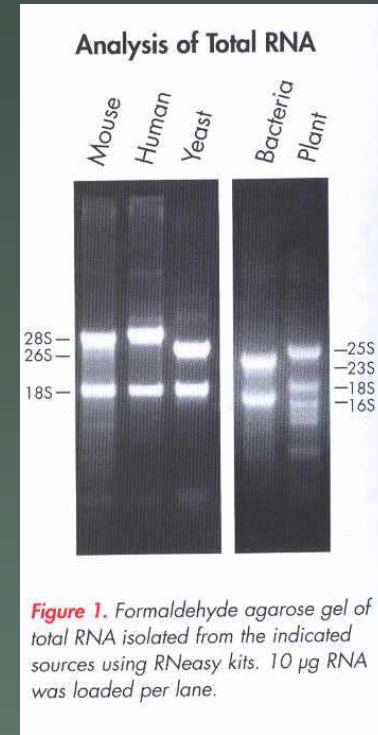


# RNA

## 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



**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-expresní 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 uložit při  $-80^{\circ}\text{C}$
  - stabilizační roztoky: RNAlater (tkáně), 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

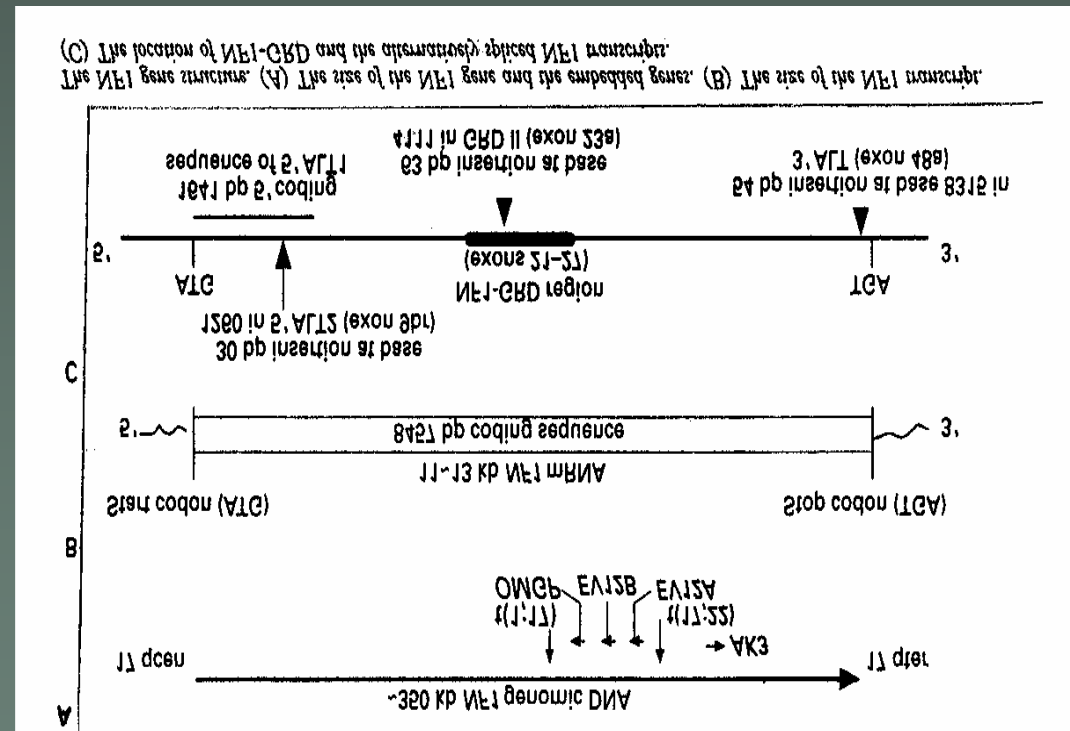
- přímá RNA diagnostika - skrínování celé kódující oblasti příslušného genu
- gene - expresní analýza:
  - diferenciační diagnostika některých typů nádorů (NB)
  - detekce cirkulujících nádorových buněk v krvi, kostní dřeni pacienta
  - monitorování průběhu léčby a detekce reziduální choroby
  - kontrola 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

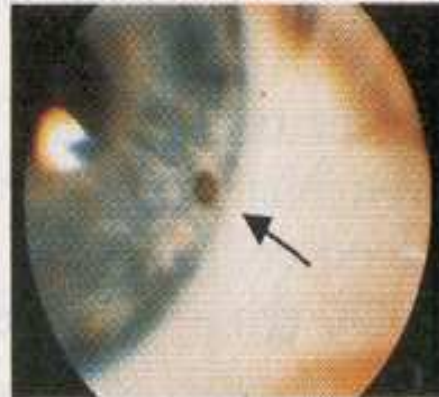
Lisch nodules in the iris

Multiple neurofibromas

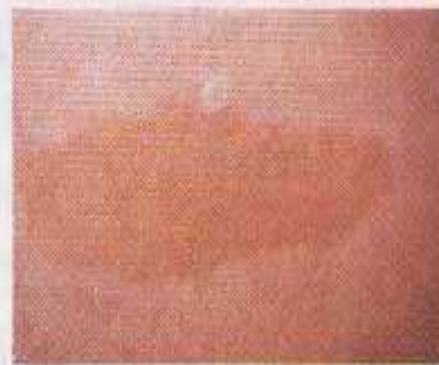
Skeletal anomalies

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

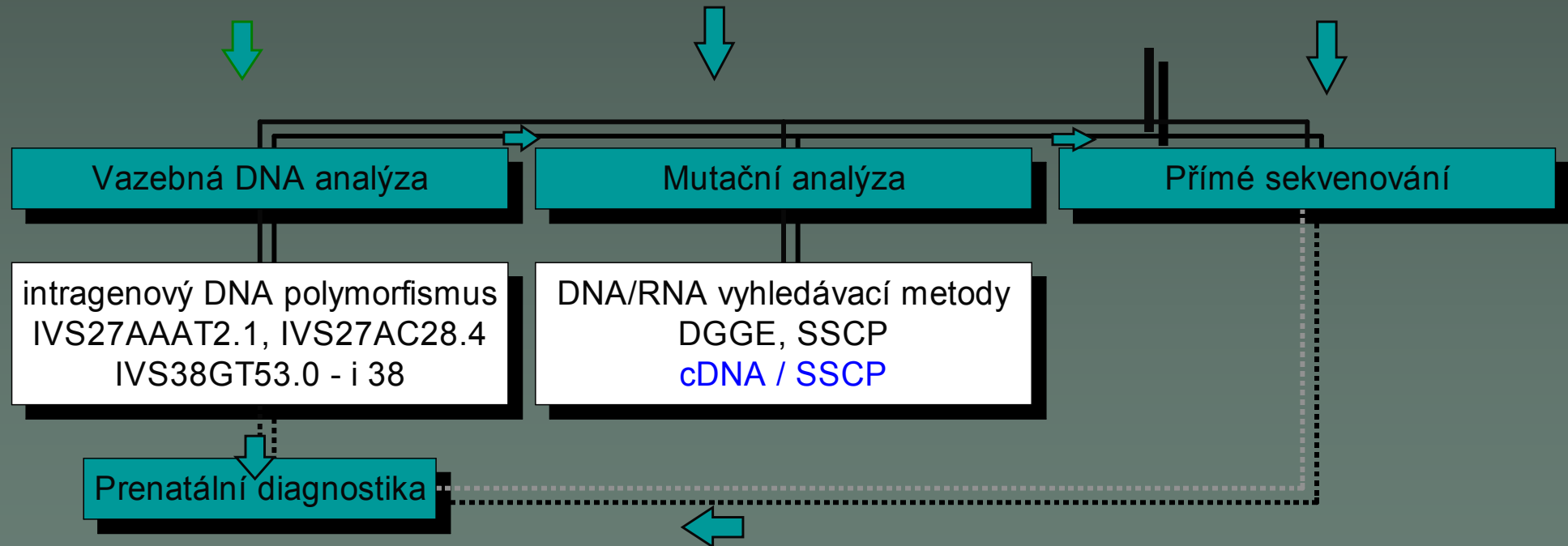
---

- 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

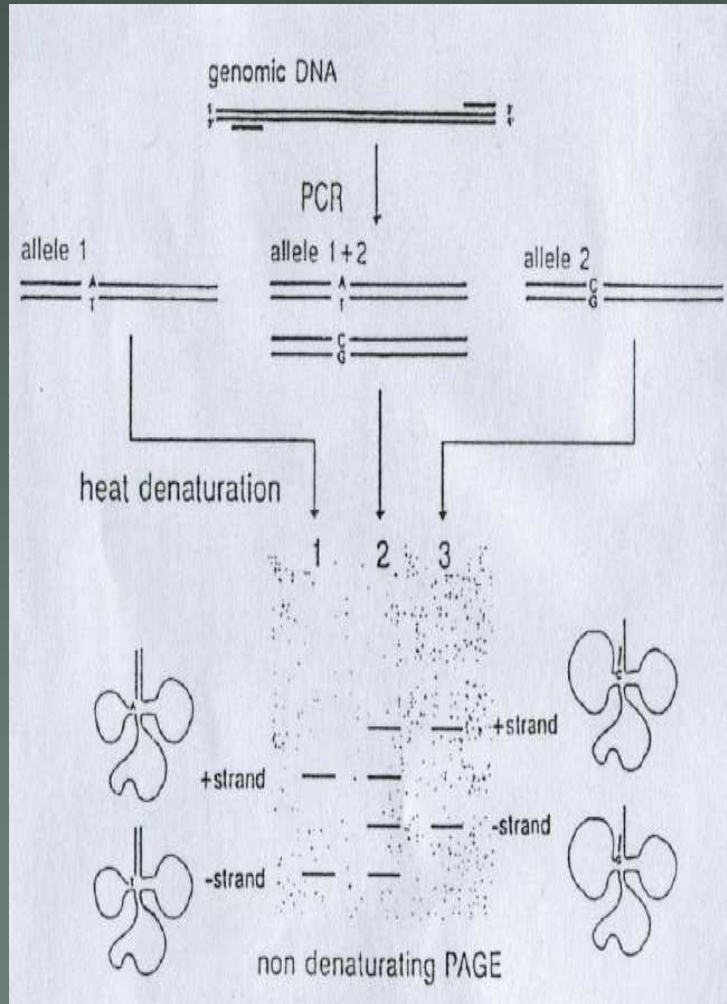


# Strategie molekulárně-genetického testování NF1 pacientů

DNA / RNA NF1 pacienta

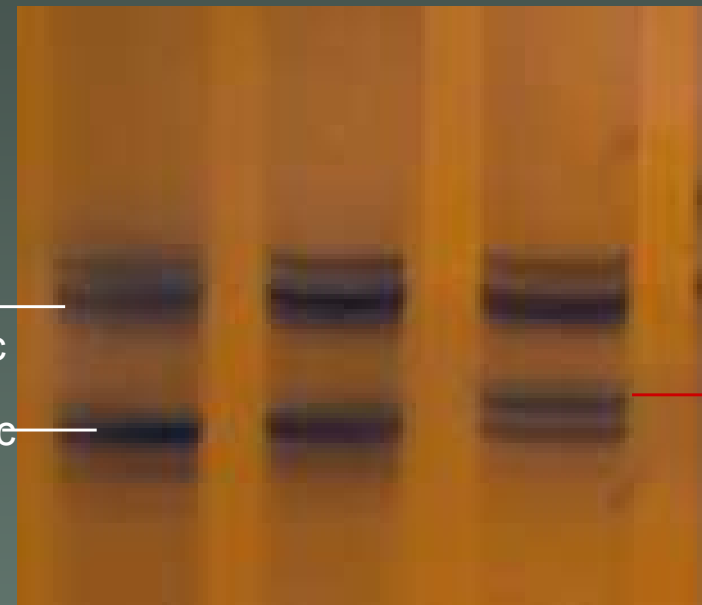


# SSCP



standardní  
+ DNA řetězec

-DNA řetězec



mt řetězec

1

2

3

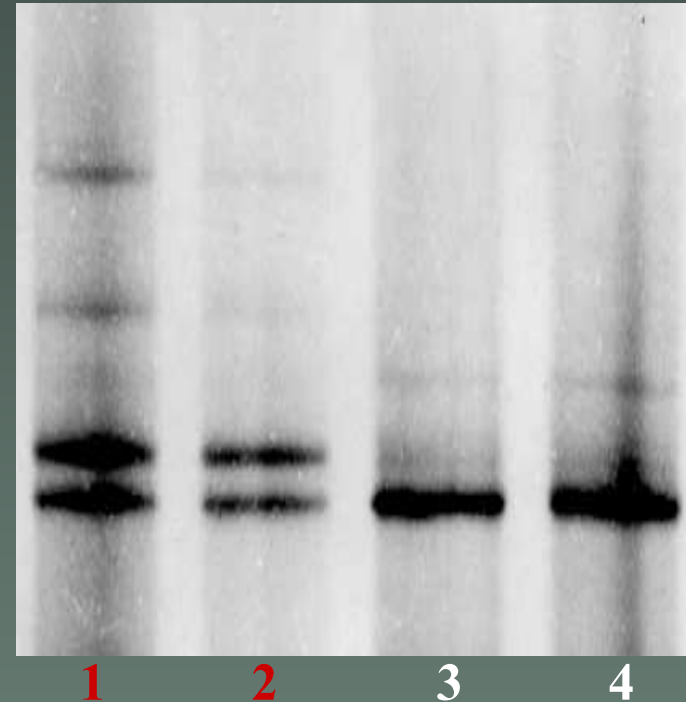
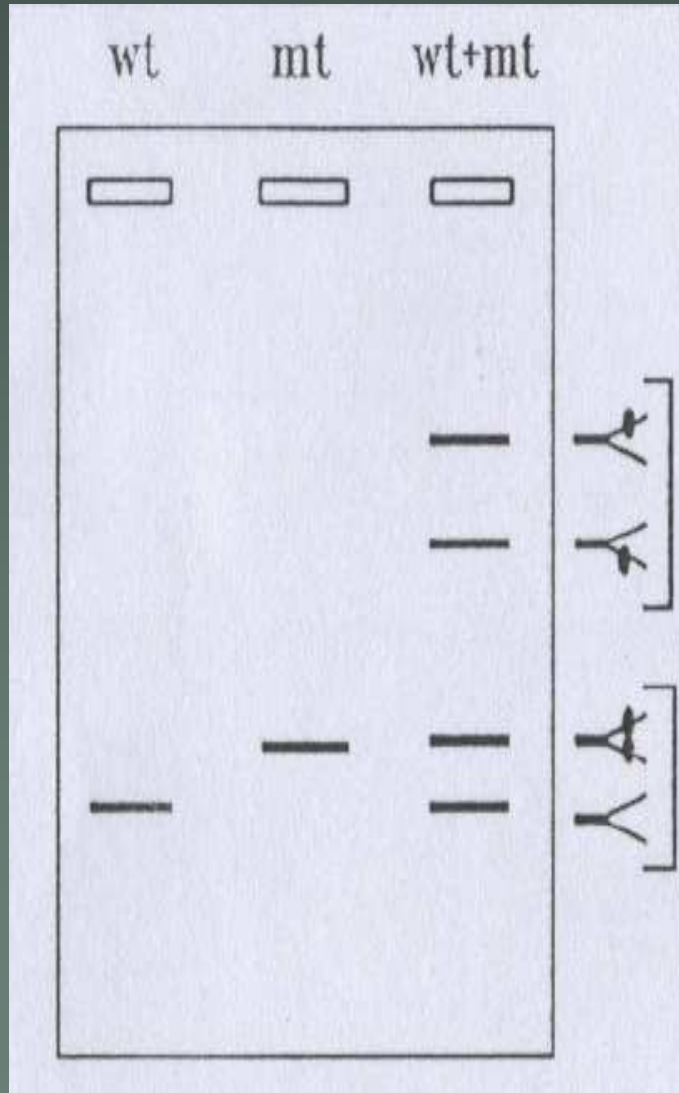
**Obr. 1: SSCP analýza exonu 29 NF1 genu**  
12% PAG(40:1), 150V/16hod/10° C

**dráha 1:** standardní DNA, **dráhy 2 -3 :** NF1  
pacienti

**dráha 3:** NF1 pacient (C5242T)

# DGGE

směr elektroforézy  
koncentrace denaturantů



Obr. 4: DGGE analýza NF1 exonu 31

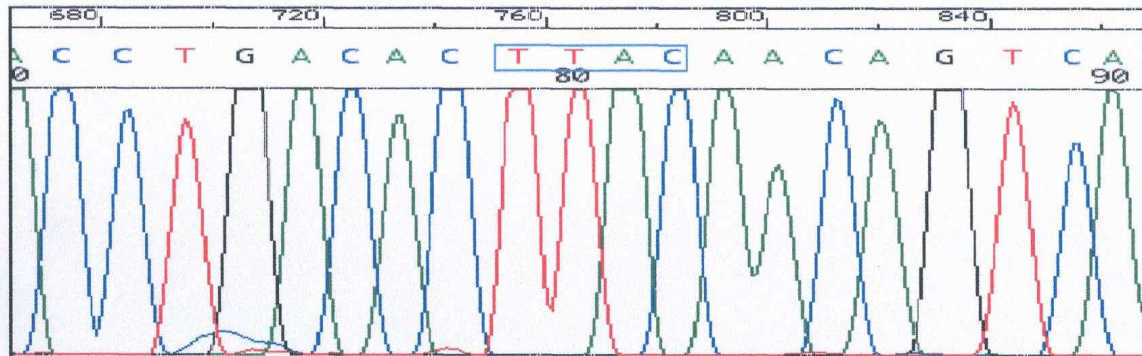
7.5% PAG(37,5:1), 10% - 40% denaturantů,  
150V/ 3,5 hod / 60°C

*dráha 1 - 2:* NF1 pacienti (C5839T), *dráhy 3-4:* zdraví členové NF1 rodiny

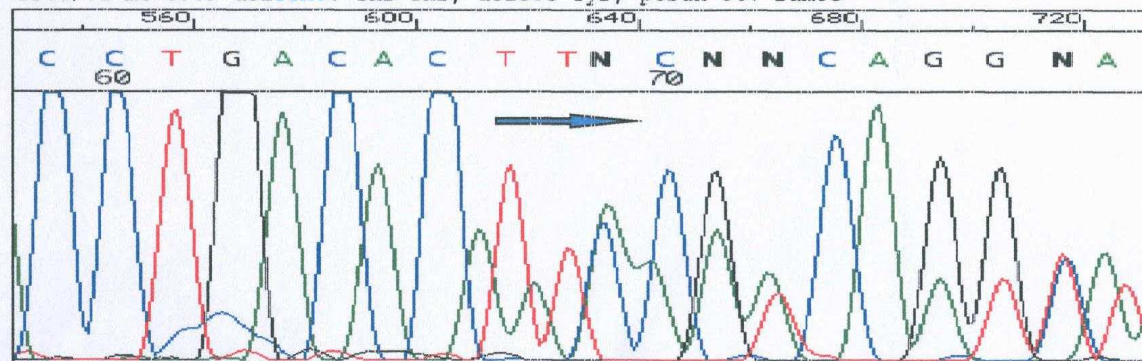
# Sekvence vzorku DNA s odlišnou elektroforetickou mobilitou

GEN NF1 - exon 37

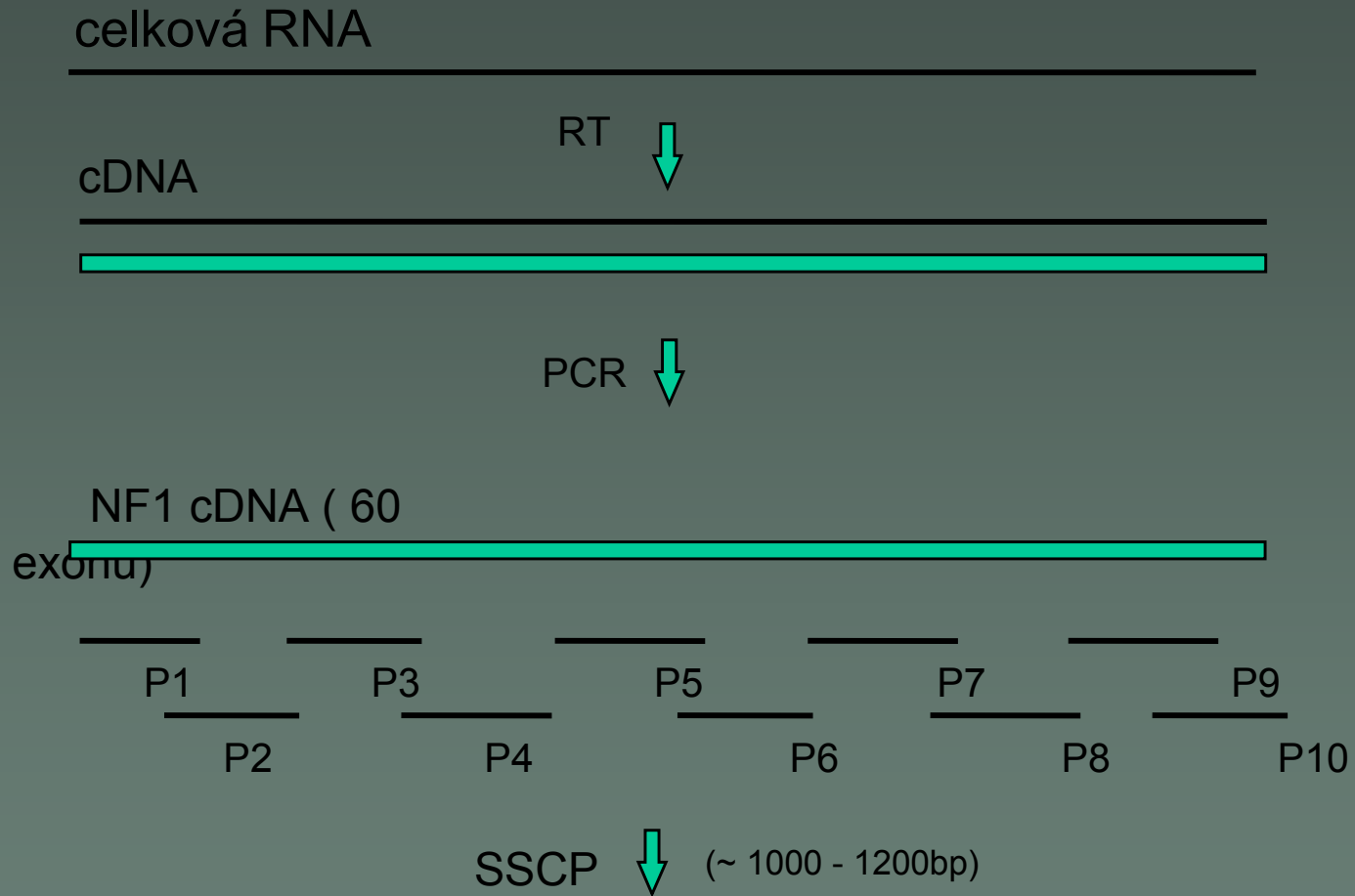
standard DNA



1200/01 mt 6789 delTTAC: Thr>Thr, delece Tyr, posun ct. ramce



# cDNA - SSCP analýza



Sekvenační analýza

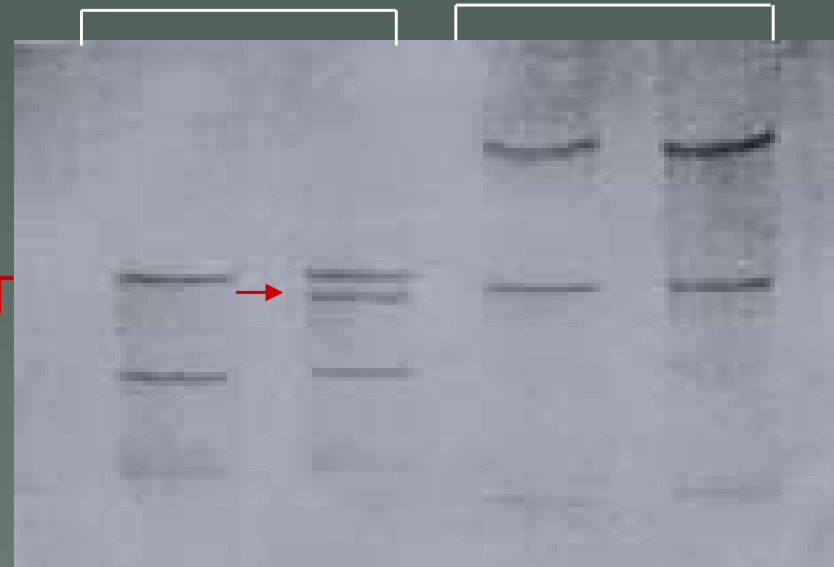
# cDNA SSCP

semi-nested PCR cDNA (segment P7)

P7 A (560bp)

P7 B (614 bp)

mt C5242T



wt

C62

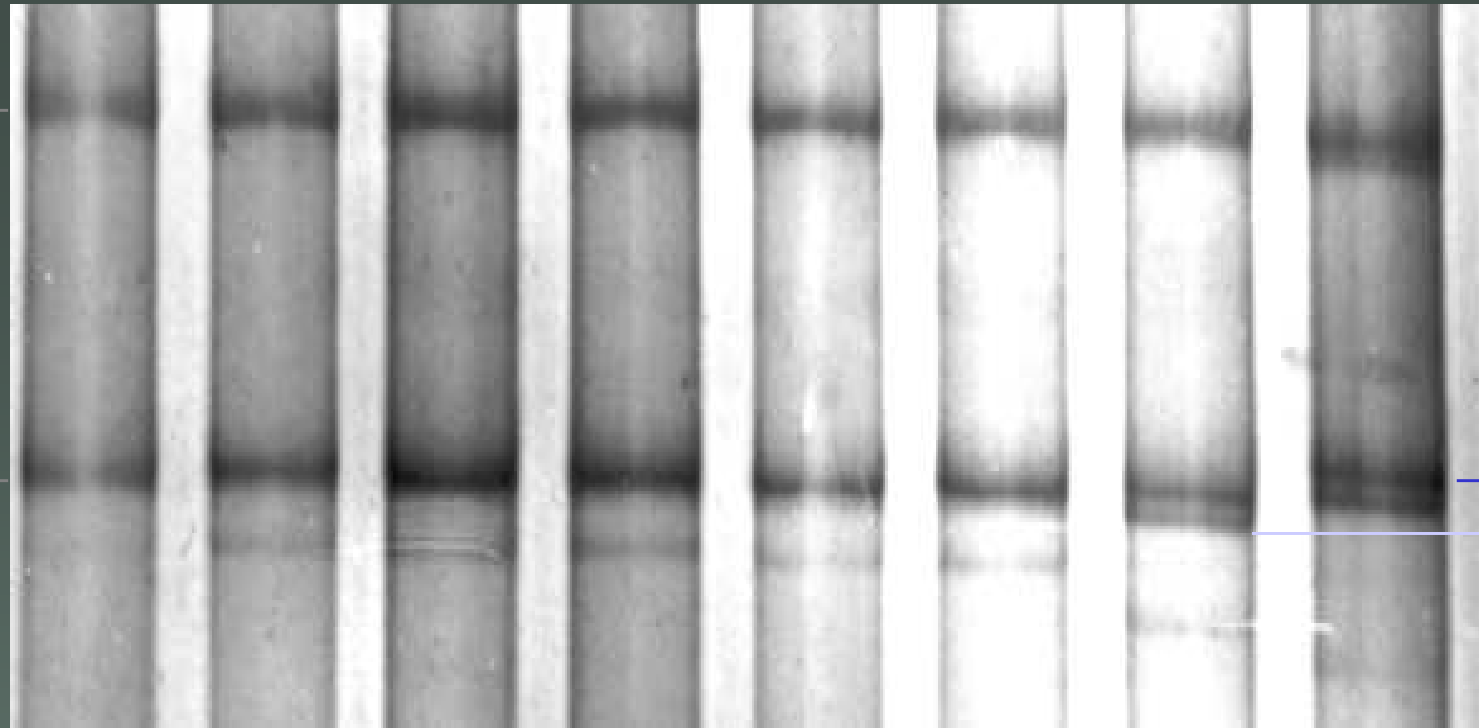
wt

C62

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

standardní  
+ssDNA

- ssDNA



1 2 3 4 5 6 7  
8

**Obr.2 : cDNA /SSCP analýza segmentu P7 NF1  
genu (exony 28 → 32/33, 1102 bp)**

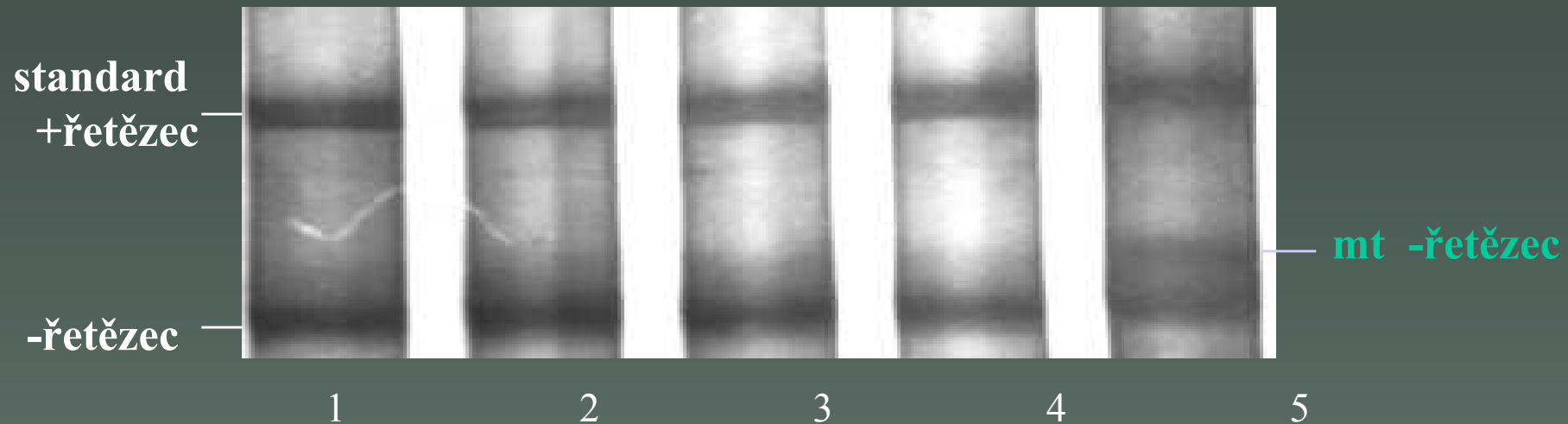
dráha 1: standardní DNA

dráhy 2 - 8: DNA NF1 pacientů

dráha 7: DNA NF1 pacienta s C5242T mutací (detekce v P7A)

dráha 8: DNA NF1 pacienta s C5839T mutací

Electroforetické podmínky: 10% PAGE, 600V/14°C/4,5hod.



**Obr. 3 : cDNA / SSCP analýza segmentu P8**

**10% PAGE (60 : 1), 600V / 4.5hod / 14°C**

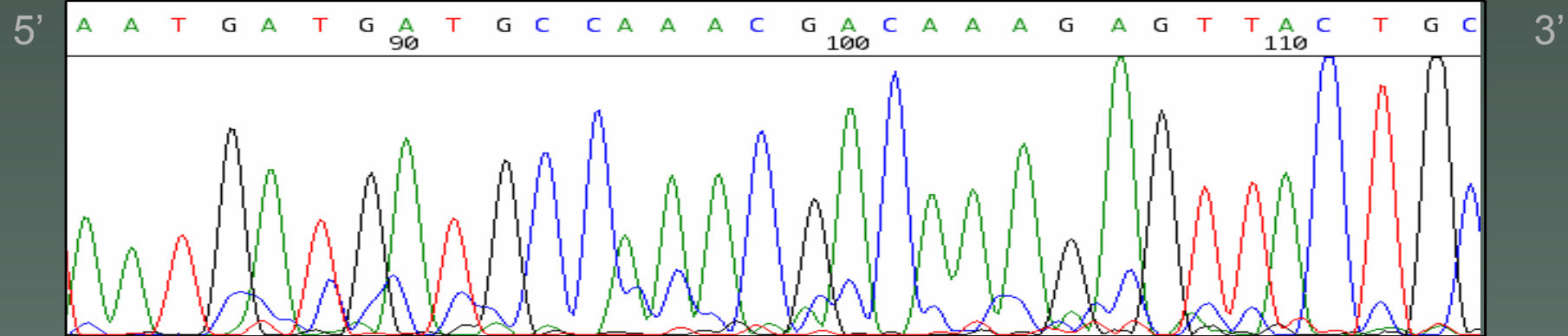
*dráha 1: standardní cDNA, dráha 2 - 5: NF1 pacienti,*

*dráha 5: NF1 pacient (C5839T) (aberrantní patern NF1 segmentu P7)*

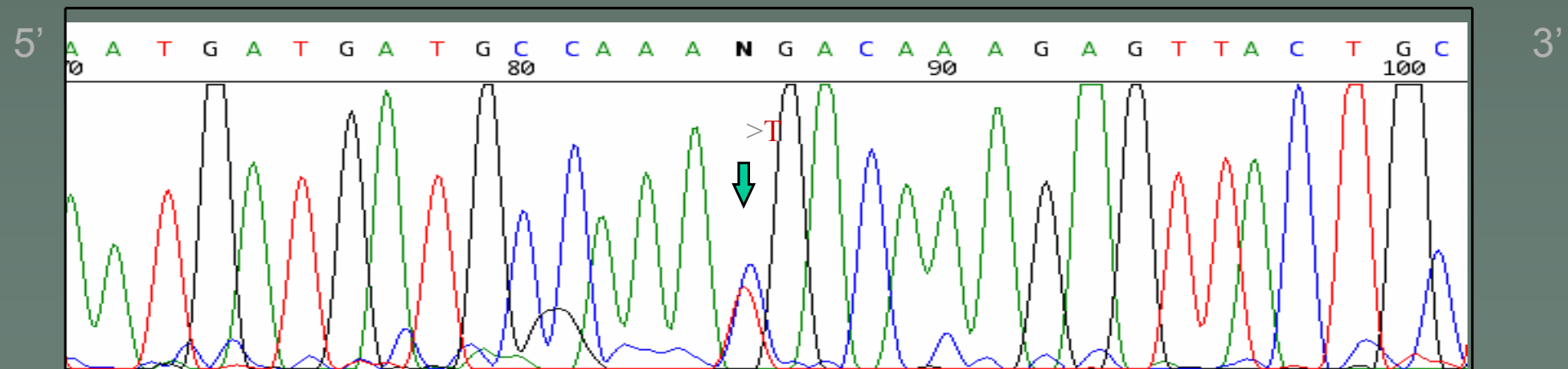


# Sekvence cDNA segmentu P7 NF1 genu ( exony 28 -32/33)

standardní cDNA



cDNA NF1 pacienta, mt C5839T ( Arg > STOP)



## Výhody a nevýhody RNA dignostiky genu NF1

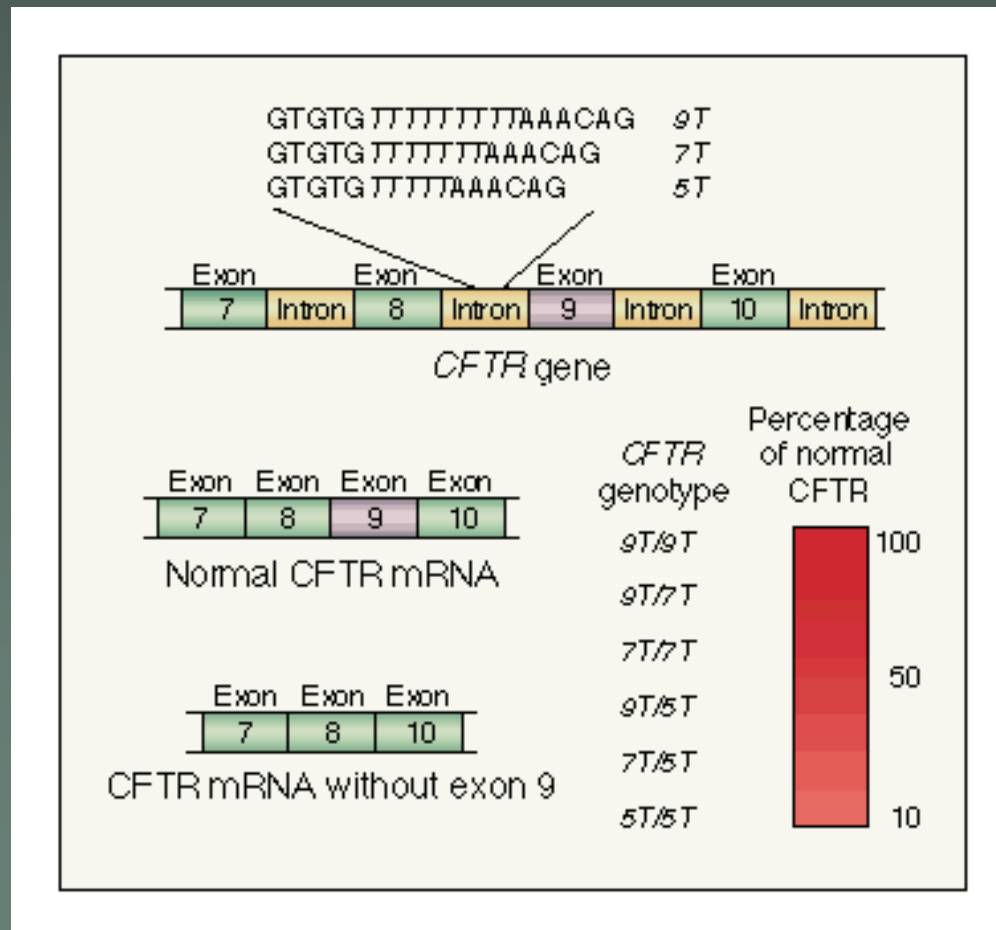
---

- jednodušší a rychlejší skríníng multiexonického genu (10 segmentů cDNA místo 60 exonů), mRNA je bez intronů
- záchyt sestřihových 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!)

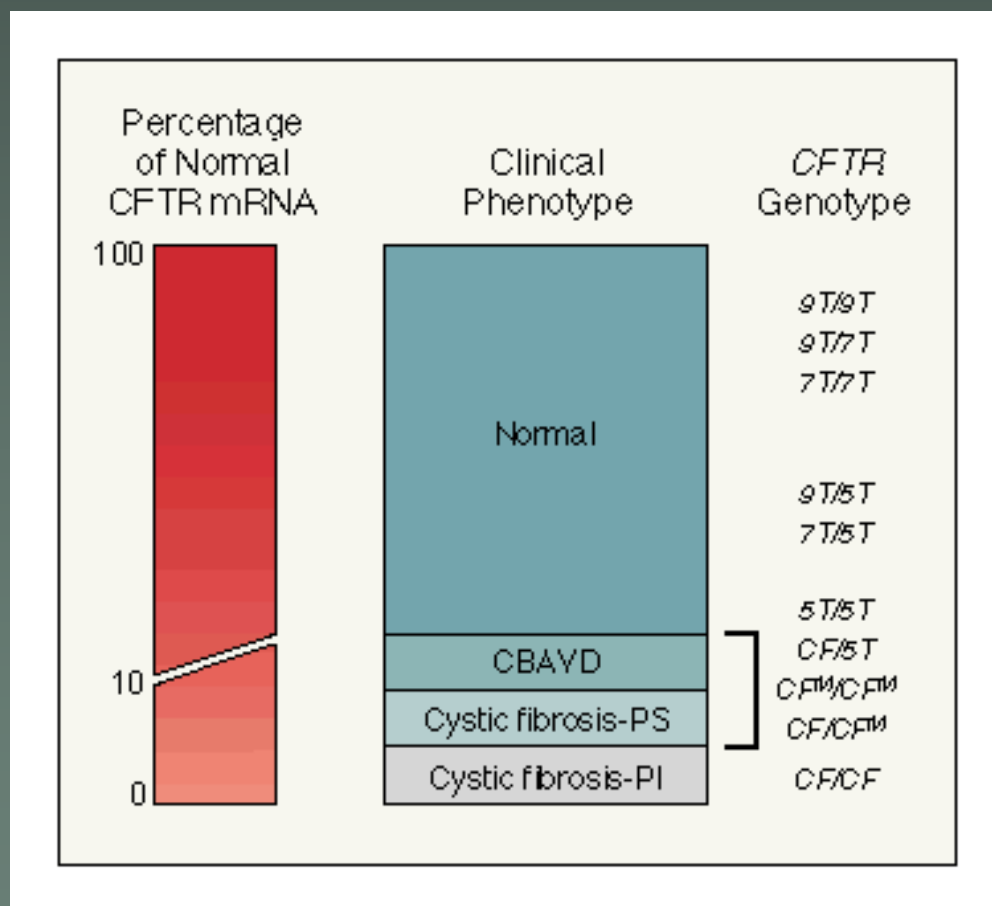
# Expresní analýza

# Polytymidinové varianty v intronu 8 genu CFTR

DNA varianty v intronu 8 *CFTR* genu a jejich efektu na hladinu mRNA .



# Porovnání podílu normalní CFTR mRNA, klinických fenotypů a *CFTR* genotypů.



## PCR analýza alel polyT sequencí v intronu 8 *CFTR* genu

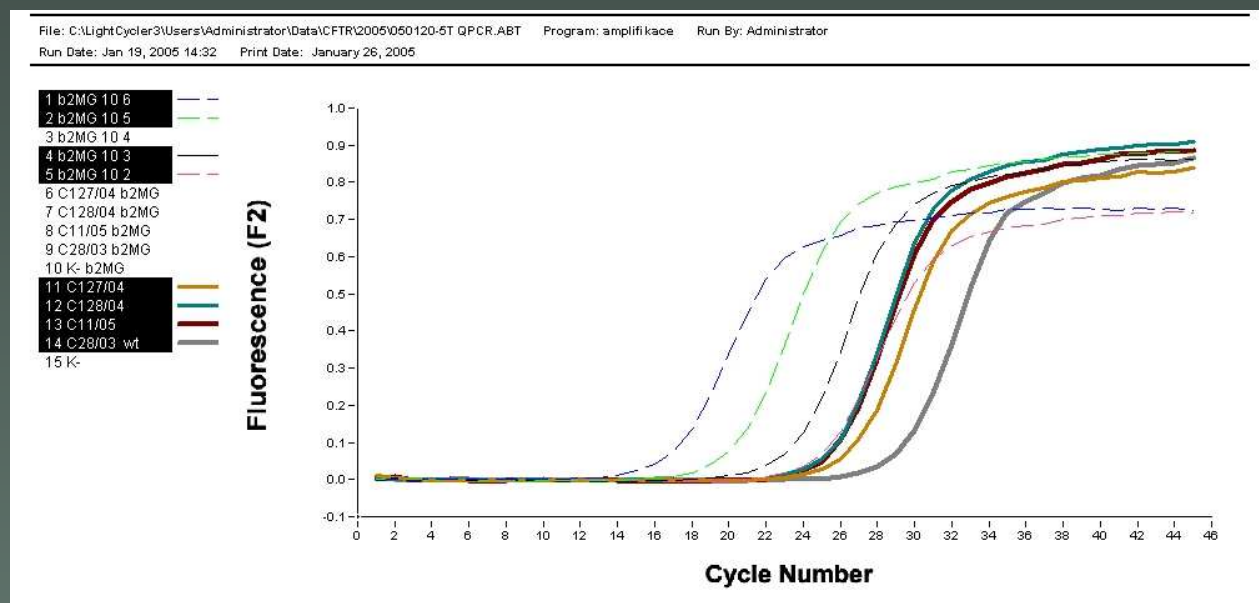
- nested PCR
- restriční štěpení
- ELFO

(5% PAG, silver stained)



# Kvantifikace cDNA PCR produktu CFTR exon 9 na LightCycler

Transkripty byly izolovány z leukocytů periferní krve.



Reakce monitorována pomocí SYBR Green I.

Koncentrace vybraných transkriptů exonu 3 je vyjádřena v relaci ke koncentraci referenčního (housekeeping) genu.

— 1.Case (patient C127/04)

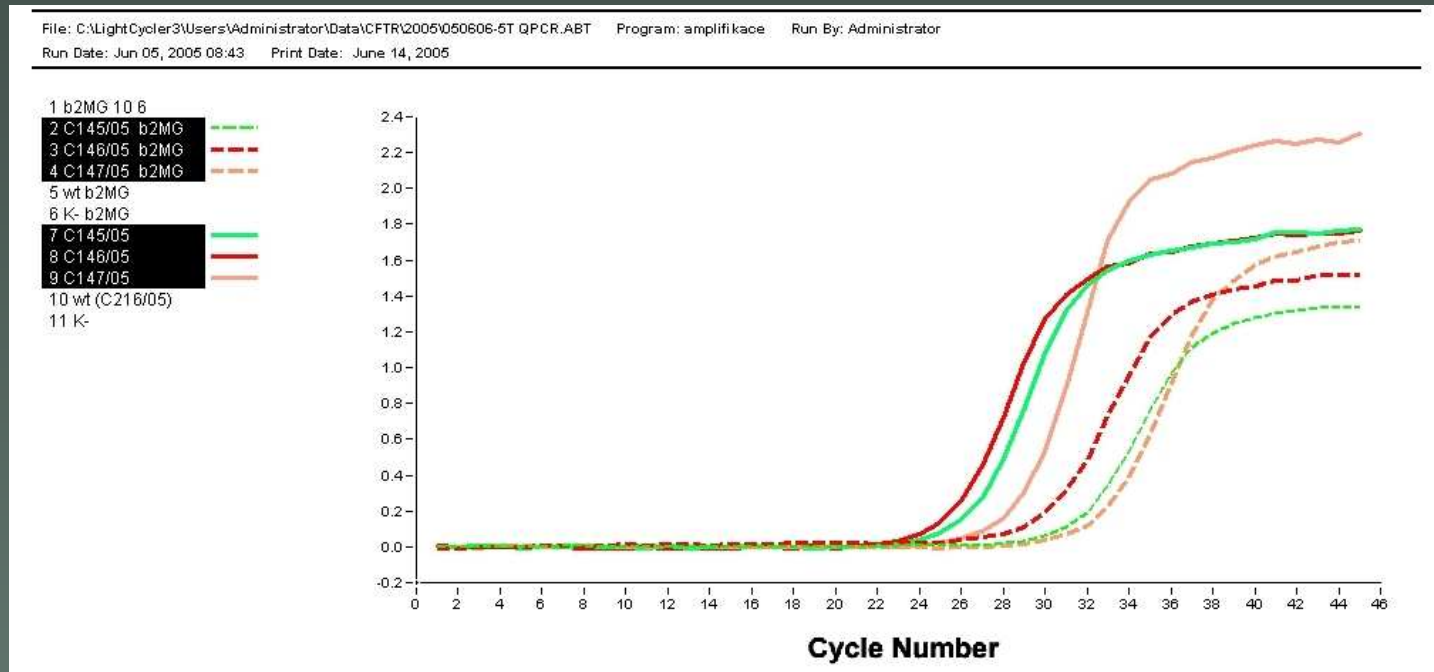
— 2.Case (patient C128/04)

— 3.Case (patient C 11/05)

— wt (C28/03)

# Kvantifikace cDNA PCR produktu CFTR exon 9 na LightCycler

## Transkripty byly izolovány z buněk bukální sliznice



Reakce monitorována pomocí SYBR Green I.

Koncentrace vybraných transkriptů exonu 3 je vyjádřena v relaci ke koncentraci referenčního (housekeeping) genu.

— 1.Case (patient C145/05)

— 2.Case (patient C146/05)

— 3.Case (patient C147/05)



# Molekulární markery neuroblastomu

---

- **Tkáňově specifická exprese TH genu** - buňky NB
  - Detekce v KD, periferní krvi - cirkulující buňky NB
  - Vysoká citlivost detekce( $\sim 1b./10^{4-5}$ )
- **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 diagnosy
  - ↖ určení prognosy
  - ↖ sledování průběhu onemocnění (MRD, relaps)
  - ↖ detekci NB buněk v transplantátu před autologní transplantací

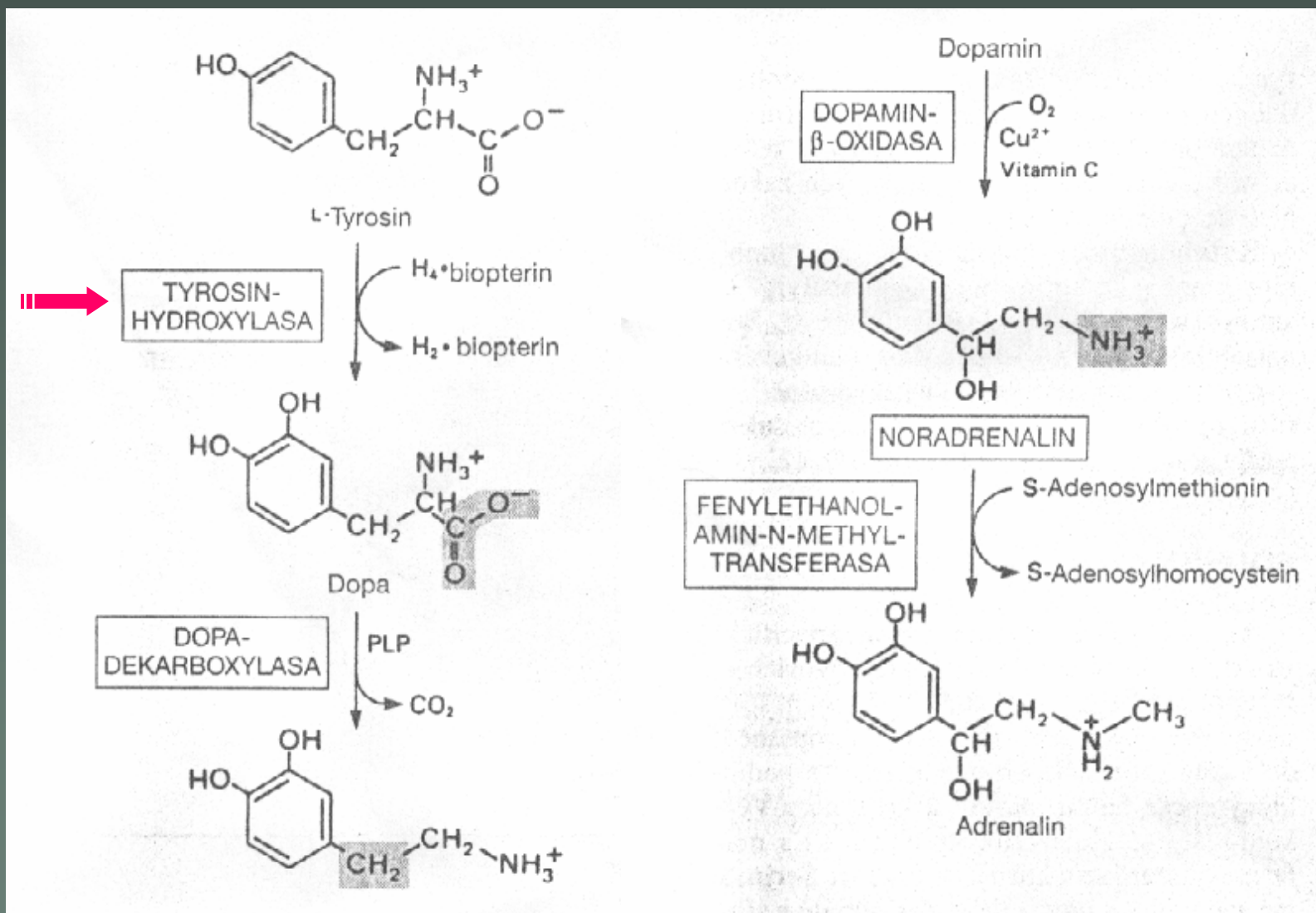
# RNA diagnostika neuroblastomu

---

## 1) Detekce exprese *TH genu* *Tyrosinhydroxyláza*

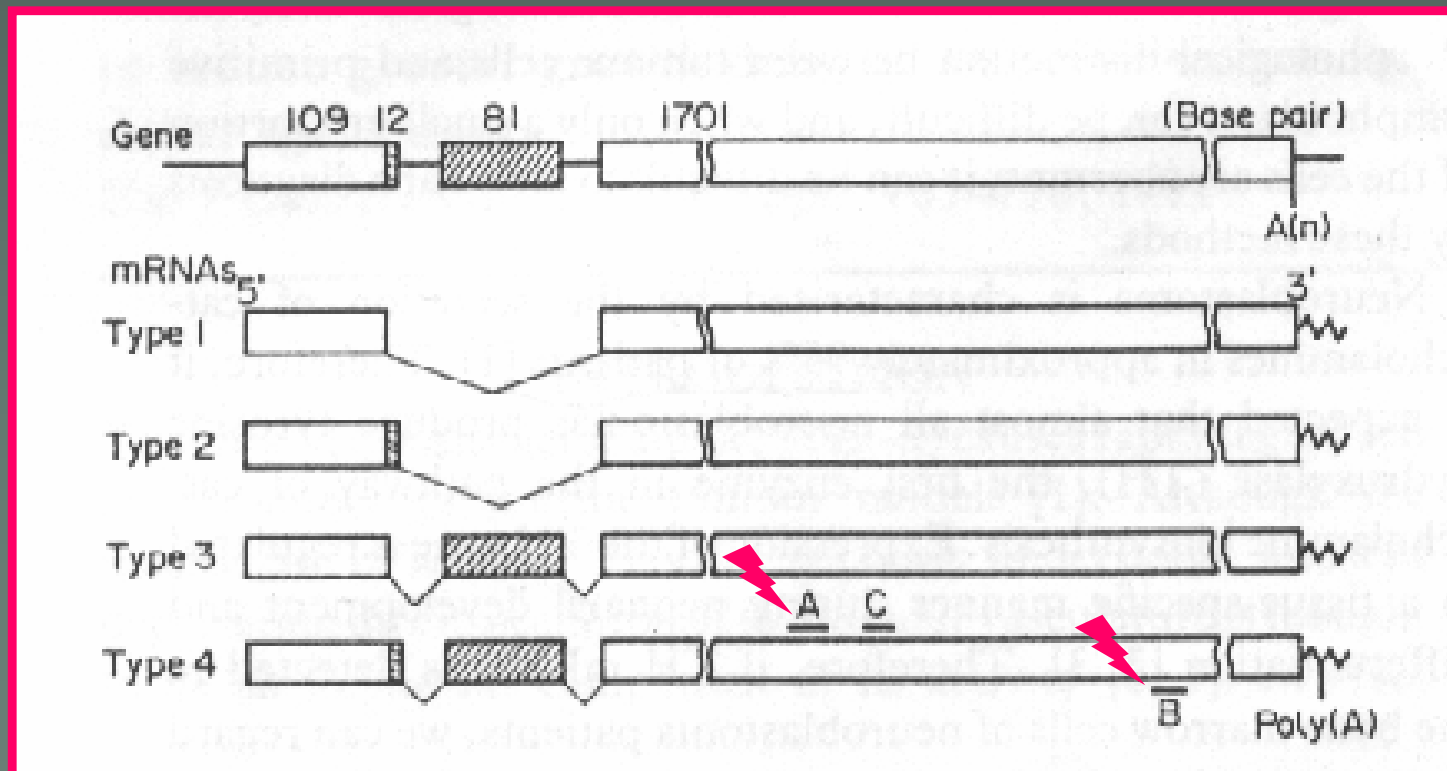
- 1.enzym dráhy syntézy katecholaminů
- katecholaminy - důležité neurotransmitery a hormony, regulují vnitřní funkce a motorickou koordinaci
  - jsou sekretovány 98% NB (NB je endokrinně aktivní)
  - jejich metabolity používány pro sledování průběhu onemocnění
- exprese TH genu je regulována tkáňově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

# Biosyntéza katecholaminů



## Schéma TH mRNA

- lokalizace genu TH v oblasti 11p15.5
- struktura čtyř typů lidské TH mRNA (*lišících se vlivem alternativního splicingu - inzercí/delecí 12pb a 81pb*)

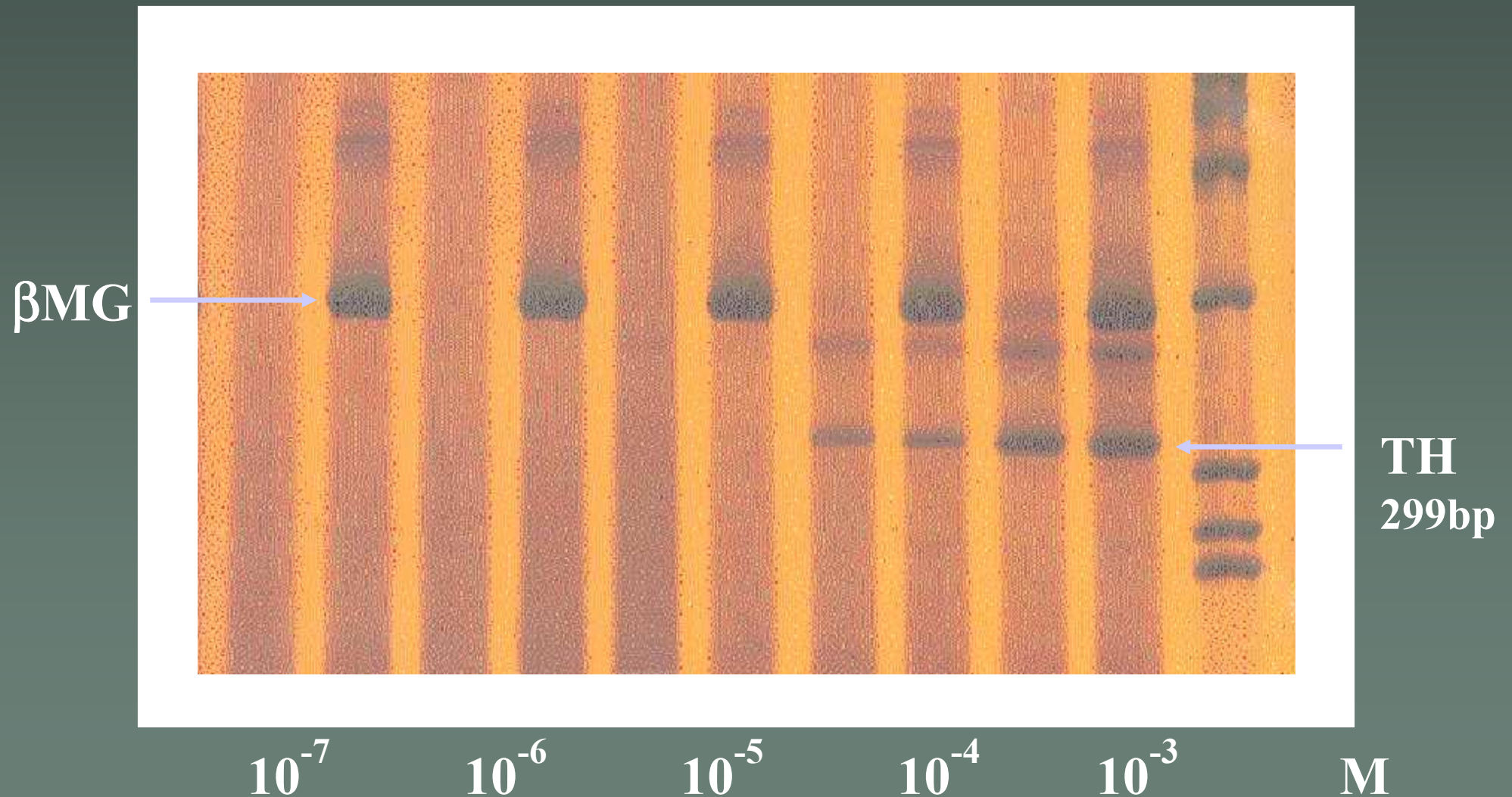


# Strategie detekce exprese TH genu

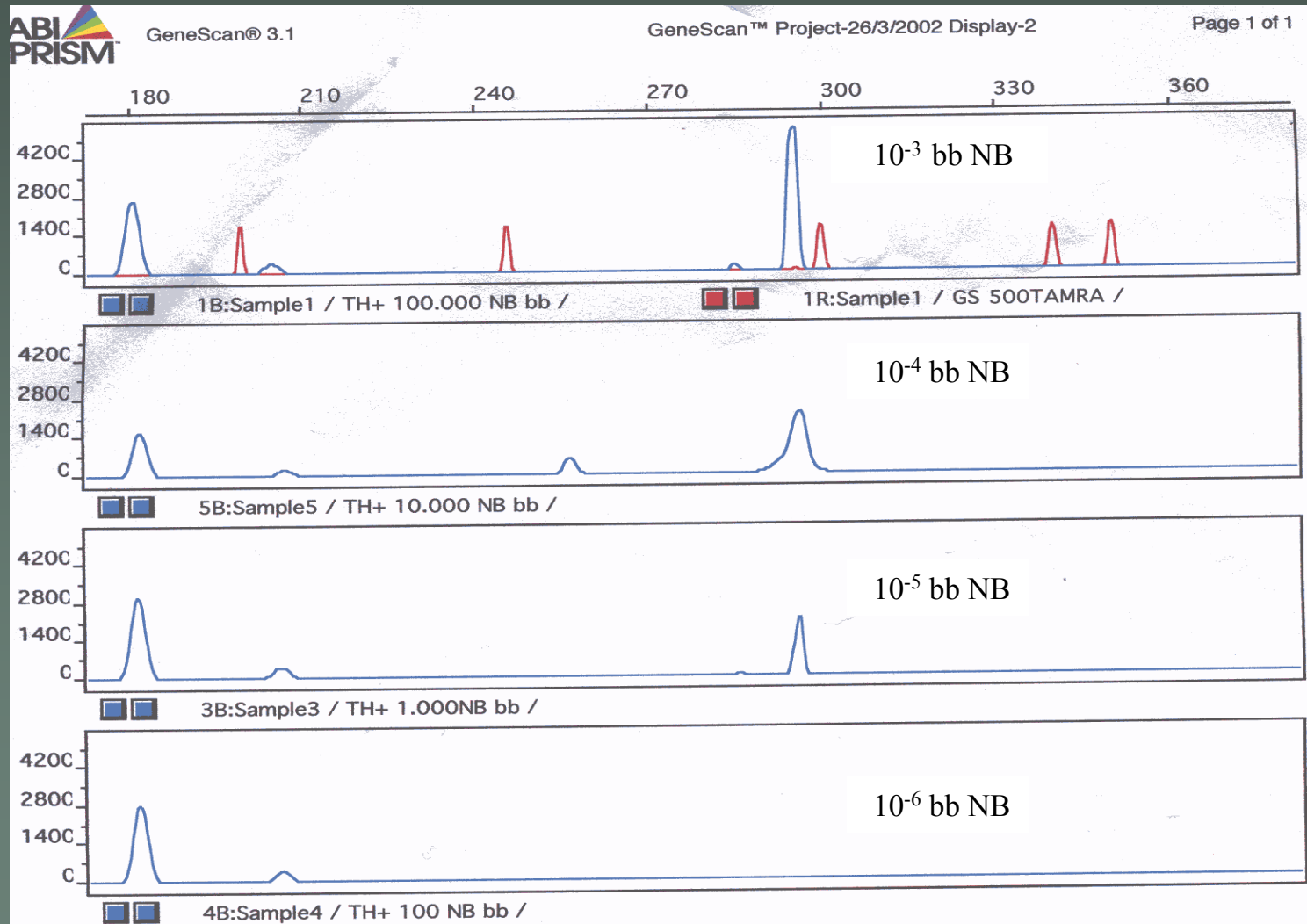
---

- ↪ Izolace mRNA (PB, BM, tkáň nádoru)
- ✿ RT-PCR ⇒ cDNA
- ✿ PCR ⇒ syntéza úseku DNA odpovídajícího mRNA pro TH
  - ⇒ syntéza DNA pro  $\beta\mu$ G (provozní gen)
  - kontrola kvality RNA a RT
- ✿ ELFO - 5% PAGE, barvení stříbrem
  - ~ Fragmentační analýza (ABI PRISM)
- ↪ Stanovení citlivosti ⇒ RNA izolovaná z NB buněčné linie IMR-32

# Citlivost detekce TH mRNA - PAGE



# Citlivost detekce TH mRNA - fragmentační analýza



## 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...)



Z průběžných výsledků vyplývá detekce *molekulárního* relapsu onemocnění s **měsíčním předstihem** od klinicky diagnostikovaného relapsu

### Kazuistika R.E. s dg. neuroblastom IV. stadia

| datum odběru BM | exprese TH genu                          | FISH                         | klinický stav   |
|-----------------|--|------------------------------|---|
| 1. 3. 01        | KD pozitivní<br>PK pozitivní             | Nmyc -<br>1p36 -             | KD, metastázy<br>v obratlech bederní páteře<br>1.blok CHT |
| 30.4.01         | PK KD(PS,LS, sternum)<br>slabě pozitivní | 0                            | před 2. Blokem CHT  |
| 26.6.01         | KD (LS,PS slabě pozitivní)               | 0                            | plánovaná separace PBSC                                   |
| 17.10.01        | PK, KD negativní                         | lok. amp. N-myc<br>gain17q - | před 2. PBSC (1-4.11.01)<br>VGPR                          |
| 5.11.01         | 0  | N-myc -                      |   |
| 16.11.01        | 0  | N-myc -                      |   |
| 22.11.01        | ABCD štěpy negativní<br>KD,PK negativní  | 0                            |   |
| 25.1.02         | PK negativní                             | 0                            | před vysoce dávkovanou<br>CHT s transplantací PBSC        |
| 27.2.02         | PK negativní                             | 0                            | kontrola po transplantaci                                 |
| 29.3.02         | KD-LS negativní<br>KD-PS pozitivní       |                              | <b>molekulární relaps</b>                                 |
| 26.4.02         |  |                              | <b>klinický relaps</b>                                    |

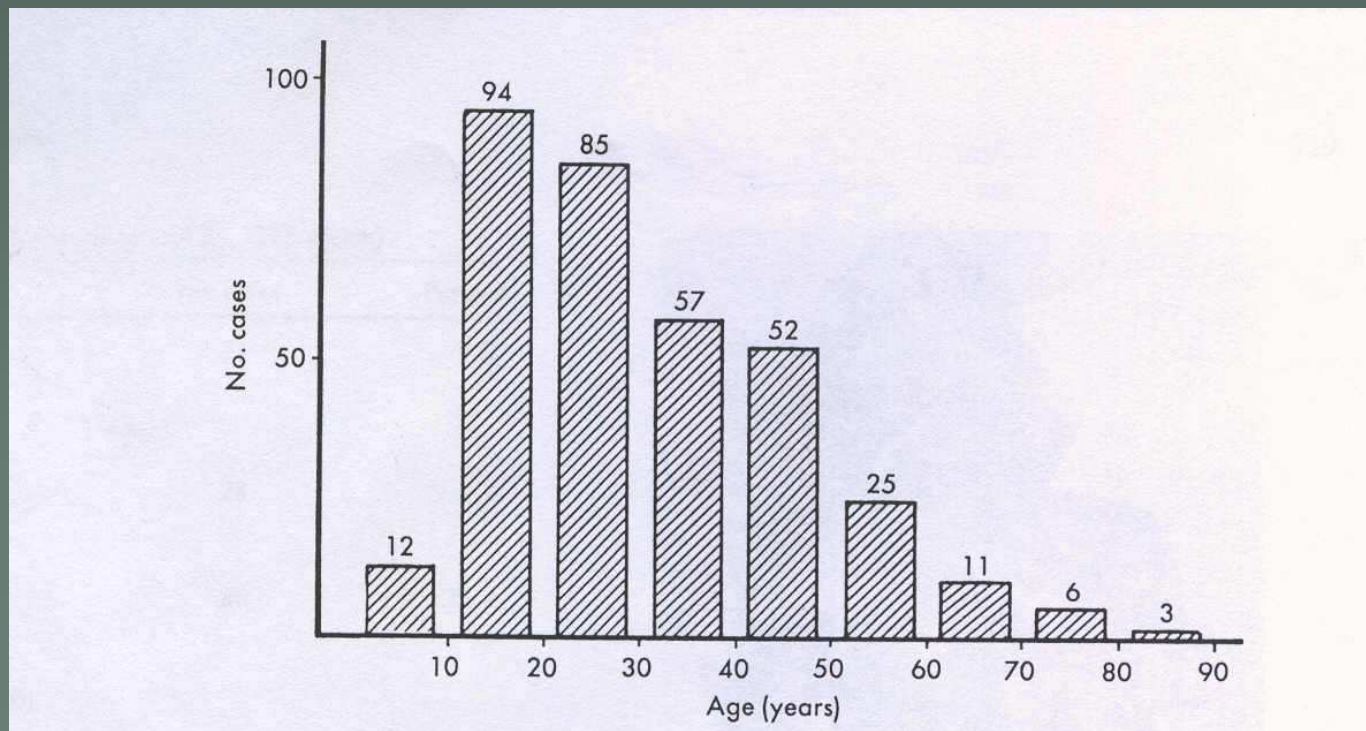
# Synoviální sarkom

- jeden z nejčastějších nádorů měkkých tkání u dospělých (vedle maligního histiocytomu, liposarkomu a rhabdomyosarkomu)
- tvoří 5,6% - 10% sarkomů měkkých tkání
- histologicky je možno klasifikovat 4 typy:
  - bifázický typ
  - monofázický fibrózní typ
  - monofázický epiteliální typ
  - špatně diferenciovatelný typ

# Klinické nálezy

## Věk a pohlaví pacientů:

- prevalence výskytu choroby je mezi 15-40 rokem života, jen zřídka se objevuje u pacientů mladších 10 let a starších 60let
- poměr postižených mužů a žen je 1,2 :1,0



## Lokalizace nádoru

- nejčastěji dolní končetiny (oblast stehna a kolena) - 60%  
horní končetiny - 23%  
hlava, krk a trup - 15-20%

## Diseminace nádorových buněk :

metastázy v plicích (94%) a v lymfatických uzlinách (21% )

| Anatomical location  | No. cases | Percent |
|----------------------|-----------|---------|
| Head-neck            | 31        | 9.0     |
| Neck (12)            |           |         |
| Pharynx (7)          |           |         |
| Larynx (7)           |           |         |
| Trunk                | 28        | 8.1     |
| Chest (10)           |           |         |
| Abdominal wall (9)   |           |         |
| Upper extremities    | 80        | 23.2    |
| Forearm-wrist (24)   |           |         |
| Shoulder (22)        |           |         |
| Elbow-upper arm (20) |           |         |
| Hand (14)            |           |         |
| Lower extremities    | 206       | 59.7    |
| Thigh-knee (102)     |           |         |
| Foot (45)            |           |         |
| Lower leg-ankle (33) |           |         |
| Hip-groin (22)       |           |         |
| TOTAL                | 345       | 100.0   |

- **Prognostické faktory**

**Table 29-3. Synovial sarcoma\***

**Favorable prognostic factors**

Young age (<15 years)  
Distal limb  
Tumor smaller than 5 cm  
Biphasic histological pattern (?)  
Marked calcification and ossification  
Euploidy

**Unfavorable prognostic factors**

Older than 20 years  
Proximal limb  
Large tumor size (5 cm or larger)  
Monophasic fibrous pattern (?)  
Poorly differentiated pattern  
High mitotic rate (>10/10 HPF)  
High nuclear grade  
Aneuploidy  
Extensive necrosis  
Vascular invasion  
Marginal excision

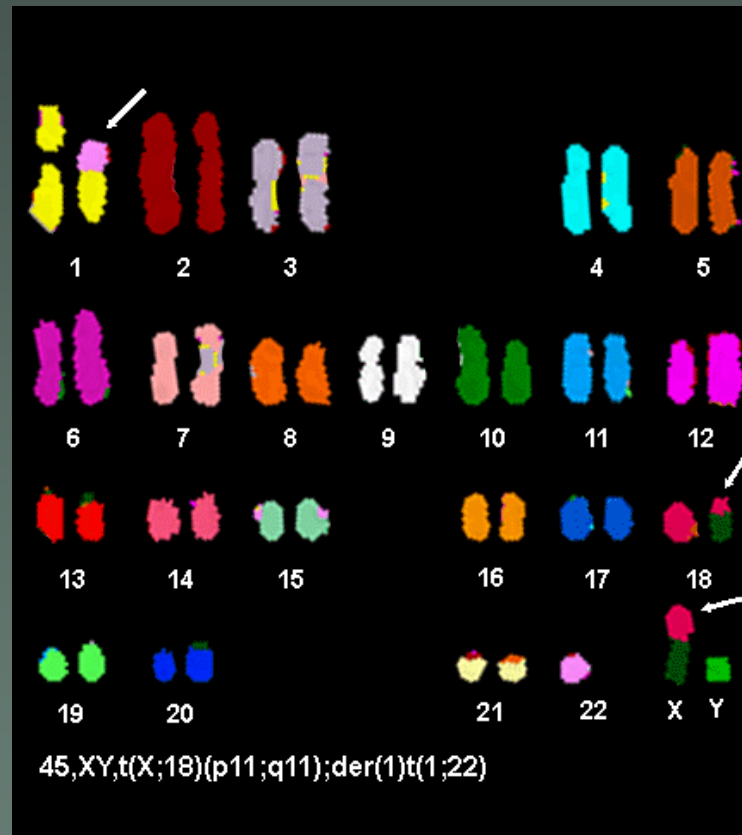
\*References 11, 27-29, 45, 111, 117, 151.

# Klinická diagnostika Synovial sarkomu

- radiografie (CT, MRI)
- mikroskopie (odlišení jednotlivých typů buněk nádoru: vřetenovité x epiteliální)
- imunohistochemie (cytokeratin, epiteliální membránový antigen)
- ultrastrukturní nálezy epiteliálních a vřetenovitých buněk
- cytogenetické nálezy : t(X;18)
- molekulárně-genetické nálezy (fúzní gen SYT/SSX1,2)

# Cytogenetika

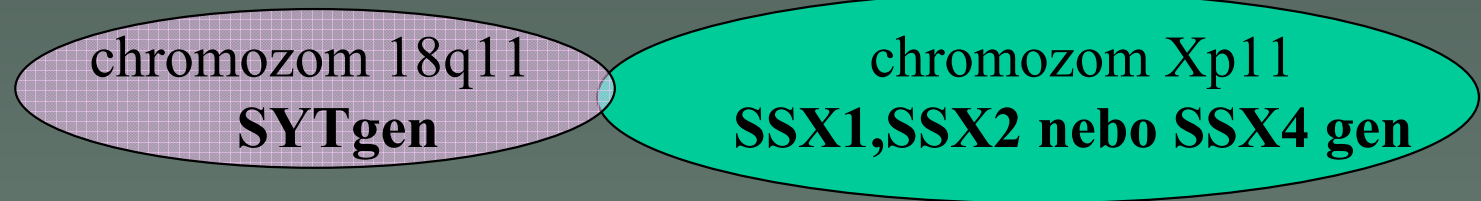
- translokace  $t(X;18)(q11;Xp11)$   
nalezena v 95% případů pacientů se synoviálním sarkomem



- \* jiné chromosomální aberace jsou častěji pozorovány v metastatických tkáních než v primárním nádoru
- \* metodou komparativní genomové hybridizace (CGH) byl u pacientů s více než dvěma chromosomálními aberacemi zjištěn i dřívější výskyt metastáz

# Molekulární diagnostika

- translokace X;18 → chimérický fúzní transkript (SYT/SSX1,2,4)



\*detekovatelný molekulárně genetickými metodami



# Struktury variant chimerického fúzního transkriptu SYT-SSX1/2

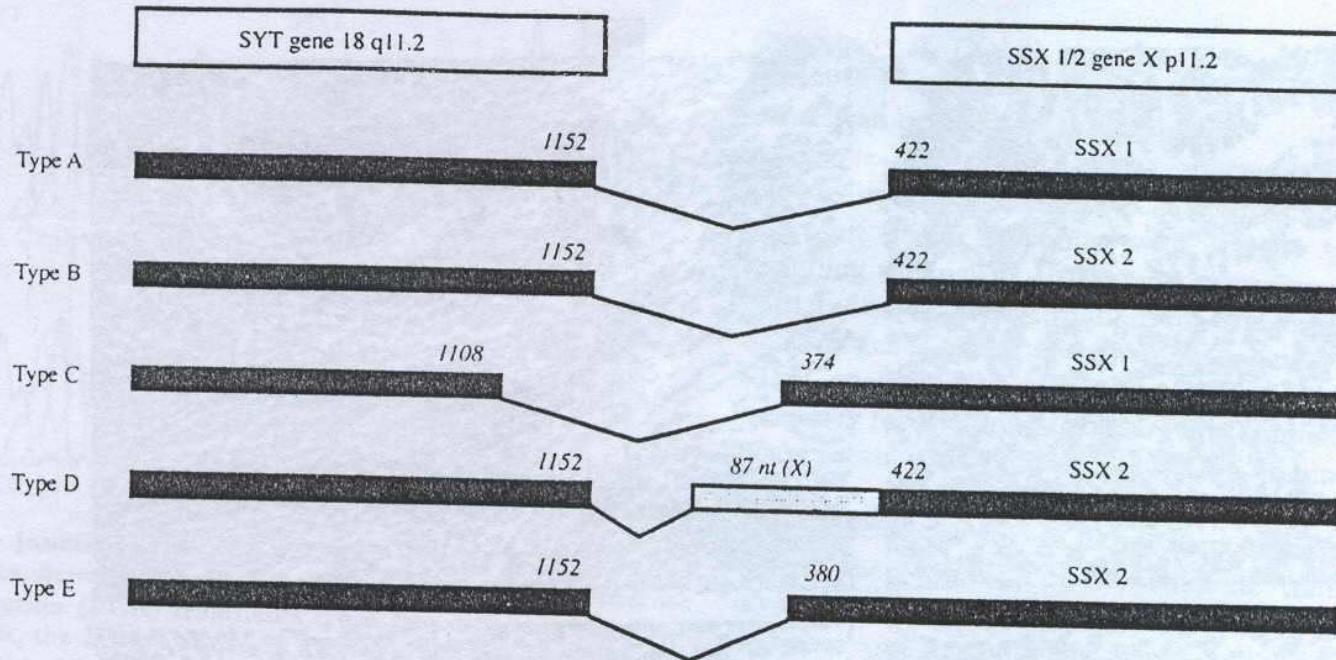

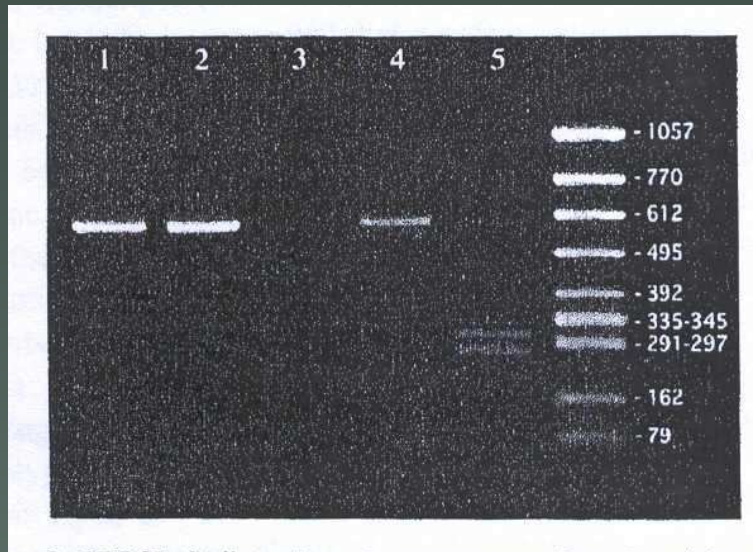


Figure 1. Structure of variant chimeric fusion transcripts of SYT-SSX1/2 [7, 9]. Enumeration of the nucleotides is given for the SYT gene (GenBank #HSSYT) and the SSX1/2 genes (GenBank # X86174 and X86175). In the type D transcript, the grey box indicates 87 nucleotides which were mapped to the X chromosome and are located between the SYT and the SSX2 part of the fusion gene [7].

# Strategie molekulárně-genetického vyšetření

- izolace RNA  z tkáně nádoru (pro potvrzení diagnózy),  
krve nebo kostní dřeně (pro sledování MRD)
- RT-PCR: přepis informace z RNA do cDNA  
zachycení fúzního transkriptu SYT/SSX1,2
- štěpení PCR produktu restrikcčními enzymy, pro rozlišení fúzního partnera genu SYT
- určení citlivosti reakce pro využití při sledování minimální residuální choroby

## RT-PCR analýza fúzního transkriptu SYT/SSX1,2



Legenda:

dráha 1: pozitivní kontrola SYT/SSX1,2

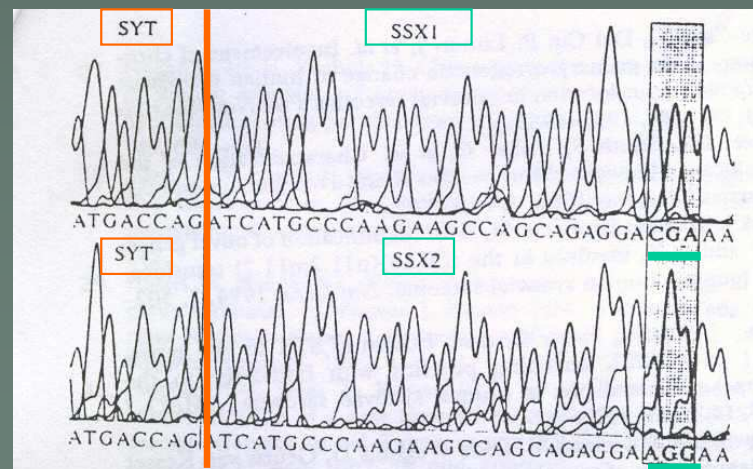
dráha 2: PCR pacienta (SYT/SSX1,2)

dráha 3: negativní kontrola

dráha 4: PCR pacienta: štěpení restr.  
enzymem SmaI

dráha 5: PCR pacienta: štěpení restr.  
enzymem NspV

## Sekvenační analýza fúzního transkriptu SYT/SSX1,2



# Biologická funkce genu SYT a genů SSX

- geny **SYT**, **SSX** a **SYT/SSX** kódují jaderné proteiny, jejichž funkce není zatím přesně známa
  - SYT gen je vyjádřen v časně embryogenezi
  - exprese SSX2 genu byla detekována u pacientů s maligním melanomem, u 25-30% pacientů s nádorem prsu a tlustého střeva
  - chimérický gen SYT/SSX kóduje protein, kde 8 posledních AK zbytků je nahrazeno 78 AK zbytky z C-konce SSX proteinu
- \* SYT-protein: ko-aktivátor transkripce, SSX-protein: ko-represor (Santos, 2002), SYT/SSX-protein: C-konec SSX domény přesměruje SYT-aktivační doménu na nový cílový promotor (Thaete 1999)