

# Klasická a onkologická cytogenetika

Zuzana Zemanová

*Centrum nádorové cytogenetiky  
Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky  
VFN a 1. LF UK v Praze*



Centrum nádorové cytogenetiky ÚKBLO VFN a 1.LF UK v Praze

# Cytogenetické vyšetření:

**Klinická cytogenetika** → stanovení karyotypu nemocných s vrozenými vývojovými vadami, geneticky podmíněnými syndromy apod.

**Prenetální diagnostika** → určení chromosomové výbavy plodů

***In vitro* fertilizace** → vyšetření oocytů, spermií, blastomer a blastocyst

**Nádorová cytogenetika** → zpřesnění diagnózy a určení prognózy některých nádorových onemocnění

**Laboratoře hygienické služby** - testování mutagenních účinků chemických látek na lidský organismus na úrovni chromosomů; radiační cytogenetika.

# Chromosomové aberace:

→ heterochromosomové x autosomové

**I. Vrozené (konstituční) odchylky** jsou základem při vzniku chromosomálně podmíněných klinických syndromů (např. Downův syndrom); obvykle jsou přítomny ve všech buňkách těla.

**II. Získané odchylky** chromosomů nalzáme v nádorových buňkách; mají klonální charakter (postihují jen určité buněčné klony).

# Nádorová buňka

- ➔ vysoká genomová nestabilita - jedna z nejdůležitějších událostí při vzniku maligního procesu
- ➔ vznik genových mutací a početních i strukturních chromosomových aberací

Chromosomové aberace jsou **specifické** pro jednotlivé typy nádorů a u řady z nich je přesně znám i jejich **prognostický význam**.

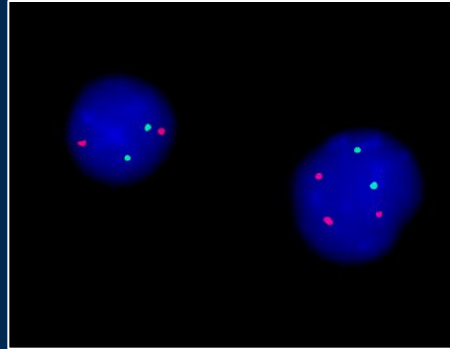
# Hematologické malignity (leukémie, preleukémie a lymfomy)

- Z cytogenetického hlediska nejlépe prostudovaná nádorová onemocnění
- U hemoblastoz má cytogenetické vyšetření největší klinický význam (základní diagnostické vyšetření)
  - relativně snadný odběr vzorku pro cytogenetické vyšetření (buňky kostní dřeně)
  - relativně jednoduchý způsob zpracování a přípravy cytogenetických preparátů
- Teprve v posledních letech informace o chromosomových aberacích v buňkách solidních nádorů

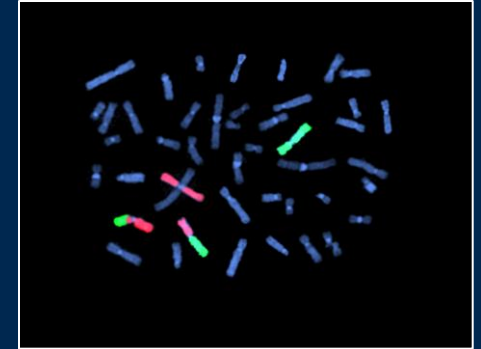
# Metody



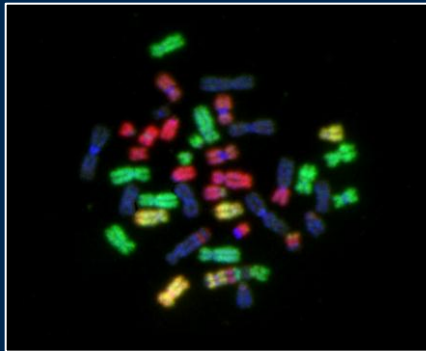
Konvenční cytogenetická  
analýza (3-5 Mb)



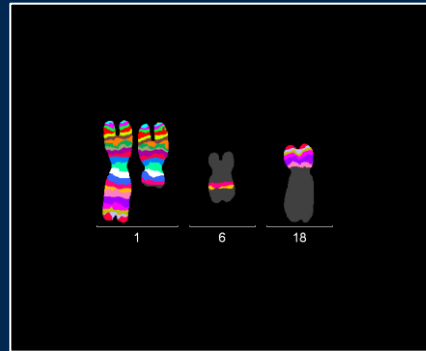
I-FISH  
(>100 kb)



WCP-FISH



mFISH  
(320kb-2.6Mb)



mBAND

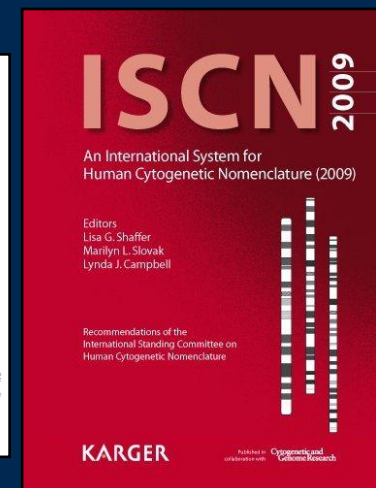
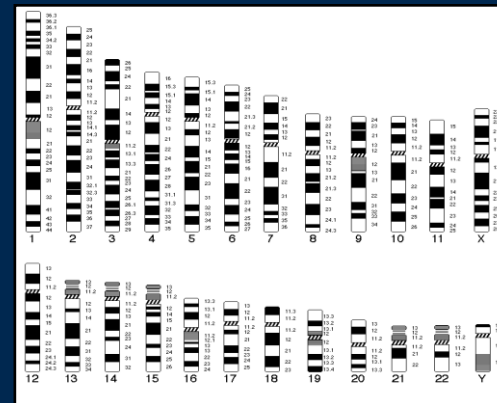
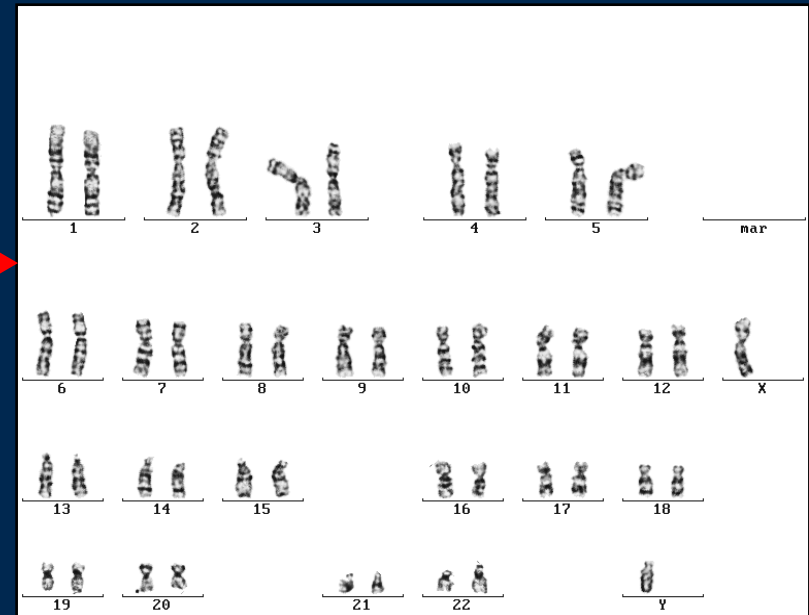
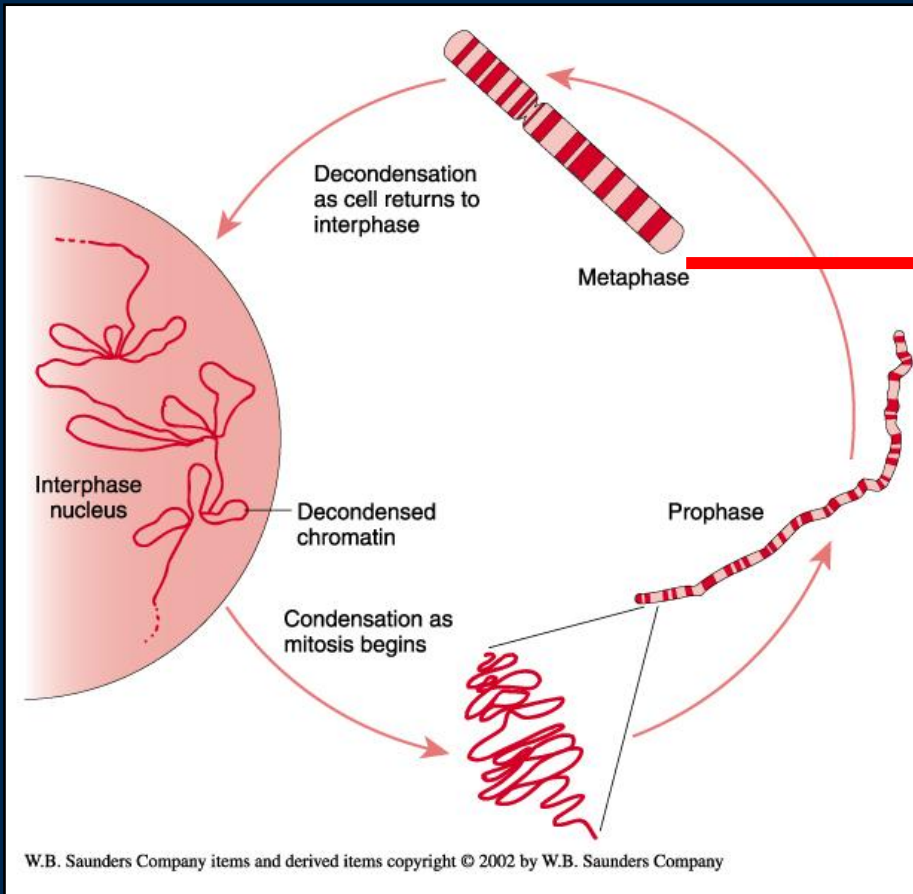


CGH

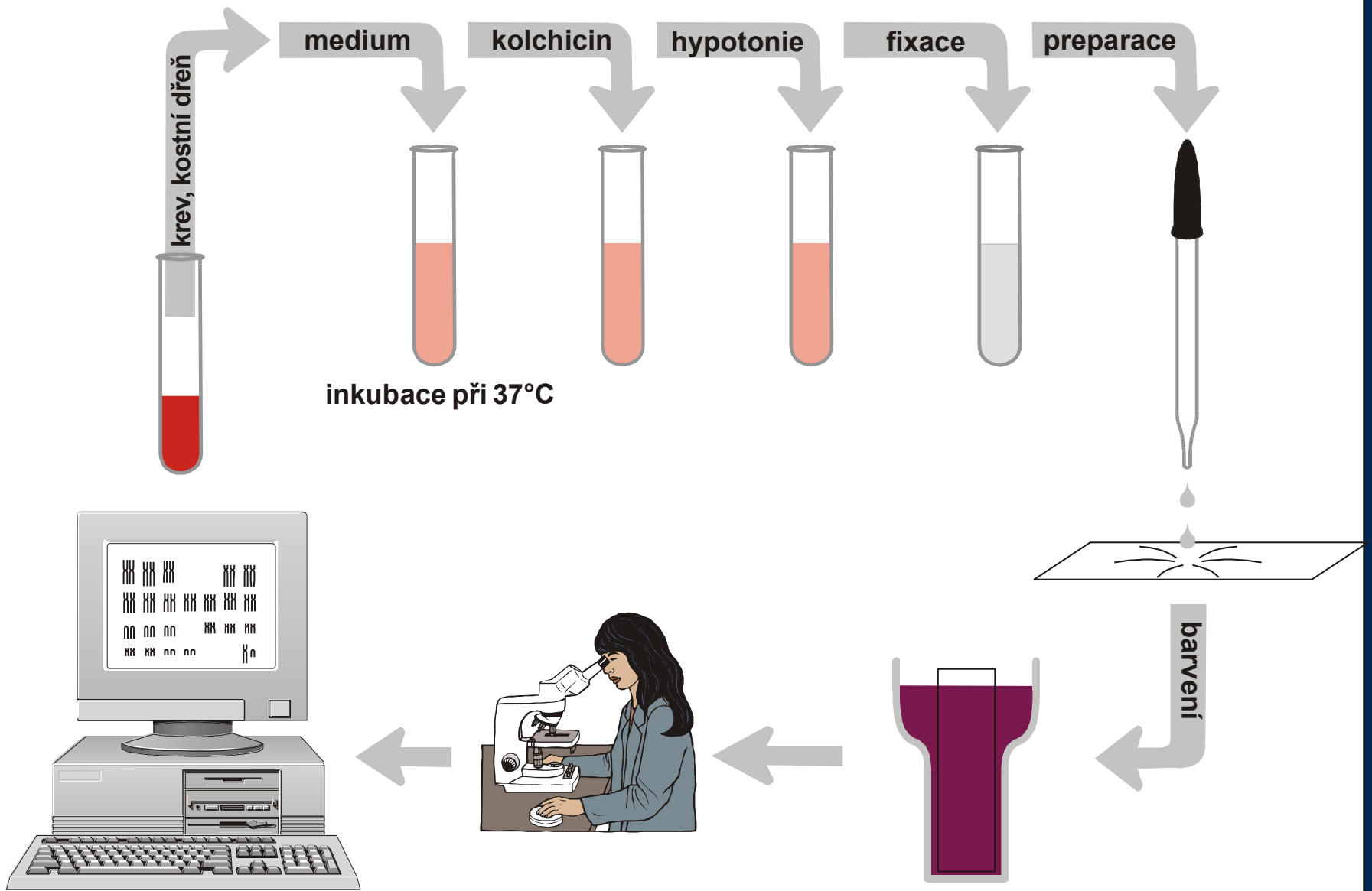


array CGH  
(> 60 bp)

# Analýza chromosomů



- ➔ Analýza karyotypu
- ➔ Detekce chromosomových odchylek (početní x strukturní)



Postup při kultivaci a přípravě preparátů k cytogenetickému vyšetření



# Pruhování chromosomů:

MetaSystems · Ikaros · 3

1 2 3 4 5 X

6 7 8 9 10 11 12

13 14 15 16 17 18

19 20 21 22 Y mar

Assign

Rotate 180° / 90°

Rotate X°

Shift

Clean

Reduce

Magnify

Staining

Annotate

CASE101	5	46,XX
---------	---	-------

DemoIKS DIR-G  
adm GBAND

# KONVENČNÍ CYTOGENETICKÁ ANALÝZA

## Výhody:

- ▶ poskytuje komplexní informace o karyotypu studovaných buněk včetně modálního počtu chromosomů
- ▶ jedno ze základních diagnostických vyšetření nemocných s hematologickými malignitami

## Problémy:

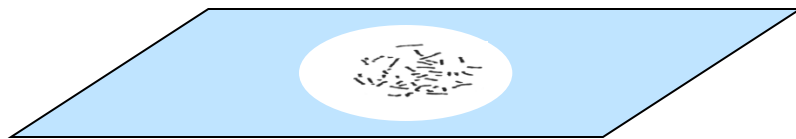
- ▶ nízký nebo nulový mitotický index studovaných buněk (např. u leukémií cca 80% úspěšnost kultivace)
- ▶ špatná kvalita hodnocených mitos, komplexní karyotypy
- ▶ omezená proliferační aktivita patologických buněčných klonů → v buněčné kultuře se dělí pouze buňky s normálním karyotypem, zatímco patologické buňky *in vitro* neproliferují

# Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

- ➡ Umožňuje hodnotit karyotyp a detekovat numerické a strukturní chromosomové aberace v buňkách v mitose i v nedělicích se interfázních jádrech (I-FISH)
- ➡ Je vhodná k určení procentuálního zastoupení patologických buněk při diagnóze i po terapii
- ➡ Studie založené na FISH se používají ke sledování vzniku a progrese maligních onemocnění



# FLUORESCENČNÍ *IN SITU* HYBRIDIZACE (FISH)



Cytogenetický preparát



Denaturace buněčné DNA fixované  
na cytogenetickém preparátu



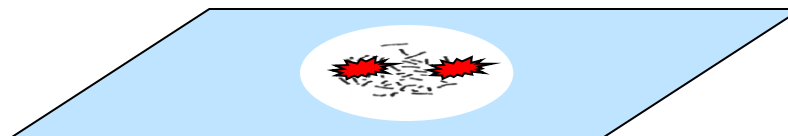
Dvouřetězcová značená DNA



Denaturace DNA sondy

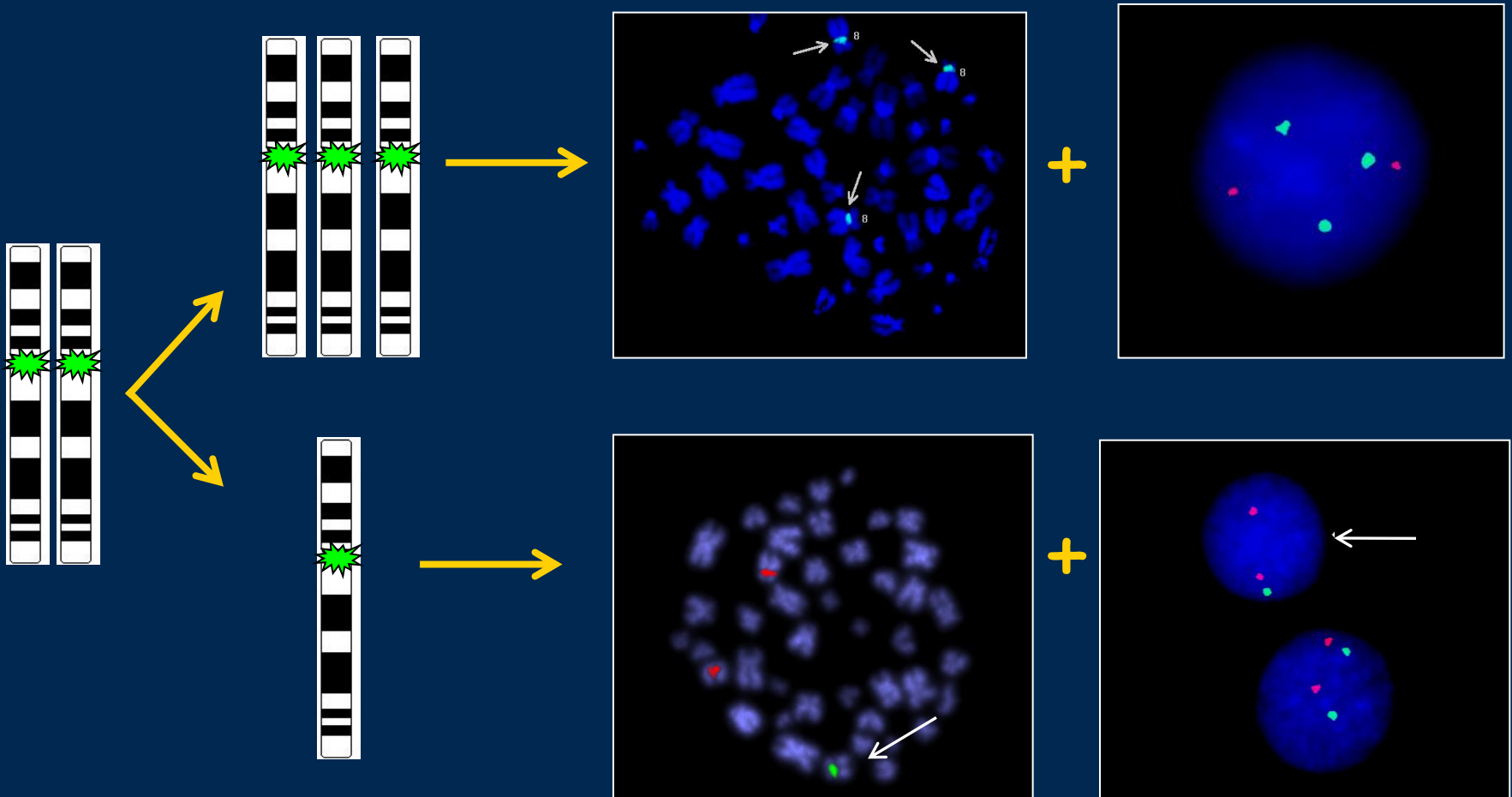


Hybridizace DNA sondy ke komplementárním úsekům  
cílové DNA fixované na cytogenetickém preparátu



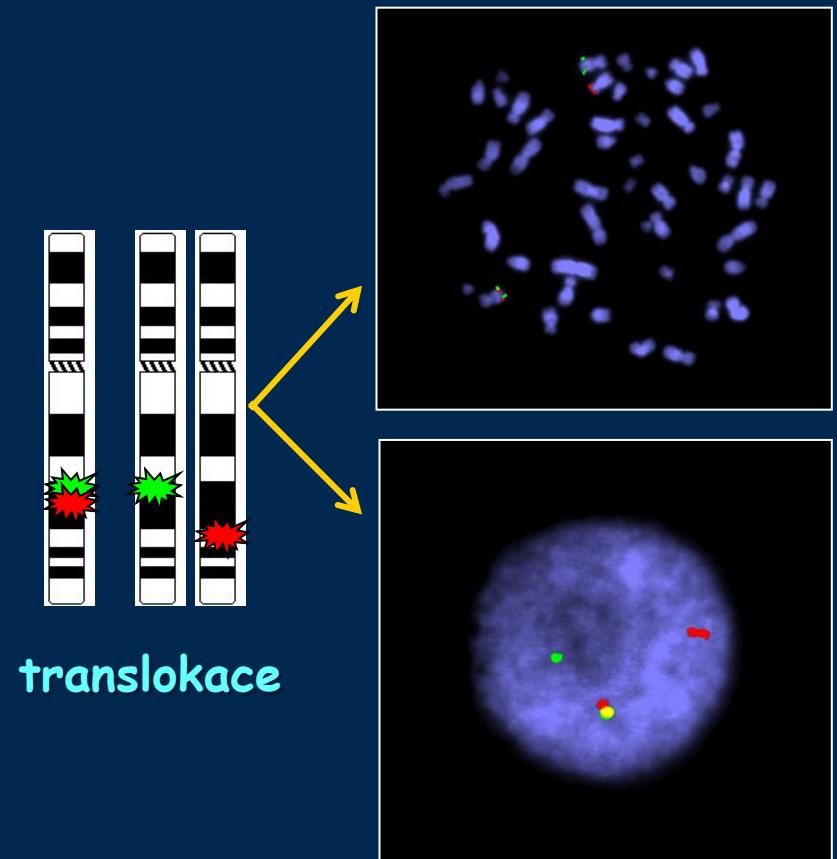
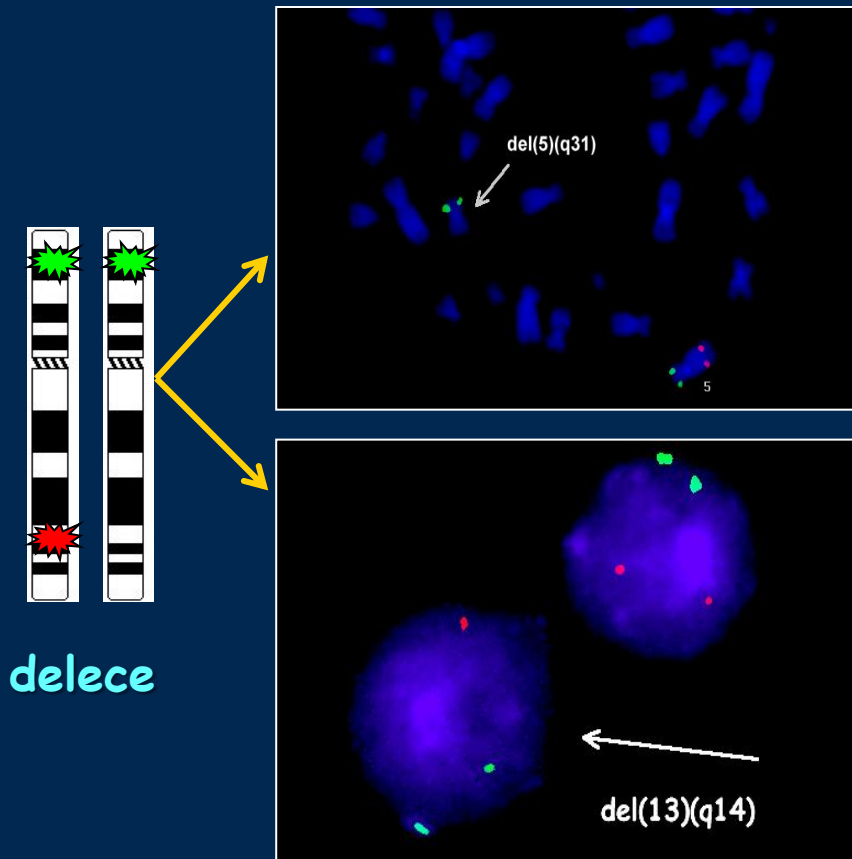
Analýza fluorescenčních signálů  
ve fluorescenčním mikroskopu

# DNA sondy pro detekci početních odchylek



# Lokus-specifické sondy

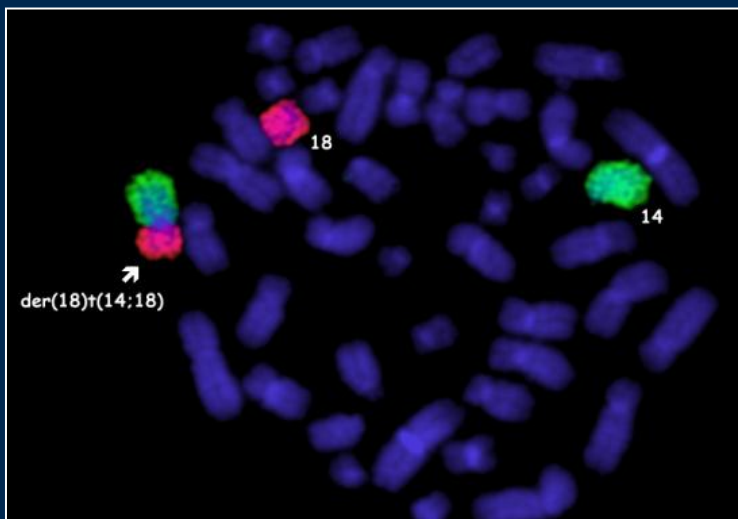
➔ Přímá lokalizace genů na chromosomech a cílená detekce strukturních aberací (delecí, translokací, inversí, insercí, duplikací/amplifikací atd.)



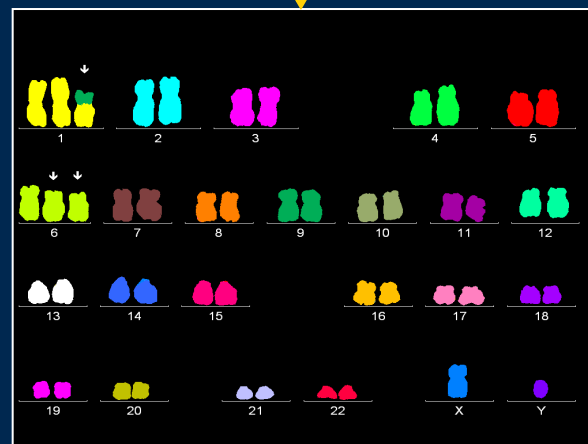
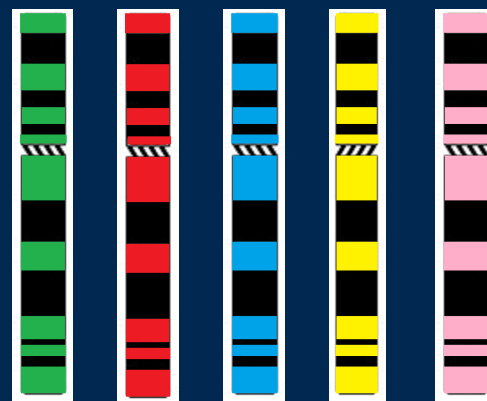
# Malovací sondy pro celé chromosomy

➔ analýza strukturních přestaveb (pouze metafáze)

dvoubarevná FISH



mnohobarevná FISH (mFISH)



# Mnohobarevné pruhování s vysokou rezolucí - mBAND

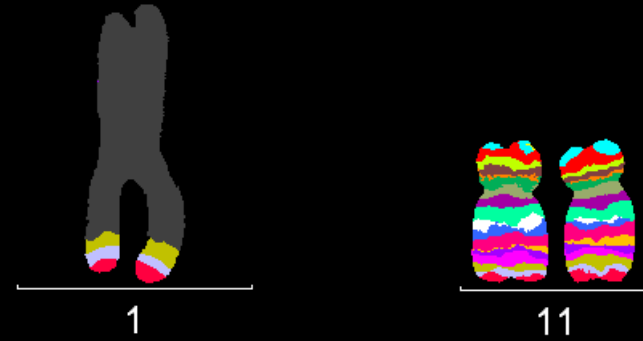
- ➔ Umožňuje přesné určení zlomových míst na chromosomech s vyšší přesností, než klasické pruhovací techniky

mBAND 1



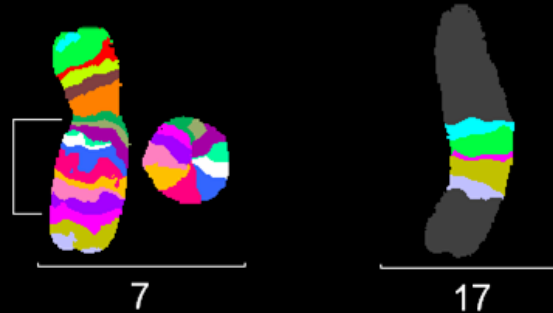
der(1)(1;11)(pter->q31::q22.2q23.3)

mBAND 11



der(1)(1;11)(pter->q31::q22.2q23.3)

mBAND 7

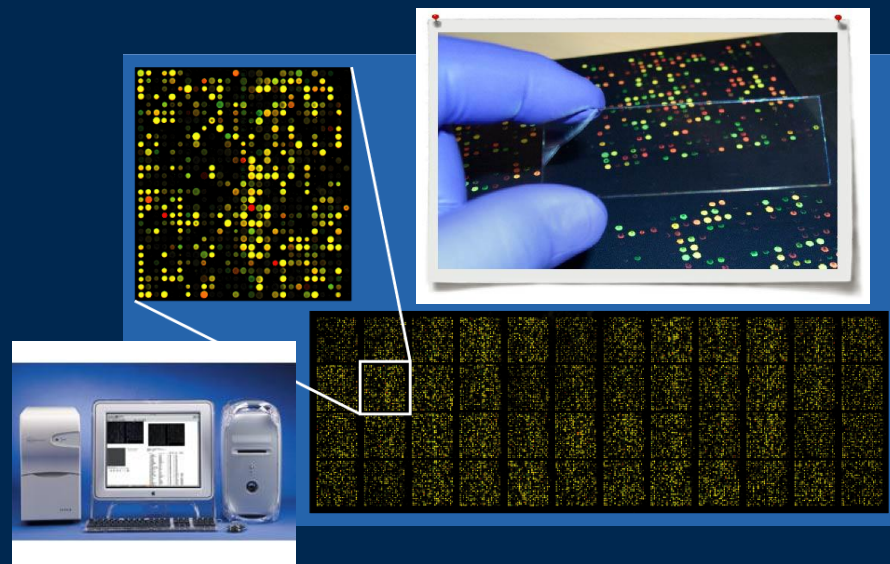
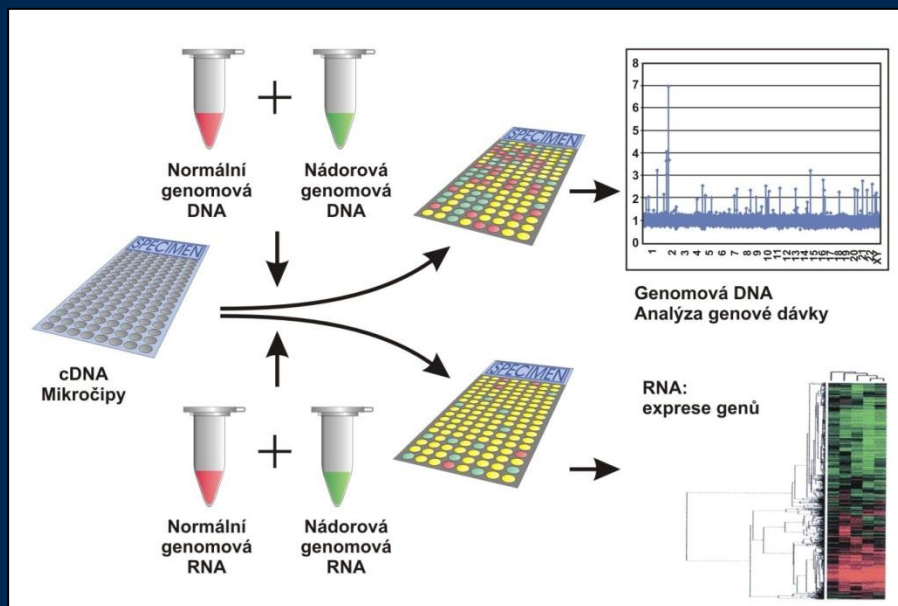


r(7)(q11q31), der(?)ins(?;7)(?;p22->p15.1::q32->q35)



# Mikročipové technologie

- ➔ Vysoce citlivá celogenomová analýza → detekují změny v počtu DNA sekvencí (DNA čipy) x umožňují sledovat genovou expresi (RNA čipy)
- ➔ Nejsou nutné kultury
- ➔ Velmi přesné určení zlomových míst
- Neumožňují detekci balancovaných strukturních aberací (translokace, fúzní geny atd.)



BAC arrays ~1MB  
Oligo arrays ~100 kb (maximal resolution ~ 35 kb)

# Klinický význam cytogenetických nálezů v onkohematologii

- ➔ Analýza karyotypu nádorových buněk patří k základním laboratorním vyšetřením
- ➔ Chromosomové aberace v nádorových buňkách mohou být **specifické** pro jednotlivé typy nádorů a u řady z nich je přesně znám i jejich **prognostický význam**.
- ➔ U pacientů s různými subtypy hematologických malignit přispívá ke:
  - stanovení diagnózy
  - upřesnění prognózy
  - sledování úspěšnosti terapie

**Hematologická  
maligní  
onemocnění**

**Chronická myeloidní leukémie  
(CML)**

**Akutí myeloidní leukémie (AML)**

**Akutí lymfoblastická leukémie  
(ALL)**

**Myelodysplastické syndromy  
(MDS)**

**Chronická lymfocytární leukémie  
(CLL)**

**Mnohočetný myelom (MM)**

**Non Hodkinské lymfomy (NHL)**

➔ **Doporučené vyšetřovací postupy - závisí na typu onemocnění  
a léčebném protokolu**

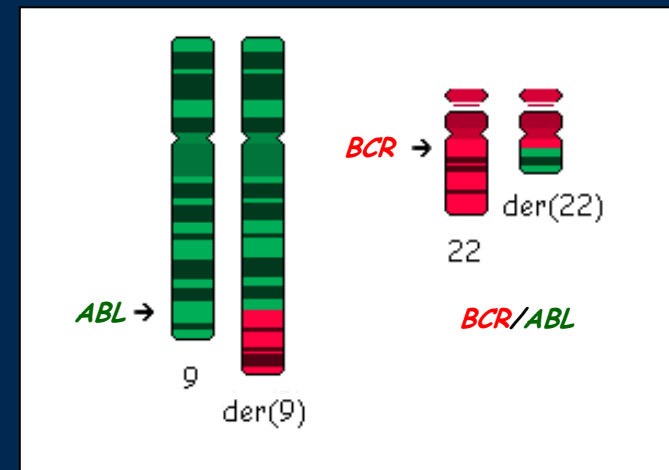
# Chronická myeloidní leukémie (CML)

- ✓ 15-20% všech leukémií
- ✓ Nejčastěji u dospělých (medián věku 45 let), u dětí a dospívajících vzácně (děti 1-2%, <20 let 10%)
- ✓ Tři fáze onemocnění: CP - chronická fáze (relativně benigní, 3-9 let)  
AP - více maligní akcelerovaná fáze  
BC - terminální blastická krize
- ✓ Klonální myeloproliferativní onemocnění → masivní nárůst blastů v KD (vytěsní zdravé buňky)
- ✓ Jedno z nejlépe prostudovaných nádorových onemocnění - Ph chromosom  $t(9;22)(q34;q11)$  - *BCR/ABL* fúze
- ✓ Jedna z prvních malignit, u které terapie cílená přímo na základní molekulární defekt zlepšila klinické výsledky u nemocných: imatinib mesylát (Glivec™, Novartis) - kompetitivní inhibitor tyrozin-kinázové aktivity genu *ABL*
- ✓  $t(9;22)(q34;q11)$  u 90-95% nemocných - *BCR/ABL*

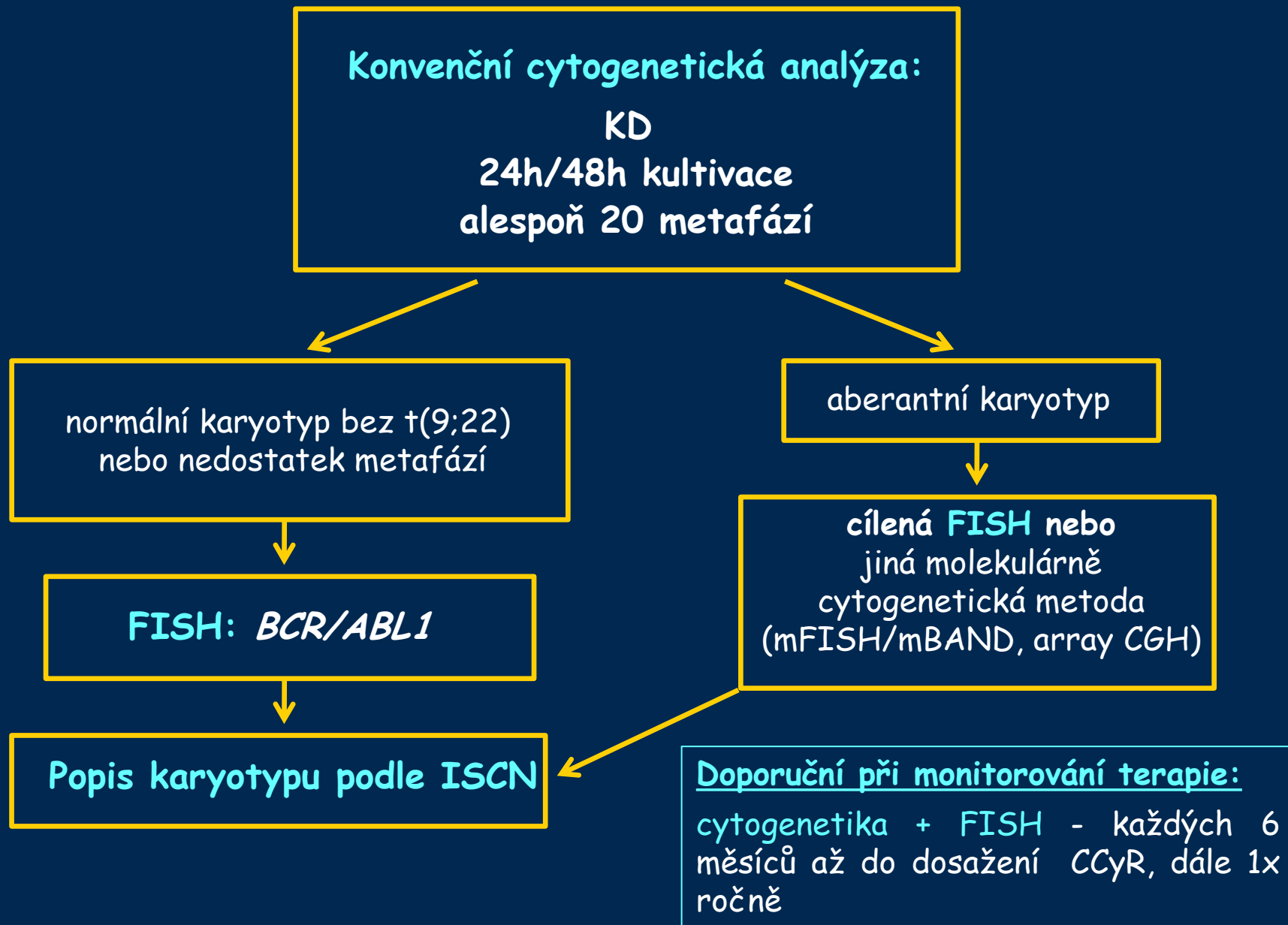
# Chromosomové aberace u CML

- ✓ Kromě  $t(9;22)(q34;q11)$  mohou být detekovány i další aberace:
- ✓ Delece 9q34 (delece oblasti vedle ABL) - může být provázána horší prognózou; vzniká současně s iniciální translokací  $t(9;22)(q34;q11)$
- ✓ Trisomie 8 (+8) - 34%
- ✓ Další nadpočetný Ph chromosom (+Ph) - 30%
- ✓ Isochromosom 17q -  $i(17)(q10)$  - 20%
- ✓ Trisomie 19 (+19) - 13%
- ✓ Ztráta Y (-Y) - 8% mužů

*atd.*



# Chronická myeloidní leukémie (CML)



# Akutní myeloidní leukémie (AML)

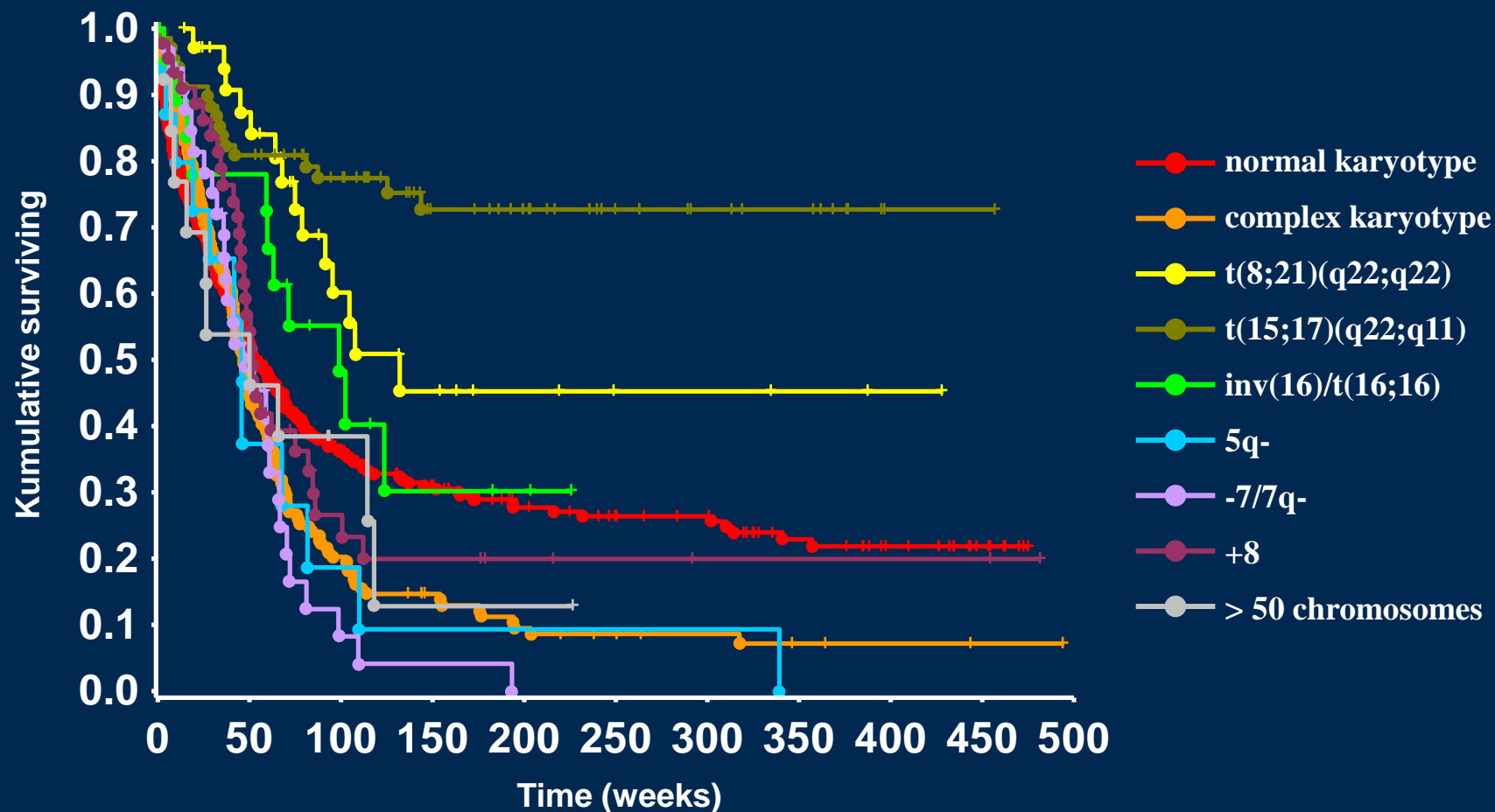
- ✓ Heterogenní skupina maligních onemocnění krvetvorby
- ✓ Akumulace nezralých myeloidních buněk (myeloblastů) v kostní dřeni
- ✓ Diagnostikovaná ve všech věkových skupinách
- ✓ Nejčastěji postihuje lidi starší než 60 let (medián věku 64-68 let)
- ✓ Sekundární AML, „therapy-related“ AML
- ✓ Agresivní onemocnění - medián OS 2-3 měsíce
- ✓ Specifické chromosomové aberace s jasným prognostickým významem → stratifikace léčby podle cytogenetických nálezů

# Cytogenetické nálezy u AML

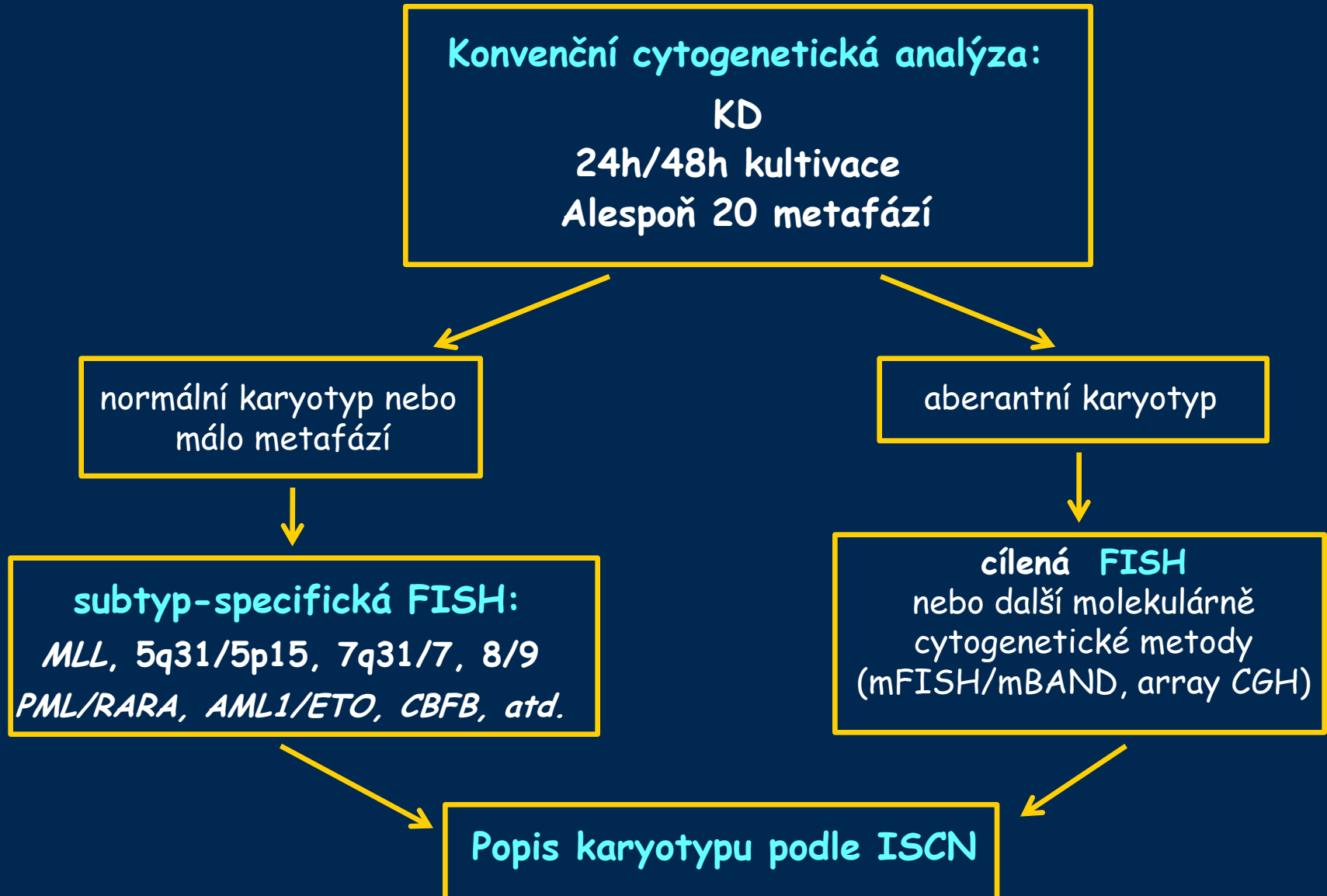
Chromosomová aberace	geny	prognóza
t(8;21)(q22;q22)	<i>RUNX1-RUNX1T1</i>	dobrá
inv(16)(p13.1q22) nebo t(16;16)(p13.1;q22)	<i>CBFB-MYH11</i>	dobrá
t(15;17)(q22;q12)	<i>PML-RARA</i>	dobrá
t(9;11)(p22;q23)	<i>MLLT3-MLL</i>	střední
t(6;9)(p23;q34)	<i>DEK-NUP214</i>	špatná
inv(3)(q21q26.2) nebo t(3;3)(q21;q26.2)	<i>RPN1-EVI1</i>	velmi špatná
t(1;22)(p13;q13)	<i>RBM15-MKL1</i>	dobrá
přestavby <i>MLL</i> genu	<i>MLL</i>	špatná
monosomie 7 nebo delece 7q31		špatná
delece 5q31	?	špatná
komplexní chromosomové přestavby	?	velmi špatná



# Prognostický význam chromosomových aberací u AML



# Akutní myeloidní leukémie (AML)



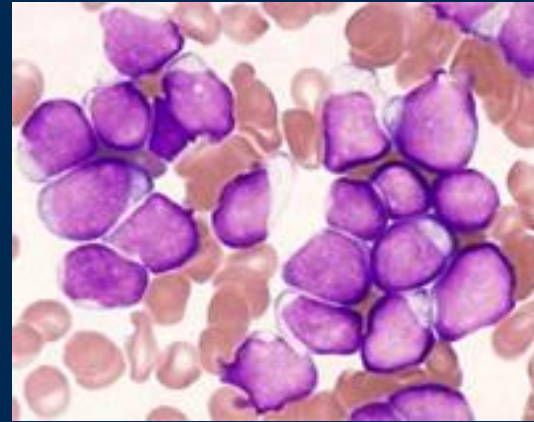
# Akutní lymfoblastická leukémie (ALL)

- ✓ heterogenní skupina onemocnění

20% leukémií u dospělých

80% všech dětských leukemií

(1/3 všech pediatrických nádorů)

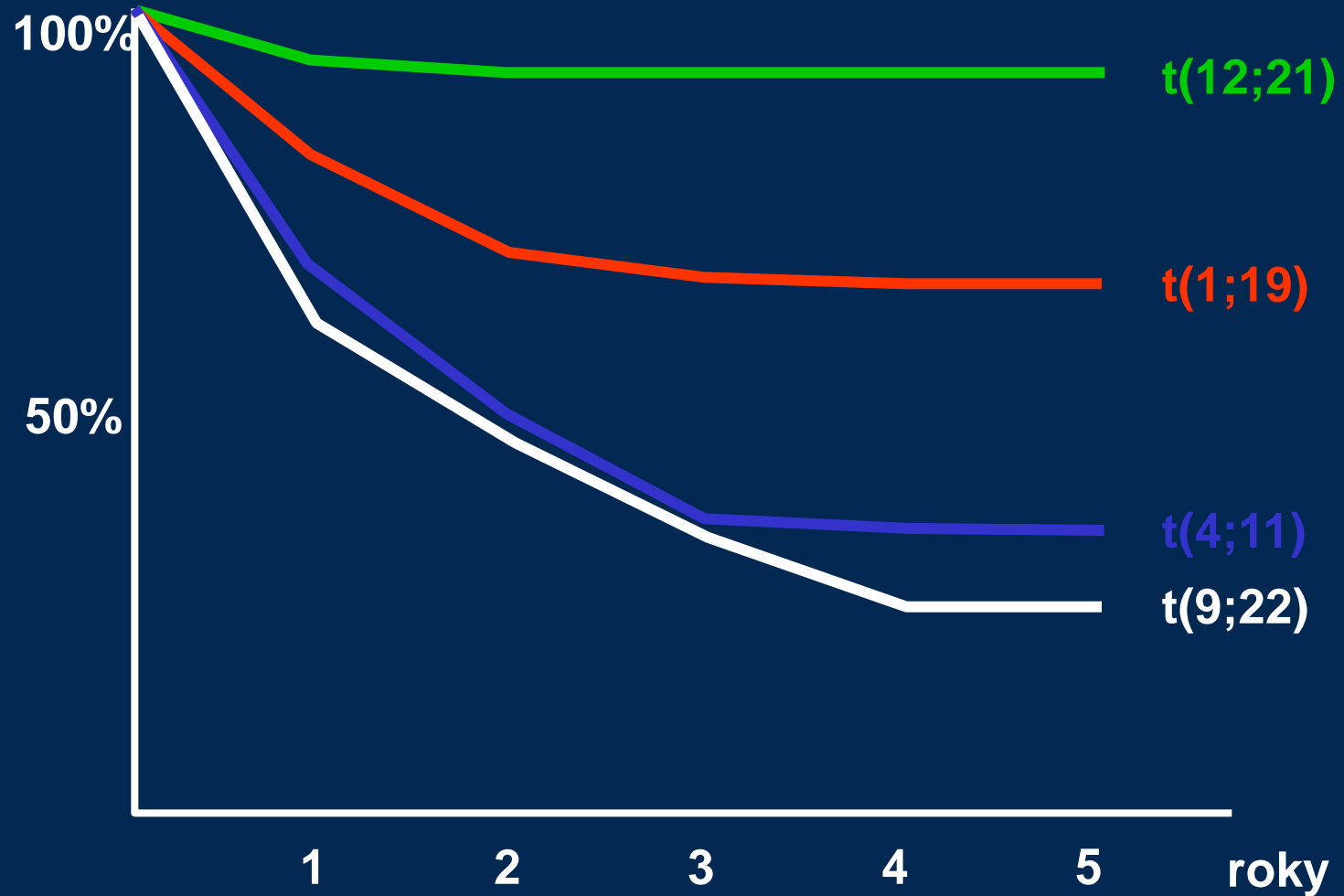


- ✓ Nejčastěji postihuje děti ve věku 2-5 let (3-5% kojenci <1 rok věku)
- ✓ U dospělých incidence mírně stoupá po 50. roku věku.
- ✓ Nejčastěji leukémie z nezralých prekurzorů B-lymfocytů (BCP ALL)
- ✓ Méně častá leukémie z prekurzorů nebo zralých T-lymfocytů (T-ALL)
- ✓ Vzácně leukémie z velmi nezralých prekurzorů krvetvorby před vývojem do lymfatické řady (hybridní leukémie).

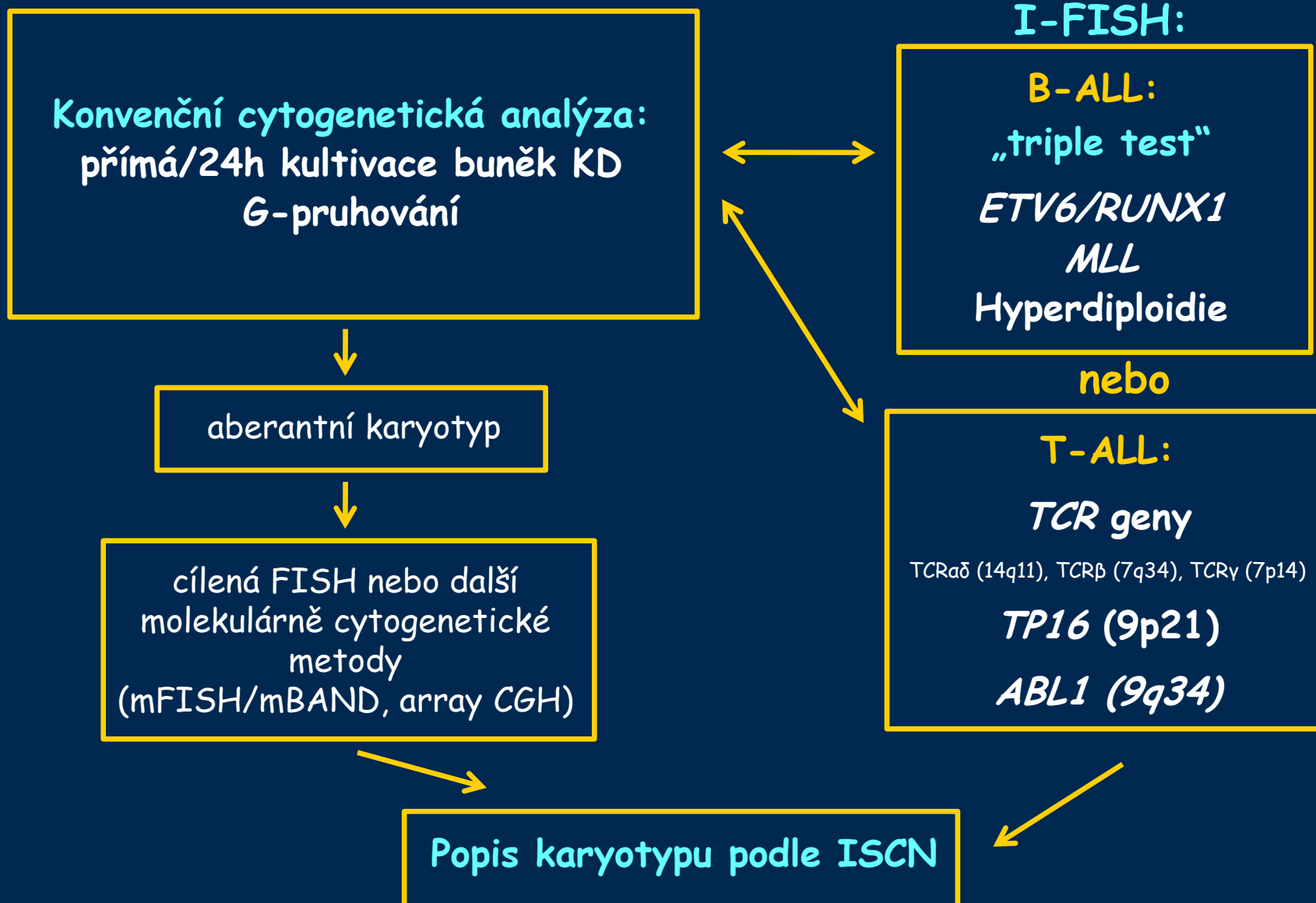
# Cytogenetika ALL

Riziková skupina	Cytogenetický nález
Nízké riziko	vysoká hyperdiploidie (51-65 chromosomů) <i>ETV6-RUNX1</i>
Střední riziko	t(1;19)(q23;p13) <i>IGH-CEBP</i> <i>IGH-ID4</i> del(6)(q) aberrace 9p aberrace 11q dup(1q) -7 dic(9;20)(p13;q11) dic(9;12)(p11-21;p11-13) jakákoliv jiná změna normální karyotyp
Vysoké riziko	t(9;22)(q34;q11) iAMP21 <i>MLL</i> translokace „near“ haploidie (<30 chromosomů) nízká hypodiploidie (30-39 chromosomů) t(17;19)(q23;p13) aberrace 17p ztráta 13q

# Prognostický význam chromosomových aberací u dětských ALL



# Akutní lymfoblastická leukémie (ALL)



# Závěry:

Cytogenetická a molekulárně cytogenetická analýza nádorových buněk

- ✓ Přispívá ke stanovení diagnózy onemocnění
- ✓ Přispívá k upřesnění prognózy onemocnění
- ✓ Umožňuje monitorování léčebné odpovědi
- ✓ Přispívá k časnému záchytu relapsu onemocnění

Kombinace molekulárně cytogenetických technik poskytuje komplexní informace o genomu nádorových buněk a umožňuje záchyt kryptických strukturních aberací, které mohou hrát významnou úlohu v patogenezi onemocnění.