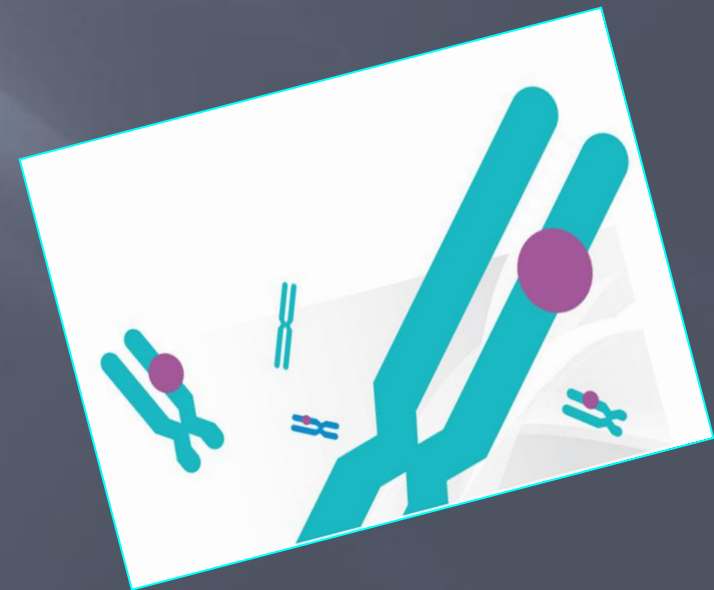


ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ & ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΡΓΑΡΜΟΓΕΣ ΣΕ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΟΓΕΝΕΙΣ ΟΓΚΟΥΣ

ΕΛΕΝΗ ΡΙΖΟΥ, Ph.D
ΤΜΗΜΑ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ,
ΓΟΝΚ «Ο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ»»



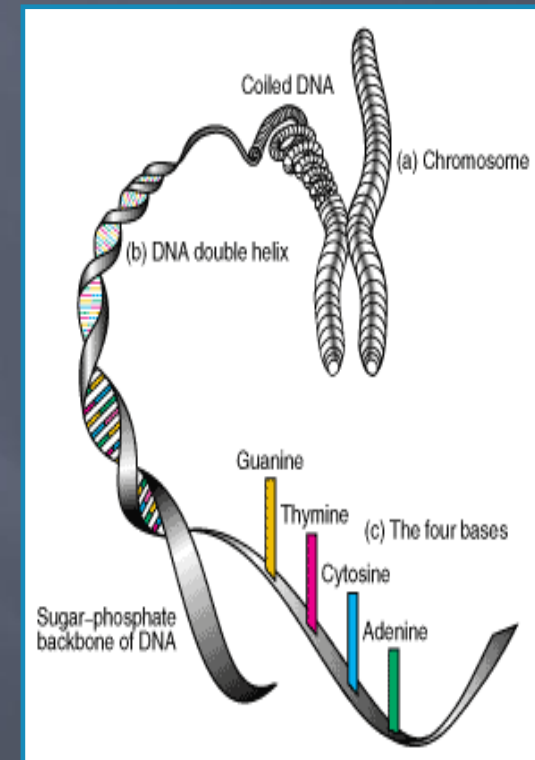
ΔΟΜΗ

- **Μεθοδολογίες Γενετικής ανάλυσης**
 - Κυτταρογενετική
 - από την κυτταρογενετική στο fish
 - περιορισμοί μεθοδολογιών
- **Κλινική εφαρμογή στα σαρκώματα**
 - *χρωμοσωμικές ανακατατάξεις - χιμαιρικά γονίδια*
 - *γονιδιακή επέκταση*
 - Βάσεις δεδομένων
- **Εργαστήριο Ογκολογικής Γενετικής**

ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ

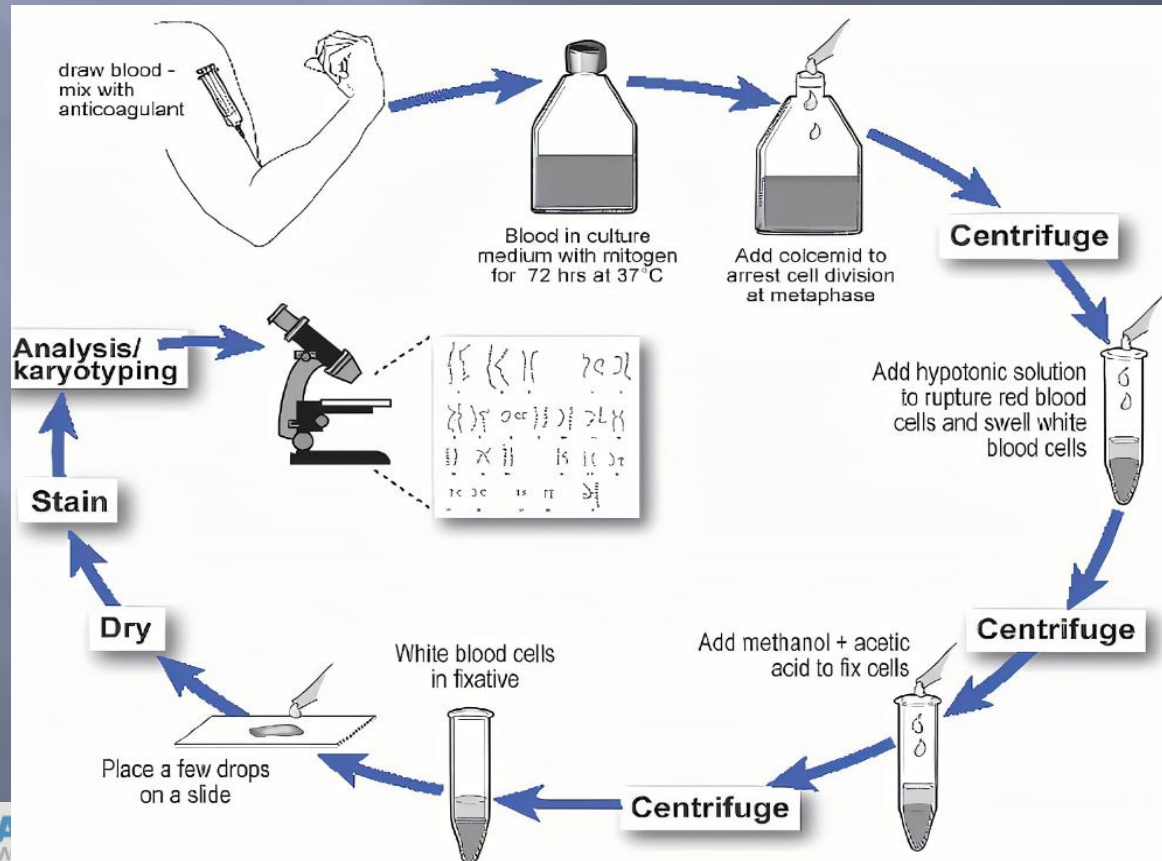
μελέτη χρωμοσωμάτων για ανίχνευση ανωμαλιών και συσχέτισή τους με συγκεκριμένο είδος όγκου

- ✓ συσχέτιση χρωμοσωμάτων και καρκίνου (Bovery 1916)
- ✓ 46,XY (Tjio & Levan, 1956)
- ✓ ζωνοποίηση χρωμοσωμάτων (Caspersson, 1968)
- ✓ ανίχνευση χρωμοσωμικών ανωμαλιών σε *sa ewing* (Aurias, TurCarel 1983)
- ✓ ταυτοποίηση χιμαιρικού γονιδίου *ews/fli* (Delattre, 1992)



ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ μεθοδολογία

- *Κυτταροκαλλιέργεια*
- *Απομόνωση χρωμοσωμάτων / μονιμοποίηση*
- *Επιστρωση και ταινιοποίηση με ειδικές χρωστικές*
- *μικροσκόπηση / ευρεση χρωμοσωμικών αλλαγών*



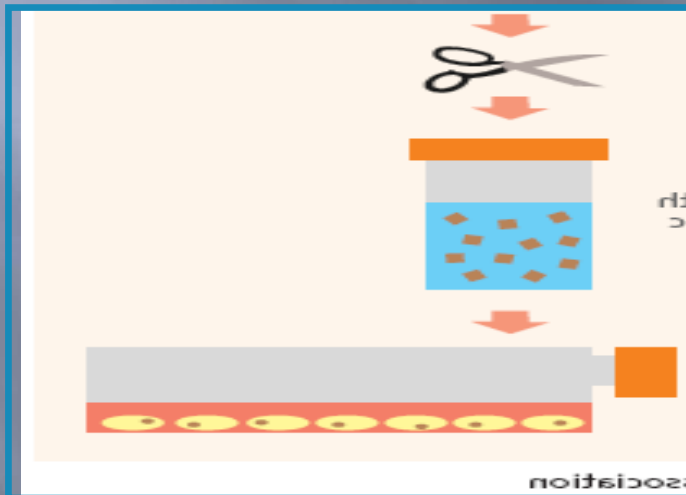
ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ

1. Κυτταροκαλλιέργεια



Αιματολογικές νεοπλασίες
(24-72 ώρες)

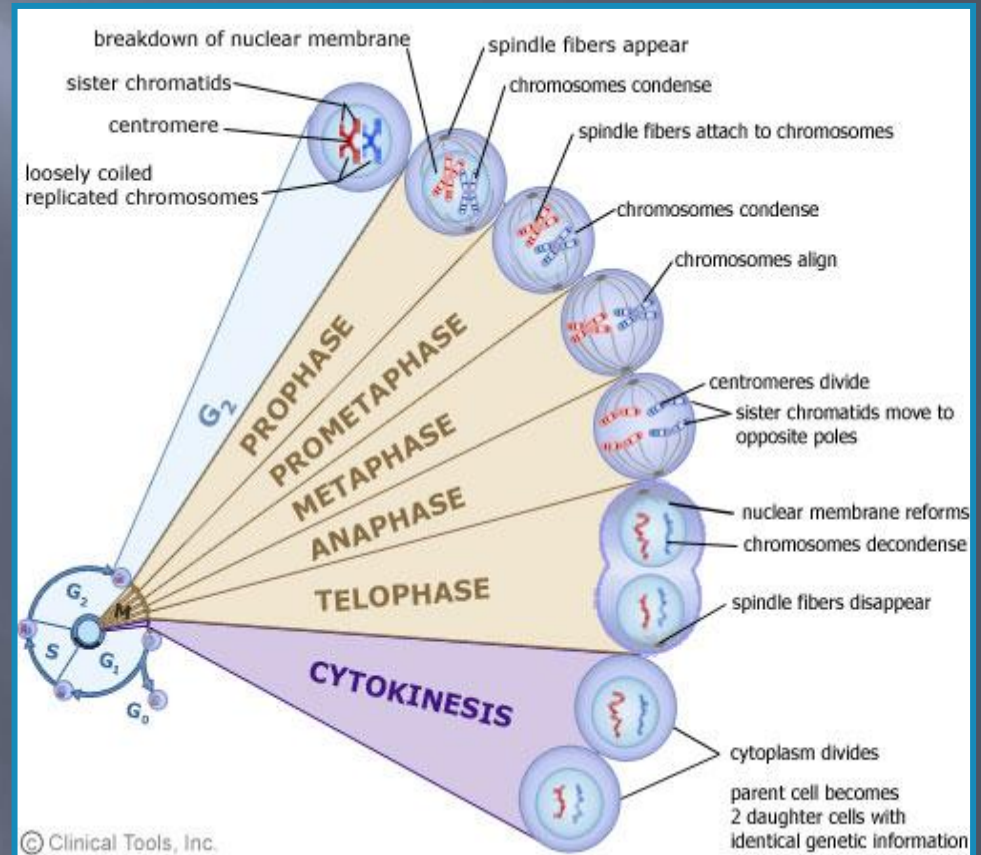
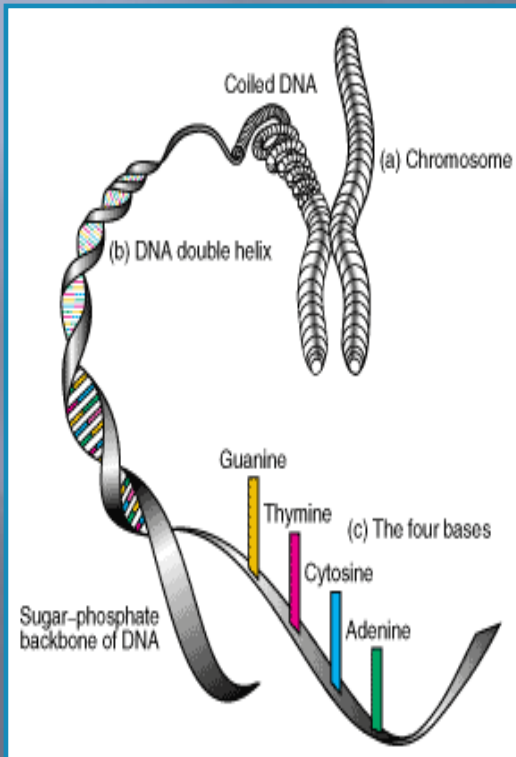
Αποδιάταξη/Κυτταροκαλλιέργεια



Συμπαγείς όγκοι
(3-10 ημέρες)

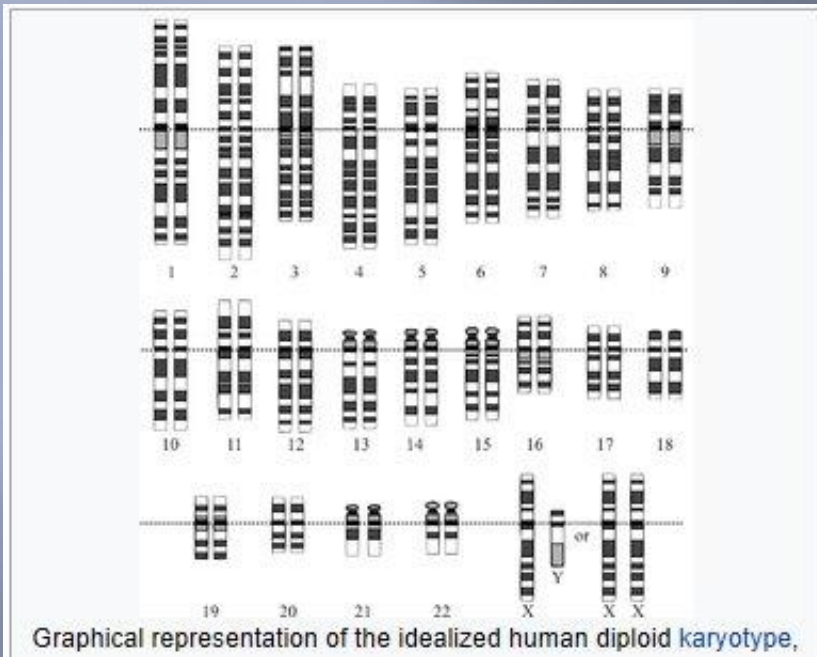
ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ- προϋποθέσεις

- *διαιρούμενα κύτταρα*
- *ανάλυση και εύρεση χρωμοσωματικών ανωμαλιών*
- *εντοπισμός επαναλαμβανόμενων ανωμαλιών*
- *συσχέτιση με είδος νεοπλασίας*



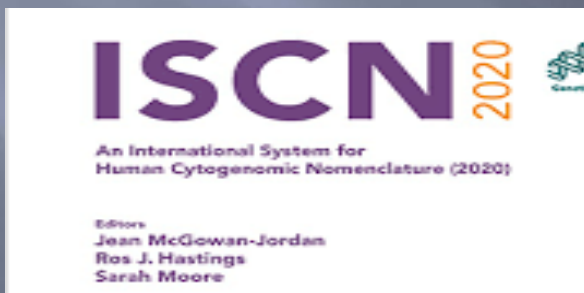
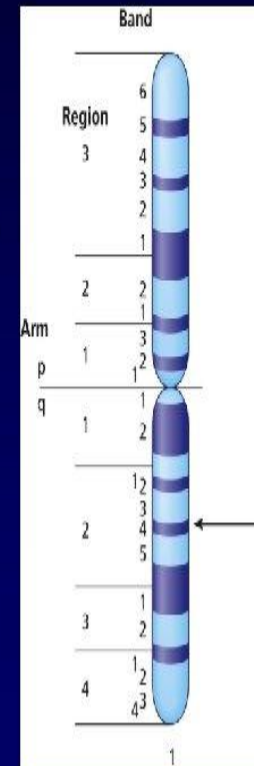
ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ

Ταϊνιοποίηση με χρώση Giemsa (G banding)



International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN)

- Regions, Bands & Sub-bands
 - Each area of chromosome given number
 - Lowest number closest (proximal) to centromere
 - Highest number at tips (distal) to centromere
- 1p31.1
 - Chromosome 1
 - Short arm
 - Region 3, band 1, sub-band 1

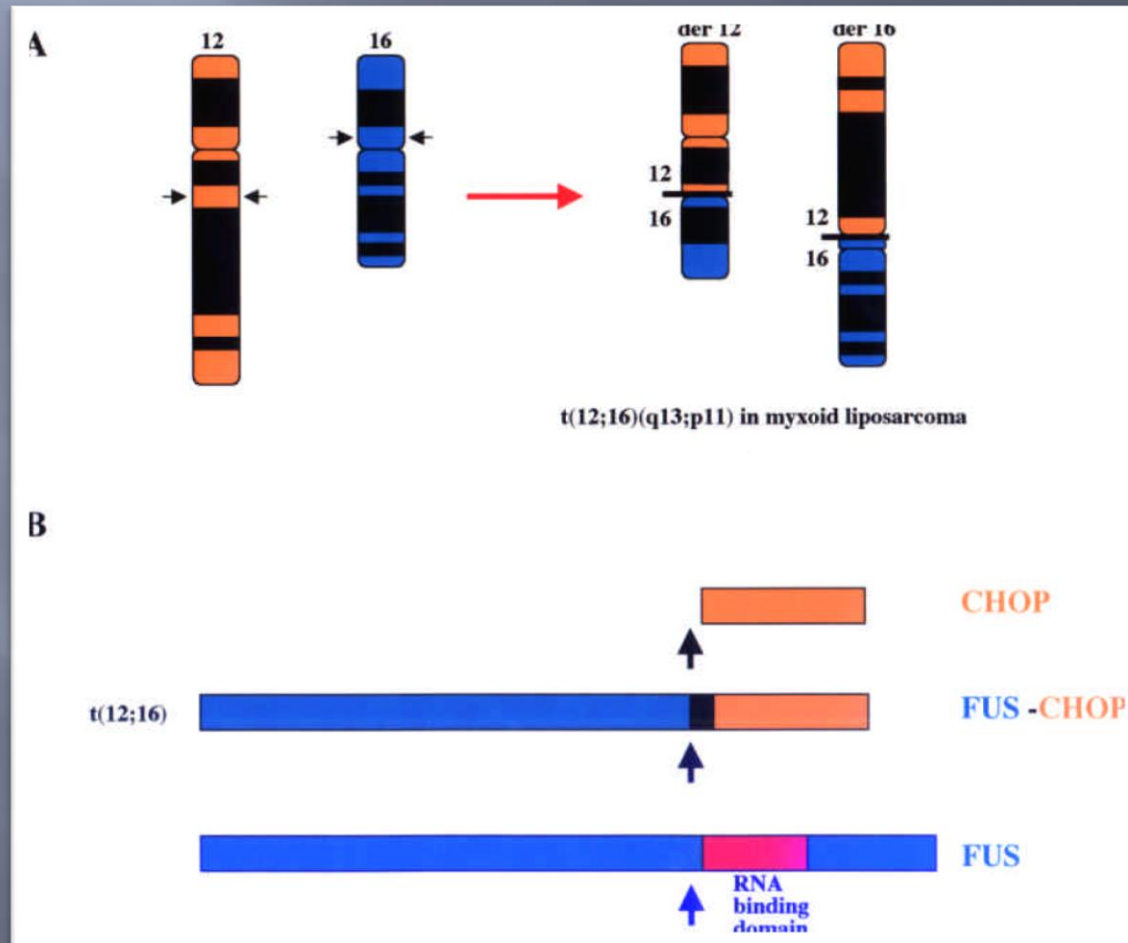


➤ ΔΟΜΙΚΕΣ

- ✓ Ισοζυγισμένες μεταθέσεις *t* ➤ ανακατανομή υλικού
- ✓ Αναστροφές *inv*
- ✓ Ελλείψεις *del* ➤ έλλειψη υλικού
- ✓ Διπλασιασμοί *dup* / πολλαπ/σμοί ➤ περίσσεια υλικού
- ΑΡΙΘΜΗΤΙΚΕΣ
- ✓ Τρισωμίες *+*
- ✓ Πολυσωμίες
- ✓ Μονοσωμίες ➤ έλλειψη υλικού
- ✓ πολυπλοειδίες *4n | 6n*

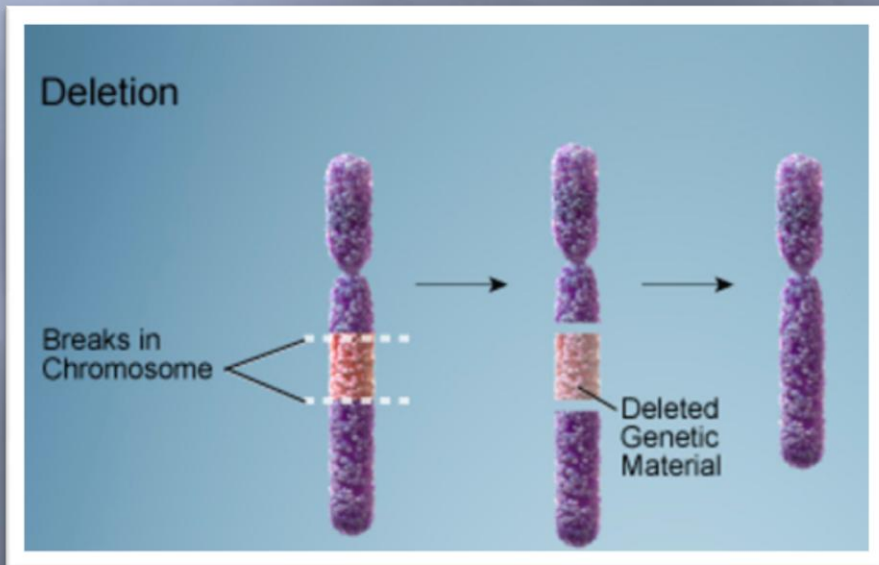
1.ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΑΝΑΚΑΤΑΤΑΞΕΙΣ

➤ *Ισοζυγισμένες μεταθέσεις & χιμαιρικά γονίδια*

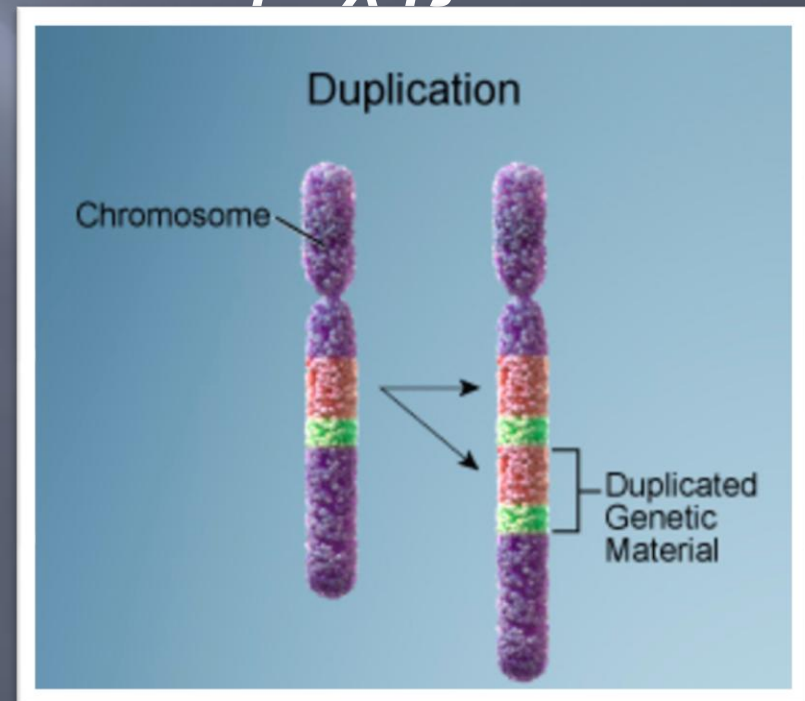


2.ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΑΝΑΚΑΤΑΤΑΞΕΙΣ

- ✓ έλλειμα
χρωμοσωμικής
περιοχής

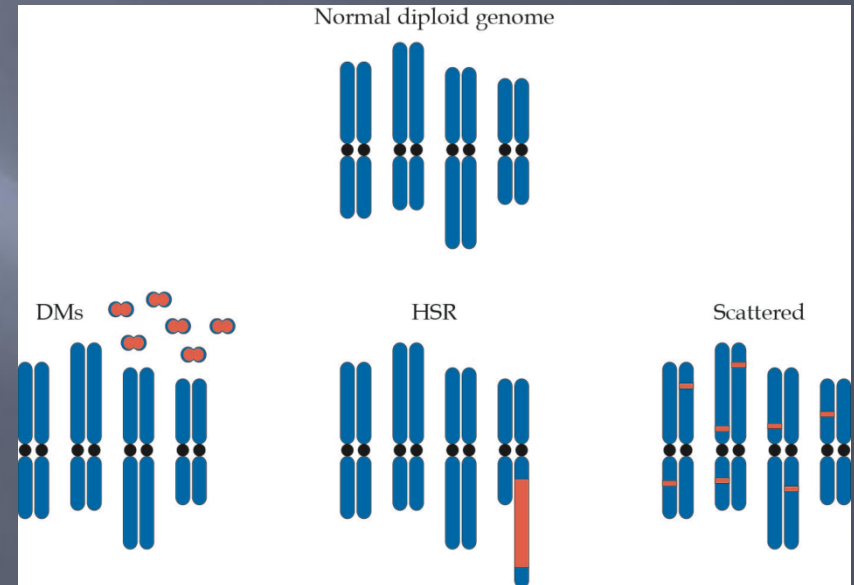
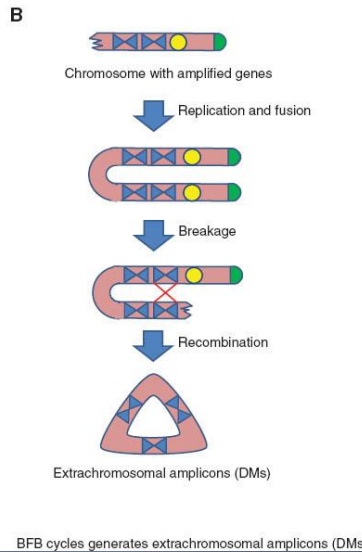
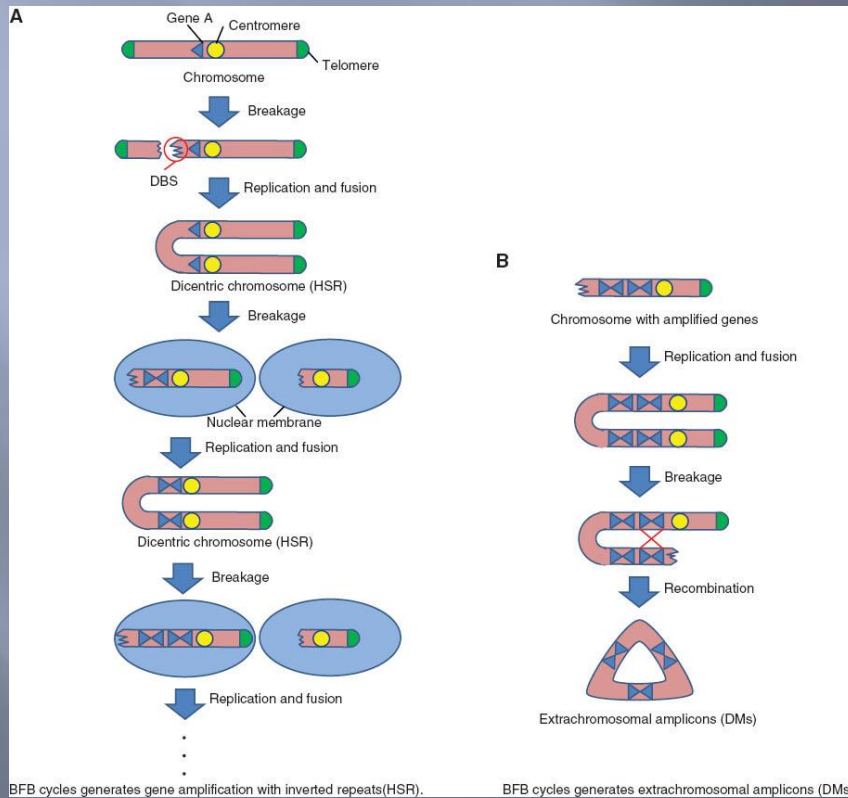


- ✓ πλεόνασμα
χρωμοσωμικής
περιοχής



3.ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΑΝΑΚΑΤΑΤΑΞΕΙΣ

➤ *πολλαπλασιαμός γενετικού υλικού & γονιδιακή ενίσχυση*



ΣΑΡΚΩΜΑ: κακοήθης όγκος μεσεγχυματογενούς προέλευσης



- **Ετερογένεια**
- ✓ *Βιολογική : επιθετικότητα*
- ✓ *Ιστολογική : >70 ιστολογικοί τύποι*

Προβλήματα διάγνωσης



ΣΑΡΚΩΜΑ: γενετική ασθένεια



- *αλλαγές στο γενετικό υλικό*
(σε επίπεδο χρωμοσώματος ή γονιδίου)
- *επαναλαμβανόμενες γενετικές ανωμαλίες*
- *συσχετίζονται με συγκεκριμένους ιστολογικούς τύπους*



εγκυρότερη διάγνωση



ΣΑΡΚΩΜΑ: γενετική ασθένεια

- Ταξινόμηση και με χρήση γενετικών χαρακτηριστικών

WHO Classification of Tumours Editorial Board. Soft Tissue and Bone Tumours. 3. 5th ed. Lyon: IARC; 2020.

WSR1-SMAD3 fibroblastic tumour

- Συστάσεις για γενετική ανάλυση
διαφορική διάγνωση
ασυνήθιστη κλινική εικόνα
για προγνωση
ειδική θεραπεία (αναστολείς NTPKS)
ανίχνευση παθογνωμικών γενετικών αλλαγών

ΕΙΔΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΛΛΑΓΩΝ

- 1) Μεταλλαγμένα γονίδια με ογκογενετική δράση πχ C-KIT, PDGFRA μη ανιχνεύσιμες κυτταρογενετικά
- 2) Πολύπλοκες αλλαγές ορατές αλλά μη αξιοποιήσιμες κυτταρογενετικά

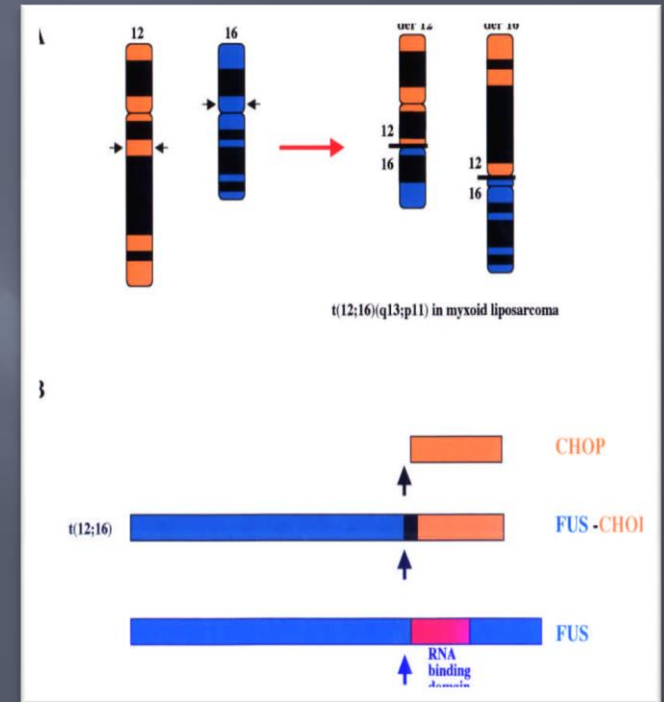
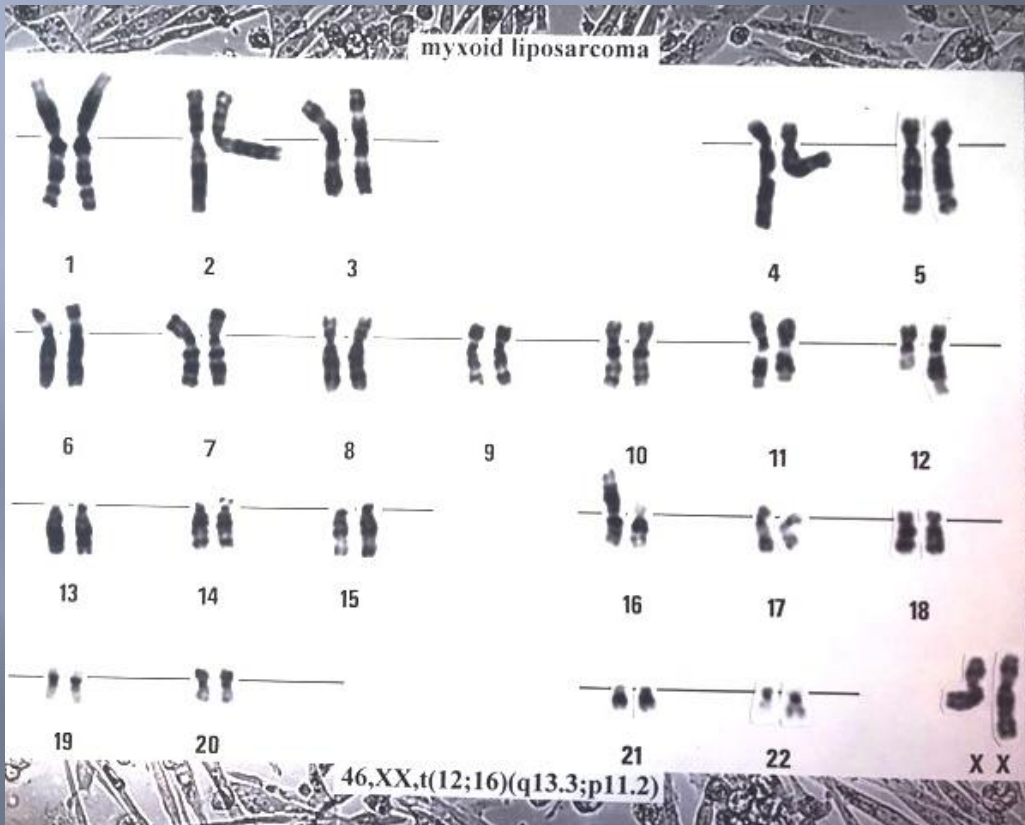
α



ΕΙΔΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΛΛΑΓΩΝ



3) χρωμοσωμικές μεταθέσεις → Χιμαιρικό γονίδιο



ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

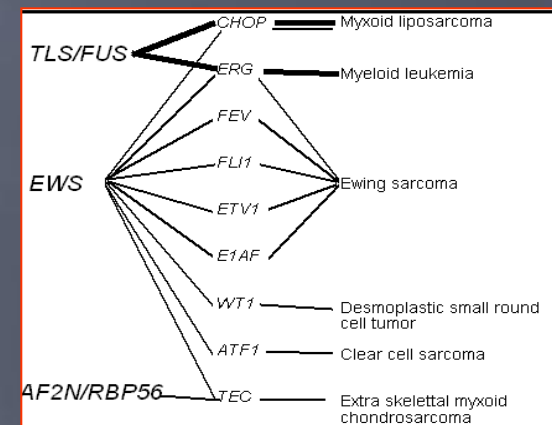


τύπος όγκου

μεταθέσεις

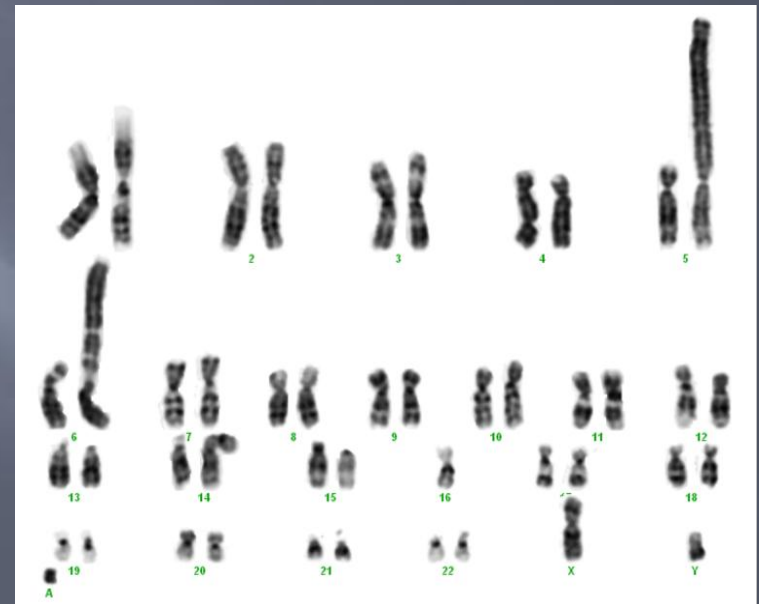
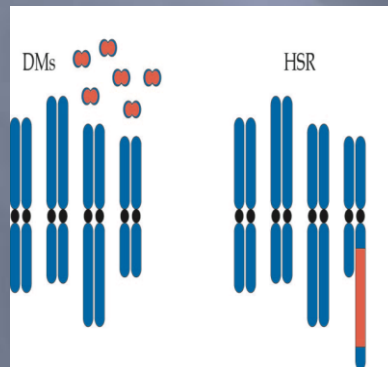
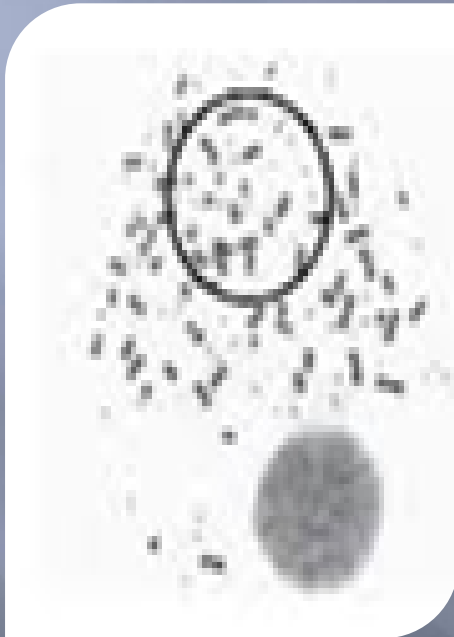
χημειρικό γονίδιο

Tumour Type	Cytogenetic Finding	Molecular Trace
Ewing's sarcoma	t(11;22)(q24;q12)	EWS-FLI1
	t(21;22)(q22;q12)	EWS-ERG
	t(7;22;)(p22;q12)	EWS-ETV1
	t(2;22)(q33;q12)	EWS-E1AF
	t(1;22)(q42;q12)	EWS-?
	t(2;22)(q33;q12)	EWS-FEV
Desmoplastic small round cell T	t(17;22)(q12;12)	EWS-ETV4
	t(6;22)(p21;q12)	EWS-POU5F1
	t(11;22)(p13;q12)	EWS-WT1
Round cell, myxoid liposarcoma & epithelioid pleomorphic liposarcoma	t(12;16)(q13;p11)	FUS-CHOP
	t(12;22)(q13;12)	EWS-CHOP
Myxoid chondrosarcoma Extraskelletal chondrosarcoma	t(9;22)(q22;q12)	EWS-CHN(TEC)
	t(9;17)(q22;q11)	hTAFII68-CHN (TEC)
Clear cell sarcoma & angiomatoid fibrous histiocyoma	t(12;12)(q13;q21)	EWS-CREB1 EWS-ATF1
	Synovial sarcoma	t(X;18)(p11.23;q11)
t(X;18)(p11.21;q11)		SS18-SSX2
t(X;18)(p11;q11)		SS18-SSX4
Gastrointestinal stromal tumour (GIST)	Several	SS18L1-SSX1
		KIT mutations
Extrarenal rhabdoid tumor	Deletion on 22q	INI inactivation
Alveolar rhabdomyosarcoma	t(2;13)(q35;q14)	PAX3-FKHR
	t(1;13)(p36;q14)	PAX7-FKHR
	t(2;2)(q35;p23)	PAX3-NCOA1
Dermatofibrosarcoma protuberans	t(17;22)(q22;q13)	COL1A1-PDGFB
Infantile fibrosarcoma/cellular ¹ mesoblastic Nephroma	t(12;15)(p13;q25)	ETV6-NTRK3
Alveolar soft part sarcoma ²	t(X;17)(p11;q25)	TFE3-ASPL
Low grade endometrial stromal sarcoma	t(7;17)(p15;21)	JAZF1-JJAZF1
Inflammatory myofibroblastic tumour	t(1;2)(q21;p23)	TPM3/TPM4-ALK
	t(2;17)(p23q23)	CLTC2-ALK
Low grade fibromyxoid sarcoma	t(7;16)(q32;p11)	FUS-CREB-3L



ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

4) Γονιδιακή ενίσχυση (amplification)



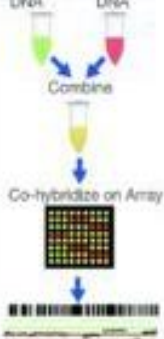

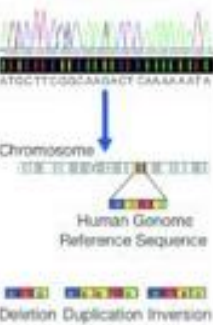
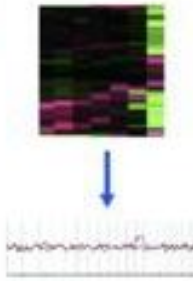


Kyriazoglou et al

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ & ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

- ✓ *Πολύπλοκοι καρυότυποι*
- ✓ *Ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα (Στόχος η καλλιέργεια των νεοπλασματικών κυττάρων)*
- ✓ *μη ικανοποιητική διακριτική ικανότητα*
- ✓ *εξειδικευμένος κυτταρογενετιστής*
- ✓ *Φρέσκος Ιστός (Κυτταροκαλλιέργεια)*
- ✓ *Πανοραμικότητα*
- ✓ *Μικρό κόστος*

ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

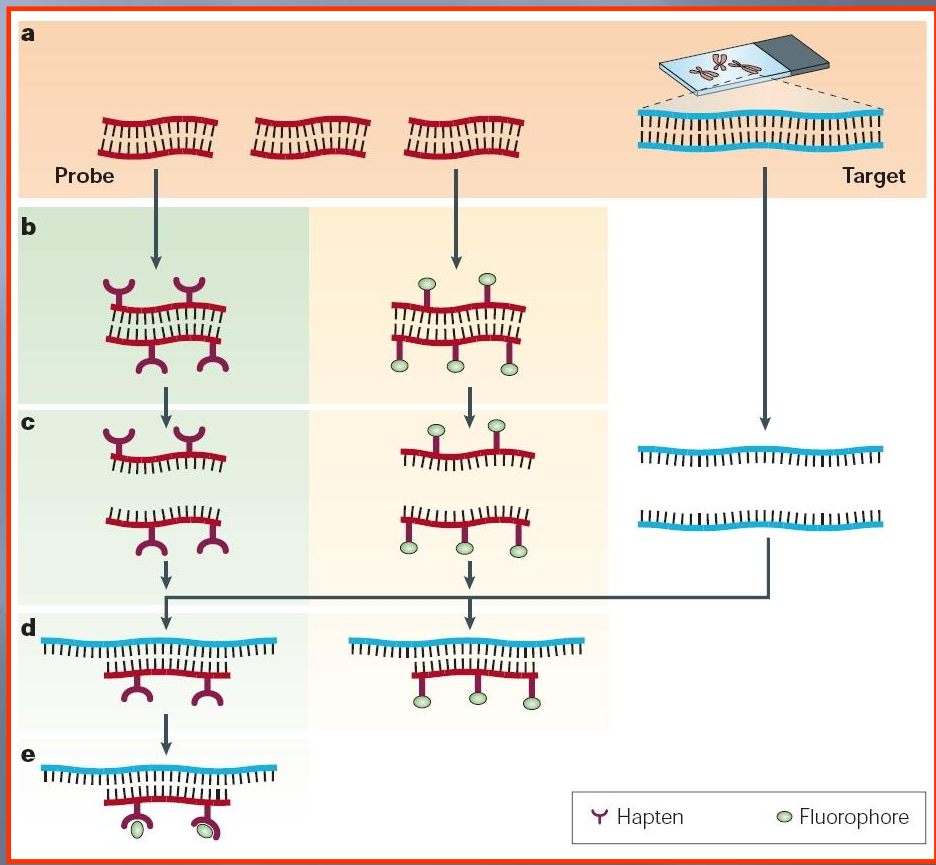
	Cytogenetic		DNA-based			RNA-based
	G-banding Karyotyping	Spectral Karyotyping	aCGH	SNP Array	Whole-genome Sequencing	Expression Array
Methods						
Resolution	~10 Mb	Variable (depends on aberration type)	Less than 1 Mb	Less than 1 Mb	Single base-pairs	~10 Mb
Sensitivity	~5%	~5%	Over 20%	Over 20%	Over 20%	Over 30%
Cost	High (hundreds of \$)	High (hundreds of \$)	High (hundreds of \$)	High (hundreds of \$)	Very High (thousands of \$)	High (hundreds of \$)
Unique Strengths	<ul style="list-style-type: none"> • Easy and reliable • High sensitivity for mosaic cultures • Detection of balanced translocations and inversions 	<ul style="list-style-type: none"> • High sensitivity for mosaic cultures • Detection of balanced translocations and complex karyotypes 	<ul style="list-style-type: none"> • High resolution 	<ul style="list-style-type: none"> • High resolution • Detection of LOH 	<ul style="list-style-type: none"> • Ultimate resolution • Detection of point mutations 	<ul style="list-style-type: none"> • Same biological material used for expression profiling and genomic integrity analysis • Identification of involved genes
Unique Limitations	<ul style="list-style-type: none"> • Low resolution 	<ul style="list-style-type: none"> • Low ratio of resolution-per-cost • Inability to identify small duplications and deletions 	<ul style="list-style-type: none"> • Low sensitivity for mosaic cultures • Cannot detect polyploidy 	<ul style="list-style-type: none"> • Low sensitivity for mosaic cultures 	<ul style="list-style-type: none"> • Very expensive 	<ul style="list-style-type: none"> • Sex chromosomes are not readily analyzed • Low sensitivity for mosaic cultures



- Τεχνική ειδικών στόχων
- Ανίχνευση γενετικών ανωμαλιών σε υλικό αρχείου
- Ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση
- Αξιοπιστία-μικρό κόστος
- Γρήγορο αποτέλεσμα
- Καλύτερη διακριτική ικανότητα

FISH (Fluorescence In Situ hybridization)

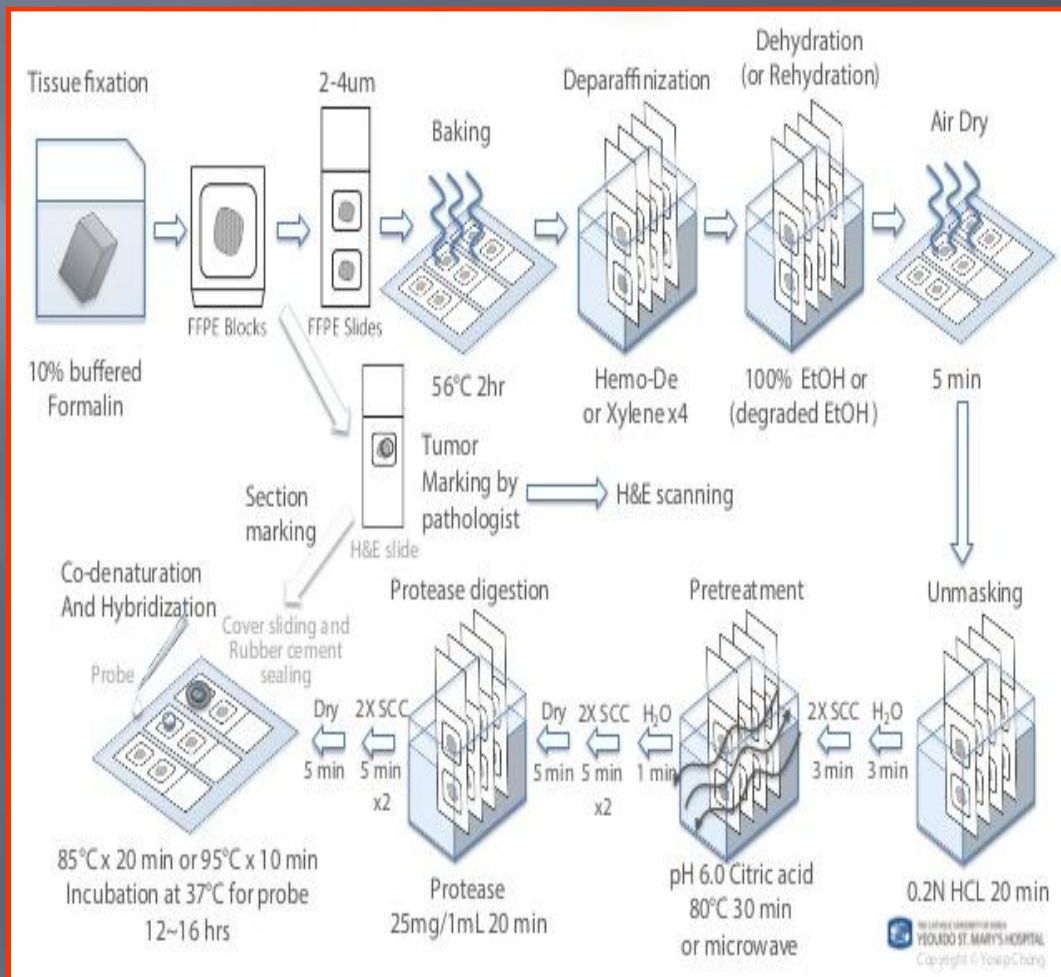
ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ



- ✓ Επιλογή ανιχνευτή (αλληλουχία DNA) με φθοριόχρωμα (πράσινο /κόκκινο) } probe
- ✓ Ταυτόχρονη αποδιάταξη / υβριδισμός δείγματος /probe
- ✓ Παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού
- ✓ Μέτρηση και αξιολόγηση σήματος

ΒΗΜΑΤΑ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ FISH

- ✓ Επιλογή υλικού βιοψίας
- ✓ Επίστρωση τομών
- ✓ Αποπαραφίνωση
- ✓ Προεργασία
- ✓ Ενζυμική μεταχείριση
- ✓ Αποδιάταξη probe/ιστού
- ✓ Υβριδισμός
- ✓ Εκπλύσεις
- ✓ Μικροσκοπική παρατήρηση
- ✓ Μέτρηση σημάτων υβριδισμού / εκτίμηση



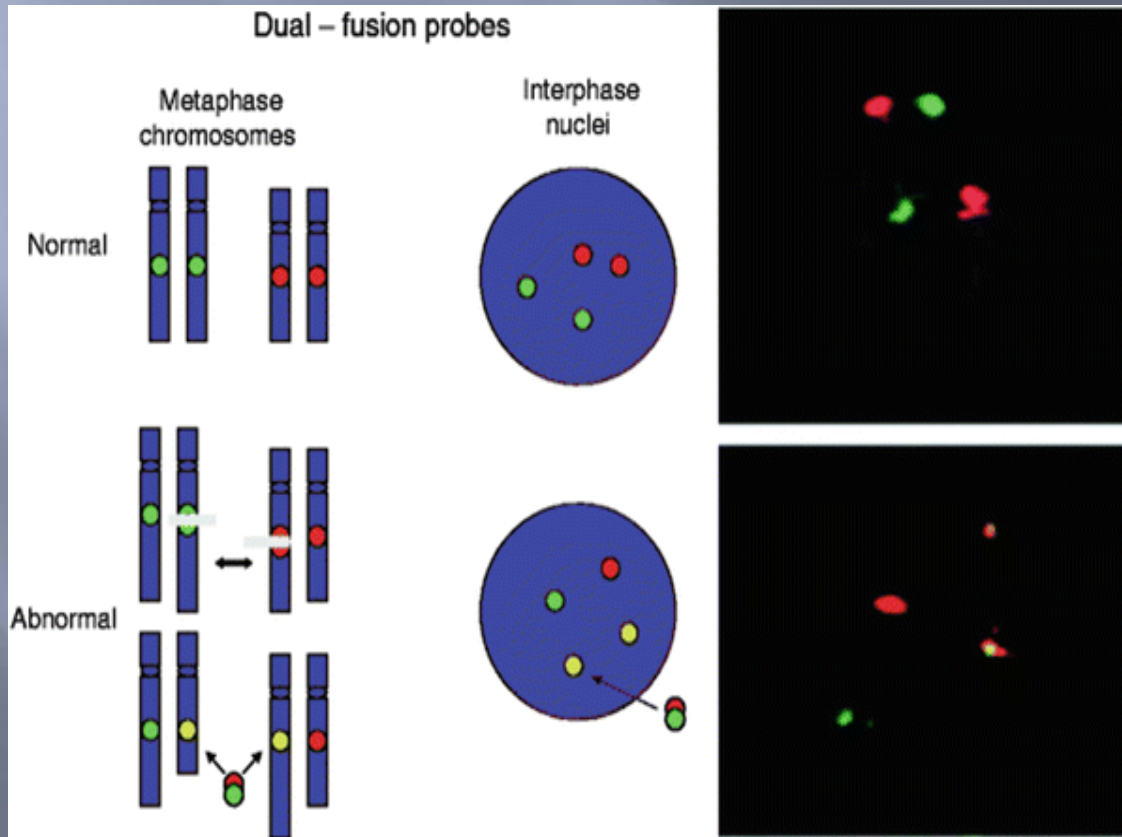


ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΑΚΤΙΚΗ

FISH- επιλογή ιχνηθετών

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΧΙΜΑΙΡΙΚΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ

Ι.δύο γονίδια καθένα σημασμένο με ένα φθοριόχρωμα



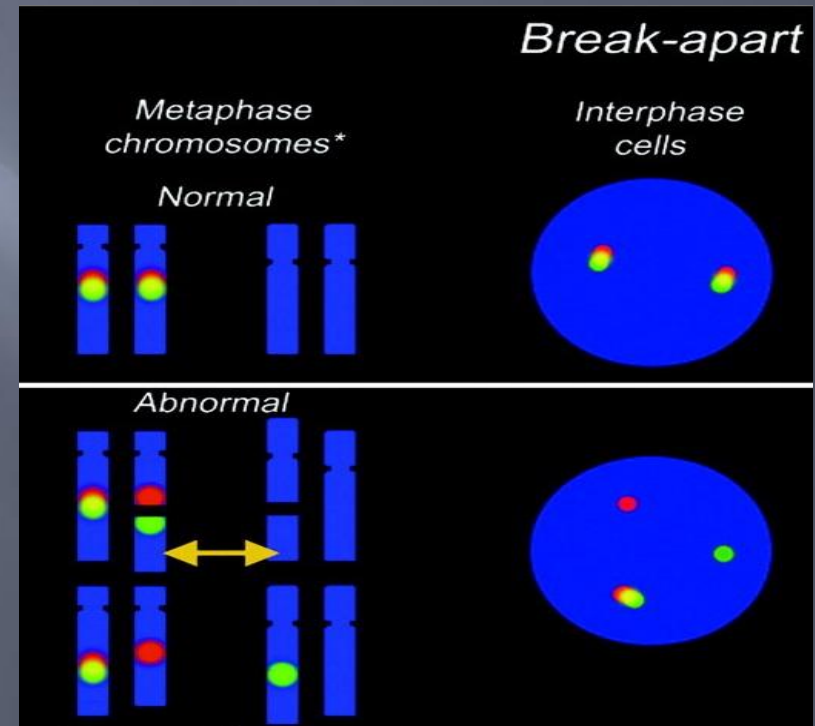
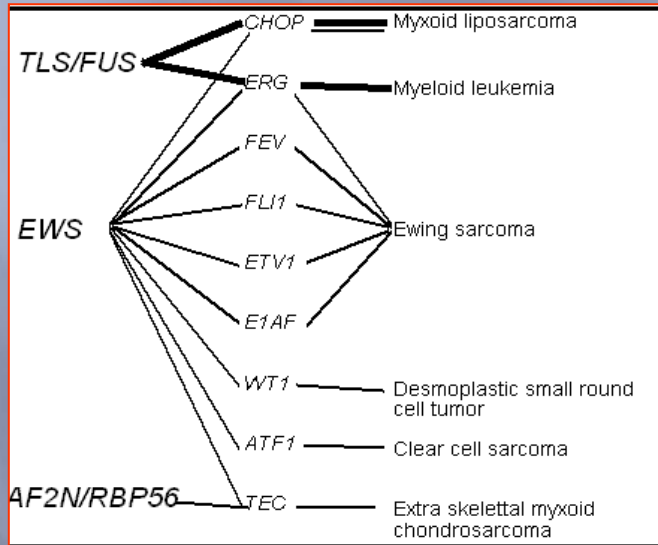
FUSION σήμα
χιμαιρικό γονίδιο



ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΑΚΤΙΚΗ

FISH- επιλογή ιχνηθετών

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΑΔΙΑΤΑΓΜΕΝΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ
II. το ίδιο γονίδιο σημασμένο με δύο φθοριοχρώματα

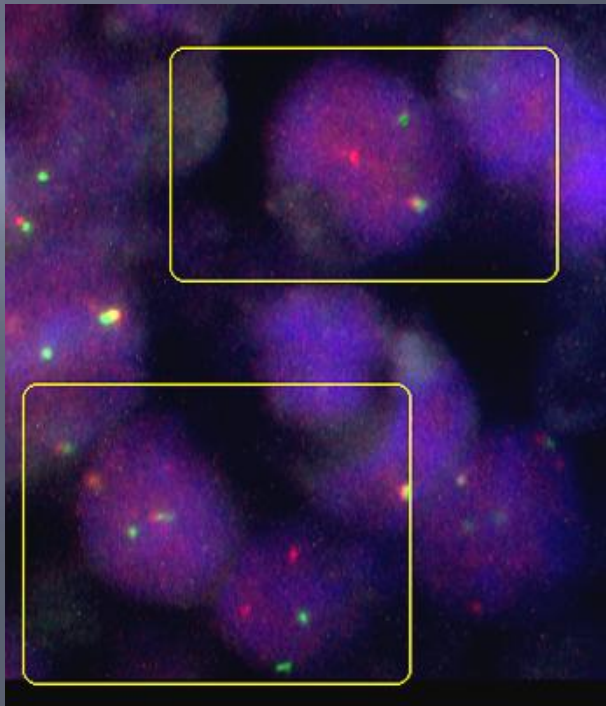
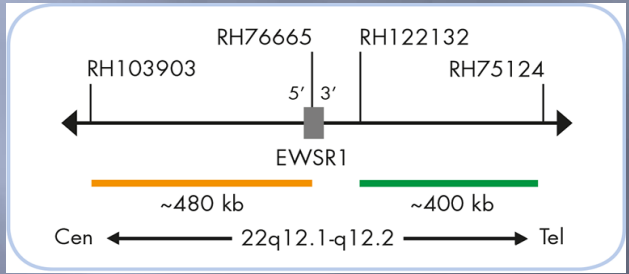


BRAKE APART σήμα
αναδιαταγμένο γονίδιο



ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΑΚΤΙΚΗ - FISH

Διάγνωση Ewing σαρκώματος αναδιάταξη γονιδίου *ews* με σήμα **Break apart**

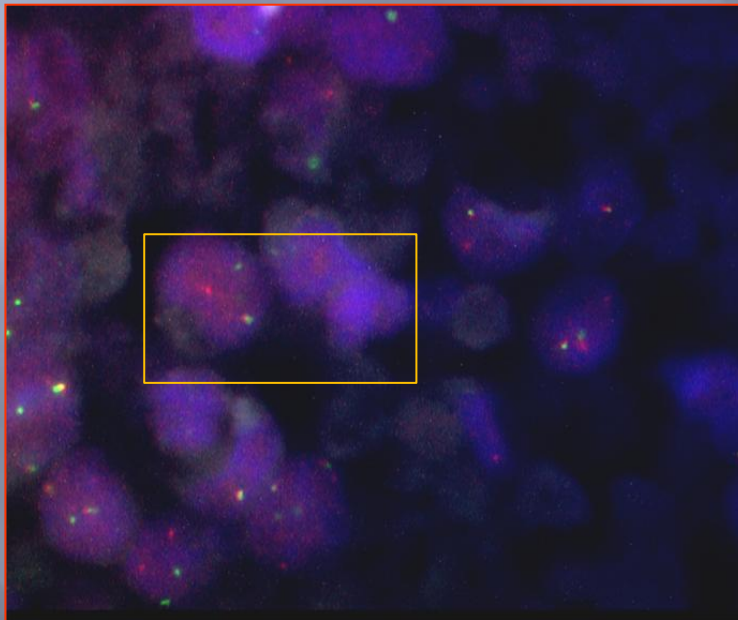
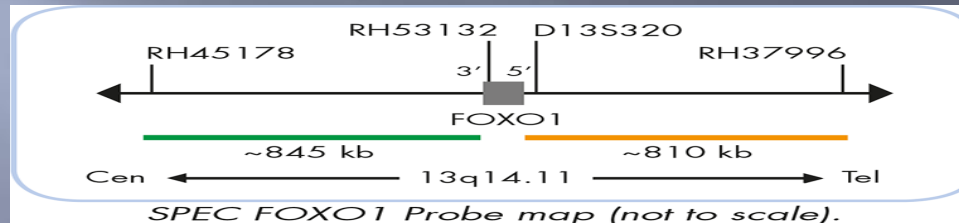


ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

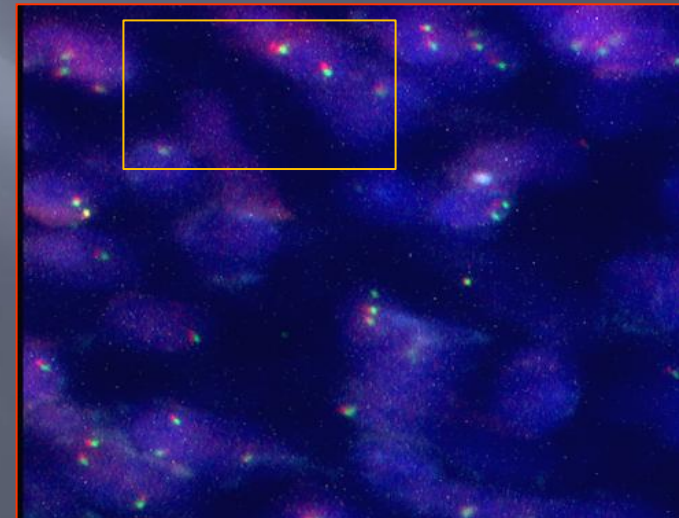


ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΑΚΤΙΚΗ - FISH

Διάγνωση Ραβδομυοσαρκώματος



Σήμα **break apart**
ανώμαλο

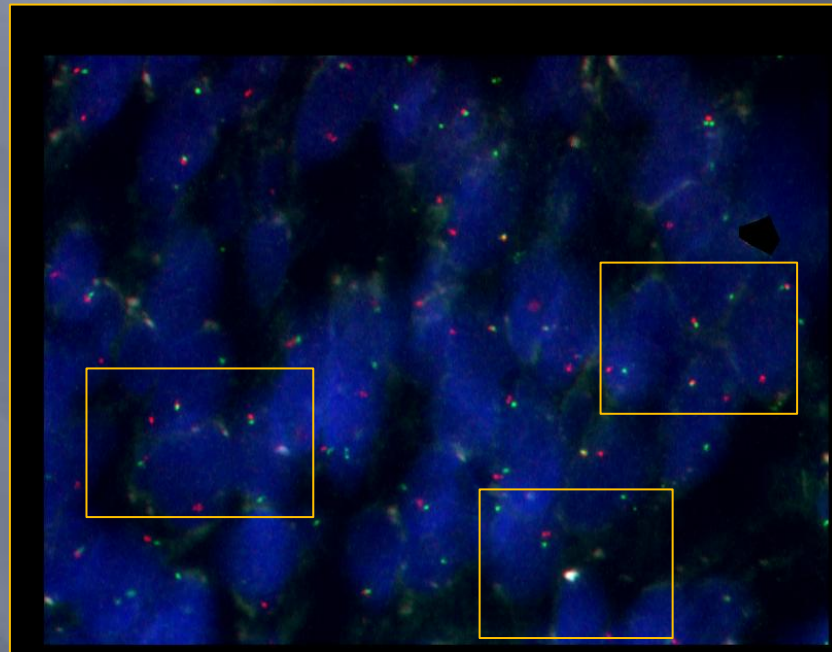
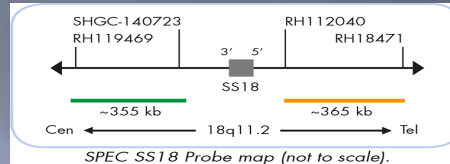


Σήμα **fusion**
ομαλό



ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΑΚΤΙΚΗ - FISH

Διάγνωση συνοβιοσαρκώματος



Σήμα **break apart** ανώμαλο

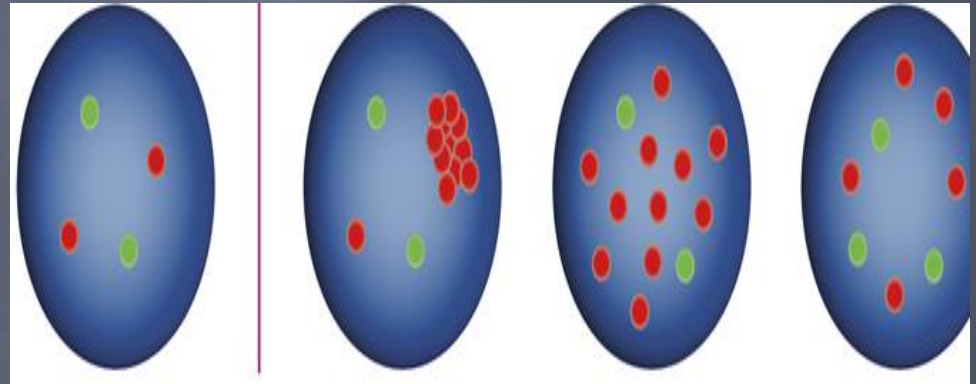
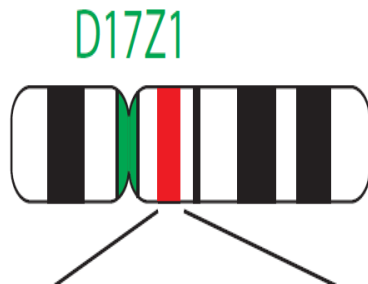


ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΑΚΤΙΚΗ

FISH- επιλογή ιχνηθετών

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΠΕΚΤΑΣΗΣ

III. **γονίδιο** και **control** καθένα σημασμένο με διαφορετικό φθοριόχρωμα

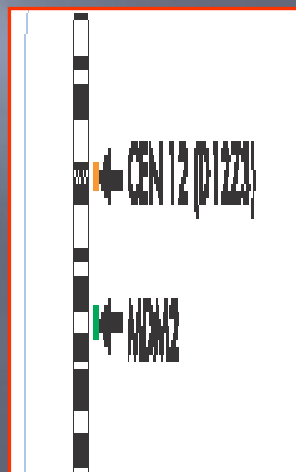
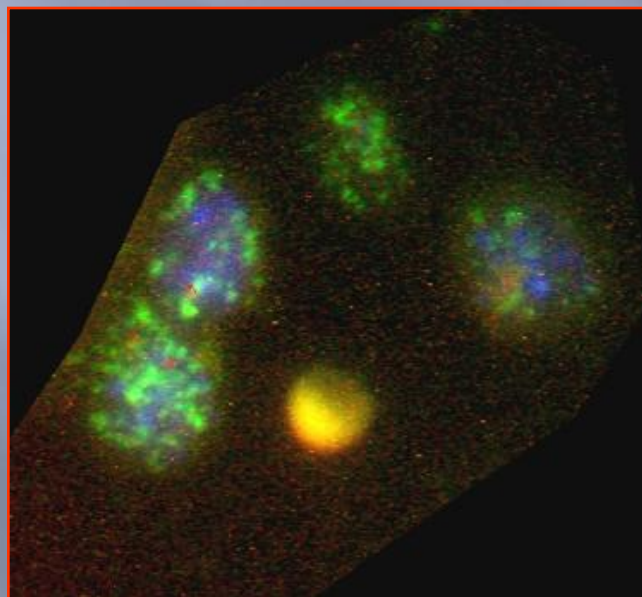


πυρήνες με πολλαπλά **σήματα**
για το amplified γονίδιο

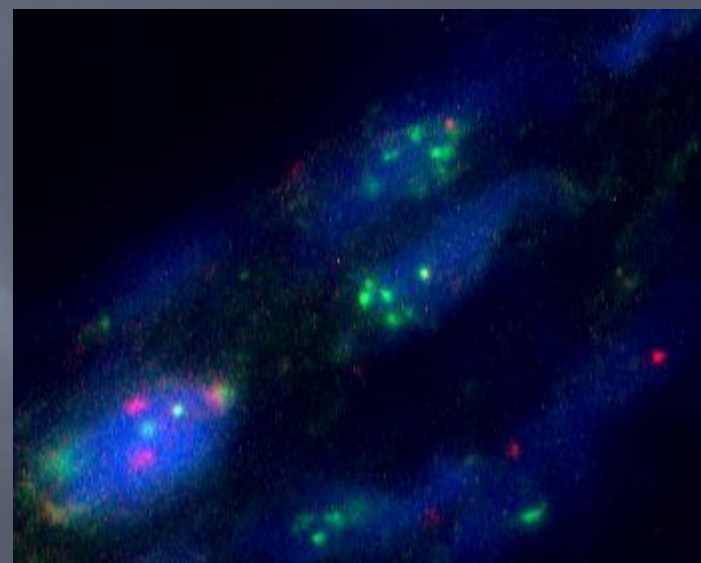
ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΑΚΤΙΚΗ - FISH

καλά διαφοροποιημένου Λιποσαρκώματος
γονιδιακή επέκταση *MDM2* /control

μεγάλου βαθμού



μέτριου βαθμού



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ



➤ Διάγνωση/διαφορική διάγνωση

FUS-CHOP/ t(12;16)(q13;p11)	μυξοειδές λιποσάρκωμα
SS18/SSX2 t(X;18)(p11.2;q11.2)	Συνοβιοσάρκωμα
EWS/FLI t(11;22)(q24;q12)	Διαχωρισμός
EWS/ERG t(21;22)(q22;q12)	μικροστρογγυλοκυτταρικών
	(EWING – μελάνωμα)
PAX7-FOXO1 t(2;13)(q35.2;q14)	ραβδομυοσάρκωμα
PAX3-FOXO1 t(1;13)(p36;q14)	ραβδομυοσάρκωμα
12q13-15 Amplification	(Διαφοροποιημένο
MDM2, CDK4	Λιποσάρκωμα - λίπωμα)

ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΑΚΤΙΚΗ

➤ πρόγνωση

✓ *Απουσία μεταθέσεων καλύτερη πρόγνωση*

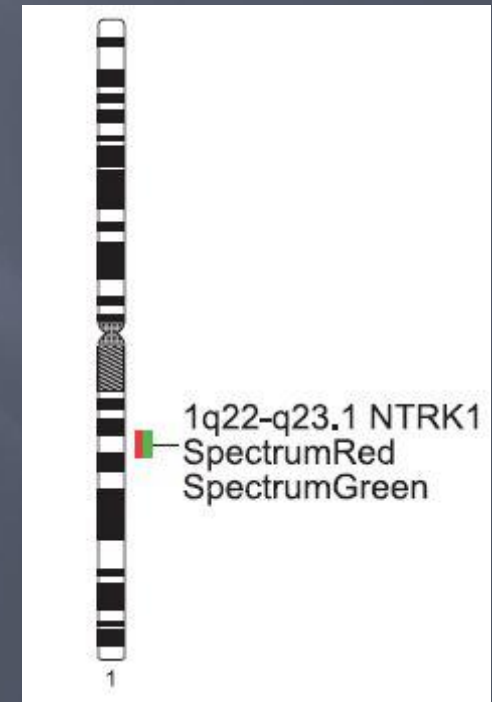
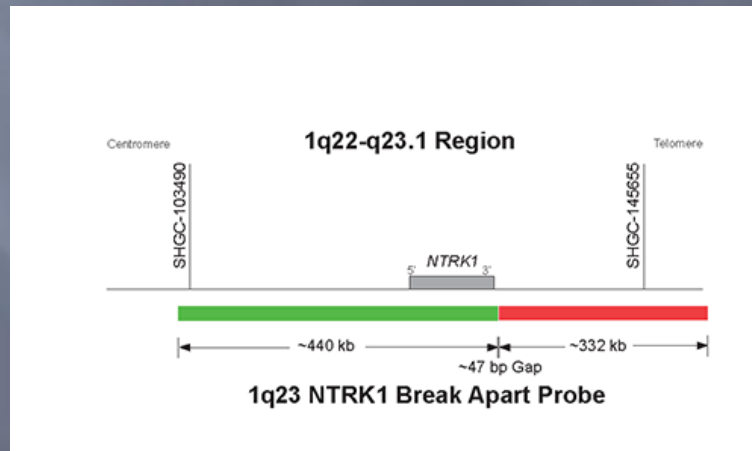
✓ *ΚΥΨΕΛΙΔΙΚΟ ΡΑΒΔΟΜΥΟΣΑΡΚΩΜΑ*

PAX7-FOXO1 t(2;13)(q35.2;q14) καλύτερη πρόγνωση

PAX3-FOXO1 t(1;13)(p36;q14)

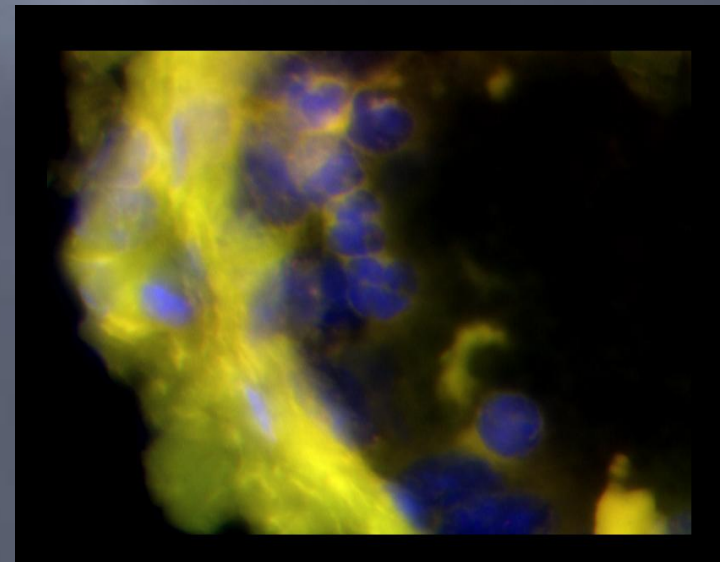
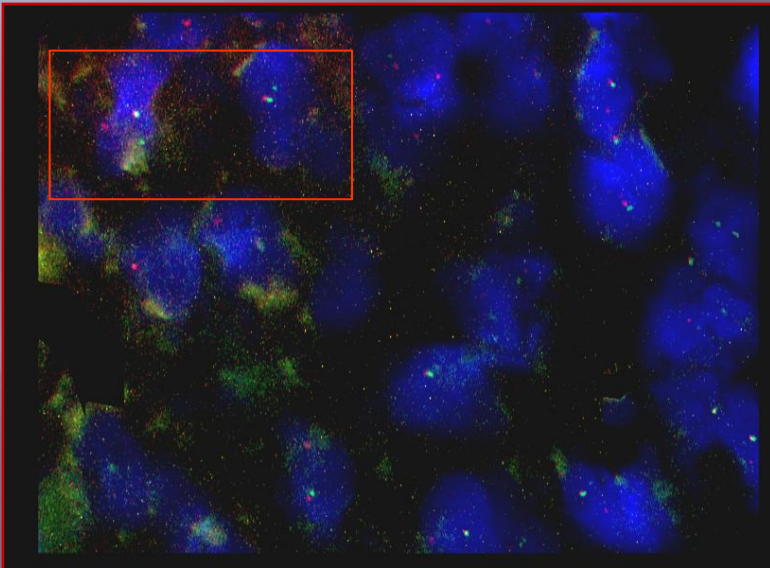
➤ Θεραπευτική προσέγγιση

✓ *Δημιουργία κατάλληλων αναστολέων*



ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ FISH

- *Καταλληλότητα υλικού*
- *Συνεργασία*
- *Κατώτατο όριο (threshold) θετικών τιμών.*
- *Ερμηνεία σημάτων υβριδισμού*



FISH 4ετία

- 190 εξετασθέντα σαρκώματα
- Παθολογοανατομικά εργαστήρια
- Κυρίως break-apart ή ampli ιχνηθέτες
- Κυρίως σαρκώματα Ewing
- Συνδυασμός με NGS (11/2019)

ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ 10ετία

- >100 εξετασθέντα σαρκώματα
- Χειρουργείο
- Συνδυασμός με mfish & mbandfish



Test Definition: MDM2F

MDM2 (12q15) Amp, FISH, Ts

Submit only 1 of the following specimens:

Specimen Type: Tissue

Preferred: Tissue block

Collection Instructions: Submit a formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tumor tissue block. Blocks prepared with alternative fixation methods may be acceptable; provide fixation method used.

Acceptable: Slides

Collection Instructions: Four consecutive, unstained, 5 micron-thick sections placed on positively charged slides, and 1 hematoxylin and eosin-stained slide.

Forms

[If not ordering electronically, complete, print, and send 1 of the following forms with the specimen:](#)

-[Oncology Test Request \(T729\)](#)

-[Cardiovascular Test Request \(T724\)](#)

Reject Due To

All specimens will be evaluated at Mayo Clinic Laboratories for test suitability.

Specimen Minimum Volume

Two consecutive, unstained, 5- micron-thick sections placed on positively charged slides and 1 hematoxylin and eosin-stained slide.

Specimen Stability Information

Specimen Type	Temperature	Time	Special Container
Tissue	Ambient (preferred)		
	Refrigerated		



Test Definition: EWSF

EWSR1 (22q12), FISH, Ts

Overview

Useful For

Supporting the diagnosis of Ewing sarcoma (EWS)/primitive neuroectodermal tumor, myxoid chondrosarcoma, desmoplastic small, round cell tumor, clear cell sarcoma, and myxoid liposarcoma when used in conjunction with an anatomic pathology consultation

An aid in the diagnosis of EWS when reverse transcriptase-polymerase chain reaction results are equivocal or do not support the clinical picture

Testing Algorithm

This test does not include a pathology consult. If a pathology consultation is requested, PATHC / Pathology Consultation should be ordered and the appropriate fluorescence in situ hybridization (FISH) test will be ordered and performed at additional charge.

This test includes a charge for application of the first probe set (2 FISH probes) and professional interpretation of results.

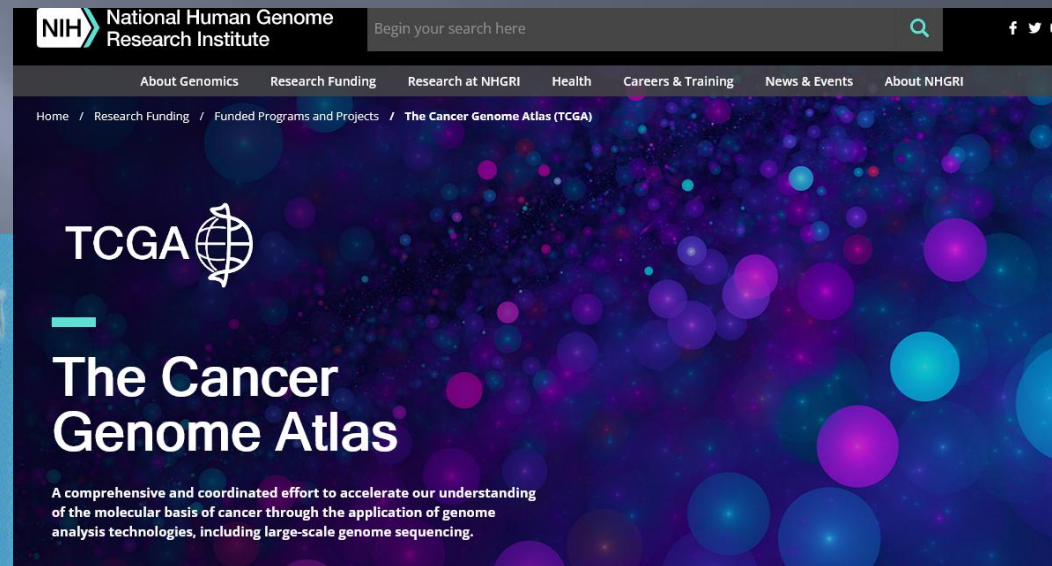
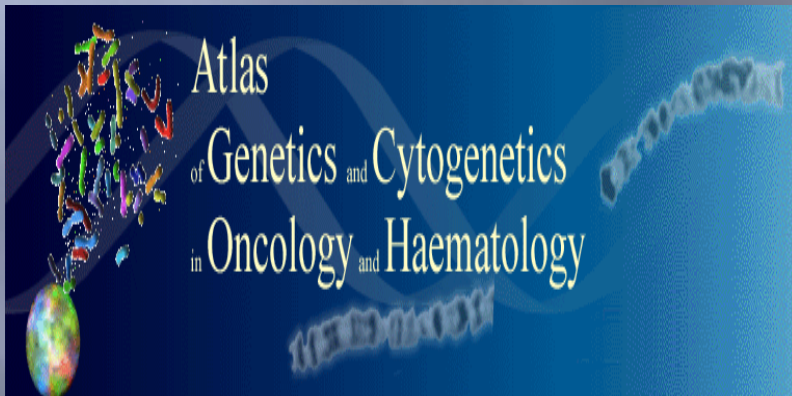
Additional charges will be incurred for all reflex probes performed. Analysis charges will be incurred based on the number of cells analyzed per probe set. If no cells are available for analysis, no analysis charges will be incurred.

See the Method Description for specific details.

Reflex Tests

Test Id	Reporting Name	Available Separately	Always Performed
PBCT	Probe, +2	No	No
PADP	Probe, +1	No	No

ΒΑΣΕΙΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ



ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΑΞΙΟΠΙΣΤΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ



- ✓ Θεσμικό πλαίσιο για την ειδικότητα της εργαστηριακής γενετικής
- ✓ διαπιστευμένες διαδικασίες
- ✓ διεργαστηριακοί έλεγχοι
- ✓ εξειδικευμένο τεχνολογικό και επιστημονικό προσωπικό
- ✓ συνεργασία και επικοινωνία

§

ΣΥΝΟΨΗ



- ✓ Διαγνωστικοί δείκτες σαρκωμάτων **χιμαιρικά γονίδια/χρωμοσωμικές μεταθέσεις & γονιδιακές ενισχύσεις/πλεονασμα χρωμ. υλικού**
- ✓ FISH για την ανίχνευσή τους
- ✓ Συνδυασμός κυτταρογενετικών-μοριακών τεχνικών
- ✓ Συνεργασία Κλινικής , Παθολογοανατομικού και Εργαστηρίου Γενετικής
- ✓ Προσπάθεια εύρεσης επιπλέον γενετικών δεικτών – θεραπευτικών στόχων



Ευχαριστώ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ CGH

