



Zastosowanie metod cytogenetycznych w diagnostyce zaburzeń wieku rozwojowego

Barbara Wiśniowiecka-Kowalnik
Zakład Genetyki Medycznej IMiD

**KURS: Choroby genetyczne wieku rozwojowego – możliwości diagnostyczne w erze badań
genomowych**



Fundusze
Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita
Polska



Instytut
Matki i Dziecka

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



edu-metgen.imid.med.pl

CYTOGENETYKA

Dział genetyki zajmujący się badaniem chromosomów.
Koncentruje się zarówno na kształcie jak i liczbie chromosomów
oraz na ich dziedziczeniu.

- ✓ **cytogenetyka klasyczna** – opiera się na analizie liczby i morfologii chromosomów zatrzymanych w stadium metafazy
- ✓ **cytogenetyka molekularna** – łączy metody cytogenetyki klasycznej z metodami biologii molekularnej

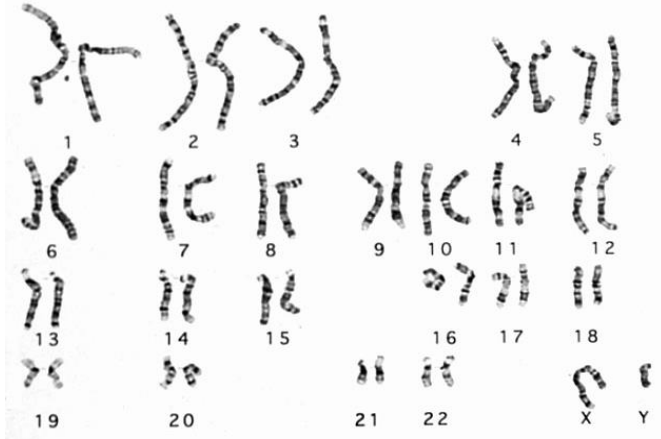


DIAGNOSTYKA ZABURZEŃ WIEKU ROZWOJOWEGO

- ✓ kariotyp klasyczny
- ✓ FISH (fluorescent in situ hybridization)
- ✓ aCGH (array Comparative Genomic Hybridization)
- ✓ MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)



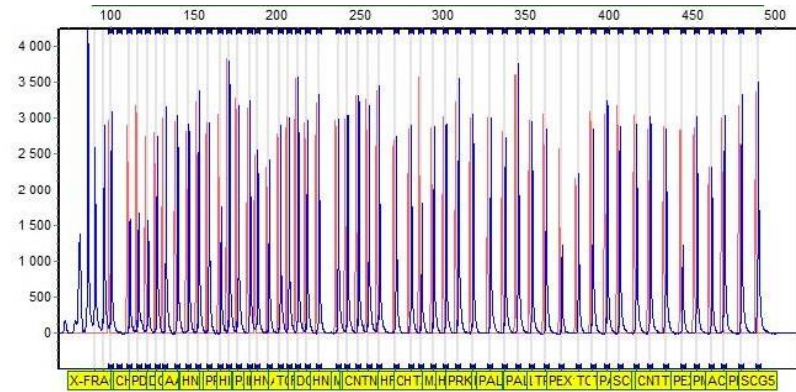
ROZDZIELCZOŚĆ STOSOWANYCH METOD



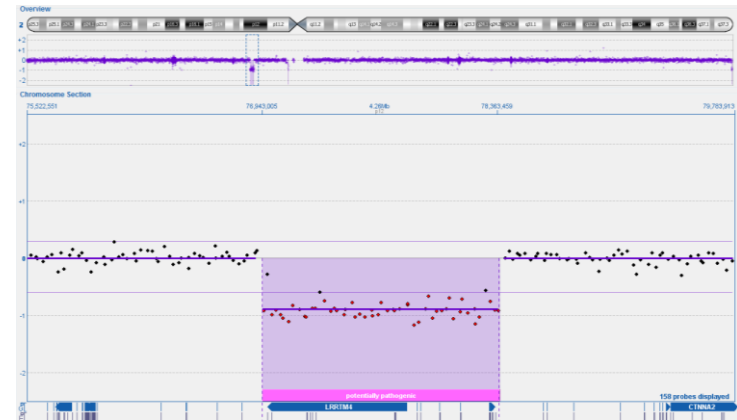
Karyotyp ≥ 5 Mpz



FISH > 100 kpz



MLPA 40-60 pz



aCGH > 1 kpz (śr. 3-100 kpz)

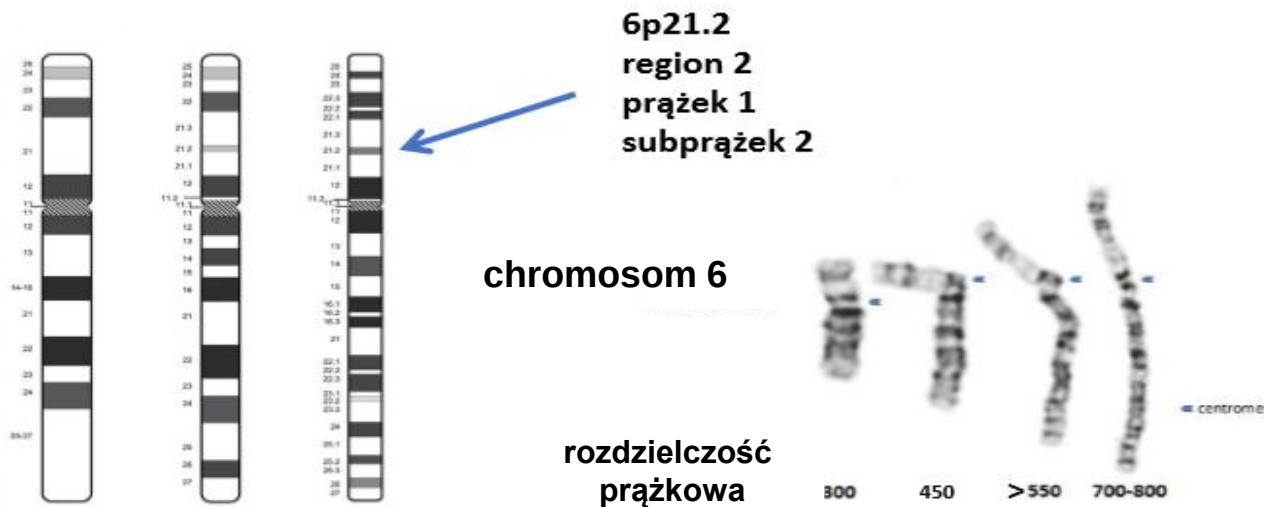
KARIOTYP

- ✓ Badanie poprzedzone jest hodowlą komórkową (znaczenie jakości, ilości oraz warunków i czasu transportu materiału)
- ✓ Utrwalone chromosomy barwione są z zastosowaniem techniki prążkowej GTG
- ✓ Każdy chromosom ma specyficzny dla siebie wzór prążkowy czyli układ poprzecznych prążków, różniących się wielkością i intensywnością zabarwienia
- ✓ Wzór prążkowy chromosomów jest stały i specyficzny gatunkowo

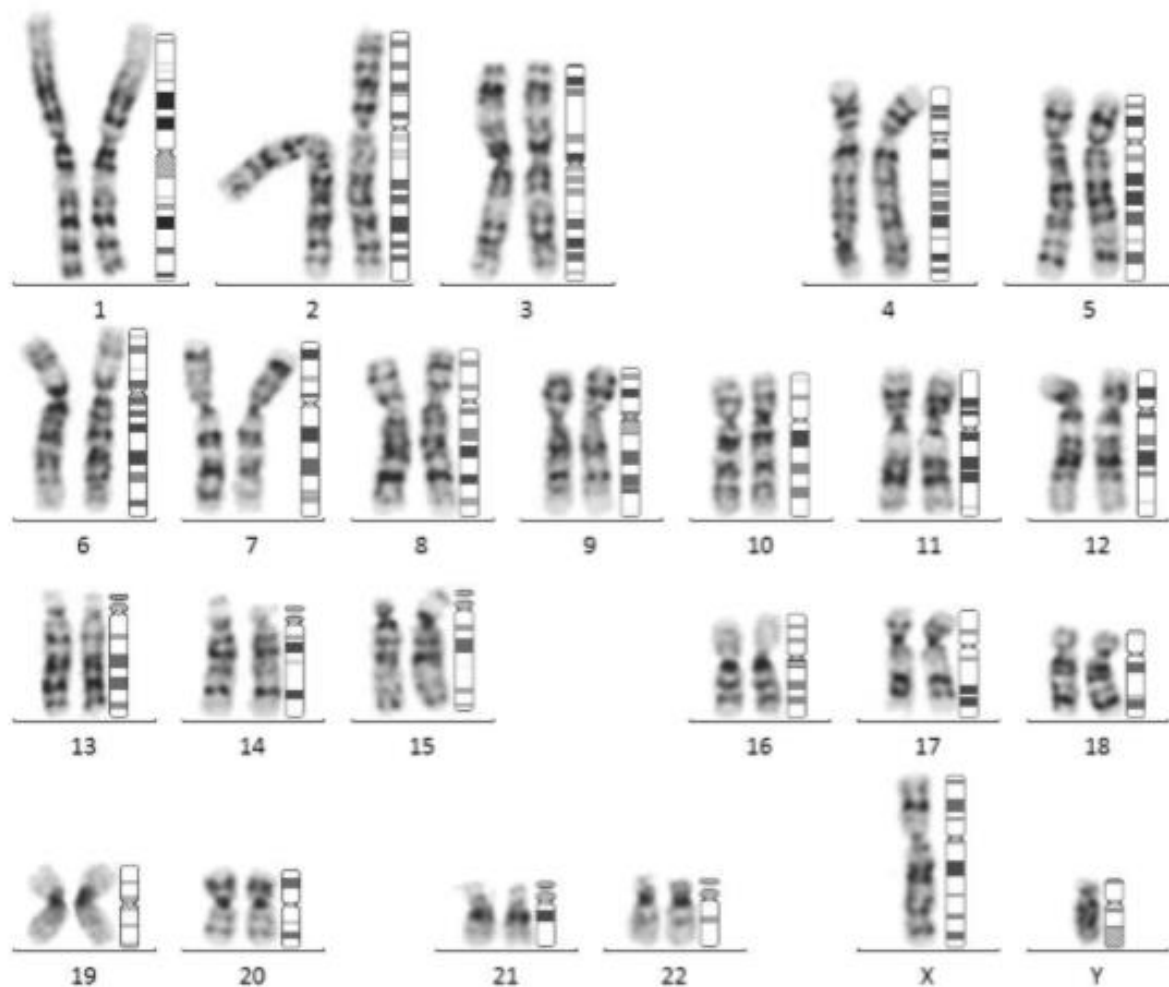


ZASADY ANALIZY PRAŻKOWEJ

- ✓ Każda para chromosomów musi być przeanalizowana co najmniej dwukrotnie przy zalecanej rozdzielczości na podstawie wzorców z ISCN
- ✓ Ponadto należy określić liczbę chromosomów oraz zidentyfikować chromosomy płci i akrocentryczne
- ✓ W przypadku znalezienia aberracji strukturalnej lub numerycznej należy przeanalizować przynajmniej 30 komórek

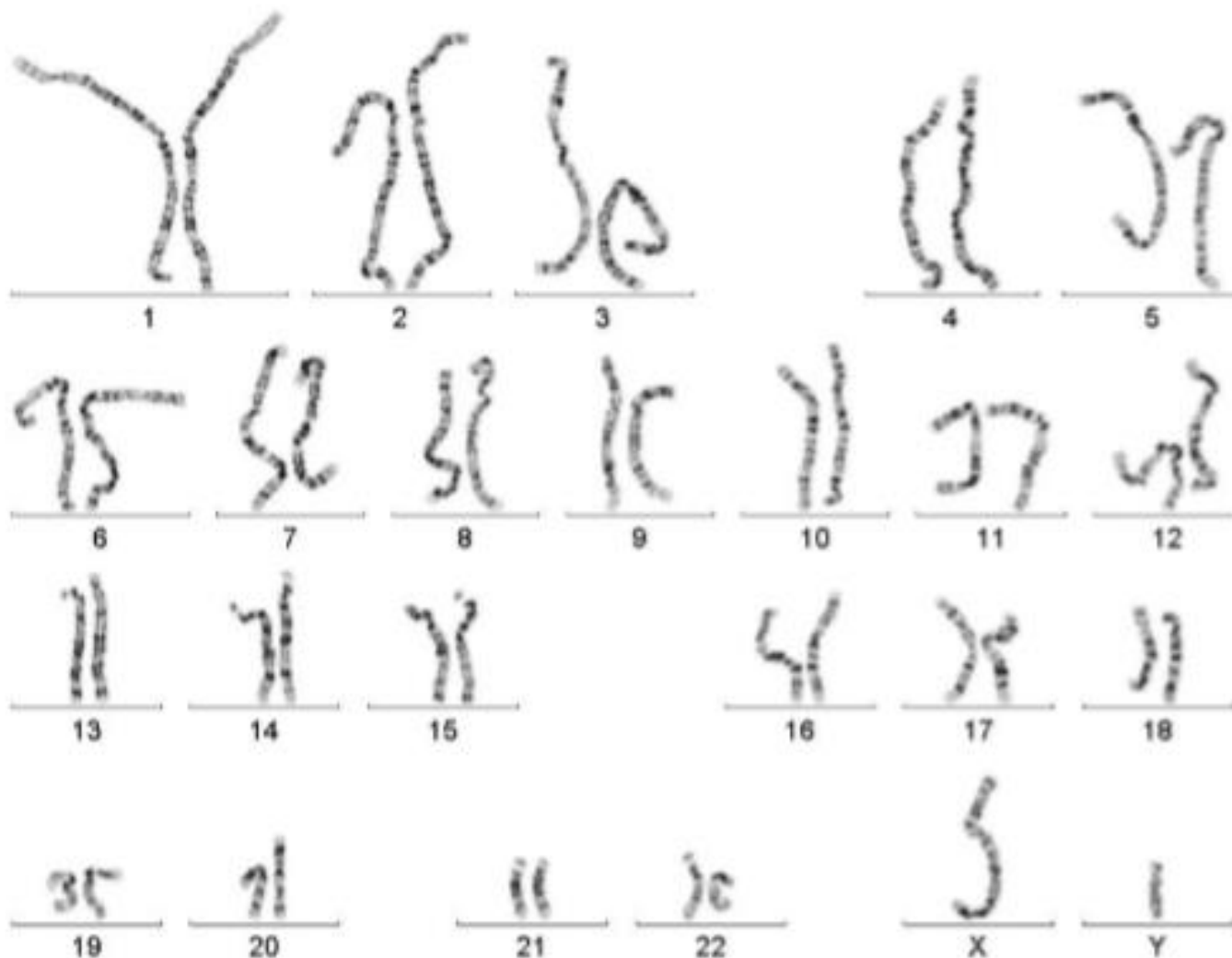


Prawidłowy kariotyp męski, rozdzielczość 450 prążków



Czułość badania zależy od długości i wyprężkowania uzyskanych chromosomów

Prawidłowy kariotyp męski, rozdzielczość 750 prążków



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita
Polska



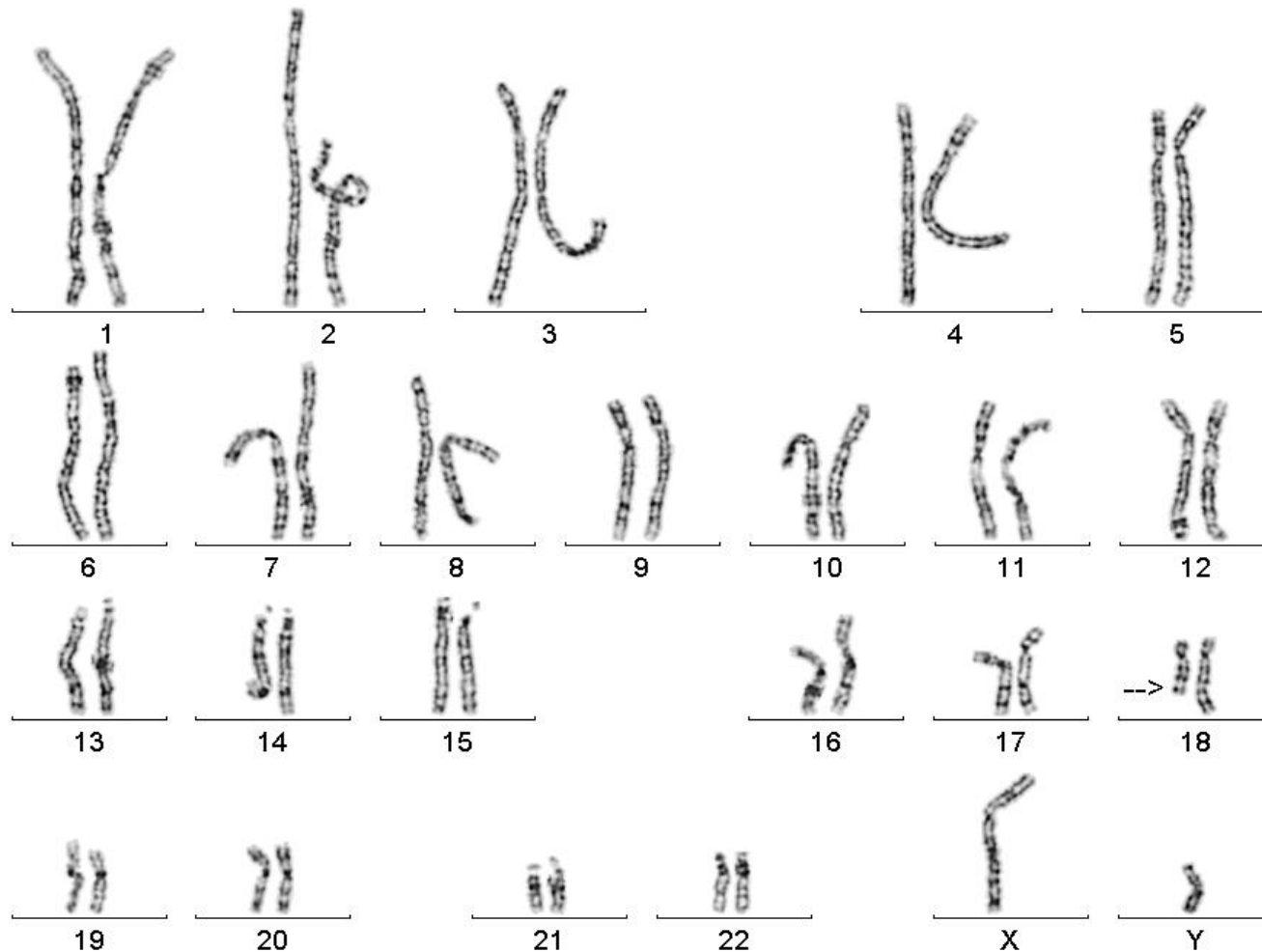
Instytut
Matki i Dziecka

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



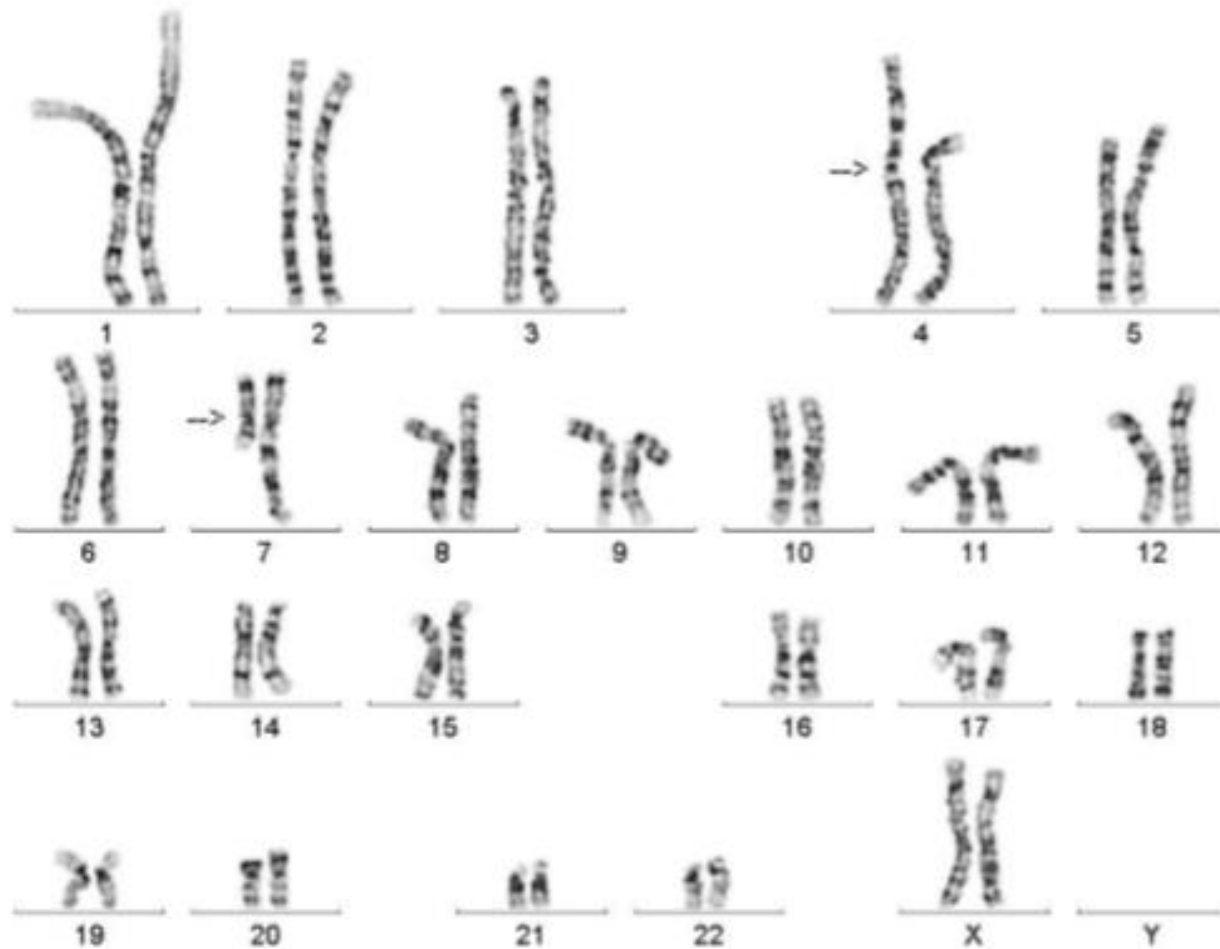
edu-metgen.imid.med.pl

CO MOŻEMY ZOBACZYĆ W KARIOTYPIE



Delecja w obrębie długiego ramienia chromosomu 18 pary, 46,XY,del(18)(q21.3)

CO MOŻEMY ZOBACZYĆ W KARIOTYPIE



Translokacja wzajemna zrównoważona, 46,XX,t(4;7)(p15.2;q11.2)



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita
Polska



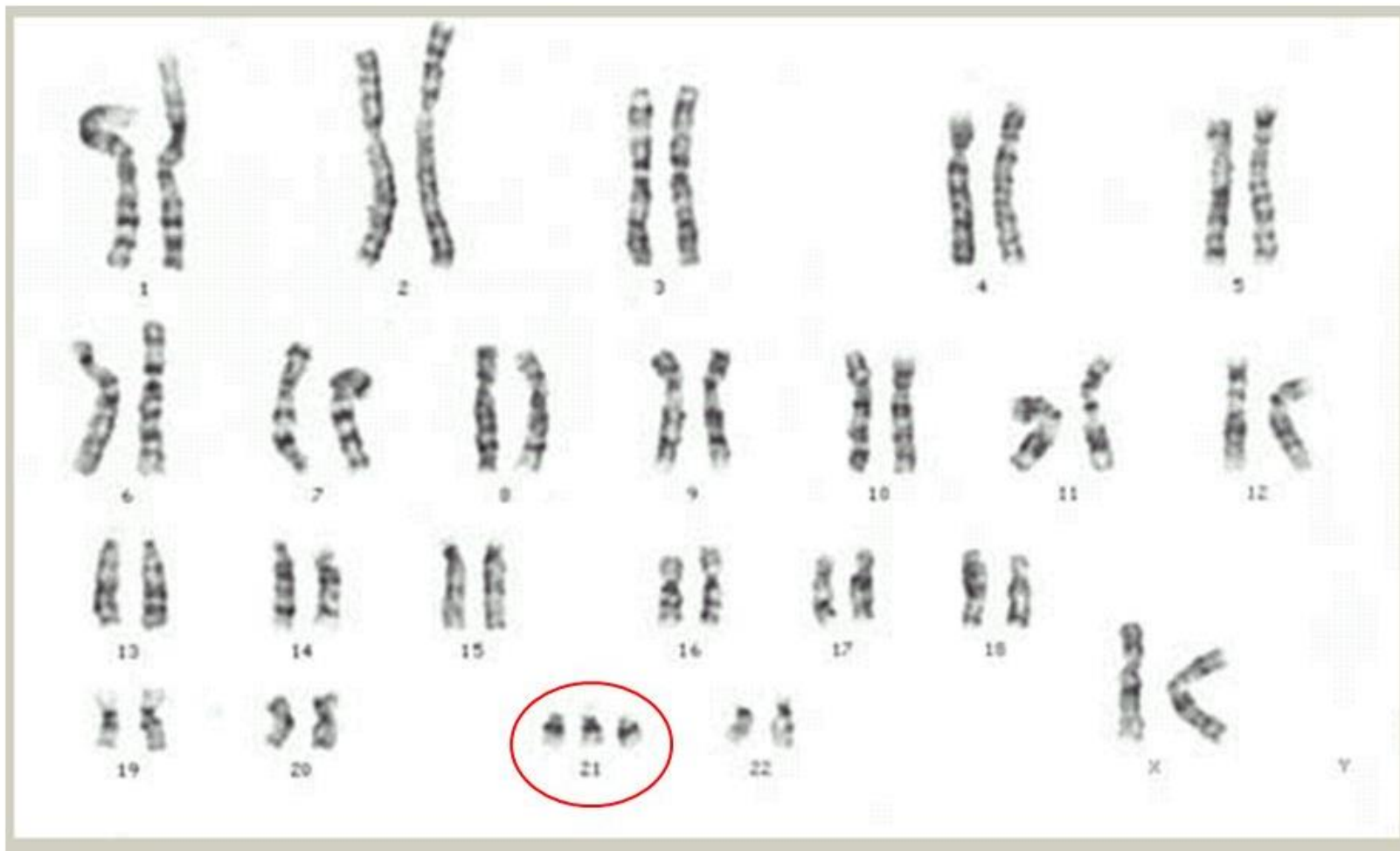
Instytut
Matki i Dziecka

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



edu-metgen.imid.med.pl

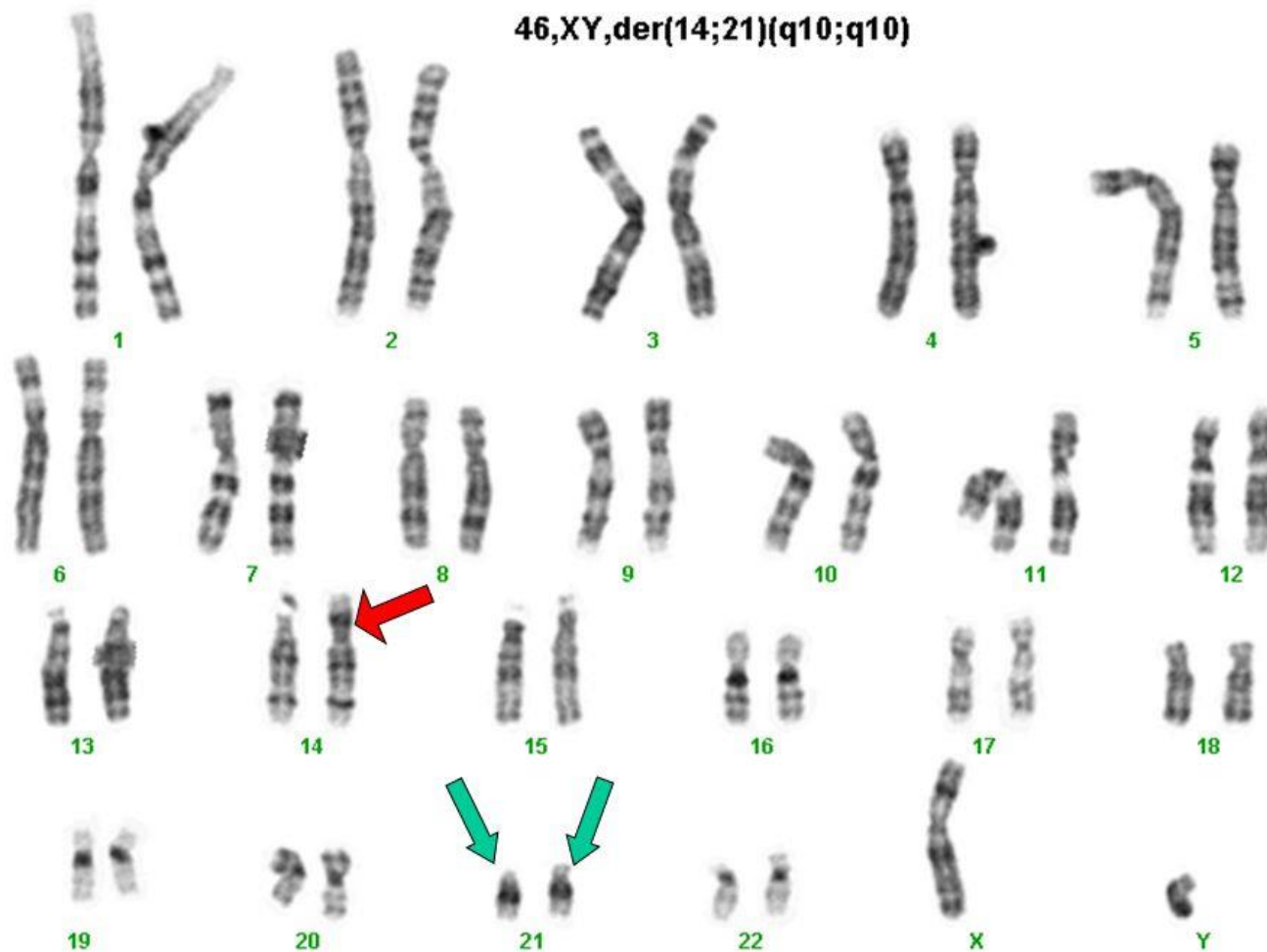
CO MOŻEMY ZOBACZYĆ W KARIOTYPIE



Trisomia chromosomu 21



CO MOŻEMY ZOBACZYĆ W KARIOTYPIE



Trisomia chromosomu 21



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita
Polska



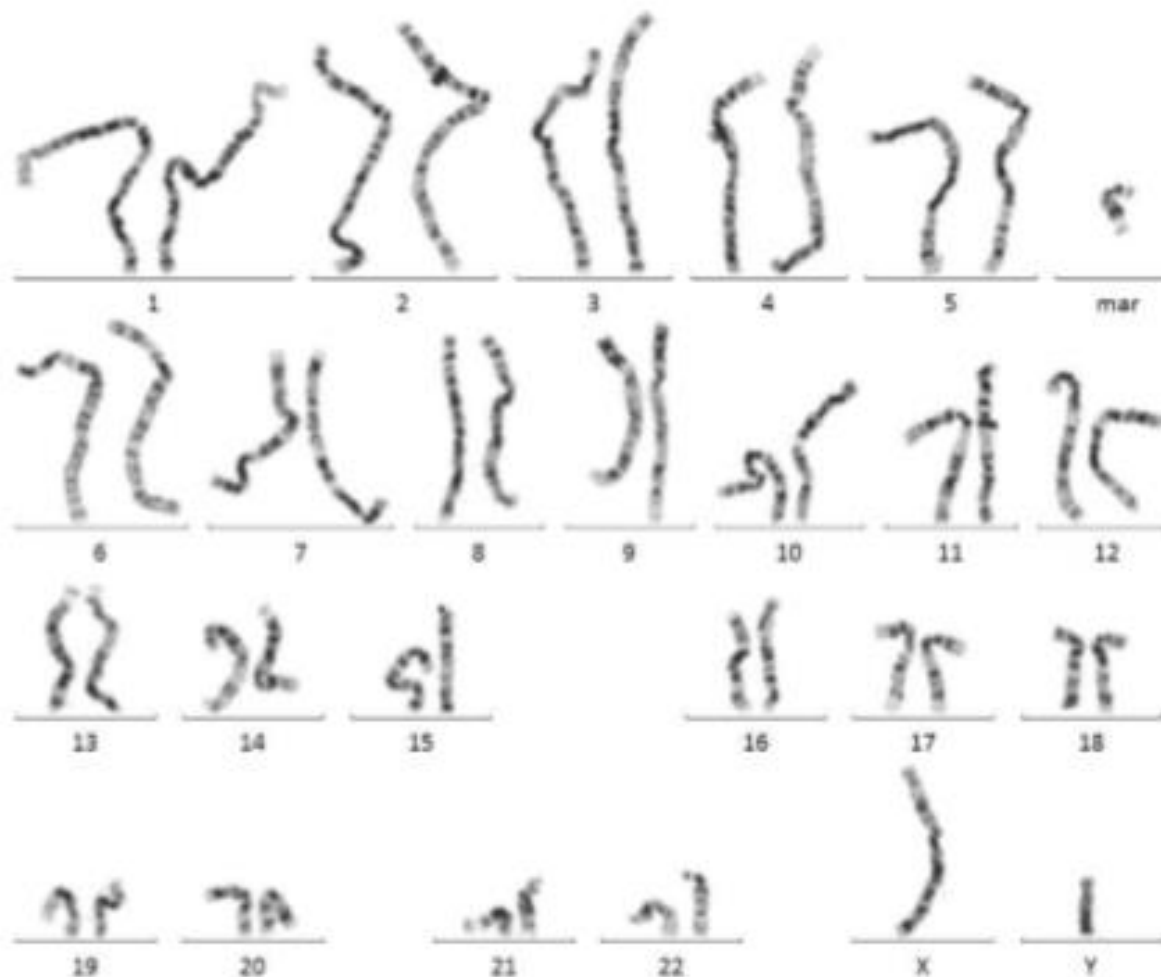
Instytut
Matki i Dziecka

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



edu-metgen.imid.med.pl

CO MOŻEMY ZOBACZYĆ W KARIOTYPIE



47,XY,+ mar



Fundusze
Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita
Polska



Instytut
Matki i Dziecka

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



edu-metgen.imid.med.pl

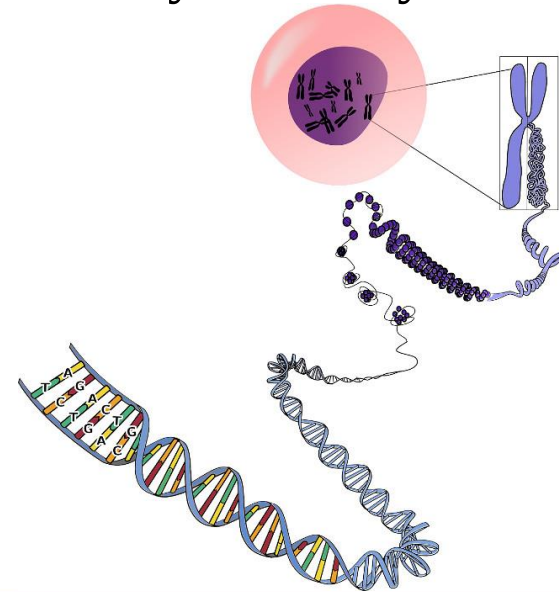
KARIOTYP – WADY I ZALETY

Zalety kariotypu

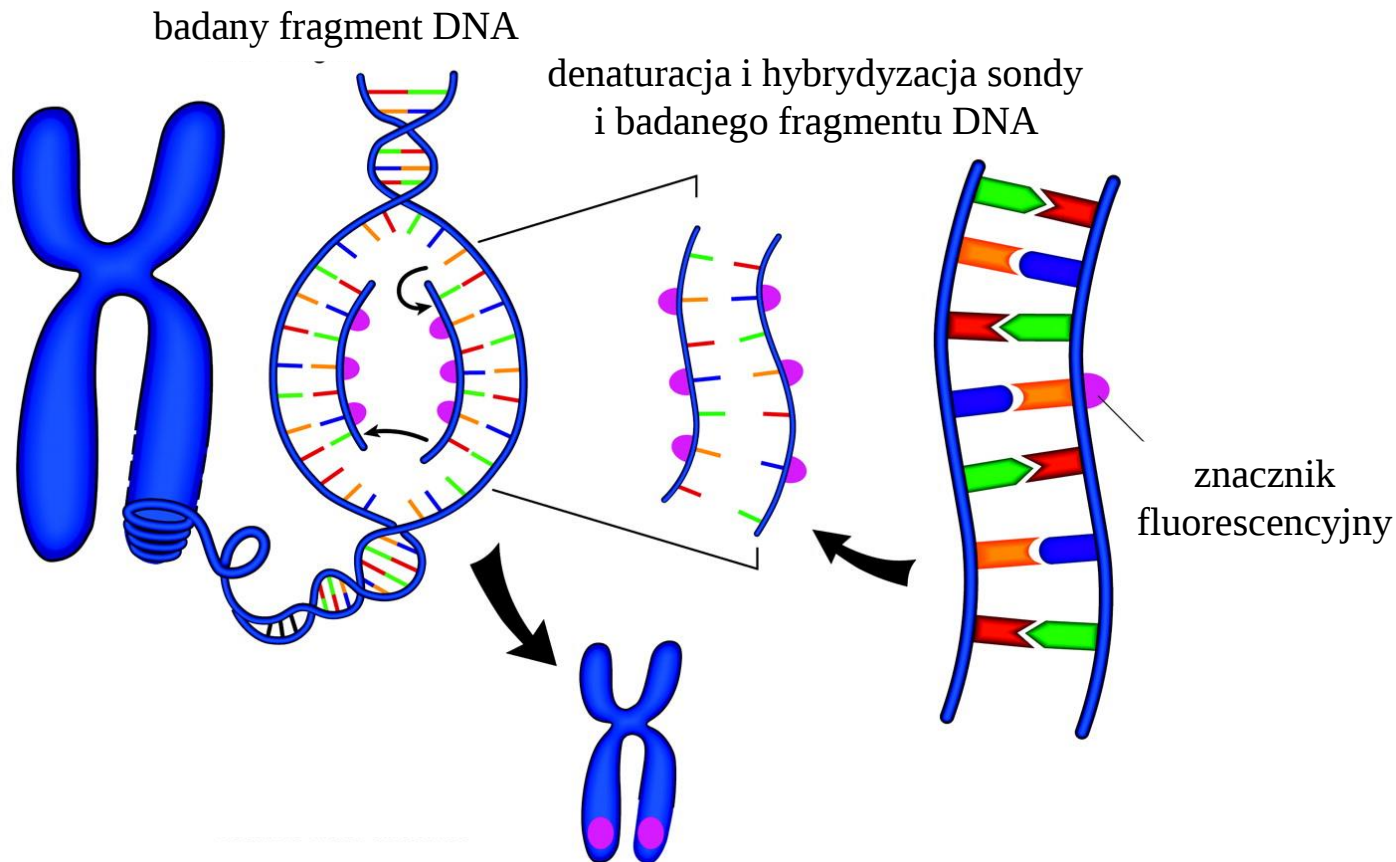
- ✓ Dotyczy wszystkich chromosomów → możliwość wykrycia rzadkich aberracji chromosomowych
- ✓ Umożliwia wykrycie:
 - aberracji zrównoważonych (translokacje, inwersje, insercje)
 - fuzji robertsonowskich
 - niskoprocentowego mozaicyzmu
 - markerów

Ograniczenia kariotypu

- ✓ Niska rozdzielczość (czułość) badania
- ✓ Długi czas od pobrania materiału do otrzymania wyniku



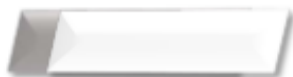
FISH



Metoda FISH umożliwia identyfikację specyficznych sekwencji DNA w chromosomach metafazowych lub jądrach interfazowych znajdujących się w preparatach cytologicznych

FISH – ETAPY BADANIA

1) Przygotowanie preparatu



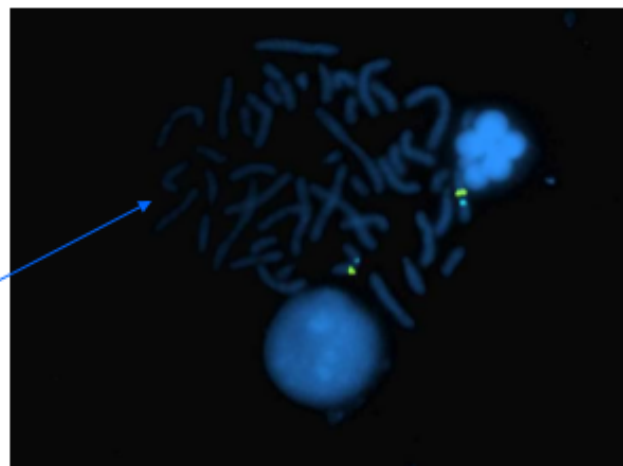
2) Wyznakowana sonda jest nakrapiana na szkiełko



3) Sonda i preparat są denaturowane co umożliwia przyłączenie się sondy do chromosomów pacjenta



4) Chromosomy są uwidocznione dzięki DAPI (Vectashield)



5) Mikroskop fluorescencyjny



RODZAJE SOND MOLEKULARNYCH

a



sondy
specyficzne
do unikalnych
sekwencji
DNA

b



sondy
centromerowe

c



sondy
subtelomerowe

d



sondy malujące

sondy specyficzne do
powtarzalnych sekwencji DNA

Expert Reviews in Molecular Medicine © 2000 Cambridge University Press

JAK ZROBIĆ WŁASNE SONDY FISH

✓ Wybrać właściwe DNA

• Szukanie klonów BAC

www.genome.ucsc.edu

<http://www.ensembl.org/index.html>

• Dostawcy klonów BAC

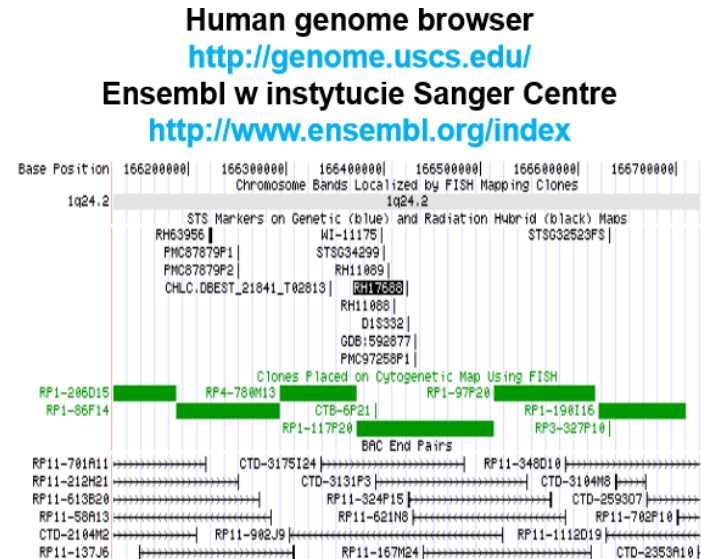
<https://bacpacresources.org>

<http://clones.thermofisher.com/cloneranger.php>

www.sanger.ac.uk/teams/teams63/clonerequest

✓ Hodowla i przygotowanie DNA

✓ Znakowanie DNA



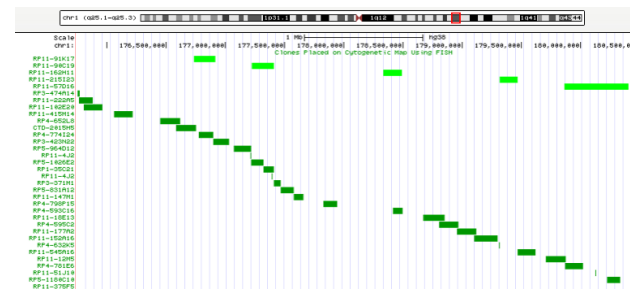
PRZYGOTOWANIE SOND

Pacjent z wykrytą aberracją – brak sond komercyjnych

Identyfikacja regionu określonego przy pomocy innej techniki



Zamówienie DNA



Hodowla bakteryjna

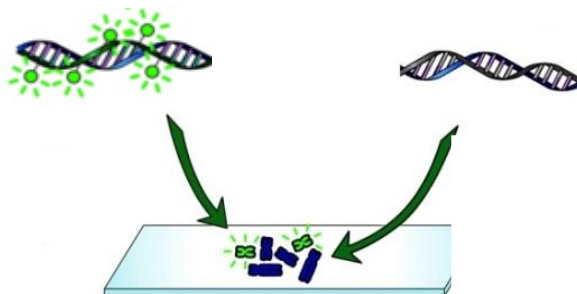


Izolacja DNA

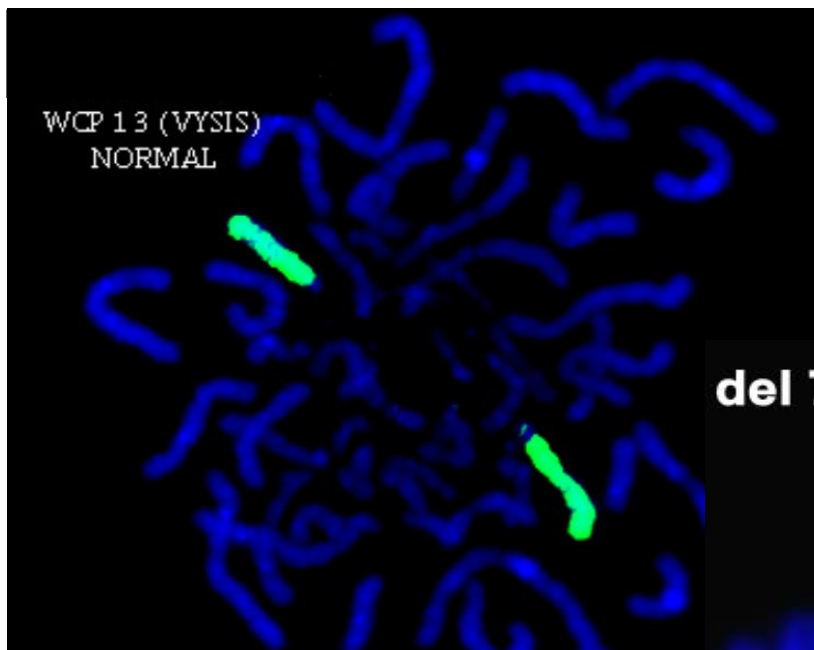
Znakowanie

Hybrydyzacja

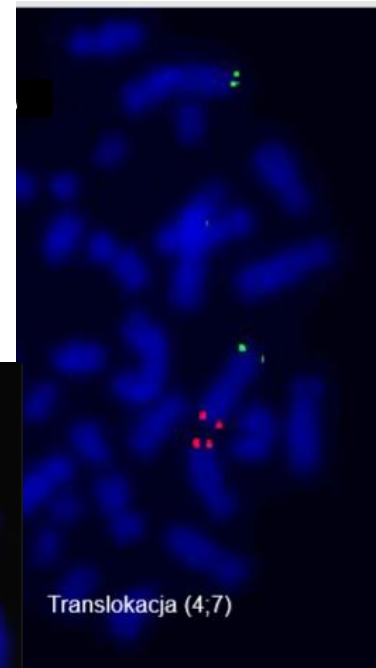
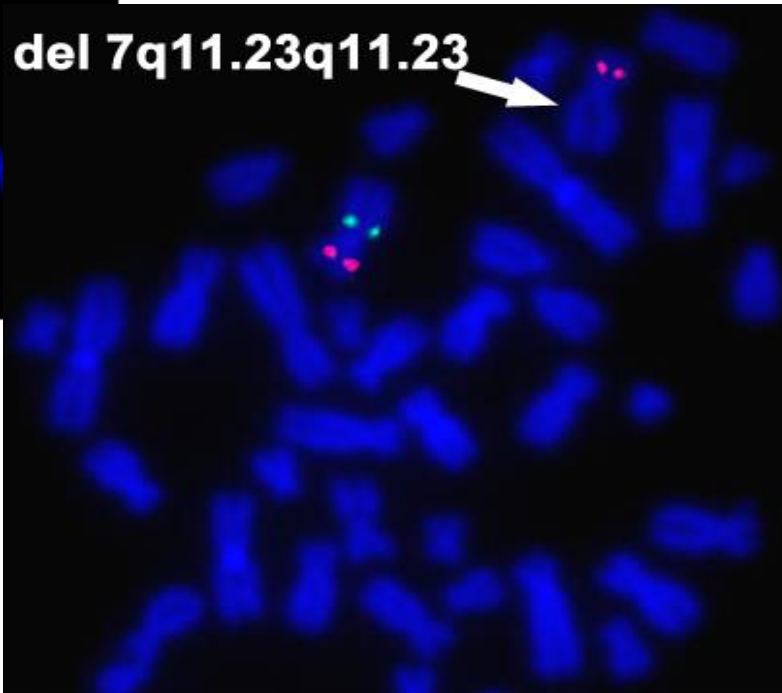
Wynik



FISH



Sonda malująca WCP 13
(VYSIS)



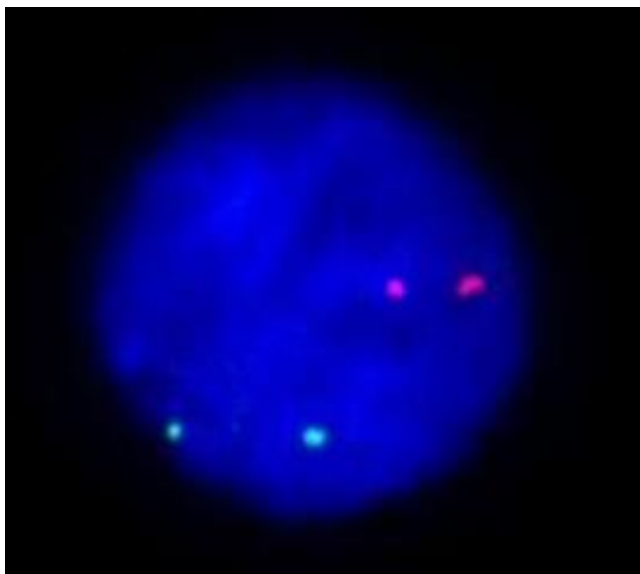
translokacja (4;7)

FISH

prawidłowa liczba sygnałów

sygnały zielone – 3p14.3

sygnały czerwone – 3q23

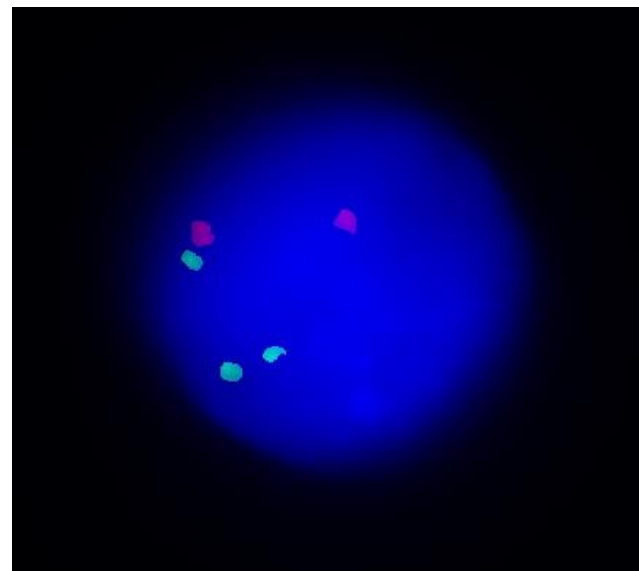


nieprawidłowa liczba sygnałów

sygnały zielone – 5q21.1

(duplikacja)

sygnały czerwone – 5p15



FISH – WADY I ZALETY

Zalety FISH

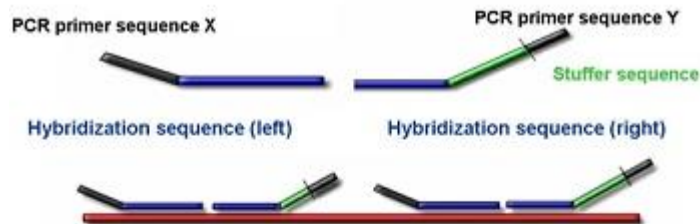
- ✓ Umożliwia wykrycie:
 - lokalizacji aberracji stwierdzonej w innym badaniu
 - aberracji zrównoważonych (translokacje, inwersje, insercje)
 - niskoprocentowego mozaicyzmu

Ograniczenia FISH

- ✓ Metoda celowana – stosowana głównie jako metoda uzupełniająca
- ✓ Metoda pracochłonna w porównaniu z innymi szybkimi metodami

METODA MLPA

1. Denaturation and Hybridization



2. Ligation

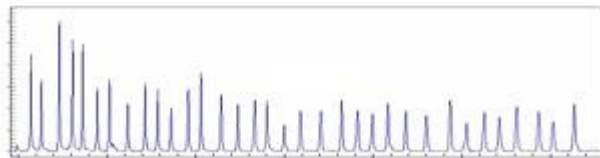


3. PCR with universal primers X and Y

exponential amplification of ligated probes only



4. Fragment analysis

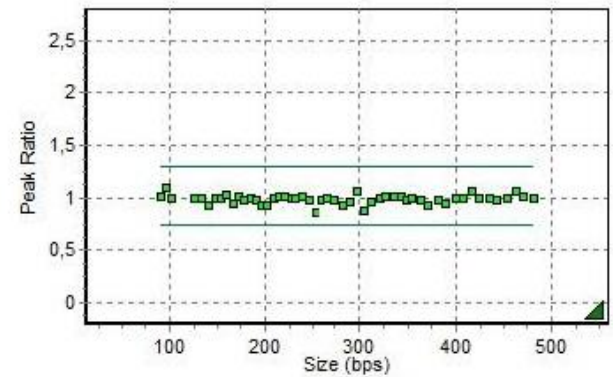


Zasada metody:

Zhybrydyzowane do DNA sondy oligonukleotydowe są łączone przez ligazę i powielane w reakcji PCR z odpowiednimi starterami. Liczba produktów takiej reakcji jest proporcjonalna do liczby kopii badanej sekwencji DNA.

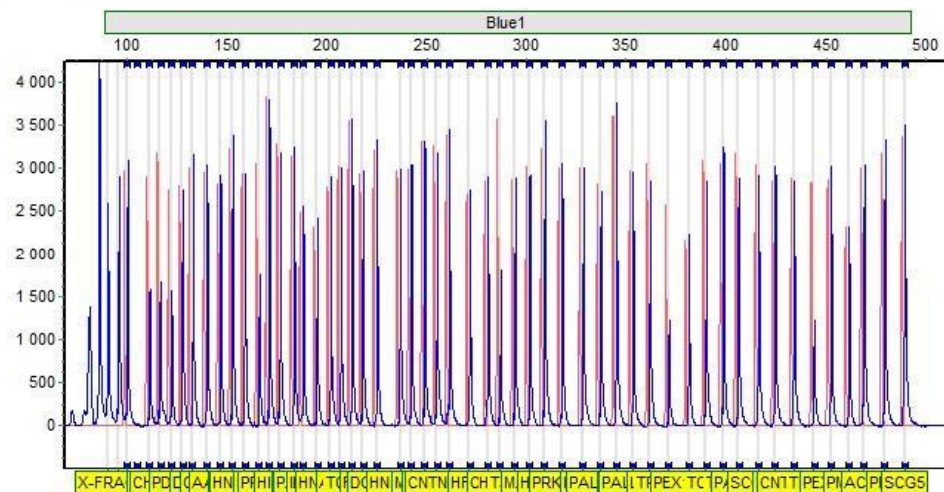
MLPA

- ✓ MLPA umożliwia jednoczesną ocenę kilkudziesięciu sekwencji jednocześnie w jednej reakcji
- ✓ Badanie trwa do 48 h
- ✓ Wartość dla próbek prawidłowych wynosi około ~ 1 co znaczy, że w próbce jest taka sama liczba kopii jak w kontroli
- ✓ Dla duplikacji wartości wynoszą $>1,30$, dla delecji wartości wynoszą $<0,7$



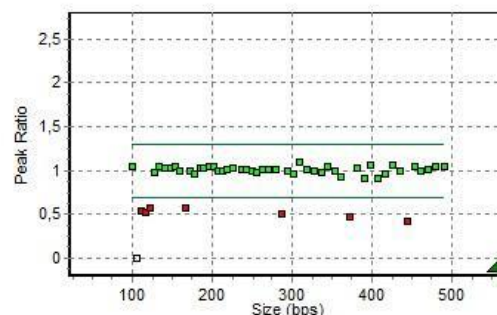
MLPA Analysis Report - SoftGenetics	
Software: GeneMarker V1.75	Analysis Type: MLPA
Project: Untitled	Compare Type: MLPA Ratio
Technician:	Normalization By: Population Normalization
Report Time: 07/31/2019 - 12:01:25	Quantification By: Peak Height
Panel: P297_C1	Classification: Loss < 0.70 <= Equivalent <= 1.30 < Gain
Control: Synthetic Control Sample	Report Value Type: Peak Ratio
Synthetic Used: gm_111144.fsa /// gm_111156.fsa /// gm_111163.fsa	

gm_111162.fsa



Sample Name: 111162
Machine: 3500 Instrument
Run Time:

Conclusion	NIEPRAWIDŁOWY	
	Date	Initial
Authorization 1		
Authorization 2		



Probe Name	Bin Size	gm_111162
1 AATF	207.4	0.995
2 AATF-1	147.3	1.034
3 ACP6	469.4	1.014
4 ASUN	153.3	1.047
5 BCL9	249.1	0.997
6 CD160	140.5	1.025
7 CHRNA7	287.7	0.505
8 CHRNA7-1	122.7	0.569
9 CNTNAP2	434.5	0.991
10 CNTNAP2-1	261.5	1.017
11 DLG1	133.0	1.050
12 DOC2A	225.3	1.037
13 FAN1	111.9	0.546
14 FAN1-2	117.2	0.525
15 FM05	218.4	1.006
16 GJA5	255.3	0.971
17 GJA8	281.4	1.017
18 HFE2	271.7	1.014
19 HIRIP3	177.0	0.970
20 HNF1B	309.6	1.103
21 HNF1B-1	236.9	1.006
22 HNF1B-2	202.2	1.041
23 HNF1B-3	159.4	1.003
24 IL21R	328.9	1.003
25 IL21R-1	195.5	1.047
26 KLF13	166.6	0.571
27 LHX1	362.4	0.938
28 MAPK3	302.2	0.962
29 MAZ	242.6	1.020
30 MVP	345.5	1.046
31 PAK2	184.0	1.031
32 PAK7	425.1	1.060
33 PAK7-1	188.4	1.029
34 PALB2	406.7	0.913
35 PALB2-1	353.8	0.990
36 PALB2-2	337.7	0.972
37 PDE4DIP	128.2	0.982
38 PEX11B	452.7	1.053
39 PEX11B-1	381.7	1.027
40 PML	479.7	1.050
41 PML-1	461.7	1.002
42 PPFIBP1	171.5	0.993
43 PRKAB2	318.3	1.020
44 SCG5	489.9	1.040
45 SCG5-1	416.7	0.958
46 TCF4	390.5	0.919
47 TCF4-1	212.7	1.003
48 TJP1	399.1	1.059
49 TJP1-1	295.0	1.002
50 TRPM1	444.5	0.431
51 TRPM1-1	371.9	0.473
52 X-FRAGMENT	100.7	1.040
53 Y-FRAGMENT	105.4	-1

zespół
mikrodelecji
15q13.3

zestaw sond mikrodelecyjnych P297



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita
Polska



Instytut
Matki i Dziecka

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



edu-metgen.imid.med.pl

MLPA – WADY I ZALETY

Zalety MLPA

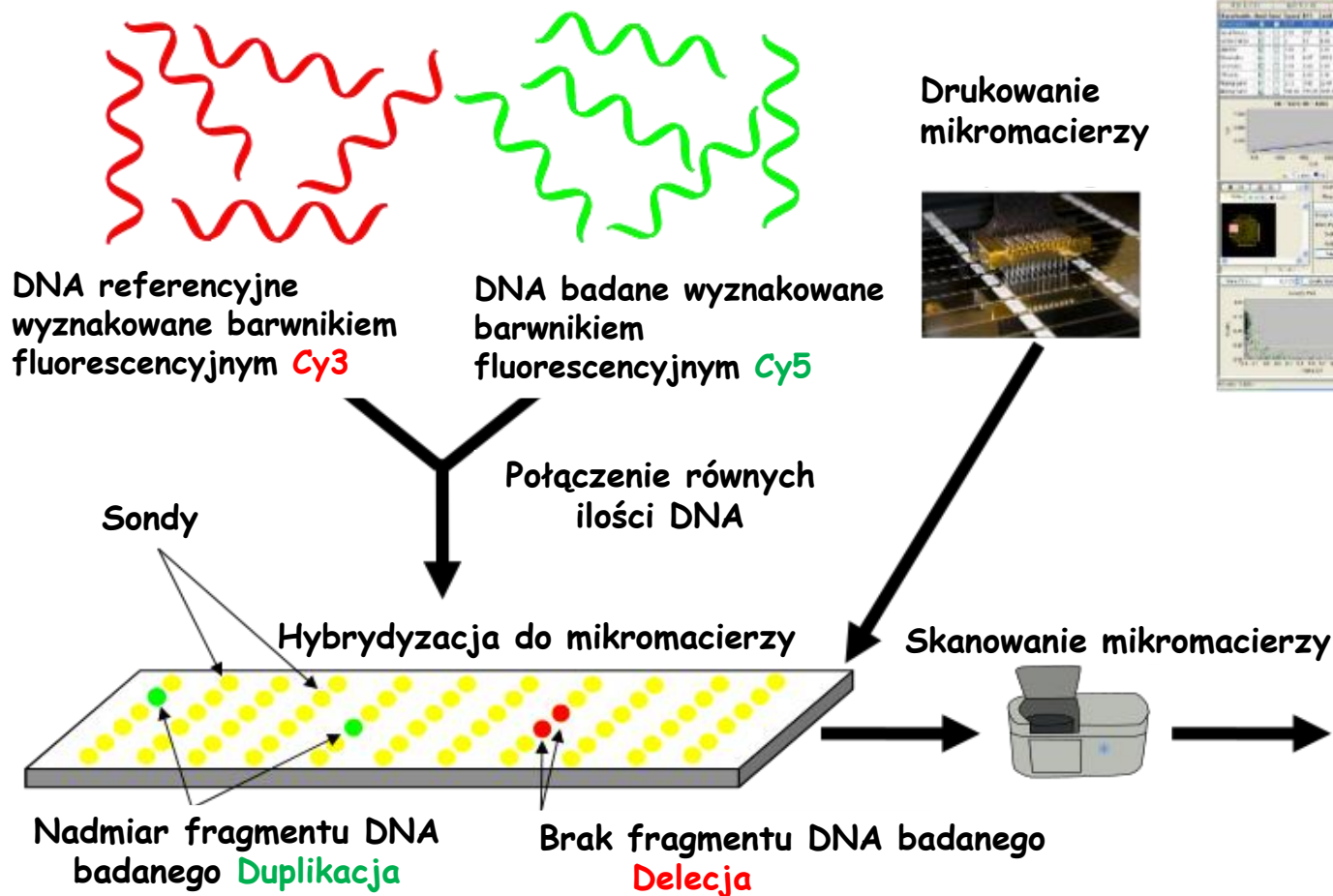
- ✓ Jednoczesna ocena kilkudziesięciu sekwencji w jednej reakcji
- ✓ Możliwość równoczesnego badania bardzo wielu pacjentów
- ✓ Niski koszt badania
- ✓ Mała ilość DNA 120-150 ng
- ✓ Krótki czas badania

Ograniczenia MLPA

- ✓ Metoda celowana
- ✓ Nie wykrywa aberracji zrównoważonych
- ✓ Nie wykrywa mozaicyzmu
- ✓ Metoda wrażliwsza niż aCGH na zanieczyszczenia i inhibitory

PORÓWNAWCZA HYBRYDYZACJA GENOMOWA DO MIKROMACIERZY

Izolacja i trawienie genomowego DNA badanego i referencyjnego



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita
Polska



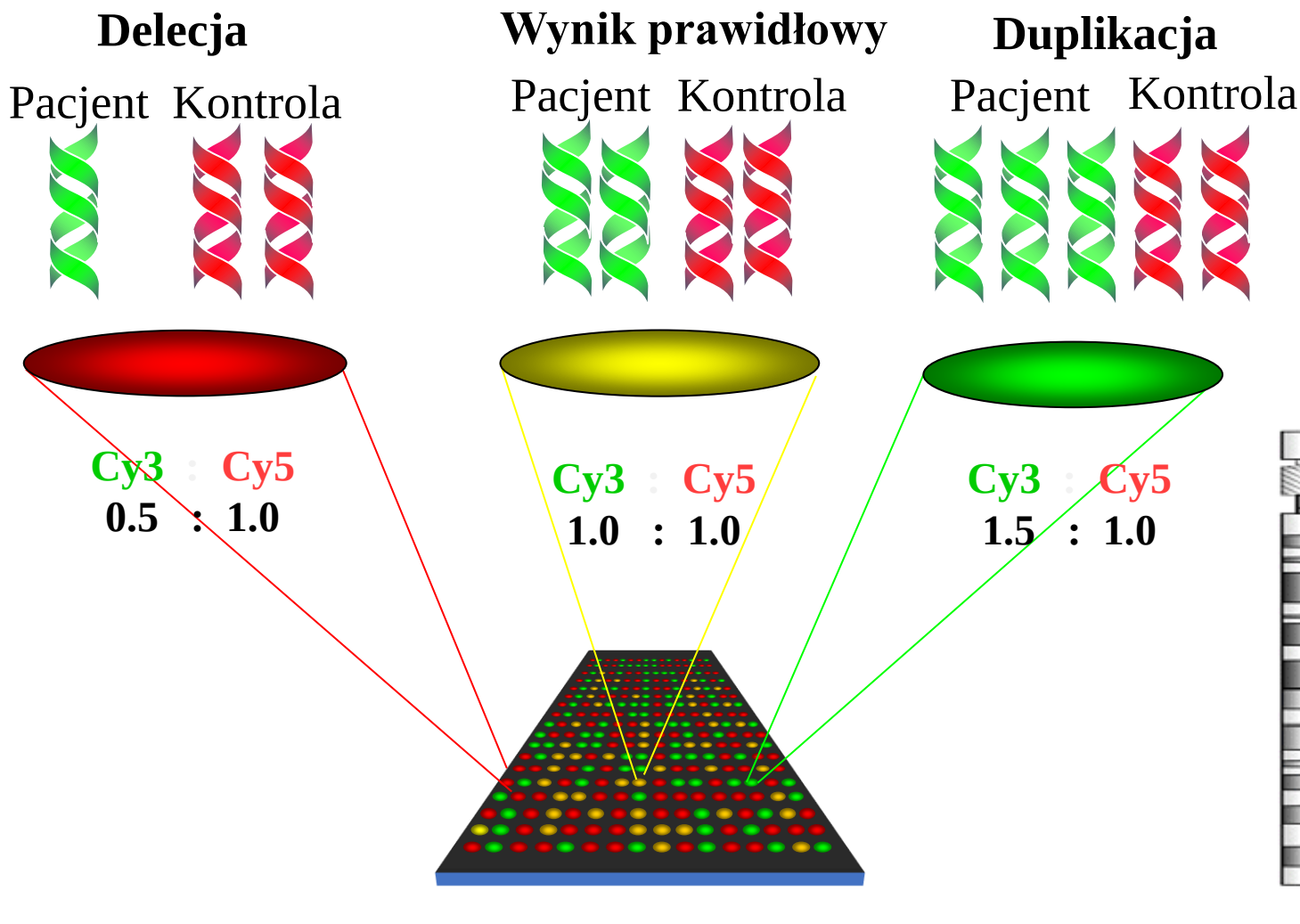
Institut
Matki i Dziecka

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



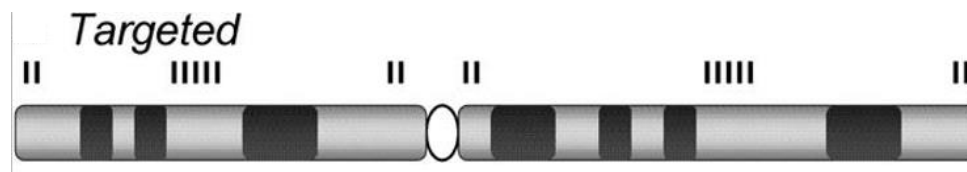
edu-metgen.imid.med.pl

ZASADA METODY aCGH

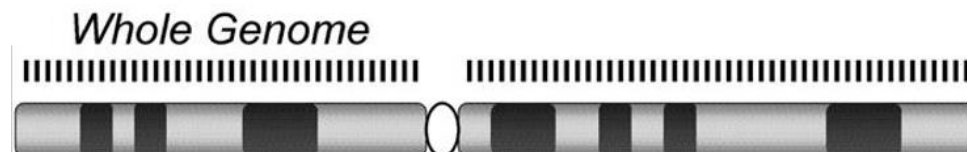


RODZAJE MIKROMACIERZY

- ✓ Mikromacierze kliniczne (celowane, ang. targeted array) z sondami specyficznymi do regionów o znanej już patologii, takich jak regiony krytyczne zespołów mikrodelecji/mikroduplikacji, regiony subtelomerowe oraz okołowcentromerowe



- ✓ Mikromacierze skonstruowane dla poszczególnych chromosomów lub wybranych regionów chromosomowych (np. 1p36)
- ✓ Mikromacierze całogenomowe



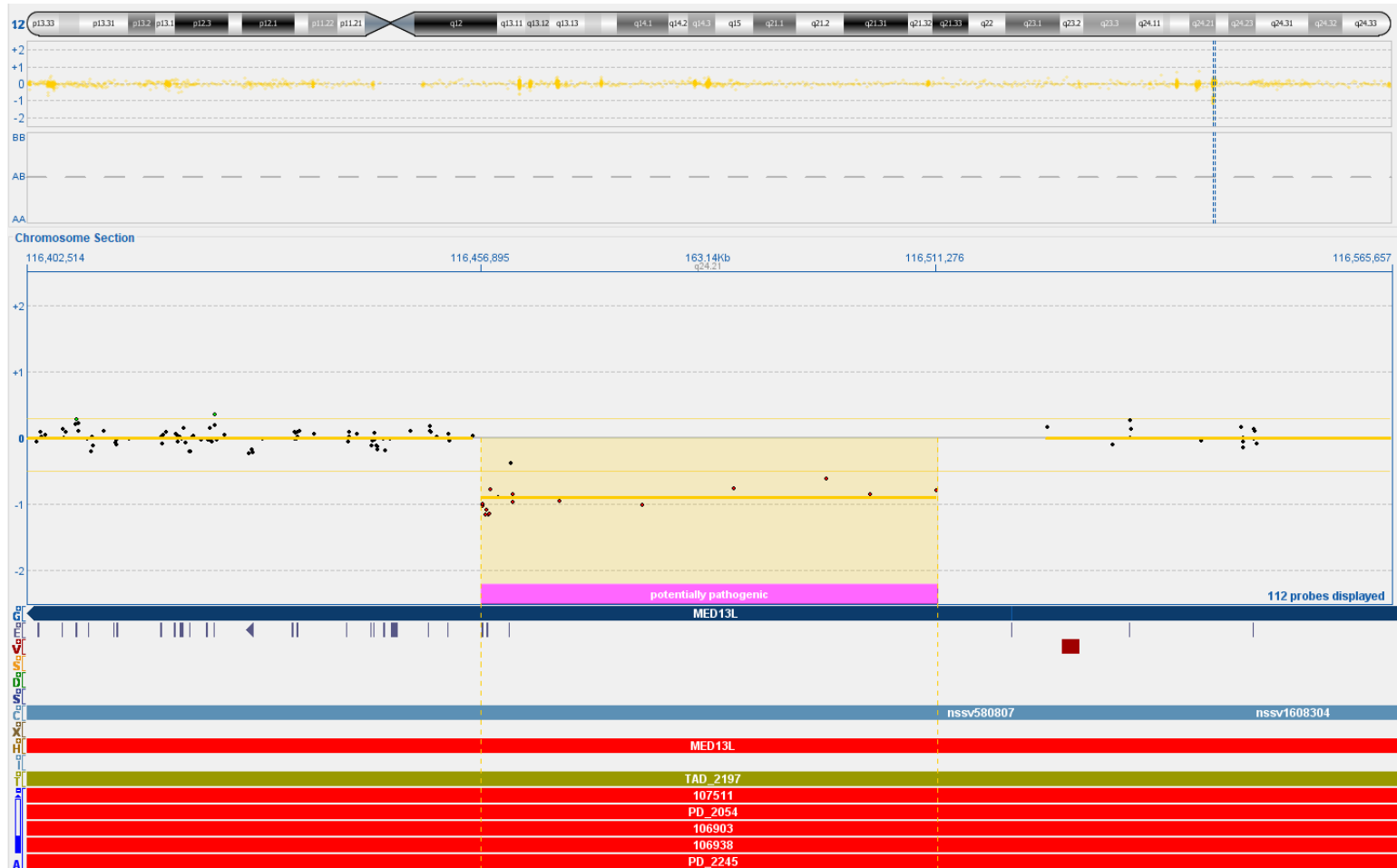
INTERNETOWE BAZY DANYCH

Table 1. Public data resources for CNV interpretation

Name	URL
Common variants	
DGV	http://projects.tcag.ca/variation
Clinically relevant variants	
ECARUCA	http://www.ecaruca.net
CAGdb	http://www.cagdb.org
Combination of common and clinically relevant variants	
dbVAR	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar
DECIPHER	http://decipher.sanger.ac.uk
ISCA CNV	https://www.iscaconsortium.org
Known disease genes	
OMIM	http://www.omim.org
HGMD	http://www.hgmd.cf.ac.uk
Gene imprint	http://www.geneimprint.com

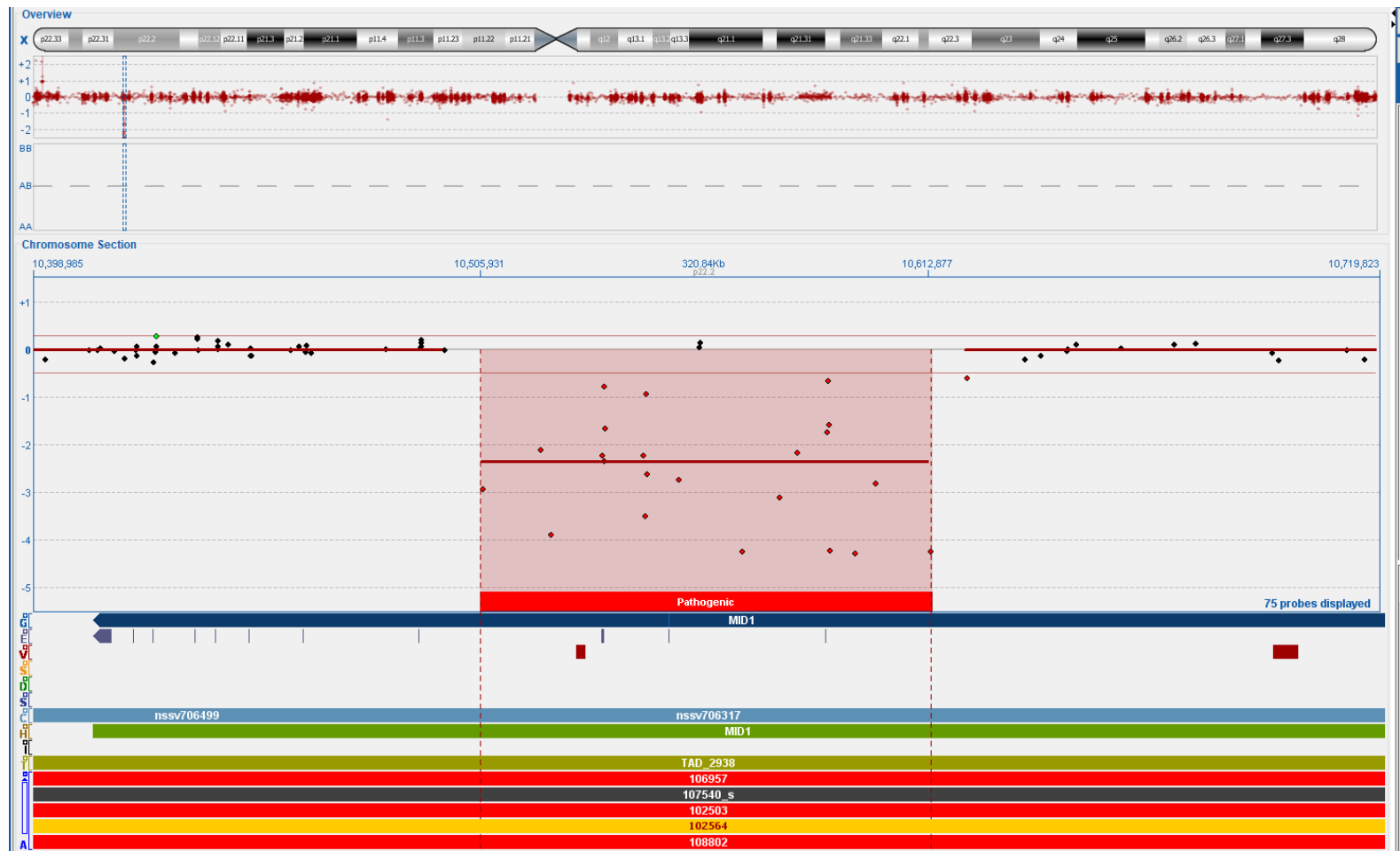
Hehir-Kwa JY et al. Clin Genet. 2013 Nov;84(5):415-21

arr[GRCh37] 12q24.21(116456895_116511276)x1 (54 kpz)



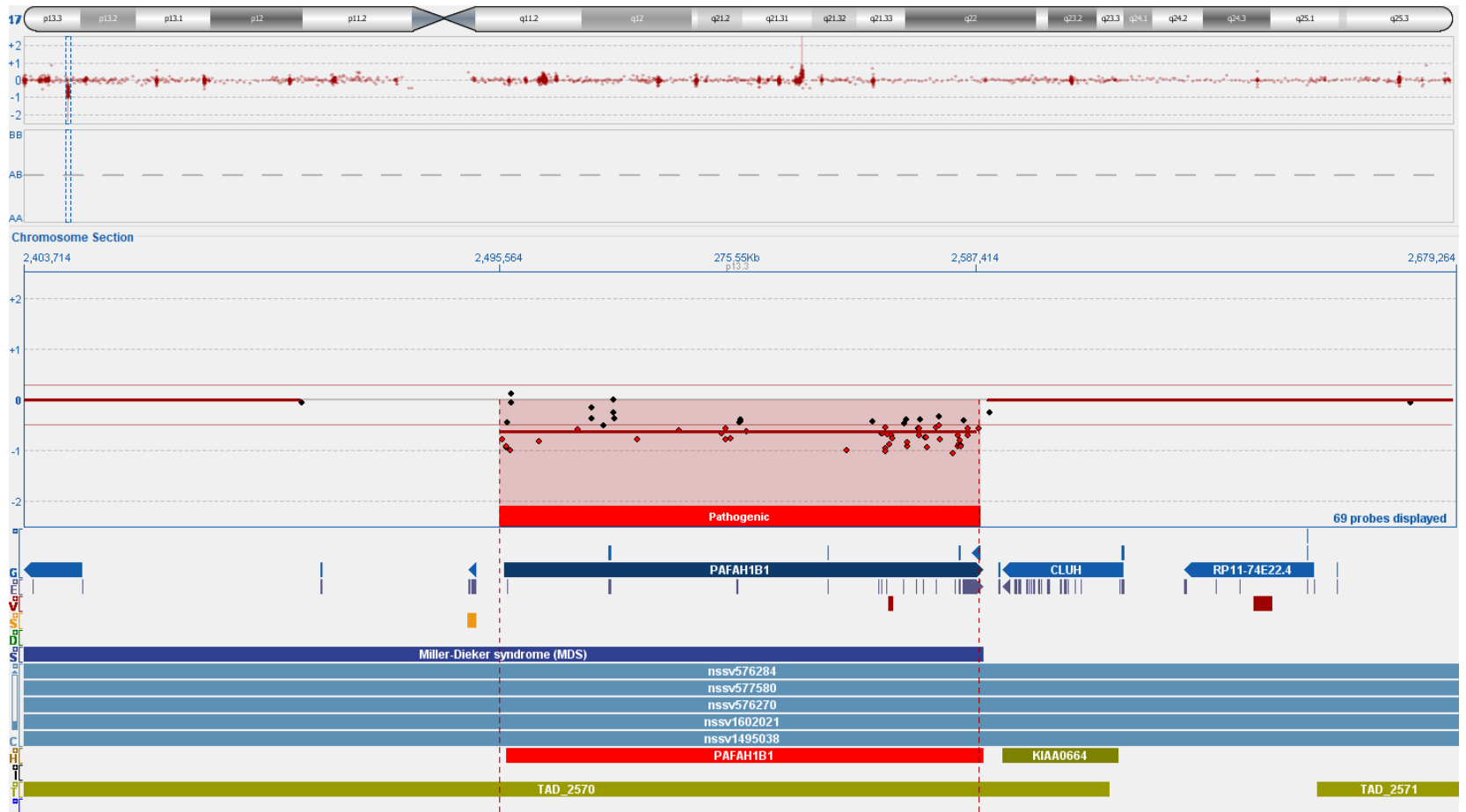
pacjent z niepełnosprawnością intelektualną w stopniu umiarkowanym, zaburzeniami zachowania, brakiem rozwoju mowy, mikrocefalią, wadą wzroku

arr[GRCh37] Xp22.2(10505931_10612877)x0



Pacjent z wielowadziem (hipoplazja robaka mózdzku, rozszczep górnej wargi i podniebienia, hydrothorax)

arr[GRCh37] 17p13.3(2495564_2587414)x1



pacjent z padaczką i niepełnosprawnością intelektualną w stopniu umiarkowanym

aCGH – WADY I ZALETY

Zalety aCGH

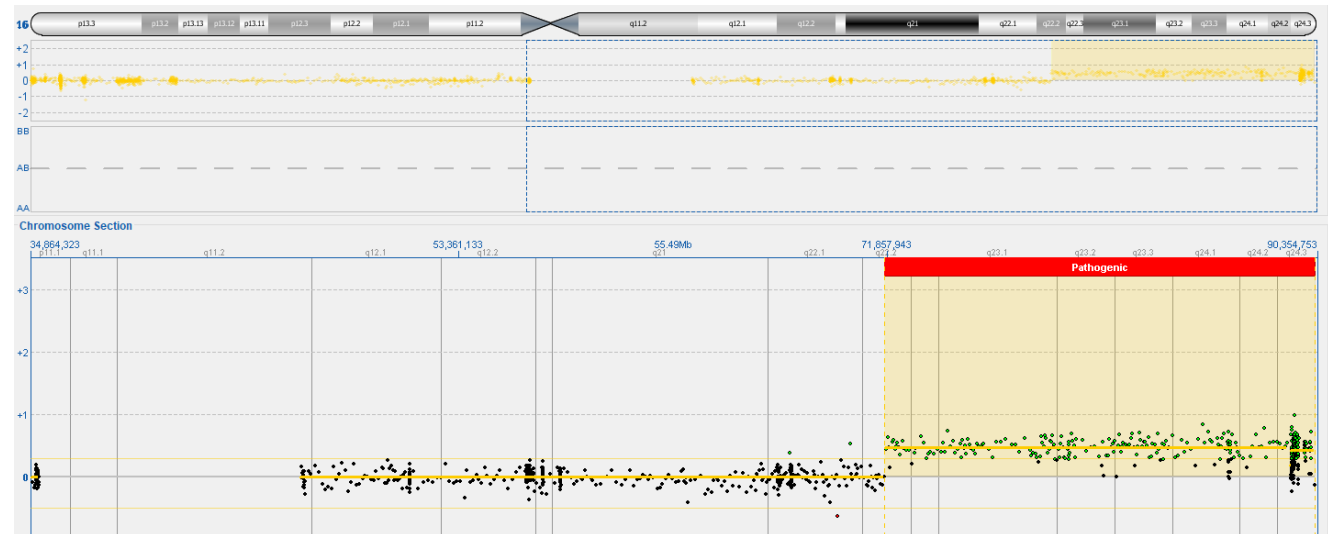
- ✓ Umożliwia analizę całego genomu
- ✓ Wysoka rozdzielczość
- ✓ Precyzyjne mapowanie miejsc złamań
- ✓ Krótki czas badania
- ✓ Wykrywanie mozaicyzmu

Ograniczenia aCGH

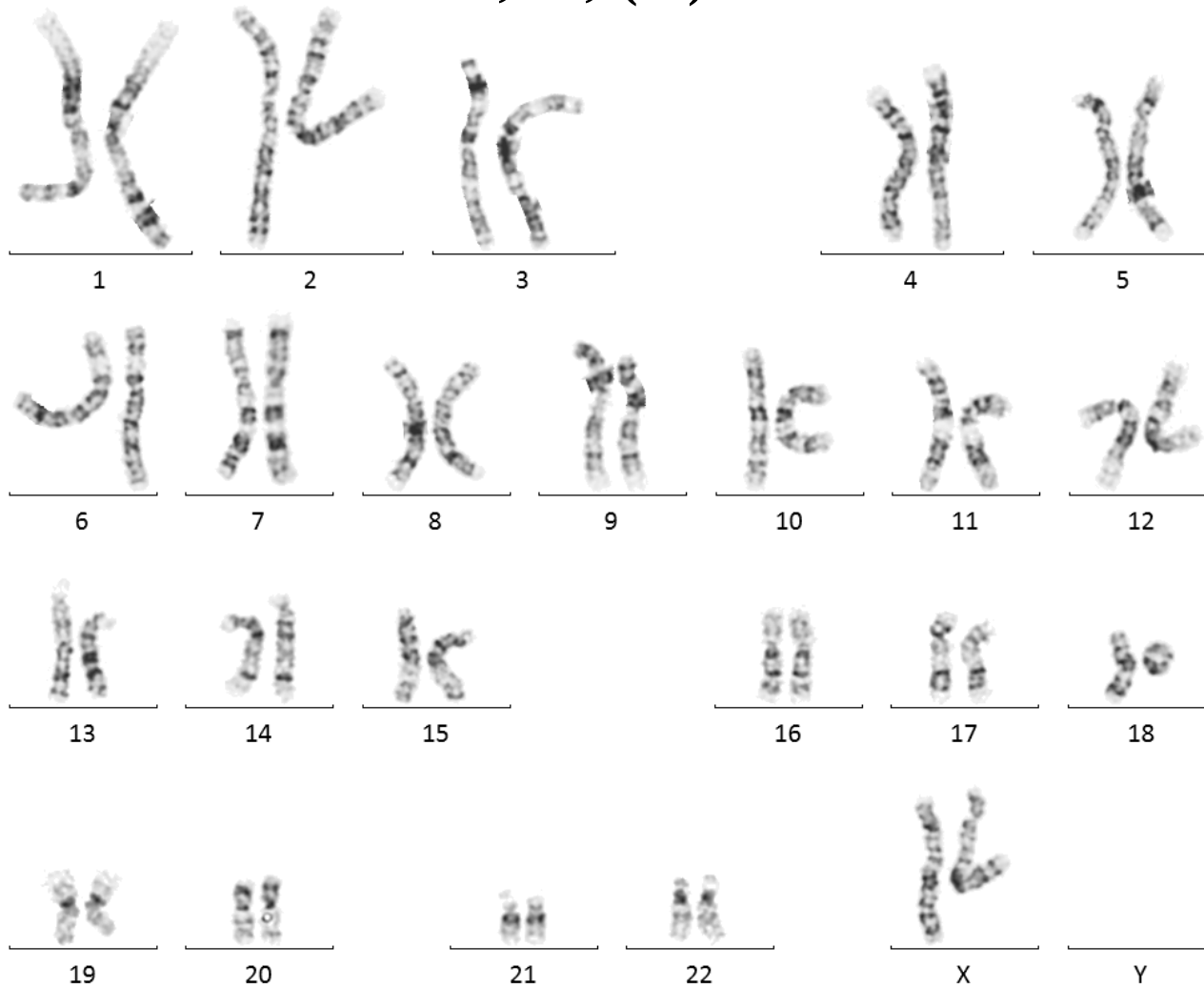
- ✓ Nie wykrywa aberracji zrównoważonych
- ✓ Wysoki koszt badania
- ✓ Problemy z interpretacją niektórych wyników badań



arr[GRCh37] 6p25.3(213632_1529540)x1,16q22.2q24.3(71755686_90252496)x3

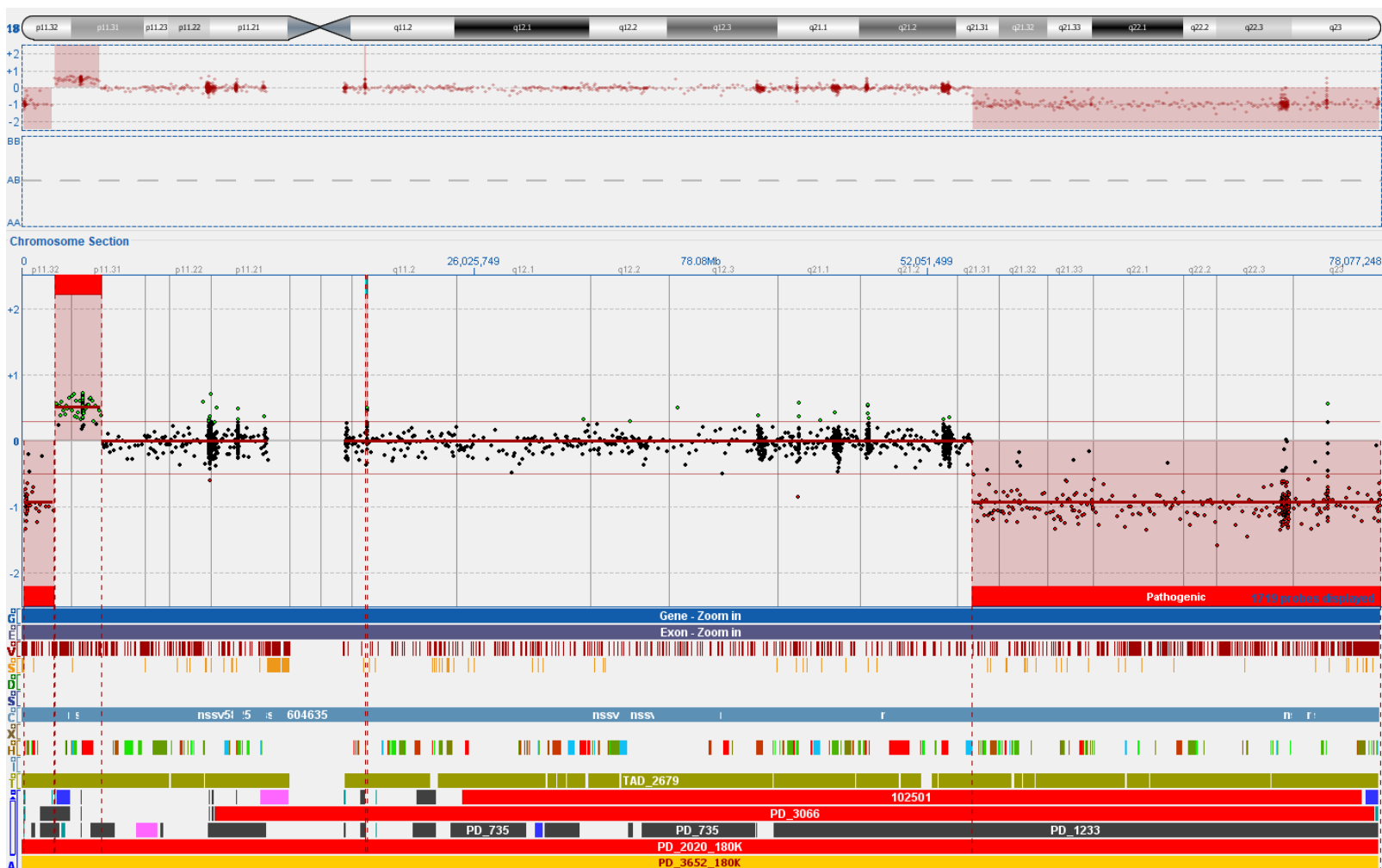


46,XX,r(18)



pacjent z hipotonią, zespołem cech dysmorficznych, wadą serca, IUGR

arr[GRCh37] 18p11.32(149089_1754474)x1,18p11.32p11.31(1949900_4492096)x3,
18q21.31q23(54622489_78005754)x1



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita
Polska



Instytut
Matki i Dziecka

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny

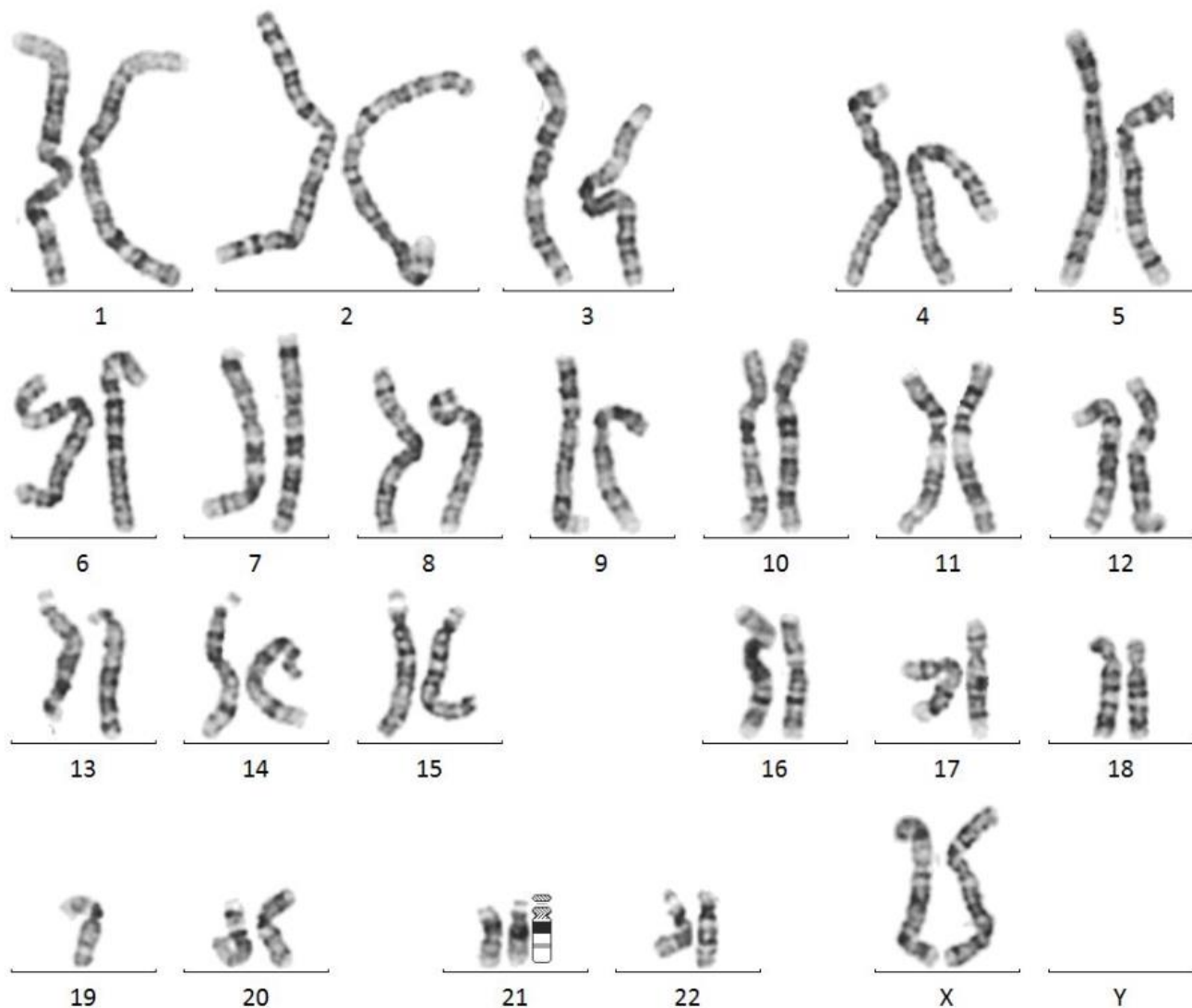


edu-metgen.imid.med.pl

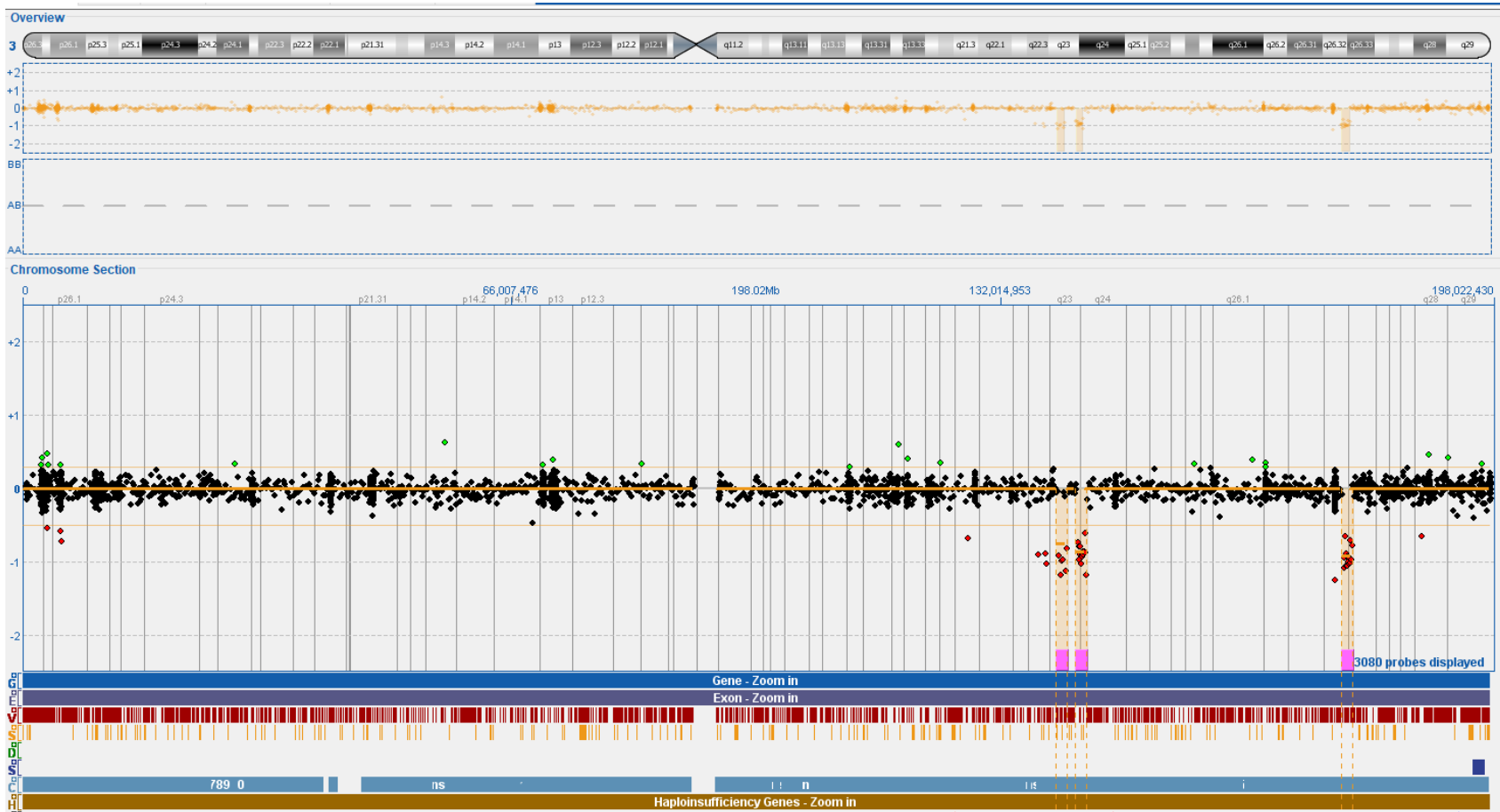
arr[GRCh37] 21q21.3q22.3(31093063_48086607)x3



46,XX,dup(21)(q21.3q22.3)

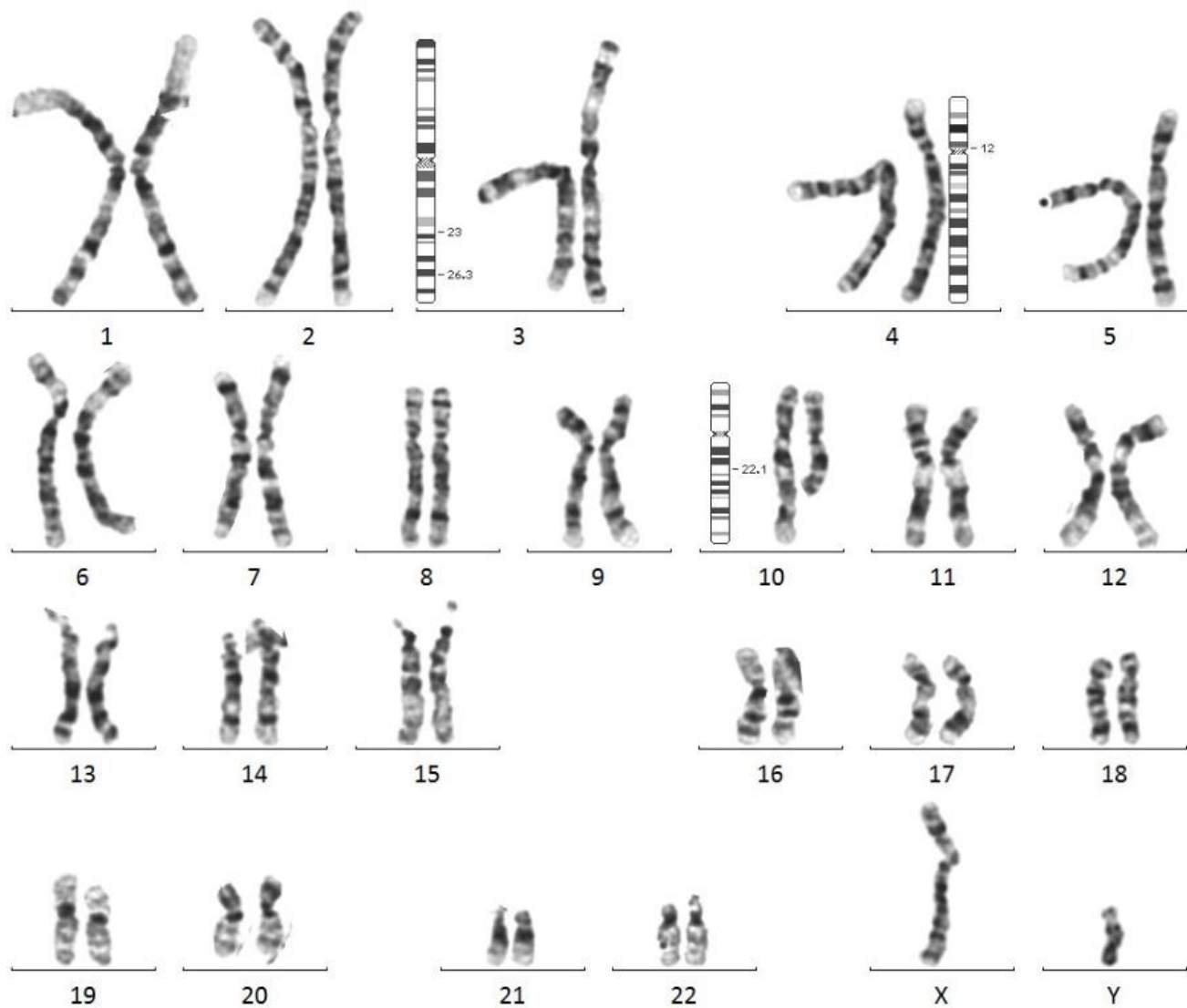


arr[GRCh37] 3q23(139444474_140621799)x1,3q23q24(142083894_143152441)x1,
3q26.32q26.33(177940998_179061643)x1

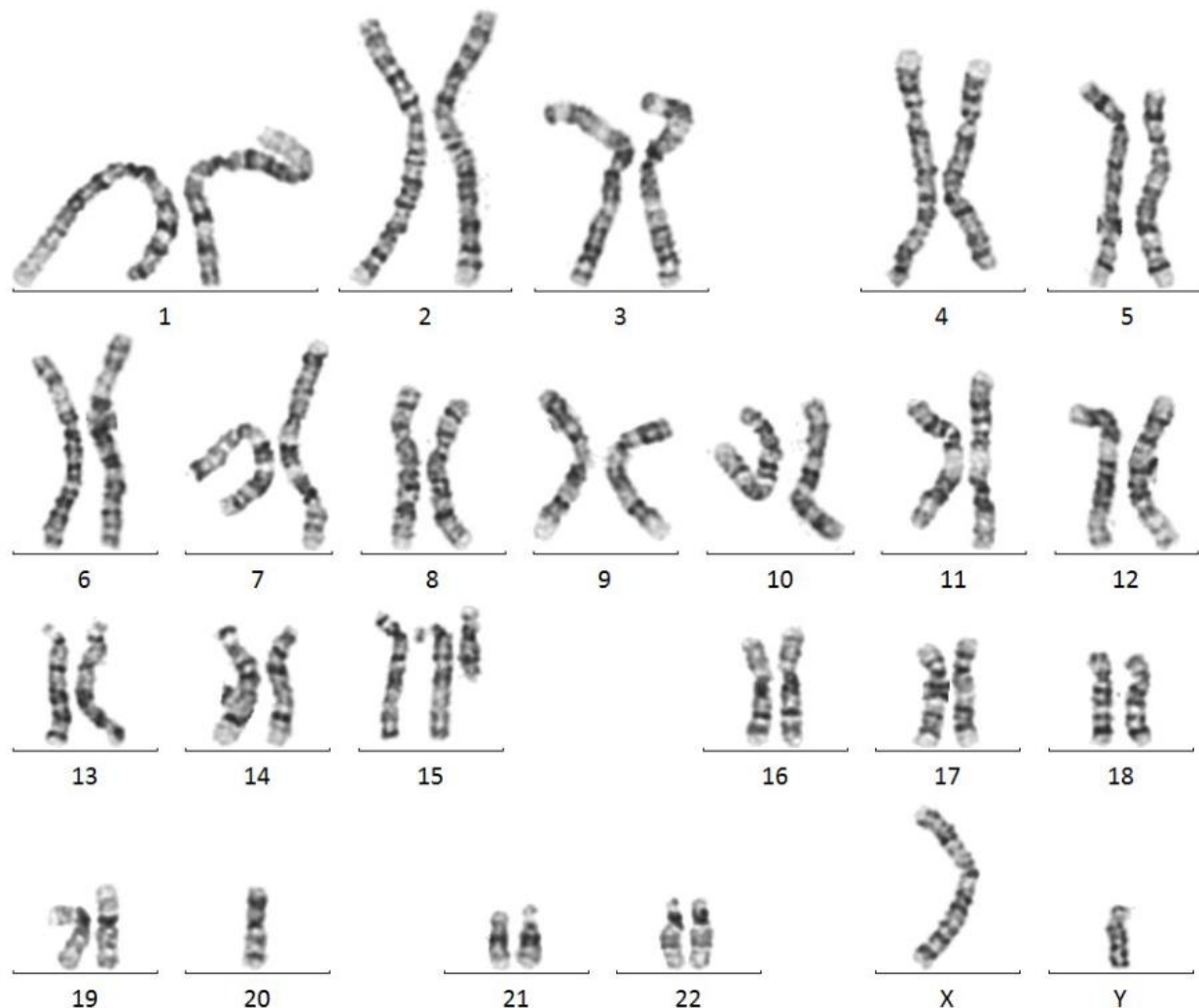


pacjent z zespołem cech dysmorficznych, opóźnieniem rozwoju mowy oraz kranioostenozą

46,XY,t(3;10)(q23;q22),der(4)ins(4;3)(p12;q23q26.3)dn

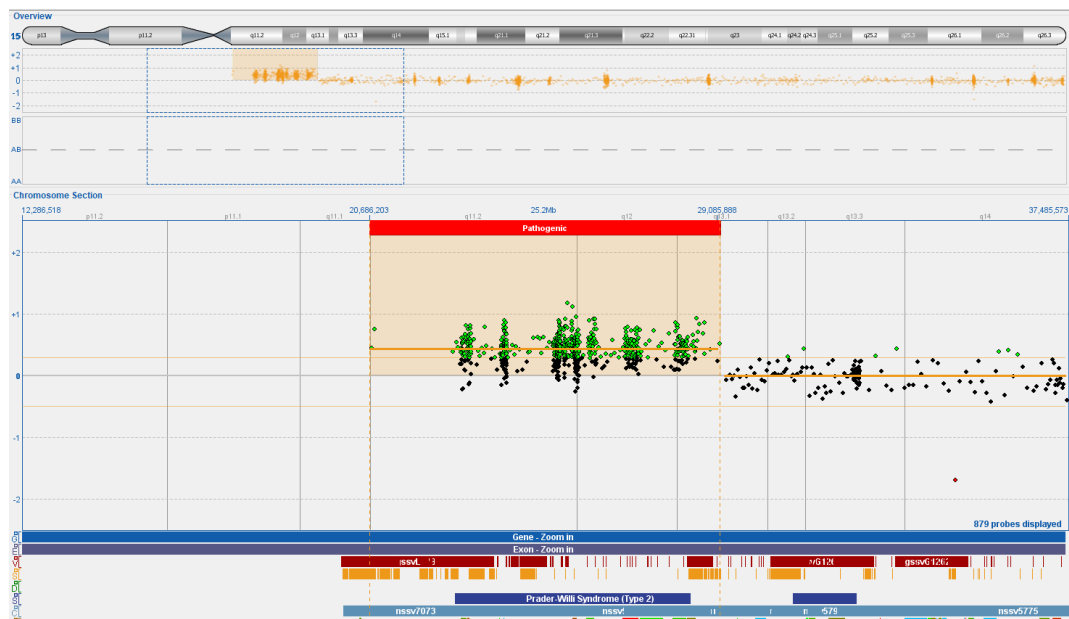
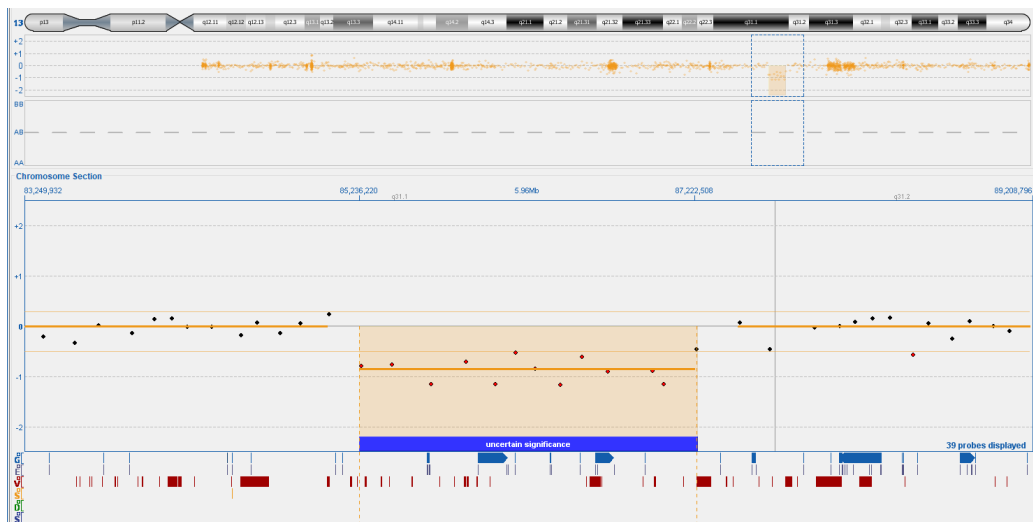


mos 47,XY,+der(15)del(15)(q21.2)dup(15)(q11.2q13.1)[34]/46,XY[16]

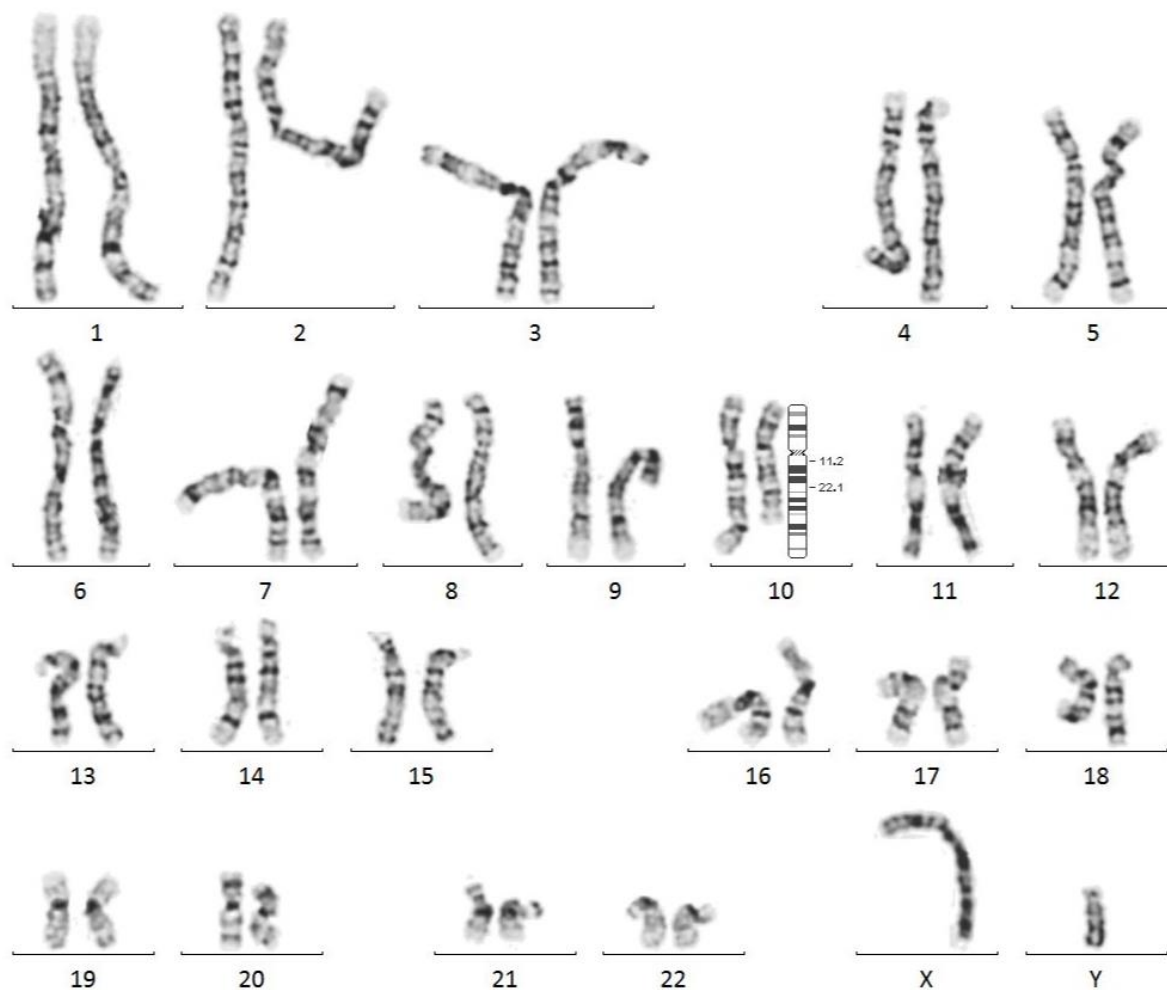


pacjent z zespołem wad wrodzonych i padaczką

arr[GRCh37] 13.q31.1(85236220_87222508)x1,15q 11.1q13.1(20686203_29085888)

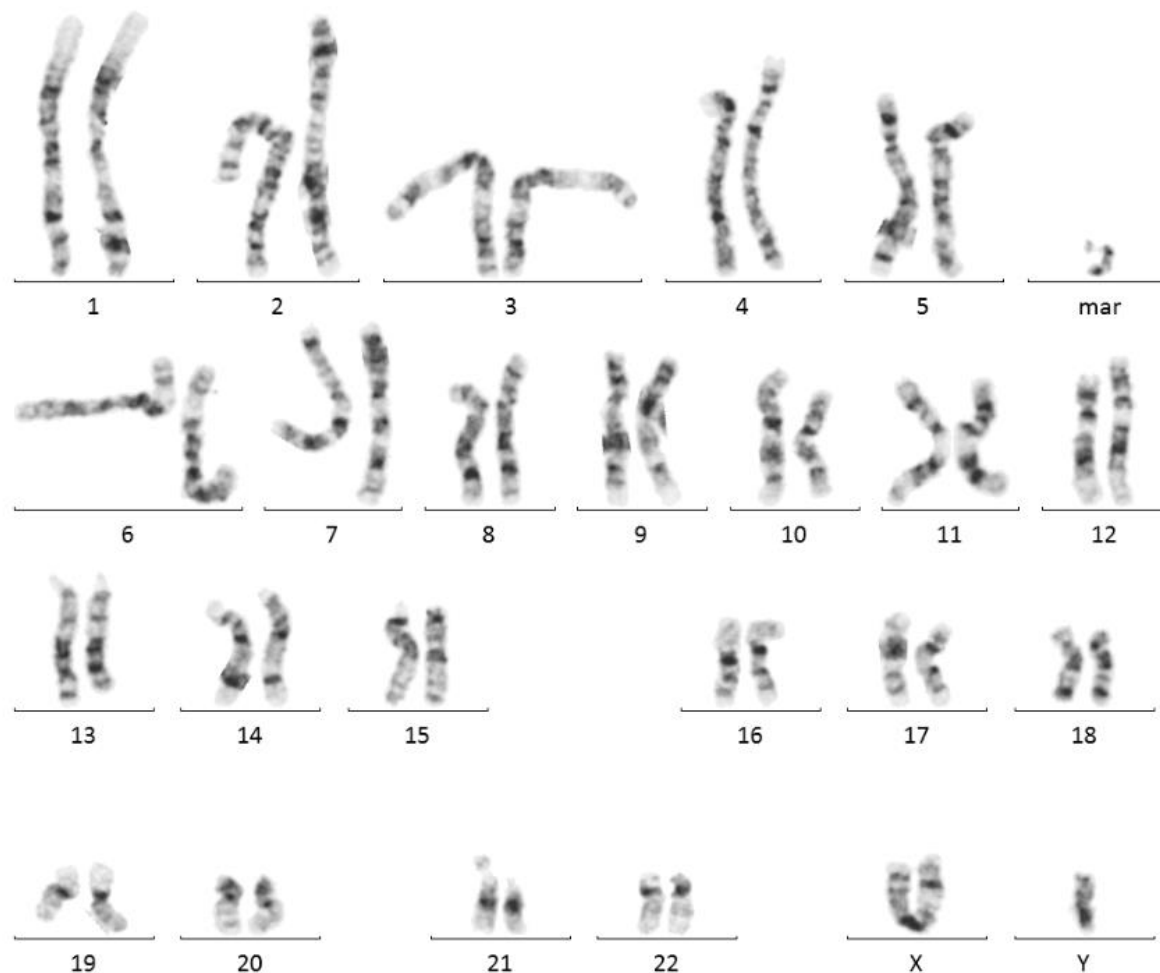


46,XY,del(10)(q11.2q22.1)

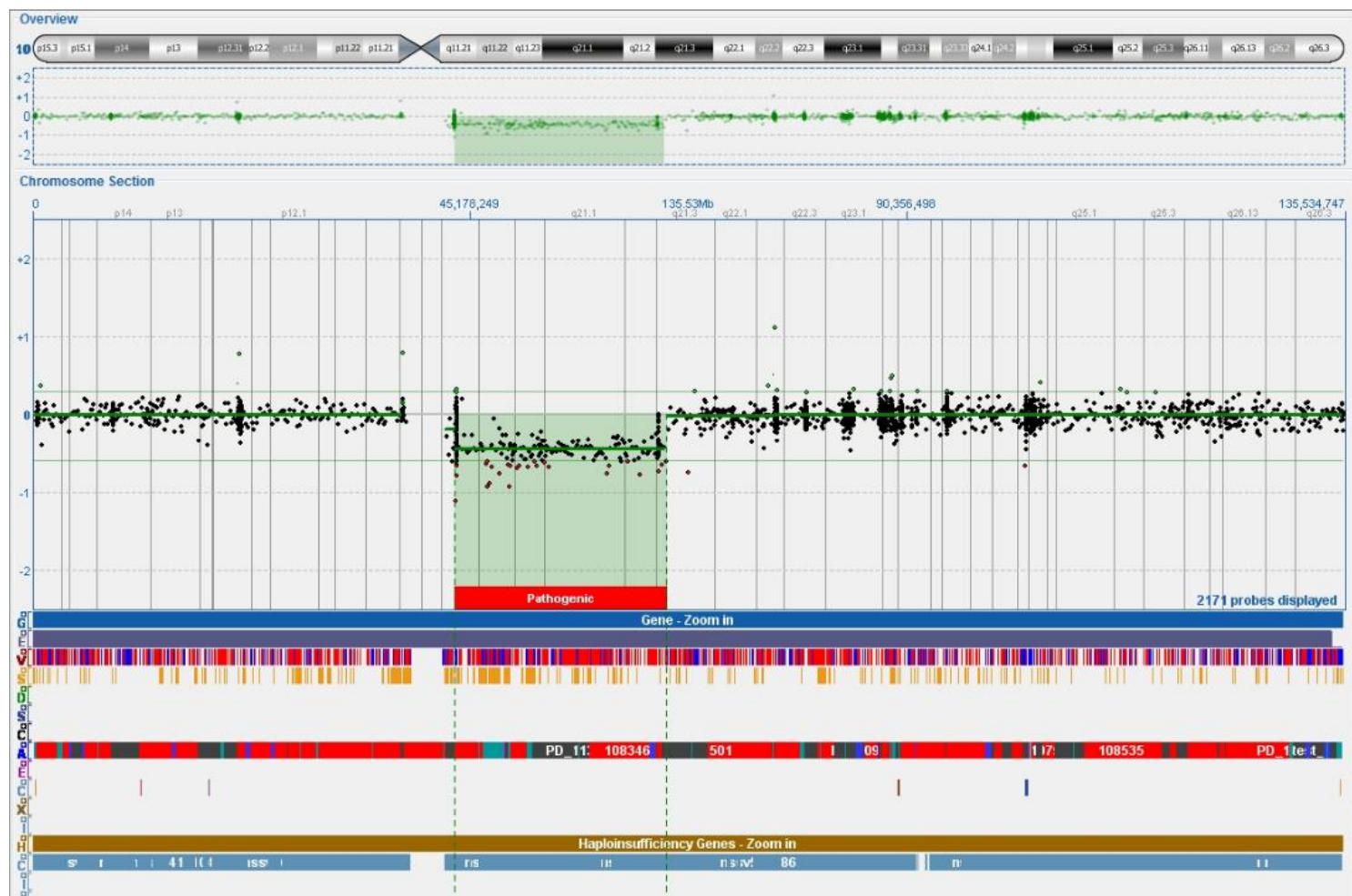


pacjent z zespołem cech dysmorficznych

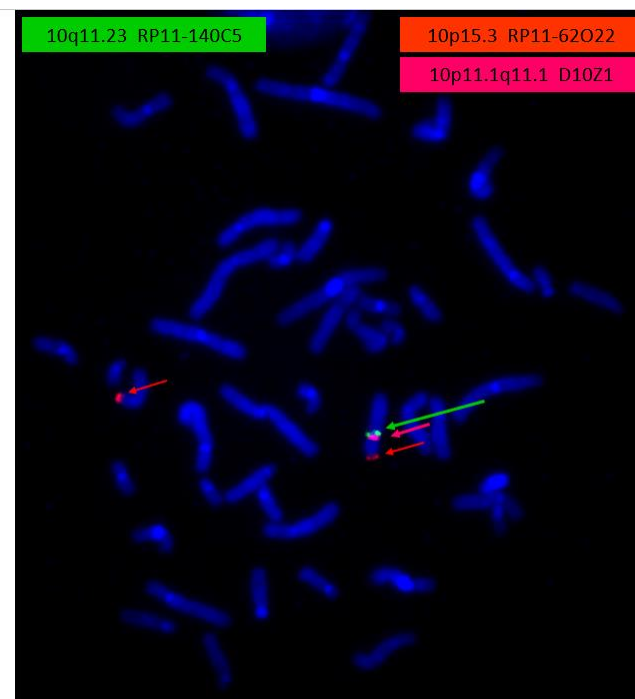
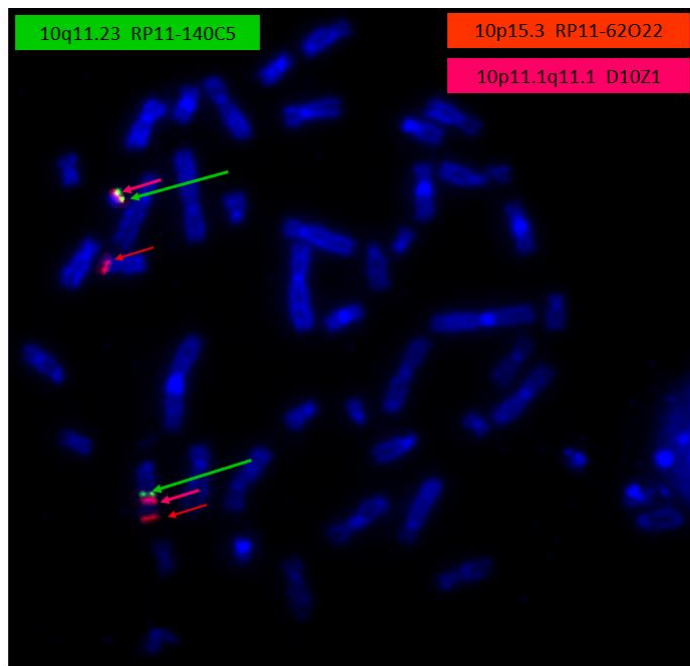
mos 47,XY,del(10)(q11.2q22.1),+mar[25]/46,XY,del(10)(q11.2q22.1)[25]



arr[GRCh37] 10q11.21q21.3(43622147_65314220)x1



**ish del(10)(p11.1q11.1)(D10Z1-),+der(10)(D10Z1+)[11]/del(10)(p11.1q11.1)(D10Z1-)[6]
 .nuc ish(D10Z1x2)[60]/(D10Z1x1)[77]**

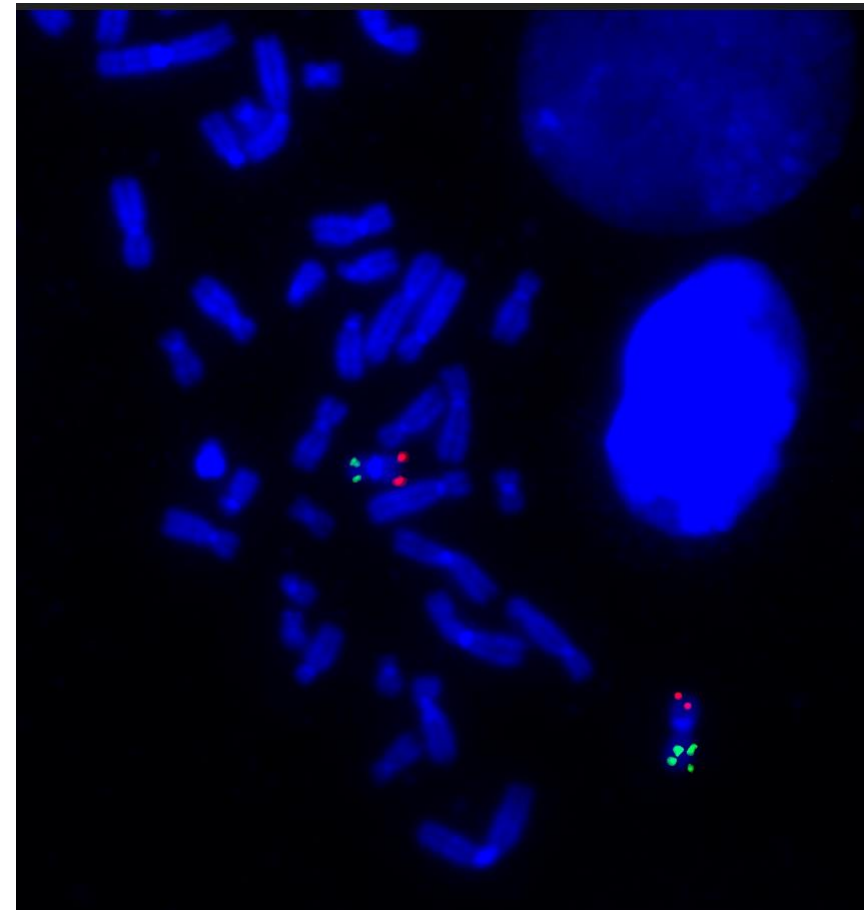
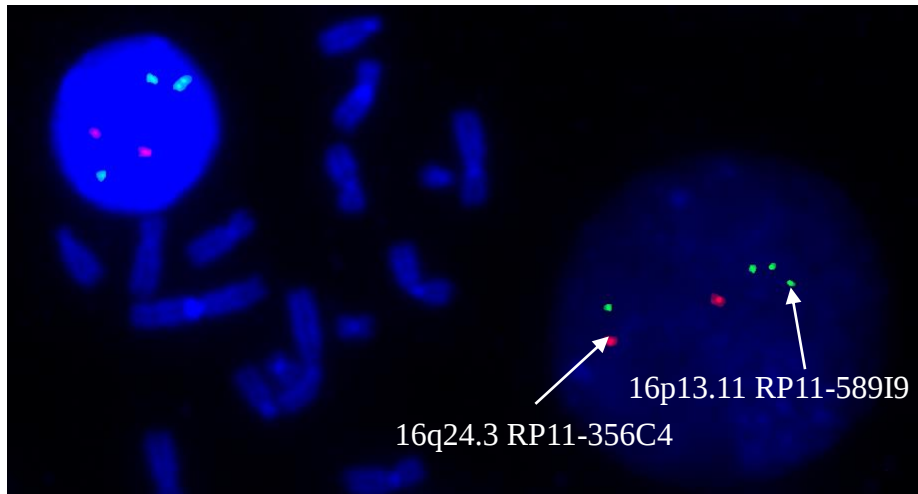


arr[GRCh37] 16p13.11p11.2(15278668_28682251)x3



pacjent z prawostronnym łukiem aorty i dysmorfią twarzy

ish der(16)dup(16)(p13.11p13.11)(RP11-589I9++).nuc ish 16p13.11(RP11-589I9x4)





DZIĘKUJĘ ZA UWAGĘ



Fundusze
Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita
Polska



Instytut
Matki i Dziecka

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



edu-metgen.imid.med.pl