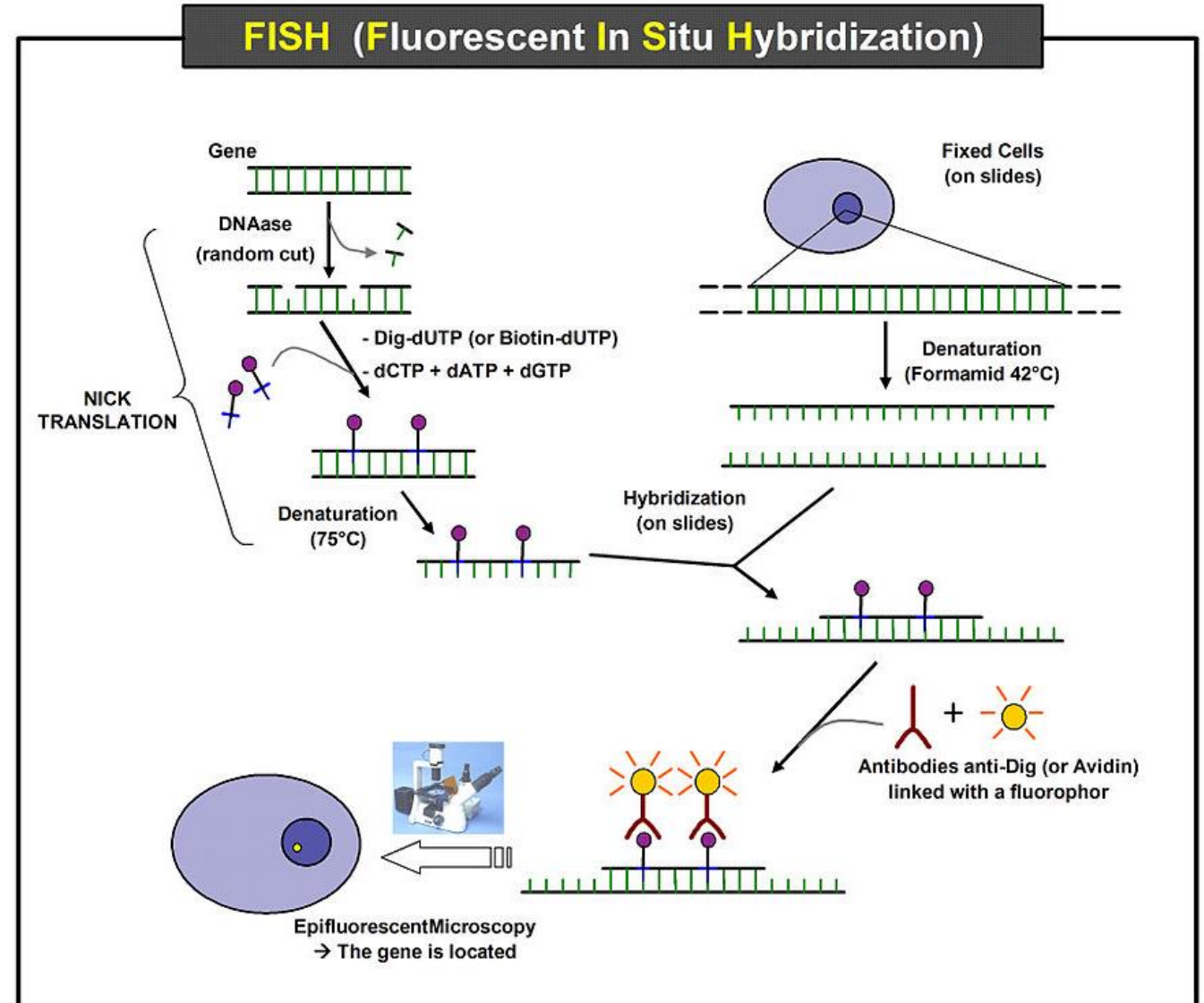


TEHNICI DE CITOGENETICĂ ȘI GENETICĂ MOLECULARĂ UTILIZATE ÎN DIAGNOSTICUL BOLILOR GENETICE

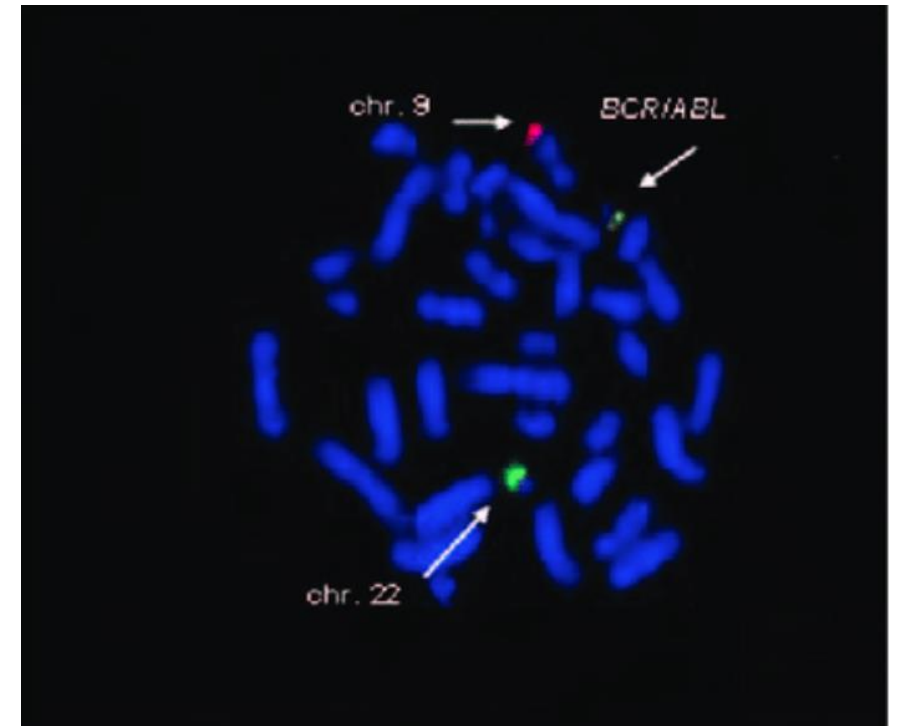
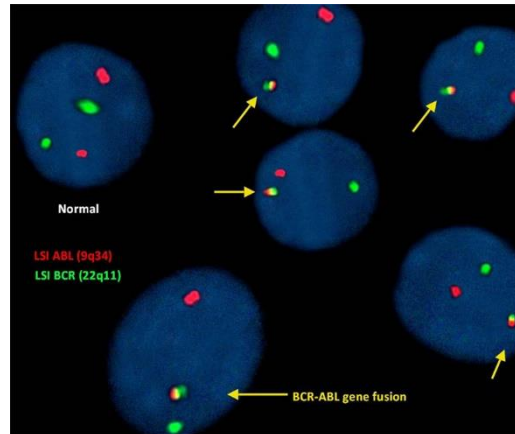
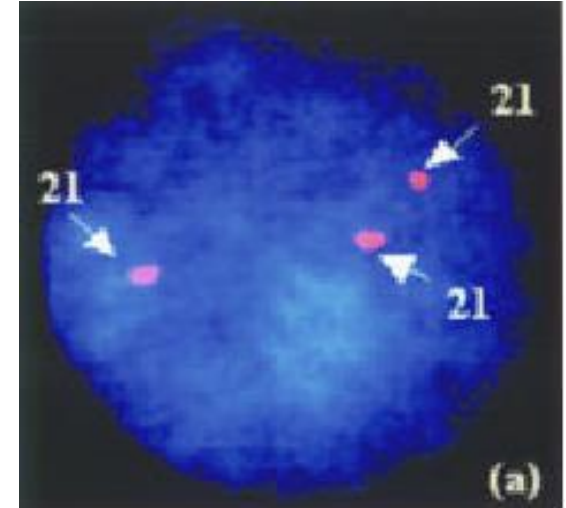
Tehnica FISH (hibridizarea fluorescentă in situ)

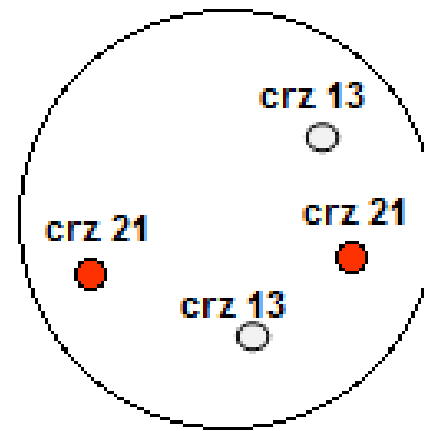
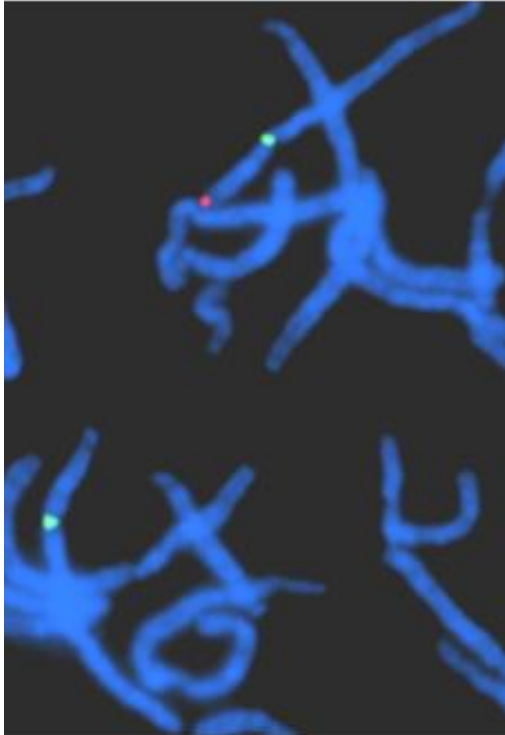
- Se bazează pe hibridizarea prin complementaritate între o sondă ADN marcată fluorescent și o țintă de ADN genomic, reprezentată de regiunea cromozomială de interes.
- FISH standard - varianta cea mai frecvent utilizată și aplicată în **detectia microdelețiilor/microduplicațiilor, aneuploidiilor**
- Comparativ cu citogenetica clasică, tehnica FISH are un nivel ridicat de rezoluție, este mai rapidă folosind nucleii interfazici și permite identificarea precisă a punctelor de ruptură și a fragmentelor cromozomiale implicate, putând fi astfel caracterizate modificări cromozomiale complexe sau cromozomi marker



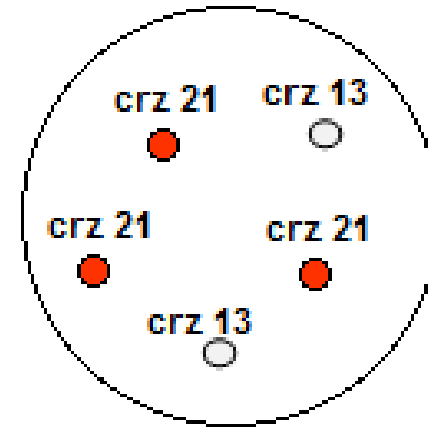
Tehnica FISH

- În varianta FISH standard, absența semnalului fluorescent la nivelul zonei cromozomiale de interes indică o deleție, iar apariția unui semnal suplimentar indică o duplicație (un cromozom suplimentar, în cazul FISH interfazic pentru diagnosticul prenatal al aneuploidiilor)
- Este utilizată în diagnosticul prenatal al aneuploidiilor pe nuclei interfazici, sindroamelor cu deleții/microdeleții (DiGeorge, Cri du chat, Williams-Beuren, Prader-Willi etc.), detecția unor inversii, translocatii specifice în hemato-oncologie cum ar fi $t(9;22)(q34.1;q11.23)$ sau $t(11;22)(q24.1-q24.3;q12.2)$
- De asemenea, tehnica FISH poate fi folosită în oncologie, pentru detecția amplificării genice (exemplu, detecția amplificării genei HER2 în cancerul de sân).



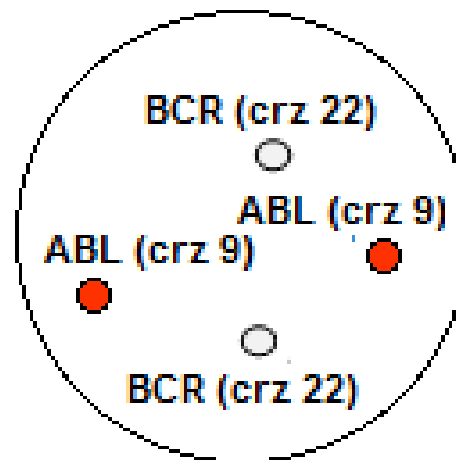


A.

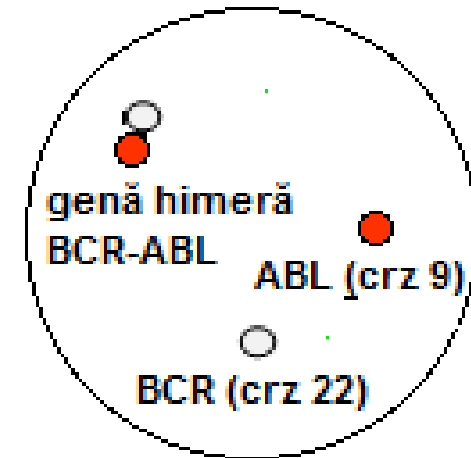


B.

Figura 1. A. Nucleu interfazic normal; B. Nucleu interfazic cu trisomie 21



A.

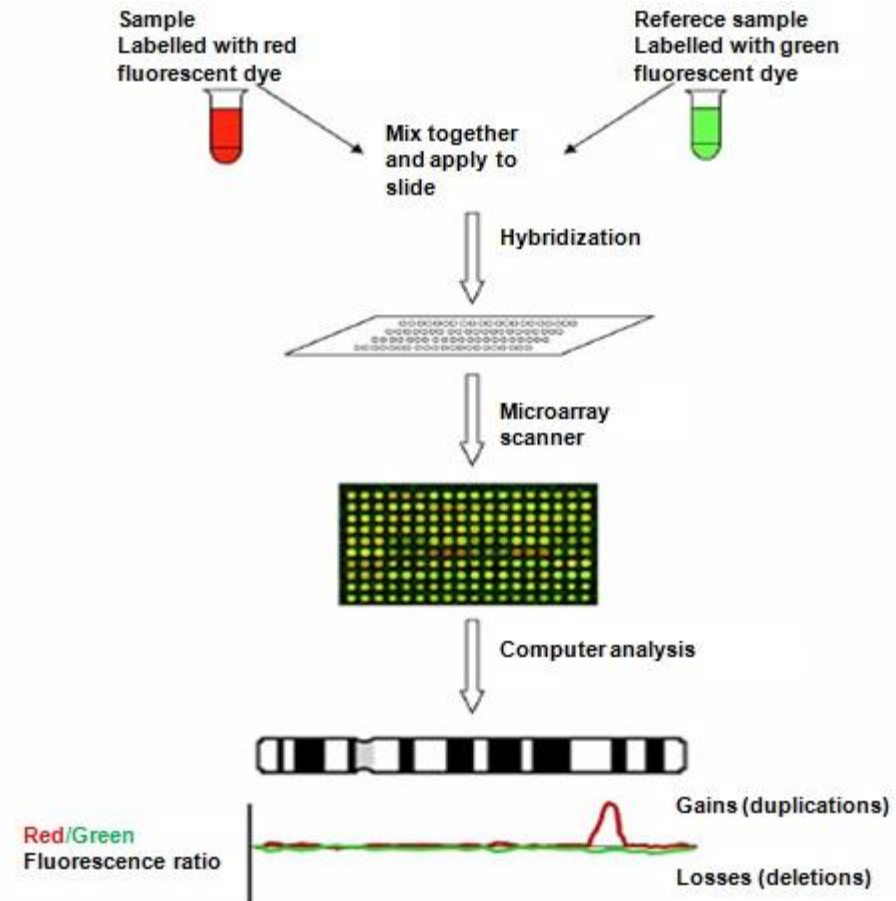


B.

Figura 2. A. Nucleu interfazic normal; B. Nucleu interfazic cu translocatie 9;22 (BCR-ABL)

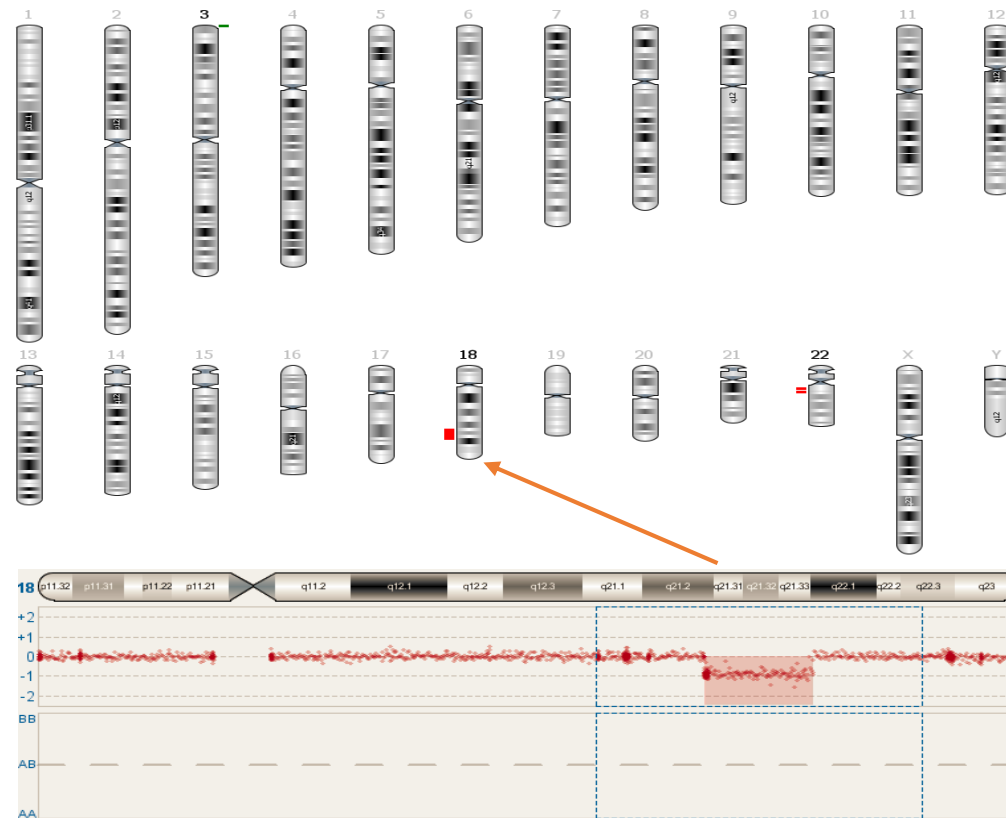
Tehnica array CGH (*aCGH - hibridizarea genomică comparativă bazată pe microarray*)

- aCGH folosește mii de sonde oligonucleotidice monocatenare (fragmente mici de ADN) imobilizate în poziții specifice pe o lamă microscopică de sticlă, fiecare sondă fiind complementară unei secvențe ADN cunoscute, ce corespunde unei anumite regiuni cromozomiale.
- Genomul testat este comparat cu un genom de referință standard prin marcarea lor cu fluorocromi diferiți.)
- Fragmentele de ADN marcate diferit sunt denaturate și prin competiție cantitativă, se fixează de sondele de pe lamă.

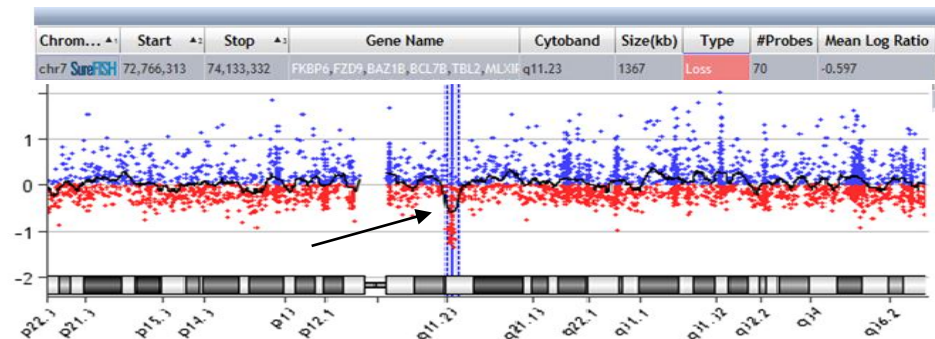


Tehnica array CGH

- Pe baza raportului de fluorescență dintre proba de interes și proba de referință, sunt obținute informații privind modificările cantitative prezente în genomul testat, în comparație cu proba de referință.
- Se realizează un screening genomic rapid pe bază de ADN, cu o rezoluție superioară cariotipării convenționale, fiind astfel posibilă detecția tuturor **aneuploidiilor cromozomiale complete sau parțiale**, precum și a pierderilor (microdeleții) sau achizițiilor (microduplicații) mici de **material genetic** – variații ale numărului de copii ale unor segmente ADN.
- Permite diagnosticul sindroamelor cauzate de microdeleții (ex. sindromul DiGeorge)/microduplicații, deleții (ex. sindromul Cri du chat) și aneuploidii (ex. sindromul Patau).



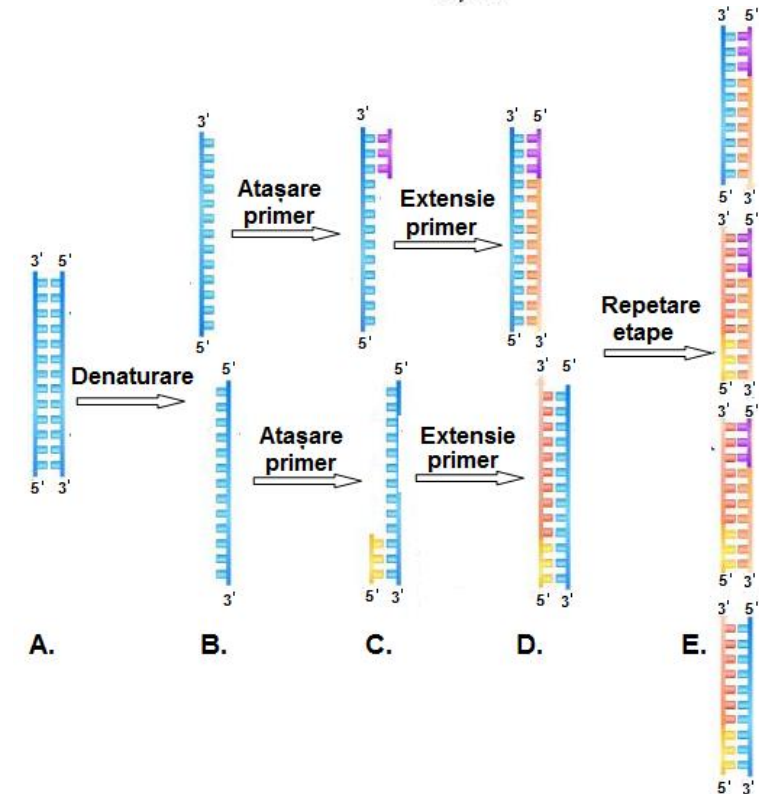
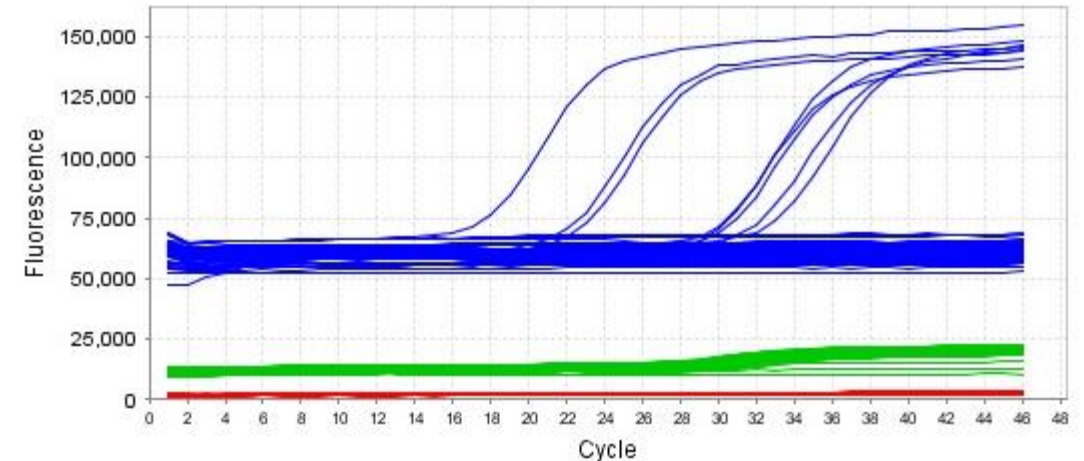
Microdeleție 18q



Microdeleție 7q11.23 (regiunea critică implicată în sindromul Williams-Beuren)
~ 1,36 Mb (26 gene: 21 gene OMIM)

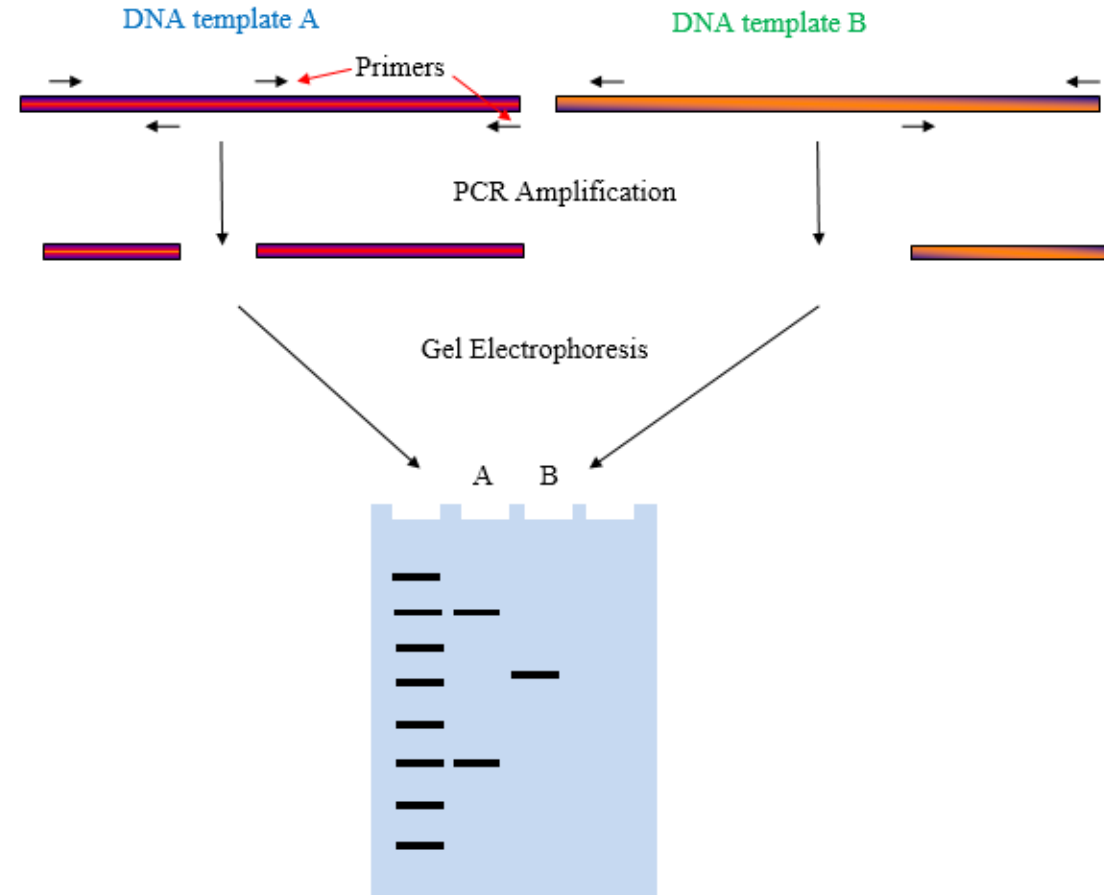
Tehnica PCR (*reacția de polimerizare în lanț*)

- PCR este o tehnică prin care se poate amplifica selectiv o secvență scurtă de ADN sau ARN, a cărei structură nucleotidică este parțial cunoscută.
- Amplificarea selectivă in vitro se bazează pe principiul extensiei unei amorse (primer) de către ADN polimerază, folosind drept matriță fragmentul ADN de amplificat monocatenar, obținut după denaturare.
- Un ciclu de amplificare cuprinde trei reacții: denaturarea segmentului de ADN supus amplificării, legarea primerilor la cele două catene în poziții opuse și extinderea primerilor, prin polimerizarea dezoxiribonucleotidelor pe bază de complementaritate, de către enzima termorezistentă Taq polimeraza. După fiecare ciclu de amplificare se dublează numărul de segmente de ADN.



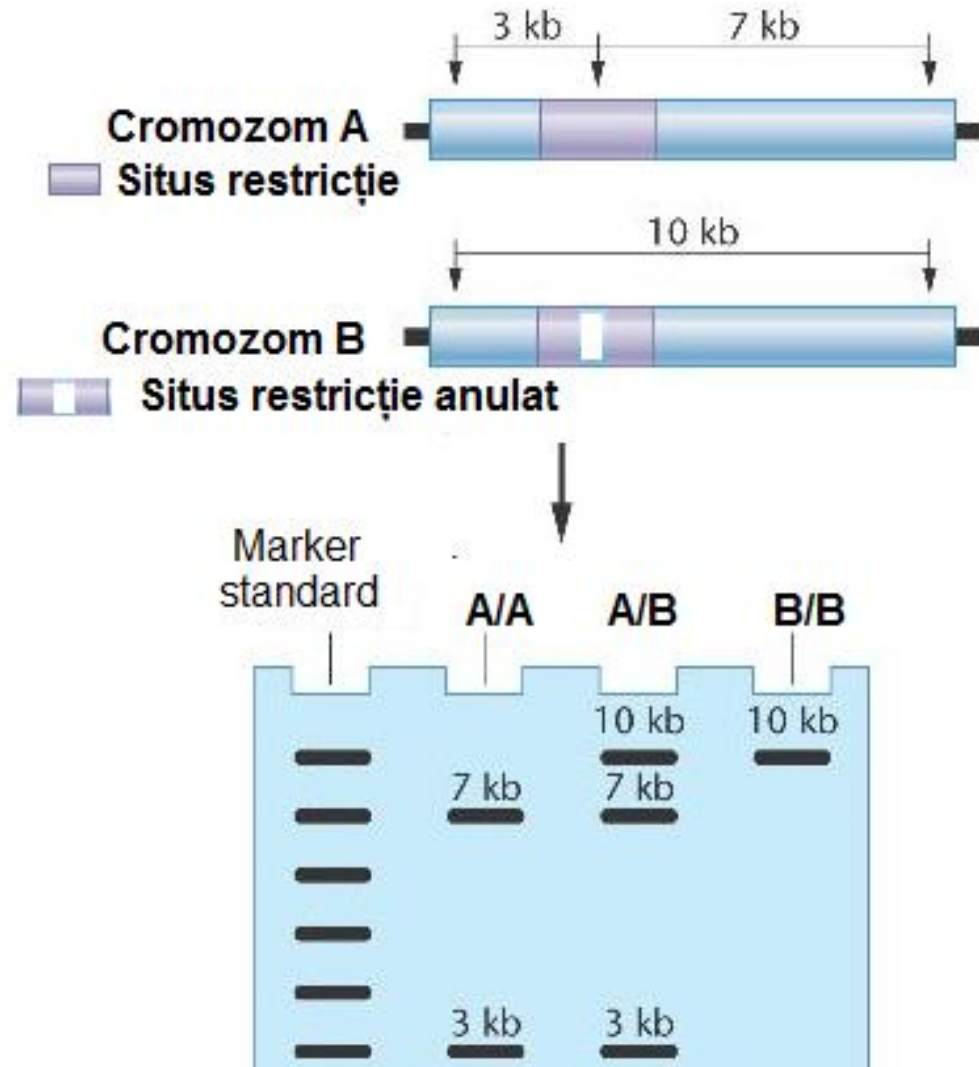
Tehnica RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism – polimorfismul lungimii fragmentelor de restricție*)

- RFLP este o metodă care permite detecția polimorfismelor/mutațiilor, ce are la bază generarea unor modele unice, prin acțiunea enzimelor de restricție, care secționează anumite regiuni din ADN-ul țintă la nivelul variantelor polimorfe prezente în ADN-ul fiecărui individ.
- Tehnica de analiză RFLP implică secționarea unei anumite regiuni din ADN cu variabilitate cunoscută, folosind enzime de restricție, după ce anterior ADN-ul țintă a fost amplificat prin PCR.



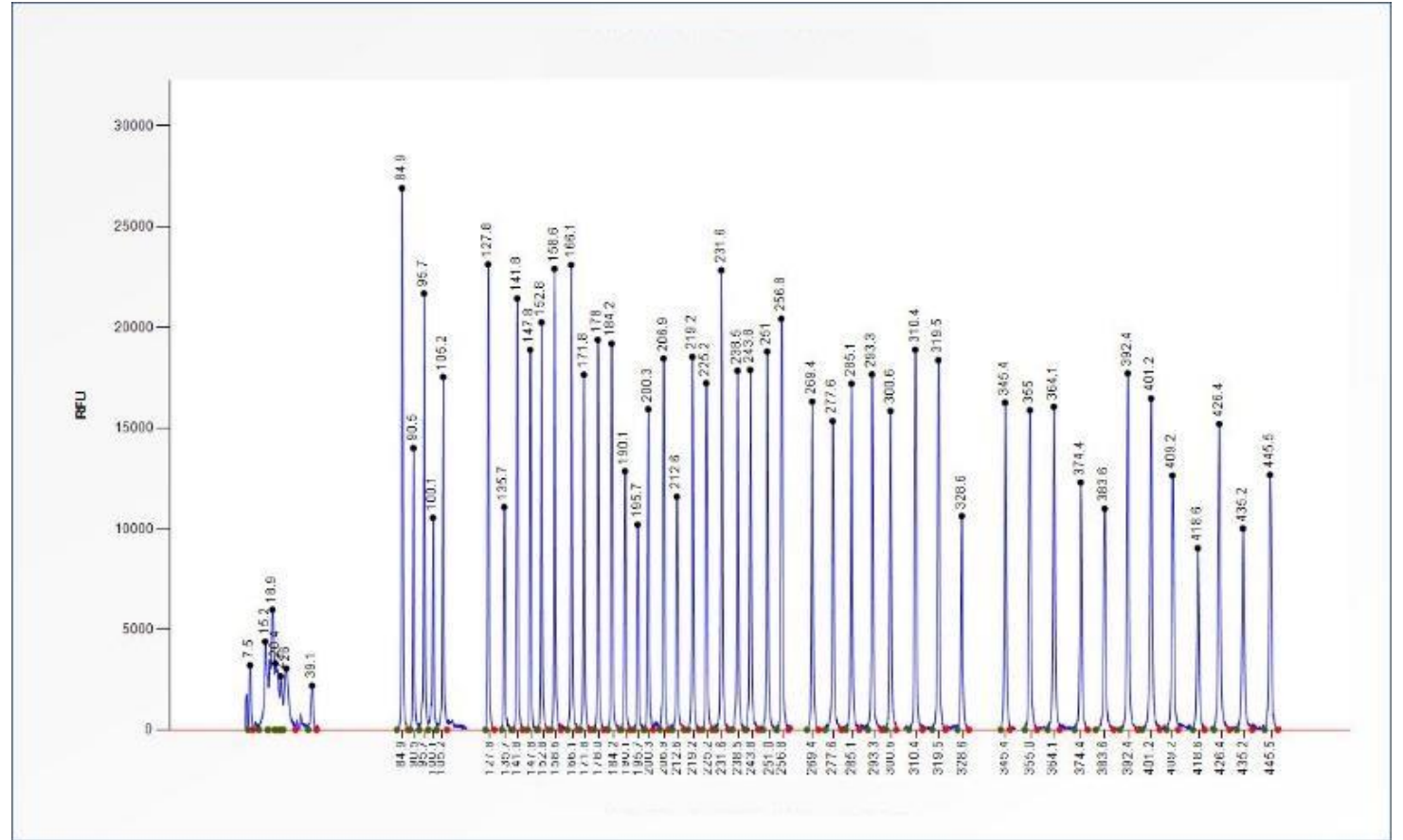
Tehnica RFLP

- Fragmentele rezultate în urma secționării sunt separate prin electroforeză în gel de agaroză în funcție de lungimile lor, determinându-se numărul de fragmente și mărimea lor relativă.
- Mutațiile pot anula situsul de restricție sau pot crea situsuri noi, generându-se fragmente de ADN cu lungimi diferite și model de migrare modificat.
- Această tehnică este utilă în special pentru identificarea de mutații mononucleotidice în afecțiuni monogenice (ex. acondroplazia, hemocromatoza etc).



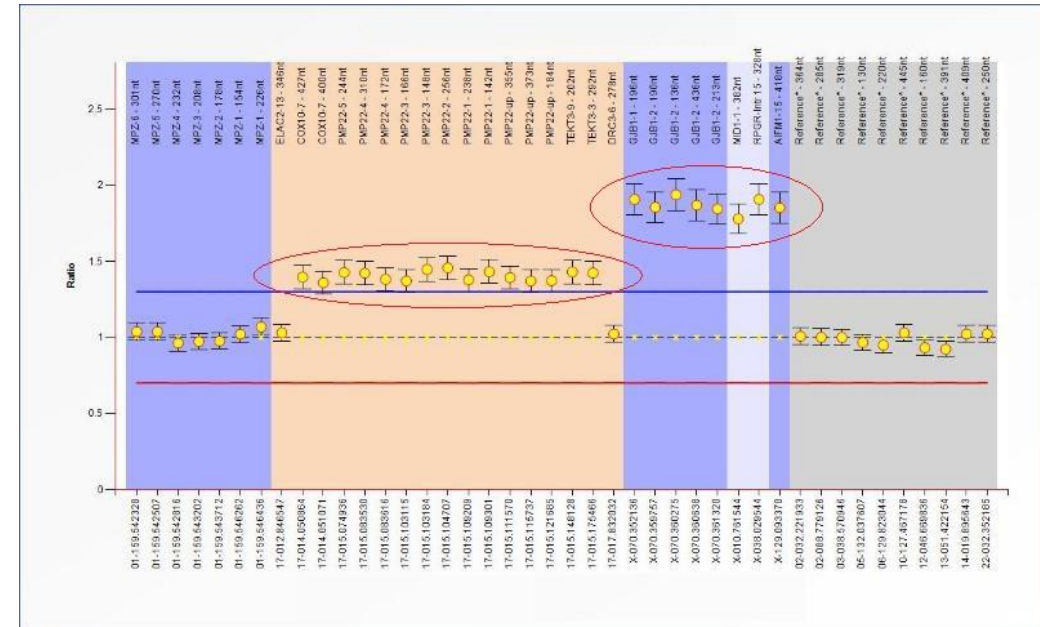
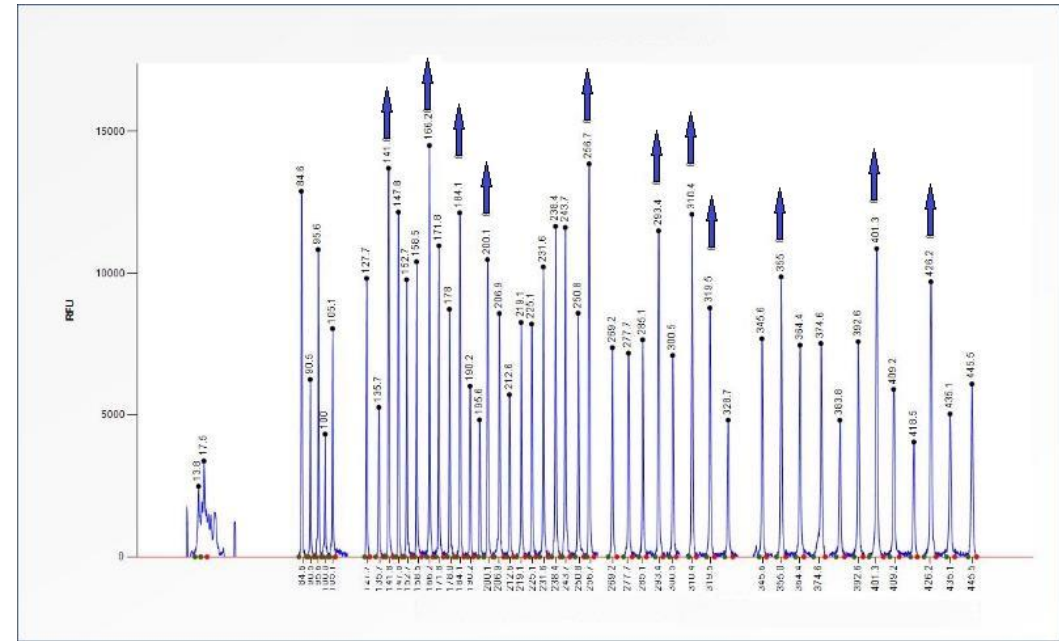
MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* - amplificarea simultană a sondelor ligaturate)

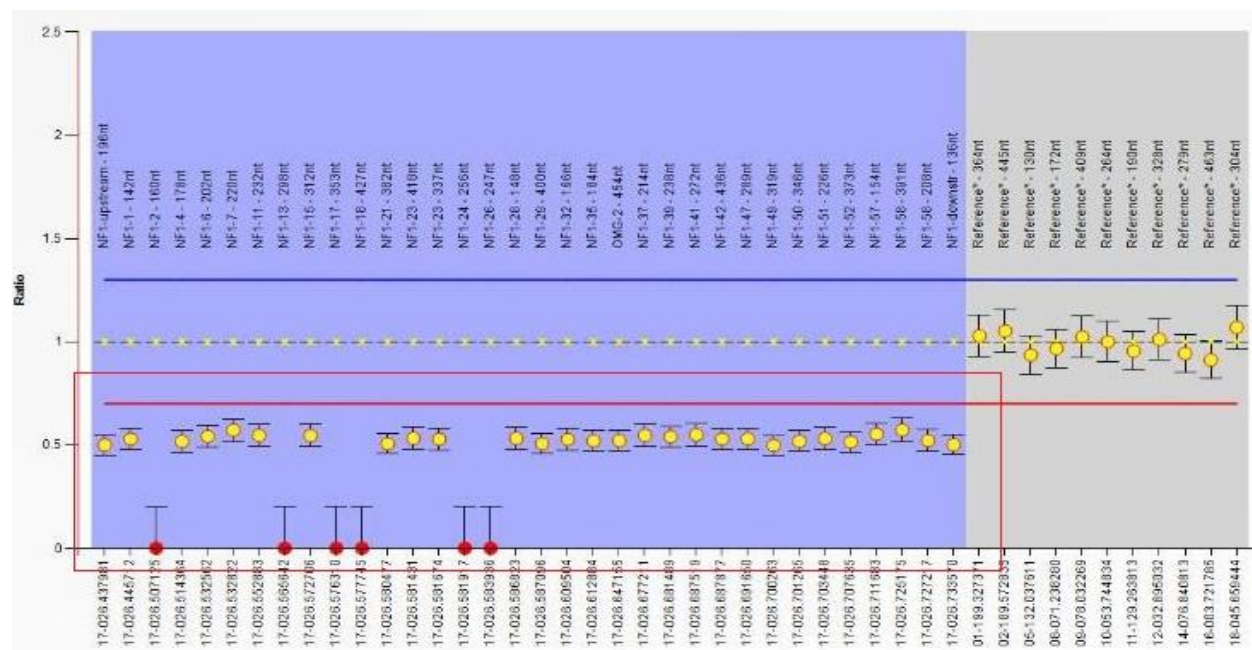
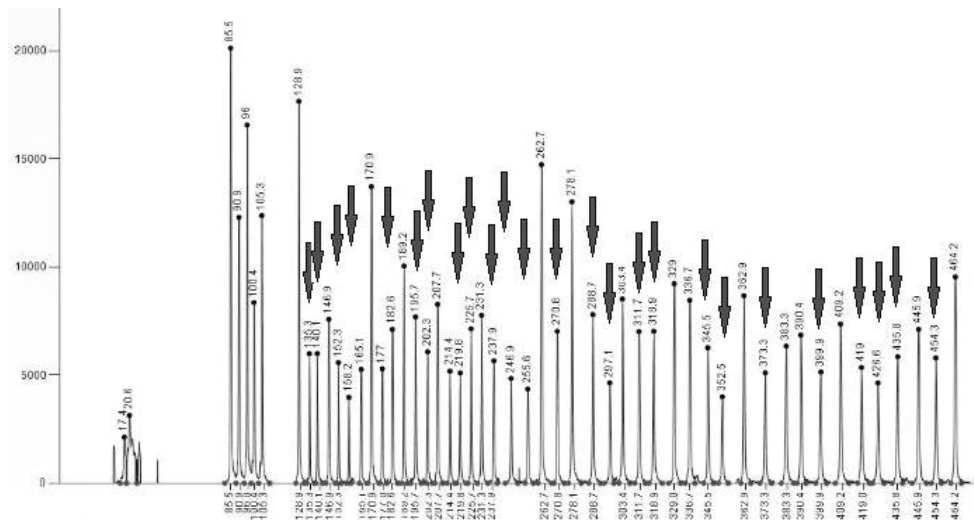
- MLPA este o metodă țintită, de înaltă rezoluție, prin care pot fi detectate deleții sau duplicații ale unor segmente de cromozomi/gene (exoni), folosind până la 50 de sonde ADN monocatenare, care se vor atașa pe bază de complementaritate la ADN-ul țintă.
- MLPA este o variantă semicantitativă a tehnicii PCR, care permite amplificarea simultană a mai multor ținte ADN, folosind o singură pereche de primeri, marcați fluorescent, într-o singură reacție. Fragmentele migrate prin electroforeză capilară sunt analizate și interpretate.



Tehnica MLPA

- Tehnica MLPA poate detecta aberații numerice (aneuploidii, poliploidii), dar și sindroame cauzate de modificări mici neechilibrate (microdeleții, microduplicații), afecțiuni monogenice în care pot fi prezente deleții genice extinse (sindromul Marfan, Neurofibromatoza tip I, Distrofia musculară Duchenne) sau duplicații (de exemplu, boala Charcot Marie-Tooth), precum și boli cauzate de mutații dinamice.
- De asemenea, poate fi determinat statusul de metilare al unor gene asociate cu anomalii de amprentare (de exemplu, sindromul Prader –Willi, sindromul Angelman).

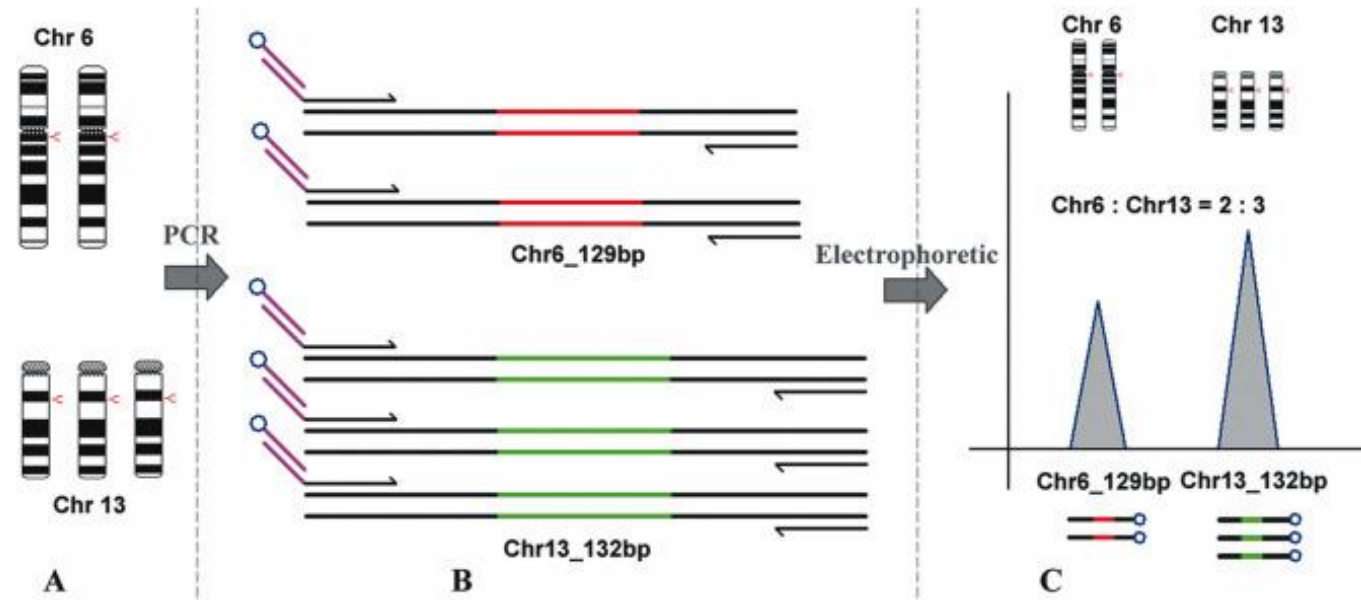




Deleție extinsă la nivelul genei NF1 asociată cu neurofibromatoza tip I

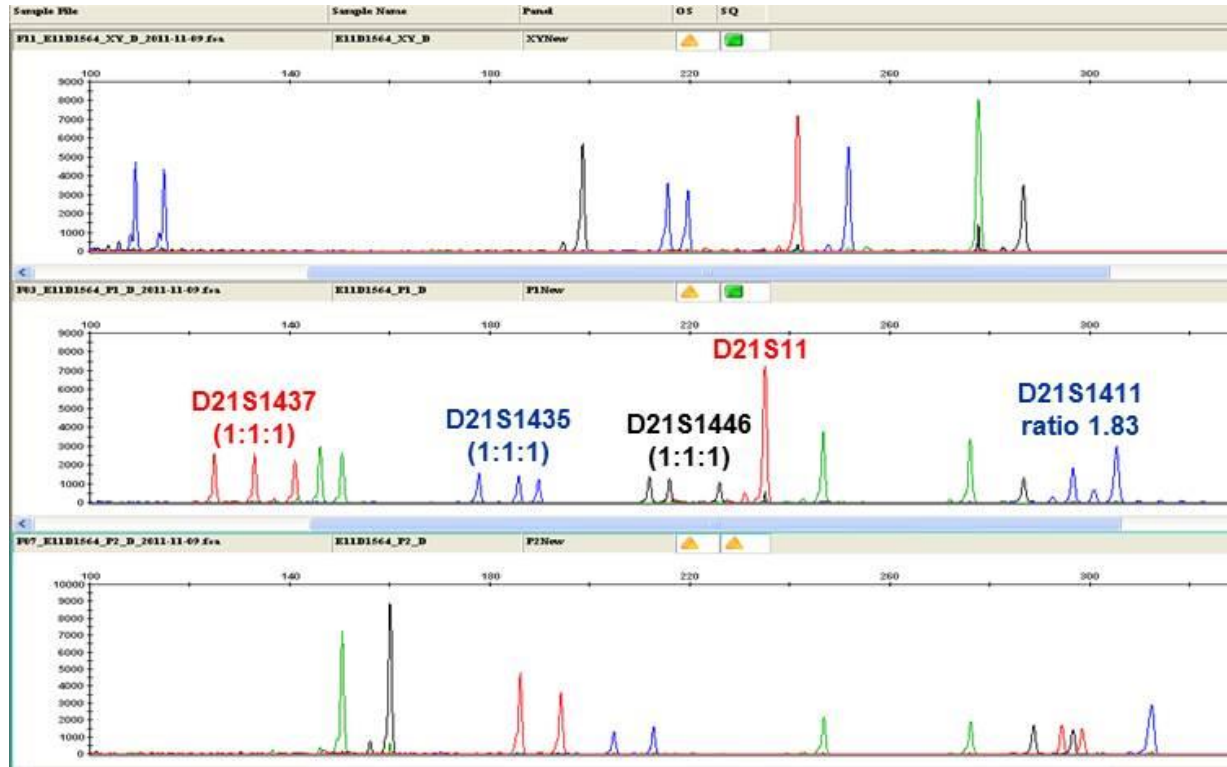
QF-PCR (*Quantitative Fluorescent PCR*)

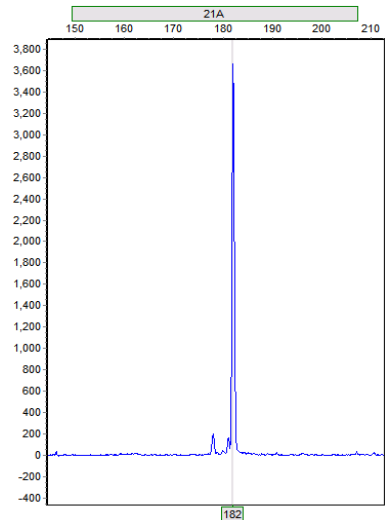
- Tehnica QF-PCR se bazează pe evaluarea unor repetiții ADN în tandem de dimensiuni mici (microsateliți – 4bp), denumite STR (short tandem repeats), variabile ca număr de la o persoană la alta. Într-o reacție PCR multiplex (amplificare PCR simultană a mai multor fragmente ADN diferite), sunt țintiți anumiți markeri STR, folosind primeri specifici marcați fluorescent.
- Analiza de fragmente după amplificare, care constă în electroforeză capilară, permite evaluarea lungimii markerilor individuali (diferită în funcție de numărul de repetiții ale secvenței de 4bp) și analiza cantitativă a fiecărei alele pe care individul o are pentru acel marker.



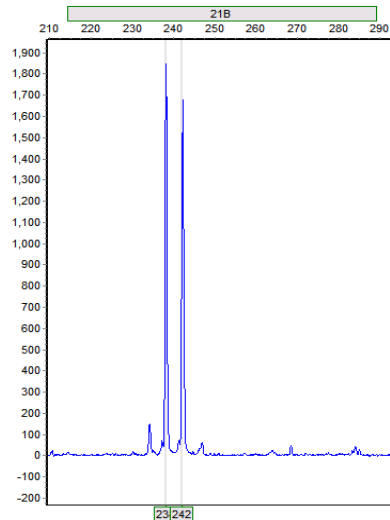
QF-PCR

- Pe baza informațiilor obținute se poate stabili numărul de copii ale cromozomului pe care se găsește markerul STR.
- Această tehnică este folosită în special, în diagnosticul prenatal, pentru identificarea aneuploidiilor 13, 18, 21, X și Y.

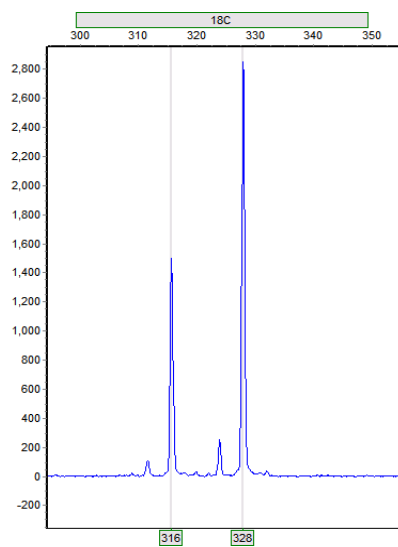




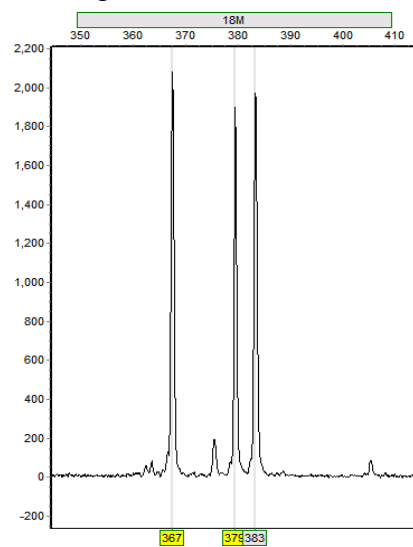
Marker 21A neinformativ, pacientul este homozigot în acest locus.



Marker 21B, prezența a două alele în cantitate comparabilă – situație normală.



Marker 18C, prezența a două alele în raport 1:2 – sugerează trisomia cromozomului 18

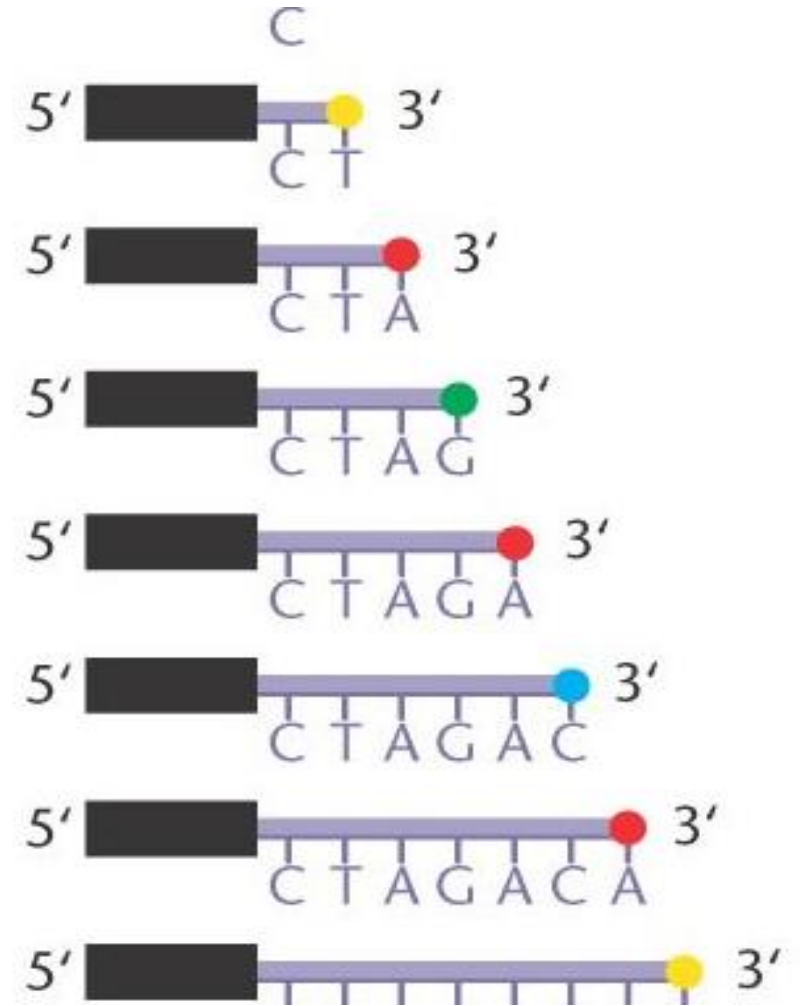


Marker 18M, prezența a trei alele în cantitate comparabilă – sugerează trisomia cromozomului 18

Marker	# Allele	Allele Name	Peak Area	Peak Ratio
18B	3 (2:1)	214:218	17957:9730	1.85
18C	3 (1:2)	316:328	8577:15418	0.56
18D-2	3 (1:1:1)	362:366:384	6911:6284:6014	
18J	3 (1:1:1)	458:462:466	7558:7501:7657	
18M	3 (1:1:1)	367:379:383	12151:11106:12199	
21A	1	182	17828	
21B	2	238:242	9265:8738	1.06
21C	2	283:296	10159:9677	1.05
21D	2	467:474	4919:5239	0.94
21H	2	375:405	8105:7768	1.04
21I	1	131	22162	
AMELXY	2	AMELX:AMEL	12145:11229	1.08
SRY	1	235	6953	

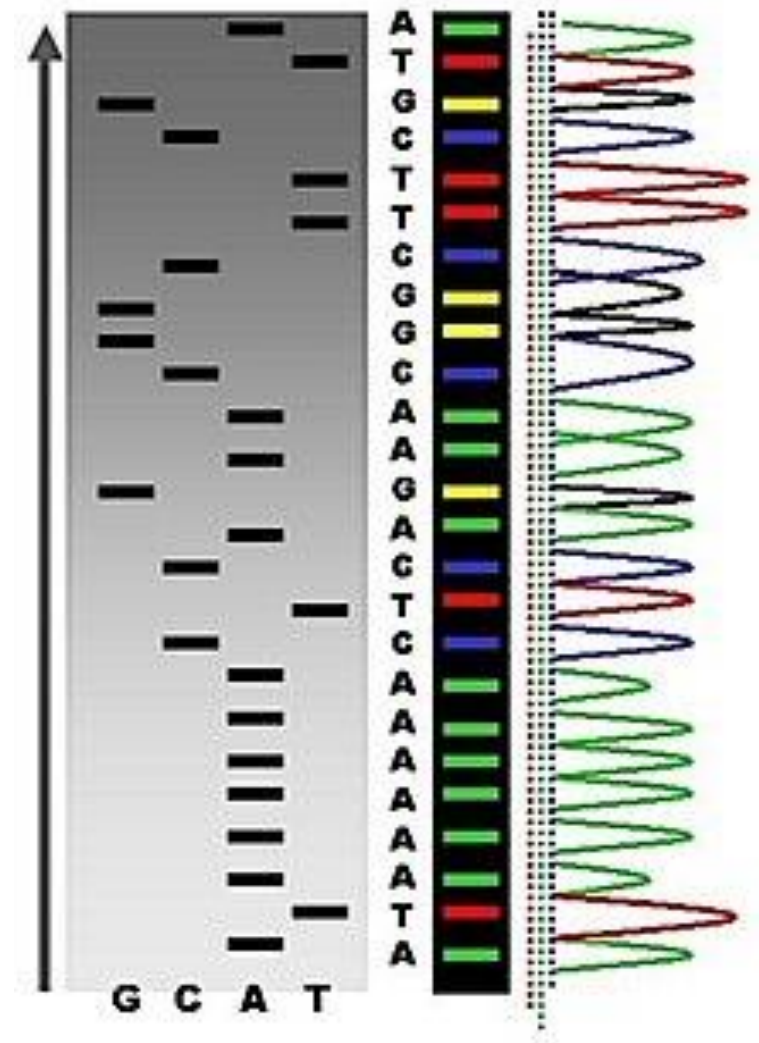
Secvențierea

- Secvențierea ADN este procesul de determinare a secvenței nucleotidelor (A, T, C și G) dintr-un fragment de ADN. Fragmentele de ADN, cu lungimi de până la 900 bp, sunt secvențiate folosind dideoxynucleotide cunoscute și sub denumirea de terminatori (metoda Sanger).
- Având în reacție atât nucleotide normale, cât și terminatori, reacția de polimerizare poate fi oprită în orice moment, prin înlocuirea unui nucleotid cu un terminator.



Secvențierea

- Ulterior, electroforeza capilară permite separarea fragmentelor în funcție de lungimea lor și este cuplată cu citirea laser a semnalului terminatorilor. Se obține astfel o secvență complementară fragmentului de interes.
- Această metodă poate identifica mutații mici (punctiforme): substituții, inserții/deleții.
- Secvențierea este folosită și pentru validarea rezultatelor altor tehnici ce permit detecția unor modificări mici. **Este aplicată, de exemplu, pentru detecția de mutații punctiforme asociate cu diferite categorii de boli genetice (monogenice, mitocondriale, etc); în prezent, este folosită, în special, în acele situații în care fenotipul este sugestiv.**



Metodele de secvențiere de nouă generație (*NGS – next generation sequencing*)

- Se bazează pe realizarea simultană a unui număr foarte mare de reacții de secvențiere într-un volum mic.
- Această tehnică permite secvențierea întregului exom (totalitatea secvențelor codante) sau chiar a întregului genom.
- Având costuri din ce în ce mai accesibile, **metodele NGS pot identifica variante genetice (mutații) responsabile de boli mendeliene sau boli poligenice.**

