

# Od Mendela k cytogenomice...

**Petr Kuglík**

Ústav experimentální biologie PŘF MU v Brně  
Oddělení genetiky a molekulární biologie  
Laboratoř molekulární cytogenetiky a cytogenomiky



# 2022 - 200. výročí narození J.G. Mendela a F. Galtona



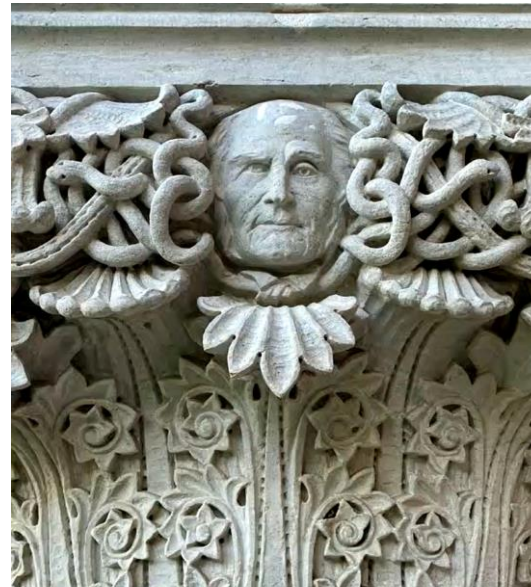
1822-1884

Mendel's genome variants  
from ancient DNA

Number of variant	4055755
SNP	3451370
INDEL	616443

Healthy men's genome variants  
from project ACGT

Number of variant	5011574
SNP	4074195
INDEL	942417



Dědičnost a  
eugenika...

1822 - 1911

“eugenics”

“If a twentieth part of the cost and pains were spent in measures for the improvement of the human race that is spent on the improvement of the breed of horses and cattle, what a galaxy of genius might we not create!”

— Francis Galton

## Pathogenic variants or risk factors with incidence in non-Finnish Europeans $\leq 30\%$

### 1) **AURKA gene:** NM\_198437.3:c.91T>A:p.Phe31Ile (rs2273535)

- heterozygous state
- associated with increased susceptibility to cancer with low penetrance (Ewart A et al. 2005, Carcinogenesis)

### 2) **CASR gene:** NM\_000388.4:c.2956G>T:p.Ala986Ser (rs801725)

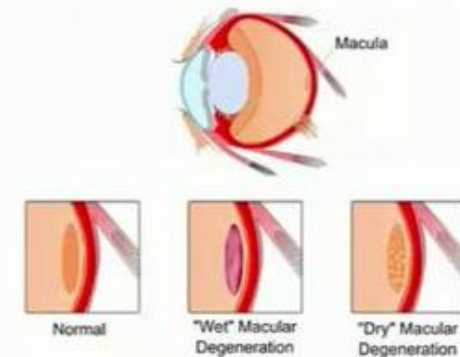
- heterozygous state
- associated with with increased risk of stones in urinary tract (Cole et al. 1999, The Lancet etc.)

### 3) **C3 gene:** NM\_000064.4:c.304C>G:p.Arg102Gly (rs2230199)

- heterozygous state
- associated with increased risk of age-related macular degeneration (yellow spot) (Yates JRW et al. 2007, The New England Journal of Medicine)



© MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH. ALL RIGHTS RESERVED.



<https://www.clayeye.com/2018/02/07/february-age-related-macular-degeneration-low-vision-awareness-month/>



# Mendelovy objevy...a chromozomy

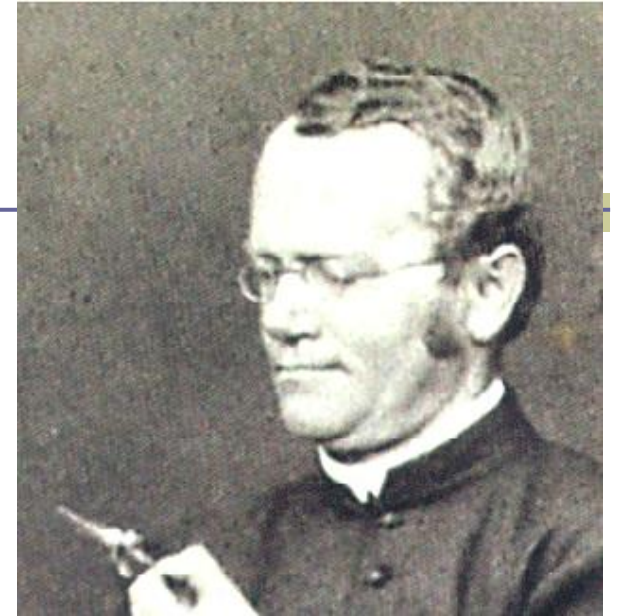
## Versuche über Pflanzen-Hybriden.

Von

Gregor Mendel.

(Vorgelegt in den Sitzungen vom 8. Februar und 8. März 1865.)

- *jednotky dědičnosti (geny) jsou materiální povahy...*
- *dědičné jednotky jsou párové...*
- *dědičné jednotky (geny) se přenášejí do další generace prostřednictvím pohlavních buněk...*
- *kombinují se nezávisle...*



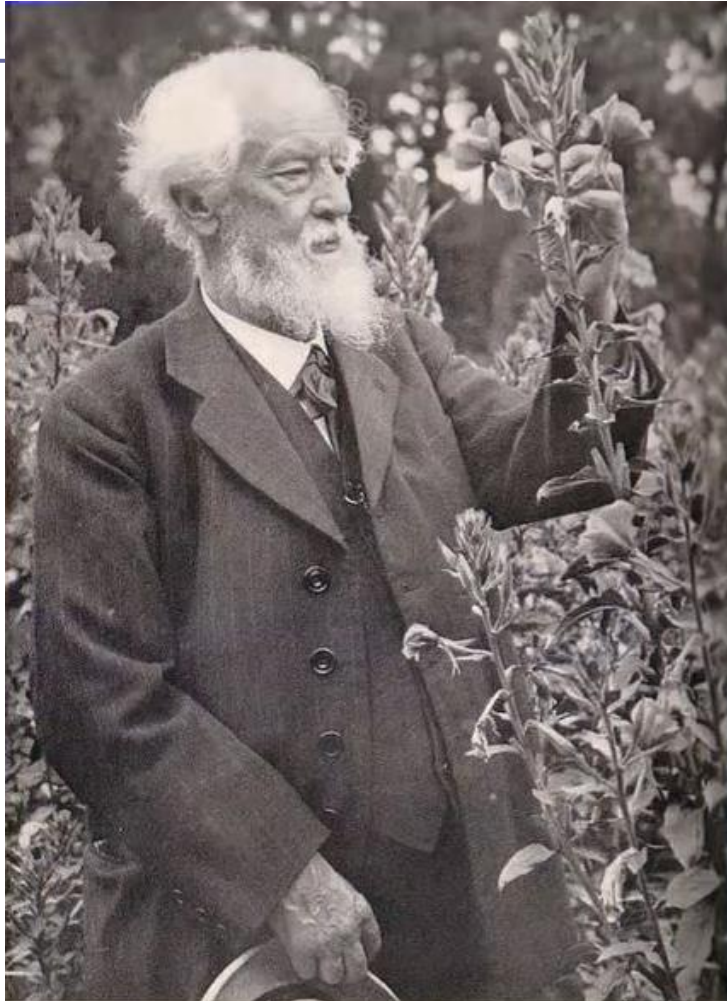


W. Johansen  
~“gen“ 1906

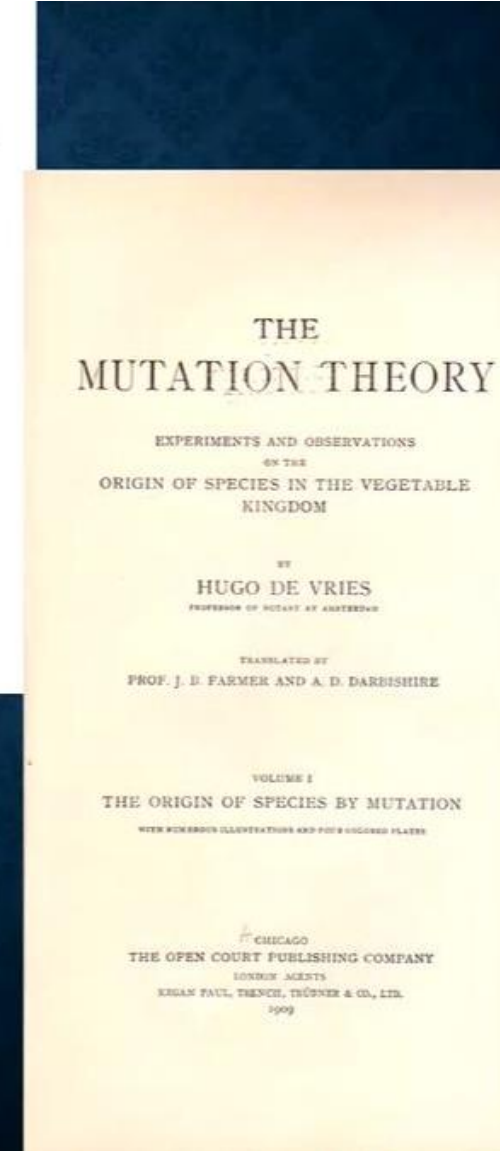


W. Bateson  
„genetika“ 1905

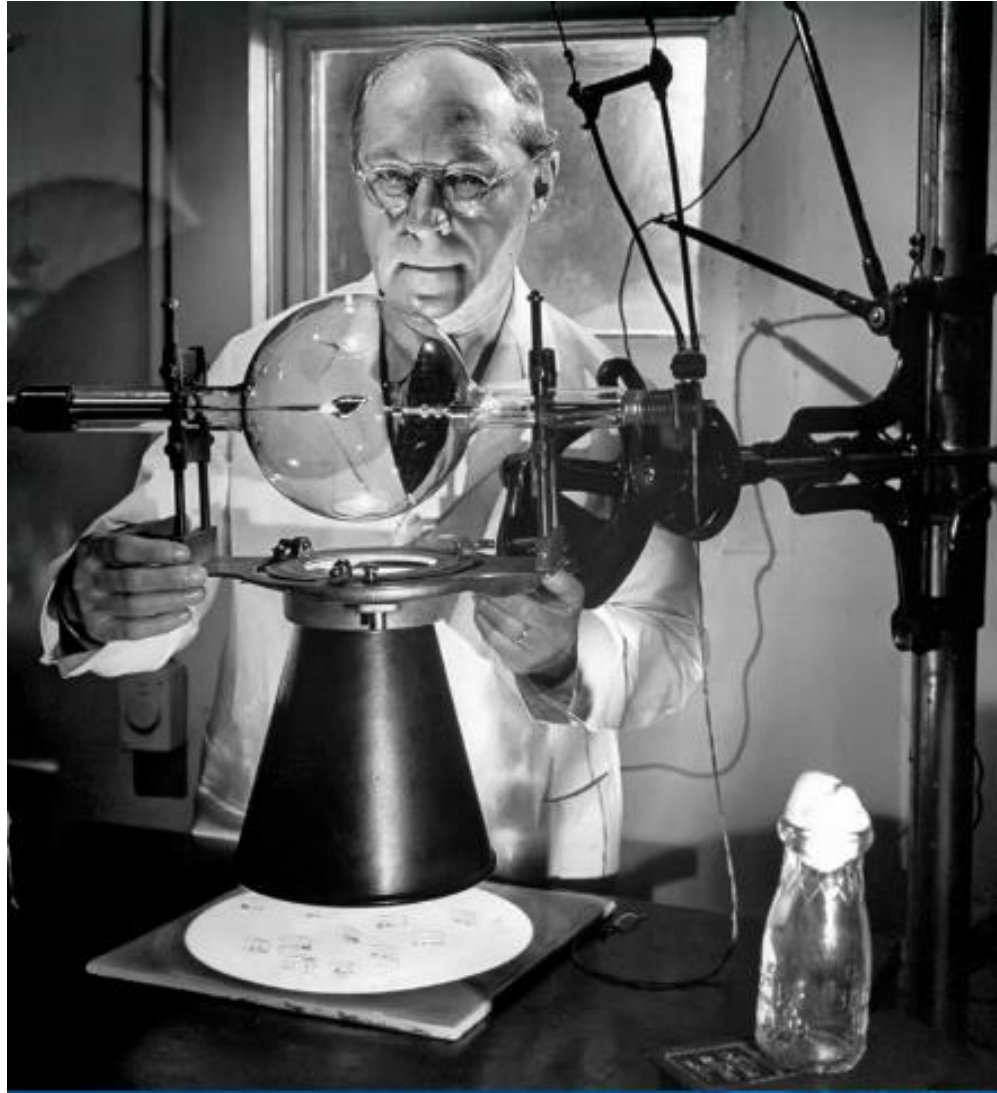
# Hugo de Vries (1848-1935)



*Hugo de Vries.*



# Hermann J. Muller (1890 – 1967)





THE MECHANISM  
OF  
MENDELIAN HEREDITY

BY

T. H. MORGAN

PROFESSOR OF EXPERIMENTAL BIOLOGY  
COLUMBIA UNIVERSITY

A. H. STURTEVANT

CUTTING FELLOW, COLUMBIA UNIVERSITY

H. J. MULLER

ASSISTANT IN ZOOLOGY, COLUMBIA UNIVERSITY

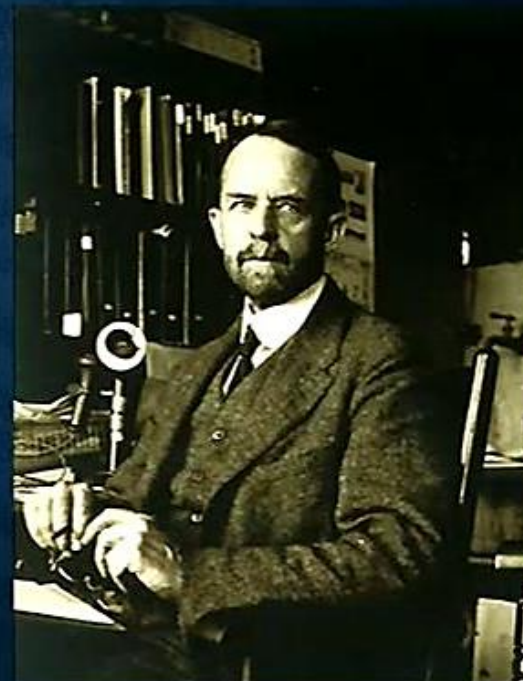
C. B. BRIDGES

FELLOW IN BIOLOGY, COLUMBIA UNIVERSITY



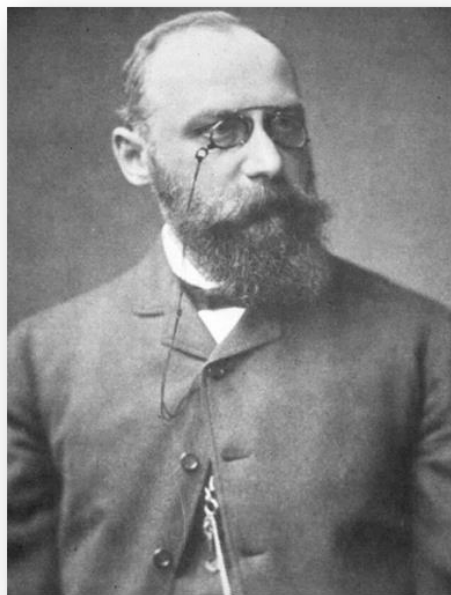
NEW YORK  
HENRY HOLT AND COMPANY

(1915)

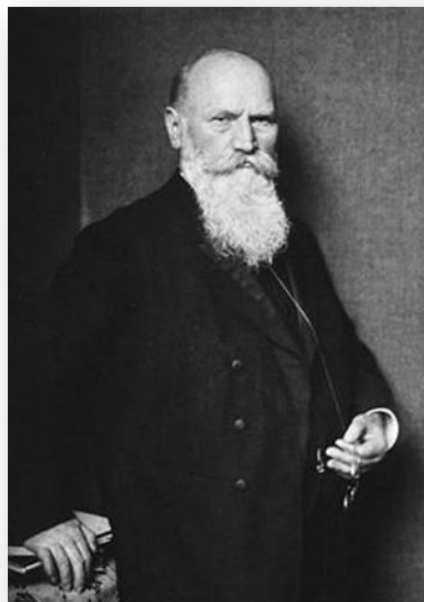


T. H. Morgan

# Od genetiky k cytogenetice...



W. Flemming (1879)  
„chromatin, mitóza“



H.W. Waldeyer (1888)  
„chromosoma“



W. Sutton (1902)  
T. Boveri (1903)



„chromozomová teorie  
dědičnosti“

*SUTTON, W. S., 1903 The chromosomes in heredity. Biol. Bull 4:231-251*

# 1921 – 1956: člověk má 48 chromozomů



Figure 1 | **Theophilus S. Painter.** Reproduced from REF. 26, courtesy of Centennial Photos, Barker Texas History Centre.



Figure 2 | *Camera lucida* drawing of a human spermatogonial metaphase made by Theophilus S. Painter. The drawing presumably shows 48 chromosomes. The cytological methods used were state of the art for the time, but it is still difficult, if not impossible, to make an exact count. Reproduced with permission from REF. 25 © (1979) Springer Verlag.

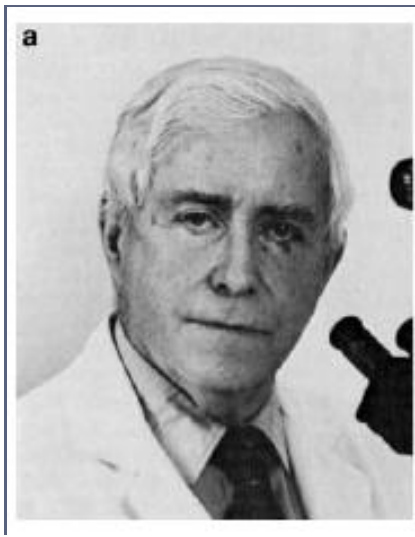
*Painter, T.S.: Studies in mammalian spermatogenesis. J. Exp. Zool. 37, 291, 1923*



# Počátek klinické cytogenetiky - správné spočítání lidských chromozomů



Joe Hin Tjio (1919 - 2001)



*Tjio, T.H., Levan, A.: The chromosome number of man. Hereditas 42:1, 1956*

Institute of Genetics, Lund

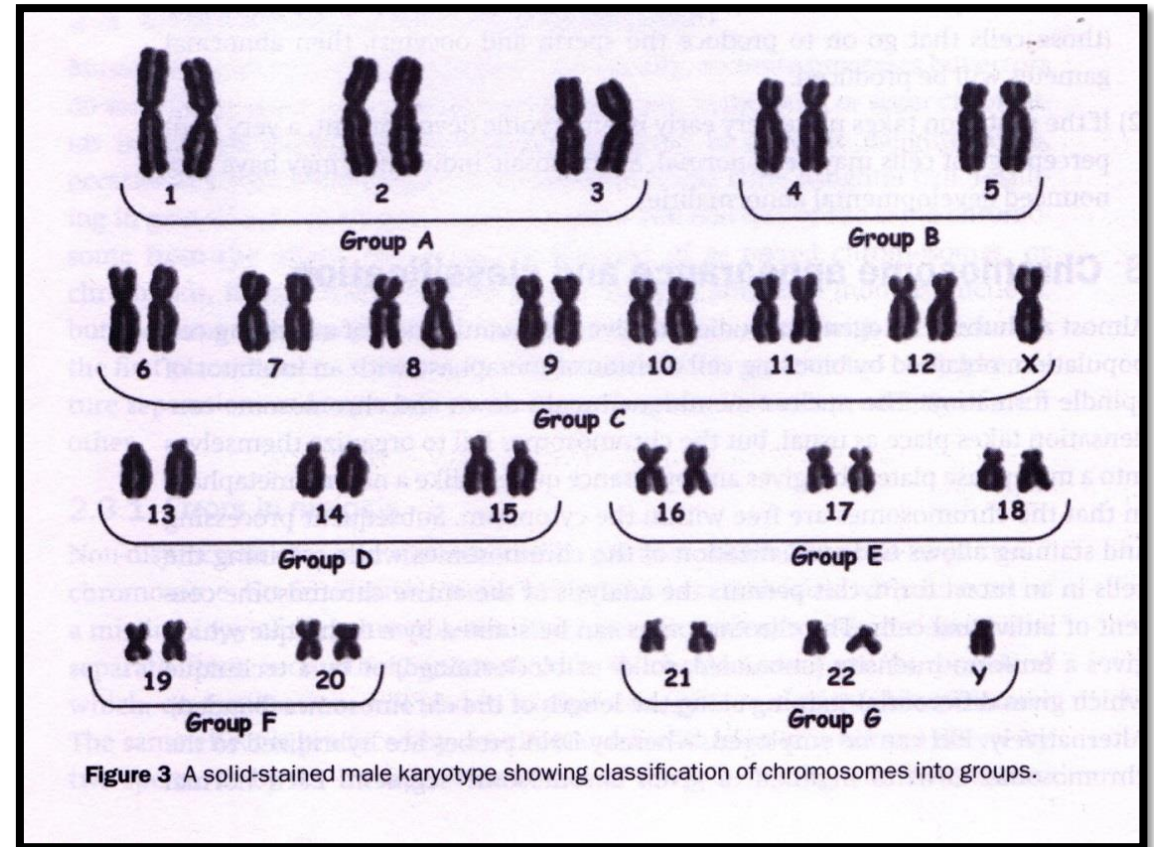
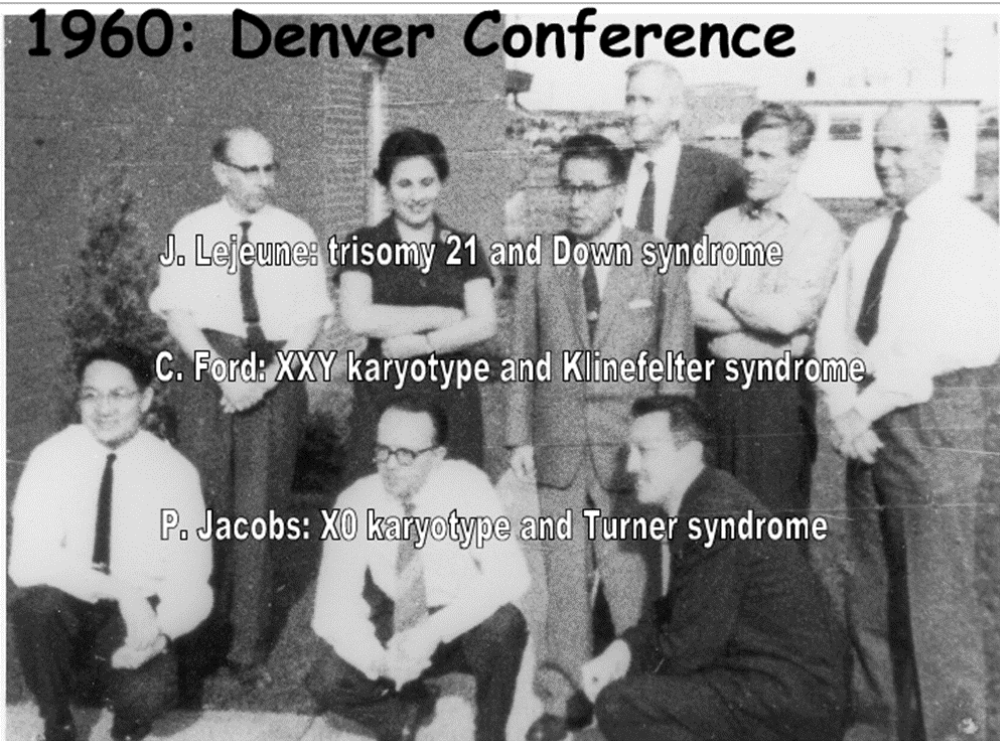
Albert Levan (1905 -1998)

1956

**Člověk má v jádře každé své tělní buňky 23 párů chromozomů,  
celkem má tedy 46 chromozomů**

# Karyotyp - konference Denver 1960, Londýn 1963

## 1960: Denver Conference



# Objev první početní a strukturní chromozomové abnormality u člověka

- **Jerome Lejeune (1926-1994)**
- **Internation Congress of Genetics, Montreal, 1958**
- **nadpočetný chromozom u 9 dětí s Downovým syndromem**
- **publikováno v roce 1959**
- **Syndrom kočičího křiku (Cri du chat)...delece 5p-**
- **publikováno v roce 1963**

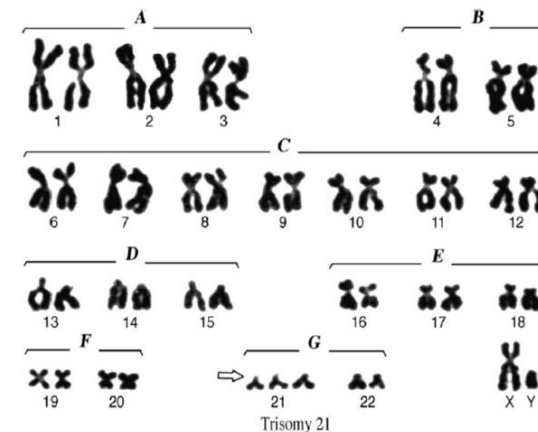
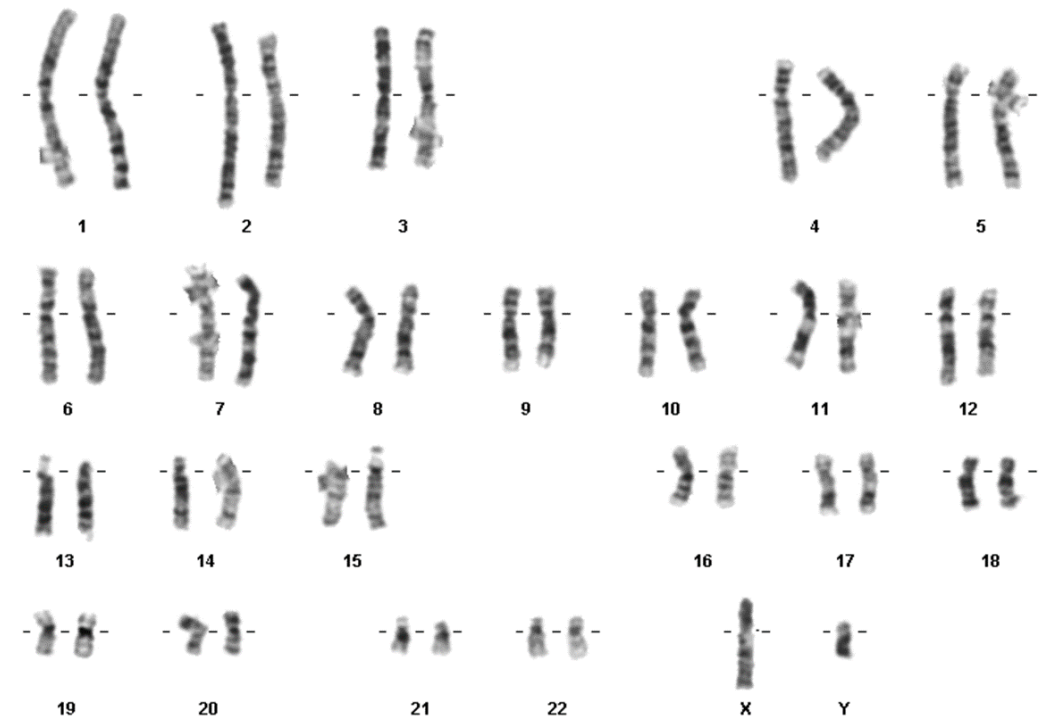
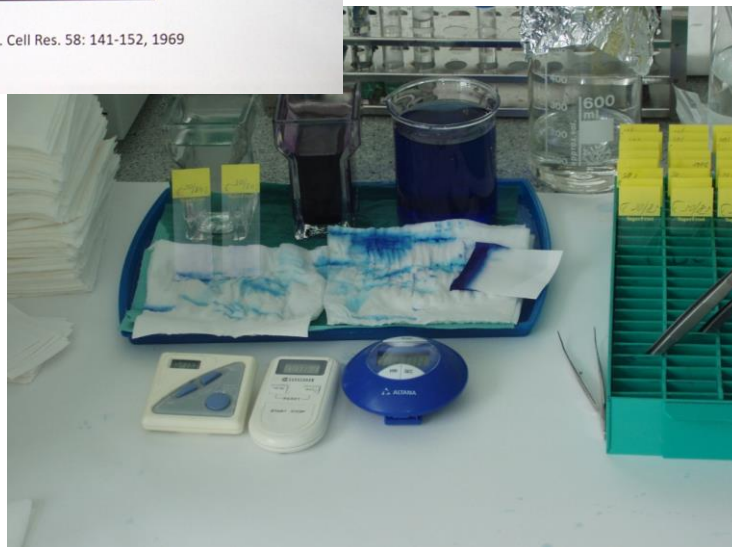
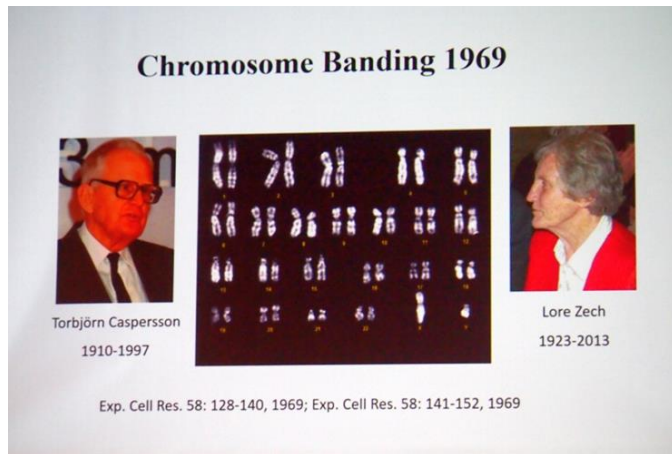


Fig. 1. Original karyotype of a trisomy 21 (Down syndrome) after "solid" Giemsa staining. Since it is impossible to recognize all individual chromosomes, they are subdivided in several groups (A-G and sex chromosomes) based on their total length and location of the centromere.



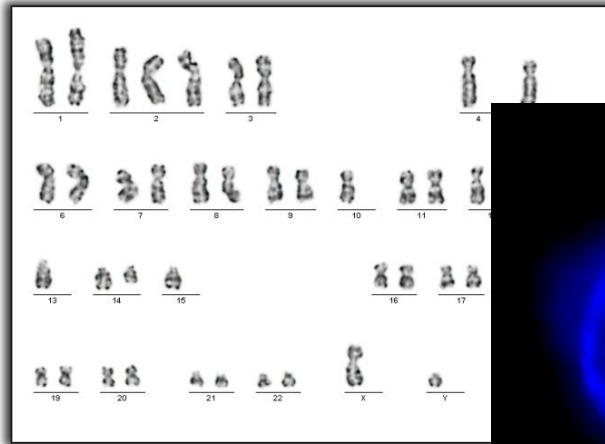
# Vyšetření karyotypu pomocí G-pruhování - 1971



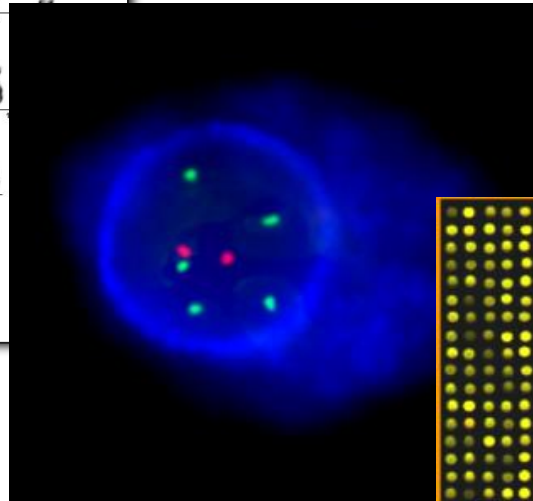
Caspersson, T., Zech, L., Johansson, C.: Analysis of human metaphase chromosome set by aid of DNA-binding fluorescent agents. *Exp. Cell Res.* 62, 490, 1970

rozlišení 5 – 10 Mb

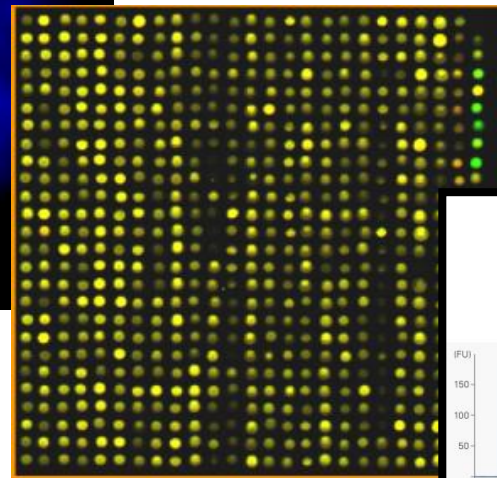
# Vývoj nových cytogenetických technik pro detekci chromozomových změn



1971 G-pruhování (5 – 10 Mb)

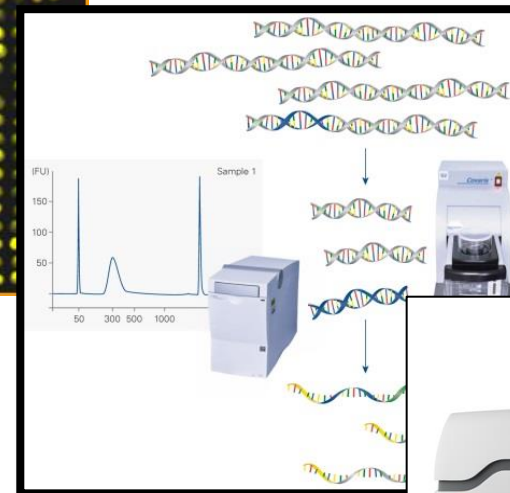


1986 Molekulární cytogenetika  
FISH (100 kb)

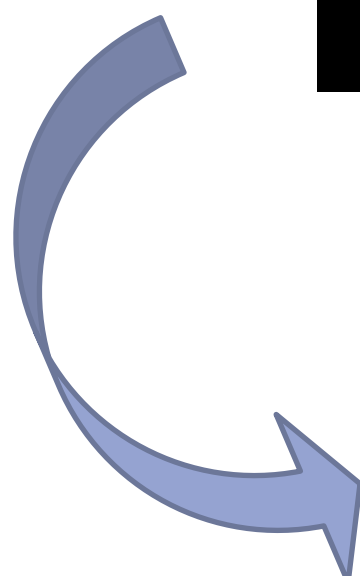


1997 array-CGH (oligo 0,06 kb)

2000 NGS



2010 Optical mapping



Od chromozomů ...k  
analýzám DNA ...





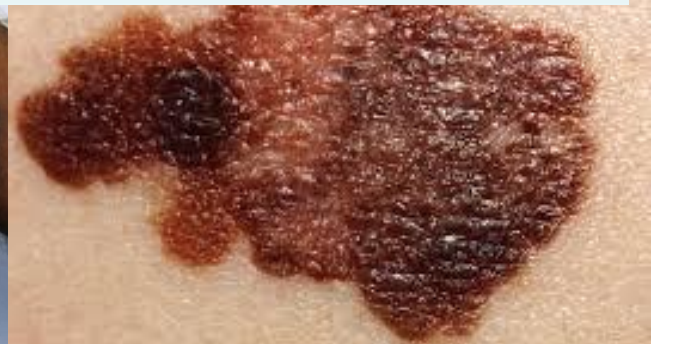
**200 years after Mendel**



**Cyto(genetics) plays an important role of medicine!**

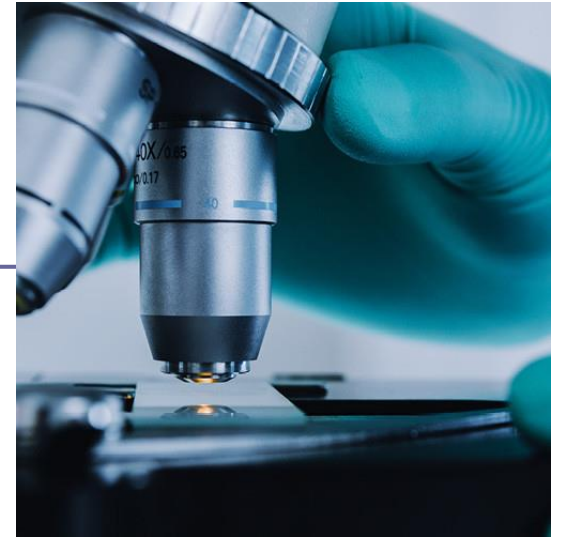


"My doctors estimated that I had an 87% risk of breast cancer and a 50% risk of ovarian cancer."





# Cytogenetika v medicíně dnes...

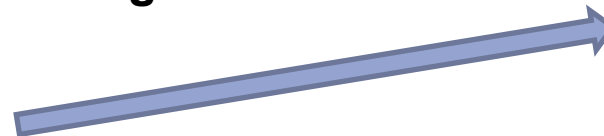


V ČR jsou cytogenetické laboratoře součástí Oddělení lékařské genetiky (velké nemocnice – Praha, Brno, Olomouc, Ostrava, Plzeň, Hradec Králové, České Budějovice...)

- soukromá pracoviště (laboratoře)...
- **20 – 30 cytogenetických laboratoří v ČR...**

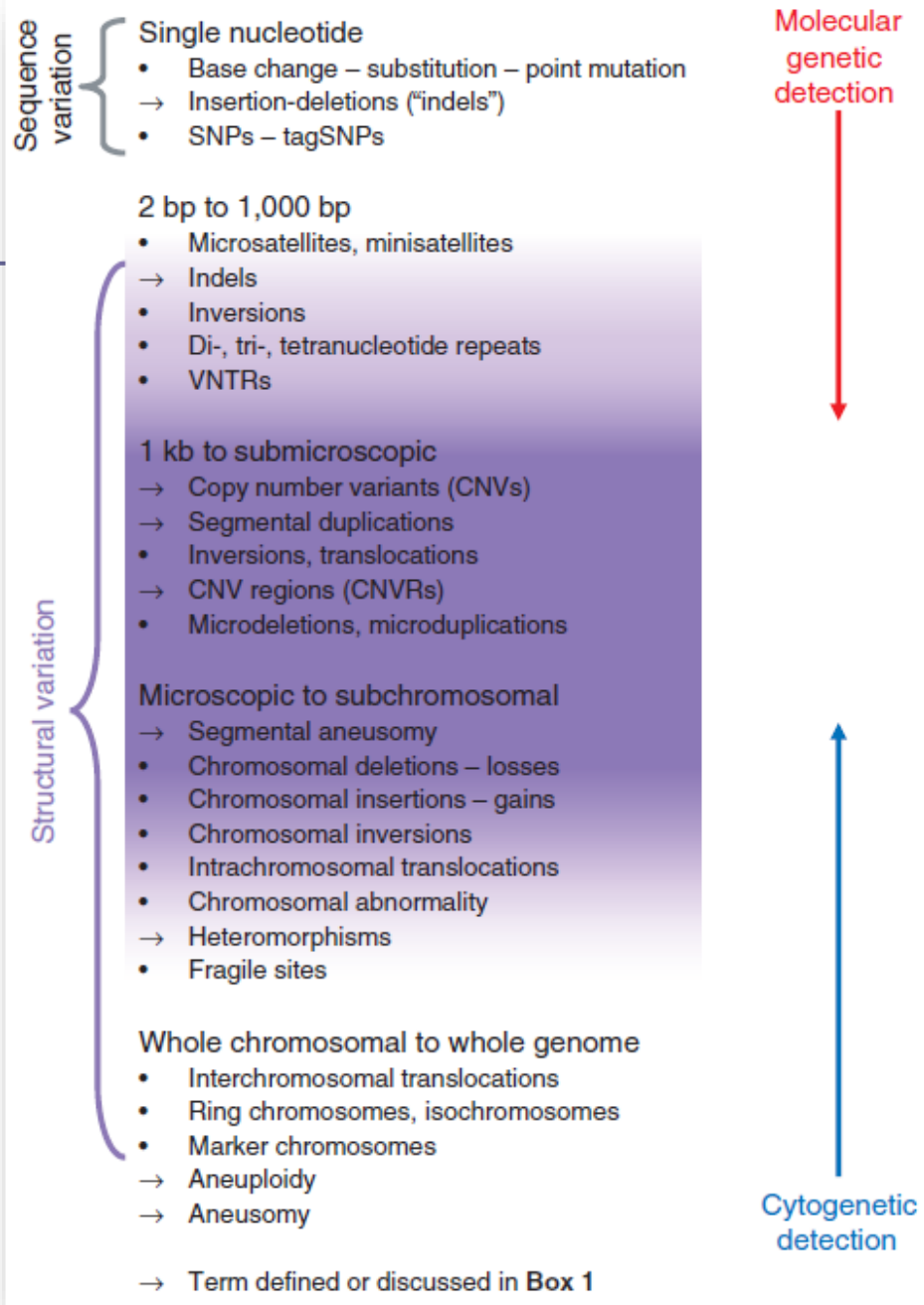
Cytogenetická laboratoř/cytogenetická diagnostika:

- a) prenatální cytogenetika
- b) postnatální cytogenetika
- c) nádorová cytogenetika

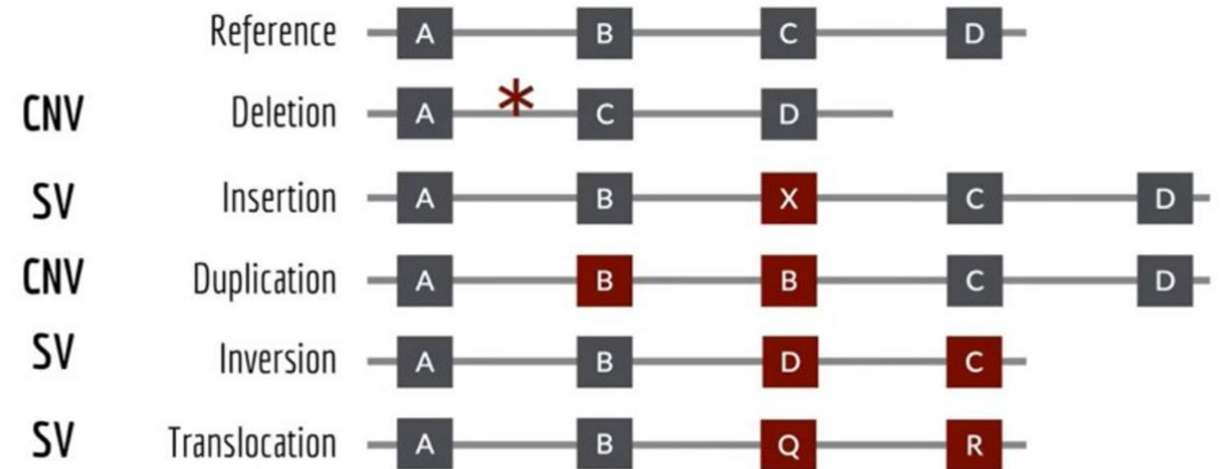


- Lékařská genetiky
- Onkologie
- Reprodukční medicína
- Pediatrie
- Kardiologie
- Patologie
- Kožní
- Neurologie
- aj

# Chromozomové aberace = strukturní variabilita genomu



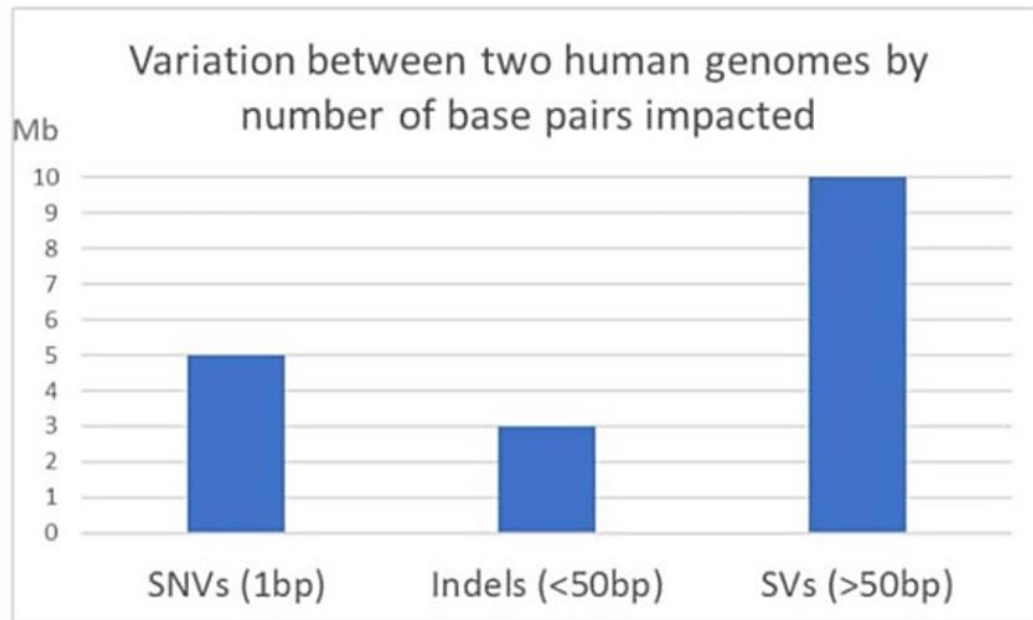
Variation in genome structure. So-called “structural variation” (SV)



Genomic structural variations (SVs) are generally defined as deletions, insertions, duplications, inversions, and translocations of at least 50 bp in size

# Strukturní variabilita genomu a její důsledky

SVs are an important source of genetic variation in the human genome and they are involved in multiple diseases, including cancer and developmental disorders.



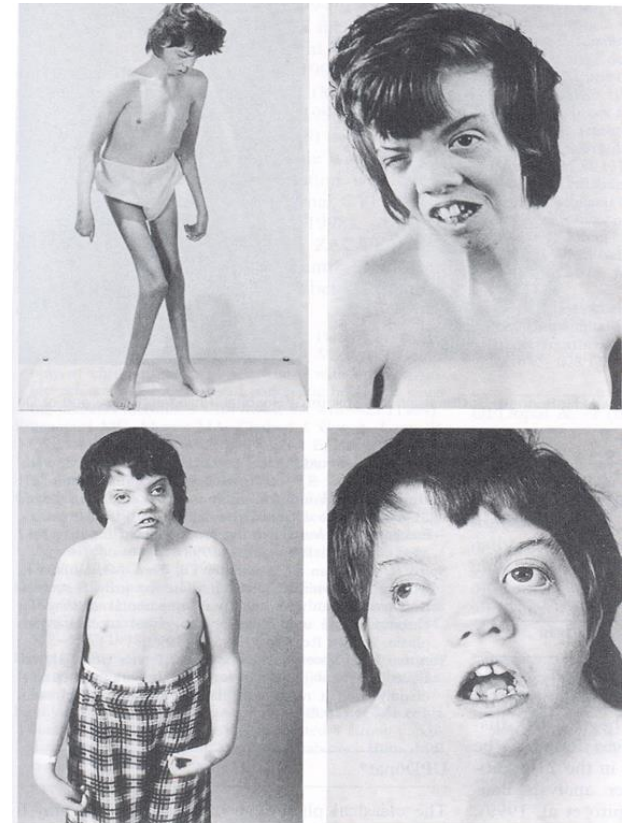
Combined from:

Shi, L. et al. (2016). *Nature Communications*.

Seo, J. et al. (2016). *Nature*.

Pendleton, M. et al. (2015). *Nature Methods*.

Huddleston, J. et al. (2017). *Genome Research*.



dup (6) (q25→qter)

Hoischen A. ESHG 2020



“Progress in science depends on new techniques, new discoveries, and new ideas, probably in that order.”

Sydney Brenner, 2002 Nobel Prize Winner



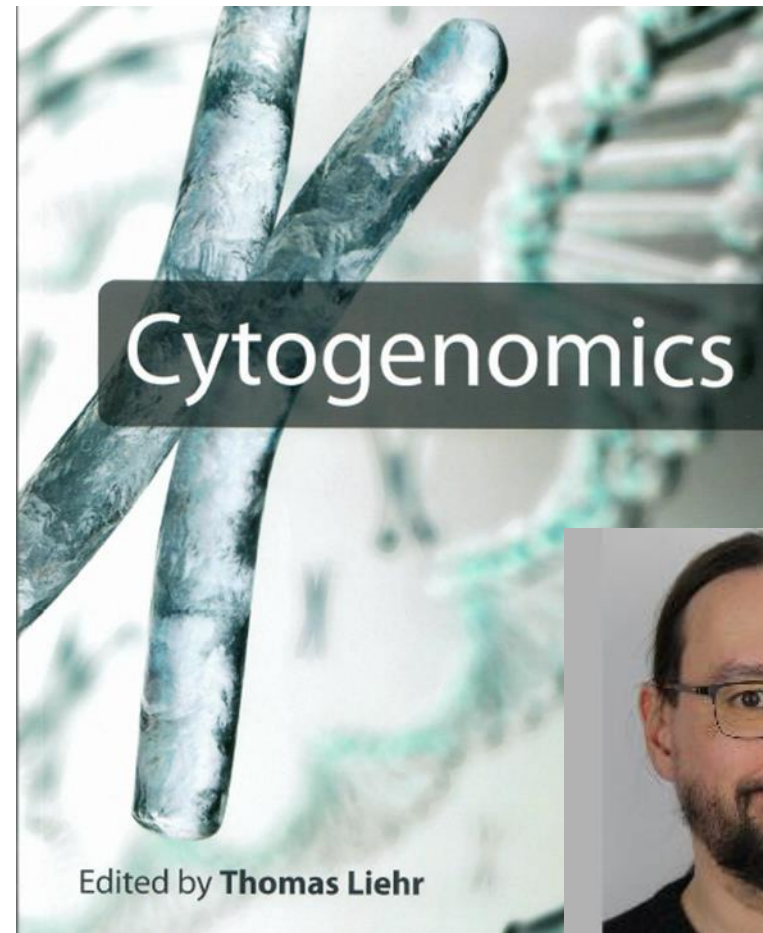
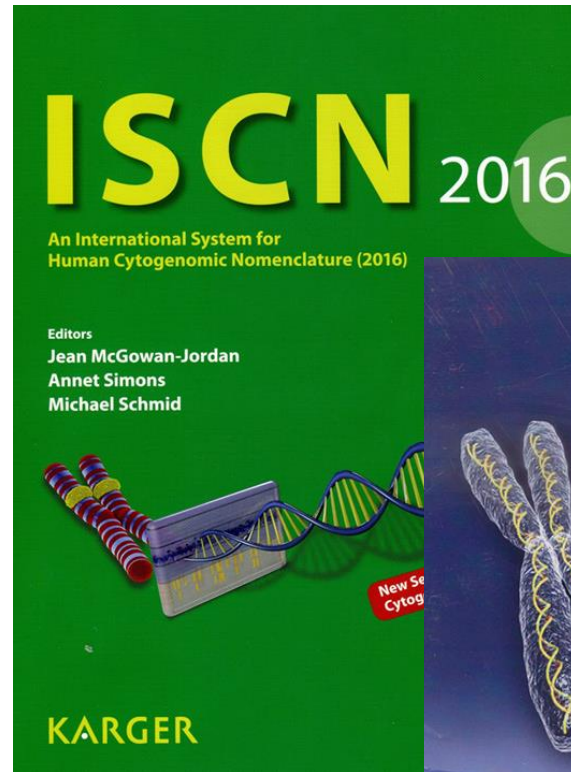
# Chromosome sequencing: the fifth and final era of cytogenetics

---

The modern history of cytogenetics fits into five eras:

- chromosome spreading
- chromosome banding
- chromosome painting (FISH)
- chromosome arraying
- **and now chromosome sequencing !!!**

# Vznik cytogenomiky aneb revoluce v cytogenetice...





# Transformace cytogenetiky v cytogenomiku

- a) stále větší využívání moderních molekulárně genetických technik (MLPA, qPCR, NGS) při studiu chromozomových poruch...
- b) integrace genomických a cytogenetických přístupů a s tím související bioinformatické analýzy...
- c) snaha zvýšit diagnostický záchyt ...poskytnout genetickou diagnózu stále většímu počtu pacientů
- d) hledání univerzální metody (testu), který by odhalil vše....“all in one“

*Review*

## From Human Cytogenetics to Human Chromosomics

Thomas Liehr

Jena University Hospital, Friedrich Schiller University, Institute of Human Genetics, Am Klinikum 1, D-07747 Jena, Germany; Thomas.Liehr@med.uni-jena.de; Tel.: +49-36451-9396850

Received: 10 January 2019; Accepted: 12 February 2019; Published: 14 February 2019



*Review*

## Chromosomics: Bridging the Gap between Genomes and Chromosomes

Janine E. Deakin <sup>1,\*</sup>, Sally Potter <sup>2,3,†</sup>, Rachel O'Neill <sup>4,†</sup>, Aurora Ruiz-Herrera <sup>5,6,†</sup>, Marcelo B. Cioffi <sup>7</sup>, Mark D.B. Eldridge <sup>3</sup>, Kichi Fukui <sup>8</sup>, Jennifer A. Marshall Graves <sup>1,9</sup>, Darren Griffin <sup>10</sup>, Frank Grutzner <sup>11</sup>, Lukáš Kratochvíl <sup>12</sup>, Ikuo Miura <sup>13</sup>, Michail Rovatsos <sup>11</sup>, Kornorn Srikulnath <sup>14</sup>, Erik Wapstra <sup>15</sup> and Tariq Ezaz <sup>1,\*</sup>

## Molecular Cytogenetics in the Era of Chromosomics and Cytogenomic Approaches

Thomas Liehr\*

Jena University Hospital, Institute of Human Genetics, Friedrich Schiller University, Jena, Germany

# Cytogenetika 21. století = cytogenomika ?

**Cytogenomics** is used as a general term that encompasses conventional, as well as molecular cytogenetics (fluorescence *in situ* hybridisation (FISH), microarrays) and molecular-based techniques (*Silva et al. 2019*).

We define “**cytogenomics**“ as the study of the numerical and structural variation of the genome at the chromosomal and subchromosomal level using methods that cover the entire genome (*Hochstenbach et al. 2020*)

The term **Cytogenomics** was intended to create a designation comprising all approaches suited to the study of genomes....with aims to collect all classical and new cytogenetic and molecular genetic/genomic a bioinformatics approaches under one roof (*Liehr 2021*)

# 21. století – konec klasické cytogenetiky aneb budeme ještě vyšetřovat karyotypy?



European Journal of Medical Genetics 59 (2016) 11–15

Contents lists available at ScienceDirect

 ELSEVIER

European Journal of Medical Genetics

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmg>



Genetic forum

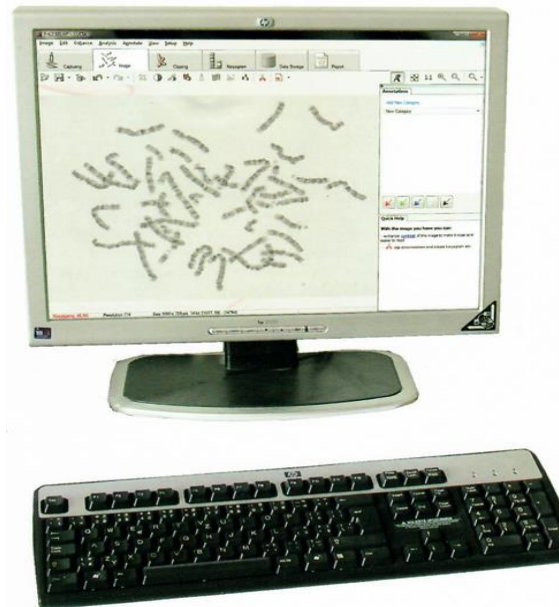
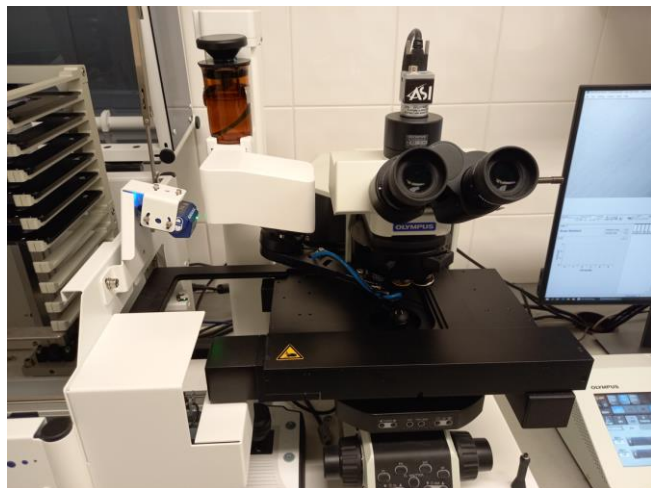
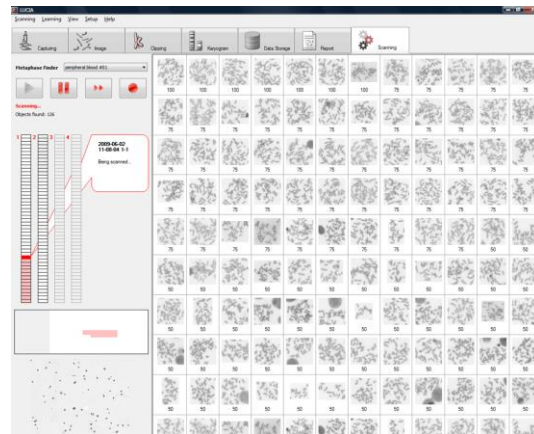
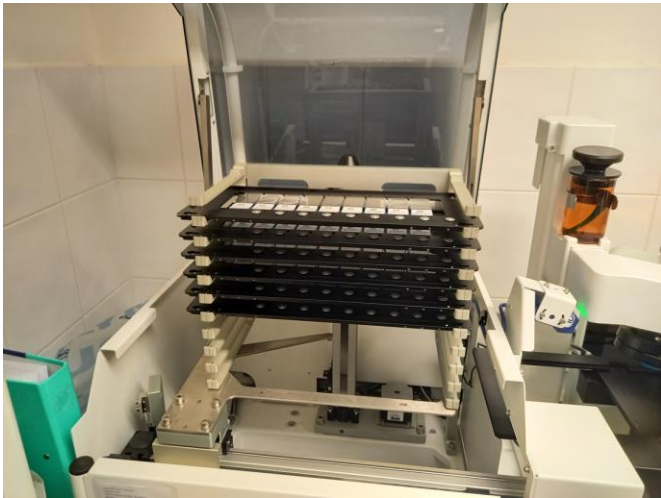
**Karyotype is not dead (yet)!**

Laurent Pasquier <sup>a,\*</sup>, Mélanie Fradin <sup>a</sup>, Elouan Chérot <sup>a,b</sup>, Dominique Martin-Coignard <sup>c</sup>, Estelle Colin <sup>d</sup>, Hubert Jourmel <sup>e</sup>, Florence Demurger <sup>a</sup>, Linda Akoul <sup>a</sup>, Chloé Quélin <sup>a</sup>, Vincent Jauffret <sup>b</sup>, Josette Lucas <sup>b</sup>, Marc-Antoine Belaud-Rotureau <sup>b</sup>, Sylvie Odent <sup>a,f</sup>, Sylvie Jaillard <sup>b,f</sup>

 CrossMark



# Karyotyp vyšetřujeme pomocí automatické vyhledávačky mitóz a analýzy obrazu



**LIM Karyotyping**  
Laboratory Imaging s.r.o. Prague

tel: +420-2-7931576  
fax: +420-2-7931577  
<http://www.lim.cz>

### Cytogenetic Report

**Patient name:** Jiří Novák  
**Personal ID:** 70 05 23/0567  
**Clinical diagnosis:** sekundární sterilita

**Case ID:** 432-00

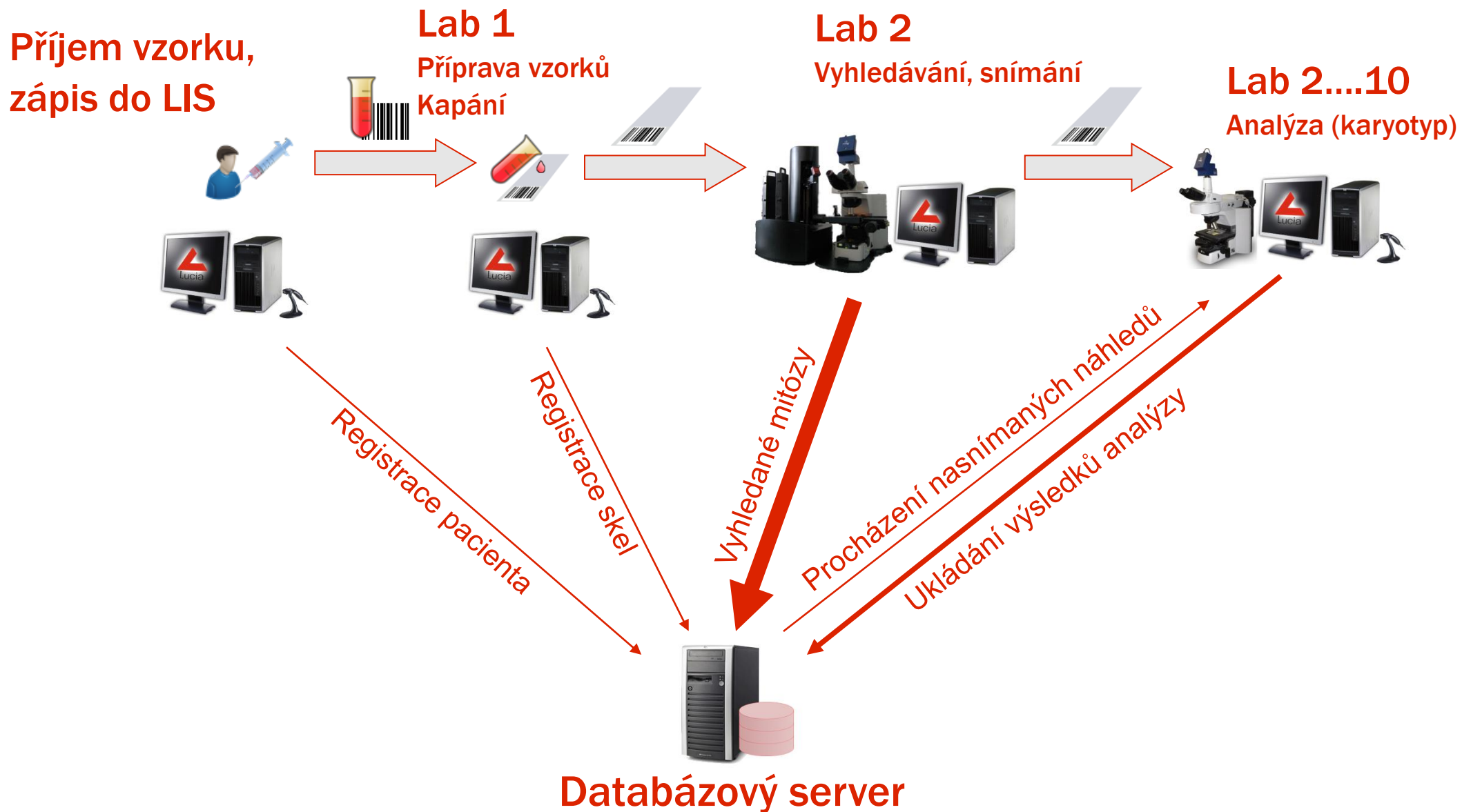
**Slide No.:** 1W  
**Material:** periferní krev

**Metaphase loc:** 58-36.6  
**Technic:** Karyo, G400

**Karyotype:** 46,XY  
**Conclusion:** v normě  
**Date:** 2000-3-20

Dr. Wemerová

# Postup zpracování vzorků při vyšetření karyotypu



# Počty vyšetřovaných pre- a postnatálních karyotypů v některých cytogenetických laboratořích v ČR v letech 2020 až 2022

Laboratoř A – Brno (V)	1900
Laboratoř B – Brno (R)	1700
Laboratoř C – Brno (H)	700
CMBG FN Brno	1200
Laboratoř Praha	7000
Laboratoř Karlovy Vary	1000
Laboratoř Pardubice	400
Laboratoř Plzeň	3200
Laboratoř Olomouc	400



Genomics of Rare Diseases

Understanding Disease Genetics Using Genomic Approaches

Translational and Applied Genomics

2021, Pages 17-34

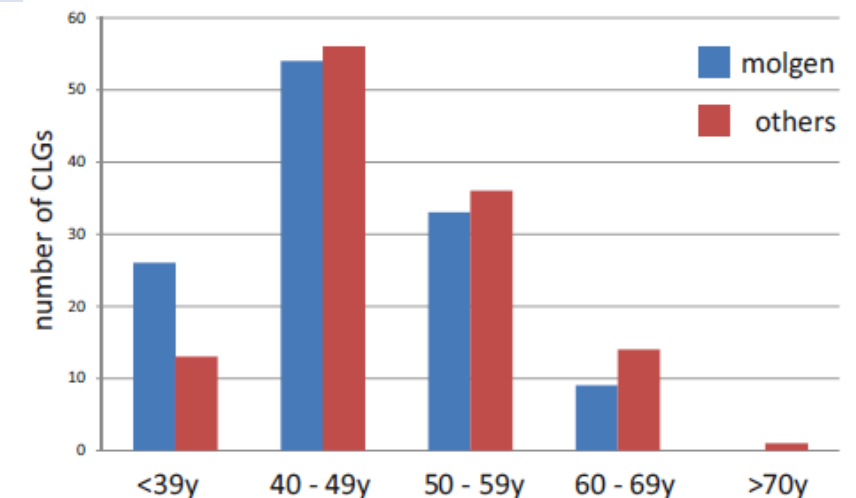


## Chapter 2 - Karyotyping as the first genomic approach

Amy Breman<sup>1</sup>, Paweł Stankiewicz<sup>2</sup>

[Show more](#) ▾

[+ Add to Mendeley](#) [🔗 Share](#) [📄 Cite](#)



Prům. věk cytogenetiků registrovaných v EBMG v roce 2019 (Hochstenbach et. al 2021)

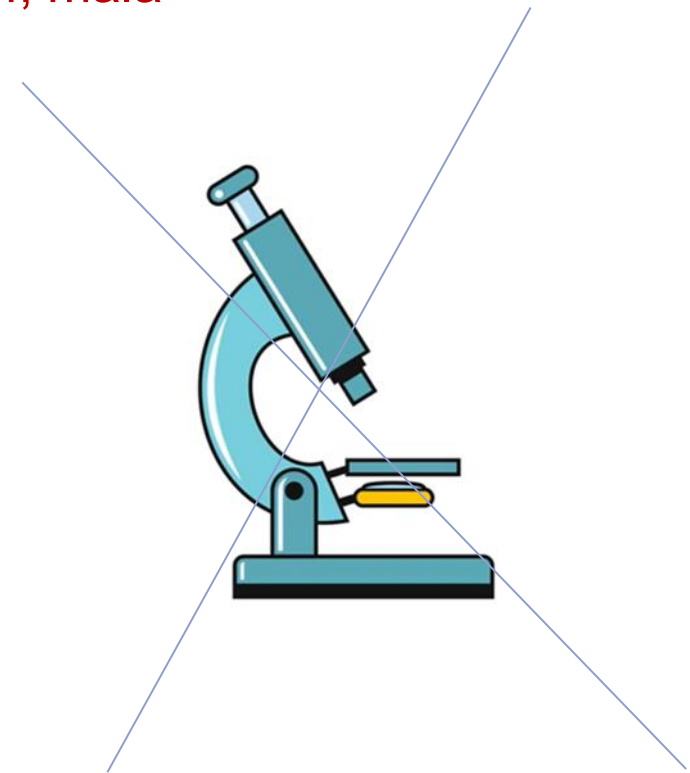


# Některé genetické diagnózy již nepožadují vyšetření karyotypu....

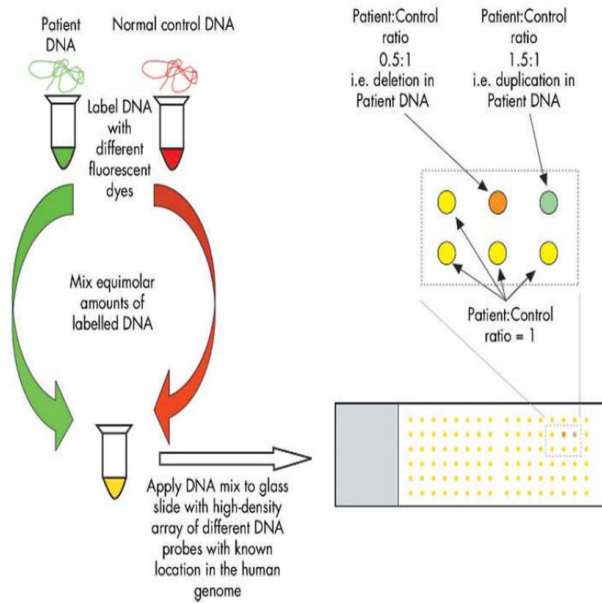
Klinické indikace pro vyšetření chromozomových abnormalit

- **problémy časného růstu a vývoje** (neprospívání, opoždění, malá postava, obojetný genitál, mentální retardace – stigmata - abnormální fenotyp)\*
- **narození mrtvého plodu a úmrtí novorozence**
- **problémy s fertilitou, opakované aborty**
- **rodinná anamnéza** (známá chromozomová abnormalita u příbuzných I. stupně)
- **těhotenství u žen** (abnormální UZ či výsledky biochem. screeeningu, pokročilý věk, chrom. aberace u rodiče...)\*
- **nádorová onemocnění**

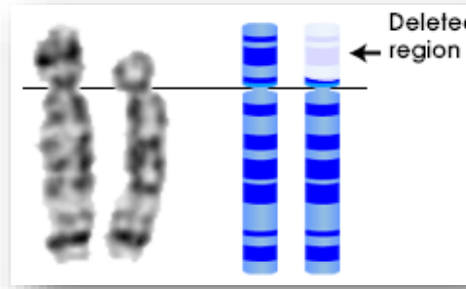
➔ **\*odborná doporučení: array-CGH (mikročipy) namísto karyotypu...jako prvoliniový test..**



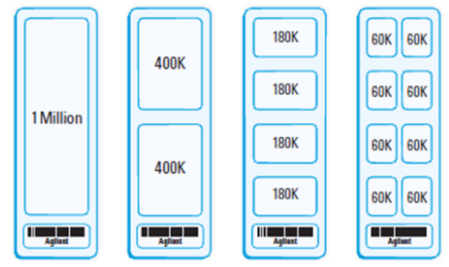
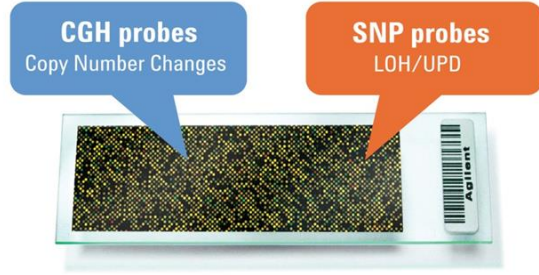
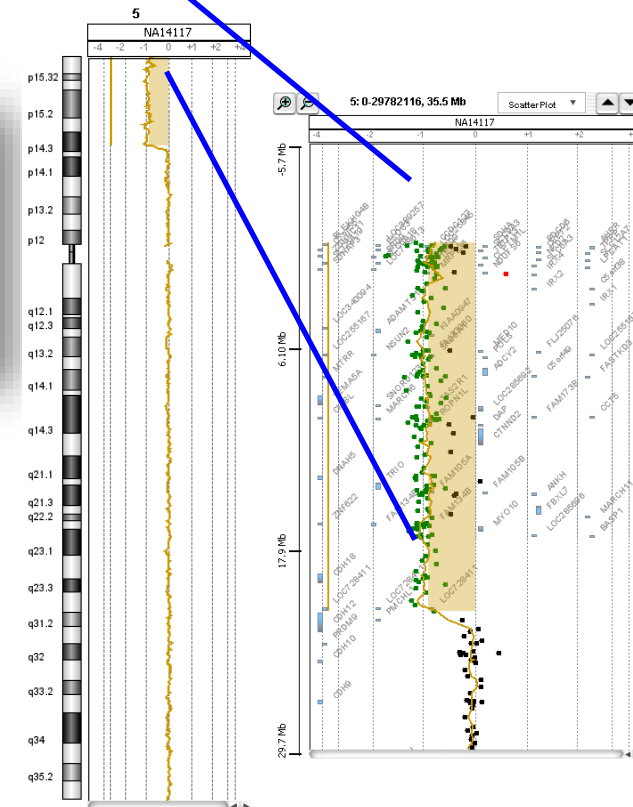
# Array CGH: ~ 1000-krát větší rozlišení nebalancovaných změn než klasická cytogenetika, ale nedokáže detekovat balancované přestavby chromozomů...!!!



Tradiční karyotypování  
5-10 Mb



Microarray CGH 50-100 kb



# Doporučení SLGG



Společnost lékařské genetiky a genomiky

České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně, z. s.

Society of Medical Genetics and Genomics

Czech Medical Society of J. E. Purkyně

Sokolská 31, 120 26 Praha 2, Czech Republic, tel.: +420 224 266 201-4, fax: +420 224 266 212, e-mail: cls@cls.cz, www.cls.cz

## Doporučený postup genetického diagnostického prenatalního vyšetření (prenatální diagnostiku, PND).

*Schváleno na schůzi výboru SLG ČLS JEP dne 11. 12. 2019 s platností od 1. 1. 2020*

Základním předpokladem provedení PND je klinicko-genetické vyšetření obou partnerů provedené lékařem se specializovanou způsobilostí v oboru lékařské genetiky dle ustanovení zákona 373/2011 Sb. § 28-29 v aktuálním znění.

### Nejčastější indikace PND:

- 1/ Prekonceptně definované riziko genetické vady u plodu
- 2/ Pozitivní osobní a/nebo rodinná anamnéza dědičného onemocnění
- 3/ Výsledek prenatalního screeningového vyšetření (multimarkerové systémy, NIPT kontingenční test, ultrazvukový nálezy)
- 4/ Teratogenní riziko (např. intrauterinní infekce Cytomegalovirem, Toxoplasmou)
- 5/ Ad libitum (např. věk matky, anxiosita)

PND musí být prováděna laboratoří a metodami akreditovanými dle ČSN EN ISO 15189 dle ustanovení § 28–29 zákona 373/2011 Sb. v platném znění. Používané metody musí být akreditovány.

### Metody PND:

#### A: Základní vyšetření

Základním vyšetřením při PND jakékoliv indikace je vyšetření nebalancovaných chromosomových (genomových) aberací, které nejčastěji vznikají *de novo* a většinou mají závažný klinický obraz.

1/ Metodou první volby při definovaném riziku častých aneuploidií je stanovení počtu chromosomů č. 13, 18, 21, X a Y rychlou kvantitativní fluorescenční polymerázovou reakcí (QF-PCR) zaměřenou na chromosom specifické délkové polymorfismy (Short Tandem Repeats – STR). Toto vyšetření je indikováno hlavně při pozitivním výsledku multimarkerového screeningu nebo při ultrazvukovém nálezu suspektním na časté aneuploidie (např. vyšší nuchální translucence plodu).

Výsledek vyšetření je k dispozici řádově do 1-2 pracovních dnů, což je důležité především v případě CVS vzhledem k možnosti včasného ukončení gravidity při průkazu patologie.

Porovnáním DNA profilů matky a plodu v oblasti STR markerů je v odebraném materiálu testována přítomnost ev. mateřské tkáně (maternální kontaminace). Metodou QF-PCR mohou být vyšetřeny i jiné aneuploidie (například časté aneuploidie produktů koncepce z abortů), polyploidie nebo významné mozaiky.

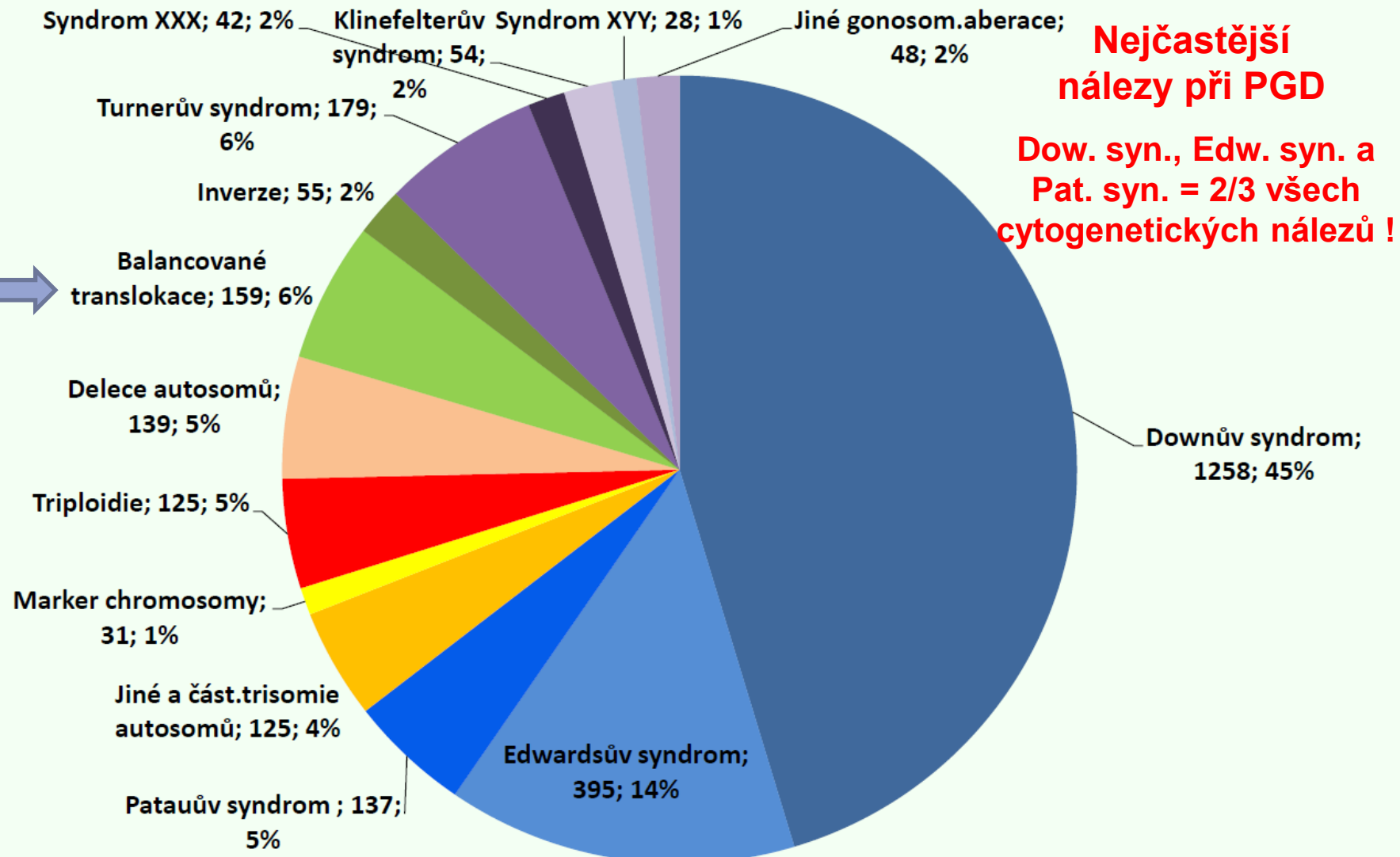
2/ Další metodou, která může být indikována buď primárně (například u mnohočetných vad plodu) nebo následně po vyloučení častých aneuploidií pomocí QF-PCR, je celogenomová chromosomální microarray (Chromosomal Microarray Analysis, CMA). CMA vyšetřuje submikroskopické změny počtu kopií chromosomů – mikrodelece / mikroduplikace (Copy Number Variation, CNV) s citlivostí 50-100 Kb. CMA pokryje spektrum všech mikroskopických chromosomových nebalancovaných aberací vyšetřovaných standardní karyotypizací a je 100-1000× citlivější. CMA na rozdíl od karyotypu nezjistí balancované chromosomální přestavby a nízkofrekvenční chromosomální mozaiky.

3/ V určitých indikacích (například při familiární translokaci nebo pro verifikaci nálezu jinou metodikou) je indikováno klasické vyšetření karyotypu plodu, i po již provedené analýze CMA.

4/ Sekvenování nové generace (NGS) – prenatalní vyšetření exomu (WES): Toto vyšetření může být indikováno ve specifických indikacích při negativní CMA (například při opakovaném výskytu vad plodu, vyšší nuchální translucence nebo suspektním fenotypu plodu). Vzhledem k technické a časové náročnosti jsou výsledky prenatalního WES používány převážně pro zpřesnění prognózy následující gravidity. Prenatální WES je zaměřeno na mutace v protein kódujících oblastech genomu, které sice představují jen asi 1–2 % celkové genetické informace (genomu), ale jsou příčinou až 85 % chorob s genetickou etiologií. Při dostatečně hloubce sekvenace je možné při WES detekovat kromě SNP a malých insercí a delecí i varianty počtu kopií (CNV) s vyšší citlivostí než většina technik CMA (~ 40 Kb). Teoreticky je možné pomocí WES detekovat CNV na úrovni exonu (~ 200 bp) a též chromosomální aneuploidie a jejich mozaiky.



# Prenatální diagnostika chromozomových aberací v ČR 2011-2016



# Masivní paralelní sekvenování – NGS a cytogenetika

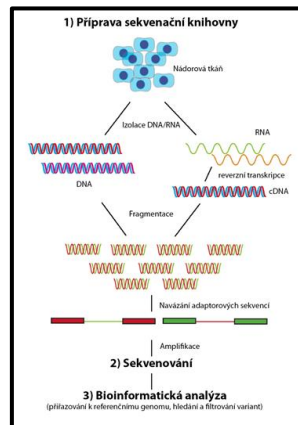
## Princip

- nové typy sekvenátorů (odtud NGS – next generation sequencing) umožňují **paralelní sekvenování až tisíců molekul DNA současně** = nižší náklady, úspora času....

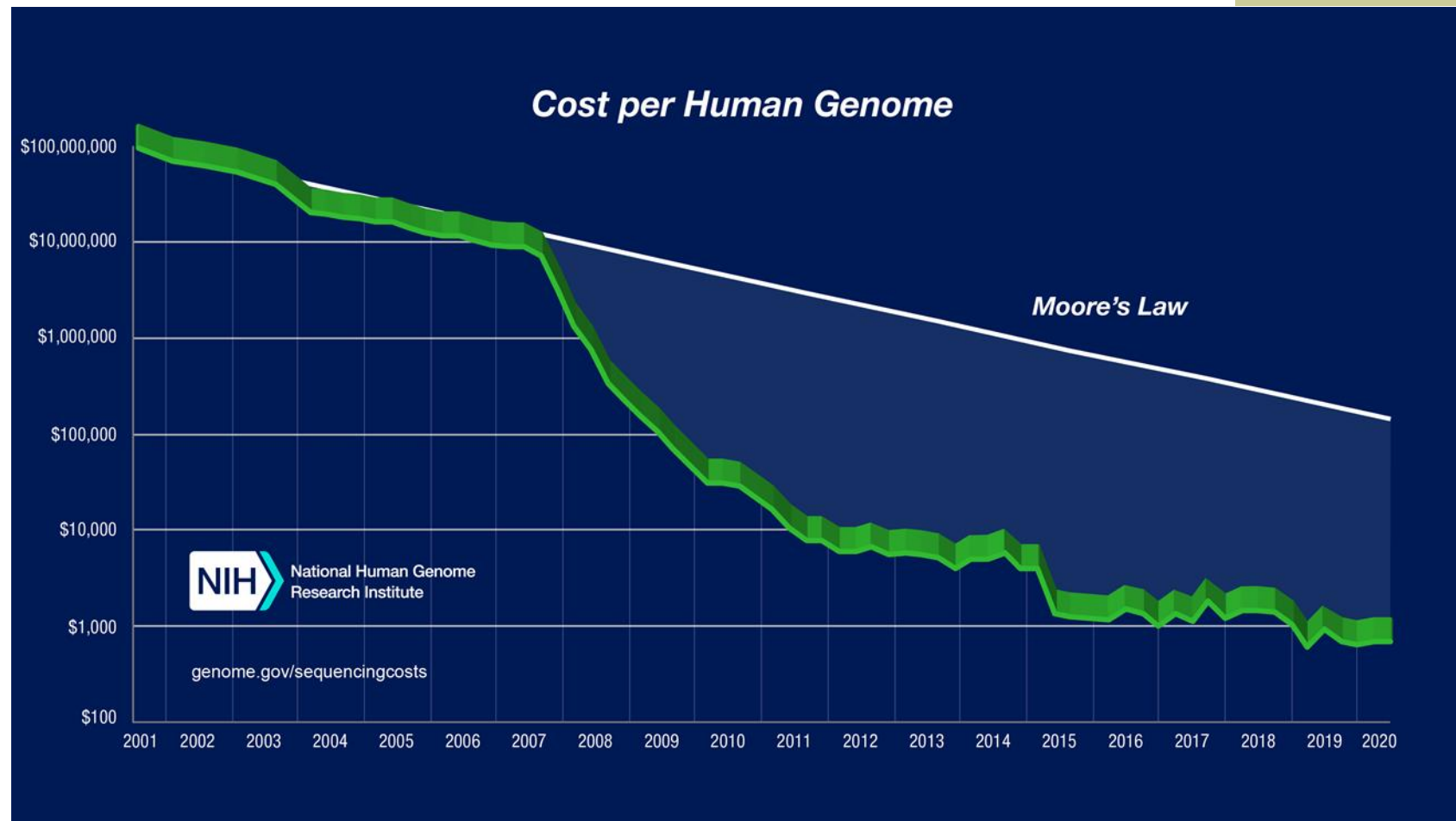
## Workflow

- izolace DNA
- fragmentace
- příprava templátu neboli vytvoření knihovny ampliconů - amplifikace
- sekvenování a detekce inkorporovaných nukleotidů
- analýza dat – bioinformatické zpracování

- Cílené (panel genů)
- Exomové (WES)
- Celogenomové (WGS)



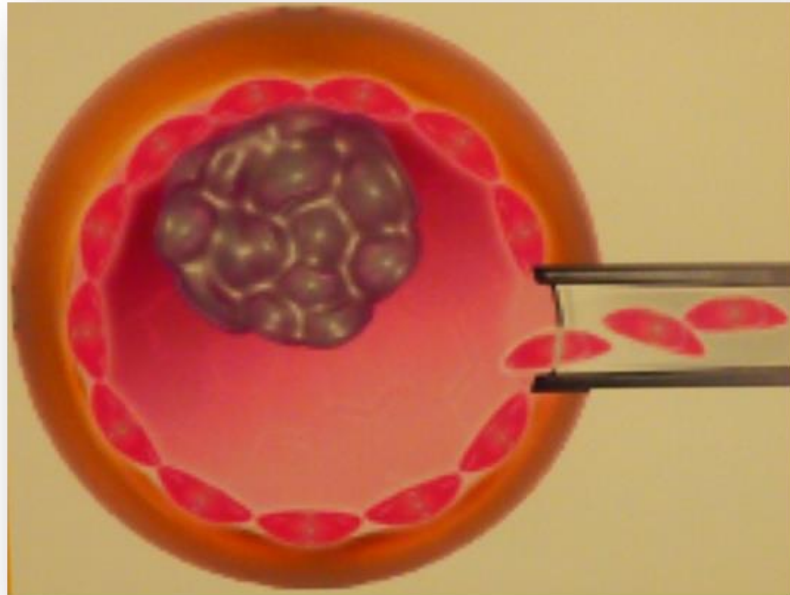
# NGS je stále levnější.....



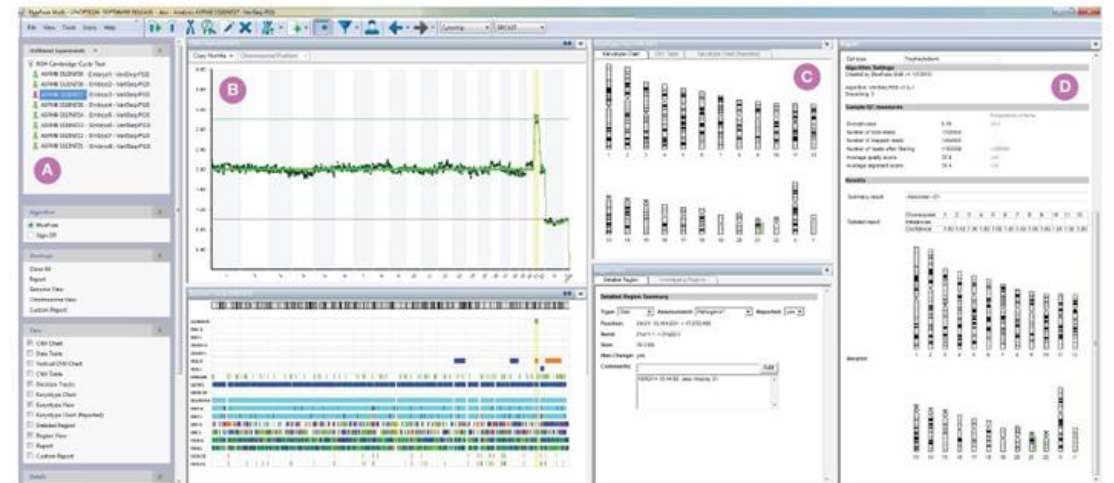




# Preimplantační genetický screening aneuploidií pomocí NGS

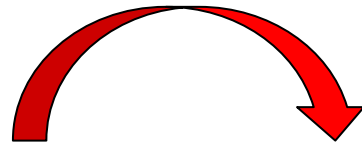
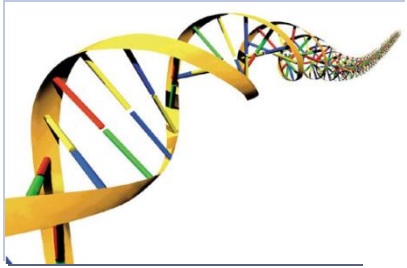


- biopsie embrya 5.- 6. den (blastocysta)
- analýza 5 – 10 buněk
- vitrifikace embryí po odběru –
- dostatek času pro vyšetření NGS
- transfer zdravého embrya



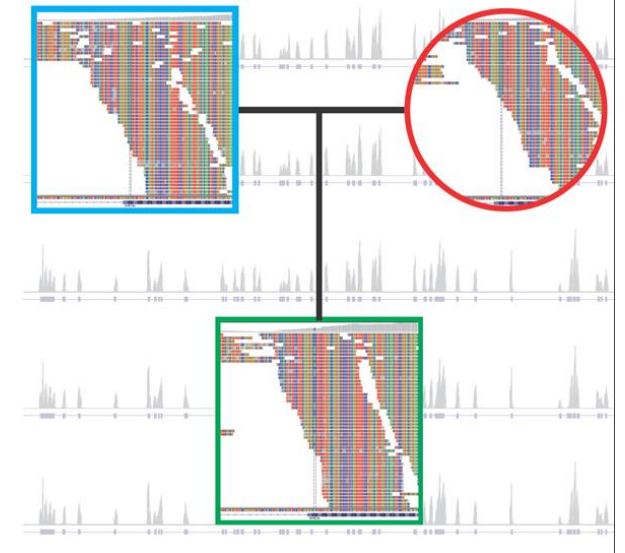
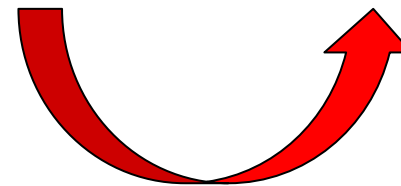
BlueFuse software provides a complete solution for analyzing, storing, and reporting VeriSeq results. A. Sample database shows experimental information. B. Profiles for the sample (top) and DecisionTrack information (bottom). C. Karyotype chart for whole-genome view (top) and region view with the opportunity to annotate (bottom). D. Reports per embryo or per cycle (embryo report shown).

# Nahradí NGS genomu vyšetření karyotypu u dětí s neurovývojovým postižením?



Genome  
with 'all' variation

```
TTAACCCTTCGAATGCTCATCAAATCGTATCTCCGAAAATGCTTTTATG  
TATCTTACTCCACCACATAATCTACGAACATCAATGTTTATGATGGTCAG  
GTTTGTAAACAAGTATTGAACTGTATAACGCAAGAGTTGCTAATAATGA  
GCAAAATACAAAATCTTGGATTCTATCGATAACAGCCGAGGTGCCAATC  
TACAAATAAAAAGCTTACTTTGGATCTTTGACAGGTGGACACTCAAAGAA  
TGCGAAGTTAATTAATGGCAAACGTTCTCGAGACTGCCAGAGCTTAAT  
TCTATGAATAAACTGGCTTATTGAACTACCATCTTACATTTAAACAAGT  
TGTTGCTTTTAAATCACTTACGAAAGATAACACTACTCAAAGCTTCAA  
AAGCTTTCTAACATATACAAAAGTGATCATAACTCGAAAATCCTTATAT  
GATTTAGCACAGAAGATGGATTTAACCTTGGCTCCTAATTCGGTGATA  
AAAAAGAAAGAGGAGGTTGGTTTGTAACTATTTGCAGACATCCATCTATC  
CTAATTCCAATCTGGTATAATAAAAGATCAGAAGGGTTTACTATTACAT  
ACAATTTGCACATCTTTTAACTCGATTTGATGGAGATGAGATGACAAAT  
CAAATCCCATGTGCCAATCTCGAACAAGCTTTGATTATGAACACAGAAAT  
AAAATCTATAACAAGCAATCCAATCTCGGCTGGTCCAAGATCAAATACC  
AATAGTTATATAGACCACAAAATATACATATAACGATGCGTGGTGAAT  
ATCCGATTCCTGTTACACTCGAAAAGATAATATACCCGAAAAGATAT
```



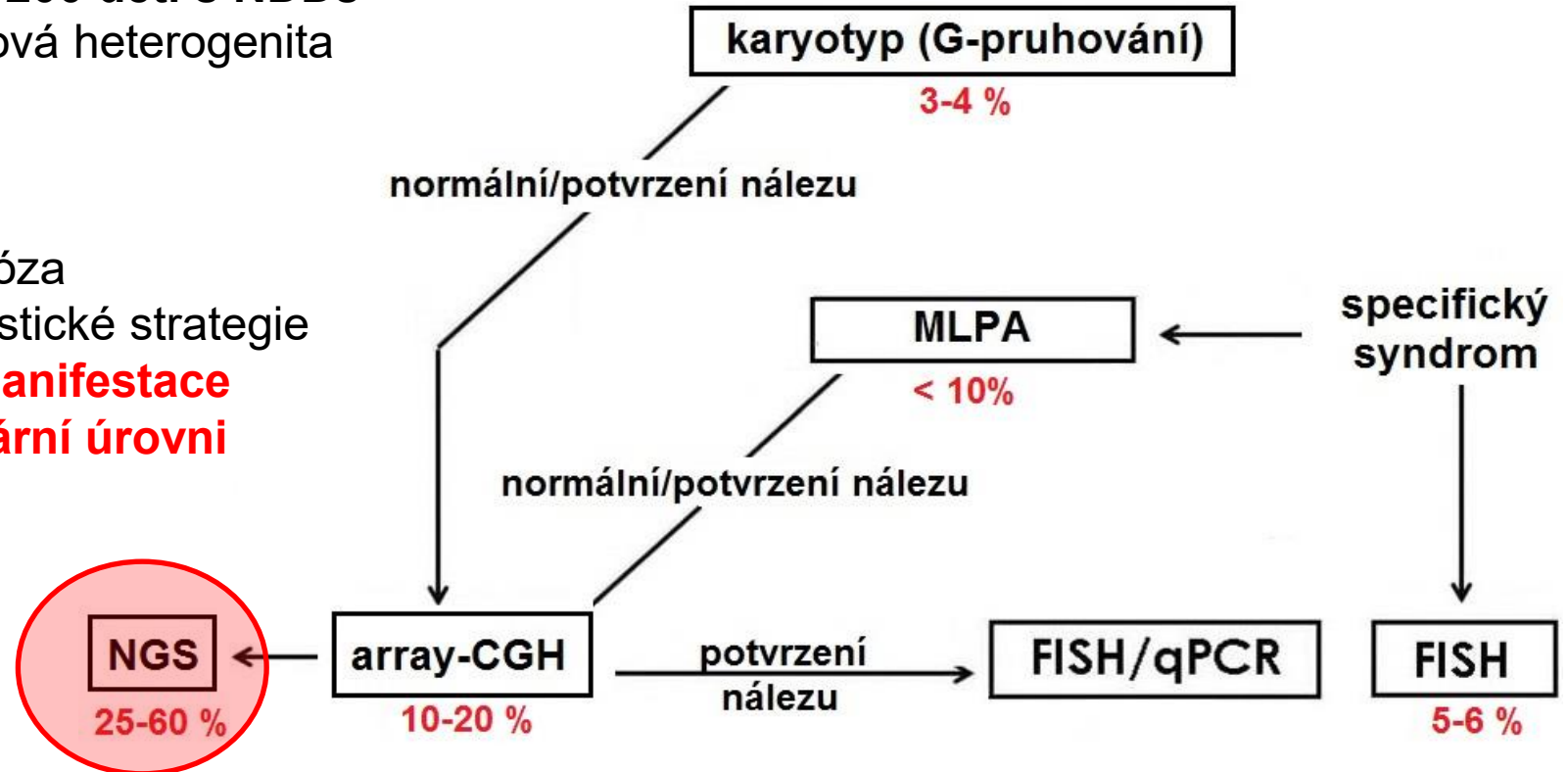
```
A-G-C-T-A-C-T  
| | X | | | |  
T-C-A-A-T-G-A
```

- detekce *de novo* bodových mutací, indel, CNVs – analýza tria – rodiče - dítě



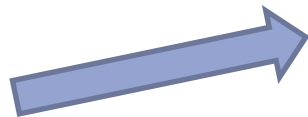
# Strategie vyšetření dětských pacientů s neurovývojovými onemocněními Ústav lékařské genetiky a genomiky FN Brno (ÚLGG FN Brno)

- V současnosti každoročně > 200 dětí s NDDs
- Výrazná genetická a fenotypová heterogenita
- Komplexní přístup
  1. Správná klinická diagnóza
  2. Volba optimální diagnostické strategie
  3. **Identifikace příčiny manifestace patologií na molekulární úrovni**
  4. Genetické poradenství



Výzkumný grant AZV ČR NU20-07-00145 „*Úloha patogenních genetických variant detekovaných pomocí exomového sekvenování v etiologii dětských neurovývojových onemocnění*“

# NGS má větší diagnostický záchyt....ale



## high diagnostic yield of WES/WGS in referrals for postnatal karyotyping

referral reason	diagnostic yield of karyotyping/FISH	number of cases	diagnostic yield of NGS	target genes	reference
recurrent pregnancy loss	2.3%	2 couples	100%	WES	Ellard et al. (2015) <i>Eur J Hum Genet</i> 23:401-404
products of conception	11.0%	19 families	42%	WES	Shamseldin et al. (2015) <i>Genome Biol</i> 16:116
		4 couples	50%	WES	Qiao et al. (2016) <i>Mol Hum Reprod</i> 22:364
		19 couples	5%	WES	Fu et al. (2018) <i>Mol Med Rep</i> 18:2027-2032
multiple congenital anomalies; developmental delay; mental retardation; intellectual disability	8.5%	100 patients	27%	WES	Gilissen et al. (2014) <i>Nature</i> 511:344-347
		50 patients	42%	WGS	Gilissen et al. (2014) <i>Nature</i> 511:344-347
		78 patients	41%	WES	Srivastava et al. (2014) <i>Ann Neurol</i> 76:473-483
		362 families	29%	WES	Sawyer et al. (2015) <i>Clin Genet</i> 89:275-284
		50 patients	48%	WES	Nolan et al. (2016) <i>J Child Neurol</i> 31:887-894
		57 patients	49%	WES	Kuperberg et al. (2016) <i>J Child Neurol</i> 31:1534-1539
		100 families	34%	WGS	Stravopoulos et al. (2016) <i>NPJ Gen Med</i> 1:15012
		4,293 families	42%	WES	McRae et al. (2017) <i>Nature</i> 542:433-438
		337 patients	43%	WES	Anazi et al. (2017) <i>Molec Psych</i> 22:615-624
		106 patients	34%	WES	Gieldon et al. (2018) <i>PLoS ONE</i> 13(8):e0201041
DSD with XX karyotype	13.0%	8 patients	25%	291 genes	Dong et al. (2016) <i>BMC Med Genet</i> 17:23
		48 patients	17%	64 genes	Eggers et al. (2016) <i>Genome Biol</i> 17:243
DSD with XY karyotype	13.0%	40 patients	35%	WES	Baxter et al. (2015) <i>J Clin Endocrinol Metab</i> 100:E333
		13 patients	69%	219 genes	Dong et al. (2016) <i>BMC Med Genet</i> 17:23
		278 patients	43%	64 genes	Eggers et al. (2016) <i>Genome Biol</i> 17:243
premature ovarian failure	6.6%	12 patients	17%	70 genes	Fonseca et al. (2015) <i>Fertil Steril</i> 104:154-162.e2
		100 patients	19%	19 genes	Bouilly et al. (2016) <i>J Clin Endocrinol Metab</i> 101:4541-4550
		36 families	36%	WES	Jolly et al. (2019) <i>J Clin Endocrinol Metab</i> doi:10.1210/je-2019-00248
short stature	3.5%	14 patients	35%	WES	Guo et al. (2014) <i>Horm Res Paediat</i> 82:44-52
		12 families	42%	4,813 genes	Kim et al. (2017) <i>Clin Genet</i> 92:594-605
		200 patients	29%	WES	Hauer et al. (2017) <i>Genet Med</i> 20:630-638
		91 patients	9%	166 genes	Yang et al. (2018) <i>BMC Med Genet</i> 19:212
		114 patients	36%	WES	Huang et al. (2018) <i>Cell Phys Biochem</i> 49:295-305
male infertility	5.4%	1,112 patients	1.5%	107 genes	Oud et al. (2017) <i>Hum Mutat</i> 38:1592-1605
		40 patients	10%	25 genes	Nakamura et al. (2017) <i>Andrology</i> 5:824-831
		8 families	5%	62 genes	Fakhro et al. (2018) <i>Genet Med</i> 20:1365-1373
		75 patients	13%	62 genes	Fakhro et al. (2018) <i>Genet Med</i> 20:1365-1373
		33 patients	2%	175 genes	Riera-Escamilla et al. (2019) <i>Hum Reprod</i> doi:10.1093/humrep/dez142



# a) problémy s detekcí strukturní variability (SV) - pomocí NGS

- 1.) SVs are important
- 2.) SVs happen in complex regions
- 3.) Classical NGS is not ideal for SV detection

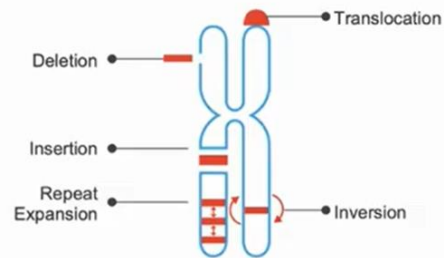
Structural Variations are the hardest to detect genomic variants



A-G-C-T-A-C-T  
| | | | | | | |  
T-C-A-A-T-G-A

Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)

1 base pair (bp)



Structural Variations (SVs)

100s bp to Millions bp



Aneuploidy

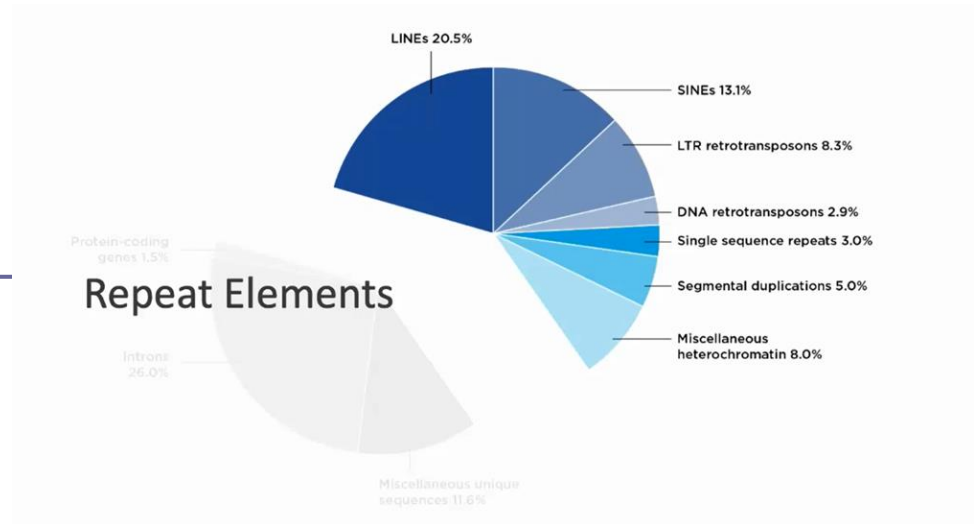
Full Chromosomes





# NGS a strukturní variabilita

NGS attempts to puzzle together fragmented DNA molecules to detect Structural Variation



2/3 of the genome is repetitive and SVs in repeat regions are often invisible by whole genome sequencing

Short Read Sequencing



- krátká čtení <300 pb Illumina, nedetekují >70 % SV větší než 50 pb, přítomnost repetitivních sekvencí (telomery, centromery, akrocentr. chromozomy...)



## A survey of undetected, clinically relevant chromosome abnormalities when replacing postnatal karyotyping by Whole Genome Sequencing



Ron Hochstenbach\*, Ellen van Binsbergen, Heleen Schuring-Blom, Arjan Buijs, Hans Kristian Ploos van Amstel

*Department of Genetics, University Medical Centre Utrecht, Utrecht University, Utrecht, P.O. Box 85090, 3508 AB, Utrecht, the Netherlands*

**Table 1**

Numbers of abnormalities undetectable by WGS in referrals for postnatal karyotyping to our laboratory during 2006–2015<sup>a</sup>.

referral reason (subcategories/explanation)	number of referrals	number of abnormal results (percentage of referrals)	undetectable by WGS		
			number	percentage of abnormal	percentage of total
<b>recurrent miscarriage</b> (couples who had at least two unexplained miscarriages)	5881	86 (1.5%)	22	25.6%	0.37%
<b>multiple congenital abnormalities and/or mental retardation</b> (products of conception, stillbirths, suspicion of trisomy 13 or trisomy 18, all other postnatal patients, from newborns to adults, including cytogenetic follow-up of abnormal microarray results)	3952	521 (13.2%)	14	2.7%	0.35%
<b>Down syndrome</b> (suspicion of trisomy 21, usually in newborns)	635	398 (62.7%)	1	0.25%	0.14%
<b>disorders of sexual development</b>					
child (usually newborn) with ambiguous genitalia	53	7 (13.2%)	0	0.0%	0.00%
woman > 36 years of age with POF	228	15 (6.6%)	11	73.3%	4.82%
child with short stature (< -3 x SD)	693	24 (3.5%)	4	16.7%	0.57%
girl with suspicion of Turner syndrome	310	20 (6.5%)	2	10.0%	0.65%
boy or male with suspicion of Klinefelter syndrome	253	45 (17.8%)	4	8.9%	1.58%
reduced male fertility (infertile/subfertile male electable for ICSI)	1047	57 (5.4%)	27	47.4%	2.58%
<b>carrier or chromosomal rearrangement</b> (family member has Down syndrome; family member has other chromosomal rearrangement)	1905	282 (14.8%)	33	11.7%	1.73%
<b>total</b>	14,957	1455 (9.7%)	118	8.1%	0.79%

<sup>a</sup> We did not include referrals of postnatal follow-up of abnormal prenatal findings in our survey.

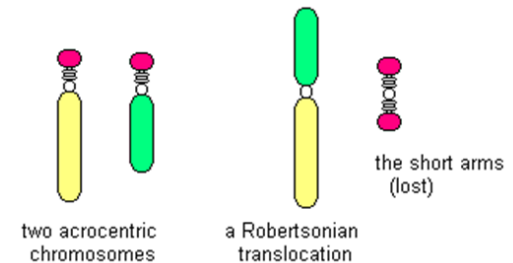


# NGS vs. cytogenetika

**Určité strukturní změny nemusí být zachyceny pomocí NGS !!!!**

Pomocí WGS nelze spolehlivě detekovat aberace v případech:

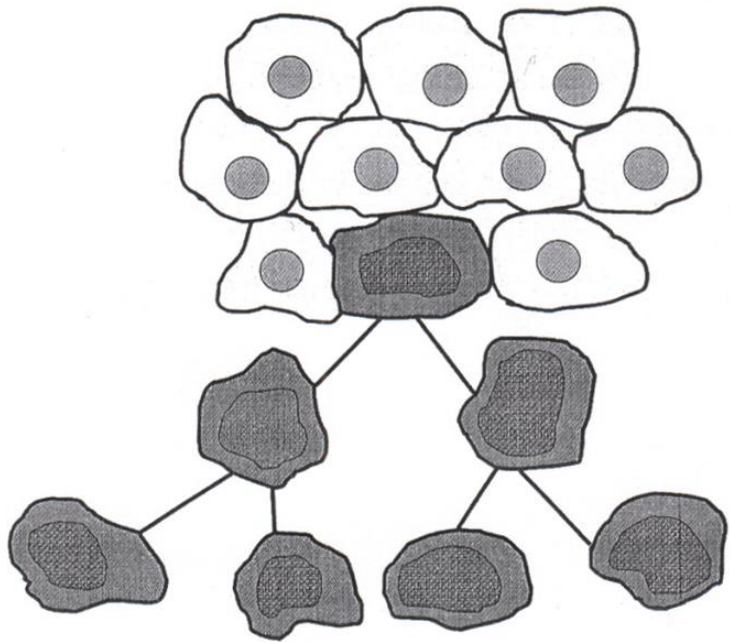
- A) malých mozaiek či klonů... NGS > 25 %
- B) Robertsonovských translokací...
- C) malých markerových chromozomů...
- D) balancovaných translokací s místem zlomu v nekódujících sekvencích...



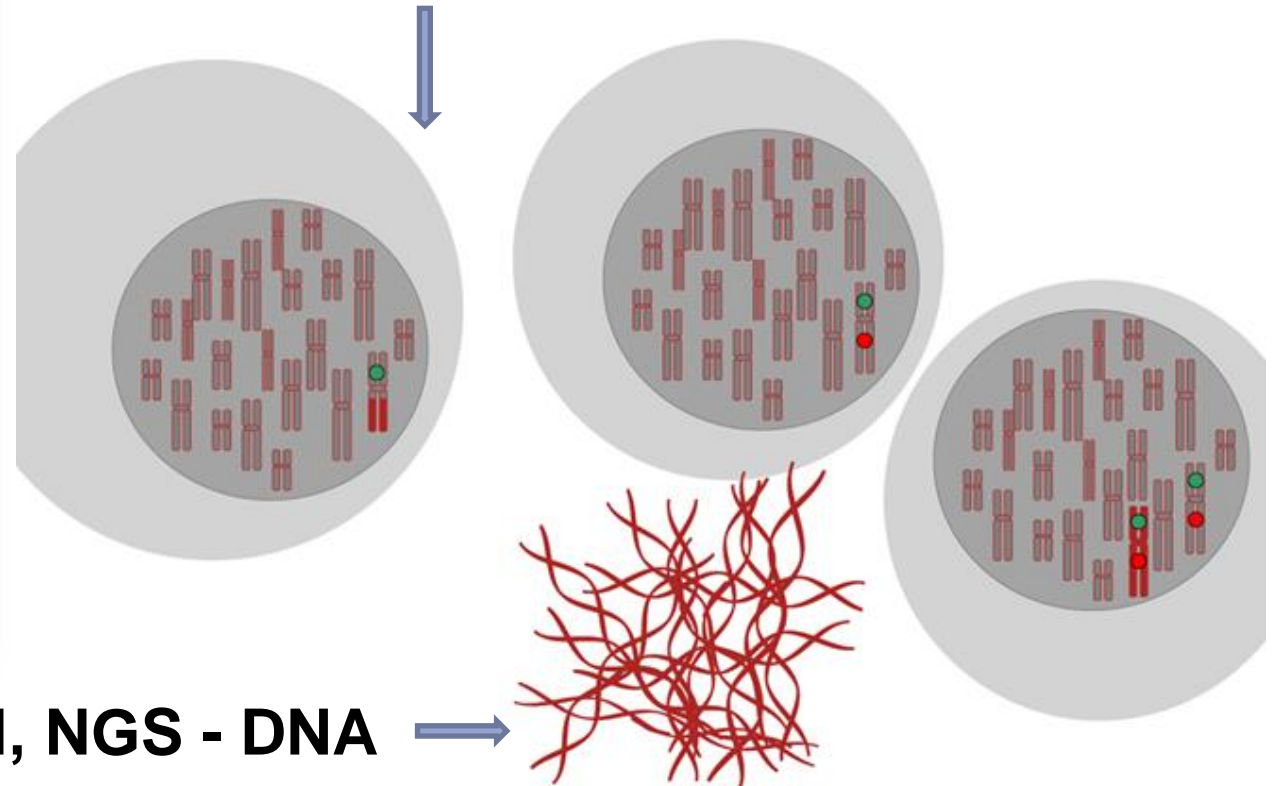


# NGS vs. cytogenetika při detekci malých klonů u nádorů

*Vznik patologického buněčného klonu (převzato od F. Mitelmana, Bertinoro, 2004).*

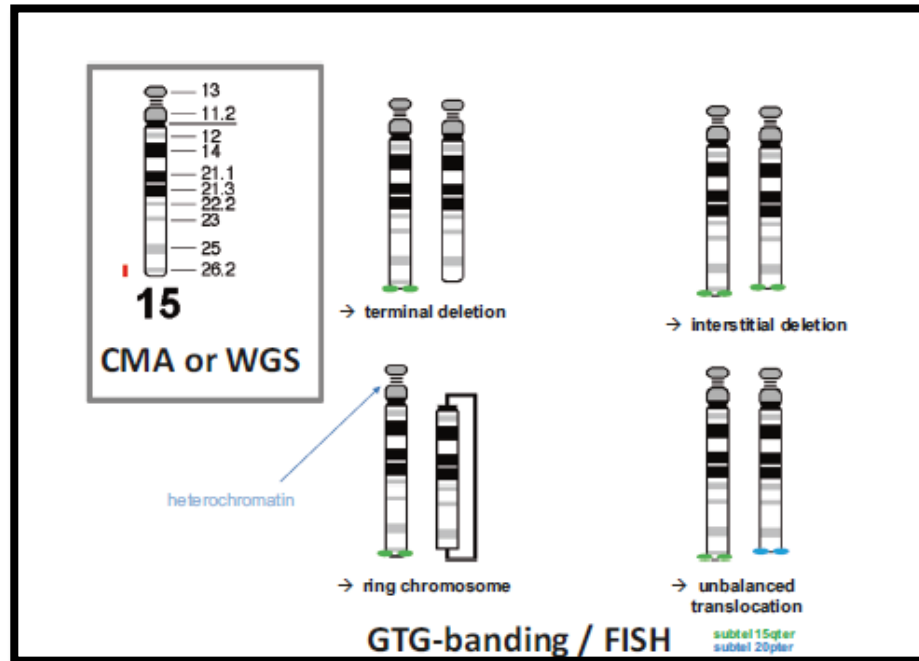


**FISH – jádra buněk**



**Array-CGH, NGS - DNA**

## b) změny detekované na úrovni DNA mohou být způsobeny různými strukturními přestavbami chromozomů – nutno ověřit na karyotypu!



### Příklad

**Ztráty DNA sekvencí**  
(array-CGH, NGS) mohou  
být způsobeny **různými**  
**strukturními změnami**  
**chromozomů !!!**

Fig. 1 This example shows that a loss of a terminal segment of a chromosome arm, as detected by CMA or WGS (in red), can be caused by four different structural rearrangements. Current WGS methods based on short-read, paired-end sequencing are not suited to discriminate between these possible rearrangements because breakpoints that are located within repetitive DNA sequences are not recognized [4]. In contrast, these rearrangements can be discriminated by microscopy, using karyotyping and/or FISH. The simplest structural rearrangement is a terminal deletion although an interstitial deletion, a ring chromosome, or a derivative chromosome representing an unbalanced translocation involving chromosome 15 and the very terminal end of another chromosome arm (here 20p) can underlie such a terminal loss. As emphasized in current guidelines for cytogenomic investigation [7], identification of the underlying rearrangement is essential for determining the recurrence risk for the parents of the patient, for genetic counseling and for the identification of family members who are at an increased risk of having imbalanced progeny.

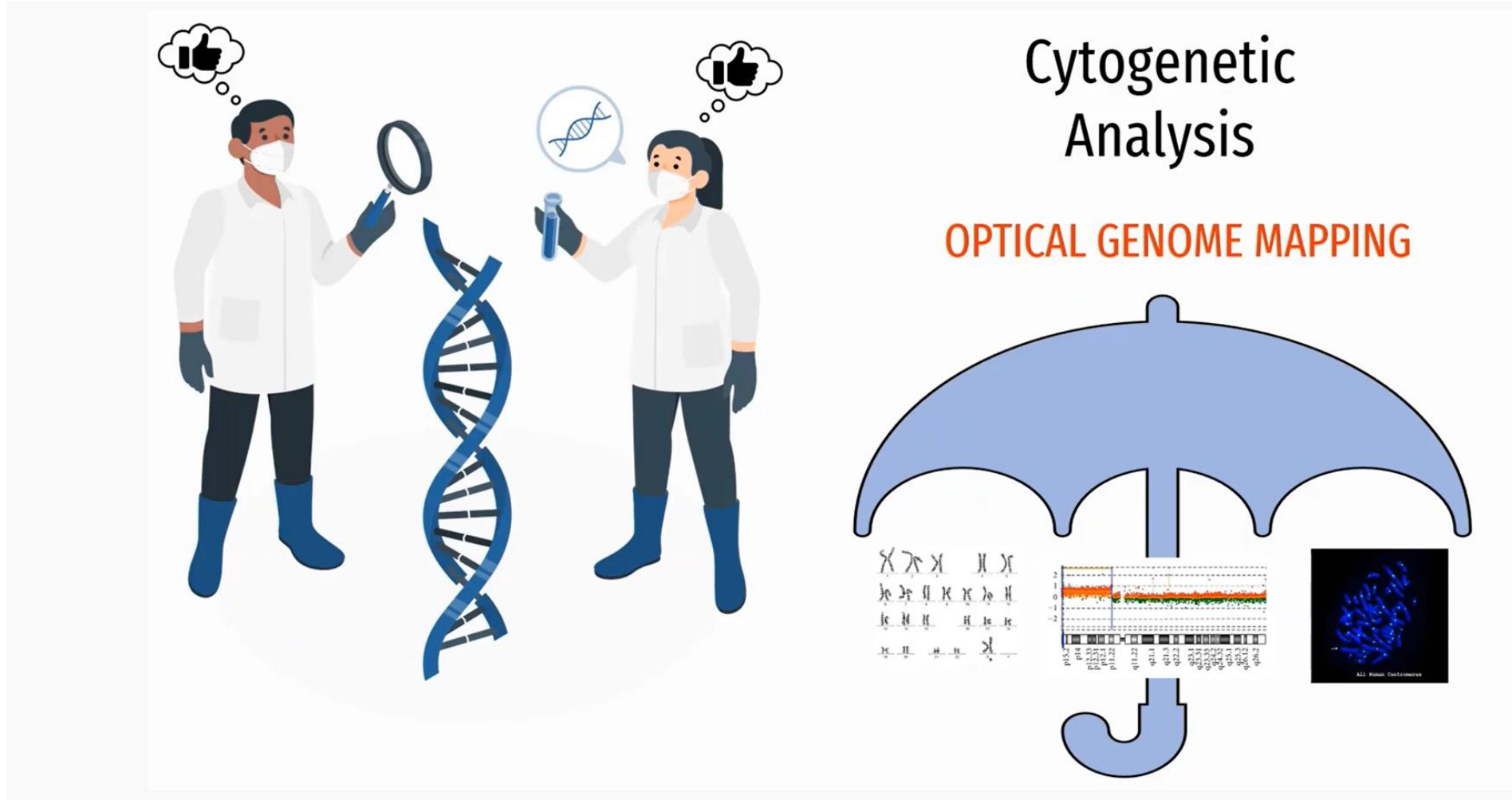
Chromosomes in the genomic age. Preserving cytogenomic competence of diagnostic genome laboratories

Ron Hochstenbach<sup>1</sup> · Thomas Liehr<sup>2</sup> · Rosalind J. Hastings<sup>3</sup>

Received: 6 April 2020 / Revised: 26 October 2020 / Accepted: 17 November 2020  
© The Author(s) 2020

**Důležité pro genetické poradenství !**

# Existuje univerzální metoda, která by nahradila vše?





# Next-Generation Cytogenomics with Optical Genome Mapping is Here! To stay!

Alka Chaubey, Ph.D., FACMG  
Chief Medical Officer, Bionano Genomics

2021



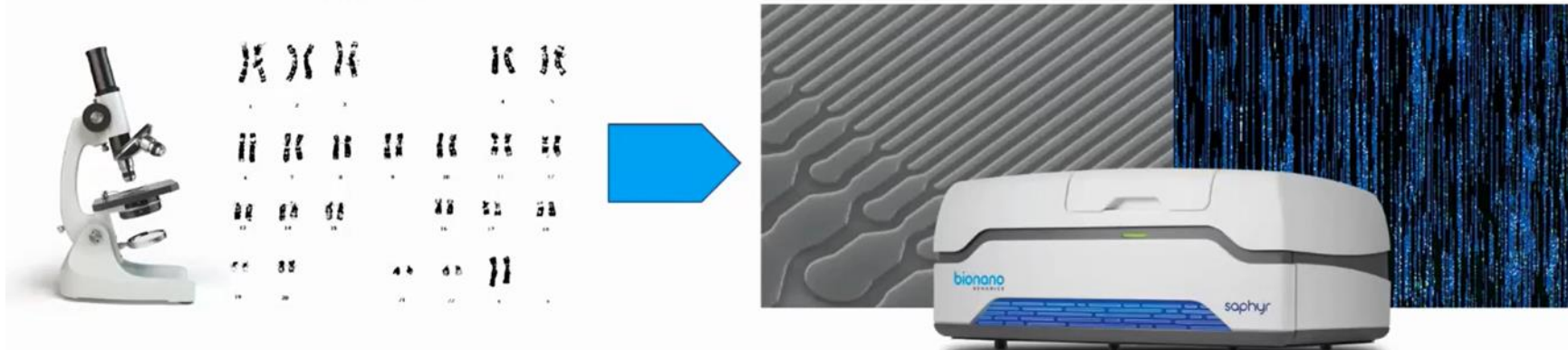
**bionano**  
GENOMICS



# REVOLUTIONIZING CYTOGENOMICS



Bionano visualizes patterns on intact DNA molecules to detect Structural Variation



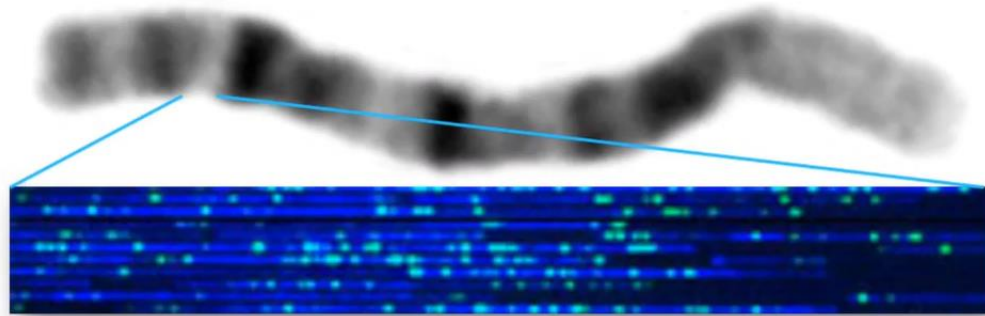
# Optical mapping for clinical structural variant detection

Alexander Hoischen

Associate Professor Genomic Technologies & Immuno-Genomics  
Scientific Director Radboud Genomics Technology Center

Departments of Human Genetics and Internal Medicine  
Radboud University Medical Center,  
Nijmegen, The Netherlands

## Next generation cytogenetics



**Cytogenetics with 500,000 'bands' i.e. labels ~10,000 improved sensitivity!**

- Genomewide analysis
- Positional information
- Single molecule resolution



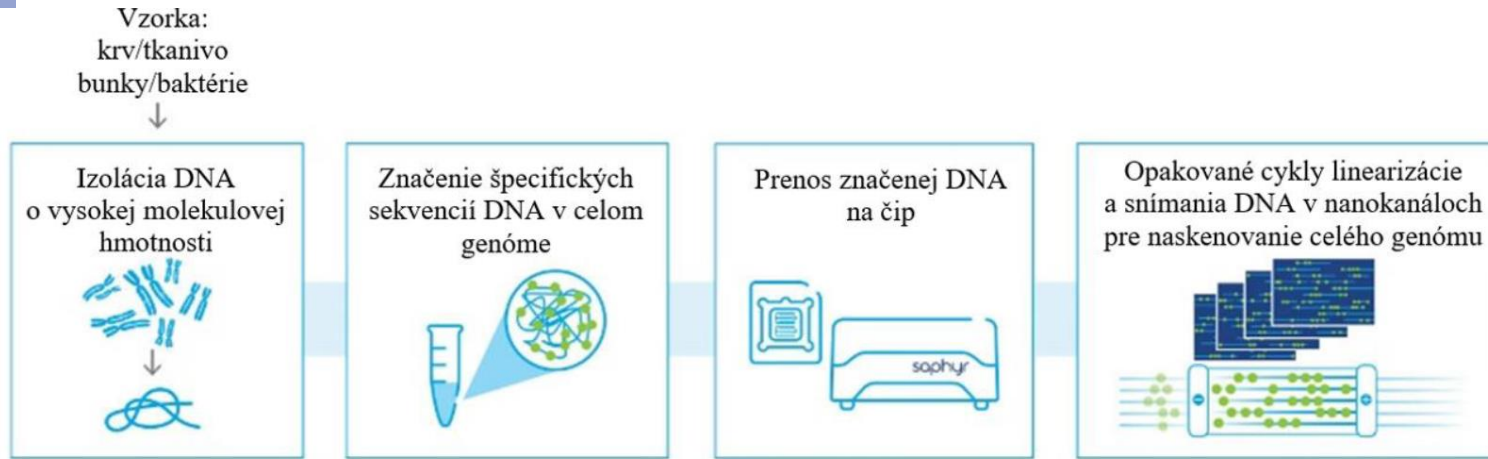
# Co umí optické genomové mapování (OGM)

## Structural Variation Classes

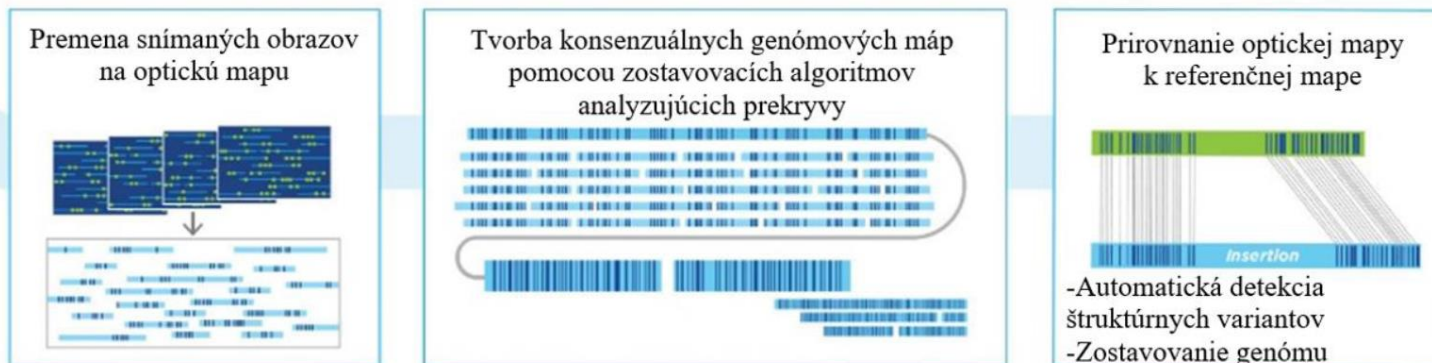
Variant Classes	Variant types	Variant Classes	Bionano (Optical Genome Mapping)*	
Aneuploidy	Monosomy	Monosomy	√	
	Trisomy	Trisomy	√	
Copy Number Variants	Deletions	Interstitial deletion	√	
		Terminal deletion	√	
	Duplications	Tandem duplications	√	
		Inverted duplications	√	
		Insertion duplications	√	
		Insertion of unknown sequence	√	
Structural Variants	Insertions	Insertion (of known sequence, copy neutral)	√	
		Balanced translocations	√	
	Translocations	Unbalanced translocations	√	
		Cryptic translocations	√	
		Inversions	Inversion – pericentric fusion point	√
	Ring chromosome	Inversions	Inversion – paracentric fusion point	√
			CNV and fusion	√
Homozygosity mapping	LOH	AOH/ROH/LOH	Not currently	
Macrosatellite/microsatellite repeat contraction/expansion	Repeat contraction	Repeat contraction (e.g. FSHD1)	√	
	Repeat expansions	Repeat expansions (e.g. Fragile X syndrome)	√ (200 triplet repeats)	
Single Nucleotide Variants	SNVs	Indels, SNPs, SNVs	No	

\* >500bp and larger

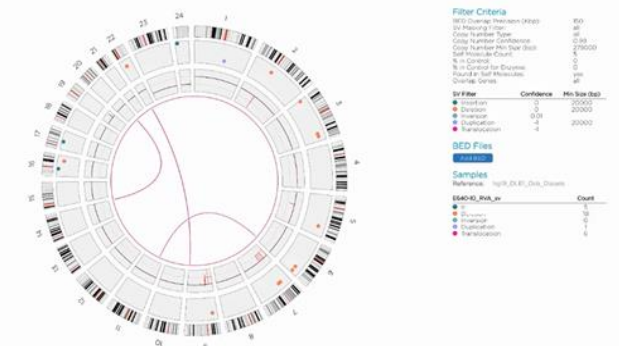
# Optické mapování genomu - postup



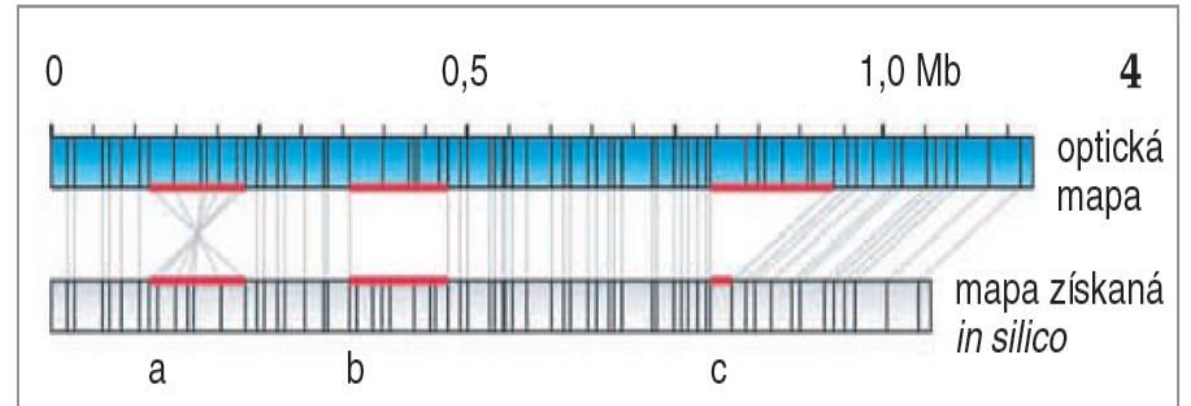
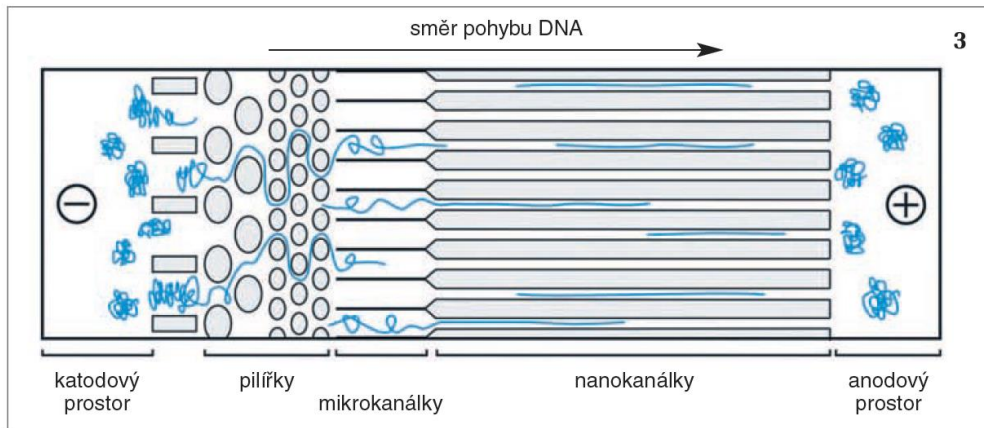
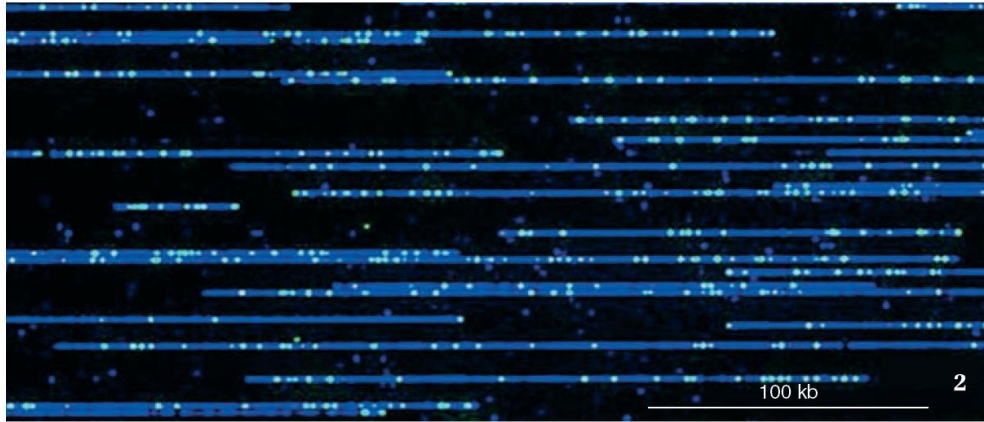
Efektívne snímame molekúl DNA o dĺžke niekoľko megabáz s vysokým rozlíšením



Visualize and Manipulate Maps and Structural Variants



# Bionano's technology is Optical Genome Mapping with Saphyr

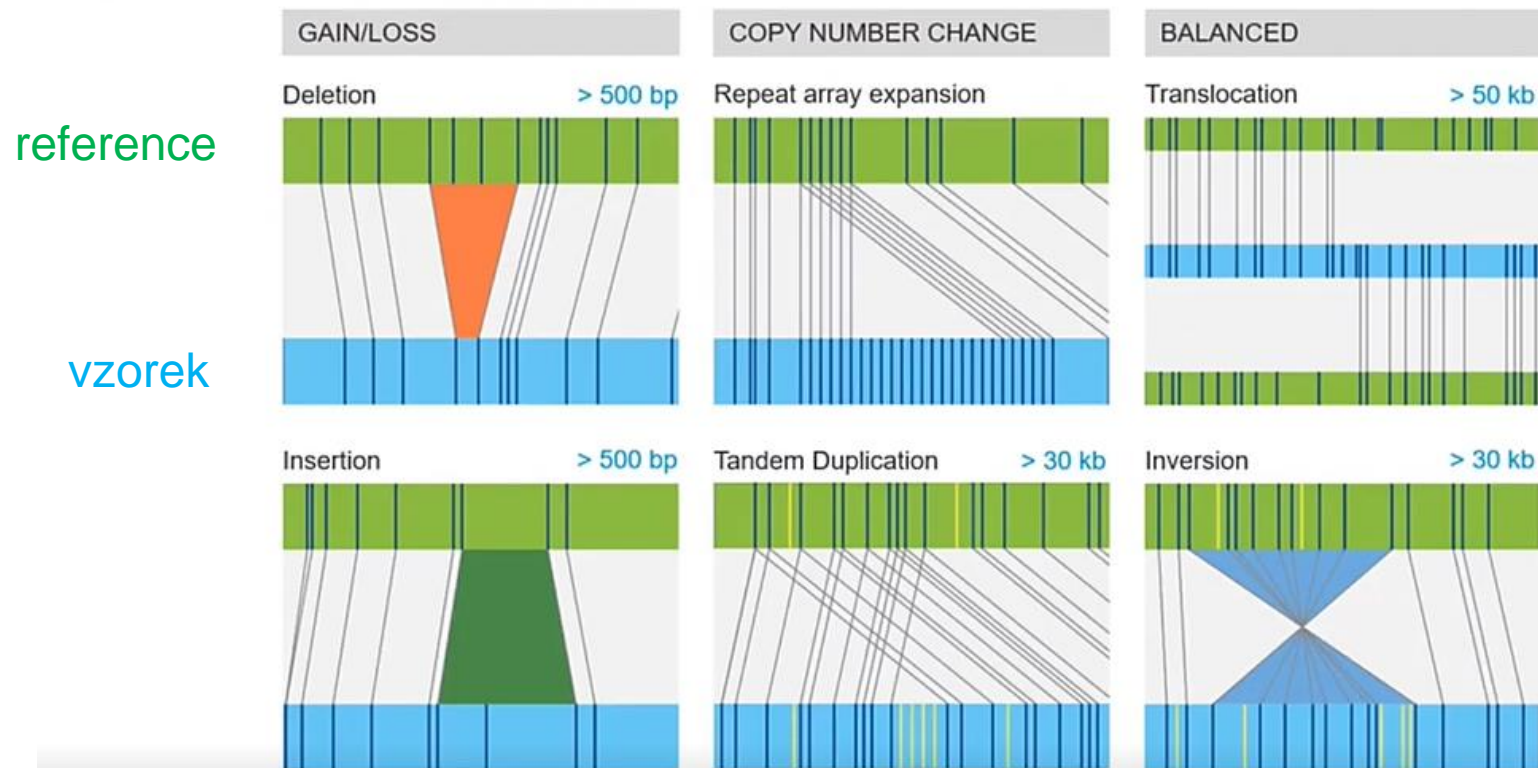


From 100x up to 1600X coverage  
At no extra cost.

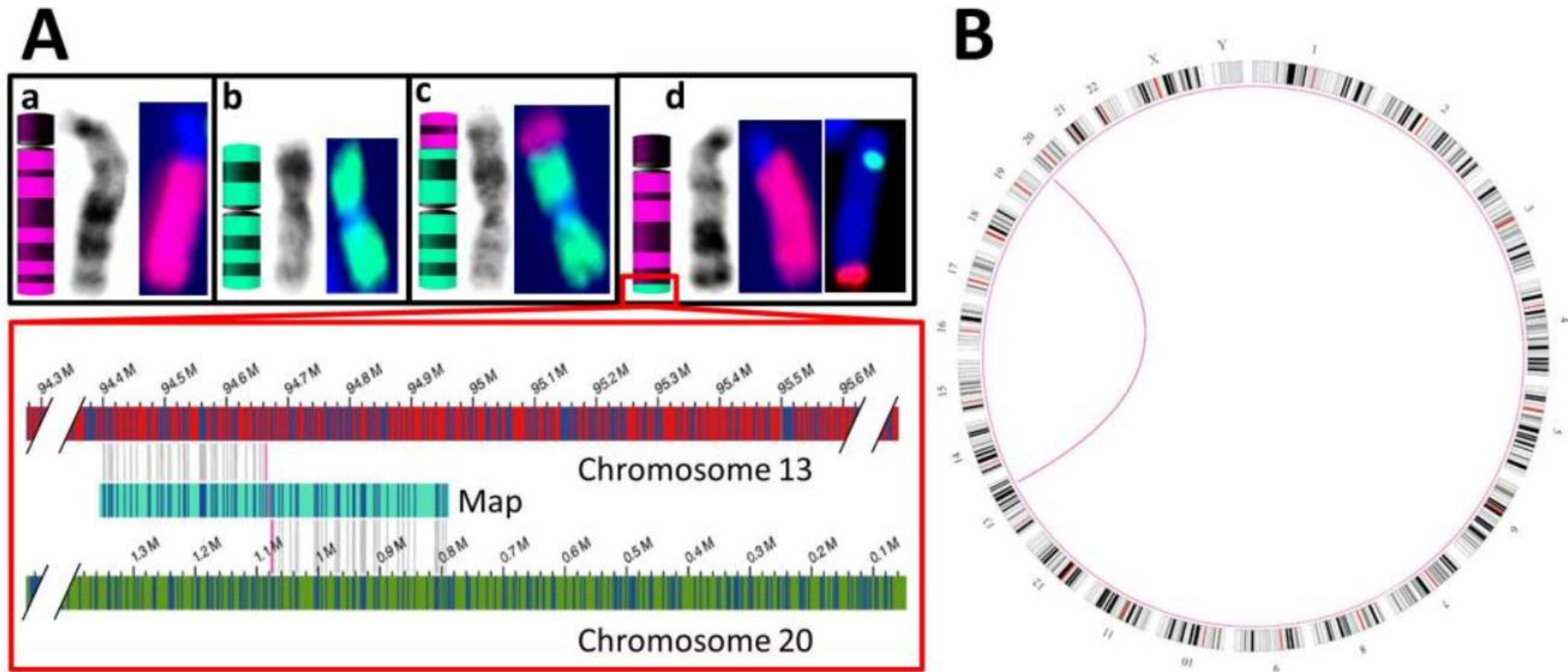


# Detekce chromozomových aberací pomocí optického mapování

## Structural variant calling by optical mapping

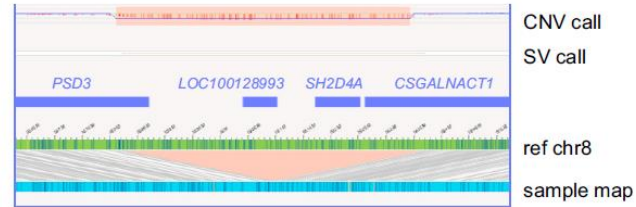
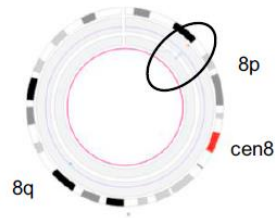
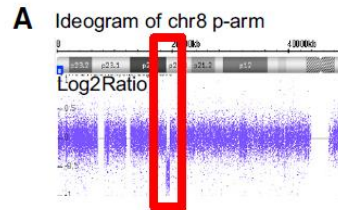


# OGM - příklad translokace (13;20)(q32;p13)

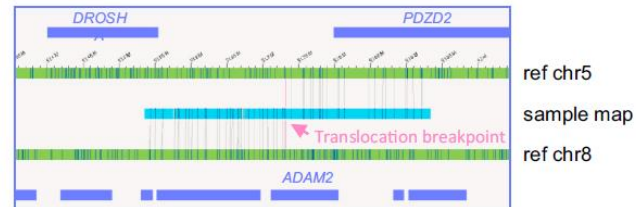
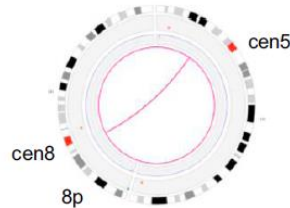
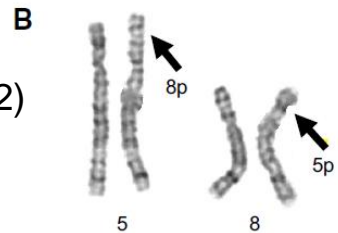


# OGM – příklady chromozomových aberací

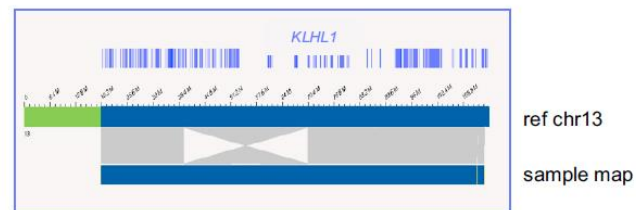
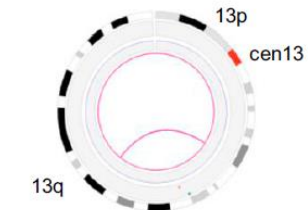
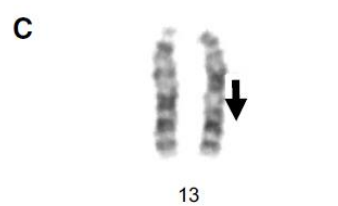
delece  
8p22p21.3



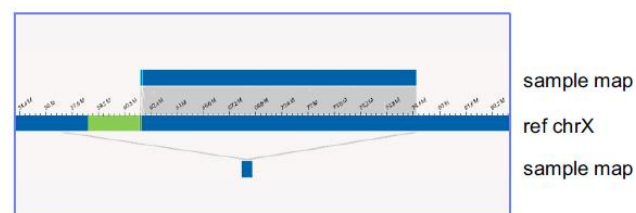
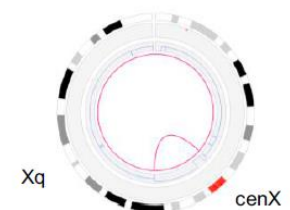
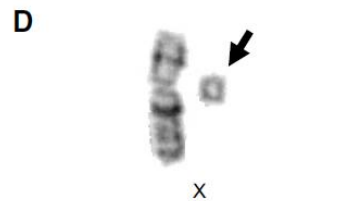
t(5;8)(p13.1;p11.2)



inverze 13q



marker X





# Cytogenetika včera a dnes – dvě kazuistiky našich laboratoří



Laboratoře molekulární cytogenetiky a cytogenomiky jsou specializované laboratoře s výzkumnou, výukovou a diagnostickou činností, které sdružují cytogenetické laboratoře Přírodovědecké fakulty MU (Oddělení genetiky a molekulární biologie ÚEB) a vybrané laboratoře Sekce cytogenomiky CMBG Fakultní nemocnice v Brně.

## Nestabilita genomu člověka

Nosným tématem činnosti našich laboratoří je výzkum nestability genomu člověka na úrovni strukturních i početních změn chromozomů pomocí molekulárně cytogenetických a cytogenomických metod. Získané poznatky mají praktický význam pro lékařskou genetiku, slouží k odhalování příčin některých vrozených geneticky podmíněných onemocnění či k bližší charakterizaci biologických vlastností zhoubných nádorů.

## Chromozomové aberace

Výzkumné aktivity našich laboratoří jsou již řadu let zaměřeny i na studium chromozomových aberací pomocí technik metafázní a interfázni fluorescenční hybridizace in situ (FISH), techniky MLPA, technologií array-CGH a v současnosti hlavně pomocí sekvenování nové generace (NGS). Ve spolupráci s řadou lékařských pracovišť se podílíme na rychlém zavádění specializovaných cytogenetických a cytogenomických vyšetření do klinické praxe a provádíme diagnostiku pacientů.

## Zefektivnění a využití metod molekulární cytogenetiky a cytogenomiky

V uplynulých letech jsme se v úzké spolupráci s lékařskými pracovišti pracovali na řešení úkolů zaměřených na rozpracování jednotlivých metod molekulární cytogenetiky a cytogenomiky a jejich využití z hlediska prenatální diagnostiky, postnatální cytogenetiky i cytogenetiky některých hematologických malignit a solidních tumorů. Nabízíme znalosti a zkušenosti z významných projektů, např.:

- Molekulárně cytogenetická charakterizace multiformního glioblastomu pomocí techniky fluorescenční hybridizace in situ, komparativní genomové hybridizace, spektrálního karyotypování a array-CGH.
- Diagnostický a prediktivní význam molekulárně cytogenetických markerů u embryonálních nádorů dětského věku

- Diagnostický význam amplifikace genů *hTERT* a *MYCC* při vzniku a vývoji cervikálních intraepiteliálních dysplázií a karcinomu děložního hrdla
- Prognostický význam klonálních chromozomových aberací při použití nových léčebných metod u mnohočetného myelomu
- Úloha genetických abnormalit ve vývoji a progresi prekancerózy monoklonální gamopatie nejasného významu
- Úloha patogenních genetických variant detekovaných pomocí exomového sekvenování v etiologii dětských neurovývojových onemocnění. V rámci tohoto projektu zkoumáme vzácná genetická onemocnění dětského věku postihujícíci duševní zdraví, jeho cílem je rozpracování a využití technologie celoxomového sekvenování (WES) pro účely molekulárně genetické analýzy dětských pacientů vyšetřovaných na OLG se závažným intelektuálním postižením, poruchami autistického spektra či vrozenými vývojovými vadami.

## Bakalářské a diplomové práce

Bakalářské a diplomové práce řešené v naší laboratoři se zabývají postnatálním vyšetřením vrozených chromozomových aberací u jednotlivců i rodin postižených některým genetickým onemocněním.

## Kontakt:

doc. RNDr. Petr Kuglík, CSc. (vedoucí pracoviště)  
kugl@sci.muni.cz

RNDr. Vladimíra Vallová, PhD.  
vlavra@mail.muni.cz

Mgr. Markéta Wayhelová, PhD.  
marketa.wayhelova@mail.muni.cz

Ústav experimentální biologie  
Univerzita v Brně, Kamenice, budova D36  
Kamenice 753/5, 625 00 Brno-Bohunice, Česká republika

## cy(t/kl)ogenetici FN Brno





# **Příklad cytogenetické analýzy**

## **KAZUISTIKA z OLG FN Brno z roku 1998**

---

- **chlapec (nar. 1984) - indikován kvůli mírné psychomotorické retardací a nízkému vzrůstu;**
- **karyotyp stanoven 47,XY,+mar;**
- **marker vznikl *de novo***

**Markerový chromozom - malý nadbytečný chromozom, který není možno analyzovat cytogenetickými pruhovacími metodami:**

- **bez euchromatinu – nemusí mít vliv na fenotyp**
- **s euchromatinem – parciální trizomie !!!**

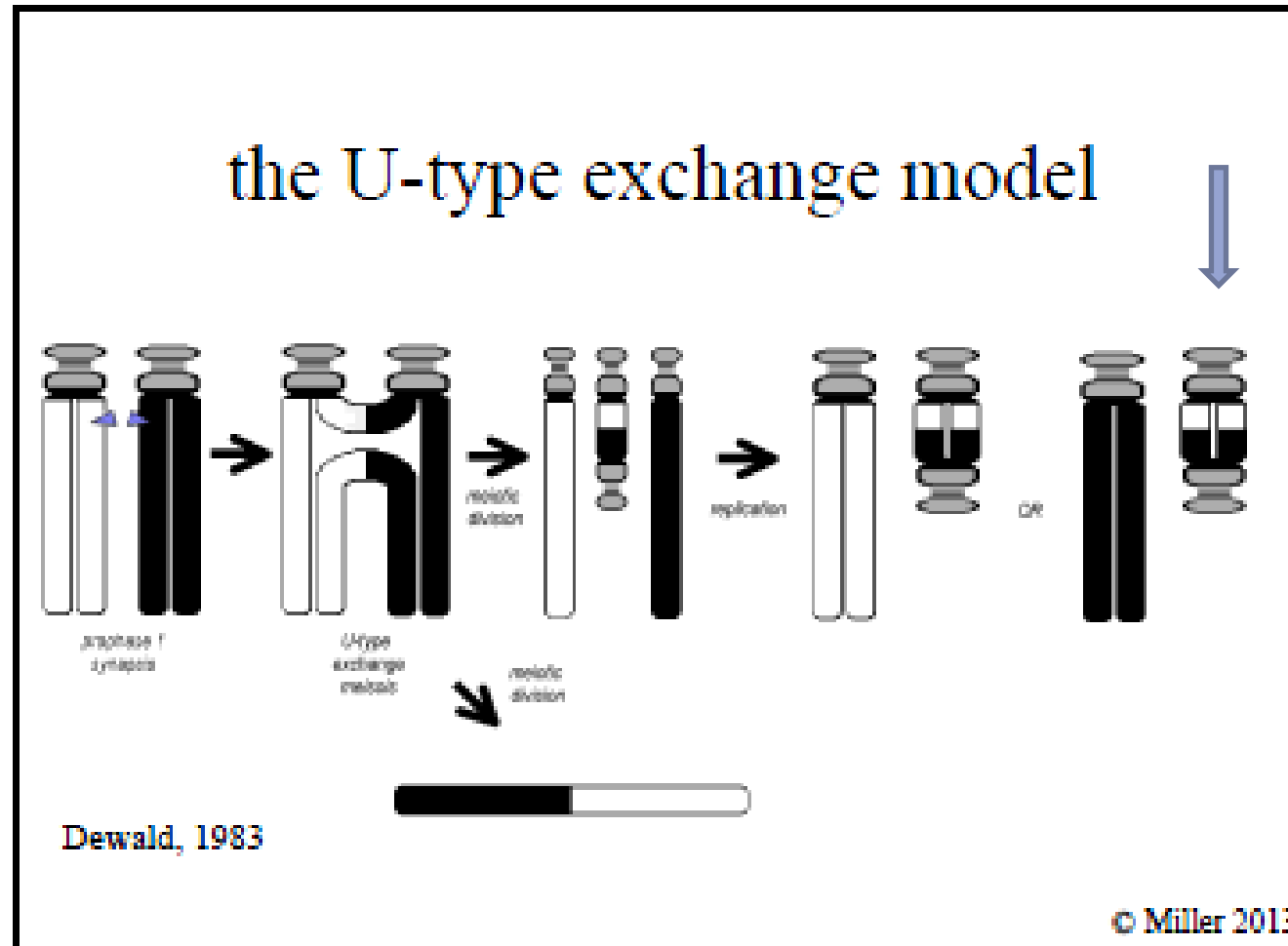
# Markerové chromozomy mohou způsobovat různé postižení – duplikace genů (parciální trizomie) !

Populační četnost 0,043 %

## Frequency of “marker” chromosomes

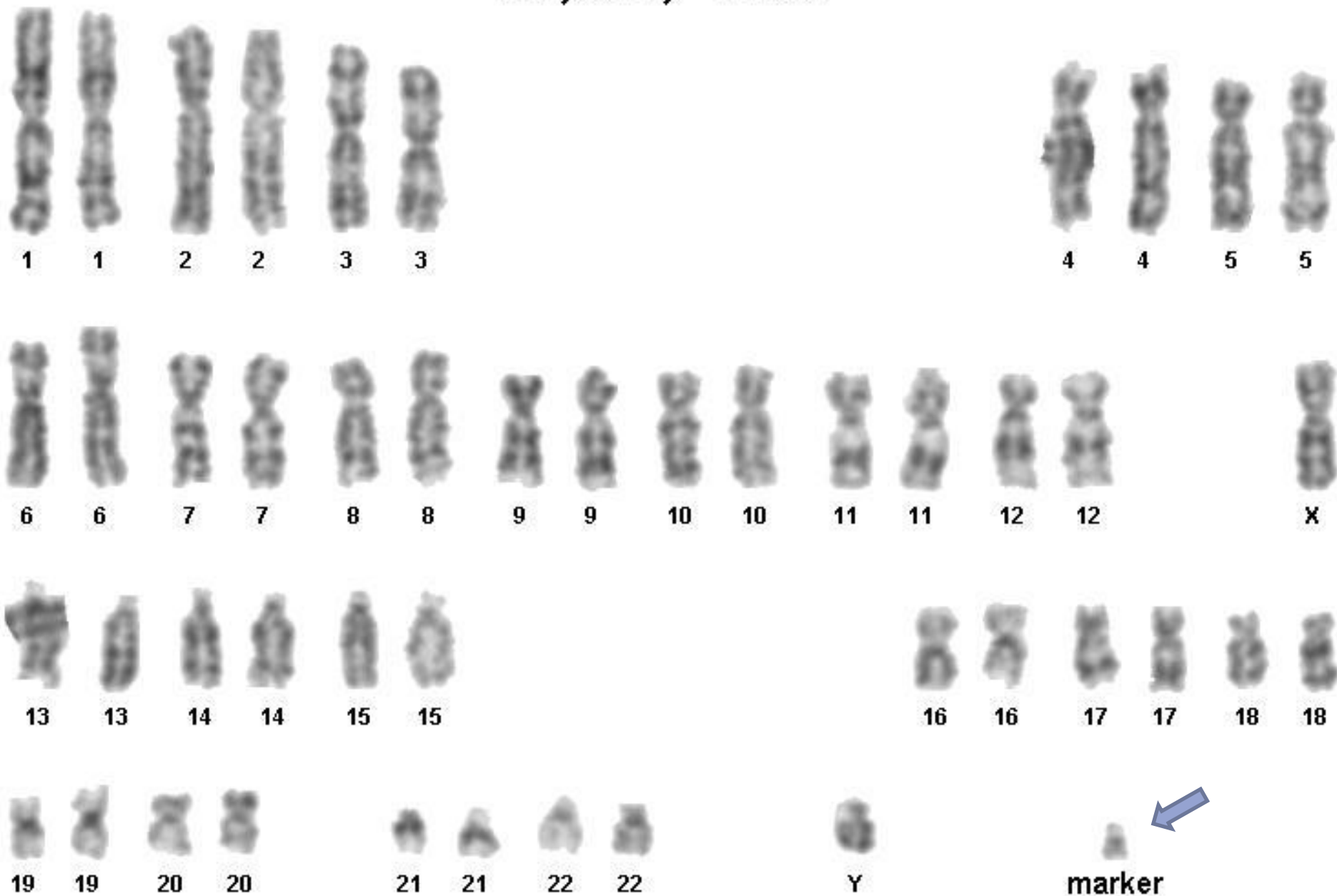
	cases	marker chromosomes	
newborn	153701	70 (0.046%)	1:2195
unselected prenatal	688030	514 (0.075%)	1:1339
suspicious prenatal ultrasound	4409	9 (0.204%)	1:490
patients with mental retardation	69332	200 (0.288%)	1:347
males with fertility problems	21841	36 (0.165%)	1:607
females with fertility problems	9165	2 (0,022%)	1:4582

# Vznik markerových chromozomů

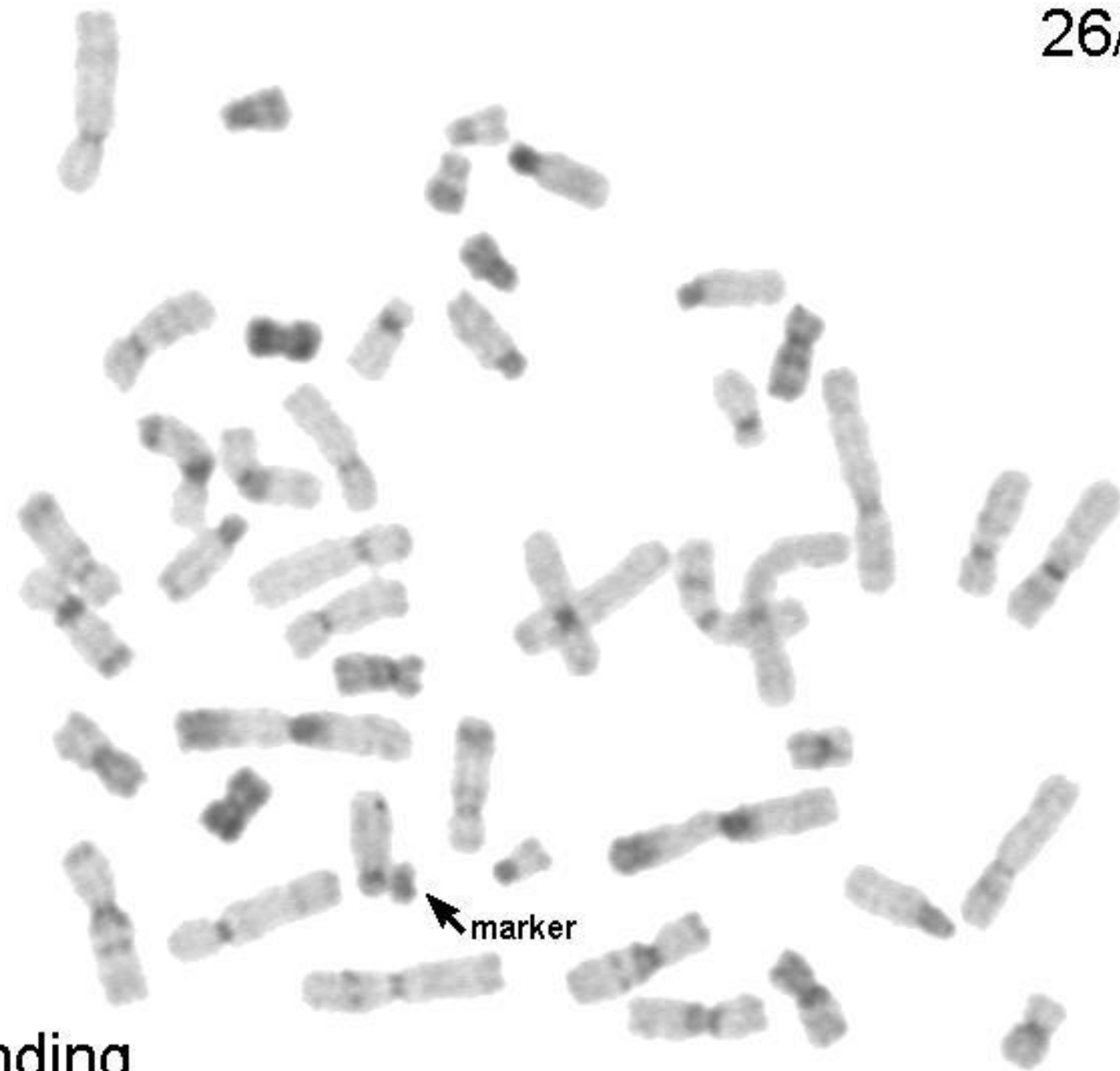


47,XY,+mar

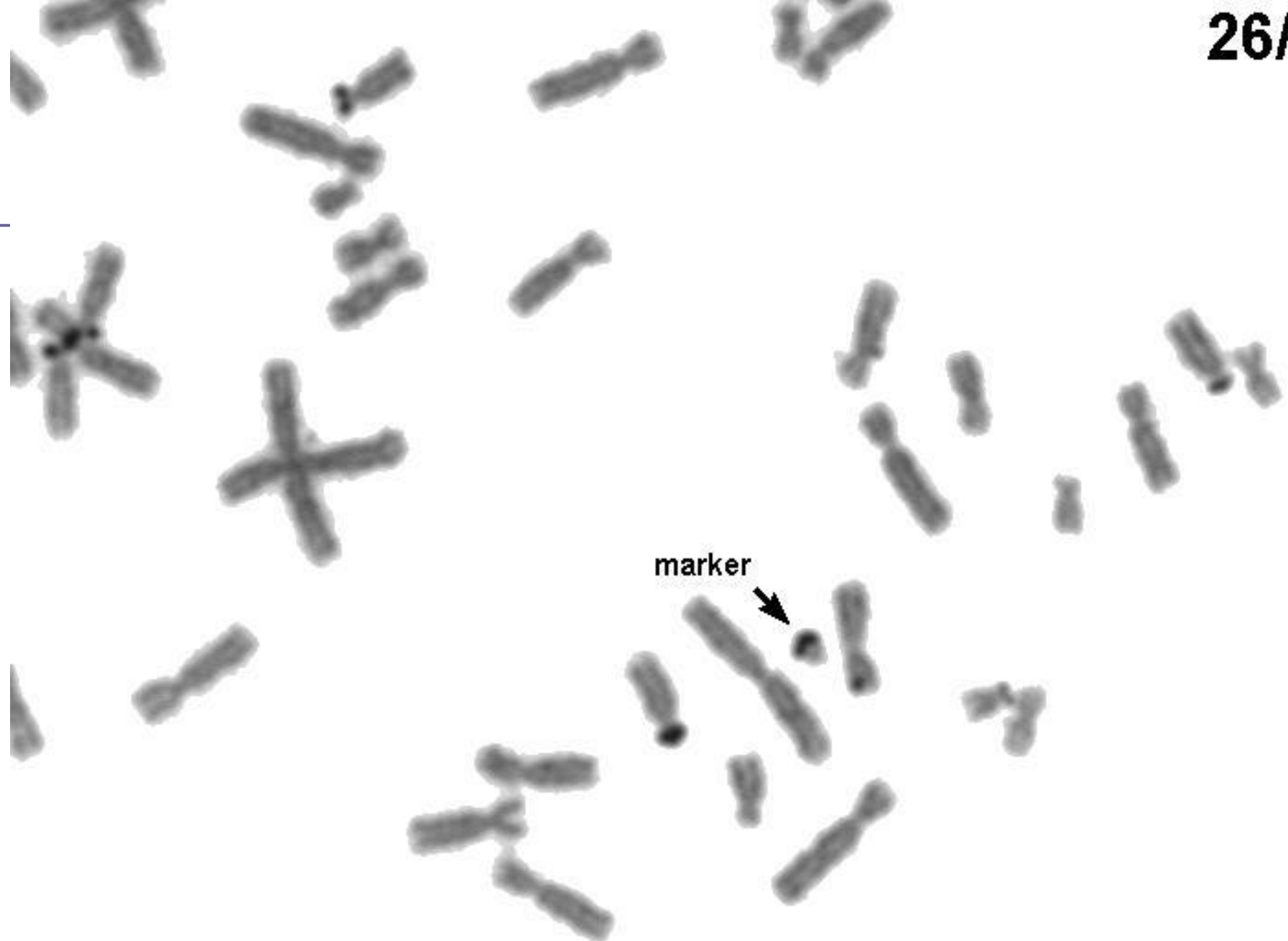
26/98







C - banding



**Ag-NOR banding**

# PACIENT 1 - postup FISH vyšetření

- markerový chromozom pochází od některého chromozomu 13, 14, 15, 21 nebo 22
- centromerická sonda a celochromozomová sonda 15 → obě negativní;
- centromerická sonda 14/22 → pozitivní;
- celochromozomová sonda 22 → negativní;
- celochromozomová sonda 14 → **pozitivní**;
  
- **ale určili jsme původ, avšak neznáme jaké geny marker obsahuje...euchromatin?**

26/98

22



maker



14



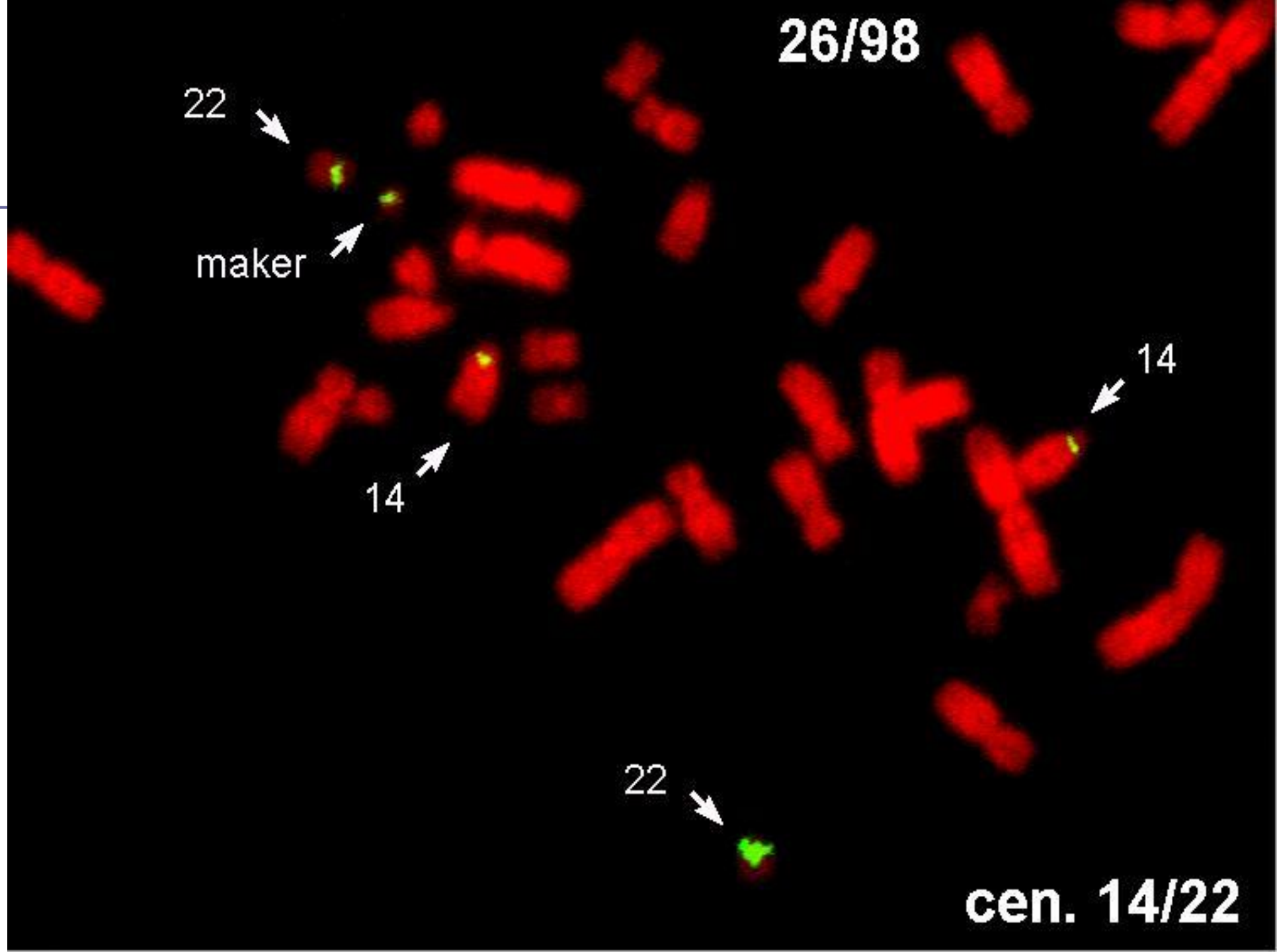
14



22



cen. 14/22





# Příklad cytogenomické analýzy

## KAZUISTIKA z OLG FN Brno z roku 2018

---

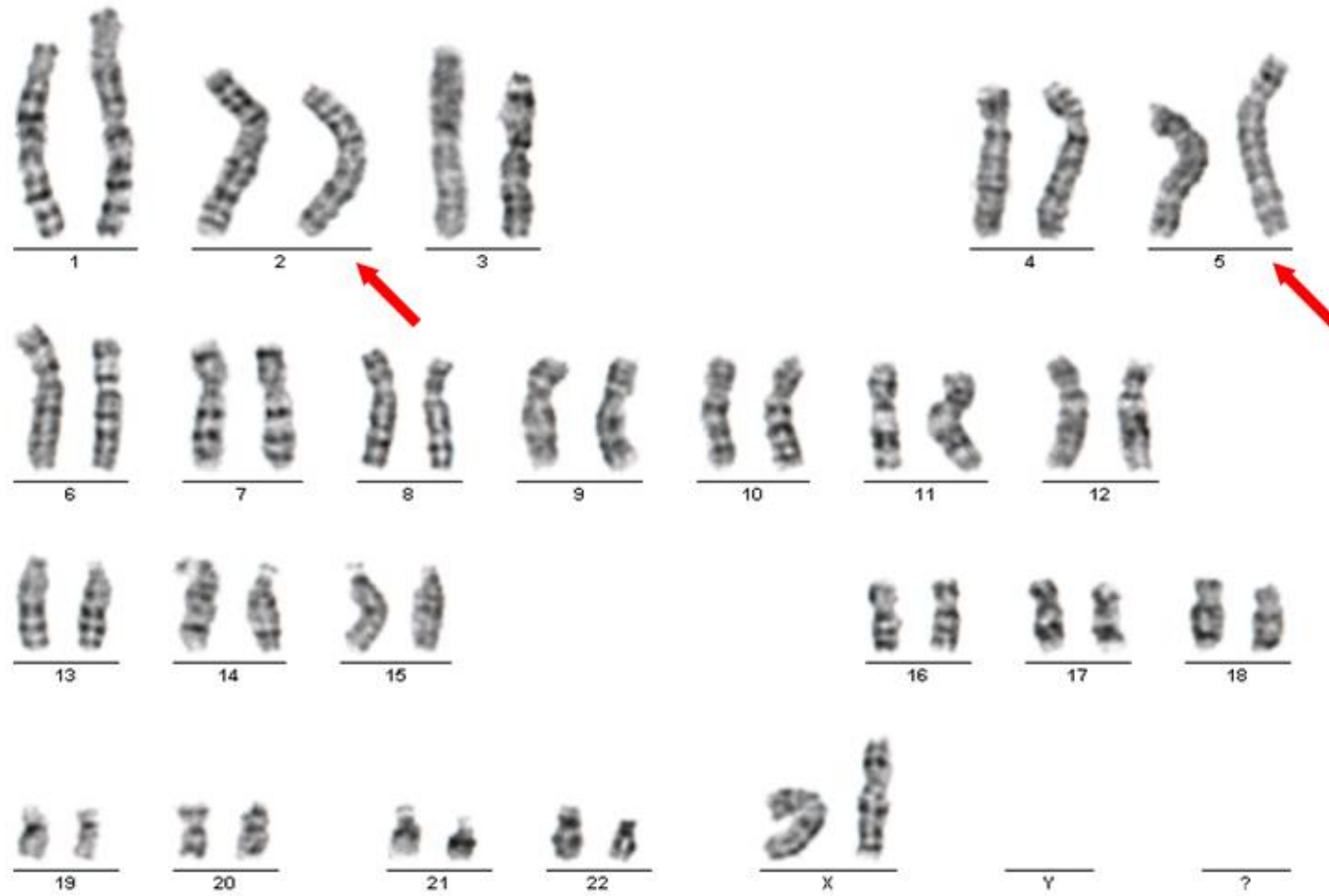
- Dívka vietnamského původu nar. 1996
- Z 2. fyziologické gravidity, AMC pro věkovou indikaci
- Prenatálně nalezena t(2;5) *de novo*, stanoveno vyšší riziko manifestace vrozené odchylky fenotypu
- Cílené UZ vyšetření na VVV a VSV s fyziologickým nálezem
- Porod týden po termínu, SZ, 2850g / 48cm, poporodní adaptace v normě
- Opožděný PMV, chůze až ve 20 měsících....
  
- Rodiče zdraví

# FENOTYP PACIENTKY

---

- Neprospívání
- Těžká PMR, od narození známky opožděného PMV chůze až ve 20. měsíci, v 7 letech neumí sama jíst ani pít, neudrží čistotu, příkazům rozumí jen zčásti, nemluví, vydává neartikulované zvuky, umí říct pouze „NE“
- Diskrétní stigmatizace - naznačený ptačí profil, hypertelorismus, níže nasedající ušní boltce, rachitický hrudník, nápadná arachnodaktylie zejm. na HKK.
- Instabilita
- Susp. porucha sluchu

# KARYOTYP 46,XX,t(2;5)

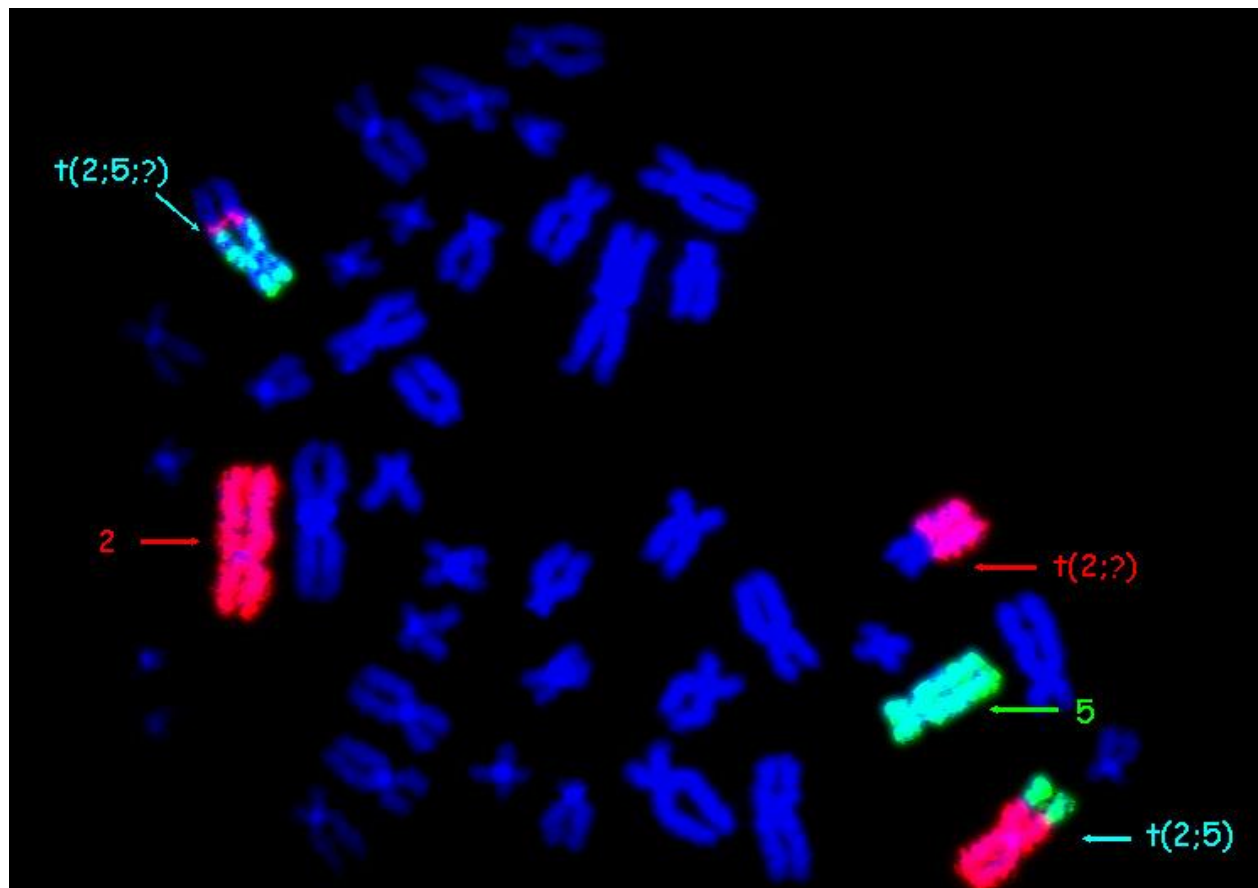


# VYŠETŘENÍ PACIENTKY – ověření FISH - nález

## Na translokaci se podílí další chromozom !

WCP 2,5

vyšetřovaný materiál periferní krev



Cambio StarFISH®chromosome-specific painting Probe, Cambridge, United Kingdom;  
LUCIA-KARYO/FISH software, Laboratory Imaging, Praha, Česká Republika



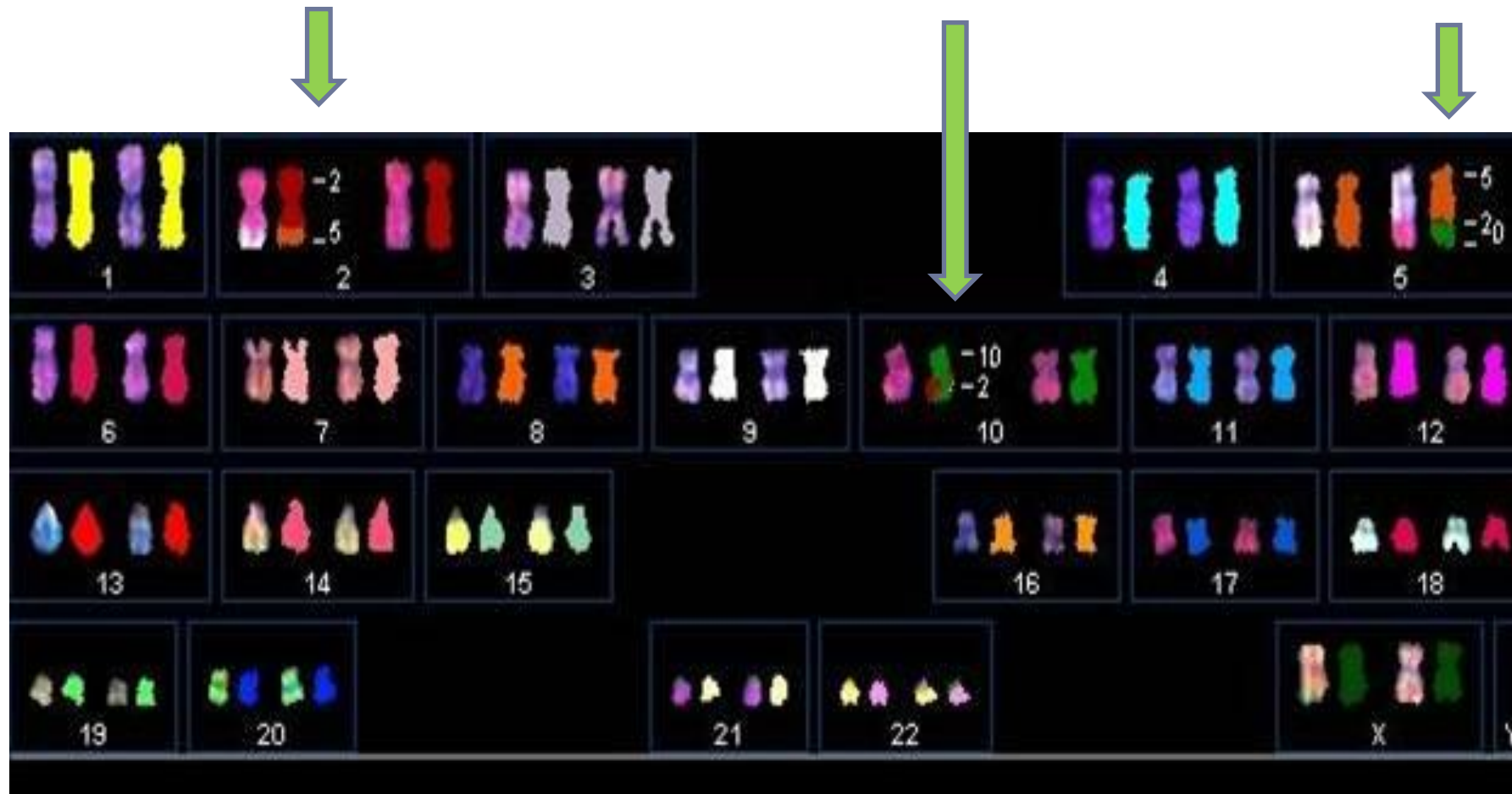
# VYŠETŘENÍ PACIENTKY – Spektrální karyotypování

vyšetřovaný materiál periferní krev

der(2)t(2;5)

der(10)t(2;10)

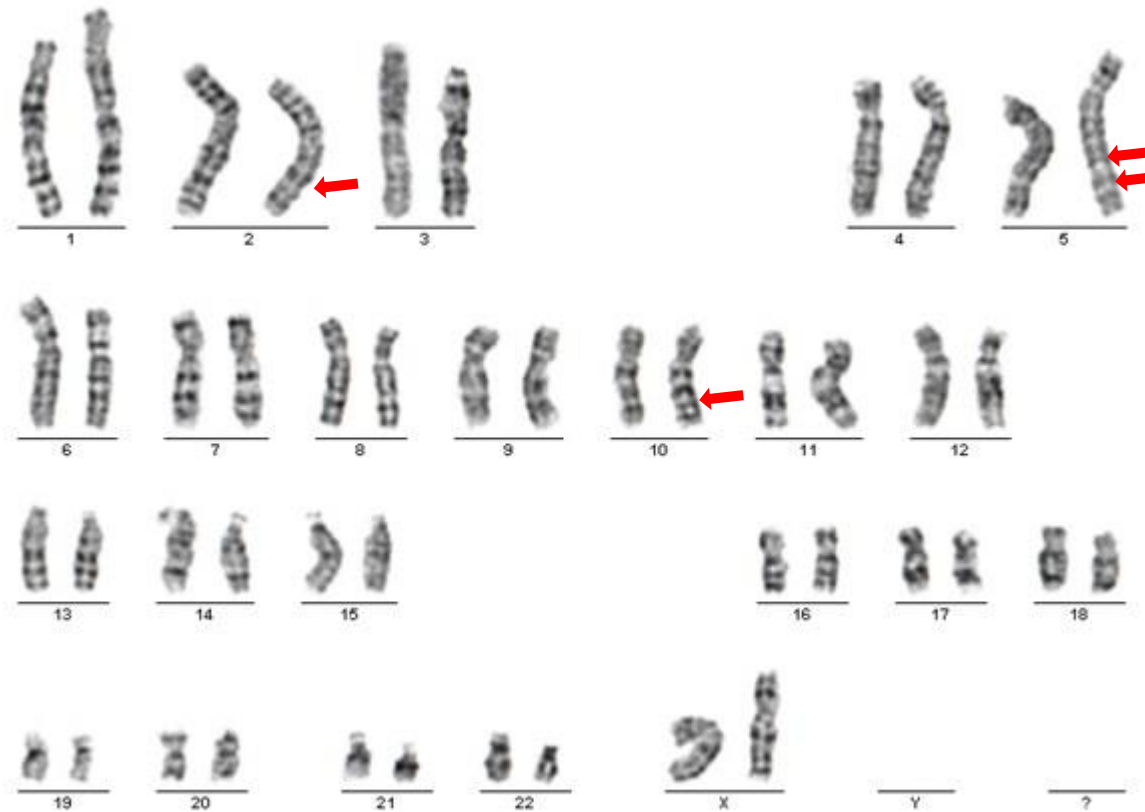
der(5)t(2;5;10)



Sky Paint Kit – DNA H-10, Applied Spectral Imaging Inc., Ascomed spol. s.r.o.

# REVIDOVANÝ KARYOTYP PACIENTKY - KOMPLEXNÍ TRANSLOKACE !

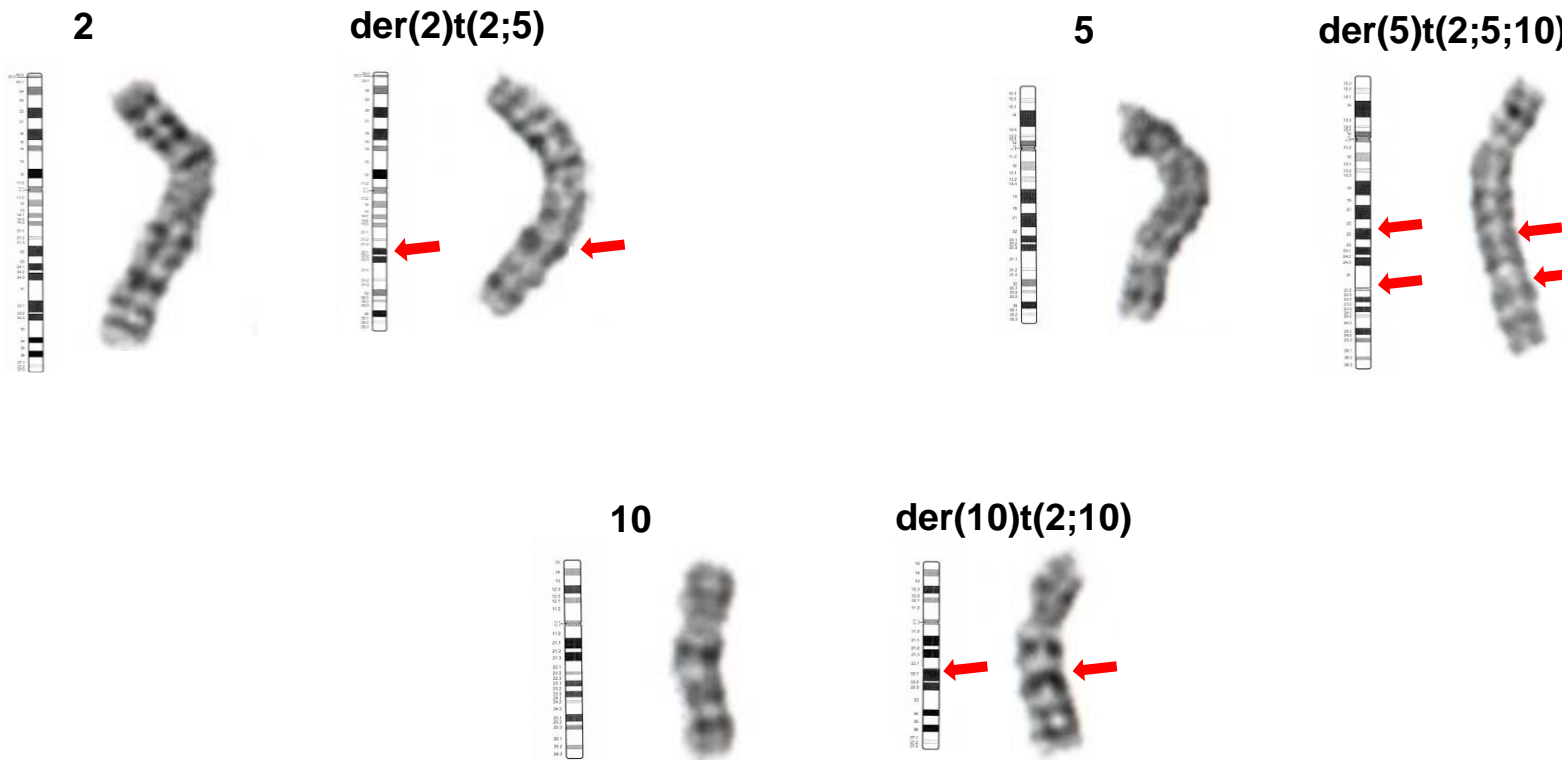
46,XX,t(2;5;10)(q21q31;q22;q22.1)de novo  
vyšetřovaný materiál periferní krev



Rodiče normální karyotyp

# SCHÉMA CHROMOZOMOVÉ PŘESTAVBY

46,XX,t(2;5;10)(q21q31;q22;q22.1)de novo



# DALŠÍ VYŠETŘOVACÍ STRATEGIE

- Pacientka trpí **mentální retardací**
- Karyotyp s **komplexní chromozomovou přestavbou**
- Vznik přestavby *de novo*

## Hypotéza:

- *Jsou translokace balancované?*
- *Nemohou být příčinou postižení pacientky kryptické mikrodelece či dizrupce genů v oblasti zlomů?*

- **Nutno dovyšetřit !!!** → **nové poznatky ve světle použití cytogenomických technologií (array-CGH a NGS)**

Funderburk SJ, Spence MA, Sparkes RS. Mental retardation associated with “balanced” chromosome rearrangements. *American Journal of Human Genetics*. 1977;29(2):136-141.

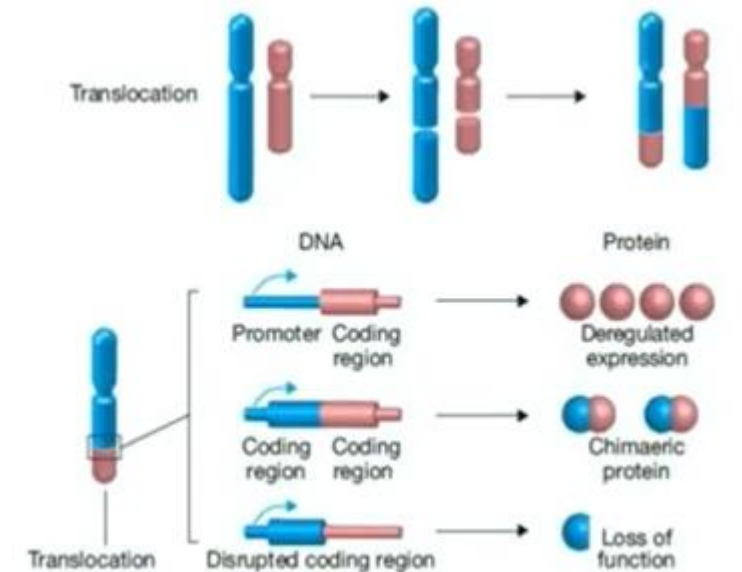
Redin C, Brand H, Collins RL, et al. The Genomic Landscape of Balanced Cytogenetic Abnormalities Associated with Human Congenital Anomalies. *Nature Genetics*. 2017;49(1):36-45. doi:10.1038/ng.3720.



# Zdánlivě balancované chromozomové aberace u naší pacientky ?

## Apparently balanced chromosomal aberrations (ABCAs)

- Mostly benign for the carrier except possible reproductive issues
  - May be inherited in families between healthy individuals
- Disease-causing ABCAs
  - Usually occur de novo
  - Cryptic imbalances
  - Gene disruption
  - Alteration of gene regulation
  - Disruption of chromatin organization => neighboring genes
- Uncharacterized ABCAs cannot be classified:
  - Remain as VUS
  - Investigations are pursued while they are likely unnecessary



Roukos et Misteli, Nat Cell Biol 2014

⇒ Molecular characterization of ABCAs is key to understand the mechanism of the disease

## ORIGINAL ARTICLE

# Cryptic deletions are a common finding in “balanced” reciprocal and complex chromosome rearrangements: a study of 59 patients

M De Gregori, R Ciccone, P Magini, T Pramparo, S Gimelli, J Messa, F Novara, A Vetro, E Rossi, P Maraschio, M C Bonaglia, C Anichini, G B Ferrero, M Silengo, E Fazzi, A Zatterale, R Fischetto, C Previderé, S Belli, A Turci, G Calabrese, F Bernardi, E Meneghelli, M Riegel, M Rocchi, S Gueneri, F Lalatta, L Zelante, C Romano, Ma Fichera, T Mattina, G Arrigo, M Zollino, S Giglio, F Lonardo, A Bonfante, A Ferlini, F Cifuentes, H Van Esch, L Backx, A Schinzel, J R Vermeesch, O Zuffardi



This paper is freely available online under the BMJ Journals unlocked scheme, see <http://img.bmj.com/info/unlocked.dtl>

*J Med Genet* 2007;44:750–762. doi: 10.1136/jmg.2007.052787

## Molecular Cytogenetics



Research

Open Access

### Cryptic genomic imbalances in patients with *de novo* or familial apparently balanced translocations and abnormal phenotype

Carolina Sismani<sup>1</sup>, Sofia Kitsiou-Tzeli<sup>2</sup>, Marios Ioannides<sup>1</sup>, Christodoulos Christodoulou<sup>1</sup>, Violetta Anastasiadou<sup>3</sup>, Goula Stylianidou<sup>3</sup>, Eleftheria Papadopoulou<sup>4</sup>, Emanuel Kanavakis<sup>2</sup>, Zoe Kosmaidou-Aravidou<sup>5</sup> and Philippos C Patsalis\*<sup>1</sup>

Address: <sup>1</sup>Department of Cytogenetics, The Cyprus Institute of Neurology and Genetics Nicosia, Cyprus, <sup>2</sup>Department of Medical Genetics, University of Athens, Choremio Research Laboratory, “Aghia Sophia” Children’s Hospital, Athens, Greece, <sup>3</sup>Department of Pediatrics, Arch Makarios III Hospital, Nicosia, Cyprus, <sup>4</sup>Department of Paediatrics, University Hospital of Heraklion, Crete, Greece and <sup>5</sup>Department of Genetics, Alexandra Hospital, Athens, Greece

Email: Carolina Sismani - [csismani@cing.ac.cy](mailto:csismani@cing.ac.cy); Sofia Kitsiou-Tzeli - [skitsiou@med.uoa.gr](mailto:skitsiou@med.uoa.gr); Marios Ioannides - [mioannid@cing.ac.cy](mailto:mioannid@cing.ac.cy); Christodoulos Christodoulou - [christod@cing.ac.cy](mailto:christod@cing.ac.cy); Violetta Anastasiadou - [vanast@cing.ac.cy](mailto:vanast@cing.ac.cy); Goula Stylianidou - [cycenter@cing.ac.cy](mailto:cycenter@cing.ac.cy); Eleftheria Papadopoulou - [bm-pjhkka@otenet.gr](mailto:bm-pjhkka@otenet.gr); Emanuel Kanavakis - [ekanakav@cc.uoa.gr](mailto:ekanakav@cc.uoa.gr); Zoe Kosmaidou-Aravidou - [garavidis@yahoo.gr](mailto:garavidis@yahoo.gr); Philippos C Patsalis\* - [patsalis@cing.ac.cy](mailto:patsalis@cing.ac.cy)

\* Corresponding author



## HHS Public Access

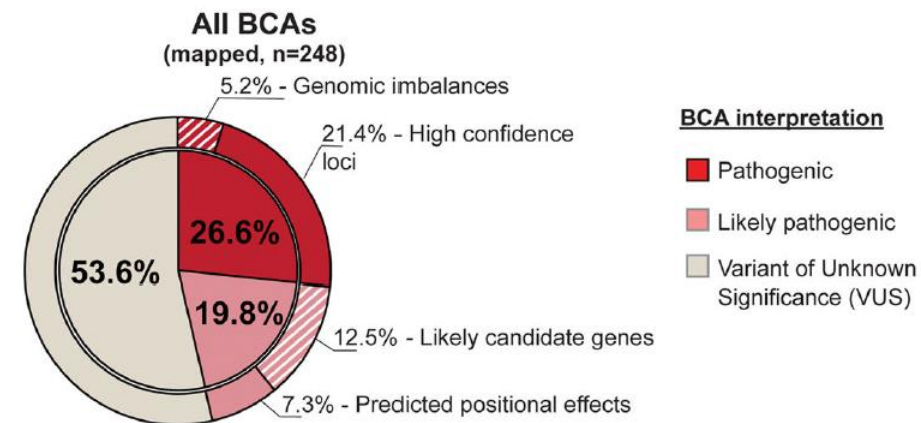
Author manuscript

*Nat Genet.* Author manuscript; available in PMC 2017 July 01.

Published in final edited form as:

*Nat Genet.* 2017 January ; 49(1): 36–45. doi:10.1038/ng.3720.

### The Genomic Landscape of Balanced Cytogenetic Abnormalities Associated with Human Congenital Anomalies



De novo BCAs associated with congenital anomalies disrupt functionally relevant loci.

*Redin et al. 2017*

# DALŠÍ VYŠETŘENÍ PACIENTKY - přehled

## 1996:

- Prenatální stanovení karyotypu (AMC)

## 2003:

- Postnatální stanovení karyotypu (G-pruhování, FISH, SKY)
- **CGH, HR-CGH – negativní - nízké rozlišení?**

## 2011:

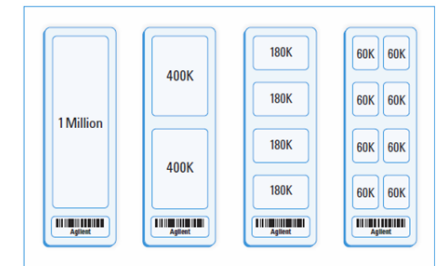
- **Array-CGH: OGT 4x44K** (cca 43 000 CGH sond, celková průměrná hustota sond 43 kb/sonda) - **negativní**
- **Array-CGH: Agilent Technologies 1x244K** (cca 240 000 CGH sond, celková průměrná hustota sond 9 kb/sonda) - **negativní**

## 2017:

- **Array-CGH: Agilent Technologies 1x1M** (cca 963 000 CGH, celková průměrná hustota sond **2,1 kb/sonda**)

### Oligo arrays Agilent

- 4x44K 43 kb rozlišení
- 1x244K 9 Kb rozlišení

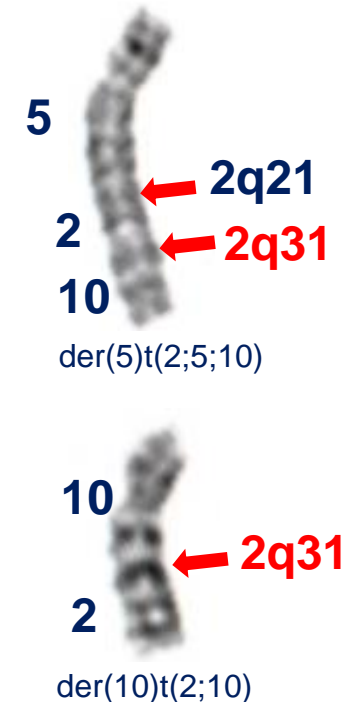
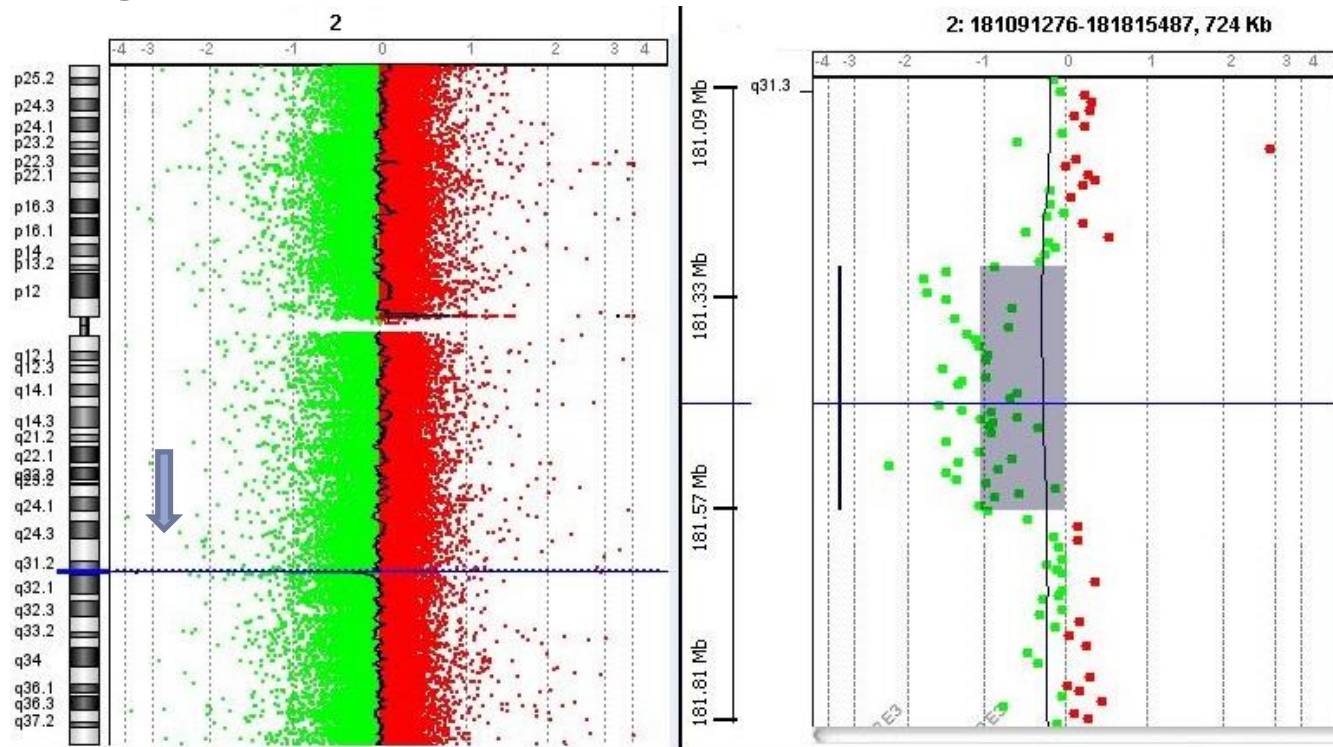


# VYŠETŘENÍ PACIENTKY 2017 (array-CGH) 1M čip - nálezy

SurePrint G3 Human CGH Microarray 1x1M (963 000 sond, celková průměrná hustota sond 2,1 kb)

**arr[GRCh37] 2q31.3(181303304\_181574921)x1,14q23.3(67174974\_67227131)x1**

Nalezena mikrolece oblasti 2q31.3 (272 kb) – suspektní místo zlomu?  
(gen *SCHLAP 1*)



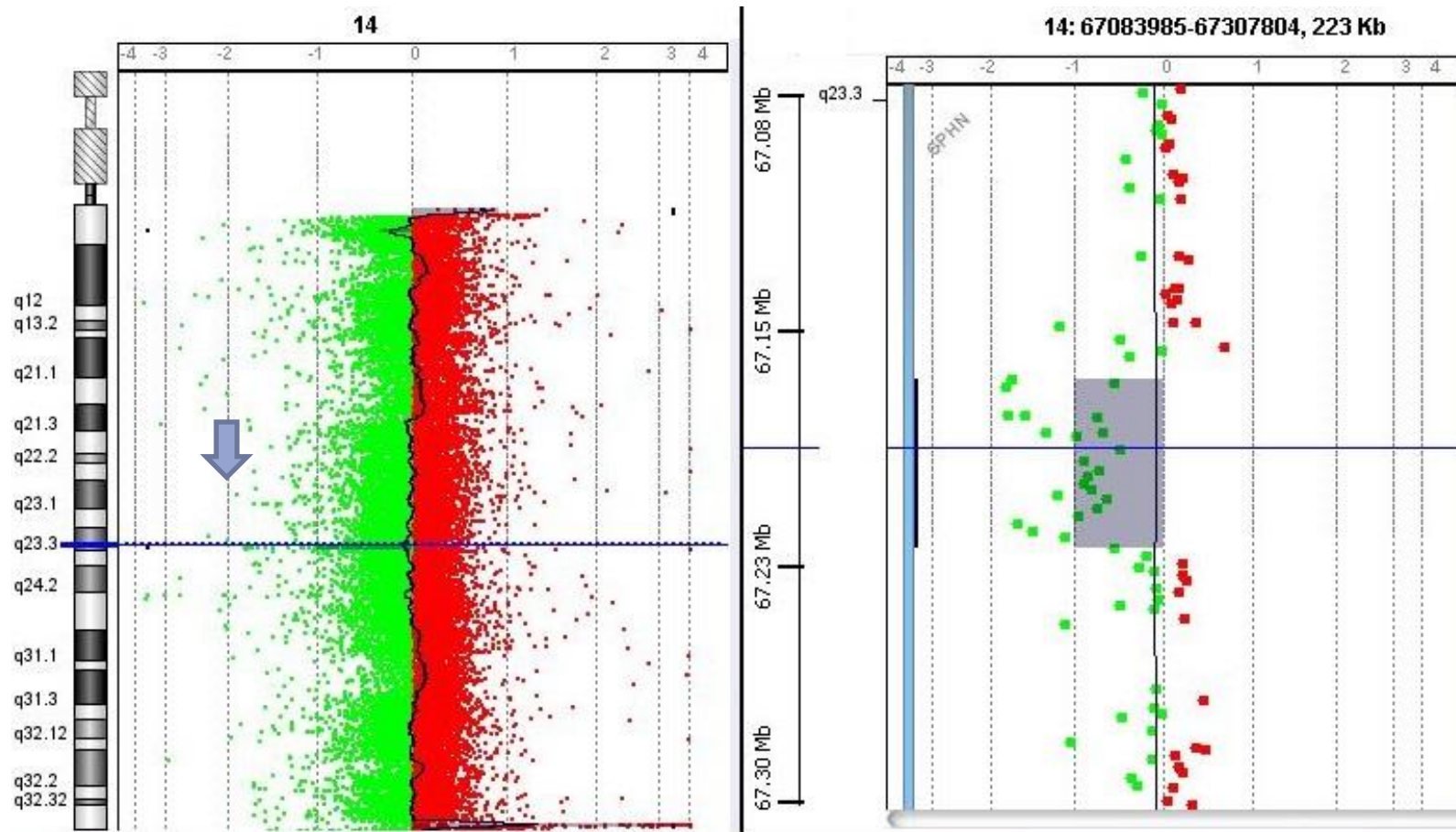


# VYŠETŘENÍ PACIENTKY

## (array-CGH) 1 M čip

### Přidatný nález

mikrodelece oblasti 14q23.3 (53 kb) – pravděpodobně benigní varianta (malá část intronu genu *GPHN*)



# VYŠETŘENÍ PACIENTKY array-CGH ZÁVĚR

## **Gen *SCHLAP1* (2q31.3):**

V oblasti mikrodelece 2q31.3 se nachází část genu *SCHLAP1*, který kóduje **dlouhou nekódující RNA**. Funguje jako **regulátor transkripce**, antagonizuje funkci komplexu SWI/SNF zeslabením vazby SWI/SNF na příslušné oblasti genomu. V databázi DECIPHER se **nenachází žádný pacient se stejnou či podobnou mikrodelečí oblasti 2q31.3.**

([www.omim.org](http://www.omim.org))

## **Gen *GPHN* (14q23.3)**

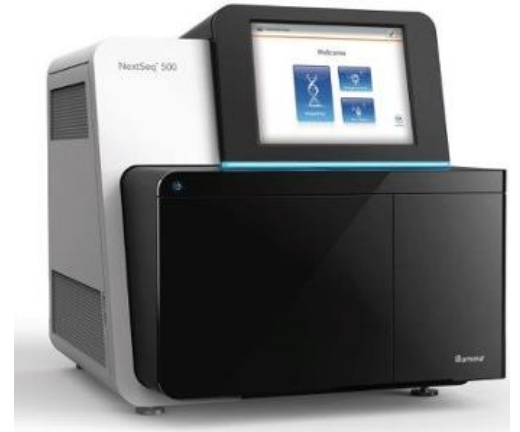
Tento gen kóduje gephyrin, organizační protein, který shlukuje a lokalizuje inhibiční glycinové a GABA receptory na mikrotubulárním matrixu neuronální postsynaptické membrány. Gephyrin je esenciální pro postsynaptickou lokalizaci inhibičních neurotransmitterových receptorů v CNS a při biosyntéze molybdenového kofaktoru (MoCo) v různých periferních orgánech. Heterozygotní delece exonů 3 a 5 genu *GPHN* může hrát roli u poruch vývoje nervového systému, zejména poruch autistického spektra a schizofrenie.

([www.omim.org](http://www.omim.org))

**Mikrodelece oblasti 14q23.3 zahrnuje pouze malý úsek intronu genu *GPHN*, jedná se pravděpodobně o benigní variantu.**

# VYŠETŘENÍ PACIENTKY pomocí NGS

- 2015-2018 – pilotní studie NGS u 35 pacientů s DID /VVV na OLG FN Brno  
Spolupráce OLG FN Brno, LMC MUNI, CEITEC MU
- NGS na Illumina MiSeq a Illumina NextSeq 500
- panel 2742 genů  
„ClearSeq Inherited Disease“  
(Agilent Technologies, obsahuje >1200 genů spojených s etiologií DID)
- bioinformatické zpracování Mgr. Jan Oppelt, Ph.D. (t.č. CEITEC MU)
- filtrace dat a vybrané varianty porovnány s databázemi ClinVar, OMIM atd. v korelaci s fenotypem pacientů
- verifikace: Sangerovo sekvenování
- **celkový záchyt patogenních variant 26 % !**



# VYŠETŘENÍ PACIENTKY - cílené NGS – varianty nejasného významu

gen	Genomová pozice (hg19) detekované sekvenční varianty	Úroveň proteinu	asociovaný fenotyp
<i>RNF213</i>	NC_000017.10:g.78291058T>C	p.(Met961Thr) *	Moyamoya (vaskulární porucha intrakraniálních tepen)
<i>CDH15</i>	NC_000016.9:g.89245912G>A	p.(Arg44Gln) *	Mentální retardace, faciální stigmatizace, abnormality končetin
<i>LMNA</i>	NC_000001.10:g.156108510C>T	p.(Arg644Cys)	Dilatovaná kardiomyopatie

\* Pouze *in silico* predikce, varianta dosud nepopsána v literatuře či databázích

gen	Varianta (úroveň proteinu)	<i>In silico</i> predikce vlivu sekvenční varianty na strukturu a funkci proteinu			
		<i>Provean</i>	<i>SIFT</i>	<i>Polyphen-2 (HumDiv)</i>	<i>Polyphen-2 (HumVar)</i>
<i>RNF213</i>	p.(Met961Thr)	deleterious	damaging	possibly damaging	benign
<i>CDH15</i>	p.(Arg44Gln)	neutral	damaging	probably damaging	possibly damaging
<i>LMNA</i>	p.(Arg644Cys)	neutral	damaging	probably damaging	possibly damaging



# ZÁVĚR

- Vyšetřili jsme genom pacientky dostupnými citlivými metodami.
- Array-CGH 1 x 1 M čip – nalezeny 2 mikrolece (53 kb a **272 kb**) – disrupce genu **SCHLAP1** a **GPH**
- NGS - našli jsme pouze varianty nejasného významu nebo benigní varianty.

**Mikrolece oblasti 2q31.3 – kauzální příčina postižení?**



**2q33.1 deletions and other deletions  
between 2q31 and 2q33 ?**

**Databáze... popsány podobné případy...**



Cytogenetics → NGS/ES → GS/ Next-Gen Cytogenomics



1888      1923      1956      1970s      1986      2004      2007      2010      2010      2014      2015      2018      2020      2020

The term "chromosome" coined

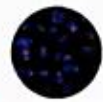
Humans reported to have 48 chr

Humans confirmed to have 46 chr

Chromosome banding techniques developed



FISH



Oligo array CGH and SNP array copy number analysis

CMA is reported to be Cost-effective vs Karyotype and FISH



ACMG & ISCA Recommends Replacing Karyotyping with Chromosomal Microarrays

NGS technology introduced into the clinic

FDA Clearance of first CMA

ACMG Standards and Guidelines for interpretation of sequencing variants

ES/GS applications in clinical care

ACMG technical standards on NGS panels AND systematic review on ES/GS for constitutional disorders

Saphyr's OGM in constitutional genetic disorders and neoplastic disorders



- NGS- Next Gen Sequencing
- ES- Exome Sequencing
- GS- Genome Sequencing
- OGM- Optical Genome Mapping

# Cyto(genetika) 200 let po objevech J.G. Mendela



*se transformovala do  
„Next-Generation Cytogenomics“*  
avšak zůstává

**stále jedním z nosných pilířů moderních  
vyšetřovacích metod využívaných v  
oblasti lékařské genetiky, onkologie a  
dalších medicínských oborů**

