

Laboratoř molekulární patologie

Ústav patologie FN Brno

Prof. RNDr. Jana Šmardová, CSc.

19.11.2014

Složení laboratoře

stálí členové

- Prof. RNDr. Jana Šmardová, CSc.
- Mgr. Květa Lišková
- Mgr. Lenka Pitrová
- Bc. Miluška Svitáková
- lab. Renata Hrabálková

studenti

- Mgr. Lenka Pitrová (disertační práce, DSP, PŘF - 5. ročník)
- Mgr. Eva Kabáthová (disertační práce, DSP, PŘF - 2. ročník)
- Bc. Johana Plch (diplomová práce, MS PŘF - 3. ročník)

Přehled činnosti

1. rutinní analýzy
2. výuka
3. výzkumná činnost

1. Rutinní analýzy

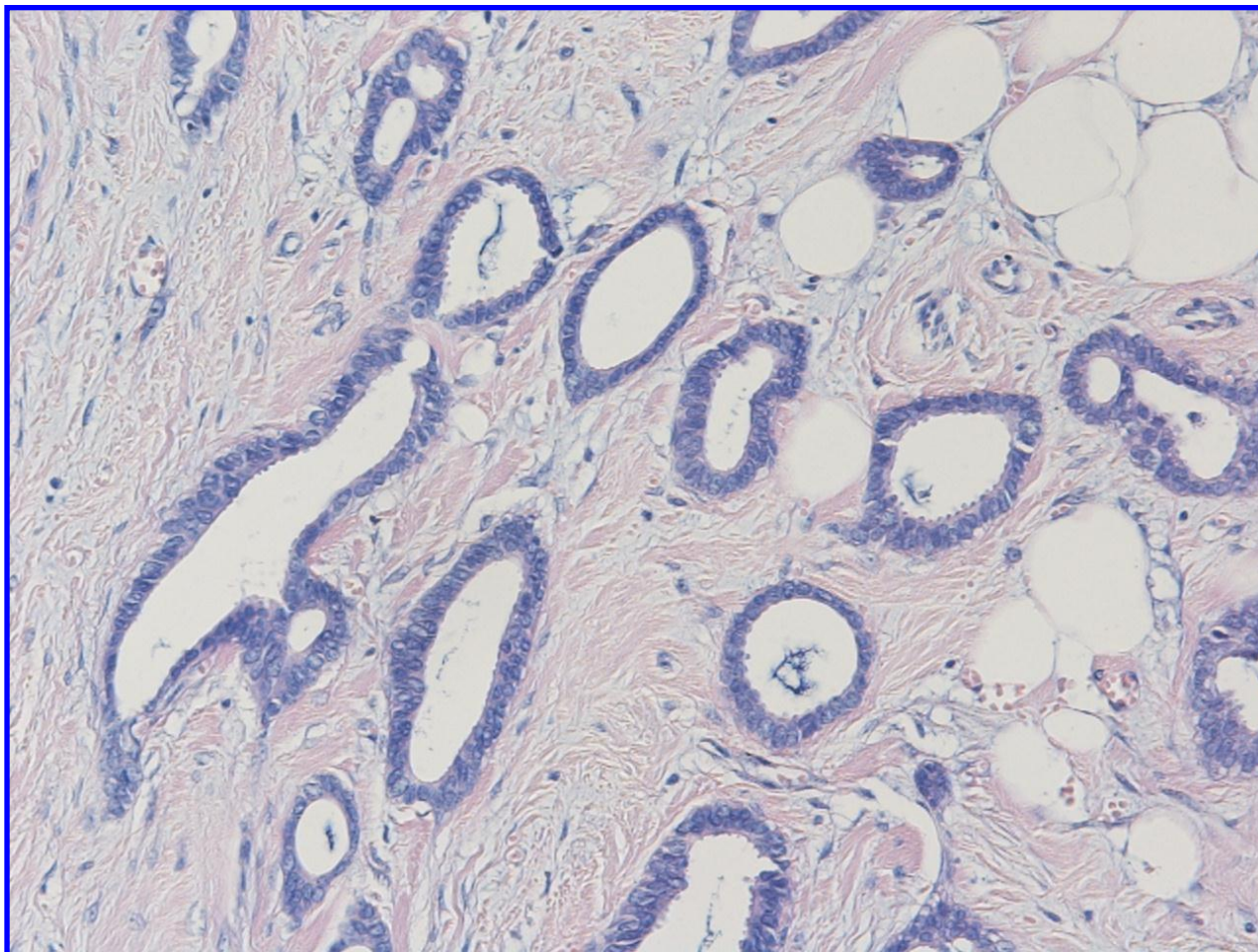
Místo molekulárně biologických metod v patologii:

Schéma diagnostického postupu

Tab. 3.4 Schématické znázornění diagnostického postupu

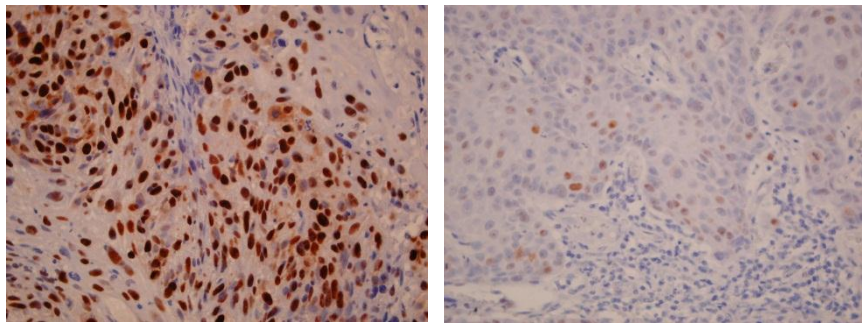
1. Diagnostický krok			
Panleukocytární marker CD45	+	-	-
Cytokeratiny AE1/AE3,CAM5.2	-	+	-
Vimentin	-/+	-/+	+/-
Závěr 1. Kroku	Lymfom	Karcinom	Sarkom
2. Diagnostický krok u lymfomů			
Blížší určení lymfomu, znázorněno základní odlišení, po něm pak následuje klasifikační postup dle WHO doporučení			
B-lymfom	CD20,CD79a, imunoglobuliny (CD21,CD22, CD23 a další markery k jednotkovému zařazení)		
T-lymfom	CD3, CD45RO, CD7,CD8 (další markery k jednotkovému zařazení)		
Velkobuněčný T/null cell anaplastický lymfom, Hodgkinova choroba, Lymfomatoidní papulóza	CD30 (k rozlišení slouží další upřesňující markery)		
Proliferační frakce	Ki-67		
2. Diagnostický krok u karcinomů			
Po následují další cytochemické reakce s cílem určit výchozí tkáň			
Karcinom s pozitivitou CAM5.2,AE1/AE3 (neplatí pro adrenokortikální a hepatocelulární karcinom)	průkaz jednoduchých se žlaznatým epitelem asociovaných keratinů 8 + 18 a nebo keratinů asociovaných s dlaždicobuněčným karcinomem, další cytokeratiny		
2. Diagnostický krok u sarkomů			
Po něm následují také případné další reakce.			
S-100+	melanom, Schwannom, liposarkom, chondrosarkom,		
desmin+	leiomyosarkom, rabdomyosarkom,		
Neurofilamenta+ synaptofysin +	neuroblastom, paragangliom, gangliocytom		
další markery	další sarkomy		

Základní vyšetřovací metody v patologii: morfologické vyšetření

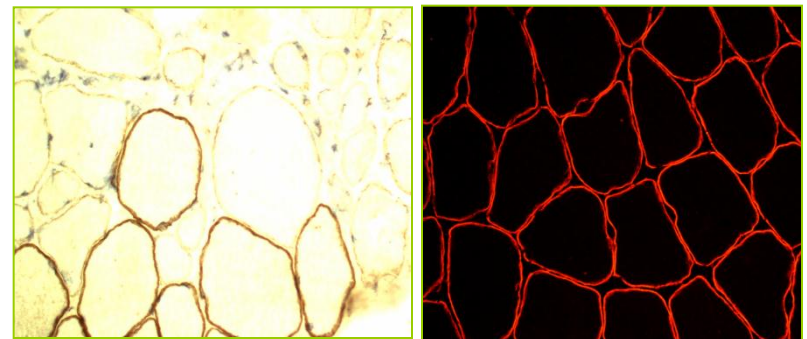


Základní vyšetřovací metody v patologii: Imunohistochemická analýza

- přítomnost a hladina proteinu
- lokalizace proteinu v buňce (jádro, cytoplazma, vazba na membránu, ...)
- počet/podíl pozitivních buněk
- výchozí materiál: formol-parafinový bloček



nádorový supresor **p53**



svalový protein **dystrophin**

Přehled rutinních analýz

1. fluorescenční hybridizace *in situ* - FISH
2. určení klonality B- a T-receptorů lymfocytů (PCR)
3. imunobloting
4. funkční analýza p53

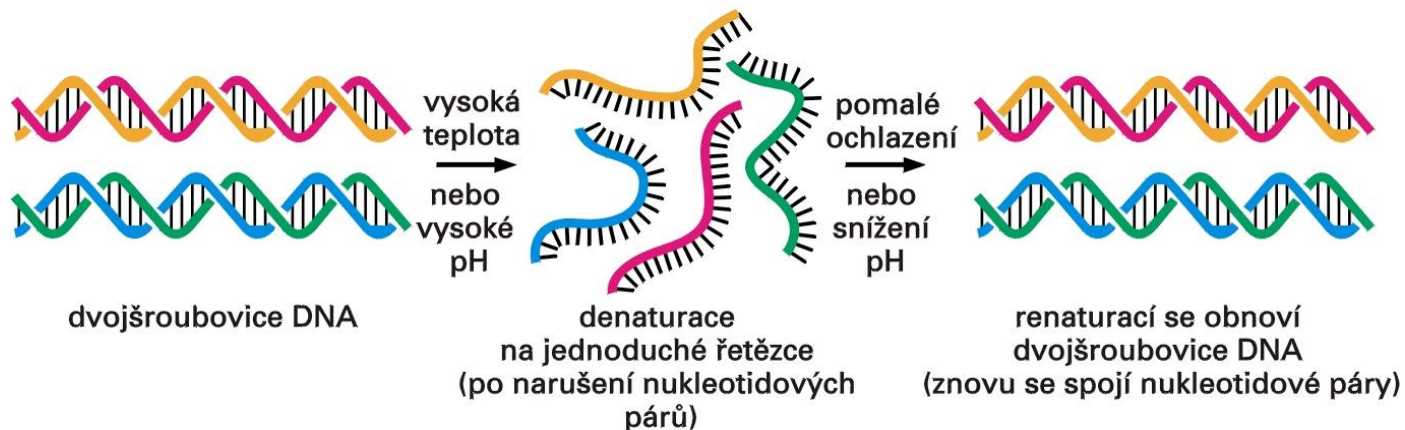
Účel analýz

- diagnostický
- prognostický
- prediktivní

1. Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

Hybridizace

- tvorba dvouřetězcových hybridů ze dvou jednořetězcových a komplementárních molekul nukleových kyselin
- založena na schopnosti **denaturace a renaturace** DNA

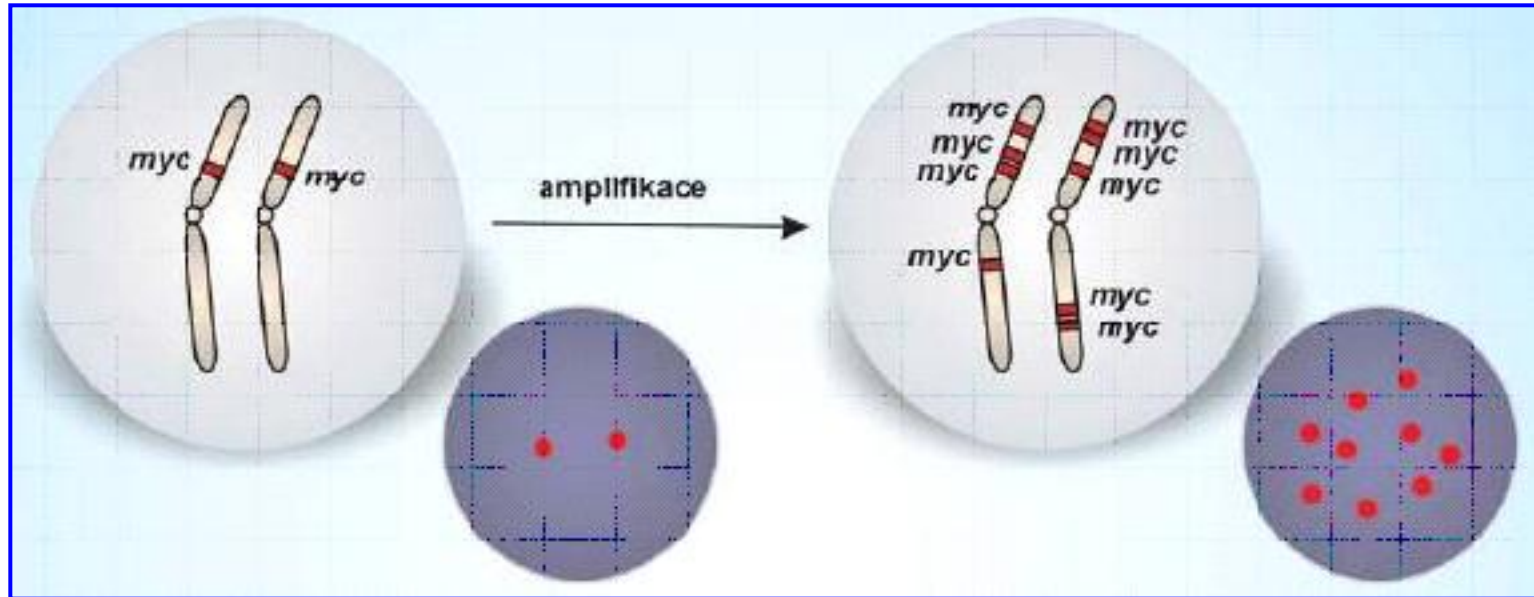


Fluorescenční hybridizace *in situ* FISH

Detekce DNA nebo RNA v intaktních buňkách radioaktivními nebo fluorescenčními sondami.

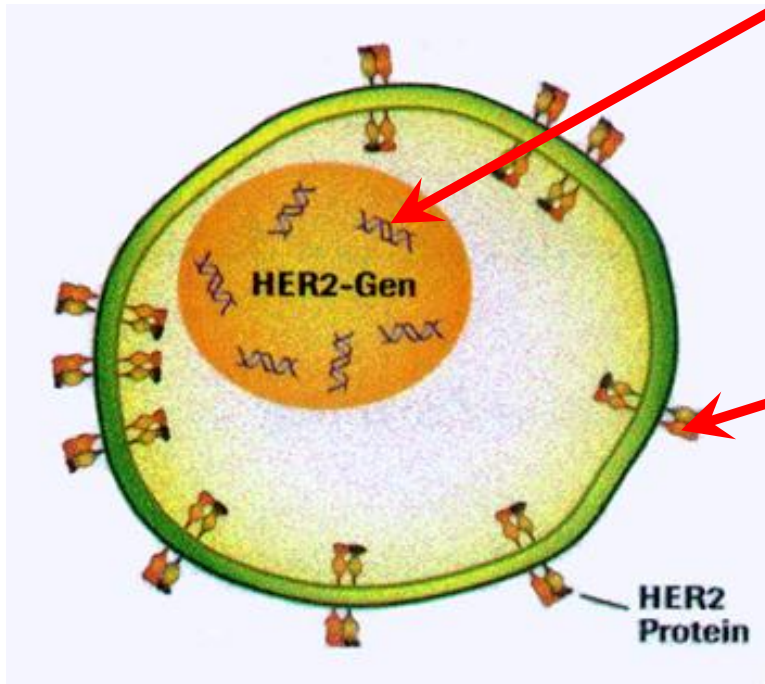


FISH 1: Detekce amplifikace genů

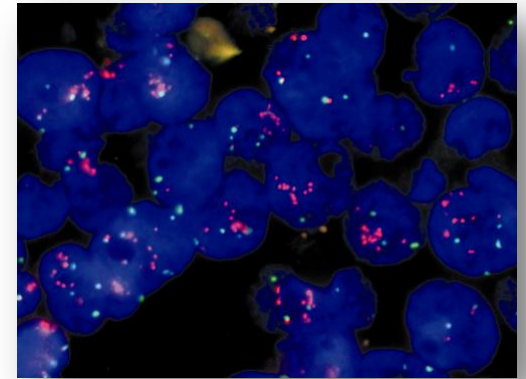


- Sonda specifická pro sledovaný gen a centromeru daného chromozomu.
- Určuje se počet / poměr signálů sledovaného genu a signálů odpovídajících počtu centromer = chromozomů.
- Např. amplifikace genu **N-myc** u neuroblastomů nebo genu **c-erbB2 (HER2/neu)** u nádorů prsu.

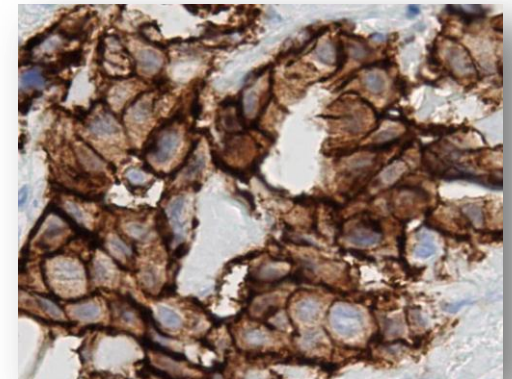
Analýza amplifikace genu *HER2/neu*



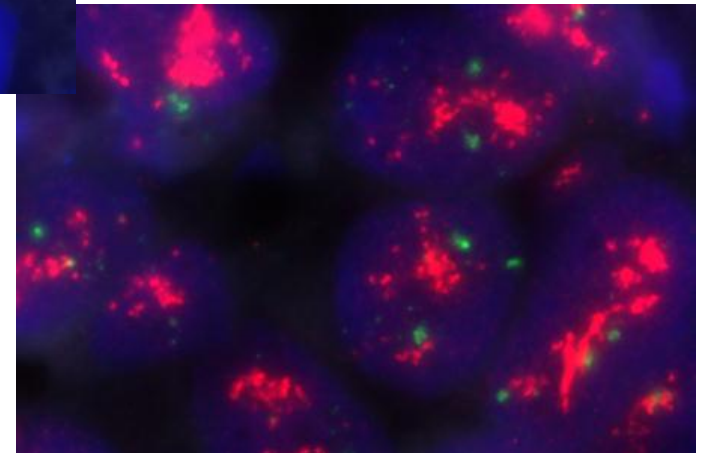
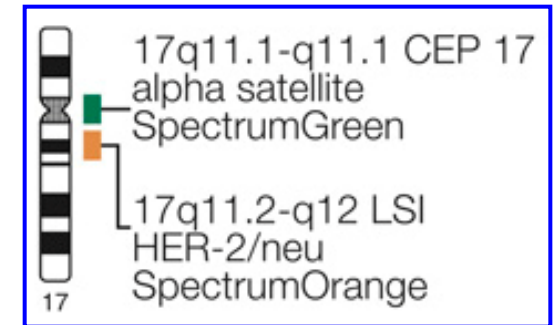
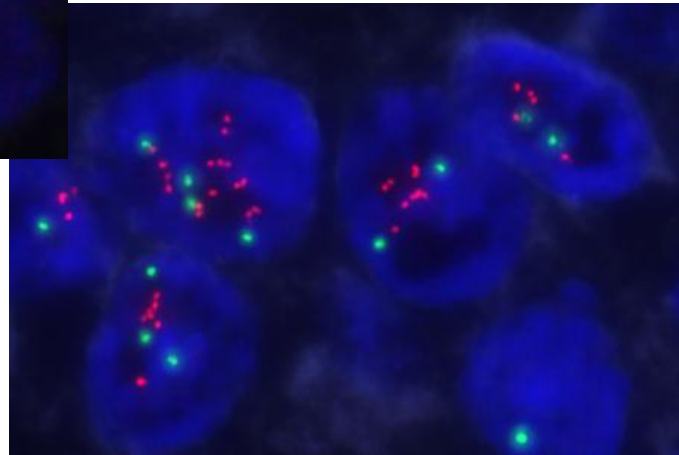
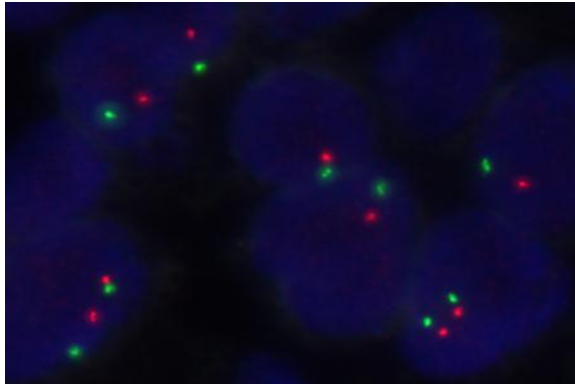
FISH



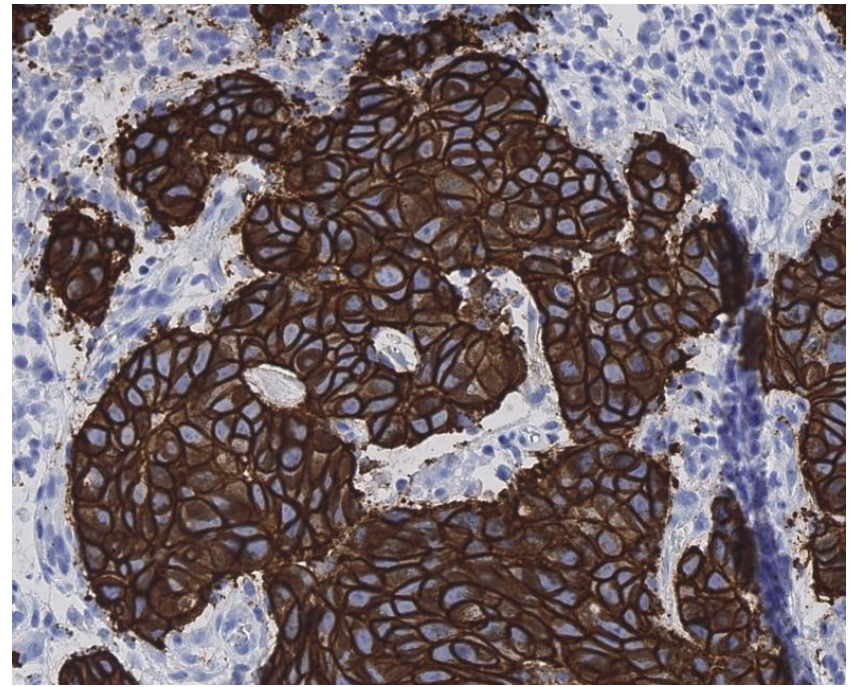
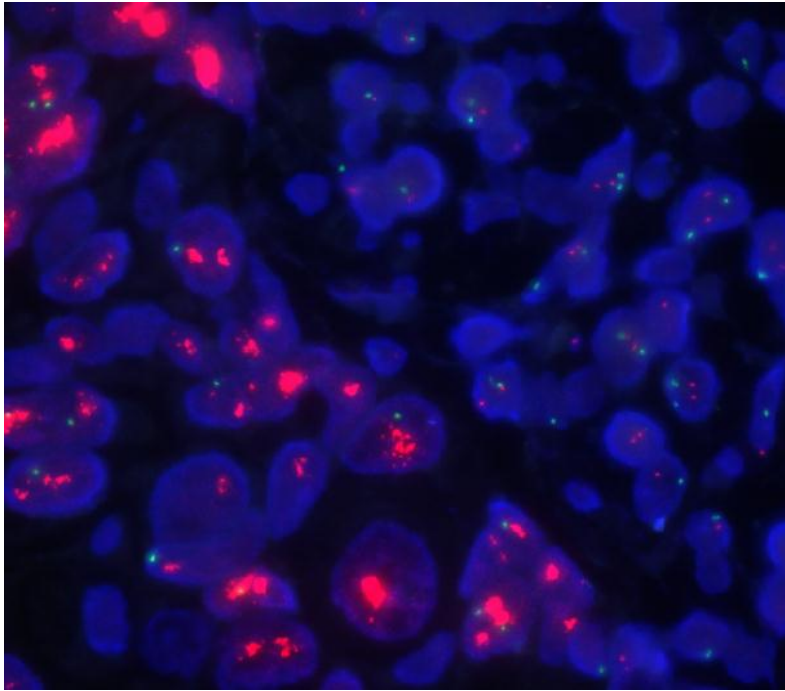
IHC



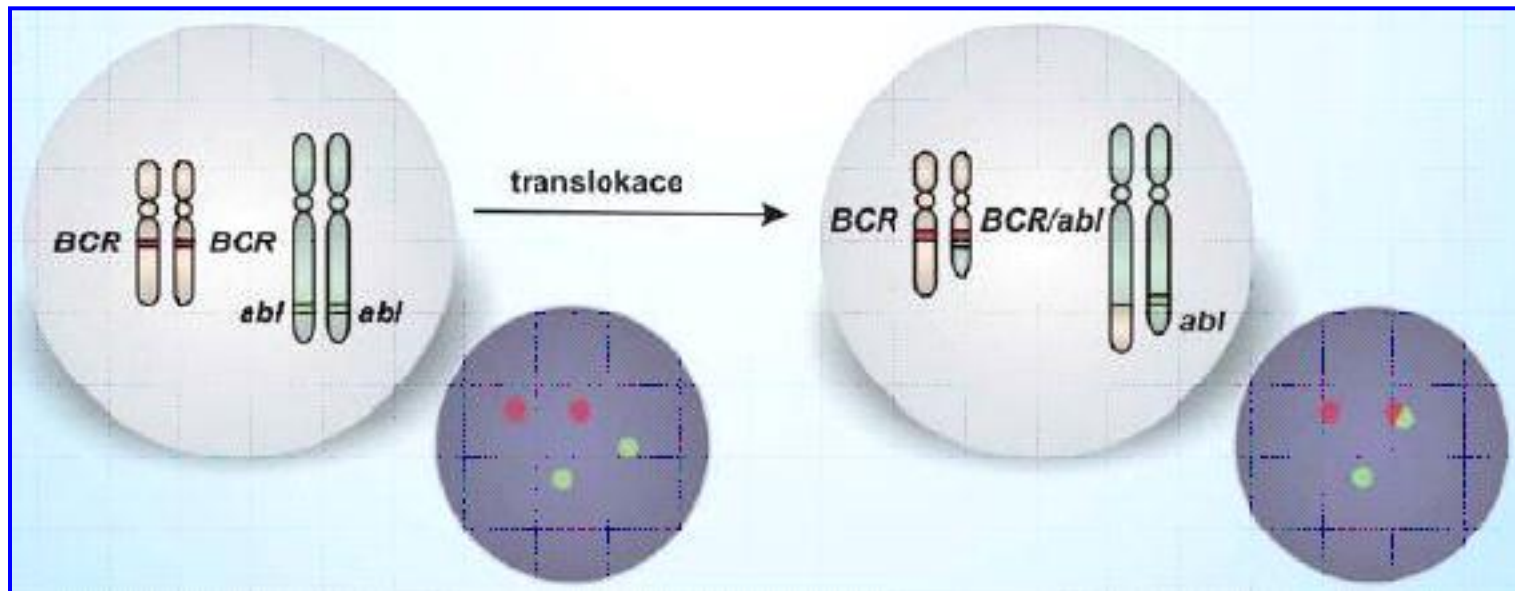
Analýza amplifikace genu *HER2/neu*



Analýza amplifikace (FISH) a exprese genu *HER2* (IHC)



FISH 2: Detekce translokace chromozomů



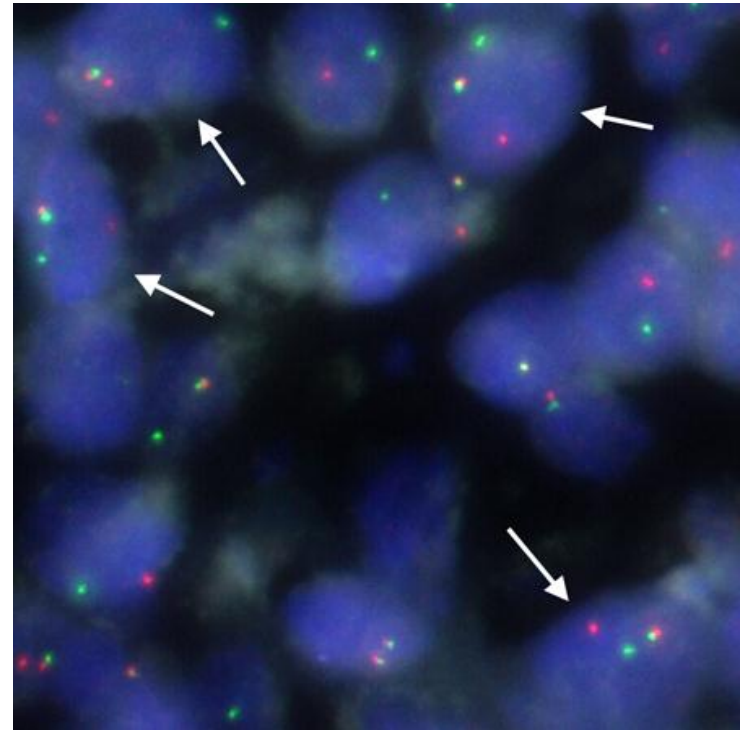
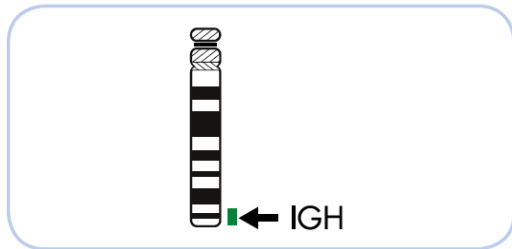
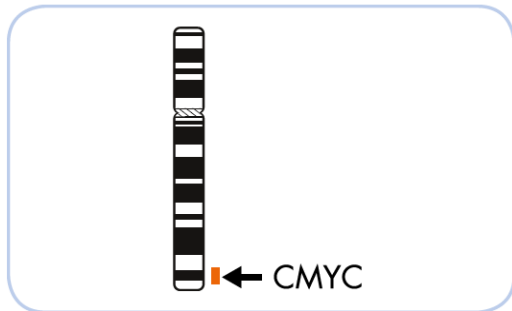
- Pro detekci se použijí dvě sondy značené odlišnými fluorescenčními barvami. Každá sonda se váže k sekvenci jednoho z genů.
- Pokud je přítomný fúzní gen, vznikne směsný signál v důsledku fluorescence sond navázaných v těsném sousedství.
- Většinou je translokována pouze jedna alela, proto lze vedle pozitivního signálu zachytit i samostatné signály obou sond.

Detekce translokace chromozomů

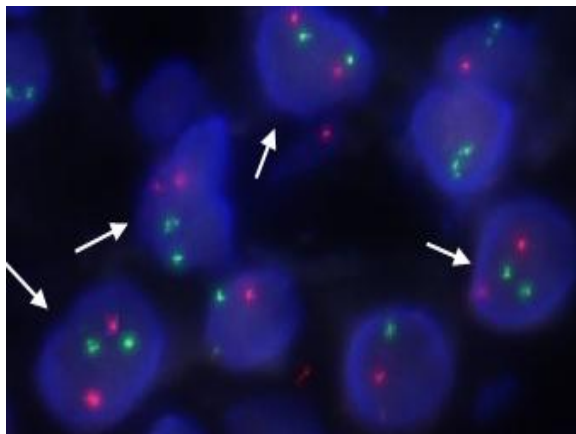
- translokace **t(14;18)** u folikulárního lymfomu (FL)
- translokace **t(8;14)** u Burkittova lymfomu (BL)
- přestavba genu *c-myc* u Burkittova lymfomu (BL)
- translokace **t(11;14)** u lymfomu z buněk plášt'ové zóny (MCL)
- přestavba genu *MALT* u MALT lymfomů
- přestavba genu *ALK* u karcinomů plic
- translokace *ALK/EML4* u karcinomů plic
- ... a další

Detekce translokace t(8;14)

c-myc/IGH

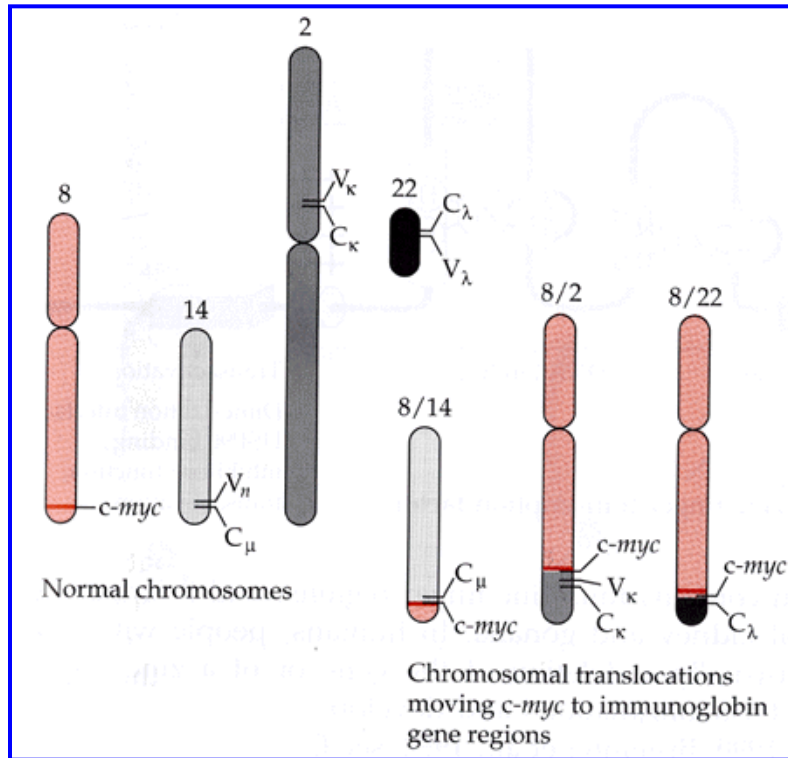


pozitivní jádra



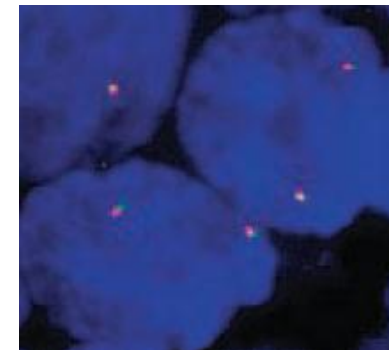
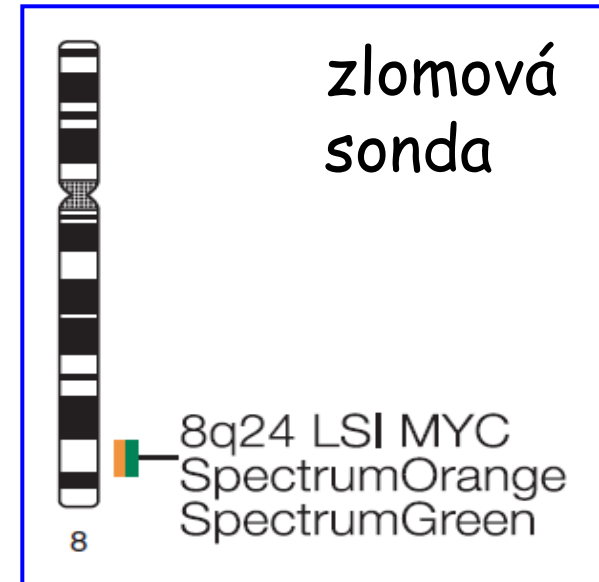
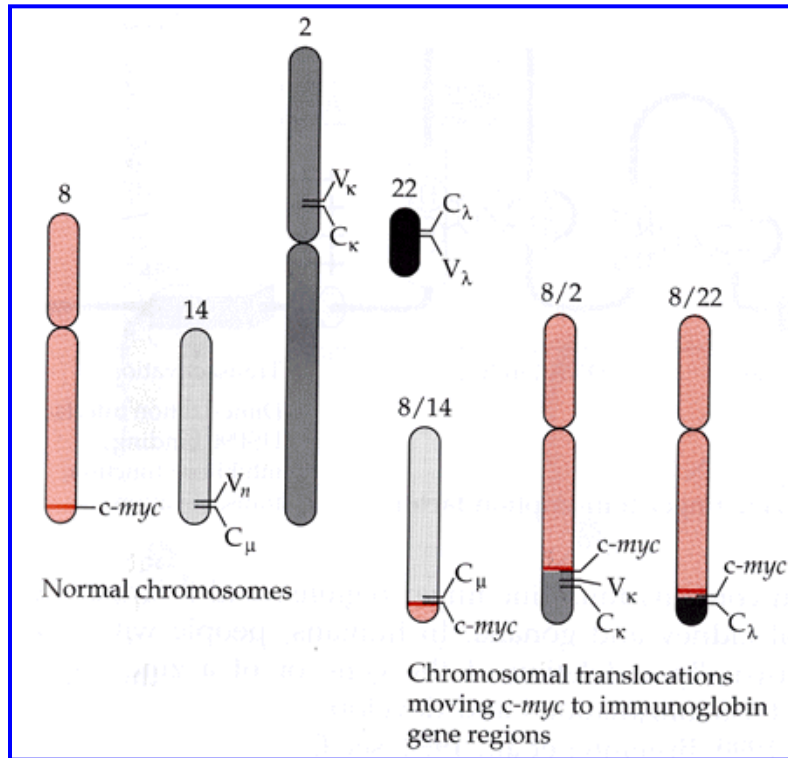
negativní jádra

Detekce přestavby genu *c-myc*



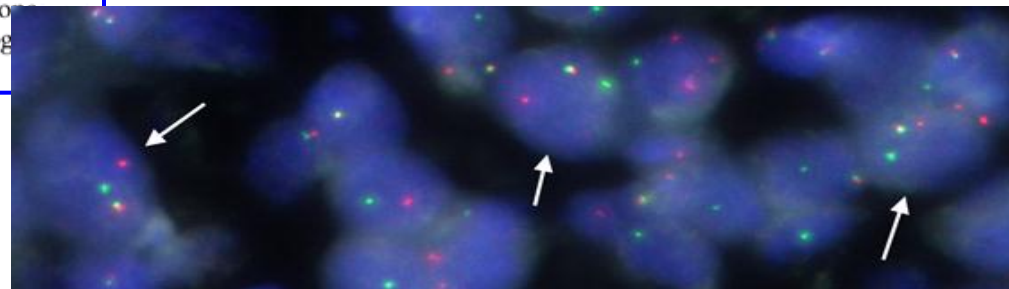
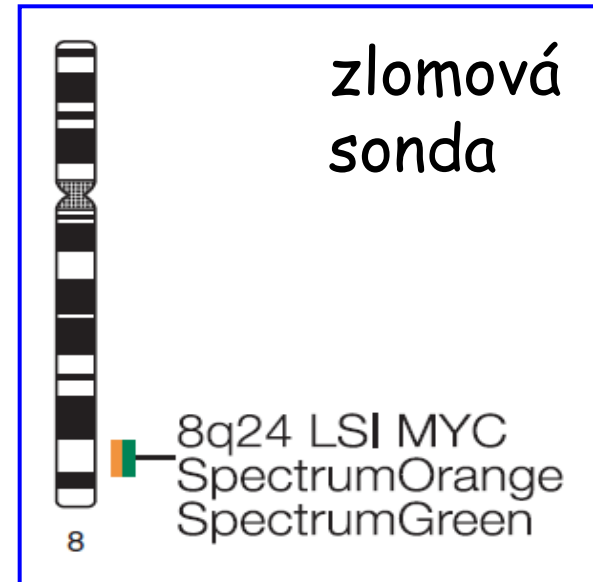
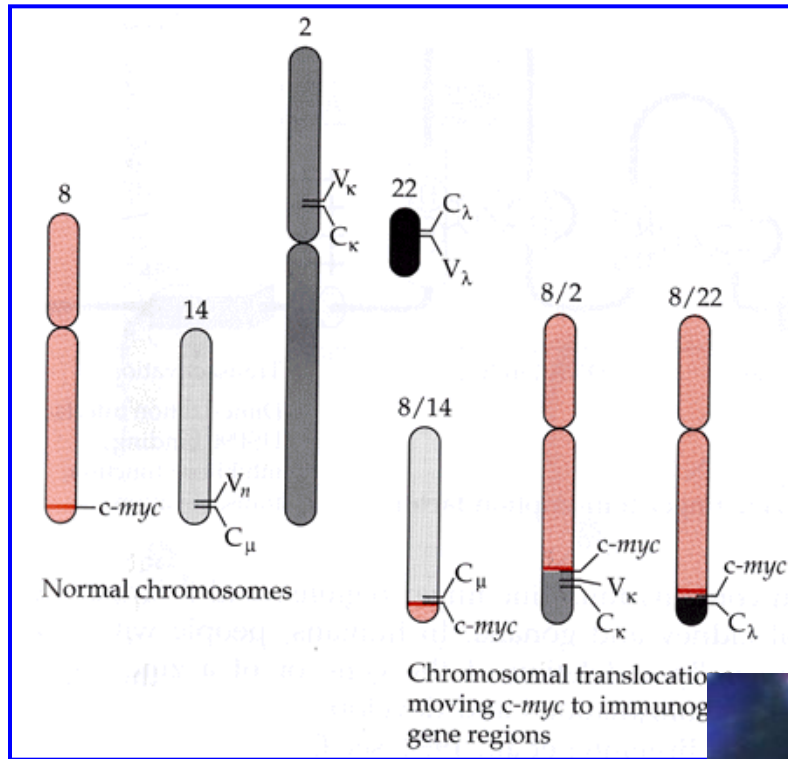
⇒ zlomová sonda

Detekce přestavby genu *c-myc*



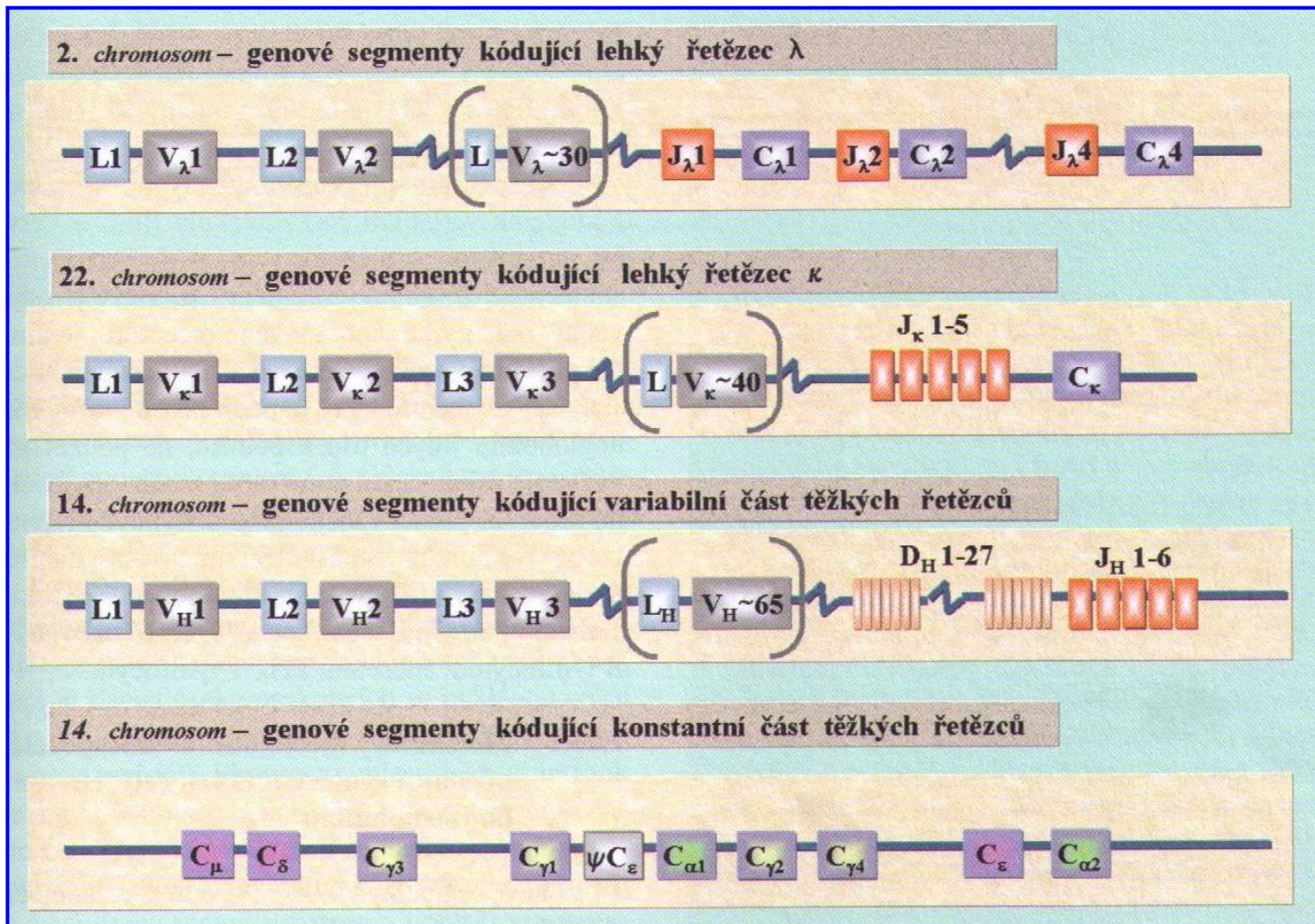
negativní jádra

Detekce přestavby genu *c-myc*



pozitivní jádra

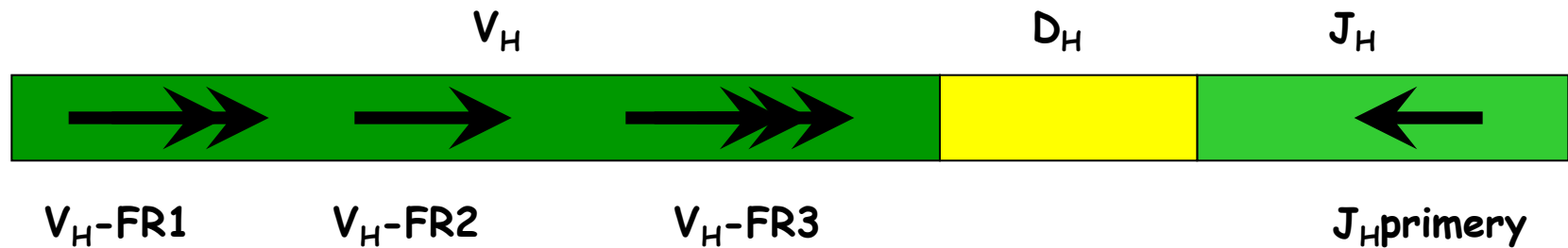
2. Určení klonality B- a T-receptorů



Organizace genových segmentů kódujících řetězce BcR (Krejsek a Kopecký, 2004)

Určení klonality B- a T-receptorů

PCR analýza přeskupování subgenů IGH



Schématický diagram přeskupování subgenů IgH se třemi sadami V_H primerů a jedním J_H primerem tvořící 3 multiplex PCR reakce (Převzato z van Dongen et al., 2003)

Velikost produktů PCR:

- Reakce A (V_H -FR1 + J_H): 310-360 nt
- Reakce B (V_H -FR2 + J_H): 250-295 nt
- Reakce C (V_H -FR3 + J_H): 100-170 nt
- Reakce CF (vnitřní kontrola, část genu pro cystickou fibrózu): 500 nt

Určení klonality B- a T-receptorů

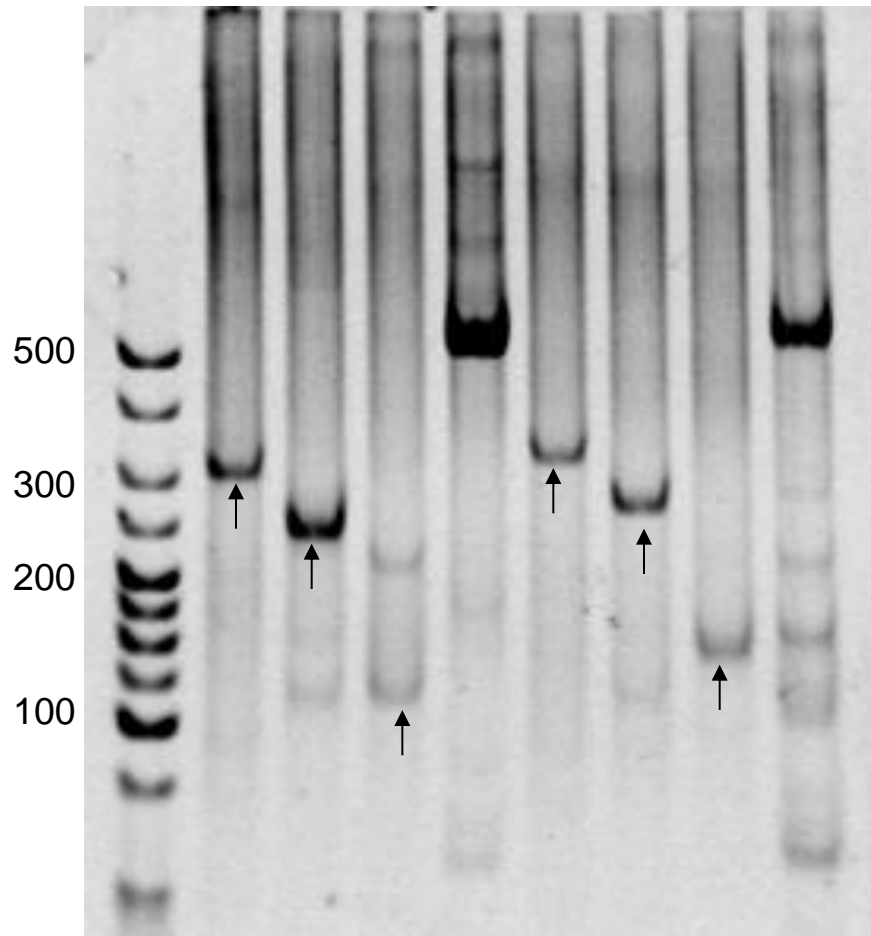
Postup analýzy

- izolace DNA (gDNA) z tkáně ve formol-parafinovém bloku
- měření koncentrace DNA na spektrometru
- multiplex PCR
- analýza produktů PCR elektroforézou v 8% polyakrylamidovém gelu
- detekce produktů PCR barvením gelu pomocí GelRed

Pozitivní

Pacient 1

Pacient 2

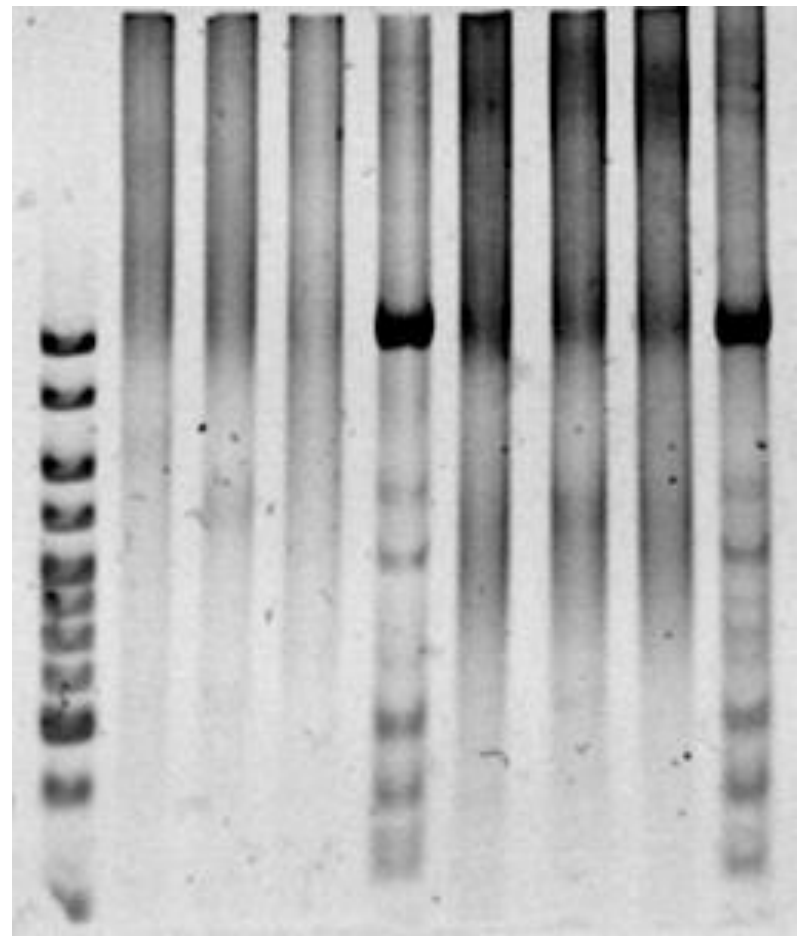


A B C CF A B C CF

Negativní

Pacient 3

Pacient 4



A B C CF A B C CF

3. Imunobloting

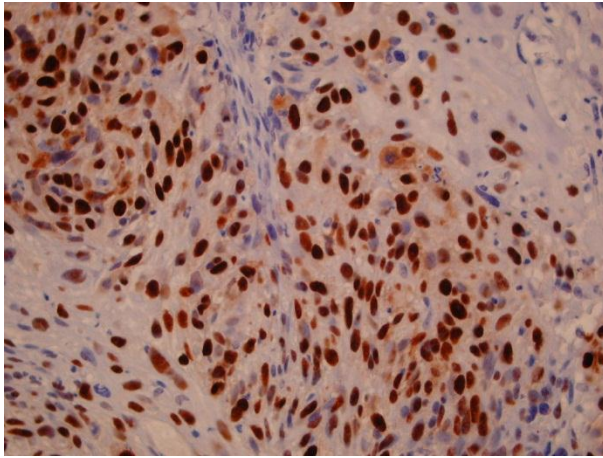
Imunohistochemická analýza

- přítomnost a hladina proteinu
- lokalizace proteinu v buňce (jádro, cytoplasma, vazba na membránu, ...)
- počet/podíl pozitivních buněk
- výchozí materiál: formol-parafinový bloček

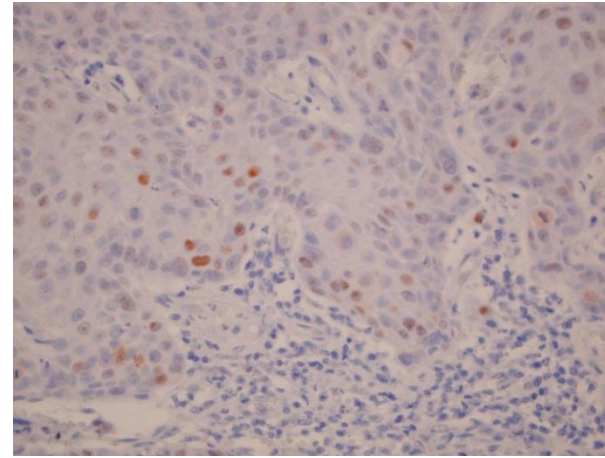
Imunobloting

- detekce aberantních (např. zkrácených) forem proteinů /hladiny proteinů
- výchozí materiál: čerstvě odebraná/zamražená tkáň

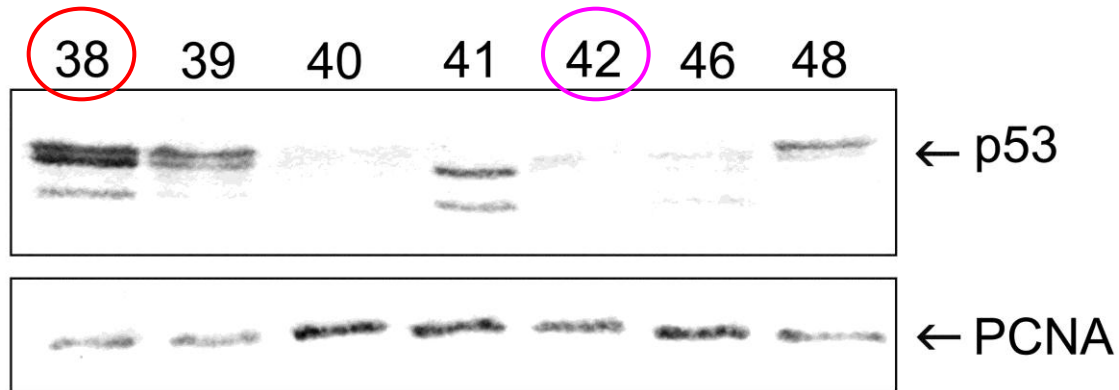
Porovnání IHC a IB



#38: 85% pozitivních jader



#42: 30% pozitivních jader

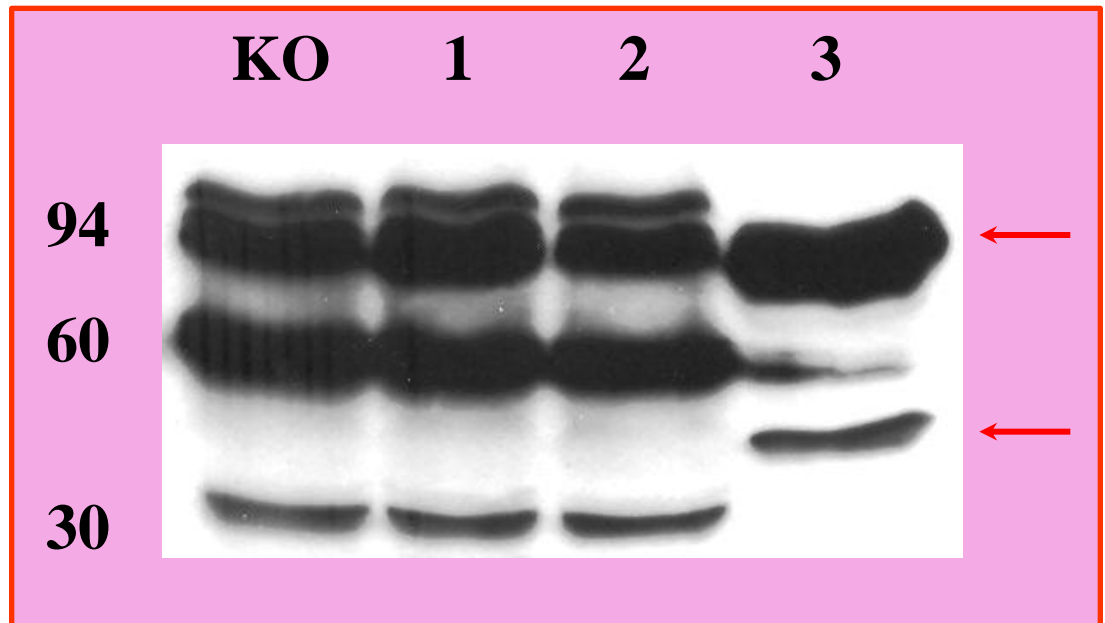


Imunobloting

Imunobloting

- detekce aberantních (např. zkrácených) forem proteinů /hladiny proteinů
- výchozí materiál: čerstvě odebraná/zamražená tkáň

- dystrofin
- calpain



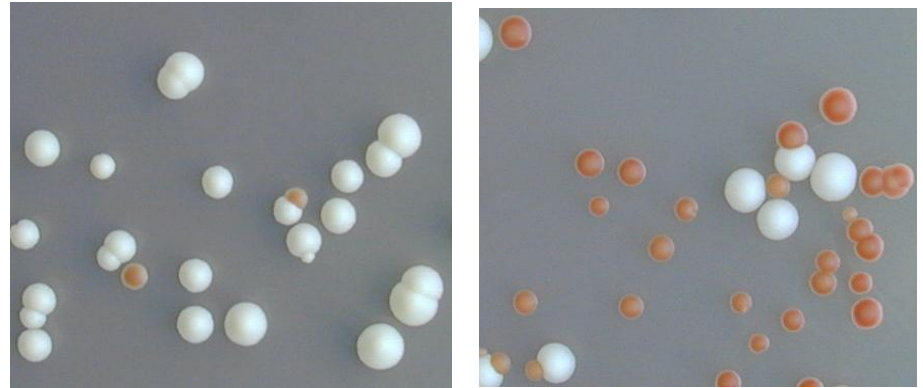
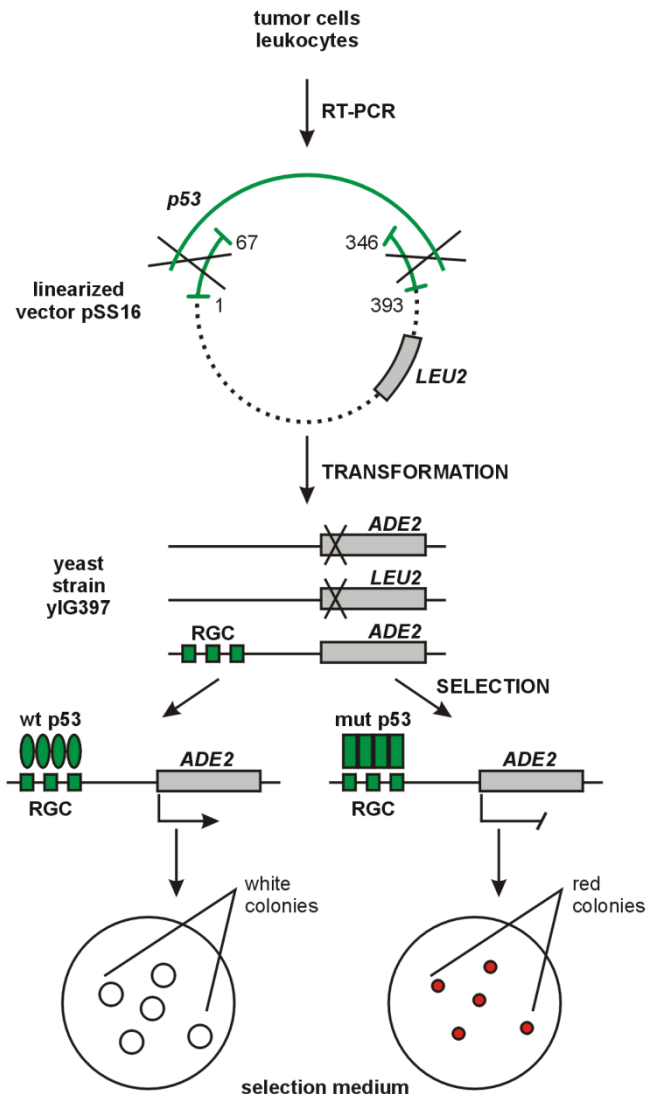
4. Analýza nádorového supresoru p53: metodou FASAY

- CLL



- dětská onkologie
- vyšetření mutace v zárodečné linii

Funkční analýza p53 metodou FASAY



zdroje pozadí

zdroje pozadí	do 10%
• degradace RNA	?
• nepřesnost DNA polymerázy	3%
• alternativní sestřih	5%
• linearizovaný vektor pSS16	< 0,5%

Galerie mutantu p53: *ts* a *cs*



R110L



A138V



G266E



Y126C



E286K



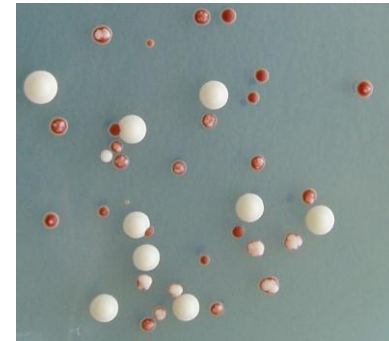
R283C



Y234C

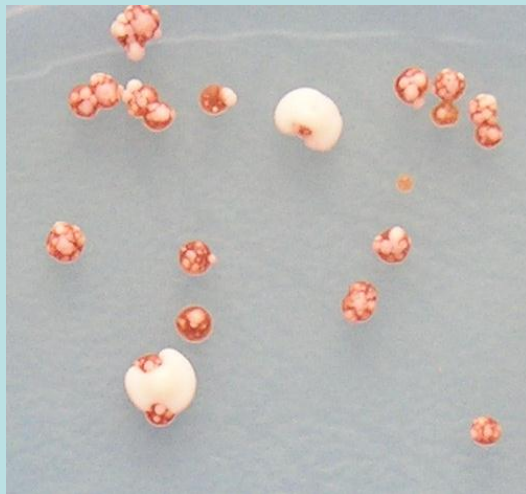
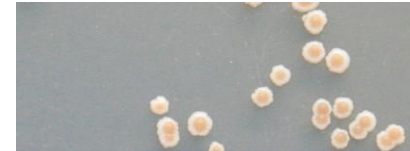


E286K

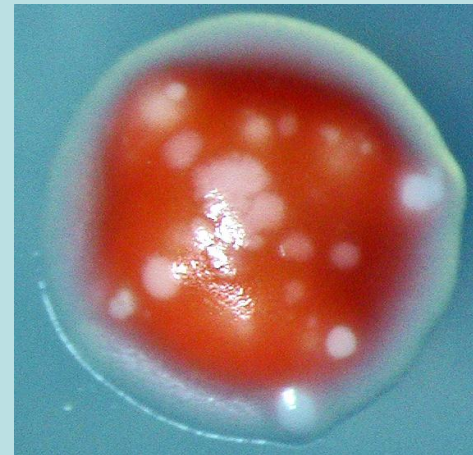


L344R

Galerie mutantů p53: *ts* a *cs*



Y126C



E286K



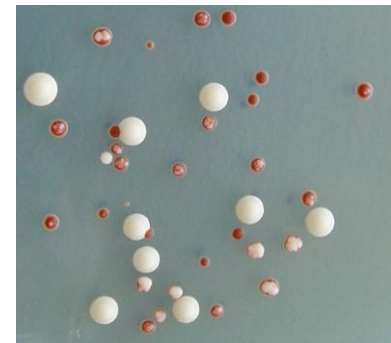
R283C



Y234C



E286K



L344R

2. Zapojení do výuky - PřF

- kurs Molekulární biologie nádoru (2 hod/týdně; 1 semestr)
 - určeno především studentům PGS oboru Buněčná a molekulární biologie (PřF) a studentům 4. a 5. roč. magisterského studia oboru Molekulární biologie a genetika (od 2001/2002)
 - otevřeno pro studenty PGS oborů Onkologie (od 2002/2003) a Lékařská biologie (LF) (od 2006/2007)
- Speciální seminář z biologie nádorů (1 hod/týdně; 1 semestr)
- kurs Biologie nádorů pro nebiology aneb buněčná filosofie (2 hod/týdně; 1 semestr)
 - otevřeno pro všechny studenty MU

Zapojení do výuky: LF

- přednáška „**Molekulární patologie - 1**“ v rámci kursu Patologie (Doc. Křen, Prof. Hermanová)
- účast při výuce bakalářského studia (MUDr. Kyclová; Mgr. K. Lišková): Molekulárně biologické metody v patologii (praktikum)

3. Výzkumný program

IGA MZ NT/13784-4/2012

Komplexní analýza mutantů p53 u lymfoproliferativních onemocnění (2012-2015; hlavní řešitelé)

IGA MZ NT/13519-4/2012

Časná identifikace CLL pacientů s dosud nevyselktovanými mutacemi v proteinu p53 (2012-2015; spoluřešitelé)

Práce studentů

- Mgr. Lenka Pitrová (disertační práce)
 - komplexní analýza molekulárních markerů (p53, ATM, cyklin D1) u lymfomů (MCL, DLBCL)
- Mgr. Eva Kabáthová (disertační práce)
 - analýza mutantů p53 s předčasně zařazeným terminačním kodónem v kvasinkových (a lidských) buňkách
- Bc. Johana Plch (diplomová práce)
 - analýza mutantů (teplotně senzitivních a s předčasně zařazeným terminačním kodónem) nádorového supresoru p53