

# RNA diagnostika

# RNA

savčí buňka:

- 10 - 30 pg celkové RNA
- rRNA (28S, 18S, 5S) 80-85%
- tRNA, snRNA 15-20%
- mRNA 1-5%

360 000 mRNA molekul/buňku,  
tj. 12 000 rozdílných transkriptů  
typická délka 1 transkriptu cca 2kb

Analysis of Total RNA



**Figure 1.** Formaldehyde agarose gel of total RNA isolated from the indicated sources using RNeasy kits. 10 µg RNA was loaded per lane.

**Table 3.** mRNA classification based on abundance

Abundance class	Copies/cell	Number of different messages/cell	Abundance of each message
Low	5-15	11,000	<0.004%
Intermediate	200-400	500	<0.1%
High	12,000	<10	3%

# Nestabilita RNA

---

- přítomnost ribonukleáz (RNázy) v buňce
- RNázy
  - velmi stabilní
  - nevyžadují kofaktory
  - účinné v nízkých koncentracích
  - obtížná inaktivace
  - kontaminace RNázami : lidská pokožka  
prachové částice (bakterie, plísně)
- izolace a analýza RNA : speciální přístup i techniky

# Stabilizace RNA a uložení

gene-expressní analýza: analyzovaná RNA musí reprezentovat *in vivo* expresi vzorku

- komplikace během odběru a zpracování biologického vzorku:
  - v okamžiku odběru **RNA** se stává **extrémě nestabilní**
  - dva hlavní typy artefaktů:
    - 1) **redukce** specifických i nespecifických druhů mRNA (downregulace genů a enzymatická degradace RNA)
    - 2) **indukce** exprese určitých genů
- **stabilizace RNA** ve vzorku při odběru :
  - okamžité zmrazení v tekutém dusíku a uložít při  $-80^{\circ}\text{C}$
  - stabilizační roztoky: RNAlater (tkáň), RNAprotect (bakterie), PAXgene (krev, kostní dřeň)
- **kontaminace DNA**
  - PCR primery překrývající hranici intron/exon
  - štěpení DNázami
  - cílená izolace mRNA
- **izolovaná RNA** může být uložena při  $-20$  nebo  $-70^{\circ}\text{C}$  (bez degradace RNA po 1 roce uložení)

# RNA v diagnostice

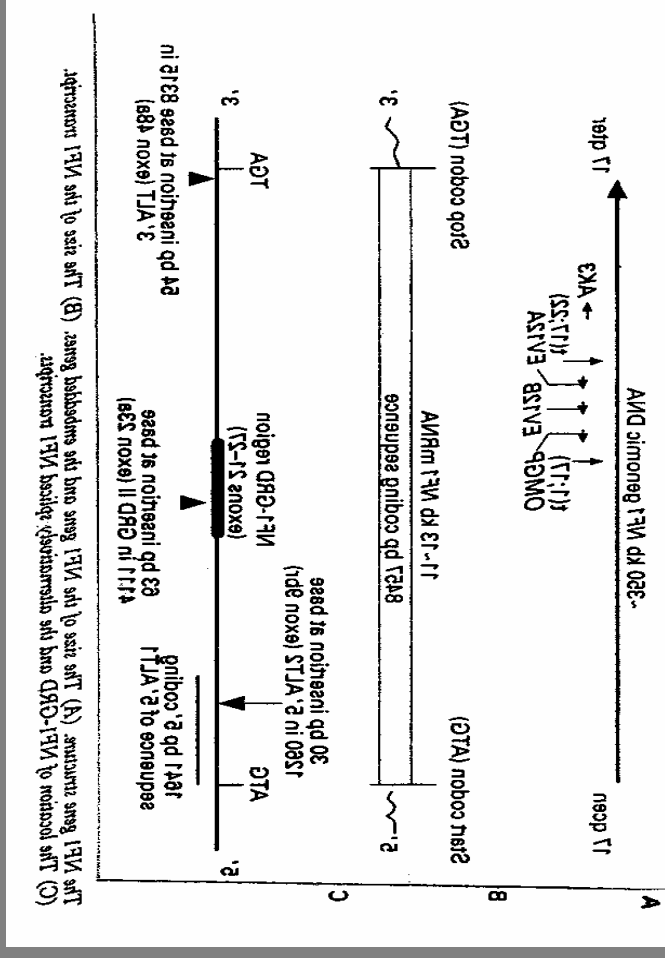
- přímá RNA diagnostika - skrínování celé kódující oblasti příslušného genu
- gene - expresní analýza:
  - diferenciacní diagnostika některých typů nádorů (NB)
  - detekce cirkulujících nádorových buněk v krvi, kostní dřeni pacienta
  - monitorování průběhu léčby a detekce reziduální choroby
  - kontrola štěpu před autologní transplantací
  - differential display, PTT test, funkční testy....

# Přímá RNA diagnostika

# RNA diagnostika NF1

## Struktura NF1 genu

- 350 kb
- 60 exonů
- 11 - 13 kb mRNA
- protein neurofibromin
  - 2818 aminokyselin
  - zřejmě tumor supresor



## Neurofibromatosis 1 (NF1) (von Recklinghausen disease)

- Autosomal dominant
- Frequency 1 in 3000
- Gene locus on 17q
- Café-au-lait spots
- Lisch nodules in the iris
- Multiple neurofibromas
- Skeletal anomalies
- Predisposition to tumors of the nervous system
- 50% new mutations



1. Lisch nodule



2. Café-au-lait spot



3. Neurofibromas

## A. Main manifestations of neurofibromatosis 1

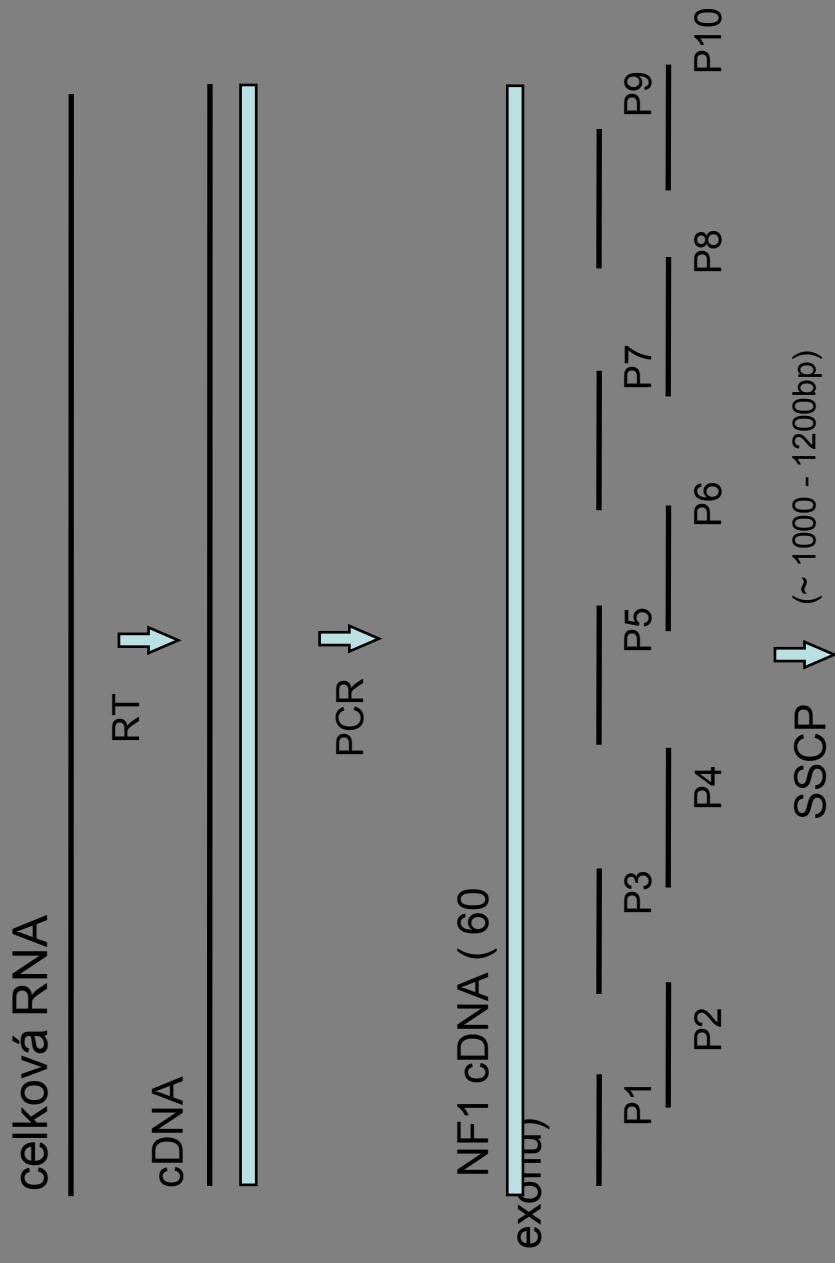


# Komplikace při molekulární diagnostice NF1

---

- problematická klinická diagnostika
- až 50 % případů *de novo*
- vysoká mutační rychlost
- velikost genu (350 kb, 60 exonů)
- absence hot spot oblastí - nutnost vyhledávání v celém genu
- nejasná korelace mezi typem mutace a formou postižení
- neurofibromin - známa funkce pouze jeho centrální domény
- různé klinické projevy i u pacientů nesoucích stejnou mutaci

# cDNA - SSCP analýza

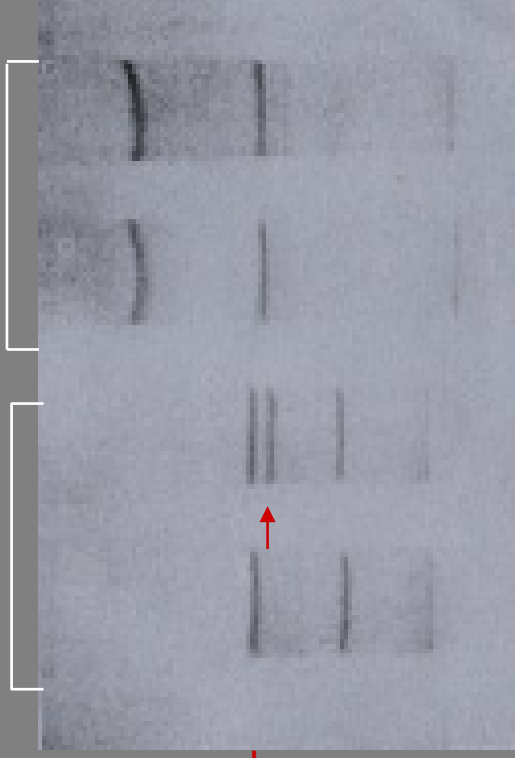


Sekvenační analýza

# cDNA SSCP

semi-nested PCR cDNA (segment P7)

P7 A (560bp) P7 B (614 bp)



mt C5242T

wt

C62

wt

C62

podmínky elektroforetické separace : 12% PAGE (60:1) / 150V / 16 hod. / r.t.

## Výhody a nevýhody RNA dignostiky

---

- jednodušší a rychlejší skríníng multiexonického genu (10 segmentů cDNA místo 60 exonů), mRNA je bez intronů
- záchyt sestříhových mutací v intronech
- záchyt delece celého exonu na jedné alele genu
- nižší ekonomické náklady
- složitější odběr krve pro izolaci RNA
- nižší stabilita RNA
- dlouhé úseky genu NF1 - obtížnější elektroforetická separace a sekvenace
- nejasný efekt mutace na fenotypové úrovni (stejně u DNA diagnostiky!)

# Expresní analýza

# Strategie detekce exprese genu

---

 Izolace mRNA (PB, BM, tkáň nádoru)

 RT-PCR  $\Rightarrow$  cDNA

 PCR  $\Rightarrow$  syntéza úseku DNA odpovídajícího mRNA pro TH

$\Rightarrow$  syntéza DNA pro  $\beta\mu$ G (provozní gen)

- kontrola kvality RNA a RT

 ELFO - 5% PAGE, barvení stříbrem

~ Fragmentační analýza (ABI PRISM)

 Stanovení citlivosti  $\Rightarrow$  RNA izolovaná z NB

buněčné linie IMR-32

# Molekulární markery neuroblastomu

- **Tkáňově specifická exprese TH genu** - buňky NB
  - Vysoká citlivost detekce ( $\sim 1b./10^{4-5}$ )
  - Detekce v KD, periferní krvi - cirkulující buňky NB
- **Nádorově specifická exprese buněčných antigenů MAGE, GAGE**
  - kombinací více molekulárních markerů je možno postihnout heterogenitu NB- zvýší se pravděpodobnost záchytu NB
  - možnost zavedení a aplikace DNA vakcín
- **Klinický význam:**
  - ↔ stanovení diagnózy
  - ↔ určení prognózy
  - ↔ sledování průběhu onemocnění (MRD, relaps)
  - ↔ detekci NB buněk v transplantátu před autologní transplantací

# RNA diagnostika neuroblastomu

---

## 1) Detekce exprese *TH* genu

### *Tyrosinhydroxyláza*

- 1. enzym dráhy syntézy katecholaminů
- katecholaminy - důležité neurotransmitery a hormony, regulují vnitřní funkce a motorickou koordinaci
  - **jsou sekretovány 98% NB** (NB je endokrinně aktivní)
  - jejich metabolity používány pro **sledování průběhu onemocnění**
- exprese TH genu je regulována tkáňově specificky během neonatálního vývoje a diferenciac



## 2) Detekce exprese genů **MAGE** a **GAGE**

---

- Genové rodiny
- Kódují nádorové antigeny
- Jejich produkty (vázané na MHC) jsou rozpoznávány cytotoxickými T lymfocyty
- Exprimovány širokým spektrem lidských nádorů (**NB**, melanom, **Synovial sarkom**, **NF1**, k.plic, žaludku, prsu...)