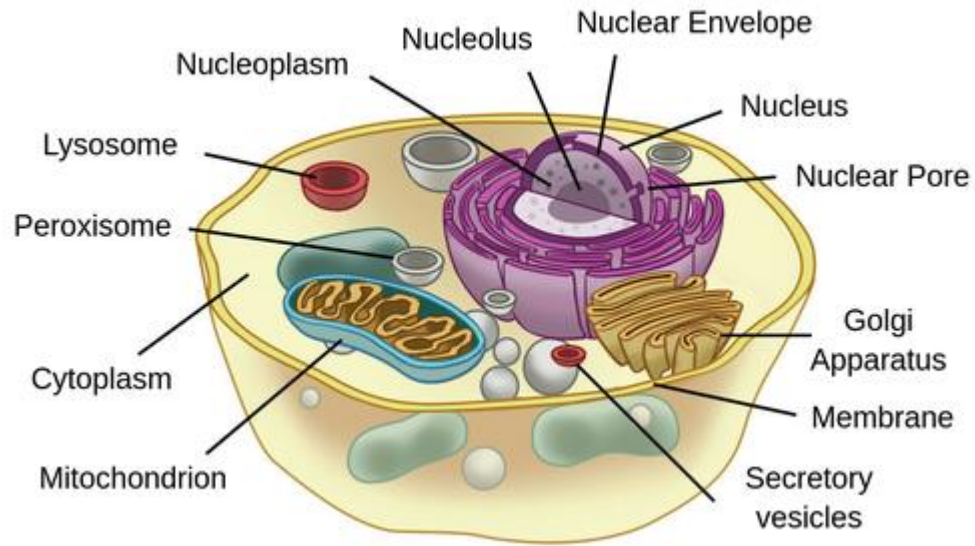


DNA mikročipy jako nástroj funkční a komparativní genomiky

Doc. RNDr. Sabina Ševčíková, PhD

BMS ÚPF LF MU

Buňka



Jádro

Nucleus

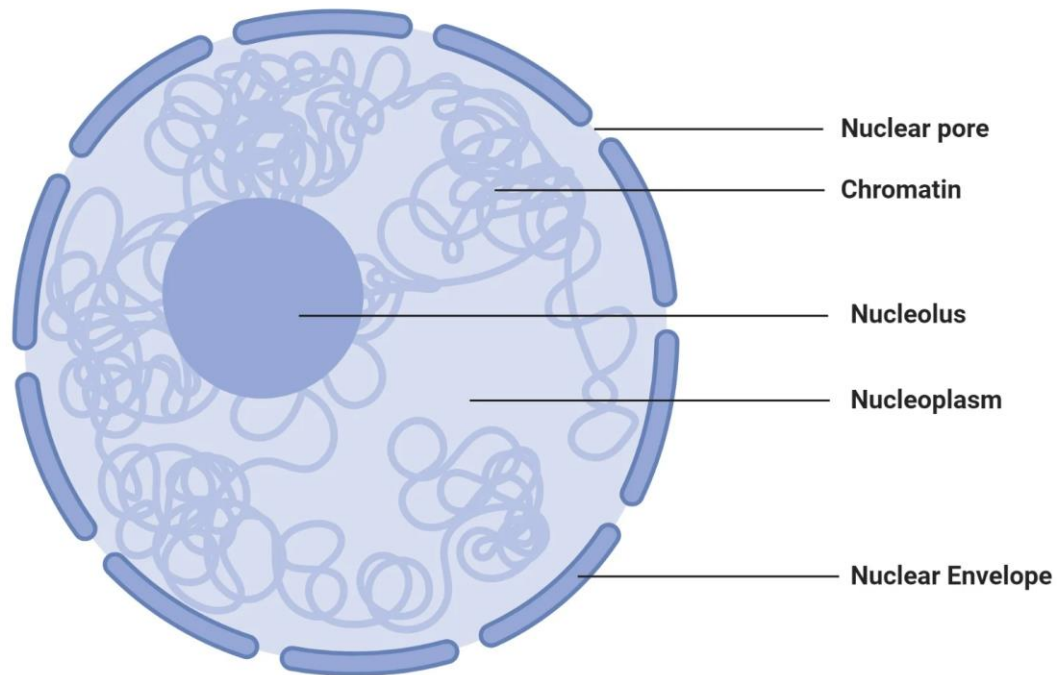
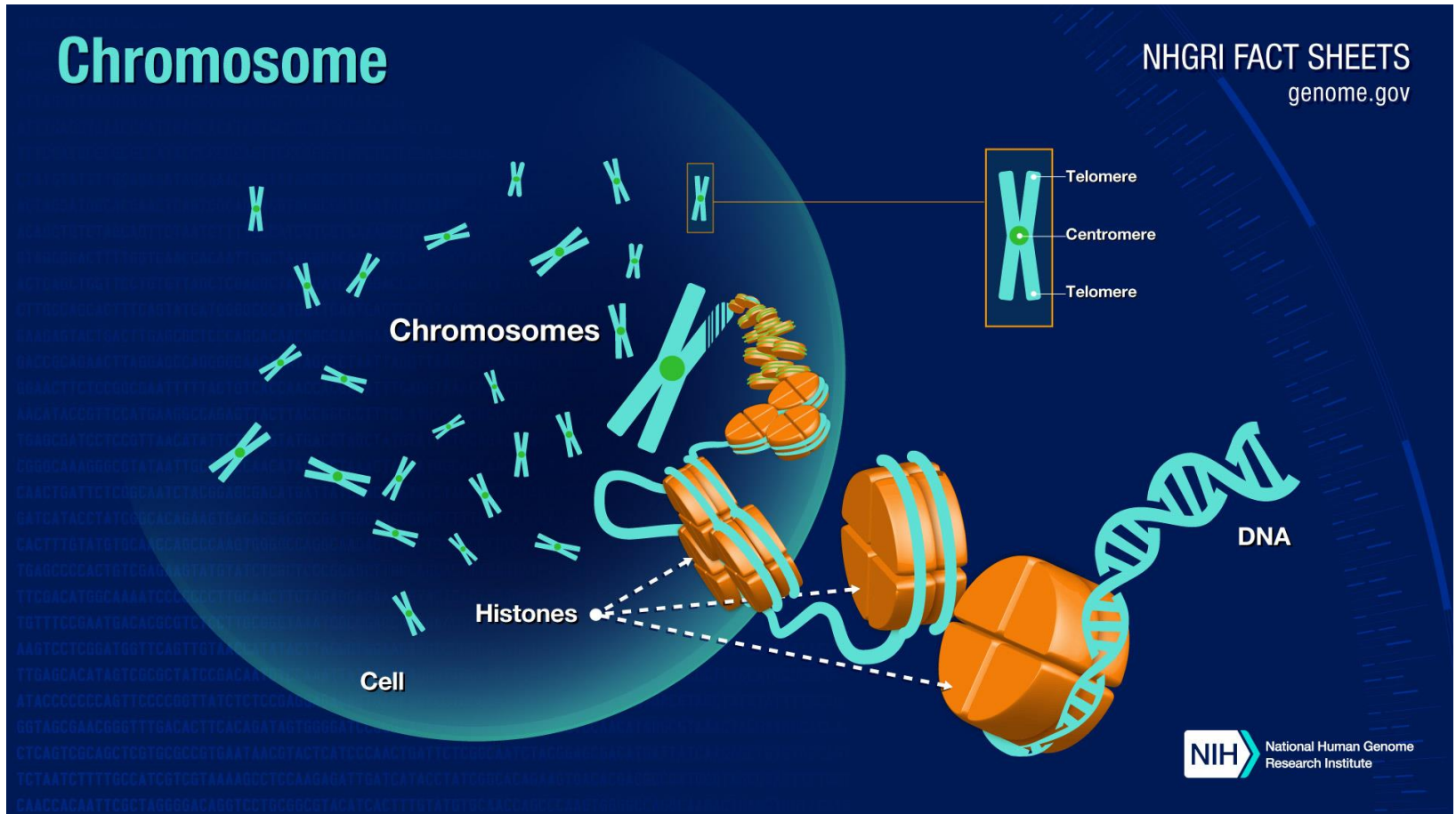
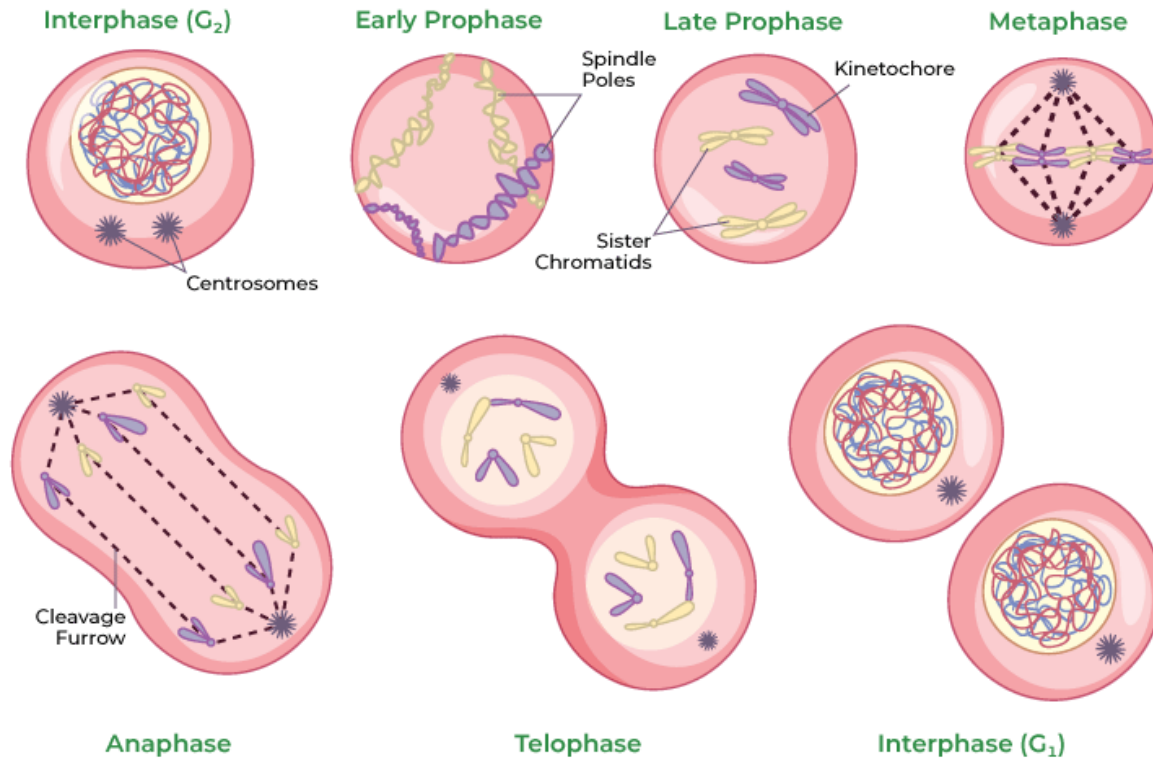


Figure: Nucleus, Image Copyright © Sagar Aryal, www.microbenotes.com

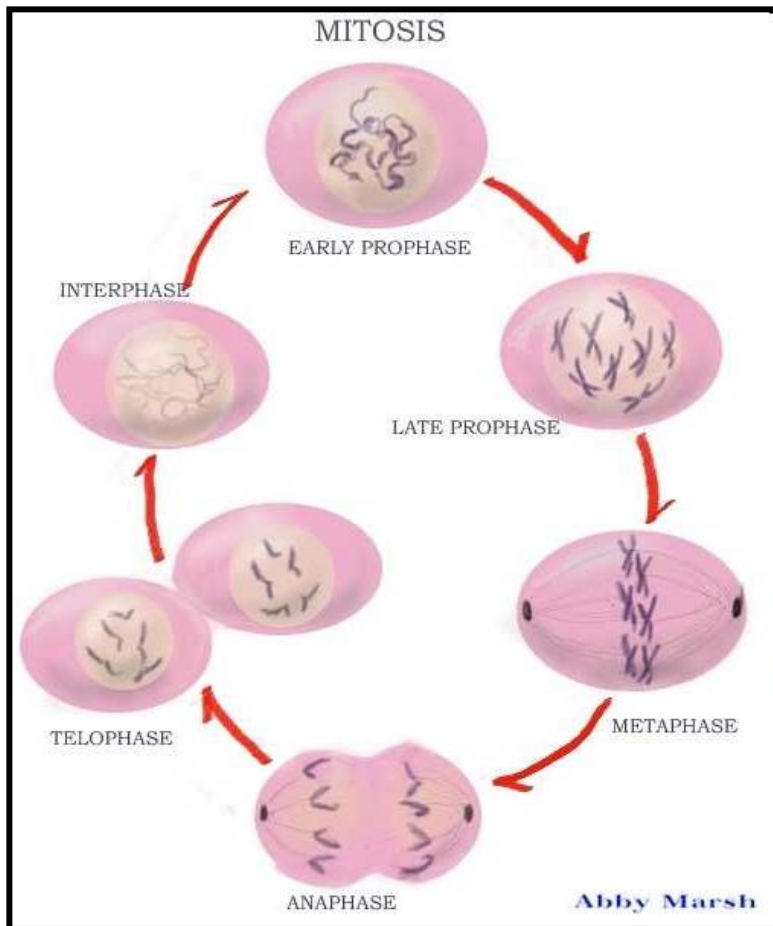
Chromozomy



Cell Division



Fáze mitózy



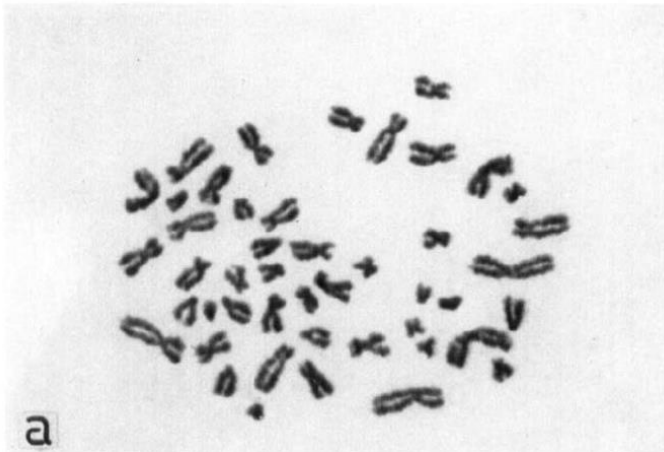
- Profáze
- Metafáze
- Anafáze
- Telofáze

Počet lidských chromozomů

Joe Hin Tjio (1919 - 2001)

Albert Levan (1905 -1998)

**Člověk 23 párů chromozomů,
celkem tedy 46 chromozomů**



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

THE CHROMOSOME NUMBER OF MAN

By JOE HIN TJIO and ALBERT LEVAN

ESTACION EXPERIMENTAL DE AULA DEI, ZARAGOZA, SPAIN, AND CANCER CHROMOSOME LABORATORY, INSTITUTE OF GENETICS, LUND, SWEDEN

WHILE staying last summer at the Sloan-Kettering Institute, New York, one of us tried out some modifications of Hsu's technique (1952) on various human tissue cultures carried in serial *in vitro* cultivation at that institute. The results were promising inasmuch as some fairly satisfactory chromosome analyses were obtained in cultures both of tissues of normal origin and of tumours (LEVAN, 1956).

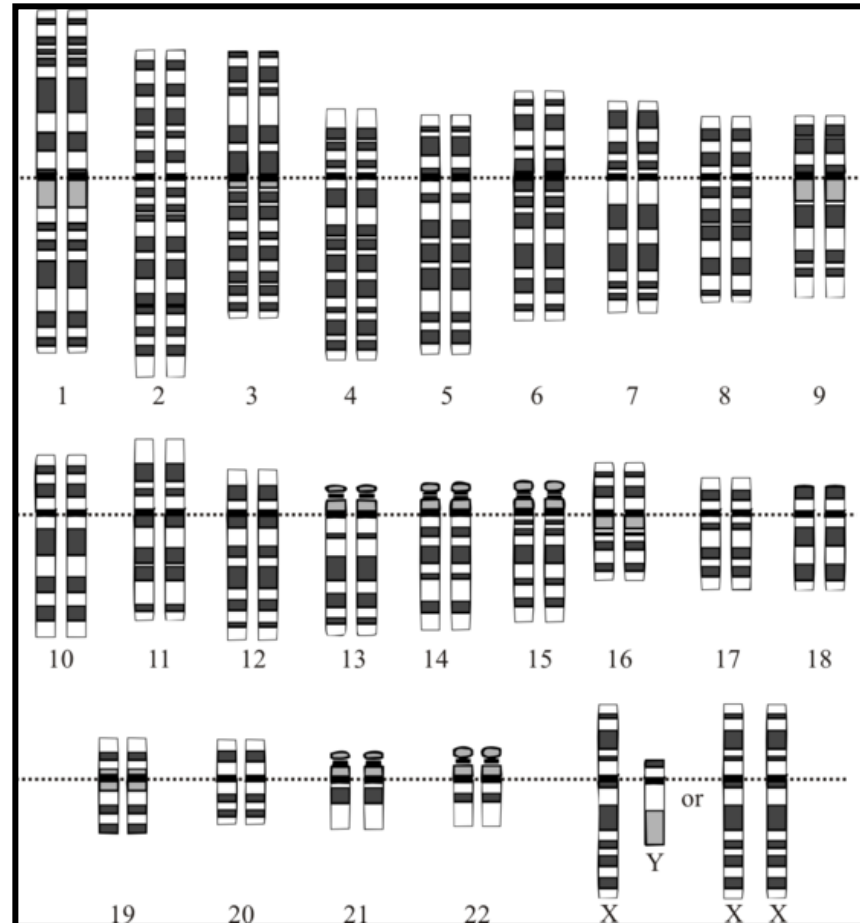
Later on both authors, working in cooperation at Lund, have tried still further to improve the technique. We had access to tissue cultures of human embryonic lung fibroblasts, grown in bovine amniotic fluid; these were very kindly supplied to us by Dr. RUNE GRUBB of the Virus Laboratory, Institute of Bacteriology, Lund. All cultures were primary explants taken from human embryos obtained after legal abortions. The embryos were 10–25 cm in length. The chromosomes were studied a few days after the *in vitro* explantation had been made.

In our opinion the hypotonic pre-treatment introduced by Hsu, although a very significant improvement especially for spreading the chromosomes, has a tendency to make the chromosome outlines somewhat blurred and vague. We consequently tried to abbreviate the hypotonic treatment to a minimum, hoping to induce the scattering of the chromosomes without unfavourable effects on the chromosome surface. Pre-treatment with hypotonic solution for only one or two minutes gave good results. In addition, we gave a colchicine dose to the culture medium 12–20 hours before fixation, making the medium 50×10^{-7} mol/l for the drug. The colchicine effected a considerable accumulation of mitoses and a varying degree of chromosome contraction. Fixation followed in 60 % acetic acid, twice exchanged in order to wash out the salts left from the culture medium and from the hypotonic solution that would otherwise have caused precipitation with the orcein. Ordinary squash preparations were made in 1 % acetic orcein. For chromosome counts the squashing was made very mild in order to keep the chromosomes in the metaphase groups. For idiogram studies a more thorough squashing was preferable. In many cases single cells were squashed

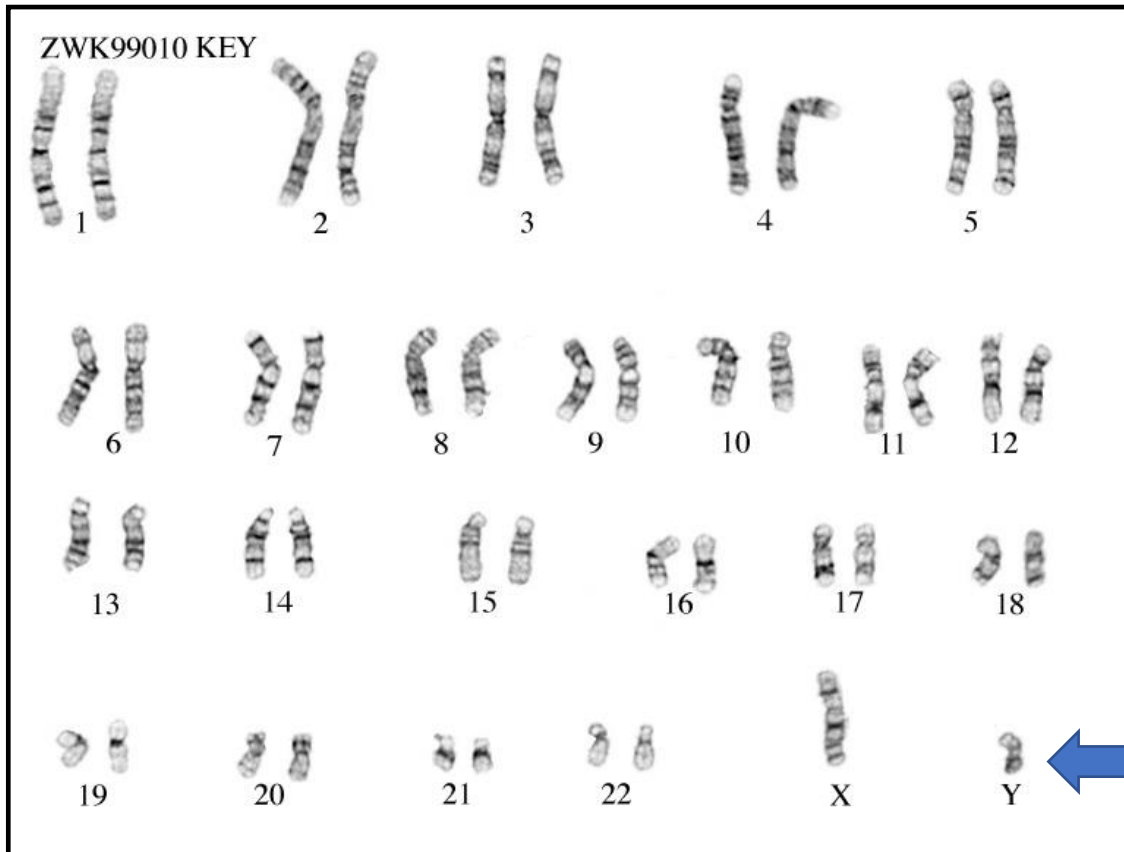
Karyotypizace

- Počet, velikost a tvar chromozomů
- Černo-bílé analýzy

Karyotyp - schéma



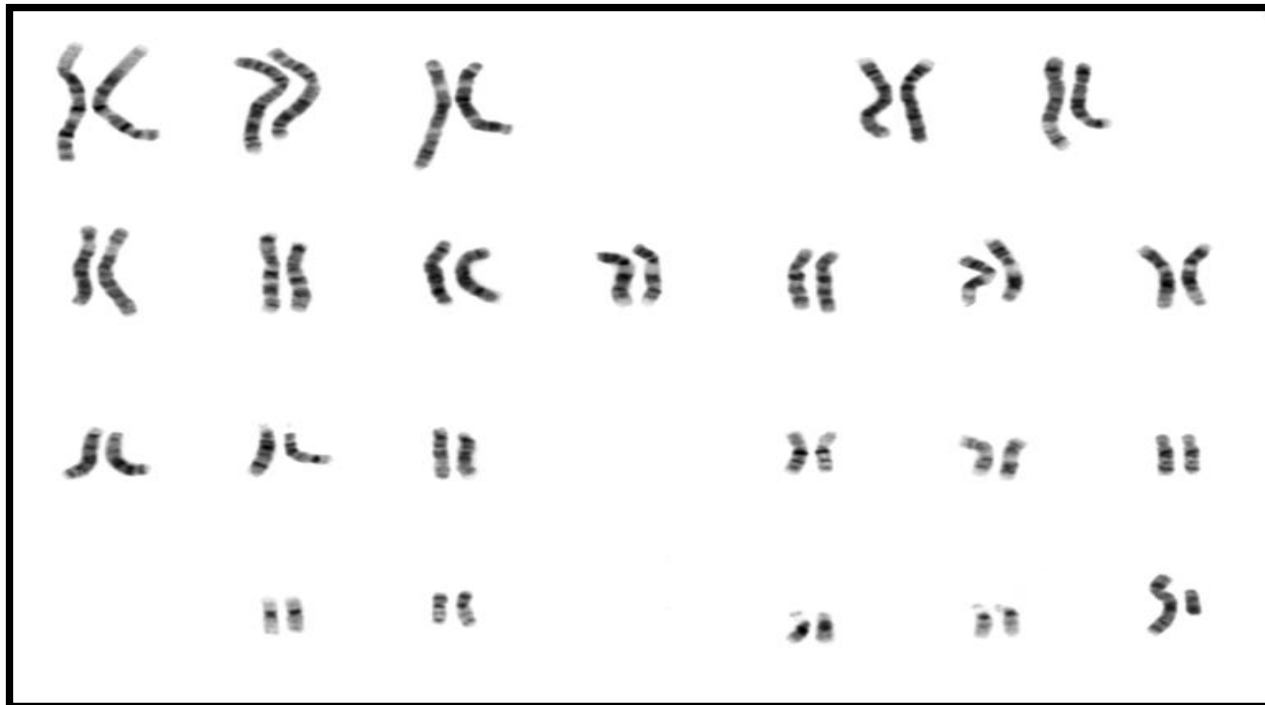
Karyotyp - doopravdy



Možnosti vyšetření karyotypu člověka

- Metafázní cytogenetika – vyšetření buněk v metafázi
- Interfázní cytogenetika – vyšetření buněk v interfázi
- Cytogenetika založená na izolaci DNA

Metafázní cytogenetika

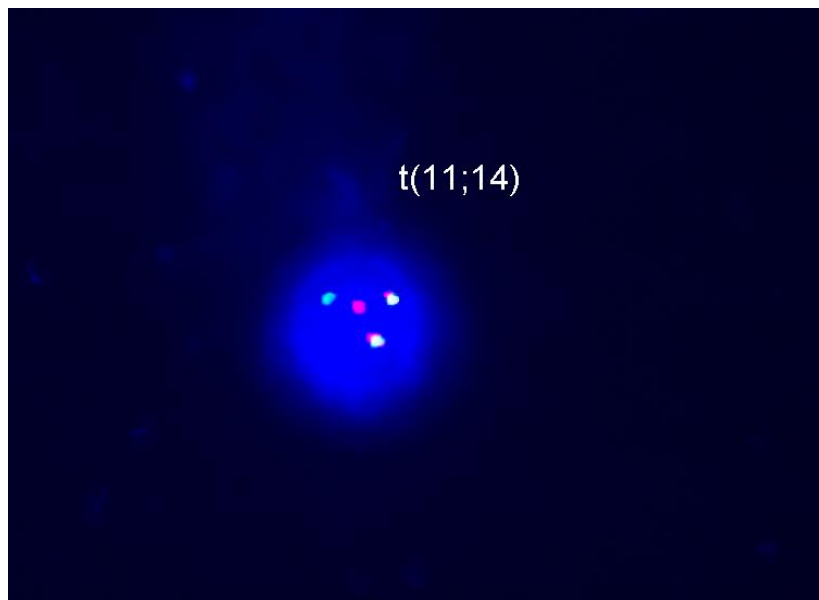


Metafázní cytogenetika



Trizomie 21. chromozomu
Down syndrome

Interfázni cytogenetika



- Vyšetření interfázni jader pomocí fluorescenčně značených sond

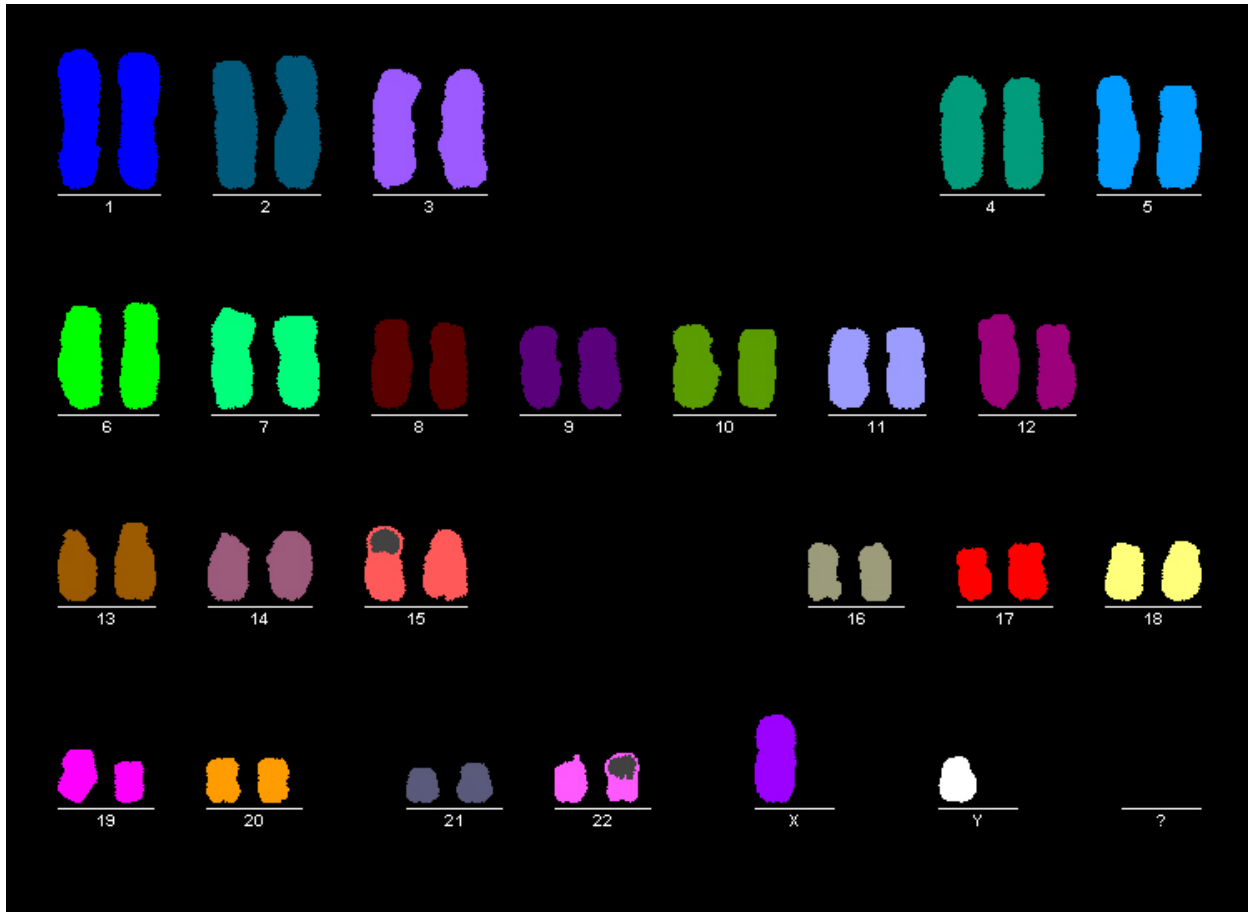
FISH- fluorescenční *in situ* hybridizace

V. Vránová

SKY karyotypizace

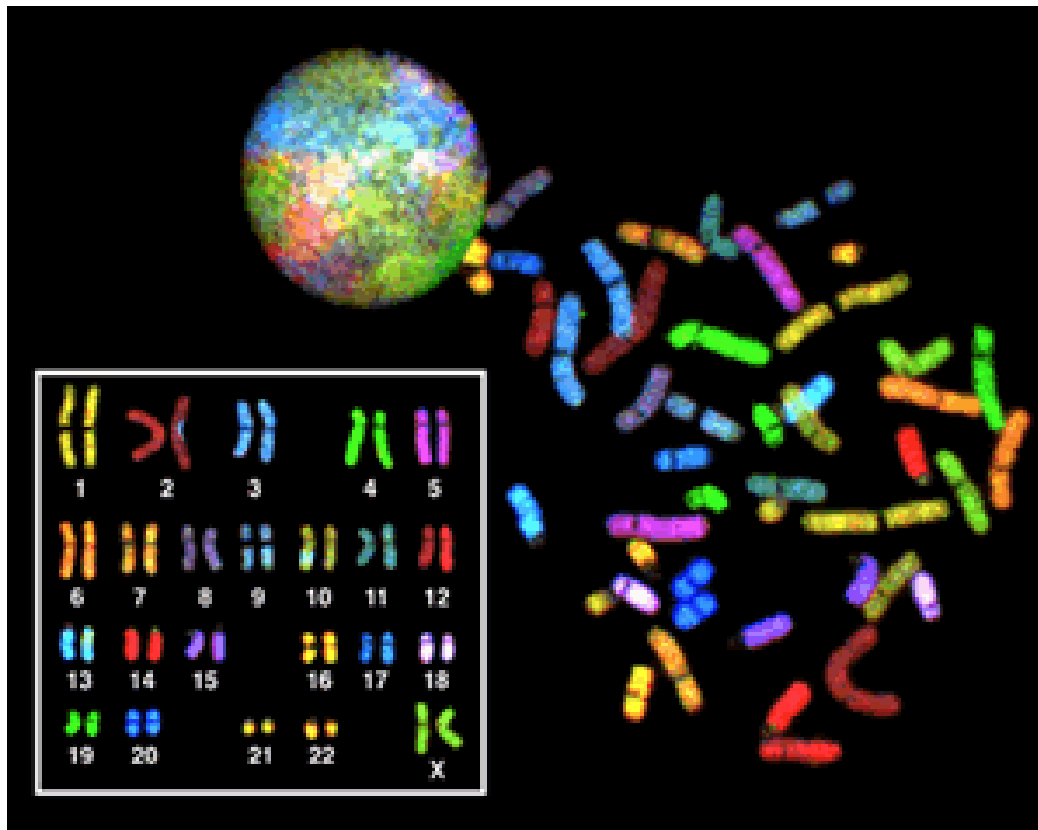
- Vizualizace všech chromozomů
- Každý chromozom jiná barva
- Knihovna krátkých prob, které se vážou na specifická místa na chromozomu

SKY spektrální karyotypizace

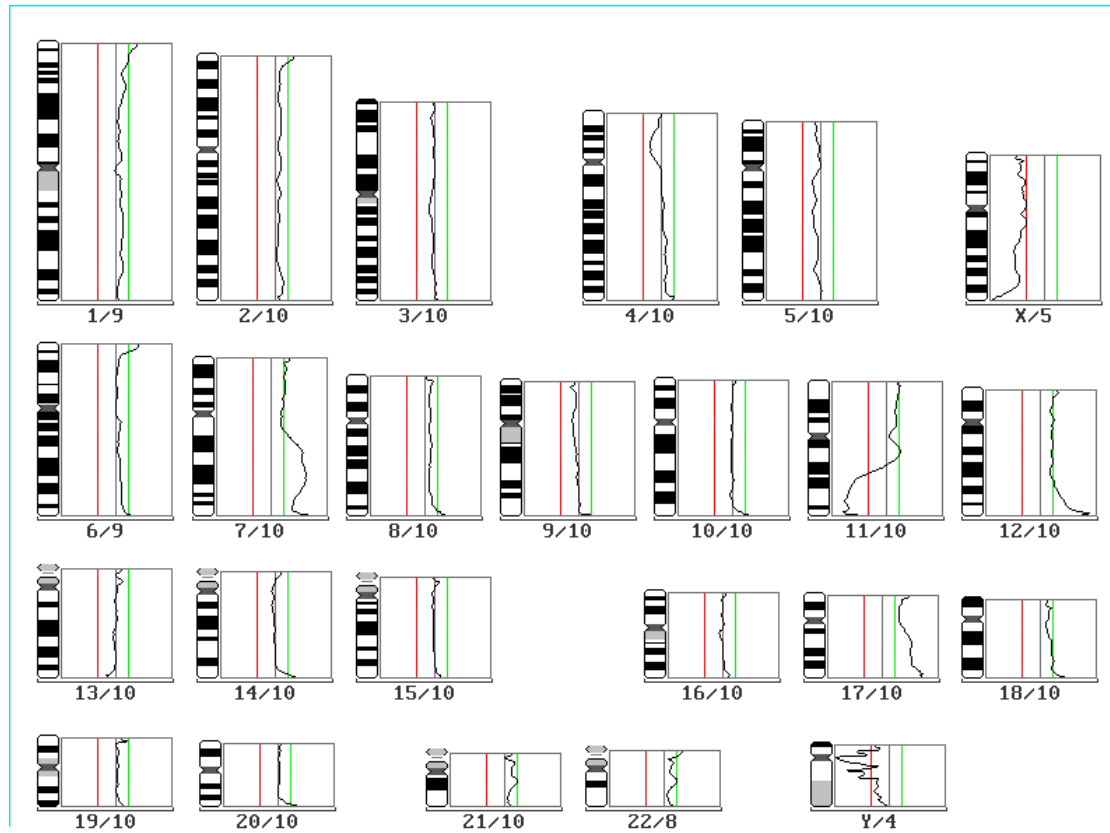


K detekci translokací

SKY



Cytogenetika založená na izolaci DNA



Komparativní genomová hybridizace (CGH)

Comparative Genomic Hybridization for Molecular Cytogenetic Analysis of Solid Tumors

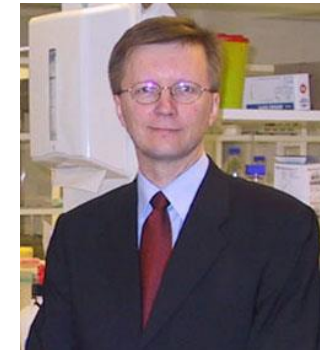
Anne Kallioniemi,* Olli-P. Kallioniemi, Damir Sudar,
Denis Rutovitz, Joe W. Gray, Fred Waldman, Dan Pinkel

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

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

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

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



Science, 1992

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

*To whom correspondence should be addressed.

Komparativní genomová hybridizace

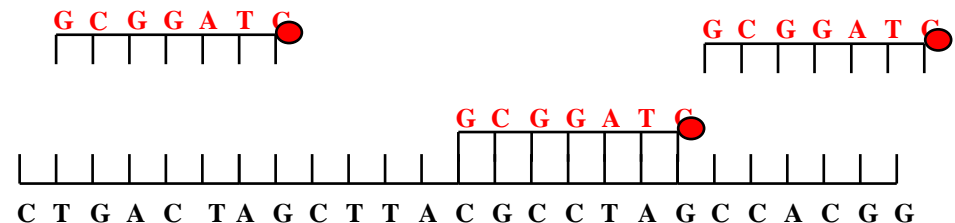
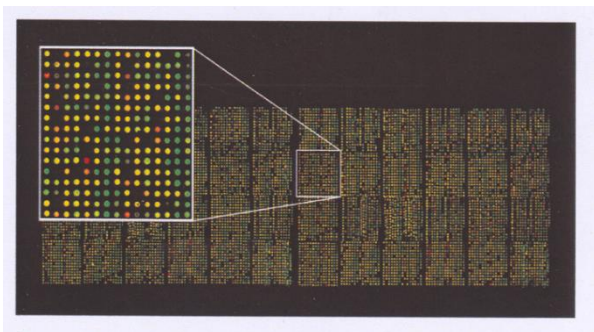
Modifikace klasických metod ke zjištění zisků a ztrát v rámci celého genomu

Klasická FISH

normální DNA → udělat probu úseku → nabarvit abnormální target → identifikace abnormálního targetu

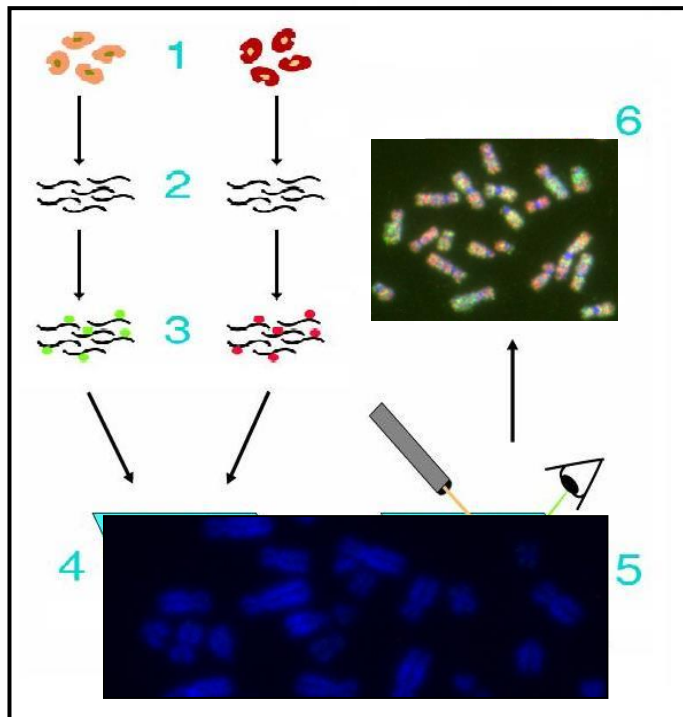
Komparativní genomová hybridizace

normální DNA → udělat probu (celý genom) → kvantifikace na normální target → kvantifikace abnormálního genomu

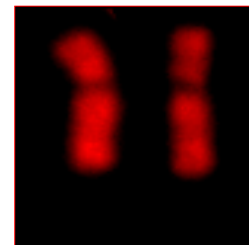


Komparativní genomová hybridizace

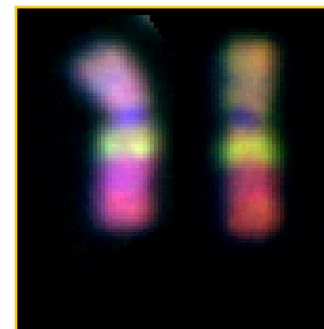
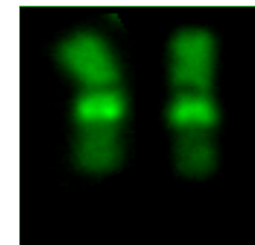
- umožňuje během jedné hybridizační reakce stanovit ztráty (delece) či zisky (duplikace, amplifikace) sekvencí DNA v celém genomu bez ohledu na mitotickou aktivitu buněk
- rozlišovací schopnost – 10 Mb, klonální zastoupení – 50 %
- nevyžaduje mitotickou aktivitu zkoumaných buněk



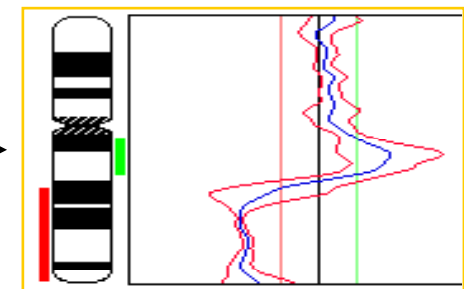
Referenční DNA



Testovaná DNA



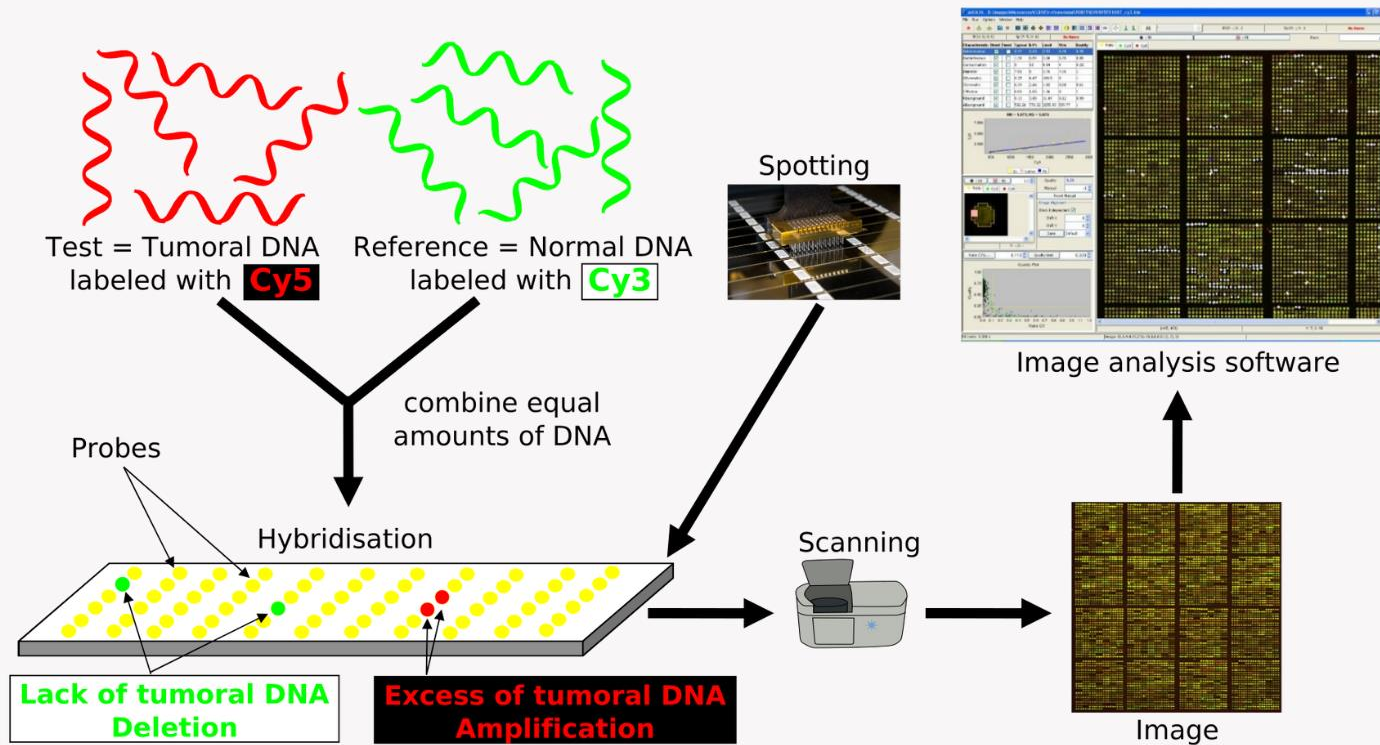
zelená - zisk



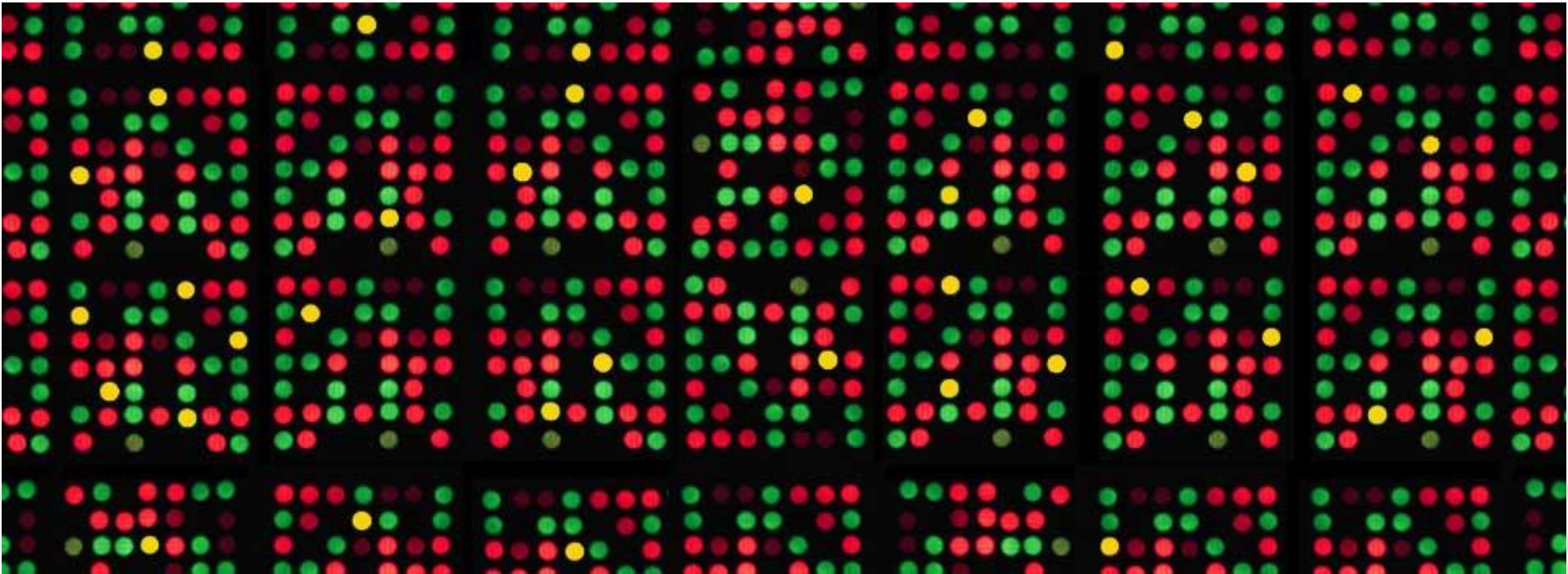
červená - ztráta

Array-CGH postup

Array CGH Protocol



Výsledky array-CGH



Požadavky pro aCGH

- DNA o dobré kvalitě a množství z
 - Periferní krve
 - Kostní dřeň
 - Solidních nádorů
 - amniocytů

$c > 100 \text{ ug/ml}$, $A_{260}/A_{280} = 1,8$

Referenční DNA – zdravý muž, žena

Rozlišení metod

- a) Cytogenetika

- Karyotyping > 10 Mb kompletní genom
- Traditional CGH > 2 Mb kompletní genom
- FISH (interphase) \geq 20 Kb specifické proby
- FISH (metaphase) \geq 100 Kb specifické proby

- b) aCGH

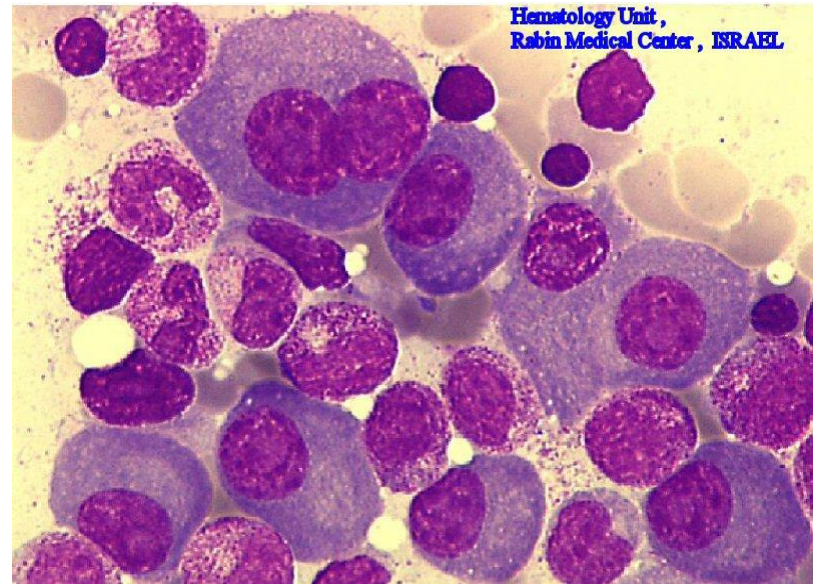
- BAC 100 Kb kompletní genom
- cDNA 2 Kb jen geny
- Oligo (60-mer) 0,06 Kb kompletní genom

Využití aCGH

- Klinická cytogenetika (prenatálně, postnatálně)
- Nádorová cytogenetika

Mnohočetný myelom

- Krevní nádorové onemocnění
- 10% krevních nádorů
- Medián věku 60 let
- 4/100 000
- Infiltrace plazmatických buněk do kostní dřeně
- Osteolytické leze
- Monoklonální IgM v séru nebo moči



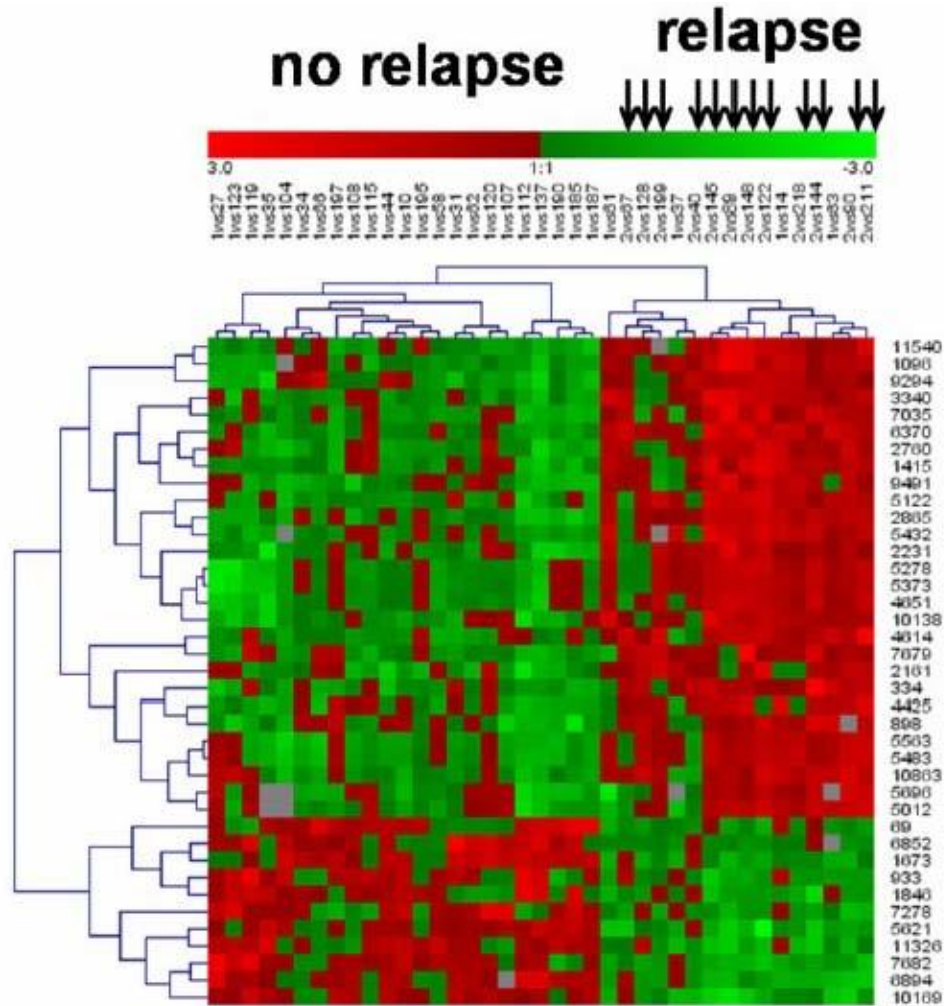
Genomické metody

- Array CGH (DNA)
- GEP (RNA)
- Real-time PCR (RNA)

GEP

- Množství RNA transkribované v buňce
- Pro stanovení high-risk pacientů
- Rozdělení MM na několik podskupin podle exprese cyklinu D
- High-risk patienti- exprese 17 genů

GEP



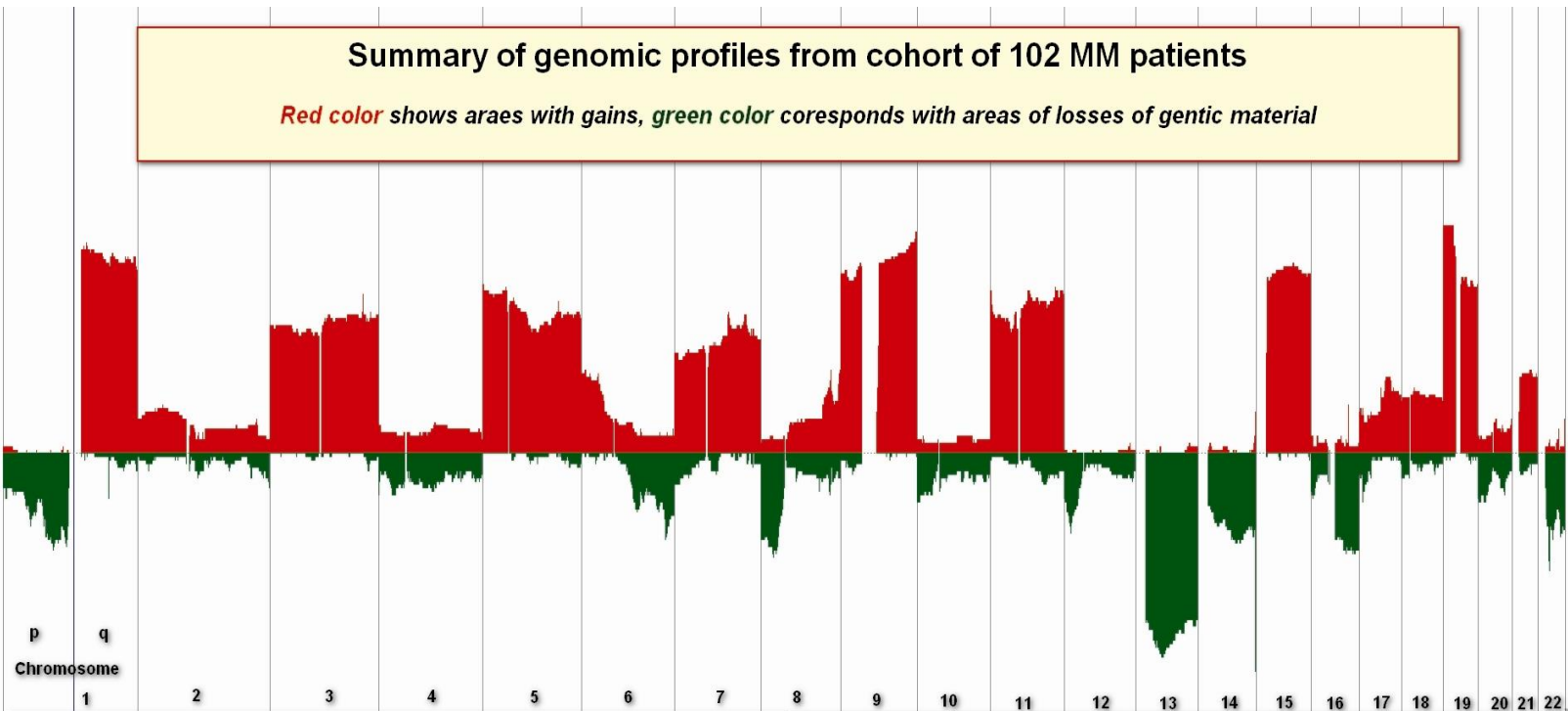
Array CGH

- celogenomové komparativní genomové hybridizace na čipech
- Analýzy chromozomových změn v celém genomu
- Lepší kvalita i množství dat
- Detekce chromosomálních aberací kolem 2kb v jediné reakci

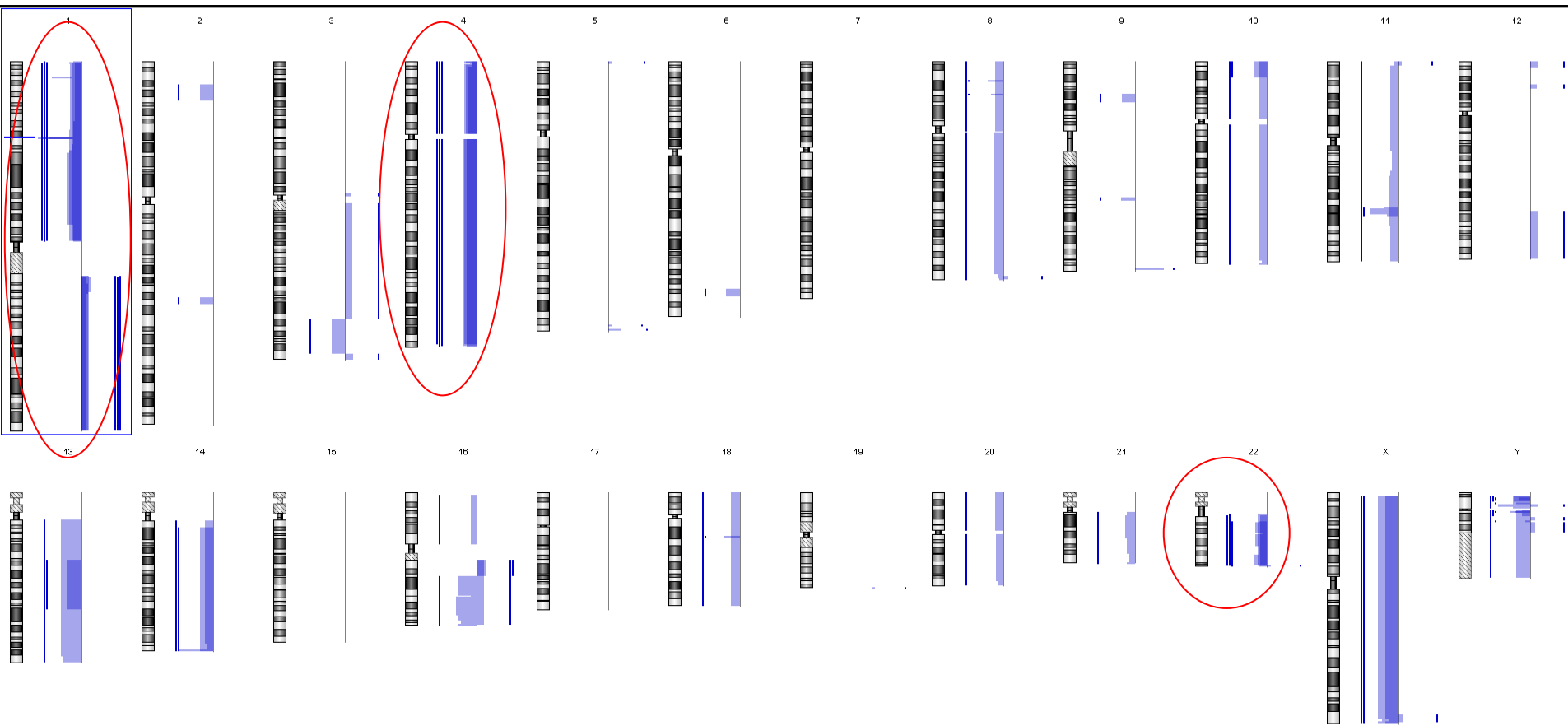
Využití aCGH v MM

Summary of genomic profiles from cohort of 102 MM patients

Red color shows areas with gains, green color corresponds with areas of losses of genetic material



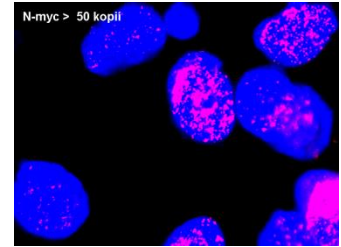
Hledání kandidátních genů pro prognózu



Real-time PCR

- Polymerase chain reaction
- Pro ověření exprese genů z GEP
- Detekce fluorescenčního signálu v reálném čase
- Kvantitativně množství templátu

Neuroblastom



- pevný dětský nádor sympatického nervového systému
- 5–10 případů /10⁶ dětí/rok
- 10 % rakoviny v dětském věku; 50 % do 2 let; 90 % do 6 let

G.M.Brodeur et al., 1995: Molecular Basis for Heterogeneity in Human Neuroblastomas

Charakteristika	TYP I (LR)	Typ II (IMR)	TYP III (HR)
N-myc	normální	normální	amplifikováno
1p36 LOH	ne	±ano	obvykle ano
Ploidie	hyper2n / 3n	2n / 4n	2n / 4n
Věk*	obvykle < 1rok	obvykle = 1 rok	obvykle 1-5 let
Stadium ^o	obvykle 1, 2, 4s	obvykle 3, 4	obvykle 3, 4
Pravděpodobnost přežití 3 roky	95%	25-50%	< 5%

Význam array CGH u dětských pacientů s neuroblastomem

VOLUME 27 · NUMBER 7 · MARCH 1 2009

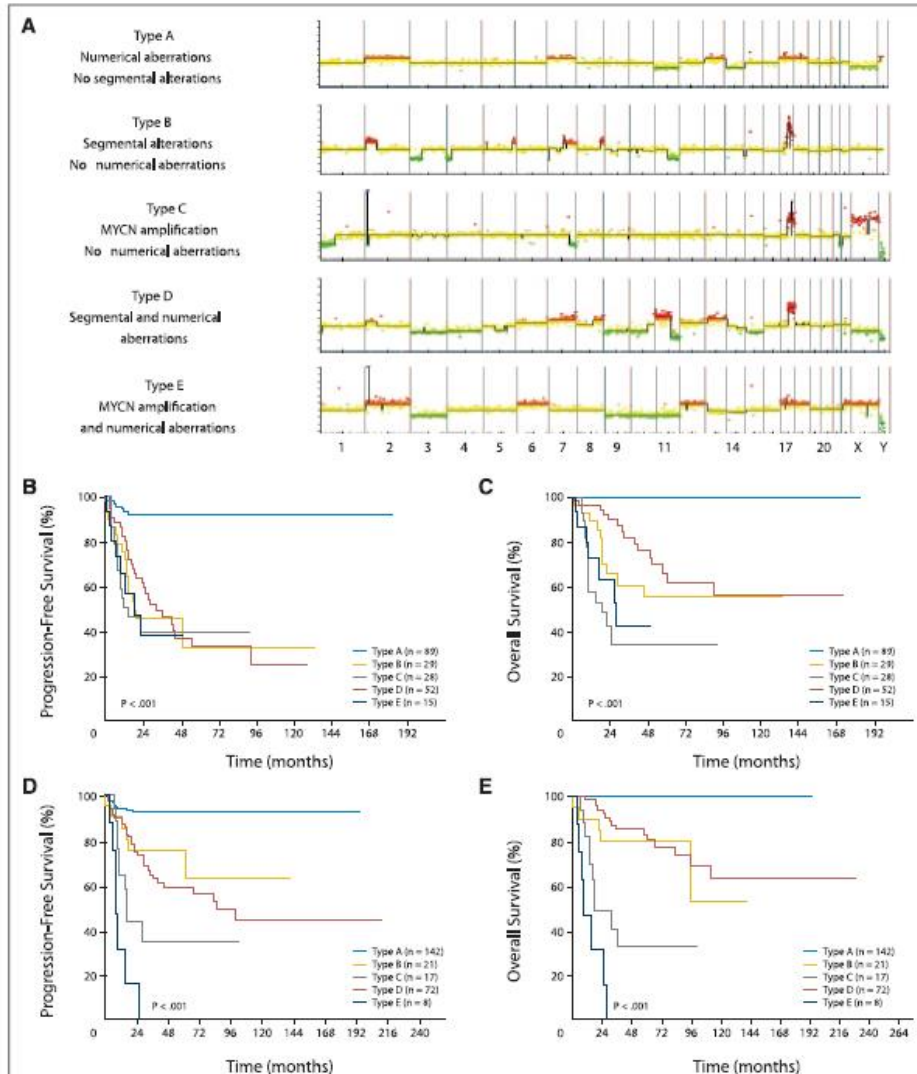
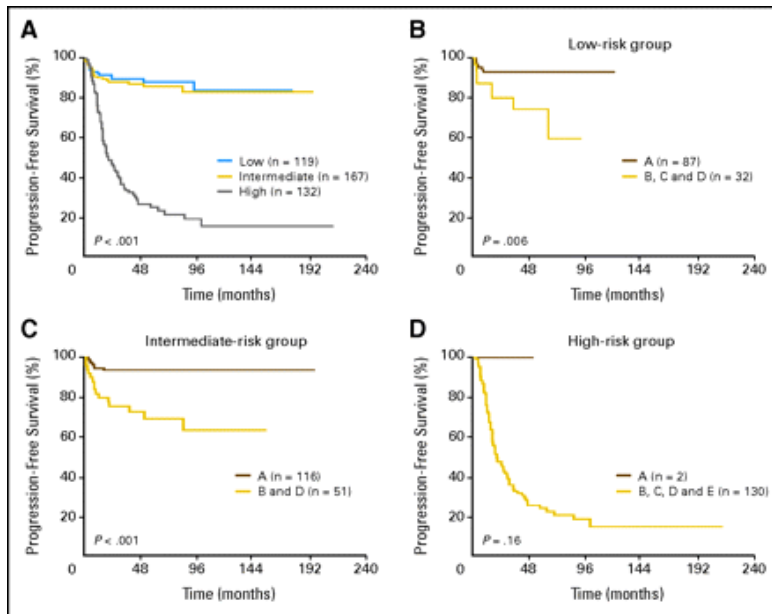
JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY

ORIGINAL REPORT

Overall Genomic Pattern Is a Predictor of Outcome in Neuroblastoma

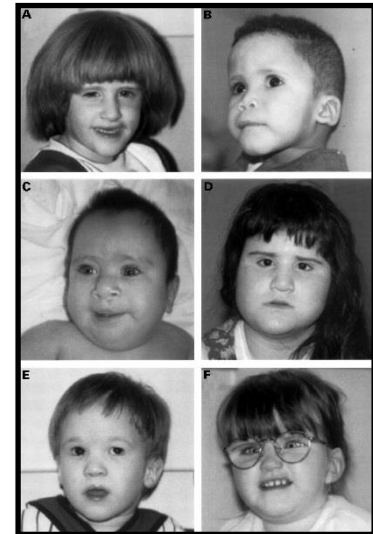
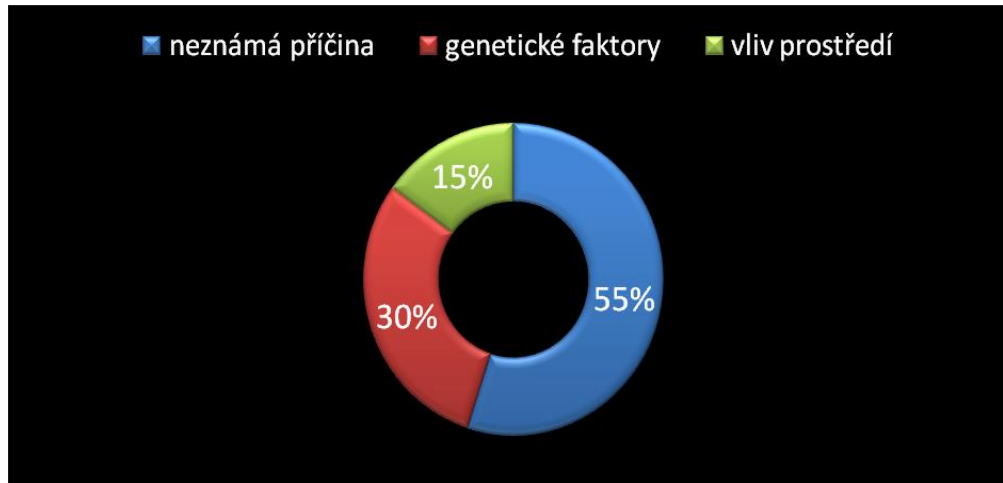
Isabelle Janoueix-Lorosey, Gudrun Schleiermacher, Evi Michels, Véronique Mosseri, Agnès Ribeiro, Delphine Lequin, Joëlle Vermeulen, Jérôme Couturier, Michel Peuchmaur, Alexander Valent, Dominique Plantaz, Hervé Rubie, Dominique Valteau-Couanet, Caroline Thomas, Valérie Combaret, Raphaël Rousseau, Angelika Eggert, Jean Michon, Frank Speleman, and Olivier Delattre

From L'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U800, Laboratoire de Génétique et Biologie des Cancers; Institut Curie, Département de Pédiatrie; Service de Biostatistiques, Unité de Génétique Somatique, and Unité de Cytogénétique; Hôpital Robert Debré, Service de Pathologie, Paris; Institut Gustave Roussy, Département de Biologie et de Pathologie Médicales; Service de Pathologie Moléculaire; Département de Pédiatrie, Villejuif; Centre Hospitalier Universitaire, Service Hématologie Infantile, Grenoble; Hôpital des Enfants, Unité d'Hématologie Pédiatrique.

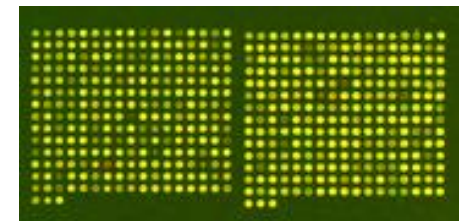


Mentální retardace (MR): příčiny

- Výskyt MR u 2-3 % populace



- 17- 20% pacientů s idiopatickou PMR
kauzální nebalancované aberace
celogenomový screening pomocí array-CGH



Častý nález CNV - mikrolecí/mikroduplikací v genomu - mohou být postiženy různé chromozomy

Děkuji za pozornost