

Laboratoř molekulární patologie

Ústav patologie FN Brno

Prof. RNDr. Jana Šmardová, CSc.

29.11.2018

Přehled činnosti

1. rutinní analýzy
2. výuka
3. výzkumná činnost

Rutinní analýzy

Přikrajování materiálu

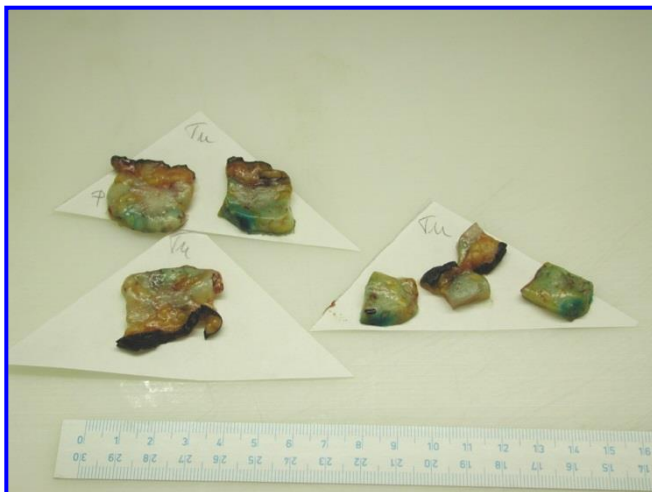
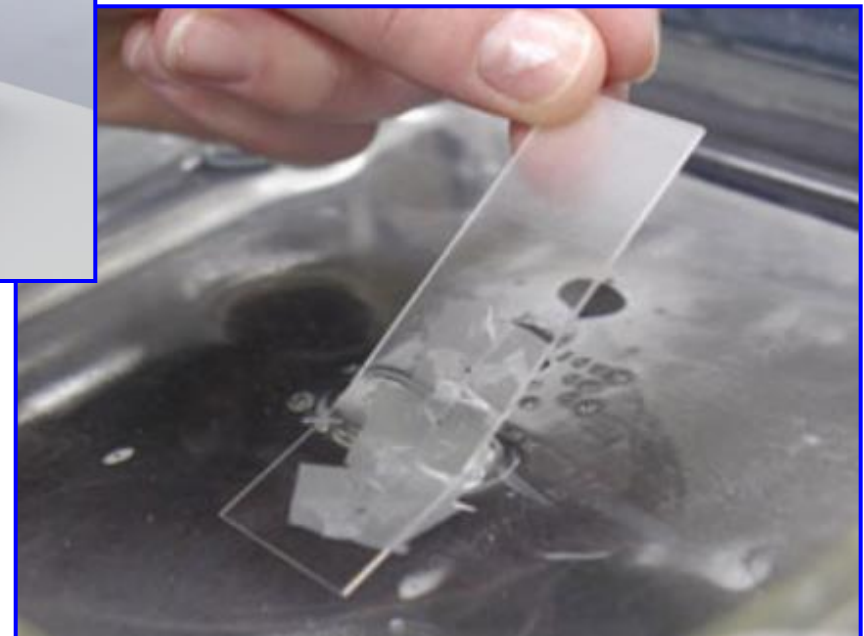


foto: primář MUDr. Pavel Fabian, PhD., MOÚ

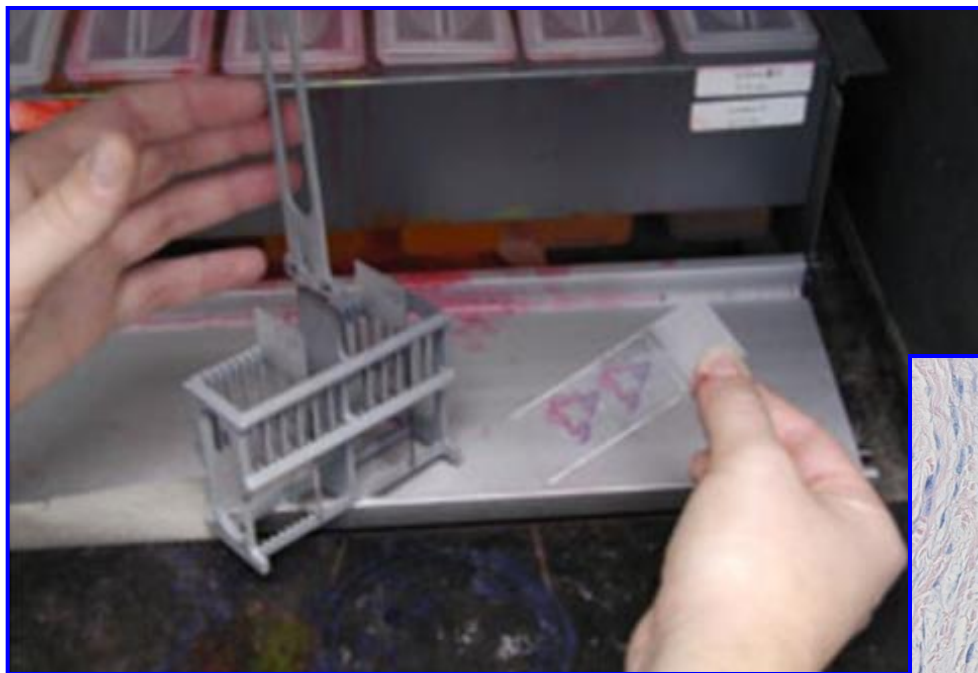
Příprava formol parafínových bloků



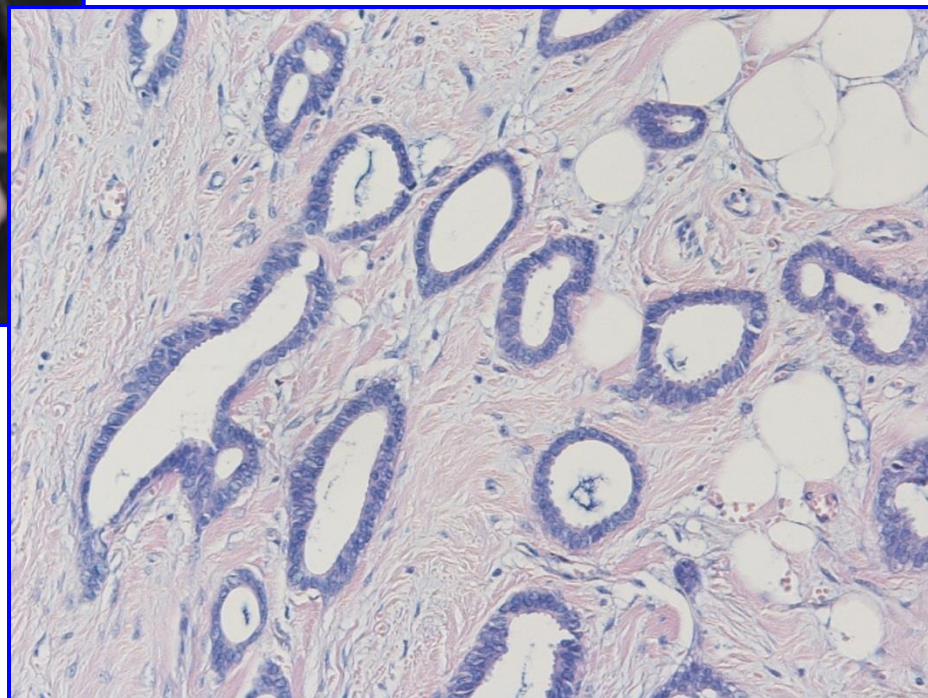
Příprava tkáňových řezů



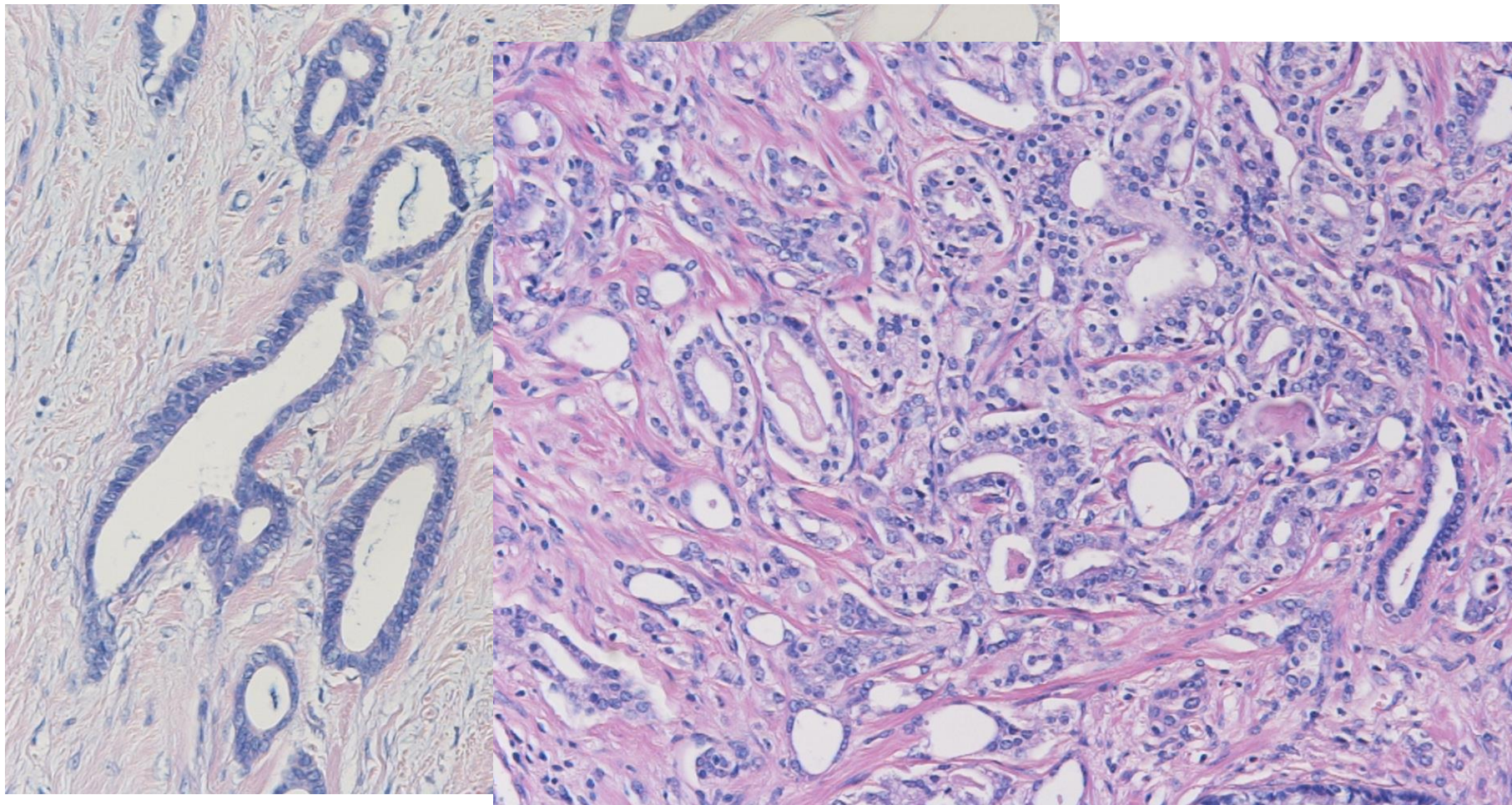
Základní vyšetřovací metody v patologii: morfologické vyšetření



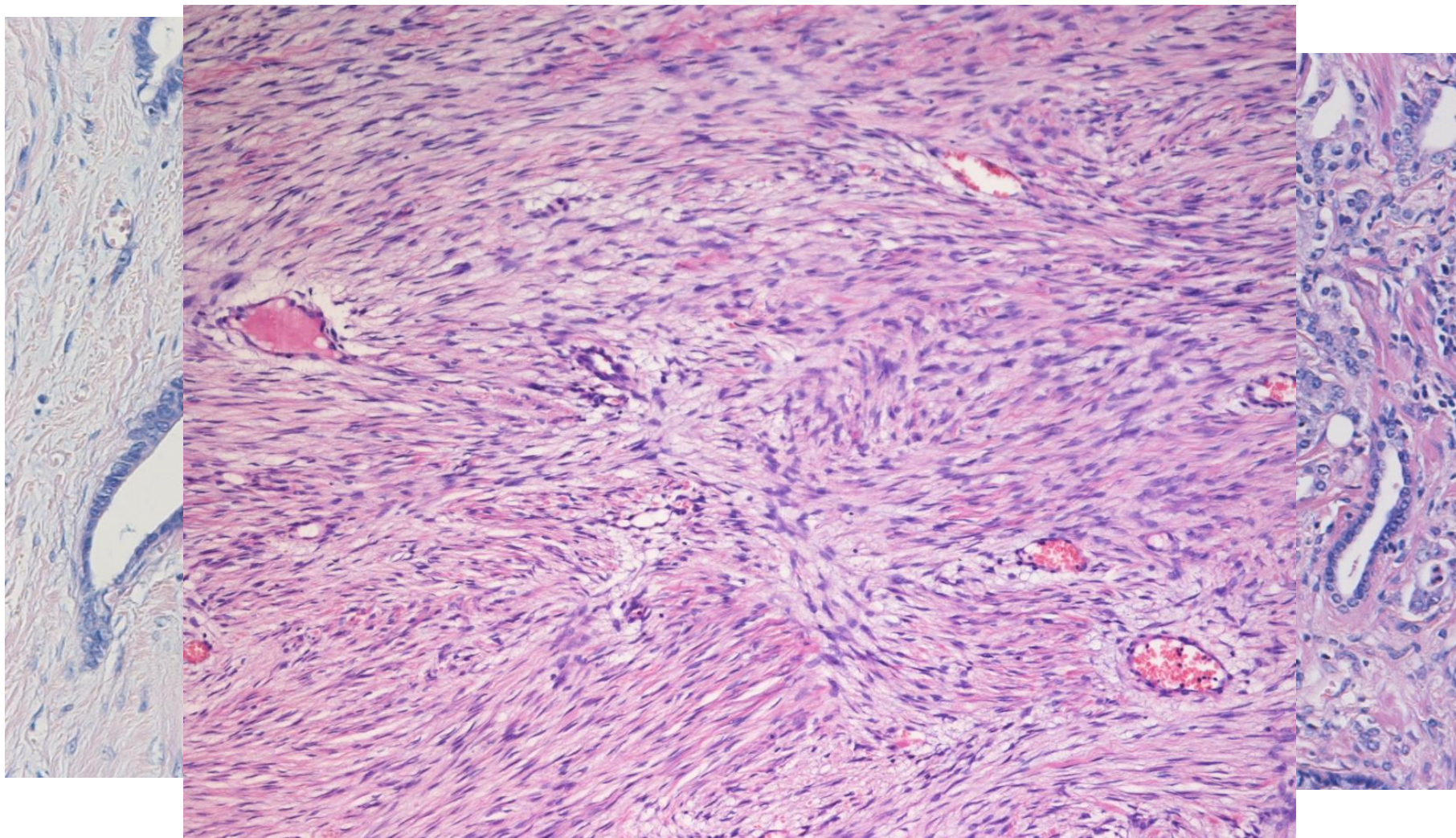
barvení hematoxylinem a eosinem



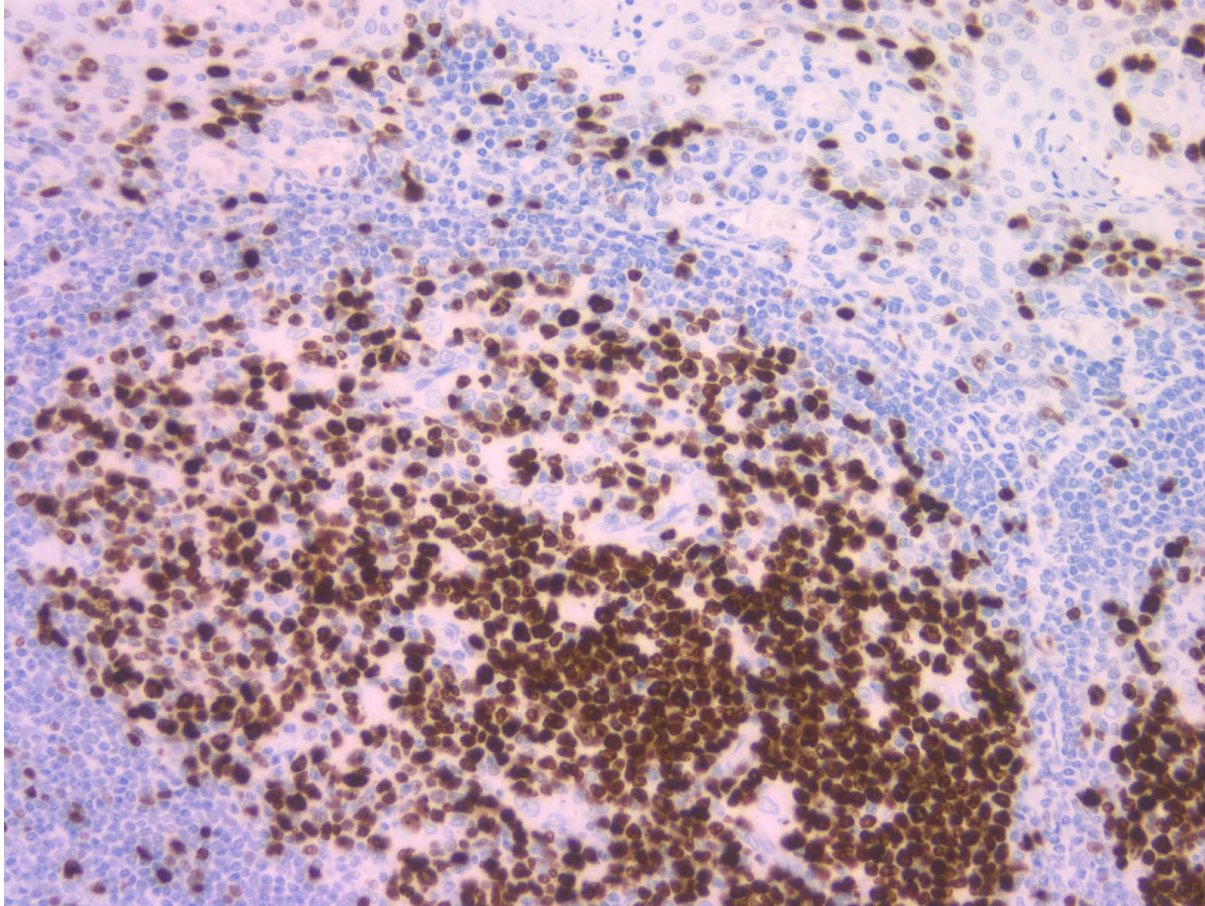
Základní vyšetřovací metody v patologii: morfologické vyšetření



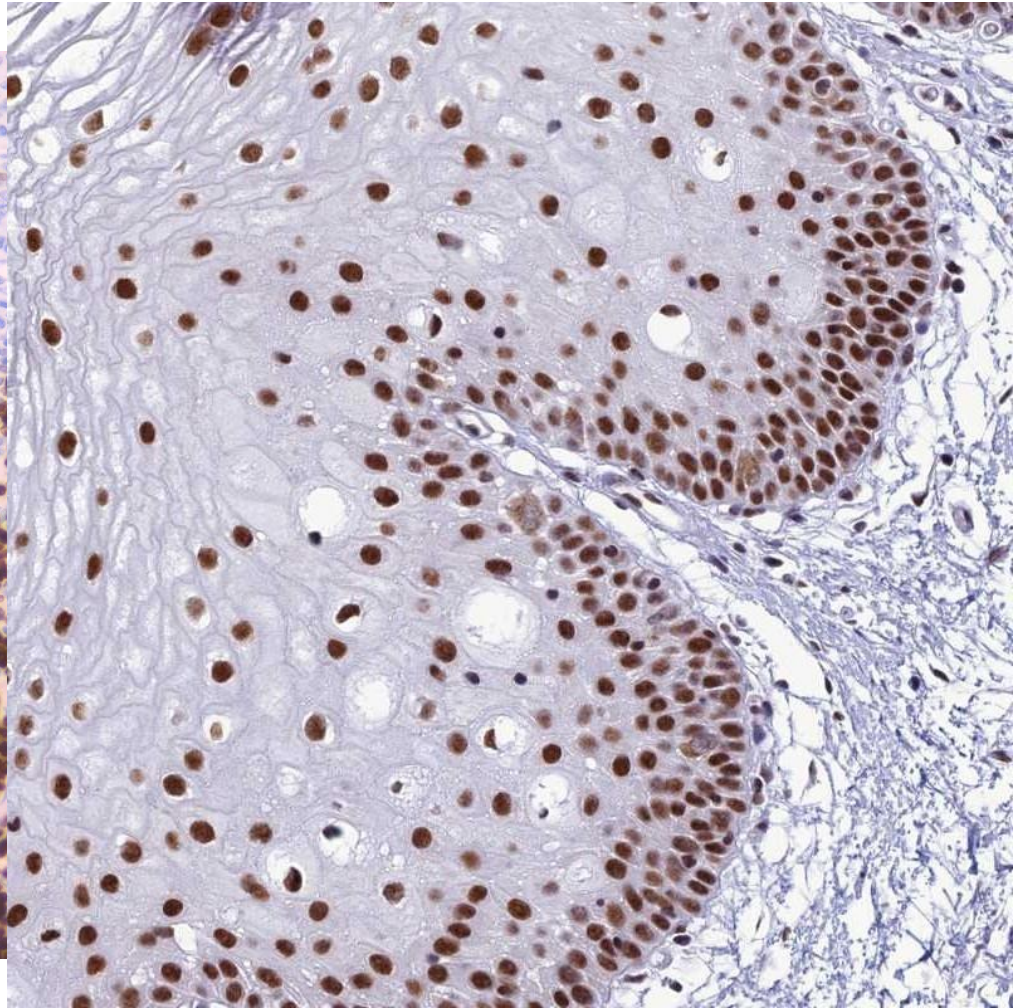
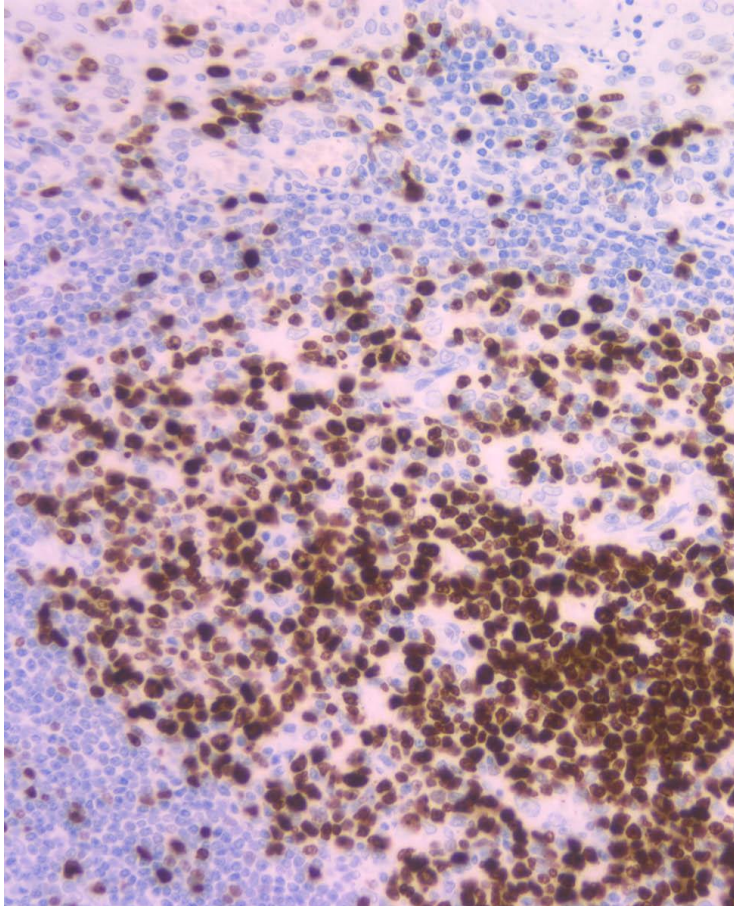
Základní vyšetřovací metody v patologii: morfologické vyšetření



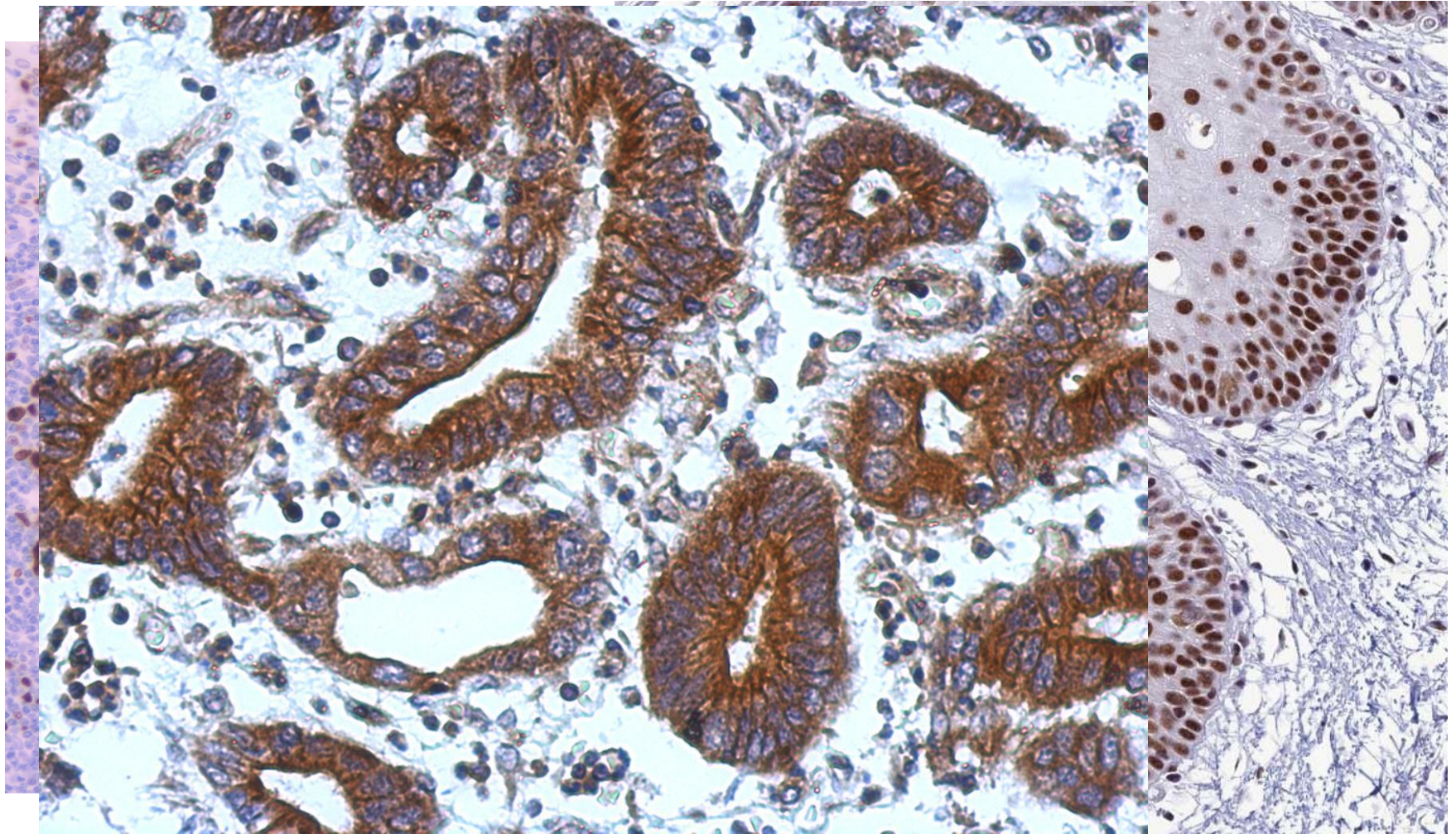
Základní vyšetřovací metody v patologii: **imuno**histochemická analýza



Základní vyšetřovací metody v patologii: imunohistochemická analýza



Základní vyšetřovací metody v patologii: imunohistochemická analýza



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		

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 následují			
B-lymfom	CD20,CD79a a další markery		
T-lymfom	CD3, CD45RO k jednotkovému		
Velkobuněčný T/null cell anaplastický lymfom, Hodgkinova choroba, Lymfomatoidní papulóza	CD30 (k rozlišení)		
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 jednotkových asociovaných asociovaných dalších cytokeratinů		
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		

Markery

- diagnostické
- prognostické
- prediktivní

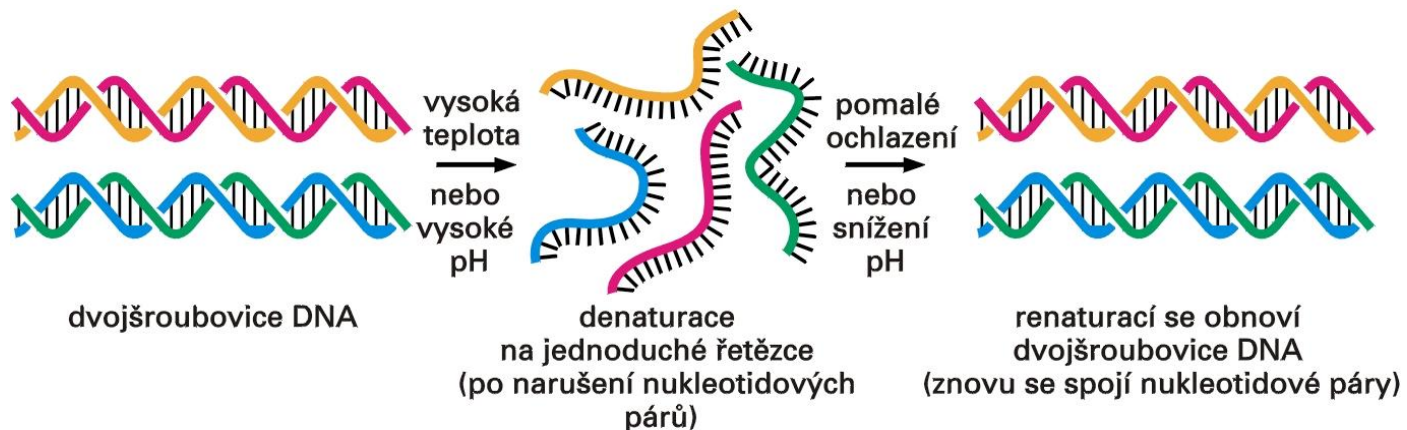
Některé rutinní analýzy

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

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



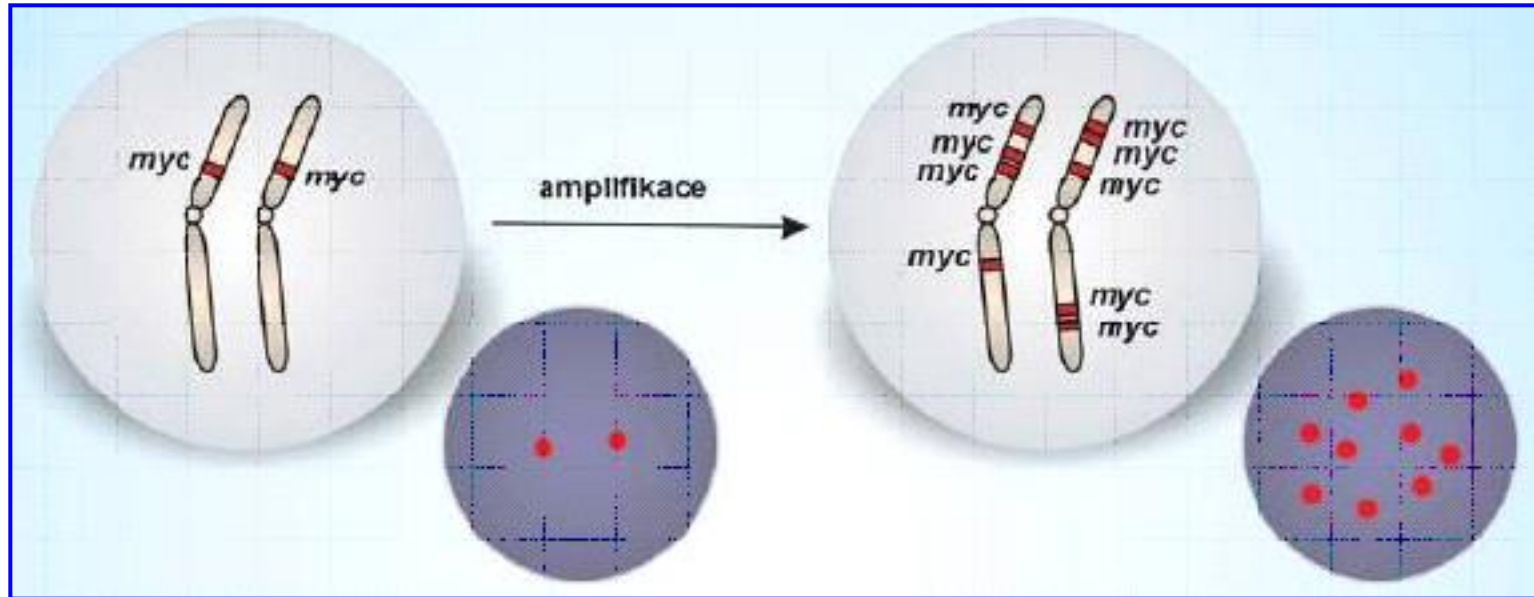
Fluorescenční hybridizace *in situ* FISH



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

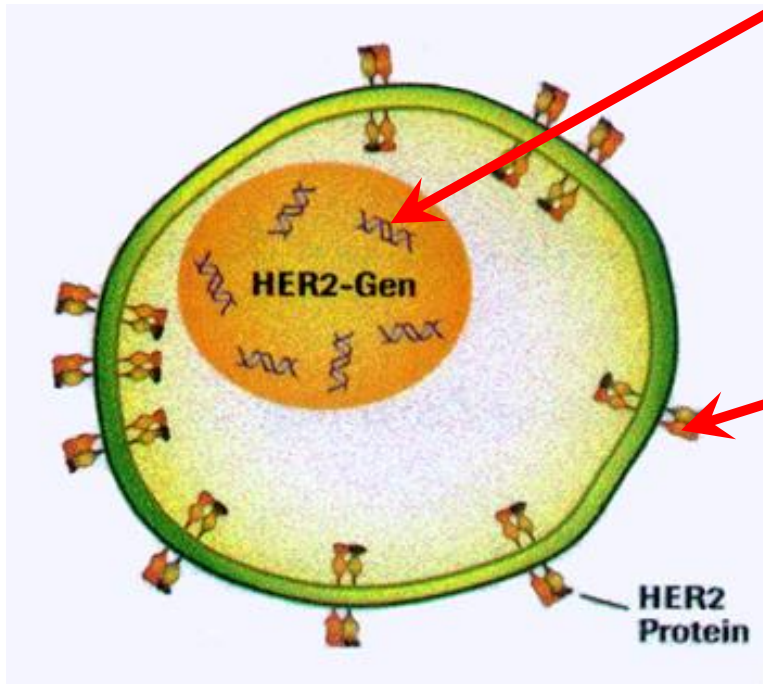


FISH 1: Detekce amplifikace genů

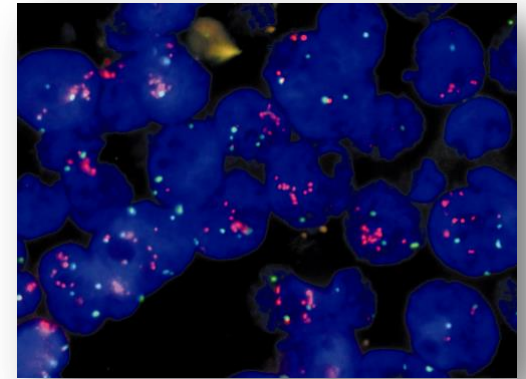


- Sonda specifická pro sledovaný gen a centromeru daného chromozomu.
- Určuje se počet / poměr signálů sledovaného genu a signálů odpovídajících počtu centromer = chromozomů.
- Např. amplifikace genu *myc* u neuroblastomů nebo genu *c-erbB2* (*HER2/neu*) u nádorů prsu.

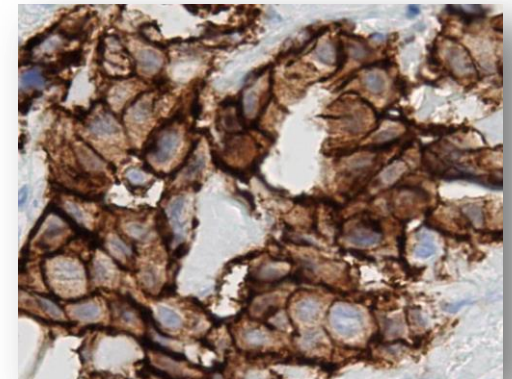
Analýza amplifikace genu *HER2/neu*



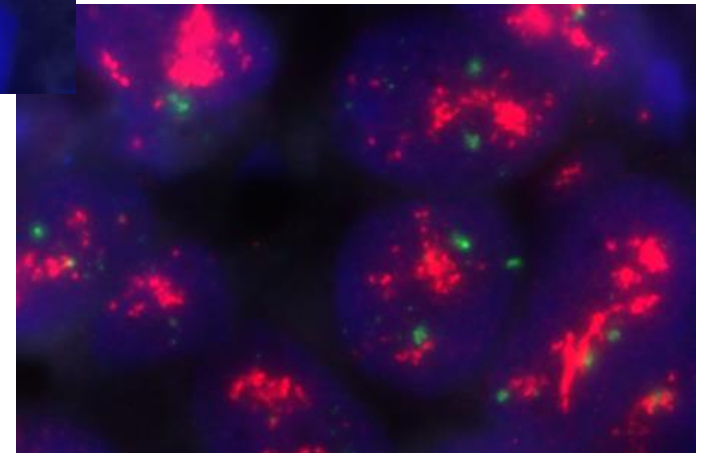
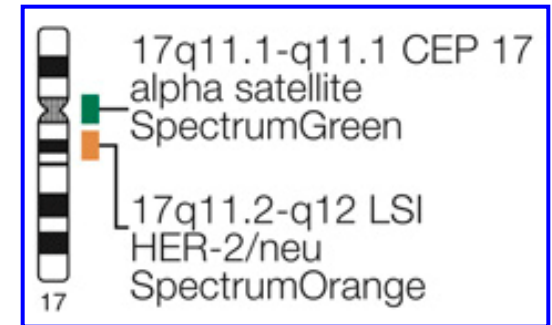
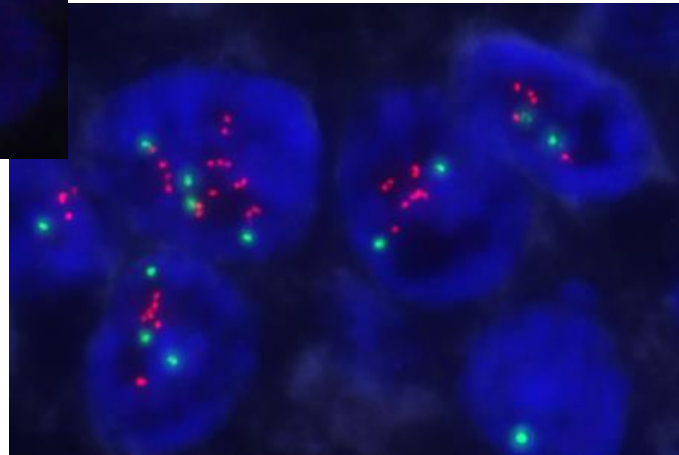
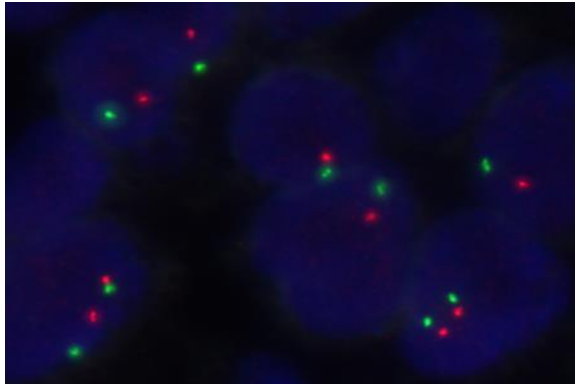
FISH



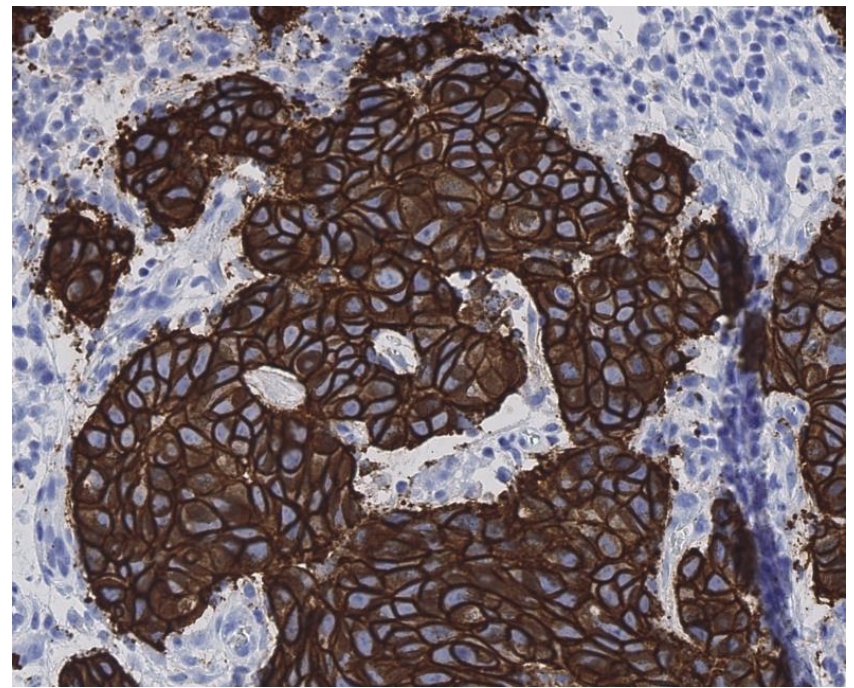
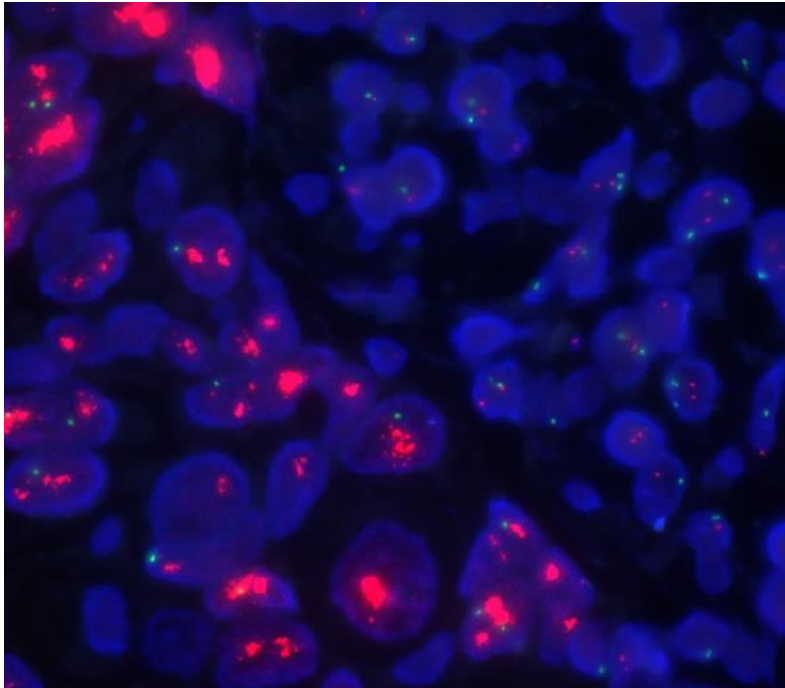
IHC



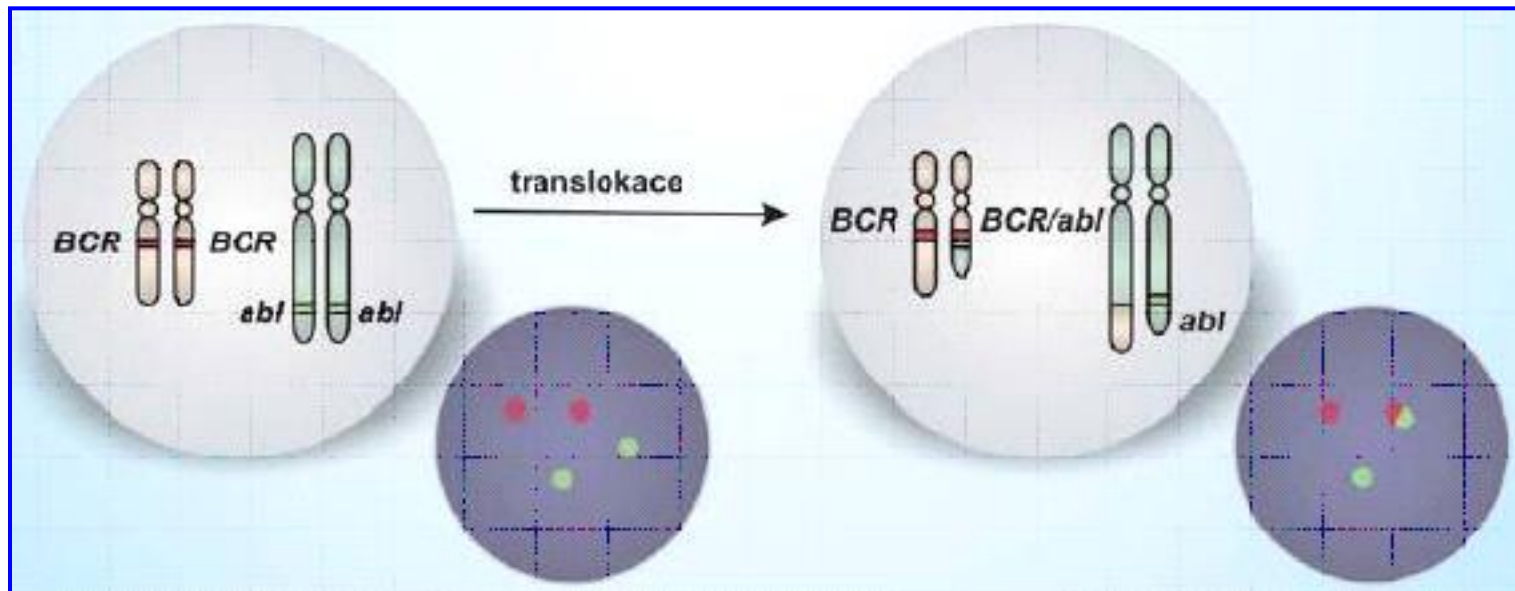
Analýza amplifikace genu *HER2/neu*



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



FISH 2: Detekce translokace chromozomů



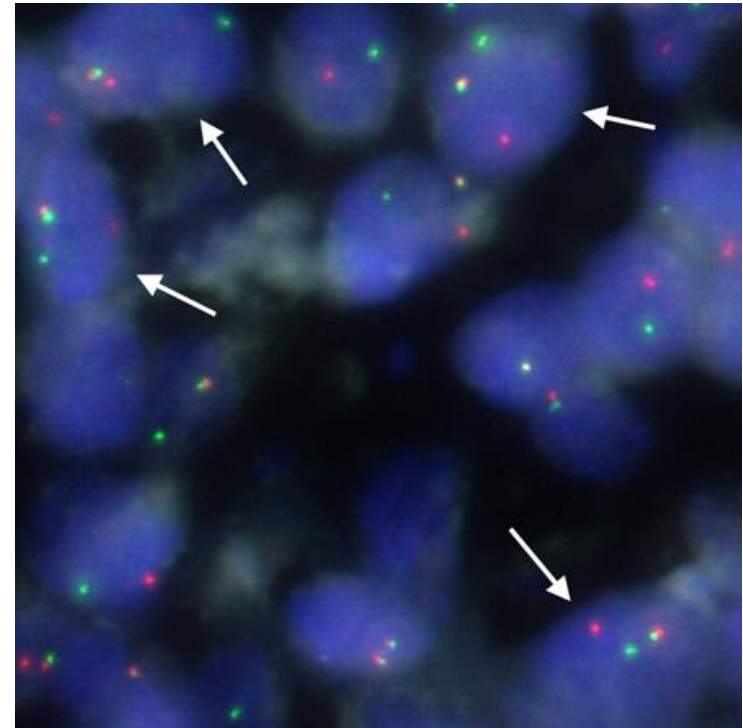
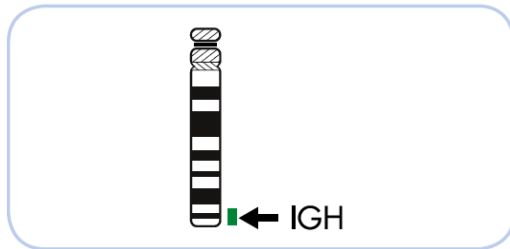
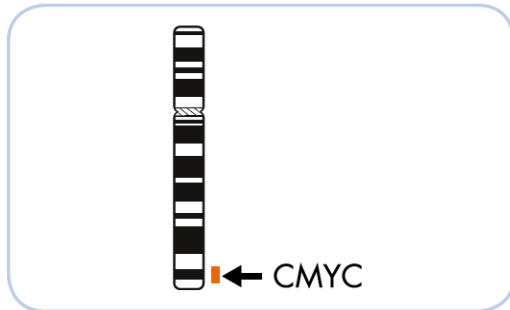
- Pro detekci se použijí dvě sondy značené odlišnými fluorescenčními barvami. Každá sonda se váže k sekvenci jednoho z genů.
- Pokud je přítomný fúzní gen, vznikne směsný signál v důsledku fluorescence sond navázaných v těsném sousedství.
- Většinou je translokována pouze jedna alela, proto lze vedle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

Detekce translokace chromozomů

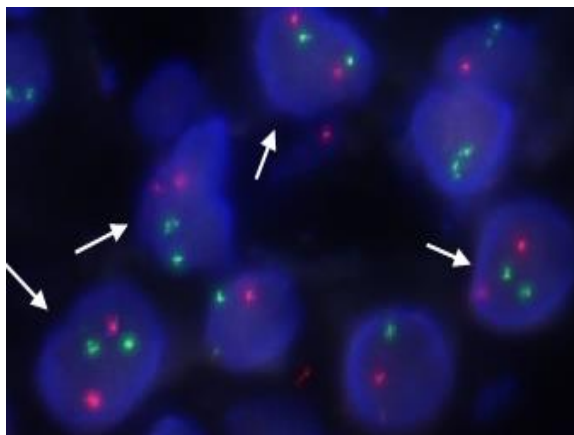
- translokace **t(14;18)** u folikulárního lymfomu (FL)
- translokace **t(8;14)** u Burkittova lymfomu (BL)
- přestavba genu *c-myc* u Burkittova lymfomu (BL)
- translokace **t(11;14)** u lymfomu z buněk plášt'ové zóny (MCL)
- přestavba genu *MALT1* u MALT lymfomů
- přestavba genu *ALK* u karcinomů plic
- translokace *ALK/EML4* u karcinomů plic
- ... a mnoho dalších

Detekce translokace t(8;14)

c-myc/IGH

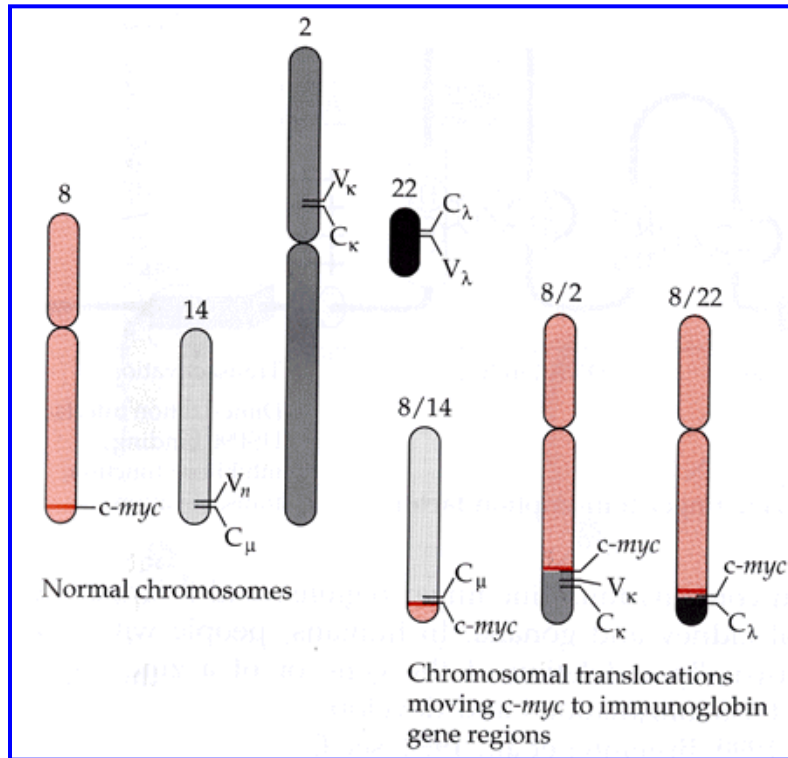


pozitivní jádra



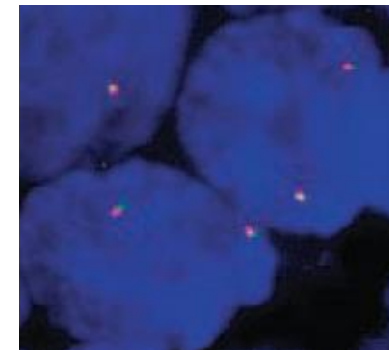
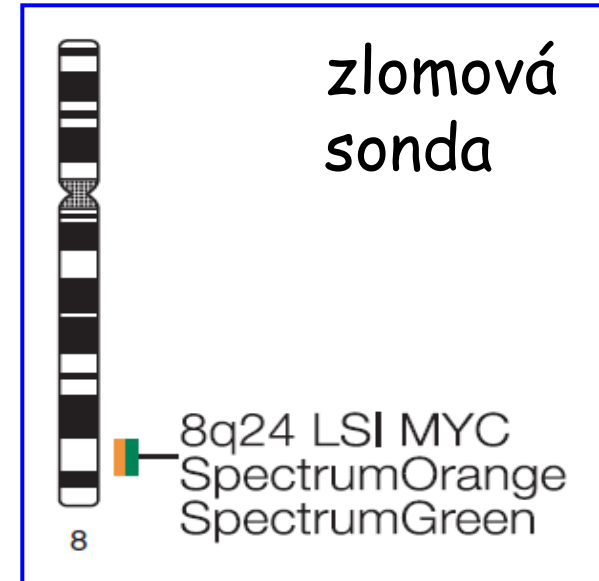
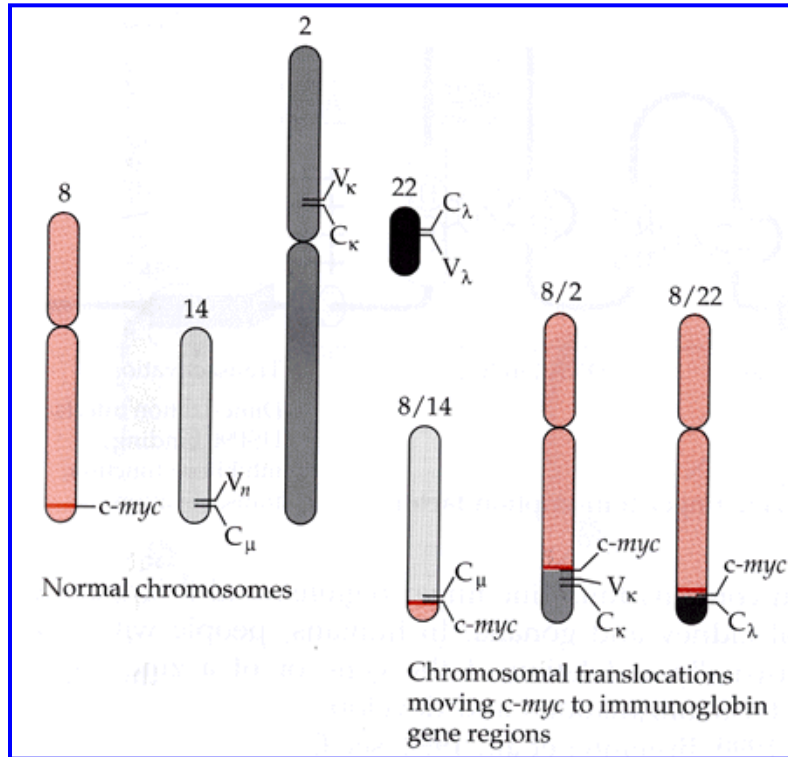
negativní jádra

Detekce přestavby genu *c-myc*



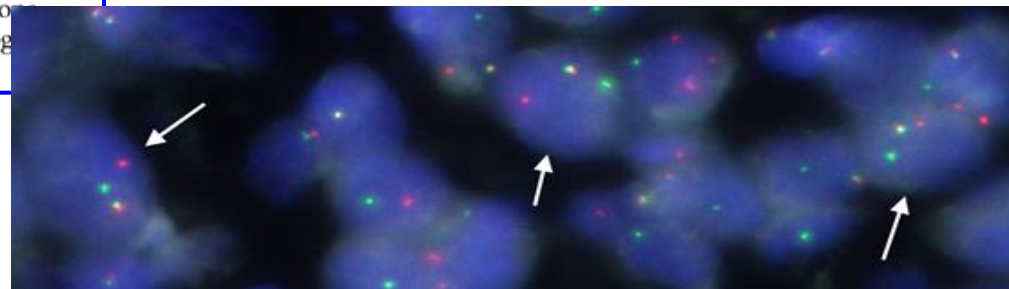
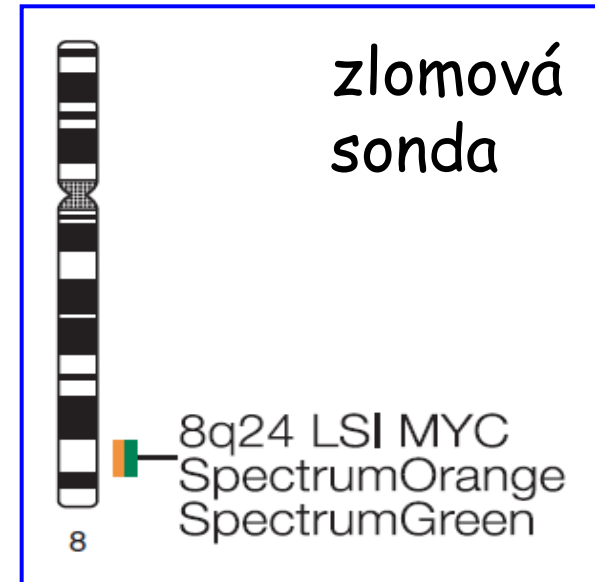
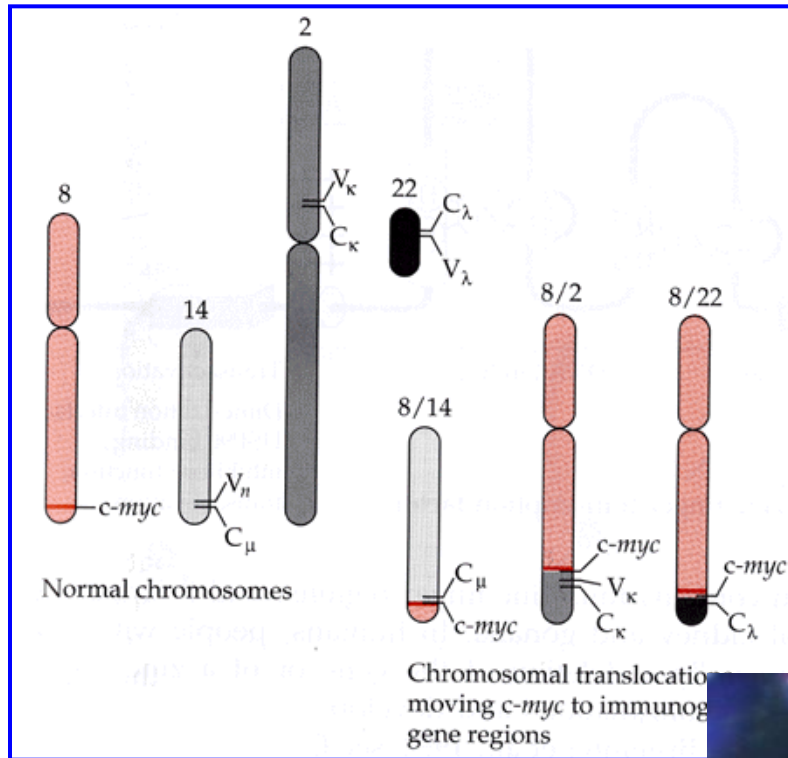
⇒ zlomová sonda

Detekce přestavby genu *c-myc*



negativní jádra

Detekce přestavby genu *c-myc*



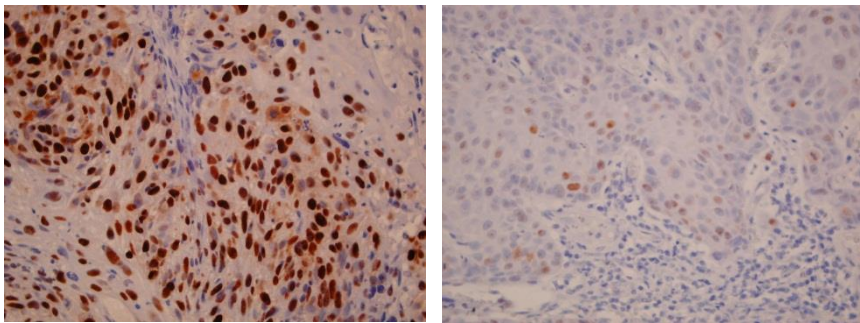
pozitivní jádra

2. Určení klonality B- a T-receptorů

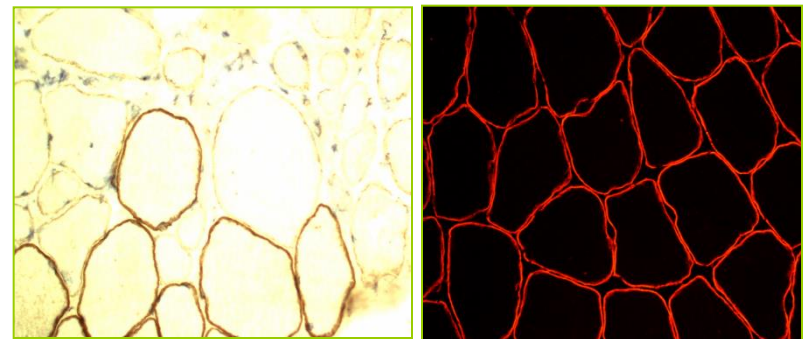
3. Imunobloting

Imunohistochemická analýza

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



nádorový supresor **p53**



svalový protein **dystrophin**

Imunobloting

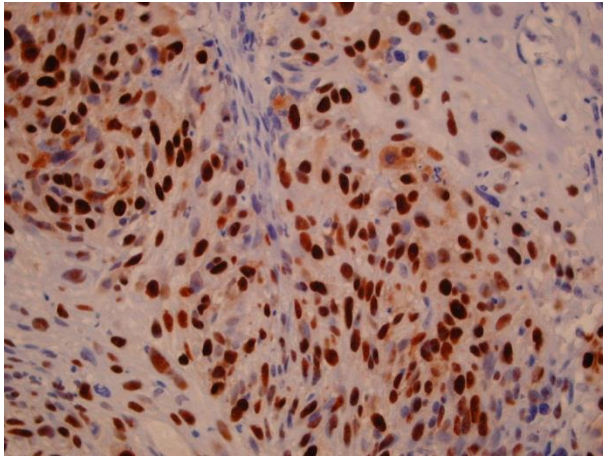
Imunohistochemická analýza

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

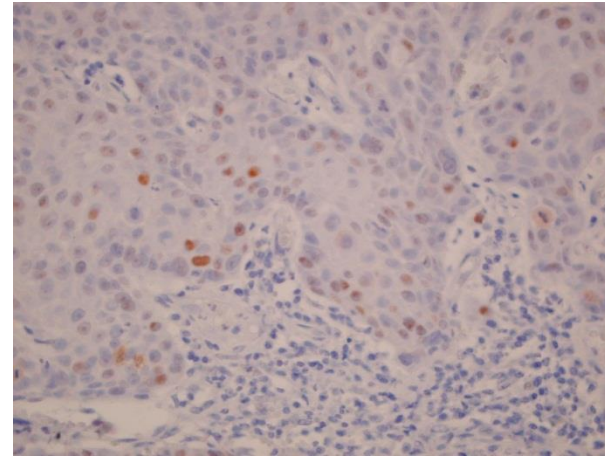
Imunobloting

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

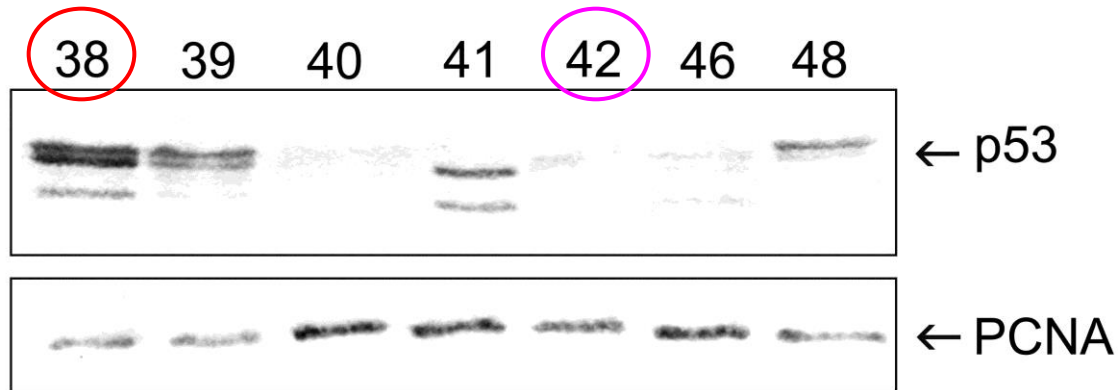
Porovnání IHC a IB



#38: 85% pozitivních jader



#42: 30% pozitivních jader

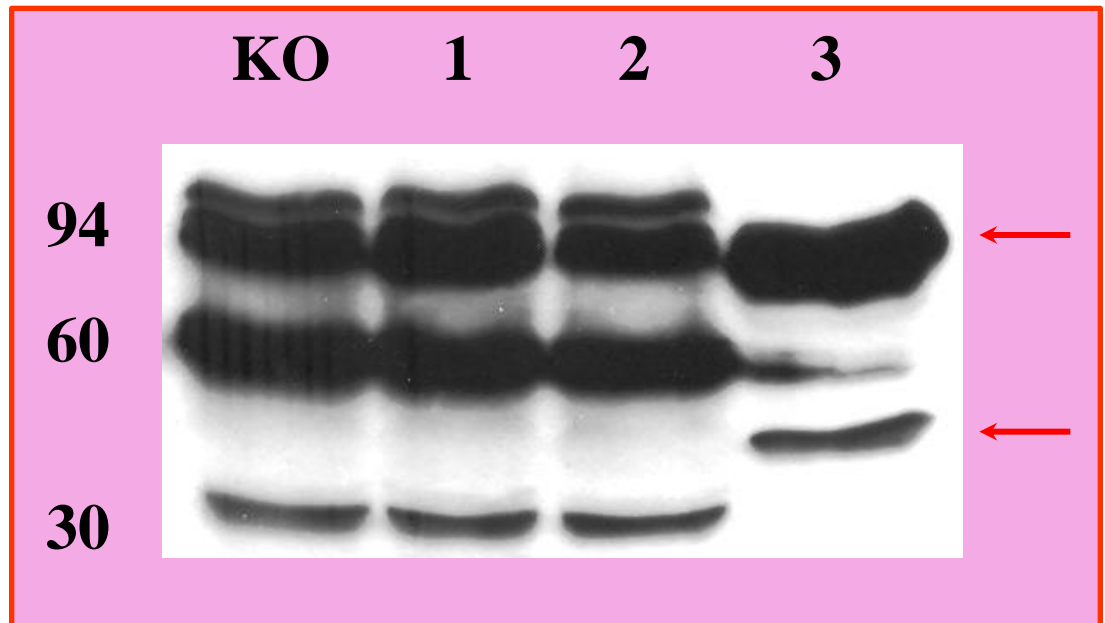


Imunobloting

Imunobloting

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

- dystrofin
- calpain



4. Analýza nádorového supresoru p53: metodou FASAY

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)
 - pro studenty PGS oborů Onkologie (od 2002/2003) a Lékařská biologie (LF) (od 2006/2007)
- navazující Speciální seminář z biologie nádorů (1 hod/týdně; 1 semestr)
- kurs Biologie nádorů pro nebiology aneb buněčná filosofie (2 hod/týdně; 1 semestr)
 - pro všechny studenty MU

Zapojení do výuky: LF

- přednáška „**Molekulární podstata vývoje nádorů; Metody molekulární patologie.**“ v rámci kursu Patologie (Doc. Křen, Prof. Hermanová)