

# Fluorescence v klinické praxi: molekulární cytogenetika

RNDr. Jan Škoda, Ph.D.  
Ústav experimentální biologie PŘF MU



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

# Osnova

- Fluorescence v klinické praxi – přehled metod
- Molekulární cytogenetika a fluorescence
- Fluorescenční hybridizace *in situ* (FISH)
- Využití FISH
- Modifikace FISH
  - Mnohobarevná FISH (M-FISH) a spektrální karyotypování (SKY)
  - Komparativní genomová hybridizace (CGH)
  - Array-CGH

# Fluorescence v klinické praxi

- využívaná především jako nedestruktivní cesta označení a analýzy biologických vzorků
- autofluorescence nebo značení s využitím fluorochromů

## Přístupy analýzy

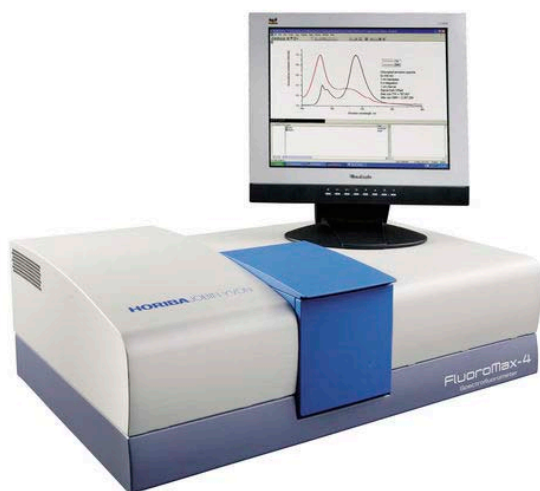
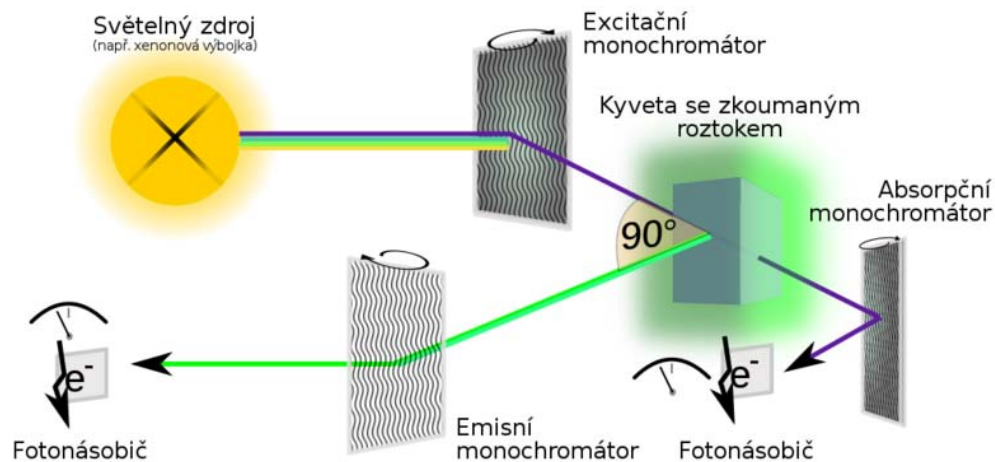
- spektrofluorimetr (kvyeta/mikrodestička)
- průtokový cytometr/sorter
- fluorescenční mikroskop





# Spektrofluorimetrie

- detekce proteinů, toxinů, biomarkerů
- detekce a měření koncentrace DNA a RNA
- testy aktivity enzymů
- testy toxicity, proliferace buněk



Invitrogen Qubit® 3.0

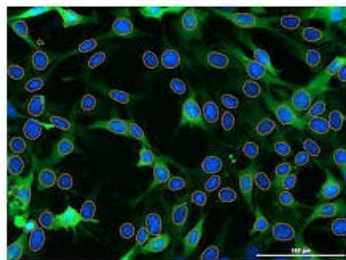
# Spektrofluorimetr s digitálním mikroskopem



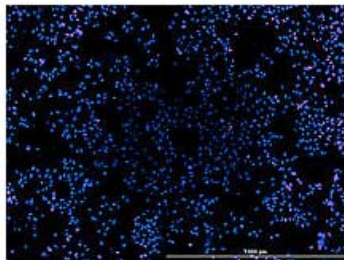
Biotek Cytation 5

kombinace fluroescenční mikroskopie (+ světlé pole, fázový kontrast) a čtečky mikrodestiček (umožňuje snímat i mikroskopická skla, Petriho misky nebo kultivační láhve)

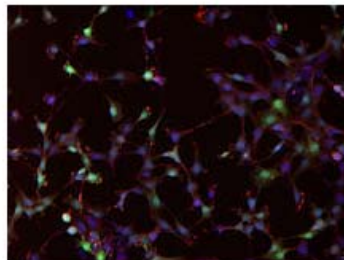
- možnost využití standardních fluorimetrických metod současně s automatizovanou analýzou obrazu
- zobrazení živých buněk, snímání v čase, fenotypizace, počítání buněk/populací...



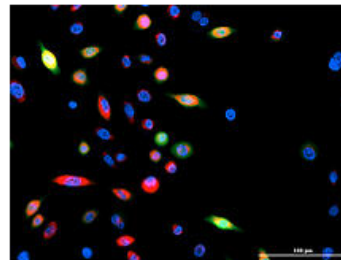
Cell Counting



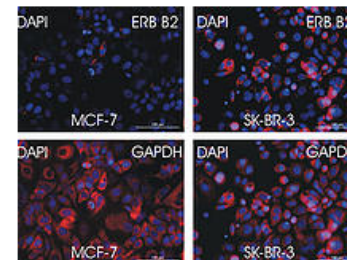
Cell Viability



Confluence



Phenotypic Assays



Live Cell Imaging

# Průtoková cytometrie a FACS

Fluorescence activated cell sorting

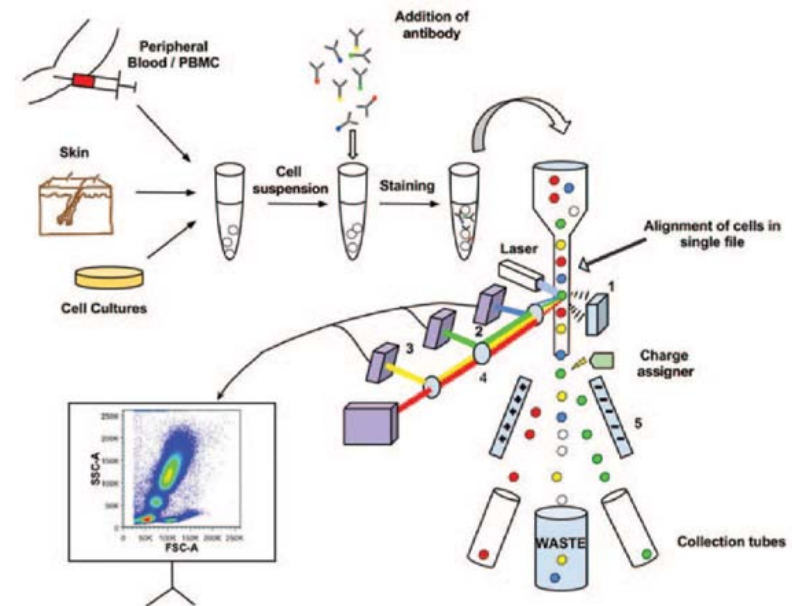
- **klinická imunologie** (imunofenotypizace lymfocytů, funkční testy, stanovení produkce cytokinů, HLA typizace...)
- **hematoonkologie** (imunotypizace leukémií, stanovení minimální reziduální nemoci, třídění buněk pro následné analýzy – např. FISH)
- **nádorová a molekulární biologie** (nádorové markery, proliferace, buněčný cyklus, apoptóza, léková rezistence...)

## Výhody

- rychlost = vysoká frekvence analýzy částic
- citlivost = lze analyzovat velké množství částic a detekovat i nepočtené populace

## Nevýhody

- potřeba buněk v suspenzi (nejčastěji živých)
- nutnost zkušené obsluhy pro nastavení přístroje i analýzu výsledků (bez intuitivní vizuální kontroly)

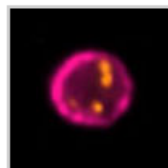


# Zobrazovací průtoková cytometrie

Imaging Flow Cytometry



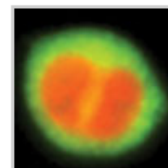
Amnis ImageStream®X Mark II



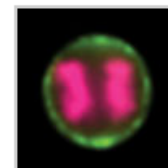
[Internalization](#)



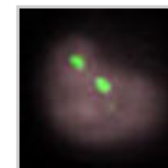
[Cell-Cell Interaction](#)



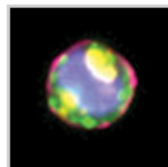
[Cell Signaling](#)



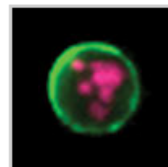
[Cell Cycle & Mitosis](#)



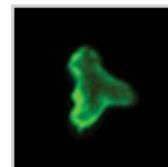
[Spot Counting](#)



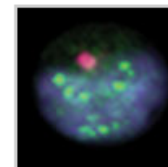
[Co-localization](#)



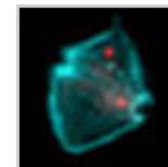
[Cell Death & Autophagy](#)



[Morphology](#)



[DNA Damage & Repair](#)



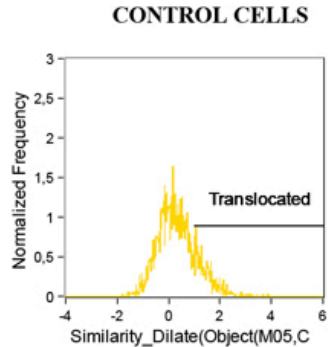
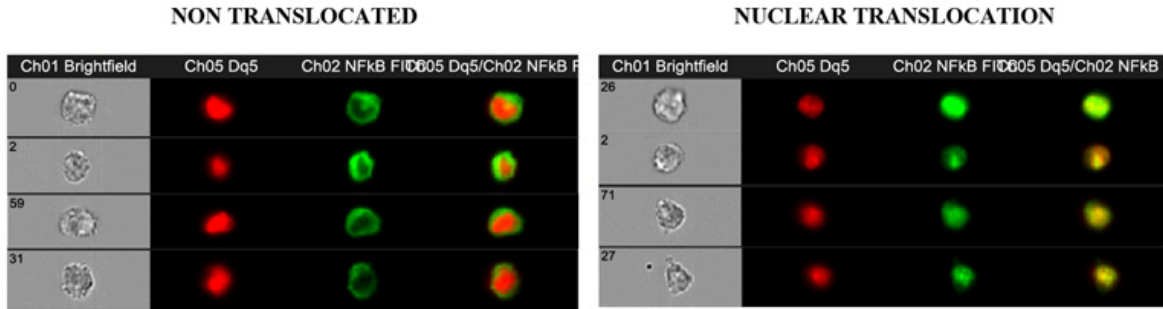
[Emerging Applications](#)

- jednotlivé částice (události) jsou **snímány při průchodu kapilárou pomocí CCD kamery** → pro každou částici existuje příslušný obraz → obrazová analýza
- **kombinace výhod průtokové cytometrie** (rychlost, citlivost) **a mikroskopie** (morfologie, lokalizace a četnost struktur...)

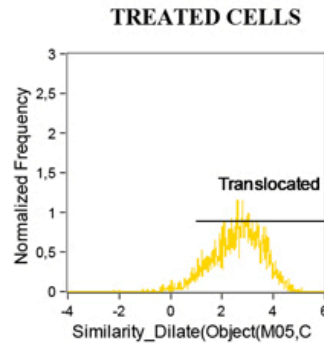


# Zobrazovací průtoková cytometrie

## Lokalizace transkripčního faktoru NFκB

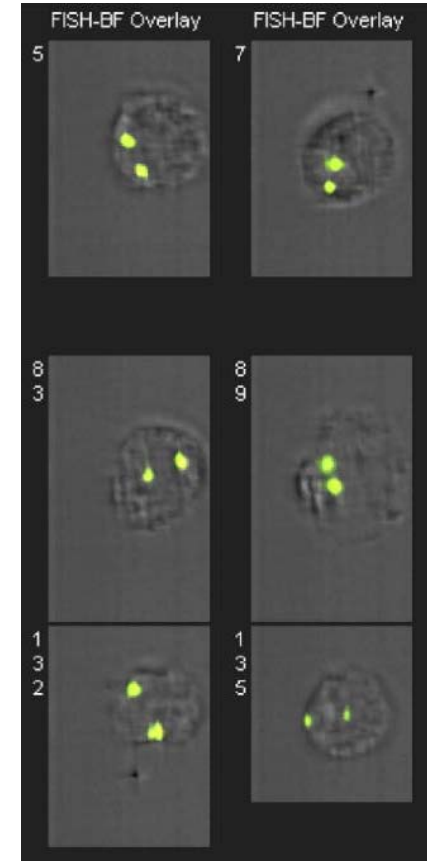


Population	Count	%Gated	Mean
R3 & R2 & R1	3410	100	0,3329
Translocated & R3 & R2 & R1	622	18,2	1,502



Population	Count	%Gated	Mean
R3 & R2 & R1	3560	100	2,589
Translocated & R3 & R2 & R1	3341	93,8	2,727

## FISH chrom. 8

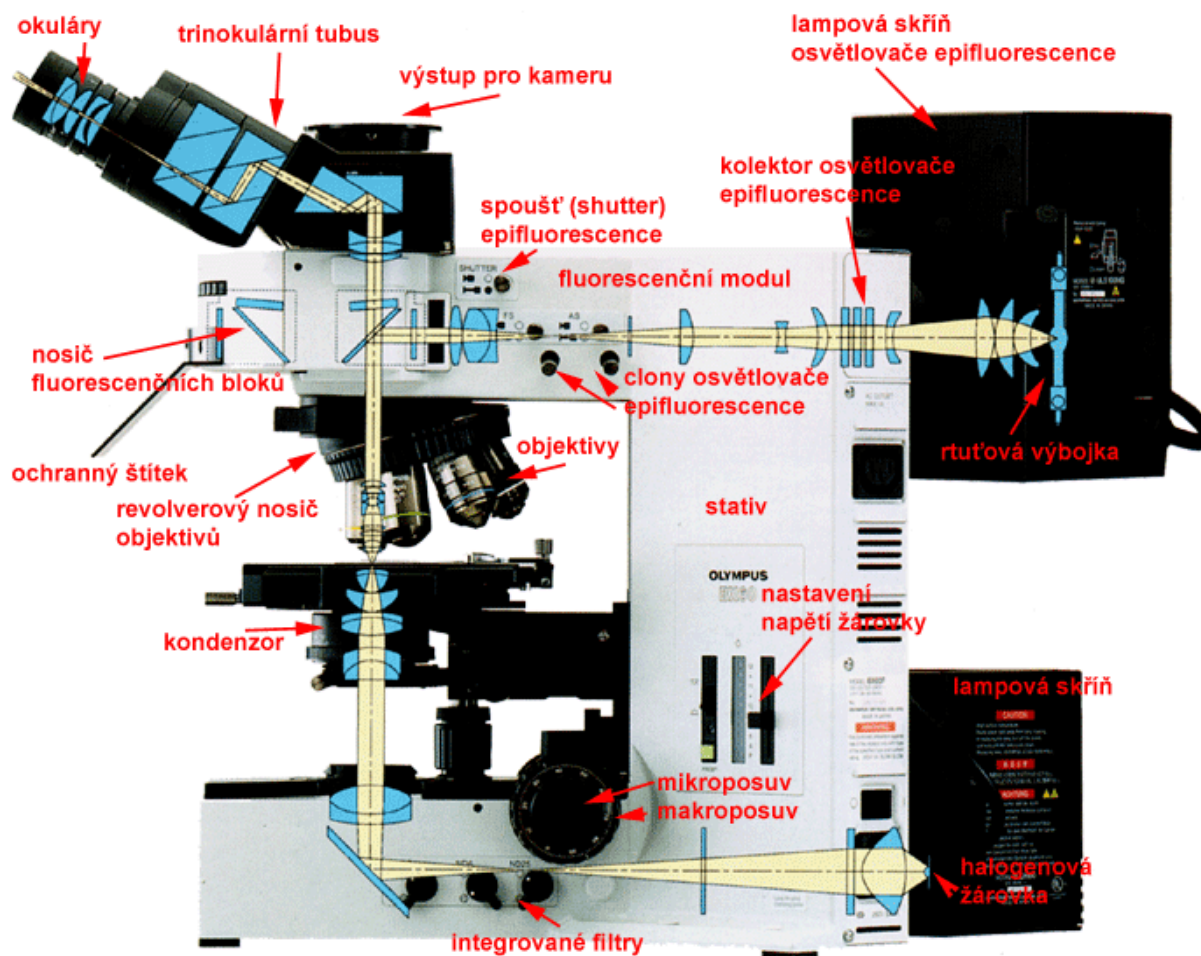


<http://www.bioimaging2014.ineb.up.pt/LABS.html>

Basiji DA et al. *Clinics in laboratory medicine*. 2007;27(3):653-viii.

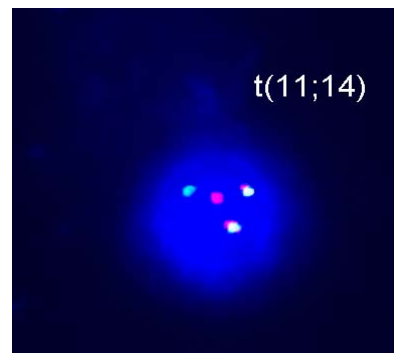


# Fluorescenční mikroskop



# Molekulární cytogenetika a fluorescence

- **molekulární cytogenetika** představuje **spojení mezi klasickou cytogenetikou a molekulární biologii**
- Využívá poznatky molekulární biologie, fluorescence, mikroskopie a počítačové analýzy obrazu ke studiu struktury a vlastností chromozomů (DNA)
- **metody založené na použití specifických fluorescenčně značených DNA sond**
- umožňuje analýzy početních i strukturních odchylek chromozomů neidentifikovatelných klasickými cytogenetickými technikami
- nevyžaduje přítomnost mitózy (I-FISH: možnost analýzy buněk v interfázi)



# Historie a milníky lidské cytogenetiky

## „Hypotonic Period“

- hypotonizace buněk (KCl), kolchicin - akumulace mitóz (1951)
- fytohemaglutinin (PHA) - stimulace lymfocytů periferní krve (1960)
- stanovení přesného počtu lidských chromozomů – 1956 (Tjio JH, Levan A)

## „Trisomy Period“

- trizomie chromozomu 21 (1959)
- první deleční syndrom - „cri du chat“ (1963)

## „Banding Area“

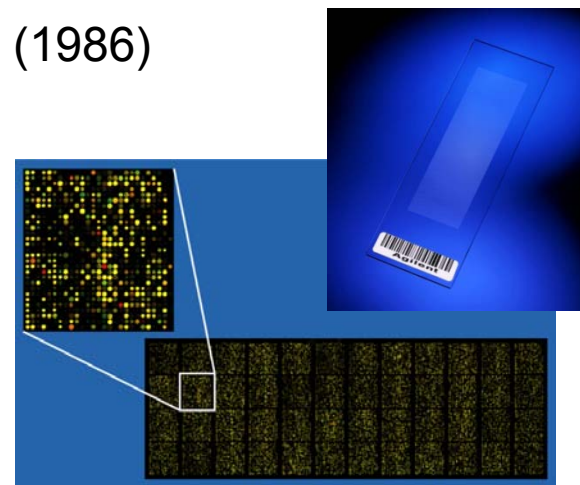
- pruhovací techniky barvení chromozomů (1968 – 1970); G-, R-, C-pruhy

## „Molecular Area“

- metoda hybridizace *in situ* (1970), fluorescenční ISH (1986)
- komparativní genomová hybridizace (CGH) (1992)
- spektrální karyotypování (M-FISH, SKY) (1996)
- M-pruhování (2001)

## „Molecular karyotyping“

- DNA čipy



# Molekulární cytogenetika při genetickém vyšetření

Genetická ambulance

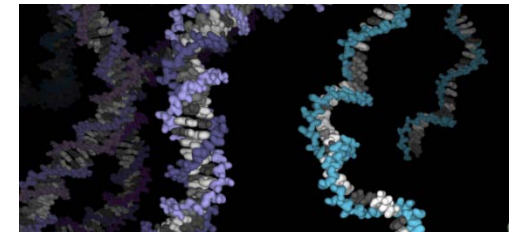
Cytogenetická laboratoř

Laboratoř DNA/RNA diagnostiky

pacient



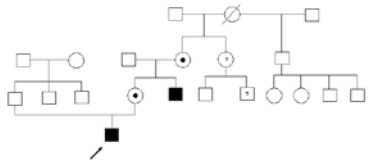
chromozomy



DNA

RNA

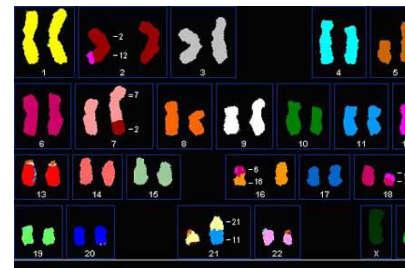
genealogické vyšetření



cytogenetické vyšetření

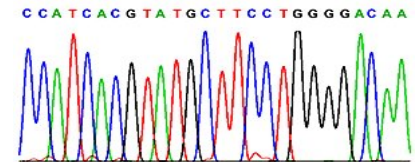


klasické



molekulárně-cytogenetické

molekulárně-genetické vyšetření





# Vybavení molekulárně-cytogenetické laboratoře

- fluorescenční mikroskop vybavený sadou fluorescenčních filtrů
- citlivá černobílá CCD kamera
- počítač a specifický software pro metody FISH, M-FISH, CGH



- skener + software pro analýzu array-CGH čipů



# Fluorescenční hybridizace *in situ* (FISH)

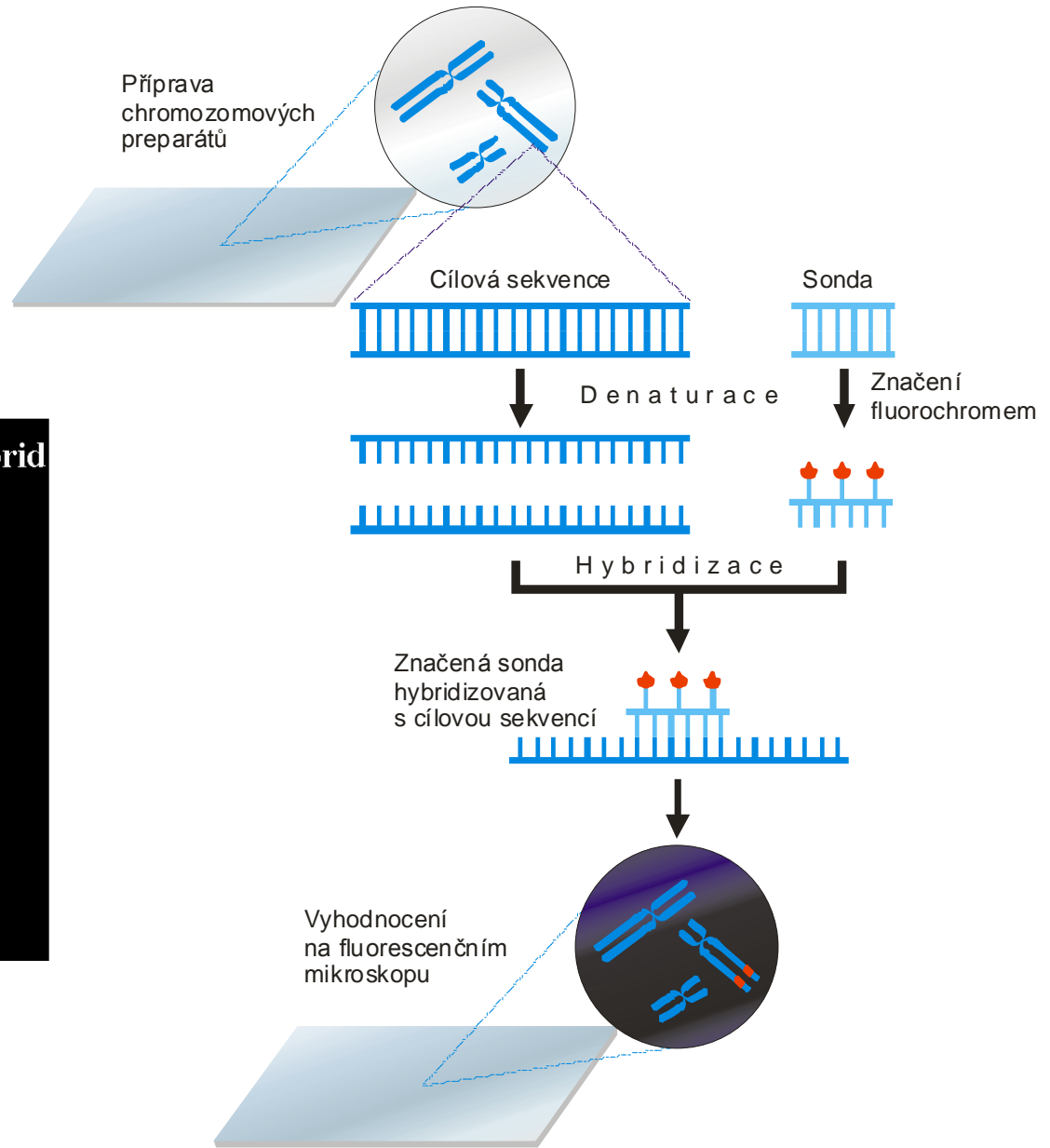
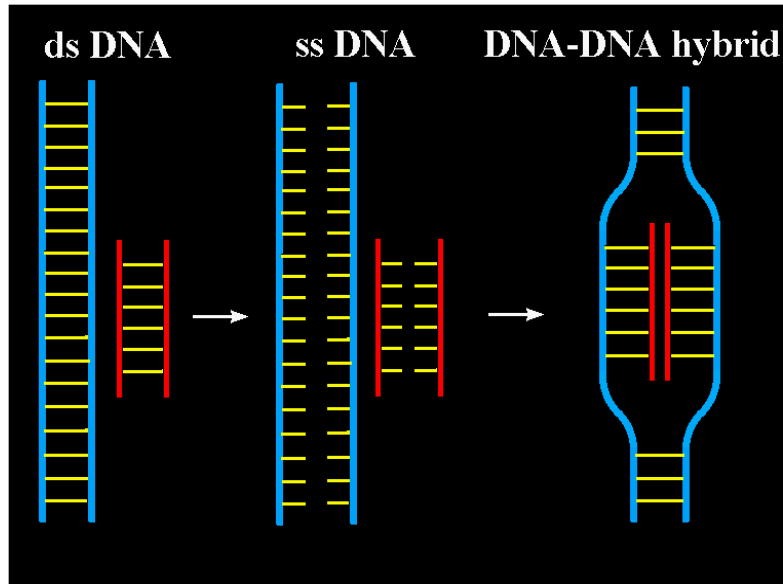
Fluorescence *in situ* hybridization

- 1969 Parduvá a Gall – radioaktivní značení
- **1986 Pinkel et al. – fluorescenční značení sondy (FISH)**

## Hybridizace fluorescenčně značené sondy s DNA metafázních chromozomů nebo interfázních jader na cytogenetickém preparátu

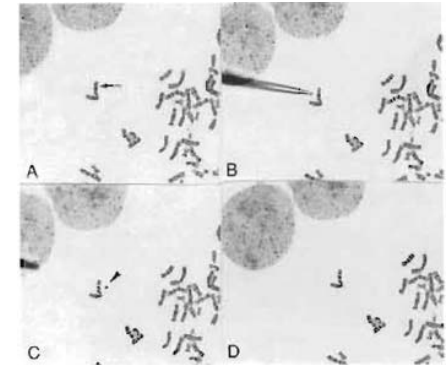
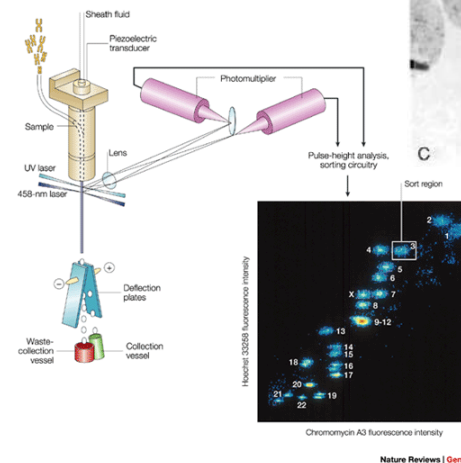
- zhotovení kvalitního preparátu obsahující cílové místo na DNA (metafázní chromozómy, interfázní jádra, tkáňové preparáty)
- denaturace cílového místa (preparátu)
- denaturace sondy
- hybridizační reakce mezi sondou a cílovým místem
- odstranění nenavázané či nespecificky vázané sondy
- barvení pozadí
- vyhodnocení a zpracování fluorescenčního signálu

# Princip FISH



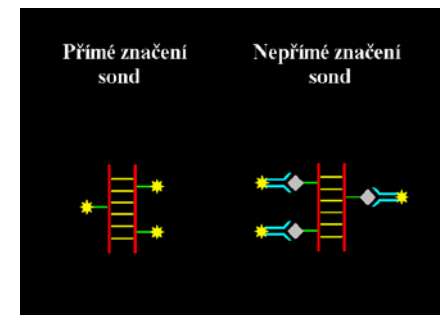
## Zdroje DNA pro přípravu sond

- klonované sekvence DNA inkorporované do vektorů, plazmidů, kosmidů
- chromozomy získané FACS
- mikrodisekce chromozomů či jejich součástí



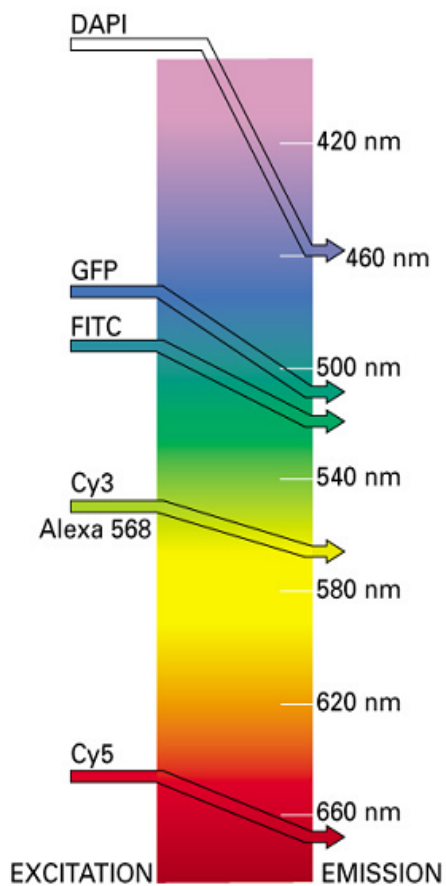
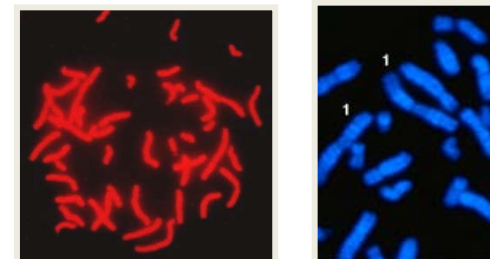
## Značení – dle způsobu detekce sond

- radioaktivně
- hapteny (biotin, digoxigenin) – nepřímé značení
- enzymy
- **fluorochromy** (FITC, TRITC, Texas Red, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumRed, SpectrumBlue, SpectrumGold)





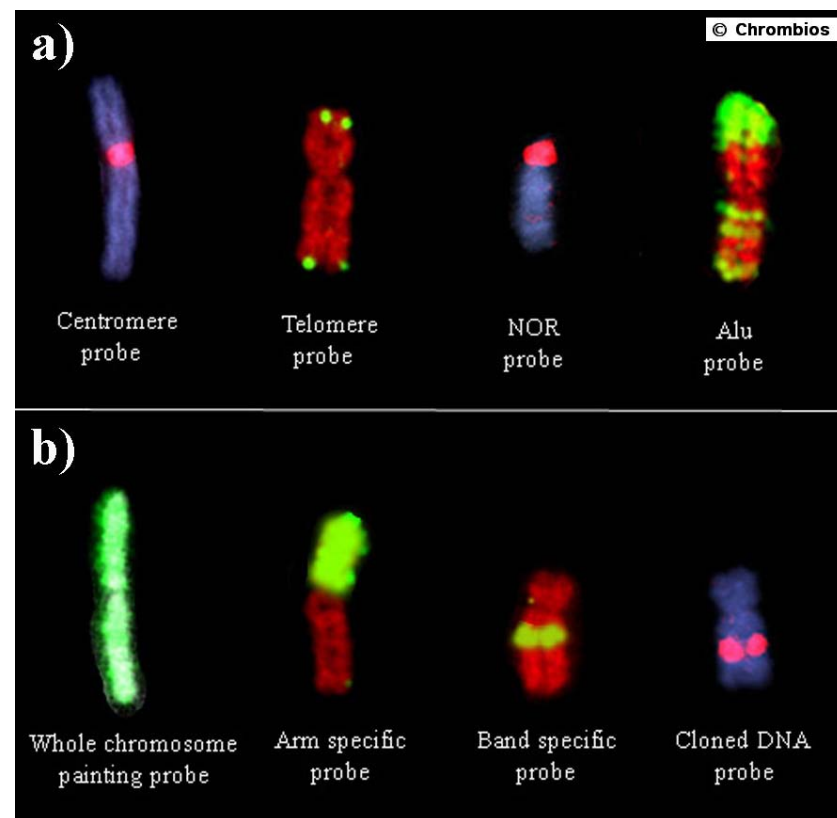
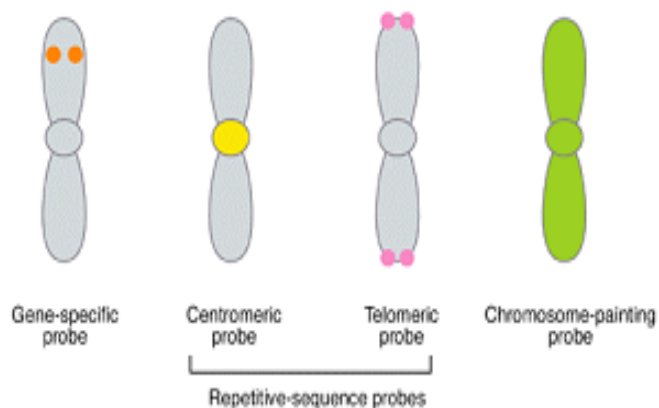
# Fluorescenční barviva v genetice



FLUROCHROM	EXCITAČNÍ MAX. (nm)	EMISNÍ MAX. (nm)	BARVA FLUORESCENCE
<b>a) značení sond</b>			
AMCA	350	450	modrá
Fluorescein - FITC	495	515	zelená
Rhodamin	550	575	červená
Rhodamin - TRITC	575	600	červená
Texas red	595	615	červená
Cy3	552	565	červená
SpectrumOrange	559	588	červená
SpectrumGreen	509	538	zelená
SpectrumAqua	433	480	modrá
<b>b) barvení pozadí</b>			
DAPI	355	450	modrá
Hoechst 33258	356	465	modrá
Propidium jodid	530	615	červená

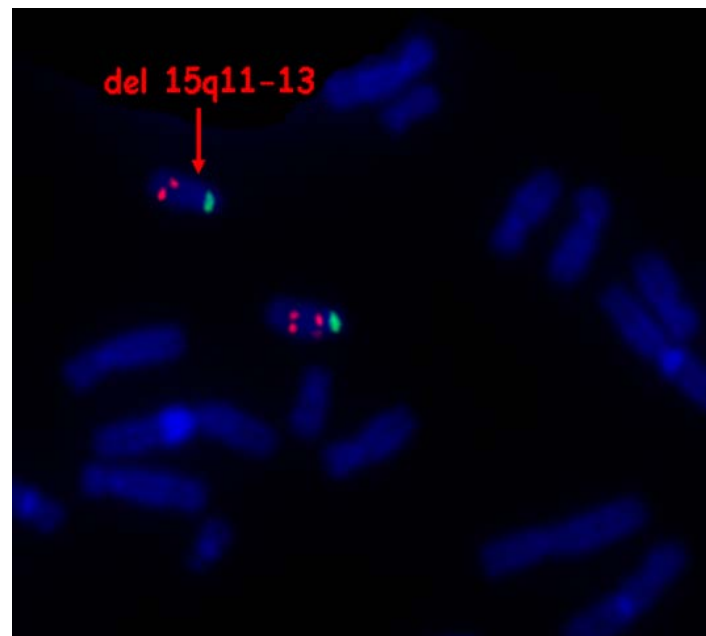
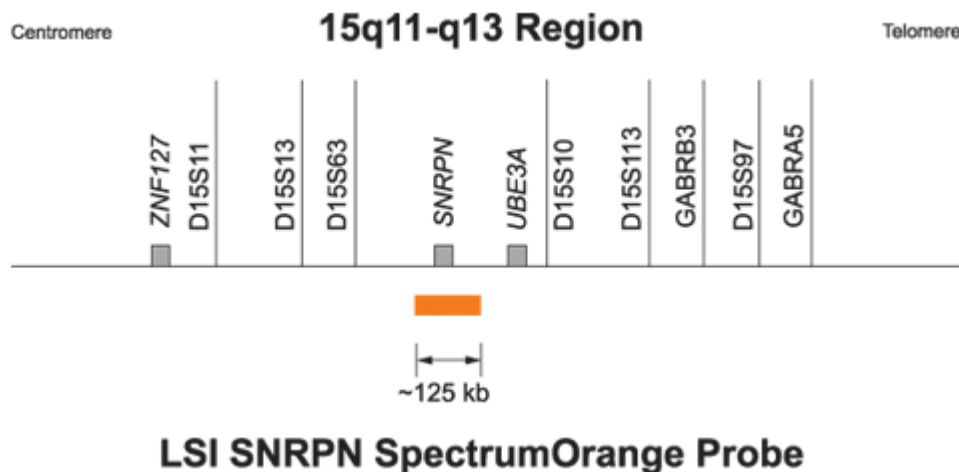
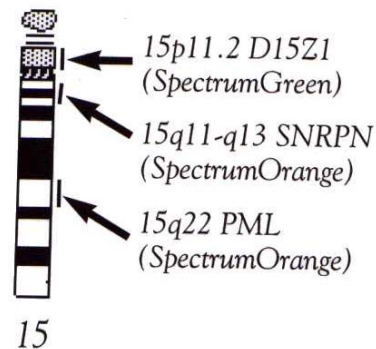
# Typy sond dle místa vazby

- Lokusově specifické
- Centromerické
- Telomerické
- Celochromozomové
- ...

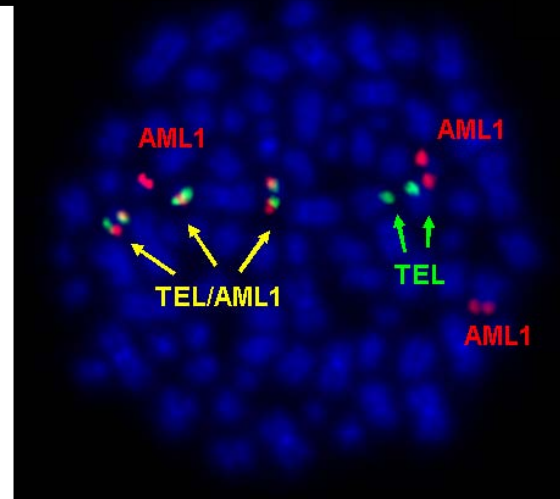
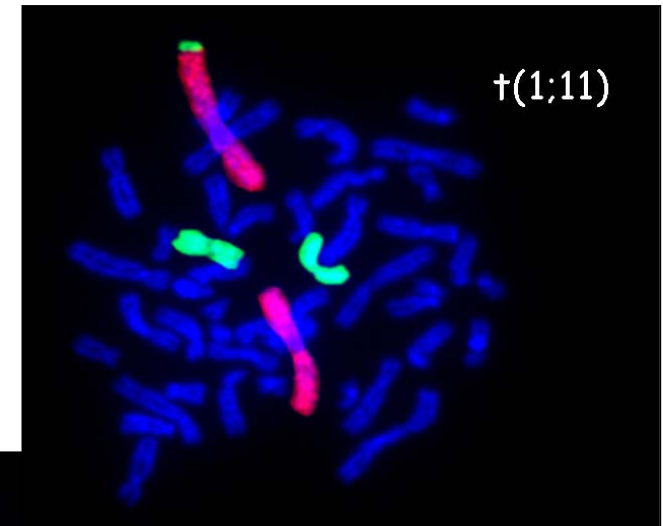
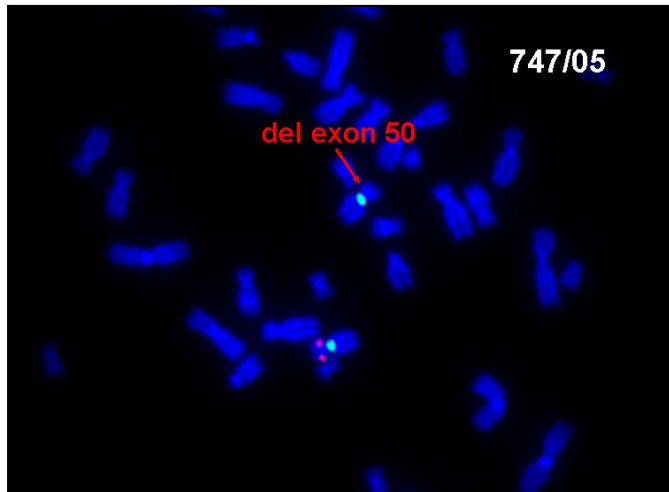


## Lokus SNRPN (Abbott Molecular)

- Delece v oblasti 15q11-q13 vedou ke vzniku mikródelečních syndromů
- Angelmannův syndrom (maternální chromozom) a Prader-Willi syndrom (paternální chromozom)

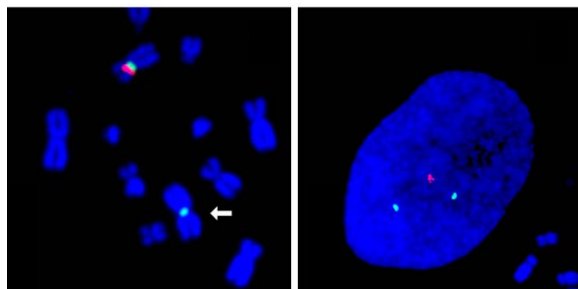
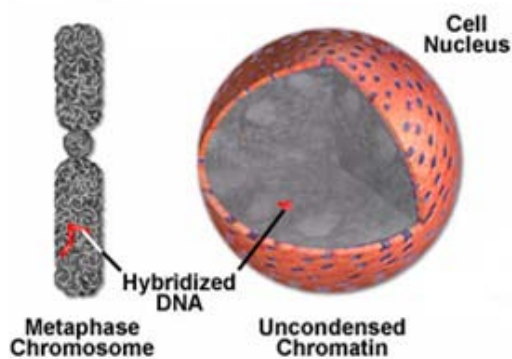


# FISH: přítomnost, počet a poloha signálů!



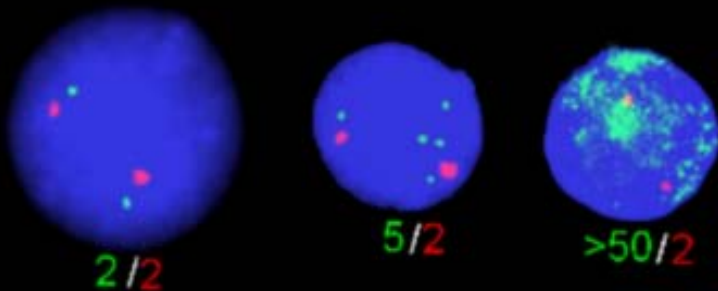


# Cytogenetika interfáze

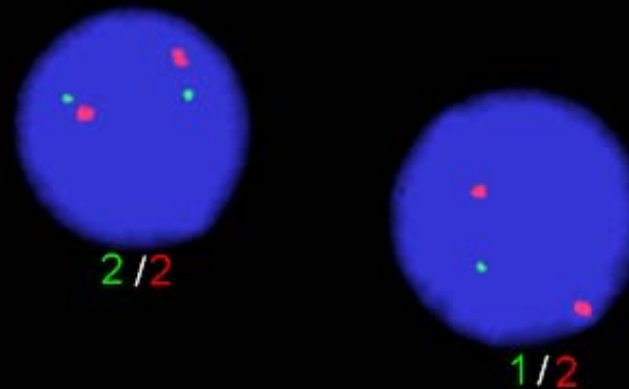


1	<i>Ne!</i>		Don't count, skip over. This could be two cells with one signal each or one twisted nucleus.
2	<i>2</i>		Count as 2 signals: one is very compact, the other is diffuse.
3	<i>Ne!</i>		Don't count, skip over. Observer can not determine which cell contains the signals.
4	<i>2</i>		Count as 2 signals. One signal is split.
5	<i>3</i>		Count as three signals.
6	<i>4</i>		Count as four signals.
7	<i>3</i>		Count as 3 signals. One is split.

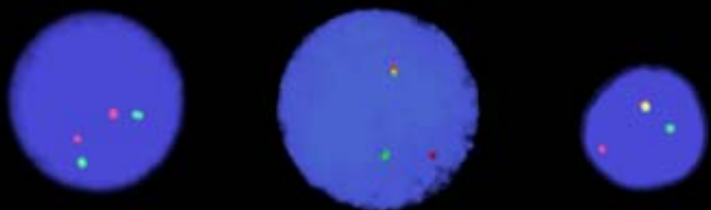
### AMPLIFIKACE



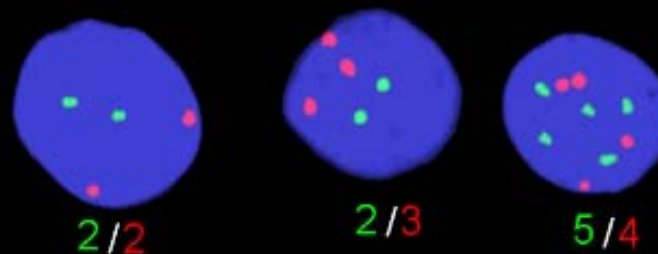
### DELECE



### TRANSLOKACE



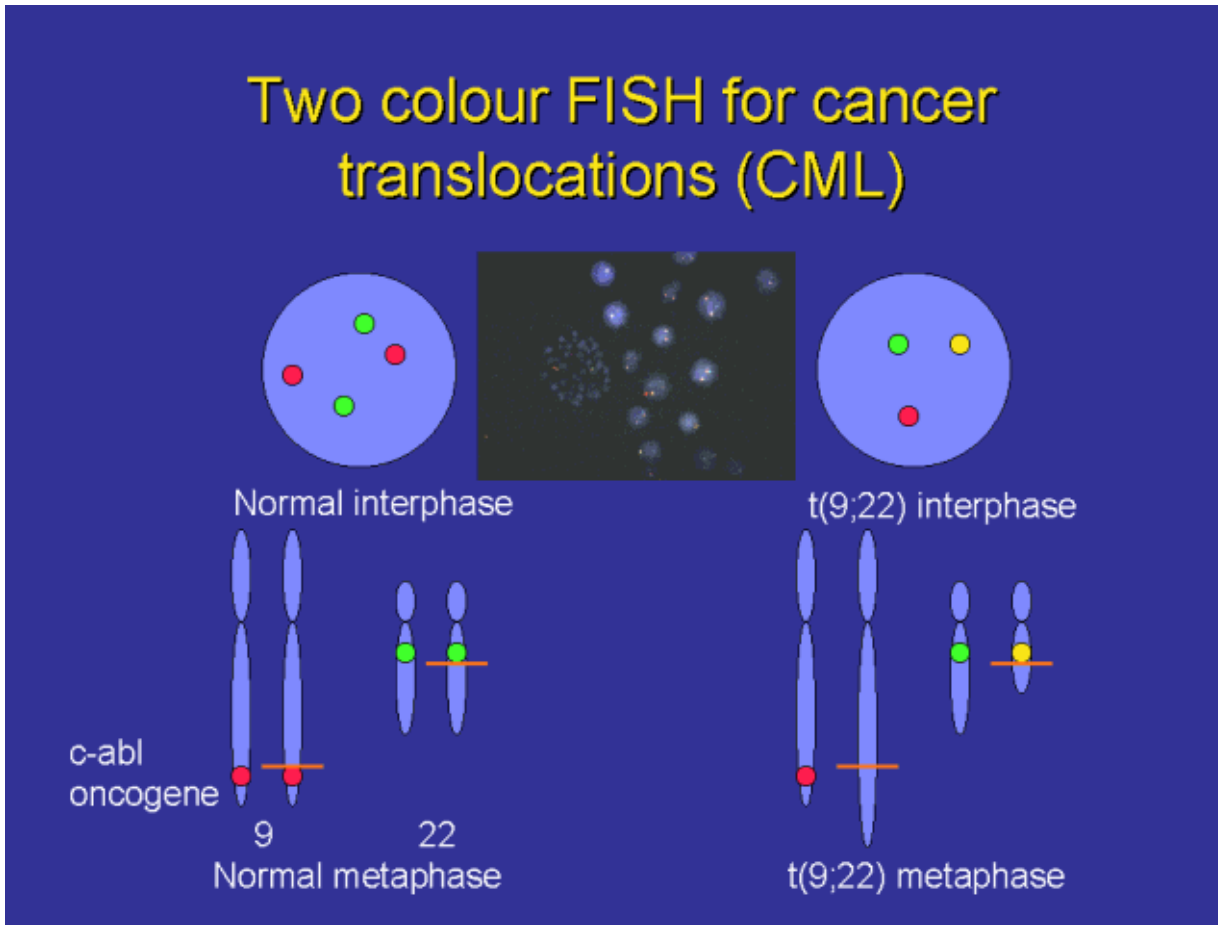
### NUMERICKÉ ABERACE



## Cytogenetika interfáze

# Cytogenetika interfáze – vyšetřování translokací v onkogenetice

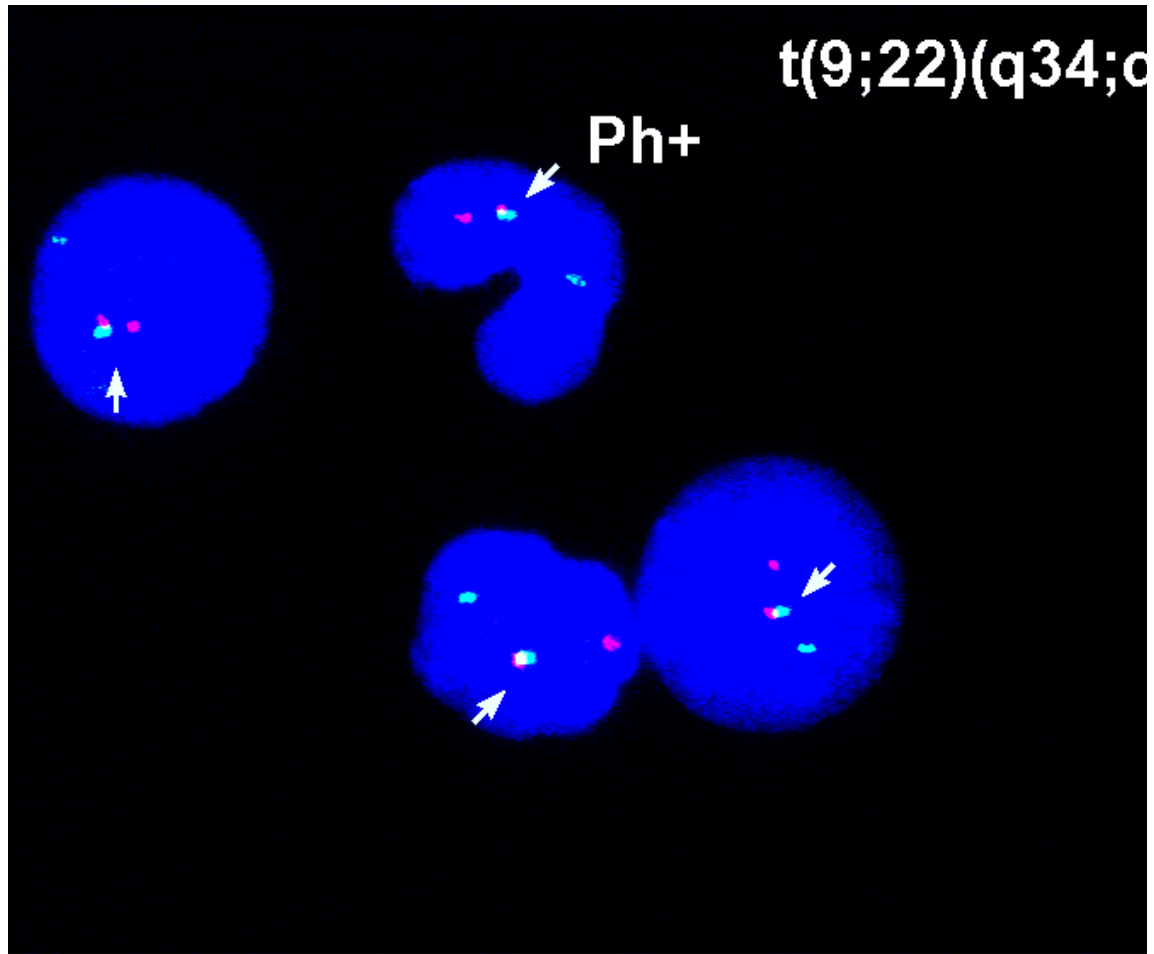
## Two colour FISH for cancer translocations (CML)



### Filadelfský chromozom

- t(9;22)(q34;q11)
- gen pro kinázu Abl se translokuje do oblasti genu BCR → expresí vzniká fúzní protein, konstitutivní kinázová aktivita → deregulace buněčného dělení a dalších procesů

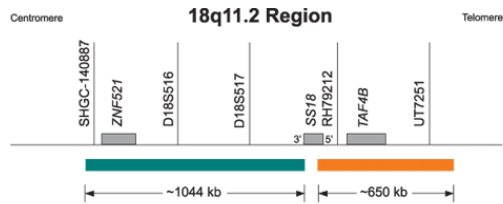
## Translokace BCR/ABL – interfáze



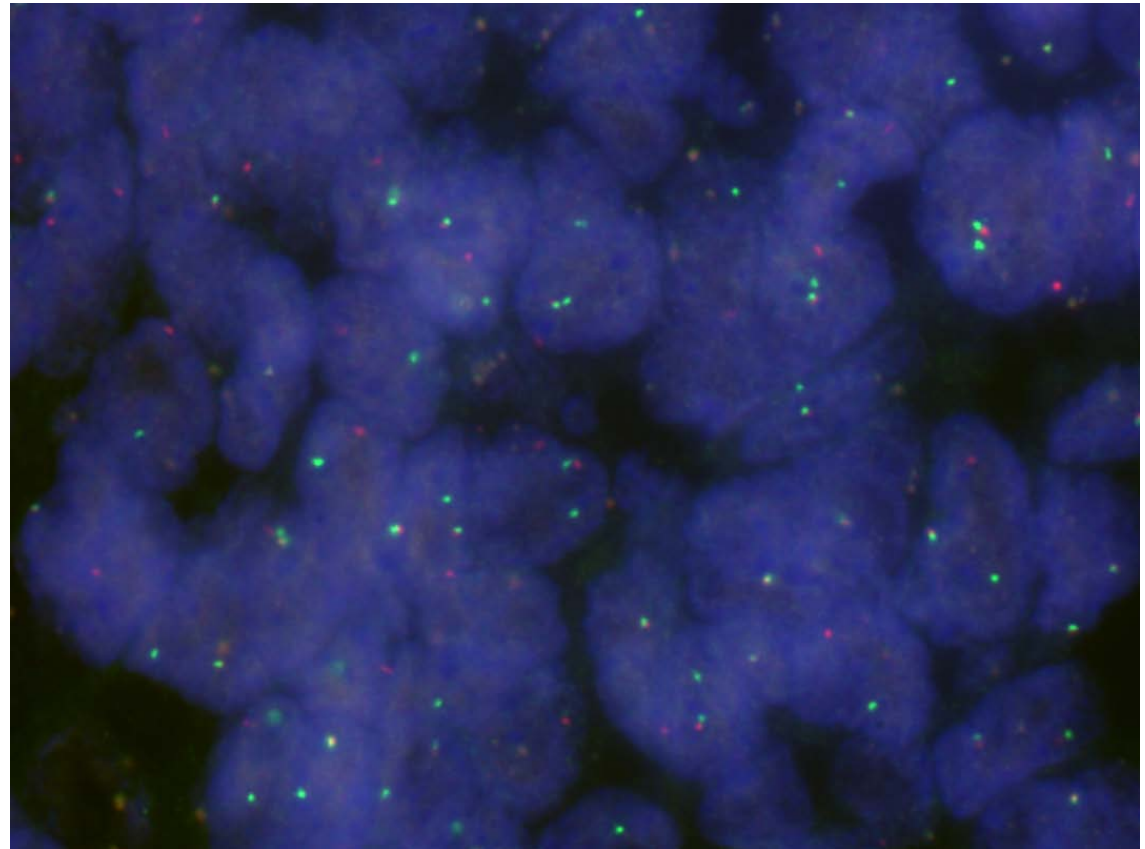
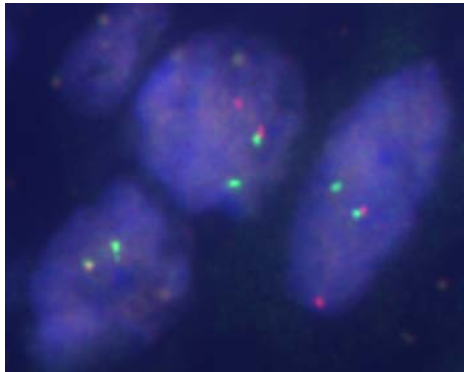
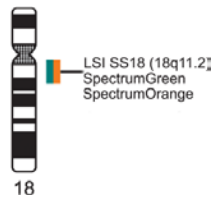


# Translokace SS18 – split sonda

- Translokace genu SS18 asociována se synoviálním sarkomem – diagnostika
- Součást molekulárně patologického vyšetření – tkáňové řezy



LSI SS18 Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe



# FISH

## Výhody

- nevyžaduje přítomnost mitóz (ve většině případů) – lze analyzovat buňky v interfázi i tkáňové řezy
- rychlé (relativně) zhodnocení velkého počtu buněk

## Nevýhody

- neposkytuje celogenomový pohled
- není vhodná pro analýzu neznámých aberací

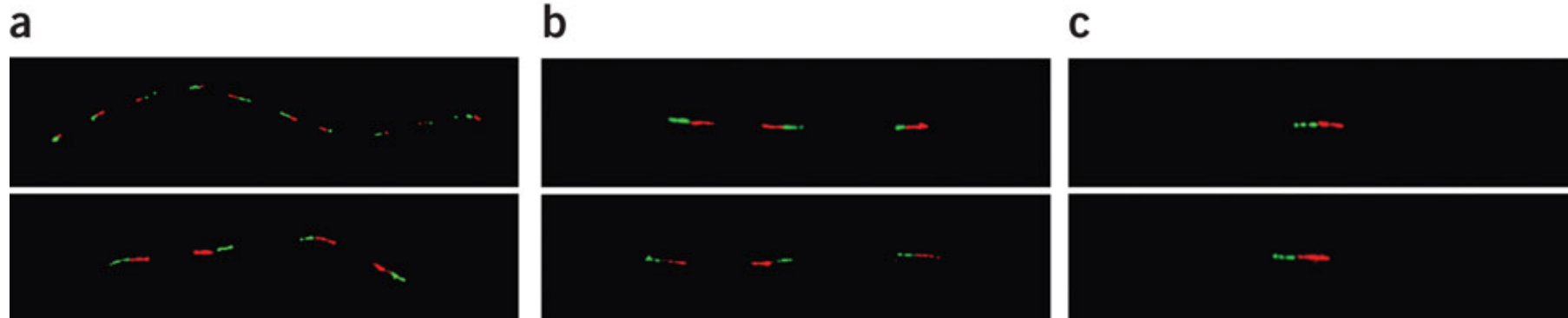
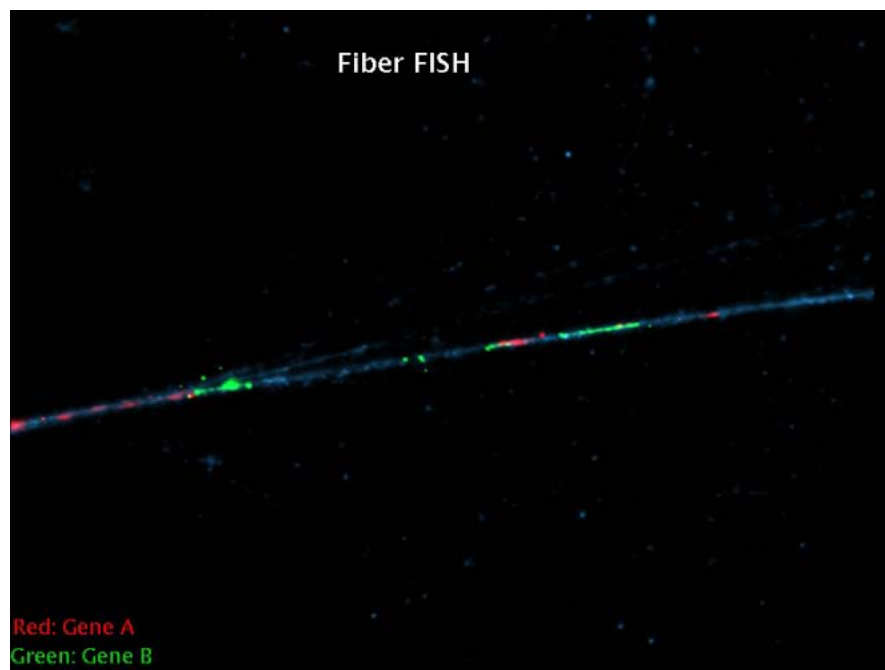
# FISH a její modifikace

- Fiber FISH
- RxFISH
- ZOO-FISH
  
- **Mnohobarevná FISH (M-FISH)**
- **Spektrální karyotypování (SKY)**
- **Mnohobarevné pruhování (M-banding)**
  
- **Komparativní genomová hybridizace (CGH)**
- **Technologie array-CGH**

# Fiber FISH

## Princip

- extrakce vláken DNA z jádra → roztěr na mikroskopické sklo → jednotlivá natažená vlákna DNA
- jednotlivé geny jsou viditelné na základě fluorescenčních signálů
- rozlišení kolem 1 kb





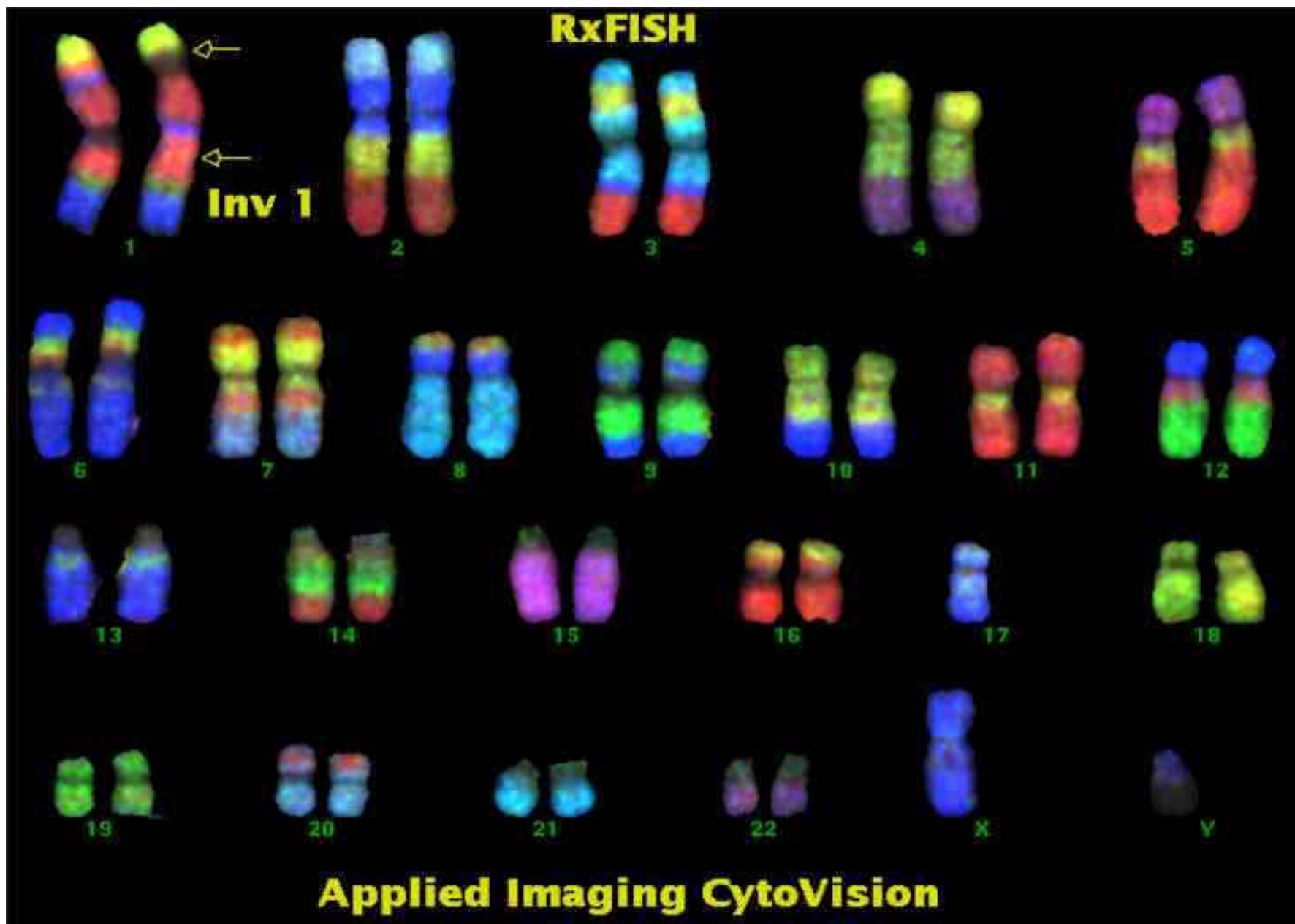
# Technika RxFISH

## Cross-species color banding

- hybridizace lidských chromozomů s celogenomovou DNA sondou odvozenou z genomu gibona (x = cross species)
- DNA člověka – DNA gibona: 98 % sekvenční homologie, avšak u gibona se vyskytují mnohonásobné přestavby chromozomů

## Výsledek:

- 18 párů s mnohobarevným vzorem (R = rainbow of colors)
- 6 párů v jedné barvě
- **můžeme detekovat intrachromozomové přestavby**



# FISH v komparativní cytogenetice – ZOO FISH

- komparativní cytogenetika – studium evoluce lidského karyotypu
- založena na použití celochromozomových DNA sond, které jsou hybridizovány na chromozomy jiného druhu
- např. chromozom 2 u lidí – fúze chromozomu 12 a 13 u šimpanze
- ZOO-FISH: hybridizace DNA různých živočišných druhů

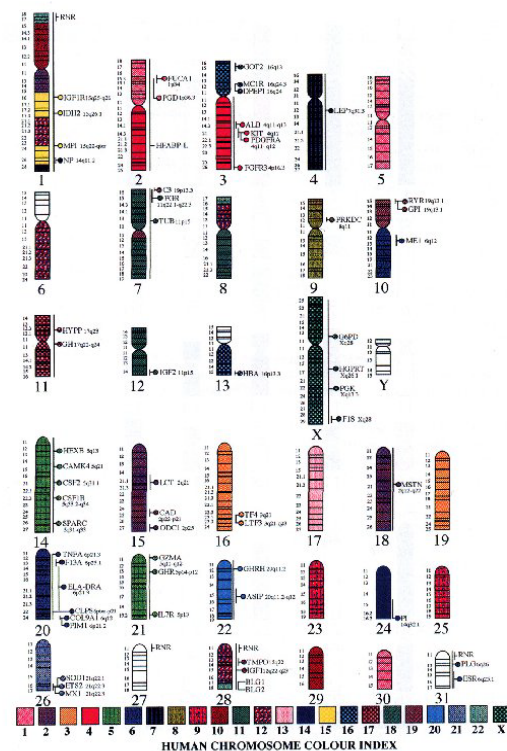
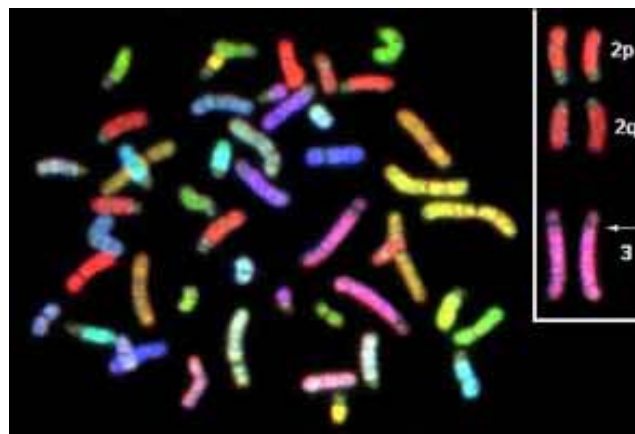
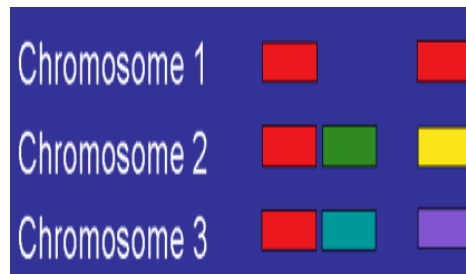


Fig. 9.5. Schematic drawing of individual horse chromosomes showing segmental homology with human chromosomes (see human chromosome colour index at the bottom). The current status of physically mapped type I loci (coding sequences; see Tables 9.5 and 9.7 for references) is also presented. Genes connected to vertical bars spanning the entire length of the chromosome represent those mapped using somatic hybrid panel analysis, while those connected to a small vertical line represent those mapped using *in situ* hybridization. Each gene bears a coloured circle indicating the human chromosome on which it is present, followed by the gene symbol and precise human location (shown beside or below each gene symbol). Note that, for example, on ECA7 the colour for the C3 circle does not match the Zoo-FISH data.

# Mnohobarevná FISH (M-FISH) a spektrální karyotypování (SKY)

- **Speicher et al., 1996 (M-FISH), Schröck et al., 1996 (SKY)**
- vícebarevné FISH techniky – detekce více značených sond na jednom preparátu
- v jedné hybridizační reakci simultánní vizualizace všech 22 autozomů a chromosomů X a Y v odlišných barvách
- kombinatorní značení –
  - 2 fluorochromy    3 sondy (= chromozomy)
  - 3 fluorochromy    7 sond
  - 4 fluorochromy    15 sond

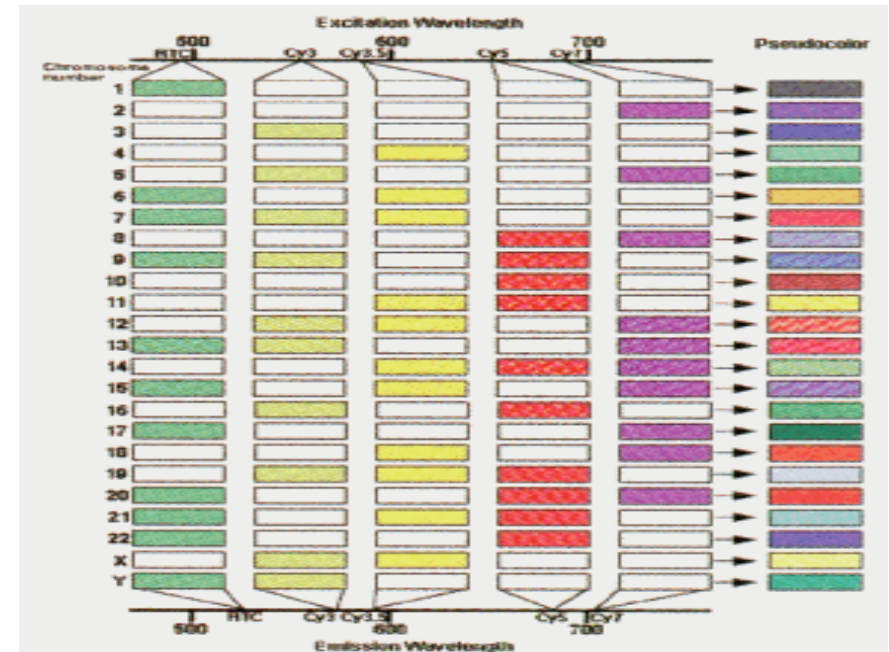
Počet kombinací:  $2^N - 1$





# M-FISH a SKY

- hybridizace preparátu se směsí **24 chromozomově specifických celochromozomových sond** vzniklých kombinatorem značením (5 fluorochromů)
- každá sonda je charakterizovaná emisním spektrem, které umožňuje identifikaci chromozomu



Name	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y
COLOR	Black	Purple	Blue	Teal	Green	Yellow	Red	Light Blue	Dark Blue	Dark Red	Yellow	Red	Pink	Light Green	Purple	Green	Dark Green	Orange	Light Purple	Red	Cyan	Dark Purple	Yellow	Teal
FITC	X			X		X		X	X		X		X			X		X			X			X
Cy3			X		X			X	X		X		X		X				X	X		X	X	
Cy3.5	X		X	X			X			X	X				X		X		X					X
Cy5	X				X	X	X	X				X		X	X	X						X		
Cy7		X	X		X	X			X	X		X									X		X	X

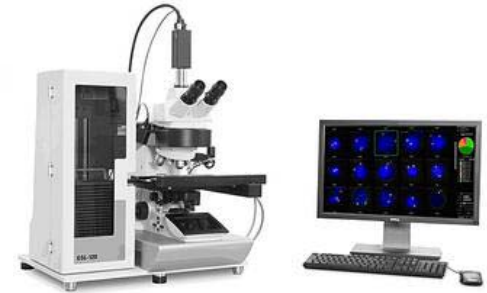
# M-FISH

## Mikroskop vybavený:

- **6 fluorescenčními úzkopásmovými filtry** (pro 5 fluorochromů + DAPI)
- **citlivou CCD kamerou**
- **specializovaným softwarem** pro analýzu obrazu (např. Lucia MFISH, MetaSystems Isis mFISH...)

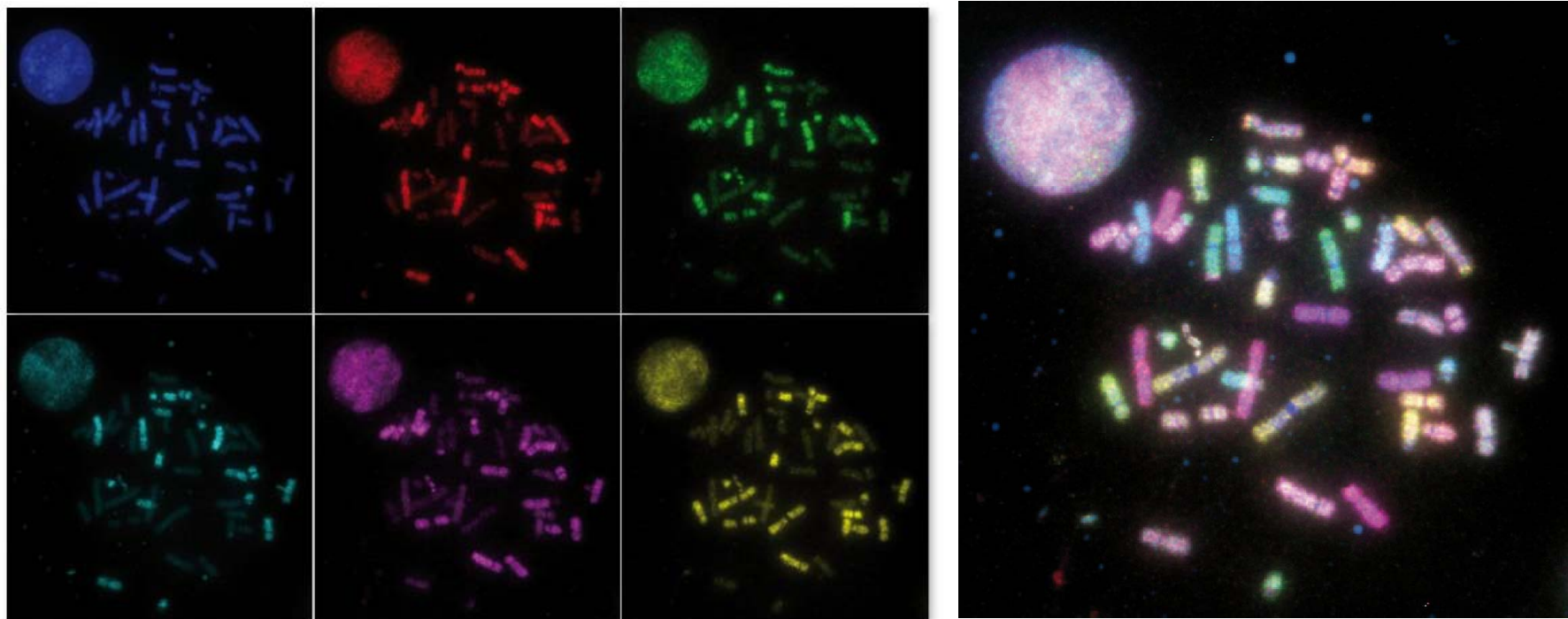
## Postup

- snímání jednotlivých fluorochromů
- složení obrazu
- počítačová analýza – dle kombinace fluorochromů přiřazení pseudobarev
- vyhodnocení



# M-FISH

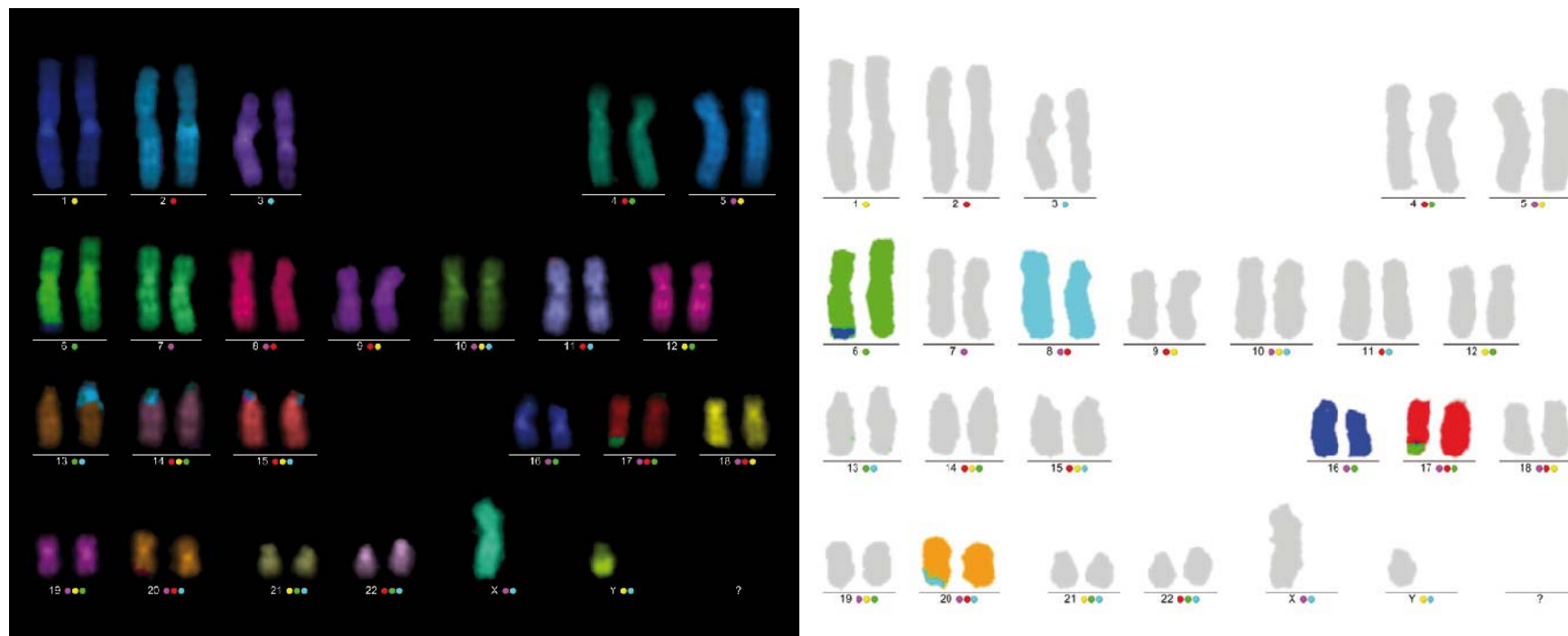
**Snímání jednotlivých fluorochromů, složení obrazu**



<http://www.lucia.cz/cs/front-page/lucia-mfish>

# M-FISH

## Počítačová analýza – přiřazení pseudobarev, vyhodnocení



<http://www.lucia.cz/cs/front-page/lucia-mfis>



## Spektrální karyotypování (SKY)

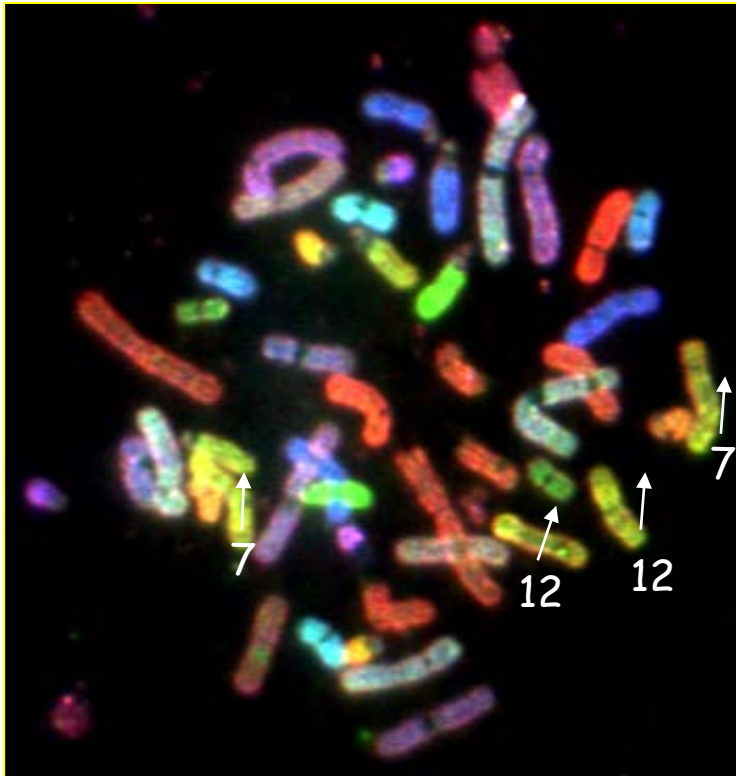
- mikroskop vybavený filtrem pro DAPI a **specializovaným systémem (interferometr) pro měření spektra emitovaného světla (GenASIs HyperSpectral)**
- **emise fluorochromů** (Spectrum Orange, Spectrum Green, TexasRed, Cy5, Cy5.5) **snímána najednou** (rozdíl oproti M-FISH)
- systém měří spektrum pro každý pixel obrazu
- speciální počítačový program přiřadí na základě měření vlnových délek každému páru chromozomů barvu, ty se označují jako pseudobarvy



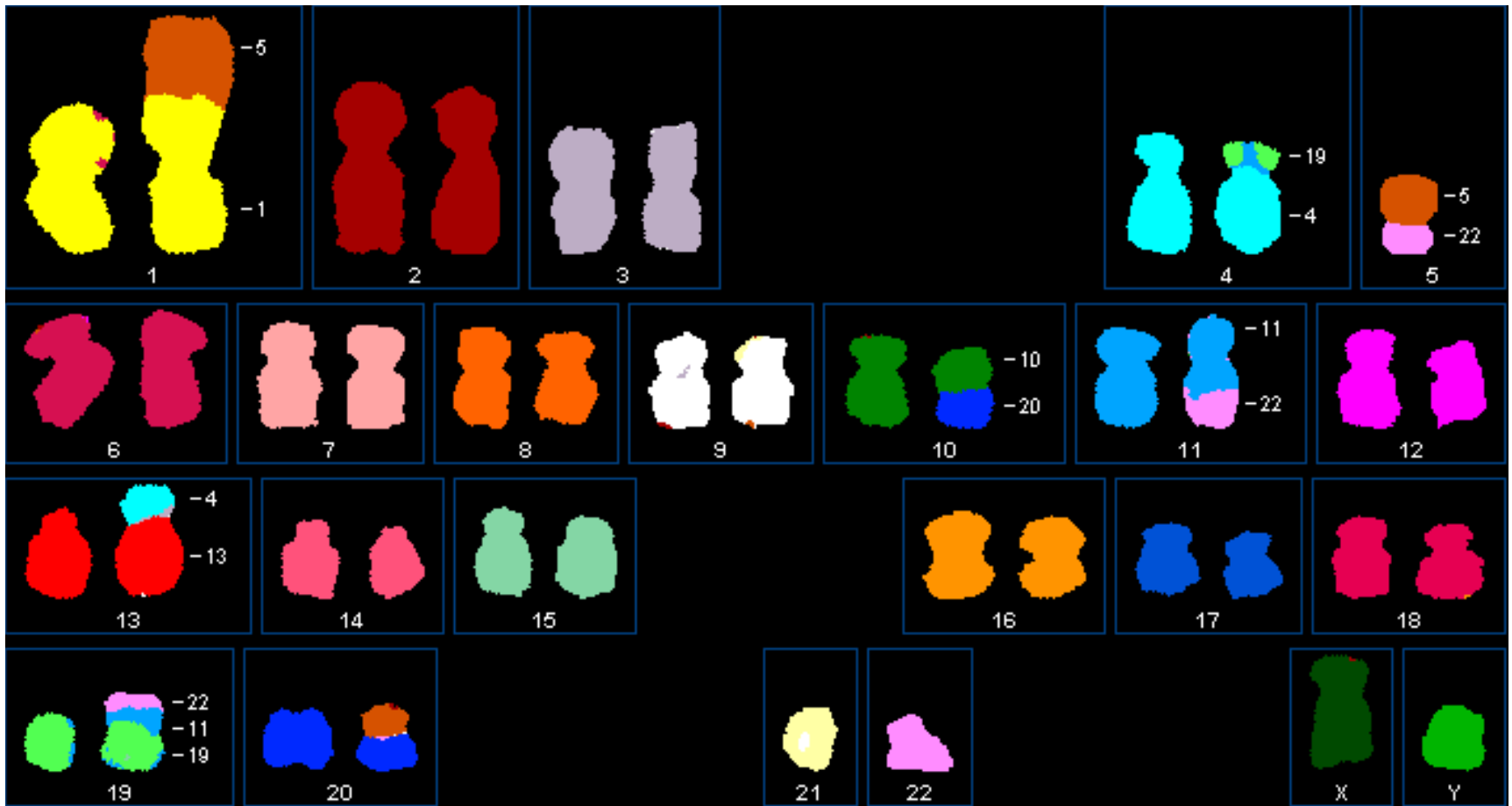
GenASIs HyperSpectral (Applied Spectral Imaging )



## Analýza obrazu pomocí software HiSKY



Software automaticky rozliší chromosomy dle změřeného spektra a zobrazí je v odpovídajících pseudobarvách – lze snadno rozlišit chromozomové páry a případné chromozomální aberace. Automaticky sestaví karyotyp...



- Pacientovi diagnostikován neuroblastom. Pomocí SKY detekována translokace t(11;22) specifická pro Ewingův sarkom → změna diagnózy a léčebného protokolu.

# M-FISH a SKY

## Výhody

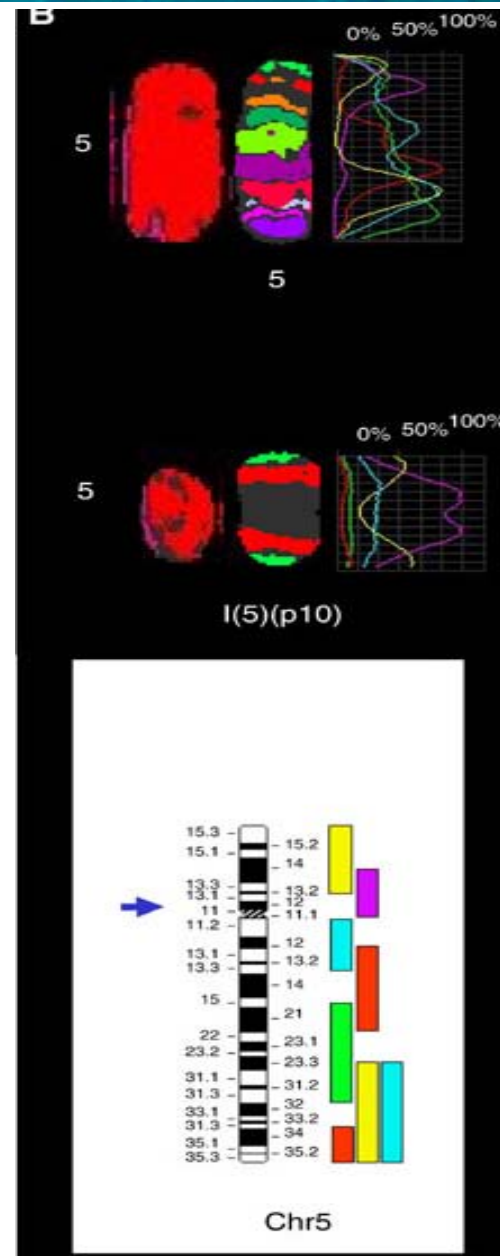
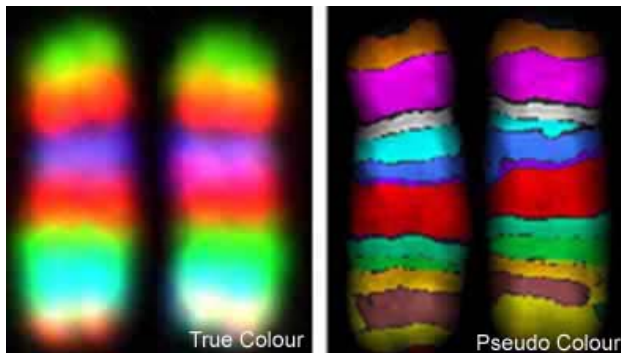
- odhalení balancovaných přestaveb
- detekce aberací v jednom kroku
  - kryptické translokace a inserce
  - marker chromozomy
  - nadbytečný materiál neznámého původu
  - komplexní přestavby

## Nevýhody

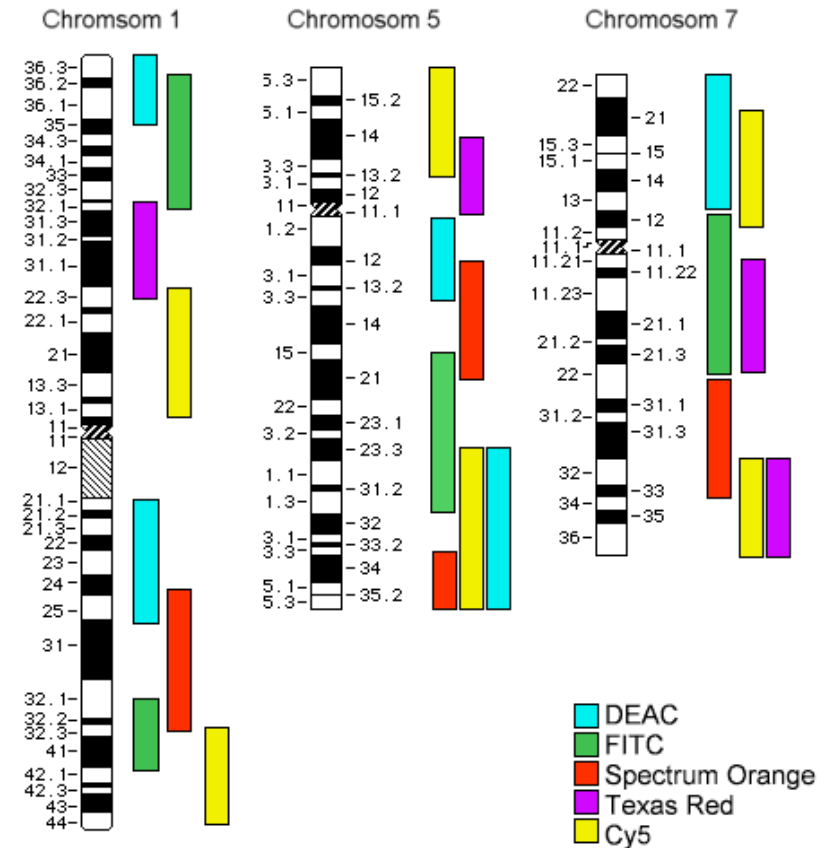
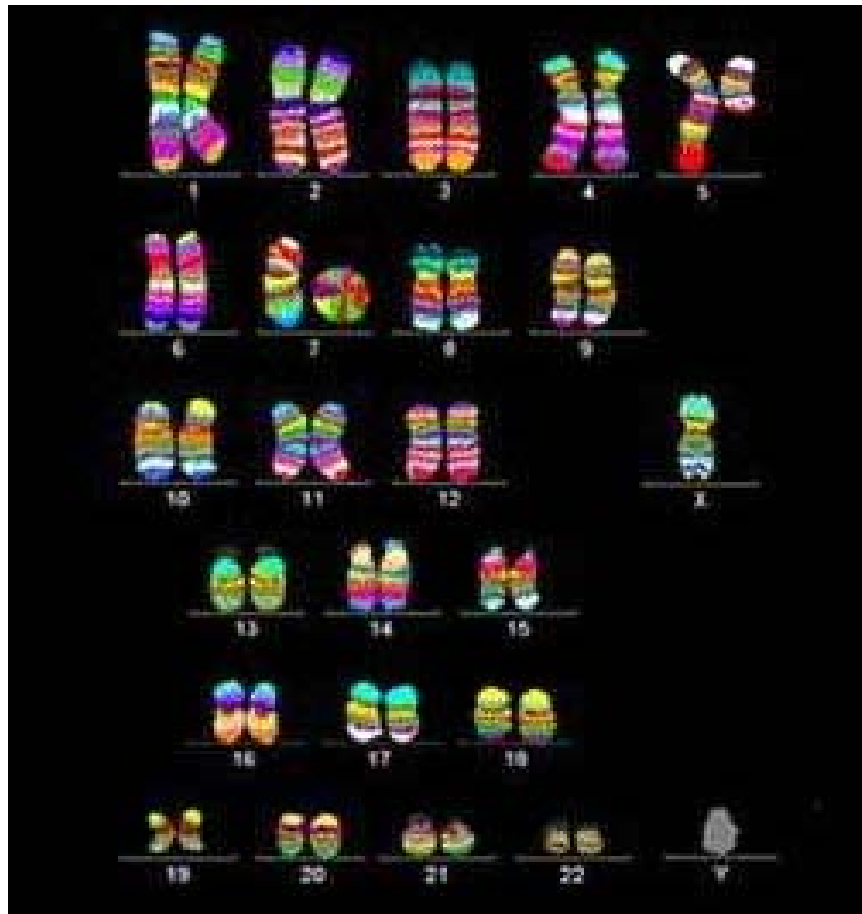
- vyžaduje kvalitní mitózy – vhodný materiál, metodicky a časově náročné
- úspěšná hybridizace
- finančně nákladné
- nelze detekovat inverze, duplikace/delece menšího rozsahu

# Mnohobarevné pruhování (M-banding)

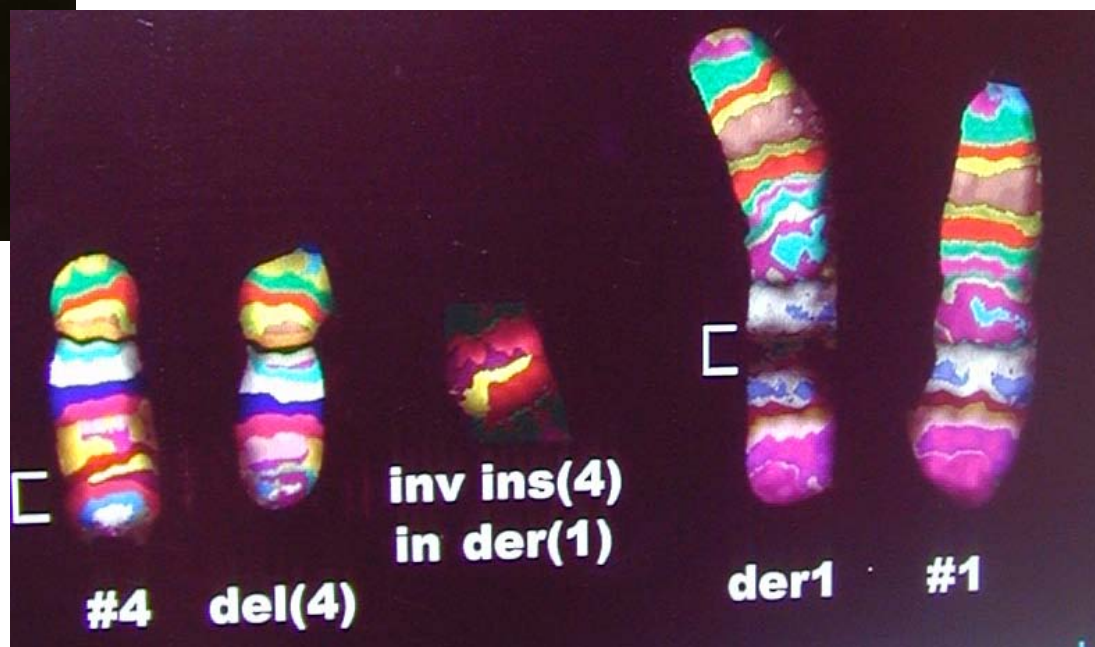
- parciální malovací sondy ze specifických oblastí chromozomů
- fluorescenční signály jednotlivých sond se podél sledovaného chromozomu částečně překrývají a dochází k jejich kombinaci



# Mnohobarevné pruhování (M-banding)







- charakterizace místa zlomu
- rozlišení intrachromozomových přestaveb

# Komparativní genomová hybridizace (CGH)

Comparative genomic hybridisation

**Hybridizace:** metoda založená na technice FISH

**Genomová:** umožňuje v jedné hybridizační reakci detekovat nebalancované změny v celém genomu; stanovit chromozomové změny vedoucí ke ztrátám (monozomie, delece) či zmnožení (zisky, amplifikace) sekvencí DNA

**Komparativní:** založená na porovnávání dvou genomů

# Vývoj CGH byl podnícen snahou o rozvoj cytogenetiky solidních nádorů



Kallioniemi et al. 1992

## Comparative Genomic Hybridization for Molecular Cytogenetic Analysis of Solid Tumors

Anne Kallioniemi,\* Olli-P. Kallioniemi, Damir Sudar, Denis Rutovitz, Joe W. Gray, Fred Waldman, Dan Pinkel

Comparative genomic hybridization produces a map of DNA sequence copy number as a function of chromosomal location throughout the entire genome. Differentially labeled test DNA and normal reference DNA are hybridized simultaneously to normal chromosome spreads. The hybridization is detected with two different fluorochromes. Regions of gain or loss of DNA sequences, such as deletions, duplications, or amplifications, are seen as changes in the ratio of the intensities of the two fluorochromes along the target chromosomes. Analysis of tumor cell lines and primary bladder tumors identified 16 different regions of amplification, many in loci not previously known to be amplified.

The discovery of genetic changes involved in the development of solid tumors has proven difficult. Karyotyping is impeded by the low number of high-quality metaphase spreads and the complex nature of chromosomal changes (1). Molecular genetic studies of isolated tumor DNA have been more successful and have been used to detect

common regions of allelic loss, mutation, or amplification (2, 3). However, such molecular methods are highly focused; they target one specific gene or chromosome region at a time and leave the majority of the genome unexamined.

We have developed a molecular cytogenetic method, comparative genomic hybridization (CGH), that is capable of detecting and mapping relative DNA sequence copy number between genomes. A copy number karyotype can be generated for a tumor by the comparison of DNAs from malignant and normal cells, thereby identifying regions of gain or loss of DNA. In this application of CGH, biotinylated

A. Kallioniemi, O.-P. Kallioniemi, D. Sudar, J. W. Gray, F. Waldman, D. Pinkel, Division of Molecular Cytometry, Department of Laboratory Medicine, University of California at San Francisco, San Francisco, CA 94143; D. Rutovitz, Medical Research Council Human Genetics Unit, Western General Hospital, Edinburgh EH4 2XU, United Kingdom.

\*To whom correspondence should be addressed.

818

SCIENCE • VOL. 258 • 30 OCTOBER 1992

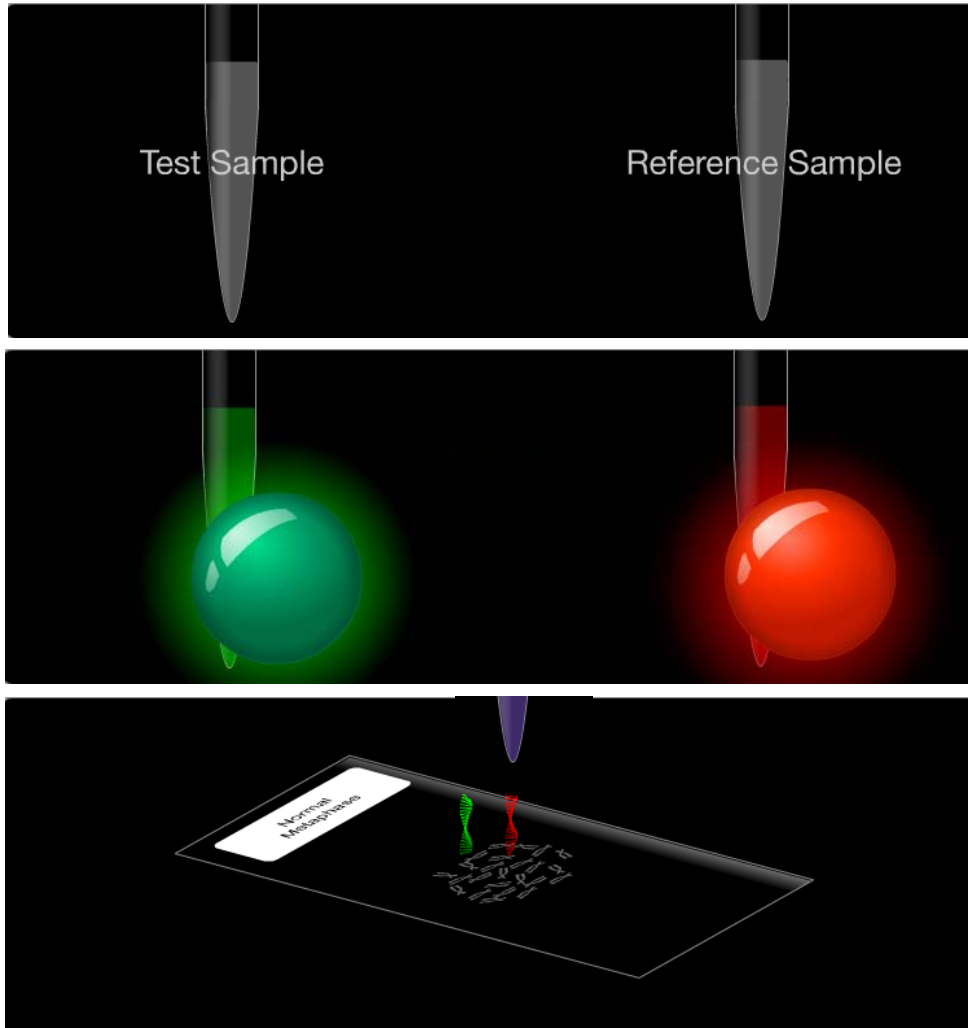


**CGH nevyžaduje mitotickou aktivitu zkoumaných buněk – materiál pro CGH je DNA!**

## Jednotlivé kroky metody CGH

- příprava normálních metafázních chromozomů (od zdravého jedince)
- izolace DNA z nádoru, periferní krve, kostní dřeně (2–3 µg)
- **značení testované a referenční (normální) DNA rozdílnými fluorochromy** (nick-translace, fragmenty 600 – 2000 bp)
- denaturace, **hybridizace značené DNA na normální metafázní chromozomy**
- snímání metafáz (10-20) citlivou CCD kamerou pod jednotlivými filtry
- karyotypování chromozomů nabarvených DAPI
- statistické zpracování a **počítačové vyhodnocení poměrů intenzit fluorescence podél jednotlivých chromozomů** pomocí speciálního programu
- místa s vyšší či nižší intenzitou fluorescence odpovídají oblastem zisků a ztrát sekvencí DNA – profily

# Princip CGH



## Izolace a kvantifikace genomové DNA

- v následujících krocích použito stejné množství testované a referenční DNA

## Značení (nick-translace) vzorků DNA odlišnými fluochromy

- obvykle **testovaná zeleně** a **referenční červeně**

## Smíchání ekvivalentních množství DNA a aplikace směsi na metafázní chromozomy → hybridizace

- sondou je celogenomová DNA



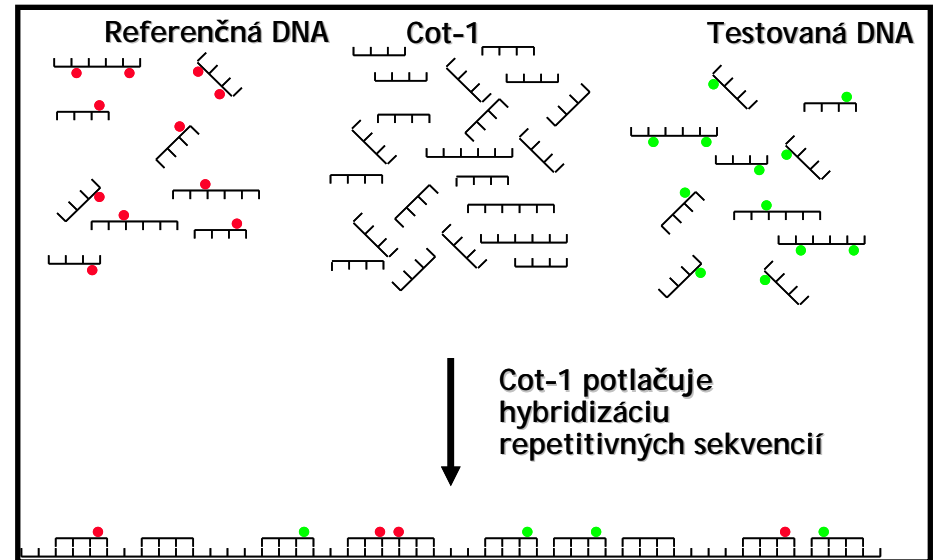
# Princip CGH

## Ve směsi využita Cot-1 DNA

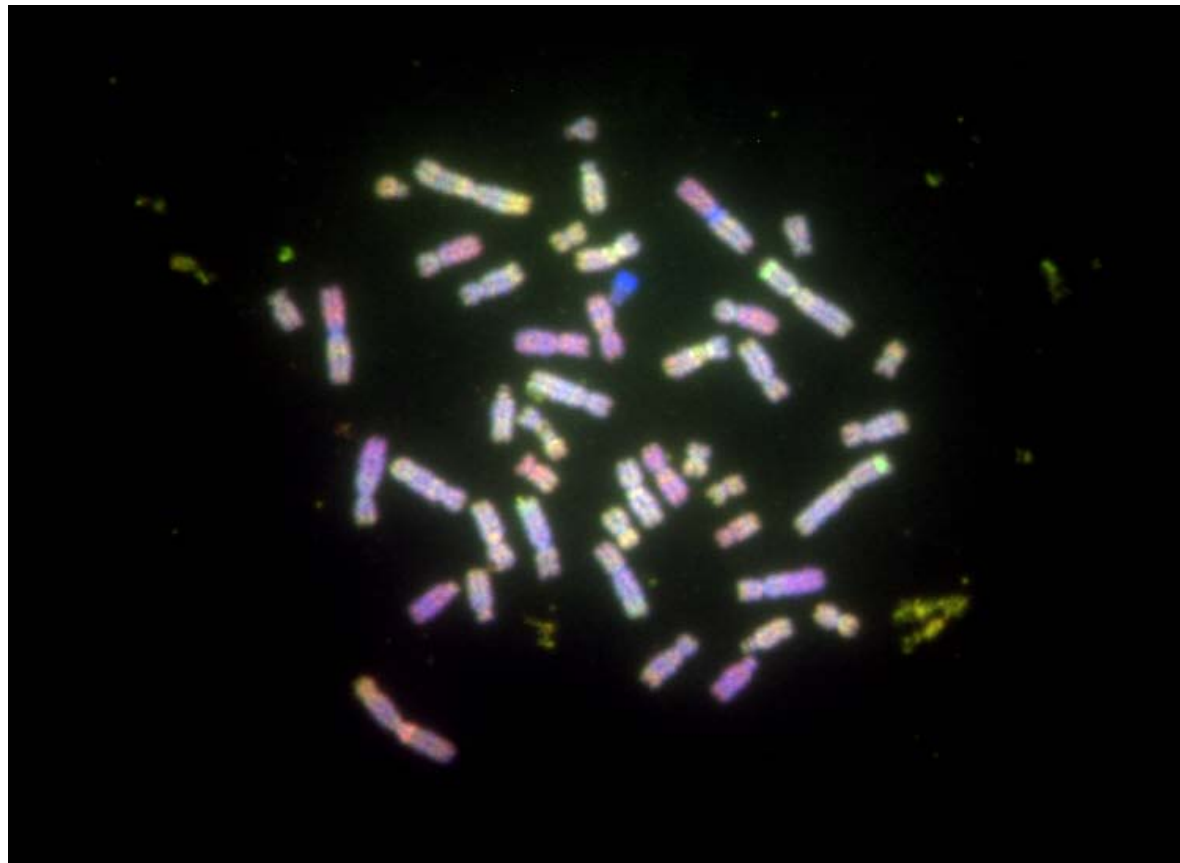
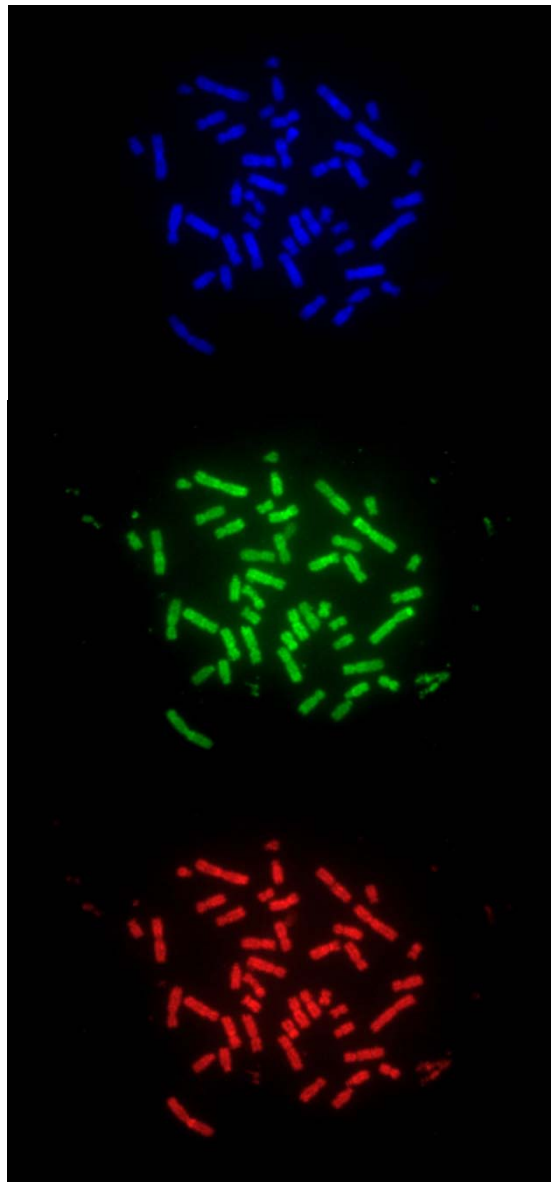
- připravena z placentální DNA
- potlačuje hybridizaci Alu a dalších repetitivních sekvencí

## Fragmentace značené DNA

- optimalizace hybridizace na metafázní chromozomy

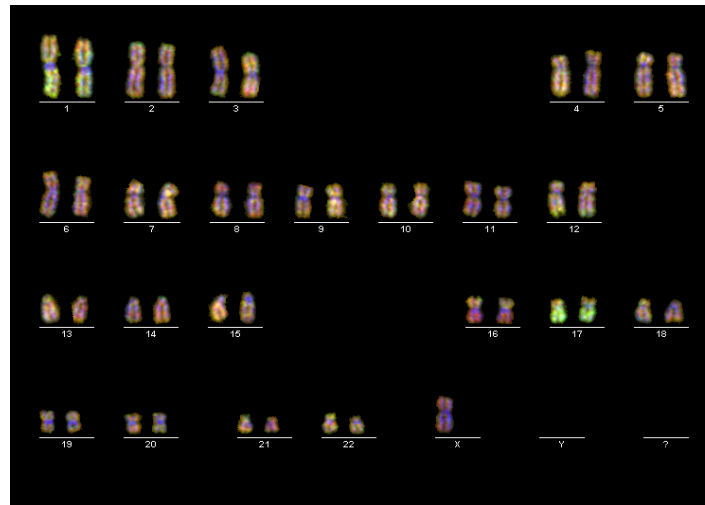
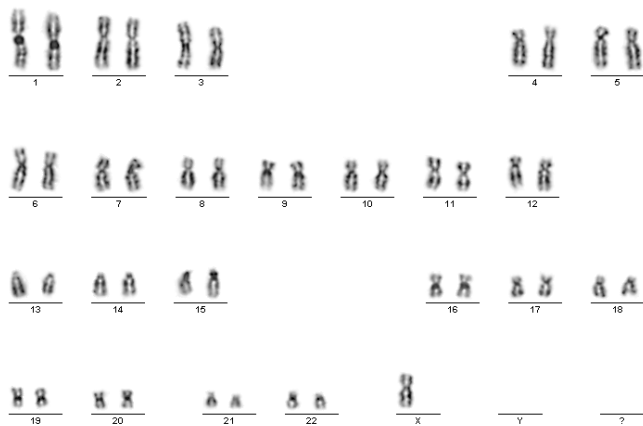
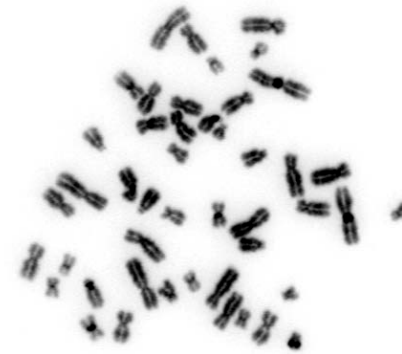
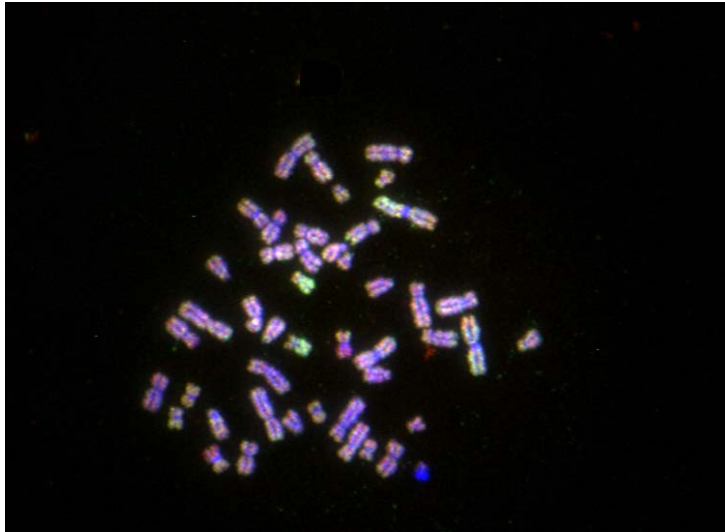


... následuje 48–72 h hybridizace, odmytí nenačkané sondy, podbarvení chromozomů pomocí DAPI a snímání pod fluorescenčním mikroskopem.



**Nasnímání mitózy citlivou CCD kamerou v modrém, zeleném a červeném spektru → složený obraz**

- výrazné barevné odchylky naznačují přítomnost chromozomových aberací

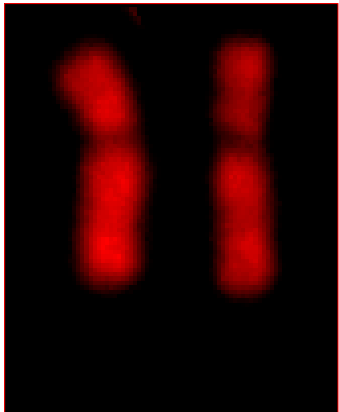


## Pomocí DAPI podbarvení se na chromozomech vytvoří pseudo G-pruhování

- identifikaci jednotlivých chromozomů – zobrazení jako karyogram

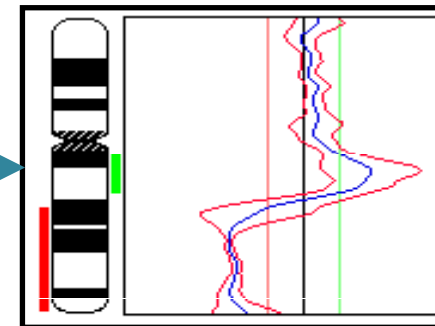
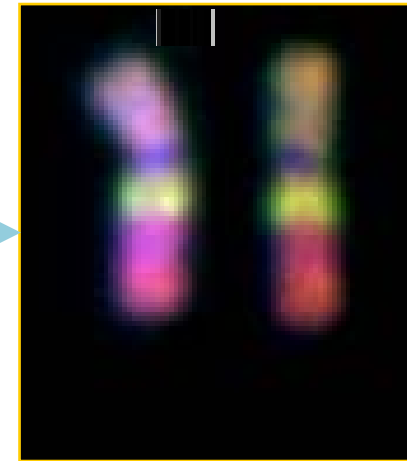
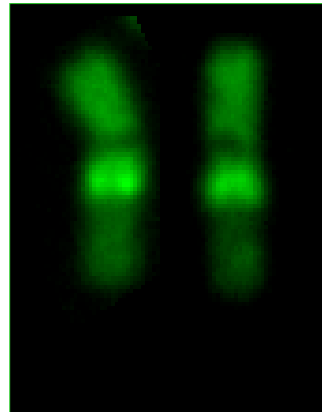
# Počítačová analýza obrazu: Zelená s červenou...

Referenční DNA



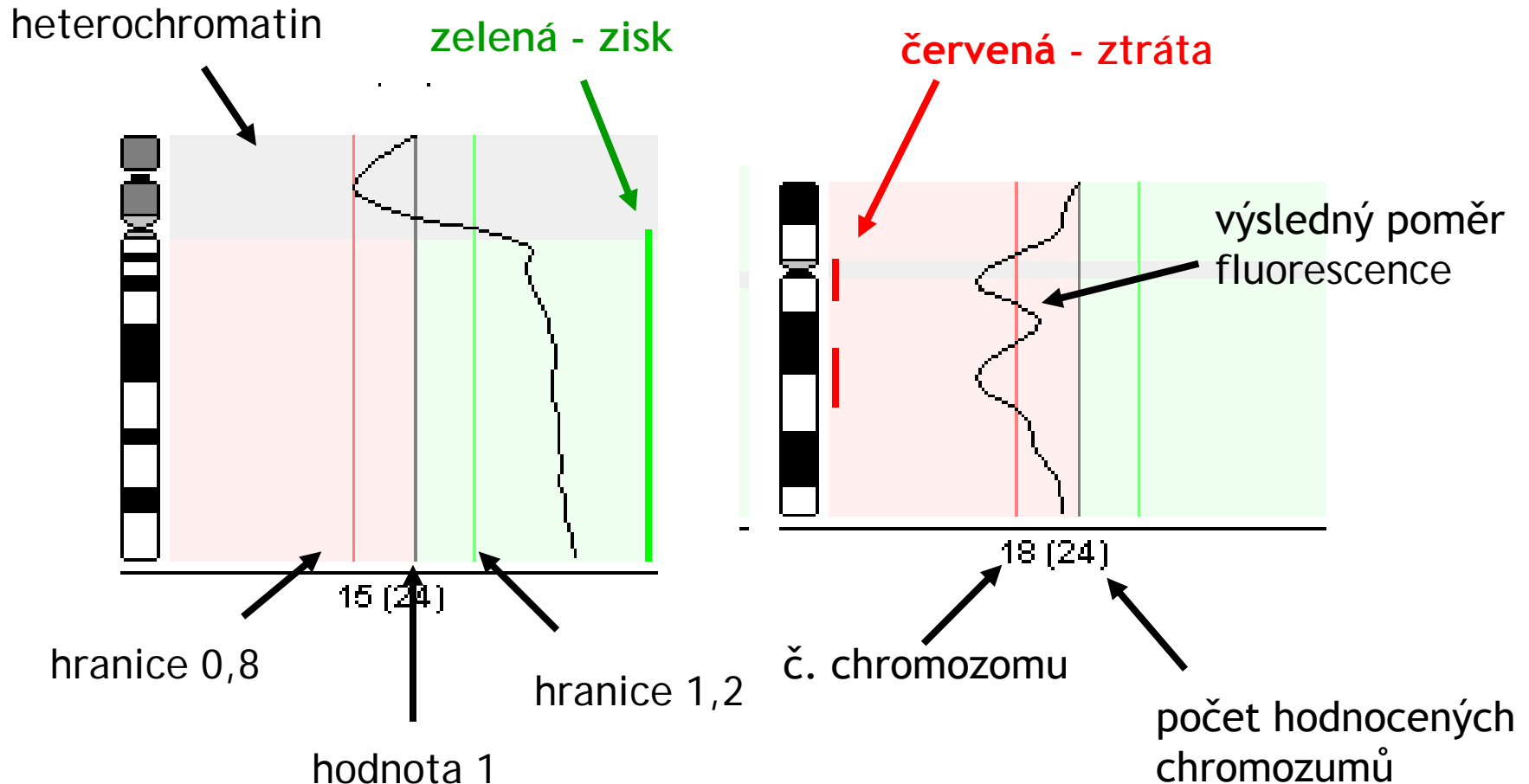
+

Testovaná DNA

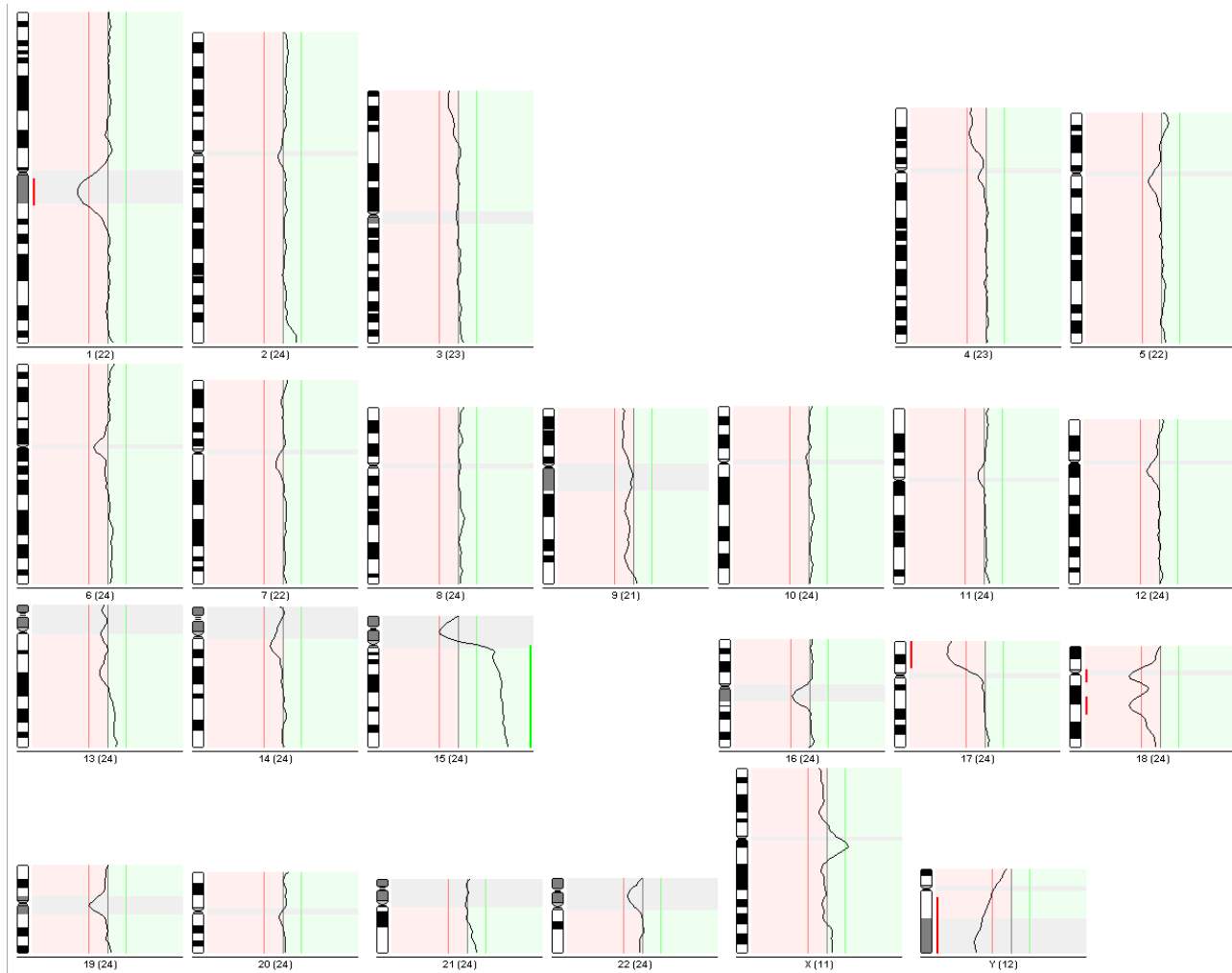


# Interpretace výsledku CGH

enh → zisky, amplifikace  
dim → ztráty, delece



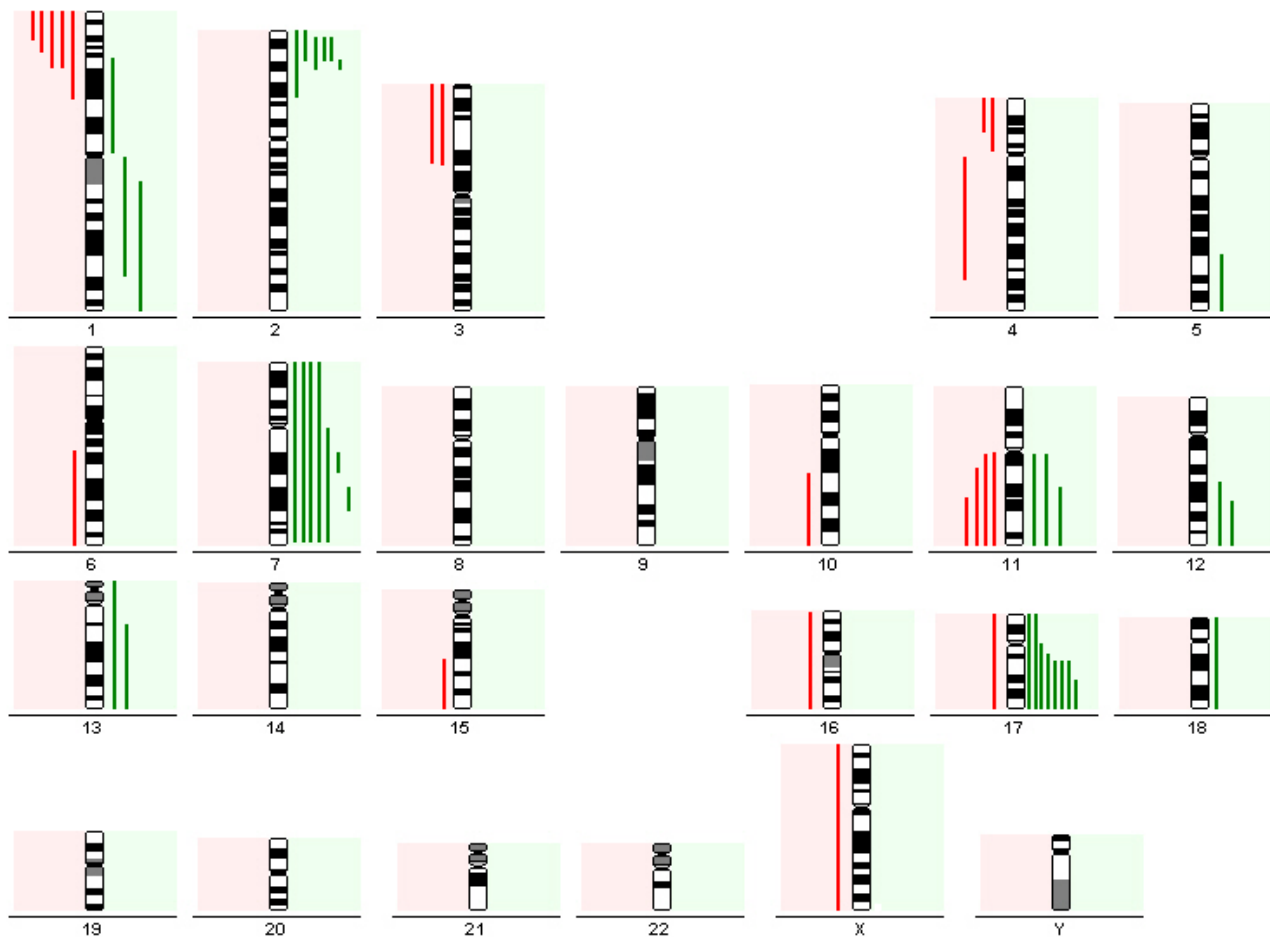




rev ish enh (15q)  
rev ish dim (17p,  
18q, Y)

**Ukázka profilu CGH zpracovaného počítačovou analýzou obrazu u pacienta s CLL**

# Sumarizace výsledků z více vzorků



- Identifikace markerů onemocnění
- Identifikace kauzálních aberací

Souhrnný výsledek CGH u 15 pacientů s neuroblastomem

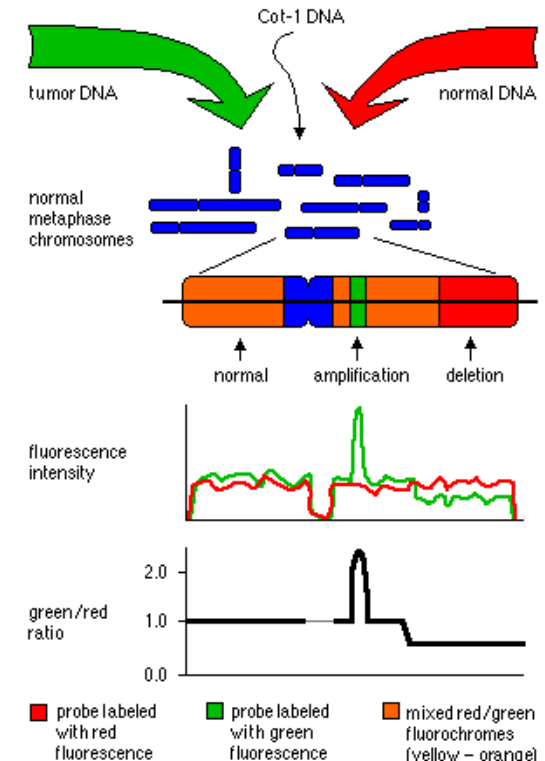
# Výhody a nevýhody klasické CGH

## Výhody

- nevyžaduje mitózy pro testovaný vzorek
- poskytuje přehled numerických změn v celém genomu v jedné hybridizační reakci

## Nevýhody

- nemožnost využití u změn, při kterých se nemění počet sekvencí – balancované aberace (translokace, inverze)
- není vhodná k odlišení ploidie (normalizace)
- možnost identifikovat jenom změny přítomné min. v 50 % buněk
- rozlišovací schopnost 10 Mb



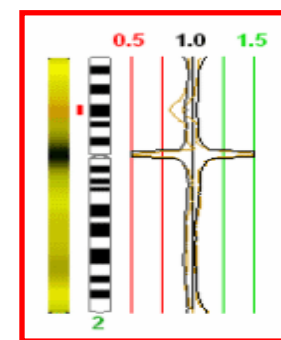
→ HR-CGH, aCGH

# Komparativní genomová hybridizace s vyšším rozlišením (HR-CGH)

Kirchhoff et al., 1997

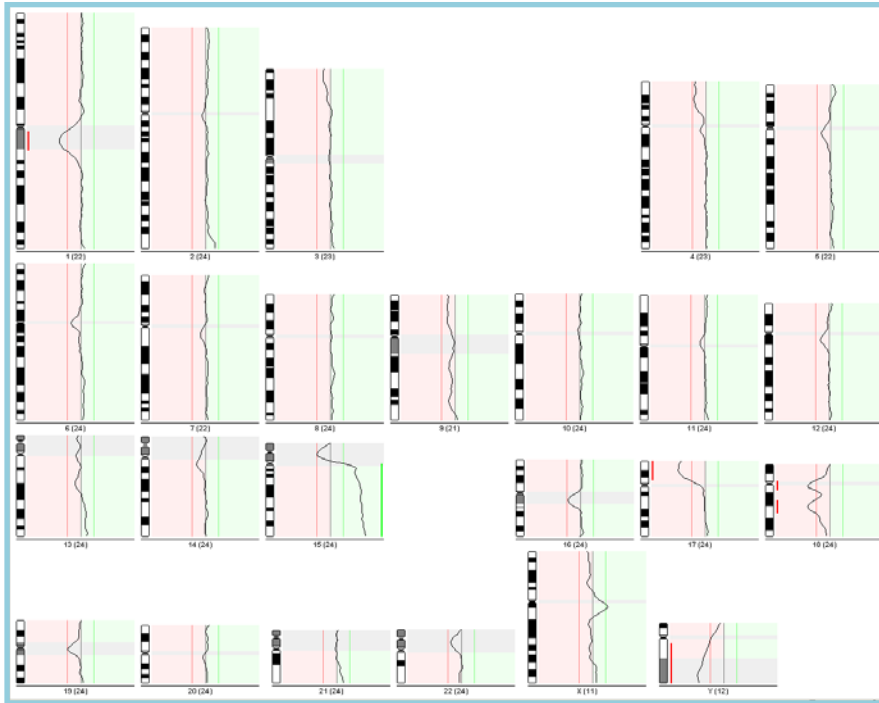
## Princip HR-CGH:

- laboratorní postup stejný jako v případě CGH
- **odlišné vyhodnocování pomocí speciálního software – statistika!**  
(Laboratory Imaging s r.o., Praha)
- rozlišovací schopnost – 4 Mb
- klonální zastoupení – 30 %



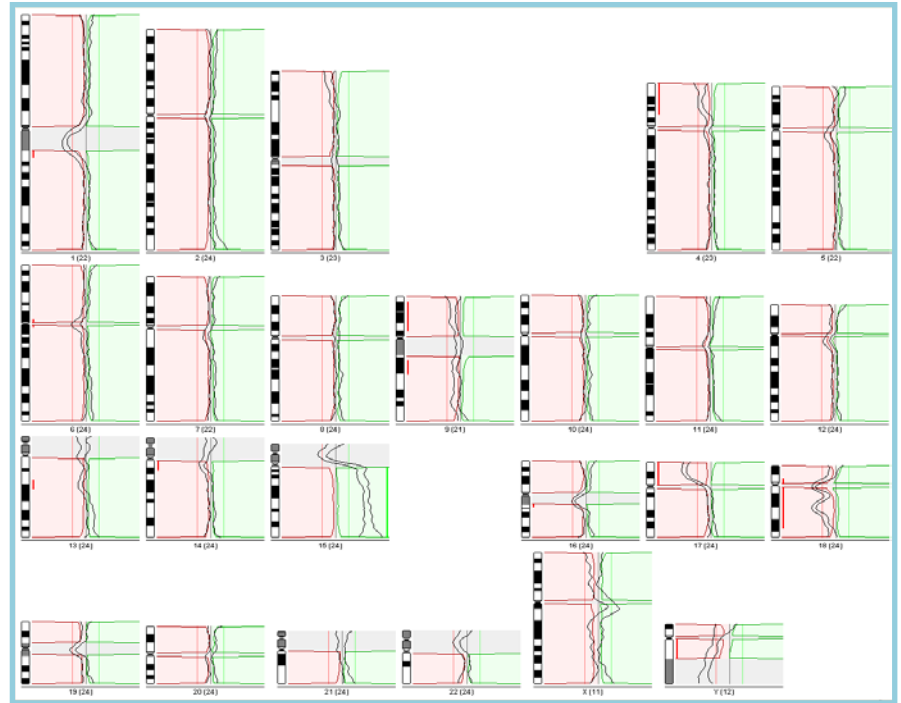
# Porovnání výsledku CGH a HR-CGH u pacienta s CLL

## CGH



rev ish enh (15q)  
rev ish dim (17p, 18q, Y)

## HR-CGH

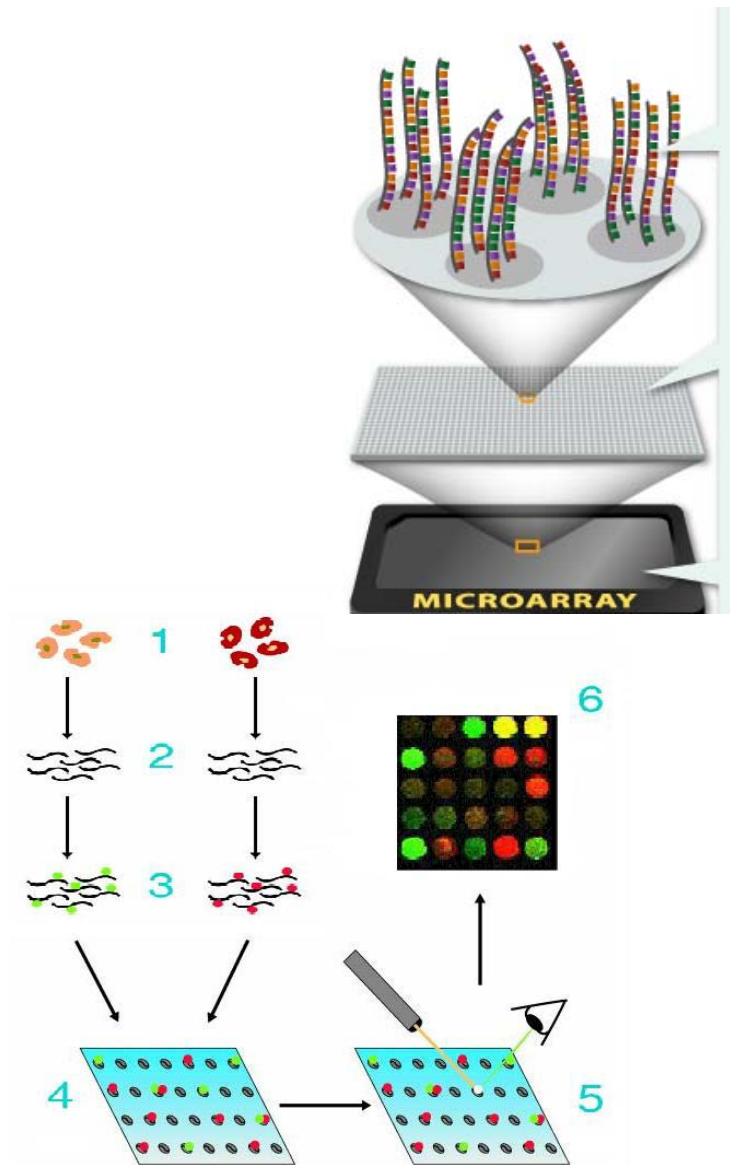


rev ish enh (15q)  
rev ish dim (4p, 9p, 9q12, 13q14,  
17p, 18q, Y)



# DNA čipy

- skládají se z jednotlivých **molekul DNA o známé sekvenci** (sondy), které jsou upevněny ve shlucích (spoty) na pevném podkladu (sklo, syntetické materiály)
- počet spotů se pohybuje od řádově stovek do desetitisíců podle typu čipů
- umožňují detekci chromozomových aberací, mutací a polymorfizmů, sekvenační analýzy ale i studium genové exprese
- **principem** metody je hybridizace značené vyšetřované DNA s imobilizovanými sondami na čipu



# Aplikace DNA čipů

## Analýza genomu

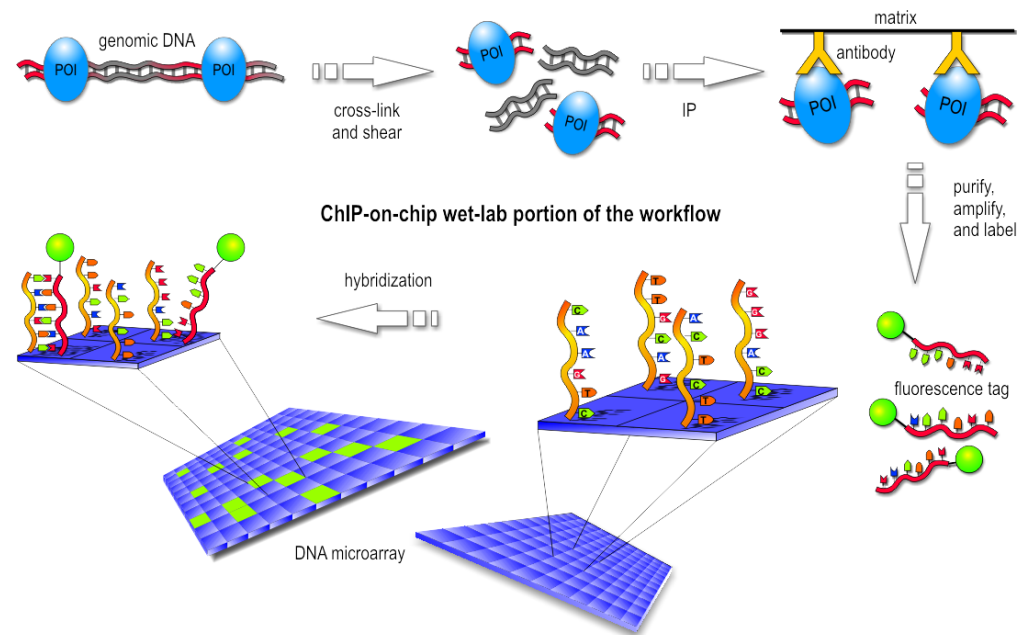
- materiál: genomová DNA
- **array-CGH**, SNP čipy, resekvenační čipy

## Expresní a funkčně specifické studie

- mRNA, proteiny  
(např. transkripční faktory)

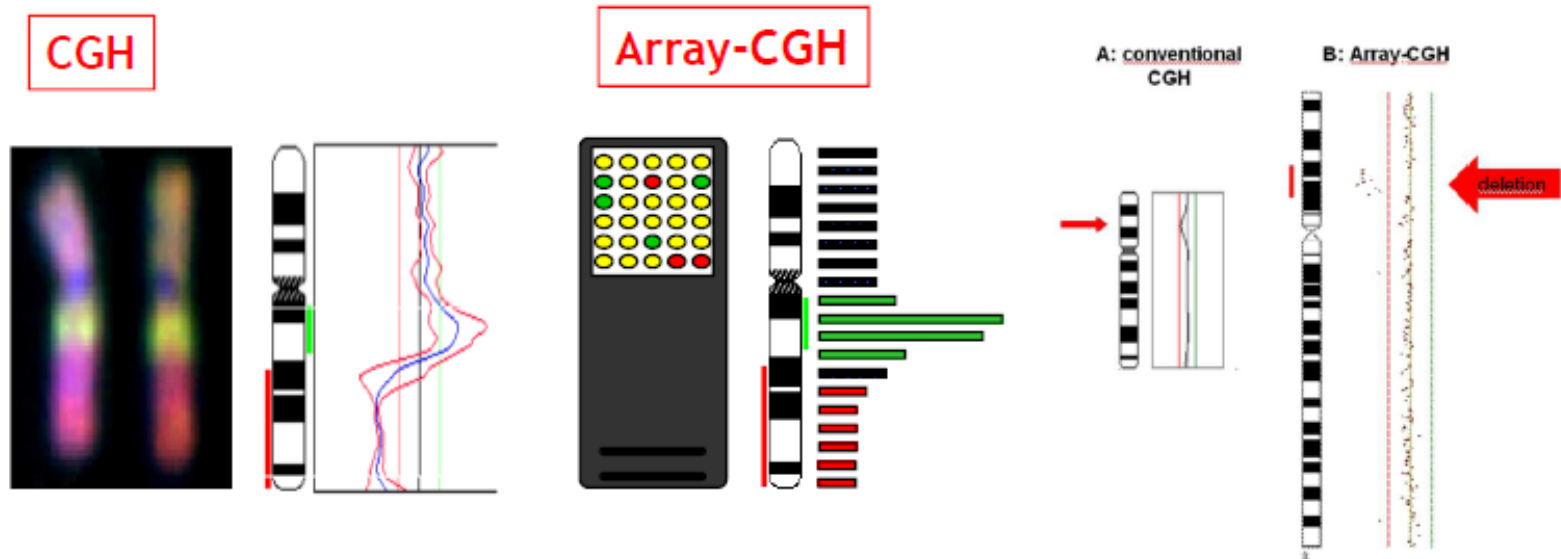
## Epigenetické studie

- ChIP-on-Chip  
(vazba proteinu/komplexu na DNA)



# Array-CGH

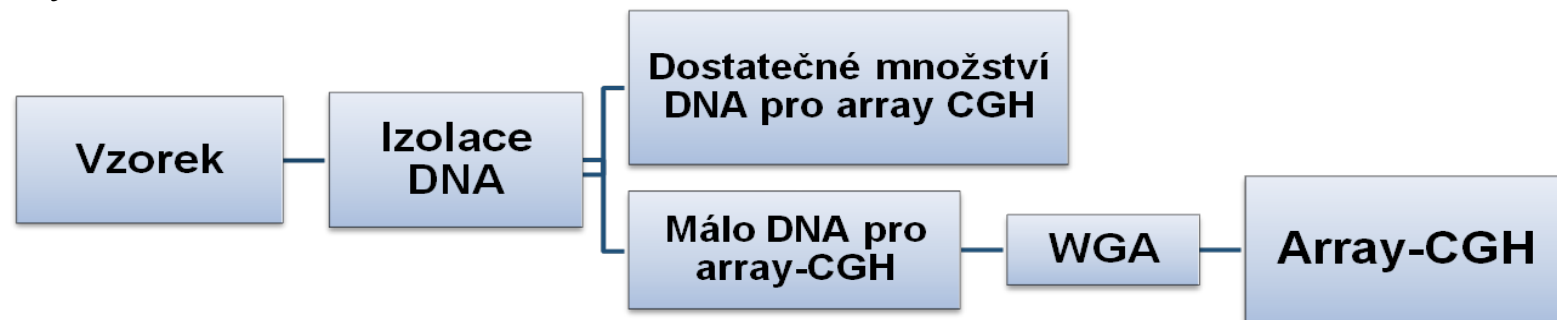
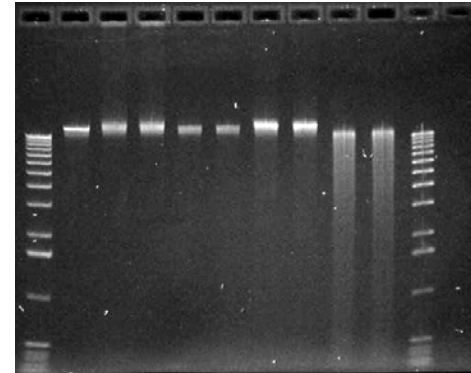
- **Solinas-Toldo et al., 1997**
- vychází z principu klasické (chromozomální) CGH
- nahrazení chromozomů separovanými klony (BAC, c-DNA klony, oligonukleotidy)
- duplikace, delece, amplifikace – CNV(copy number variants)
- nedetekuje balancované přestavby



# Array-CGH

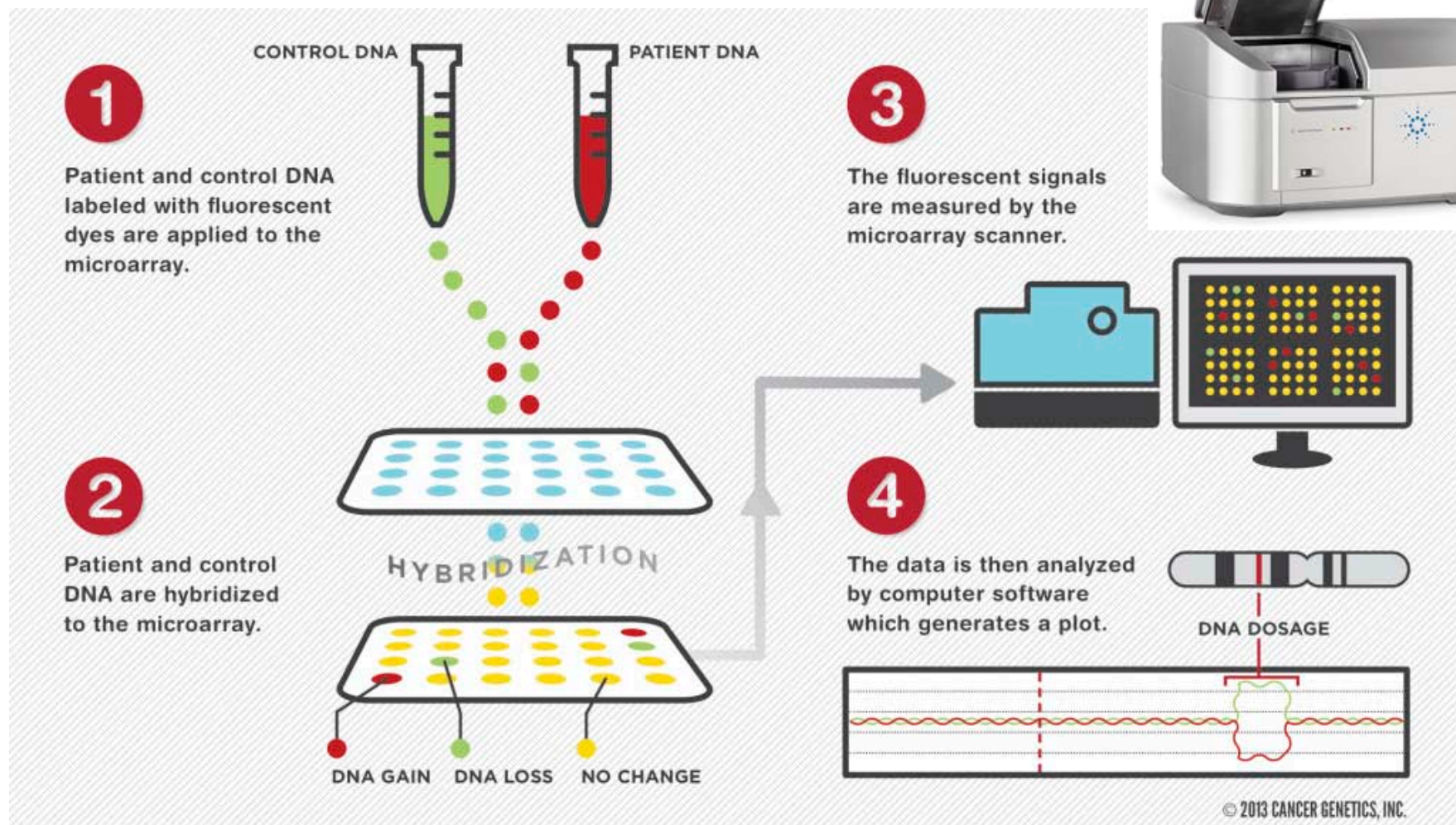
## Postup

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





# Princip array-CGH





# Příprava DNA čipů pro techniku array-CGH

## 1. Target loading



## 2. Assemble hybrid. chamber



## 5. Scanning



## 3. Incubation



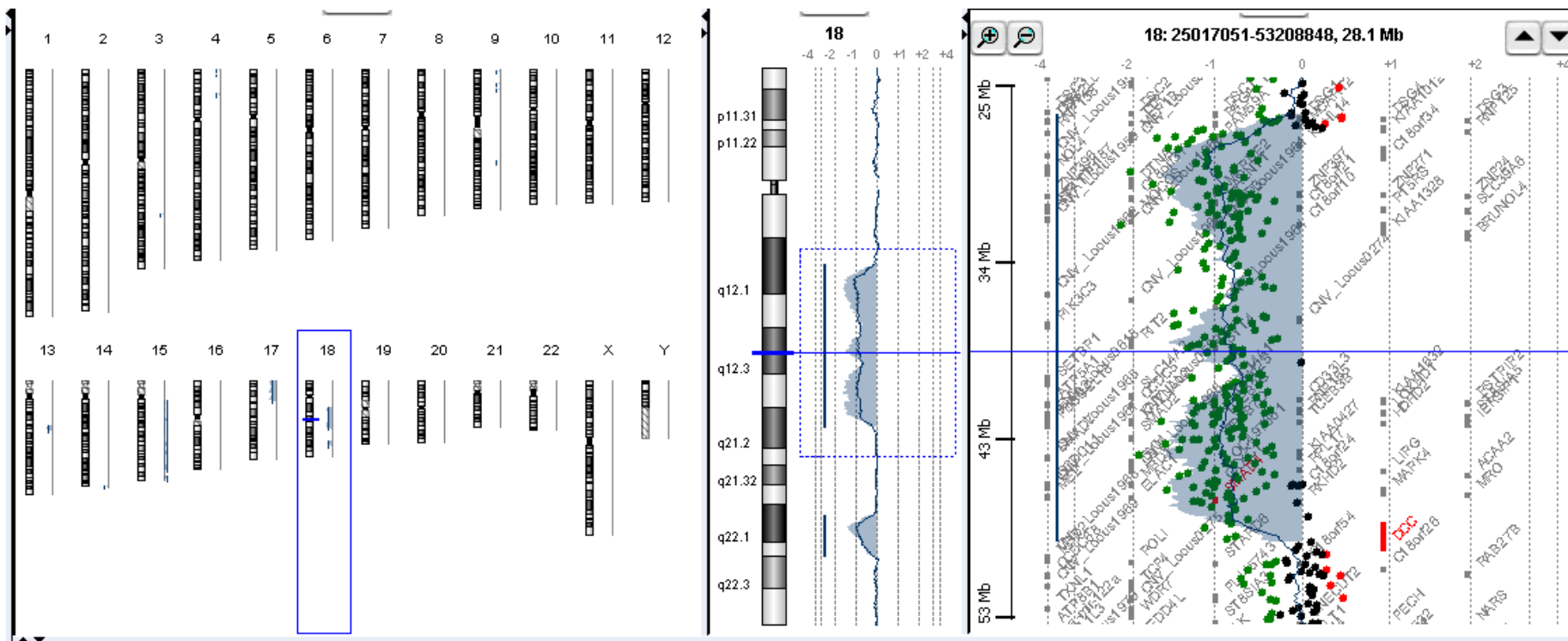
## 4. Wash



## 6. Analysis and interpretation



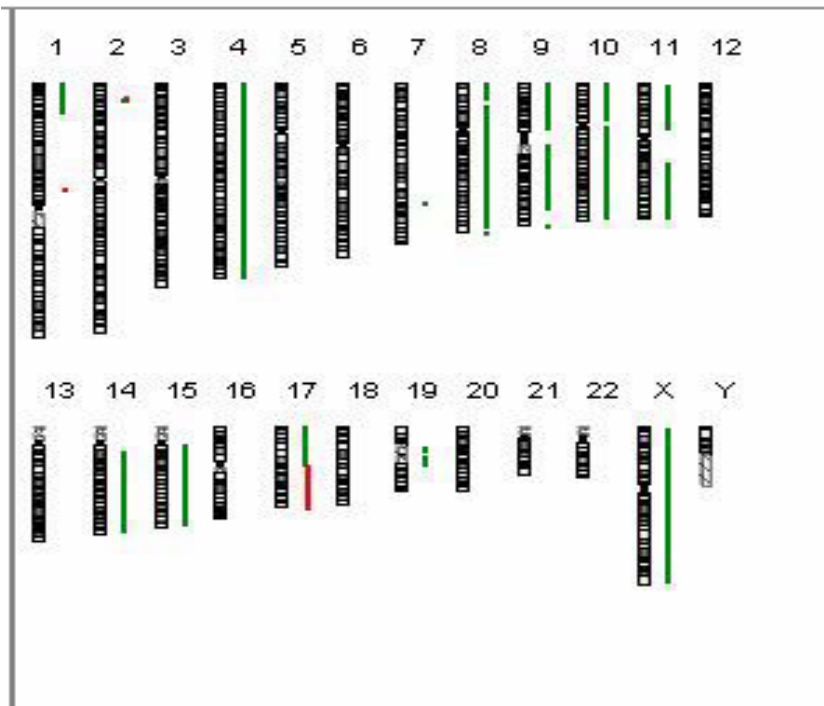
# Vyhodnocování array-CGH



aCGH Analytics Software, Agilent Technologies

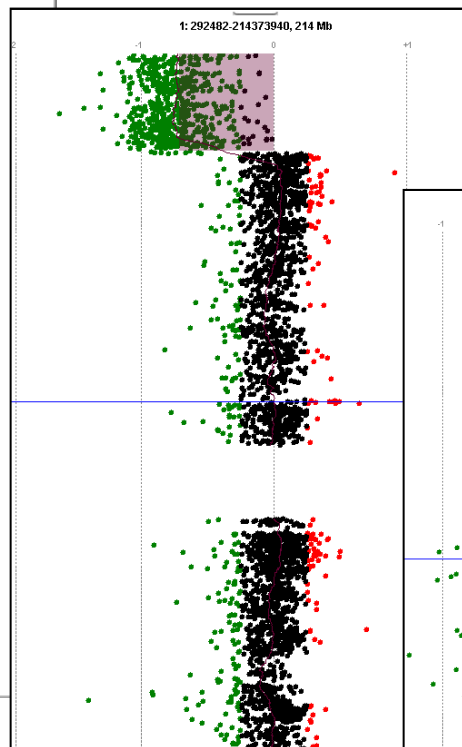
# Celogenomová analýza u pacienta s neuroblastomem pomocí aCGH

## Genome Overview

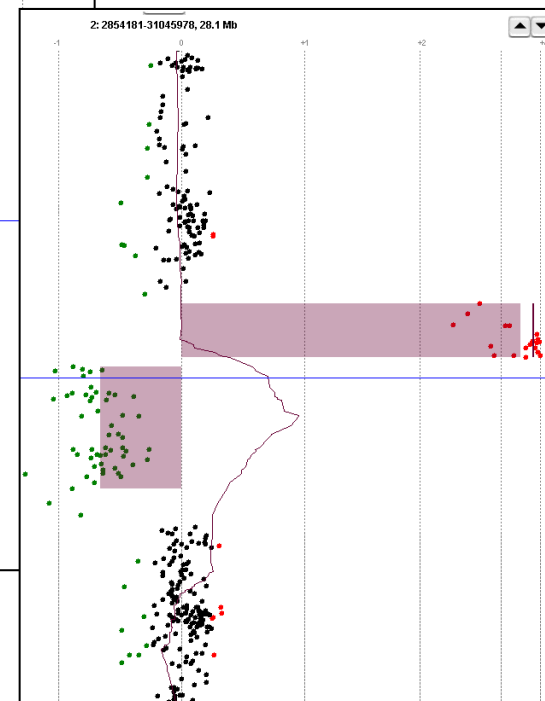


### Analysis Settings

Aberration Algorithm : ADM-1  
Threshold : 6.0  
Centralization : ON  
Bin Size : 10  
Centralization : 6.0  
Threshold



1p36 delece a  
MYCN amplifikace



# Rozlišení array-CGH

## 1. Velikost klonů

Úseky genomové DNA vložené do vektorů

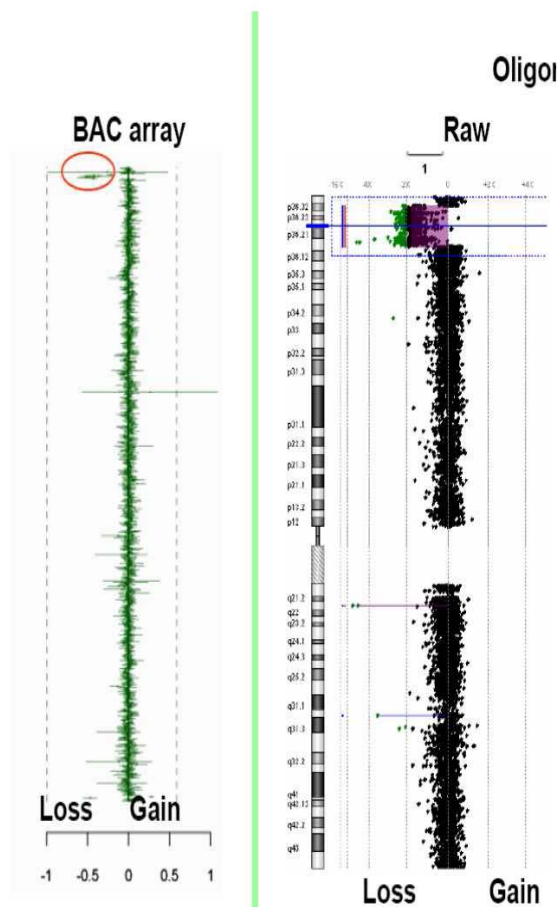
- BAC (Bacterial Artificial chromosome) - 50–200 kb
- PAC (Phage Artificial chromosome) - 75-200 kb
- Rozlišení ~ 1Mb

cDNA - 1-2 kb

- Pouze genové oblasti
- Rozlišení - 1-2 kb

Oligonukleotidy - 25-85 bází

- **Rozlišení pod 1 kb**
- s krátkými nebo dlouhými oligonukleotidy
- v současnosti nejrozšířenějším typem, použitelné pro prakticky všechny aplikace





# Rozlišení array-CGH

## 2. Rozložení a vzdálenost klonů

Cílená aCGH – vybrané oblasti zájmu, např. mikrolece, mikroduplikace

Chromozomově-specifická aCGH

Celogenomová aCGH

- sondy v určitých intervalech
- překrývající se – tiling arrays

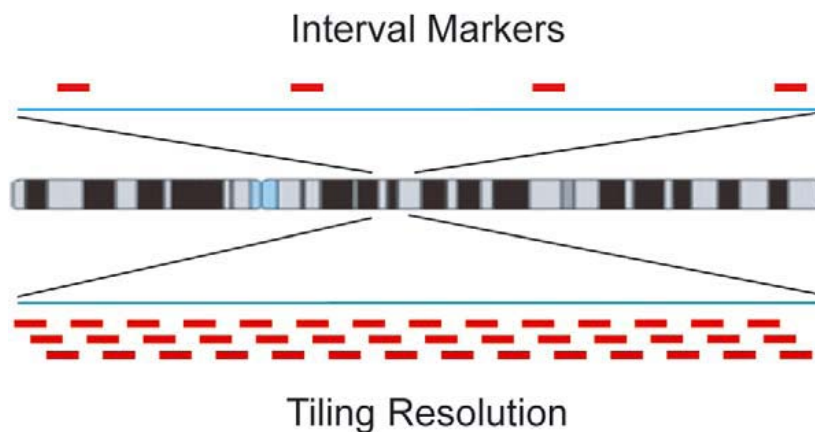


Table 1 List of genomic microarrays available

Microarray name	Coverage	Produced by
<b>Genome-wide microarrays</b>		
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)
<b>Targeted microarrays</b>		
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



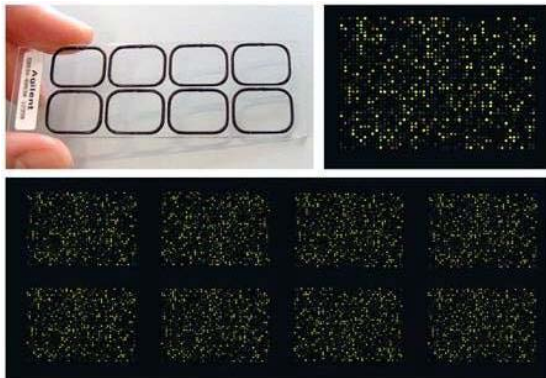
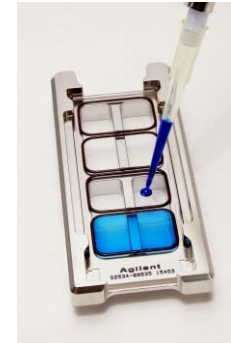
# Agilent Human CGH Microarray

## Oligo arrays

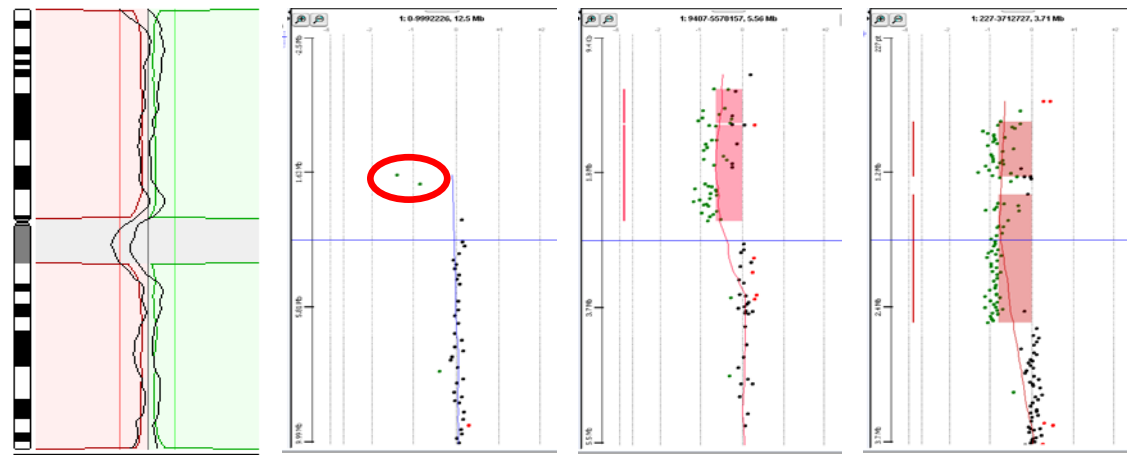
8x15K	custom chip
4x44K	43 kb rozlišení
2x105K	21 kb rozlišení
1x244K	9 Kb rozlišení

## 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)**

# Array-CGH

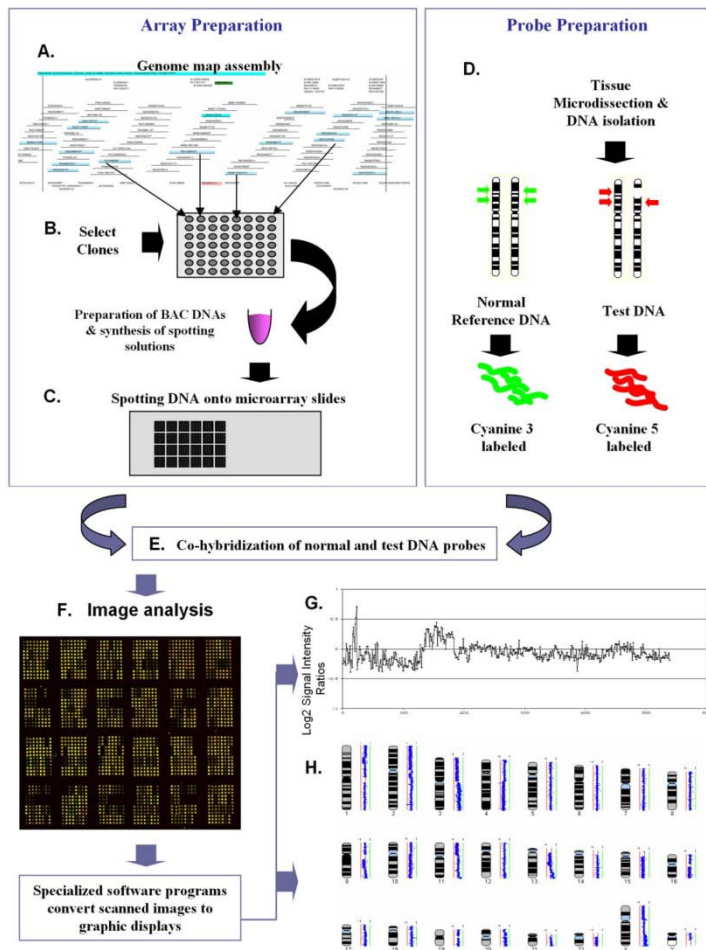
## Výhody

- přehled numerických změn v celém genomu v jedné hybridizační reakci
- přesná lokalizace změn – vysoké rozlišení

## Nevýhody

- neodhalí balancované aberace (translokace, inverze)
- neodhalí změny ploidie (např. tetraploidní nádor)
- časová a finanční náročnost

# Molekulární karyotypování – 1000x citlivější než klasická cytogenetika



		Resolution	Coverage
a	<b>Cytogenetics</b>		
	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	<b>aCGH</b>		
	BAC	100 Kb (Spectral Genomics - 2 Mb)	Complete
	cDNA	2 Kb	Genes Only
	Oligo (60-mer)	0.06 Kb	Complete

**! ALE !** Redukuje informaci o heterogenitě analyzované buněčné populace

# Klinická cytogenetika: Prenatální cytogenetická diagnostika

## Vyšetřovaný materiál

- kultivované i nekultivované buňky plodové vody, fetální krev, choriové klky

## FISH

### AneuVysion Assay Kit (Abbott Vysis)

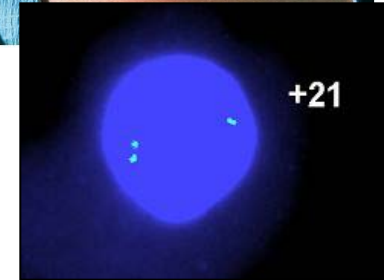
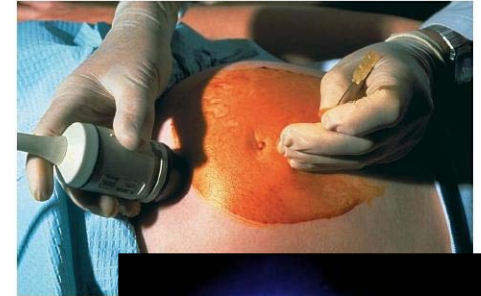
- trizomie chromozomů 13, 18, 21 (Patau, Edward, Down sy)
- vyšetření sestavy a počtu gonozomů (XX, XY)

### Mikrodeleční syndromy

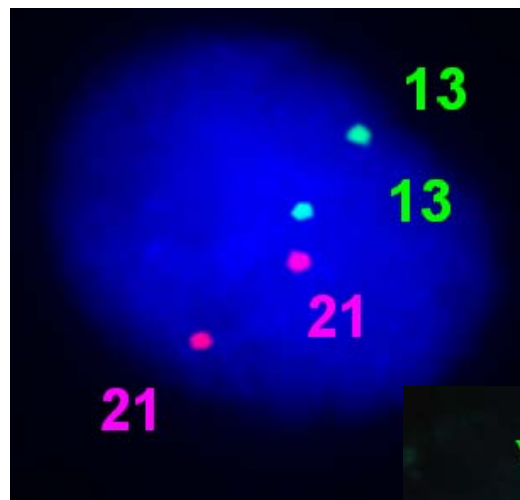
- DiGeorge sy (del(22)(q11.2))

## Array-CGH:

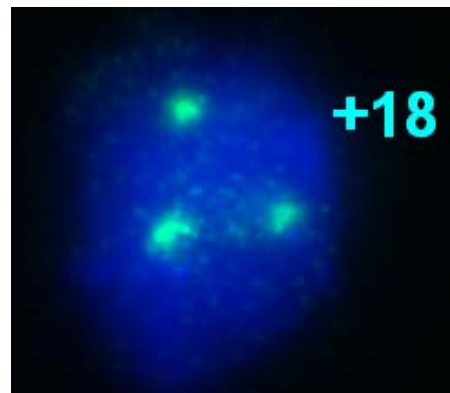
- Celogenomový screening



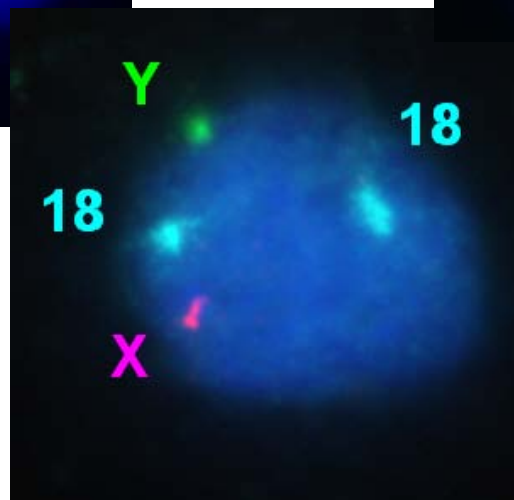
# Prenatální cytogenetická diagnostika



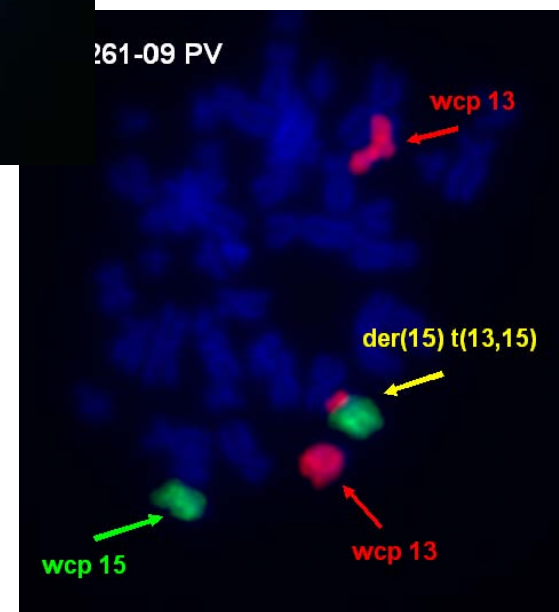
Normální buňky



trizomie chr. 18



t(13;15)

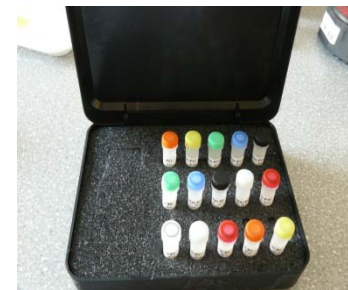




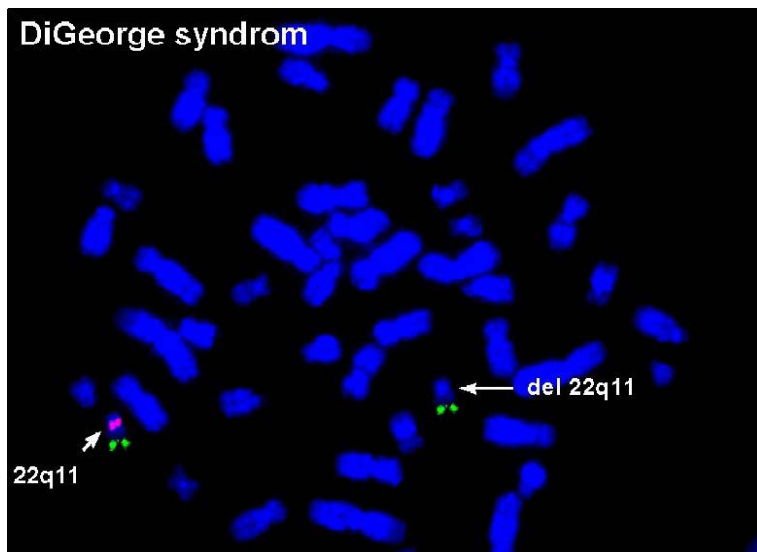
# Klinická cytogenetika: Postnatální cytogenetické analýzy

## Vyšetřovaný materiál

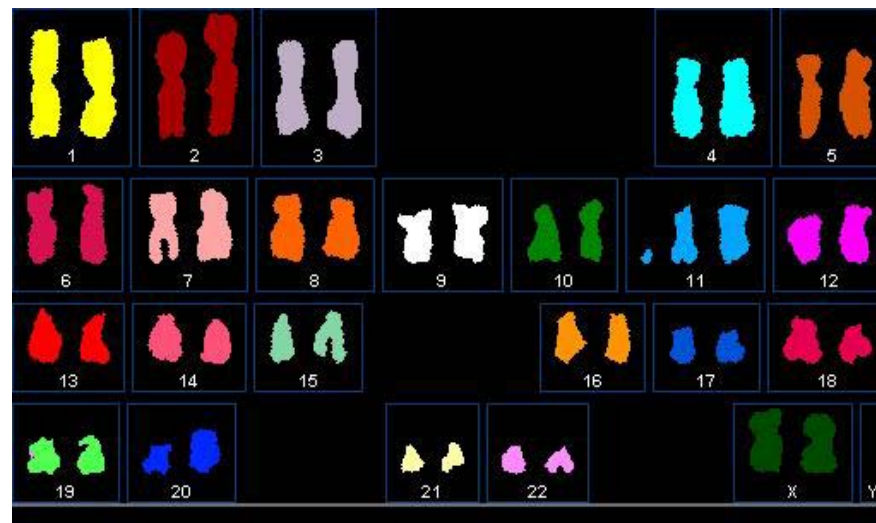
- periférní lymfocyty, bukální stěry
- Mikrodeleční syndromy – **FISH**
  - DiGeorge sy, Prader-Willi/Angelman sy, Williams-Beuren sy, 1p36 mikrodeleční sy a další
- Původ marker chromozomů – **CGH, SKY, WCP FISH**
- Identifikace a specifikace numerických a strukturních chr. aberací – **CGH, SKY**
- Detekce gonozomálních mosaik – **FISH (X/Y sondy)**



# Postnatální cytogenetické analýzy



FISH: DiGeorge syndrom



SKY: identifikace marker chromosomu (chr. 11)

