

Od megabází k bázím, aneb kterak molekulárně uchopit genomové abnormality

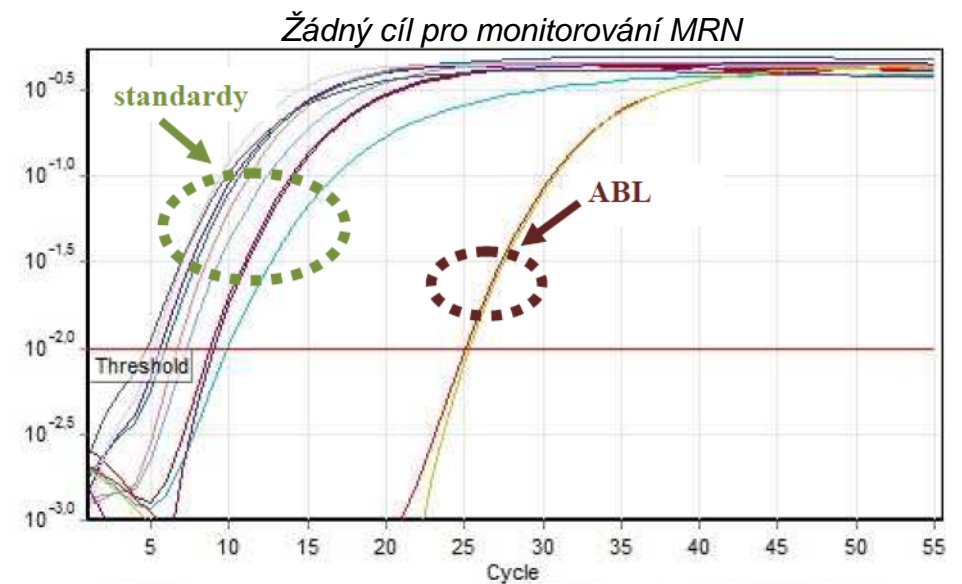
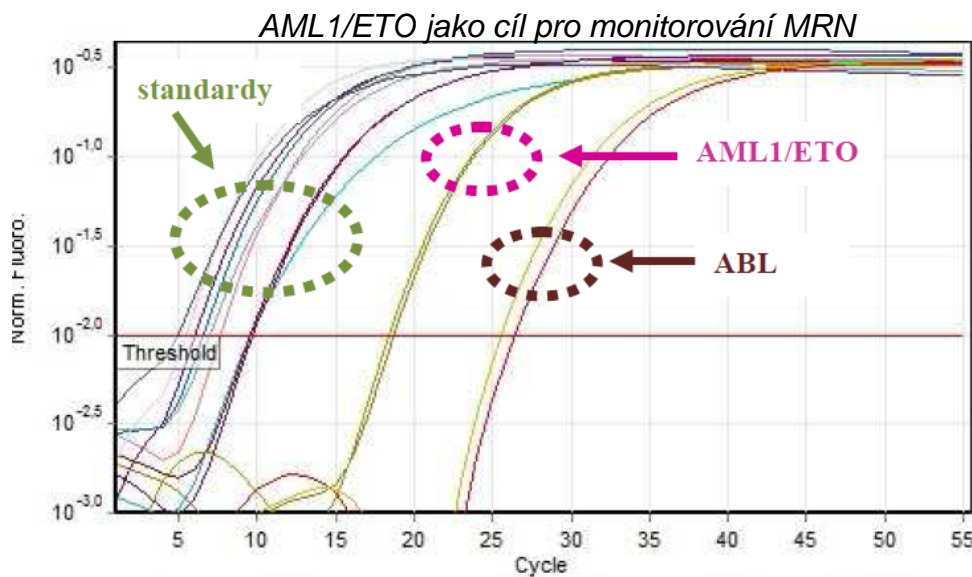
Tereza Jančušková

Laboratoř molekulární diagnostiky CHAMBON a.s.
člen skupiny Synlab Czech



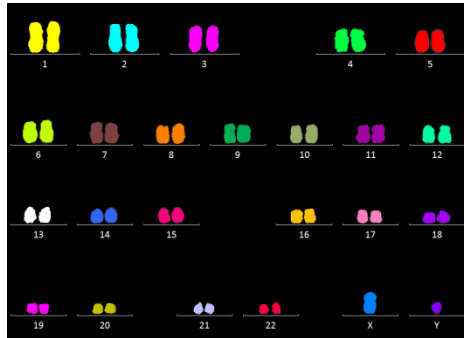
Úvod

- Akutní leukémie – rozdílná prognóza v závislosti na řadě faktorů
- Sledování MRN rutinním molekulárně-biologickým screeningem
 - chromozomové aberace
 - mutace v hematologicky významných genech
- Jen u 50 % pacientů s akutními leukémiemi



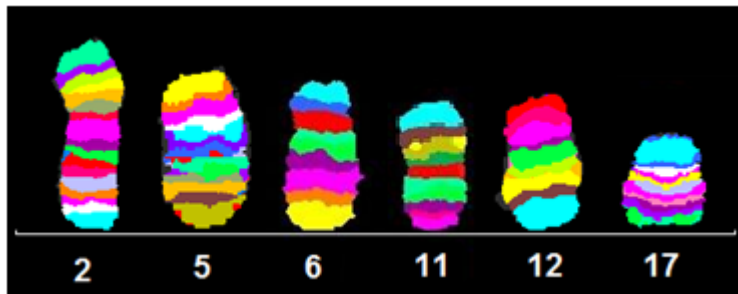
Molekulární cytogenetika

- mFISH

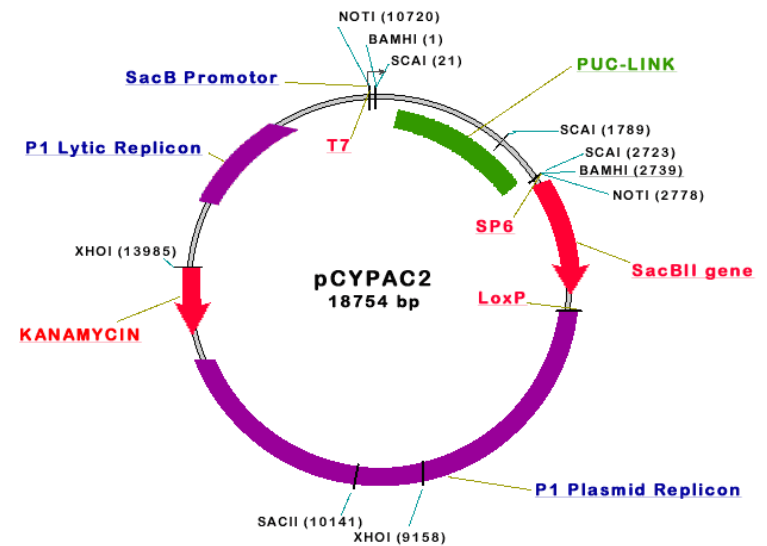
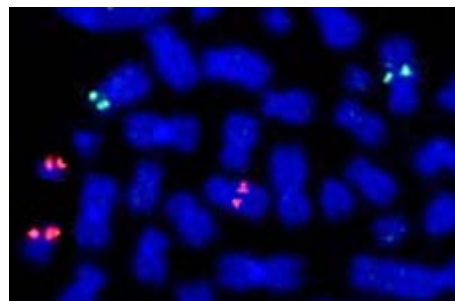


- *Bacterial Artificial Chromosome*
- Bakteriální vektor - inzert lidské DNA (~100 - 300 kb)
- BAC knihovna (25 000 klonů) – pokrytí prakticky celého genomu

- mBAND



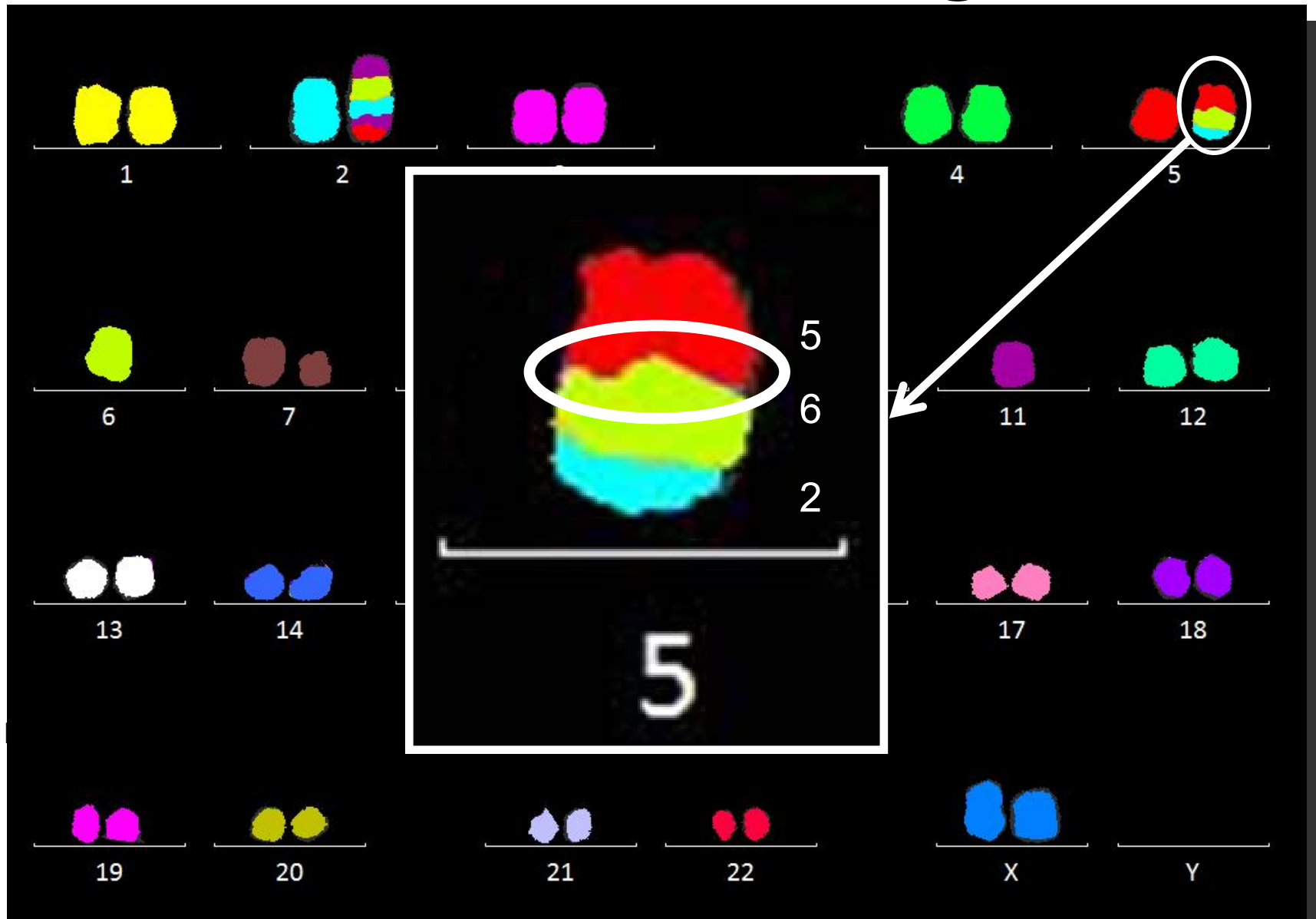
- BAC-FISH



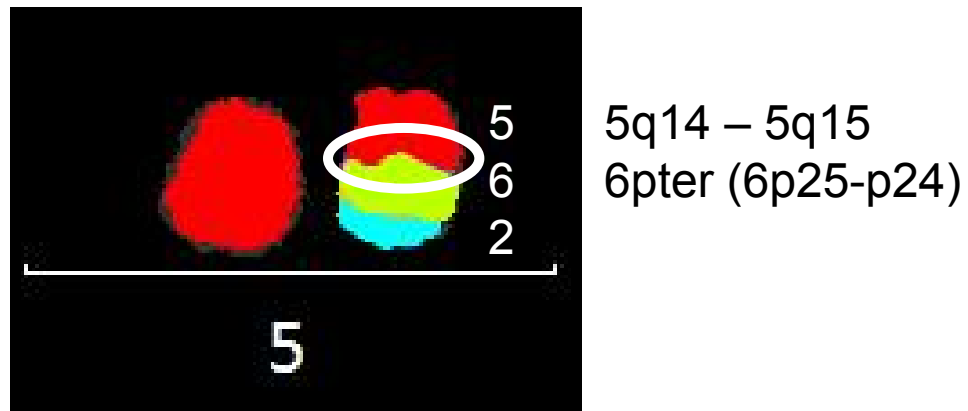
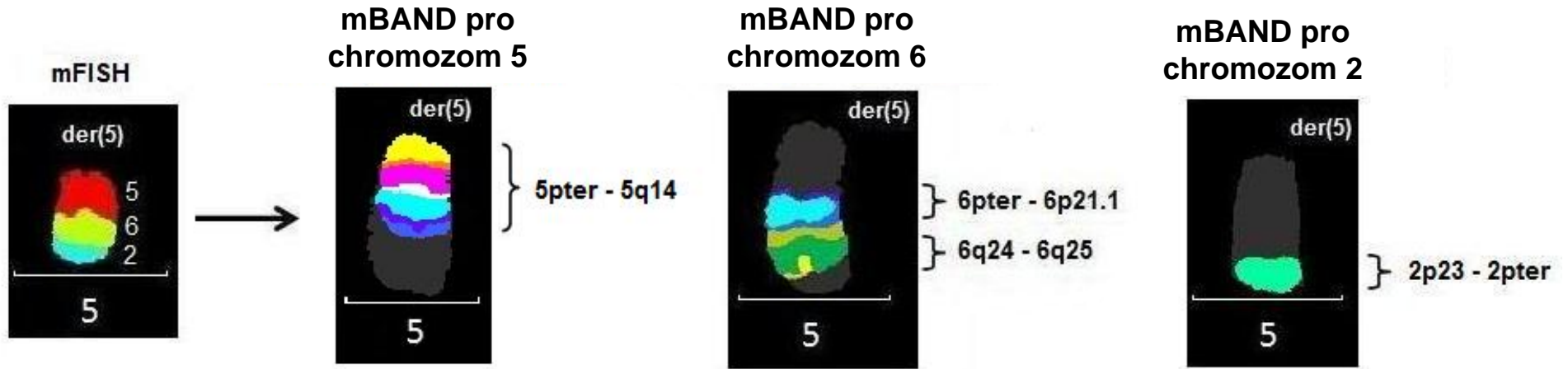
Pacientka K655

- Rok narození 1943
- Věk v době vyšetření – 67 let
- Vyšetřovaný materiál: kostní dřeň
- Dg. AML (C920)

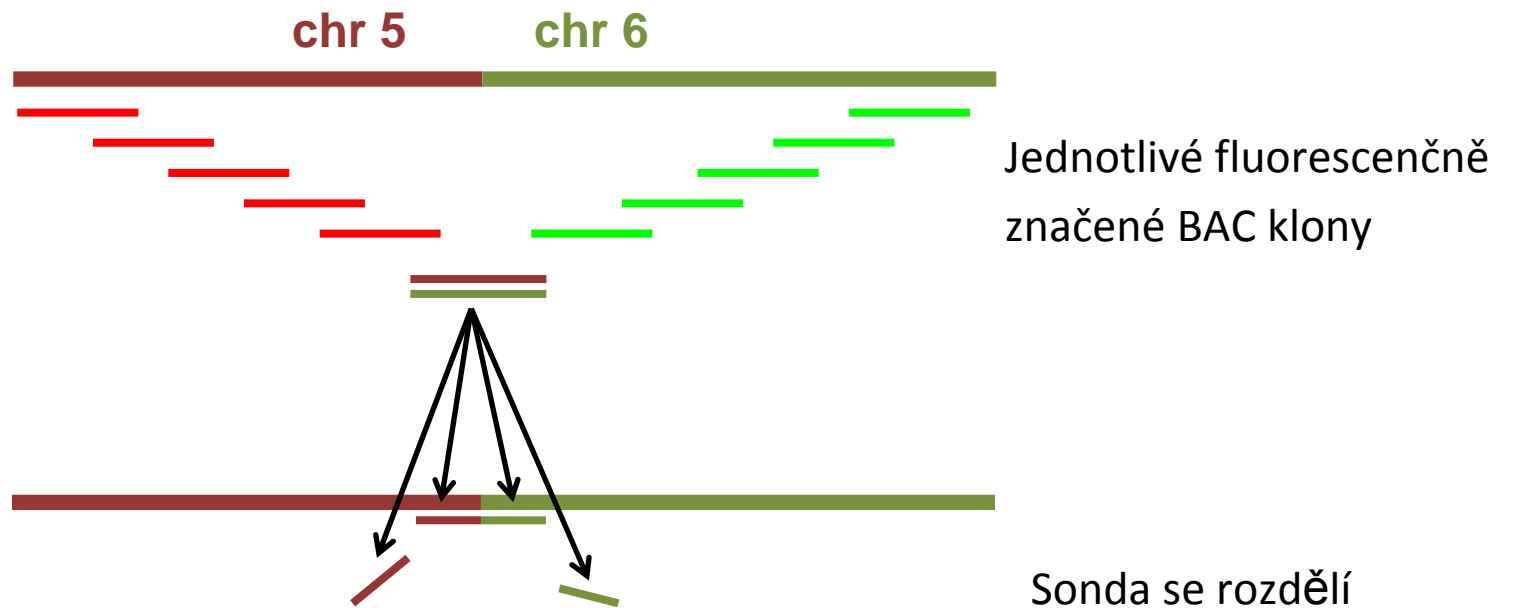
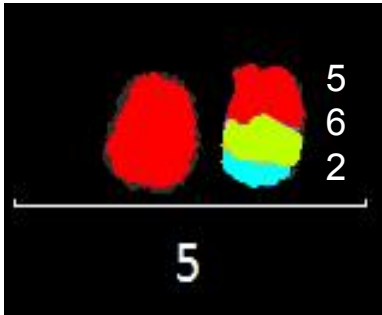
1. krok – rutinní screening + mFISH

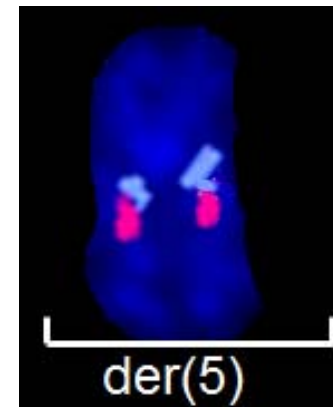
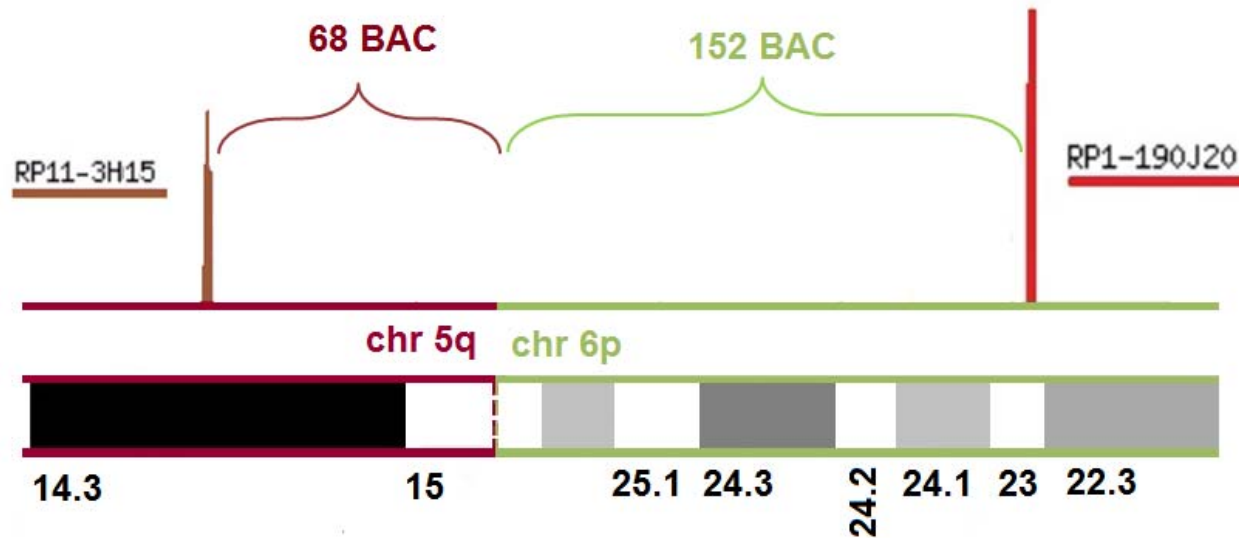


2. krok - mBAND



3. krok – BAC klony



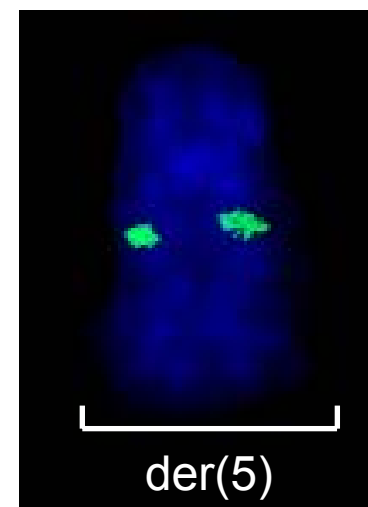
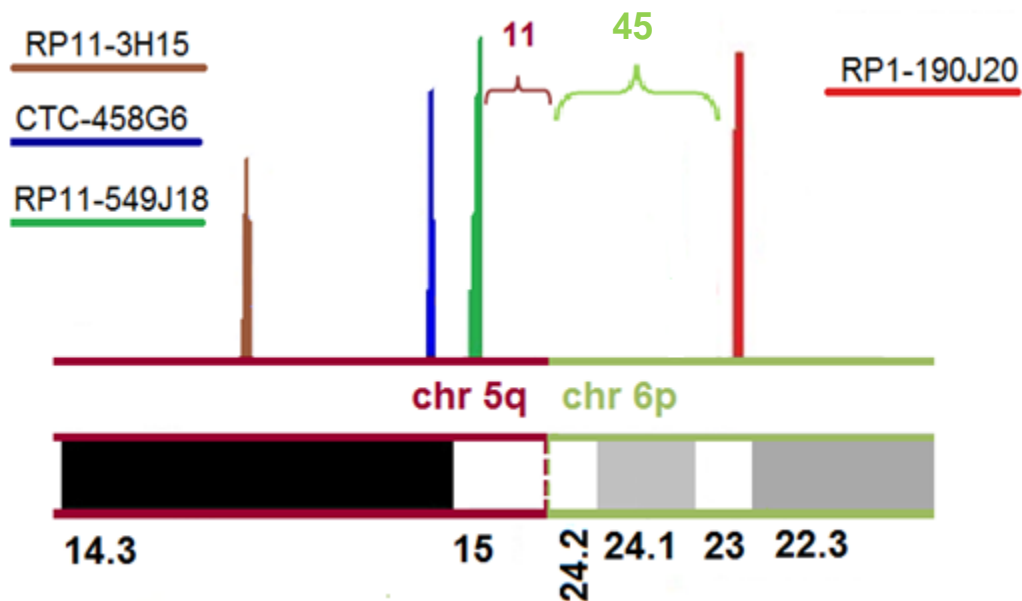


RP11-3H15 – DEAC (5q14.3)

RP1-190J20 – TR (6p23)

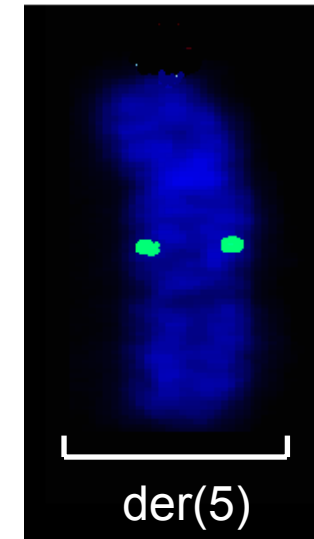
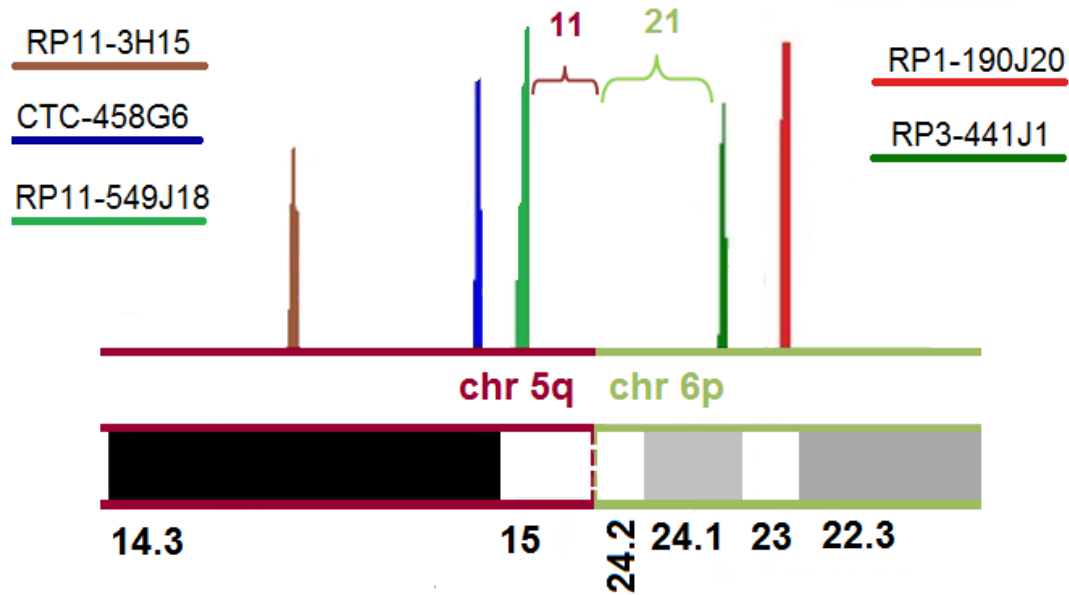
RP1-20B11 (6p25.3) – nepřítomen

CTC-55111 (5q15) - nepřítomen

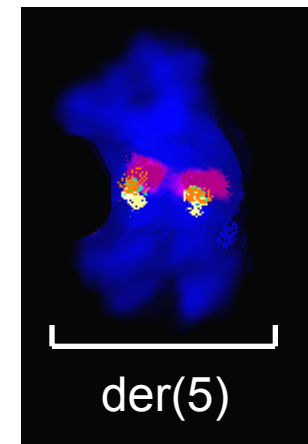
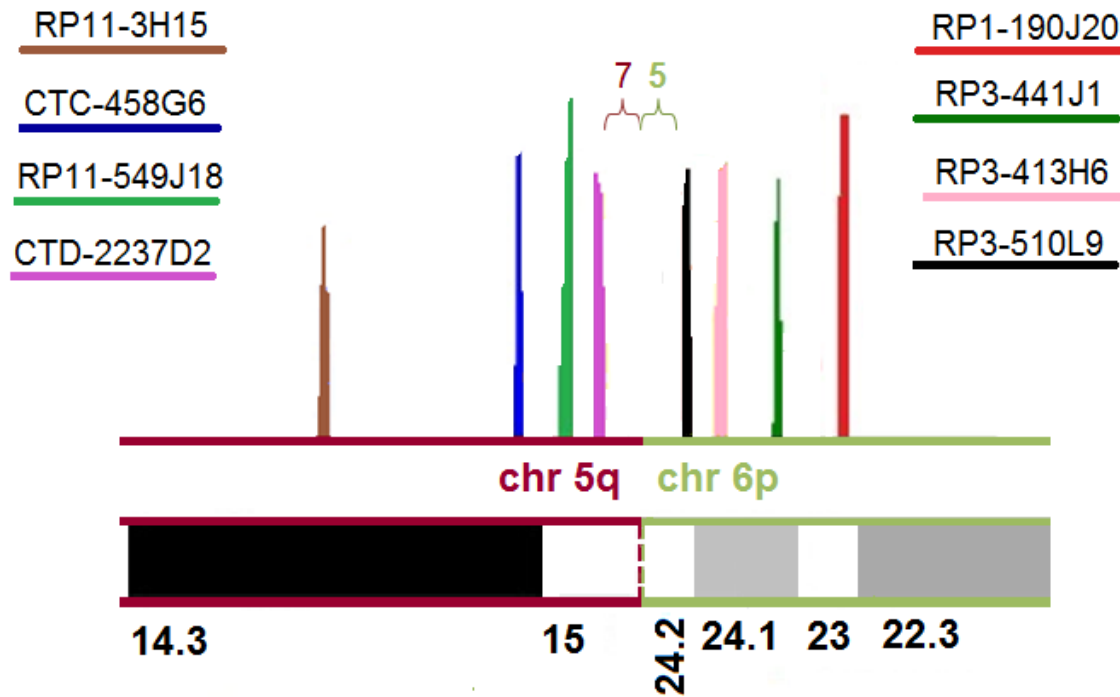


RP11-549J18 – Cy5 (5q15)

RP11-421M1 (6p24.2) - nepřítomen



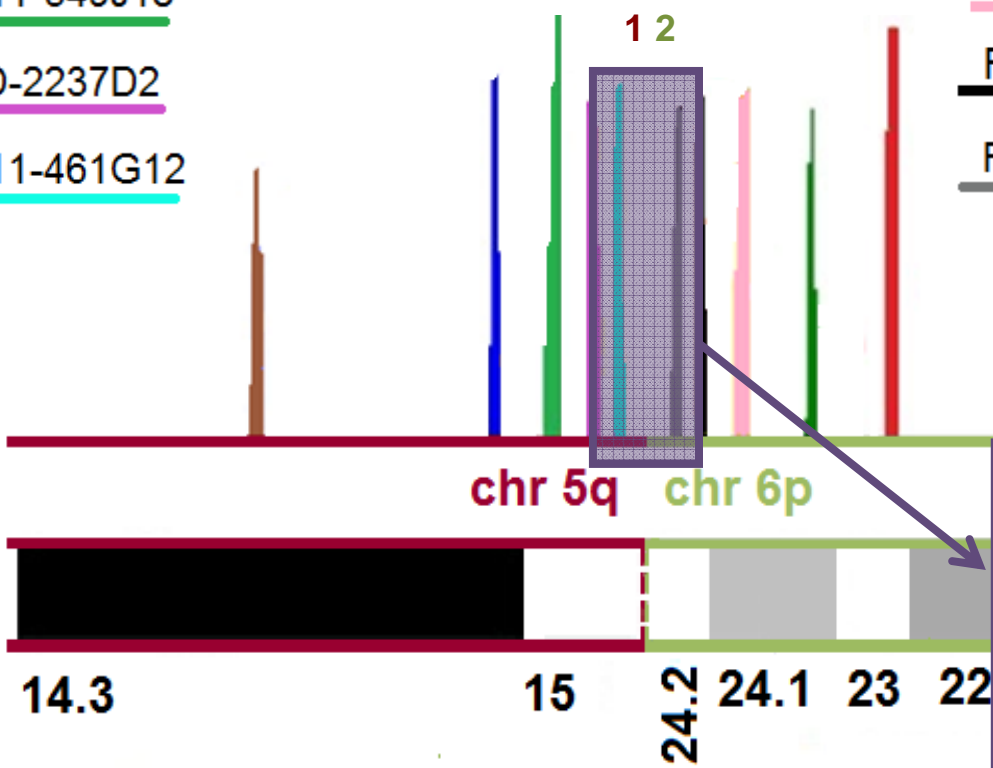
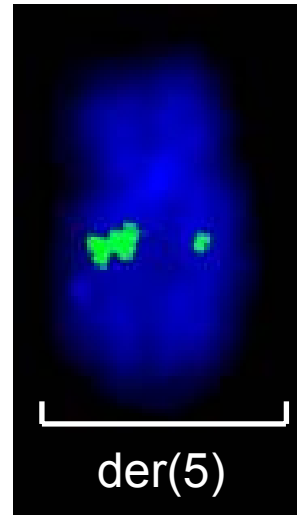
RP3-441J1 – FITC (6p24.1)



CTD-2237D2 – TR (5q15)
 RP3-510L9 – Cy5 (6p24.2)

RP11-3H15
CTC-458G6
RP11-549J18
CTD-2237D2
RP11-461G12

RP1-190J20
RP3-441J1
RP3-413H6
RP3-510L9
RP4-761I2



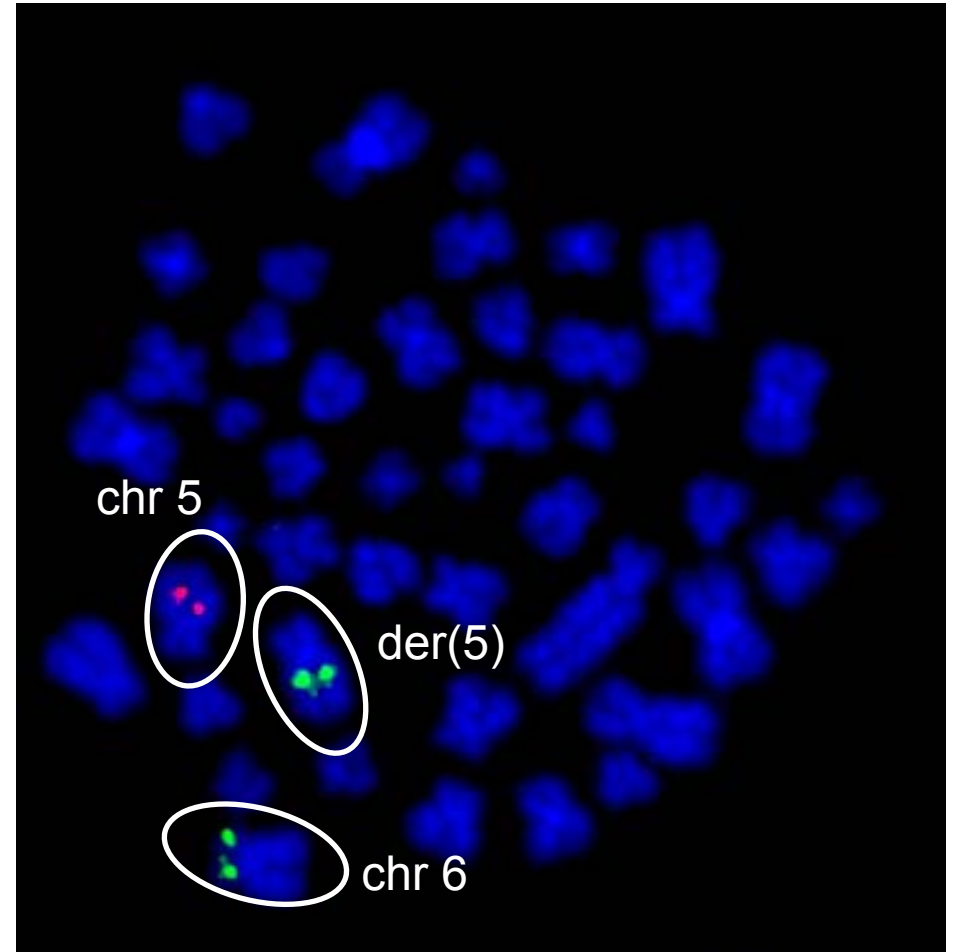
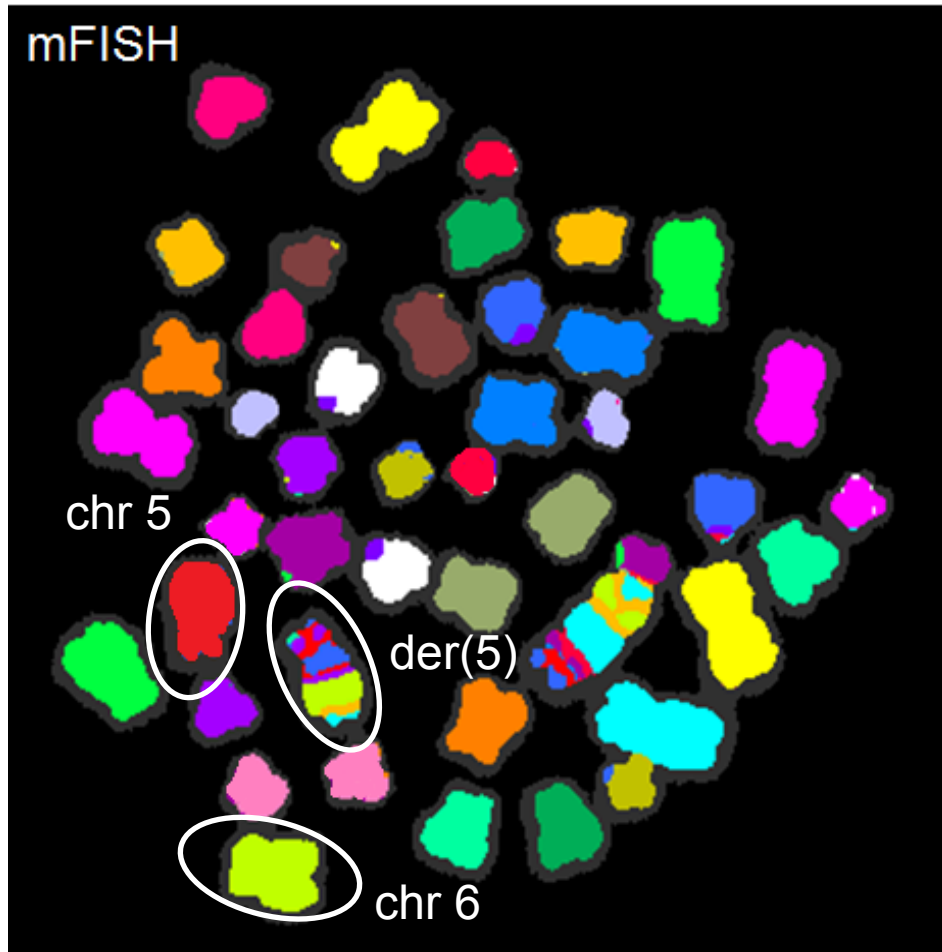
RP11-461G12 – FITC (5q15)
 RP3-417M14 (6p24.2) - nepřítomen



Hybridize BAC sond:

CTC-484P3 (5q15) **TexasRed -**

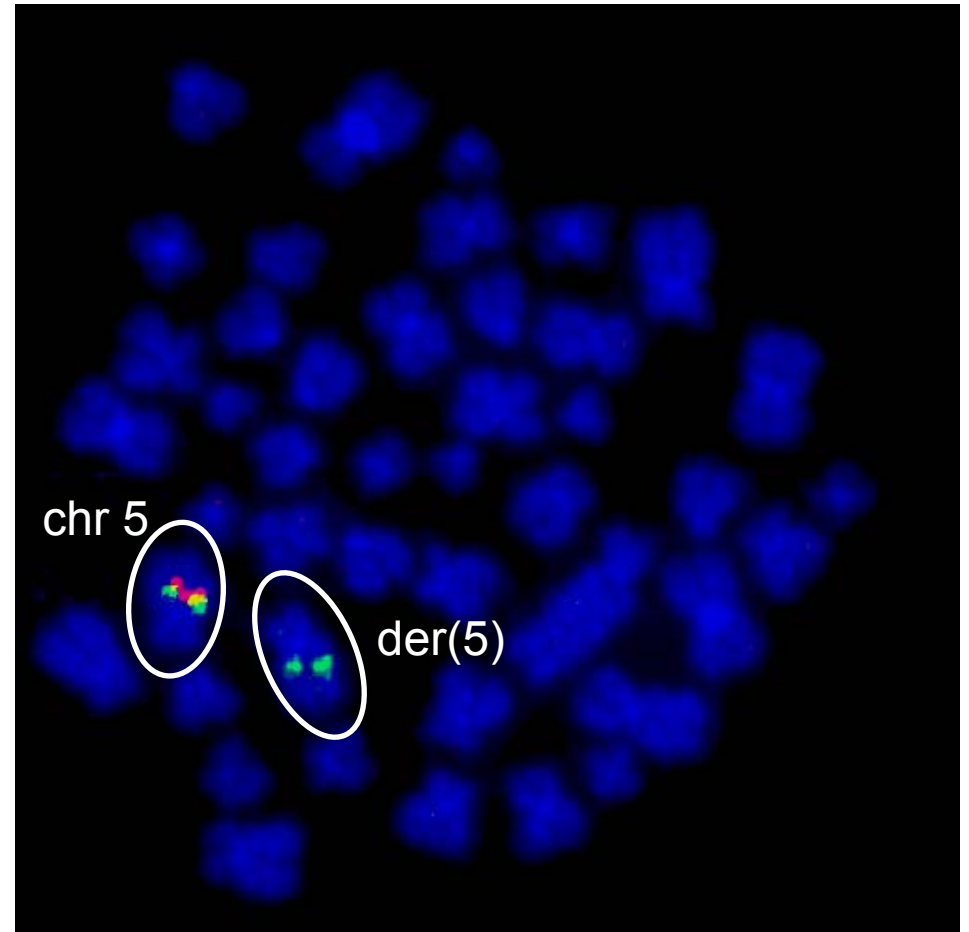
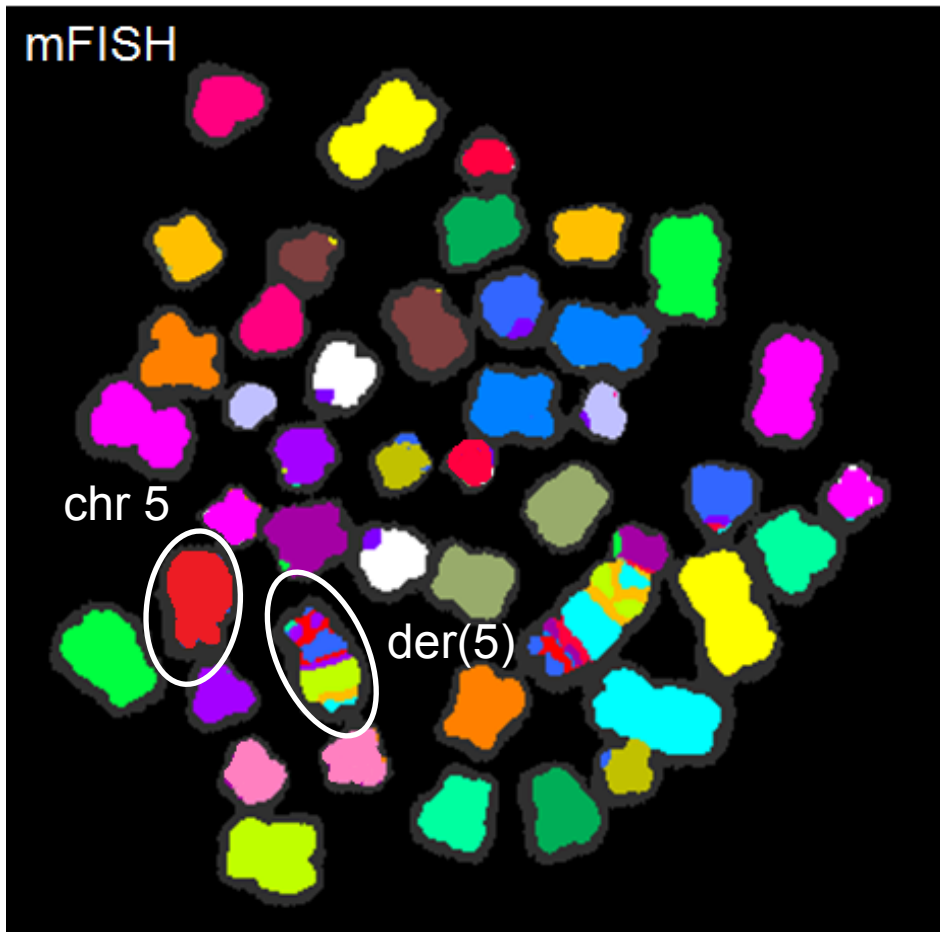
RP4-761I2 (6p24.2) **FITC +**



Hybridize BAC sond:

CTC-303L1 (5q15) **TexasRed -**

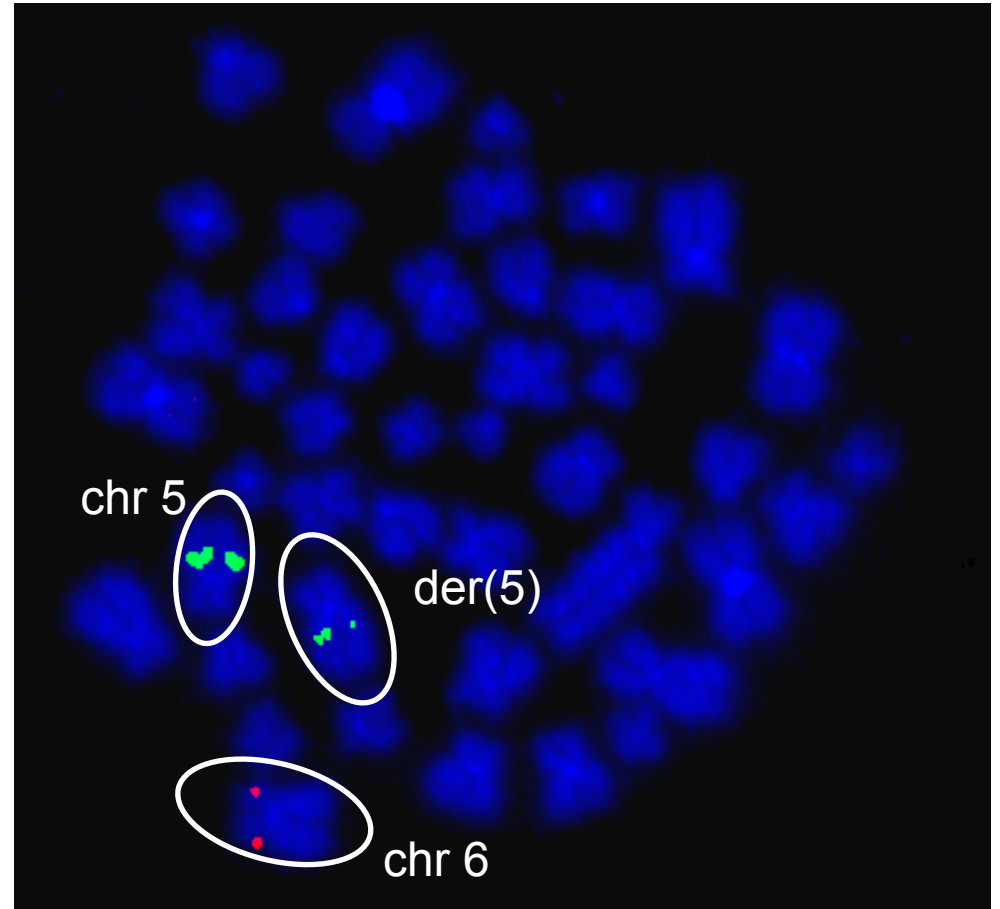
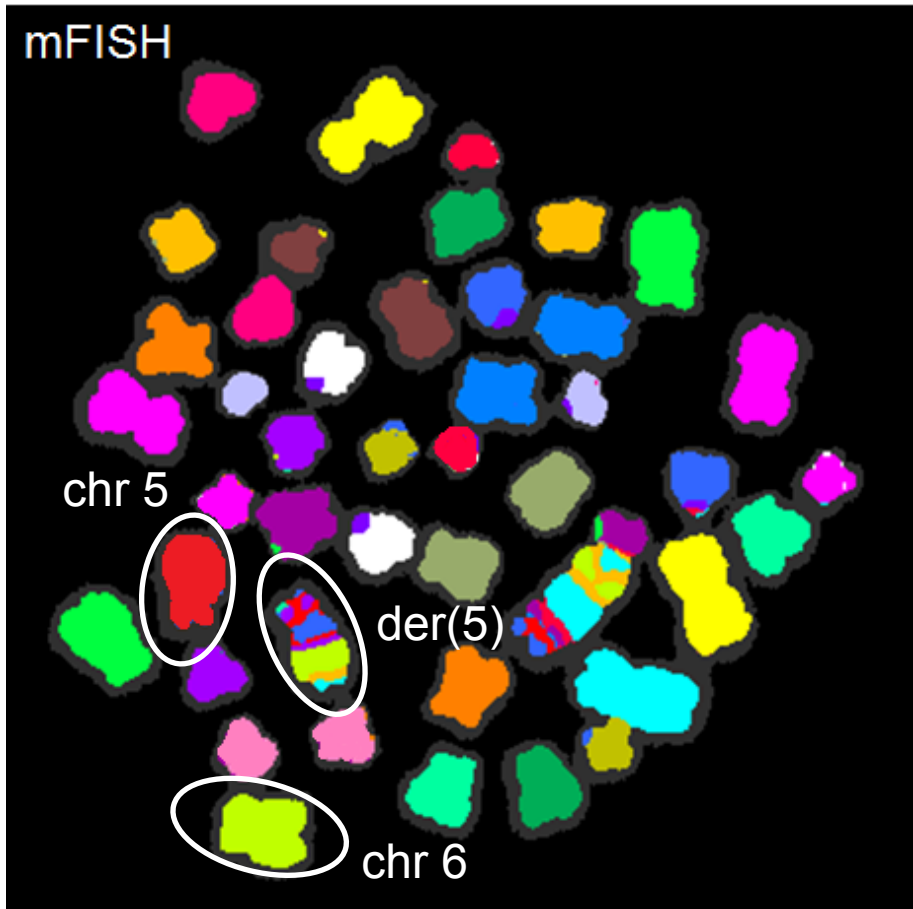
RP11-1015H3 (5q15) **FITC +**



Hybridize BAC sond:

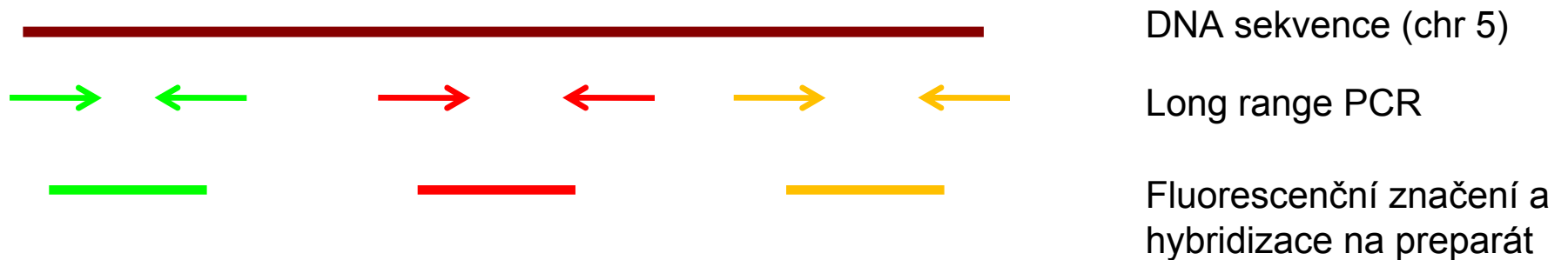
RP3-417M14 (6p24.2) **TexasRed -**

RP11-461G12 (5q15) **FITC +**



Příprava vlastních sond pro chromozom 5

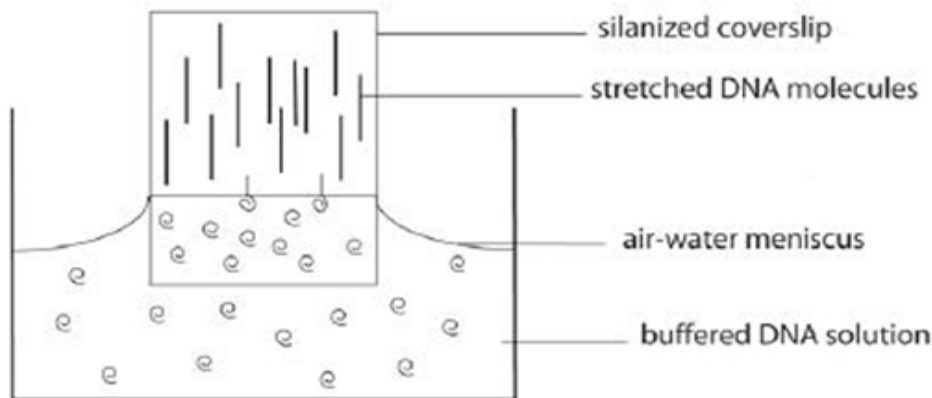
long range PCR



Esej pro real-time PCR

Chromosome combing & FISH na vlákně DNA

- DNA v roztoku, silanizované krycí sklo
- Tah konstantní rychlostí 300 $\mu\text{m/s}$
- Ireverzibilní zachycení nataženého vlákna DNA na silanizovaném krycím skle
- Signály hybridizovaných sond jsou uspořádány za sebou ("beads on a string,,)



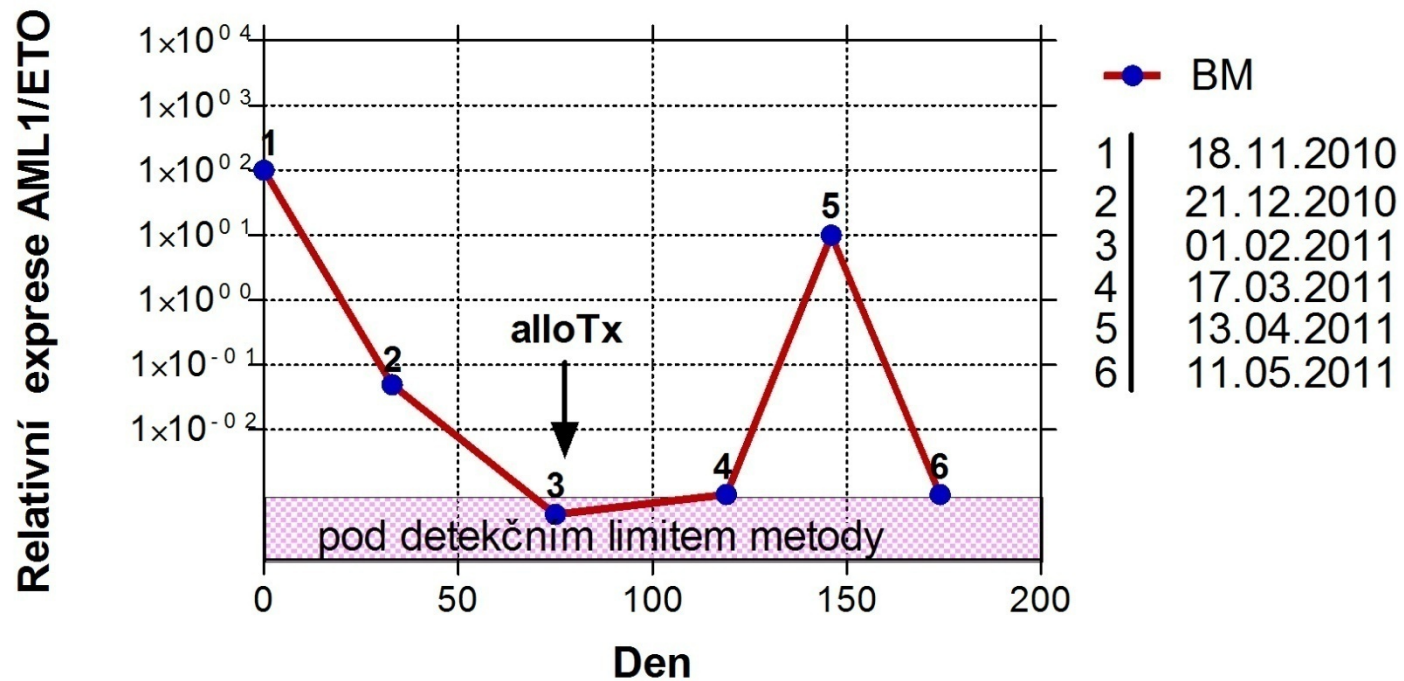
Labit et al. 2008

Fiber-FISH



Finální výstup

Kvantifikace relativní exprese AML1/ETO u AML



Shrnutí

- Identifikace unikátního klon-specifického znaku leukemických blastů – konstrukce molekulární real-time PCR eseje pro sledování MRN
- Personalizovaná medicína – „šitá na míru“

Děkuji za pozornost