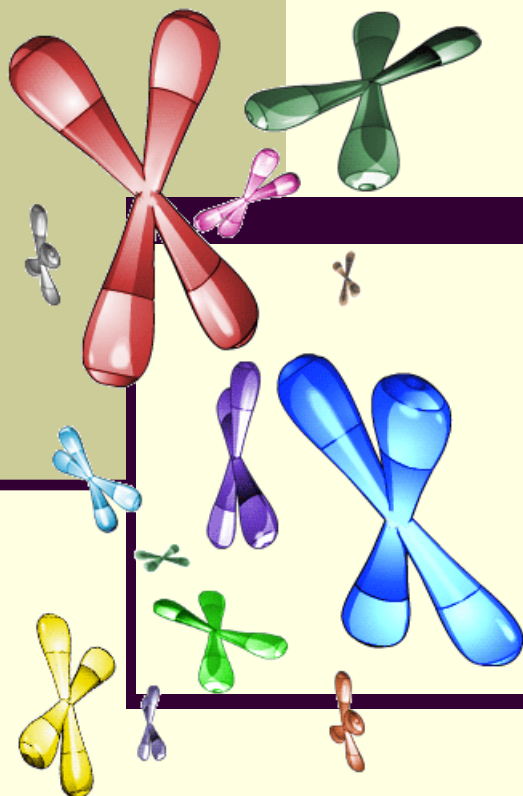


Využití

molekulárně cytogenetických metod v klinické genetice a onkogenetice



Oddělení lékařské genetiky
FN Brno



vytvořilo Oddělení lékařské genetiky FN Brno
s podporou projektu OPvK



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



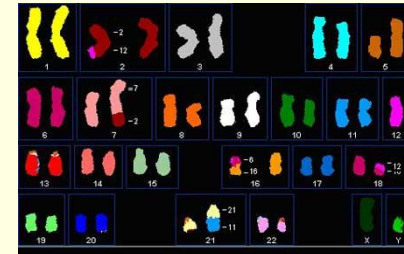
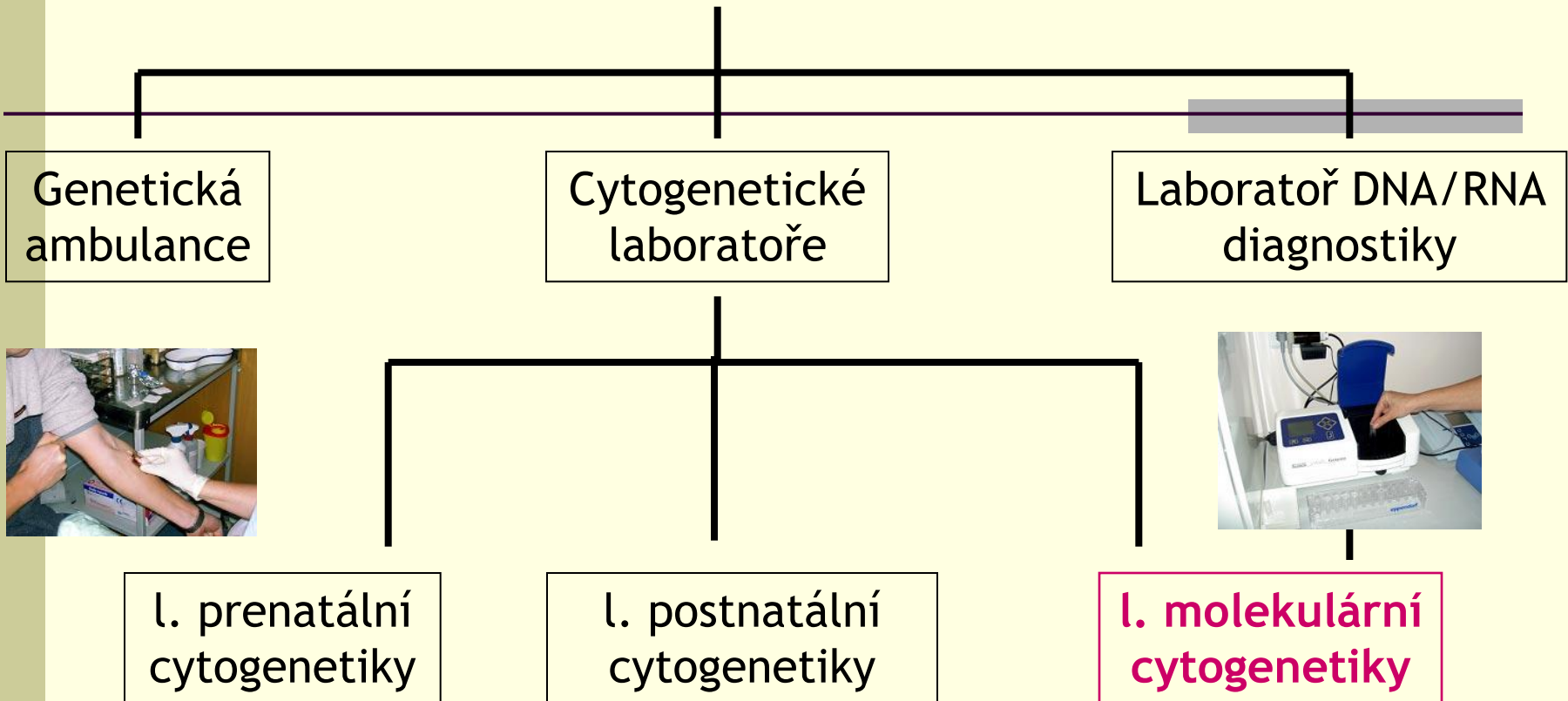
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Oddělení lékařské genetiky FN Brno



Laboratoř molekulární cytogenetiky (1998)

Společné pracoviště Oddělení genetiky a molekulární biologie,
ÚEB PŘF MU a Oddělení lékařské genetiky FN Brno



- 1) specializované molekulárně cytogenetické vyšetření pacientů FN Brno
- 2) výzkumná činnost
- 3) vzdělávací činnost



Samostatné webové stránky:
<http://www.cba.muni.cz/cytogenlab>

Materiál pro molekulární cytogenetické vyšetření

- periferní krev
- kostní dřeň
- vzorky různých tkání
- buňky plodové vody, choriových klků, placenty
- pupečnicková krev
- vzorky solidních nádorů

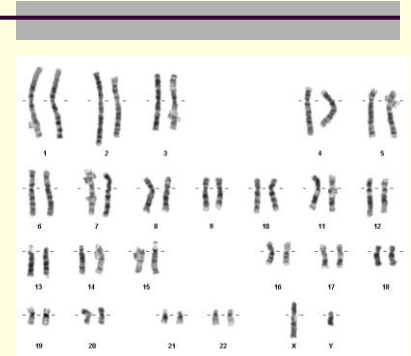


Kde všude nám molekulární cytogenetika může pomoci?

- klinická cytogenetika
- nádorová cytogenetika
- evoluční studie karyotypu
- studium architektury interfázního jádra
- mapování lidského genomu
- genetická toxikologie
- forenzní genetika
- analýza virových infekcí

Rozlišujeme tedy:

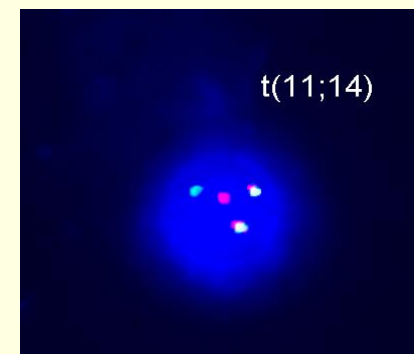
- Základní („klasická“) cytogenetická vyšetření
 - k identifikaci chromosomů a jejich změn je využito hlavně barvicích metod (Giemsa, Wright)
 - až na výjimky je nutné získat chromosomy z metafázních buněk



OLG FN Brno

- **Molekulárně cytogenetická vyšetření**

- identifikují změny chromosomů molekulárně biologickými metodami
- hybridizace *in situ*, SKY/mFISH, CGH, PRINS, PCR *in situ*, MLPA, MAPH
- k vyšetření většinou stačí jádra interfázních buněk

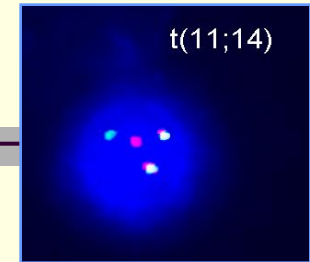


OLG FN Brno

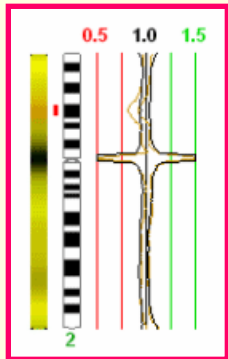
Metody využívané na OLG FN Brno

FISH (fluorescenční in situ hybridizace) r. 1996

detekce balancovaných i nebalancovaných změn



OLG FN Brno



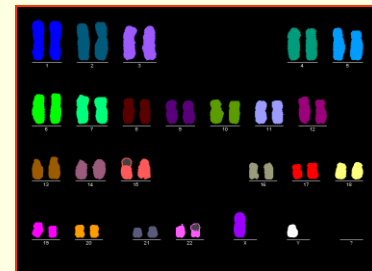
r. 2000

CGH/HR-CGH (komparativní genomová hybridizace)

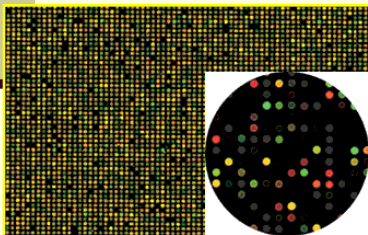
detekce nebalancovaných změn v celém genomu
CGH (5-10Mb), HR-CGH (do 3Mb)

Spektrální karyotypování (SKY) r.2002

detekce balancovaných i nebalancovaných změn v genomu
nutnost mitózy



OLG FN Brno



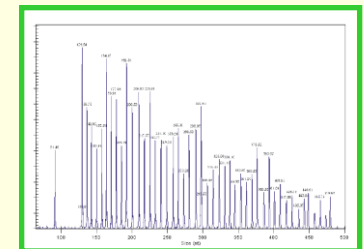
Array-CGH r.2008

Agilent's Human CGH Microarray Kit
Detekce nebalancovaných změn v celém genomu

MLPA (Multiple Ligation-dependent Probe Amplification)

Screening subtelomerových oblastí

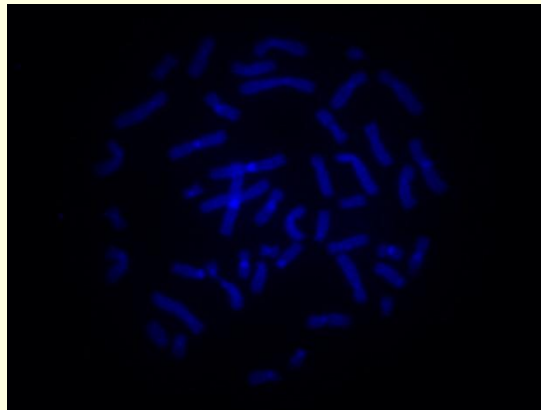
DiGeorge syndrom



OLG FN Brno

FISH = fluorescenční *in situ* hybridizace

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

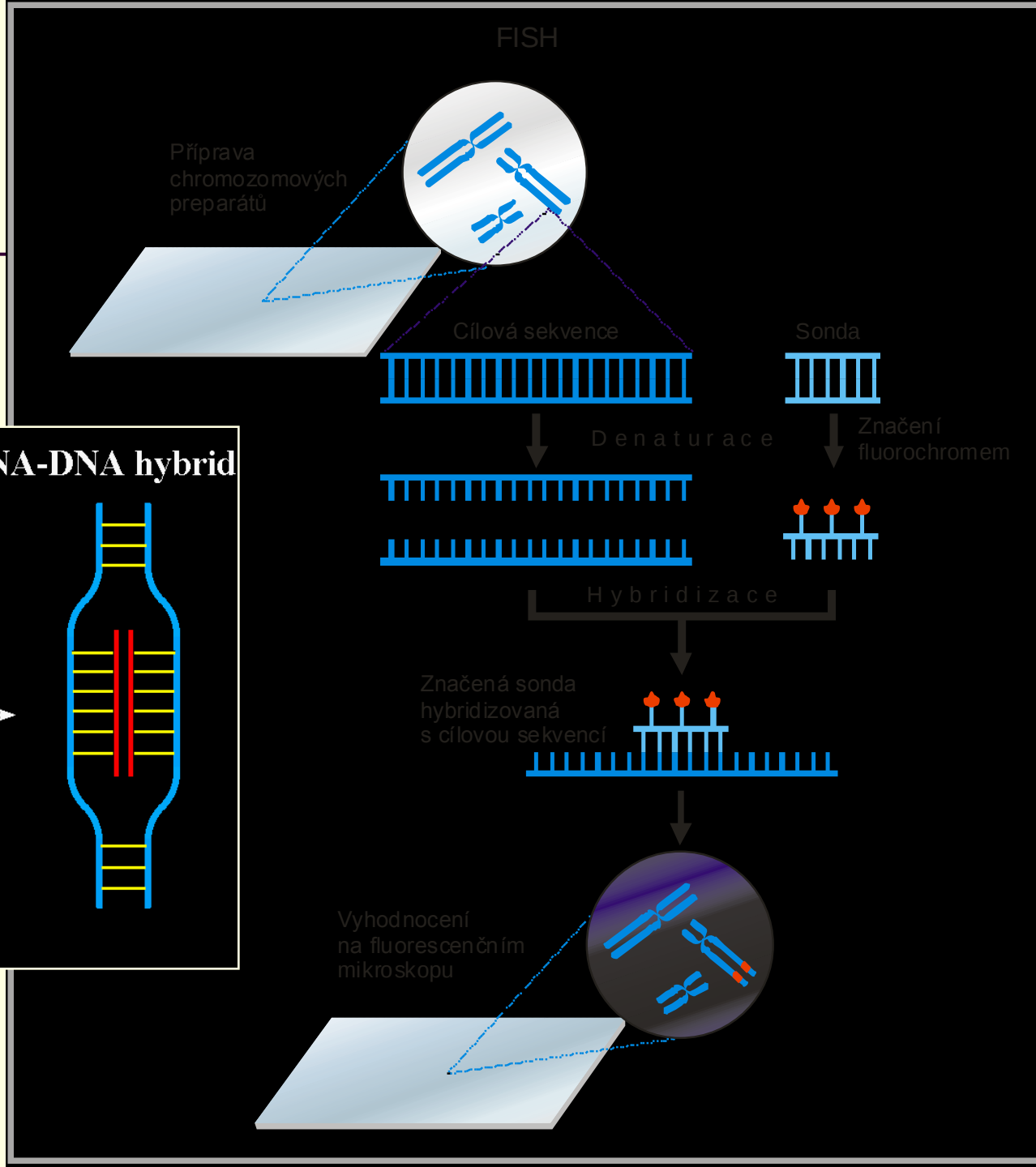
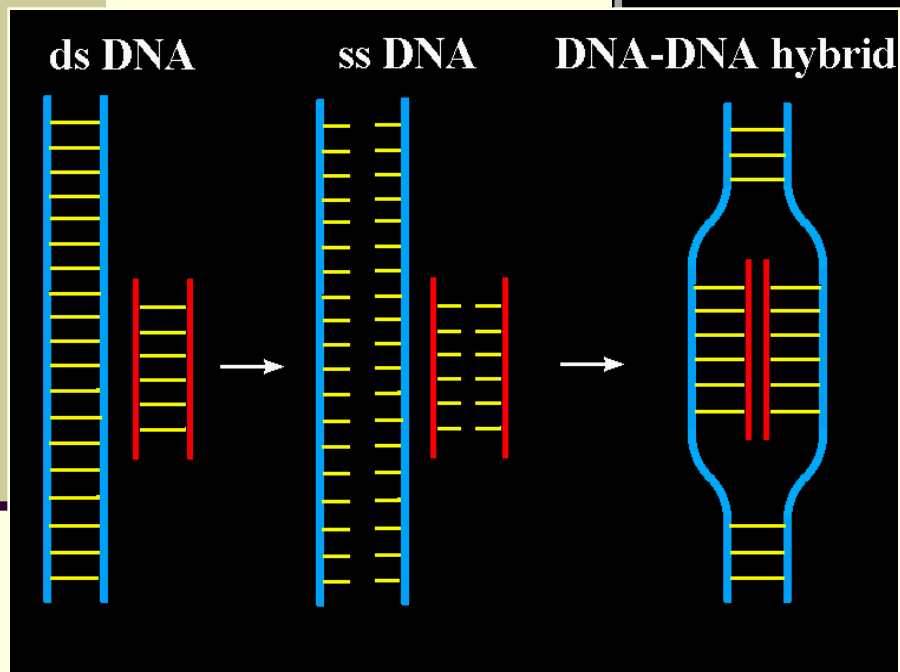


OLG FN Brno

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

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

FISH

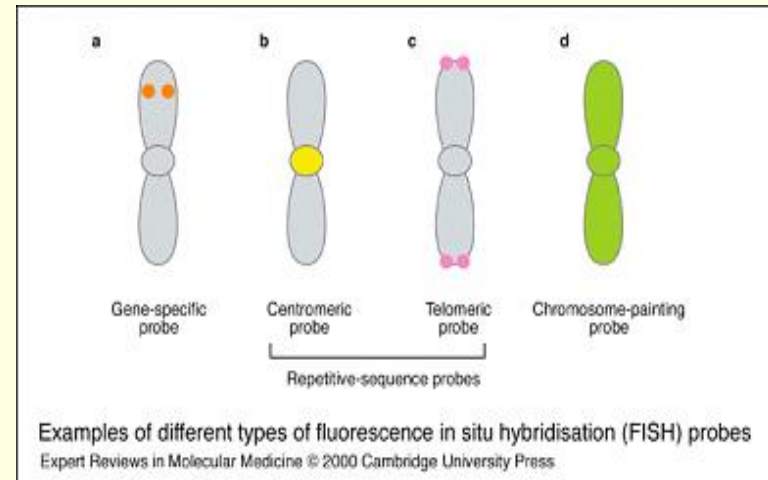


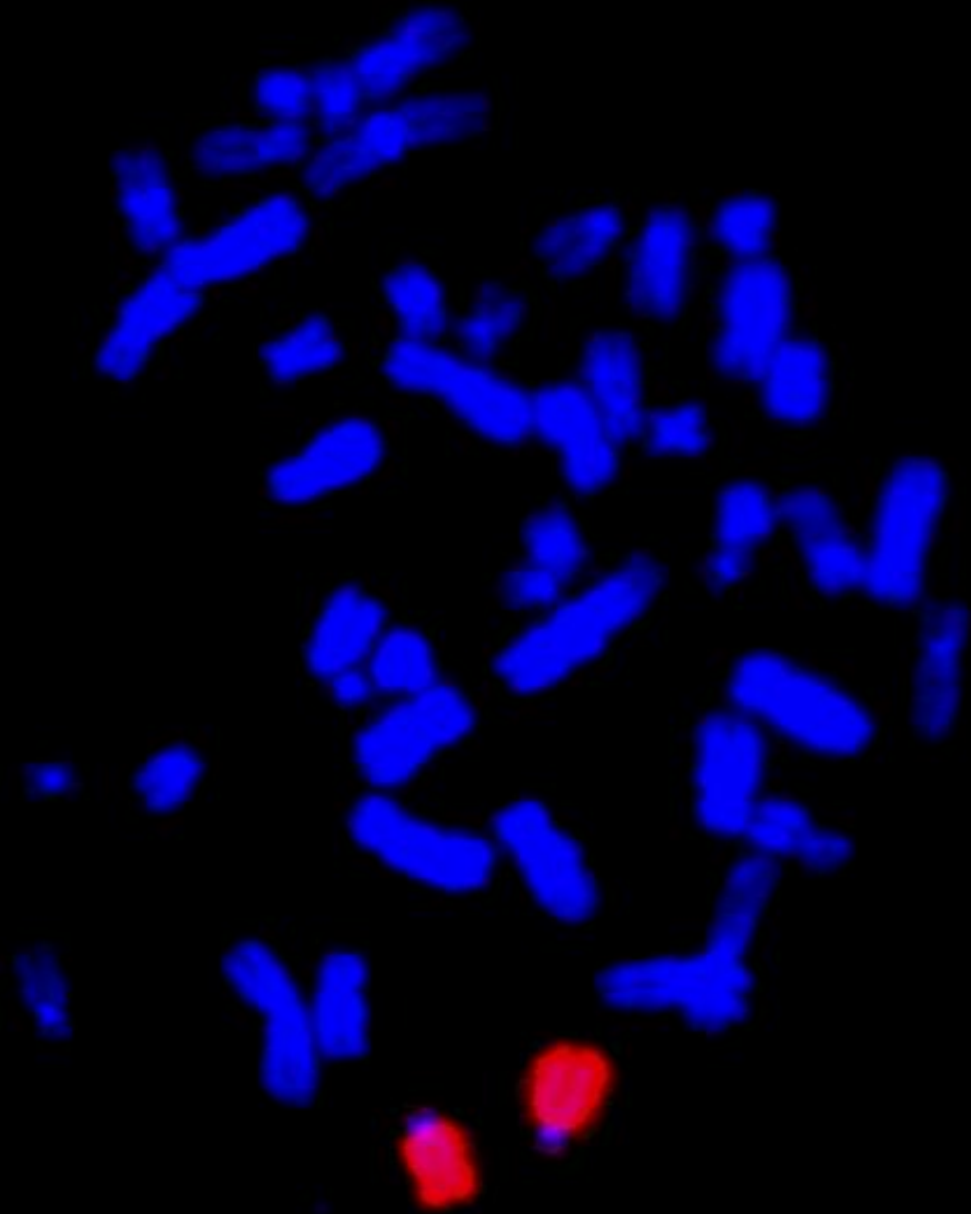
FISH : Typy sond

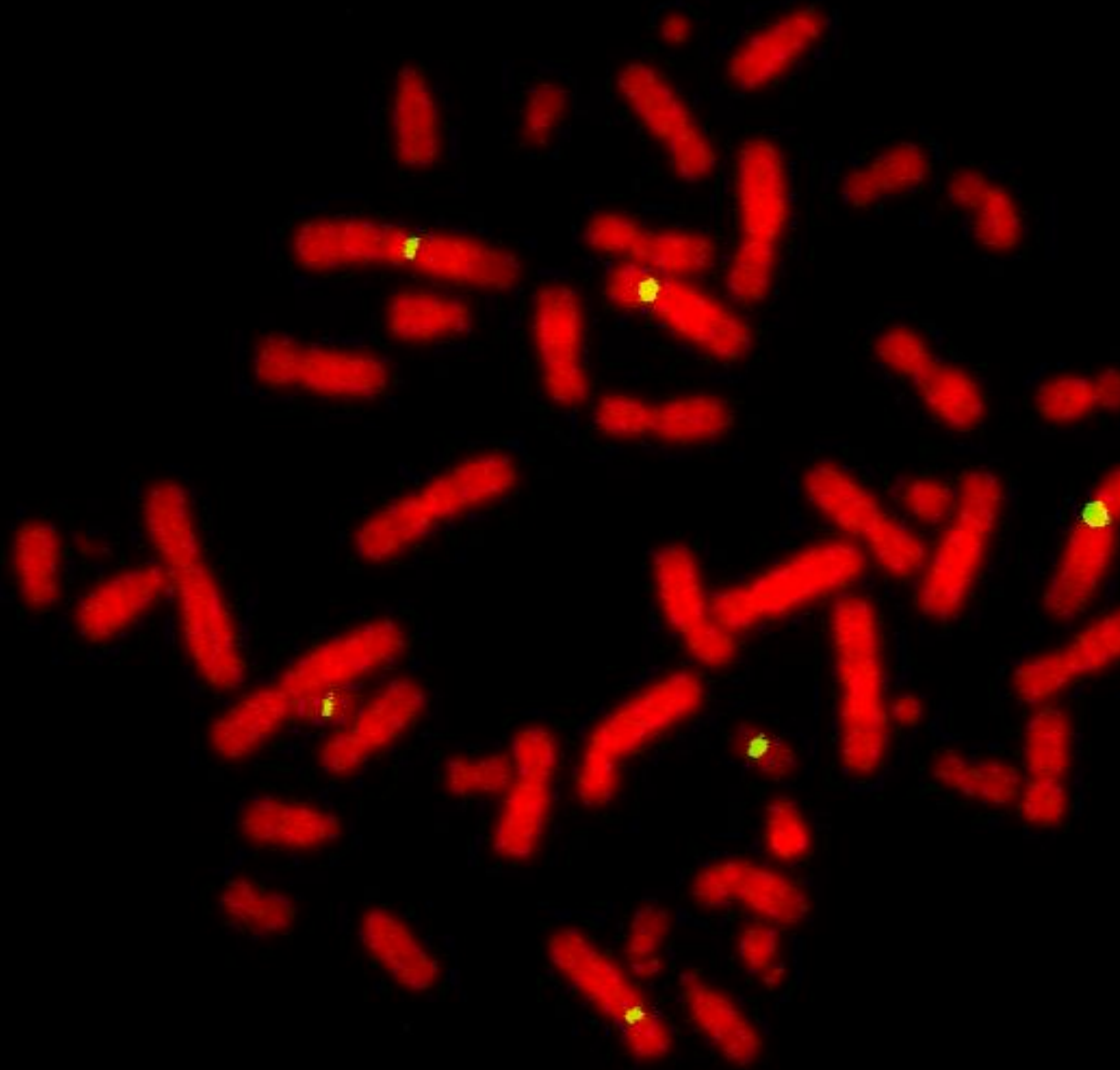
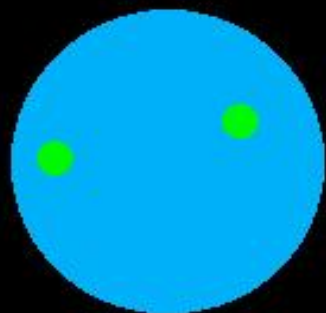
- Celogenomové
- Celochromozomové
- Centromerické
- Sondy telomerické,
ramenově či pruhově specifické

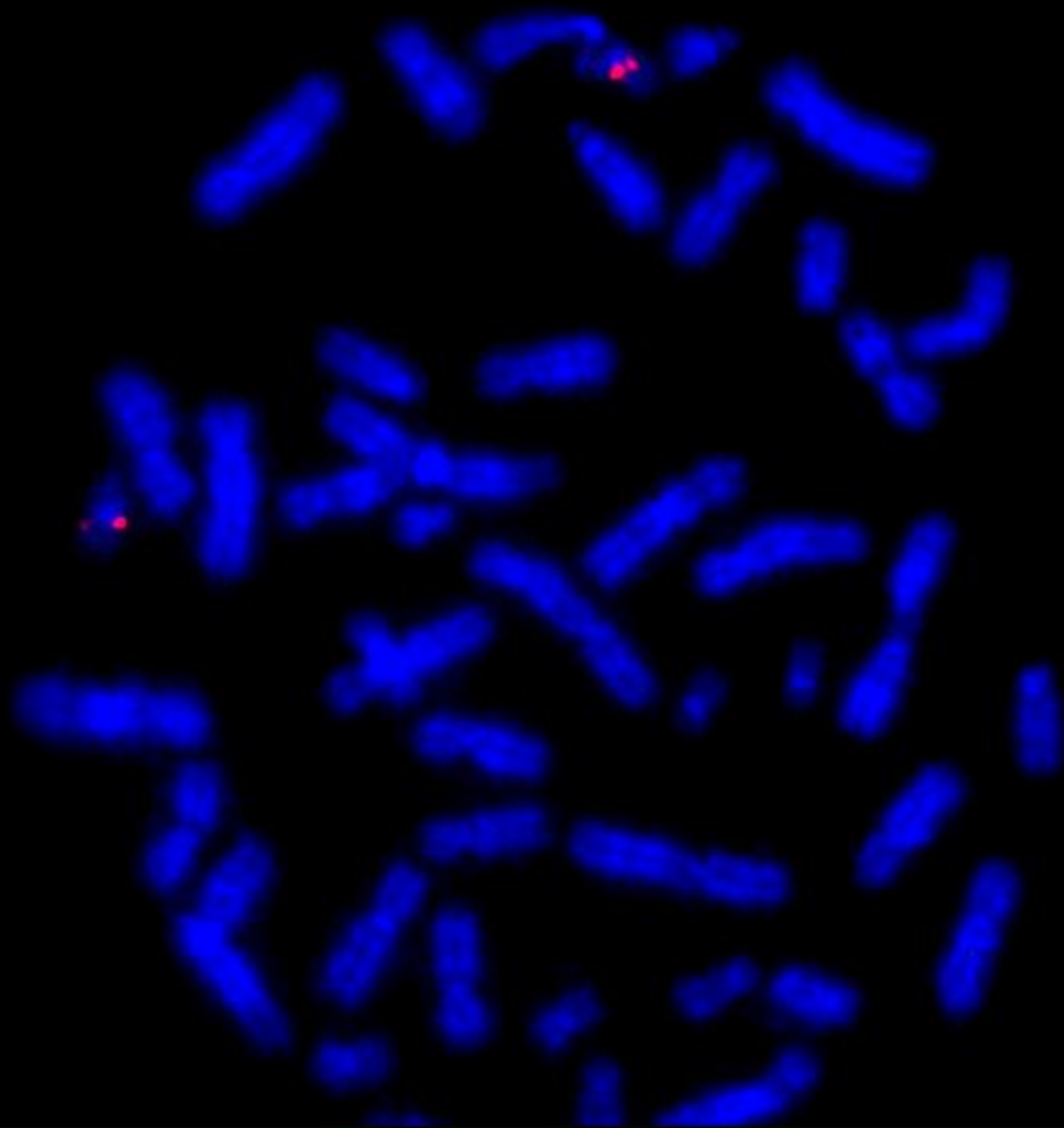
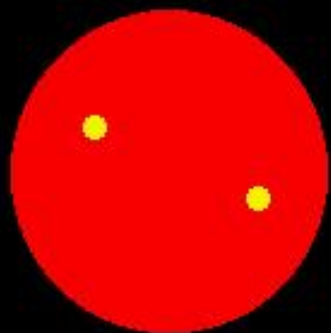
- Sondy pro jedinečné sekvence:

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

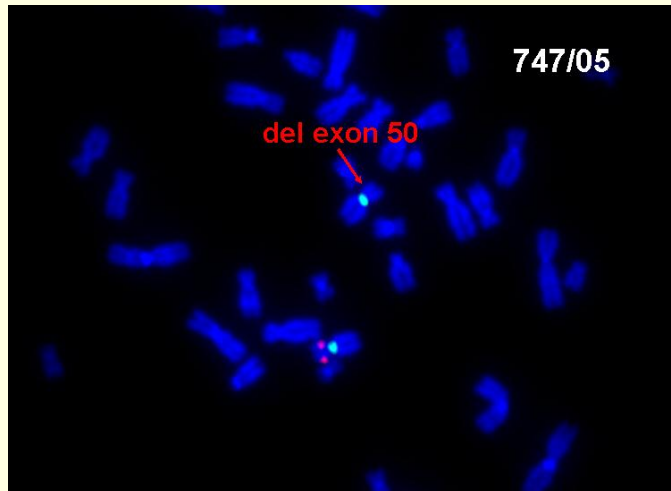




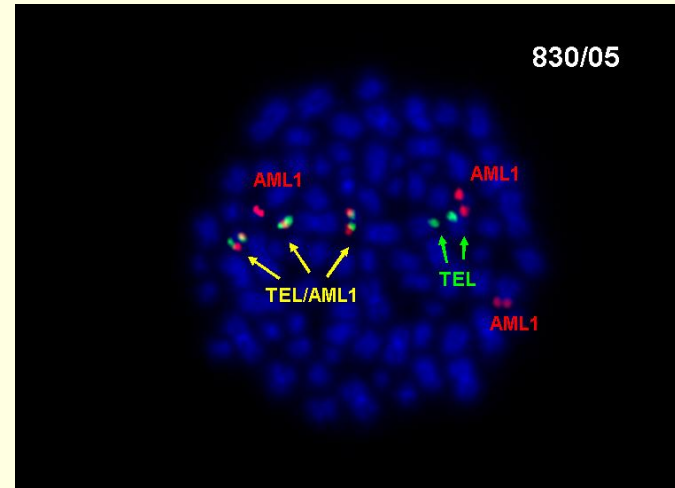




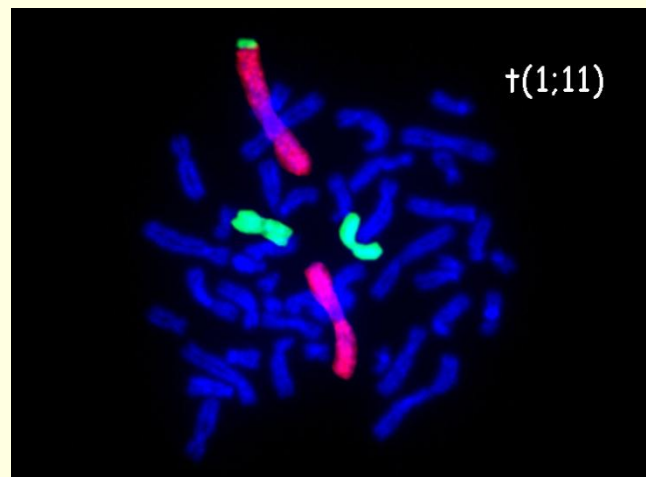
Přítomnost, počet a poloha signálů



OLG FN Brno



OLG FN Brno



OLG FN Brno

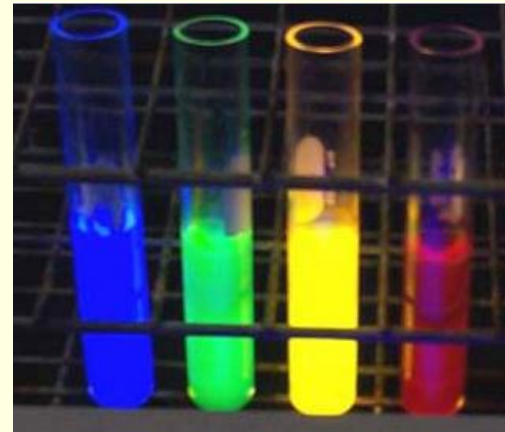
Výhody, nevýhody FISH

Výhody

- nevyžaduje přítomnost mitóz (ve většině případů)
- rychlé zhodnocení velkého počtu buněk

Nevýhody

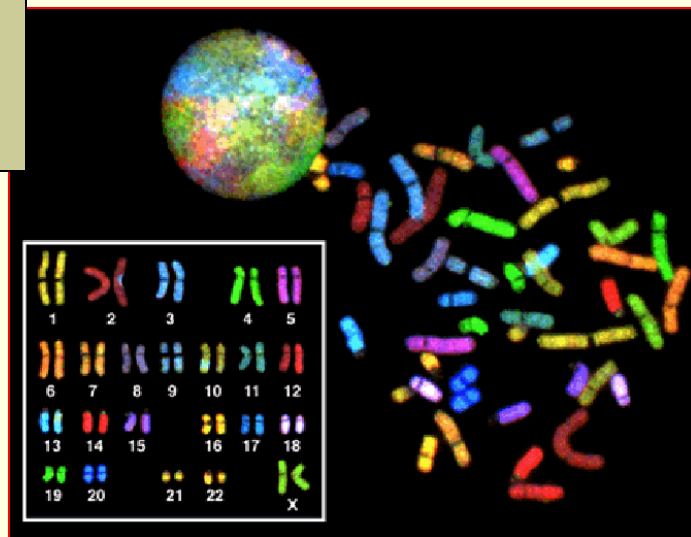
- úspěšná hybridizace
- neposkytuje celogenomový pohled



Spektrální karyotypování SKY

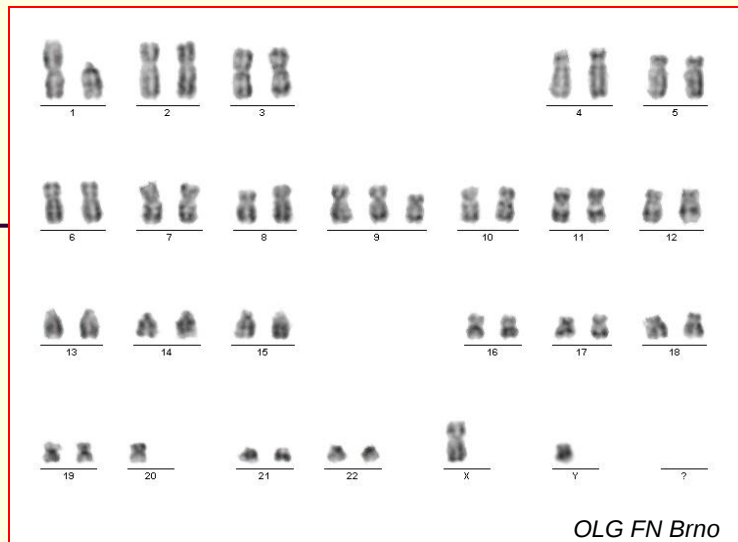
Umožňuje odhalení balancovaných a nebalancovaných (i kryptických) přestaveb celého genomu v jednom kroku

- vyvinuta v roce 1996
- identifikace každého chromosomu pomocí jedinečné kombinace 5 fluorochromů **FITC** **Rhodamin** **TexasRed** **Cy5** **Cy5.5**
- referenční spektra - pseudobarvy, přiřazeny každému chromosomovému páru na základě měření vlnových délek

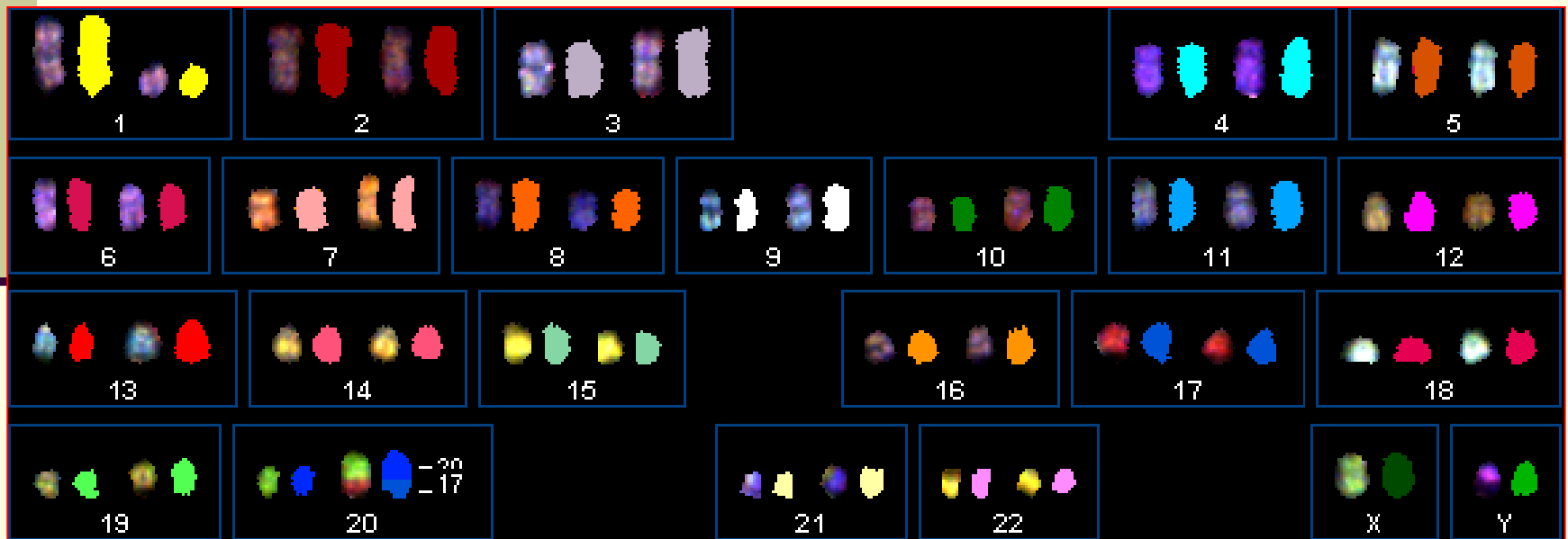


Nevýhody - potřeba kvalitních mitóz
- úspěšná hybridizace
- finančně nákladné

Chlapec, 1 rok, neuroblastom

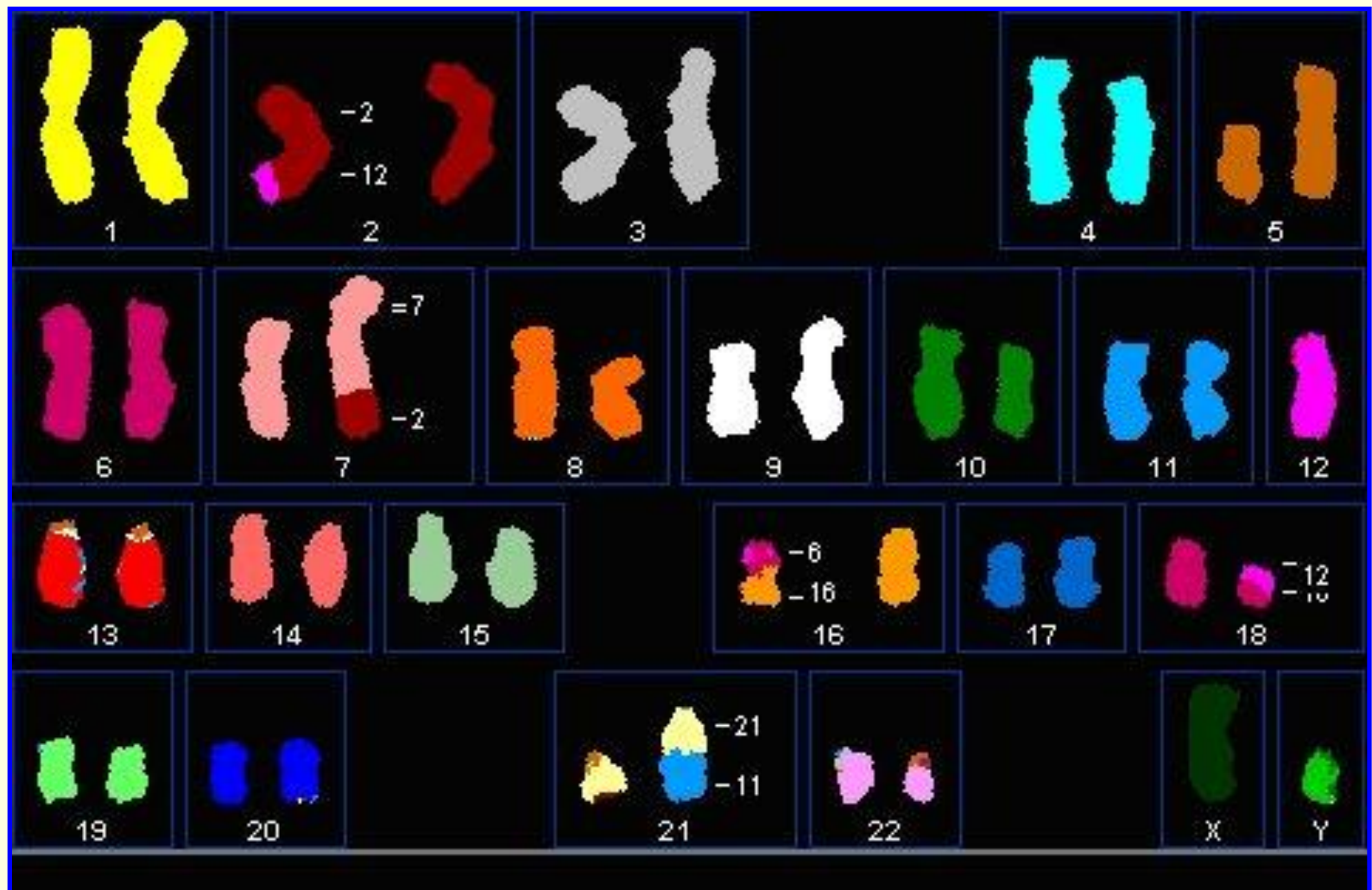


46,XY,del(1p),+del(9p),-20

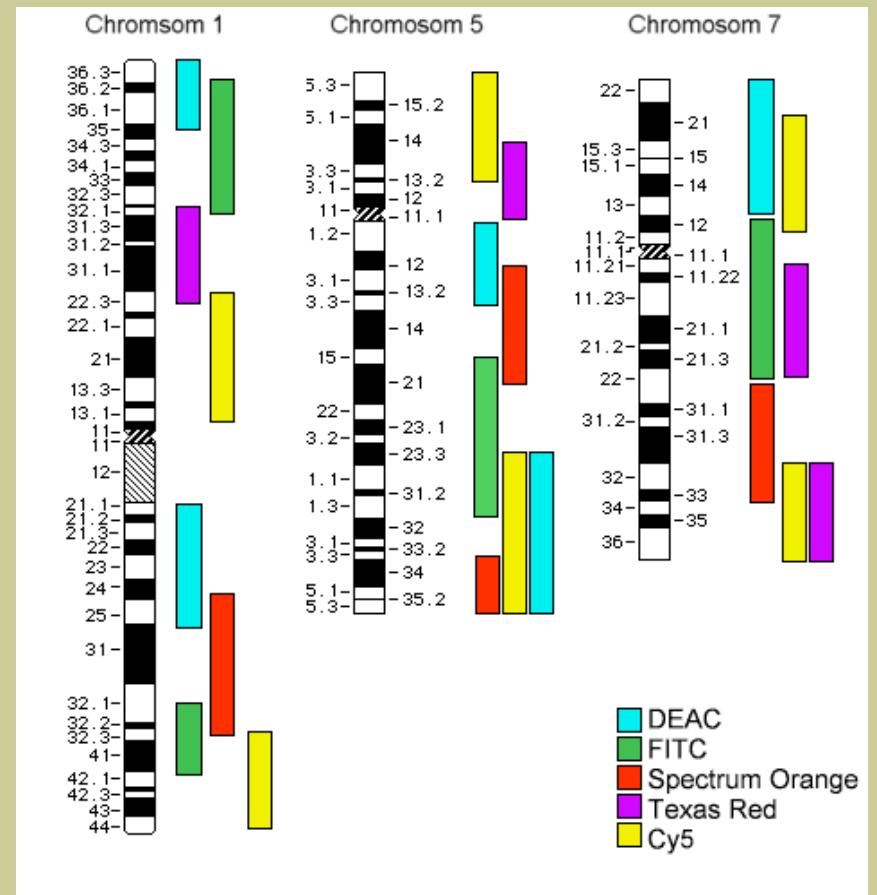
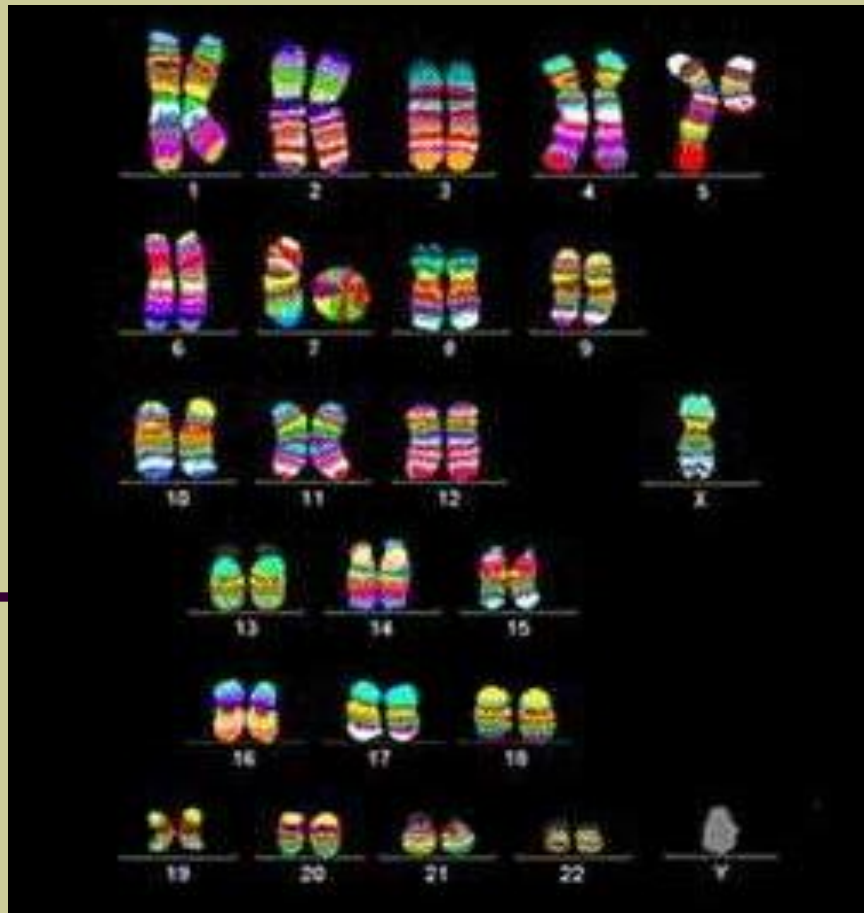


46,XY,del(1p),der(20)t(17;20)

SKY



Mnohobarevné pruhování (M-banding)





Komparativní genomová hybridizace (CGH)

- umožňuje během jediné hybridizační reakce stanovit změny vedoucí ke ztrátám či získům sekvencí DNA v celém genomu **bez ohledu na mitotickou aktivitu buněk**

- Kallioniemi A., Kallioniemi O.-P. *a kol.*, 1992

- potřebný materiál: **izolovaná DNA**

- rozlišovací schopnost - 10 Mb

- klonální zastoupení - 50 %



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 se-

CGH

A tak to funguje...

1. Genomic DNA is isolated and quantitated

Test Sample

Reference Sample

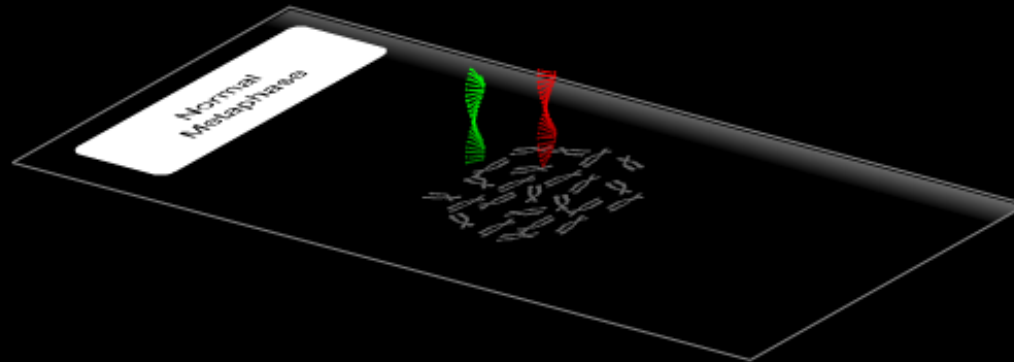
2. Genomic DNA is labeled with Cy3 or Cy5



CGH

A tak to funguje...

3. Labeled DNA is digested into smaller products that allow optimal hybridization



DNA extraction

competitor



reference

(red dUTP)

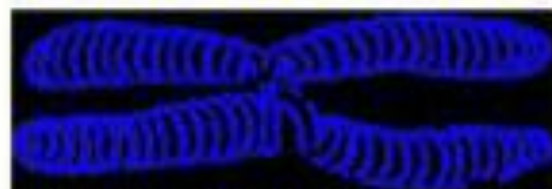


test

(green dUTP)



Hybridisation for
48-72 hours



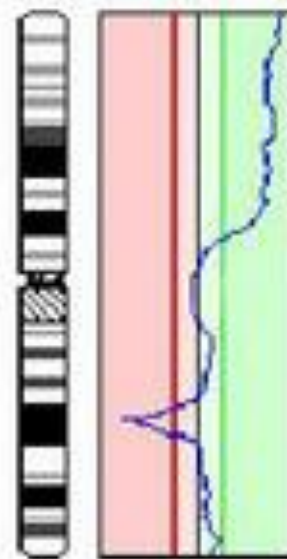
Normal metaphase chromosomes

Sample Preparation &
Hybridisation

metaphase
chromosome



Fluorescent
Image profile



enh(1p)

dim(1q31)

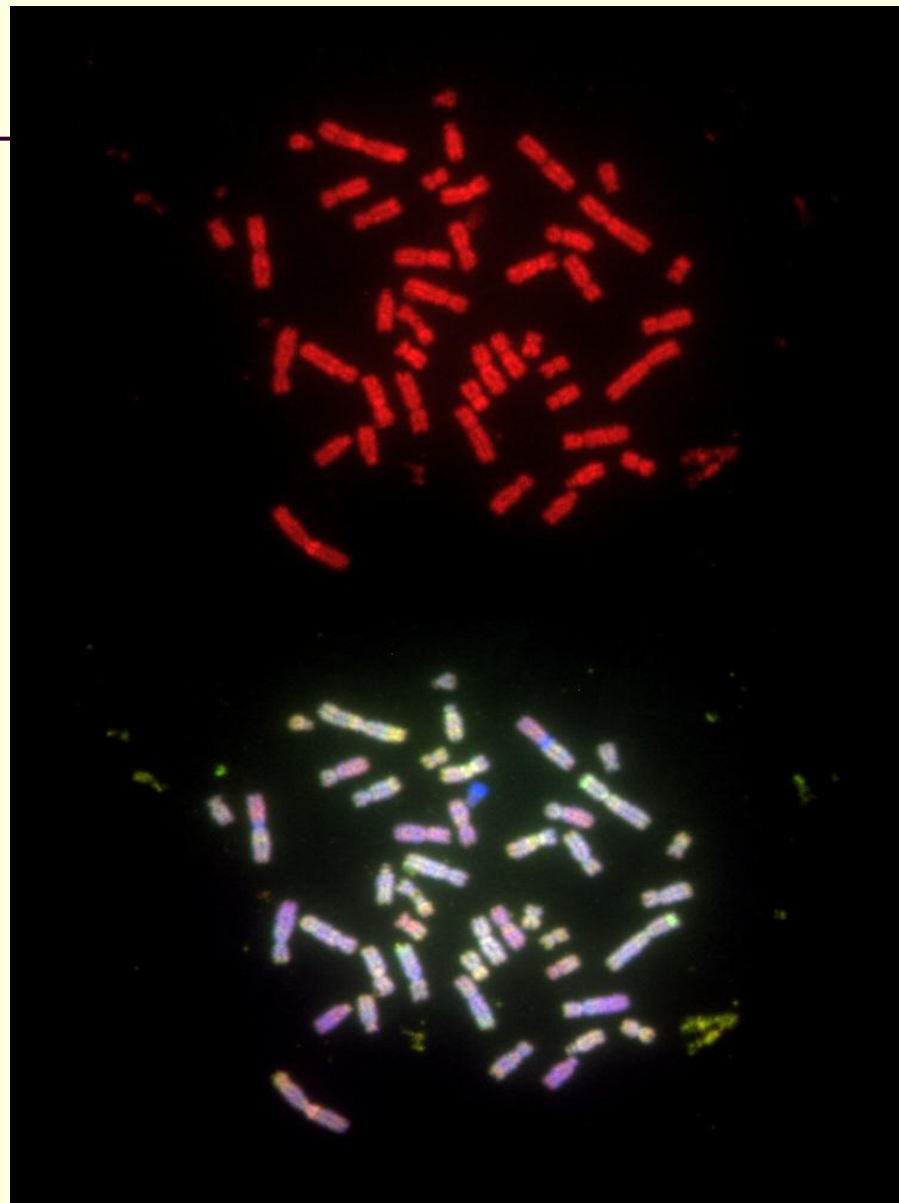
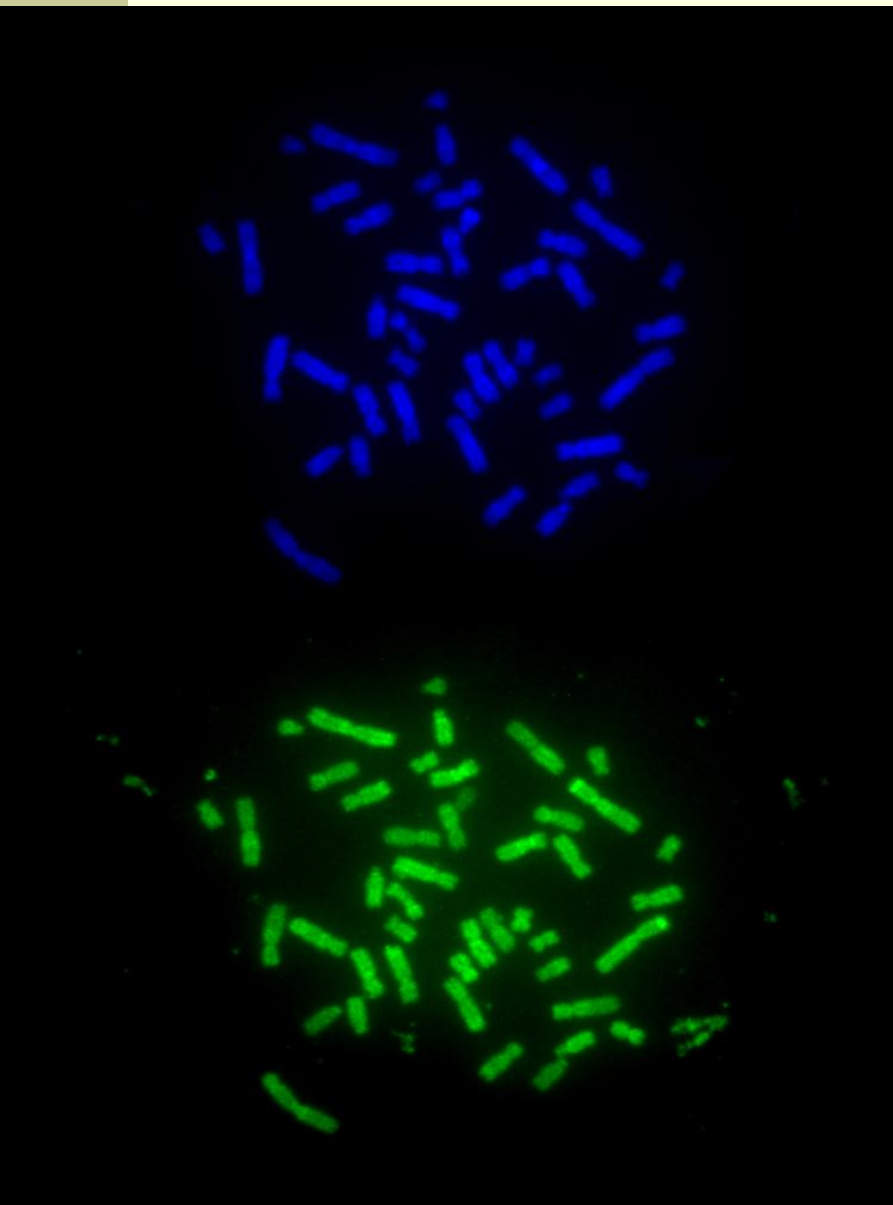
Image through a triple-band filter

Green; increase in copy number
Red; decrease in copy number

Fluorescence microscopy &
Image Analysis

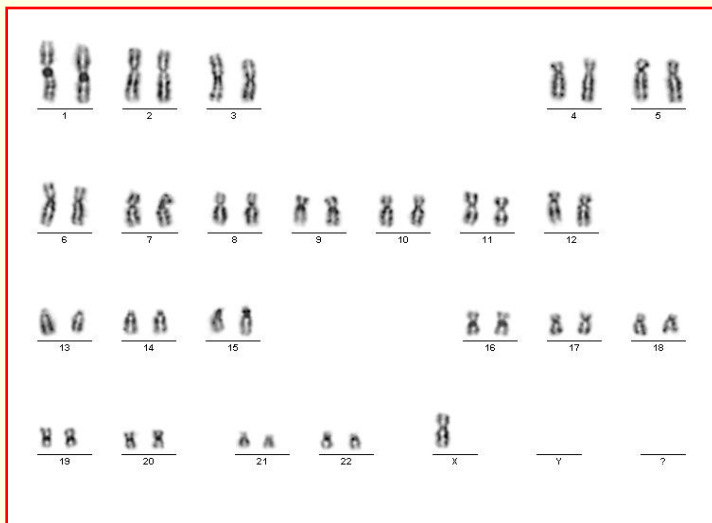
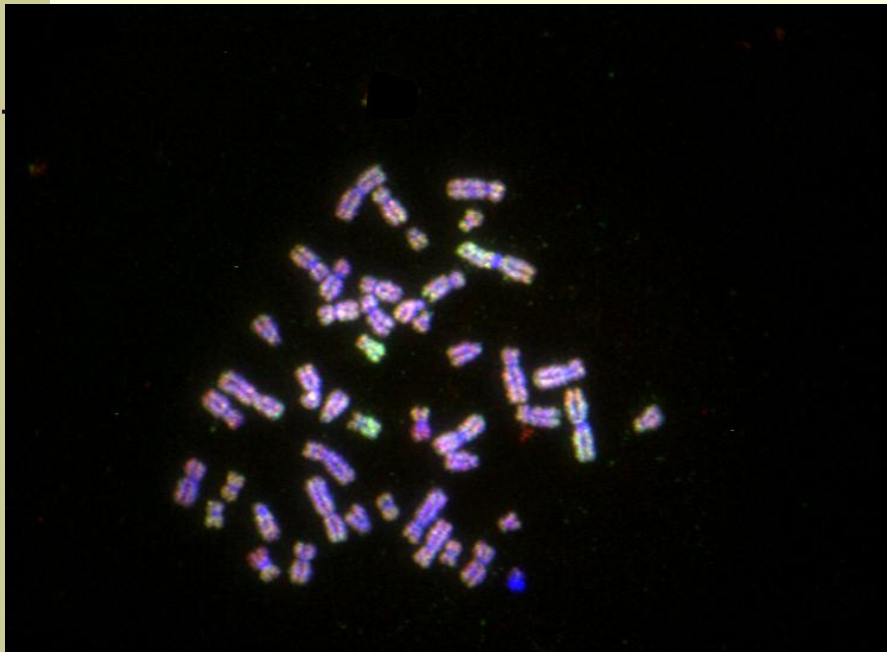
CGH

interpretace výsledků



CGH

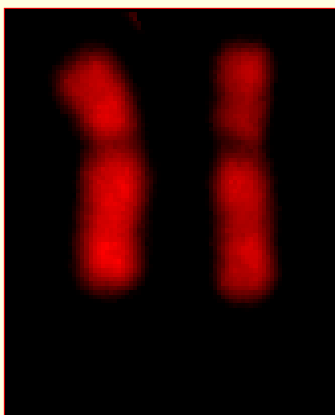
interpretace výsledků



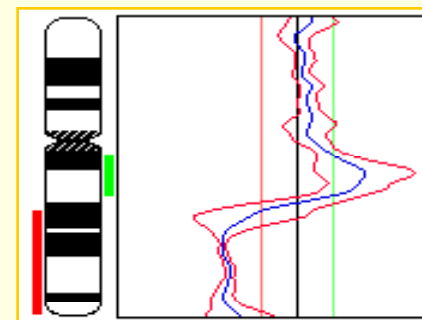
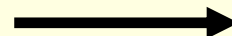
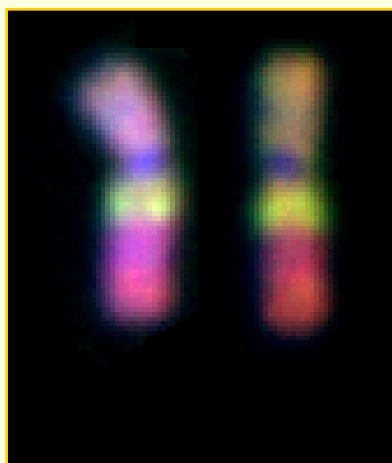
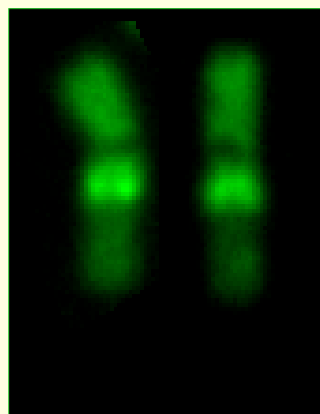
CGH

interpretace výsledků

Referenční DNA



Testovaná DNA



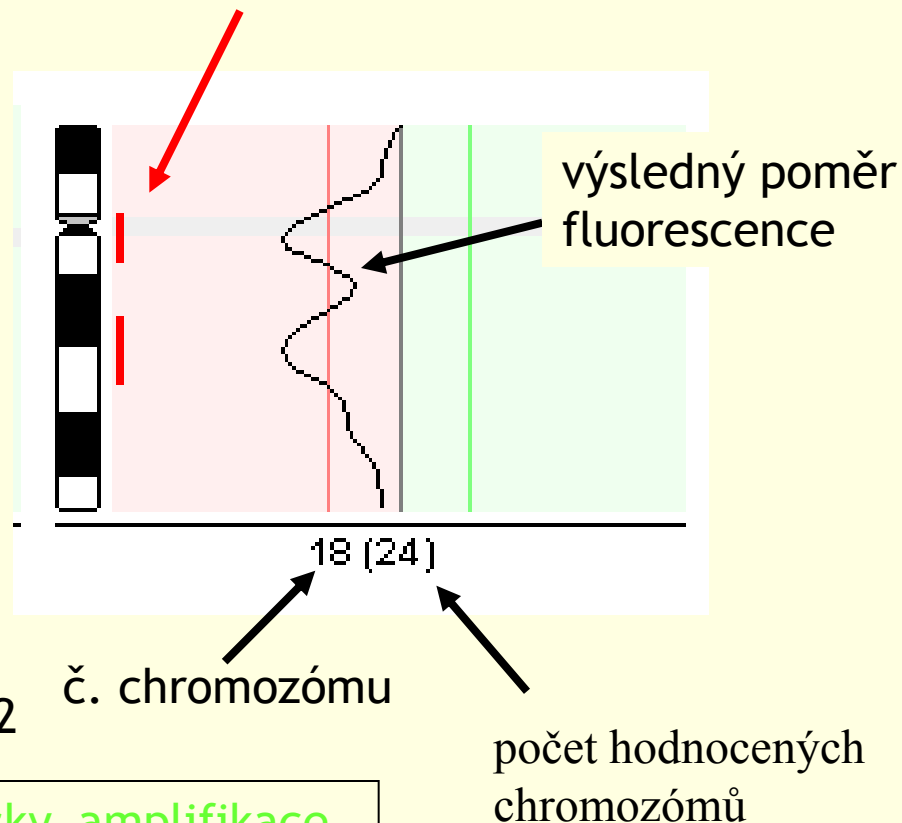
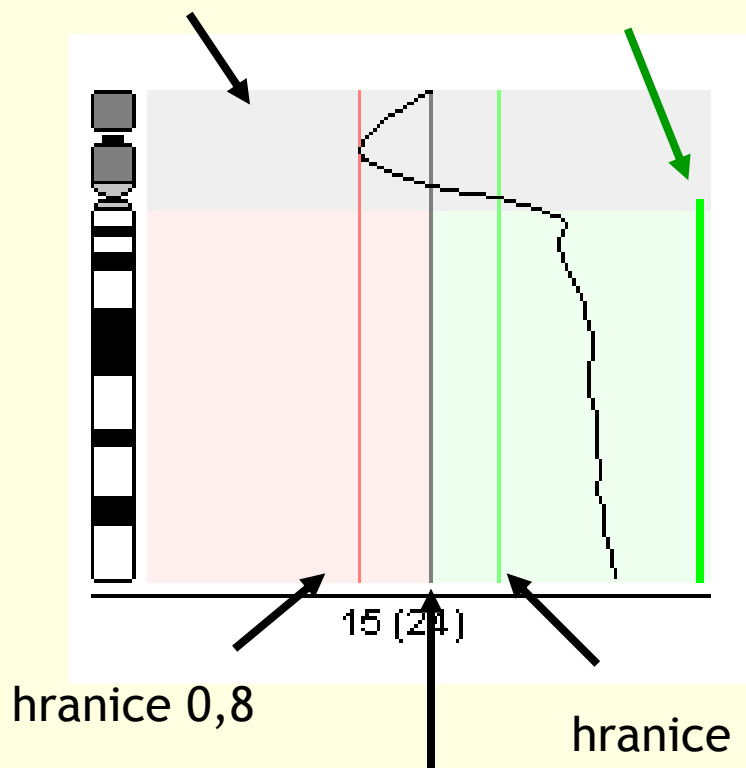
CGH

interpretace výsledků

heterochromatin

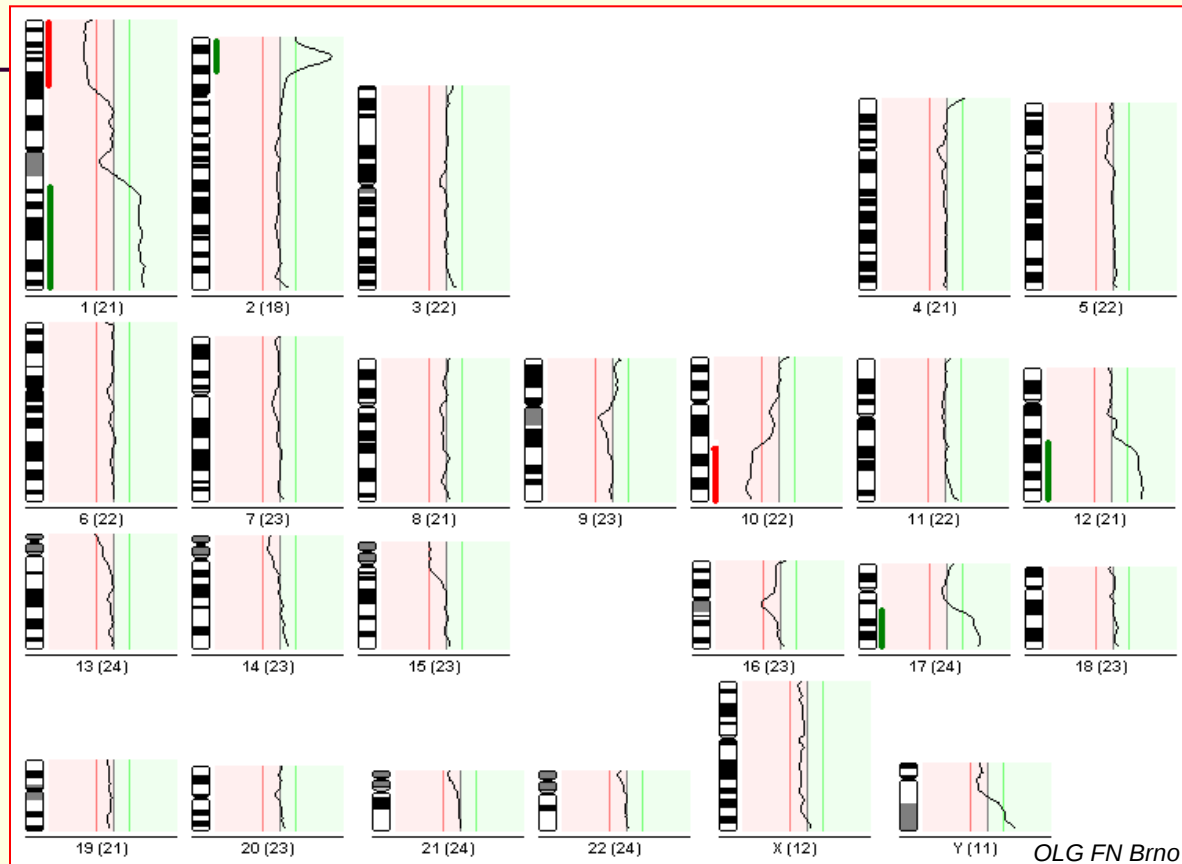
zelená - zisk

červená - ztráta



enh → zisky, amplifikace
dim → ztráty, delece

Ukázka profilu CGH zpracovaného počítačovou analýzou obrazu u pacienta s neuroblastomem



rev ish enh (1q21-qter, 2p22-p24, 12q21-qter, 17q21-qter)

rev ish dim (1p31-pter, 10q22-qter)

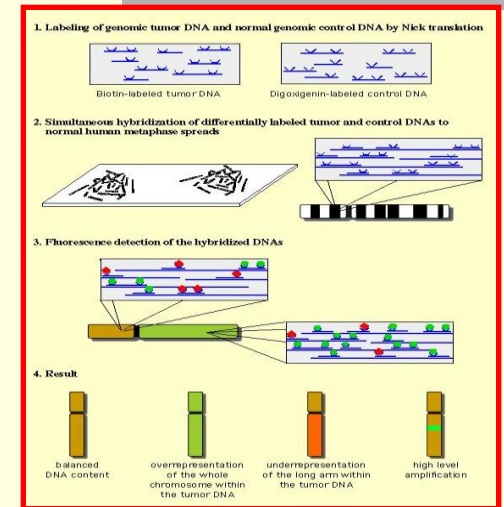
enh → zisky, amplifikace

dim → ztráty, delece

Výhody a nevýhody klasické CGH?

Výhody

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



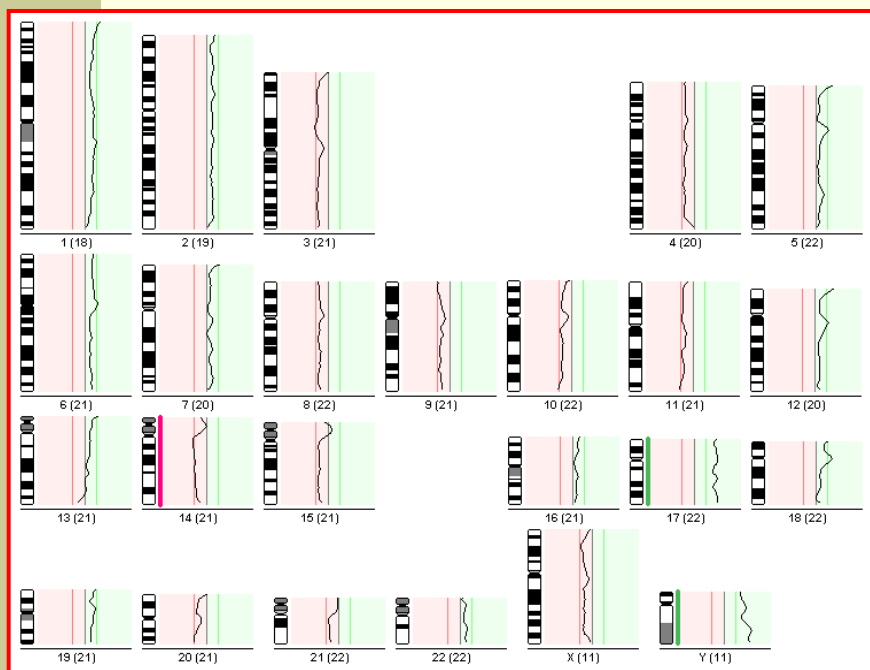
Nevýhody

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

CGH

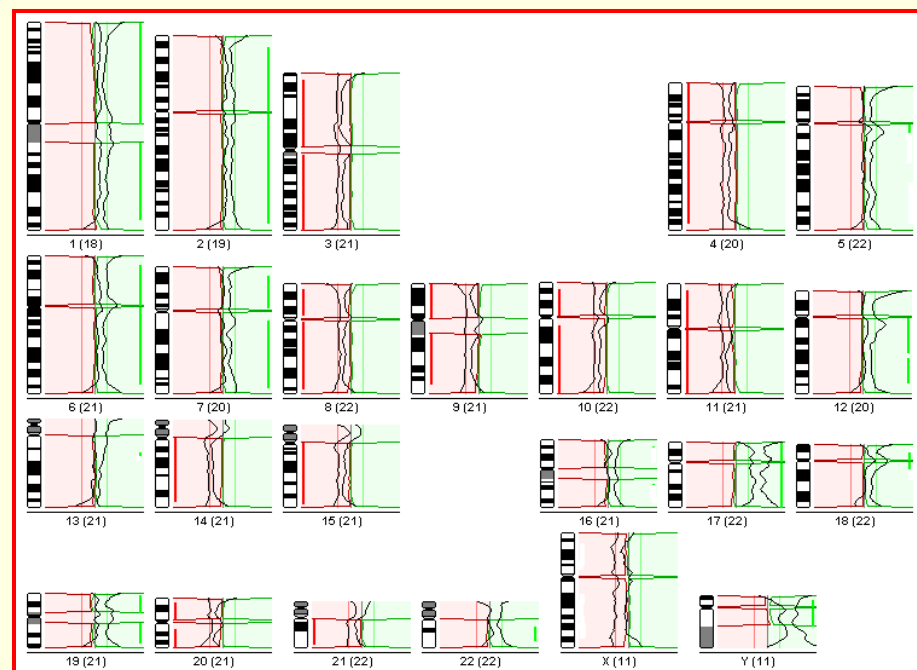
neuroblastom

HR-CGH



OLG FN Brno

rev ish enh (17,Y)
rev ish dim (14)



OLG FN Brno

rev ish enh (1,2,6,7,12q,17,19,22,Y)
rev ish dim (3,4,8,9,10,11,14,15,20,21)

Kazuistika .1

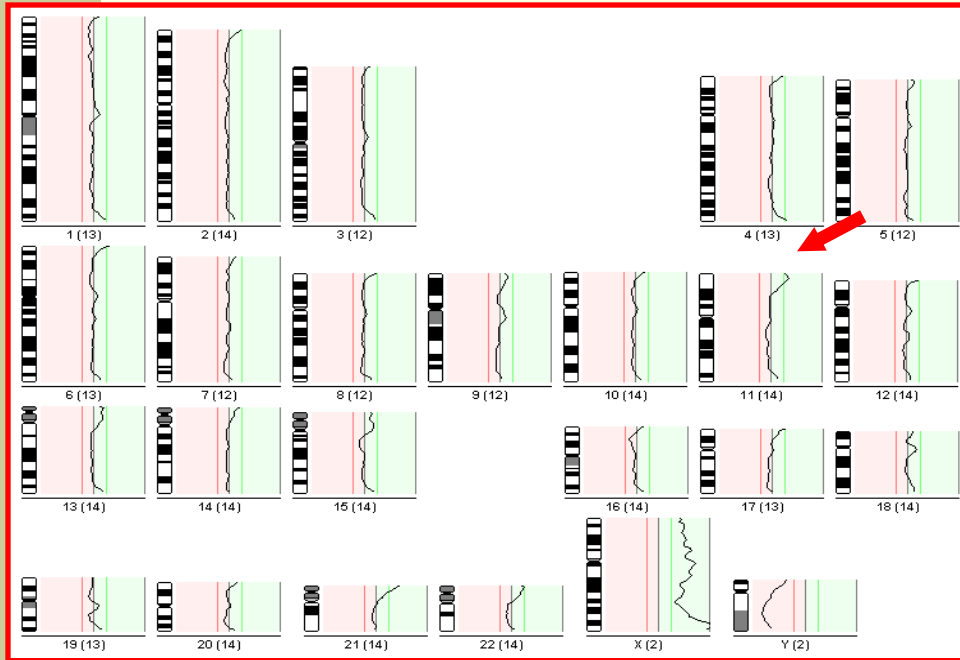
- děvče, rok narození 2002
- dg: stigmata - mongoloidní postavení očí, hyperplastická gingivální sliznice, soudkovitý hrudník, velké rozlité břicho
- matka 46,XX, inv(9), otec 46,XY,add(1)[87]/46,XY[13]



46,XX,add(1)

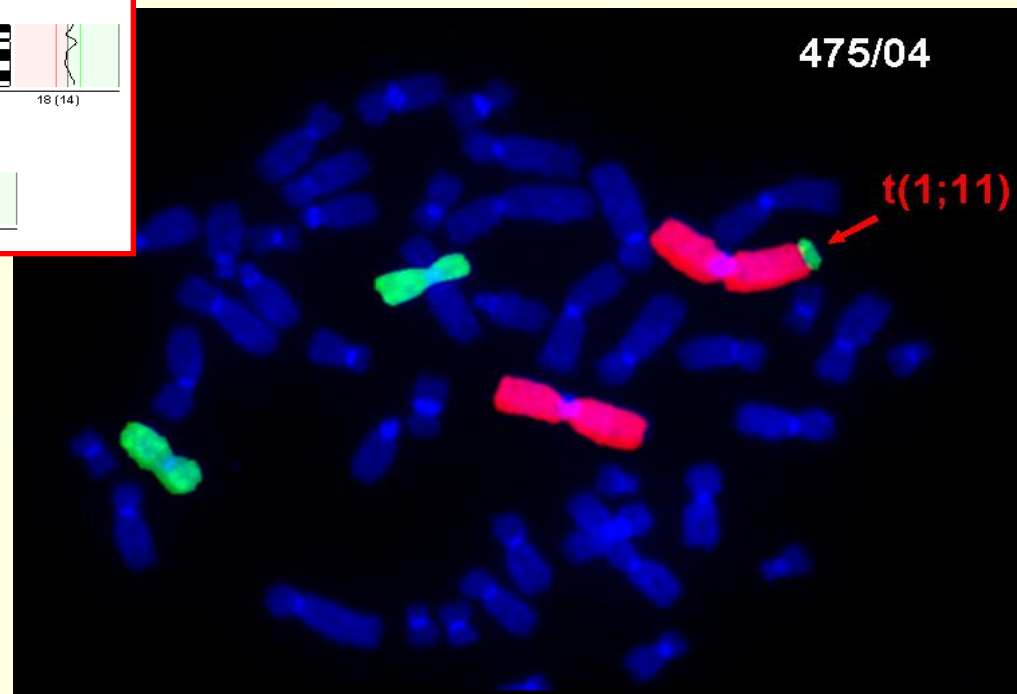
Kazuistika .1

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



OLG FN Brno

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



Array CGH : ještě větší rozlišení

- detekce numerických změn v celém genomu v jedné reakci
- přesná lokalizace změn!



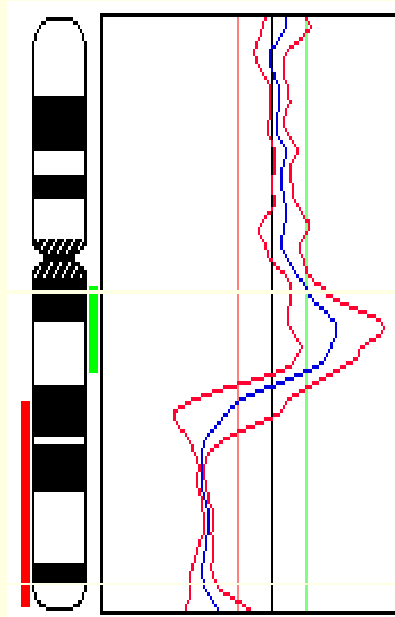
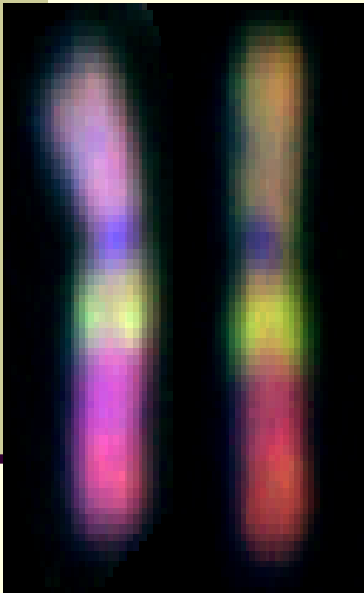
BAC, P1 klony,
oligonukleotidy ~ 35 kb



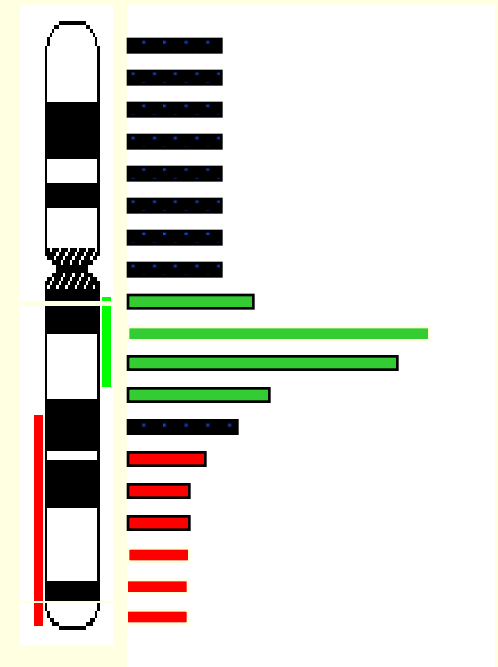
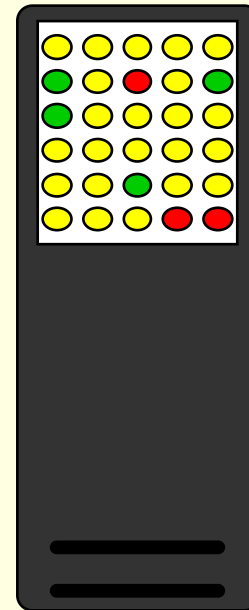
- Solinas-Toldo a kol., 1997
- nahrazení chromosomů separovanými klony
- BAC, PAC, c-DNA klony, oligonukleotidy ~ 35 kb
- princip DNA/DNA hybridizace, sondy fluorescenčně značené

Array CGH : rozdíl je jen v podkadu

CGH



Array-CGH



Takto to potom vypadá...



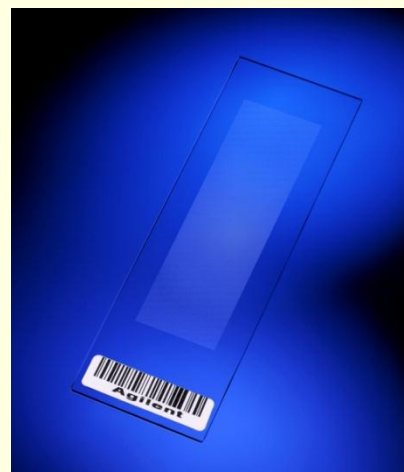
www.abbottmoleculars.com

a)



www.affymetrix.com

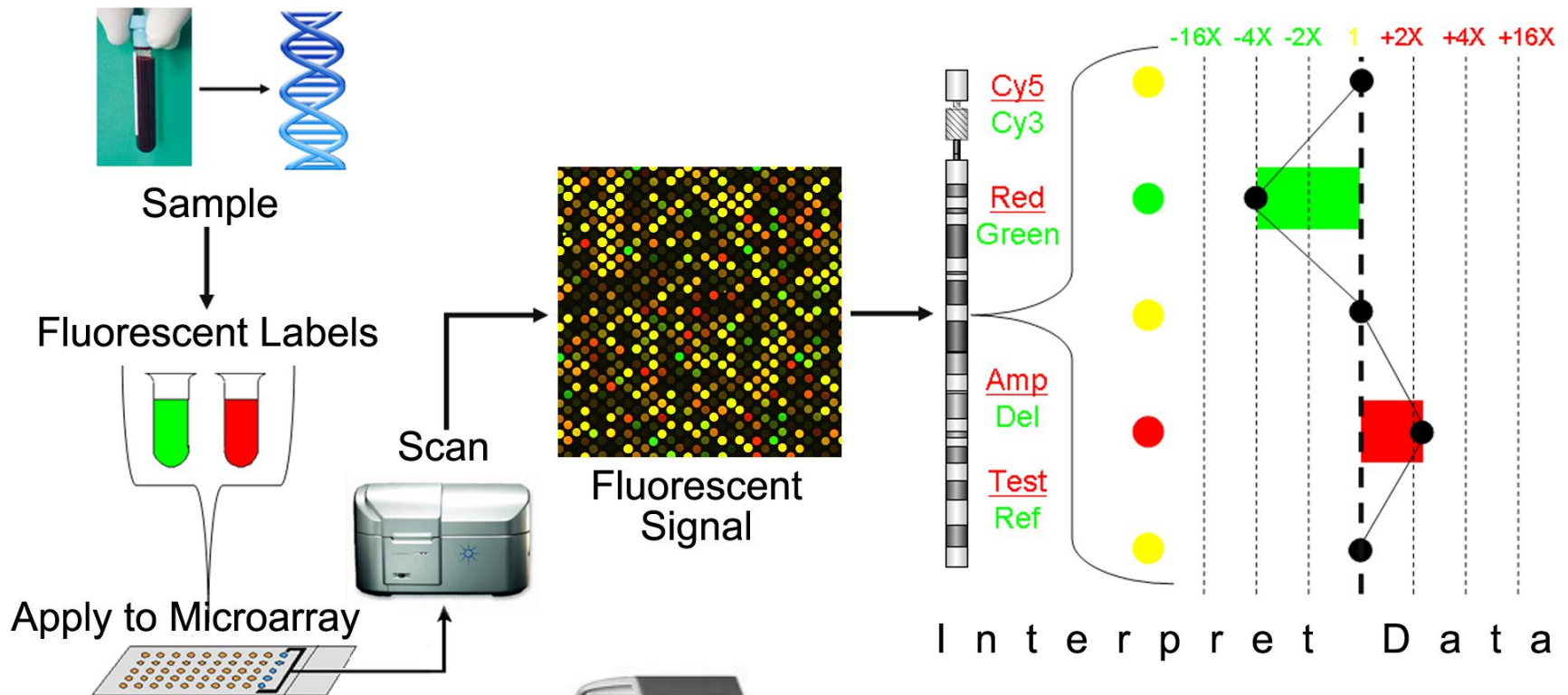
b)



www.agilent.com

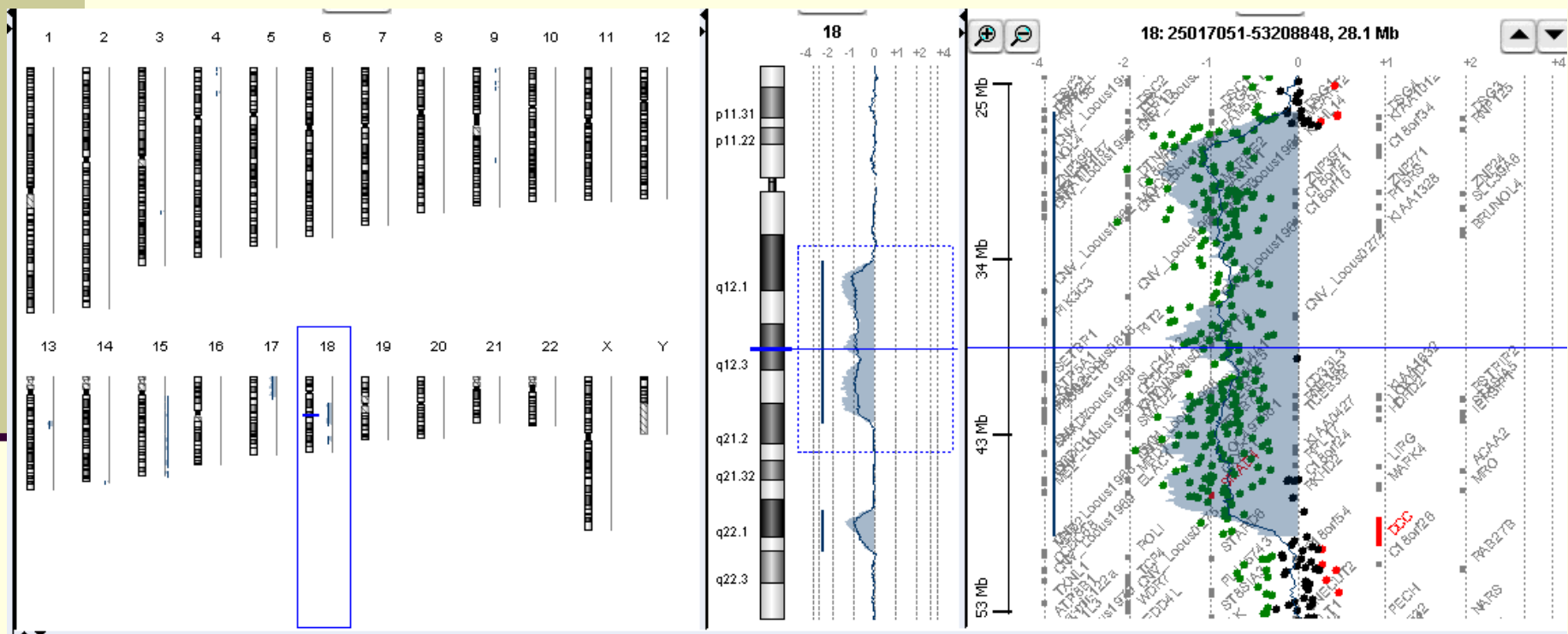
Ukázky CGH čipů firmy a) Affymetrix a b) Agilent.

Array CGH : princip metody



Array CGH : vyhodnocení

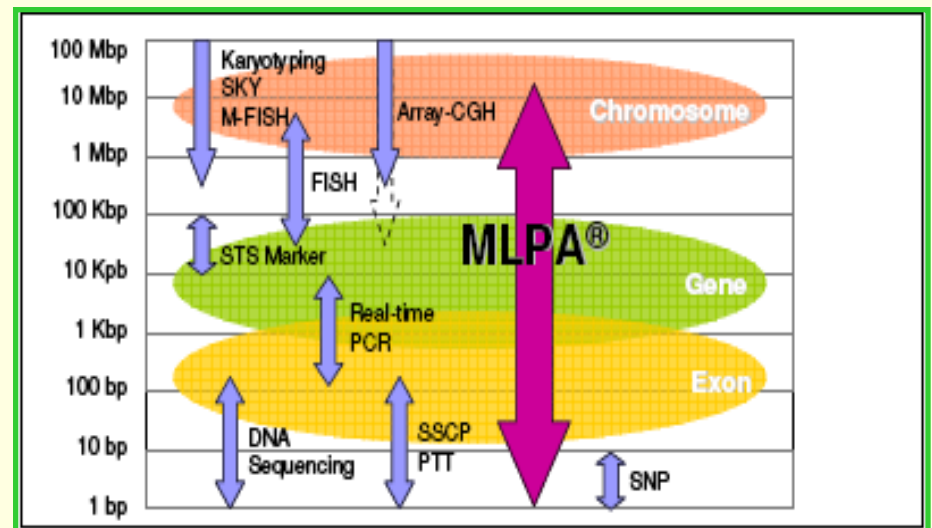
aCGH Analytics Software, Agilent Technologies



Trošku více molekulární biologie - MLPA

- Multiplex Ligation-dependend Probe Amplification
- Schouten a kol., 2002

(Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* Jun 15;30(12):57)



MLPA je:

Citlivá:

jen 20 ng DNA

Specifická:

MLPA je schopná odlišit sekvence lišící se v jediném nukleotidu

Multiplexní:

dokáže detekovat změny počtu kopií až 45 specifických sekvencí v jedné reakci

Jednoduchá:

MLPA reakci je možné uskutečnit v jedné zkumavce

Relativně levná metoda:

Kit obsahuje všechny potřebné reagensie, potřebné vybavení je běžnou součástí všech molekulárně-biologických laboratoří

MLPA má i své nevýhody:

- vysoká citlivost na kontaminaci reakce
- časově náročná a obtížná výroba vlastních sond
- minimálně 50% buněk nesoucích danou přestavbu
- bodové mutace nebo polymorfismus v místě ligace mohou vést k falešným výsledkům

A takto MLPA funguje...

**Syntetický oligonukleotid
50-60 bp**

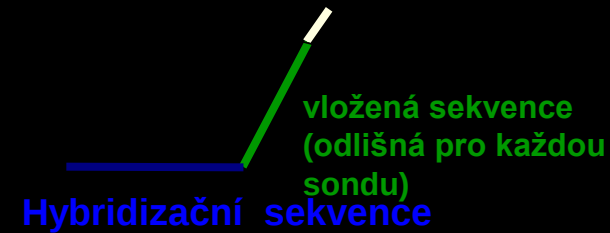
PCR primer Y



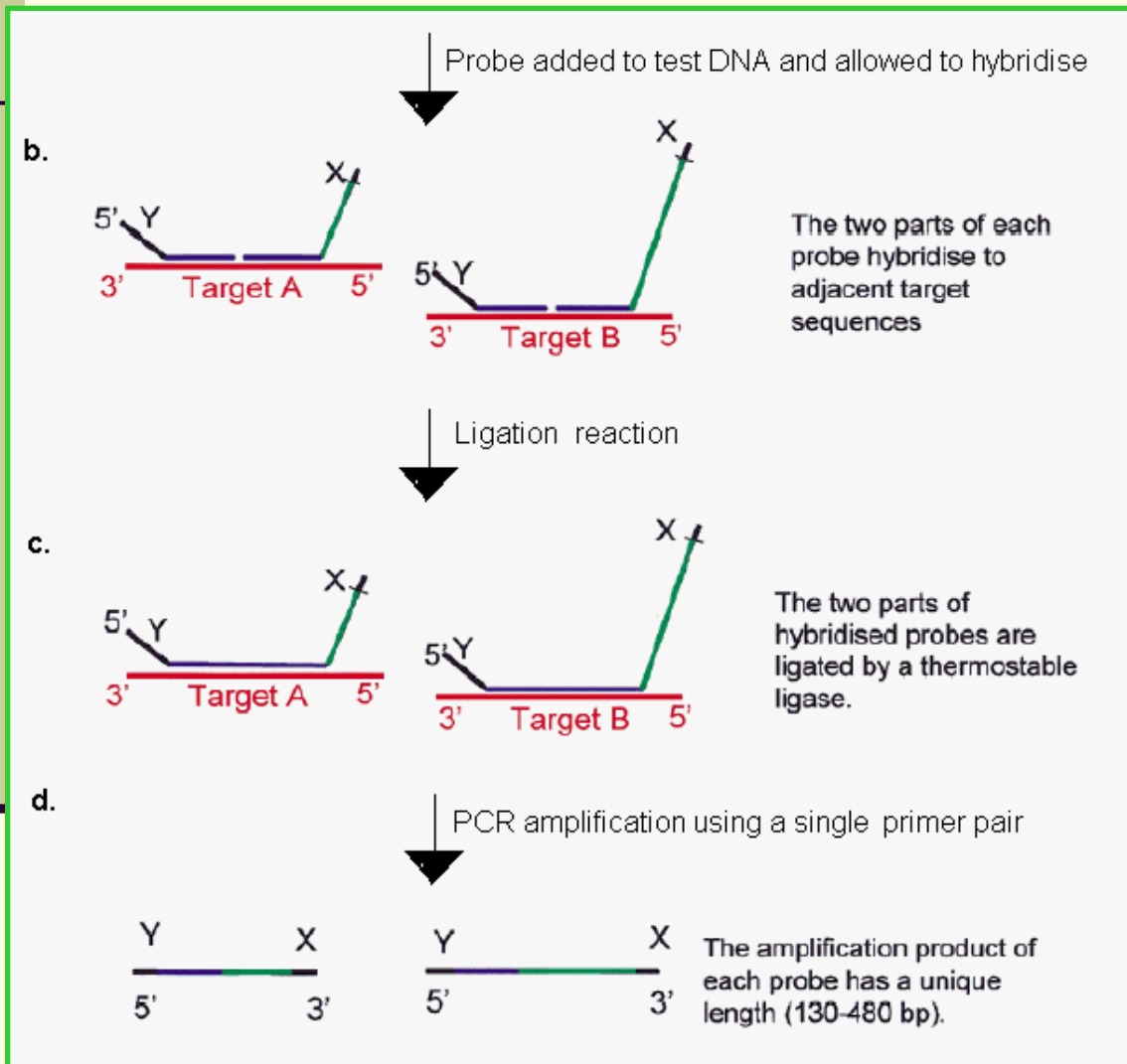
Hybridizační sekvence

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

PCR primer X



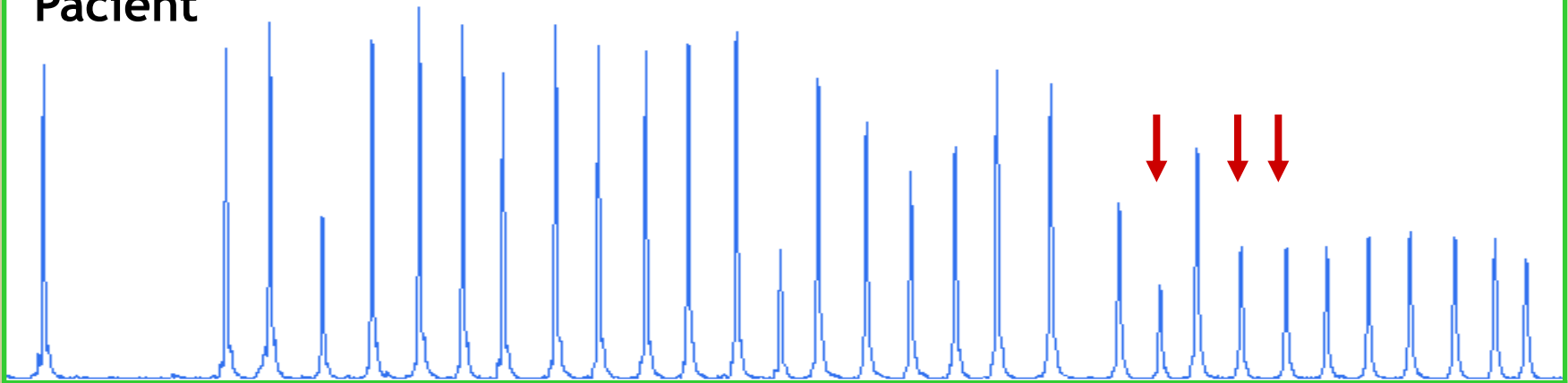
A takto MLPA funguje...



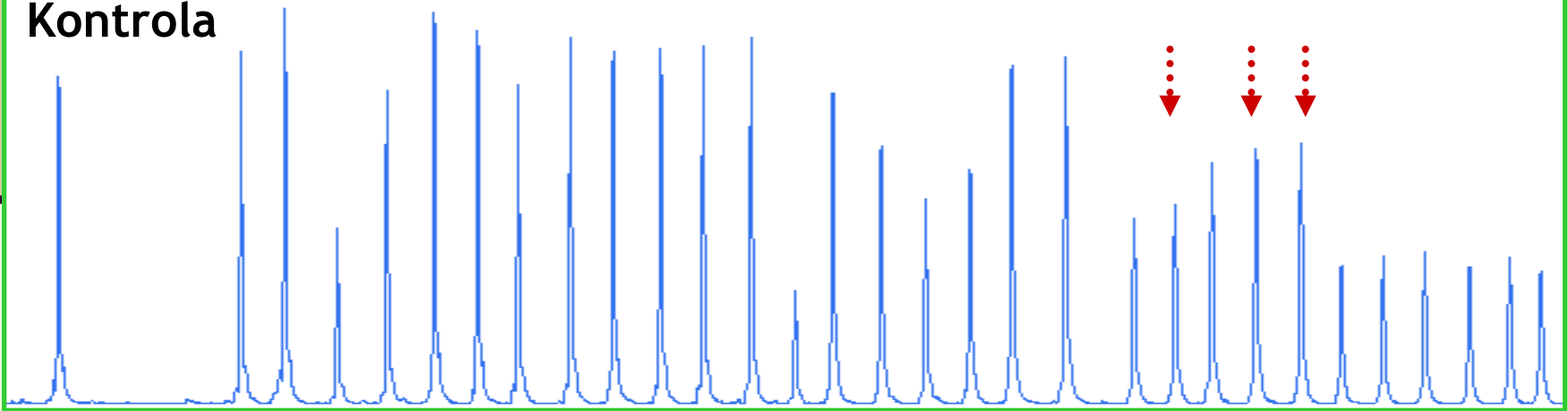
kapilární elektroforéza

A takto MLPA funguje...

Pacient

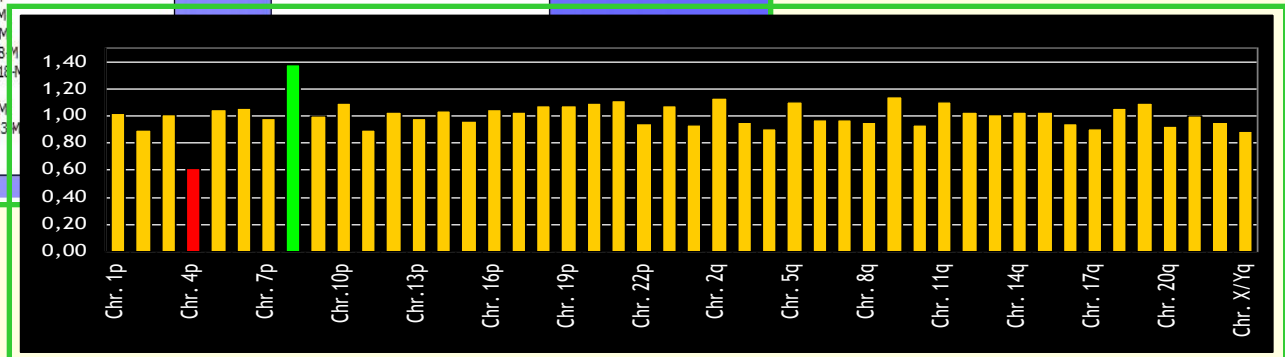


Kontrola



S hodnocením je to někdy těžší

The screenshot shows the Coffalyser web application interface. At the top, there's a header with the 'Coffalyser' logo and a 'Select an MLPA Mix' dropdown menu currently set to 'Chr 20 MLPA MIX2'. A 'LOAD' button is next to it. Below the header is a navigation bar with tabs: 'MLPA-Mix', 'Import your Data', 'Data Analysis', 'Results Section', 'Statistical Analysis', 'Batch Analysis', and 'Help Page'. On the left side, there's a 'Navigate' sidebar with icons for 'MLPA-Mix', 'Import Data', 'Analysis', 'Results', 'Statistics', 'Batch', and 'Help'. The main content area is titled 'Mlpa - Mix configuration' and includes a subtitle: 'Adjust your MLPA-mix if you're not using a standard mix, using the buttons.' Below this, there are two main sections: 'Probe list of active mix' and 'Control genes of active mix'. The 'Probe list of active mix' contains a list of gene names and their corresponding MLPA probes, such as 'STK6-D01-136-M SLOW', 'FRG1-D02-151-M', 'BCL2L1-D01-160-M', 'FLJ10474-D01-166-M = ODZ3', 'MYBL2-D01-178-M', 'JAG1-D01-202-M', 'BCAS1-D01-211-M', 'CCND2-M02-220-M', 'HCK-D01-229-M', 'TNFRSF6B-D01-238-M', 'KIAA0980-D01-255-M', 'KCNIP4-D01-256-M', 'THBD-D01-265-M', 'SOX12-D01-274-M', 'DEC2-D02-283-M', 'ADA-D01-292-M', 'C20orf1-D01-310-M = TPX2', 'FLJ22115-D01-319-M = C20orf99', 'CREBBP-D03-328-M', 'OPRL1-D01-337-M', 'ZNF217-D02-346-M', 'PTPN1-D01-364-M', 'IL2-D01-373-M', 'REM-D01-373-M', 'E2F1-D01-391-M', 'TOP1-D01-400-M', 'BCL2L1-D03-418-M', 'DNMT3B-D01-418-M', 'URKL1', 'TSC2-D37-436-M', and 'EEF1A2-D01-463-M'. The 'Control genes of active mix' section contains a list of gene names and their corresponding MLPA probes, such as 'FRG1-D02-151-M', 'FLJ10474-D01-166-M = ODZ3', 'CCND2-M02-220-M', 'KCNIP4-D01-256-M', 'DEC2-D02-283-M', 'CREBBP-D03-328-M', 'IL2-D01-373-M', and 'TSC2-D37-436-M'. Between these two sections are buttons for 'Add Gene to control genes' (labeled '>>') and 'Remove from control genes' (labeled '<<'). On the left side of the main content area, there's a 'Show List' section with a 'Gene Names' dropdown menu and an 'Edit mix' section with buttons for 'remove Probe', 'Insert New', 'Rename Probe', 'Apply changes', and 'Save to file'.



MLPA Kity fy MRC Holland

- aneuploidie celých chromosomů 13, 18, 21, X a Y
 - delece a duplikace chromosomových oblastí a celých genů (DiG, CMT1, subtelomerické oblasti)
 - delece a duplikace v jednom nebo více exonů (DMD)
 - metylace DNA
- ⇒ 120 různých aplikací

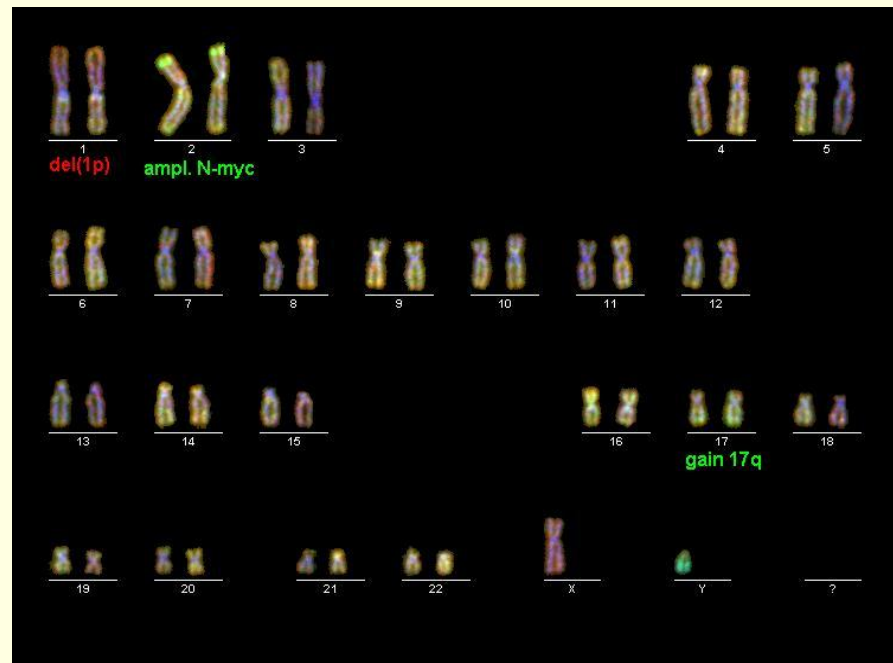
OLG FN Brno:

- subtelomerické přestavby u pacientů s MR
- DiGeorge syndrom
- delece exonů u pacientů s DMD
- přestavby u pacientů s NF
- delece RB1 genu

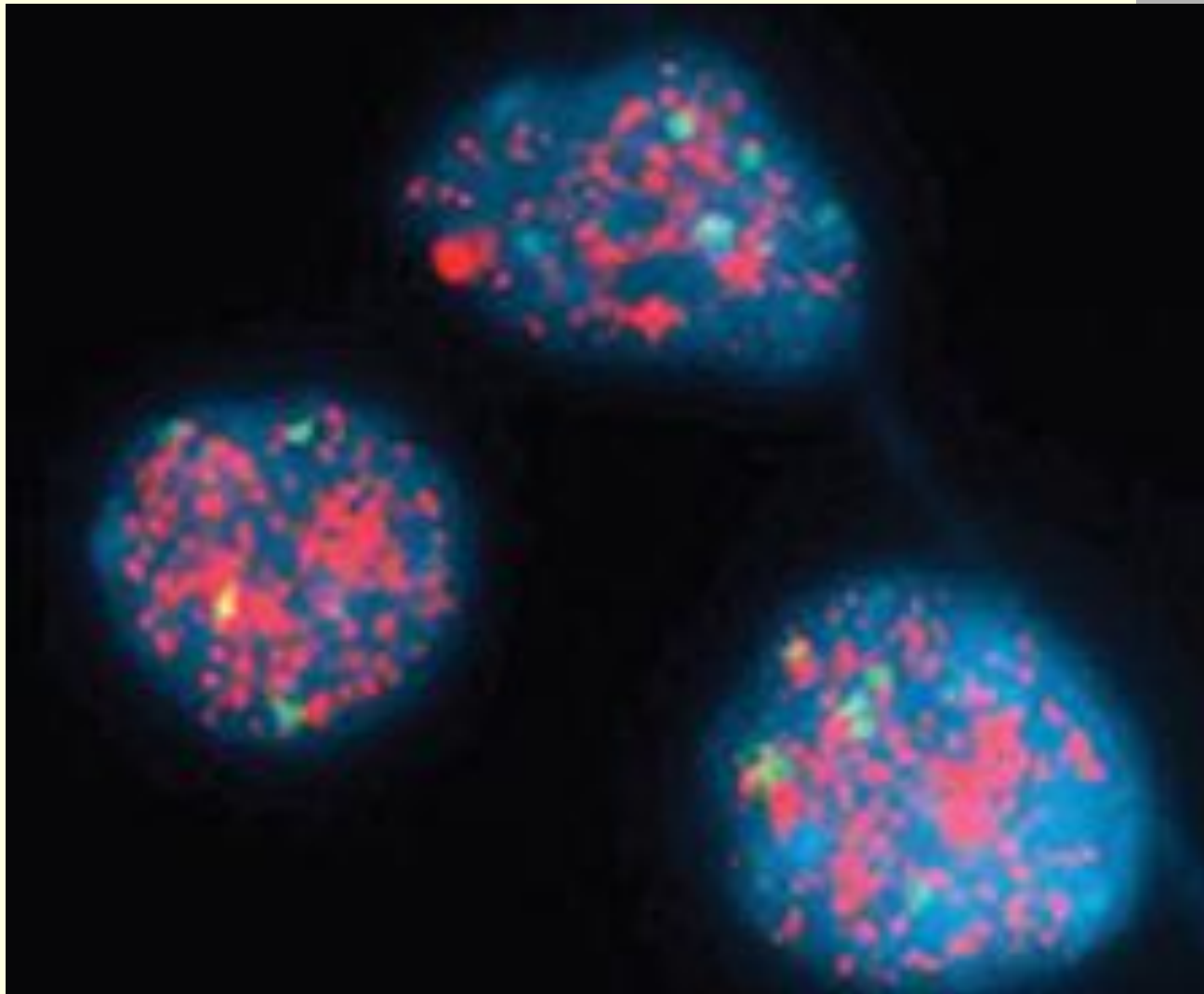


Využití metod molekulární cytogenetiky u solidních nádorů : **Neuroblastom**_(mimo jiné..)

- **Cytogenetika:** kultivace tkáně tumoru; vyšetření karyotypu
- **Molekulární cytogenetika:**
 - I –FISH: amp.MYCN
del 1p36
gain 17q
 - CGH, HR-CGH
 - array-CGH
 - SKY, MLPA
- **Molekulární genetika:**
tyrozinhydroxyláza,
protein PGP 9.5

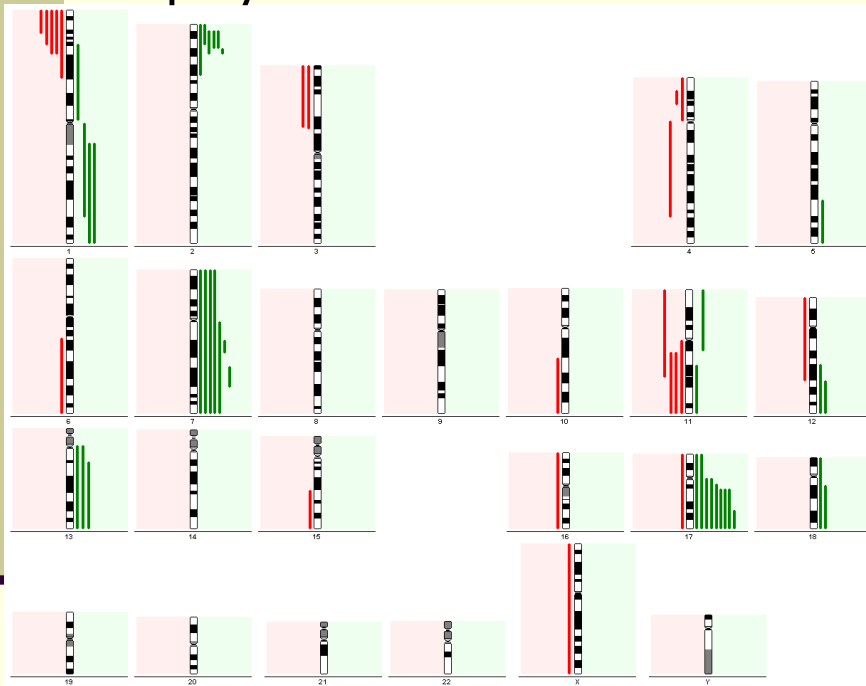


NB I-FISH amplifikace MYCN genu



NB CGH : profily pacientů

□ Souhrn CHA u pacientů ze skupiny **HR** NB



strukturní změny chromosomů:
zisk 2p a 17q, delece 1p, 3p, 9p, 11q

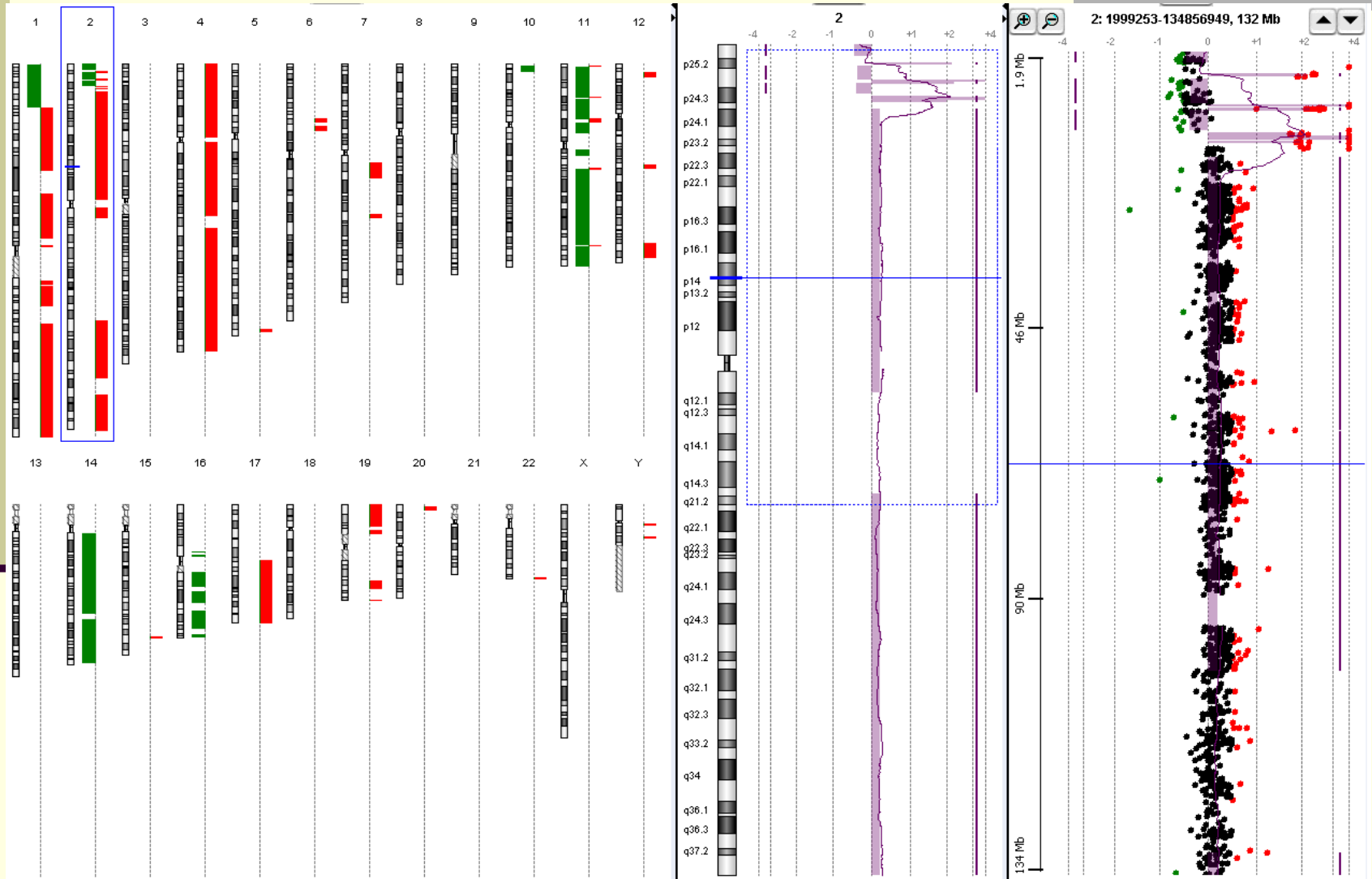
□ Souhrn CHA u pacientů ze skupiny **IMR** NB



numerické změny chromosomů:
-3, -4, -8, -9, -14, -15, -16, -19, -X
+2, +5, +6, +7, +17, +18

Ztráty genetického materiálu označeny **červeně** a zisky **zeleně**

NB array CGH amplifikace MYCN genu



Význam molekulárně cytogenetických vyšetření :

I-FISH, CGH

**komplexní analýza cytogenetických
změn**

array-CGH

upřesnění stratifikace pacientů



**individualizace léčebné
terapie**

Spektrum molekulárně cytogenetických vyšetření

- Prenatální genetická diagnostika
- Klinická (postnatální) cytogenetika
- Onkogenetika

Spektrum molekulárně cytogenetických vyšetření

Prenatální genetická diagnostika

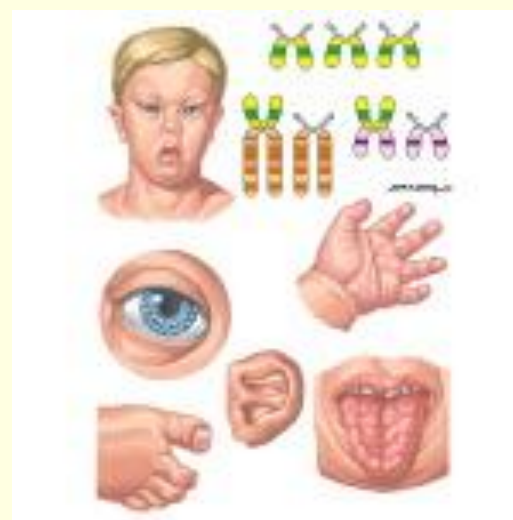
PV – kultivovaná, nekultivovaná, fetální krev, choriové klky

- trizomie chromosomů 13, 18, 21 (Patau, Edwards, Down sy)
- vyšetření sestavy a počtu gonosomů (XX, XY)
- mikródeleční syndromy (DiGeorge, del(22)(q11.2),...)
- vyšetření suspektních CHA (balancované translokace,...)



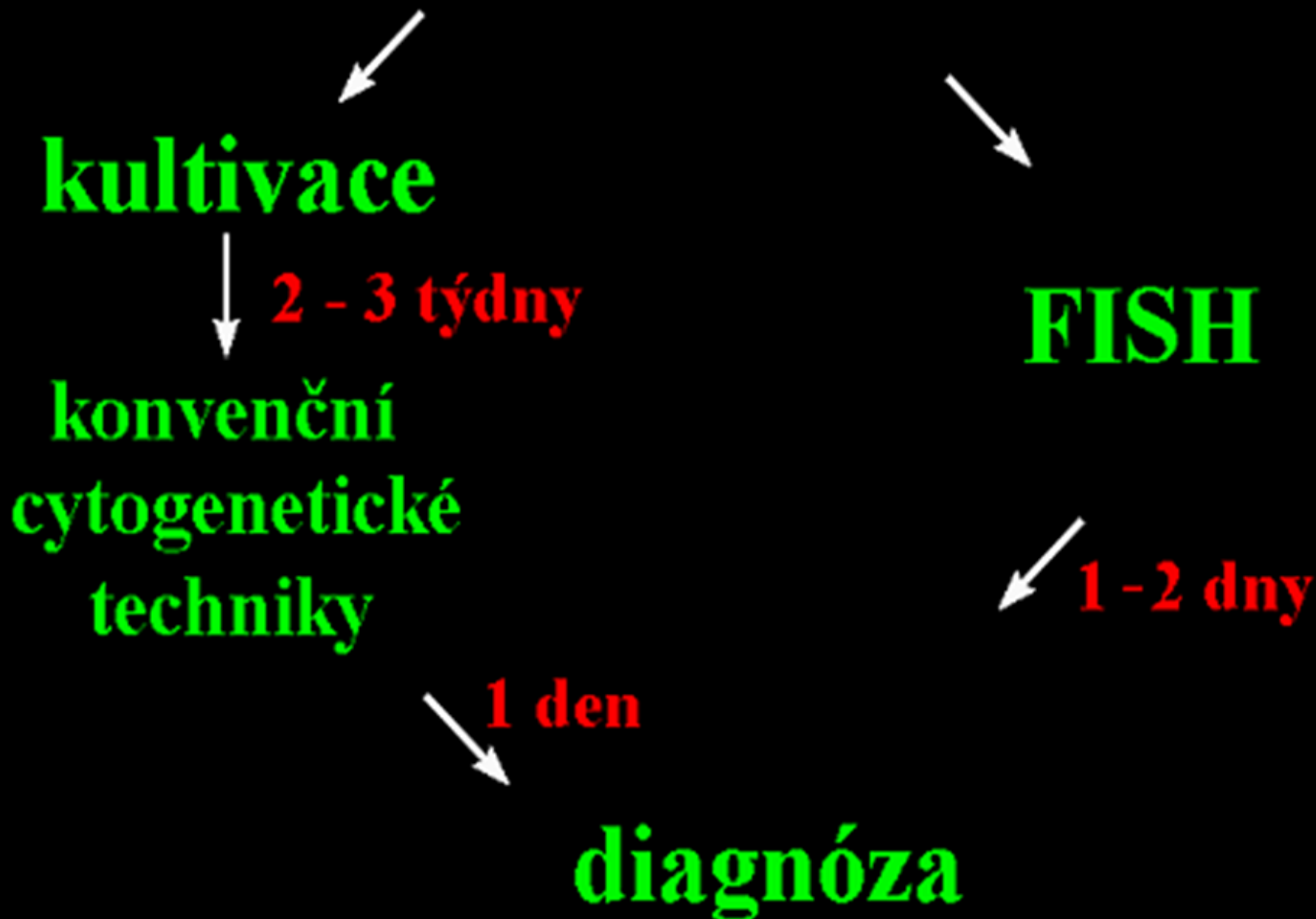
OLG FN Brno

FISH: + 21



Downův syndrom

Amniocentéza



Prenatální genetická diagnostika

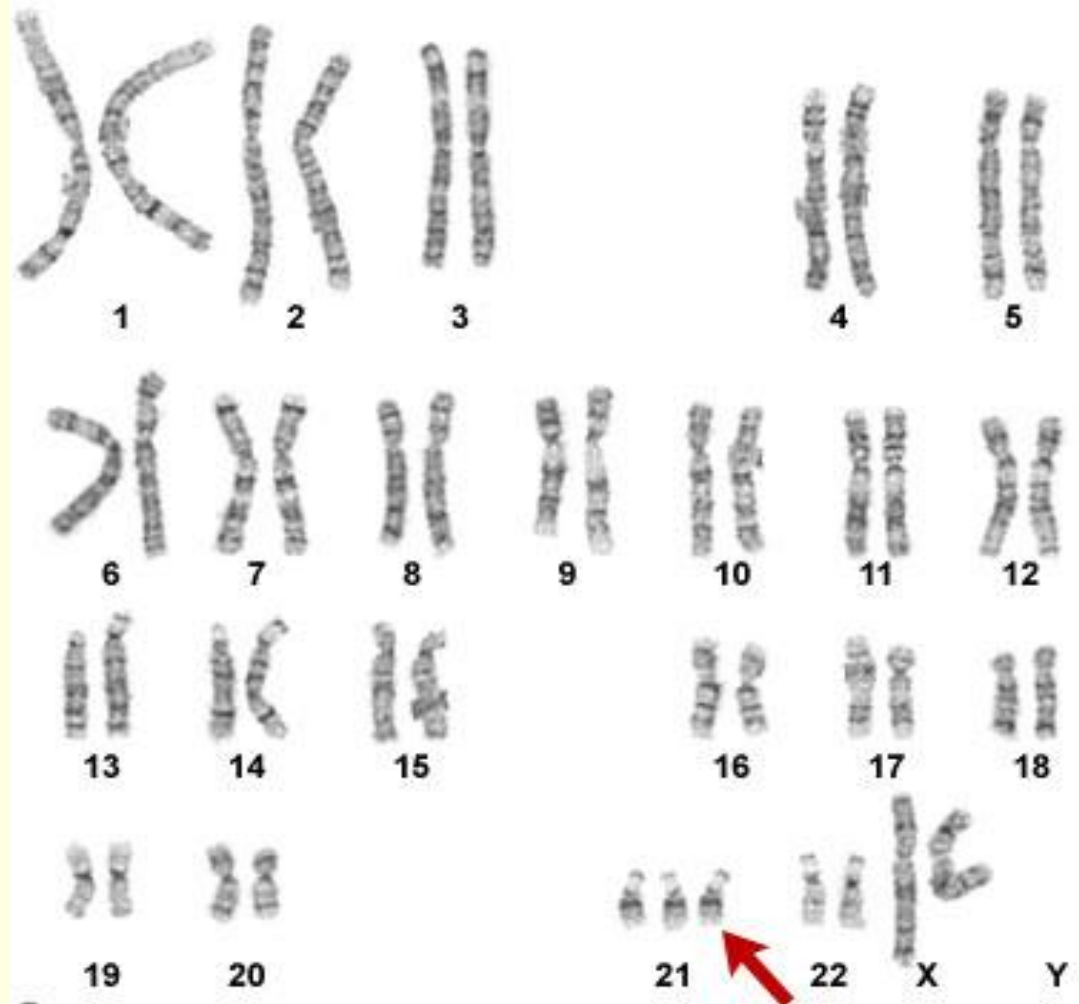
Downův syndrom



OLG FN Brno



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



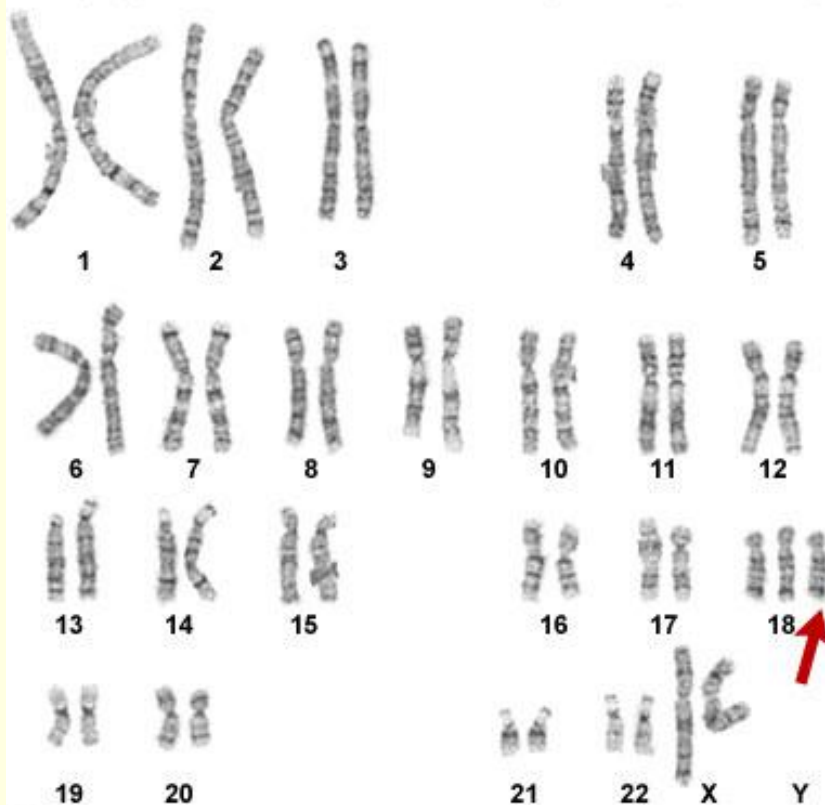
© Clinical Tools, Inc.

Prenatální genetická diagnostika

Edwardsův syndrom

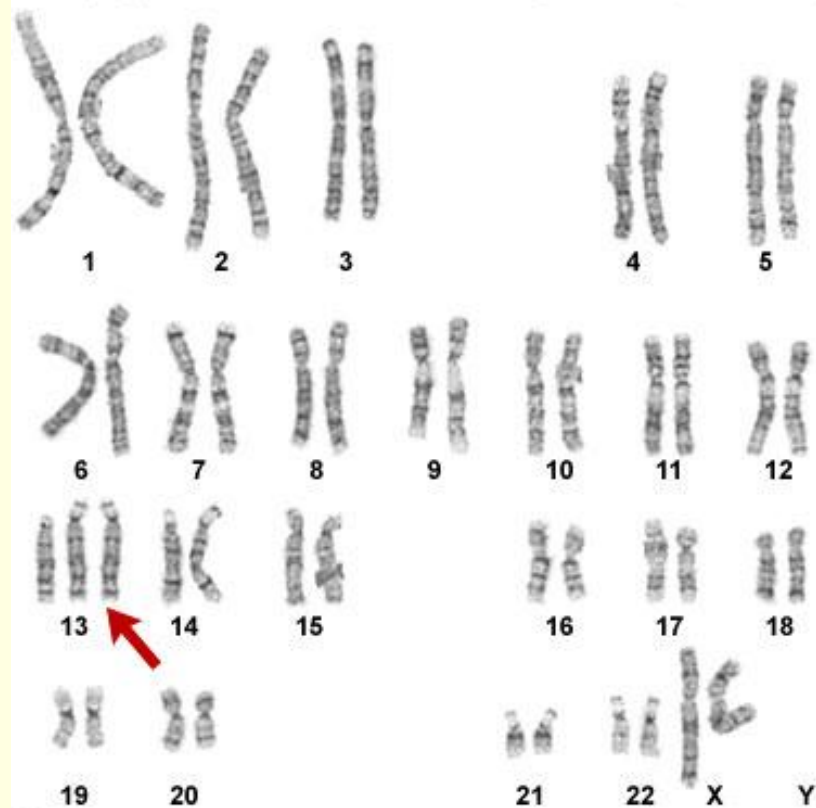
Patauův syndrom

Karyotype from a female with Edwards syndrome (47,XX,+18)



© Clinical Tools, Inc.

Karyotype from a female with Patau syndrome (47,XX,+13)

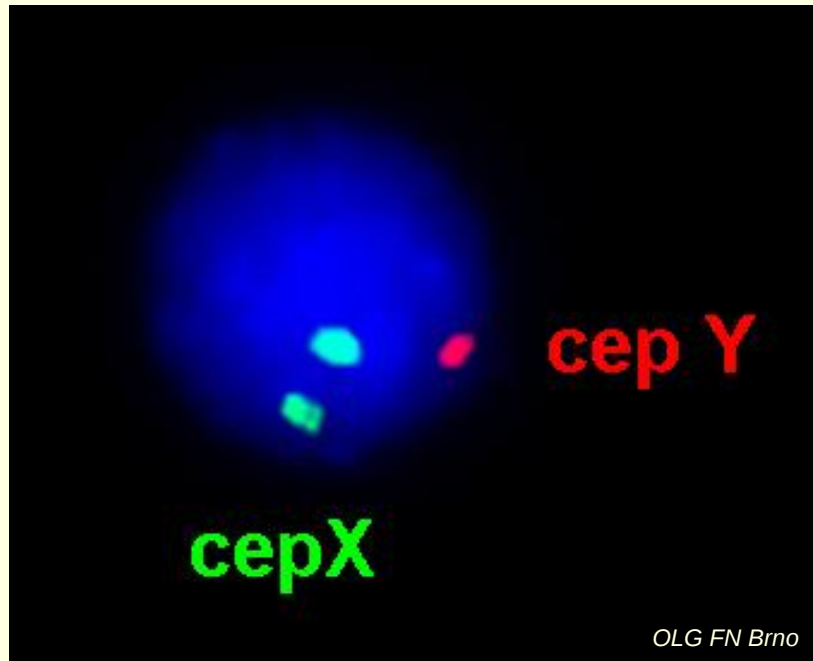
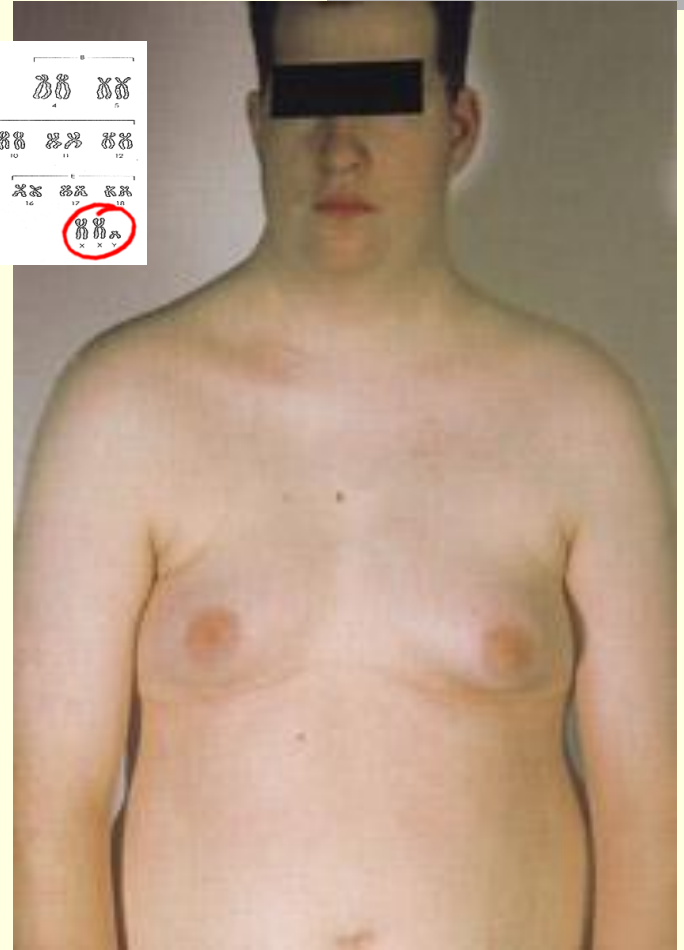
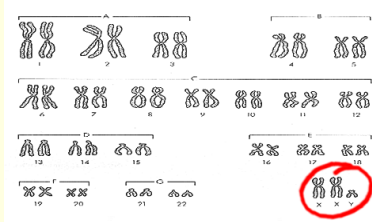


© Clinical Tools, Inc.

Prenatální genetická diagnostika

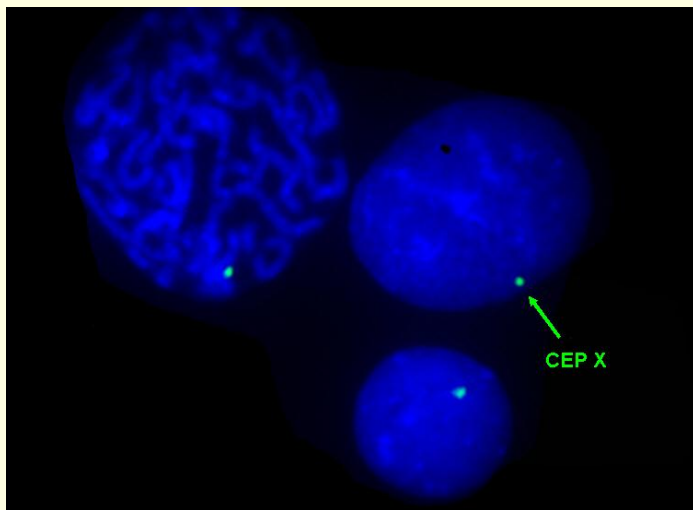
Klinefelterův syndrom

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



Turnerův syndrom

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



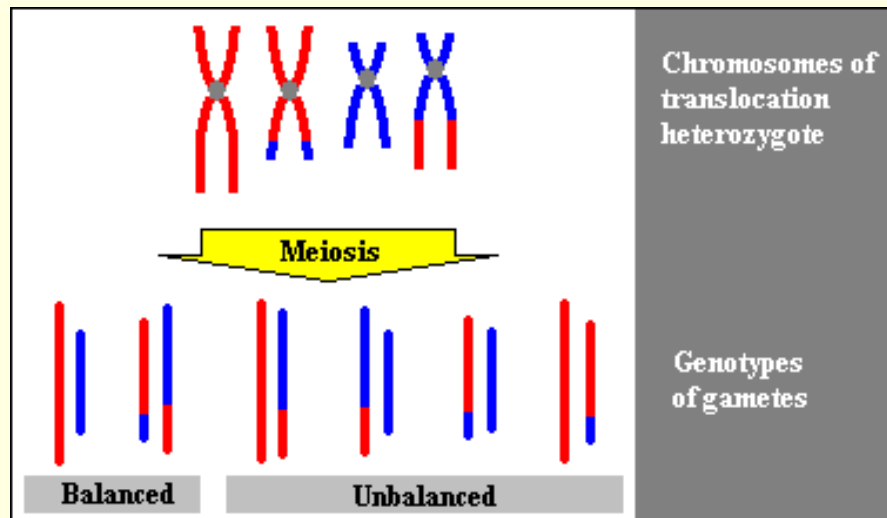
OLG FN Brno



medgen.genetics.utah.edu

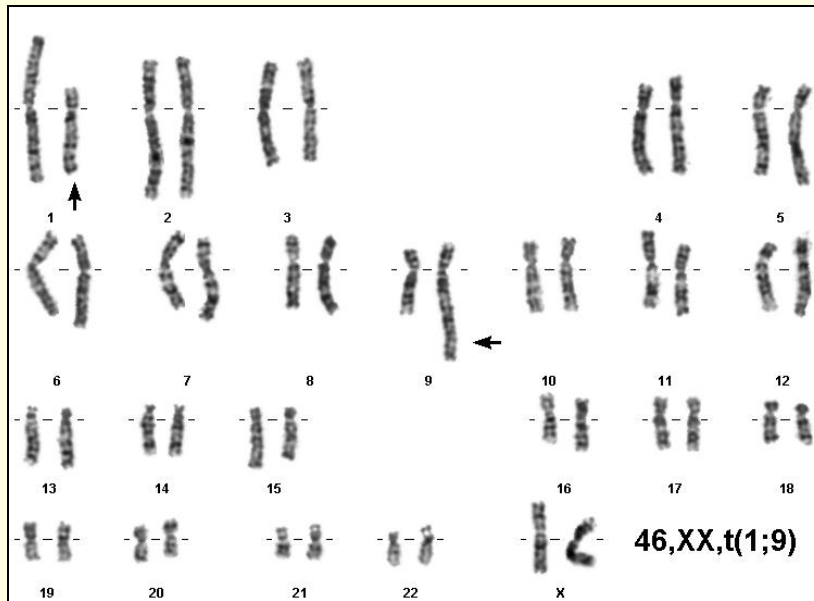
Balancované translokace - důsledky

- 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)

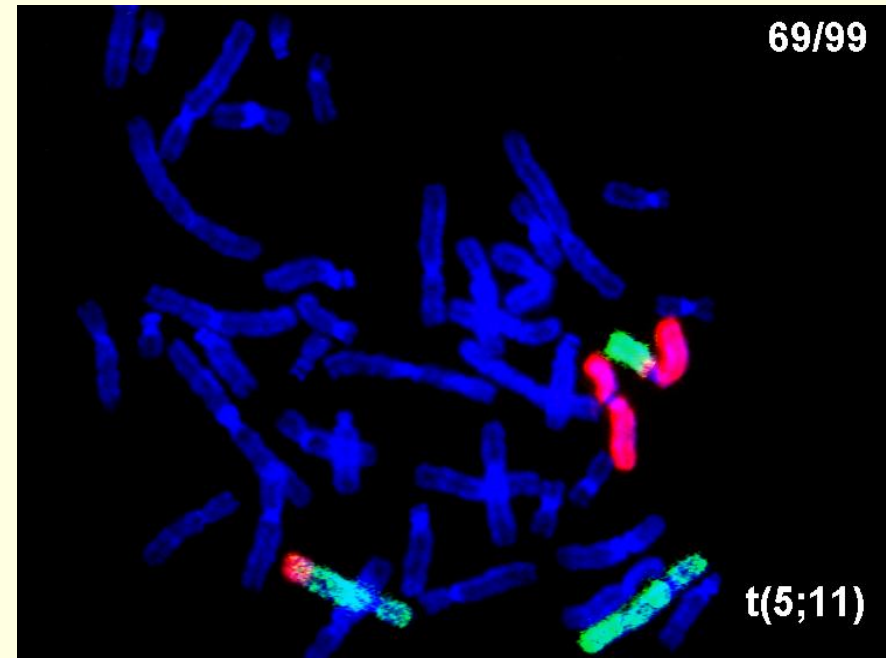


Prenatální genetická diagnostika

Ukázka karyotypu s translokací



OLG FN Brno



OLG FN Brno

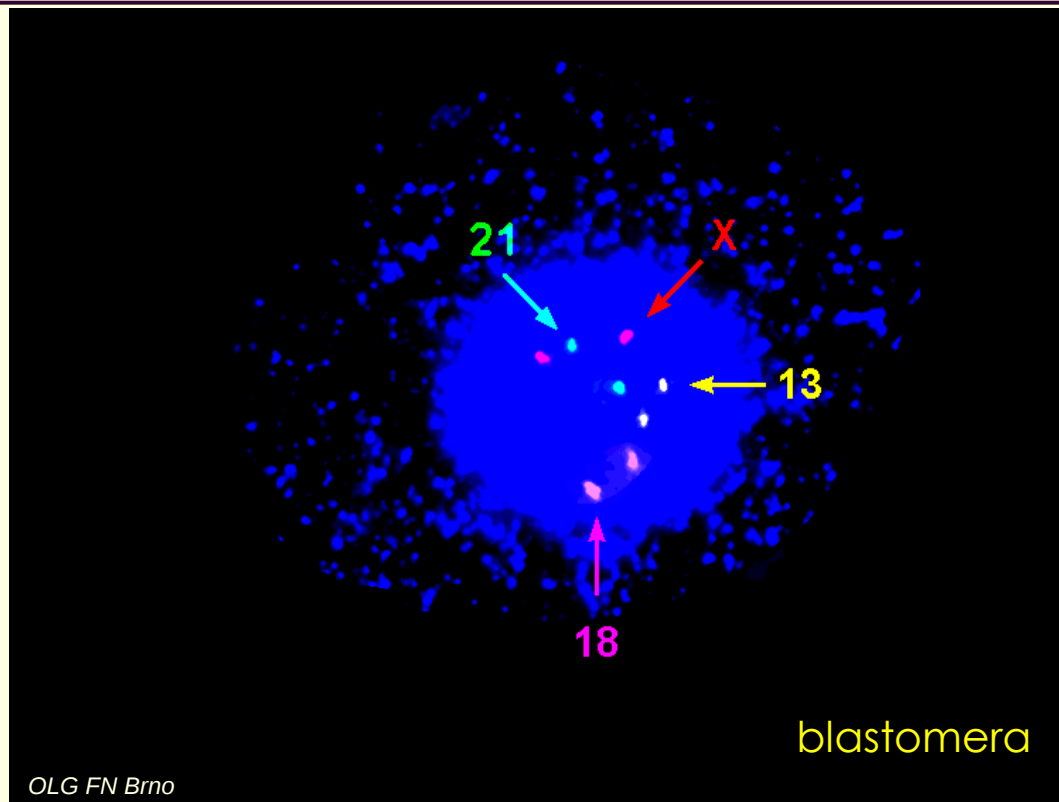
Preimplantační genetická diagnostika (PGD)

- **Nutné postupy asistované reprodukce – IVF**

- **Vyšetření 1-2 buněk třídenního embrya
in vitro pomocí FISH metody,**
- **možnost detekce genetické abnormality budoucího plodu**
- **vyřazení patologických embryí z programu IVF**
- **transfer embrya bez genetické zátěže do dělohy matky**

cílem je zvýšit úspěšnost metod asistované reprodukce a snížit riziko SA, především pak narození zdravého potomka

Preimplantační genetický screening (PGS) nejčastějších aneuploidií



- limitovaný počet buněk dostupných genetické analýze
- možné riziko narušení vývoje vyšetřovaného embrya
- není vyloučená jiná genetická vada
- doporučeno doplnění PGD CVS nebo amniocentézou a stanovením karyotypu plodu

1. Spektrum molekulárně cytogenetických vyšetření

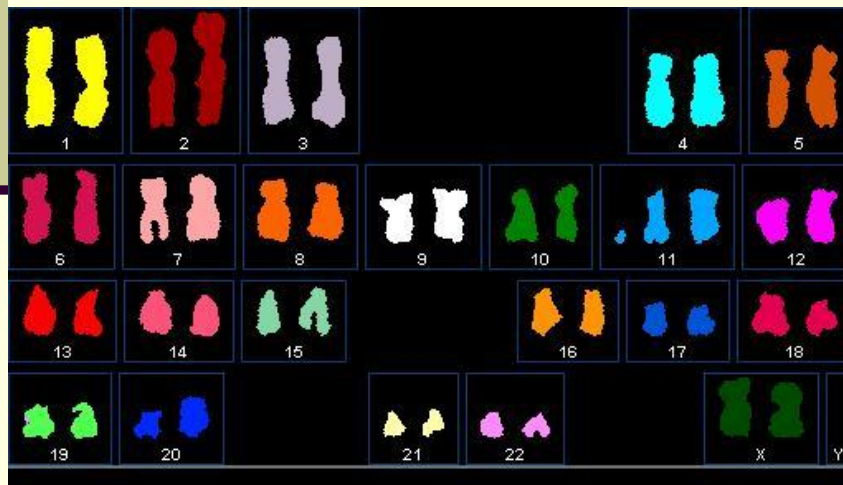
- Prenatální genetická diagnostika
- Klinická (postnantální) cytogenetika
- Onkogenetika

1. Spektrum molekulárních cytogenetických vyšetření

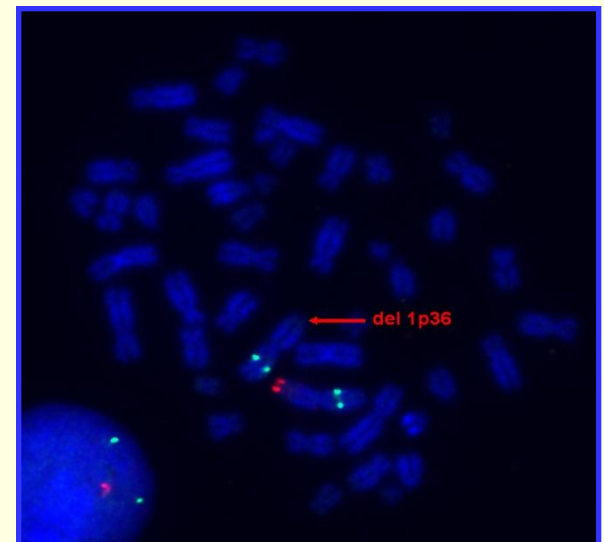
Klinická cytogenetika

lymfocyty periferní krve, bukální stěry

- detekce mikródelečních syndromů – FISH, MLPA
- detekce mikródelecí v subtelomerických oblastech – FISH, MLPA
- analýza původu marker chromosomů – CGH, SKY
- identifikace a upřesnění strukturních chromosomových přestaveb
- detekce malých numerických mozaik - FISH



SKY: identifikace marker chromozómu pocházejícího z chr. 11



FISH: delece 1p36

Mikrodeleční syndromy

(nezachytitelné pomocí klasické cytogenetiky)

del 22q11 (DiGeorge syndrom)

■ SRDEČNÍ VADY:

- přerušení oblouku aorty
- Fallotova tetralogie: neúplné mezikomorové septum
stenóza plicnice
hypertofie levé komory
posun aortálního oblouku nad pravou komoru

■ ANOMÁLIE TVÁŘE:

- nízko položené uši s abnormálním ohybem ušního boltce
- úzká oční štěrbina
- malá ústa a malá dolní čelist
- bulbózní nos s čtvercovou špičkou
- submukózní nebo viditelný rozštěp patra

■ PORUCHY IMUNITY:

- nedostatek T-lymfocytů , hypokalcémie

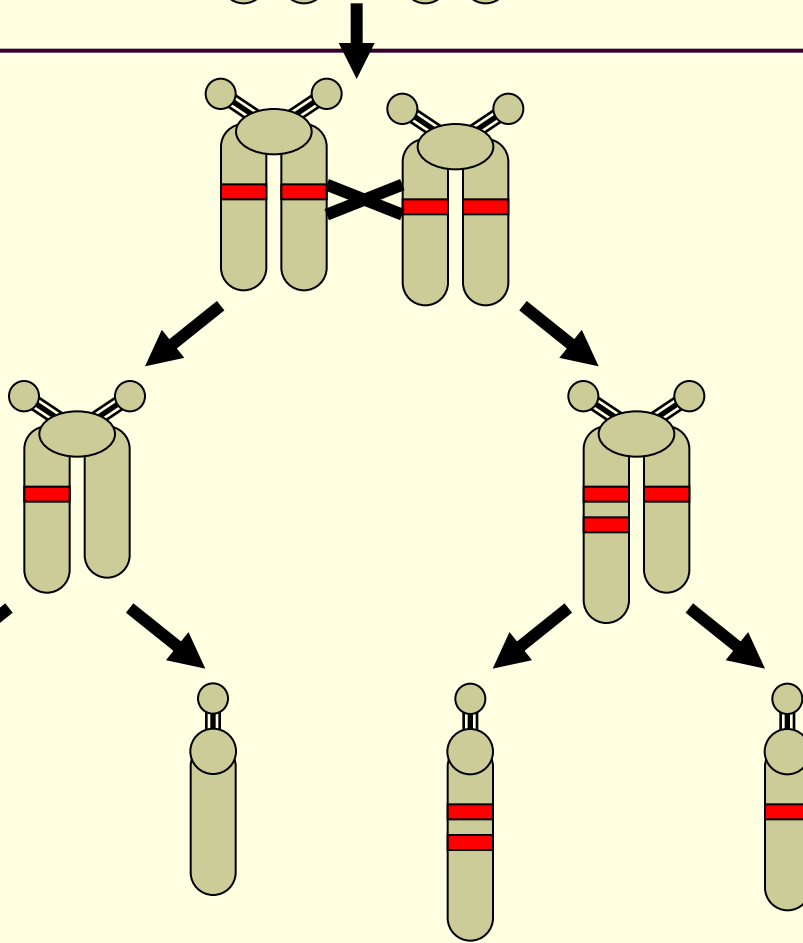
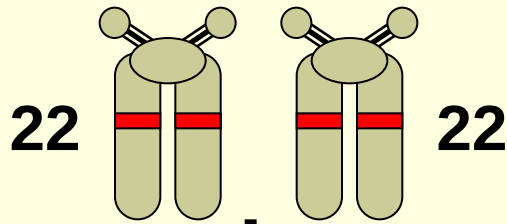
Klinická cytogenetika

Mikrodelece 22q11

DiGeorgeův/VCFS syndrom

- mikrodelece na chromosomu 22 v oblasti q11.2 patří mezi nejčastější konstituční aberace u člověka
- pacienti s mikrodelecí se vyskytují v populaci s četností 1: 4000 až 1: 6000 živě narozených dětí
- přibližně 90 % probandů má de novo delecí 22q11, asi u 6% se jedná o familiární přenos
- Fenotyp obdobný mohou mít i pacienti s dalšími mikrodelecemi – doplnit dle DiG kitu

Nerovnoměrný crossing-over

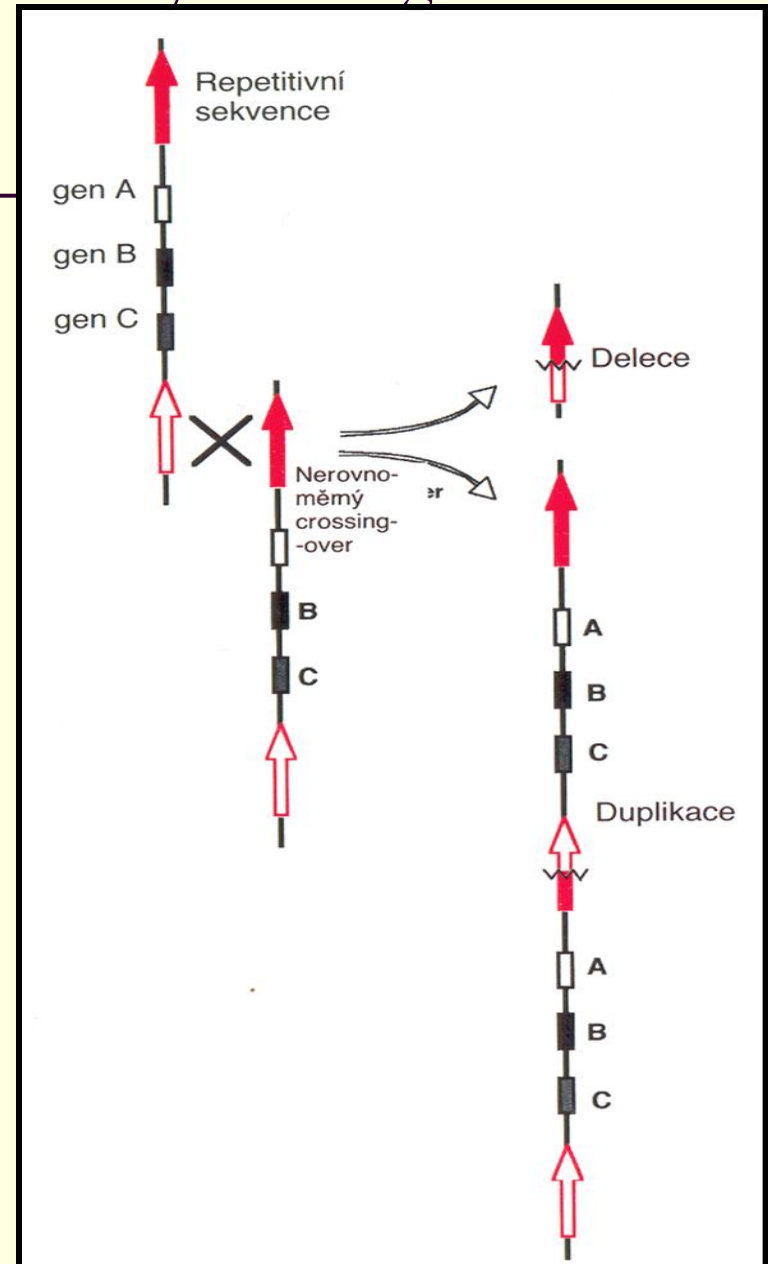


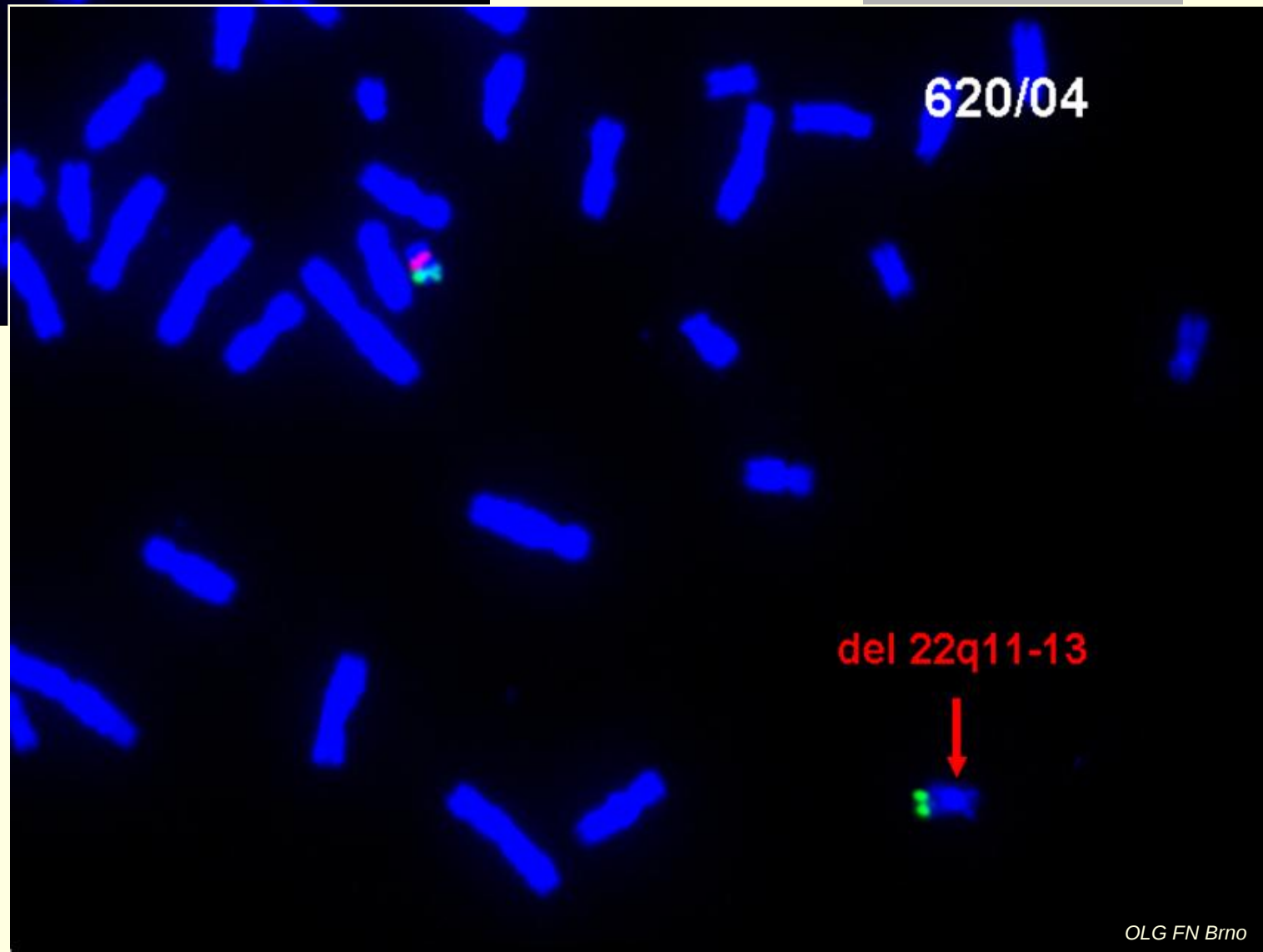
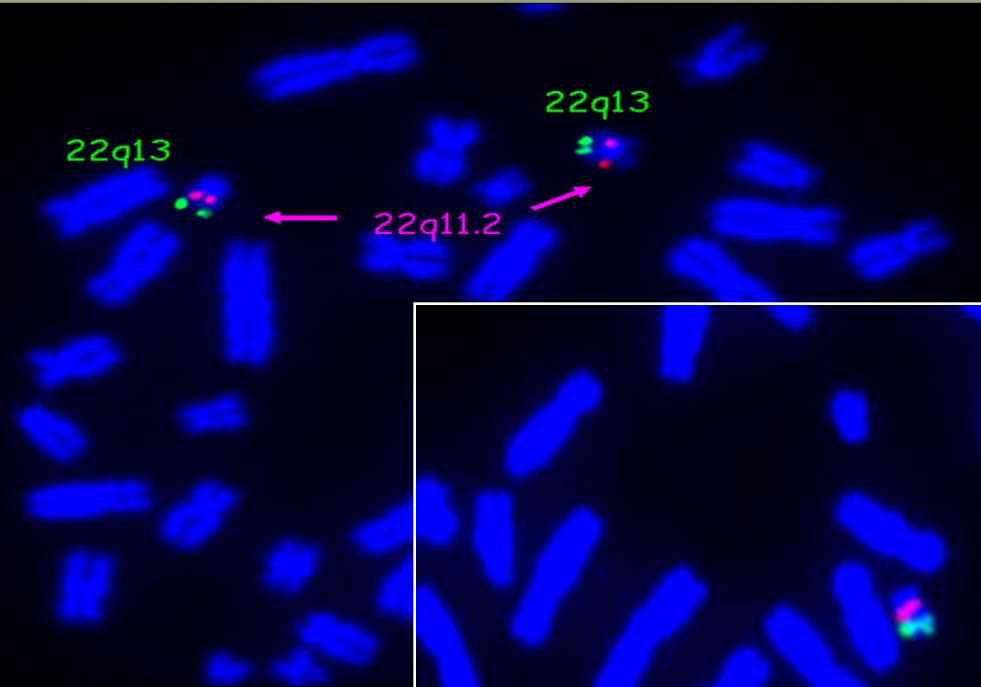
normální

del(22q11)
syndrom
DiGeorge

dup(22q11)
syndrom
cat-eye

normální



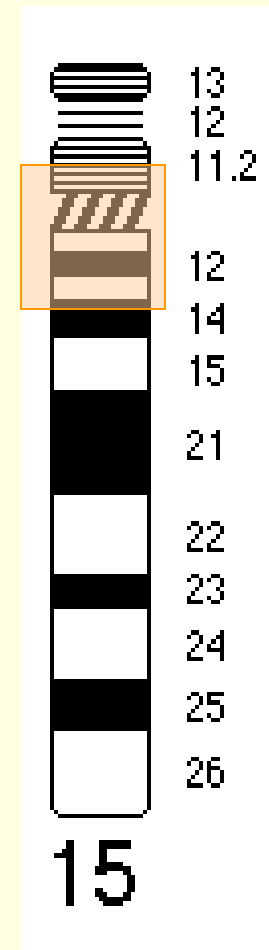


Mikrodeleční syndromy

Syndromy Prader-Willy a Angelman

abnormality na
chromosomu 15
v oblasti ***15q11-q13***

klinicky naprosto
odlišné syndromy!!



del 15q11-13



15q22

15q11-13

15p11.2

15q22

Prader-Willy syndrom

Hlavní klinické příznaky:

- Snížená aktivita plodu
- Neprospívání kojenců
- Hypotonie novorozenců
- Obesita
- Hyperfagie, neukojitelný hlad
- Hypogenitalismus, hypogonadismus
- PMR
- Malá postava
- Akromikrie
- Hypopigmentace
- Problémy s chováním



Angelman syndrom

Hlavní klinické příznaky:

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



Genetické příčiny vzniku PWS a AS

Prader-Williho syndrom

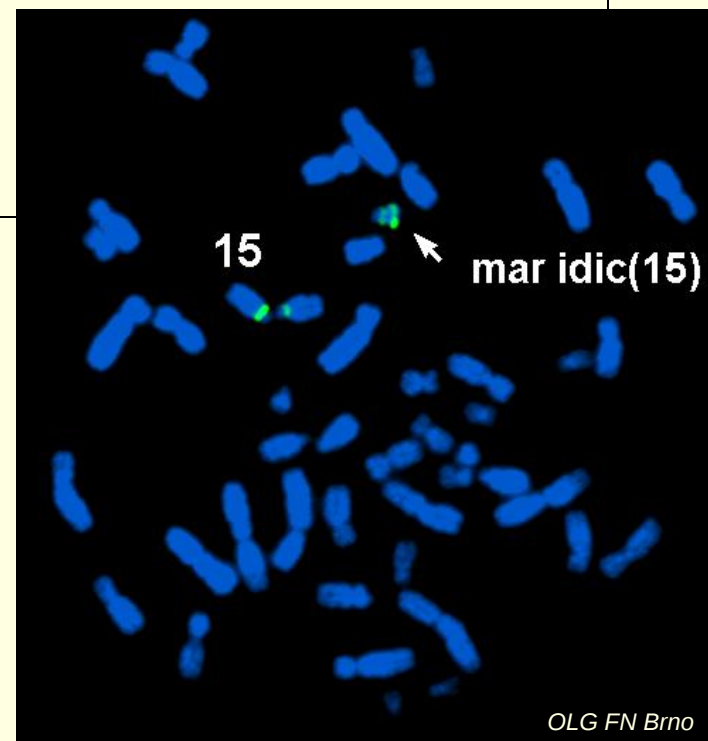
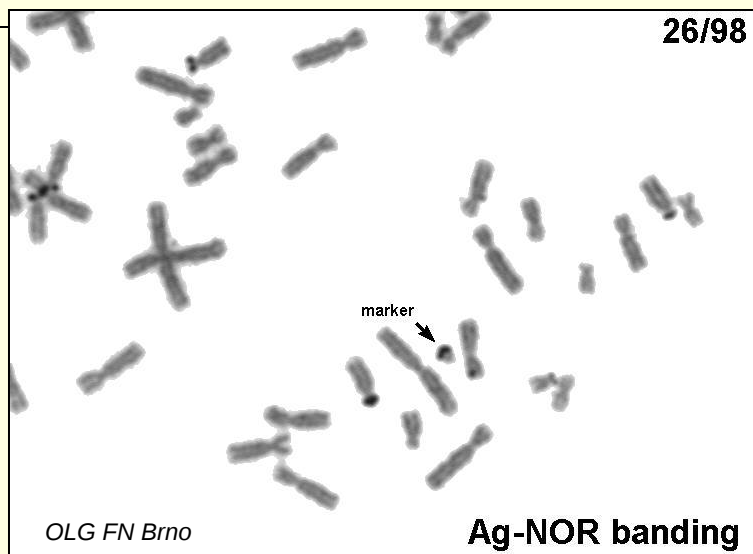
1. Delece na paternálním chromosomu 15 (70%)
2. Maternální uniparentální disomie chromosomu 15 (20 - 25%)
3. Změna imprintingu (2 - 4%)
4. Různé chromosomální přestavby (méně než 5%)

Angelmanův syndrom

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

Identifikace markerových chromosomů

- „supernumerary marker chromosome“, markerový chromozom či jen marker;
- je to malý nadbytečný chromosom, který není možno analyzovat cytogenetickými pruhovacími metodami;
- výskyt - 1/4000 u novorozenců, 1/2500 u amniocentéz;

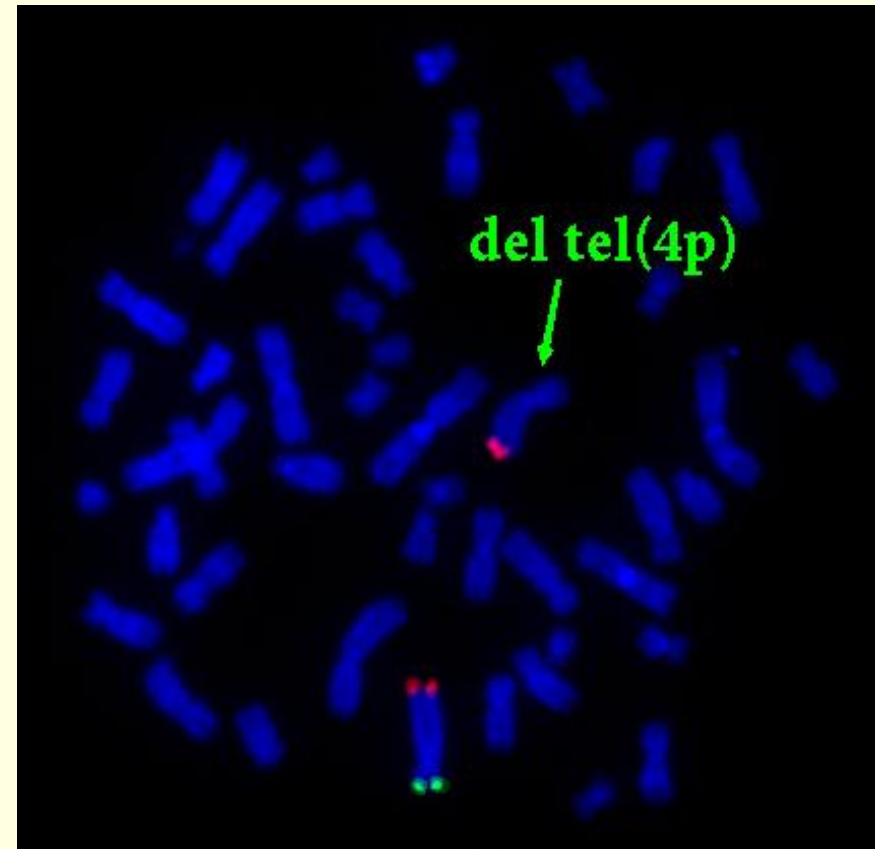


Základní charakteristika markerových chromosomů

- chromosom - nese funkční kinetochory, většinou se stabilně dědí;
- malý - velikost obvykle menší než chromosomy skupiny G;
- nadbytečný - výjimka jsou markery odvozené od gonosomů;
- nepřítomnost pruhového vzoru - nelze analyzovat běžnými cytogenetickými metodami;

Delece subtelomerických oblastí

- Sub-microscopic (cryptic) telomeric rearrangements cannot be seen by conventional chromosome banding
- Cryptic rearrangements have been implicated in up to 6% of unexplained mental retardation
- Method exists for assaying all 41 unique telomeres (no p arm for 13, 14, 15, 21 and 22; Xp same as Yp) simultaneously on one slide



1. Spektrum molekulárně cytogenetických vyšetření

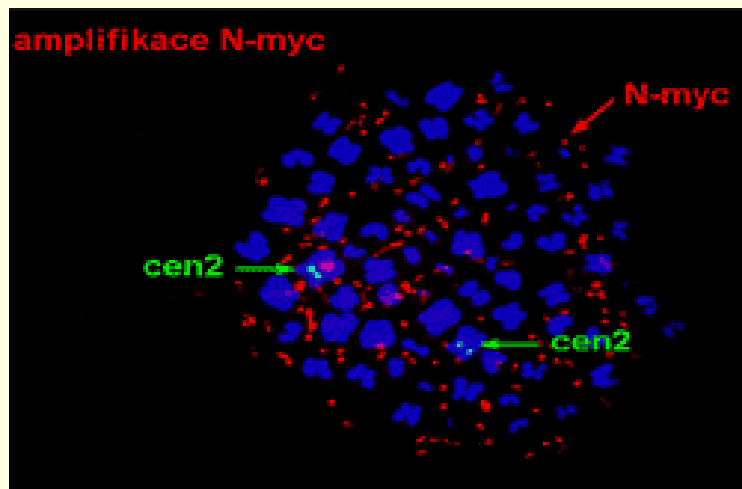
- Prenatální genetická diagnostika
- Klinická (postnatální) cytogenetika
- Onkogenetika

1. Spektrum molekulárně cytogenetických vyšetření

Onkogenetika

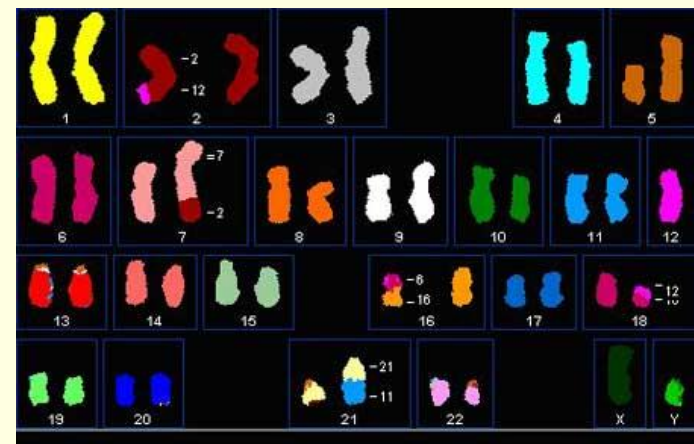
kultivované buňky KD, nátěry KD, otisky nádorů, DNA z KD
a nádorů

- detekce prognosticky významných specifických CHA
u některých hematologických malignit (AL, CL, MDS, lymfomy),
u dětských solidních nádorů (NB, meduloblastom, Ewingův sarkom)
- FISH, CGH, SKY



Amplifikace N-myc onkogenu

OLG FN Brno



OLG FN Brno

Komplexní karyotyp pomocí SKY

Cytogenetická vyšetření v onkologii

- nedílná součást všech onkohematologických vyšetření
- cytogenetické a molekulárně genetické metody používané v onkohematologii jsou součástí diagnostiky a léčby těchto malignit ve smyslu:
 - upřesnění diagnózy
 - stanovení léčebné strategie
 - monitorování léčby
 - sledování reziduální choroby po transplantaci
 - předpověď pravděpodobného vývoje onemocnění
 - lokalizování protoonkogenů a tumorsupresorových genů

Chromosomové změny u nádorů – rozdělení I.

- **ztráta** genetického materiálu
(delece, monosomie)
- **zmnožení** genetického materiálu
(duplikace, amplifikace, trisomie, polyploidie)
- **přemístění** bez ztráty materiálu
(translokace, inverze, inzerce)

Chromosomové aberace u nádorů – rozdělení II.

primární základní při vzniku nádorů, jediná změna, spouští mnohastupňový proces karcinogeneze

sekundární objevují se v průběhu onemocnění, obraz stadia choroby, výraz progresu tumoru, prognostický faktor progresu onemocnění

specifické pravidelně u určitého typu nádoru, představují specifický nádorový marker, v místech zlomu byly identifikovány geny, které jsou zúčastněné v nádorovém procesu

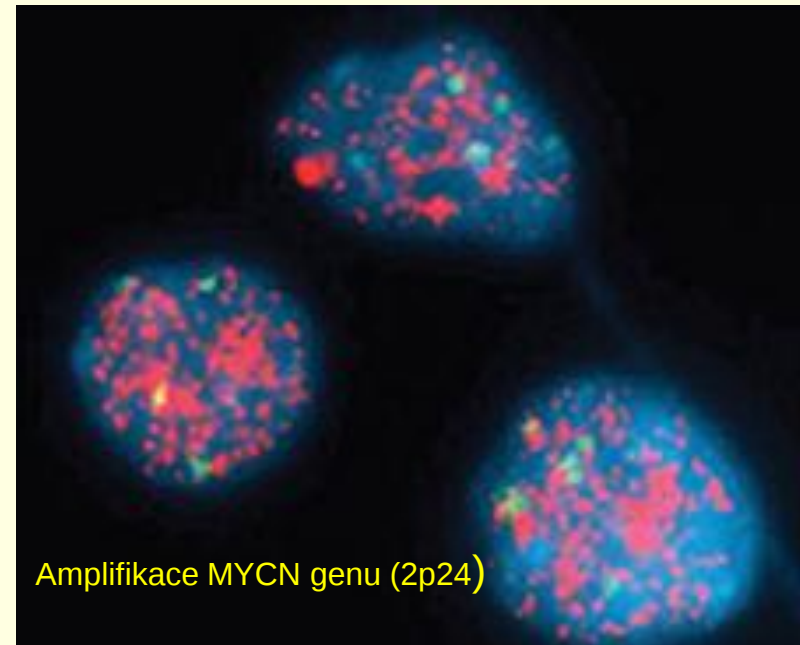
náhodné vyskytují se náhodně, postihují různé chromosomy

Početní CHA u nádorů

- aneuploidie x polyploidie
- hyperdiploidie (více než 46 chromosomů) – často lepší prognóza (ALL, mnohočetný myelom)
- hypodiploidie – méně než 46 chromosomů – horší prognóza (mnohočetný myelom)

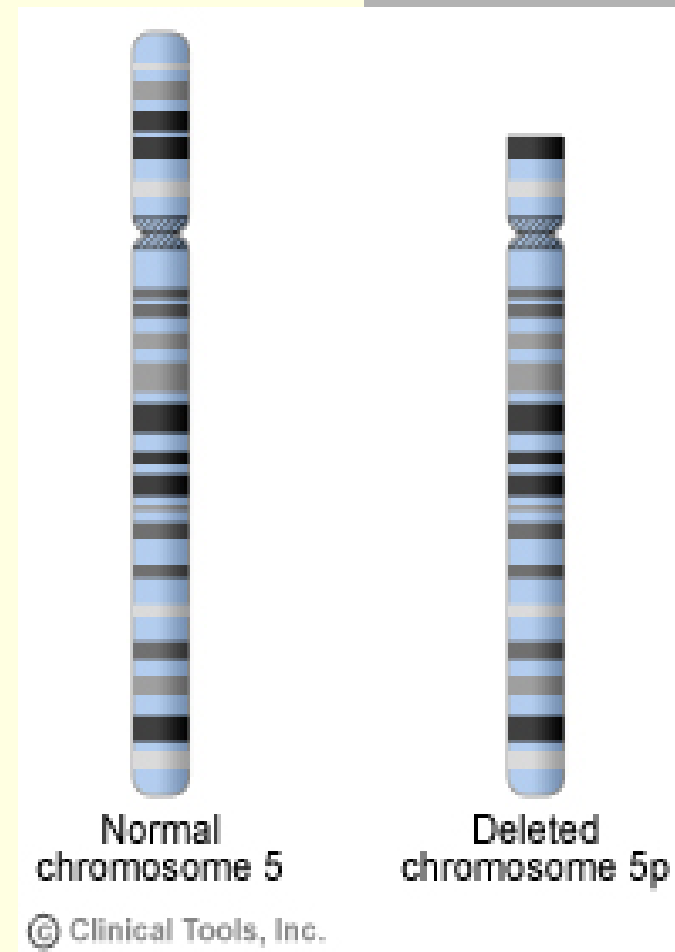
Strukturní CHA: Amplifikace

- časté u solidních nádorů ale i u leukémií
- většinou zmnožení proto-onkogenů
- double minutes (d-min)
- vyšetření pomocí FISH, počet signálů v buňce
- vyšetření přítomnosti amplifikace má klinický a terapeutický význam



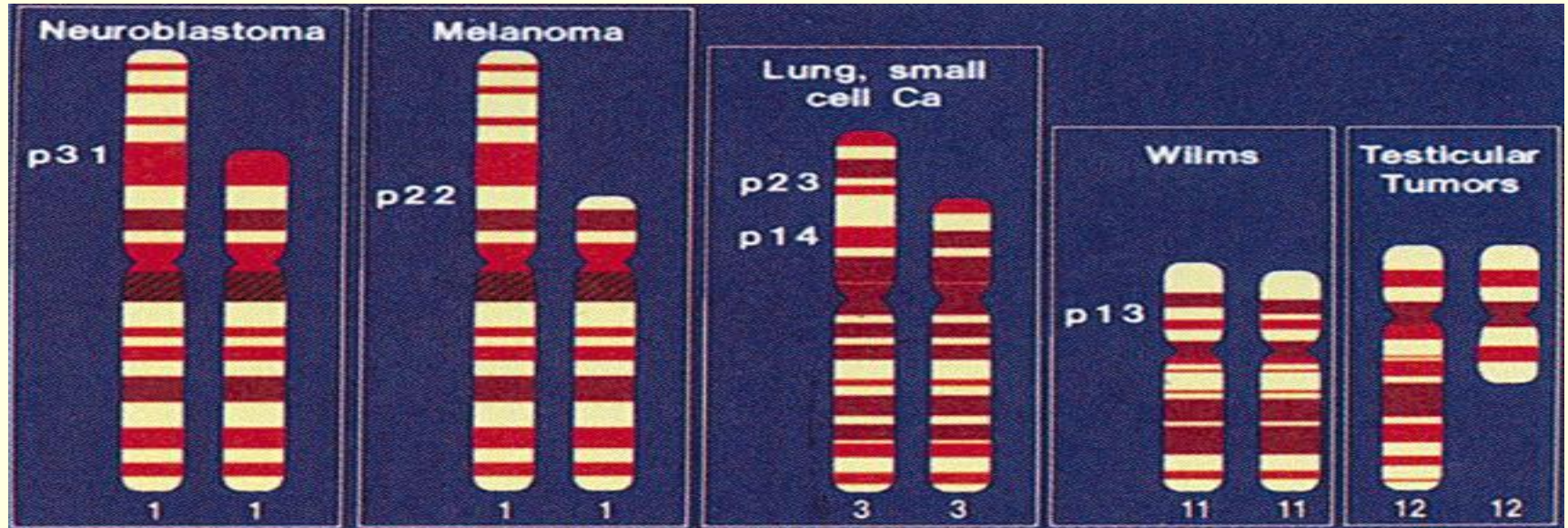
Strukturní CHA : Delece

- ztráta části chromosomu, často postiženy nádorové-supresorové geny nebo geny pro stimulační a růstové faktory
- LOH-ztráta heterozygotnosti v důsledku delece genu
- u hematologických malignit specifické změny



Onkogenetika

Ztráta části chromosomu je častou příčinou různých typů solidních nádorů - příklady delecí



neuroblastom

melanom

plicní karcinom

Wilmsův
tumor

testikulární
tumor

Příklady delecí

del 5q

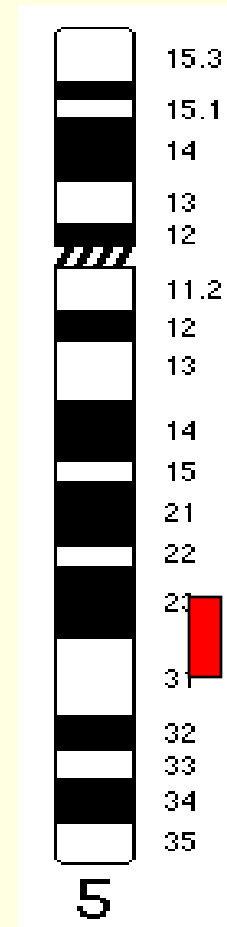
- u AML a MDS, delece je intersticiální, rozsah velmi variabilní, vždy je postižen pruh 5q31-kritická oblast, v oblasti zmapováno více genů řídících normální hemopoézu, předpokládá se přítomnost nádorového- supresorového genu

del 11q23

- u AML a ALL, v oblasti 11q23 mapován MLL gen, mimo delecí zúčastněn v početných translokacích (6q27, 9p21, 10p15, 17q11, 19p13)

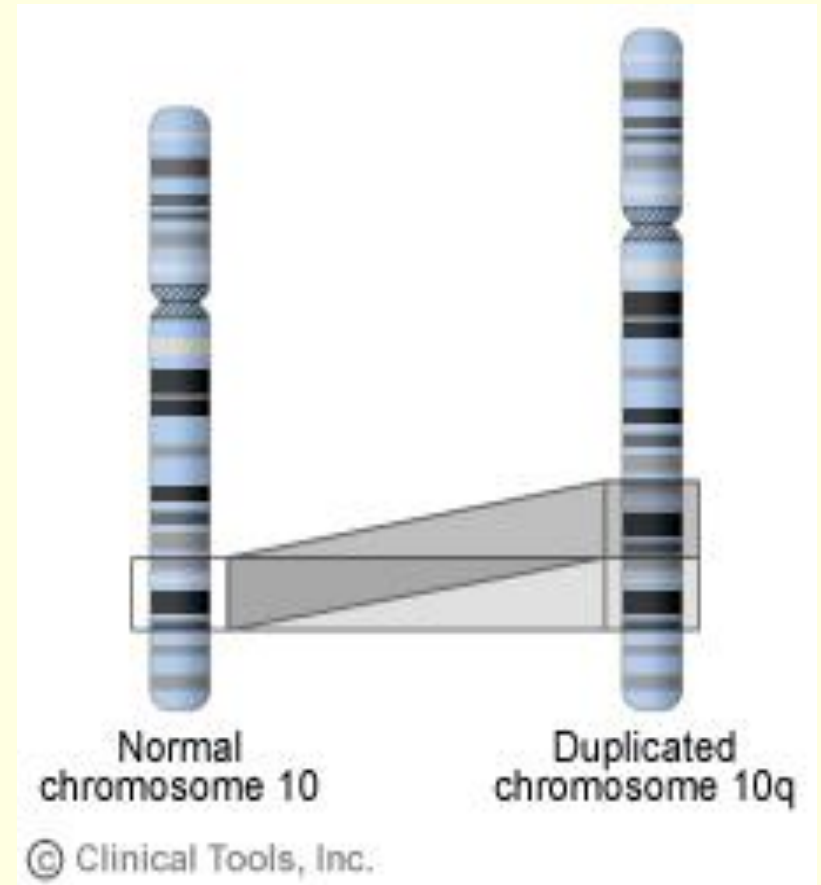
monozomie

- ztráta celých chromosomů, změny jsou spíše sekundární, častá monosomie 5, 7 u MDS

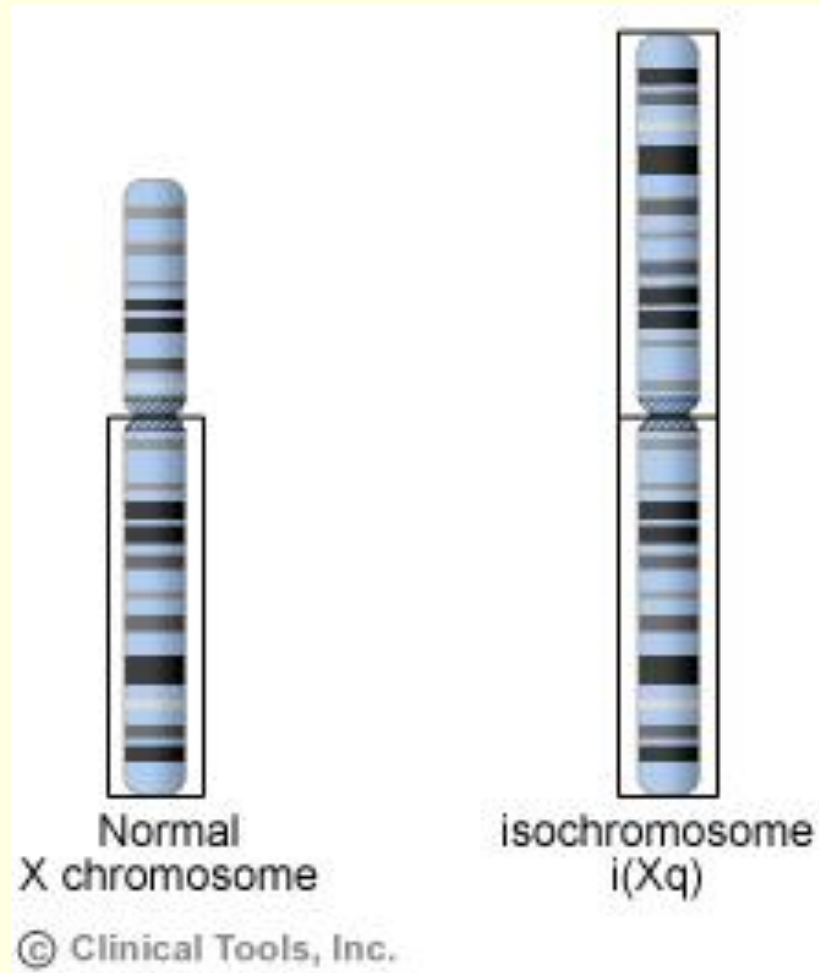
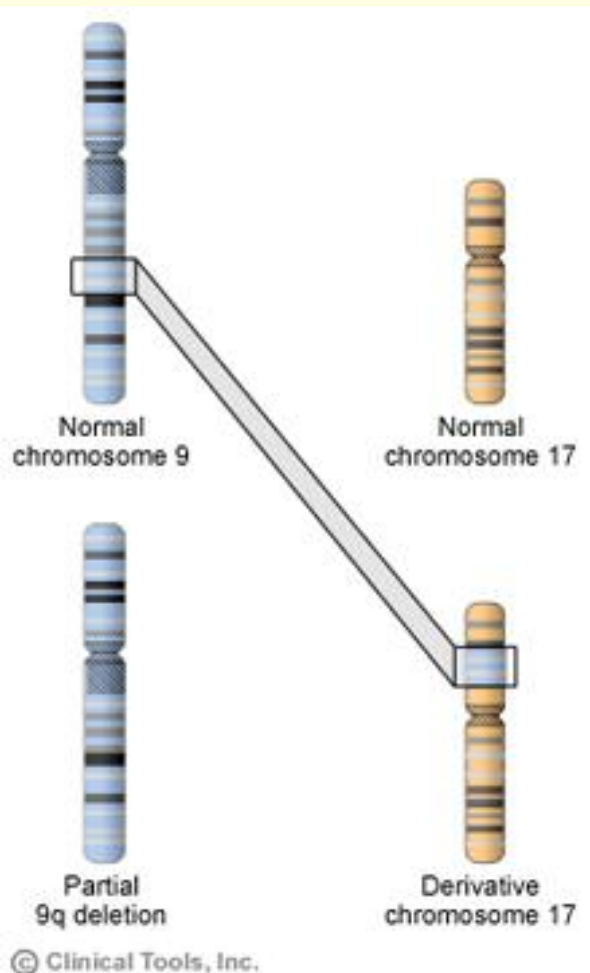


Strukturní CHA : Duplikace

- celé chromosomy nebo jejich části
- časté sekundární změny v nádorových buňkách
- zmnožení genové dávky
- Stav a progrese nádorového onemocnění
- u leukémií časté +8, u CLL specifická +12, další Ph



Strukturní CHA : Inerce a Izochromosom

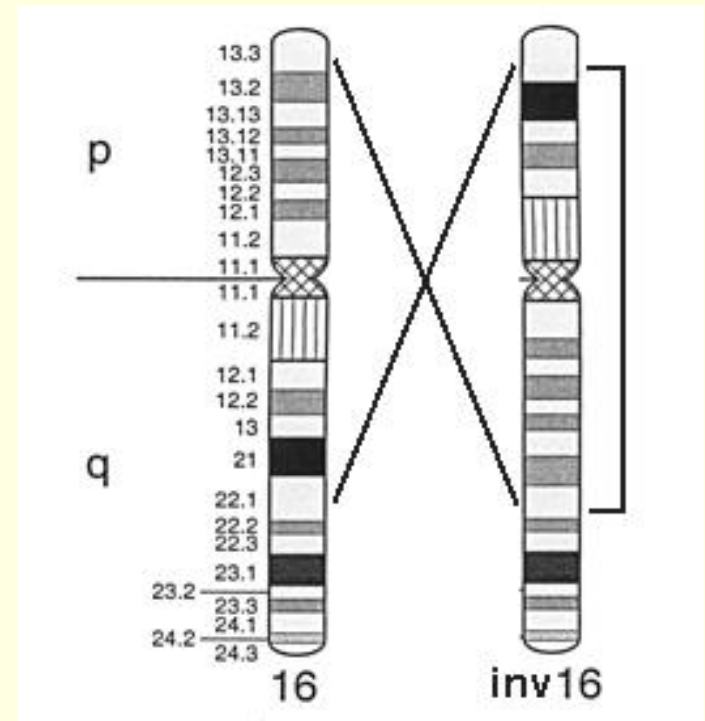
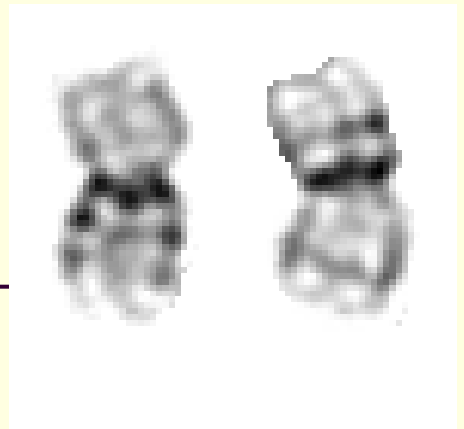


Strukturní CHA : Inverze

AML-M4eo

inv(16), t(16;16)

- fúzní gen CBF/MYH11
- asi 50% má přídatné změny 7q-, +8, +21
- spojená s dobrou prognózou
- detekce FISH pomocí specifické sondy



Translokace : Důsledky jednotlivých chromosomových aberací v procesu karcinogeneze

- v místech zlomů identifikovány geny přímo zúčastněné v nádorovém procesu

dva principiální důsledky translokací a inverzí:

- místo zlomu uvnitř genů na každém chromosomu, přeskupením se vytvoří fúzní gen, kódující chimérický protein, zapojený do maligního procesu
- deregulace exprese genu (aktivace protoonkogenu) translokací do oblasti silného promotoru (gen pro T-cell receptor nebo imunoglobulinový protein)

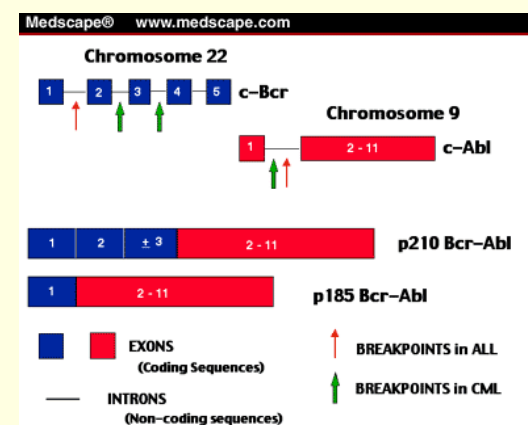
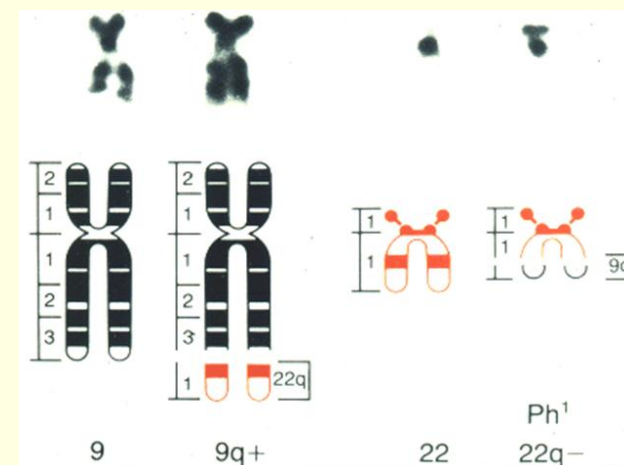
Onkogenetika

Důsledky chromosomových aberací v procesu karcinogeneze;

Translokace spojené se vznikem **chimerického proteinu**

t(9;22)

- u CML, vzniká Ph chromozom
 - na chromosomu 9q34 je lokalizován buněčný protoonkogen **ABL**, na chromozómu 22q11 **BCR** gen, při translokaci vzájemná výměna částí obou chromozomů
 - na chromosomu 22 se vytvoří fúzní gen **BCR/ABL**, který kóduje hybridní protein p210, který je iniciátorem maligního procesu
- ## t(15;17)
- AML M3, fúzní protein **PML/RARA** je pravděpodobně cílovým proteinem při terapii trans retinovou kyselinou,
 - přímý vztah léčby genetického defektu a maligního onemocnění



+ (9;22)

abl

bcr/abl

abl

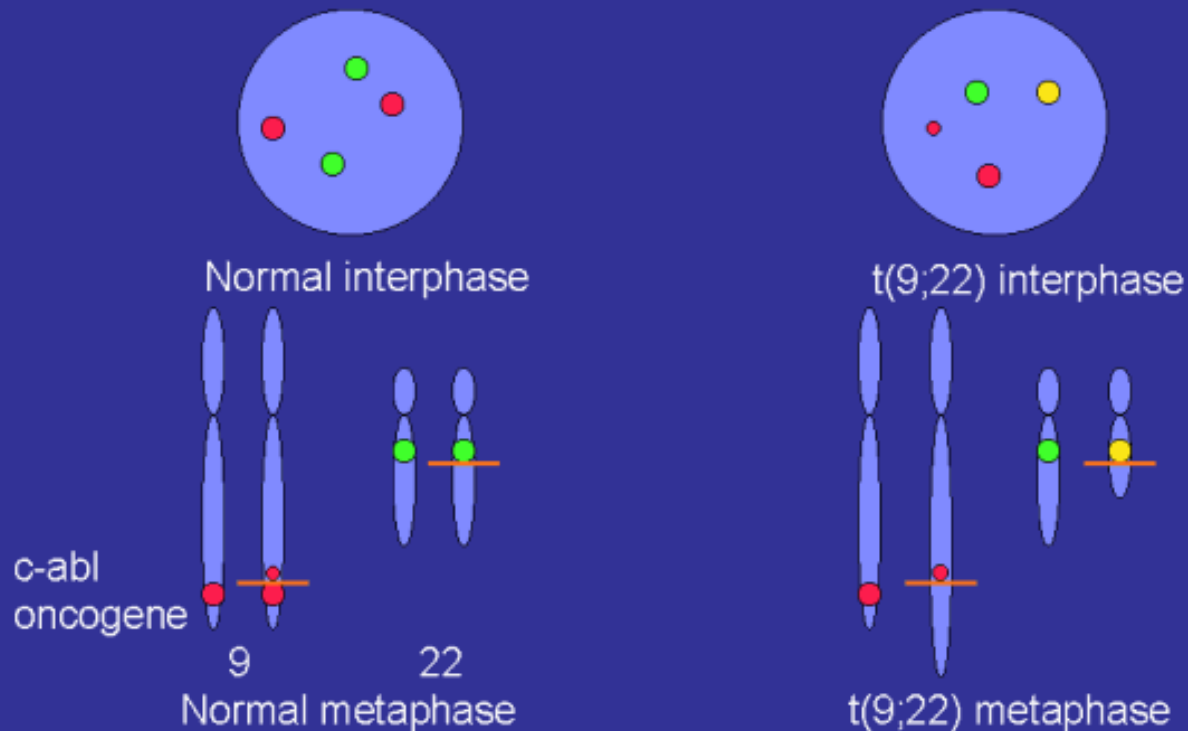
bcr

Philadelphský chromosom

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

Two colour (ES) FISH for CML

Larger probe – spanning the breakpoint



Onkogenetika

Důsledky chromosomových aberací v procesu karcinogeneze;

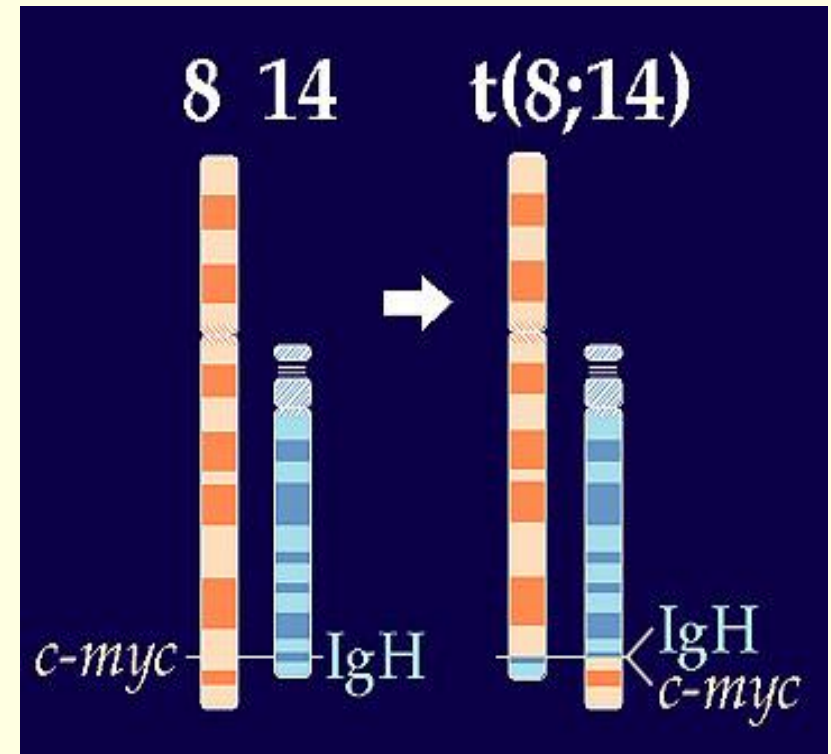
Translokace spojené s **aktivací protoonkogenů**

t(8;14)

- u ALL a lymfomů
- c-MYC onkogen z 8q24 přesunut do oblasti genu pro těžký řetězec imunoglobulinu na 14q32
- přemístěním dochází k deregulaci exprese c-MYC protoonkogenu
- deregulace spouští proces karcinogeneze

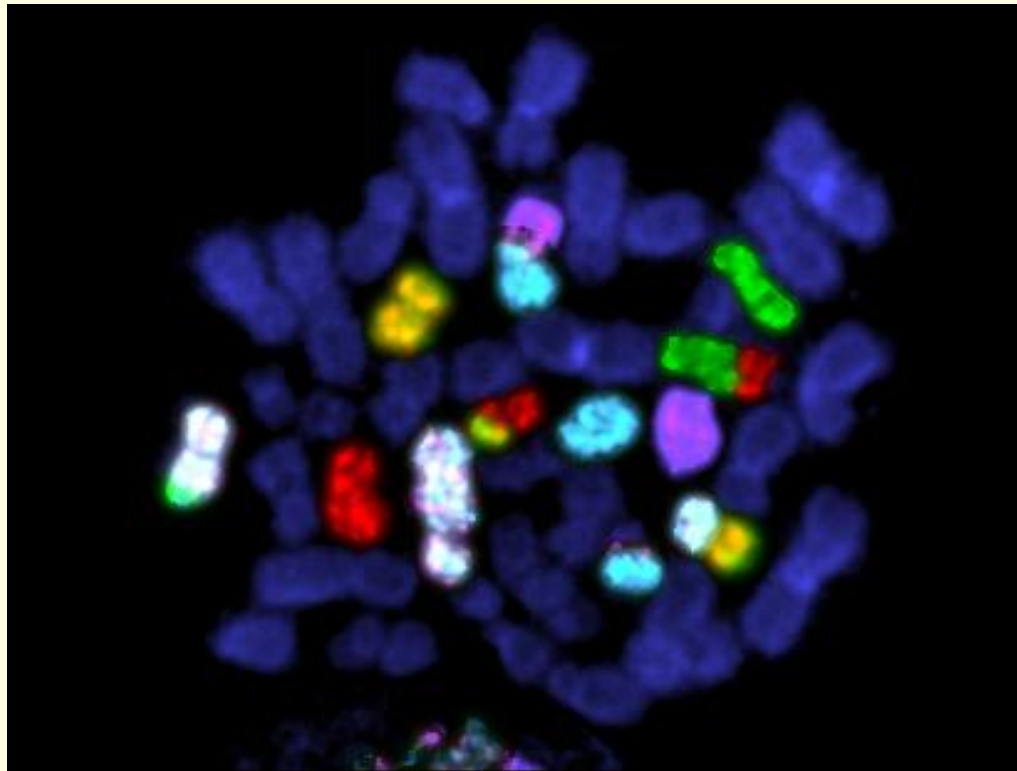
t(2;8), t(8;22)

- variantní translokace s místem zlomu v c-MYC genu



Komplexní aberace

Komplexní karyotyp – detegujeme numerické či početní změny zahrnující tři a více chromosomů nebo strukturní změny, při kterých dochází ke třem a více zlomům



Doporučená literatura

Snustad, Peter, D.: Genetika, Masarykova Univerzita, 2009

Kuglík, Petr : Základy molekulární cytogenetiky člověka; elektronická skripta,
<http://www.sci.muni.cz/UEB/OGMB/Cytogenlab.html>

Thompson & Thompson : Klinická genetika, Praha : Triton, 2004