

Αρχές μοριακής ανάλυσης

Πανεπιστημιακή Αιματολογική Ογκολογική Μονάδα (ΠΟΑιΜ)
Α' Παιδιατρική Κλινική ΕΚΠΑ

Κατερίνα Κατσιμπάρδη, MD, PhD
Γλεντής Σταύρος, PhD

Κύτταρα και γενετικό υλικό

Διαφορετικοί τύποι κυττάρων στο ανθρώπινο σώμα

Κοινά σημεία και διαφορές γενετικού υλικού των κυττάρων

Το **DNA** είναι πανομοιότυπο σε όλα τα ανθρώπινα κύτταρα
Εξαιρέσεις:

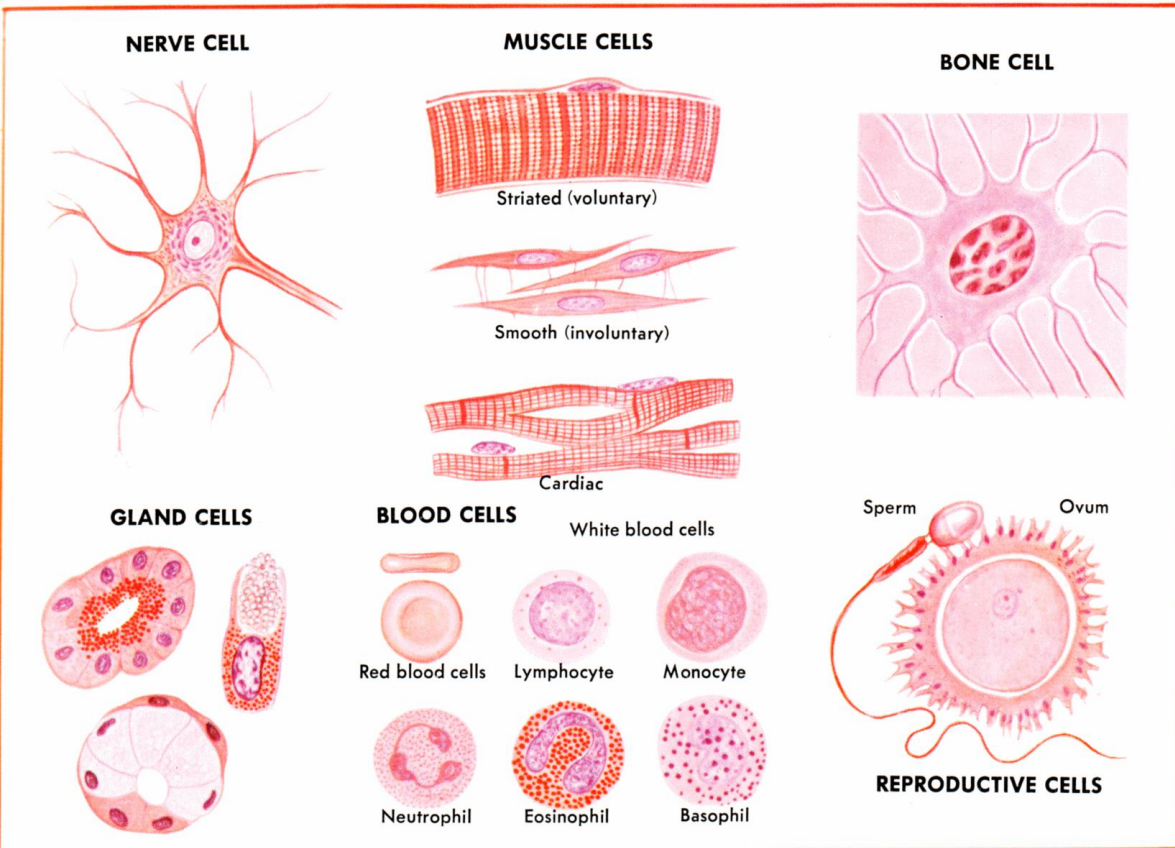
- Αναπαραγωγικά κύτταρα (σπερματοζώαρια, ωάρια)
- Ερυθρά κύτταρα (όχι DNA)
- Σωματικές αναδιατάξεις (V(D)J αναδιάταξη στα γονίδια Ig και TCR στα β- και T- λεμφοκύτταρα)
- Επίκτητες σωματικές μεταλλάξεις
- Καρκινικά κύτταρα

Το **RNA** διαφέρει σε κάθε τύπο κυττάρου

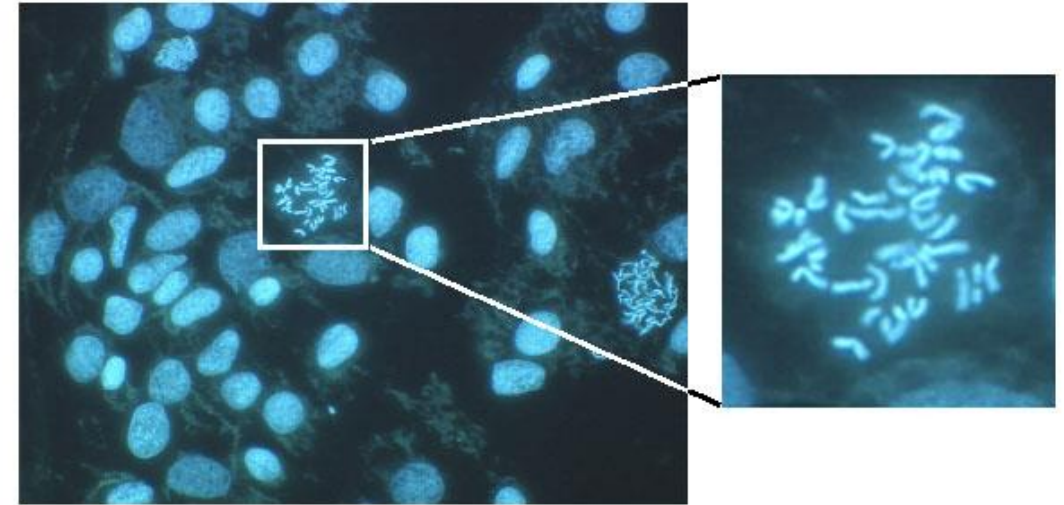
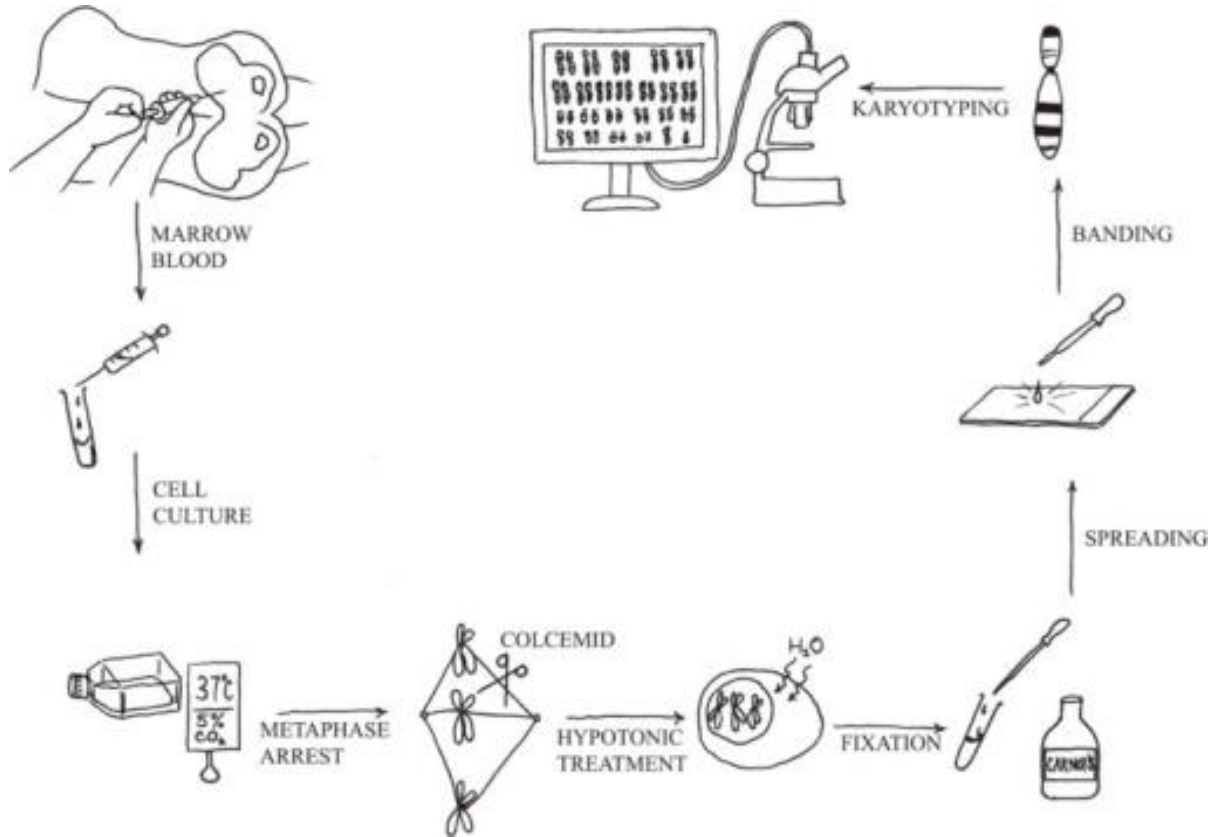
*Διαφορές παρατηρούνται και μεταξύ ίδιων τύπων κυττάρων ή από περιβαλλοντικούς παράγοντες

Η **επιγενετική σήμανση** συνήθως διαφέρει στους τύπους κυττάρων

*Μπορεί να είναι επίκτητη ή κληρονομική



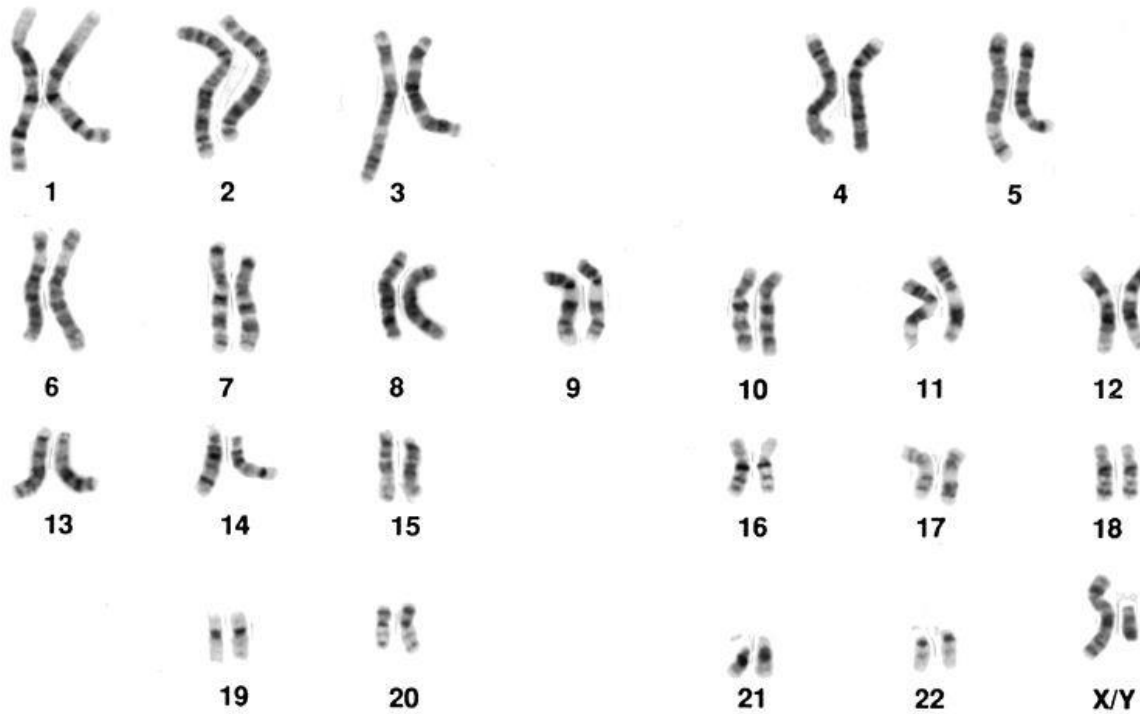
Καρυότυπος



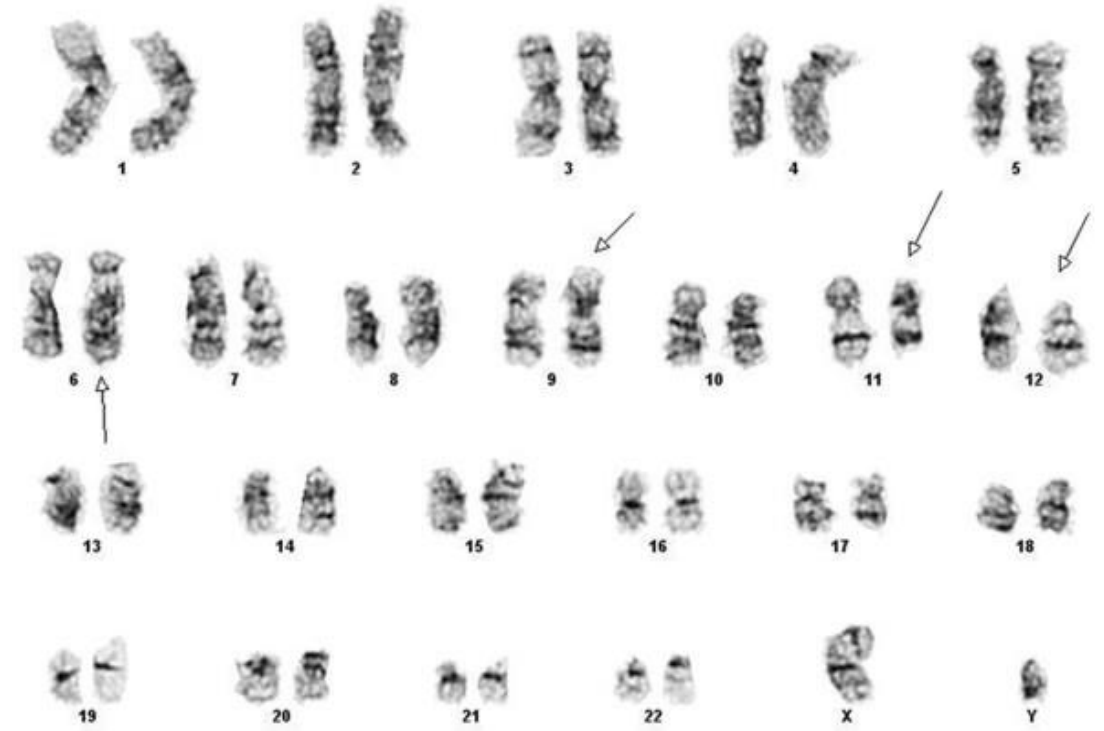
Με τον καρυότυπο ανιχνεύουμε:

- Αριθμητικές ανωμαλίες (πχ. τρισωμία 21)
- Μεγάλες δομικές αλλαγές (ελλείψεις, διπλασιασμοί, αναστροφές, μετατοπίσεις)

Καρυότυπος



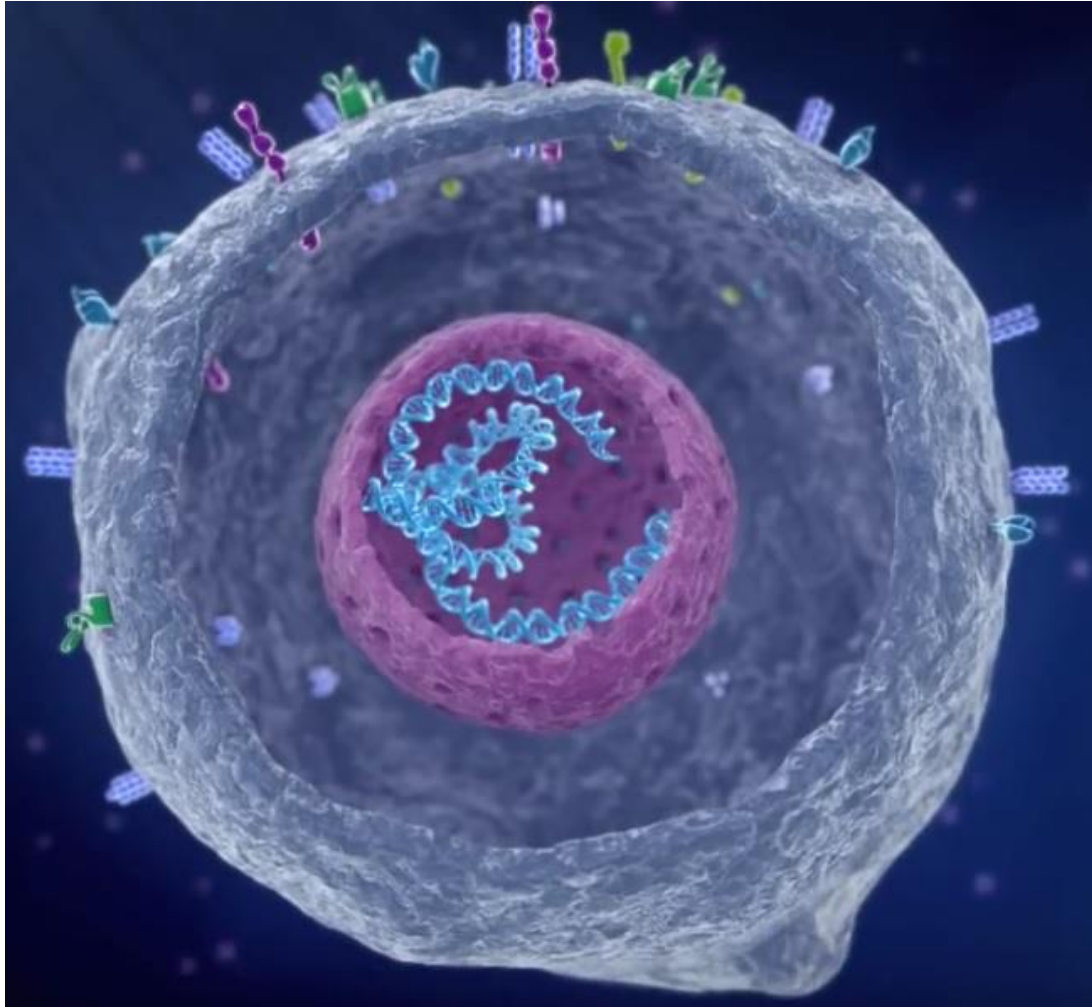
Normal Karyotype: 46,XY



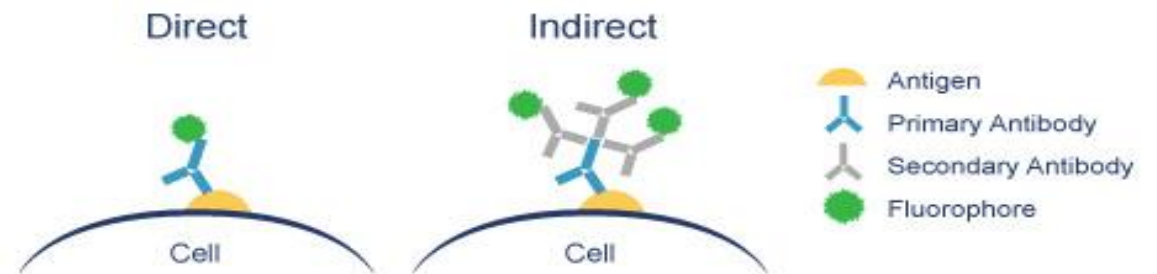
Abnormal Karyotype:

46,XY,ins(6;11)(q27;q23q23),t(9;12),(p24;p11.2)[5]/
46,XY[15].

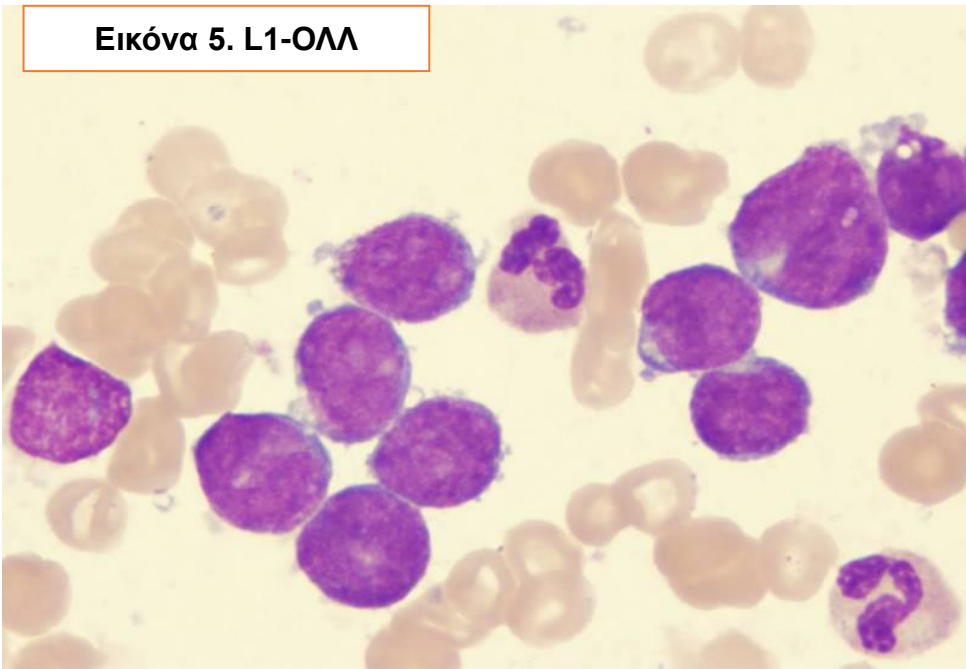
Ανοσο(ϊστο/κυτταρο)χημεία



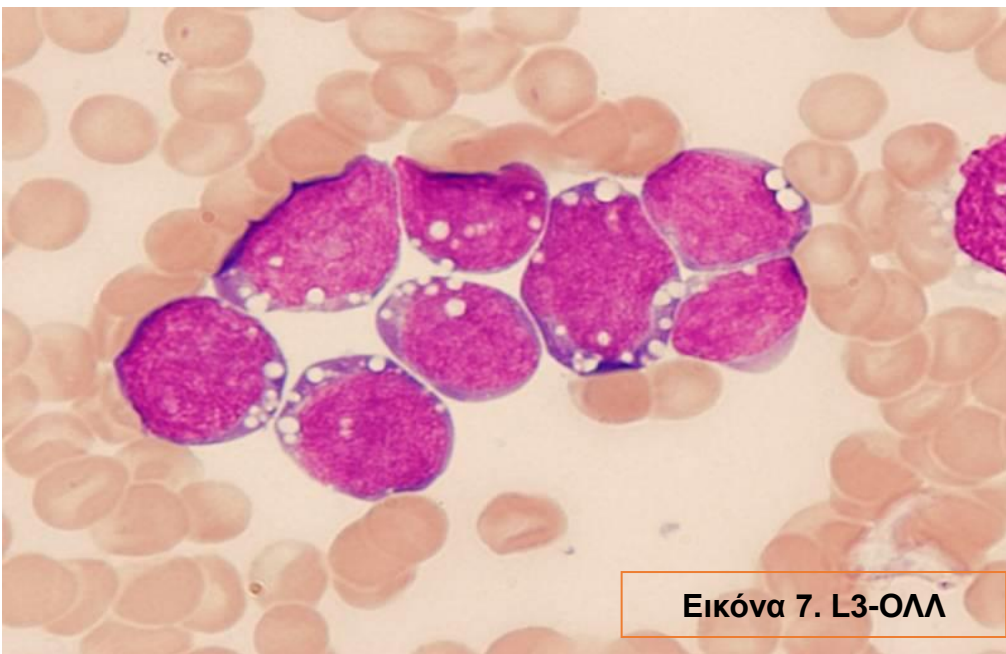
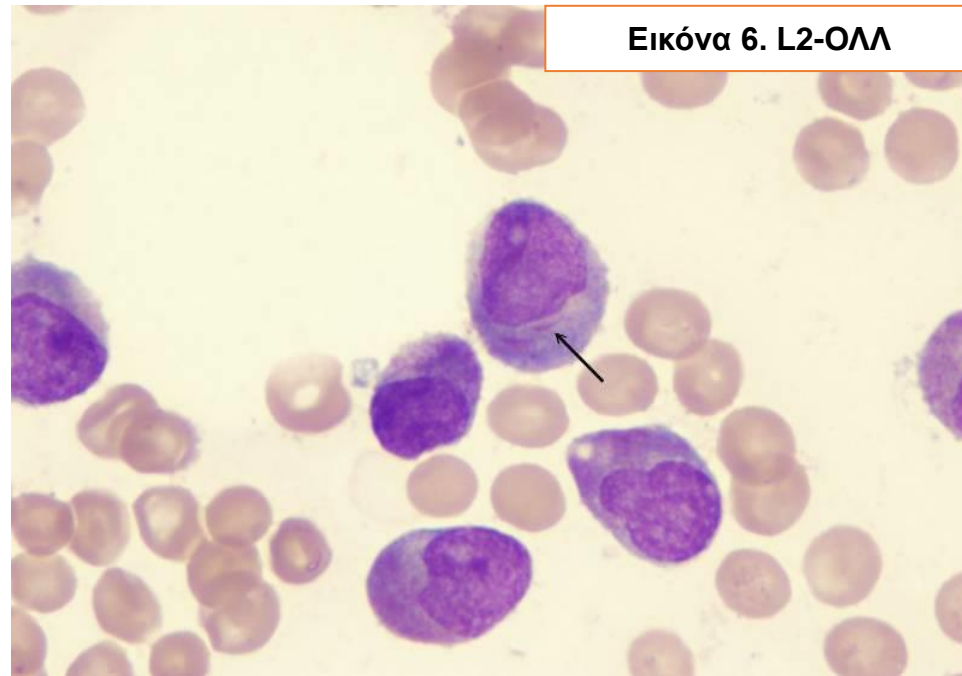
- Εργαστηριακή τεχνική που συνδυάζει ανοσολογία, ιστολογία/κυτταρολογία και χημεία.
- Χρησιμοποιούνται αντισώματα για την ανίχνευση πρωτεϊνών (αντιγόνων) στα κύτταρα.
- Εφόσον το αντιγόνο είναι παρών στο κύτταρο δημιουργείται σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος
- Τα αντισώματα φέρουν φθορίζουσα ουσία και επομένως το σύμπλεγμα γίνεται ορατό μετά την χημική αντίδραση



Εικόνα 5. L1-ΟΑΛ



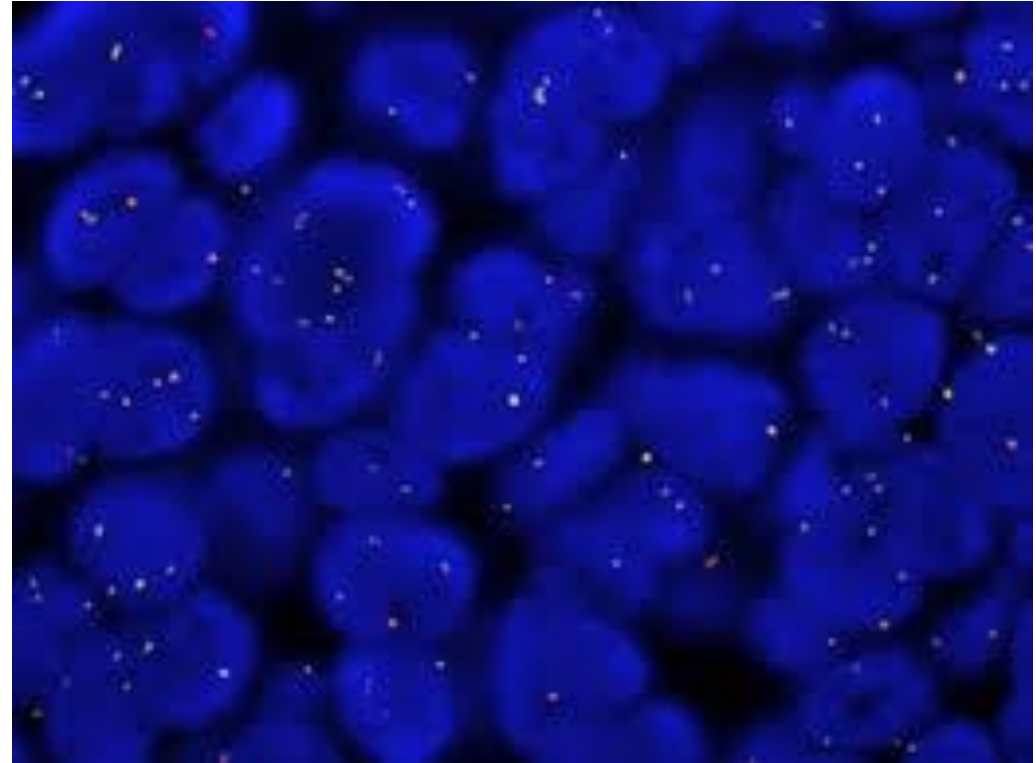
Εικόνα 6. L2-ΟΑΛ



Εικόνα 7. L3-ΟΑΛ

Επίχρισμα μυελού των οστών. Χρώση Wright-Giemsa, 1000x.

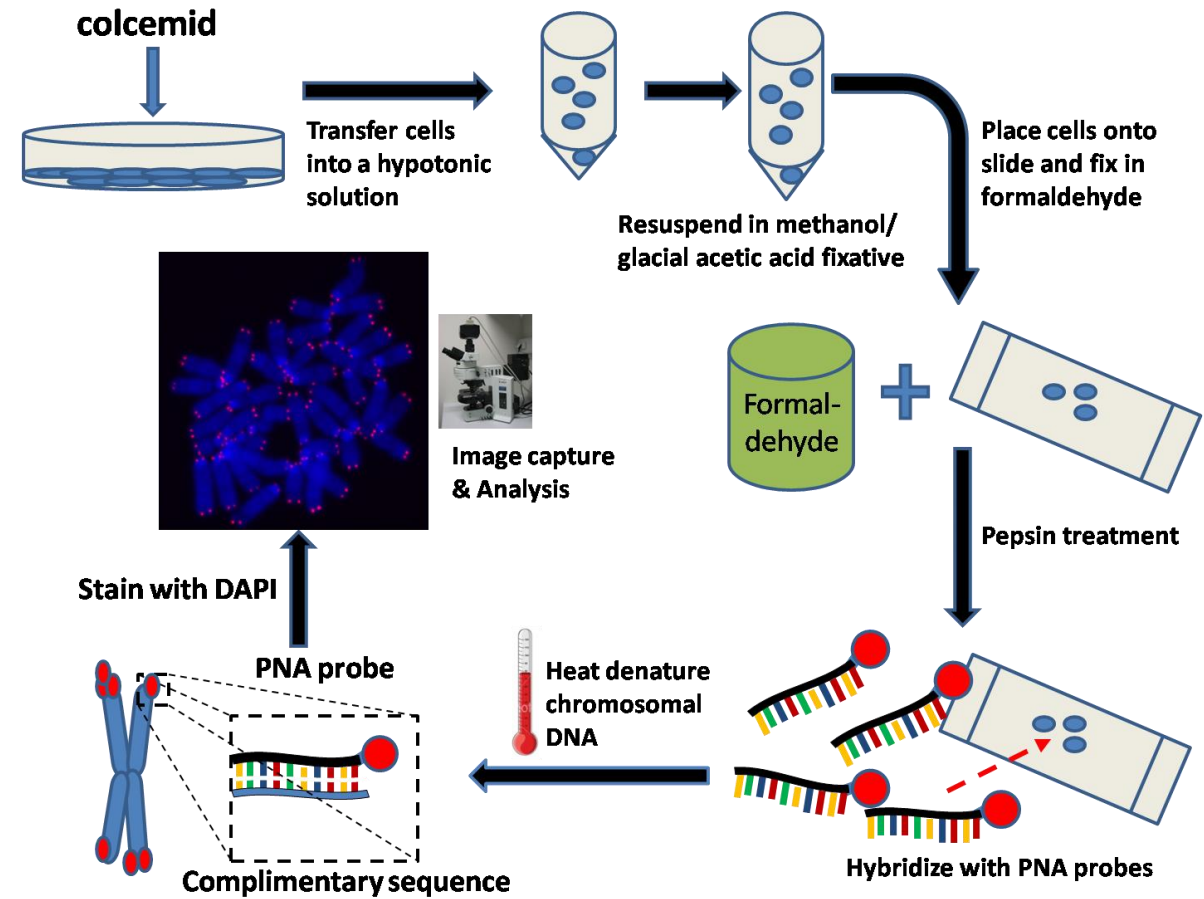
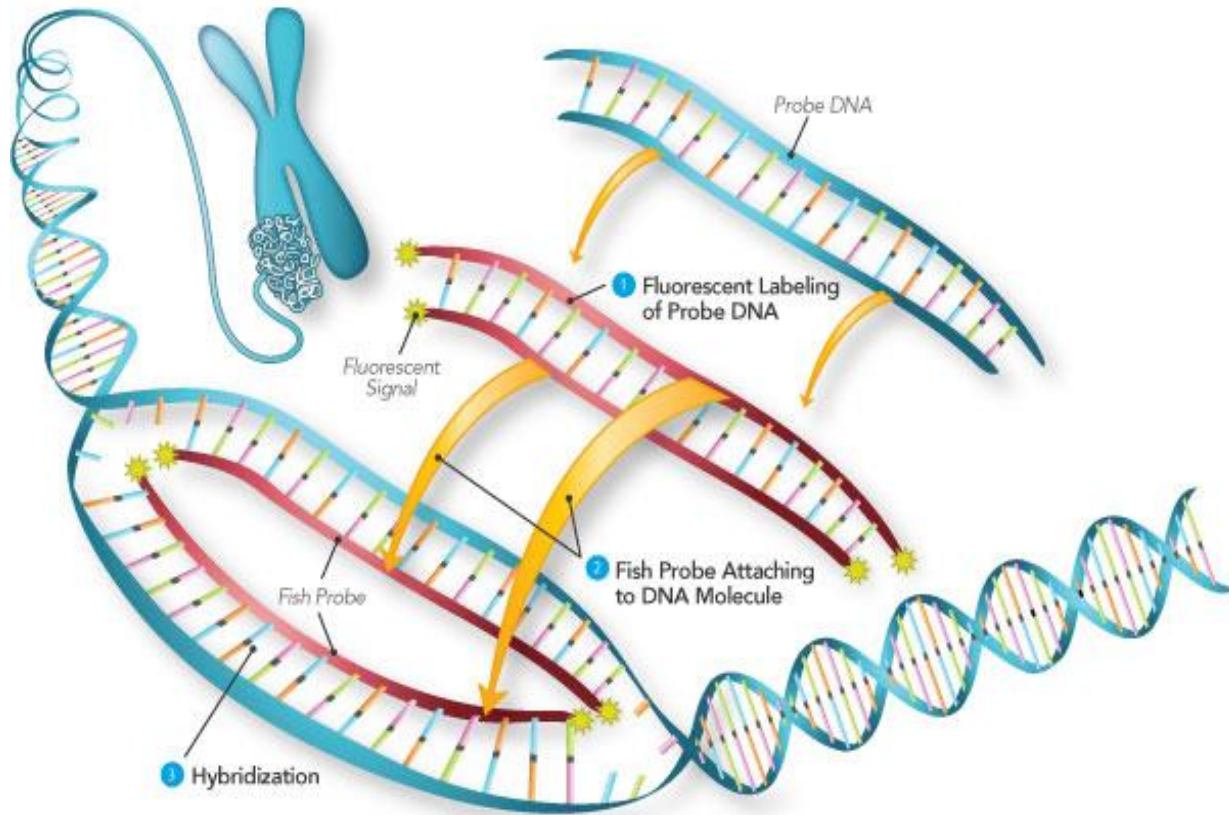
Φθορίζων in situ υβριδισμός (FISH)

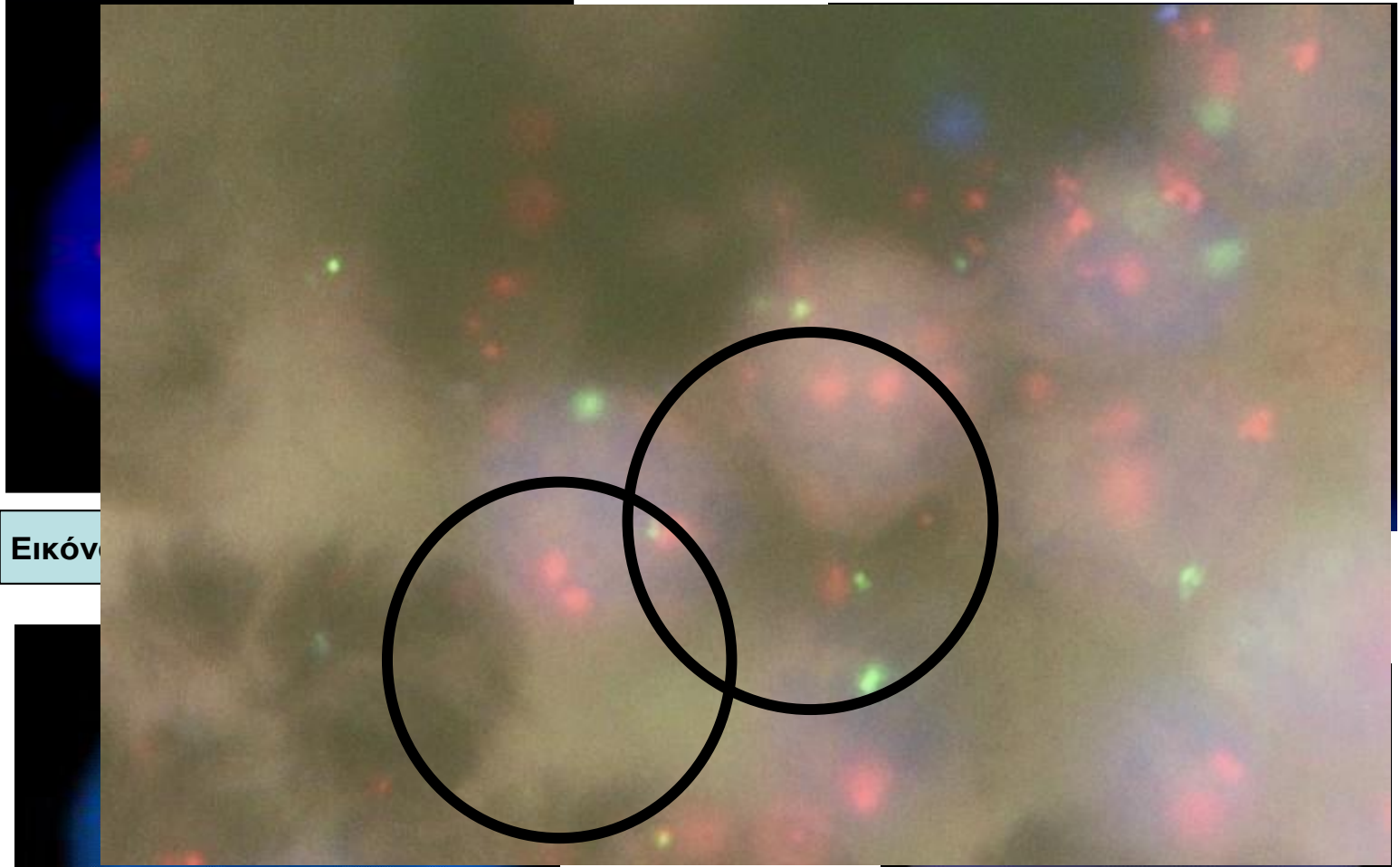


Με την τεχνική FISH βλέπουμε:

- Αριθμητικές ανωμαλίες (πχ. τρισωμία 21)
- Στοχευμένες δομικές αλλαγές (μεταθέσεις)

Φθορίζων in situ υβριδισμός (FISH)

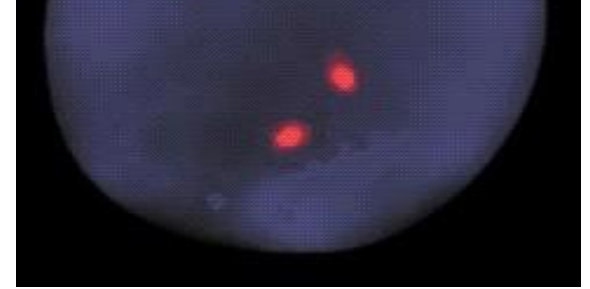




Εικόνα



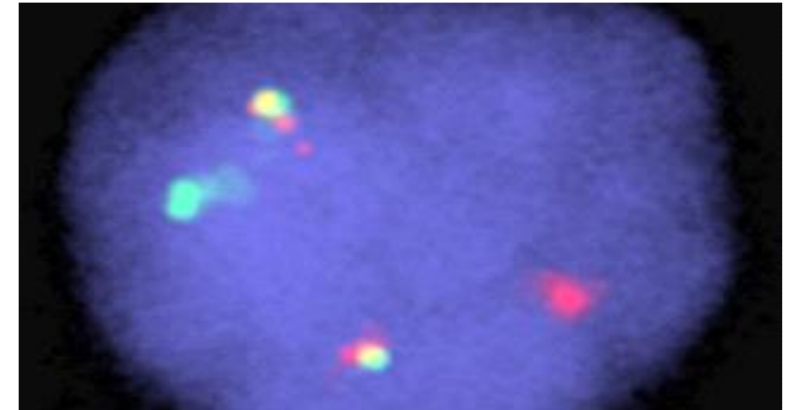
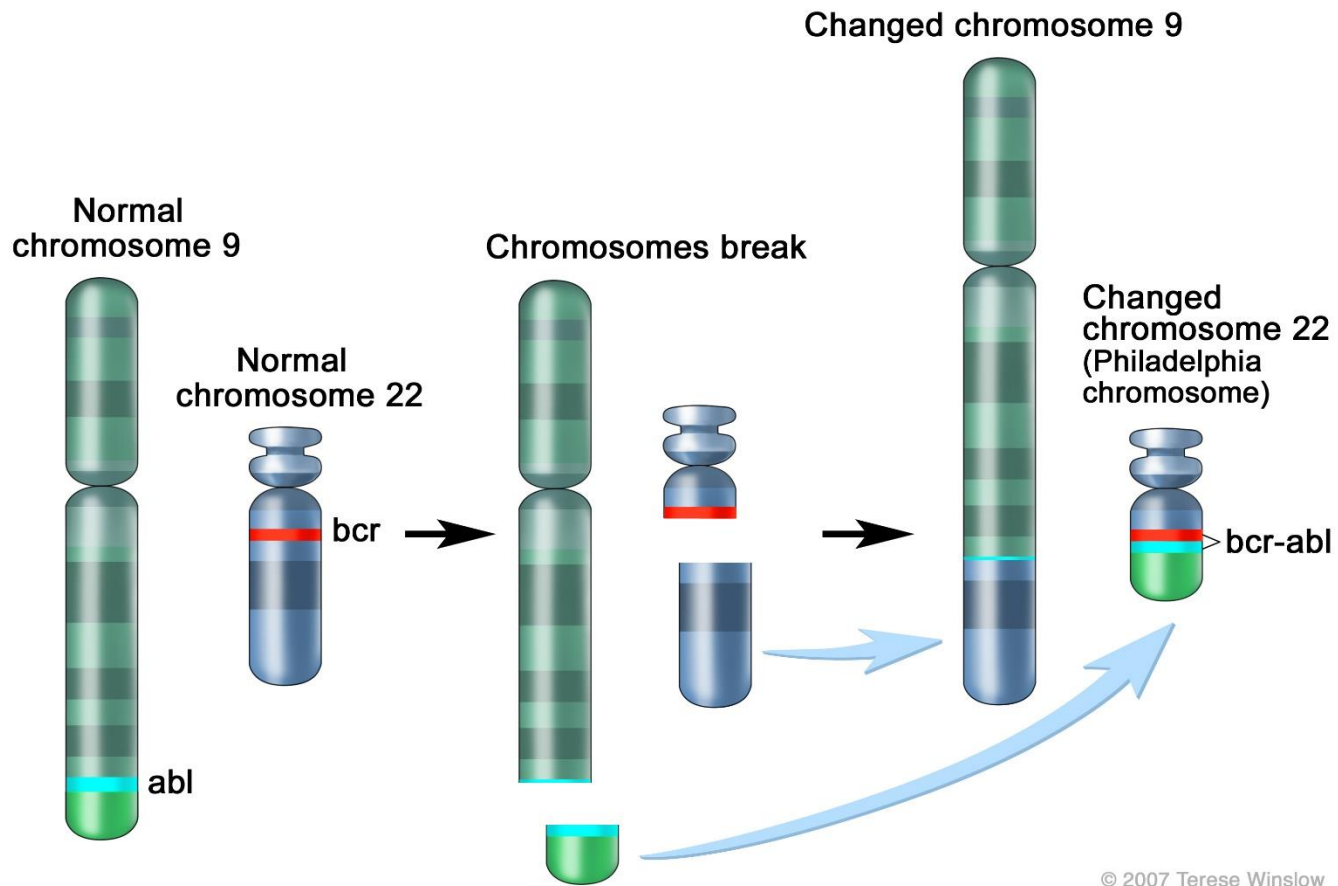
Εικόνα 45. υπερεκπροσώπηση *AML1*



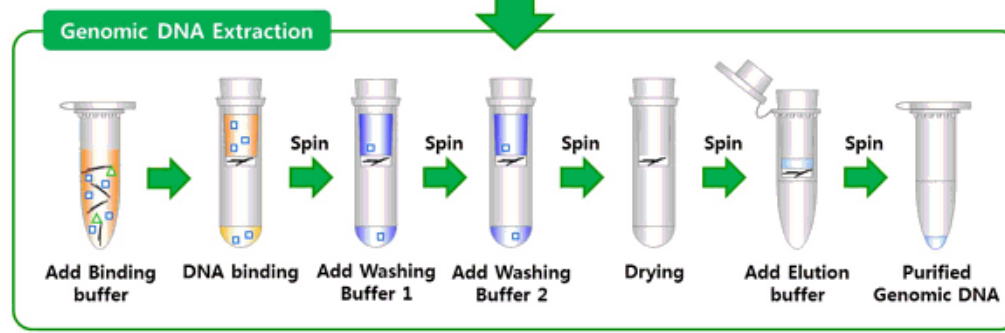
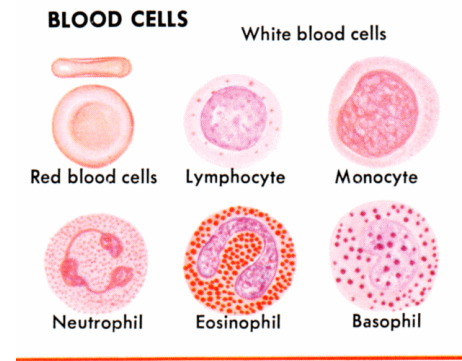
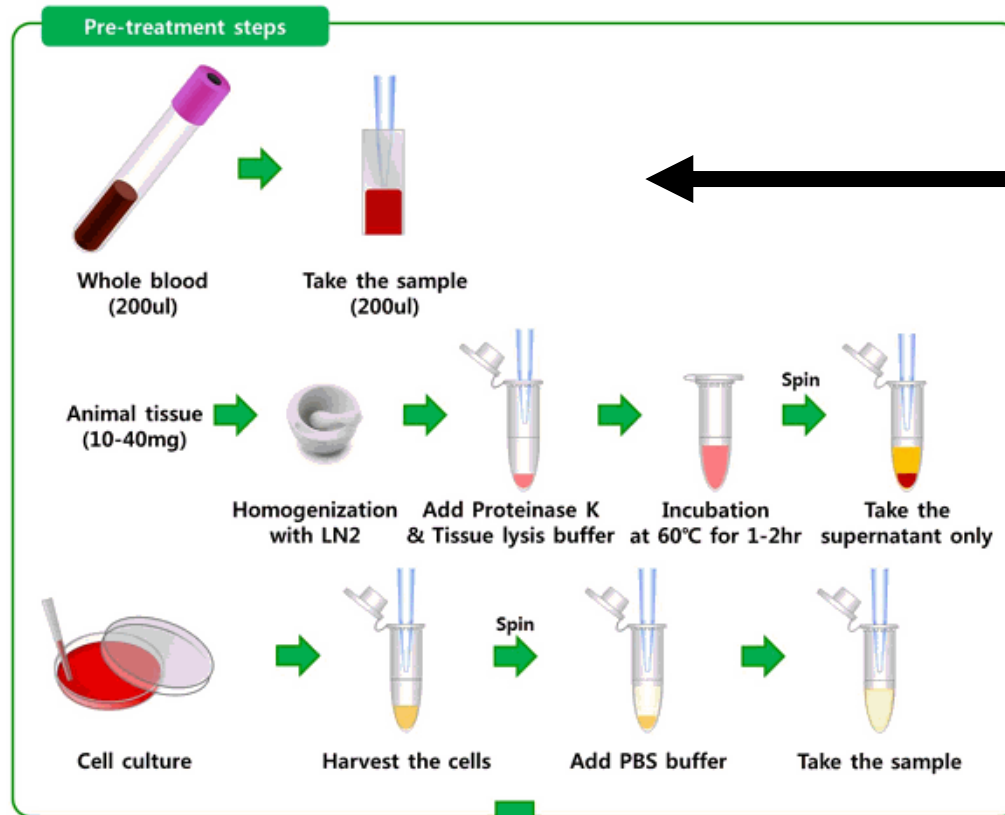
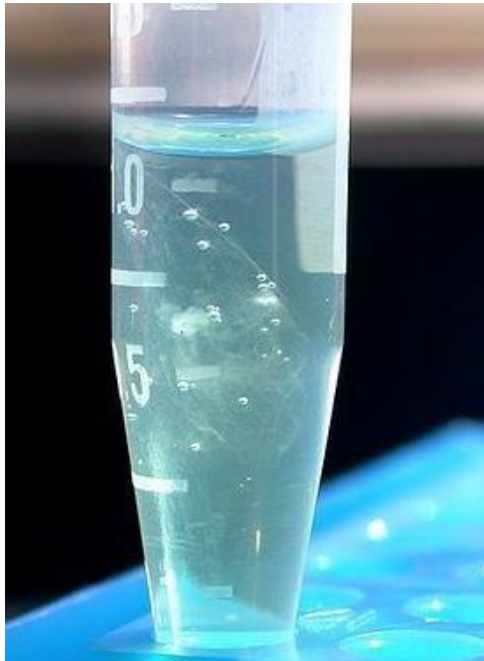
Εικόνα 46. *TEL/AML1 (+)*
έλλειμμα *TEL*

Chr12: Green colour
Chr21: Red colour

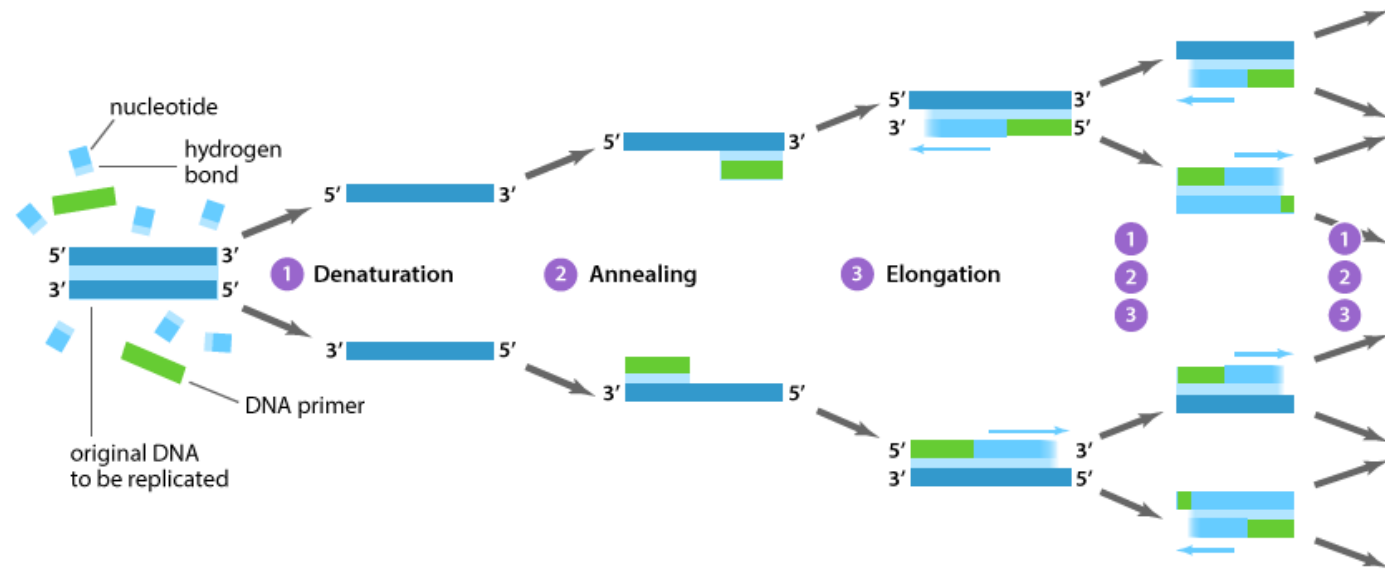
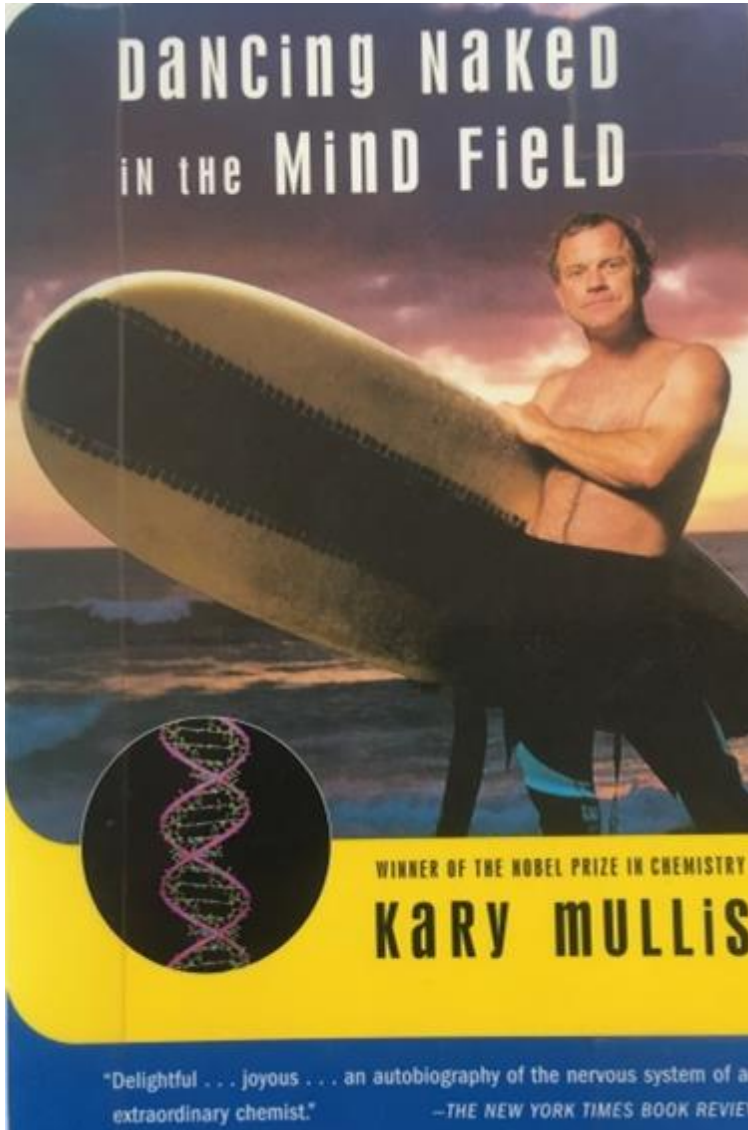
Σύντηξη γονιδίων BCR-ABL1

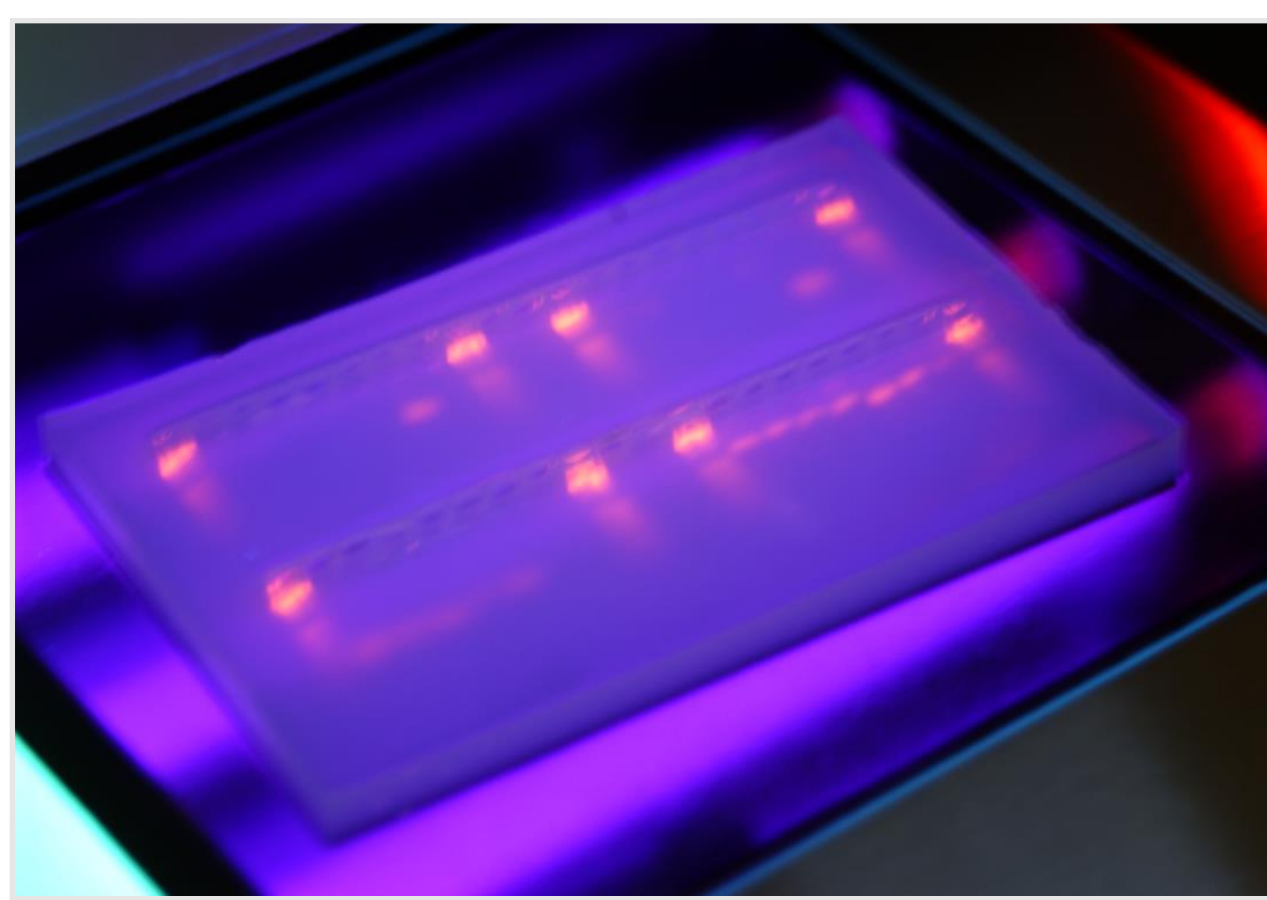
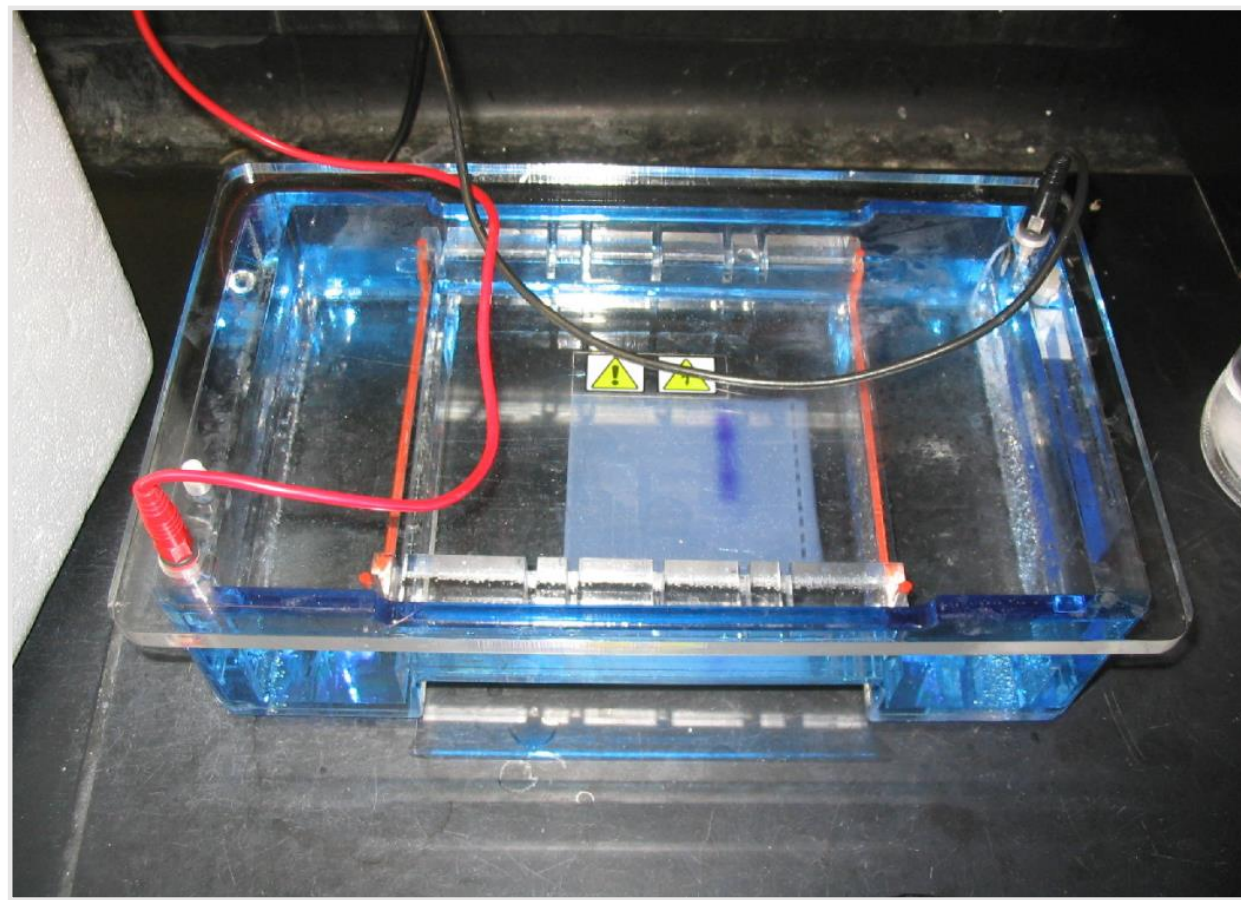


Απομόνωση γενετικού υλικού (DNA/RNA)



Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)



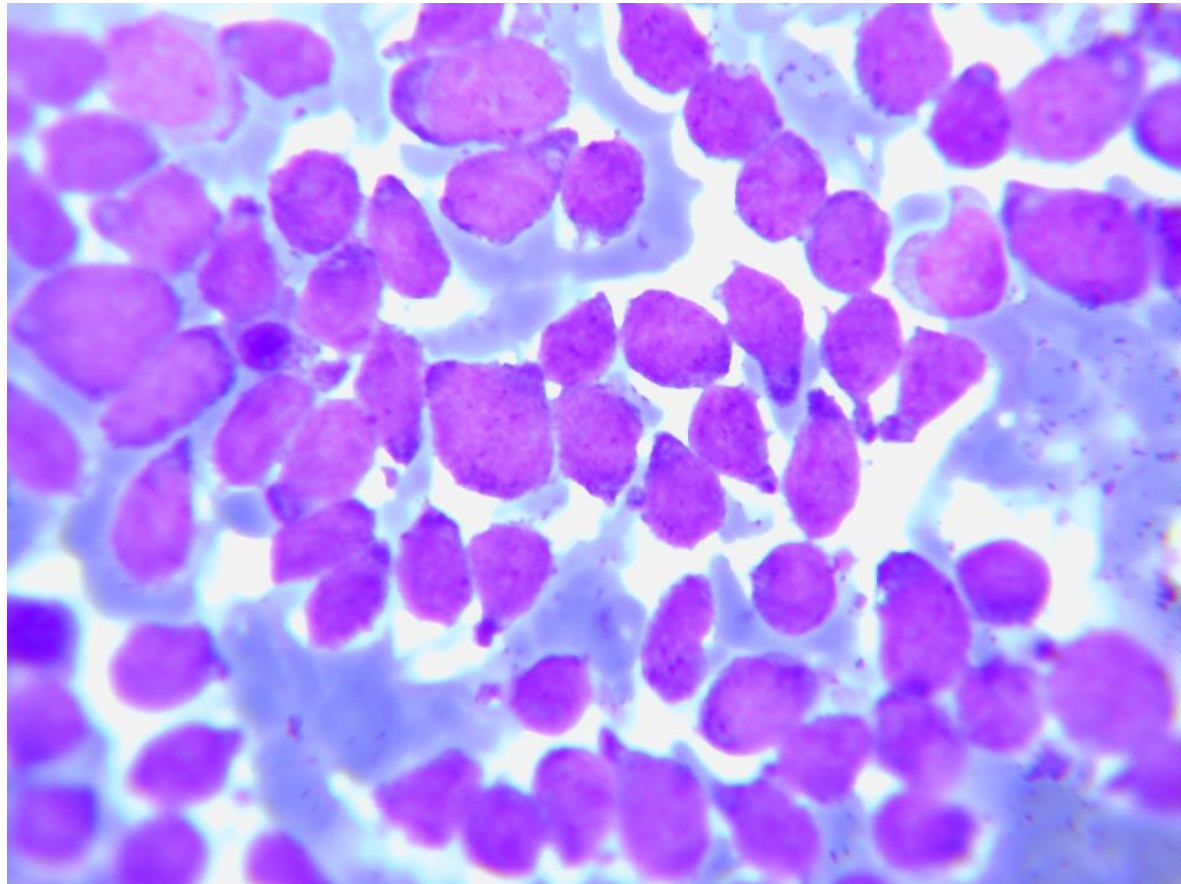


Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης

Εφαρμογή PCR στη μελέτη της ΟΛΛ

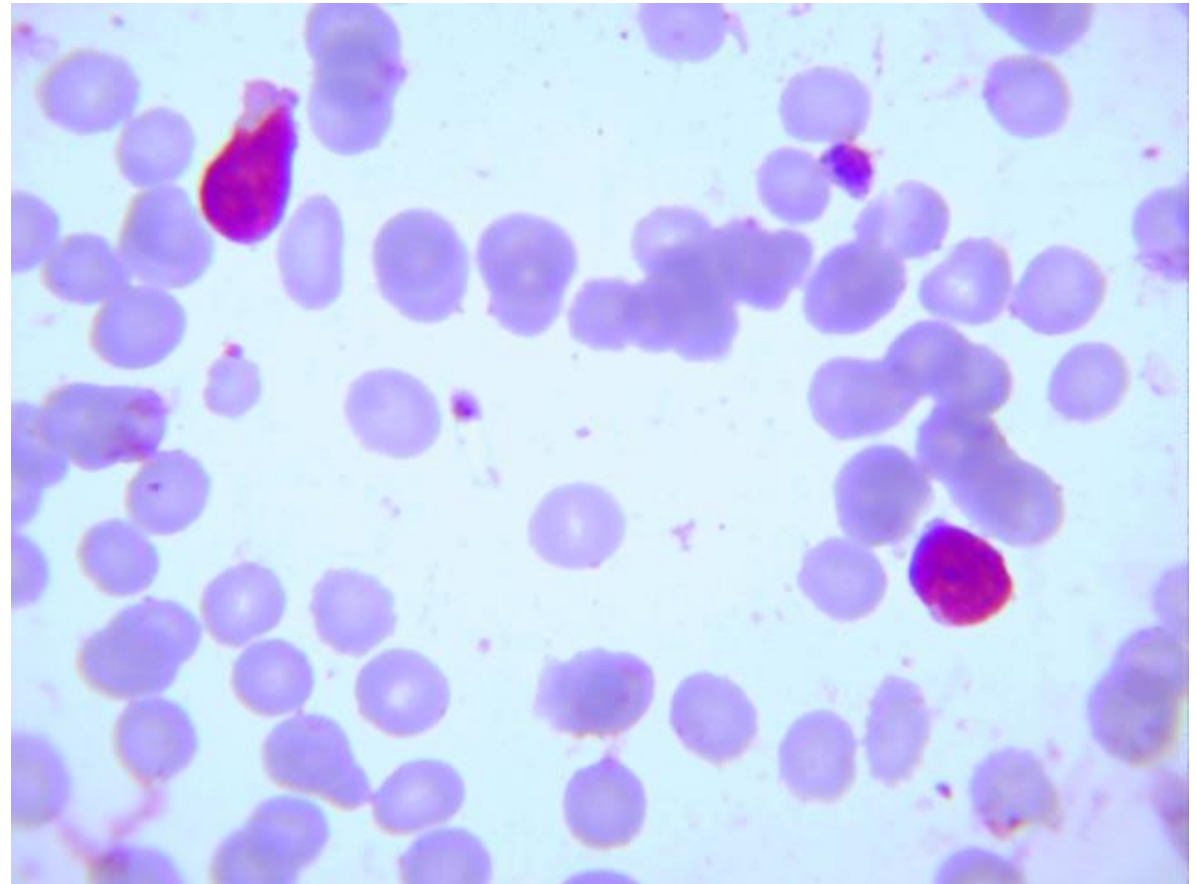
Διάγνωση: 10^{12} - 10^{13} λευχαιμικά κύτταρα

Βλάστες στο μυελόγραμμα: 25-90%

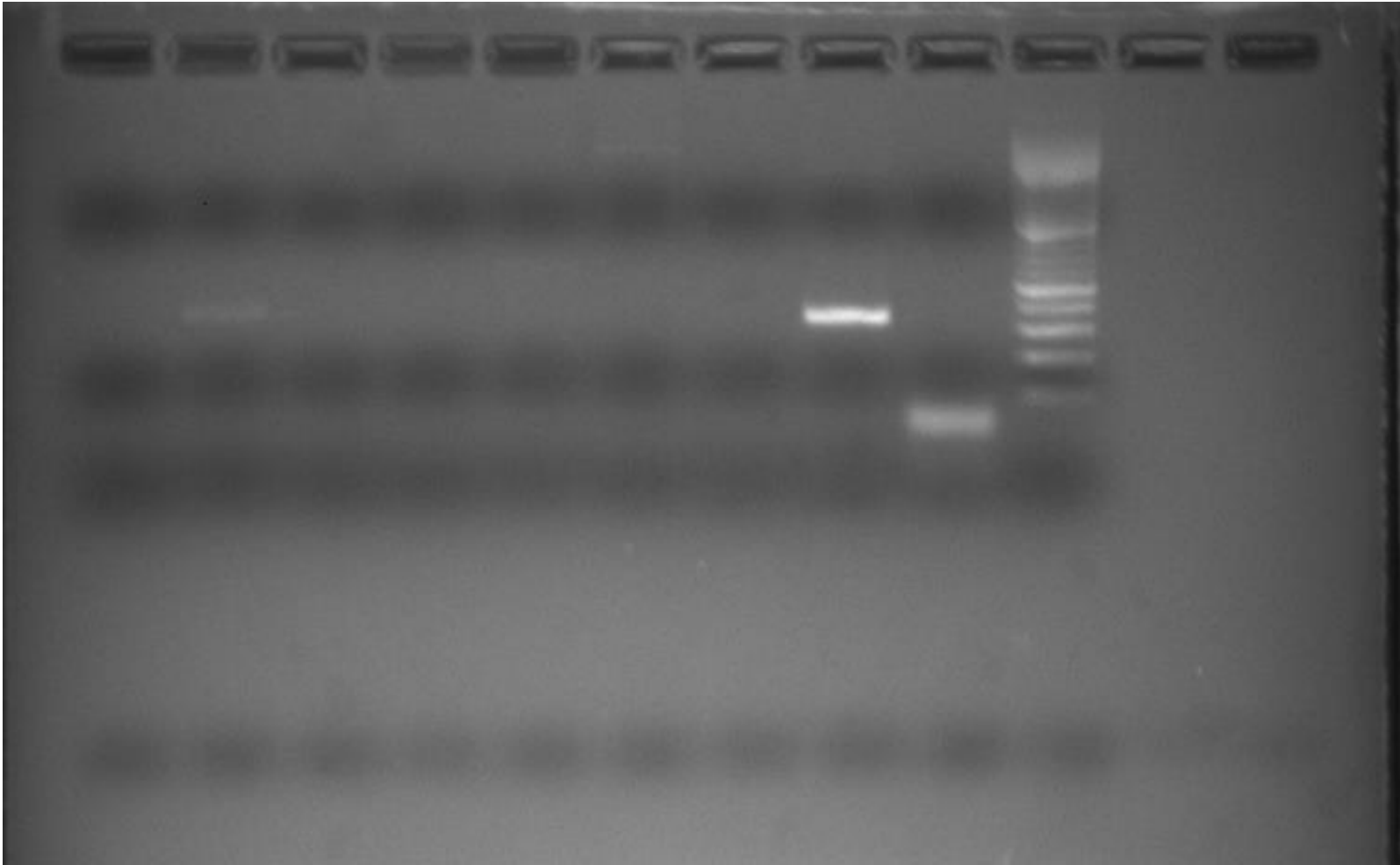


Τέλος εφόδου: 10^{10} λευχαιμικά κύτταρα

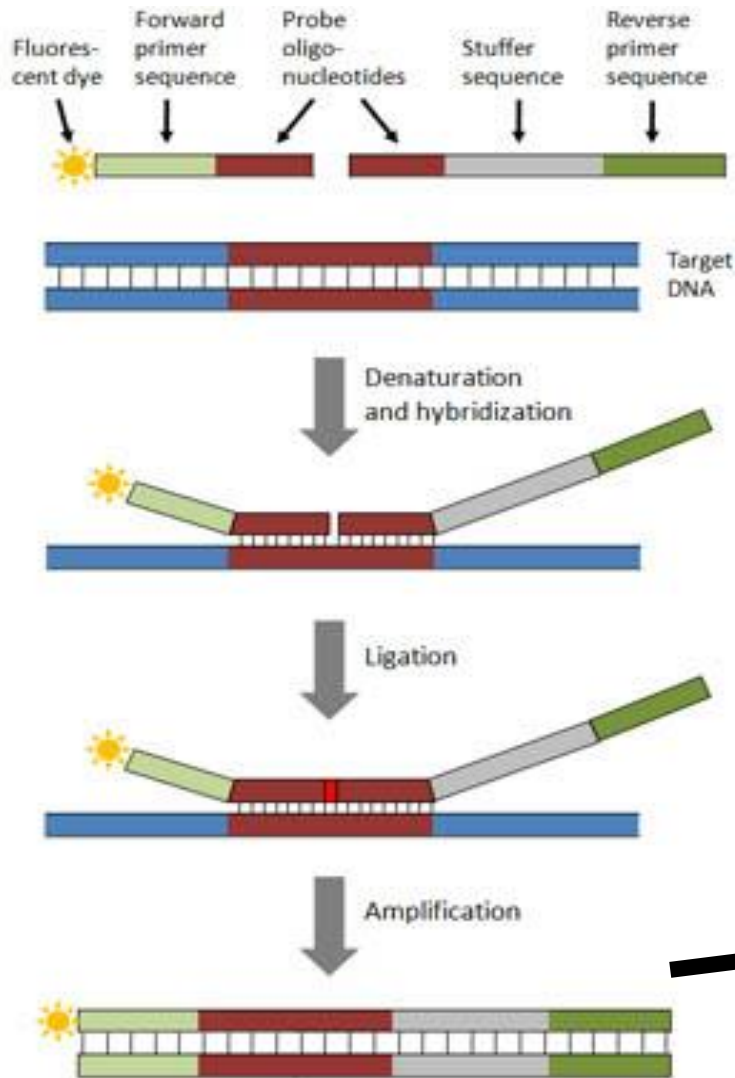
Βλάστες στο μυελόγραμμα: 1-5%



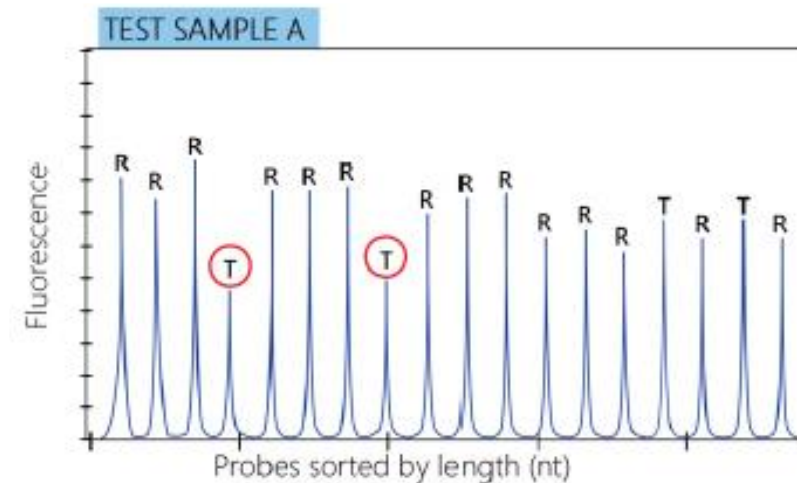
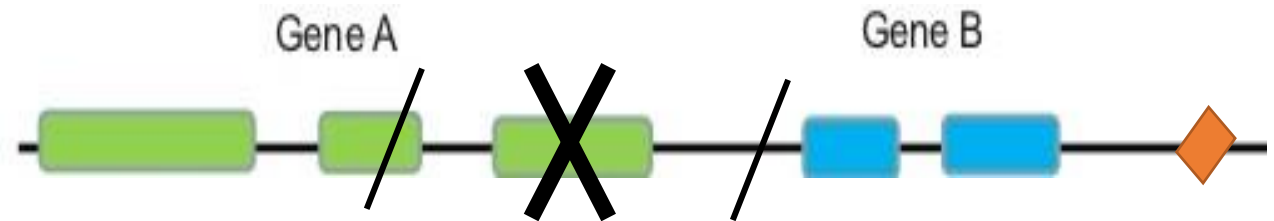
VH1 VH2 VH3 VH4a VH4b VH5 VH6 + - Marker



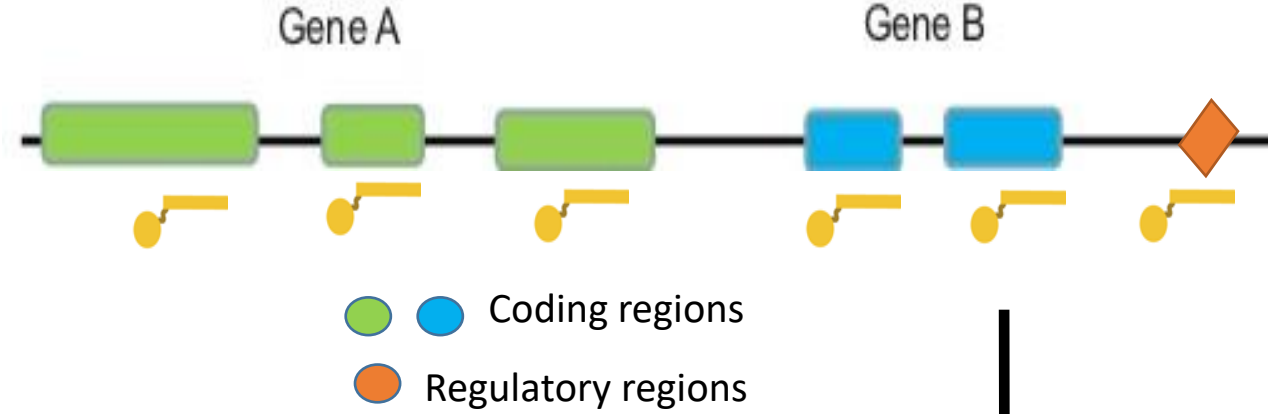
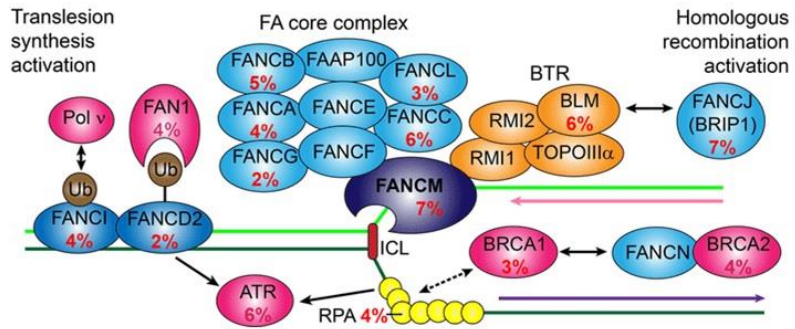
Multiplex – Ligation – Dependent Probe Amplification (MLPA)



- Ανιχνεύει συγκεκριμένες προσθήκες ή ελλείψεις στο DNA, ανάλογα με τον σχεδιασμό του πειράματος



Next Generation Sequencing (NGS)



Single nucleotide variant (SNV)

Reference Genome: ATTGCGATCGAGCCCG
 Sequenced region : ATTGCTATCGAGCCCG

Insertion or deletion (Indel)

Reference Genome: ATTGCGATCGAGCCCG
 Sequenced region : ATTGC -- TCGAGCCCG

Copy number variant (CNV)

Reference Genome : 
 Sequenced region : 

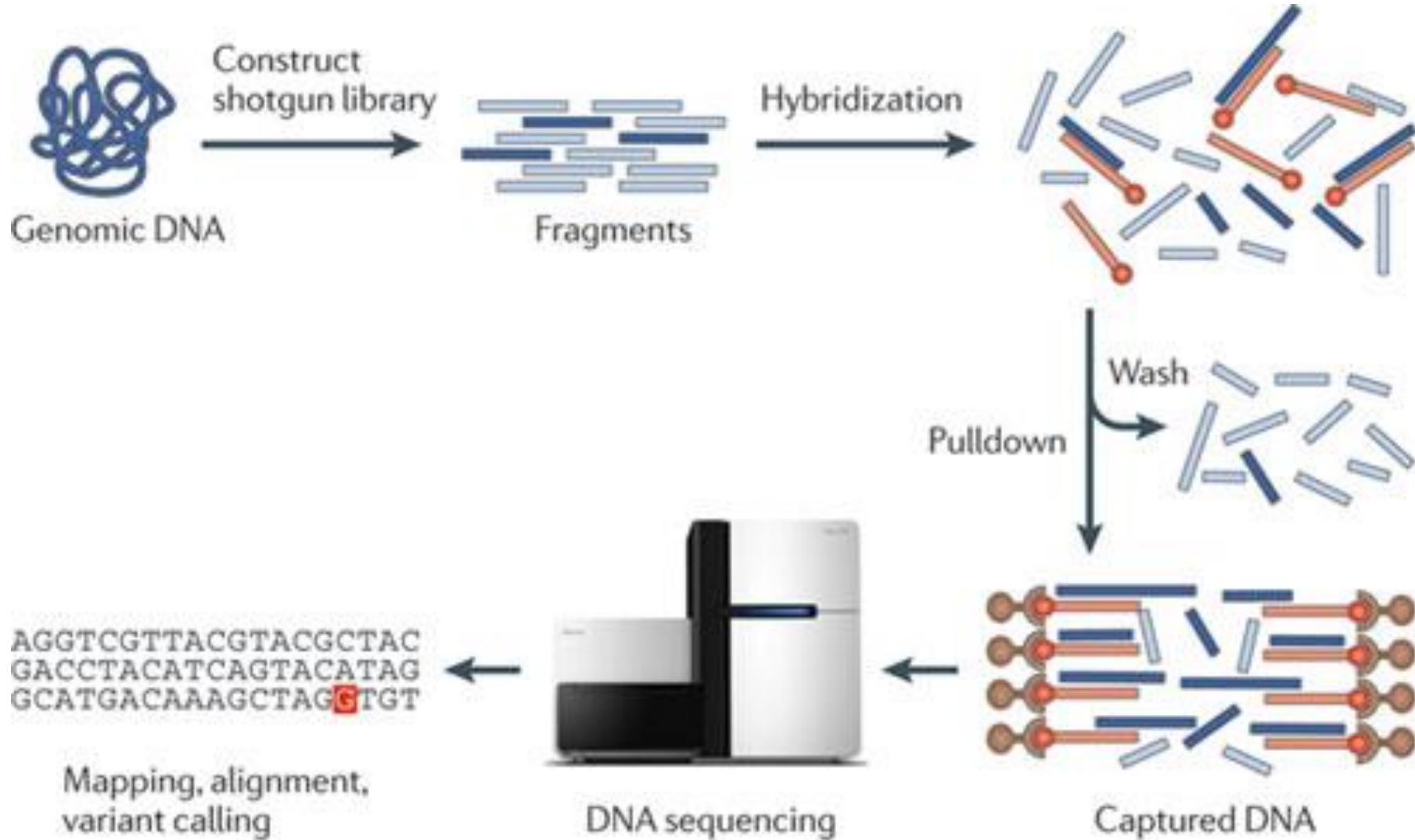


Next Generation Sequencing (NGS)

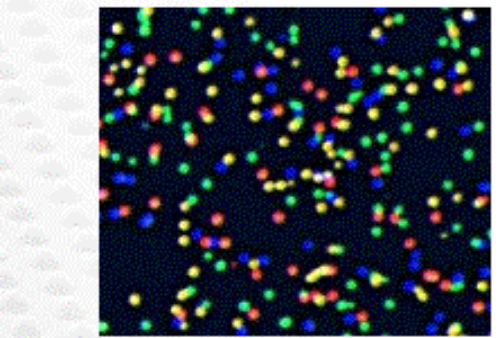
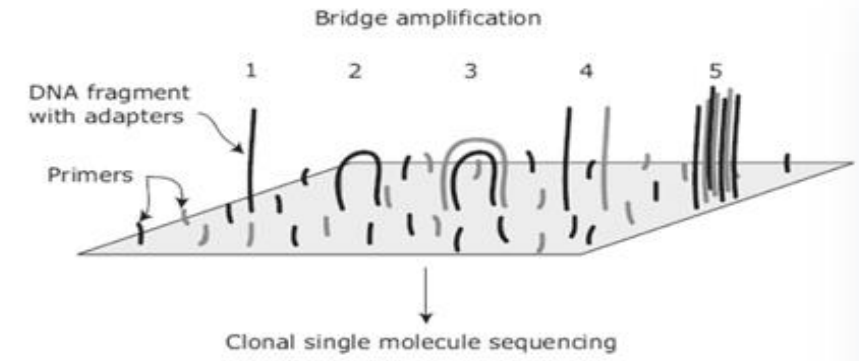
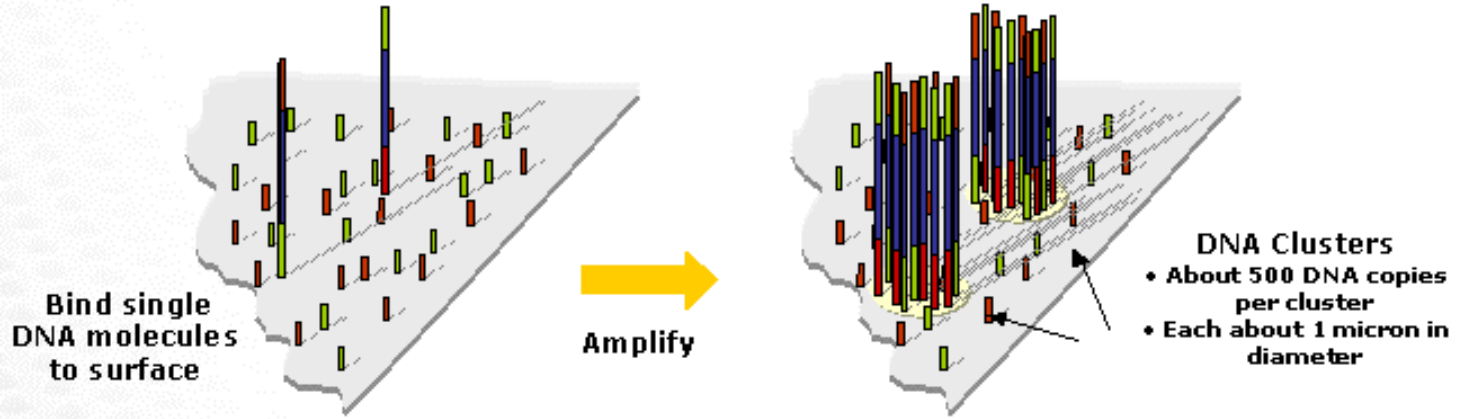
Παράλληλη αλληλούχηση εκατομμύριων μικρών τμημάτων DNA σε ένα μόνο πείραμα

- Εύρεση γενετικών παραλλαγών πολλών γονιδίων ταυτόχρονα ή και ολόκληρου του γονιδιώματος
- Εύρεση μεταλλάξεων σε χαμηλό ποσοστό (<5%)
- Εύρεση αριθμητικών ή μη-ισοζυγικών αναδιατάξεων υψηλής ανάλυσης (CNV)
- Ανάλυση έκφρασης όλων των γονιδίων και παράλληλα αναγνώριση πρωτότυπων/μοναδικών αντιγράφων και σύντηξη γονιδίων
- Επιγενετική ανάλυση (chip-seq, ATAC-seq)

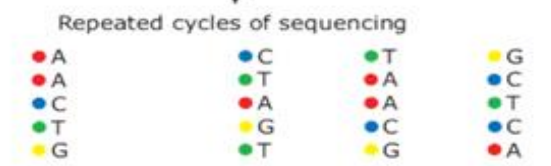
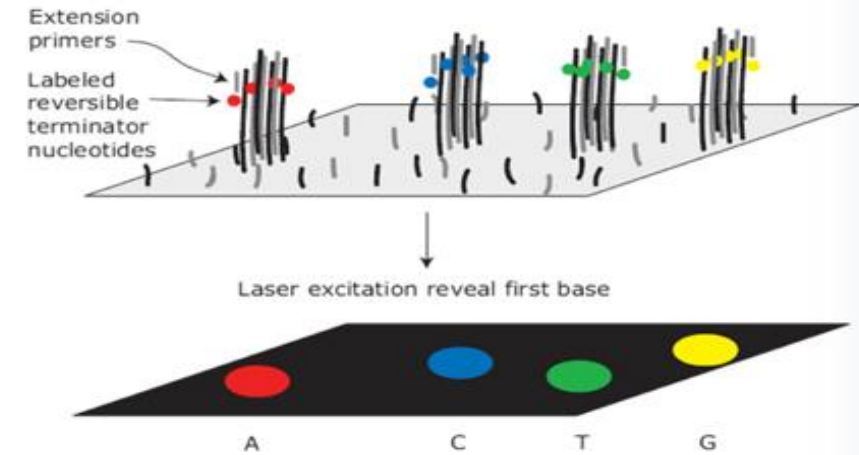
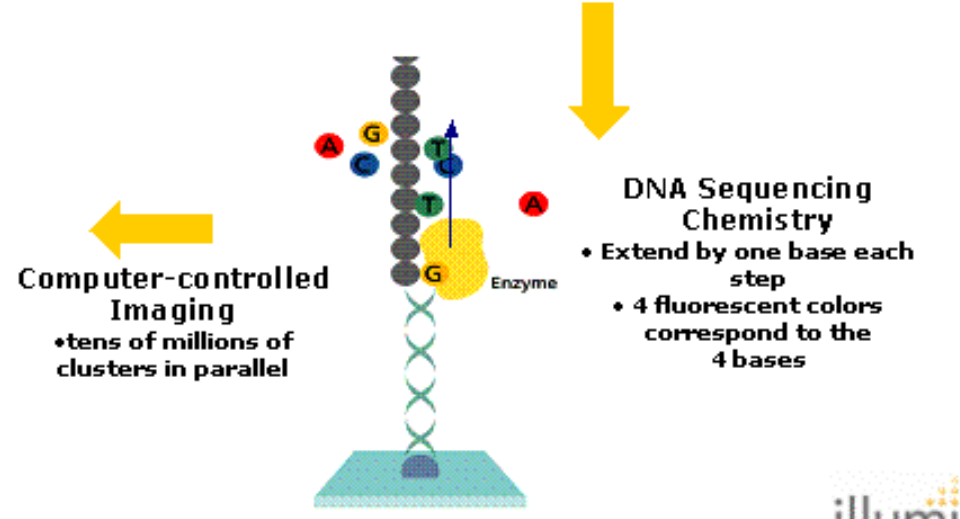
Πειραματικό πρωτόκολλο



Τεχνολογία που εφαρμόζει η τεχνική NGS

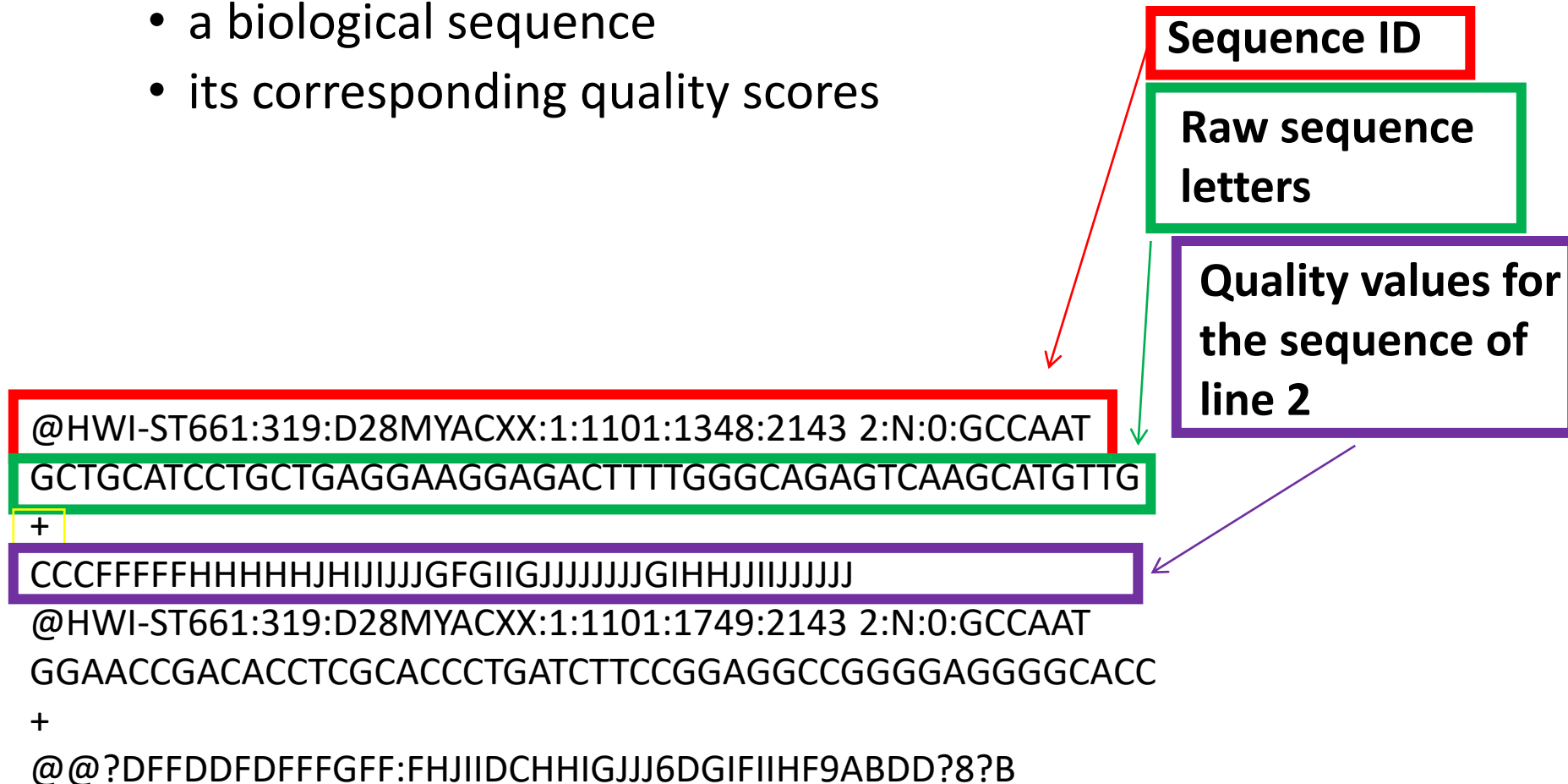


Solexa digital image



Ακατέργαστα δεδομένα NGS

- Text-based format for storing raw unaligned reads
 - a biological sequence
 - its corresponding quality scores

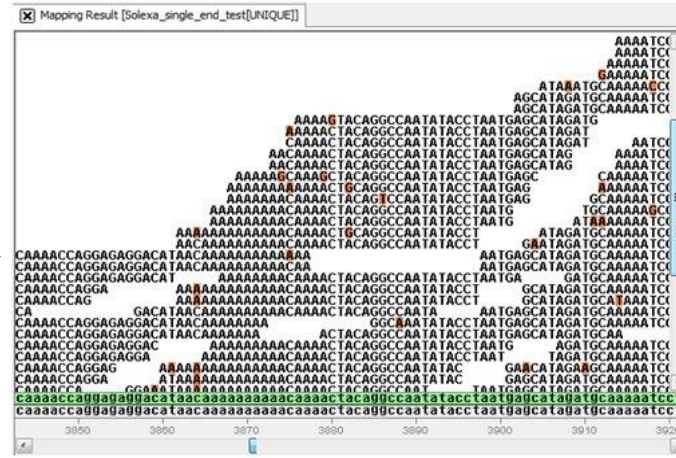


Βιοπληροφορική ανάλυση αποτελεσμάτων

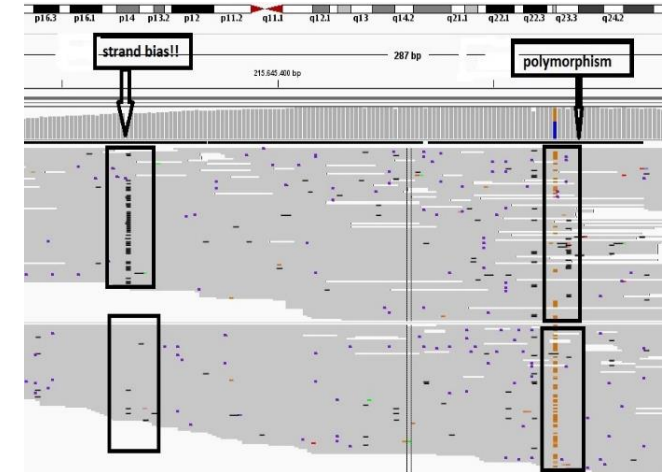
sequenced reads



aligned reads



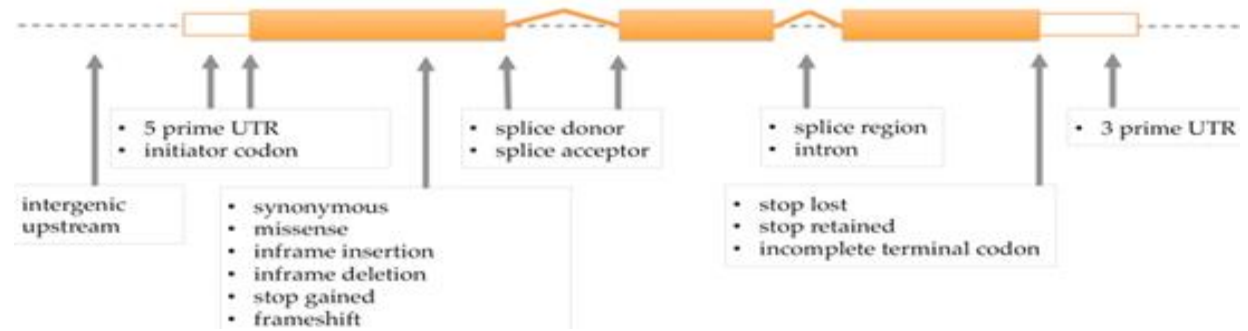
variant calling



candidate variants



functional annotation



Questions

Email: sglentis@med.uoa.gr & kkatsibardi@med.uoa.gr