



Chromozomové aberace u člověka jako příčina genetických onemocnění a možnosti jejich vyšetření



Vladimíra Vallová

Odd. genetiky a molekulární biologie

UEB PŘF MU

Odd. lékařské genetiky

FN Brno

Osnova



- **charakteristika a mechanismus vzniku CHA u člověka**
- **vrozené aberace chromosomů u člověka a syndromy s nimi spojené**
- **indikace ke stanovení karyotypu člověka a možnosti vyšetření chromosomů člověka**
- **moderní přístupy v cytogenetice člověka – DNA čipy**
- **moderní přístupy v cytogenetice člověka – metoda MLPA**

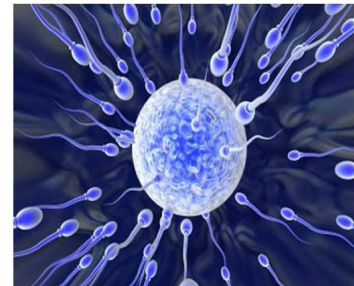
Geneticky podmíněná onemocnění u člověka

1. **Monogenní choroby** (AD, AR, XD, XR) – poruchy strukturních genů, hormonů, enzymů (metabolické poruchy)
2. **Chromosomové aberace (CHA)**
3. Patologické stavy s **multifaktoriálním typem** dědičnosti (cukrovka, ateroskleróza)
4. Choroby s **nemendelistickým způsobem** dědičnosti - mitochondriální, expanze trinukleotidových repeticí...
5. Genetické poruchy **somatických buněk** (nádory)



Zastoupení genetických chorob

- incidence vážných **monogenně** podmíněných chorob odhadnuta na **0,36% u živě narozených** novorozenců (studie na 1 000 000 dětí), méně než 10% se manifestuje po pubertě
- **0,6 % populace** má vrozenou **chromosomovou aberaci**
- **až 80 % populace** onemocní do konce života **multifaktoriálně podmíněnou** chorobou (genetická predispozice + vliv zevního prostředí)



Chromosomy...

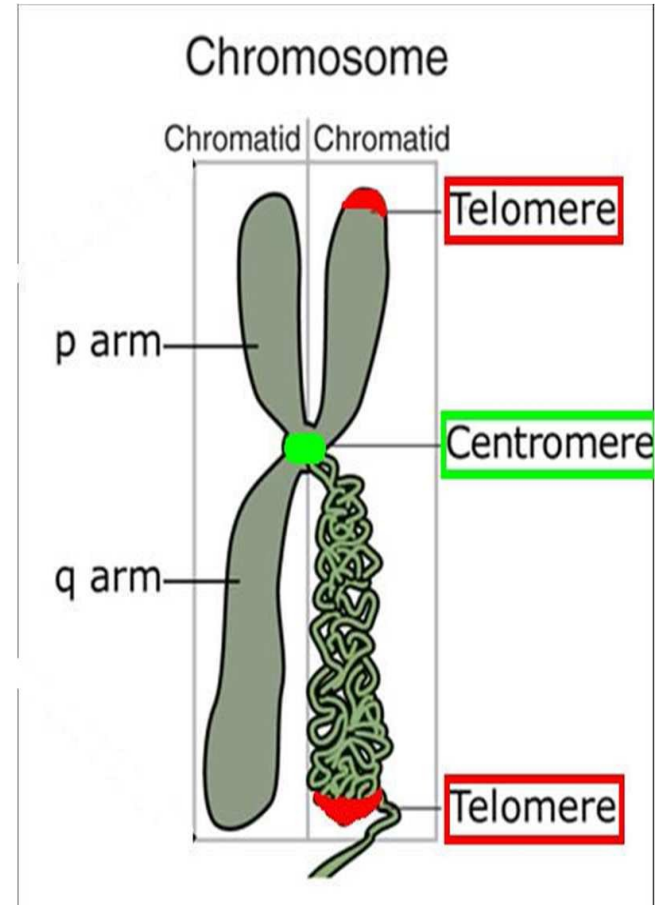
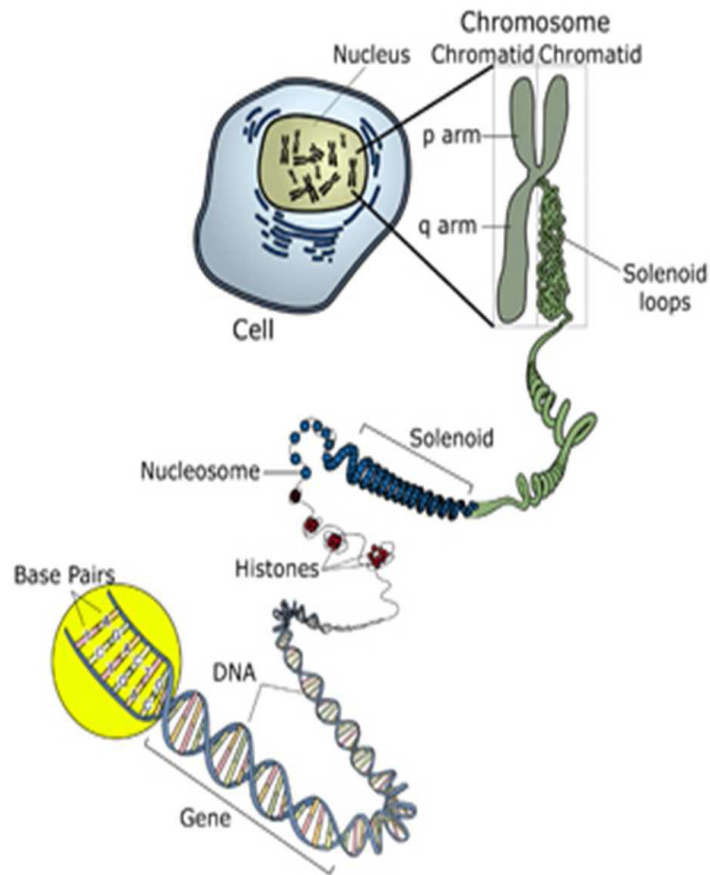
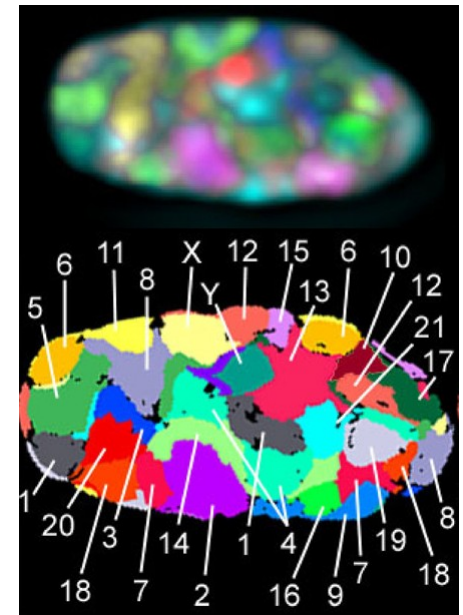


Image adapted from: National Human Genome Research Institute.

Karyotyp člověka



46,XY
46,XX



Co může poškodit chromozomy ?

- a) náhodné chyby při buněčných procesech (chyby replikace, reparace, rekombinace DNA)
- b) klastogeny v životním prostředí (ionizující záření, UV záření, chemikálie, viry atd.)



Chromozomové aberace a jejich rozdělení

Vrozené CHA

- 20 – 50% všech počtů
- 50 – 60% abortů v I. trimestru
- 5% všech rozpoznaných těhotenství
 - 4,4% se potratí
 - 0,6 % se narodí
 - VVV, psychomotorická retardace, sterilita, stigmatizace, aj.

Získané CHA

- v somatických buňkách

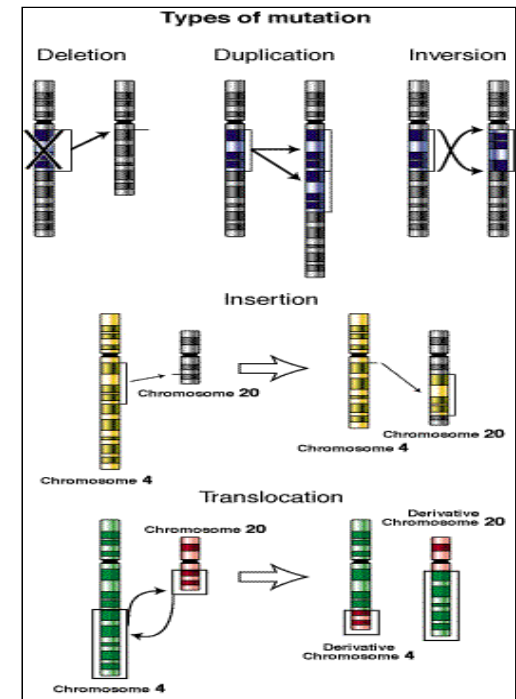
A) nádorová tkáň (leukémie, solidní nádory) – onkocytogenetické vyšetření

B) hodnocení působení mutagenů – studujeme v lymfocytech periferní krve - rizikové prostředí, léky

Chromozomové aberace a jejich rozdělení

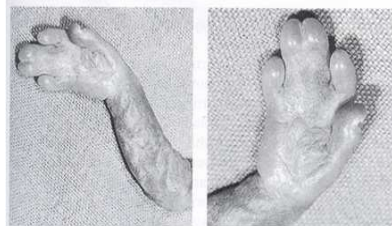
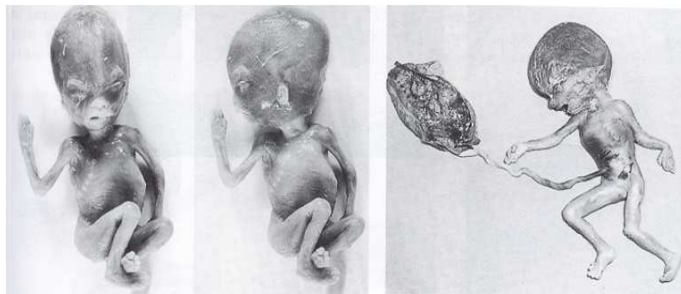
Numerické - změny v počtu chromozomů
(polyploidie, aneuploidie)

Strukturní - změny ve struktuře chromozomů
(balancované, nebalancované)

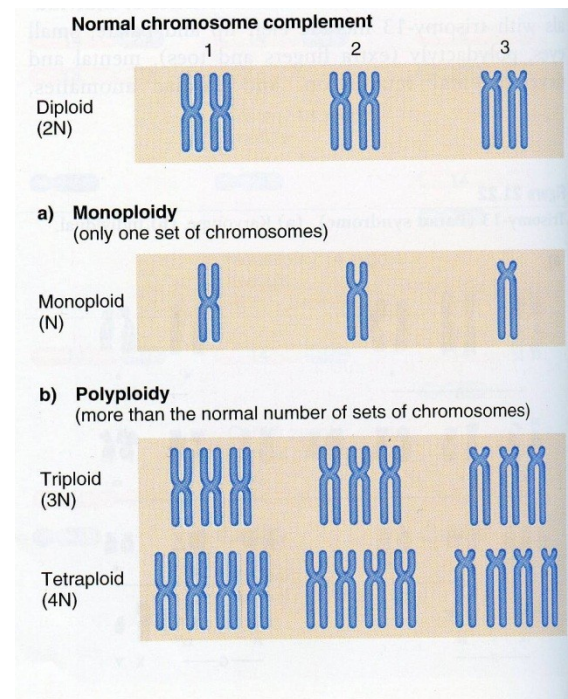


Polyploidie – zmnožení celé sady chromozomů

- **triploidie** ($3n = 69,XXX$) – 1 až 3 % početí
- **tetraploidie** ($4n = 92,XXXX$)
obě tyto konstituce jsou u člověka letální
- **mixoploidie** – $46,XX/69,XXX$
- $46,XX/92,XXXX$



triploidy 69,XXX



AJMG AMERICAN JOURNAL OF
medical genetics

Article

Mixoploidy in humans: Two surviving cases of diploid-tetraploid mixoploidy and comparison with diploid-triploid mixoploidy

Matthew J. Edwards¹, Jonathan P. Park²,
Doris H. Wurster-Hill², John M. Graham Jr
M.D., Sc.D.^{3*}

Article first published online: 7 JUN 2005

DOI: 10.1002/ajmg.1320520314

Copyright © 1994 Wiley-Liss, Inc., A Wiley
Company

Issue



American Journal of Medical
Genetics

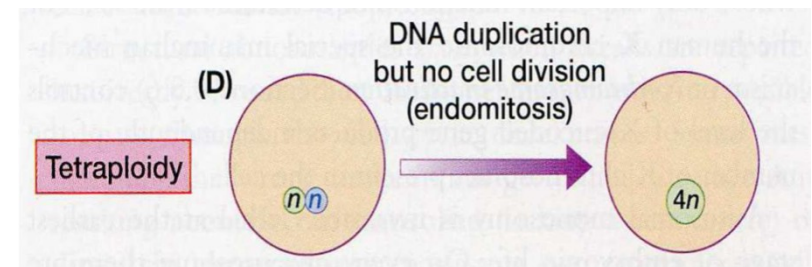
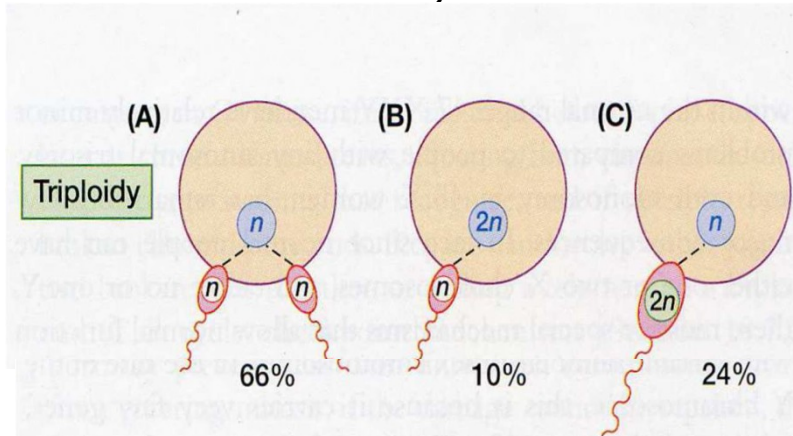
Volume 52, Issue 3, pages
324–330, 1 September 1994

Vznik polyploidie u člověka

■ Triploidie –

- **Diandrie** – haploidní sada navíc pochází od otce
 - tzv. **dispermie** (oplození vajíčka dvěma spermii) nebo splynutí **neredukované spermie** s vajíčkem
- **Digynie** – haploidní sada navíc pochází od matky
 - důsledkem splynutí **neredukovaného vajíčka** se spermii – chyba při meiotickém dělení vajíčka nebo nevyloučení polárního tělíska

- **Tetraploidie** vzniká endoreduplikací, tj. rozdělením chromozomů bez rozdělení buňky.



Triploidie u člověka

Odlišný fenotyp závisí na rodičovském původu nadpočetné sady chromozomů:

Diandrie - **částečná hydatidózní mola**

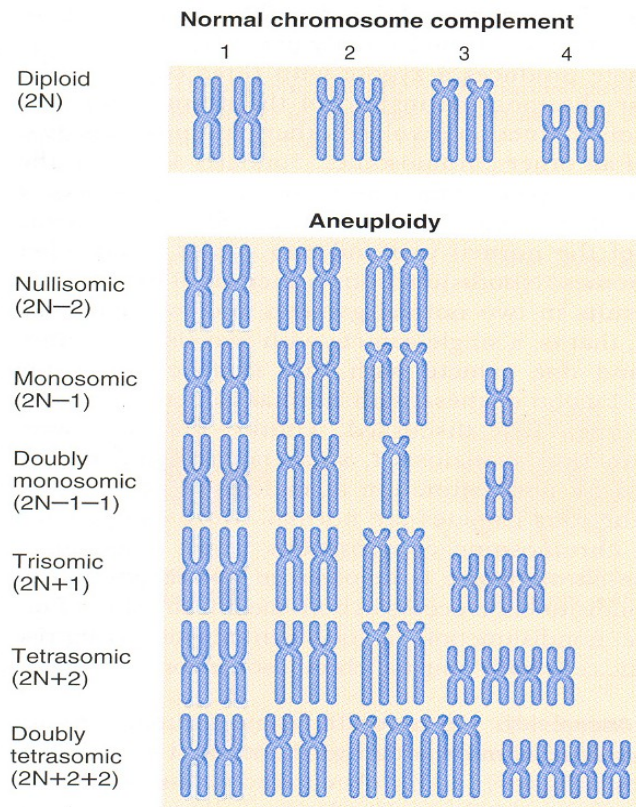
Digynie - **nemolární produkt**, extraembryonální tkáně jsou redukované

Je pravděpodobně způsoben imprintingem genů (aktivní otcovské alely určitých genů podporují vývoj obalů, aktivní mateřské alely dalších genů zase vývoj vlastního embrya).



Aneuploidie

- numerická odchylka se týká pouze určitého chromozomu. Konkrétní chromozom může být buď zmnožen – **trizomie** (tři kopie), **tetrazomie** (čtyři kopie), nebo ztracen – **monozomie** (jedna kopie).



Nejčastější aneuploidie u člověka

Table 21.1 Aneuploid Abnormalities in the Human Population

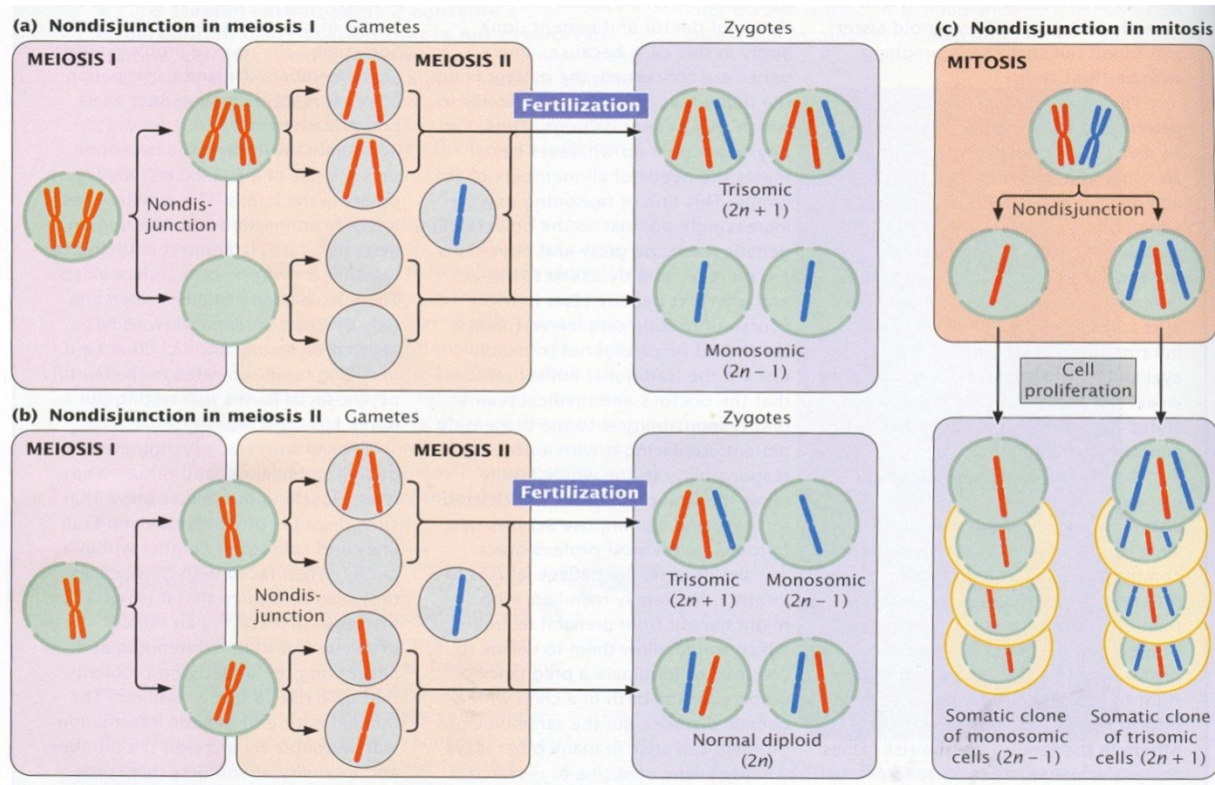
Chromosomes	Syndrome	Frequency at Birth
Autosomes		
Trisomic 21	Down	14.3/10,000
Trisomic 13	Patau	2/10,000
Trisomic 18	Edwards	2.5/10,000
Sex chromosomes, females		
XO, monosomic	Turner	4/10,000 females
XXX, trisomic	Viable; most are fertile	14.3/10,000 females
XXXX, tetrasomic		
XXXXX, pentasomic		
Sex chromosomes, males		
XYY, trisomic	Normal	25/10,000 males
XXY, trisomic	Klinefelter	40/10,000
XXYY, tetrasomic		
XXXY, tetrasomic		

Nondisjunkce – příčina aneuploidií

Vznik aneuploidie

a) v důsledku chyby při rozchodu chromozomů do dceřiných buněk během buněčného dělení (**nondisjunkce**)

b) **opožděním chromozomu** při rozchodu **v anafázi** buněčného dělení



Věk jako příčina aneuploidií

* Věk a nondisjunkce

- věk matky > 35 let, věk otce > 50 let

Věk matky:

- stárnutí vajíčka, špatná funkce dělicího vřeténka (s věkem klesá četnost rekombinací chromozomů)
- kumulace mutagenního ovlivnění během života ženy (meiotické dělení u ženy začíná již v době embryonálního vývoje, pak je zastaveno a pokračuje až v době pohlavní dospělosti)
- změny v intracelulárních podmínkách v důsledku hormonální nedostatečnosti

Nondisjunkce +21 Oogeneze : spermiogeneze

80 % mat : 20 % pat

MI mat : MII mat

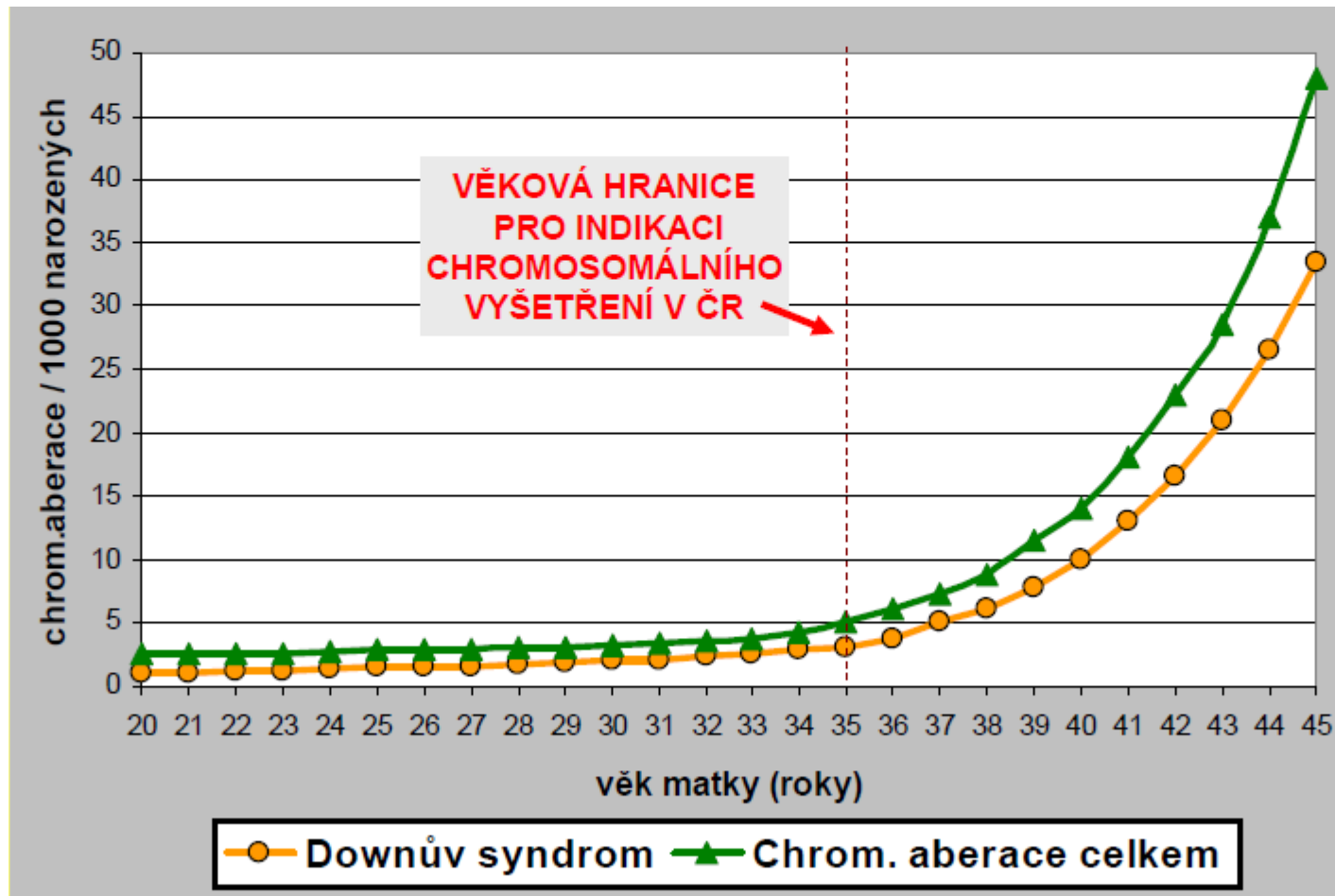
80 % : 20 %

* Věk a opoždění chromozomu v anafázi

- závislost není tak zřejmá

Přibližné % výskytu chromozomálních aberací ve vztahu k věku matky (průměr dle různých autorů)						
Věk matky	20	25	30	35	40	45
Všechny CHA	0,12	0,22	0,34	0,49	1,59	5,26

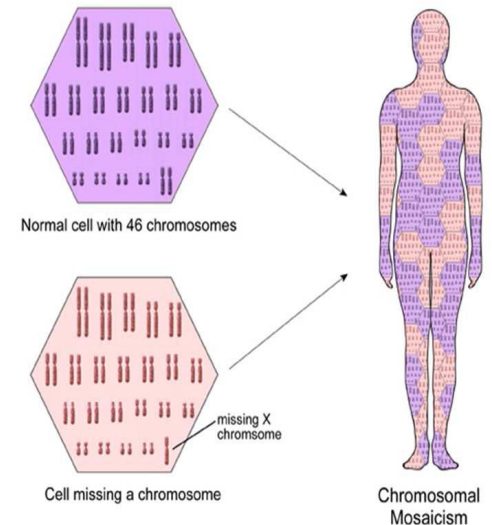
VÝSKYT CHROMOSOM. ABERACÍ V ZÁVISLOSTI NA VĚKU MATKY



Mozaika vs. chiméra

Chromozomální mozaika – dvě (nebo více) buněčných linií s různým karyotypem pocházejících z jedné zygoty. Vzniká nondisjunkcí při mitotickém dělení a poměr buněčných linií závisí na tom, ve kterém dělení k nondisjunkci nebo ztrátě chromozomu došlo a na tom jak jsou abnormální buňky životaschopné.

Chiméra - dvě buněčné linie s odlišným karyotypem, pocházející ze dvou zygot. U člověka známe vzácně chiméru 46,XX/46,XY.

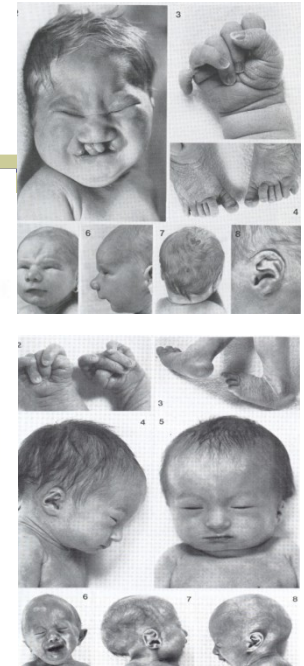


U.S. National Library of Medicine

<http://ghr.nlm.nih.gov>



Nejčastější syndromy spojené s numerickými CHA



Autozomy:

- +13 Patau sy
- +18 Edwards sy
- +21 Down sy

- +8 Warkany 2 sy
- +9 trizomie 9 (Rethore: +9p)
- +22 trizomie 22

Gonozomy:

Ženy

- X Turner sy
- XXX
- XXXX

Muži

- XXY Klinefelter sy
- XXXY
- XXYY
- XYY

Cytogenetika!!

Table 21.1 Aneuploid Abnormalities in the Human Population

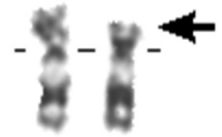
Chromosomes	Syndrome	Frequency at Birth
Autosomes		
Trisomic 21	Down	14.3/10,000
Trisomic 13	Patau	2/10,000
Trisomic 18	Edwards	2.5/10,000
Sex chromosomes, females		
XO, monosomic	Turner	4/10,000 females
XXX, trisomic	Viable; most	
XXXX, tetrasomic	are fertile	14.3/10,000 females
XXXXX, pentasomic		
Sex chromosomes, males		
XYY, trisomic	Normal	25/10,000 males
XXY, trisomic		
XXYY, tetrasomic	Klinefelter	40/10,000
XXXYY, tetrasomic		

Strukturní změny chromosomů

- jsou následkem chromosomových zlomů, na které navazuje určitá přestavba. Mohou vznikat spontánně nebo jako následek působení různých vnějších faktorů.

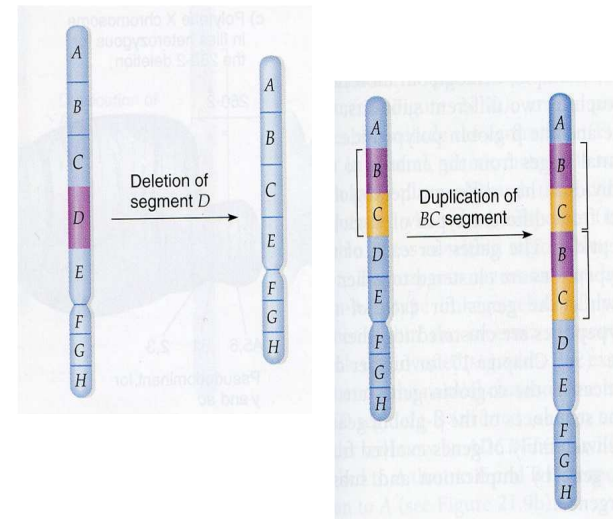
- **Nebalancované** (část genetického materiálu chybí či přebývá):
 - Delece
 - Duplikace
 - Izochromozom
 - Dicentrický chromozom
 - Ring chromozom
 - Marker chromozom
- **Balancované** (zachováno původní množství genetického materiálu)
 - Inverze
 - Translokace

Delece a duplikace



11

- Terminální
- Intersticiální
- zlom chromozomů – ztráta acentrického fragmentu (delece)
- nerovnoměrný crossing-over (delece – duplikace)
- důsledek abnormální segregace chromozomů s balancovanými translokacemi nebo inverzemi

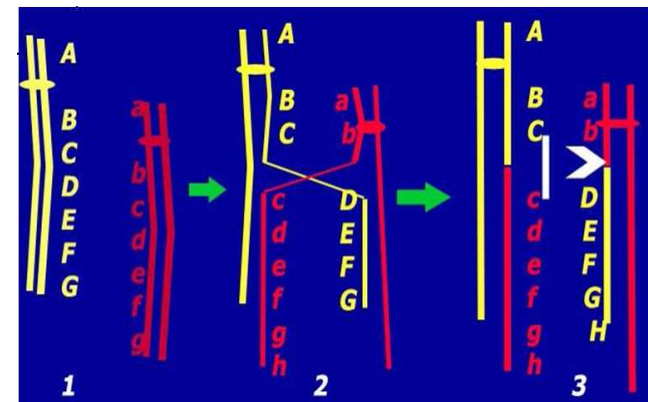


Russel, 2001

Nejčastější syndromy spojené s delecí/duplikací u člověka

- del 4p – Wolf Hirschhorn sy
- del 5p – Cri du chat sy
- del 18q – 18q deleční sy
- mikroleční/mikroduplikační sy

Cytogenetika!!



Izochromosom, dicentrický chromosom – porucha dělení centromery

- **Izochromozom:** jedno rameno chybí, zbývající je naopak duplikováno
 - přítomnost jednoho izochromozomu v karyotypu - parciální monozomie pro jedno rameno, parciální trizomie pro druhé
 - u člověka nejčastější $i(Xq)$, $i(18p)$, $i(12p)$
- **dicentrický chromosom** – fúze dvou částí chromozomů, každá má centromeru
 - u člověka nejčastěji z pohlavních nebo akrocentrických chromozomů

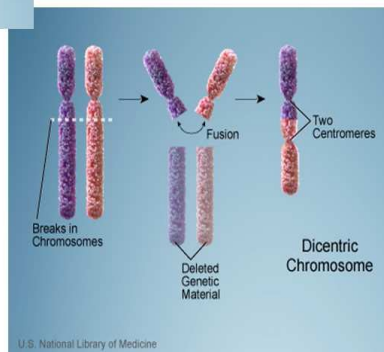
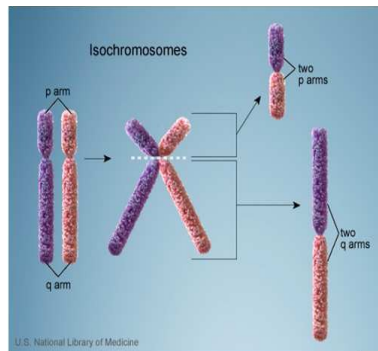


Figure from de la Chapelle, 1982

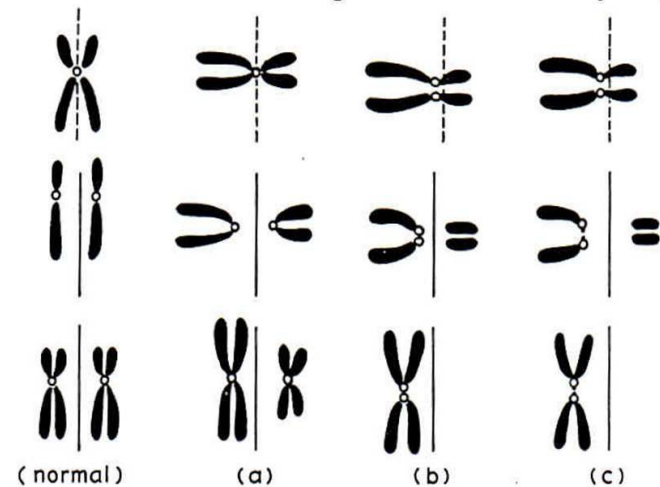


Figure 3 Possible modes of division of the centromere as depicted by de la Chapelle et al. (a) Transverse misdivision giving rise to an isochromosome for the long arm and another for the short arm; (b) breakage distally in the centromeric region producing a dicentric isochromosome and an acentric fragment; (c) breakage in the proximal part of one arm producing a dicentric isochromosome with the centromeres a short distance apart.

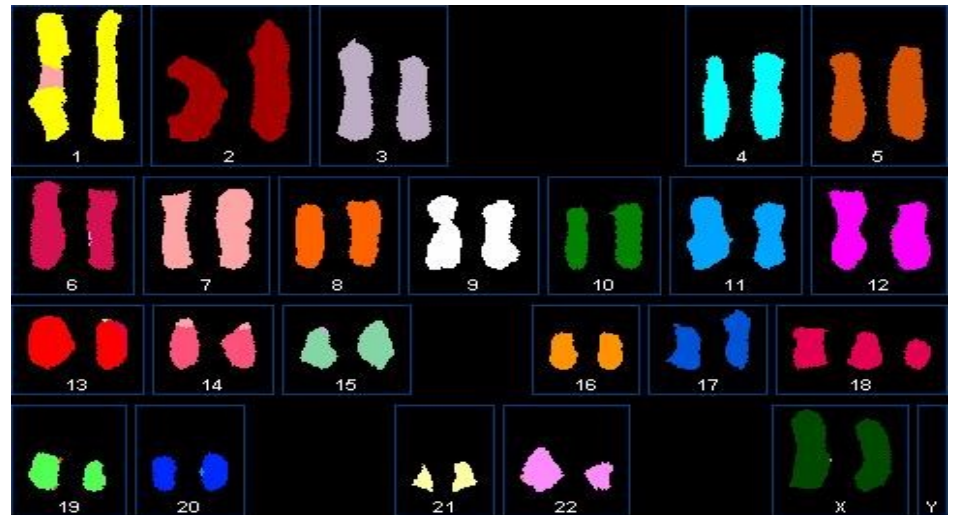
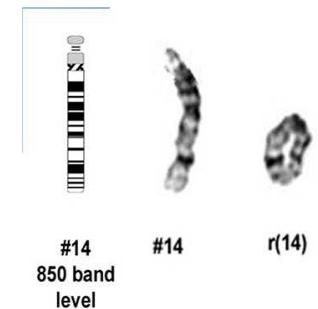
Marker chromozom

Marker

- malý nadbytečný chromozom, který často není možno určit pruhovacími metodami
- bez euchromatinu
- s euchromatinem – parciální trizomie

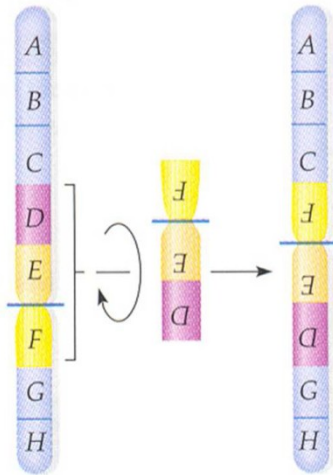
Ring chromozom

- výskyt - 1/4000 u novorozenců, 1/2500 u amniocentéz

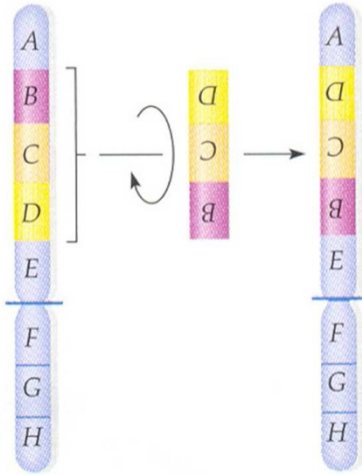


Inverze

a) Pericentric inversion
(includes centromere)



b) Paracentric inversion
(does not include centromere)

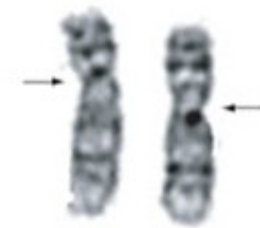


Russel, 2001

- nezpůsobuje abnormální fenotyp
- klinický význam pro potomstvo – přenašeč jakékoliv inverze má zvýšené riziko tvorby abnormálních gamet – nebalancované CHA u potomstva
- celkové riziko narození dítěte s nebalancovaným karyotypem se v případě přenašeče pericentrické inverze odhaduje na 5 až 10 %

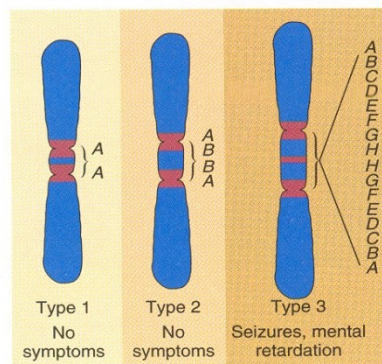
Normální varianta: inv(9)(p11q12)

- výskyt asi u 1% jedinců vyšetřovaných v cytogenetických laboratořích
- normální varianta – neovlivňuje fenotyp



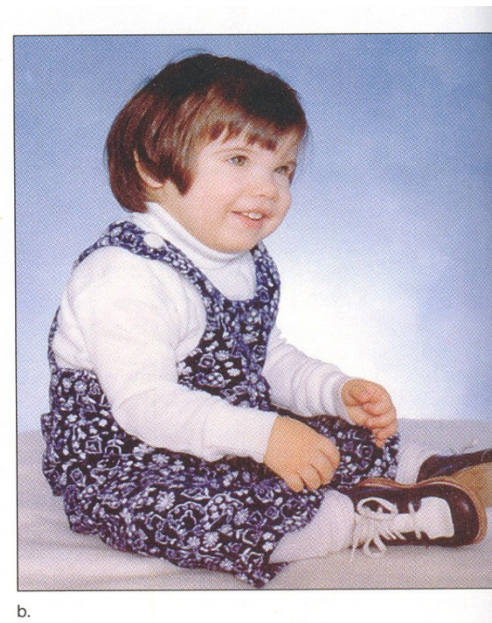
Syndrom: inv dup(15)

často jako marker chromozom



- Poor muscle tone
- Epicantal folds
- Small size
- Mental retardation
- Seizures
- Developmental delay
- Curved spine (scoliosis)
- Learning disabilities
- Autistic features
 - poor speech
 - hand flapping
 - lack of eye contact
 - need for routine

a.

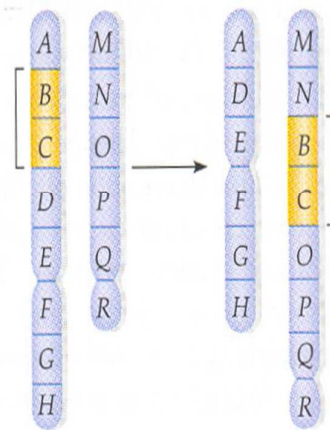


b.

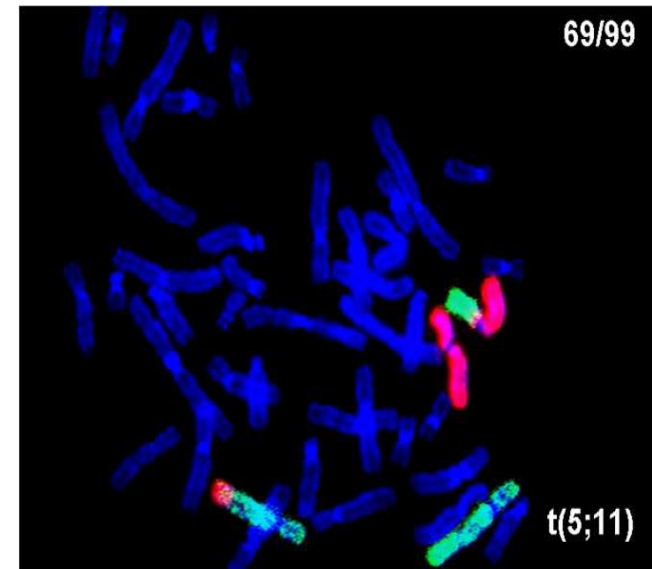
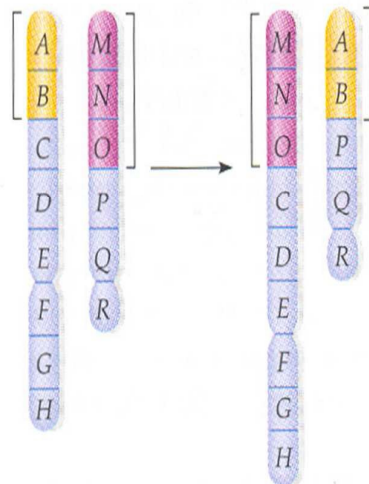
Translokace

- výměny chromozomových segmentů mezi dvěma či více chromozomy
 - prosté
 - reciproké
 - Robertsonovské translokace
 - komplexní translokace (postihují tři či více chromozomů)

b) Nonreciprocal interchromosomal translocation



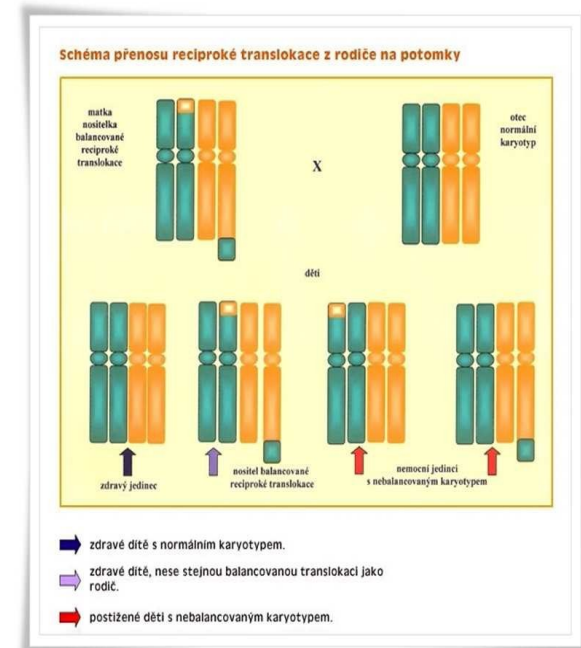
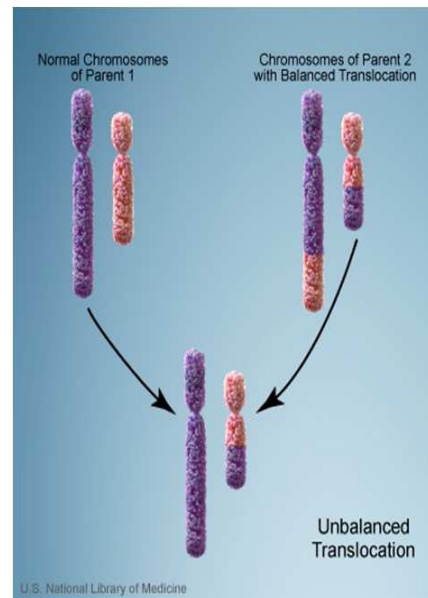
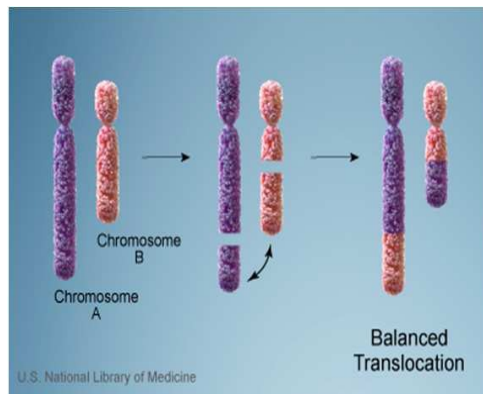
c) Reciprocal interchromosomal translocation



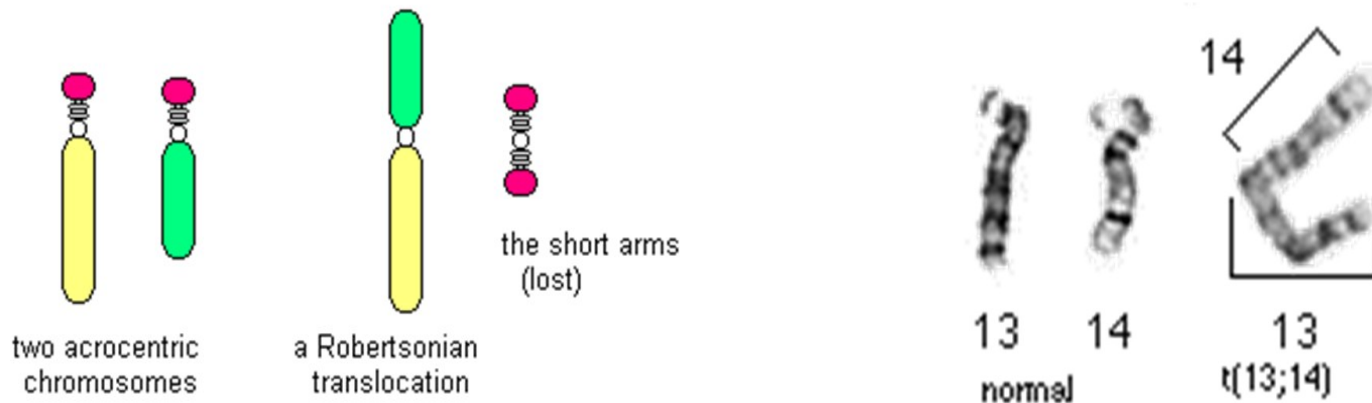
Ukázka reciproké translokace pomocí techniky FISH

Balancované translokace - důsledky

- 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)



Robertsonovské translokace

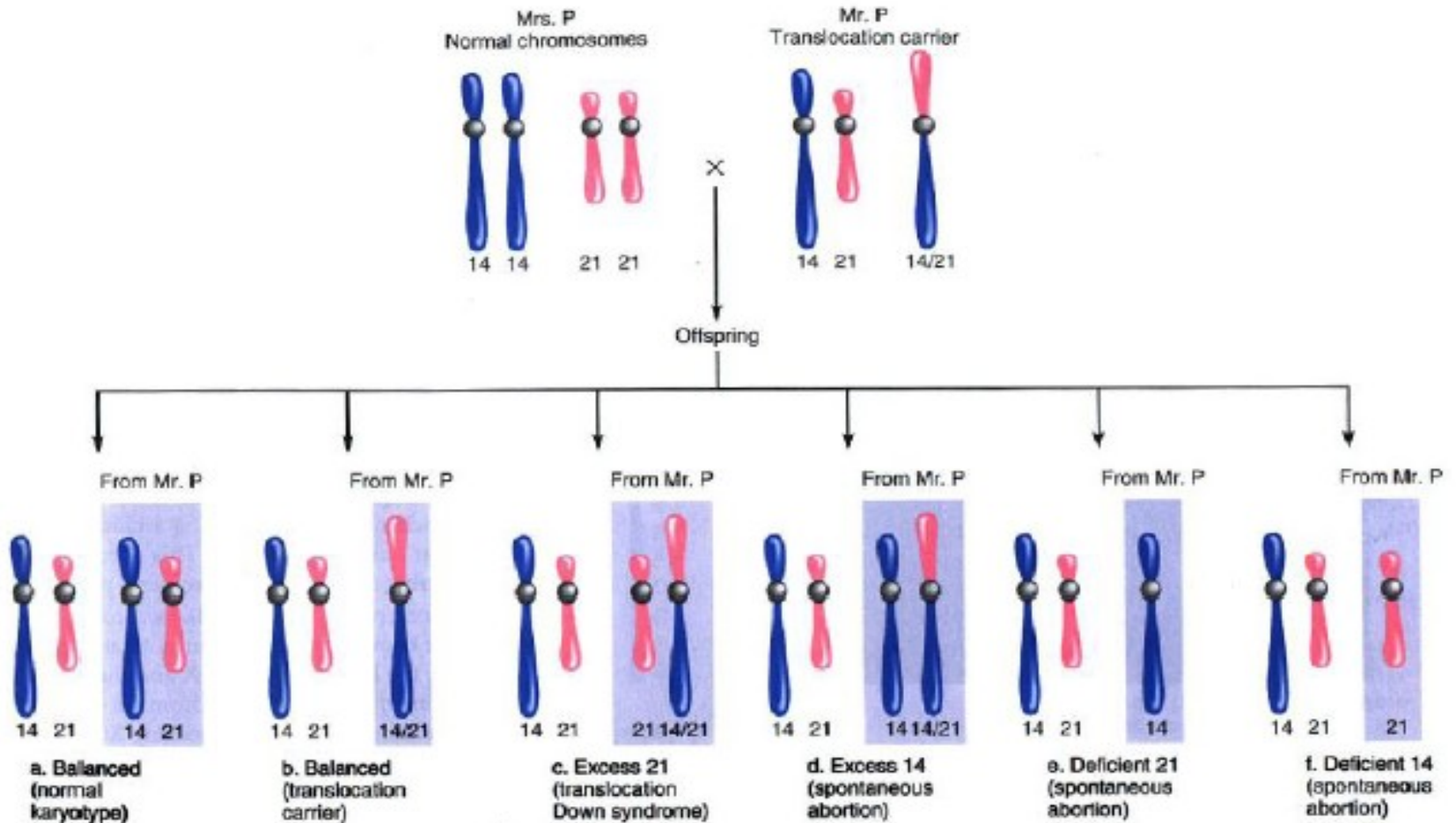


Zápis: 45,XX,der(13;14)(q10q10) – 45 chromozomů

Nejčastější Robertsonovská translokace – chr. 13 a 14 (1 na 1300 osob!)

Asi 4% případů Downova syndromu – důsledek Robertsonovských translokací postihujících chromozom 21

Robertsonovské translokace



Komplexní chromozomové přestavby

- vrozené komplexní přestavby se vyskytují zřídka
- jsou charakterizovány 3 nebo více zlomy lokalizovanými na dvou nebo více chromozomech
- možná asociace s
 - mentální retardací
 - vrozenými anomáliemi
 - opakovanými spontánními aborty

46,XY,t(1;14),(p34;q24),t(4;6)(q25;p23)pat

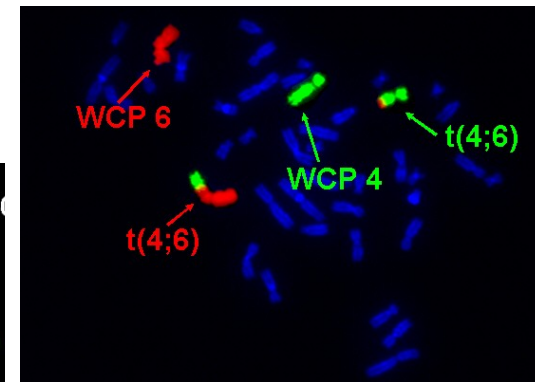
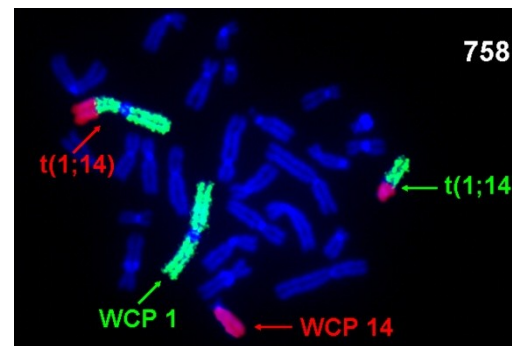
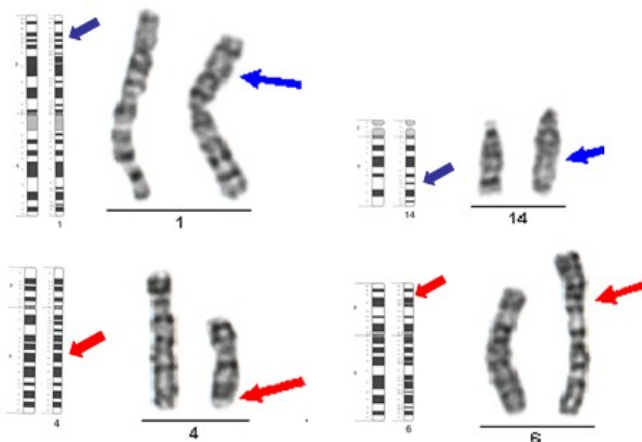


TABLE 2 Frequencies of chromosome rearrangements

Rearrangement	Frequency in the general population
Robertsonian translocations	1 in 1000
Reciprocal translocations	1 in 625
Marker chromosomes	1 in 2000
Terminal deletions	At least 1 in 5000 ^a
Interstitial deletions	At least 1 in 4000 ^b
Interstitial duplications	At least 1 in 4000 ^c

^aThe most common terminal deletion is likely the del(1)(p36). The estimated frequency is 1 in 10,000. At least 50% were not detected by initial chromosome analysis. Thus, the frequency may be twice the estimate, or 1 in 5000.

^bRecognized interstitial deletions range in frequency between greater than 1 in 50,000 to 1 in 4000. Thus, the frequency is at least 1 in 4000 and may actually be more frequent than recognized.

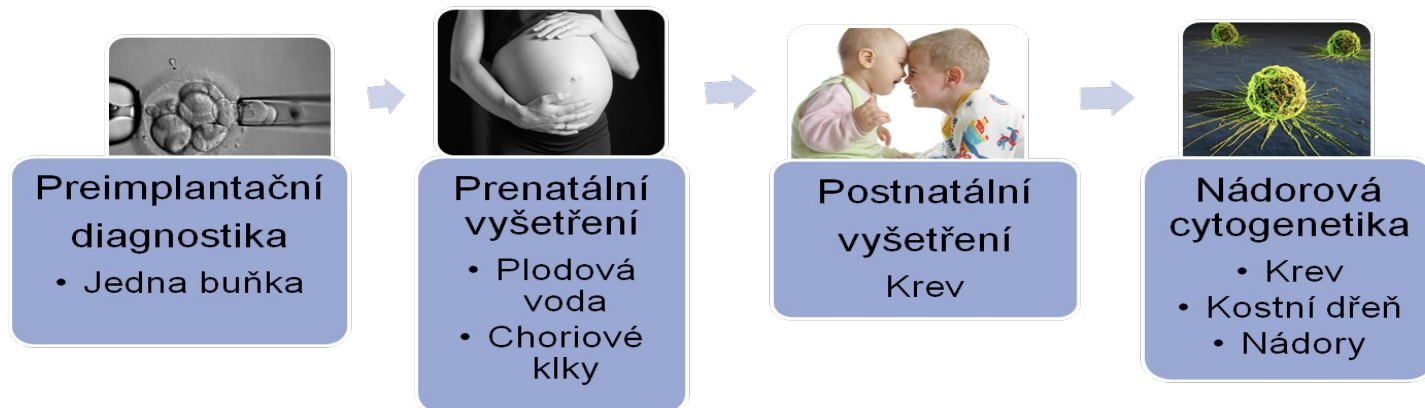
^cBased on the estimated frequency of interstitial deletions and the fact that many interstitial duplications may be the reciprocal recombination product of deletions.

Klinické indikace pro vyšetření karyotypu člověka

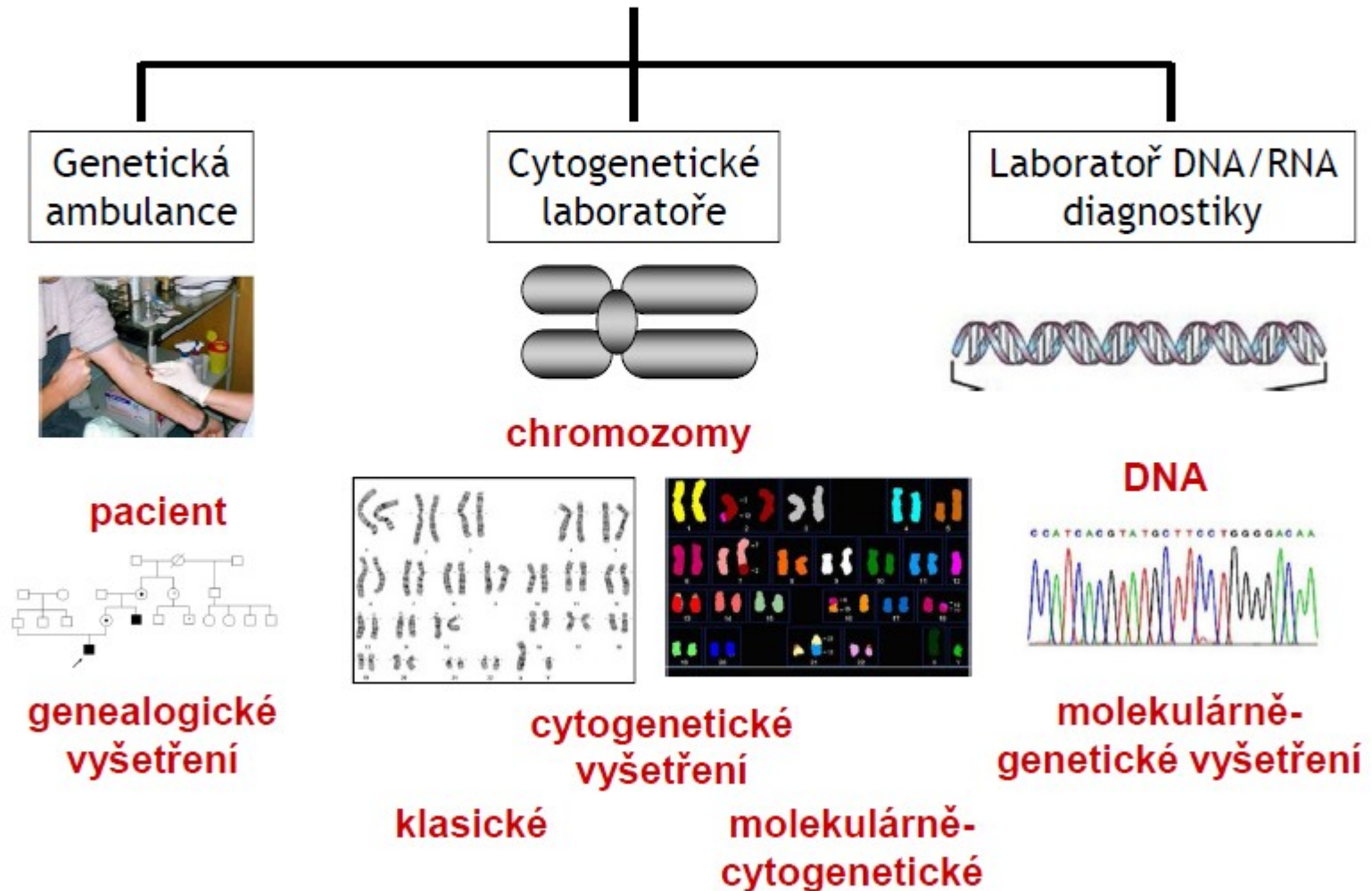
- narození mrtvého plodu a úmrtí novorozence
- novorozenec s mnohočetnými VVV
- problémy časného růstu a vývoje
(neprospívání, opoždění, malá postava, anomálie genitálu, mentální retardace...)
- porucha pohlavního vývoje
- problémy s fertilitou – sterilní a infertilní páry
- dárci gamet
- těhotenství u žen pokročilého věku anebo nepříznivými výsledky screeningu
- rodinná anamnéza (známá chromozomová abnormalita u příbuzných I. stupně)
- nádorová onemocnění

Materiál pro vyšetření chromozomových změn u člověka

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

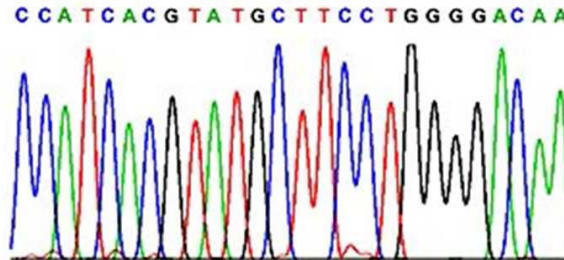
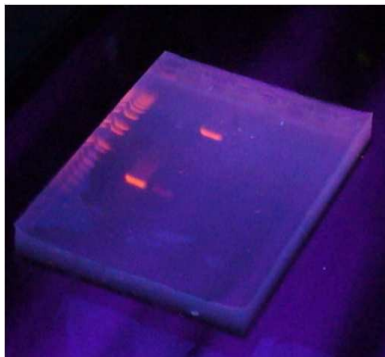


Možnosti vyšetření

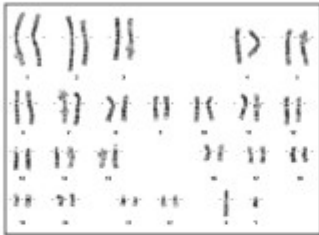


Laboratorní vyšetření

- **Cytogenetické vyšetření** - karyotyp, hodnocení mozaiky, získané chromosomové aberace
- **Molekulárně cytogenetické vyšetření** - FISH (metafázní, interfázní), SKY, CGH
- Molekulárně genetické vyšetření - analýza DNA, RNA
- Další laboratorní vyšetření - screening DPM, biochemie, hematologie, histologie, imunohistochemie...
- Další odborná vyšetření - neurologie, endokrinologie...

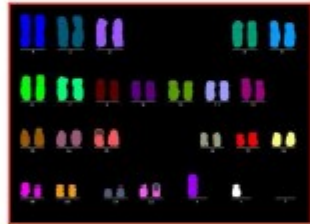
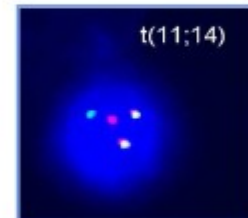


Možnosti vyšetření chromosomů člověka



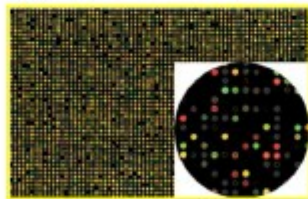
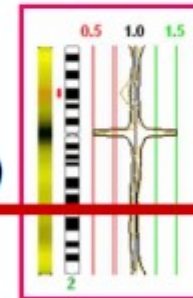
Klasická cytogenetika

FISH (fluorescenční in situ hybridizace)



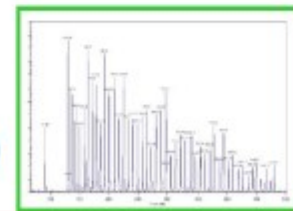
Spektrální karyotypování (SKY)

CGH/HR-CGH (komparativní genomová hybridizace)



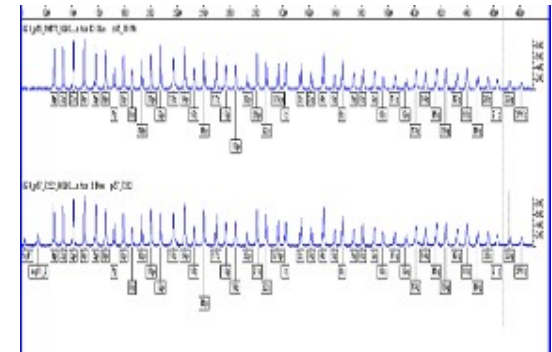
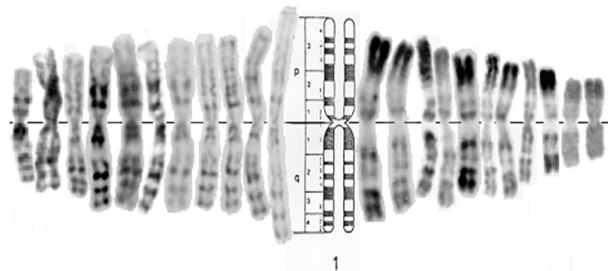
DNA čipy

MLPA (Multiple Ligation-dependend Probe Amplification)



Molekulární karyotypování – 1000x citlivější než klasická cytogenetika

		Resolution	Coverage
a Cytogenetics	Karyotyping	> 10 Mb	Complete
	SKY	> 2 Mb	Complete
	Traditional CGH	> 2 Mb (cytoband)	Complete
	FISH (interphase)	≥ 20 Kb	Probe Specific
	FISH (metaphase)	≥ 100 Kb	Probe Specific
b aCGH	BAC	100 Kb (Spectral Genomics - 2 Mb)	Complete
	cDNA	2 Kb	Genes Only
	Oligo (60-mer)	0.06 Kb	Complete

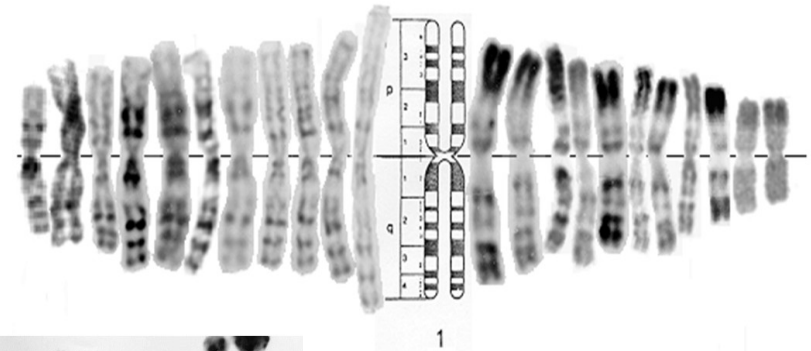


I. Klasická cytogenetika

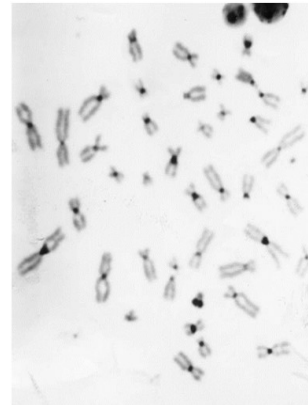
- **klasické barvení** - získané chromosomové aberace
- **diferenciační barvení**
 - odliší jednotlivé chromozomy dle charakteristických pruhů
 - vhodné pro studium vrozených CHA, chromozomálních změn u nádorů



Klasické barvení – hodnocení zlomů



G-pruhy vs. R-pruhy

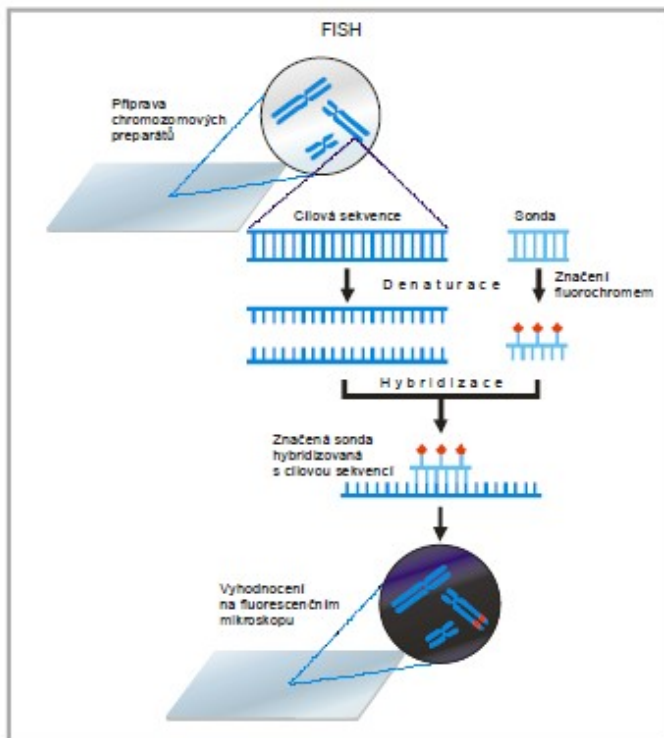


C-pruhy -
heterochromatín

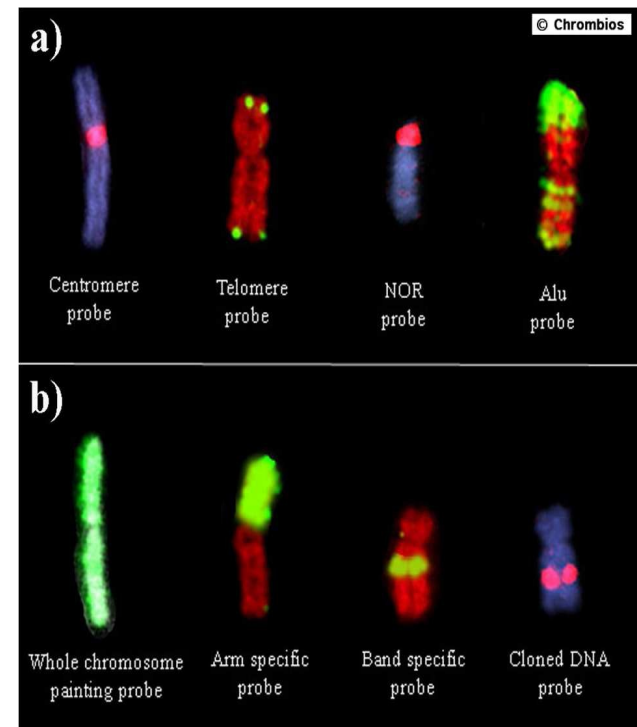
II. Molekulární cytogenetika - FISH

- 1969 Parduová a Gall - radioaktivní značení
- 1986 Pinkel a kol. - fluorescenční značení (FISH)

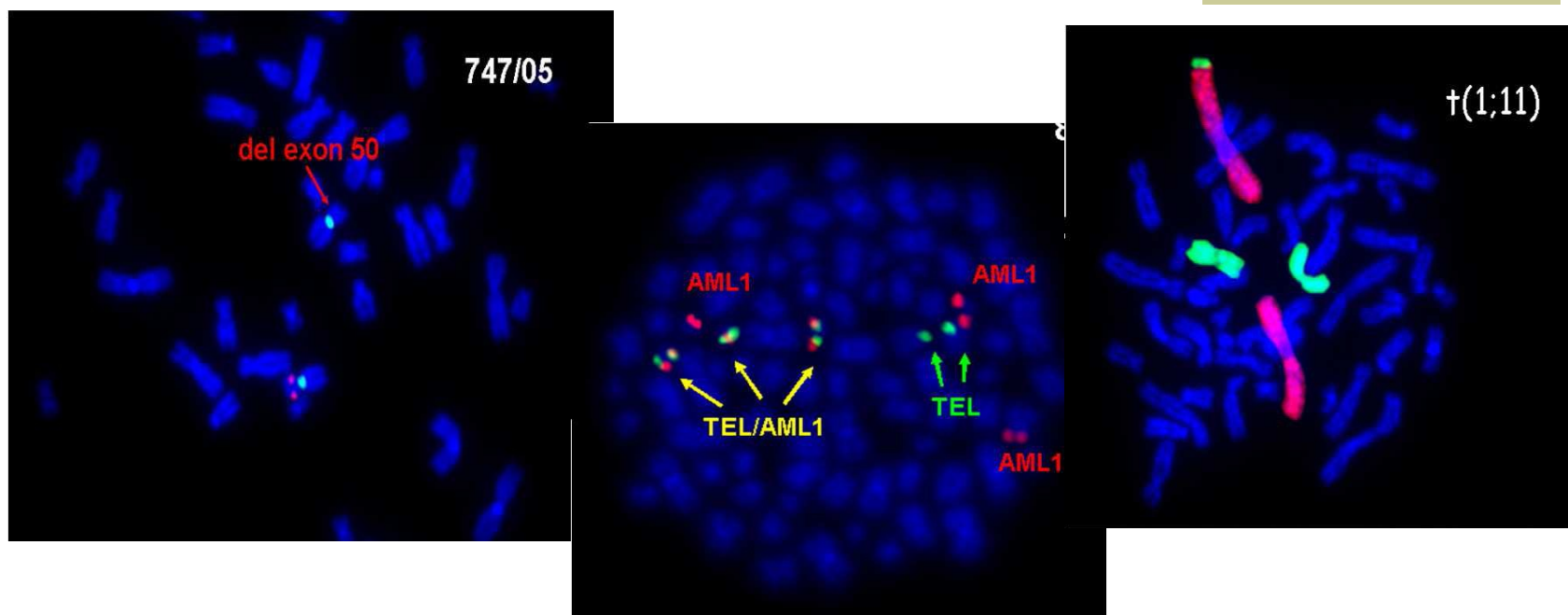
Hybridizace značené sondy s chromozomy na cytogenetickém preparátu



podľa Lichter & Cremer 1996)



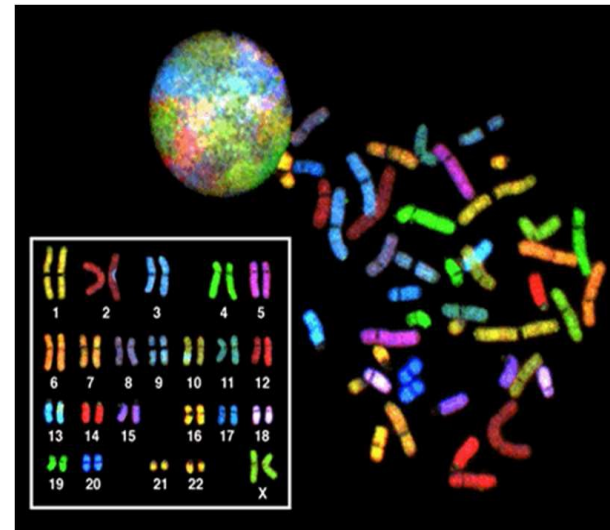
Přítomnost, počet a poloha signálů



- nevyžaduje přítomnost mitózy – cytogenetika interfáze
- rychlé zhodnocení velkého počtu buněk
- rychlá identifikace známých delecí, duplikací, amplifikací, translokací

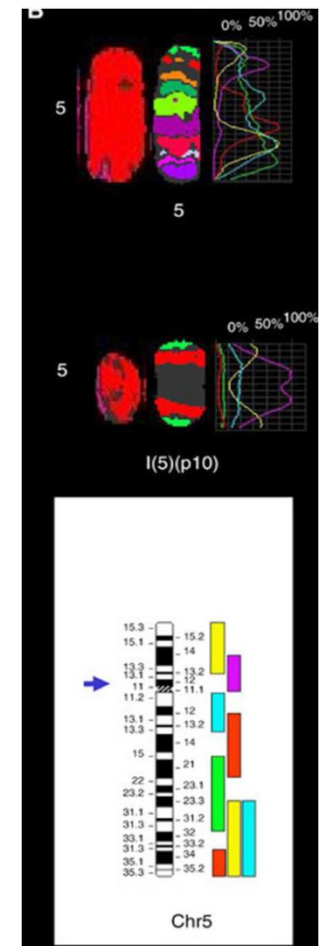
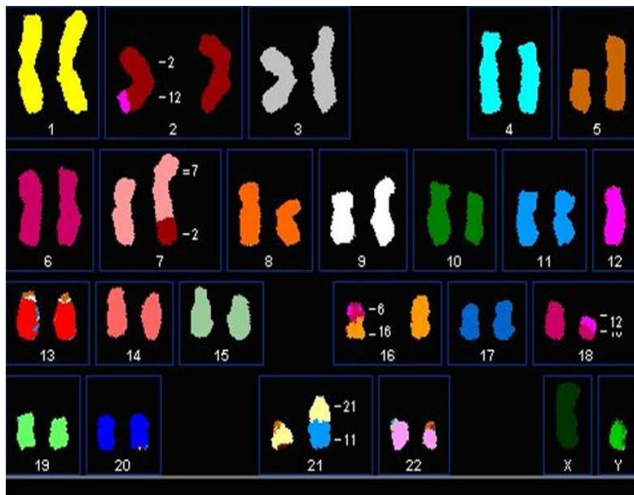
SKY (spektrální karyotypování) mFISH (multicolor FISH), mBand

- v jedné hybridizační reakci simultánní vizualizace všech 22 autozomů a chromosomů X a Y v odlišných barvách
- citlivost v rozmezí 1 – 2,5 Mb
- kombinaturní značení sond; celkový počet kombinací při použití N fluorochromů je $2N - 1$



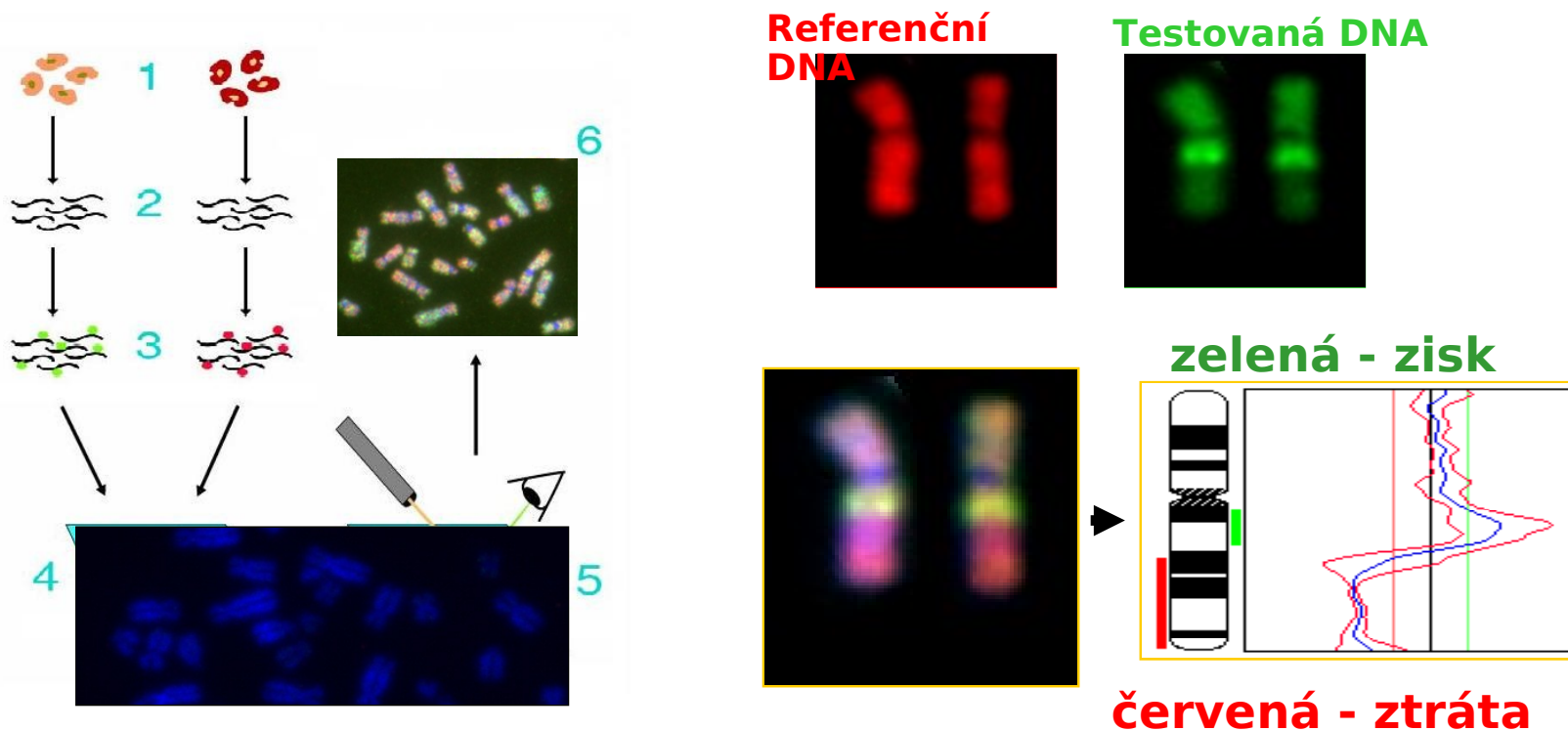
Využití technik SKY a mFISH, mBand

- odhalení balancovaných přestaveb
- kryptické translokace a inserce
- marker chromozomy
- nadbytečný materiál neznámého původu
- komplexné přestavby
- charakterizace místa zlomu či odhalení intrachromozomové přestavby (mBand)



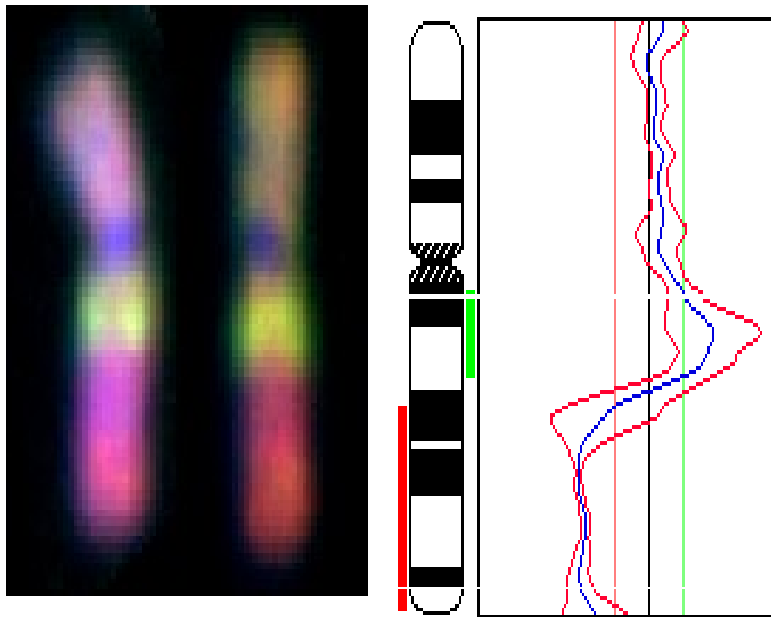
Komparativní genomová hybridizace (CGH)

- umožňuje během jedné hybridizační reakce stanovit straty (delece) či zisky (duplikace, amplifikace) sekvencí DNA v celém genomu; neodhalí balancované přestavby
- rozlišovací schopnost – 10 Mb,
- nevyžaduje mitotickou aktivitu zkoumaných buněk

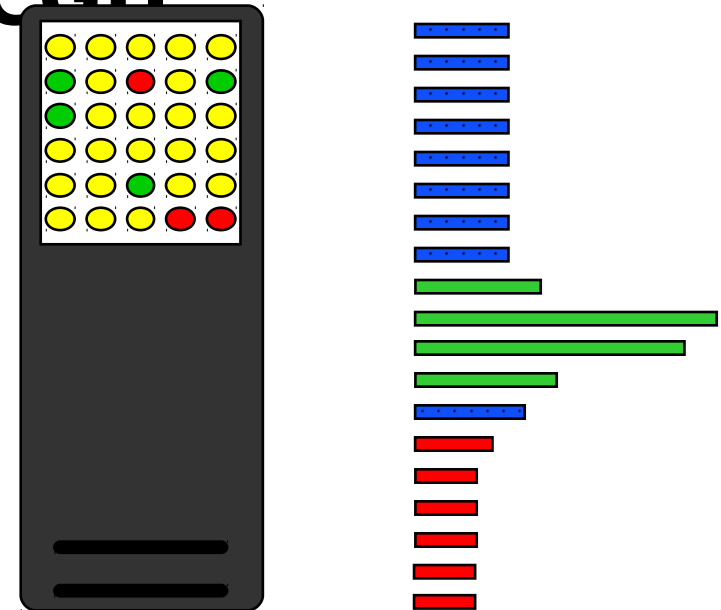


Technika array-CGH aneb rozdíl je jen v podkladě...

CGH



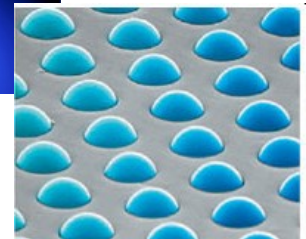
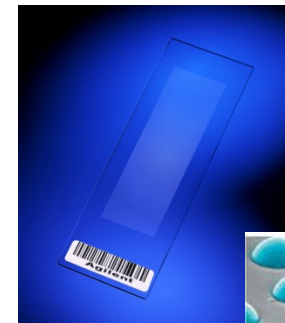
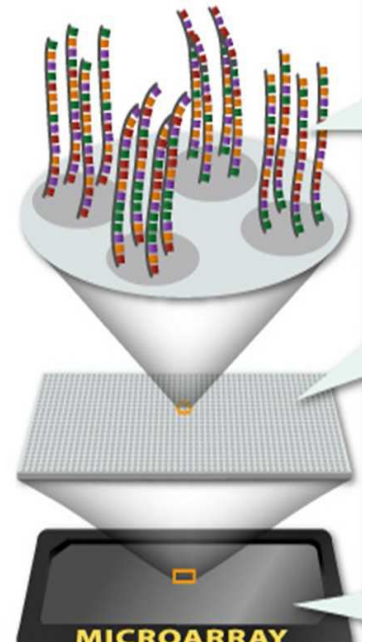
**Array-
CGH**



Array-CGH patří mezi tzv. moderní metody analýzy genomu, konkrétně mezi čipové technologie...

Moderní metody analýzy genomu: DNA čipy

- **principem** metody je hybridizace značené vyšetřované DNA s imobilizovanými sondami na čipu
- **sondy**: jednotlivé molekuly DNA o známé sekvenci, které jsou upevněny ve shlucích (spoty) na pevném podkladu
- počet spotů se pohybuje od řádově stovek do milionů podle typu čipů
- **podklad**:
 - sklo: mikroskopické sklíčko; různé úpravy povrchu
 - nylonová nebo nitrocelulózová membrána
 - plast, gel
 - mikrokuličky (BeadArrays® (Illumina))
- **historie**: Southern blot (polovina 70. let), skutečné mikročipy - polovina 90. let 20.st., pak masivní rozvoj a vývoj různých adaptací a variací; komerční trh



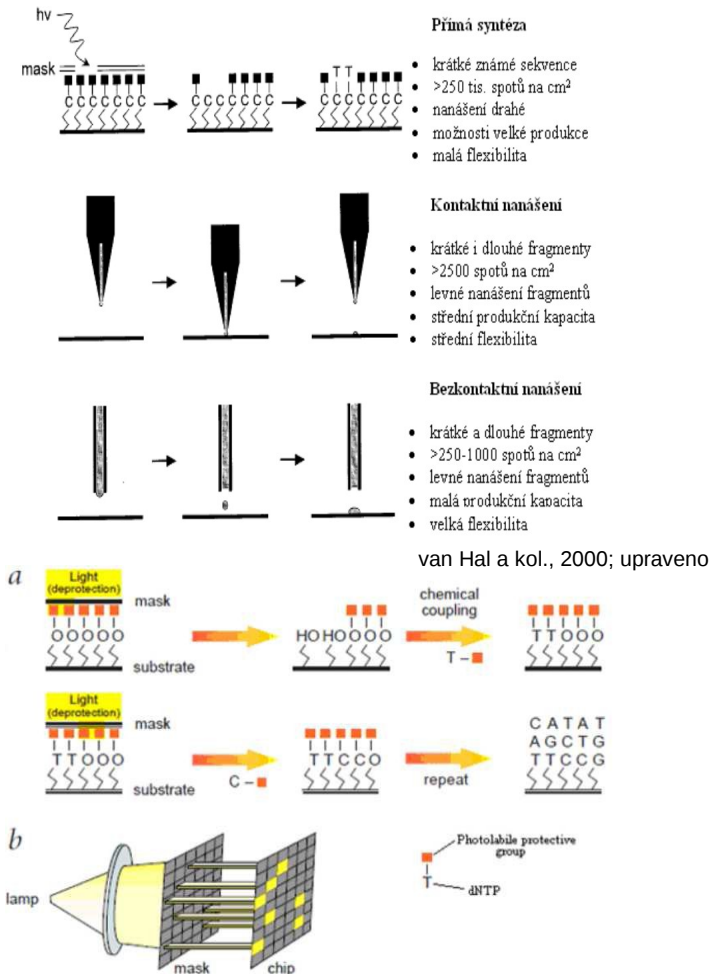
Dělení mikročipů

Podle počtu sond

- **Nízkohustotní** (desítky až stovky specifických sond, někdy označované jako tzv. „macroarray“, např. analýza specifických signálních drah)
- **Vysokohustotní** (tisíce až miliony specifických sond; většina analýz)

Podle přípravy

- **„Off chip“ - „spotované“**
 - přenesení už připravené sondy (oligonukleotidy, cDNA, BAC, atd.)
 - kontaktní a bezkontaktní
- **„On chip“ – syntetizované *in situ***
 - pouze oligonukleotidy
 - fotolitografická syntéza (Affymetrix, Roche/Nimbelegen)
 - „Ink-jet“ syntéza (Agilent)



Obr.1: a) Fotolitografická syntéza oligonukleotidů. b) Schématické znázornění lampy, masky a čipu (Lipshutz a kol, 1999; upraveno)

Dělení mikročipů



Podle značení

- fluorescence, autoradiografie, chemiluminiscence

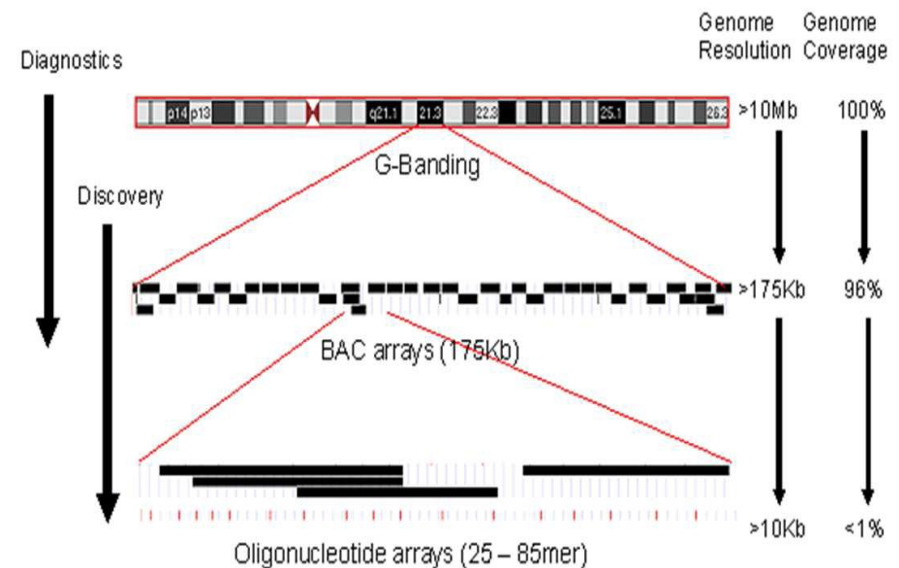


a počtu snímaných barev

- **Jednokanálové** – značení jednou barvou
- **Dvoukanálové** - kombinace dvou DNA značených odlišnými fluorochromy

Podle typu sond

- BAC, PAC
- cDNA
- **Oligonukleotidové**
 - s krátkými nebo dlouhými oligonukleotidy
 - v současnosti nejrozšířenějším typem, použitelné pro prakticky všechny aplikace



Dělení mikročipů

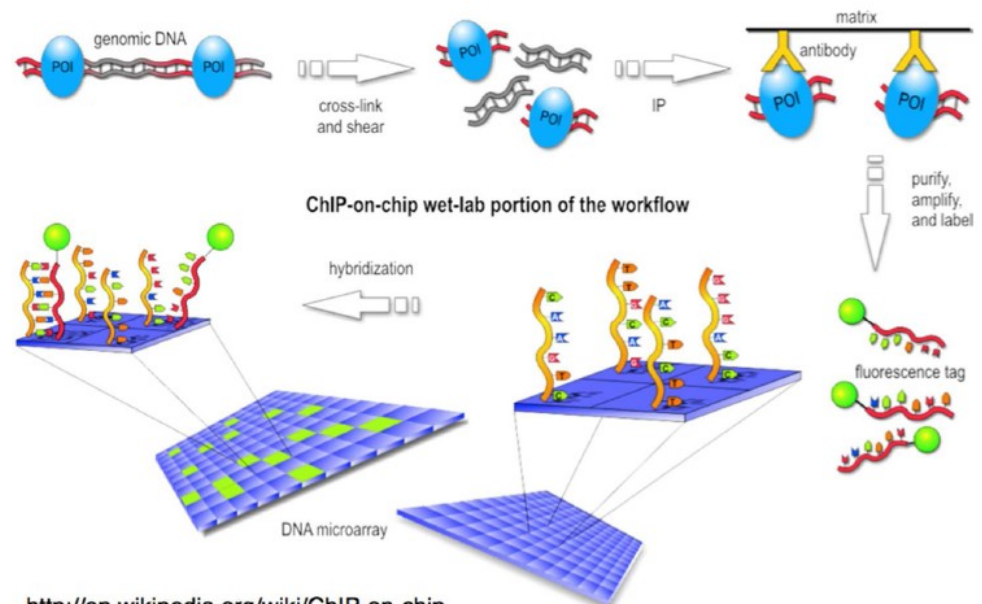
Podle aplikace

I. analýza genomu

- materiál: genomová DNA
- **array-CGH**, **SNP čipy**, resekvenační čipy

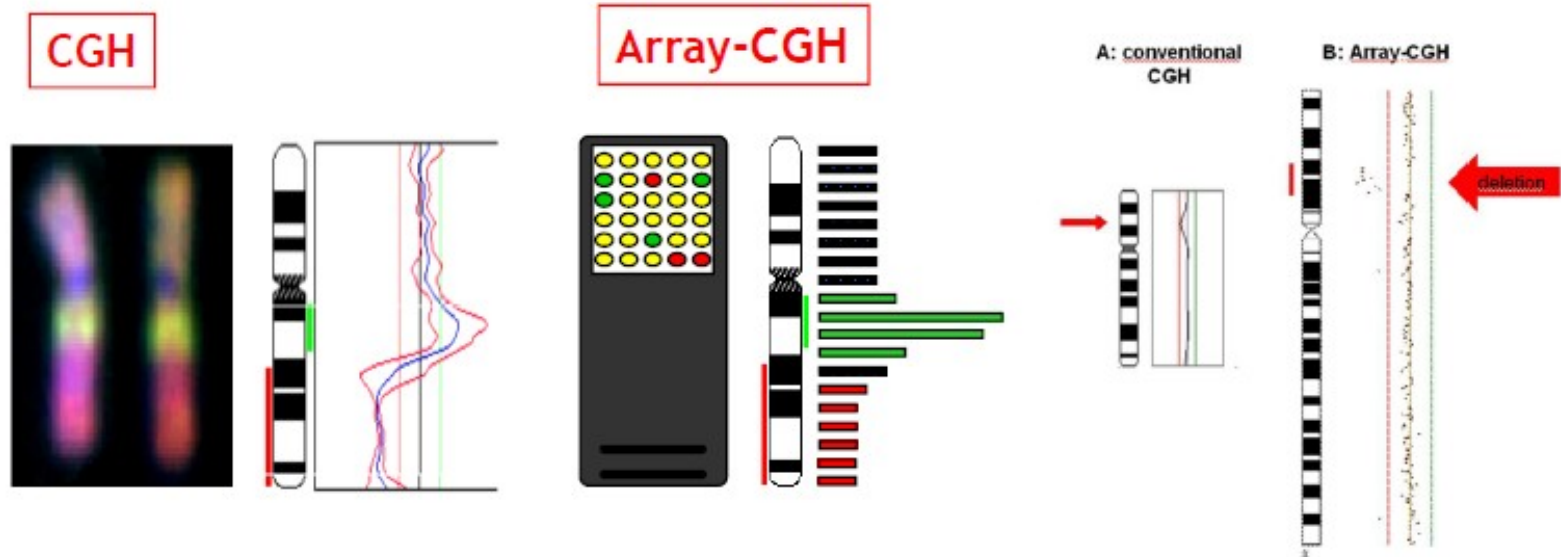
II. expresné štúdie – mRNA, proteiny

III. epigenetické štúdie - ChIP-on-Chip (vazba proteinu na DNA)



I. Array-CGH

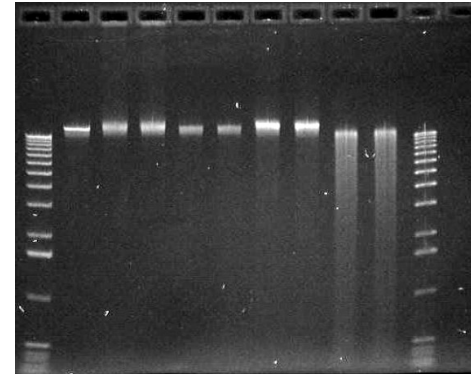
- *Solinas-Toldo a kol., 1997*
- vyháží z principu klasické (chromozomální) CGH
- nahrazení chromozomů separovanými klony (BAC, c-DNA klony, oligonukleotidy)
- duplikace, delece, amplifikace – CNV(copy number variants)
- nedetekuje balancované přestavby



Array-CGH

Postup

- Izolace DNA
- Kontrola kvality, stanovení kvantity
 - Celogenomová amplifikace
- Naštěpení DNA
- Naznačení DNA - fluorescence
- Hybridizace
- Odmytí
- Skenování
- Analýza dat



Array CGH: The Complete Process

Step 1

Patient DNA Control DNA

Step 2

Step 3

Step 4

HYBRIDIZATION

Equal hybridization DNA dosage loss DNA dosage gain

Steps 1-3 Patient and control DNA are labeled with fluorescent dyes and applied to the microarray.

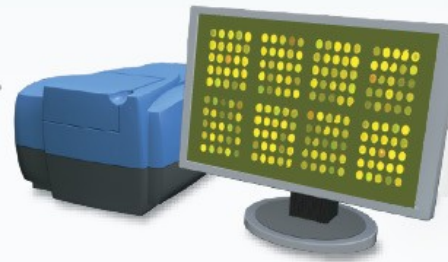
Step 4 Patient and control DNA compete to attach, or hybridize, to the microarray.

Step 5 The microarray scanner measures fluorescent signal intensity.

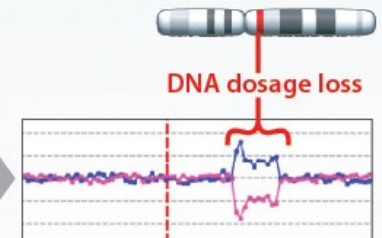
Step 6 Computer software gathers the data and generates a plot.

Step 5

Step 6



COMPUTER SOFTWARE



DATA PLOT
(Chromosome 7)

Příprava DNA čipů pro techniku array-CGH

1. Target loading



2. Assemble hybrid. chamber



3. Incubation



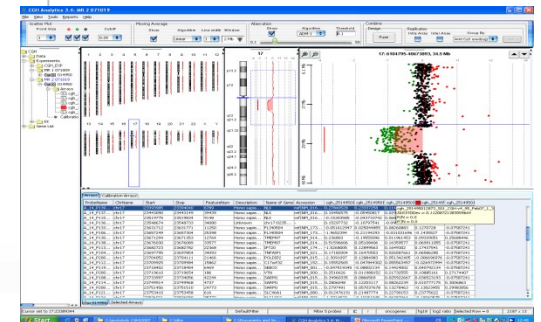
4. Wash



5. Scanning

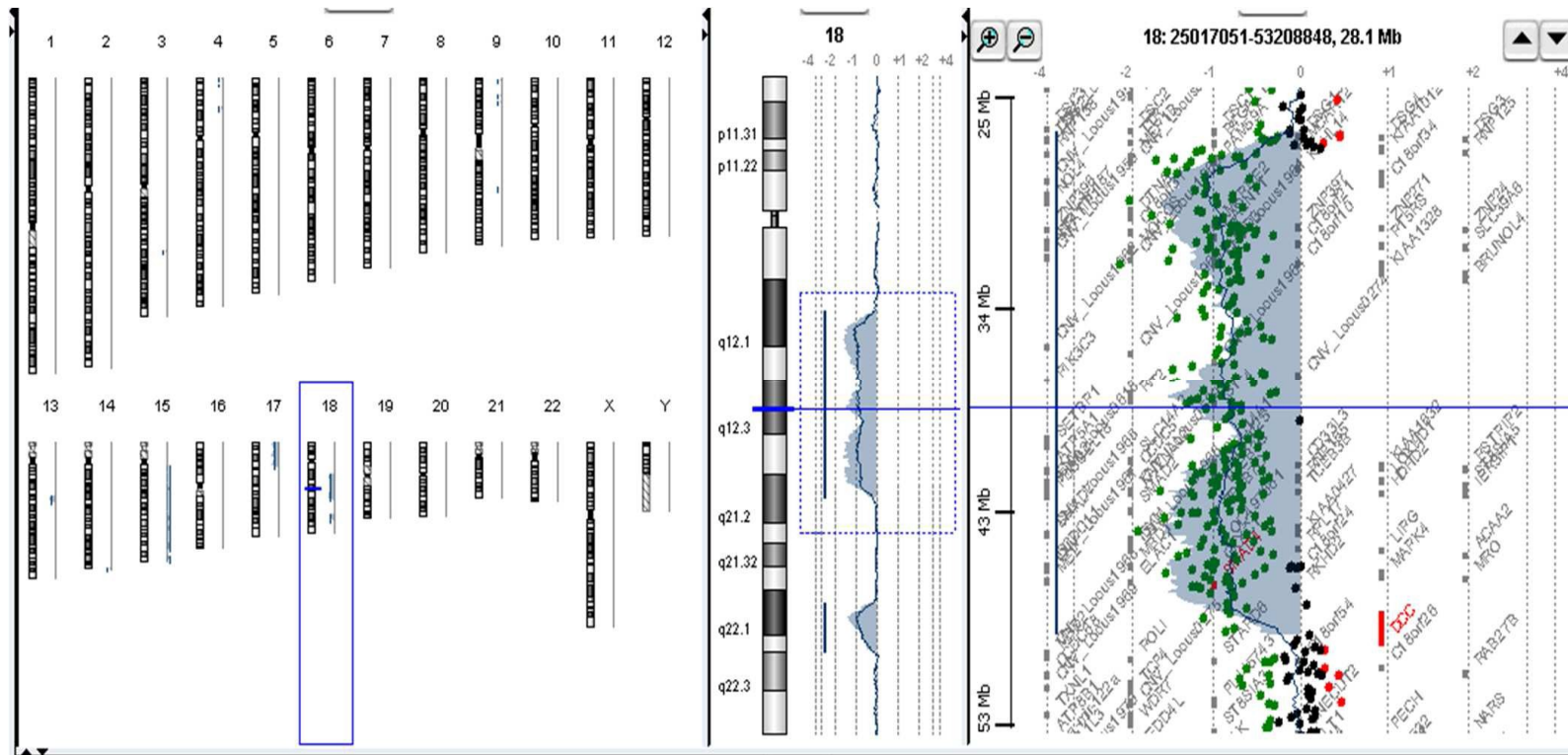


6. Analysis and interpretation



Vyhodnocování array-CGH

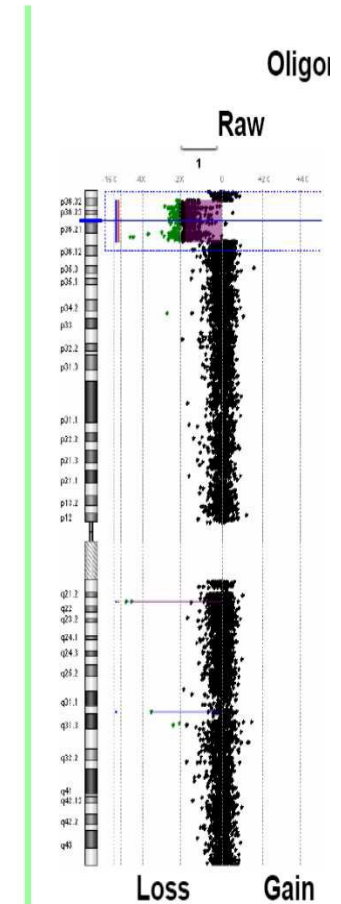
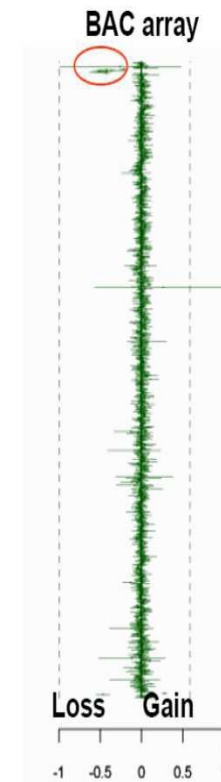
aCGH Analytics Software, Agilent Technologies



Rozlišení array-CGH

1. velikost klonů

- Úseky genomové DNA vložené do vektorů
 - BAC (Bacterial Artificial chromosome) - 50–200 kb
 - PAC (Phage Artificial chromosome) - 75-200 kb
 - Rozlišení ~ 1Mb
- cDNA - 1-2 kb
 - Pouze genové oblasti
 - Rozlišení - 1-2 kb
- Oligonukleotidy - 25-85 bazí
 - Rozlišení - pod 1 kb



Rozlišení array-CGH

2.rozložení a vzdálenost klonů

- Cílená aCGH - vybrané oblasti zájmu, např. mikrodetelece, mikroduplikace
- Chromozomově-specifická aCGH
- Celogenomová aCGH - sondy
 - v určitých intervalech
 - překrývající se - tiling arrays

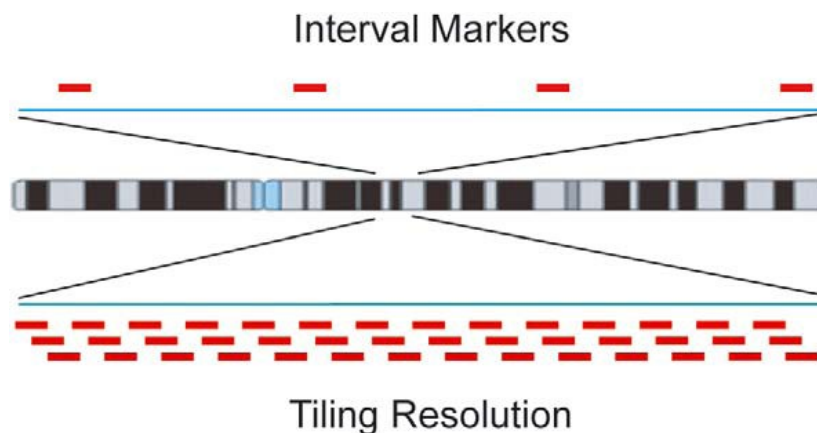
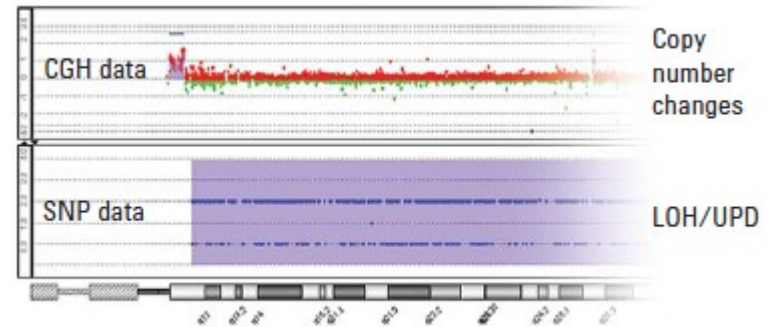
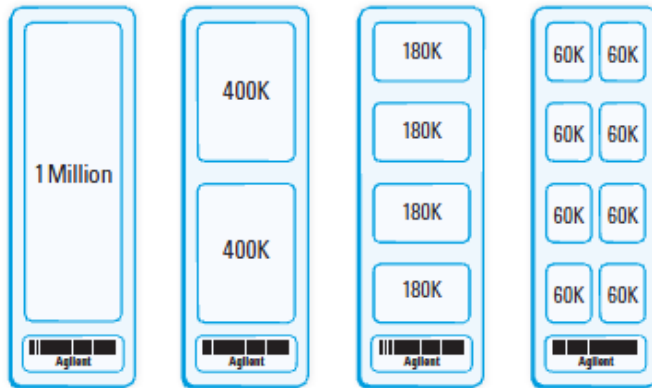


Table 1 List of genomic microarrays available

Microarray name	Coverage	Produced by
Genome-wide microarrays		
1 or 3 Mb BAC array	1 BAC clone per 1 or 3 Mb	Academia/Spectral Genomics (www.spectralgenomics.com)
32k BAC array	1 BAC clone per 95 kb	Academia
44k Oligonucleotide array	1 oligonucleotide per 70 kb	Agilent (www.agilent.com)
317k SNP array	1 SNP per 10 kb	Illumina (www.illumina.com)
385k oligonucleotide array	1 oligonucleotide per 8 kb	Nimblegen (www.nimblegen.com)
10 or 100 or 500k SNP array	1 SNP per 300 or 30 or 6 kb	Affymetrix (www.affymetrix.com)
Targeted microarrays		
SignatureChip	subtelomeres and microdeletion syndrome regions	Signature Genomics (www.signaturegenomics.com)
GenoSensor	subtelomeres and microdeletion syndrome regions	Vysis (www.vysis.com)
Chromosome microarray analysis array	subtelomeres and microdeletion syndrome regions	Baylor College of Medicine (www.bcmgeneticlabs.org)
Prenatal array	1 BAC clone per 10 Mb, higher density at microdeletion syndrome regions	Wellcome Trust Sanger Institute

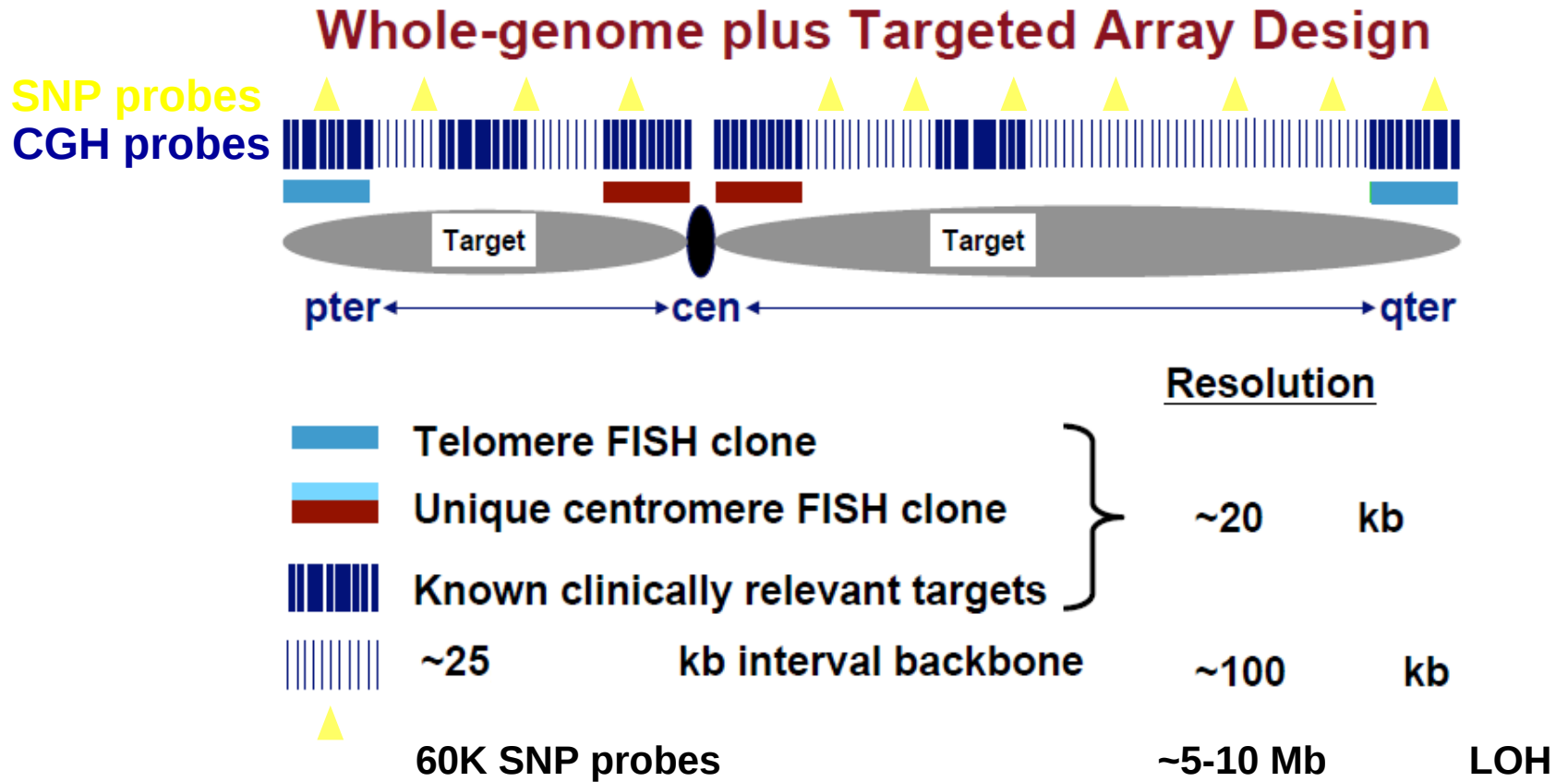
Agilent Human CGH Microarray



CGH-only

Description	Part Number	Number of targeted ISCA regions	Backbone probe density
ISCA 4x180K v2	G4826A AMADID 031748	~500	25 Kb
ISCA 8x60K v2	G4827A AMADID 031746	~500	60 Kb
ISCA 2x105K v2	G4425B AMADID 031750	~500	35 Kb
ISCA 4x44K v2	G4426B AMADID 031747	~230	75 Kb

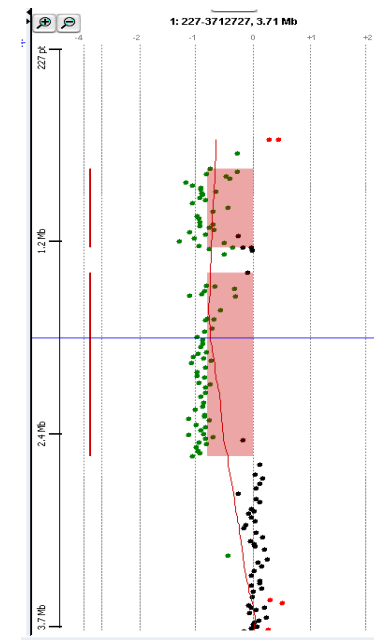
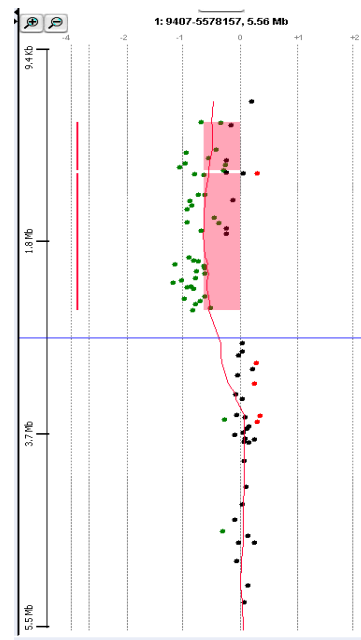
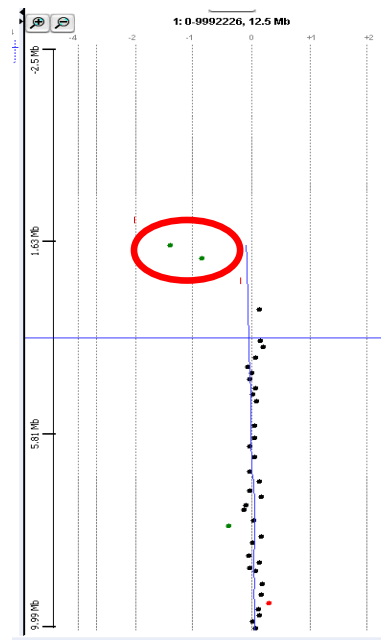
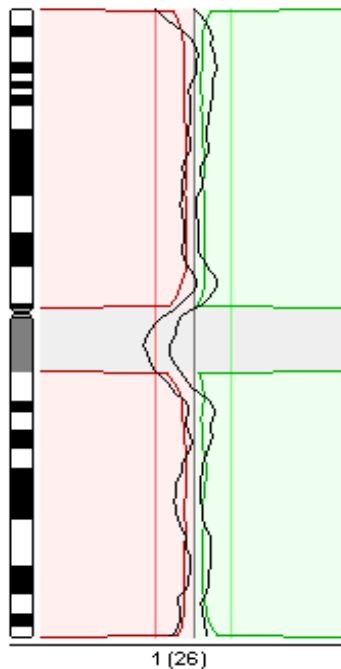
Agilent ISCA CGH+SNP Microarray



Baldwin et al., Genet Med 2008

Porovnání záchytu chrom. aberací pomocí HR-CGH a oligonukleotidových čipů – různý formát

Pacient s del(1)(p36), ~ 3,2 MB



Karyotyp normální
HR-CGH negativní

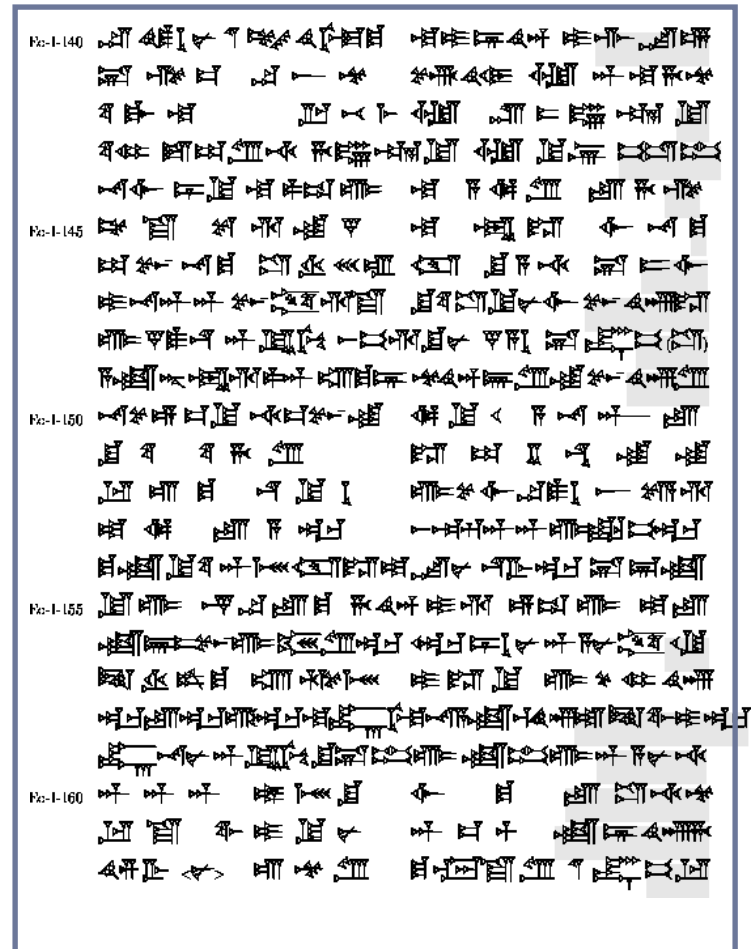
8x15K negativní

4x44K del(1)(p36)

2x105K del(1)(p36)

Array-CGH a variabilita v počtu kopií (CNVs)

- se stále se zvyšujícím rozlišením je stále obtížnější nalézt hranici mezi **benigními** (polymorfními) a **patogeními CNVs**
- získat data je **snadné**
- interpretovat výsledek je **obtížné**
- **existuje normální karyotyp?**



Array-CGH a CNVs

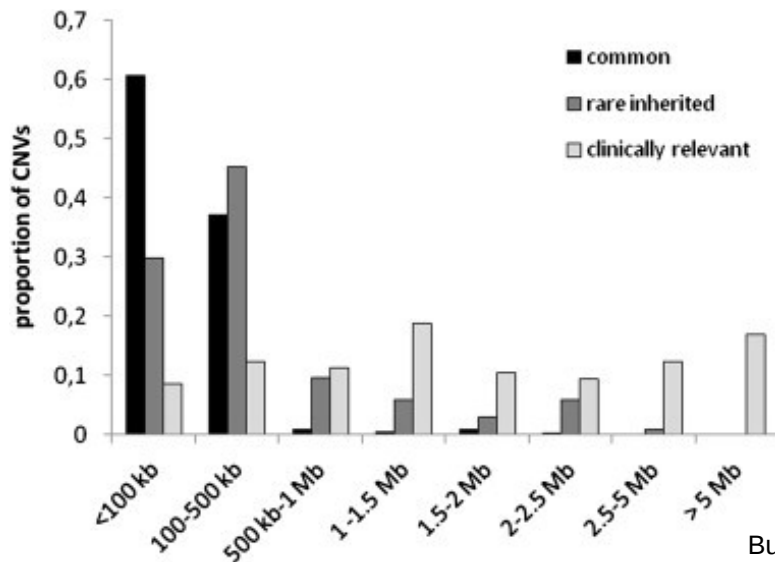
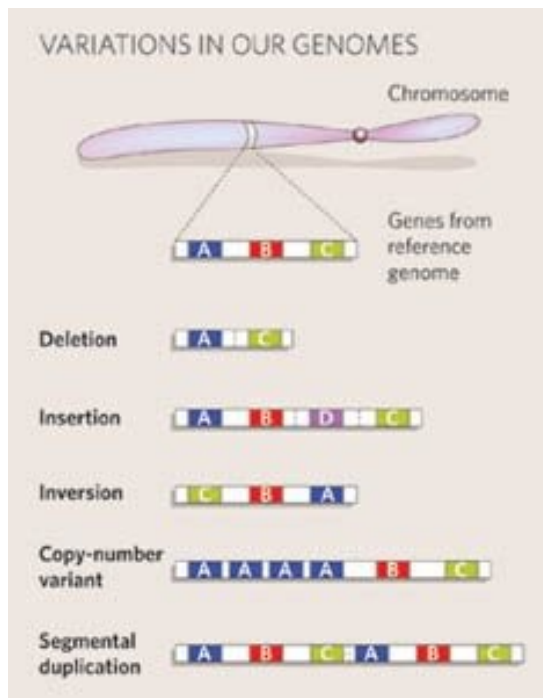
Global variation in copy number in the human genome

Richard Redon et al.: *Nature*. 2006 November 23; 444(7118): 444–454.

CNVs – segmenty DNA větší než 1 kb přítomné ve variabilním počtu kopií v porovnání s referenčním genomem

- doposud detekováno **29 133 CNV**
- **12 % lidského genomu** obsahuje CNV
- **0,12 - 7,3 % rozdíly** v CNV mezi jedinci
- **41 % všech CNV pokrývá geny**

CNV patogenní x benigní
CNV nejasného významu



Charakteristika patogenních CNVs

Výsledky 15 753 analýz array-CGH ze 7 skupin ISCA

International Standards for Cytogenomic Arrays (ISCA) Consortium

>145 members, total cases to date (Nov 26th 2011): 28,526

patogenní CNV = 2 766 (17,6 %)

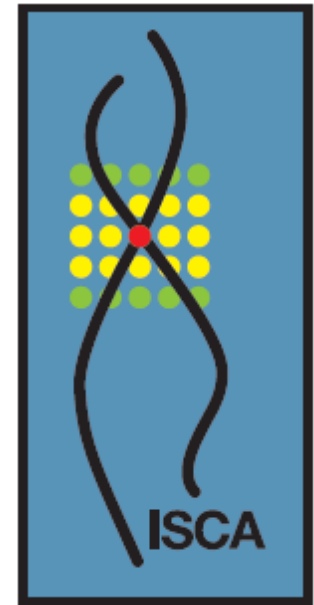
Velikost patogenních CNV:

Průměr: 6,2 Mb

Median: 2,7 Mb

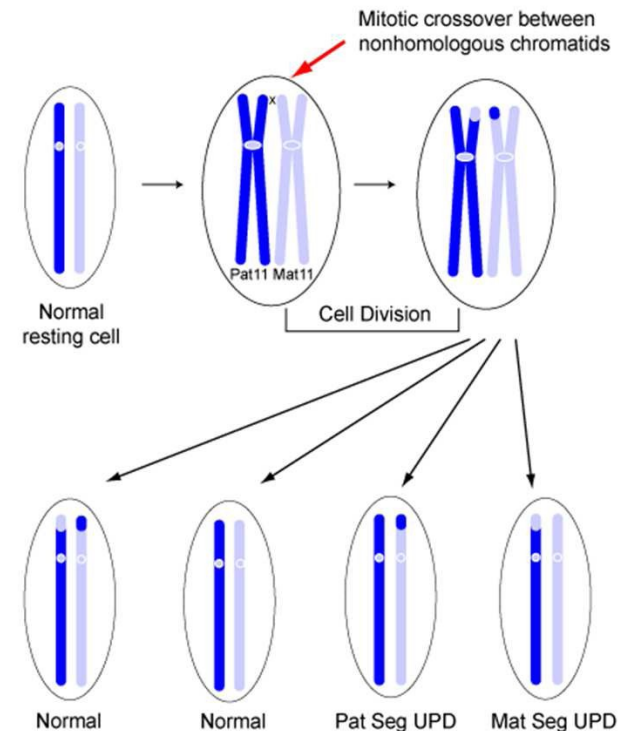
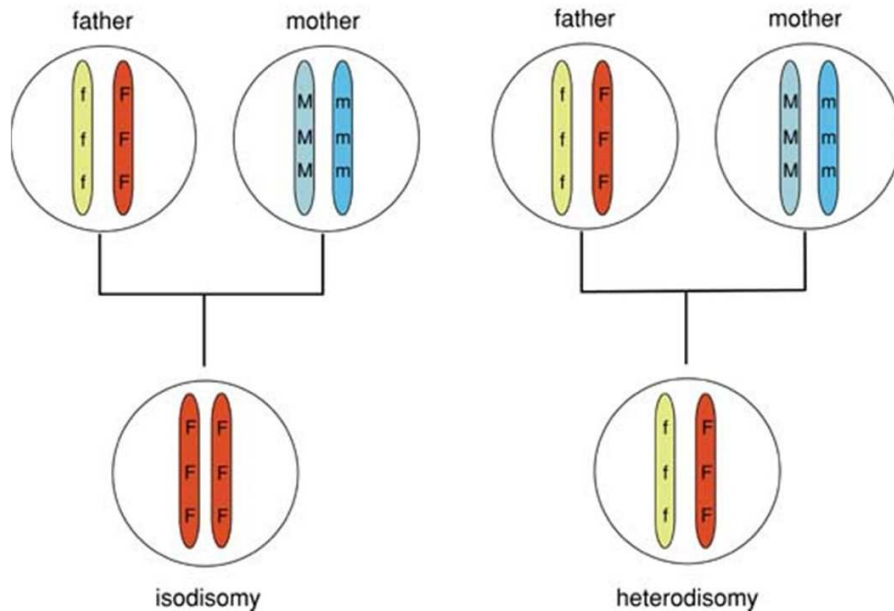
Median počtu genů: 44

Delece – 63,6 % vs. duplikace – 36,4 %

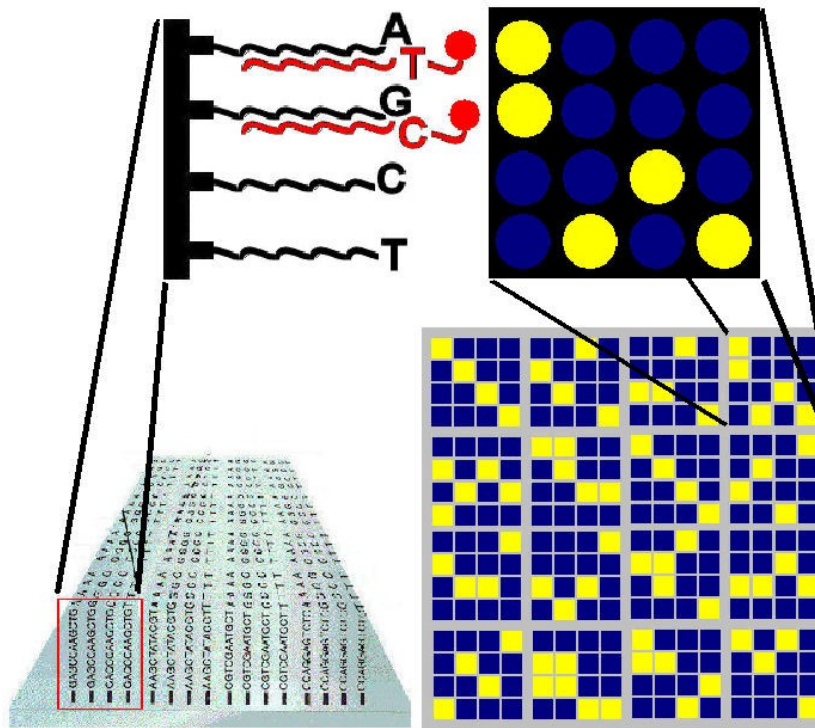


II. SNP čipy

- umožňují rozlišit nejen CNV ale i SNP
 - sondy pro detekci CNV + sondy speciálně navržené pro detekci SNP
- detekce uniparentální dizomie (UPD), ztráty heterozygotnosti (loss of heterozygosity – LOH)
- genotypizace, asociační studie



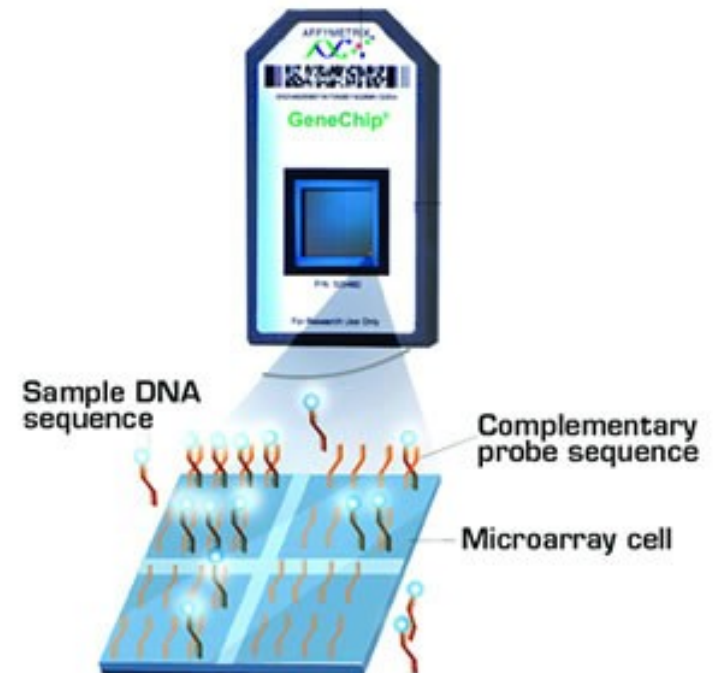
SNP čipy



The **DNA** sequences of the four **oligos** highlighted in the first bloc differ only at the last position. To determine which alleles are present, **genomic DNA** from an individual is isolated, fragmented, tagged with a fluorescent dye, and applied to the chip. The **genomic DNA** fragments anneal only to those **oligos** to which they are perfectly complementary: in this case, the allele with the **~T~ SNP** allele binds to the **~~A oligo**, and the allele with the **~C~ SNP** allele binds to the **~~G oligo**. A computer reads the position of the two fluorescent tags and identifies the individual as a **C / T heterozygote**. [The *single* spots in the other three columns indicate that the individual is *homozygous* at the three corresponding **SNP** positions].

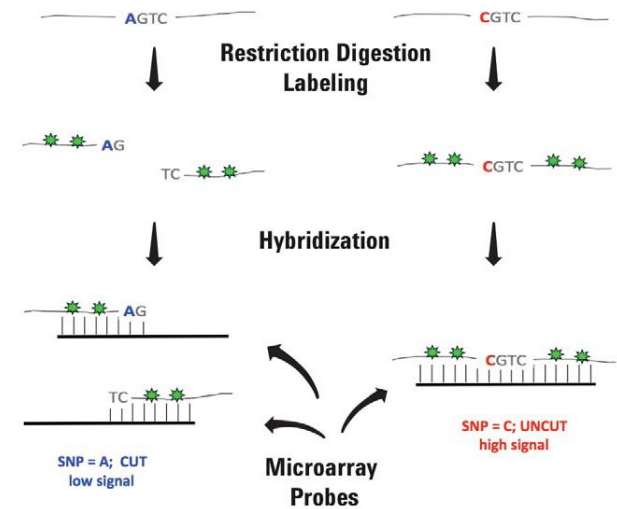
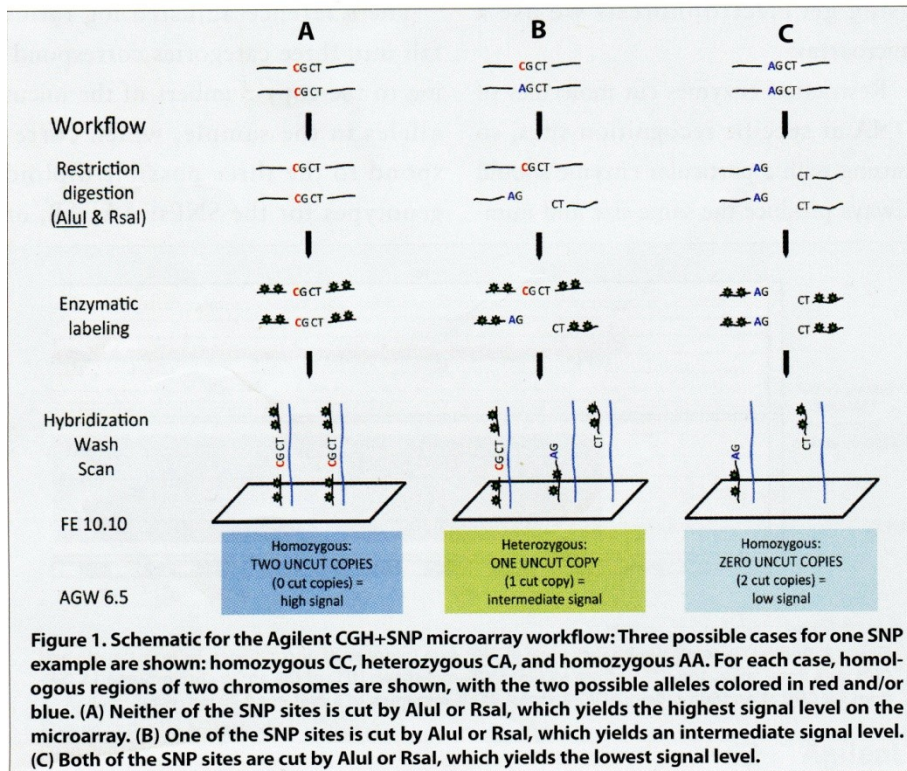
Princip SNP čipů - Affymetrix

- 25bp sondy, záměna 13. nukleotidu
- jednobarevná detekce - na čip se hybridizuje pouze označená testovaná DNA



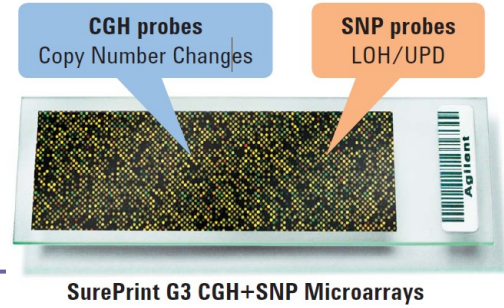
Princip SNP čipů - Agilent

- 60bp, SNPs pouze v místech rozpoznávaných restričními endonukleázami

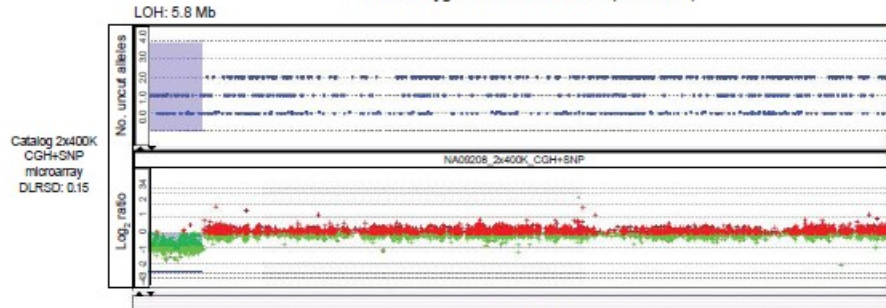


Genomic status	Genotype
Normal diploid genome	AA, AB, BB
Diploid genome with copy-neutral LOH or UPD	AA, BB
Hemizygous LOH	A, B
Amplification: e.g. trisomy	AAA, AAB, ABB, BBB

Výsledky CGH + SNP čipů

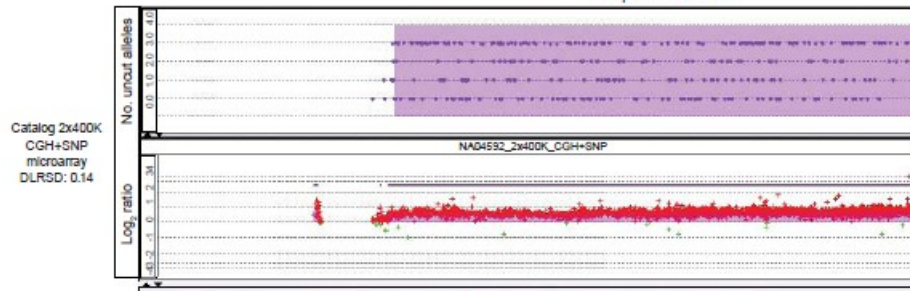


b. Hemizygous deletion Chr 17 (NA09208)

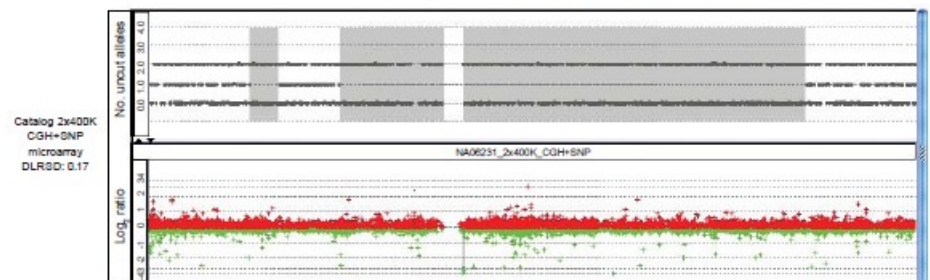


a. Trisomy Chr 21 (NA04592)

Amplification: 37 Mb



c. Consanguineous parents, eg Chr 11 (NA06231)



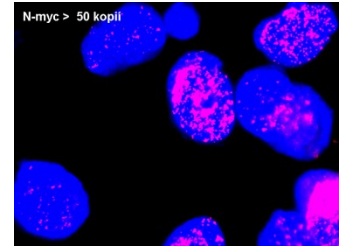
Využití arrayCGH a SNP čipů

- Nádorová genetika
- Klinická genetika
- Farmakogenomika
- Asociační studie – asociace SNP i CNV s řadou onemocnění (revmatoidní artritida, diabetes, nádorová onemocnění, psychiatrická onemocnění)
- Evoluční studie

Nádorová genetika

- identifikace specifických klonálních aberací postihujících jednotlivé typy nádorů
- bližší upřesnění chromosomových oblastí obsahujících onkogeny či tumor supresorové geny
- kvantifikace celkové chromosomové nestability genomu nádorových buněk
- studium genetických změn při vývoji nádorů

Neuroblastom



- pevný dětský nádor sympatického nervového systému
- 5–10 případů /10⁶ dětí/rok
- 10 % rakoviny v dětském věku; 50 % do 2 let; 90 % do 6 let
- klinická stádia (1,2 / 3,4; 4S) (International Staging System for Neuroblastoma)

G.M.Brodeur et al., 1995: Molecular Basis for Heterogeneity in Human Neuroblastomas

Charakteristika	TYP I (LR)	Typ II (IMR)	TYP III (HR)
N-myc	normální	normální	amplifikováno
1p36 LOH	ne	±ano	obvykle ano
Ploidie	hyper2n / 3n	2n / 4n	2n / 4n
Věk*	obvykle < 1rok	obvykle = 1 rok	obvykle 1-5 let
Stadium°	obvykle 1, 2, 4s	obvykle 3, 4	obvykle 3, 4
Pravděpodobnost přežití 3 roky	95%	25-50%	< 5%

* v době stanovení diagnózy
• International Staging System for Neuroblastoma

Význam array CGH u dětských pacientů s neuroblastomem

VOLUME 27 · NUMBER 7 · MARCH 1 2009

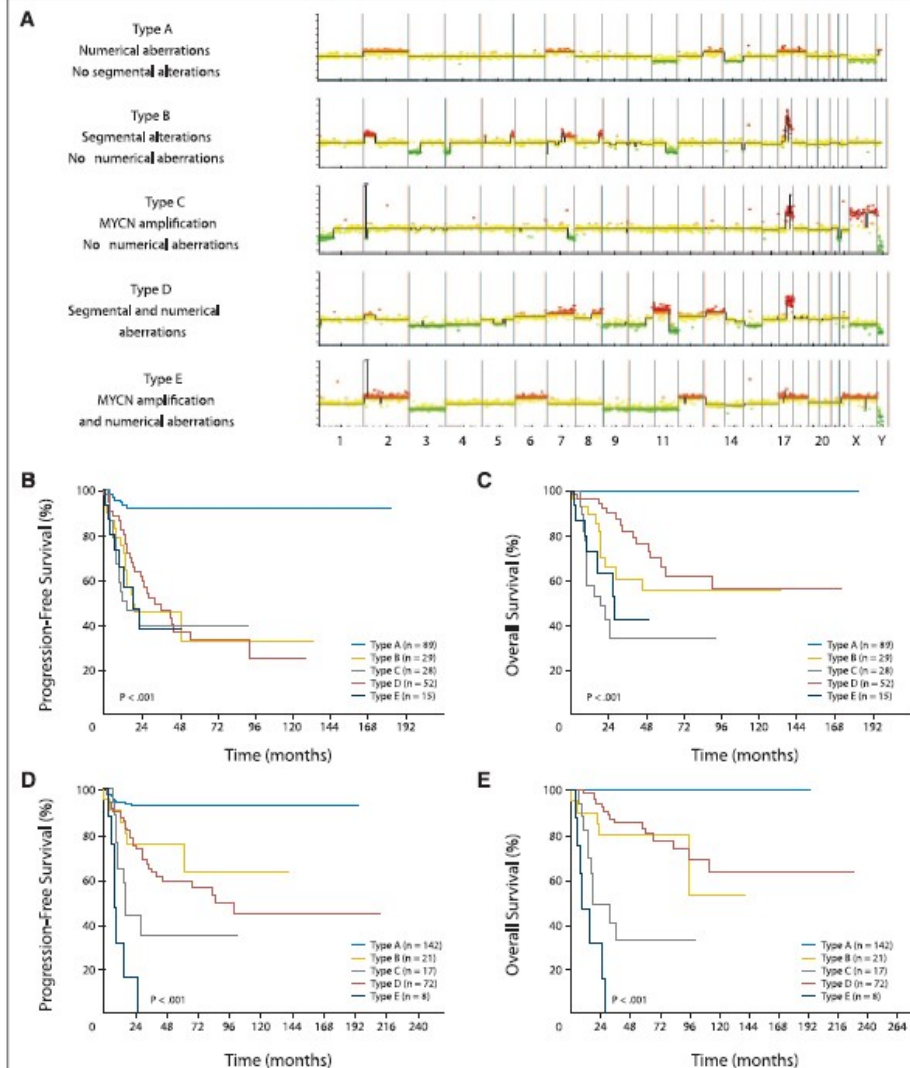
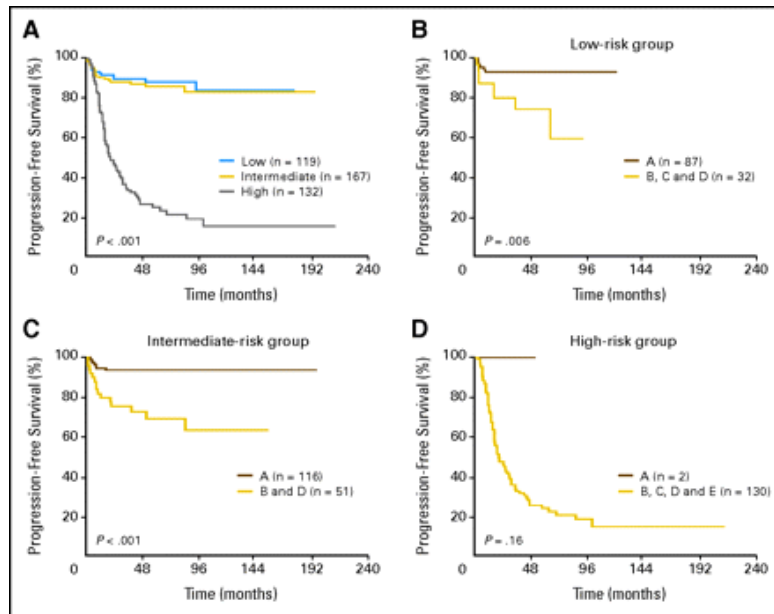
JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY

ORIGINAL REPORT

Overall Genomic Pattern Is a Predictor of Outcome in Neuroblastoma

Isabelle Janoueix-Lorosey, Gudrun Schleiermacher, Evi Michels, Véronique Mosseri, Agnès Ribeiro, Delphine Lequin, Joëlle Vermeulen, Jérôme Couturier, Michel Peuchmaur, Alexander Valent, Dominique Plantaz, Hervé Rubie, Dominique Valteau-Couanet, Caroline Thomas, Valérie Combaret, Raphaël Rousseau, Angelika Eggert, Jean Michon, Frank Speleman, and Olivier Delattre

From L'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U830, Laboratoire de Génétique et Biologie des Cancers; Institut Curie, Département de Pédiatrie; Service de Biostatistiques, Unité de Génétique Somatique, and Unité de Cytogénétique; Hôpital Robert Debré, Service de Pathologie, Paris; Institut Gustave Roussy, Département de Biologie et de Pathologie Médicales, Service de Pathologie Moléculaire; Département de Pédiatrie, Villejuif; Centre Hospitalier Universitaire, Service Hématologie Infantile, Grenoble; Hôpital des Enfants, Unité d'Hémo-Oncologie Pédiatrique.



Klinická genetika

Postnatální genetika

- hledání příčin u pacientů s MR, VVV, dysmorfickými črtami a normálním anebo zdanlivě balancovaným karyotypem
- definování a upřesnění mikrodelečních/mikroduplikačních syndromů
- původ nadbytečného materiálu, marker chromozomů ...

Prenatální a preimplantační genetika

- detekce aneuploidií
- díky celogenomové amplifikaci i určování změn v blastomerách nebo polárních tělískách

ORIGINAL ARTICLE

Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features

C Shaw-Smith*, R Redon*, L Rickman*, M Rio, L Willatt, H Fiegler, H Firth, D Sanlaville, R Winter, L Colleaux, M Bobrow, N P Carter

Nucleic Acids Research, 2006, Vol. 34, No. 9 e68
doi:10.1093/nar/gkl336

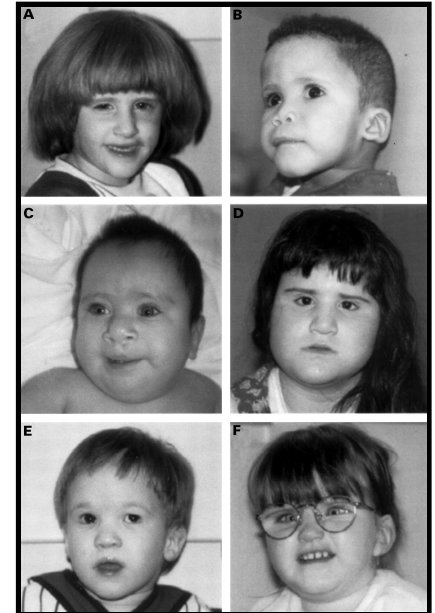
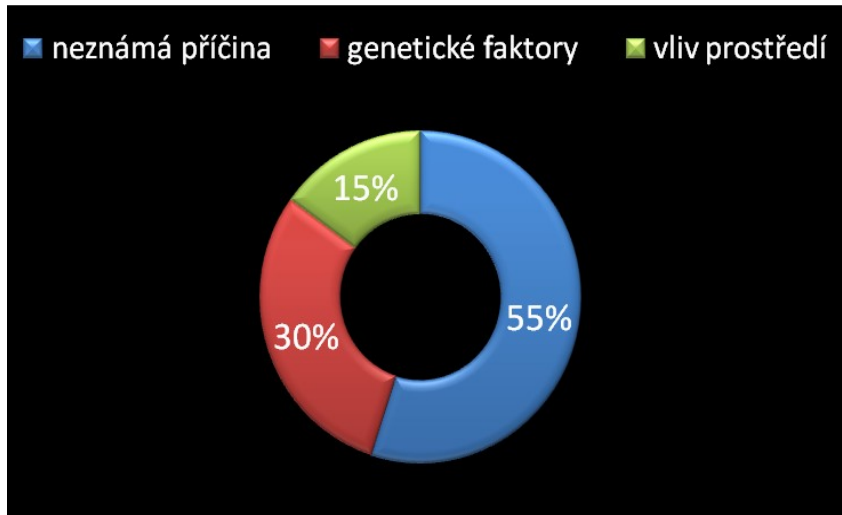
Single-cell chromosomal imbalances detection by array CGH

Cedric Le Caignec^{1,2}, Claudia Spits², Karen Sermon², Martine De Rycke², Bernard Thienpont¹, Sophie Debrock⁴, Catherine Staessen², Yves Moreau³, Jean-Pierre Fryns¹, Andre Van Steirteghem², Inge Liebaers² and Joris R. Vermeesch^{1,*}

¹Center for Human Genetics, University Hospital Gasthuisberg, Leuven, Belgium, ²Research Centre Reproduction and Genetics, University Hospital and Medical School, Vrije Universiteit Brussel, Brussels, Belgium, ³ESAT-SISTA, K.U. Leuven, Leuven, Belgium and ⁴Leuven University Fertility Center, University Hospital Gasthuisberg, Leuven, Belgium

Mentální retardace (MR)

- Výskyt MR u 2-3 % populace



- 17- 20% pacientů s idiopatickou MR →
kauzální nebalancované aberace →
celogenomový screening pomocí array-CGH

Význam array CGH u pacientů s MR a/nebo VVV

REVIEW

Array CGH in patients with learning disability (mental retardation) and congenital anomalies: updated systematic review and meta-analysis of 19 studies and 13,926 subjects

Surdeep S. Sagoo, MSc, PhD¹, Adam S. Butterworth, BA, MSc², Simon Sanderson, MRCP, FFPH³, Charles Shaw-Smith, MA, PhD⁴, Julian P. T. Higgins, BA, PhD¹, and Hilary Burton, MA, FFPH³

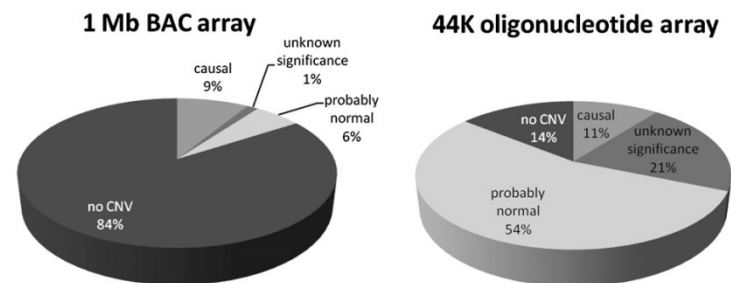
Table 2 Genetic abnormalities identified by array CGH in idiopathic learning disability and congenital anomalies

Author (year)	Resolution	Patients	Patients with noncausal abnormality	False-positive yield (%)	Patients with casual abnormality	Diagnostic yield (%)
Vissers et al. (2003)	1 Mb	20	1	5.0	2	10.0
Shaw-Smith et al. (2004)	1 Mb	50	5	10.0	7	14.0
de Vries et al. (2005)	50 Kb	100	5	5.0	10	10.0
Schoumans et al. (2005)	1 Mb	41	NS ^a	NS ^a	4	9.8
Menten et al. (2006)	1 Mb	140	9	6.4	19	13.6
Miyake et al. (2006)	1.4 Mb	30	20	66.7	5	16.7
Rosenberg et al. (2006)	1 Mb	81	7	8.6	13	16.0
Sharp et al. (2006)	Targeted	290	7	2.4	16	5.5
Aradhya et al. (2007)	35 Kb	20	3	15.0	7	35.0
Baris et al. (2007)	1 Mb	234	12	5.1	13	5.6
Baross et al. (2007)	30 Kb	100	1	1.0	11	11.0
Engels et al. (2007)	0.5 Mb	60	1	1.7	6	10.0
Fan et al. (2007)	30–35 Kb	100	1	1.0	15	15.0
Lu et al. (2007)	Targeted	2444	231	9.5	171	7.0
Shaffer et al. (2007)	Targeted	8789	445	5.1	604	6.9
Shen et al. (2007)	35 Kb	211	9	4.3	16	7.6
Thureson et al. (2007)	1 Mb	48	2	4.2	3	6.3
Wagenstaller et al. (2007)	23.6 Kb	67	13	19.4	11	16.4
Pickering et al. (2008)	1 Mb	1101	47	4.3	86	7.8

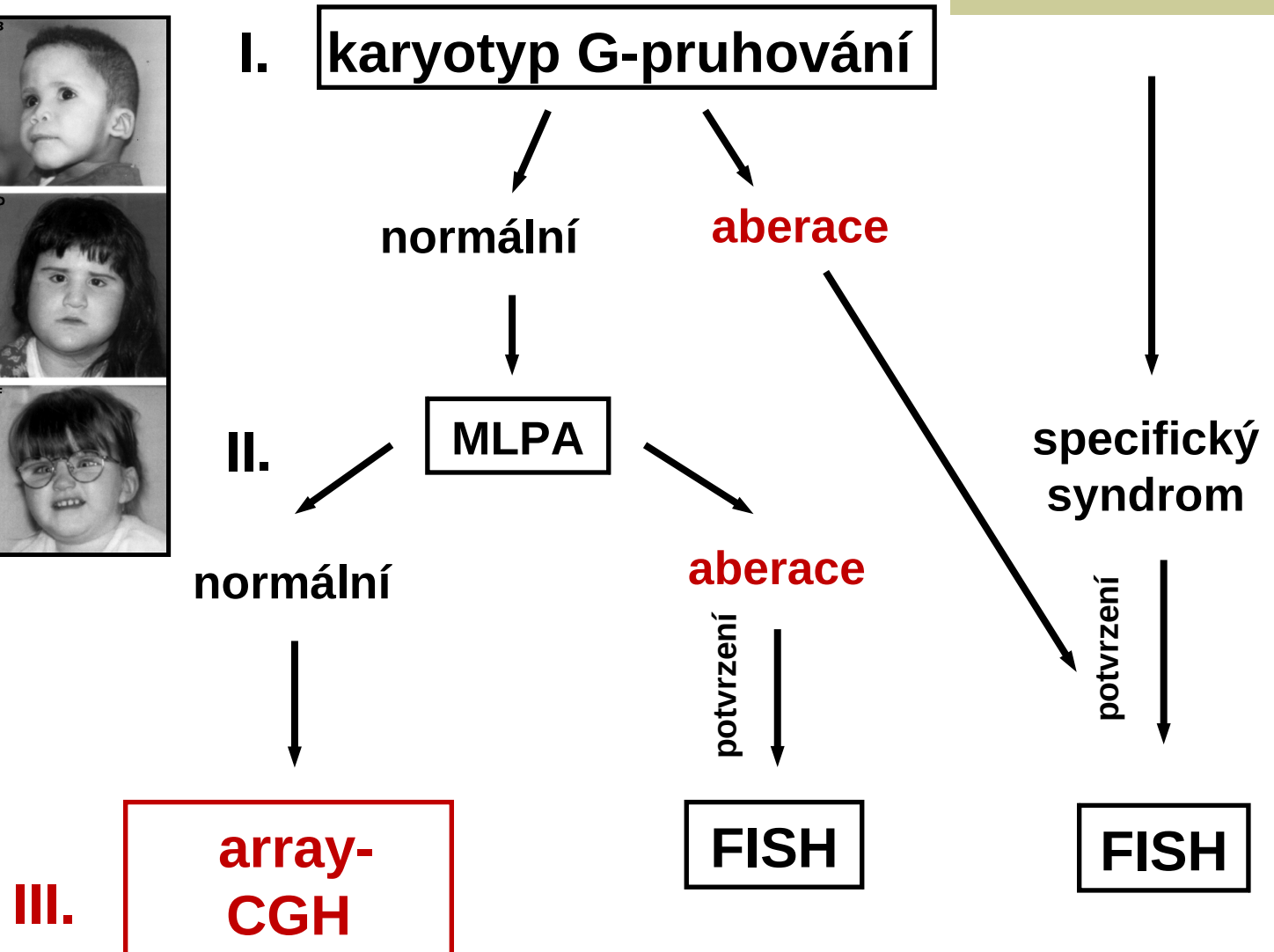
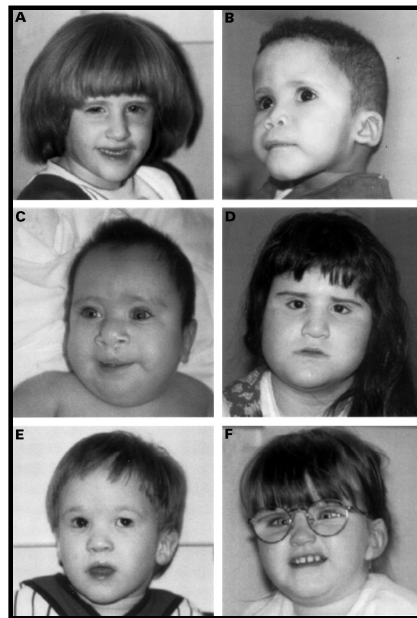
^aNot stated: a total of 151 copy number polymorphisms (CNP) detected in the cohort; number of patients with CNPs not stated.

Záchyt CNVs pomocí array CGH u pacientů s MR/VVV závisí na:

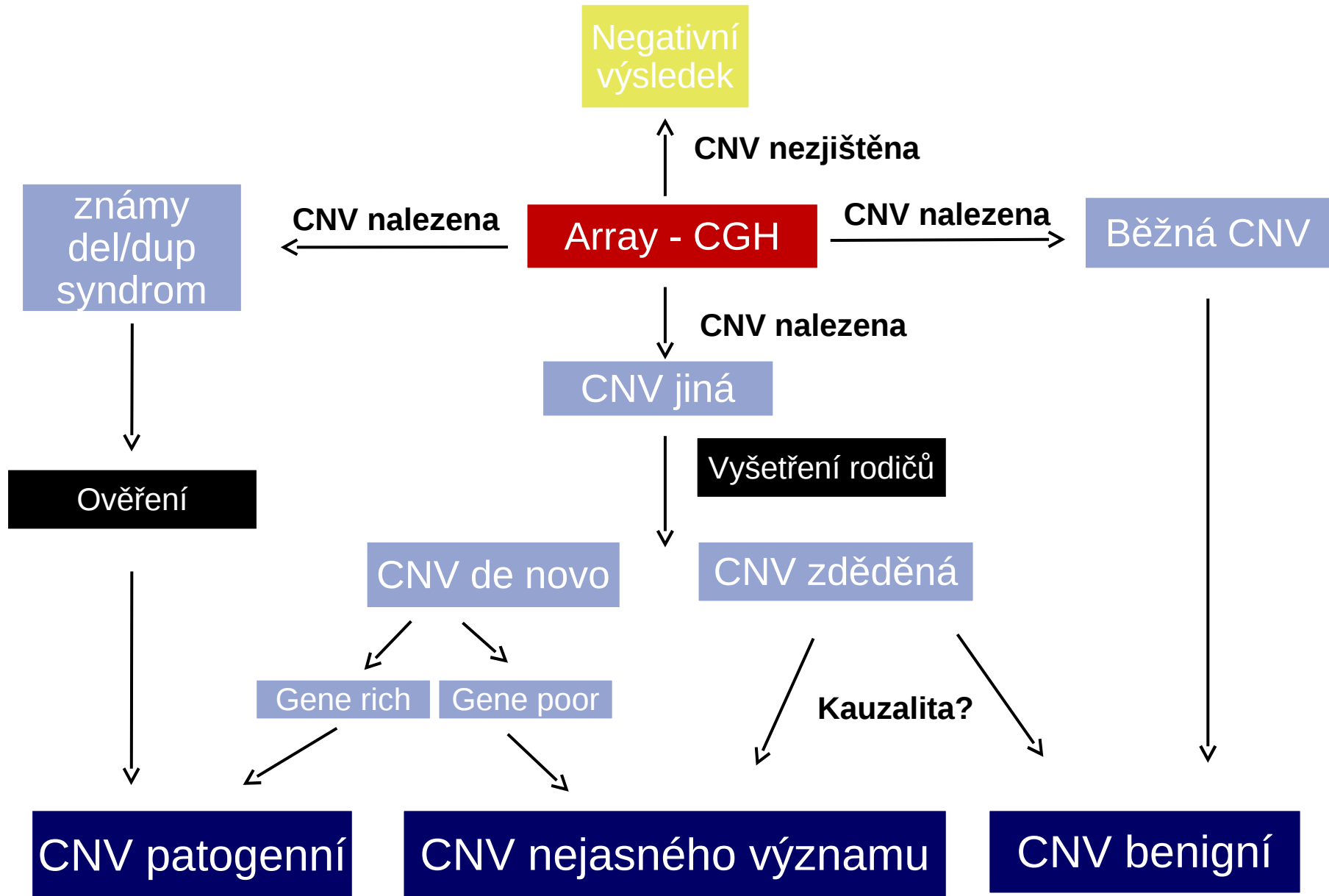
- typu čipu, rozlišení
- pokrytí známých syndromů
- kritériích výběru pacientů



Vyšetřovací postup u pacientů s MR a VVV na OLG FN Brno



Používaný algoritmus vyšetření pomocí aCGH



Interpretace CNV nalezených pomocí array-CGH v klinické genetice – rozhodovací kritéria

Risk assessment of CNVs



Major Criteria	Characteristic of Pathogenic CNVs	Characteristic of Benign CNVs
1 a CNV is inherited from a healthy parent b CNV is inherited from an affected parent	X	X
2 a CNV is similar to a CNV in a healthy relative b CNV is similar to a CNV in an affected relative	X	X
3 a CNV overlaps a genomic imbalance in DGV b CNV overlaps a genomic imbalance in Decipher or ECARUCA	X	X
4 CNV contains morbid OMIM genes	X	
5 a CNV is gene rich b CNV is gene poor	X	X

Minor Criteria	Characteristic of Pathogenic CNVs	Characteristic of Benign CNVs
1 a CNV is a deletion b CNV is a homozygous deletion	X X	
2 a CNV is a duplication b CNV is an amplification	X	X
3 CNV is > 3 Mb in size	X	
4 CNV is devoid of know regulatory elements		X

Array-CGH u pacientů s MR - korelace genotypu s fenotypem

Využití web. databází k interpretaci výsledků

- **DECIPHER**

- **ISCA**

- **ECARUCA**

- **GENOGLYPHIX**

- **CARTAGENIA BENCH**



All tomorrow's genomes

Array-CGH u pacientů s MR - korelace genotypu s fenotypem

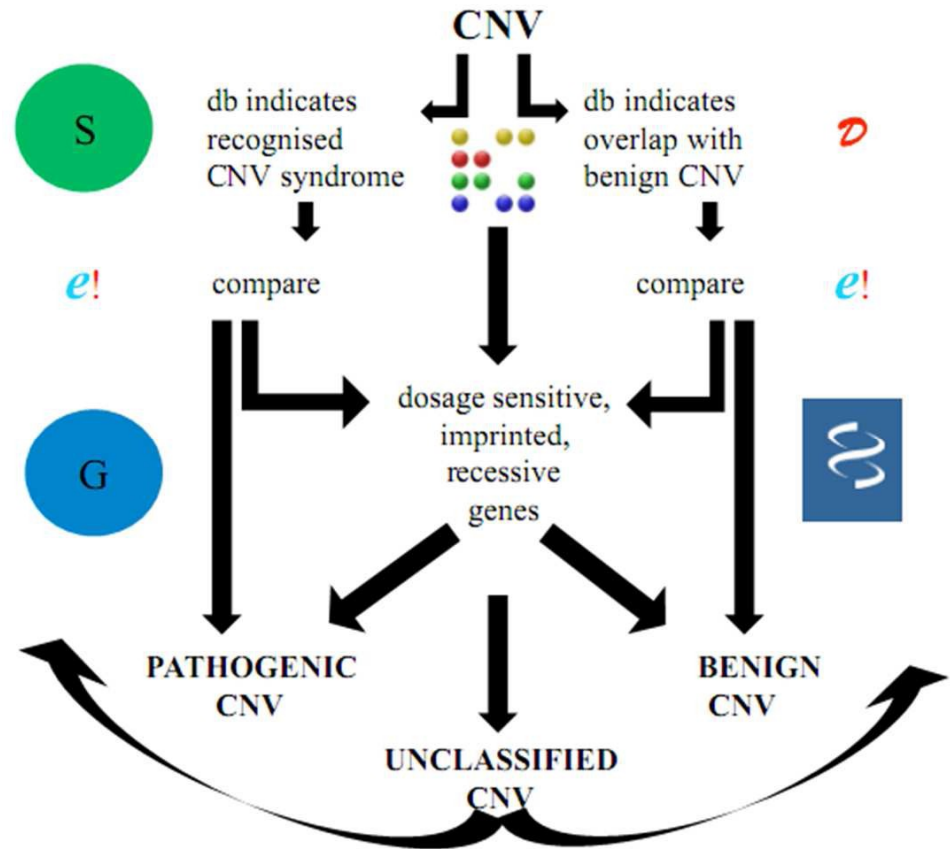
Databáze jsou důležité pro:

- **klinickou interpretaci výsledků array-CGH**
- **identifikaci kauzálních regionů pro nové chromozomové syndromy**
- **možnost vyhledat stejnou či podobnou aberaci a srovnat fenotypové projevy**
- **možnost rozlišení benigních CNVs**
- **odhad prognózy dle typu a funkce genů nacházejících se v sledované oblasti**

Interpretace array CGH

Vždy v kontextu

- s fenotypem pacienta
- s vyšetřením rodičů
- s databázemi



Molekulární karyotypování aneb soumrak konvenční cytogenetiky v éře DNA mikročipů?

Current controversies in prenatal diagnosis 3: is conventional chromosome analysis necessary in the post-array CGH era?†

The-Hung Bui¹, Annalisa Vetro^{2,3}, Orsetta Zuffardi^{2,3} and Lisa G. Shaffer^{4*}

¹The Karolinska Institute, Center For Molecular Medicine & Surgery, Clinical Genetics Unit, Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden

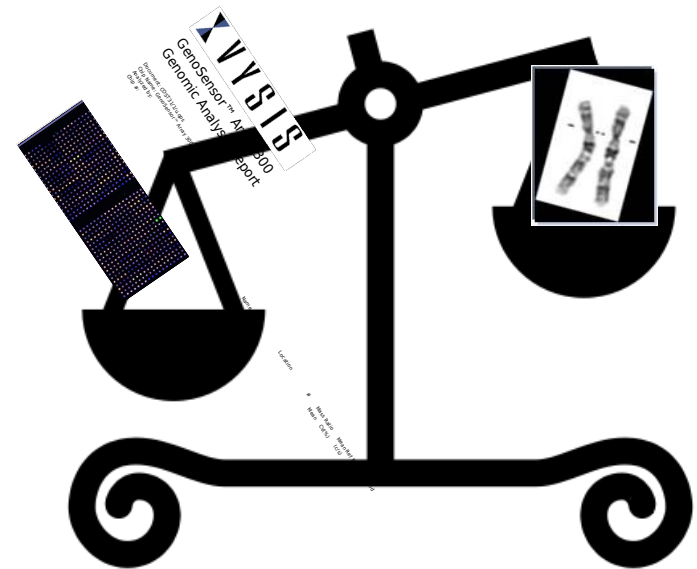
²Genetica Medica, University of Pavia, Pavia, Italy

³IRCCS, Fondazione C. Mondino, Pavia, Italy

⁴Signature Genomic Laboratories, Spokane, WA 99207, USA

Prenatal Diag. 31, 235,2011

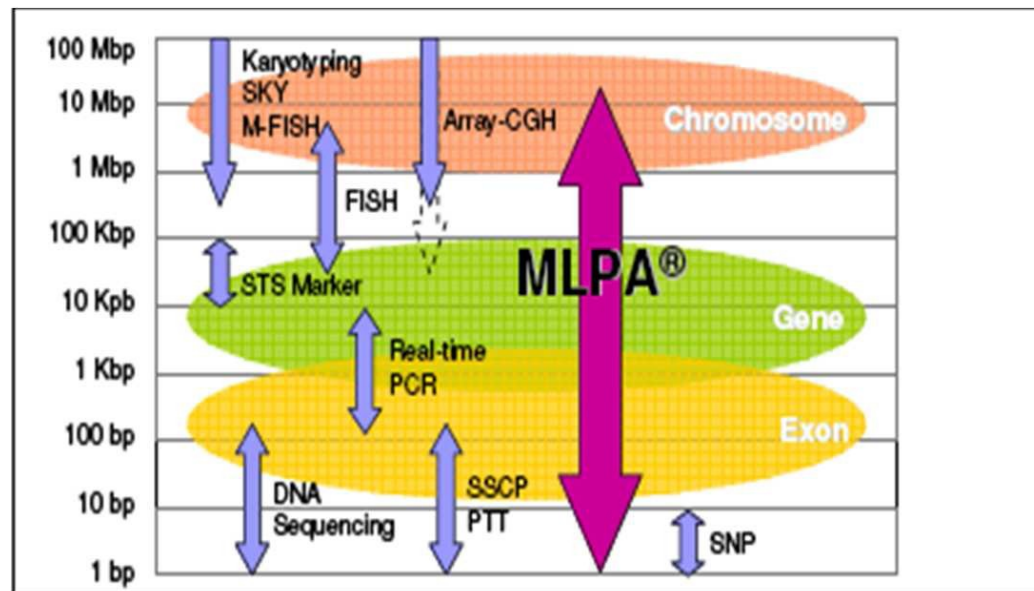
The questions that need to be answered are: Is microarray analysis sufficient for the detection of cytogenetic abnormalities?
Is there still a role for karyotyping and FISH in this new era of cytogenetics ?



Moderní metody analýzy genomu: MLPA

MLPA - Multiple Ligation-dependent Probe Amplification

- rychlá, jednoduchá, relativně levná metoda založena na PCR
 - poprvé popsaná v roce 2002, Schouten JP et al., *Nucleic Acids Res.*
 - publikováno už více jak 750 článků na různá témata využívajících MLPA
 - rutinně se dělá ve více než 800 laboratořích v 80 krajínách
- MLPA mixy jsou dostupné pro více než **250 různých aplikací**



MLPA

- jedná se o speciální formu multiplex PCR, při které se amplifikují MLPA sondy a ne zkoumaná DNA;
- detekuje změny počtu kopií až 50 specifických sekvencí v jedné PCR reakci;
- dokáže odlišit sekvence lišící se v jediném nukleotide;
- vyžaduje minimum DNA (20 ng (3000 buněk));
- identický protokol pro různé aplikace;
- všechny potřebné reagenty jsou součástí kitu; nevyhnutné vybavení je běžnou součástí všech molekulárně-biologických laboratoří.



Princip MLPA

- pro každé cílové místo vstupuje do reakce sonda sestávající ze dvou oligonukleotidů; jeden je syntetický, druhý derivovaný z M13 fága;
- oba oligonukleotidy obsahují hybridizační sekvenci specifickou pro dané cílové místo, oligonukleotid z M13 fága navíc nehybridizující sekvenci o různé délce pro každou sondu; všechny sondy mají na koncích stejný PCR primer;
- po hybridizaci sond k cílovým sekvencím a jejich následné ligaci, je vytvořena kopie každé cílové sekvence ve studovaném vzorku;
- k ligaci dojde jedině když oba oligonukleotidy perfektně hybridizují k cílové sekvenci;
- všechny zligované sondy jsou současně amplifikovány v multiplexní PCR reakci použitím jednoho páru PCR primerů;
- naamplifikované produkty dosahují díky různé délce sond velikost 130– 490 bp a jsou analyzovány pomocí kapilární elektroforézy; počty kopií cílových sekvencí jsou určeny porovnáním s kontrolním vzorkem

Princip MLPA – příprava sond

**Syntetický oligonukleotid
50-60 bp**

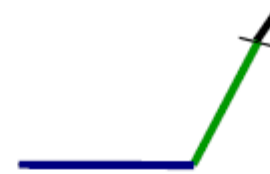
PCR primer Y



Hybridizační sekvence

**M13-derivovaný oligonukleotid
60-450 bp**

PCR primer X

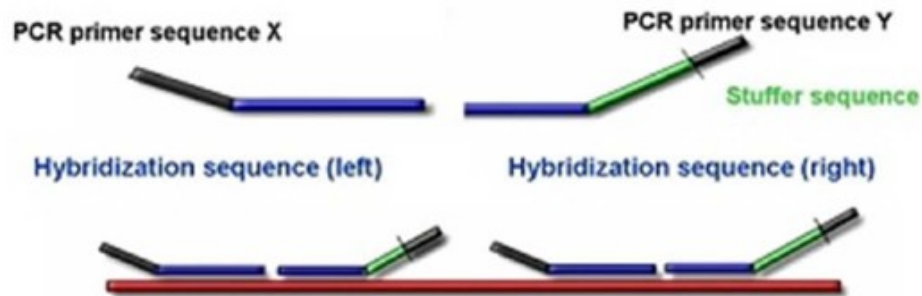


vložená sekvence
(odlišná pro každou
sondu)

Hybridizační sekvence

Princip MLPA

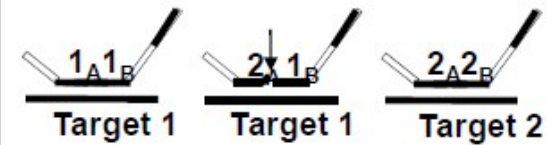
1. Denaturation and Hybridization



2. Ligation



No ligation of mismatched probes



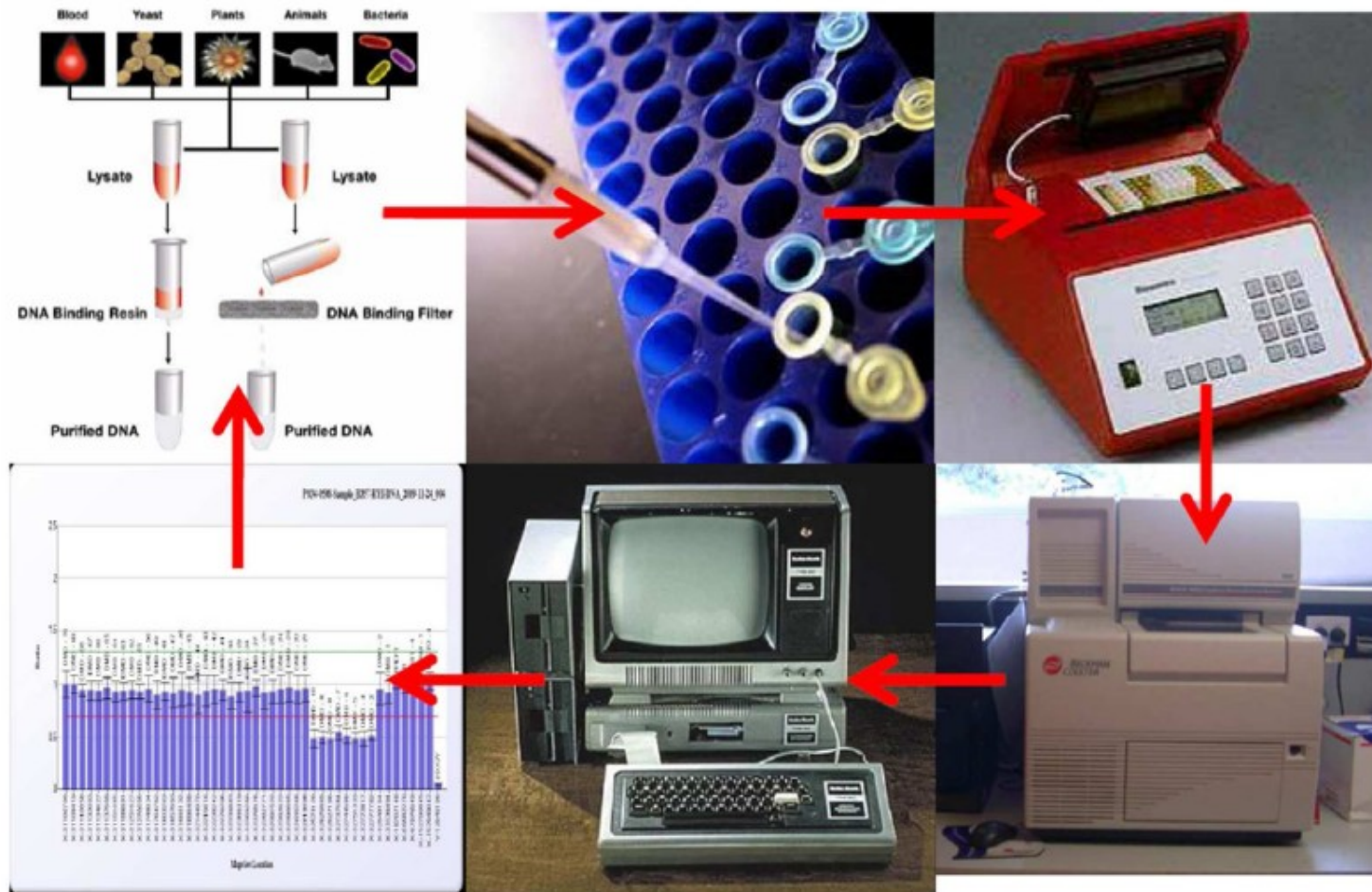
3. PCR with universal primers X and Y

exponential amplification of ligated probes only



130 – 480 bp

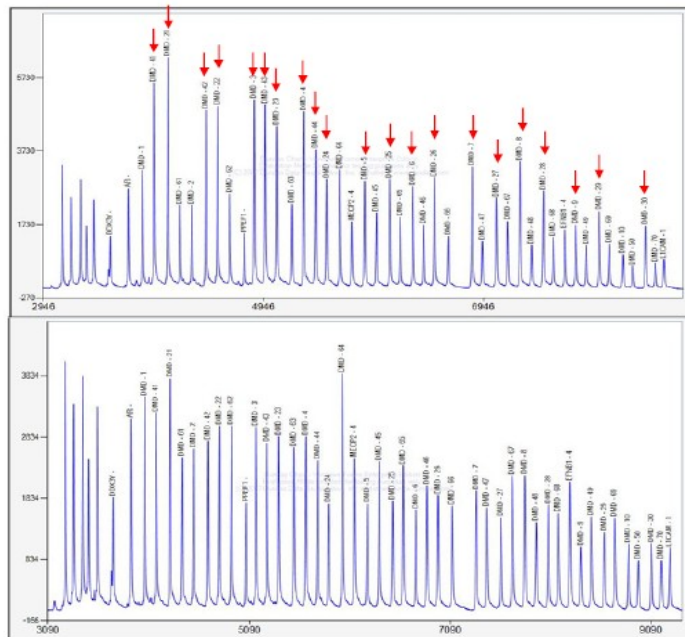
Princip MLPA



Vyhodnocení MLPA

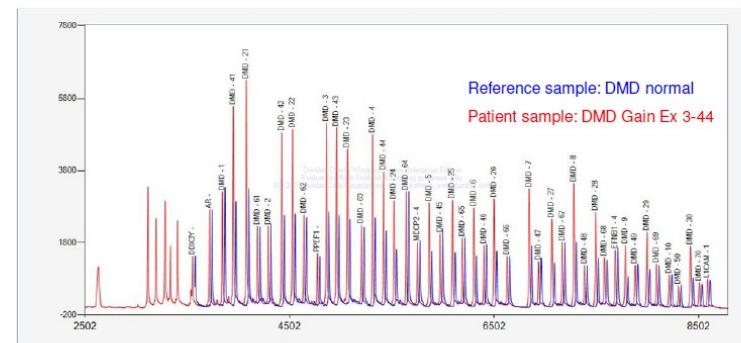
- Relativní technika – absolutní intenzity signálů nejsou používané pro interpretaci!
- Pro interpretaci je nutný referenční vzorek, s kterým je pacient porovnáván.

Comparing electropherograms



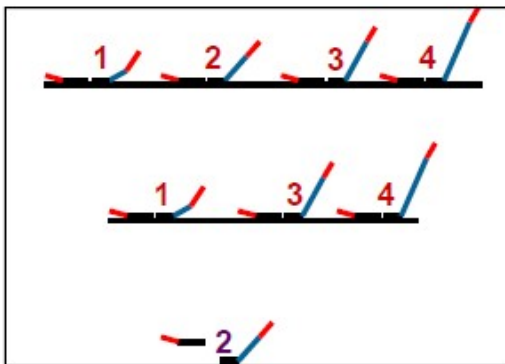
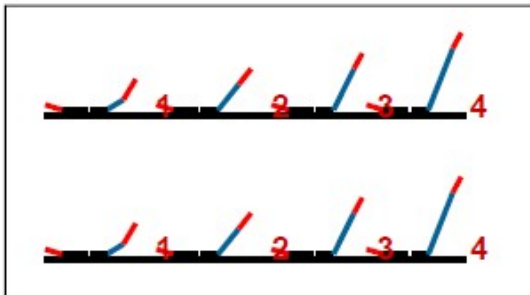
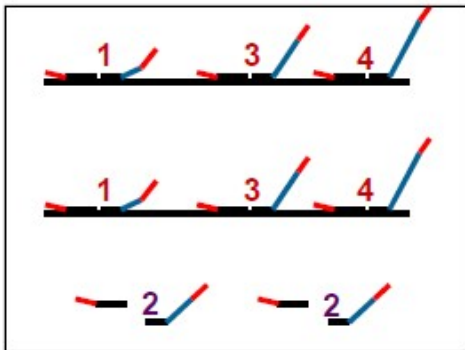
Patient sample
DMD Gain Ex 3-44

Reference sample
DMD normal

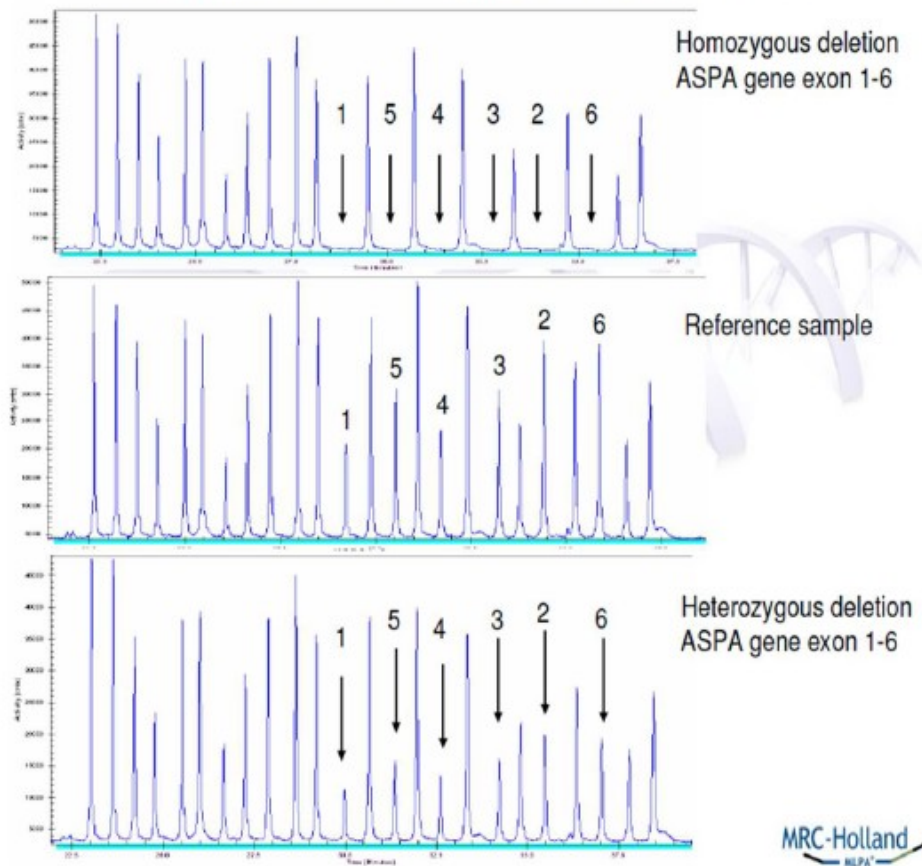


Reference sample: DMD normal
Patient sample: DMD Gain Ex 3-44

Vyhodnocení MLPA



Homozygous & heterozygous deletion ASPA gene

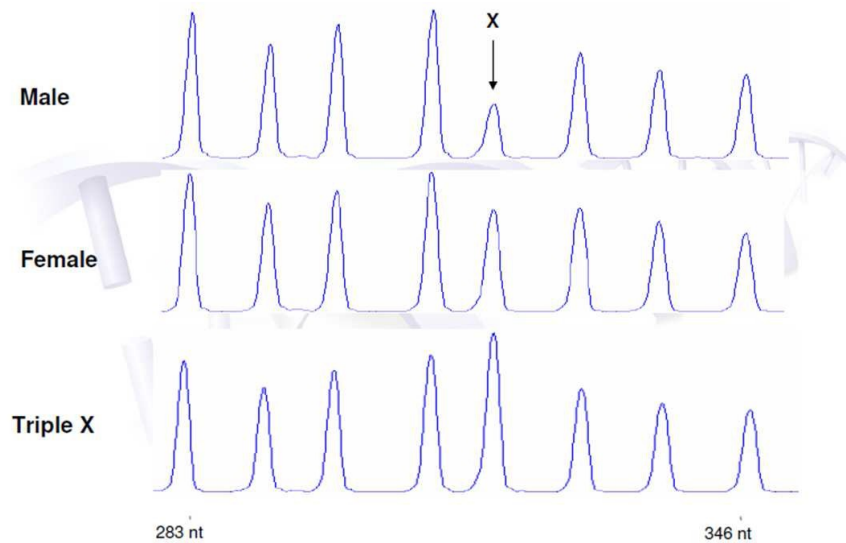


MRC-Holland
MLPA



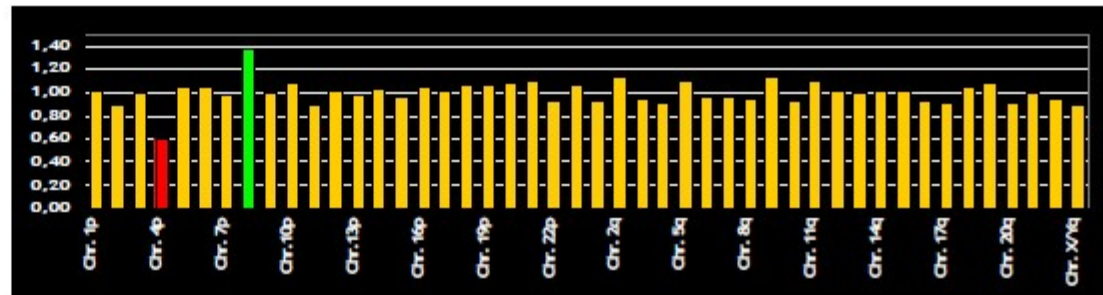
Vyhodnocení MLPA

Detection of Chr. X copy number: 1, 2 or 3 copies per cell



www.mlpa.com

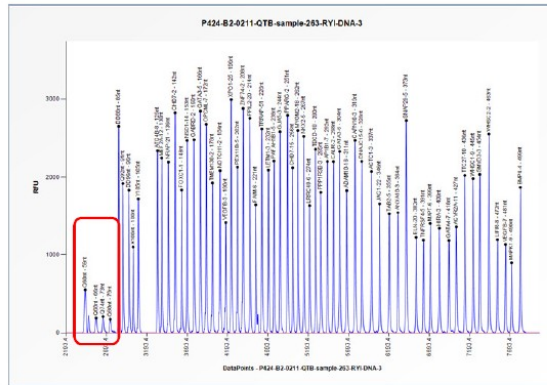
MRC-Holland
MLPA



Problémy MLPA reakce

- 3.1 High Q-fragments – not sufficient DNA
- 3.2 Incomplete denaturation
- 3.3 Signal sloping

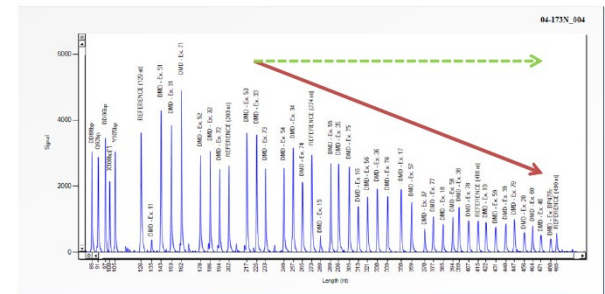
3.1 High Q-fragments



Normal situation with sufficient DNA

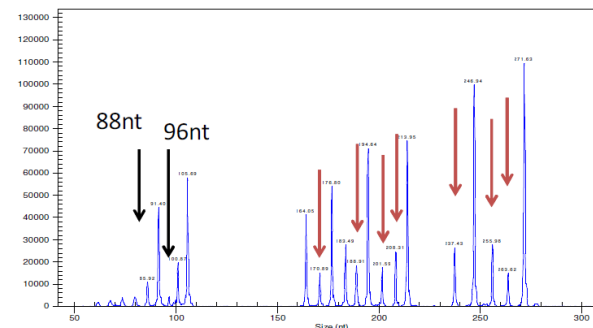
3.3 Signal sloping

- The signal intensities of longer MLPA fragments are more than 3 times lower than those of the shorter MLPA fragments



3.2 Incomplete denaturation

Denaturation incomplete: reduction of probe signals



Využití MLPA

1. zjišťování změn v počtu kopií DNA

- aneuploidie celých chromosomů 13, 18, 21, X a Y
- delece a duplikace chromosomových oblastí a celých genů (subtelomerické oblasti)
- delece a duplikace v jednom nebo více exonech (DMD)

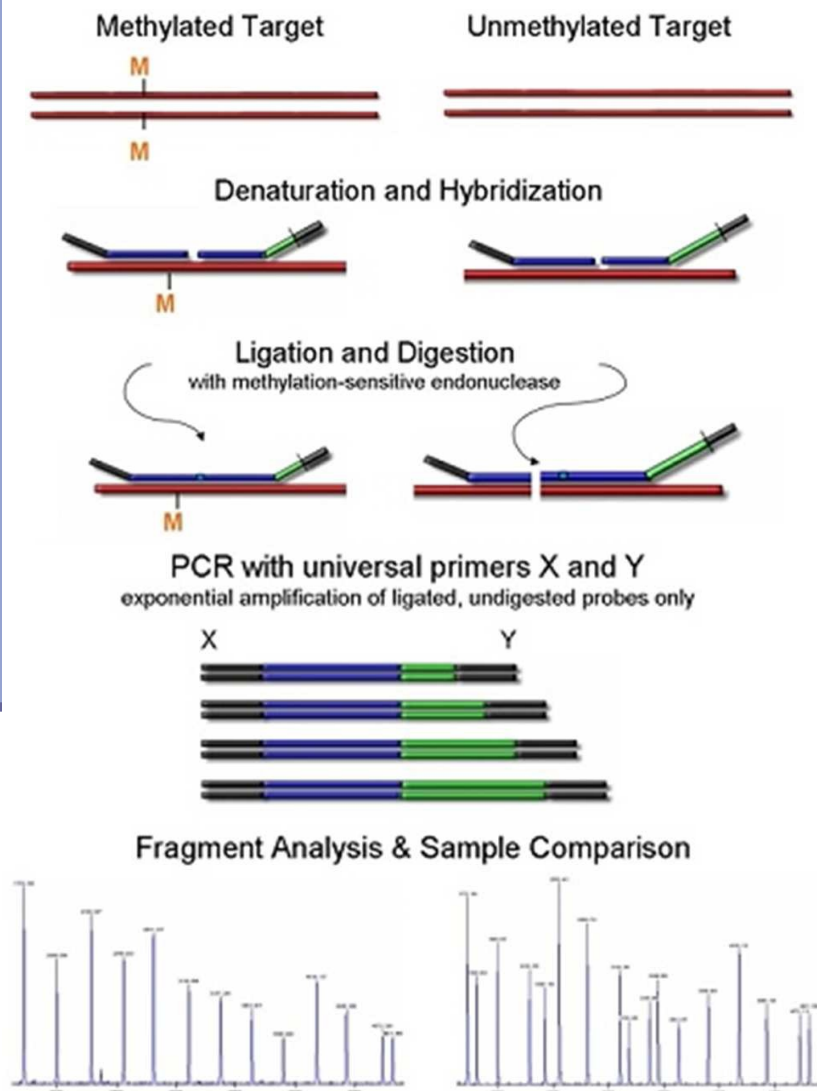
Modifikace

2. zjišťování metylace u imprintovaných genů a promotorových oblastí

3. relativní kvantifikaci mRNAs

4. detekci známých bodových mutací a SNPs

Modifikace MLPA – metylace DNA



Do procesu vstupuje krok štěpení DNA

DNA je metylovaná – neproběhne štěpení nahybridizované sondy a signál pro danou oblast je viditelný

DNA je nemetylovaná – nahybridizovaná sonda je štěpená a signál pro danou oblast nevzniká

Využití:

Epigenetické studie

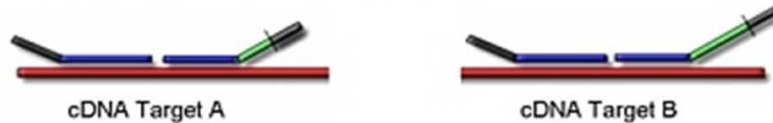
- Regulace genové transkripce (např. hypermethylace promotoru genu TP53 u některých nádorů)
- Imprinting u některých syndromů – Prader-Willy/Angelman, X-vázaná MR

Modifikace MLPA – relativní kvantifikace RNA

1. Reverse transcriptase reaction



2. Denaturation and Hybridisation



3. Ligation

with methylation-sensitive endonuclease

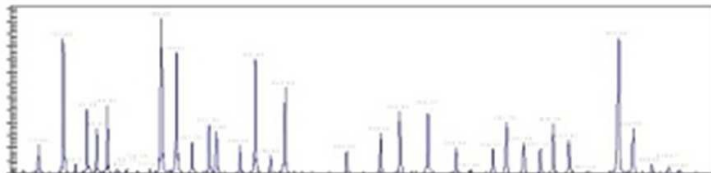


4. PCR with universal primers X and Y

exponential amplification of ligated, undigested probes only

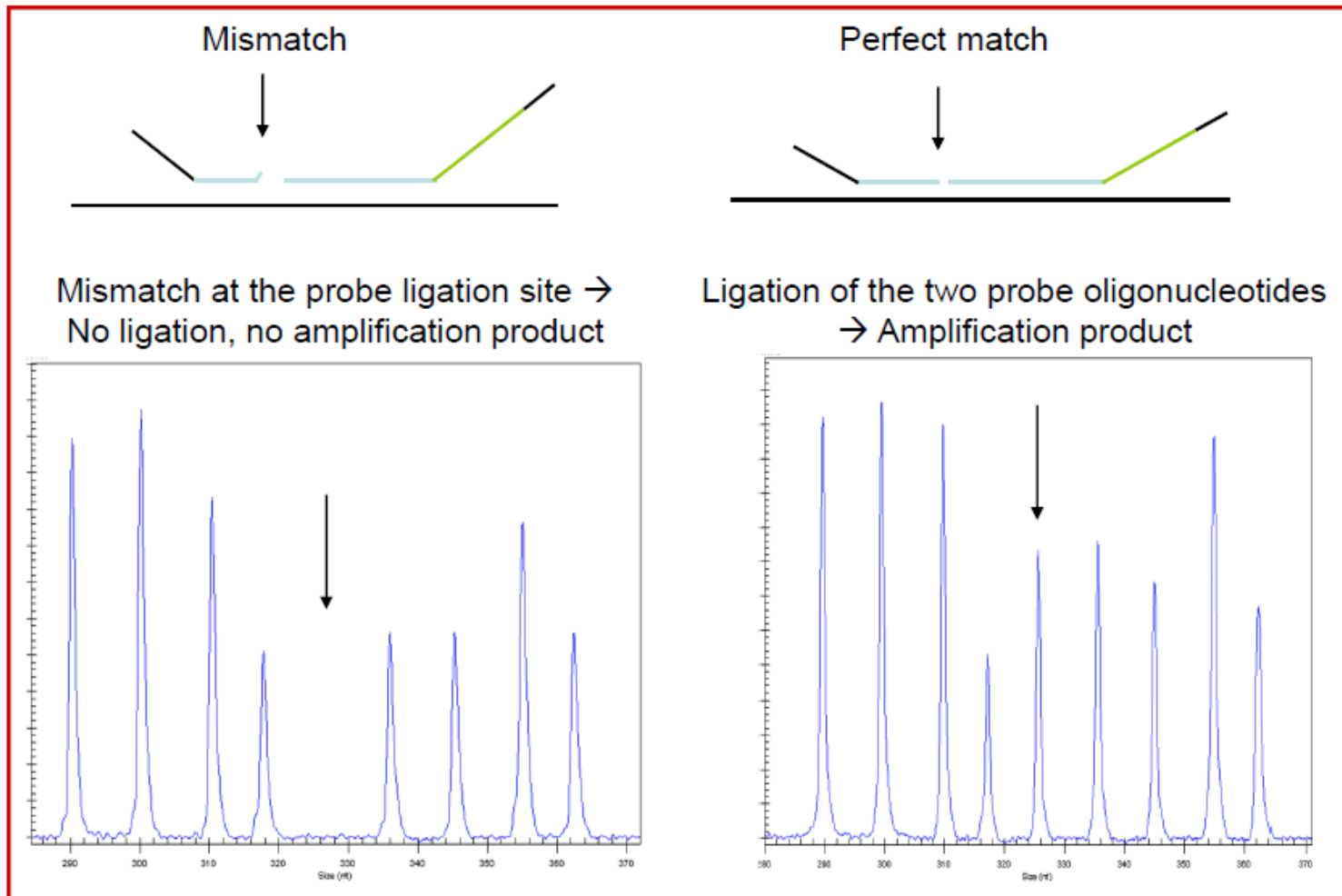


5. Fragment analysis



Do procesu vstupuje krok reverzní transkripce mRNA – cDNA; další proces stejný

Modifikace MLPA – detekce známých bodových mutací



Nevýhody MLPA

- detekuje jenom změny v relativním množství – neodliší například diploidní a triploidní buňky
- vysoká citlivost na kontaminaci reakce
- nutnost mít minimálně 50% buněk nesoucích danou přestavbu
- časově náročná a obtížná výroba vlastních sond
- bodové mutace nebo polymorfismus v místě ligace mohou vést k falešným výsledkům

DĚKUJI ZA POZORNOST

Otázky?

