



Cytogenetyka klasyczna i molekularna w diagnostyce neonatologicznej

Kurs: „Genetyka neonatologiczna - nie tylko testy przesiewowe”

16.11.2020

Kamila Ziemkiewicz

Zakład Genetyki Medycznej IMiD

kamila.ziemkiewicz@imid.med.pl

Badanie kariotypu – analiza liczby i morfologii chromosomów zatrzymanych w stadium metafazy

Analizowany jest kariotyp konstytucyjny

- wrodzony
- taki sam (zazwyczaj) dla wszystkich komórek somatycznych organizmu (wyjątki m.in.: mozaicyzm, chimeryzm)

Badanie kariotypu poprzedzone jest hodowlą komórkową (znaczenie jakości, ilości oraz warunków i czasu transportu materiału)

Utrwalone chromosomy barwione są z zastosowaniem techniki prążkowej GTG

Wzór prążkowy chromosomów jest stały i specyficzny gatunkowo

Wskazania do oceny kariotypu noworodka we krwi obwodowej:

1. Zespół cech dysmorficznych
2. Zespół wad wrodzonych
3. Podejrzenie określonej aberracji chromosomowej
4. Nieprawidłowości różnicowania płci
5. Weryfikacja lub uzupełnienie wyników innych badań np. aCGH
6. Potwierdzenie/wykluczenie obecności znanej aberracji

Aberracje chromosomowe 9,1/1000 żywych urodzeń



Kariotyp **nieprawidłowy zrównoważony**

Zrównoważone strukturalne aberracje chromosomowe (~1-3/1000)

- Zazwyczaj bez poważnych konsekwencji klinicznych
- Niezrównoważenia u potomstwa



Kariotyp **nieprawidłowy niezrównoważony**

Niezrównoważone strukturalne aberracje chromosomowe ~2-3/1000

- Wady wrodzone, dysmorfia
- Opóźnienie rozwoju psychomotorycznego

Aberracje numeryczne ~3/1000

- Trisomia chromosomu 21 ~1,5/1000 noworodków
- Trisomia chromosomu 18 ~0,3/1000 noworodków
- Trisomia chromosomu 13 ~0,2/1000 noworodków
- Inne ~1/1000 noworodków**



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita
Polska



Instytut
Matki i Dziecka

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



edu-metgen.imid.med.pl

Aberracje chromosomowe

1. Nieprawidłowa ploidia

- Triploidia **69,XXX; 69XXY; 69XYY**
- Tetraploidia **92,XXYY**

} u żywo urodzonych w mozaice

2. Aberracje numeryczne

- Monosomie

- Trisomie

+21, +13, +18

+8, +9, +22 i inne

- Tetrasomie

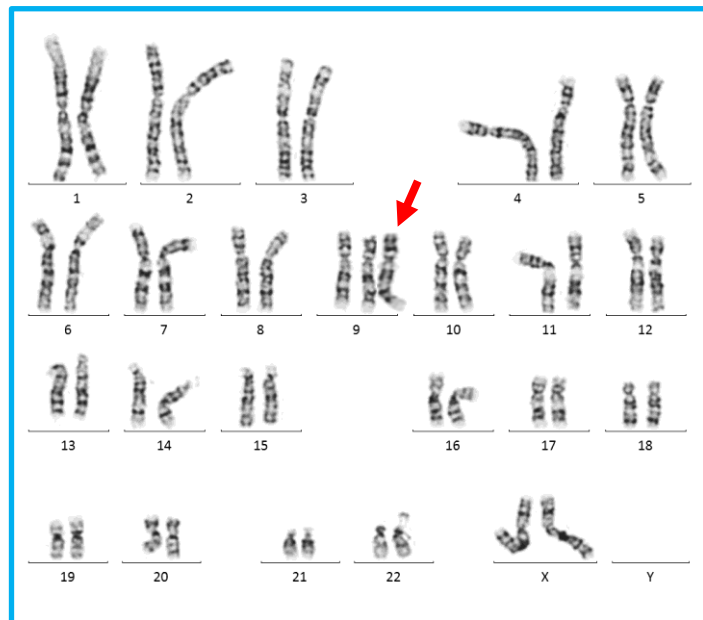
- Pentasomie

} chromosomy płci

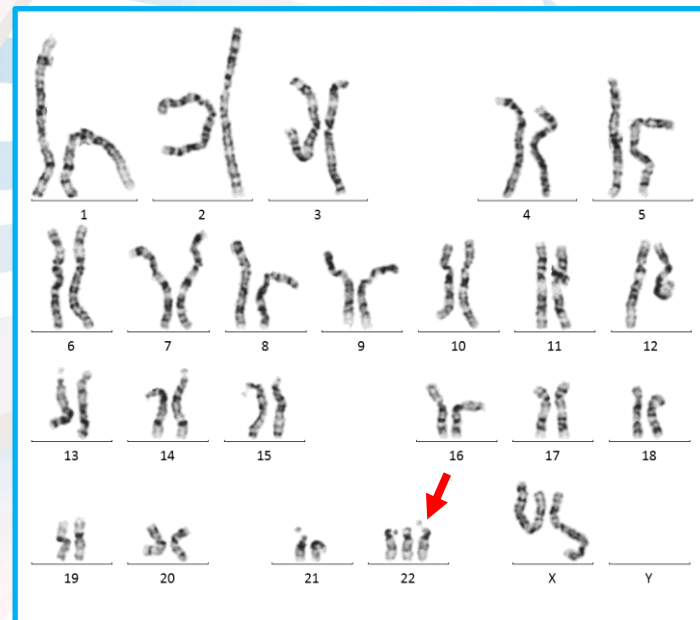
3. Aberracje strukturalne

- delecje/duplikacje
- chromosomy pochodne
- translokacje, inwersje i inne.....

Aberracje chromosomowe u noworodków – expect unexpected



47,XX,+9



47,XX,+22

30 komórek
(rekomendowane)



50 komórek



druga tkanka
- fibroblasty
- FISH kom. nabłonka
policzka

lub analiza FISH jader interfazowych
optymalnie materiał niehodowany

Case Report

Monosomy 21 Seen in Live Born Is Unlikely to Represent True Monosomy 21: A Case Report and Review of the Literature

Trent Burgess,¹ Lilian Downie,² Mark D. Pertile,¹ David Francis,¹ Melissa Glass,¹ Sara Nouri,¹ and Rosalynn Pszczola²

¹ Victorian Clinical Genetics Services, Murdoch Childrens Research Institute, Royal Children's Hospital, Parkville 3052, Melbourne, Australia

² Sunshine Hospital, Western Health, Sunshine 3020, Melbourne, Australia

Correspondence should be addressed to Trent Burgess; trent.burgess@vcgs.org.au

Received 27 November 2013; Accepted 22 December 2013; Published 4 February 2014

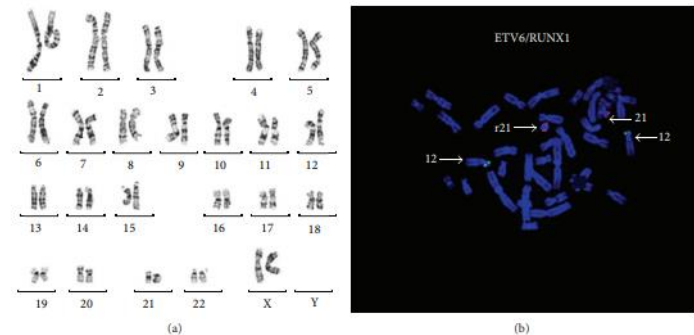
Academic Editors: P. D. Cotter, M. Fenger, and C. López Ginés

Copyright © 2014 Trent Burgess et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

We report a case of a neonate who was shown with routine chromosome analysis on peripheral blood lymphocytes to have full monosomy 21. Further investigation on fibroblast cells using conventional chromosome and FISH analysis revealed two additional mosaic cell lines; one is containing a ring chromosome 21 and the other a double ring chromosome 21. In addition, chromosome microarray analysis (CMA) on fibroblasts showed a mosaic duplication of chromosome region 21q11.2q22.13 with approximately 45% of cells showing three copies of the proximal long arm segment, consistent with the presence of a mosaic ring chromosome 21 with ring instability. The CMA also showed complete monosomy for an 8.8 Mb terminal segment (21q22.13q22.3). Whilst this patient had a provisional clinical diagnosis of trisomy 21, the patient also had phenotypic features consistent with monosomy 21, such as prominent epicanthic folds, broad nasal bridge, anteverted nares, simple ears, and bilateral overlapping fifth fingers, features which can also be present in individuals with Down syndrome. The patient died at 4.5 months of age. This case highlights the need for additional studies using multiple tissue types and molecular testing methodologies in patients provisionally diagnosed with monosomy 21, in particular if detected in the neonatal period.



FIGURE 1: (a) demonstrates the observed broad nasal bridge, anteverted nares, and prominent epicanthic folds, (b) simple ears, and (c) bilateral 5th finger clinodactyly.



Zalety klasycznej oceny kariotypu

- ✓ Dotyczy wszystkich chromosomów → możliwość wykrycia także rzadkich aneuploidii i niezrównoważenia genomu (produkty translokacji, chromosomy markerowe)
- ✓ Analiza chromosomów metafazowych (badanie ilościowe i jakościowe) w przeciwieństwie do badania ilościowych opartych na analizie wyizolowanego DNA (np. aCGH) umożliwia wykrycie:

- **Poliploidii**
- **Niskoprocentowego mozaicyzmu**
np. mos 47,XX,+9[4]/46,XX[46]
- **Aberracji zrównoważonych** (translokacje, inwersje, insercje) – rzadka przyczyna nieprawidłowego fenotypu
- **Zrównoważonych fuzji robertsonowskich** – nie powodują nieprawidłowego fenotypu, wpływ na prokreację w przyszłości

Ograniczenia:

- Niska czułość badania – zmiany **powyżej 5 mln par zasad** (teoretycznie!)
- Długi czas od pobrania materiału do otrzymania wyniku (7 dni)
- Badanie dotyczy tylko jednej populacji komórek jądrazastych

Czułość badania związana jest z otrzymaną rozdzielczością prążkową chromosomów



Trudności diagnostyczne i interpretacyjne w analizie kariotypu

1. Mozaicyzm i mikromozacyzm
2. Mozaicyzm tkankowospecyficzny
3. Aberracje chromosomów płci
4. Chromosomy markerowe
5. Zrównoważone aberracje chromosomowe

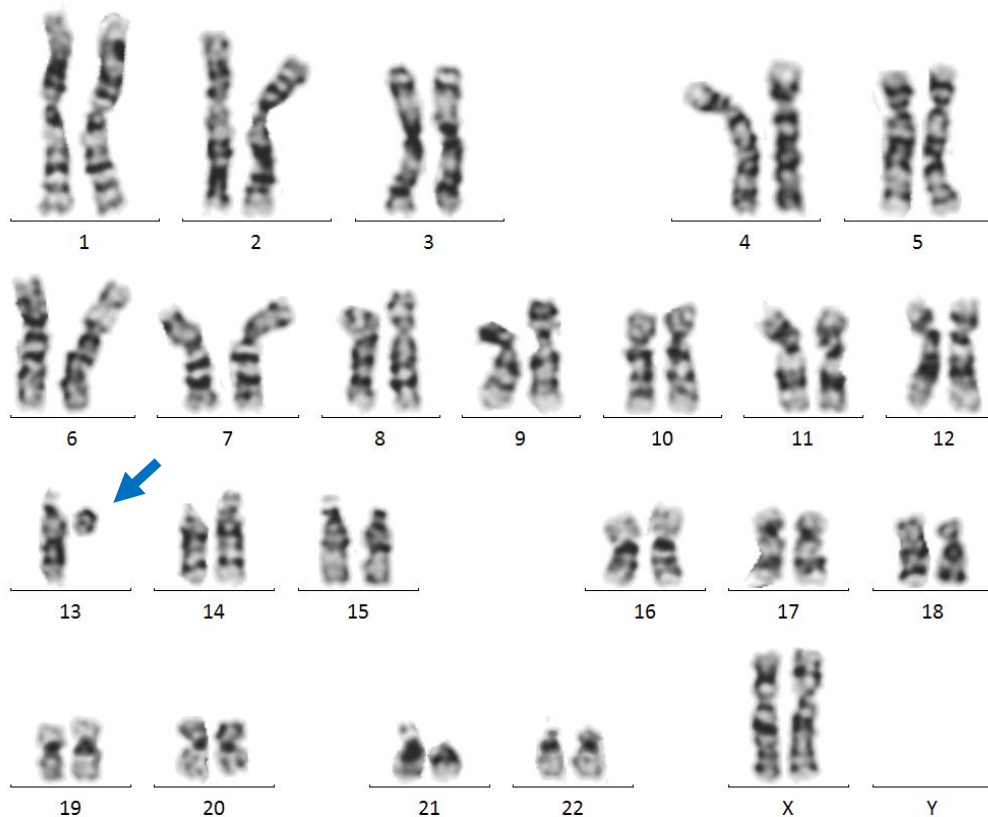
Trudności diagnostyczne i interpretacyjne w analizie kariotypu

1. Mozaicyzm i mikromozacyzm

1. Wpływ mozaicyzmu na fenotyp nie zawsze zależy od % komórek nieprawidłowych
 - Mozaicyzm tkankowospecyficzny
 - Nie wiemy jaki jest kariotyp w najważniejszych narządach
2. W przypadku mikromozacyzmu
Czy niewielki % komórek nieprawidłowych może mieć znaczący wpływ na fenotyp?
3. Mozaicyzm chromosomów płci
 - Płeć???
 - Determinacja płci nie (zawsze) zależy od % mozaicyzmu

Trudności diagnostyczne i interpretacyjne w analizie kariotypu

2. Mozaicyzm tkankowospecyficzny



46,XX,del(13)(q13.3)

Wskazania do oceny kariotypu noworodka w fibroblastach skóry:

- 1. Fenotyp sugerujący konkretny zespół przy prawidłowym kariotypie z krwi**
- 2. Plamy przebarwieniowo-odbarwieniowe skóry**
- 3. Nietypowa, nierównomierna pigmentacja tęczynek oczu, włosów**
- 4. Asymetria w budowie ciała**
- 5. Podejrzenie zespołu Pallister-Killian**

Zespół Pallister-Killian – diagnostyka postnatalna tylko w fibroblastach skóry (prenatalna – amniocyty)

Obecność dodatkowego chromosomu - izochromosom 12p, tetrasomia 12p

- głębokie upośledzenie rozwoju psychoruchowego
- hypotonia
- epilepsja
- hypo i hiperpigmentacja
- wady serca
- upośledzenie słuchu i wzroku
- wady przepony
- dysmorfia (hyperteloryzm, wysokie czoło, rzadkie włosy, spłaszczony nos)



źródło: Wikipedia

Trudności diagnostyczne i interpretacyjne w analizie kariotypu

3. Aberracje chromosomów płci

Noworodek ze wskazaniem: określenie płci chromosomalnej

- Analiza minimum 30 metafaz
- Przy niezgodności płci chromosomalnej z fenotypową → FISH na region SRY
- Przy podejrzeniu mozaicyzmu → badanie w drugiej tkance
- W celu określenia poziomu mozaicyzmu – optymalnie badanie FISH na jadrach interfazowych (najlepiej na materiale niehodowanym!)
- W mozaikach % komórek z danym kariotypem nie przekłada się na fenotyp

Trudności diagnostyczne i interpretacyjne w analizie kariotypu

4. Chromosomy markerowe

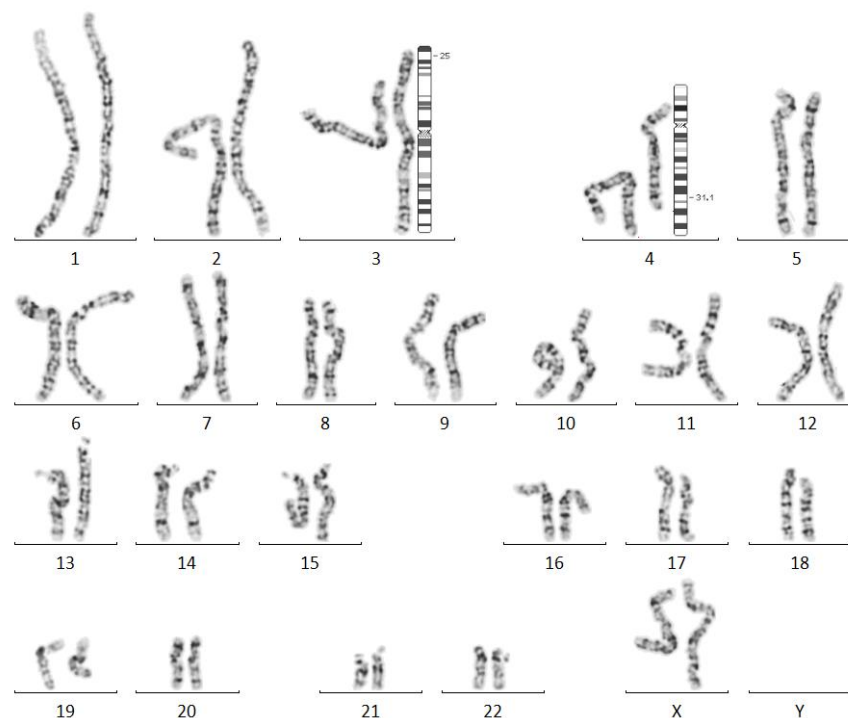
- Chromosomy markerowe często są „gubione” w podziałach somatycznych
 - Mozaicyzm tkankowospecyficzny
 - Nie wiemy jaki jest kariotyp w najważniejszych narządach
- W przypadku chromosomów markerowych odziedziczonych fenotyp dziecka i rodzica mogą różnić się
 - Różny % markera w tkankach
 - Różny stopień utraty markera w podziałach somatycznych
 - Różny stopień penetracji i ekspresji
- Większy rozmiar chromosomu markerowego nie oznacza automatycznie większej patogenności.
- Marker z chromosomów płci
 - Płeć???
 - Konieczne badania molekularne (region SRY)
- W przypadku mar(15) konieczne badania molekularne (region PWS/AS !)

Trudności diagnostyczne i interpretacyjne w analizie kariotypu

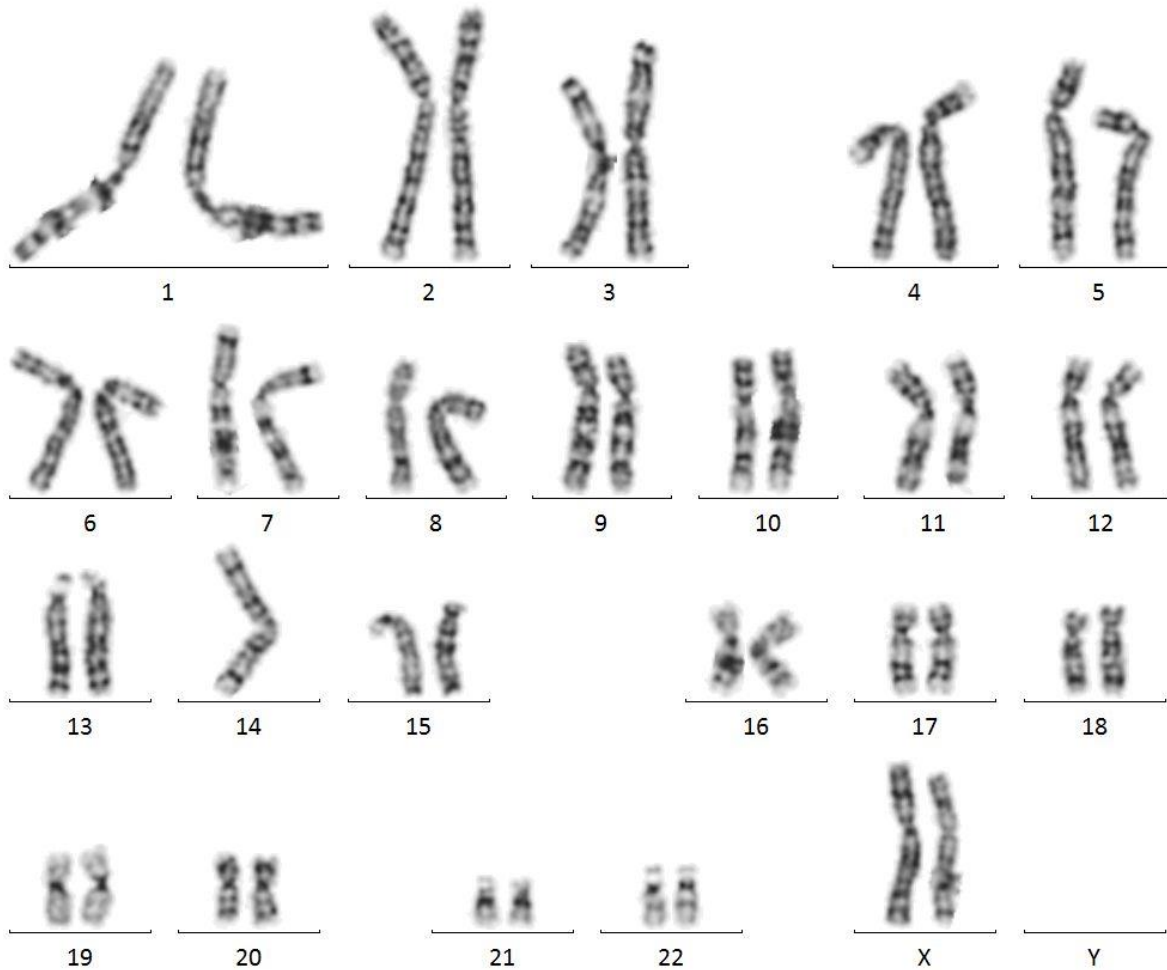
5. Zrównoważone aberracje chromosomowe:

- Translokacje, inwersje, insercje
- Zazwyczaj nie wpływają na fenotyp
- Mogą być przyczyną niepowodzeń rozrodu u ich nosiciela
- Ryzyko częściowych trisomii i częściowych monosomii u potomstwa
- **W rzadkich przypadkach mogą być przyczyną nieprawidłowego fenotypu**
 - submikroskopowe niezrównoważenie w miejscu złamania
 - przerwanie ciągłości genu

Nieprawidłowy fenotyp + aberracja
zrównoważona *de novo* →
konieczna dalsza diagnostyka



46,XX,t(3;4)(p25;q31.1)



14q32

UPD(14)pat
Kagami-Ogata Syndrome

UPD(14)mat
Temple Syndrome

45,XX,der(14;14)(q10;q10)



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita
Polska

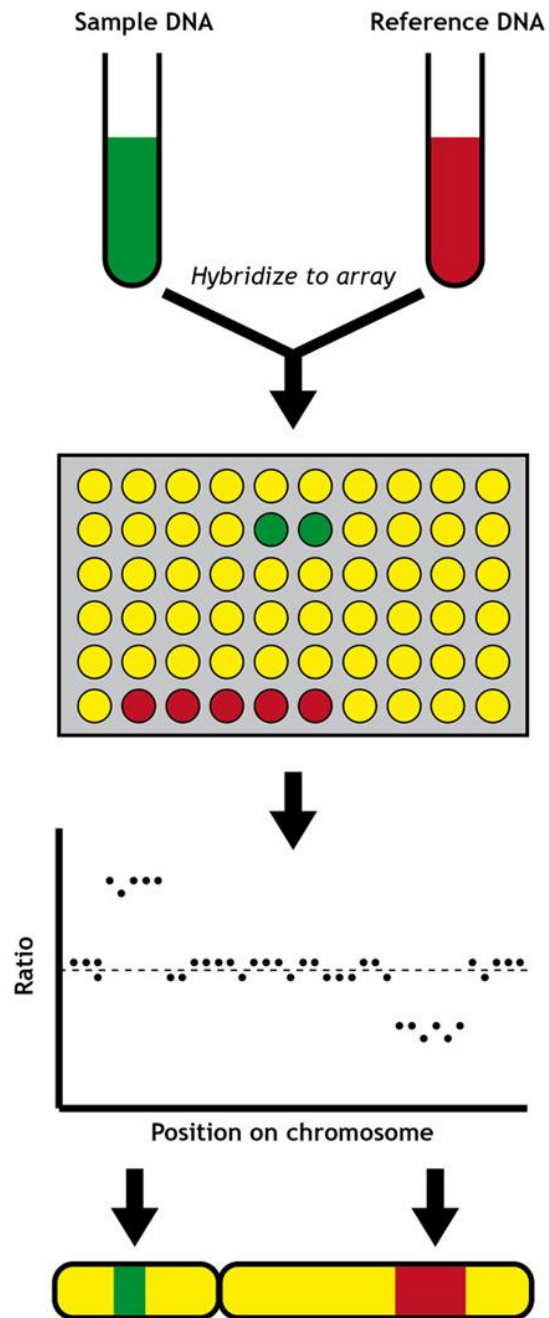


Instytut
Matki i Dziecka

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



edu-metgen.imid.med.pl



array CGH

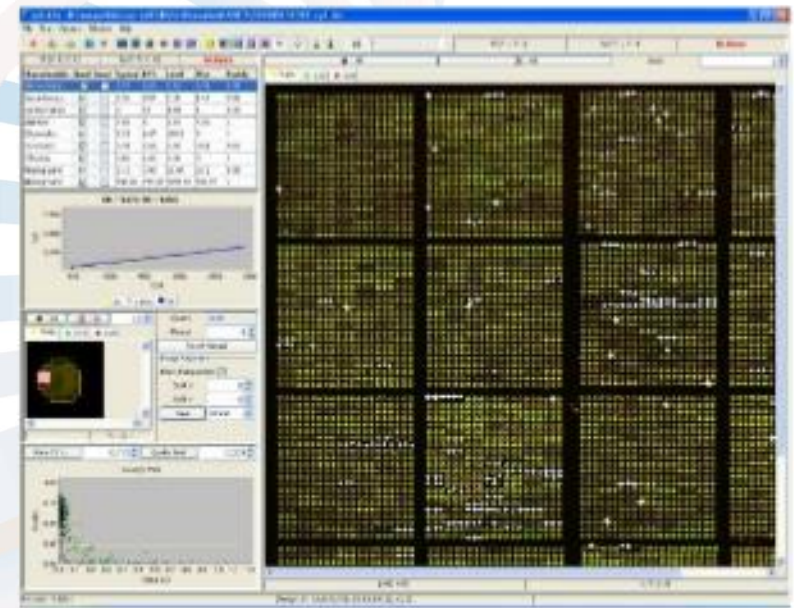
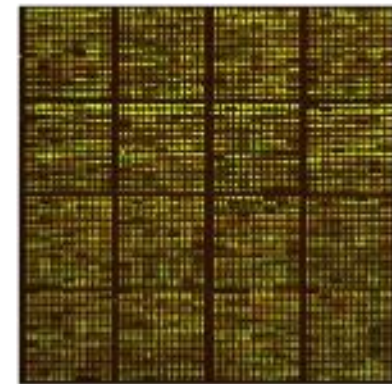
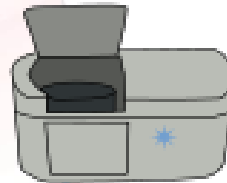


Image analysis software

Scanning



Image

aCGH

Zalety aCGH

- ✓ Badanie całogenomowe
- ✓ Wysoka przepustowość
- ✓ Nie wymaga hodowli komórkowej
- ✓ Krótki czas badania
- ✓ Wysoka czułość (śr. 30 kpz)
- ✓ Obejmuje wszystkie komórki jądrzaste krwi

Ograniczenia aCGH

- Nie wykrywa aberracji zrównoważonych
- Nie określa typu trisomii
- Nie wykrywa niskoprocentowego mozaicyzmu
- Nie wykrywa triploidii
- Wysoka cena

Kariotyp

- Fenotyp sugerujący konkretny zespół
- Wielowadzie, stan noworodka stabilny
- Podejrzenie mozaicyzmu
- Potwierdzenie obecności znanej aberracji
- Weryfikacja wyników badań prenatalnych (NIPT, aCGH, kariotyp)
- Możliwość pobrania min. 1 ml krwi
- Wynik prawidłowy → aCGH



aCGH

- „Dyskretny” fenotyp
- Wielowadzie,
stan noworodka niestabilny
- Podejrzenie zesp. mikrodelecyjnego
- Weryfikacja wyników innych badań i dalsza diagnostyka (np. po badaniu kariotypu)
- Problemy z pobraniem krwi (min. ilość 0,25 ml)

Krew należy pobrać przed planowanymi zabiegami operacyjnymi!

Rodzaje sond do FISH

- malujące
- centromerowe
- subtelomerowe
- **locus-specyficzne**

Hybrydyzacja:

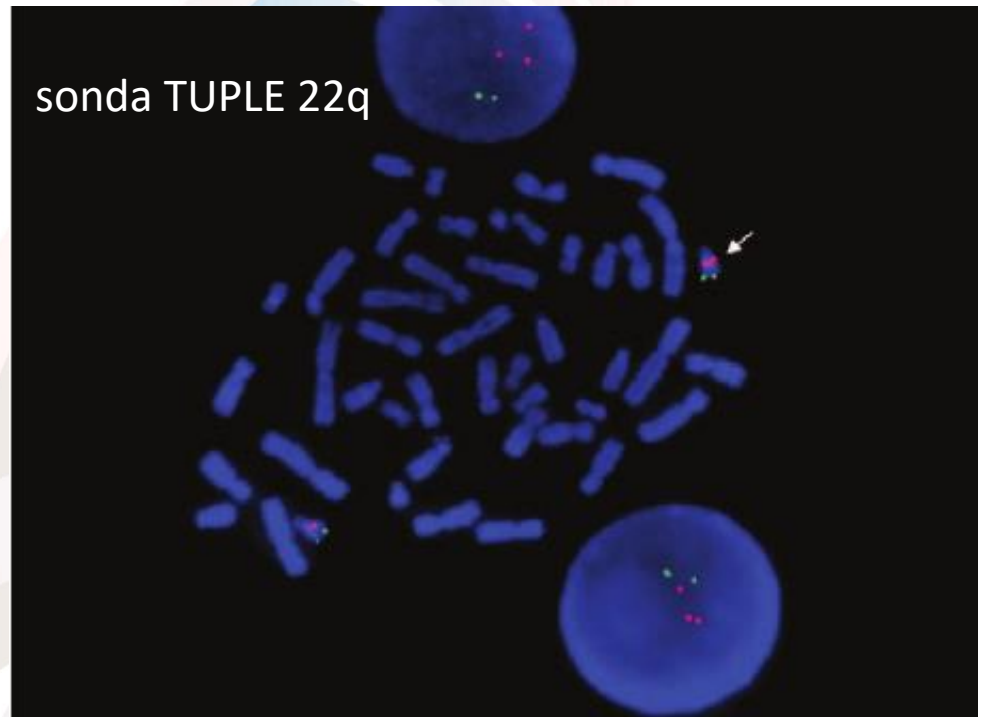
- do chromosomów metafazowych
- do jąder interfazowych

Czułość metody:

! ok. 40-250 kpz

Badanie obejmuje tylko konkretny region na podstawie podejrzenia klinicznego

sonda TUPLE 22q



Zastosowanie:

- **Podejrzenie zespołu mikrodelecyjnego**
- **Badania rodzinne**

Wybrane aberracje submikroskopowe (zespoły mikrodeleccyjne) z towarzyszącymi wadami rozwojowymi identyfikowane przy użyciu techniki FISH

- a) zespół Williamsa del 7q11.23 (1/7 500 - 10 000 ż.u.)
- b) zespół Beckwitha-Wiedemanna del 11p15 (1/10 500-13 700 ż.u.)
- c) zespół Millera-Diekera del 17p13.3 (1/?)
- d) zespół DiGeorge'a del 22q11.2 (1/3 000 ż.u.)**
- e) zespół monosomii 1p36 del 1p36 (1/ 5000 - 10 000 ż.u.)
- f) zespół kociego krzyku del 5p (1/ 20 000 - 50 000 ż.u.)
- g) zespół Smitha-Magenis del 17p11.2 (1/ 15 000 - 25 000 ż.u.)
- h) zespół Wolfa-Hirschhorna del 4p (1/ 50 000 ż.u.)
- i) zespół Pradera-Williego/Angelmana del 15q11-13
(PWS 1/ 10 000 - 30 000 ż.u.; AS 1/ 12 000 - 20 000 ż.u.)

źródło: <https://ghr.nlm.nih.gov>

Rapid FISH

- Analiza na jądrach interfazowych (pominięcie etapu hodowli)
- Zestaw sond komercyjnych zawiera mieszaninę sond centromerowych dla chromosomów X, Y i 18 i mieszaninę sond specyficznych dla krytycznych regionów chromosomów 13 i 21
- Wynik w ciągu 24 – 48 h
- Czułość 96,4-100% Specyficzność 99,8-100 %

Zalety

- ✓ metoda ekonomiczna czasowo i finansowo przy małej ilości badań
- ✓ wykrywa mozaikowość i nieprawidłową ploidię
- ✓ badanie obejmuje wszystkie komórki jądrzaste krwi

Ograniczenia

- metoda pracochłonna w porównaniu z innymi szybkimi metodami
- nie pozwala na ocenę typu trisomii (prosta czy translokacyjna)

Zastosowanie: **Konieczność jak najszybszego potwierdzenia najczęstszych aneuploidii**



21

trisomia prosta



21

trisomia translokacyjna



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita
Polska



Instytut
Matki i Dziecka

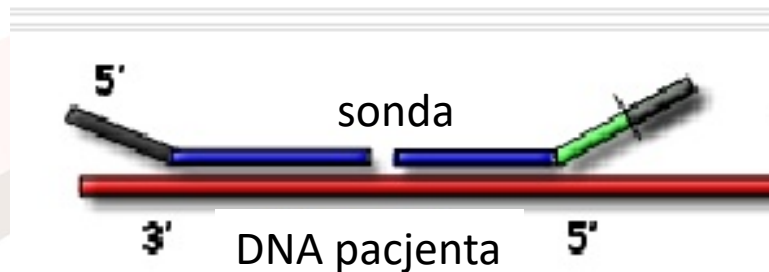
Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



edu-metgen.imid.med.pl

MLPA - Multiplex ligation-dependent probe amplification

1. Hybrydyzacja oligonukleotydowych sond połówkowych do DNA pacjenta
2. Ligacja
3. PCR z użyciem uniwersalnych par starterów
4. Rozdział kapilarny produktów PCR z odczytem fluorescencji



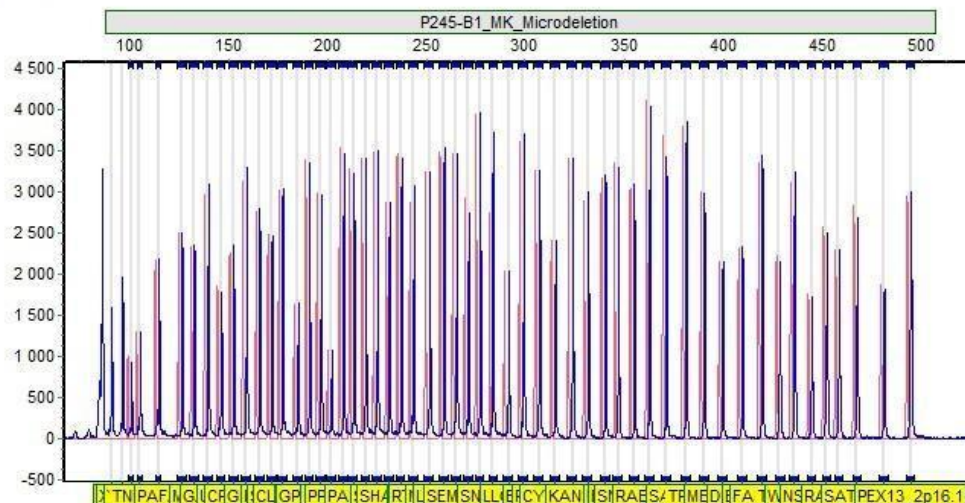
Liczba produktów reakcji jest proporcjonalna do liczby kopii badanej sekwencji DNA.

MLPA mikrodelecyjne

Syndromes that can be detected by the P245 probemix		
<i>Syndrome</i>	<i>Genetic locus</i>	<i>OMIM</i>
1p36 deletion syndrome	1p36	607872
2p16.1-p15 microdeletion syndrome	2p16.1-p15	612513
2q23.1 microdeletion/microduplication syndrome	2q23.1	156200
Glass syndrome	2q32-q33	612313
3q29 microdeletion syndrome	3q29	609425
3q29 microduplication syndrome	3q29	611936
Wolf-Hirschhorn syndrome	4p16.3	194190
Cri-du-Chat syndrome	5p15	123450
Sotos syndrome	5q35.3	117550
Williams-Beuren syndrome	7q11.23	194050
Williams-Beuren duplication syndrome	7q11.23	609757
Langer-Giedion syndrome	8q24.11-q24.13	150230
9q22.3 microdeletion syndrome	9q22.3	-
DiGeorge syndrome-2	10p13-p14	601362
Prader-Willi syndrome	15q11.2	176270
Angelman syndrome	15q11.2	105830
Witteveen-Kolk* / 15q24 microdeletion syndrome	15q24	613406
Rubinstein-Taybi syndrome	16p13.3	180849
Miller-Dieker syndrome	17p13.3	247200
Lissencephaly-1	17p13.3	607432
Smith-Magenis syndrome	17p11.2	182290
Potocki-Lupski syndrome	17p11.2	610883
NF1 microdeletion syndrome	17q11.2	613675
Koolen-de Vries syndrome	17q21.31	610443
17q21.31 microduplication syndrome	17q21.31	613533
DiGeorge syndrome	22q11.21	188400
22q11.2 microduplication syndrome	22q11.2	608363
Distal 22q11.2 deletion syndrome	22q11.2	611867
Phelan-McDermid syndrome	22q13	606232
Rett syndrome	Xq28	312750
MECP2 duplication syndrome	Xq28	300260

MLPA Analysis Report - SoftGenetics	
Software: GeneMarker V1.75	Analysis Type: MLPA
Project: Untitled	Compare Type: MLPA Ratio
Technician:	Normalization By: Population Normalization
Report Time: 09/15/2016 - 14:54:34	Quantification By: Peak Height
Panel: P245_B1_MK_Microdeletion_Vs18_MK	Classification: Loss < 0.70 <= Equivalent <= 1.30 < Gain
Control: Synthetic Control Sample	Report Value Type: Peak Ratio
Synthetic Used: gm_6255_1.fsa /// gm_6269_1.fsa /// gm_6292_1.fsa /// gm_6297_1.fsa	

gm_6269_1.fsa

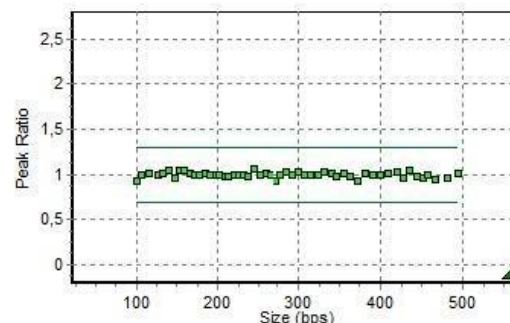


Sample Name: 6269

Machine: 3130-19335-037

Run Time: 09/06/2016 - 16:00:51 -> 09/06/2016 - 16:32:08

Conclusion	PRAWIDŁOWY	
	Date	Initial
Authorization 1		
Authorization 2		



	Probe Name	Bin Size	gm_6269_1
1	CLDN5_22q11.2	196.5	0.992
2	CREBBP_16p13	171.8	0.991
3	CYP1A1_15q24	331.7	1.034
4	DBY	115.0	1.007
5	DLG1_b_3q29	419.7	1.026
6	DLG1a_3q29	355.0	1.014
7	DMD_Xp21.1	291.6	0.996
8	ELN_7q11.23	315.2	1.000
9	ELN_b_7q11.23	363.1	0.981
10	EXT1_8q24.11	428.6	0.965
11	FANCC_9q22.32	435.9	1.041
12	GABRD_1p36.3	159.1	1.052
13	GATA3_10p14	133.1	1.007
14	GNB1_1p36.33	177.3	1.001
15	GP1BB_22q11.2	208.0	0.981
16	KANSL1_17q21	347.0	0.981
17	LETM1_4p16.3	231.2	1.003
18	LLGL1_17p11.2	307.1	0.995
19	LRR48_17p11	276.5	1.001
20	MAPT_17q21.31	270.8	0.938
21	MBD5_2q23.1	212.9	0.980
22	MBD5b_2q23.1	409.5	1.006
23	MECP2_Xq28	146.3	0.964
24	MECP2b_Xq28	185.0	1.010
25	MECP2c_Xq28	201.8	0.999
26	NF1a_17q11.2	258.3	1.018
27	NF1b_17q11.2	340.4	1.008
28	NSD1_5q35.3	152.6	1.046
29	NSD1b_5q35.3	458.3	0.998
30	PAFAH1B1_17p	139.9	1.041
31	PAFAH1B1a_17	236.9	0.985
32	PEX13_2p16.1	494.4	1.017
33	PPL2_22q11.21	219.1	1.003
34	PTCH1_9q22.32	323.8	0.997
35	RABL2B_22q13	381.3	1.017
36	RAI1_17p11.2	467.5	0.949
37	REL_2p16.1	224.9	1.005
38	RTDR1_22q11.2	264.8	1.001
39	SATB2_2q33.1	390.5	0.995
40	SATB2b_2q33.1	481.1	0.968
41	SEMA5A_5p15.3	283.9	1.035
42	SEMA7A_15q24	190.7	0.989
43	SHANK3a_22q1	251.1	1.001
44	SNAP29_22q11	371.4	0.930
45	SNRPN_15q11.2	243.1	1.068
46	SNRPNb_15q11	299.3	1.024
47	TERT_5p15.33	444.6	0.984
48	TNFRSF4_1p36	126.8	1.002
49	TRPS1_8q23.3	399.7	1.000
50	UBE3A_15q11.2	165.8	1.015
51	WHSC1_4p16.3	452.2	0.967
52	X_FRAG	101.2	0.922
53	Y_FRAG	105.6	0.996

MLPA

Zalety MLPA

- ✓ Wysoka przepustowość
- ✓ Niski koszt
- ✓ Mała ilość DNA 20-500ng
- ✓ Nie wymaga hodowli komórkowej
- ✓ Krótki czas badania

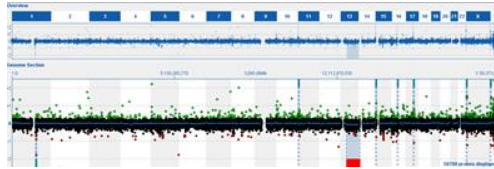
Ograniczenia MLPA

- Nie wykrywa aberracji zrównoważonych
- Nie wykrywa mozaicyzmu

Badania postnatalne

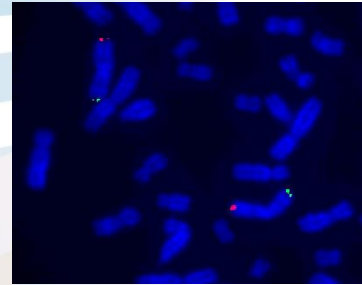
Materiał z hodowli (krew, fibroblasty):

- aCGH
(EDTA)

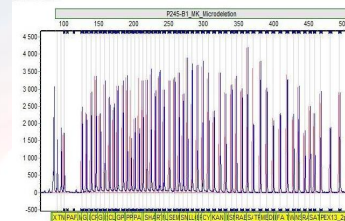


- FISH na chromosomach metafazowych i Rapid FISH (heparyna)

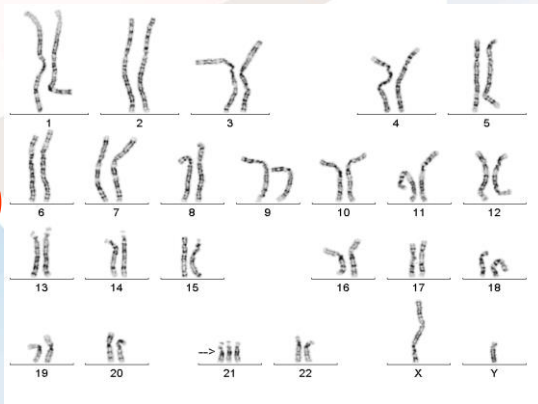
fibroblasty – pobranie na sól fizjologiczną



- inne badania molekularne (np. MLPA)
(EDTA)



- Karyotyp
(heparyna)

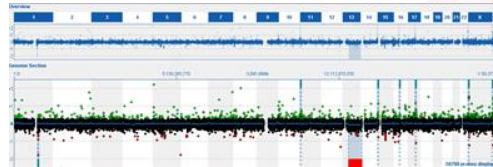


Do badania karyotypu i FISH na chromosomach metafazowych materiał do założenia hodowli musi zawierać żywe, zdolne do podziałów komórki!

Badania postnatalne

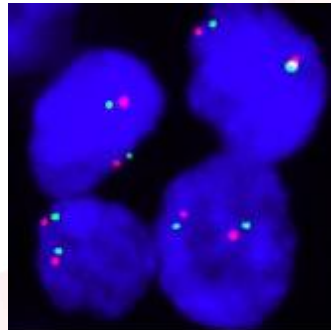
Materiał niehodowany (krew, fibroblasty, komórki nabłonka policzka):

- aCGH
(EDTA)

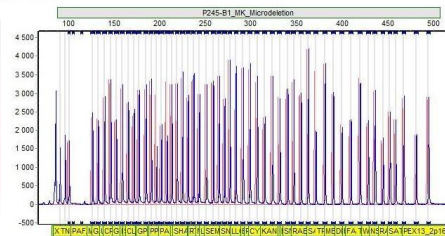


fibroblasty i kom nabł. policzka
– pobranie na sól fizjologiczną

- RAPID FISH
(heparyna)



- inne badania molekularne
(np. MLPA) (EDTA)



- ~~➤ Karyotyp~~

- ~~➤ FISH na chromosomach metafazowych~~