

Komparatívna genómová hybridizácia: úvod do metodiky

RNDr. Miroslav Tomka, PhD.¹, RNDr. Ivana Hojsíková²

¹MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o. člen MEDIREX GROUP

²Medirex, a. s., člen MEDIREX GROUP, Bratislava

Metódy klasickej cytogenetiky, ako sú prúžkovanie alebo fluorescenčná in situ hybridizácia, si našli pevné miesto pri skríningu genetických abnormalít, ako aj pri hodnotení odpovede na liečbu alebo určovaní prognózy. Vývoj však priniesol nové metodiky, ktoré umožňujú hodnotiť genetické alterácie na molekulovej úrovni naraz v celom genóme. K takýmto metodikám patrí aj komparatívna genómová hybridizácia (CGH). Nasledujúci článok prináša stručný opis metodiky, jej podstatu, obmedzenia ako aj jej využitie v laboratórnej diagnostike rôznych druhov ochorení.

Kľúčové slová: aCGH, array CGH, komparatívna genómová hybridizácia, zhubné nádory prsníka, zhubné nádory tela maternice, zhubné nádory krčka maternice, zhubné nádory vaječníkov.

Comparative genomic hybridization: introduction to the method

Traditional cytogenetic methods like banding or fluorescent in situ hybridization found their place in genetic abnormality screening as well as in evaluation of the treatment response or prognosis. Development in the field of molecular biology over the past years brought new methods which allow the assessment of alterations on the molecular level, even on the whole genome at the same time. Comparative genomic hybridization (CGH) belongs to such methods. Following article introduces the method in brief, describes its principle, limitations as well as its use in diagnostics of different kinds of diseases.

Key words: aCGH, array CGH, comparative genomic hybridization, breast cancer, endometrial cancer, cervical cancer, ovary cancer.

Úvod

Incidencia zhubných nádorov má celosvetovo stúpajúci trend. Slovensko nie je výnimka. Národný onkologický register SR za rok 2008 evidoval u oboch pohlaví spolu 30 144 osôb s nádorovými ochoreniami, z toho 15 055 mužov a 15 089 žien.

Zo štatistík pre rok 2008 vyplýva, že v Slovenskej republike medzi najčastejšie sa vyskytujúce nádorové ochorenia u žien patria zhubné nádory prsníka, tela maternice, krčka maternice a vaječníkov. Zhubné nádory prsníkov tvoria po nemelanómových nádoroch kože druhý najčastejšie sa vyskytujúci typ nádorového ochorenia u žien. V roku 2008 bolo hlásených 2639 nových prípadov s 772 úmrtiami. Zhubné nádory tela maternice boli zaznamenané 876-krát, pričom 221 postihnutých následkom tohto ochorenia podľahlo. Zhubné nádory krčka maternice boli hlásené u 634 pacientok, z čoho 209 končilo exitom. Zhubné nádory vaječníkov boli evidované u 509 pacientok s hlásenými 276 úmrtiami (1).

Onkologické ochorenia vo všeobecnosti považujeme za ochorenie génov. Túto skutočnosť najlepšie ilustrujú familiárne viazané ochorenia, pri ktorých sa mutačné poškodenie konkrétneho génu prenáša z generácie na generáciu a u postihnutého jedinca sa tak zvyšuje riziko vypuknutia ochorenia v skorších rokoch života. So zvyšujúcou sa priemernou dĺžkou života je možné predpokladať aj zvyšujúcu sa incidenciu malígnych ochorení. V tomto smere bude stúpať potreba nových skríningových metód umožňujúcich efektívne a včasné odhalenie ochorenia. Medzi také patrí aj metodika nazývaná komparatívna genómová hybridizácia – CGH.

Skríningové metodiky cytogenetiky

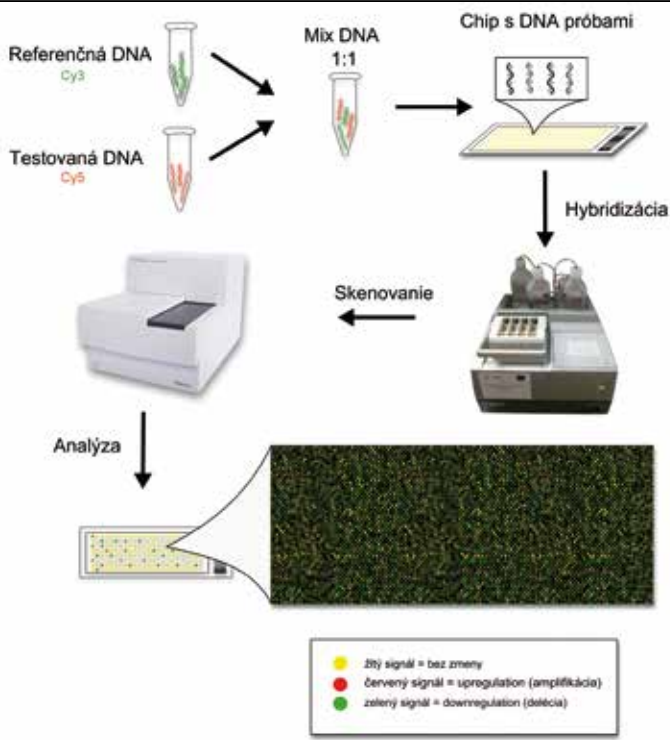
Od sedemdesiatych rokov minulého storočia sa na sledovanie nebalansovaných chromozómových abnormalít, ako sú strata alebo zisk genetického materiálu, využívajú rôzne druhy prúžkovania chromozómov. Výsledkom aplikácie metodiky sú pod mikroskopom viditeľné prúžky na kondenzovaných chromozómoch, čo uľahčuje identifikáciu a lokalizáciu abnormalít. Metodika dosahuje v ideálnych prípadoch rozlíšenie 5Mb (2).

Ku klasickým metodikám cytogenetiky patrí aj fluorescenčná in situ hybridizácia (FISH). Fluorescenčne značené próby, RNA alebo DNA, sa na základe komplementarity viažu na presne zodpovedajúcu sekvenciu nukleotidov chromozómovej DNA. Použitím fluorescenčného mikroskopu a príslušného softvéru je možné lokalizovať a detegovať prítomnosť alebo neprítomnosť konkrétneho genetického materiálu v danej oblasti chromozómov. Zavedením „super-resolution“ techník sa rozlišovacia schopnosť FISH metodiky zvýšila až na možnosť detekcie niekoľko málo kilobáz (3).

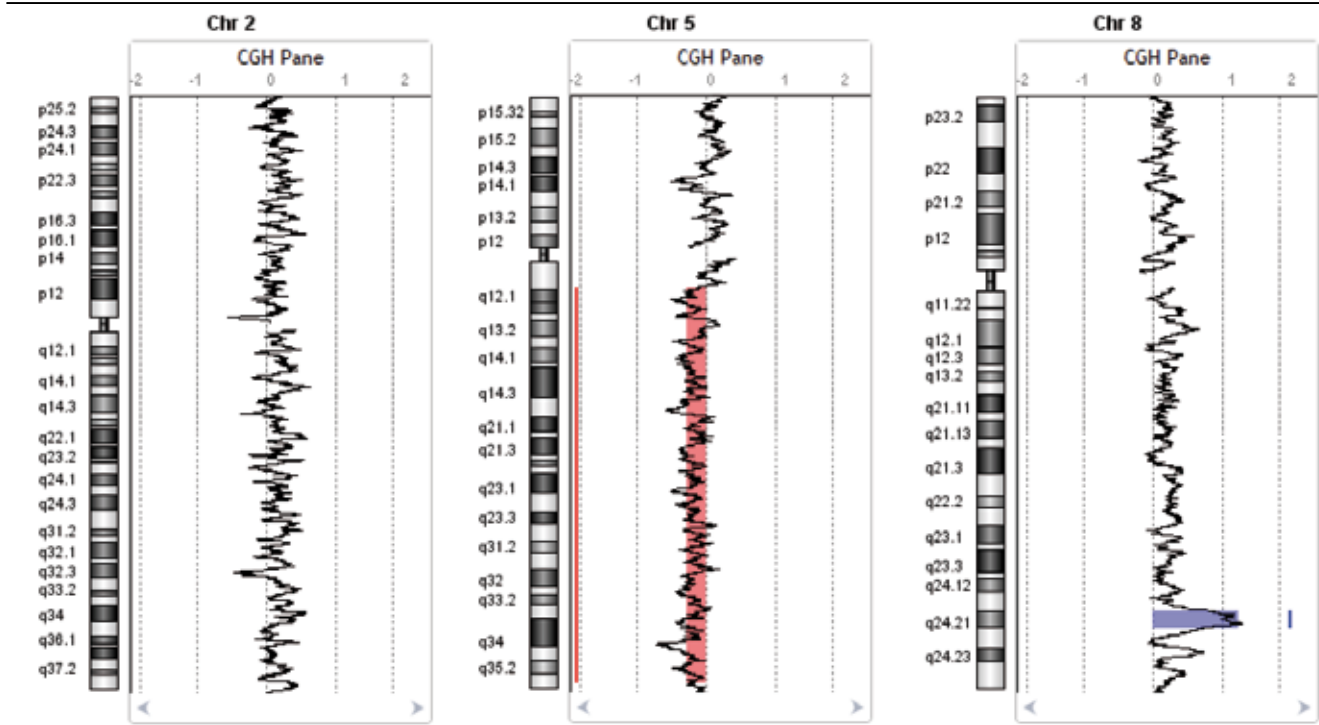
Niekam medzi klasické cytogenetické metodiky, ako je karyotypovanie a FISH, a molekulárno-biologické techniky, ako je kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia v reálnom čase (qRT-PCR) či sekvenovanie, zaraďujeme komparatívnu genómovú hybridizáciu (CGH) a jej modernejšiu vetvu v podobe array CGH (aCGH).

Krátko z histórie CGH

Komparatívna genómová hybridizácia, CGH, prvýkrát opísala v roku 1992 skupina vedcov z kalifornskej univerzity (4). Metodiku založili na kompetitívnej fluorescenčnej in situ hybridizácii. Metafázové chromozómy na sklíčku hybridizovali s odlišne fluorescenčne značenými referenčnými a testovanými úsekmí

Obrázok 1. Schematické znázornenie metodiky array CGH.

DNA. Hybridizáciu testovanej a referenčnej DNA sondy hodnotili podľa intenzity výsledného farebného signálu. Oblasť chromozómov, ktoré stratili, alebo, naopak, získali genetický materiál, mali v porovnaní s normálnou referenčnou vzorkou zmenený pomer intenzít oboch signálov, čo sa prejavilo vo výslednej farbe signálu (4).

Obrázok 2. Obrázok ilustruje genetické aberácie u testovaného pacienta. Červeným pruhom označená oblasť chromozómu č. 5 zodpovedá strate genetického materiálu v tejto oblasti chromozómu. Chromozóm č. 8 vykazuje zisk genetického materiálu, ktorý je označený modrým pruhom. Chromozóm č. 2 nevykazuje žiadnu abnormalitu genetického materiálu. Získané výsledky boli potvrdené sekvenovaním.

V roku 1997 autorský kolektív z Heidelbergu publikoval upravený variant CGH. Namiesto hybridizácie DNA sond s chromozómami použili na matrix naviazané krátke úseky DNA a tie hybridizovali s testovanou a referenčnou DNA. Metodiku tak zjednodušili a značne zvýšili jej rozlišovaciu schopnosť (5). Dnes technológia array CGH (alebo matrix CGH) dosahuje rozlišovaciu schopnosť na úrovni 100 kb (6). Publikovaná metodika položila základ automatizácii procesu CGH a otvorila tým dvere do rutinných diagnostických laboratórií.

Princíp aCGH

Oba typy metodiky CGH, konvenčná na chromozómoch, aj array CGH na báze DNA, sú založené na rovnakom princípe (obrázok 1). Testovaná a referenčná DNA je špecificky fluorescenčne značená. Testovaná DNA sa obvyčajne značí červeným farbivom (Cyanín-5) a referenčná DNA zeleným fluorofórom (Cyanín-3). Obe DNA sú spoločne a v rovnakom pomere nanesené na sklíčko (DNA microarray), ktoré obsahuje presne špecifikované jednovláknové úseky DNA, tzv. sondy, alebo klony. Ich dĺžka sa u jednotlivých výrobcov líši (napr. Agilent ponúka 60 bázové sondy).

Hybridizácia prebieha pri presne regulovaných podmienkach niekoľko hodín (24 – 56 hodín), najčastejšie v poloautomatických hybridizačných peciach. Po hybridizácii je sklíčko prenesené do počítačom riadeného skenera, kde je obraz nasnímaný a softvérovo vyhodnotený. Pre každý gén je vypočítaný normalizovaný pomer intenzít červeného a zeleného signálu, ktorý indikuje zmenu v množstve genetického materiálu na jednotlivých úsekoch DNA (tzv. CNV – Copy Number Variation). Ak je normalizovaný pomer < 1 , hovoríme o strate genetického materiálu (t. j. delécia), ak je, naopak, pomer > 1 , ide o zisk genetického materiálu (t. j. amplifikácia) (obrázok 2).

Silné a slabé stránky aCGH

Každá metodika má svoje výhody aj nevýhody. Slabá stránka metodiky je neschopnosť odhaliť balansované alterácie, ako sú recipročné translokácie alebo inverzie. Tieto anomálie nemenia počet kópií v genóme, a tak ostávajú pre CGH nedetegovateľné.

Nedetegovateľné ostávajú aj mutácie, ktoré sú mimo detekčný rozsah metodiky. Zavedením aCGH sa rozlíšenie metodiky zvýšilo na teoretickú hodnotu 100 kb. Rozlíšenie aCGH je primárne určené dvoma faktormi: dĺžkou cieľovej DNA a hustotou pokrytia genómu sondami. Z toho vyplýva, že čím sú cieľové sondy DNA na matrici kratšie a čím hustejšie je nimi pokrytá daná oblasť, tým je rozlíšenie vyššie (7).

Medzi najväčšie prednosti aCGH patrí schopnosť simultánnej detekcie aneuploidií, delécií, inzercii a duplikácií v rámci celého genómu. Vhodným navrhnutím prekryvajúcich sa DNA sond môže byť určitá oblasť v rámci genómu pokrytá na 100 %. To môže byť výhodné pri skríningu špecifických oblastí chromozómov, ktoré sú priamo dotknuté pri konkrétnych druhoch ochorenia. Technika aCGH tak spája výhody lokusovo špecifickej FISH analýzy s možnosťou skríningu celého genómu.

aCGH v diagnostike

Metodika aCGH našla svoje uplatnenie v prenatalnej a postnatalnej diagnostike, v preimplantačnom skríningu, ale aj v diagnostike nádorových ochorení.

Prenatálna a postnatálna diagnostika sa zameriava na vývinové a mentálne poruchy zapríčinené aberáciami genetického materiálu. Samotná analýza sa vykonáva na vzorkách plodovej vody, choriových klčkov, ale aj periférnej krvi embrya a neskôr novorodenca. Kan et al. (8) uvádzajú, že pomocou aCGH bolo identifikovaných 20 % (44/220) klinicky významných CNV pri abnormálnych, ultrazvukom detegovaných nálezoch. Z tohto množstva 21 patrilo aneuploidiám a 23 iným chromozómovým imbalanciám. Zaujímavosťou je, že 3,2 % vzoriek (7/220) s CNV bolo detegovaných iba prostredníctvom aCGH, a nie použitím konvenčných cytogenetických techník ako G-banding a kvantitatívna fluorescenčná PCR. Z toho dôvodu navrhujú nahradiť karyotyping za metodiku aCGH a využiť ju ako voľbu prvostupňového skríningu. Konvenčná cytogenetika by sa mala použiť následne pri vizualizácii klinicky významných CNV (8). Napriek tomu, že pomocou metodiky aCGH nie je možné zistiť všetky druhy poškodenia genetického materiálu, je schopná odhaliť približne dvakrát viac chromozómových abnormalít ako G-prúžkovanie (7).

Citlivosť metodiky aCGH dokumentuje jej využitie v preimplantačnom skríningu, kde je k dispozícii len minimálne množstvo materiálu. Pomocou aCGH je možné odhaliť chromozómové imbalancie v rozsahu cca 1Mb z jediného lymfoblastu, fibroblastu alebo blastoméry (9).

Hoci aCGH hrá nezastupiteľnú úlohu najmä pri skríningu aberácií spôsobujúcich vývinové a mentálne poruchy, svoje miesto si našla aj pri skríningu nádorových ochorení. V tejto oblasti však skríning nie je vždy jednoduchý. Heterogenita buniek spôsobená ich klonálnou povahou, nedostatok materiálu (biopsia), jeho znížená kvalita (FFPE bločky), spolu so samotným typom aberácie (nízky počet kópií, aberácie na krátkom úseku), môžu metodike aCGH spôsobiť problémy. Napriek tomu sa aCGH s úspechom používa pri detekcii genomických abnormalít v hematolo-

gických ochoreniach, ako sú CLL (chronická lymfocytová leukémia), MDS (myelodysplastický syndróm), MM (mnohopočetný myelóm), ALL (akútna lymfoblastová leukémia), AML (akútna myeloidná leukémia) a CMML (chronická myelomonocytová leukémia) (10).

Technológia aCGH sa osvedčila pri charakterizovaní genetických abnormalít zodpovedných napríklad za zhubný nádor močového mechúra (11), kolorektálnych nádorov (12), nádorov pľúc (13), pri identifikácii nových génov zodpovedných za vznik nádorov prostaty (15) a mnohých ďalších.

Metodika aCGH hrá svoju úlohu aj pri štúdiu najčastejšie sa vyskytujúcich nádorových ochorení žien. Ako je známe, nádory prsníka sú heterogénnou skupinou, v ktorej etiológii nachádzame mutácie génov ako *BRCA1*, *BRCA2*, ale aj zmeny v počte génov *LSM1*, *BAG4* a *C8ORF4* pozorované pomocou aCGH (15). Francúzska štúdia v 18 medicínskych centrách sledovala 423 pacientov s metastatickými nádormi, pričom používali Sangerovo sekvenovanie a aCGH. Genomické alterácie odhalili u 195 (46 %) pacientov. Najčastejšie išlo o aberácie génov *PIK3CA*, *CCND1* a *FGFR1*, ale aj zriedkavé mutácie v géne *AKT1* a zriedkavé amplifikácie v génoch *EGFR*, *MDM2*, *FGFR2*, *AKT2*, *IGF1R* a *MET*. Vybraní pacienti (55 zo 423) boli podrobení personalizovanej liečbe s rôznym výsledkom (16).

Nádory vaječníkov sú taktiež spojené s mutačným vyradením tumor supresorových génov *BRCA1/2*, ale vyskytujú sa aj ako súčasť Li-Fraumeniho syndrómu, v ktorom dôležitú úlohu hrá gén *TP53*. Špecifické genetické alterácie boli pomocou aCGH odhalené aj v prípade ovariálnych nádorov, ktoré vykazovali rezistenciu na chemoterapiu (17). Metodikou aCGH bol realizovaný skríning vybraných onkogénov z endometriálnych nádorov, pričom bola pozorovaná amplifikácia onkogénov *AR*, *PIK3CA*, *MET*, *HRAS*, *NRAS*, *D17S1670*, *FGFR1*, *CTSB*, *RPS6KB1*, *LAMC2*, *MYC*, *PDGFRA*, *FGF4/FGF3*, *PAKI* a *FGR* (18). Metodika aCGH zachytila CNV v 73 % (19/26) vzoriek aj v prípade cervikálnych nádorov. Amplifikácia bola zistená najmä v oblastiach 3q (50,0 %), 1q (42,4 %), 19q (23,1 %), kým strata v oblastiach 11q (30,8 %), 4q (23,1 %) a 13q (19,2 %). Zvýšený výskyt amplifikácie 3q bol pozorovaný v pozitívnych vzorkách na HPV 16 a HPV 18, čo len potvrdzuje závažnosť infekcie HPV pri tomto nádorovom ochorení (19).

Záver

Onkologické ochorenia aj napriek dokázateľným úspechom v diagnostike a liečbe predstavujú vážny problém nielen z medicínskeho hľadiska. So zvyšujúcim sa priemerným vekom populácie môžeme predpokladať, že incidencia týchto ochorení bude aj naďalej stúpať. Z toho dôvodu je žiaduce, aby klinické laboratória mali k dispozícii moderné metodiky, ktoré umožňujú odhaliť ochorenie na základnej, molekulovej úrovni. Komparatívna genomová hybridizácia tieto podmienky spĺňa.

Hoci použitie aCGH v skríningu onkologických ochorení je v niektorých prípadoch komplikované, výsledky získané touto metodikou majú vysokú výpovednú hodnotu a pravdepodobne budú postupne nahrádzať metodiky klasickej cytogenetiky. Odporúčania medzinárodného konzorcia pre štandardizáciu cytogenomických arraí – ISCA (International Standard Cytogenomic Array) použiť CGH ako prvú skríningovú metódu a G-banding používať iba v prípadoch, ako sú Downov syndróm a v prípadoch rodinného výskytu chromozómových aberácií (20), je len krokom k tomuto prechodu. Výsledkom zavedenia nových technológií do

diagnostiky a skríningu nádorových ochorení by mal byť genetický profil pacienta, ktorý v konečnom dôsledku vyústi do personalizovanej terapie.

Tento článok vznikol vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre projekt: Dobudovanie technickej infraštruktúry v oblasti výskumu diagnostických postupov a metód v rámci včasnej diagnostiky najčastejších onkologických ochorení žien, ITMS 26210120026, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra:

1. Safaei D, Plesko I. Incidencia zhubných nádorov v Slovenskej republike 2008. Národný onkologický register SR. NCZ; 2014.
2. Theisen A. Microarray-based comparative genomic hybridization (aCGH). *Nature Education* 2008;1:45.
3. Han R, Li Z, Fan Y, Jiang Y. Recent advances in super-resolution fluorescence imaging and its applications in biology. *J Genet Genomics*. 2013;40(12):583-595.
4. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*. 1992;258(5083):818-821.
5. Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, et al. Matrix-based comparative genomic hybridization: Biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer*. 1997;20(4):399-407.
6. Friedman JM, Baross A, Delaney AD, et al. Oligonucleotide microarray analysis of genomic imbalance in children with mental retardation. *Am J Hum Genet*. 2006;79(3):500-513.
7. Bejjani BA, Shaffer LG. Application of Array-Based Comparative Genomic Hybridization to Clinical Diagnostics. *J Mol Diagn*. 2006;8(5):528-533.
8. Kan AS, Lau ET, Tang WF et al. Whole-genome array CGH evaluation for replacing prenatal karyotyping in Hong Kong. *PLoS One*. 2014;9(2):e87988. doi: 10.1371/journal.pone.0087988. eCollection 2014.
9. Greco E, Bono S, Ruberti A, et al. Comparative genomic hybridization selection of blastocysts for repeated implantation failure treatment: a pilot study. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:457913. doi: 10.1155/2014/457913. Epub 2014 Mar 23.
10. Simons A, Sikkema-Raddatz B, de Leeuw N, et al. Genome-wide arrays in routine diagnostics of hematological malignancies. *Hum Mutat*. 2012;33(6):941-948.
11. Conconi D, Panzeri E, Redaelli S, et al. Chromosomal imbalances in human bladder urothelial carcinoma: similarities and differences between biopsy samples and cancer stem-like cells. *BMC Cancer*. 2014;14:646. <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/14/646>
12. Brim H, Lee E, Abu-Asab MS, et al. Genomic aberrations in an African American colorectal cancer cohort reveals a MSI-specific profile and chromosome X amplification in male patients. *PLoS One*. 2012;7(8):e40392. doi:10.1371/journal.pone.0040392
13. Lo FY, Chang JW, Chang IS, et al. The database of chromosome imbalance regions and genes resided in lung cancer from Asian and Caucasian identified by array-comparative genomic hybridization. *BMC Cancer*. 2012;12:235. <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/12/235>
14. Kamradt J, Jung V, Wahrheit K, et al. Detection of novel amplicons in prostate cancer by comprehensive genomic profiling of prostate cancer cell lines using oligonucleotide-based arrayCGH. *PLoS One*. 2007;2(8):e769. doi: 10.1371/journal.pone.0000769
15. Yang ZQ, Streicher KL, Ray ME, et al. Multiple interacting oncogenes on the 8p11-p12 amplicon in human breast cancer. *Cancer Res*. 2006;66(24):11632-11643.
16. André F, Bachelot T, Commo F, et al. Comparative genomic hybridisation array and DNA sequencing to direct treatment of metastatic breast cancer: a multicentre, prospective trial (SAFIR01/UNICANCER). *Lancet Oncol*. 2014;15(3):267-274.
17. Osterberg L, Levan K, Parheen K, et al. Specific copy number alterations associated with docetaxel/carboplatin response in ovarian carcinomas. *Anticancer Res*. 2010;30(11):4451-4458.
18. O'Toole SA, Dunn E, Sheppard BL, et al. Genome-wide analysis of deoxyribonucleic acid in endometrial cancer using comparative genomic hybridization microarrays. *Int J Gynecol Cancer*. 2006;16(2):834-842.
19. Kuglik P, Smetana J, Vallova V, et al. Genome-wide screening of DNA copy number alterations in cervical carcinoma patients with CGH+SNP microarrays and HPV-FISH. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(8):5071-5082.
20. Coppinger J, Alliman S, Lamb AN, et al. Whole-genome microarray analysis in prenatal specimens identifies clinically significant chromosome alterations without increase in results of unclear significance compared to targeted microarray. *Prenatal Diagnosis*. 2009;29(12):1156-1166.



RNDr. Miroslav Tomka, PhD.
MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o. člen MEDIREX GROUP
 Galvaniho 17/C, 821 04 Bratislava
 miroslav.tomka@medirex.sk