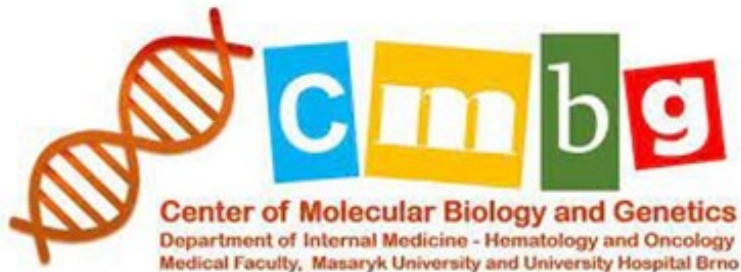


Metody molekulární cytogenetiky



Mgr. Hana Dynková Filková

Sekce cytogenomiky, Centrum molekulární biologie a genetiky, IHOK, FN Brno



Indikace k molekulárně cytogenetickému vyšetření

- Páry s poruchou reprodukce (více než rok, SA,..)
- Zátěž v rodě (VCA,...)
- Pacienti s intelektuálním postižením (neurovývojovými poruchami, vývojovými poruchami intelektu), poruchami autistického spektra, vrozenými vývojovými vadami, stigmatizací...
- Prenatální indikace z důvodu abnormálního průběhu gravidity (abnormální prenatální screening)
- Onkologická onemocnění



Cytogenetika v medicíně dnes...

V ČR jsou cytogenetické laboratoře součástí Oddělení lékařské genetiky (velké nemocnice – Praha, Brno, Olomouc, Ostrava, Plzeň, Hradec Králové, České Budějovice...)

- soukromá pracoviště (laboratoře)
- **20 – 30 cytogenetických laboratoří v ČR...**

Cytogenetická laboratoř/cytogenetická diagnostika:

- a) prenatální cytogenetika
- b) postnatální cytogenetika
- c) nádorová cytogenetika



- Lékařská genetik
- Onkologie
- Reprodukční medicína
- Pediatrie
- Kardiologie
- Patologie
- Kožní
- Neurologie
- aj

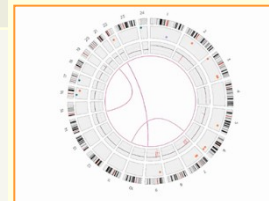
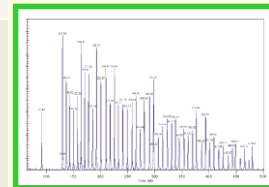
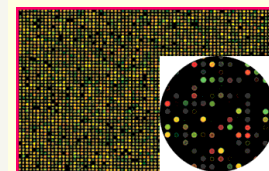
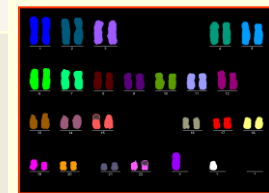
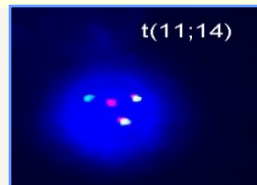
Materiál pro cytogenetické vyšetření

- periferní krev
- vzorky různých tkání (biopsie kožní)
- buňky plodové vody, choriových klků, placenty
- pupečnicková krev
- buňky kostní dřeně
- vzorky solidních nádorů

- *Izolovaná DNA*
- *Suspenze buněk (jádra interfázní či metafáze)*

I. Metody molekulární cytogenetiky

	citlivost	detekované změny	materiál	metoda
(KARYOTYP)	5-10 Mb	balancované změny nebalancované změny	suspenze buněk (metafázní chromozomy)	celogenomová metoda
FISH (fluorescenční in situ hybridizace)	cca >10 kb	balancované změny nebalancované změny	suspenze buněk (interfázní jádra, metafázní chromozomy)	cílená metoda
M FISH (mnohobarevná FISH)	5-10 Mb	balancované změny nebalancované změny	suspenze buněk (metafázní chromozomy)	celogenomová metoda
Array CGH (komparativní genomová hybridizace na čípech)	cca > 50 kb	nebalancované změny (zisky, ztráty)	izolovaná DNA	celogenomová metoda
MLPA (Multiple Ligation-dependent Probe Amplification)	> (1bp) 1kb	nebalancované změny (zisky, ztráty)	izolovaná DNA	cílená metoda - vyšetření až 50 sekvencí najednou
OGM (Optical Genome Mapping)	>500 bp	balancované změny nebalancované změny	izolovaná DNA	celogenomová metoda

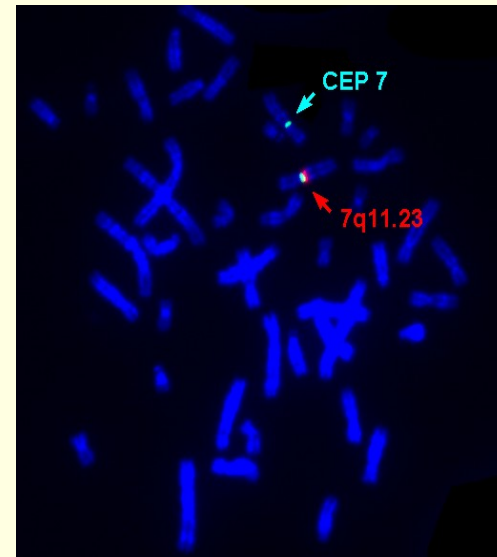
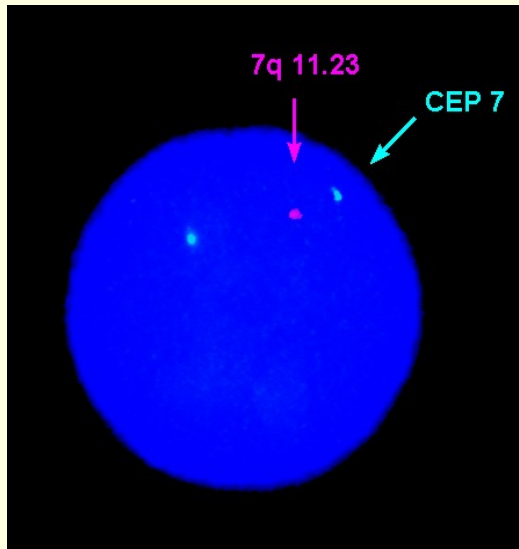


FISH = fluorescenční *in situ* hybridizace

Umožňuje detekci balancovaných i nebalancovaných změn v interfázních buňkách i v mitózách

- 1969 Parduvová a Gall - radioaktivní značení
- 1986 Pinkel a spol. - fluorescenční značení (FISH)

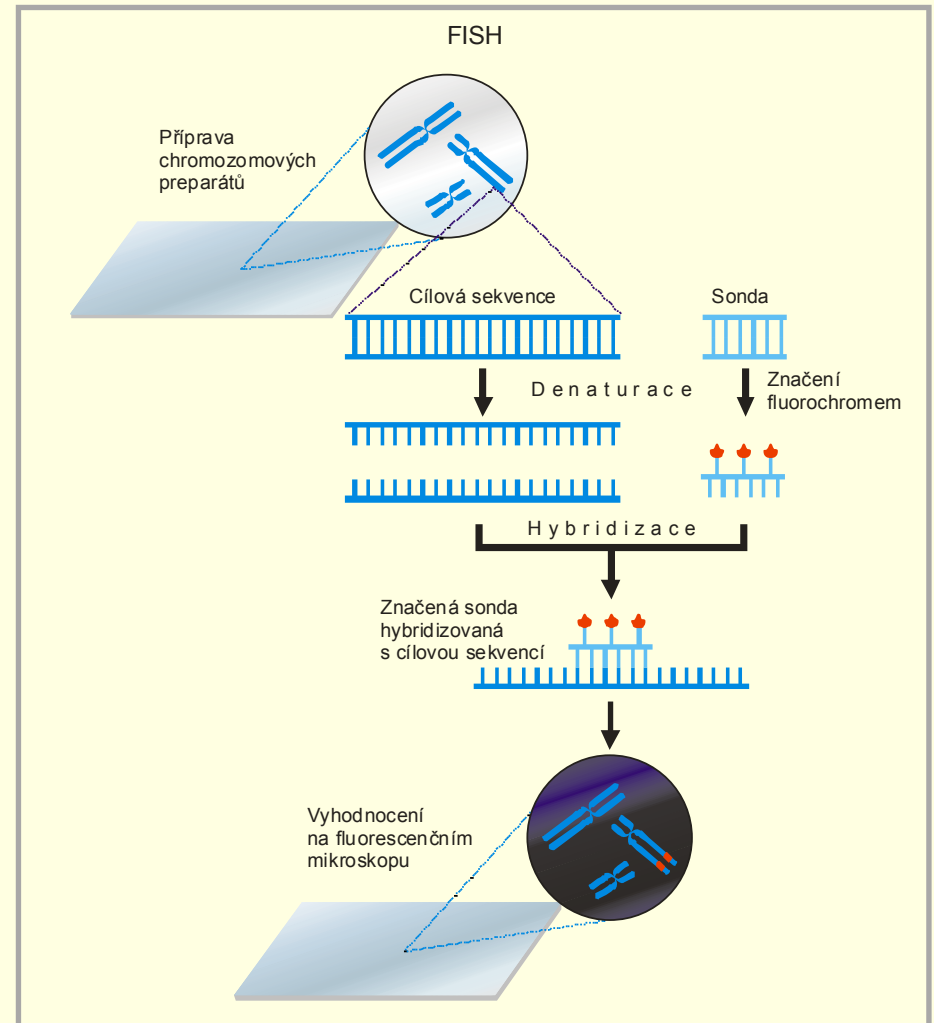
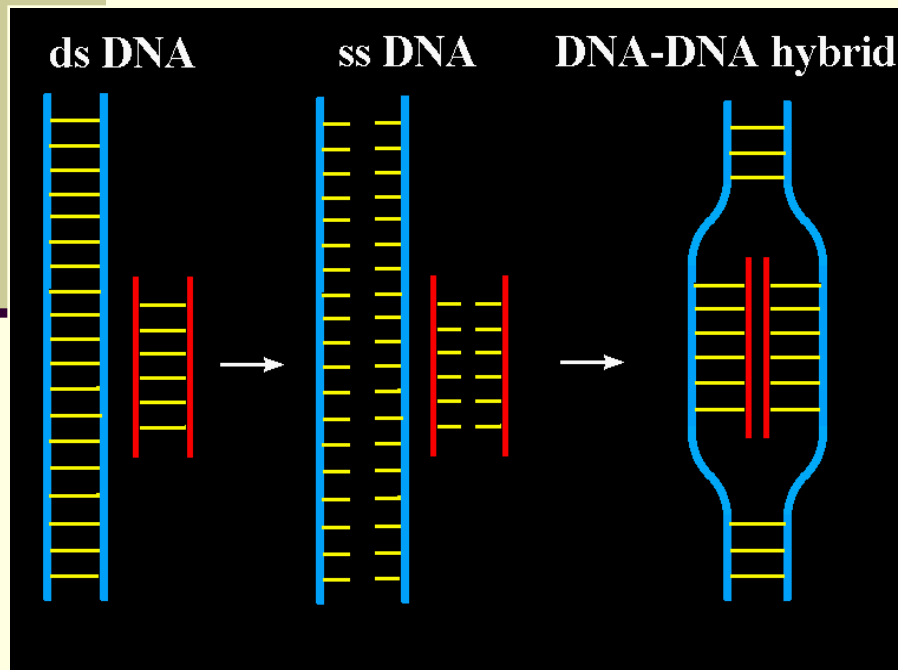
Hybridizace sondy (značené fluorescenčním barvivem) s chromozómy na cytogenetickém preparátu



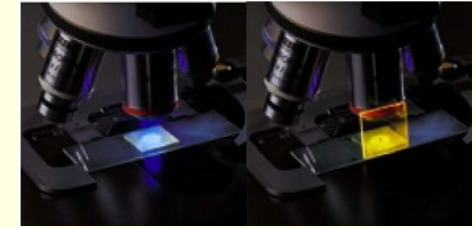
Postup FISH

Zhotovení kvalitních preparátů

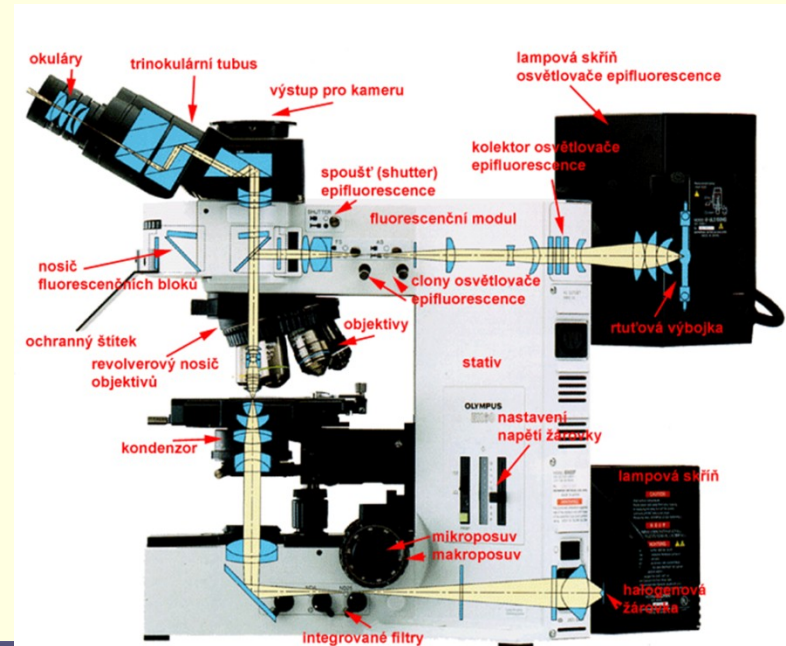
1. Denaturace sondy i cílového místa
2. Hybridizace
3. Odmytí
4. Barvení pozadí
5. Hodnocení pomocí fluorescenčního mikroskopu



FISH Vybavení



- fluorescenční mikroskop vybavený sadou fluorescenčních filtrů
- citlivá ČB kamera
- počítač a specifické programové moduly pro aplikace FISH, M-FISH



Innovative Solutions For Automated Imaging

MetaSystems

Home Applications Products News About

Reset

Next Event

- Association for Molecular Pathology 2009 Annual Meeting (10-13)
- Show more...

Products

- Karyotyping
- Fluorescence Imaging
- Automated Slide Scanning
- DNA Probe Kits
- Data Management

Search

CoolCube 1

Ikaros Karyotyping System

The karyotyping system Ikaros combines an intuitive graphic user interface with a variety of powerful tools to provide highest flexibility and ease of use. Ikaros has been developed with focus on security, speed, and quality.

Cap...
Add Capture
Object Threshold
Mask Metaphase
Create Objects
Check Objects



FISH : Typy sond

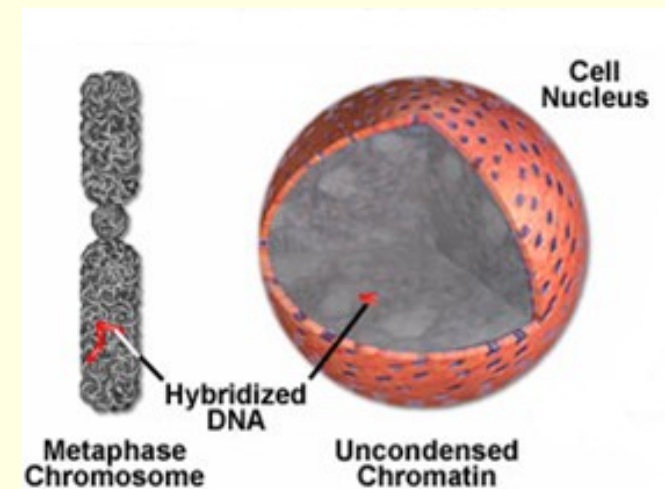
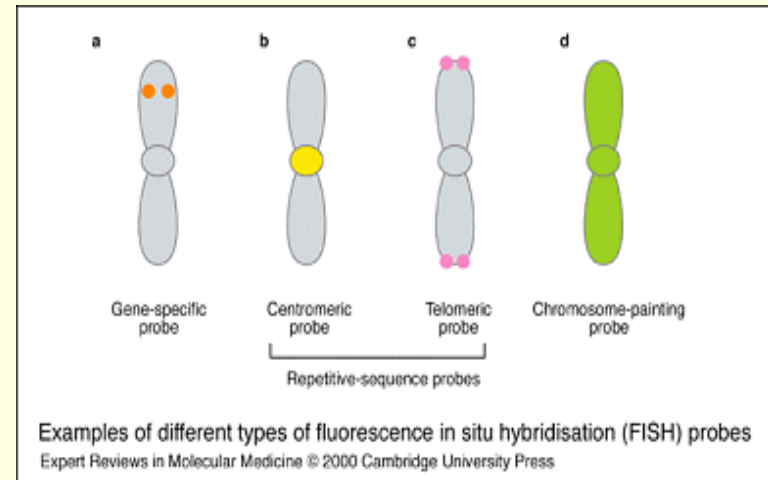
- Celochromozomové
- Centromerické
- Sondy subtelomerické
- Sondy lokus specifické

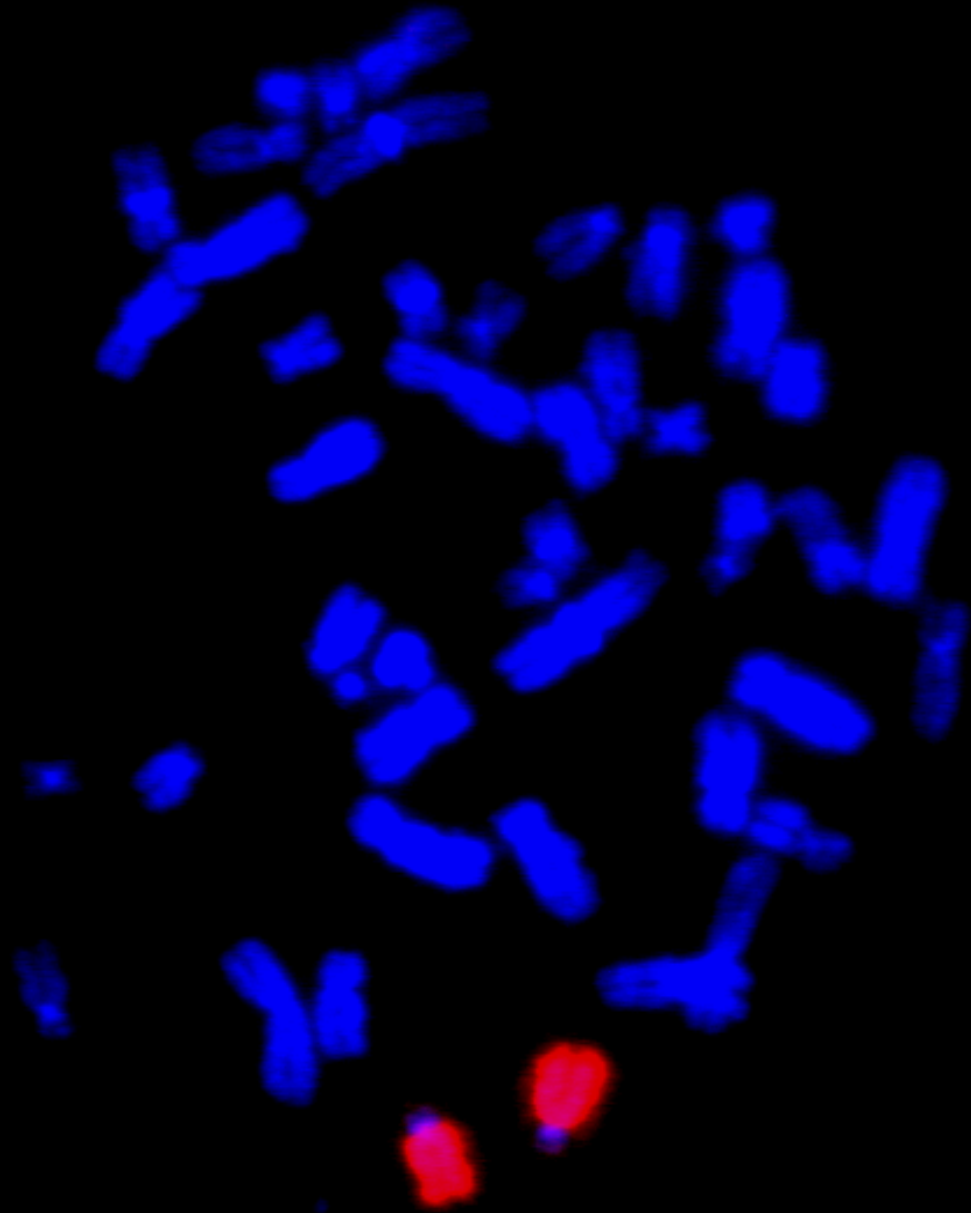
Sondy pro jedinečné sekvence:

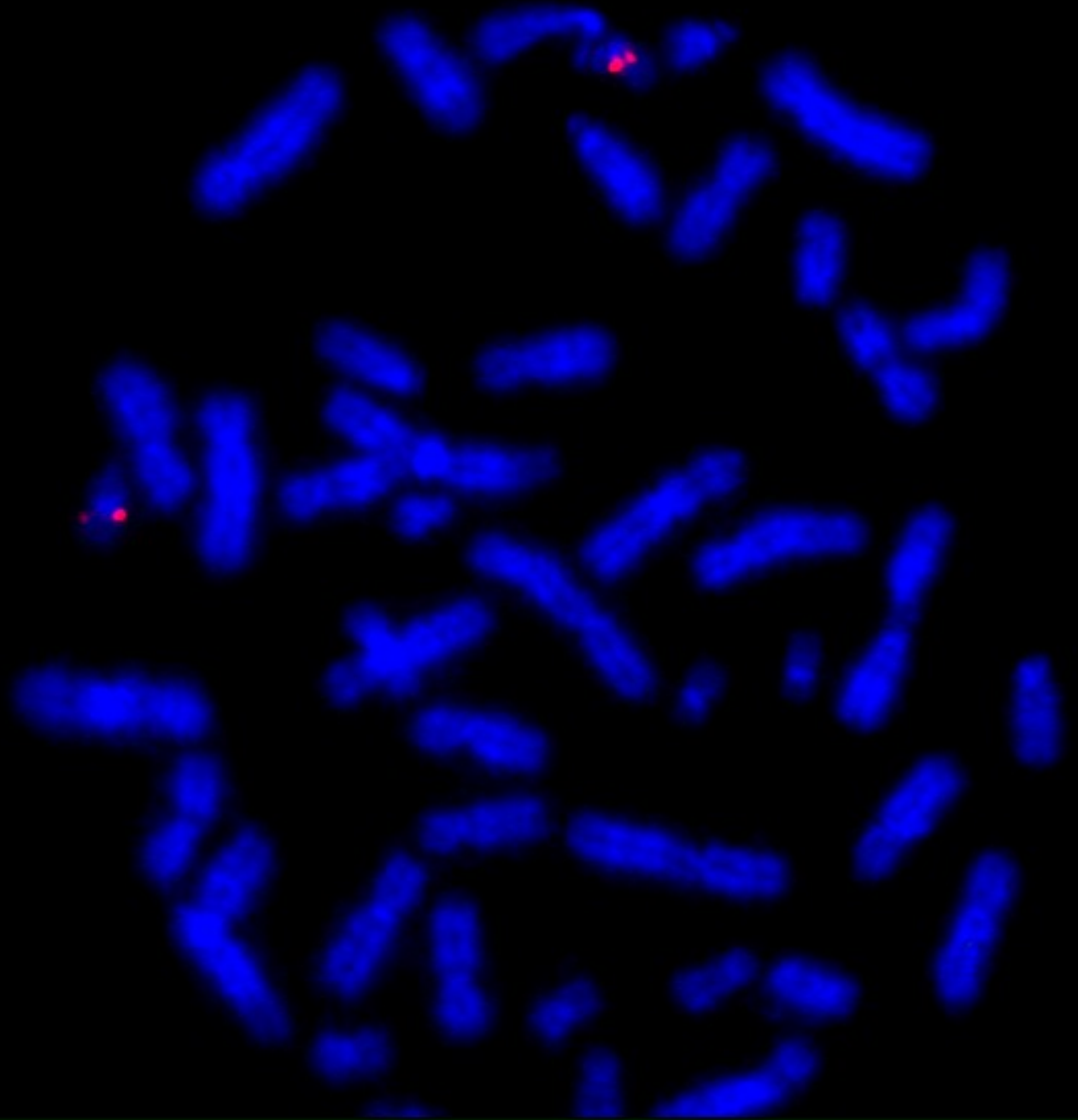
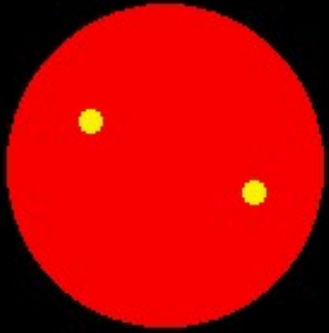
- plazmidové (500pb-5 kb)
- kosmidové (20-50 kb)
- bakteriofág lambda (8-15 kb)
- YAC klony (50-1000 kb)

Značení DNA sond

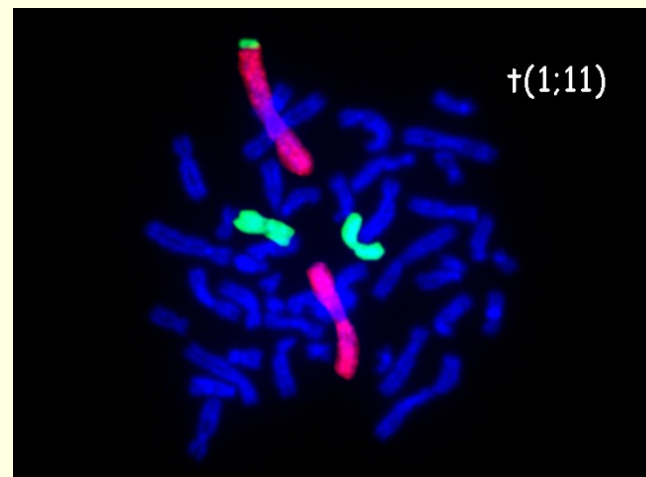
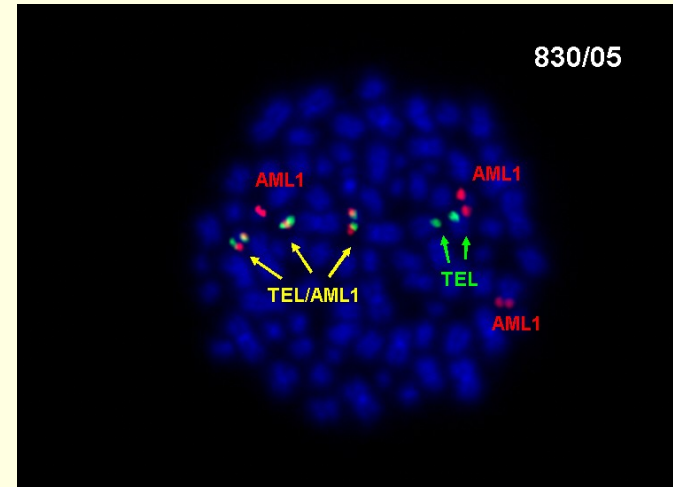
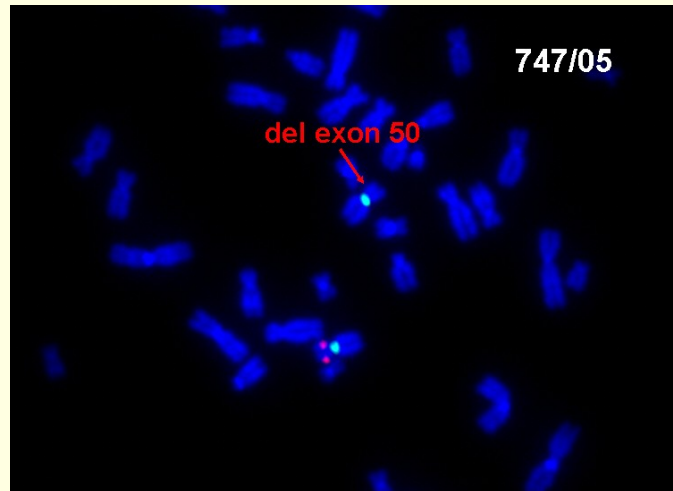
- **fluorochromy**, Texas Red, Spectrum Green, Spectrum Orange, FITC, TRITC, SpectrumAqua, SpectrumGold, aj







FISH : Přítomnost, počet a poloha signálů



Mnohobarevná FISH (M FISH)

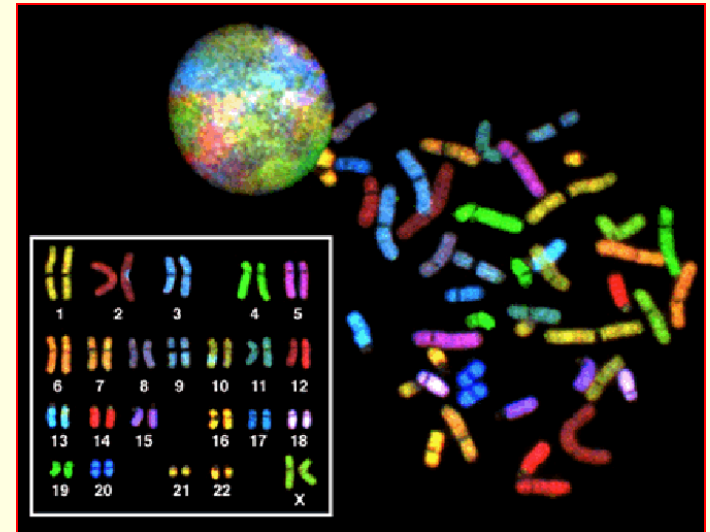
vícebarevné FISH techniky – detekce více značených sond na jednom preparátu

Speicher a kol., 1996 (M-FISH), Schröck a kol., 1996 (SKY)

Umožňuje odhalení balancovaných a nebalancovaných (i kryptických) přestaveb celého genomu v jednom kroku

Identifikace každého chromozómu pomocí jedinečné kombinace 5 fluorochromů
FITC
Rhodamin **TexasRed** **Cy5** **Cy5.5**

• referenční spektra - **pseudobarvy**, přiřazeny **každému chromozómovému páru** na základě měření vlnových délek



Nevýhody - potřeba kvalitních mitóz
- úspěšná hybridizace
- finančně nákladné

Sky Color Image - sason1-600.raw Sky Zoom View Sky Band Image - SASON-1.tif

Sky Information

Spectrum
 556

500 600 700

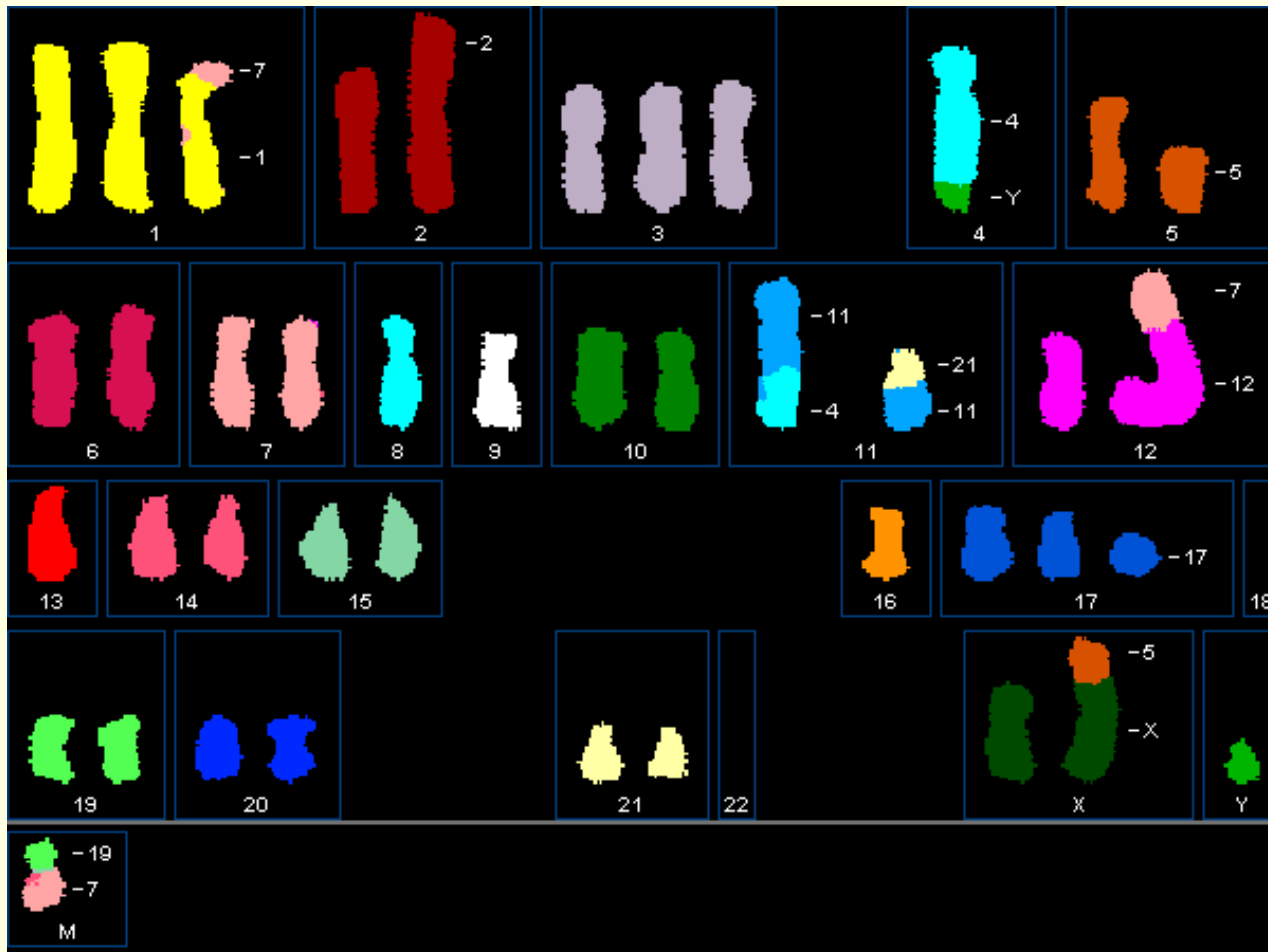
Reference: A B C D E F

Markers: a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z

Under the Cursor Normalization

For Help, press F1 0% Chromosomes: 46 Out of image 88%

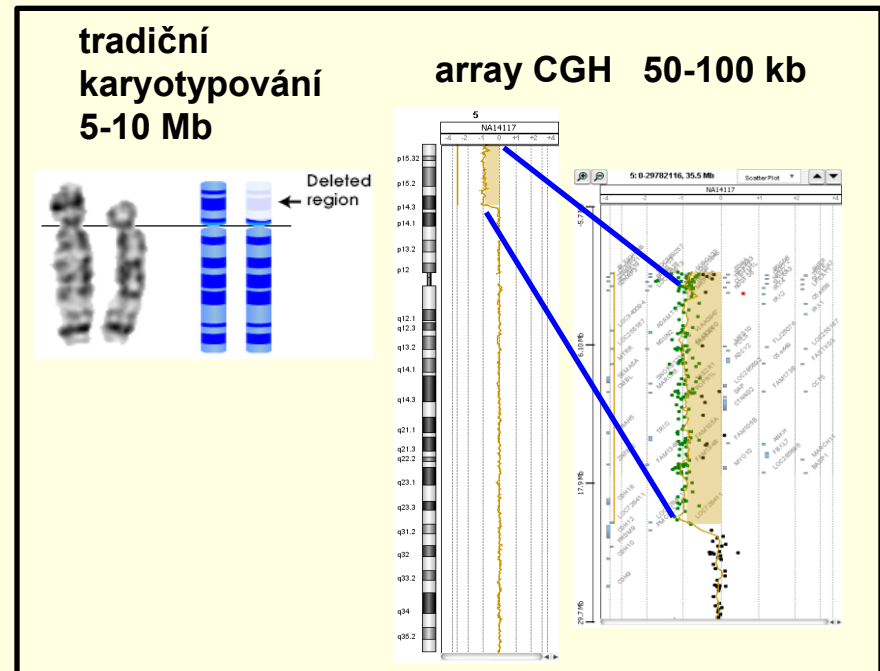
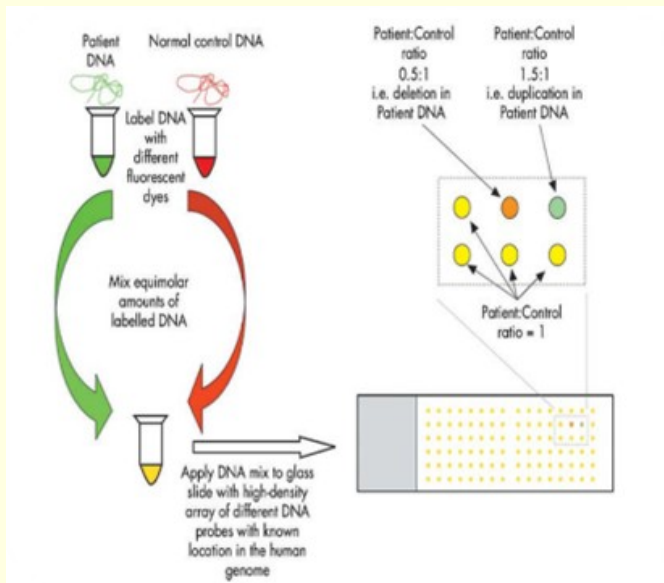
M FISH - komplexní karyotyp



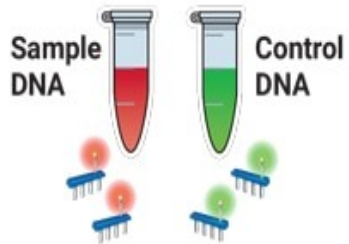
Obr. 10 (Dokumentace OLG FN Brno)

Komparativní genomová hybridizace na čipech (array-CGH)

- Efektivní metoda celogenomového screeningu nebalancovaných přestaveb chromosomů během 1 hybridizační reakce
- Založena na společné hybridizaci různě značených vzorků DNA (testované DNA a referenční DNA) na DNA mikročip pokrytý fragmenty oligonukleotidů
- Ztráta či zisk genetického materiálu v testované DNA je odečten ze spotů vykazující abnormální poměry intenzit signálů .

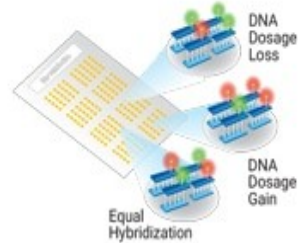


Extract & Label DNA



Extract genomic DNA from a test and a reference sample and label one with a red fluorescent dye and the other a green fluorescent dye.

Hybridize & Wash



Mix and hybridize to a microarray printed with thousands of oligonucleotide probes then wash.

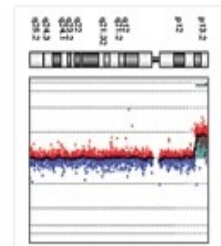
Scan



Detect red and green signals using a fluorescence scanner.

Analyze Data

CytoGenomics Software

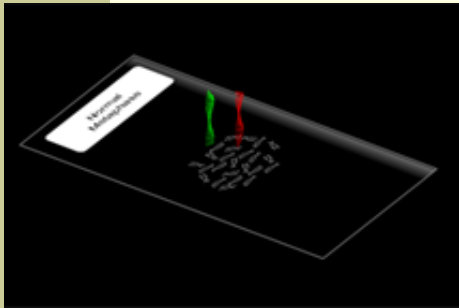


Compute and report gains or losses in the test DNA using software.

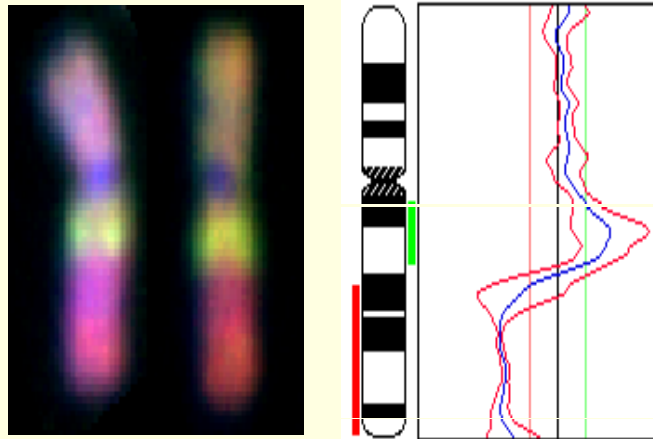


Původ metody array-CGH

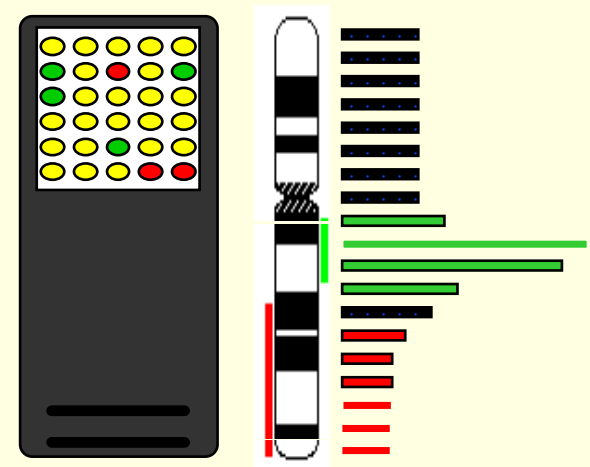
- *Solinas-Toldo a kol., 1997*
- vyhází z principu klasické (chromosomální) CGH
- nahrazení chromozomů separovanými klony (BAC, c-DNA klony, oligonukleotidy)



CGH



Array-CGH



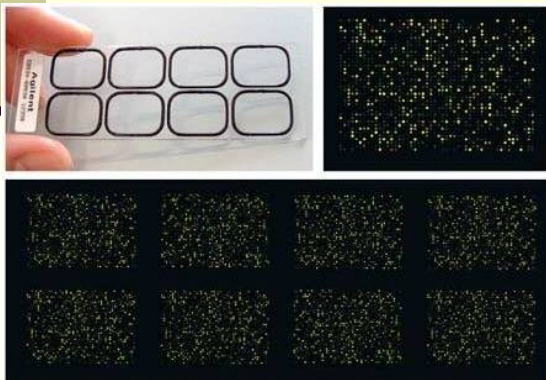
Agilent Human CGH Microarray

Oligo arrays

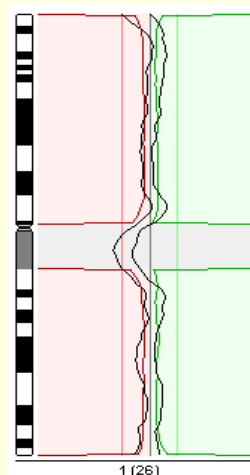
- 8x15K custom chip
- 4x44K 43 kb rozlišení
- 2x105K 21 kb rozlišení
- 1x244K 9 Kb rozlišení

Nové typy – Sure Print G3 Human

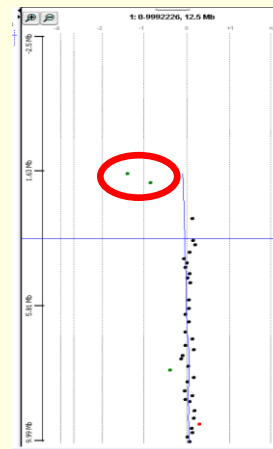
- 8x60K 41 Kb rozlišení
- 4x180K 13 Kb rozlišení
- 2x400K 5 Kb rozlišení
- 1x1M 2 Kb rozlišení



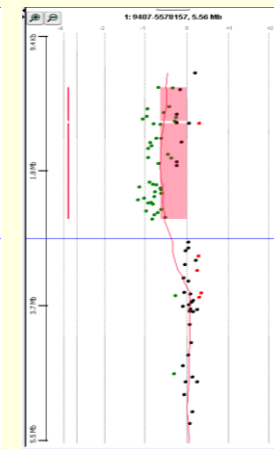
del(1)(p36), cca 3 Mb



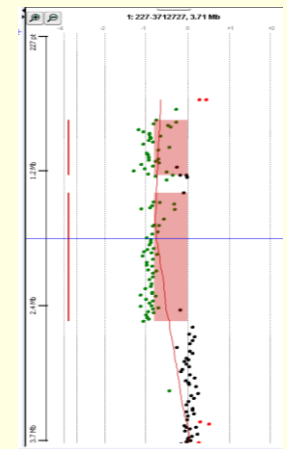
HRCGH
negativní



8x15K
negativní



4x44K
del(1)(p36)



2x105K
del(1)(p36)

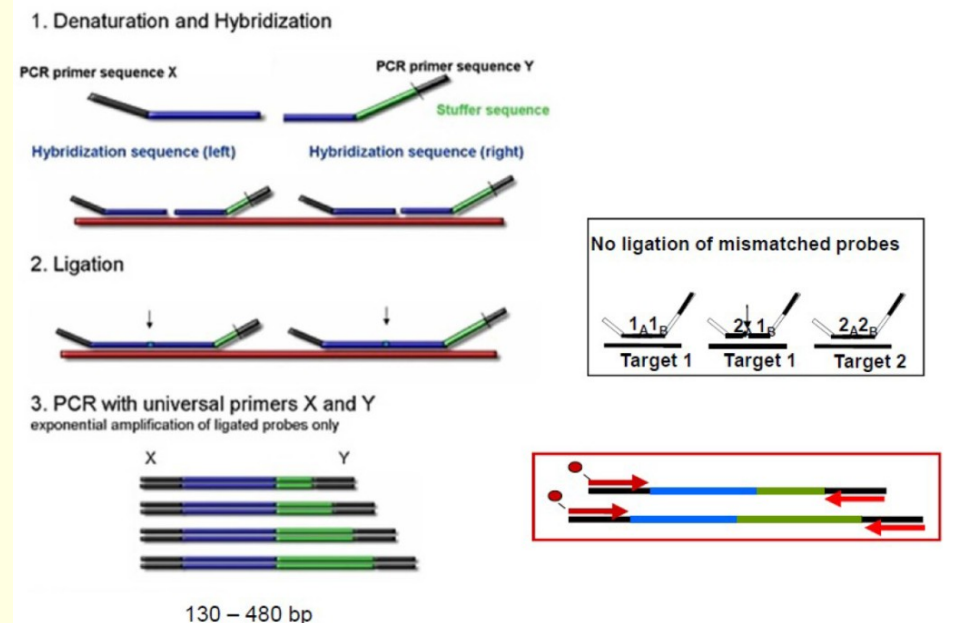
Interpretace nálezů CNVs musí probíhat vždy v kontextu s:

1. Fenotyp jedince
2. Vyšetření rodičů -> stanovení původu CNVs (de novo/zděděná CNV od rodiče s normálním/patologickým fenotypem)
3. Informace v databázích genetických variant (UCSC, DECIPHER, DGV...) a o genech v oblasti CNVs (databáze OMIM)
4. Informace v relevantní vědecké literatuře (Pubmed...)

Array CGH: ~ 1000-krát větší rozlišení nebalancovaných změn než klasická cytogenetika, ale nedokáže detekovat balancované přestavby chromozomů...!!!

Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification - MLPA

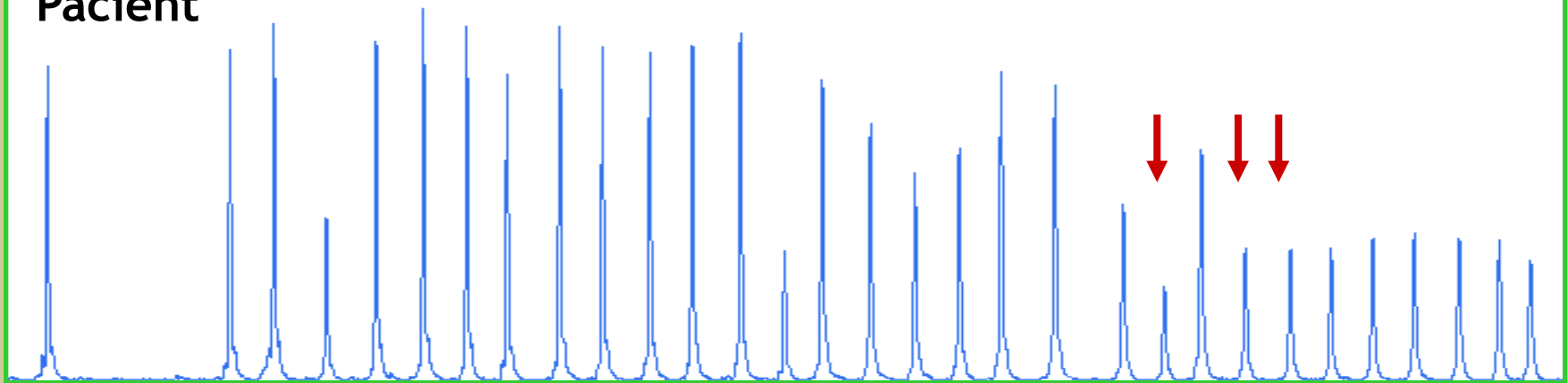
- jedná se o speciální formu multiplex PCR, při které se amplifikují MLPA sondy a ne zkoumaná DNA
- **detekuje změny počtu kopií (především rozsáhlejších delecí/duplikací) až 50 specifických sekvencí v jedné PCR reakci**
- dokáže odlišit sekvence lišící se v jediném nukleotidu;
- další aplikace – stanovení SNP, metylace v promotorové oblasti



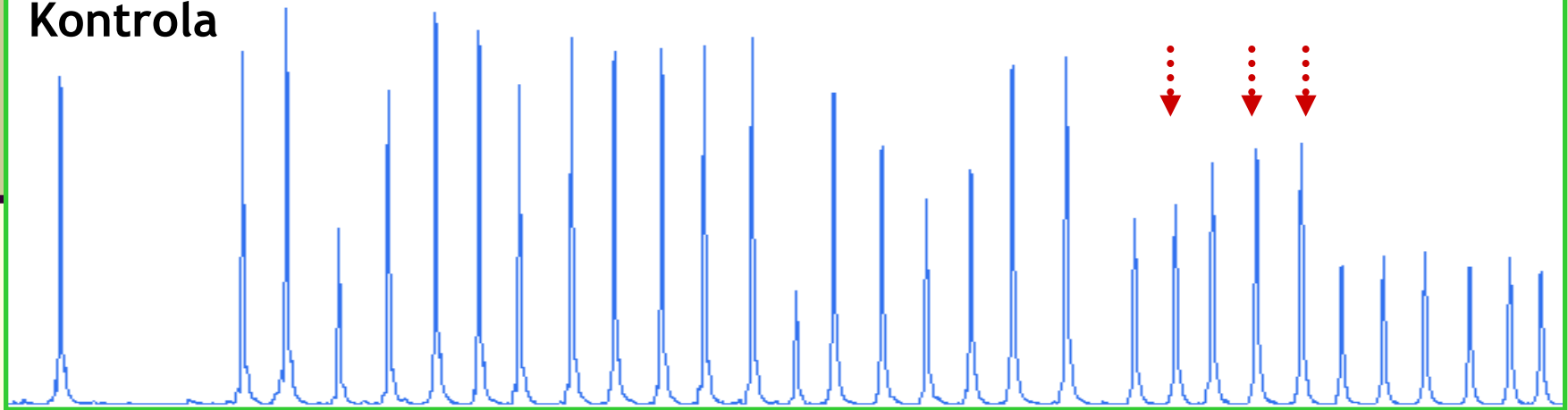
<https://files.mrcholland.com/kb/articles/22/how-does-mlpa-work.mp4>

MLPA princip

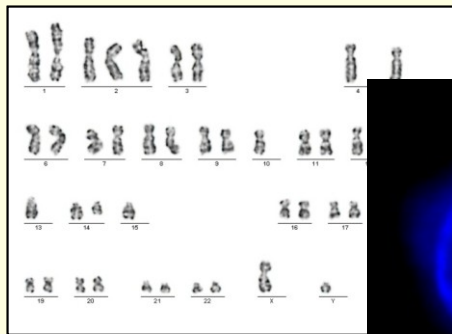
Pacient



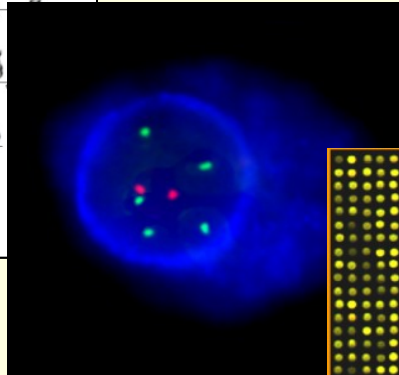
Kontrola



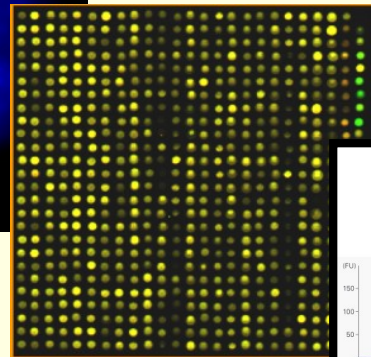
Vývoj nových cytogenetických technik pro detekci chromozomových změn



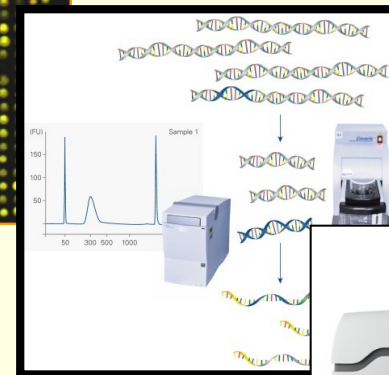
1971 G-pruhování (5 – 10 Mb)



1986 Molekulární cytogenetika
FISH (100 kb)



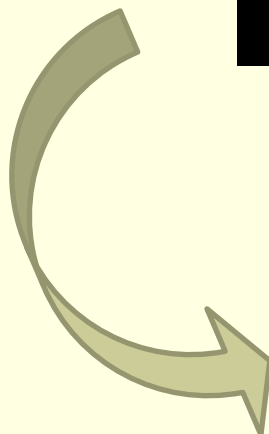
1997 array-CGH (oligo 0,06 kb)



2000 NGS

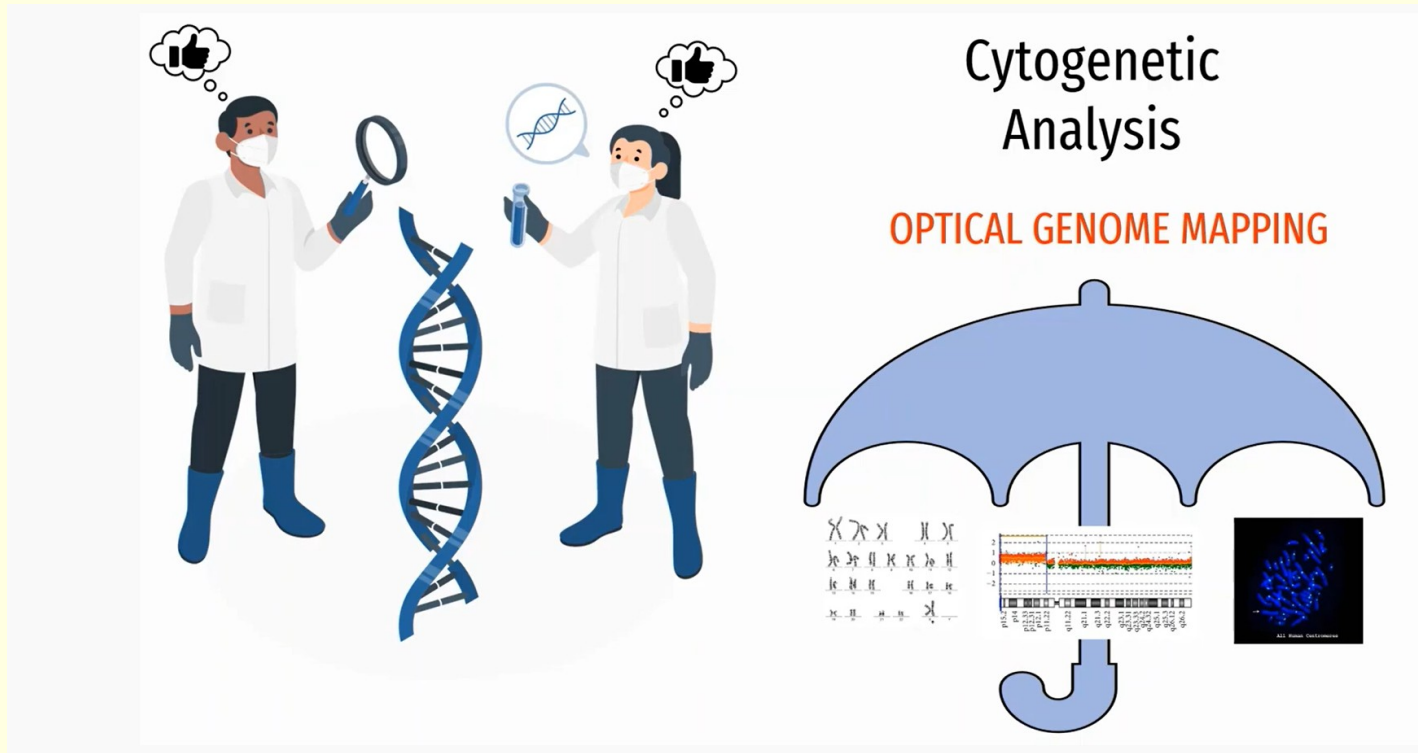


2023 Optical mapping



Od chromozomů
...k analýzám DNA

Existuje univerzální metoda, která by nahradila vše?



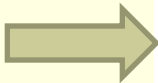
<https://bionano.com/videos/saphyr-ogm-technology-overview-video/>

Optical mapping for clinical structural variant detection

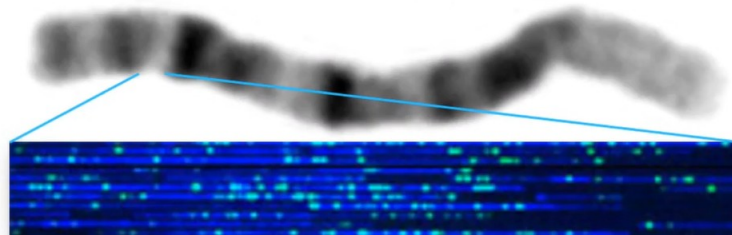
Alexander Hoischen

Associate Professor Genomic Technologies & Immuno-Genomics
Scientific Director Radboud Genomics Technology Center

Departments of Human Genetics and Internal Medicine
Radboud University Medical Center,
Nijmegen, The Netherlands

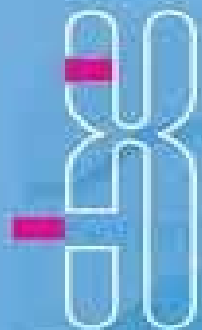


Next generation cytogenetics

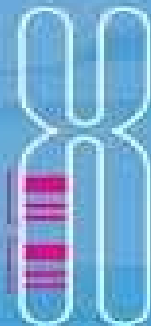


Cytogenetics with 500,000 'bands' i.e. labels ~10,000 improved sensitivity!

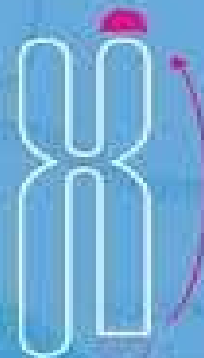
- Genomewide analysis
- Positional information
- Single molecule resolution



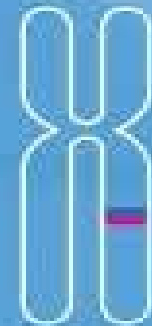
Deletions



Duplications

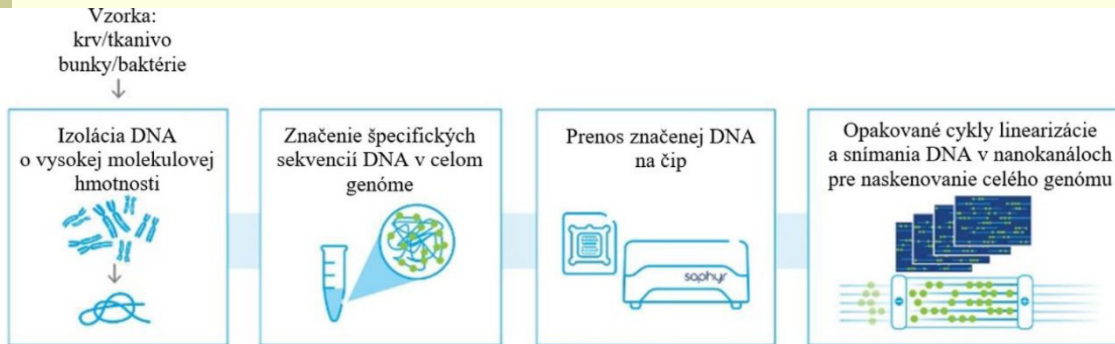


Translocations



Inversions

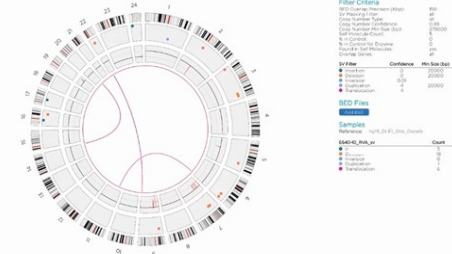
Optické mapování genomu - postup



Efektívne snímanie molekúl DNA o dĺžke niekoľko megabáz s vysokým rozlíšením



Visualize and Manipulate Maps and Structural Variants



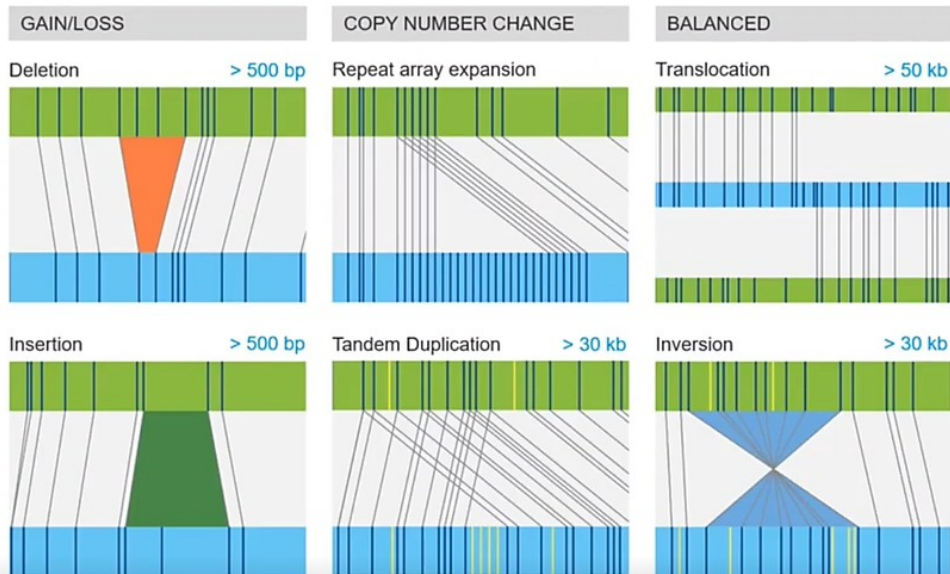
Bionano Genomics (<https://bionanogenomics.com/technology/platform-technology/>)

Detekce chromozomových aberací pomocí optického mapování

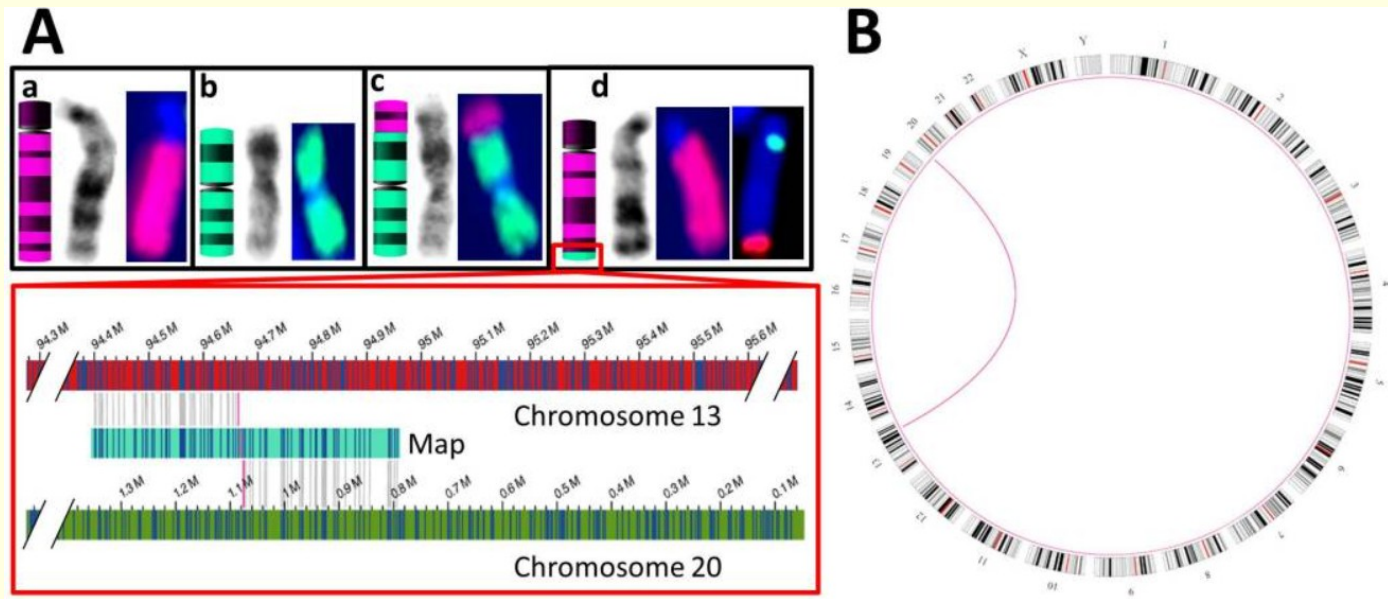
Structural variant calling by optical mapping

reference

vzorek



OGM - příklad translokace (13;20)(q32;p13)



VÝSLEDKY

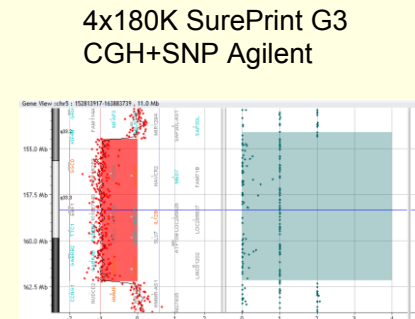
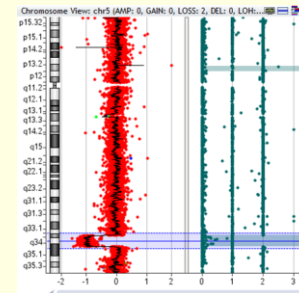
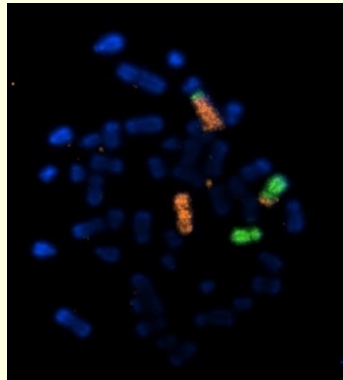
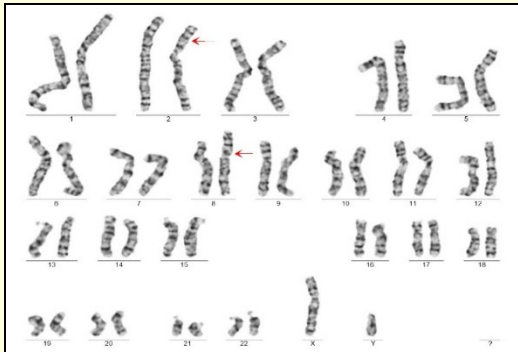
Pacienti s definovanou strukturní změnou – Proband 3

- kluk, nar. 2021, symptomatická epilepsie a epileptický syndrom, febrilný status epilepticus
- rodiče zdraví nepříbuzní

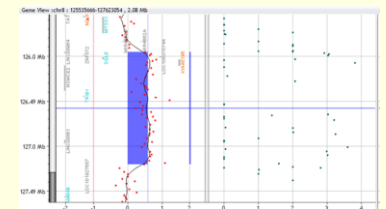
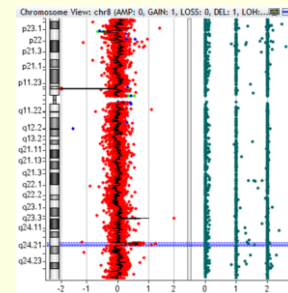
Karyotyp: 46,XY,t(5;8)(q31;q13)

FISH: t(5;8)

aCGH: del(5)(q33.2q34) - GABA receptory
dup(8)(q24.13)



del(5)(q33.2q34) - GABA receptory



dup(8)(q24.13)

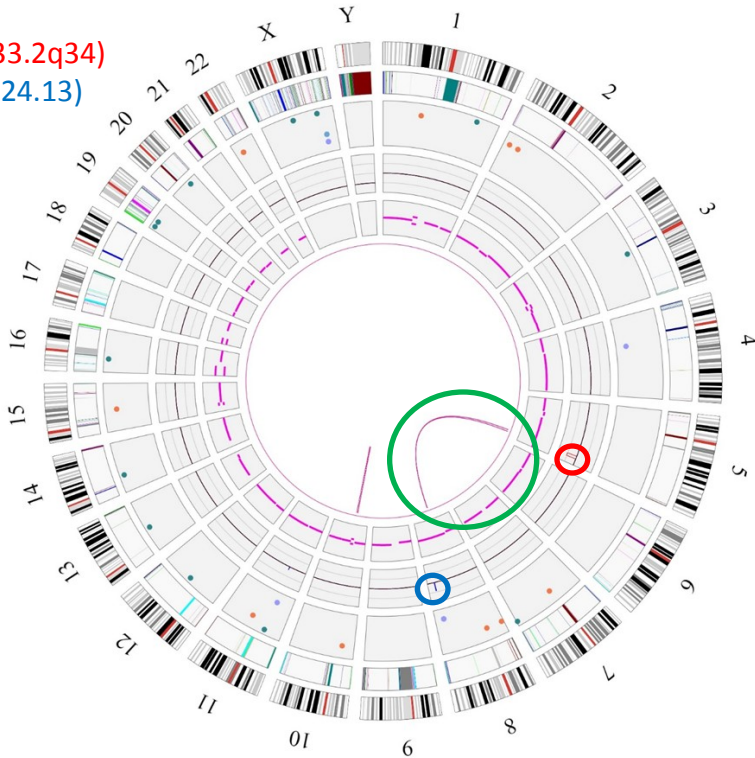
VÝSLEDKY

Proband 3

t(5;8)

del(5)(q33.2q34)

dup(8)(q24.13)



Name: O4 De novo
Sample: O4
Reference: hg19_DLE1_Okb_Olabels.cmap

SV Filters	
Feature SV Overlap Precision (Kbp):	12
SV Masking Filter:	non masked
VAF Filter:	0-1
Self Molecule Count:	0
% in Control Database:	0
% in Control Database for Enzyme:	2
SV Chimeric Score:	all
Found in Self Molecules:	yes
Overlap Genes:	all

CNV Filters	
Feature CNV Overlap Precision (Kbp):	500
Copy Number Type:	all
Copy Number Confidence:	0.99
Copy Number Min Size (bp):	250 000
Copy Number Masking Filter:	all

Aneuploidy Filters	
Aneuploidy Type:	all
Aneuploidy Confidence:	0.95

AOH/LOH Filters	
AOH/LOH Minimum Size (bp):	25 000 000

SV Filter	Confidence	Min Size (bp)
● Insertion	0	
● Deletion	0	
● Inversion	0.7	
● Duplication	-1	
● Intra-Fusion	0.05	
● Inter-Translocation	0.05	

Feature File: cnv_mask.bed SV CNV Action
[Add Feature](#)

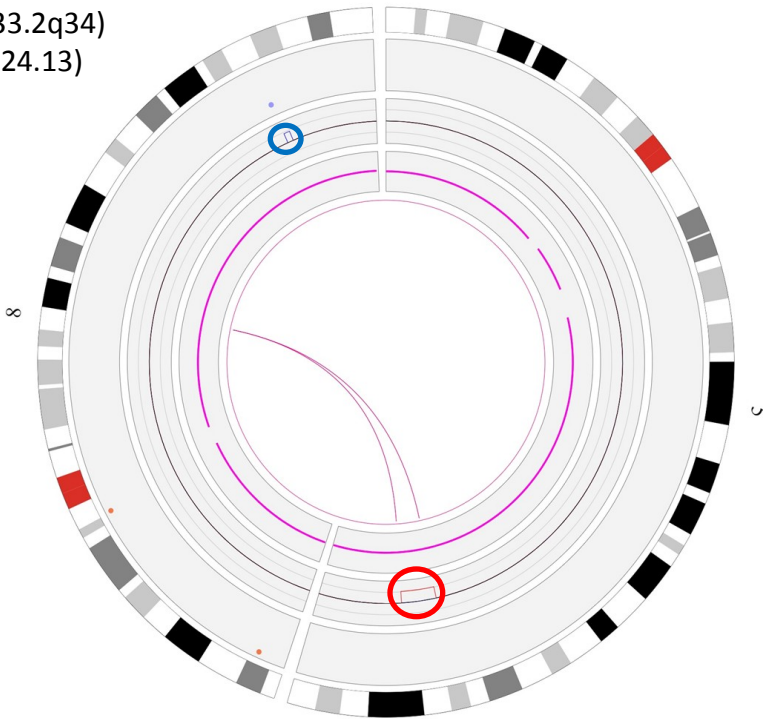
Category	Count
● Insertion	15
● Deletion	11
● Inversion	2
● Duplication	6
● Intra-Fusion	2
● Inter-Translocation	4
● AOH/LOH Region	0
● CNV Gain Segment	2
● CNV Loss Segment	1
● Aneuploidy Gain	0
● Aneuploidy Loss	0

Circos Tracks (start from outer rings)
Cytoband
cnv_mask.bed Feature
SV track
CNV track
VAF segments
Translocations

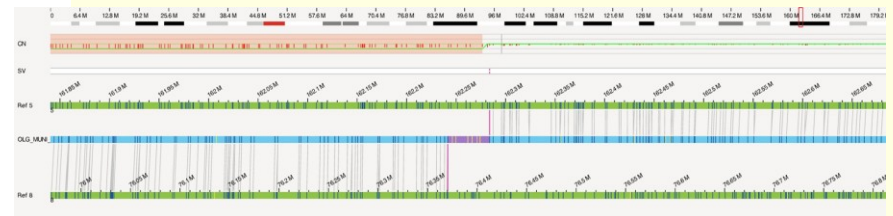
VÝSLEDKY

Proband 3

t(5;8)
del(5)(q33.2q34)
dup(8)(q24.13)



t(5;8); del(5)(q33.2q34)



ogm[GRCh37]t(5;8)(q34;q21.11)(154,464,548~162,283,811;76,370,347~76,382,253)
ogm[GRCh37] 5q33.2q34(154464548_162276558)x1

dup(8)(q24.13)



ogm[GRCh37] 8q24.13(125936927_127239385)x3

II. Využití metod molekulární cytogenetiky v klinické genetice dle typu aberací

Detekce numerických změn: **aneuploidie** (monozomie, trizomie,...)

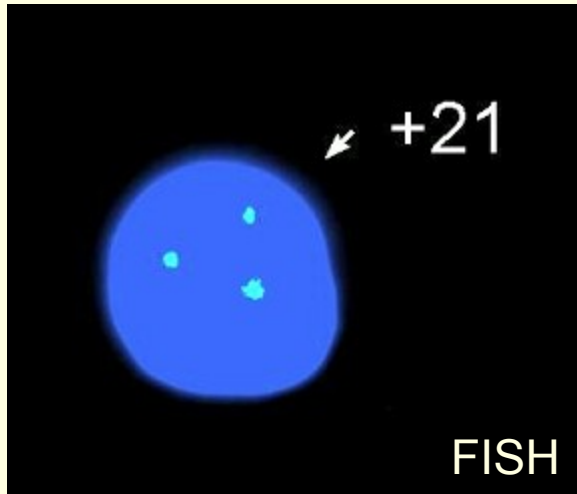
Detekce strukturních změn:

- **balancované**: inverze, reciproké translokace, robertson. translokace,...
- **nebalancované**:
 - Mikrodelece (mikrodeleční/mikroduplikační syndromy, CNV,..)
 - Subtelomerické přestavby
 - Nebalancované translokace
 - Marker chromozomy
 - Izochromozom; ring chromozomy,...

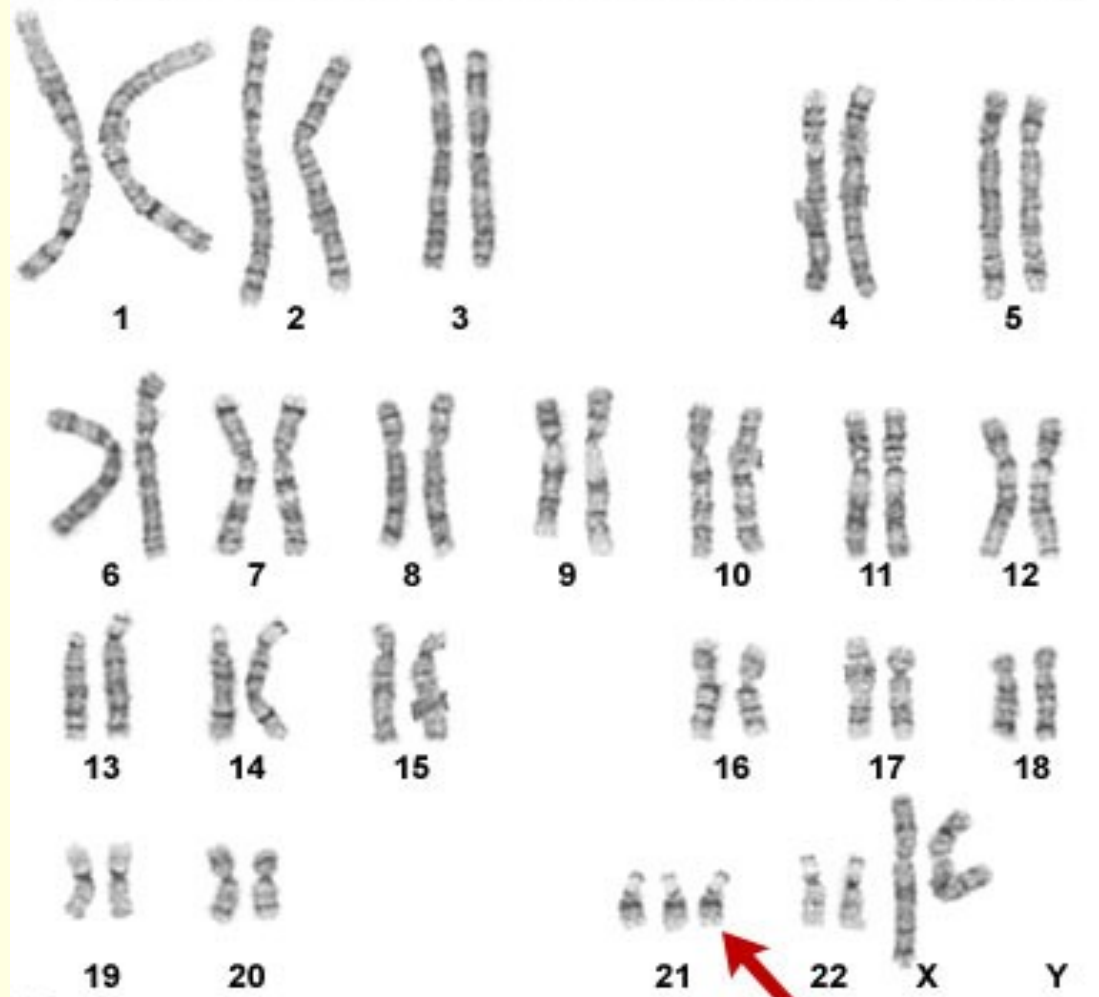
Detekce LOH, UPD

Využití metod molekulární cytogenetiky (příklady)

numerické změny: Downův syndrom 47,XX/XY,+21



Karyotype from a female with Down syndrome (47,XX,+21)



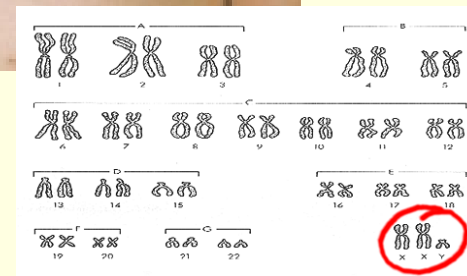
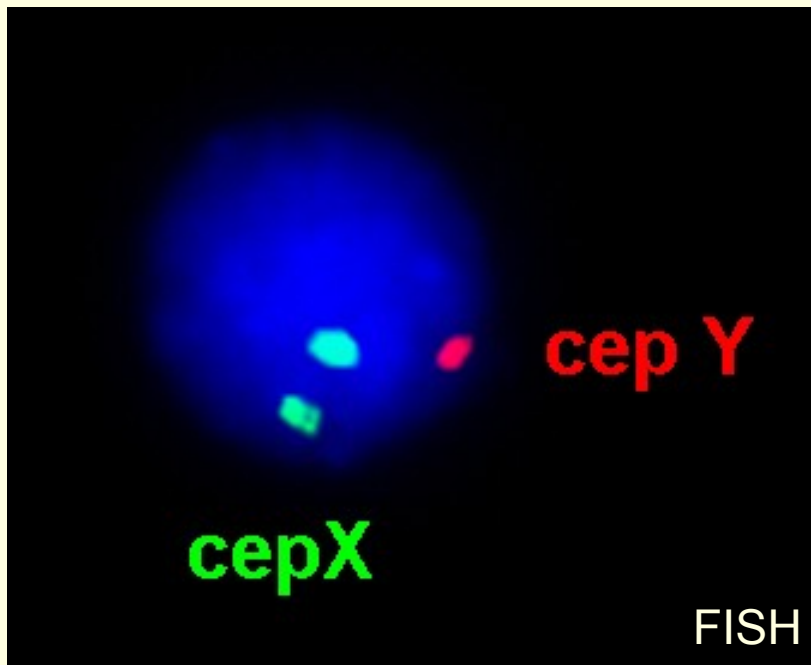


Využití metod molekulární cytogenetiky

(příklady)

numerické změny: Klinefelterův syndrom

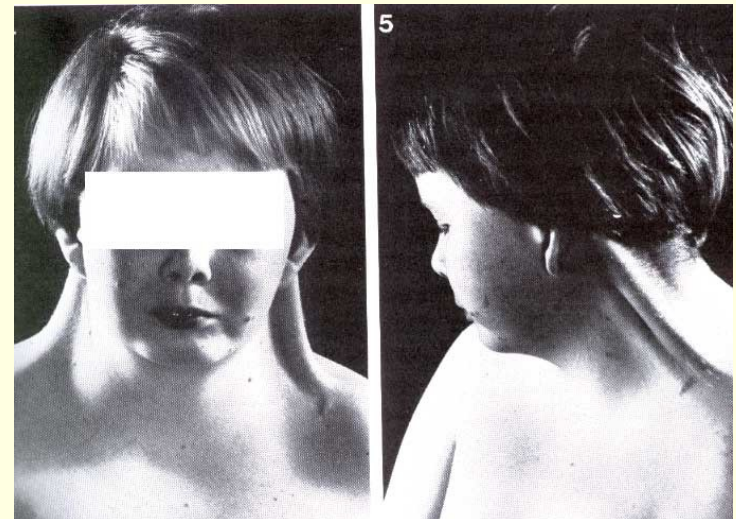
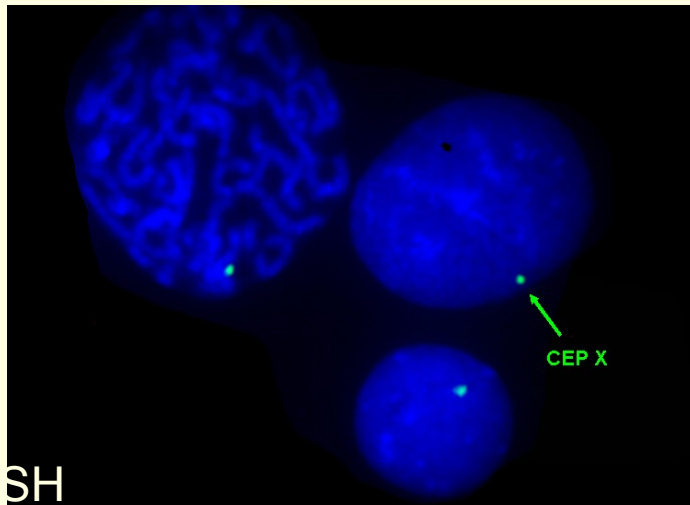
- **47,XXY**
- vysoká postava, porucha růstu vousů, ženská distribuce podkožního tuku, PMR



Využití metod molekulární cytogenetiky (příklady)

numerické změny: Turnerův syndrom

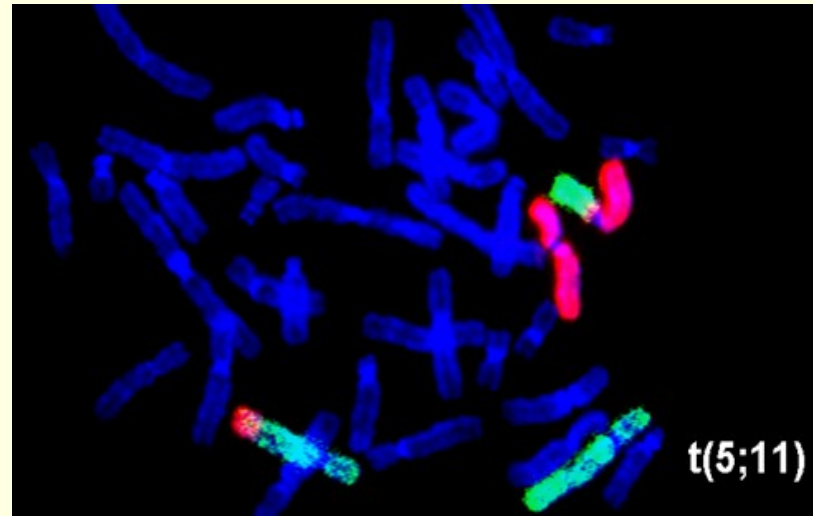
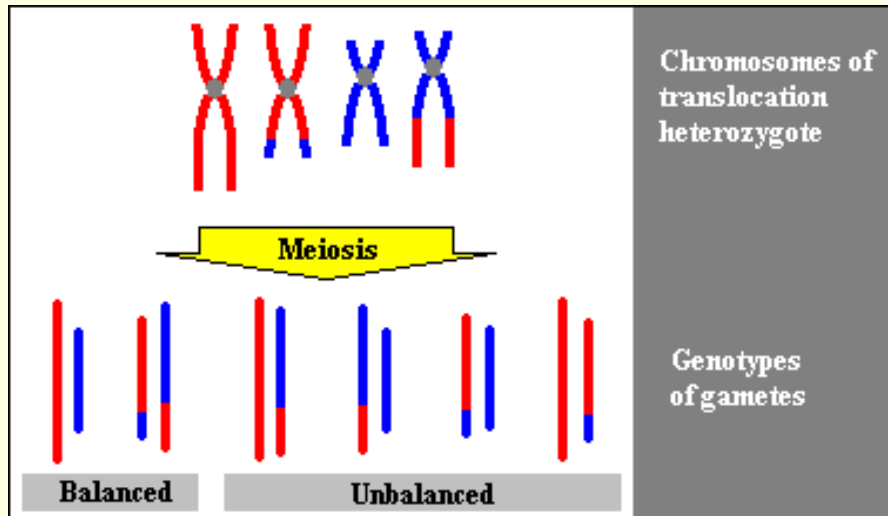
- **45,X**
- chybí jeden chromozom X
- 1/2500 dívek
- 95 % SA
- malá postava, chybí vaječníky až sterilita



Využití metod molekulární cytogenetiky

strukturní změny: balancované translokace

- výskyt v populaci s četností asi 1 : 500
- neovlivňují jednoznačně fenotyp nositele (5 x vyšší výskyt v populaci mentálně retardovaných pacientů)
- významná příčina sterilit u přenašečů
- v důsledku aberantní meiotické segregace vznik gamet s nebalancovanými přestavbami (duplikace, delece)
- **Metoda FISH, karyotyp**



Kazuistika

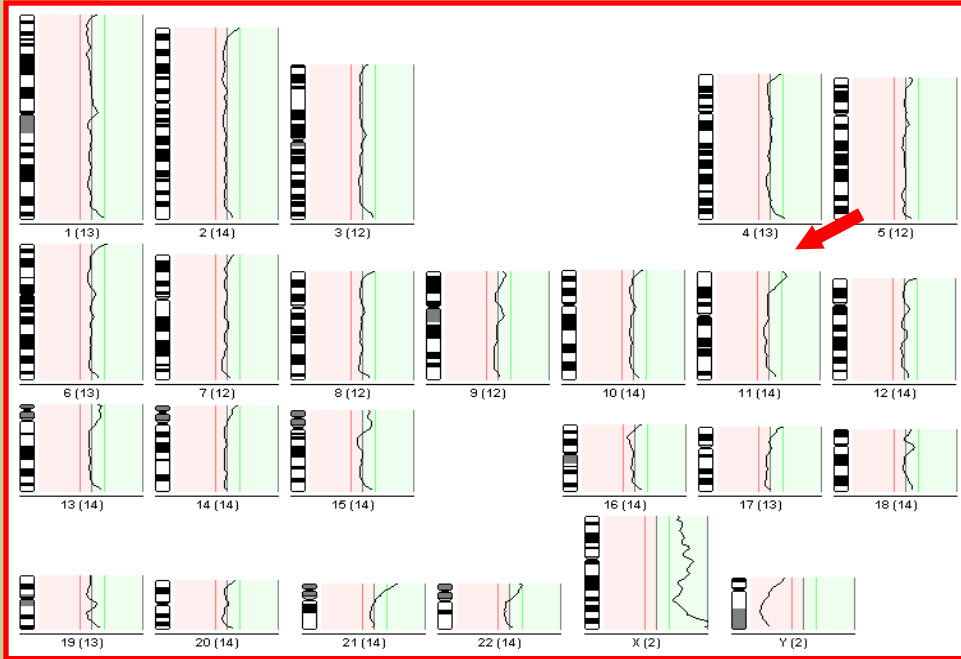
- děvče, rok narození 2002
- dg: stigmata - mongoloidní postavení očí, hyperplastická gingivální sliznice, soudkovitý hrudník, velké rozlité břicho
- matka 46,XX, inv(9), otec 46,XY,add(1)[87]/46,XY[13]



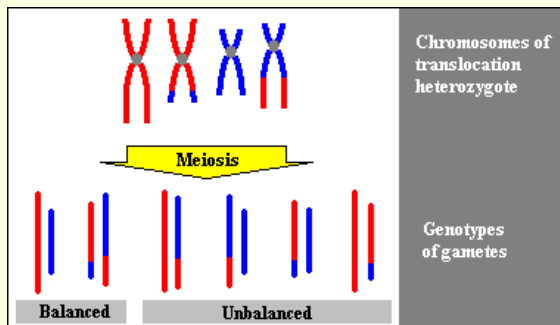
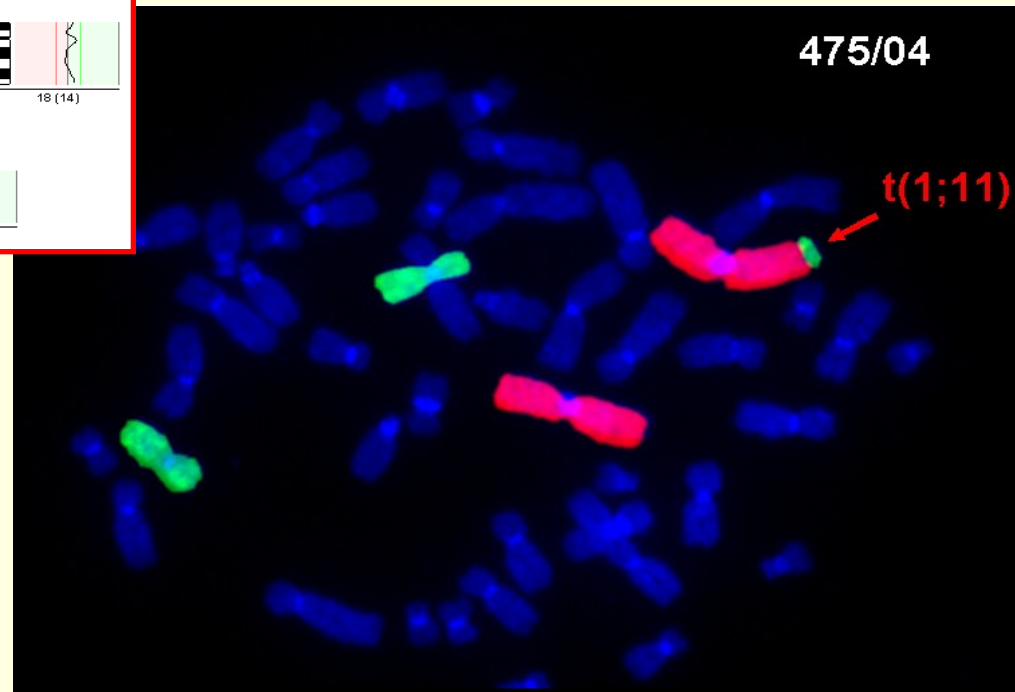
46,XX,add(1)

Kazuistika

CGH: rev ish enh (11p15-pter) - nebalancovaná translokace



FISH: der(1)t(1;11)



Využití metod molekulární cytogenetiky

strukturní změny: Mikrodeleční syndromy

- skupina geneticky podmíněných chorob, jejichž příčinou jsou drobné mikrotelece DNA segmentů (2-4 Mb), které nejsou detekovatelné klasickými cytogenetickými metodami
- pacienti mají *specifické klinické příznaky*...dříve popis dle fenotypu („*phenotype first*“ ...)
- nyní přístup „*genotype first*“ ...nejprve nález, srovnání velikosti, genů – vliv na fenotyp
- **rekurentní** - vznikají opakovaně ve stejném místě na chromozomu ...např. del 22q11
- **nerekurentní** - mohou vzniknout kdekoliv v genomu ...

Mikrodeleční syndromy

Jsou způsobeny mikrodelecí úseku chromozomu – většinou 2 – 4 Mb

Nejčastější rekurentní mikrodeleční syndromy:

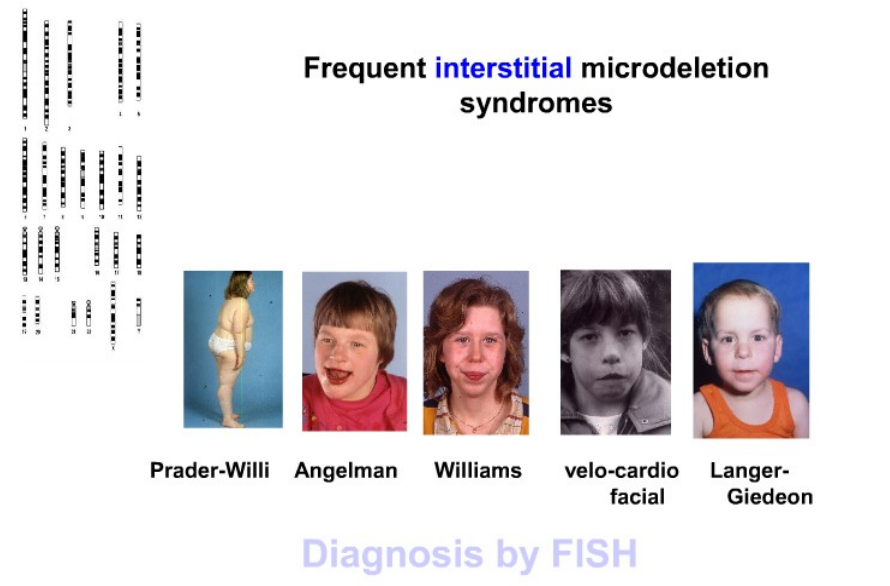
DiGeorgeův/Velokardiofaciální syndrom

Prader-Williho a Angelmanův syndrom

Williamsův-Beurenův syndrom

Obecné příznaky:

- růstová retardace
- dysmorfismus
- stigmata
- mentální retardace
- malformace
- vrozené vady

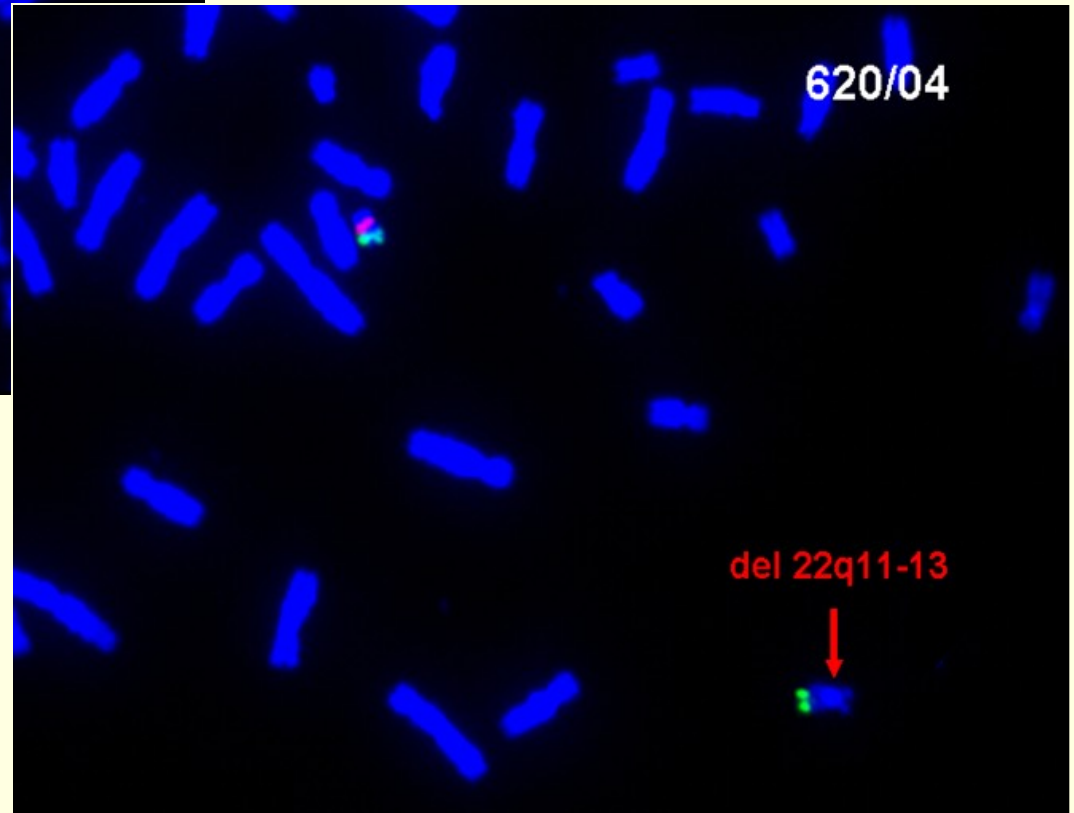
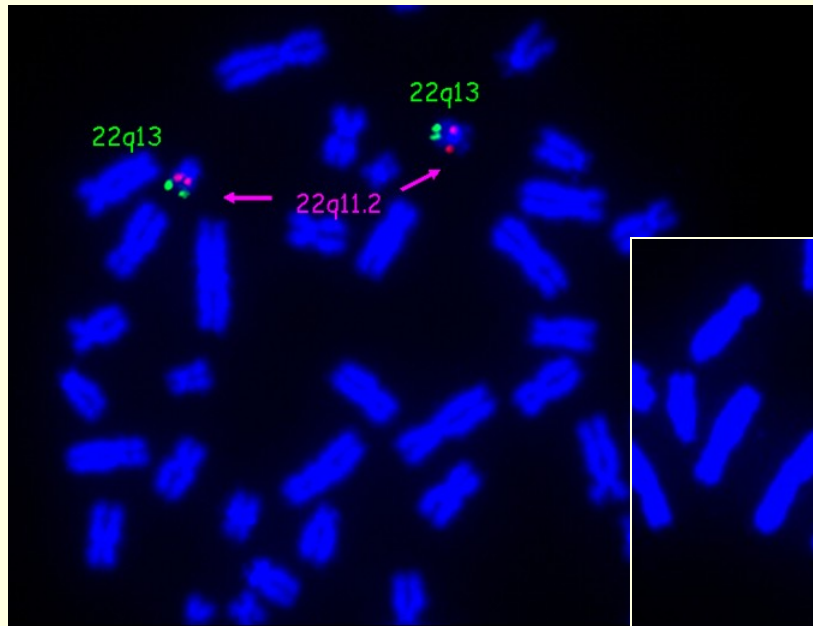


Mikrodeleční syndrom	Lokalizace	Nejčastější velikost přestavby [kb]	Četnost v populaci
DiGeorgeův syndrom/ Velokardiofaciální syndrom	22q11	3 000	1:4 000
Williamsův-Beurenův syndrom	7p11.23	2 000	1:10 000
Smith-Magenisův syndrom	17p11.2	5 000	1:25 000
Prader-Williho syndrom/ Angelmanův syndrom	15q11-q13	4 000	1:25 000

Využití metod molekulární cytogenetiky

FISH: detekce mikrodelečních syndromů

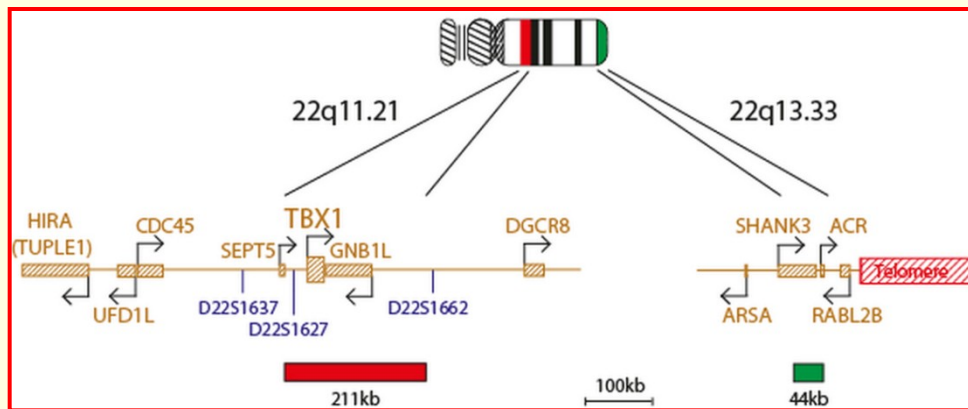
– např. del 22q11 **DiGeorge syndrom**



- SRDEČNÍ VADY
- ANOMÁLIE TVÁŘE
- PORUCHY IMUNITY

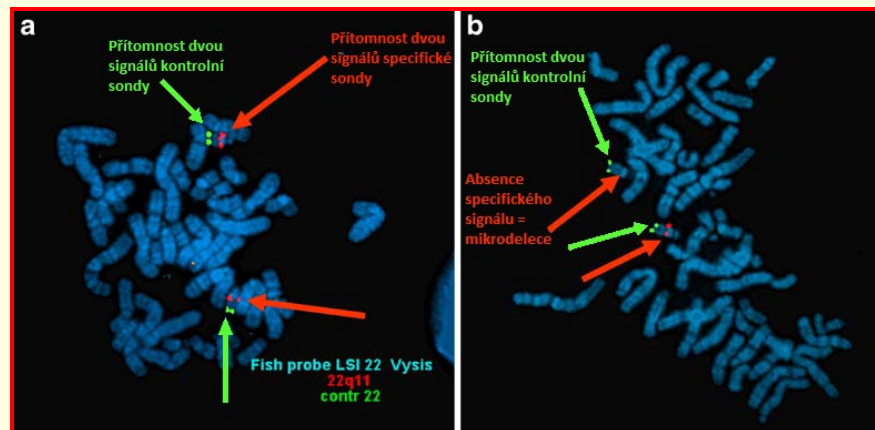
Využití metod molekulární cytogenetiky

FISH: DiGeorge syndrom del 22q11



Obrázek: Příklad komerčně dostupných sond pro detekci mikrodelece 22q11 (www.cytocell.co.uk)

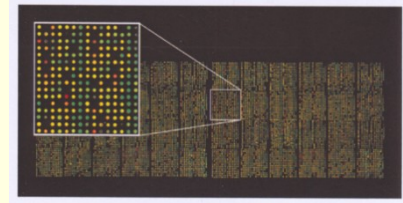
Dvoubarevná FISH



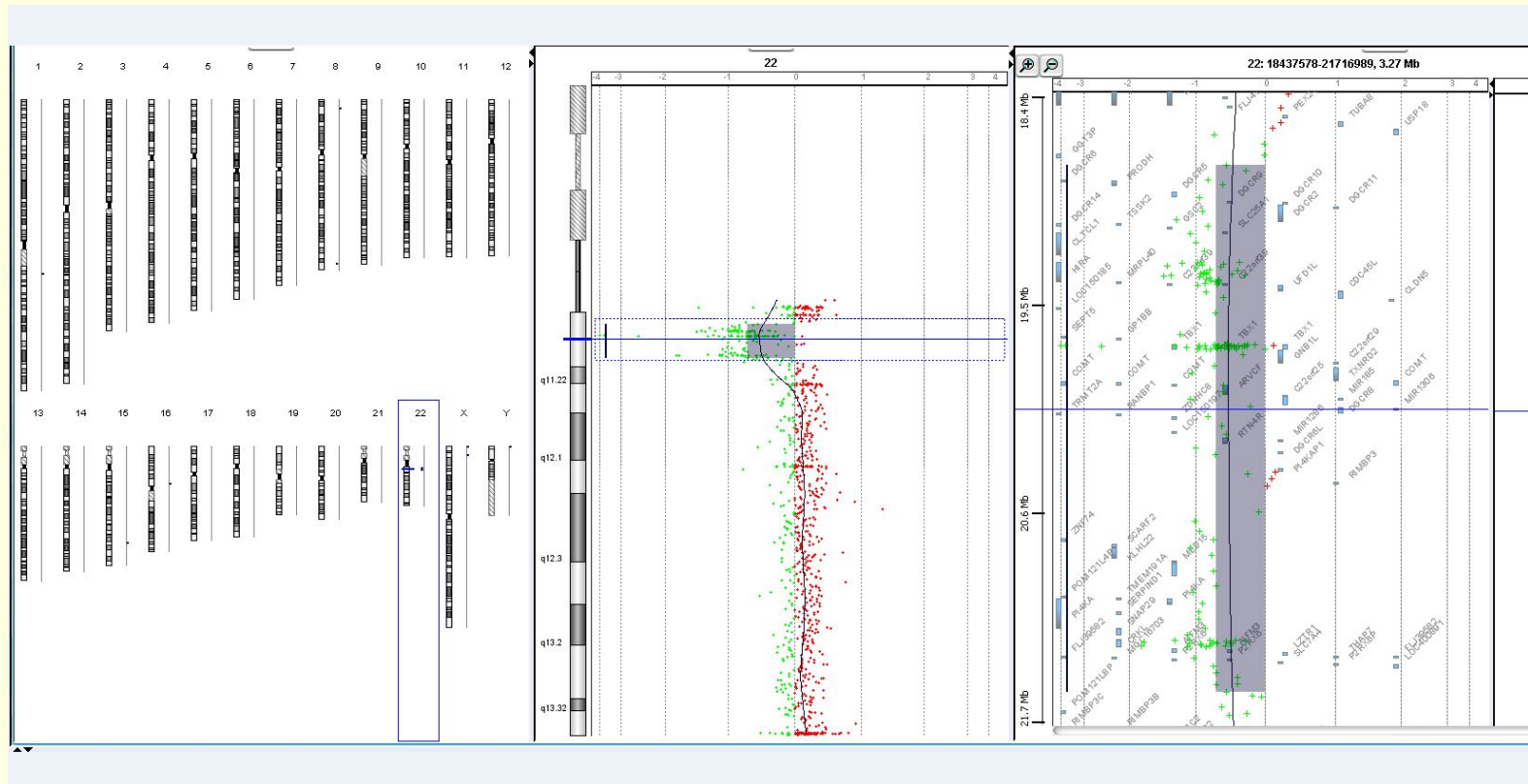
Obrázek: Ukázka normální mitózy a mitózy s mikrodelecí 22q11 vyšetřená pomocí techniky FISH (de Ravel *et al.*, 2007; upraveno)

Využití metod molekulární cytogenetiky

Array CGH: DiGeorge syndrom del 22q11



Pomocí DNA čipů zjistíme i velikost mikrolece



Array-CGH profil DNA pacienta s mikrolepci 22q11 o velikosti 2,72 Mb

ISCN: $\text{arr}[\text{GRCh37}] 22\text{q}11.21(18818376_21540347)\times 1$

Využití metod molekulární cytogenetiky

mikrodeleční syndromy : **Prader Willi a Angelman syndrom**

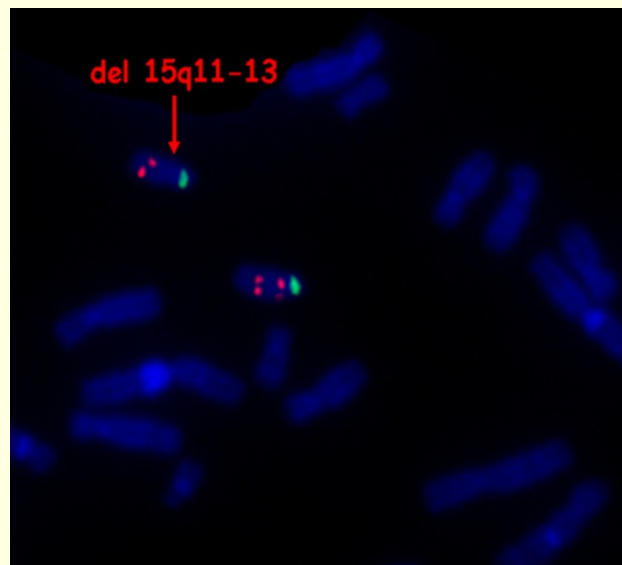
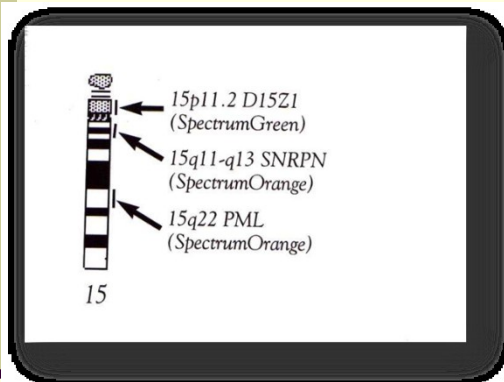
del 15q11-13

Metody pro stanovení diagnózy PWS a AS

Cytogenetické : karyotyp - translokace

Molekulárně cytogenetické : FISH - mikrodelece

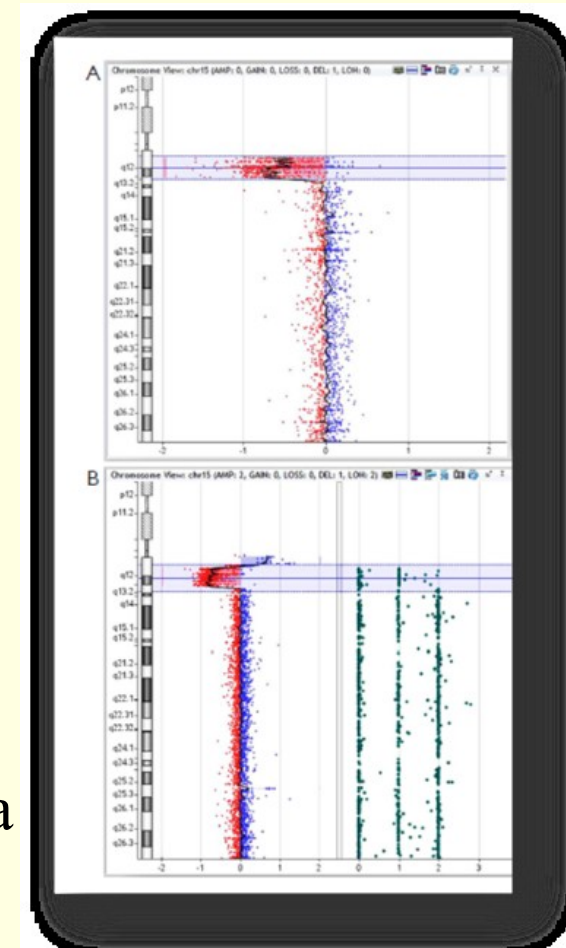
15q11-13 DNA sonda



MLPA, array-CGH

Molekulárně genetické:

PCR - uniparentální disomie, Metylační analýza



Prader-Williho syndrom



Hlavní klinické příznaky:

- Snížená aktivita plodu
- Neprospívání kojenců
- Hypotonie novorozenců (do 9 měs.)
- **Obesita**
- **Hyperfagie**, neukojitelný hlad
- Hypogenitalismus, hypogonadismus
- **PMR**
- **Malá postava**
- **Akromikrie**
- **Hypopigmentace**
- **Problémy s chováním**

Angelmanův syndrom – „Happy Puppet“

Výskyt : frekvence není přesně známá –
- odhad asi **1: 15 000- 1: 30 000**



Hlavní klinické příznaky

- Vážná PMR
- Tuhá nemotorná chůze
- Trhavé pohyby, špatná rovnováha
- Absence řeči
- Šilhání
- Výbuchy smíchu, šťastná povaha
- Hypotonie
- Epilepsie
- Abnormální tvar lebky
- Hypopigmentace

Využití metod molekulární cytogenetiky

Genetické příčiny vzniku PWS a AS

Prader-Williho syndrom

1. Delece na paternálním chromozómu 15
(70%)
2. Maternální uniparentální disomie chromozómu 15
(20 - 25 %)
3. Změna imprintingu
(2 - 4 %)
4. Různé chromozomální přestavby
(méně než 5 %)

Angelmanův syndrom

1. Delece na maternálním chromozómu 15
(70 %)
2. Paternální uniparentální disomie chromozómu 15
(4 %)
3. Změna imprintingu
(1 %)
4. Různé chromozomální přestavby
(2 %)
5. Mutace v genu UBE 3A
(3 - 5 %)

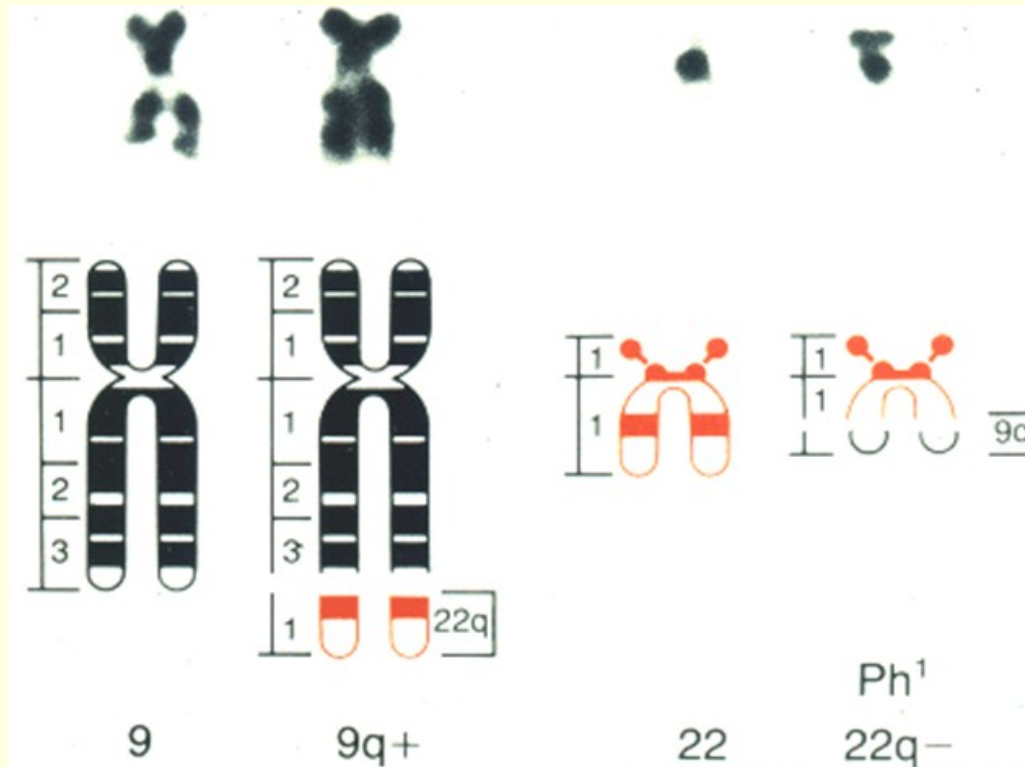
Využití metod molekulární cytogenetiky

onkocytogenetika (příklad reciproké translokace)

Chronická myeloidní leukemie (CML)

Philadelphský chromozóm

translokace BCR/ABL (9q34/22q11.2)



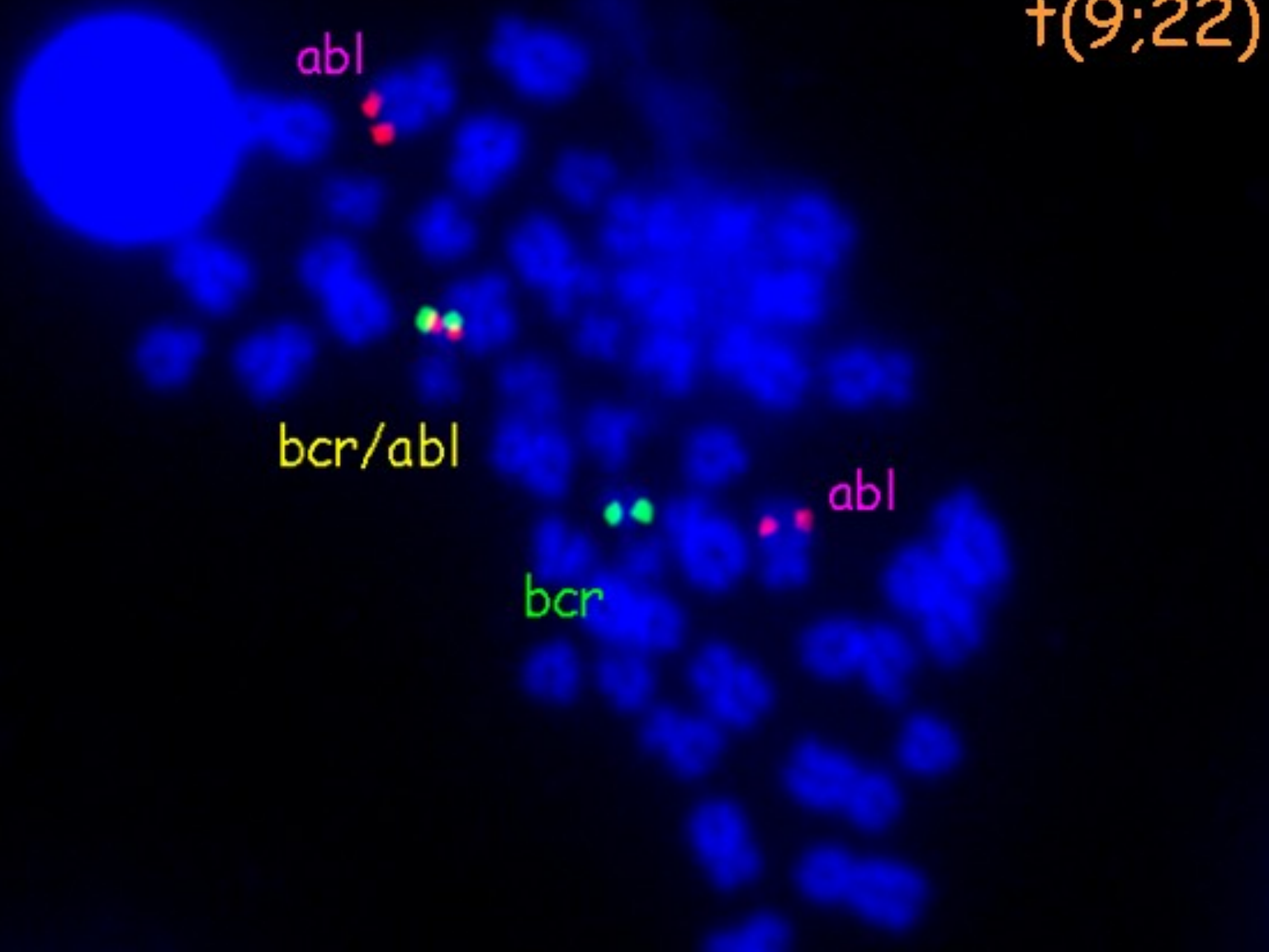
+ (9;22)

abl

bcr/abl

bcr

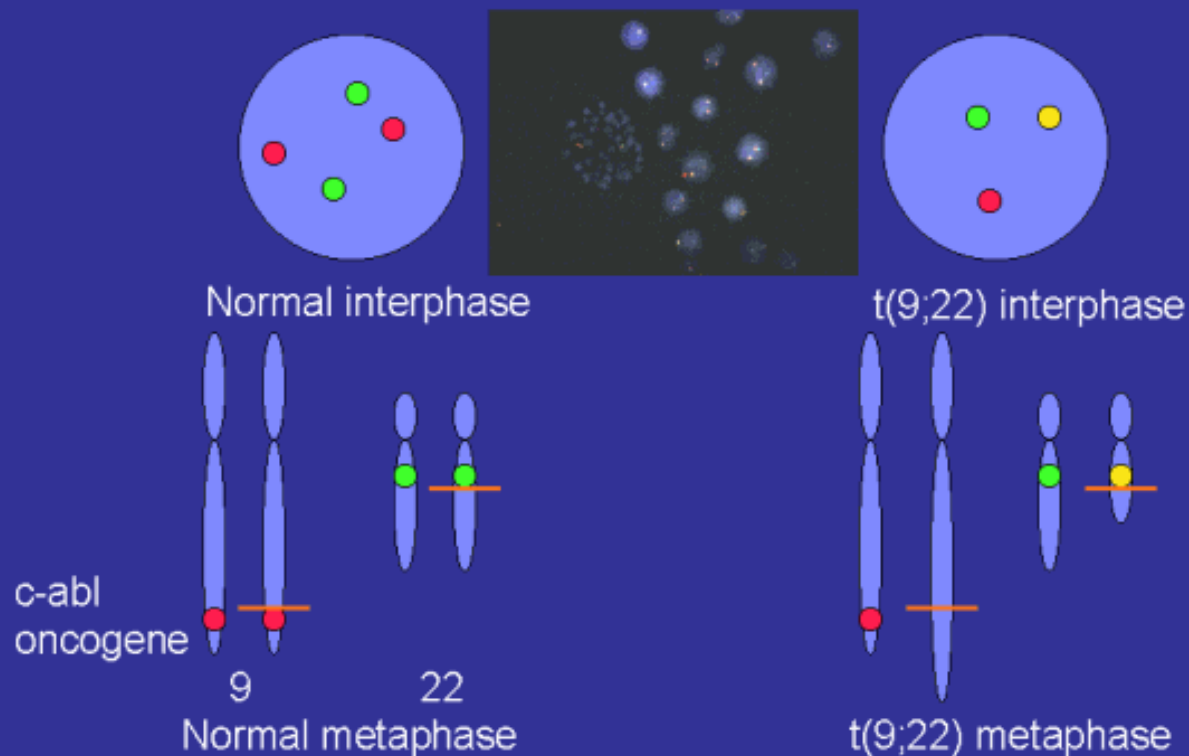
abl



Philadelphský chromozóm

translokace BCR/ABL (9q34/22q11.2)

Two colour FISH for cancer translocations (CML)



Philadelphský chromozóm

translokace BCR/ABL (9q34/22q11.2)

Two colour (ES) FISH for CML

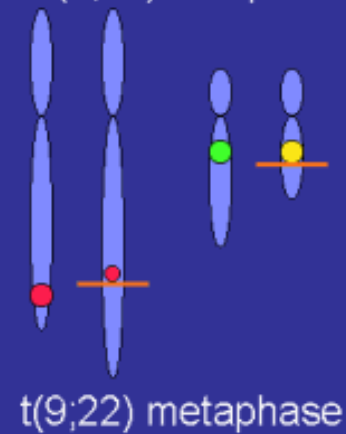
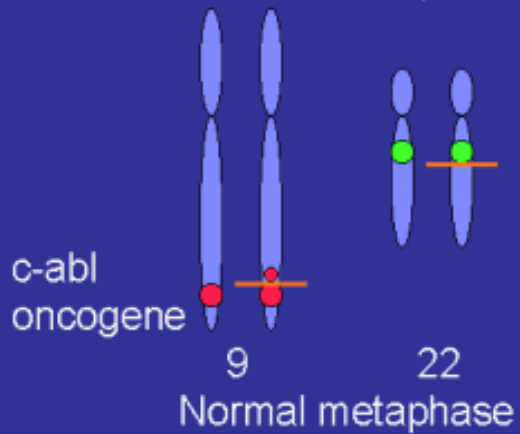
Larger probe – spanning the breakpoint



Normal interphase



t(9;22) interphase



Využití metod molekulární cytogenetiky

u solidních nádorů : **Neuroblastom**(mimo jiné..)

□ **Cytogenetika:** kultivace tkáně tumoru; vyšetření karyotypu

□ **Molekulární cytogenetika:**

□ I –FISH: amp.MYCN genu 2p24
del 1p36
gain 17q

□ array-CGH

□ SKY, MLPA

□ **Molekulární genetika:**

tyrozinhydroxyláza,
protein PGP 9.5

