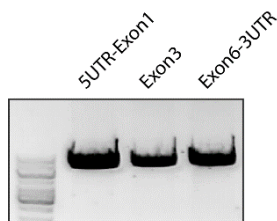


Vývoj sondy pro rutinní detekci amplifikace genu *PPM1D* v klinických vzorcích karcinomu prsu

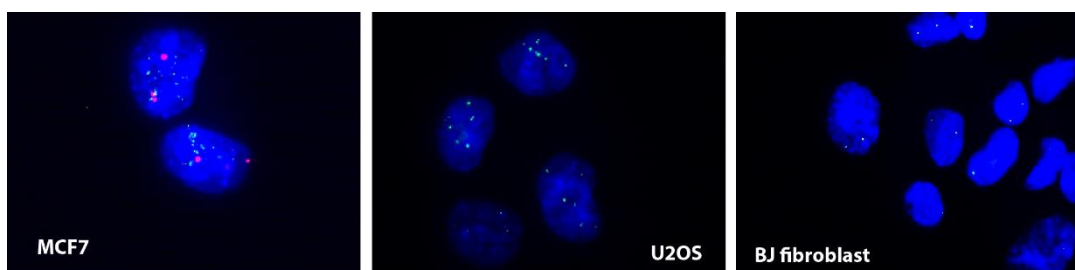
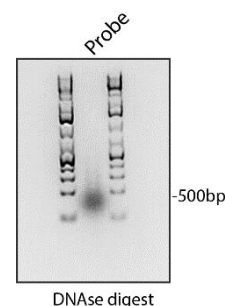
Amplifikace genu *PPM1D* na chromozomálním lokusu 17q23.2 je přítomna v přibližně 10 % nádorů prsu a v menší míře i v dalších typech nádorů. Nejnovější studie ukazují, že amplifikace *PPM1D* kódujícího protein fosfatázu WIP1 ovlivňuje citlivost nádorových buněk k chemoterapii a může snižovat účinek doxorubicinu. V experimentálních podmínkách vede inhibice WIP1 fosfatázy ke zvýšení účinnosti chemoterapie v p53 pozitivních nádorech. Stanovení amplifikace *PPM1D* se během vyhodnocení histologického materiálu patologem zatím rutinně neprovádí především vzhledem k malému množství dostupných klinických studií a vysokým pořizovacím nákladům na vhodnou probu. Na Ústavu molekulární genetiky AV ČR v.v.i. byl optimalizován protokol pro přípravu sondy vhodnou pro detekci amplifikace *PPM1D* metodou FISH.

Pro přípravu sondy byl použit bakteriální arteficiální chromosom (BAC) obsahující lidský gen *PPM1D*, jehož celistvost byla prokázána pomocí PCR (**Obr. 1**). Pro získání velkého množství sondy jsme amplifikovali BAC obsahující *PPM1D* pomocí Φ 29 polymerázy, která umožnila zvýšit výtěžek přibližně o dva řády. V dalším kroku byla BAC DNA štěpena DNAasou na fragmenty dlouhé přibližně 500 bazí (**Obr. 2**). Následně byly fragmenty DNA značeny různými fluorescenčními nukleotidy pomocí DNA Polymerázy I. Po přečištění a blokaci nespecifické reakce byla *PPM1D* proba hybridizována se zafixovanými buňkami o známém počtu kopií genu *PPM1D* a detekována pomocí fluorescenční mikroskopie (**Obr. 3**). Optimalizovány byly především různě značené nukleotidy, koncentrace enzymů, inkubační časy a hybridizační podmínky. Jako kontrolní probu jsme použili značený PCR fragment hybridizující se satelitní oblastí chromozomu 17. V diploidních retinálních epitelálních buňkách a BJ fibroblastech byly detekovány dvě kopie genu *PPM1D*, v aneuploidních A375 a U2OS buňkách bylo detekováno očekávaných tři a šest kopií genu *PPM1D* a v MCF7 buňkách odvozených od karcinomu prsu se známou amplifikací genu *PPM1D* bylo detekováno přibližně 12-15 kopií genu *PPM1D*. Ve všech testovaných liniích byl pomocí této sondy detekován očekávaný signál odpovídající počtu kopií genu *PPM1D*.



Obr. 1. Validace BAC pomocí PCR. Přítomny jsou exony i regulační oblasti genu *PPM1D*.

Obr. 2. Fragmentace BAC pomocí DNAsy. Většina DNA migruje v optimální velikosti 500 bp.



Obr. 3. Reprezentativní obrázky značení buněk *PPM1D* sondou (zelená, ATTO-488). Na MCF7 buňkách byl značen i chromosom 17 (červeně, Texas Red). Jádra jsou značena modře pomocí DAPI.

Závěr: Testování nově připravené FISH sondy pro lidský gen *PPM1D* na panelu buněčných liniích karcinomu prsu a kontrolních diploidních liniích prokázalo její spolehlivost při detekci amplifikace lokusu 17q23.2. V případě zájmu o další informace anebo zakoupení neexklusivní licence na přípravu *PPM1D* sondy se obraťte na **Centrum pro Transfer Technologí**, ÚMG AVČR, Vídeňská 1083, 14220 Praha 4, Tel. (420-241 063 227).