

DIAGNOSTIKA

RNA

EXPRESE

SESTŘIH „SEKV. EXONŮ“

DNA

PŘÍMÁ

SCORING

- Restrikční analýza PCR produktu
- Hybridizace PCR produktu s alelově specifickými oligonukleotidy
- detekce variant pomocí sond
- ARMS
- MLPA
- Triplet Primed PCR

SCANNING

- analýza teploty tání (SYBR Green)
- sekvenování

NEPŘÍMÁ

analýza mikrosatelitů

RNA v diagnostice

- **Detekce infekčních agens**
- **Přímá RNA diagnostika** - screenování celé kódující oblasti příslušného genu (eliminace intronů, poskytuje informace o alternativním sestřihu)
- **Analýza genové exprese:**
 - 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

RNA

savčí buňka:

- 10 - 30 pg celkové RNA
 - rRNA (28S,18S, 5S) 80-85%
 - tRNA, snRNA 15-20%
 - mRNA 1-2%

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

Izolace RNA

Pro selektivní izolaci mRNA se využívá zejména její polyadenylace (sekvence A_n $n \sim 10 - 200$, ozn. polyA) na jejím 3` konci.

- použití pevného nosiče, na který je kovalentně navázán oligonukleotid polyT, jehož délka se pohybuje v rozmezí 10 – 20 nukleotidů.
- dojde k hybridizaci mRNA k polyT na nosiči pomocí sekvence polyA.
- po odmytí nenavázaných RNA jsou hybridizačně navázané molekuly mRNA eluovány pomocí zvýšení teploty nebo iontové síly.

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

Analyzovaná RNA musí reprezentovat *in vivo* expresi a sekvenci 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

isothiokyanát
(inhibitor RNáz)

stabilizace RNA ve vzorku při odběru :

- okamžité zmrazení v tekutém dusíku a uložit při -80°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°C (bez degradace RNA po 1 roce uložení)**

Reverzní transkripce

1970 David Baltimore, Howard Temin a Satoshi Muzitani



David Baltimore in the 1970's.
Image via the National Library of Medicine
(image in public domain).



Howard Temin in the 1970's.
Image via via Nobelprize.org. Nobel Media
AB 2013

Reverzní transkriptáza (RT)

RNA-dependentní DNA-polymeráza

katalyzuje transkripci jednovláknové RNA (ssRNA) do jednovláknové DNA (ssDNA)

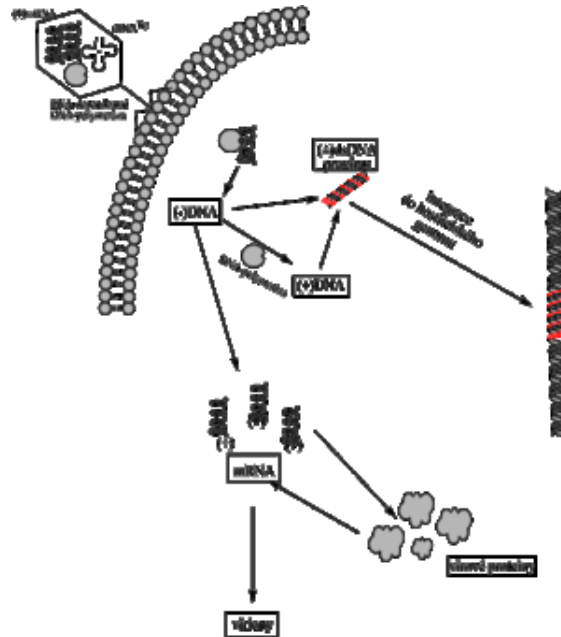
patří do skupiny enzymů s polymerázovou aktivitou

Reverzní transkripce

1970 David Baltimore, Howard Temin a Satoshi Muzitani

Retrosvět

Rozmanitá kolekce sekvencí DNA vytvářených reverzní transkripcí



Reverzní transkripce

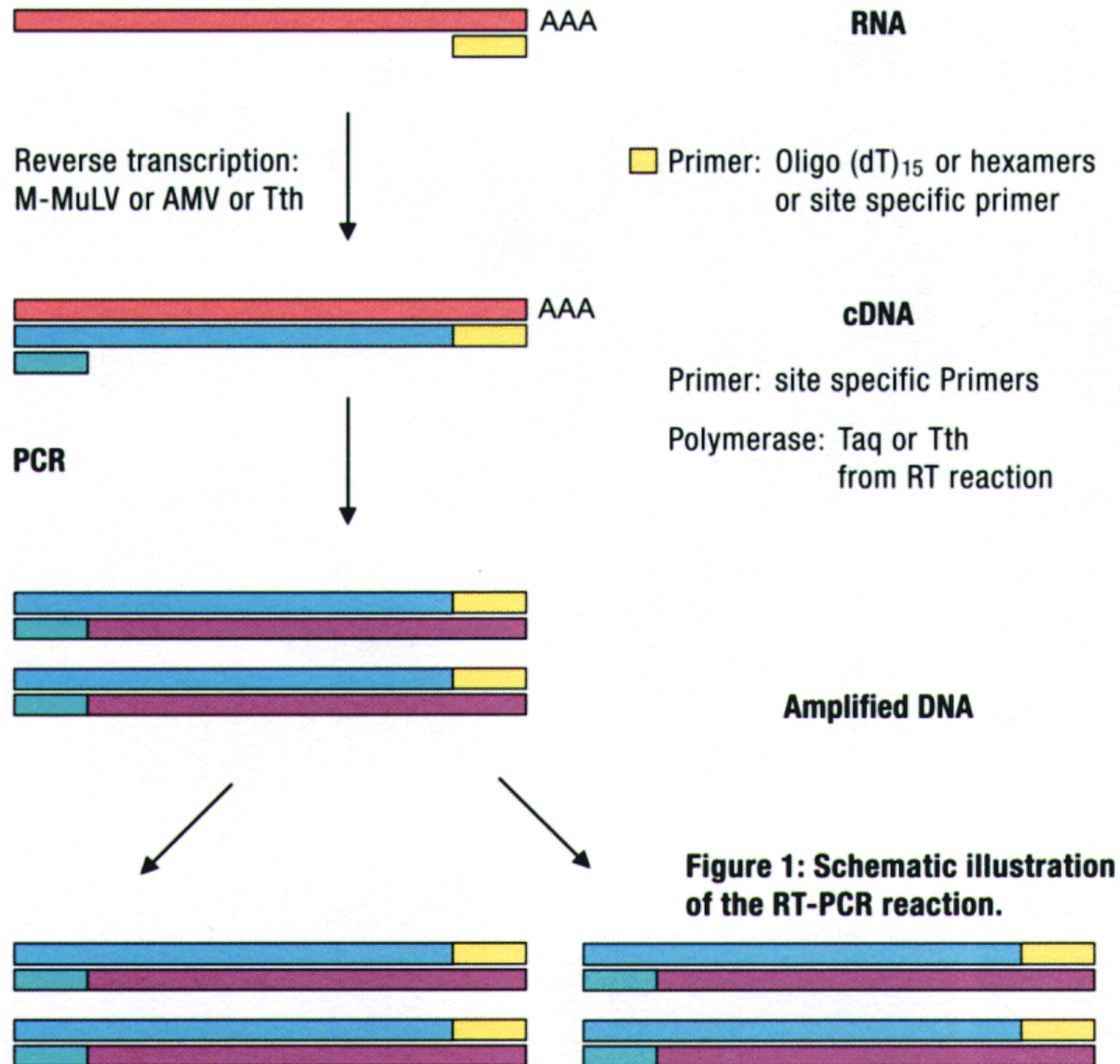
Reverzní transkriptázy

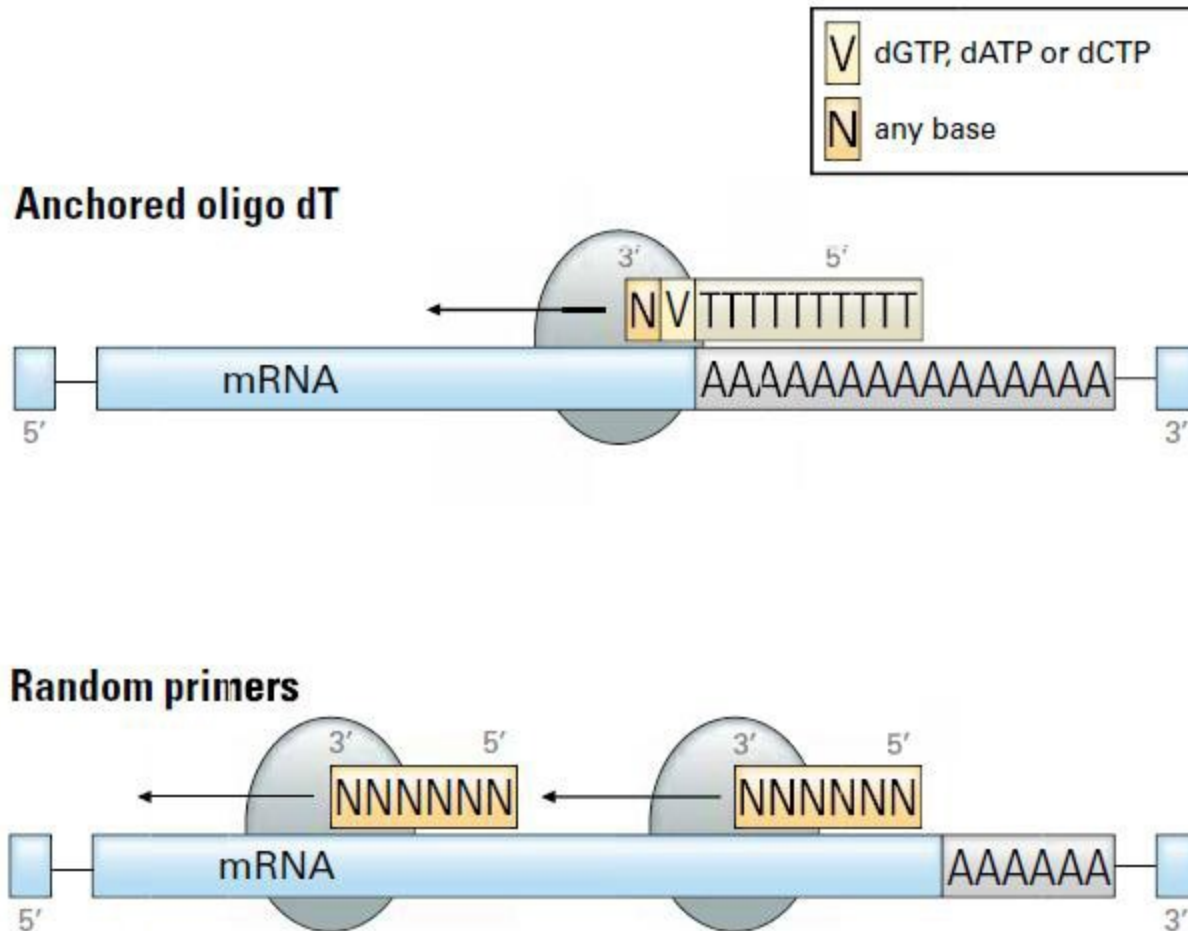
M-MuLV	Moloneyho myší leukemický virus	do 10 kb	37 C	
AMV	ptačí myeloblastický virus	do 10 kb	42 C	
Tth	bbakteriální termostabilní polymerasa	do 2 kb	65 C	nemá aktivitu RNasy H, vyžaduje Mn +2 kationty v reakci

Používají se tři typy primerů:

- specifické oligonukleotidy pro syntézu vybrané určité mRNA
- směs náhodných hexanukleotidů
- oligo(dT)
 - oligo(dT)₂₀ homogenní mix 20-mer thymidinů
 - oligo(dT)_{12–18} mix od 12-mer do 18-mer thymidinů .

Reverzní transkripce

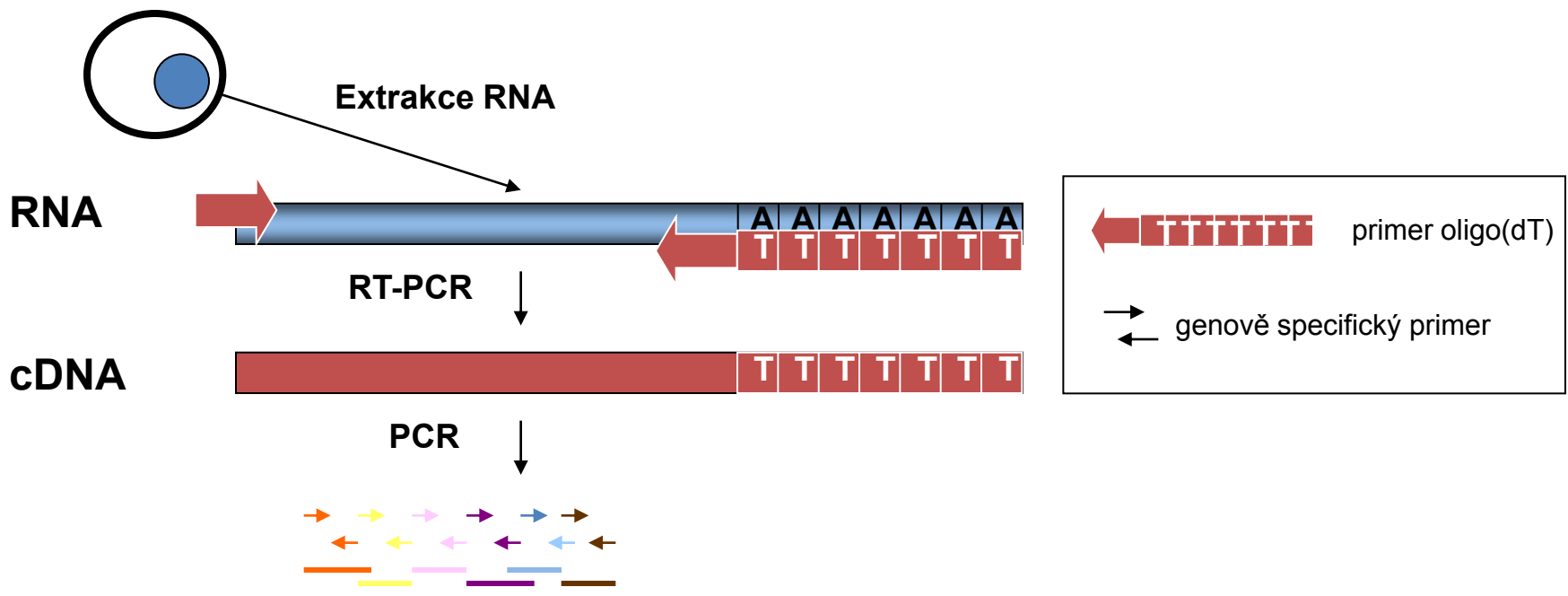




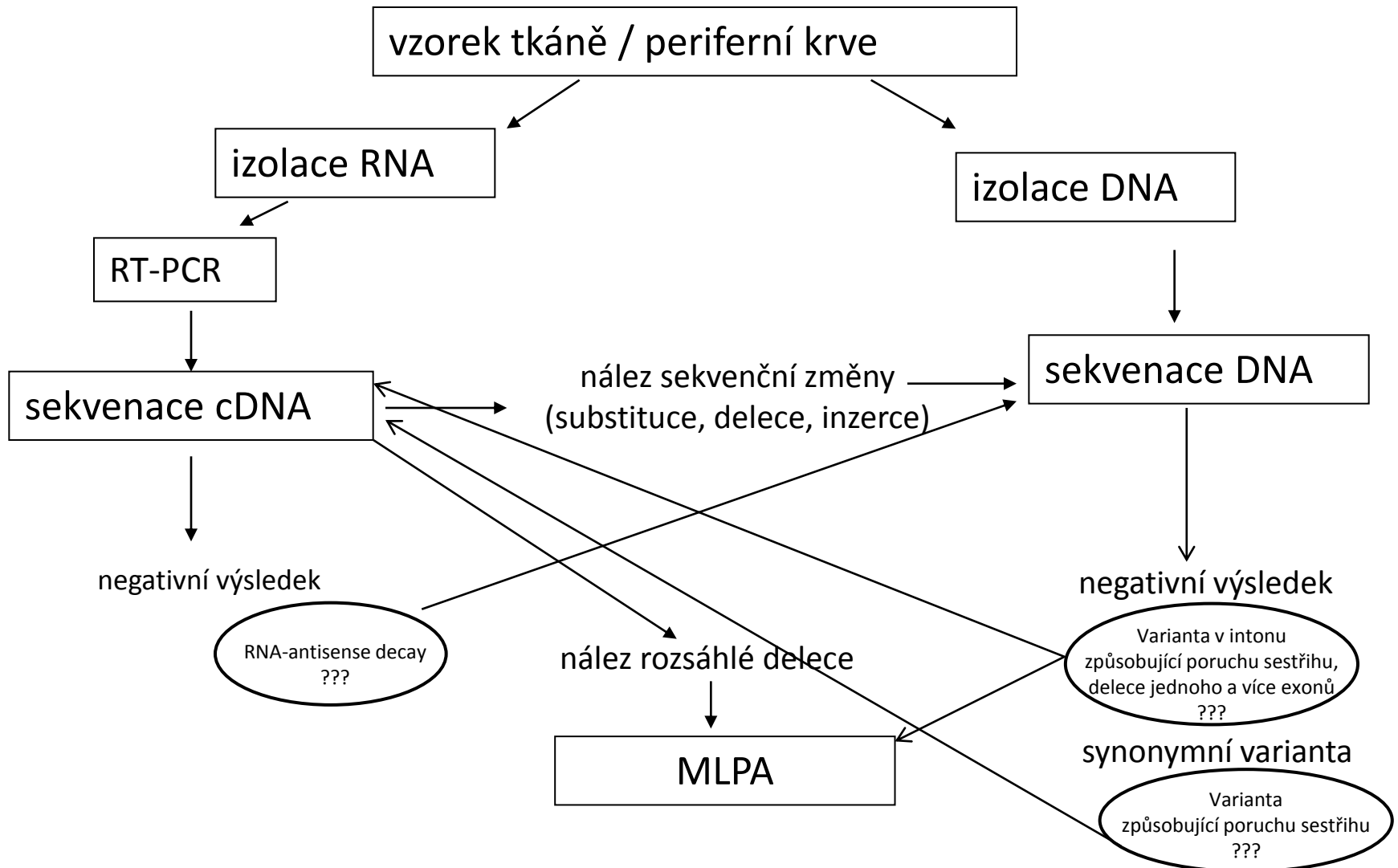
Priming strategie pro cDNA syntézu

Kombinace oligo dT a random hexamer generuje více sensitivní a účinné RT-qPCR reakce.

Přímá RNA diagnostika



Přímá DNA/RNA diagnostika



Výhody a nevýhody RNA diagnostiky genů

- jednodušší a rychlejší skríníng multiexonického genu (10 segmentů cDNA místo 60 exonů), mRNA je bez intronů
- záchyt sestřihových mutací v intronech
- záchyt synonymních variant způsobujících poruchu sestřihu
- záchyt delece celého exonu na jedné alele genu
- nižší ekonomické náklady
- složitější odběr krve pro izolaci RNA
- nižší stabilita RNA
- dlouhé úseky genu obtížnější elektroforetická separace a sekvenace
- RNA-antisense decay

Výhody a nevýhody RNA diagnostiky genů

Analýza DNA

Analýza cDNA

GTG>GTA

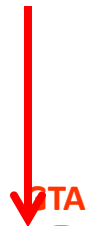
c.2709G>A

p.V903V

c. 2707_2850del

p.V903-Q950del48

Splice error

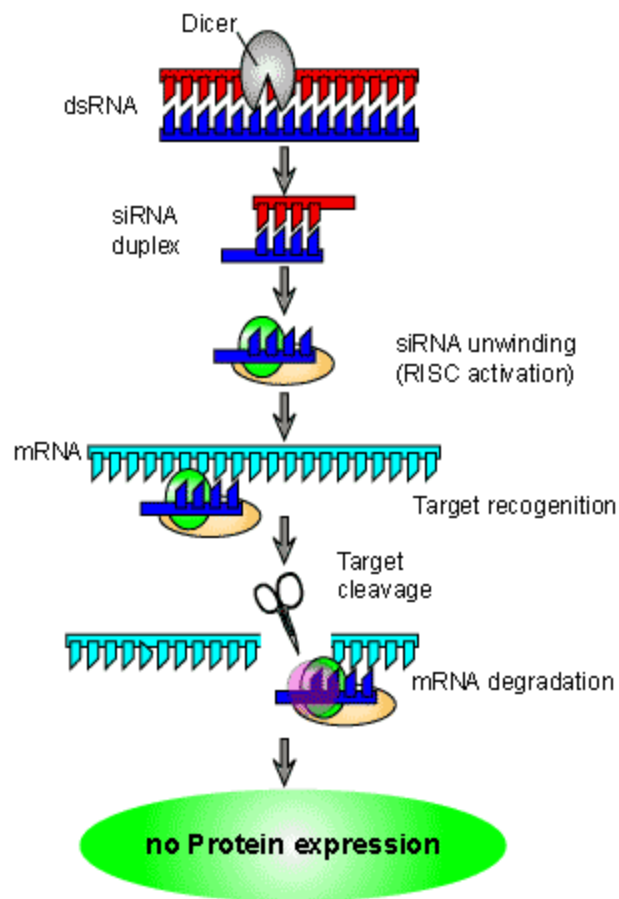


3061 AATTTATGGATCGGCTGTTGTCCTTAATG**GTG**TGTAACCATGAGAAAGTGGGACTTCAAA 3120

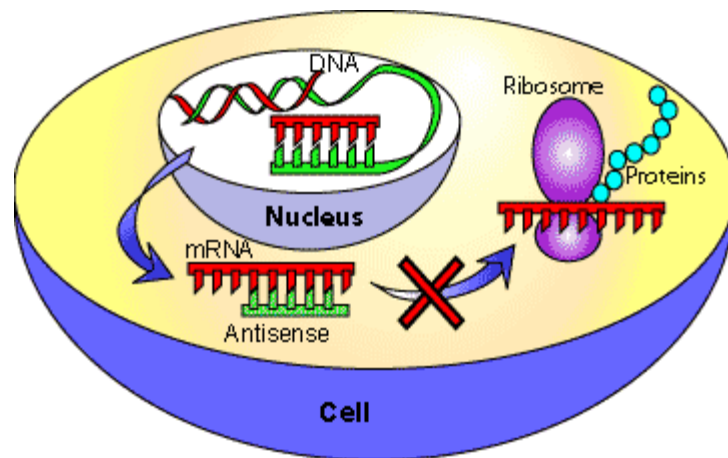
2678 AATTTATGGATCGGCTGTTGTCCTTAATGGTGTGTAACCATGAGAAAGTGGGACTTCAAA 2737

893 K--F--M--D--R--L--L--S--L--M--V--C--N--H--E--K--V--G--L--Q-- 912

Výhody a nevýhody RNA diagnostiky genů

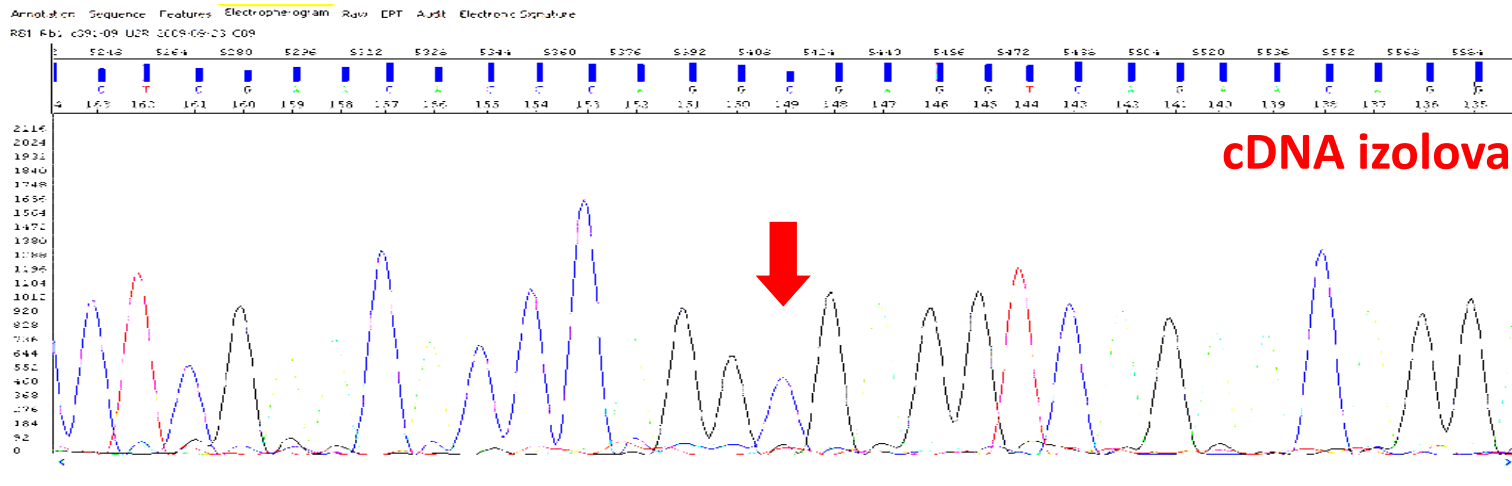
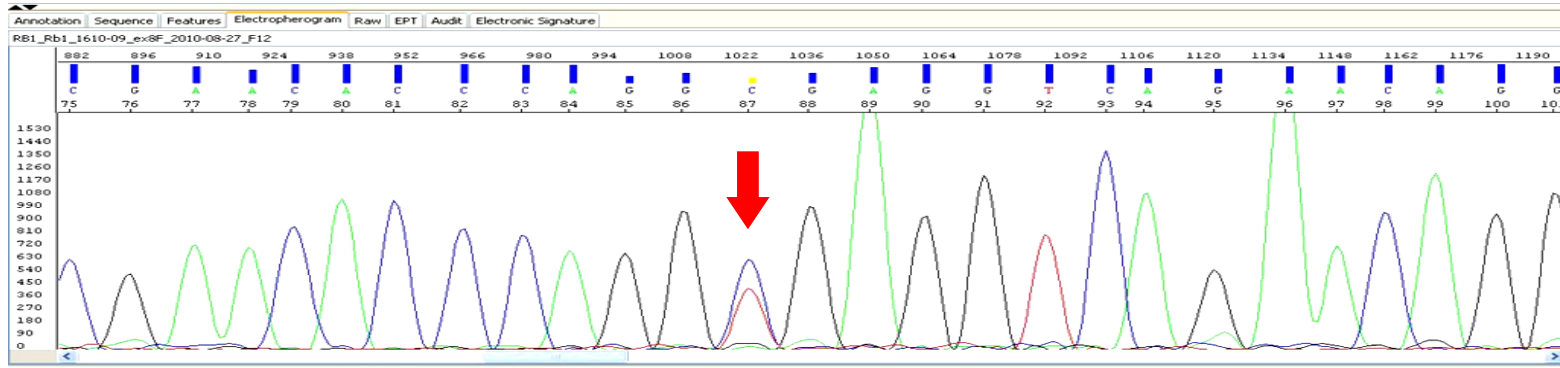


RNA-antisense decay



Retinoblastom – metodou Sangerovo sekvenování

RB1 gen: p.[R255X]+[=], c. [763C>T]+[=] **DNA izolovaná z krve**



cDNA izolovaná z krve

Project Name: Pokus2

Location: /home/gsjunior/Desktop/Pokus/Pokus2

Overview

Project

Computations

Variants

Global Align

Consensus Align

Global Align - Sample_2 x 1608/09_ex8

Alignment Data

Sample_2



1 Selected

Read Type

- Consensus
- Individual

Reported Frequency

- Global
- Relative

Read Orientation

- Any
- Forward
- Reverse

Refposn: 148 C

A % = 0
C % = 50
G % = 0
T % = 50
N % = 0
- % = 0
reads: 12

Legend



```
AGCTGTTATACCCATTAATGGTTCACCTCGAACACCCAGGC GAGGTCAGAACAGGAGT  
AGCTGTTATACCCATTAATGGTTCACCTCGAACACCCAGGC GAGGTCAGAACAGGAGT  
AGCTGTTATACCCATTAATGGTTCACCTCGAACACCCAGGT GAGGTCAGAACAGGAGT  
AGCTGTTATACCCATTAATGGTTCACCTCGAACACCCAGGC GAGGTCAGAACAGGAGT
```

CON_2 (2>) = 16.67%; C@148=5

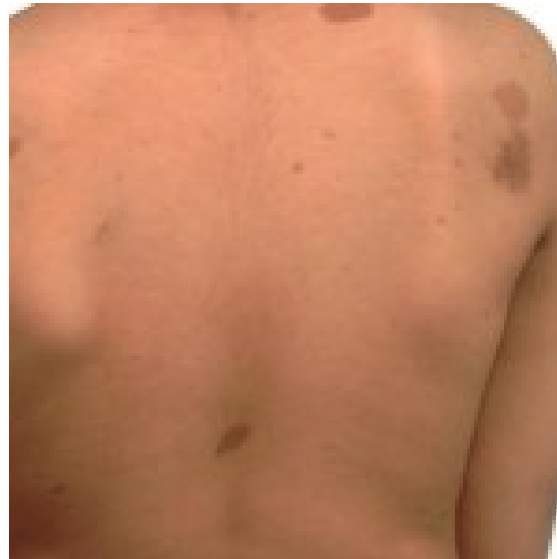
Neurofibromatoza typu 1

von Recklinhausen disease

NF1 příznaky

Skvrny bílé kávy

Nejčastější projevem NF1 je vznik mnoha bezbolestných, světle hnědých skvrn na kůži, které jsou známy pod názvem “café au lait spots” a které postihují 95% pacientů s NF1. Tyto skvrny mohou být přítomné již po porodu, nebo se objeví v průběhu prvních tří let života. Během dětství se u většiny dětí s NF1 vyskytne alespoň šest těchto flíčků o velikosti cca 5 mm. Během dospívání dané skvrny rostou a v dospělosti u většiny pacientů dosahují okolo 15 mm.



Pihy

Dalším obvyklým příznakem NF1 je seskupení pih na neobvyklých místech jako je např. podpaží, ve slabinách či pod prsy.

NF1 příznaky

Nezhoubné nádory na kůži nebo pod kůží – neurofibromy

S přibývajícím věkem, obvykle poté v době dospívání či na počátku dospělosti, se osobám s NF1 vytvoří **neurofibromy**, což jsou nezhoubné nádory rostoucí na povrchu nervových tkání pod kůží. V době dětství nabývají velikost hrášku, avšak s přibývajícím věkem se zvětšují. Počet neurofibromů se u každé osoby liší. Někteří jich mají na těle pouze několik, kdežto jiným pokrývají celé tělo. Většina neurofibromů není bolestivá, avšak jejich vzhled se může jevit jako neatraktivní; mohou se zachytit na oblečení a občas také mohou způsobit podráždění či štíplavý pocit. U některých osob mohou způsobovat rozlehlá bolestivá opuchnutí. V nejhorších případech dochází poblíž jejich výskytu k poškození kostí



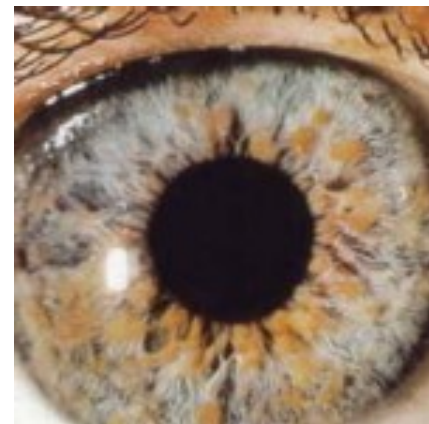
NF1 příznaky

Oči

Okolo 14% dětí s NF1 se vyvine nádor uvnitř optického nervu – tzv. **gliom optiku**. Tento nádor bývá obvykle nezhoubný. Úkolem gliom optiku, optického nervu umístěného v pozadí každého oka, je odesílání informací z očí do mozku.

Největší výskyt tohoto typu nádoru je u dětí ve věku sedmi let. Mnohé z těchto nádorů jsou malé, vyznačují se pomalým růstem a nezpůsobují žádné problémy. Nicméně u dětí s rychle rostoucím nádorem se brzy mohou objevit potíže se zrakem.

Dalším frekventovaným příznakem jsou malé hnědé skvrny na duhovkách, jež se označují jako Lisch uzliny. Ve většině případů nezpůsobují žádné potíže se zrakem, ani jiné nepříjemnosti.



NF1 příznaky

Mozek a nervový systém

Příznaky postihující mozek a nervový systém jsou u osob s NF1 poměrně běžné. Cca 20% osob trpí migrénami, u 5% se objeví mozkový nádor. Tyto nádory jsou zpravidla malé, nezhoubné a nezpůsobují žádné viditelné symptomy.

Výjimkou jsou však nádory, které se občas vyskytnou v určitých částech mozku, a které způsobují příznaky jako jsou:

Změny osobnosti

Slabost na jedné straně těla

Potíže s rovnováhou a koordinací

U cca 7% pacientů se vyvine epilepsie s opakovanými záchvaty. Většinou se jedná o mírnou formu epilepsie s nepravidelnými záchvaty.

Maligní nádor pochvy periferního nervu (MPNST)

MPNST je zřejmě nezávažnějším příznakem u osob s NF1. Jedná se o typ rakoviny, který se objevuje u cca 10% osob s NF1 a to nejčastěji ve věku mezi 20-35 let.

Příznaky:

Neurofibromy se změní z měkké tkáně na tvrdou

Existující neurofibromy se náhle zvětší

Konstantní bolest delší než jeden měsíc nebo bolest, která pacienta nutí vstávat

Náhlé problémy s nervovým systémem, které se u pacienta nevyskytovaly v minulosti: např. slabost, necitlivost či pocit brnění v rukou či nohou

Ztráta kontroly močového měchýře či střev

Neurofibromatoza typu 1

von Recklinhausen disease

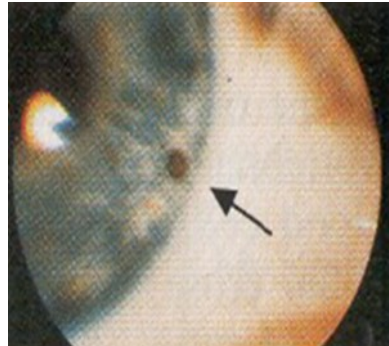
Autosomálně dominantní

Frekvence 1:3000

Lokus 17q

50% mutací de novo

Predispozice k tumorům
nervového systému



Lisch nodule



Café-au- lait spots

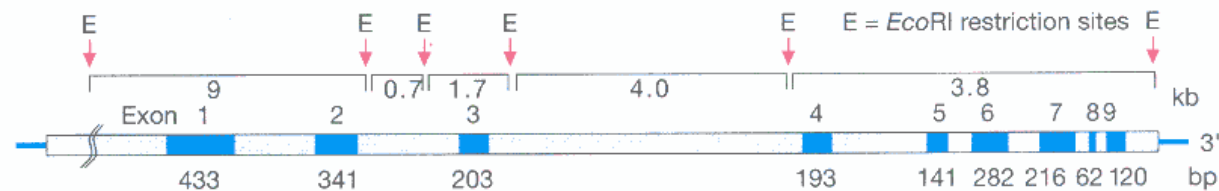


Neurofibromy

Neurofibromatoza typu 1

Molekulární diagnostika

Struktura NF1 genu



- 350 kb

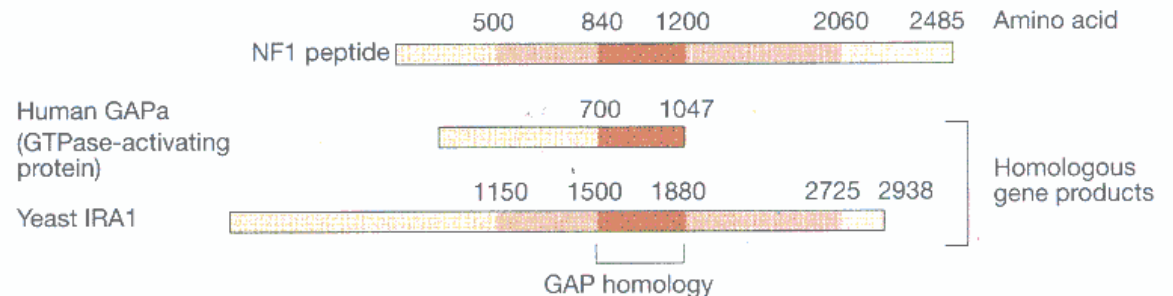
- 60 exonů

- 11 - 13 kb mRNA

- protein neurofibromin

- 2818 aminokyselin

- zřejmě tumor supresor



C. NF1 gene product (neurofibromin)

Neurofibromatoza typu 1

Molekulární diagnostika

Komplikace při molekulární diagnostice NF1

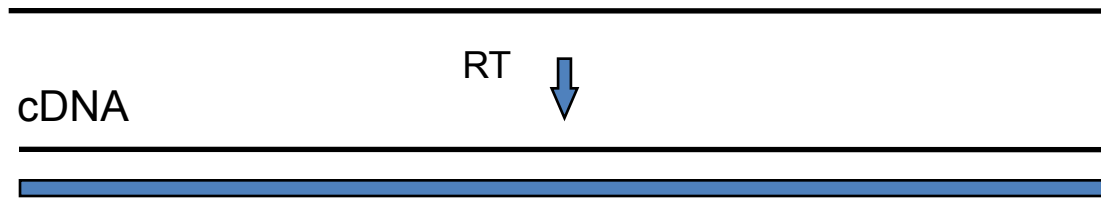
- problematická klinická diagnostika
- až 50 % případů *de novo*
- vysoká mutační rychlost
- velikost genu (350 kb, 60 exonů)
- absence hot spot oblastí - nutnost vyhledávání v celém genu
- nejasná korelace mezi typem mutace a formou postižení
- neurofibromin - známa funkce pouze jeho centrální domény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

Neurofibromatoza typu 1

Molekulární diagnostika

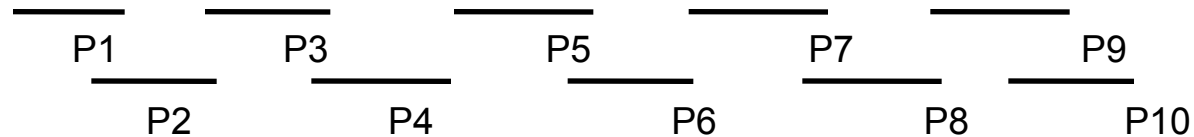
cDNA analýza

celková RNA



PCR ↓

NF1 cDNA (60exonů)

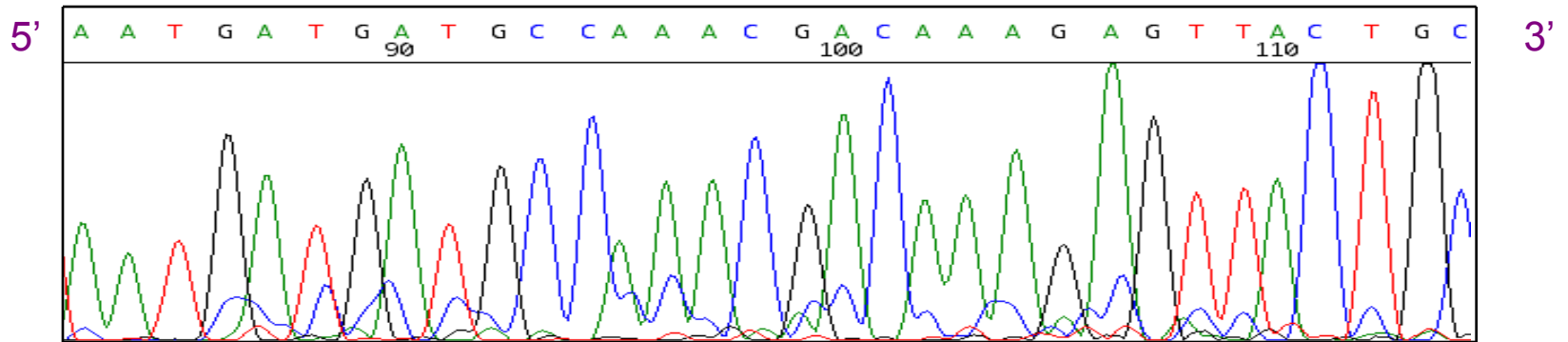


↓ (~ 1000 - 1200bp)

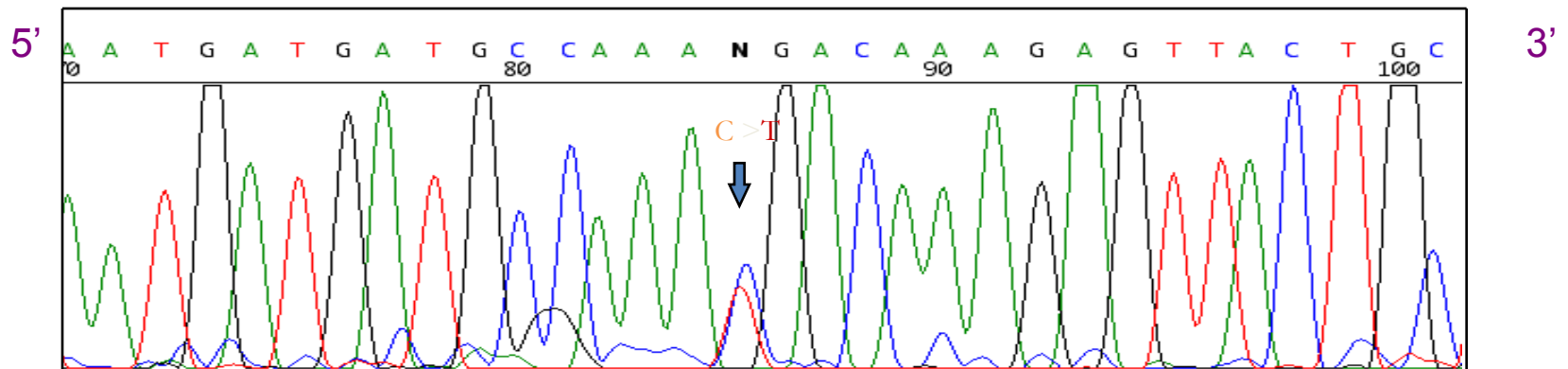
Sekvenační analýza

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

standardní cDNA



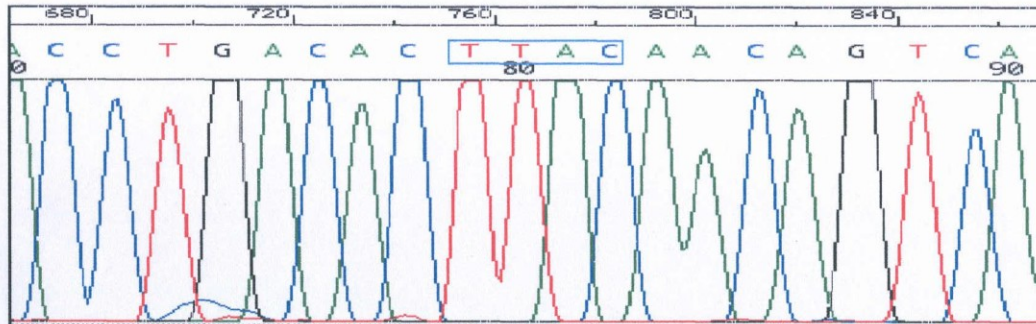
cDNA NF1 pacienta, mt



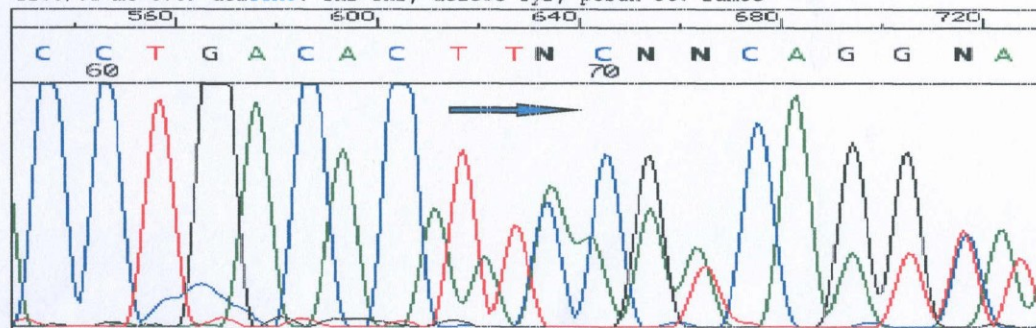
Sekvenace DNA segmentu

GEN NF1 - exon 37

standard DNA



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



Analýza genové exprese

Analýza exprese v onkologii

Nádorové buňky se od normálních zdravých buněk liší na molekulární úrovni svým expresním profilem



nádorová buňka exprimuje jiné geny ze své výbavy



projeví se změnou množství a spektra exprimované mRNA

využití metody real-time RT-PCR - studium genové exprese,

hledaným znakem epiteliálních nádorových buněk je mRNA.

Onkomarkery

Nádorové markery jsou látky produkované maligními buňkami, nebo organismem jako odpověď na nádorové bujení.

Od látek produkováných normálními buňkami se liší kvalitativně – normální buňky je neprodukují, či kvantitativně – produkované i normálními buňkami.

Jaký mají onkomarkery klinický význam

Klinický význam jednotlivých markerů je i u samotných odborníků, zabývajících se problematikou onkomarkerů značně diskutovaným problémem. I jejich stanoviska se postupem času měnila. Od původního přeceňování až k úplnému zatracení a novému uznání. Verifikace významu onkologických markerů a jejich využití v ambulantní praxi neustále probíhá.

Statistické pojmy pro klinické hodnocení

1. Cut off – referenční hladina

je definována jako hladina markeru, pod kterou leží většina hodnot zdravé populace, či pacientů s benigním onemocněním, nebo hladina pod kterou leží většina hodnot pacientů v kompletní remisi

2. Senzitivita markeru

Udává procento správně pozitivních výsledků z daného souboru

3. Specificita markeru

Udává procento správně negativních výsledků z daného souboru

4. PV+

pozitivní prediktivní hodnota – udává v procentech s jakou pravděpodobností bude mít pacient hledanou chorobu, bude-li test pozitivní

5. PV -

negativní prediktivní hodnota - udává v procentech s jakou pravděpodobností nebude mít pacient hledanou chorobu, bude-li test negativní

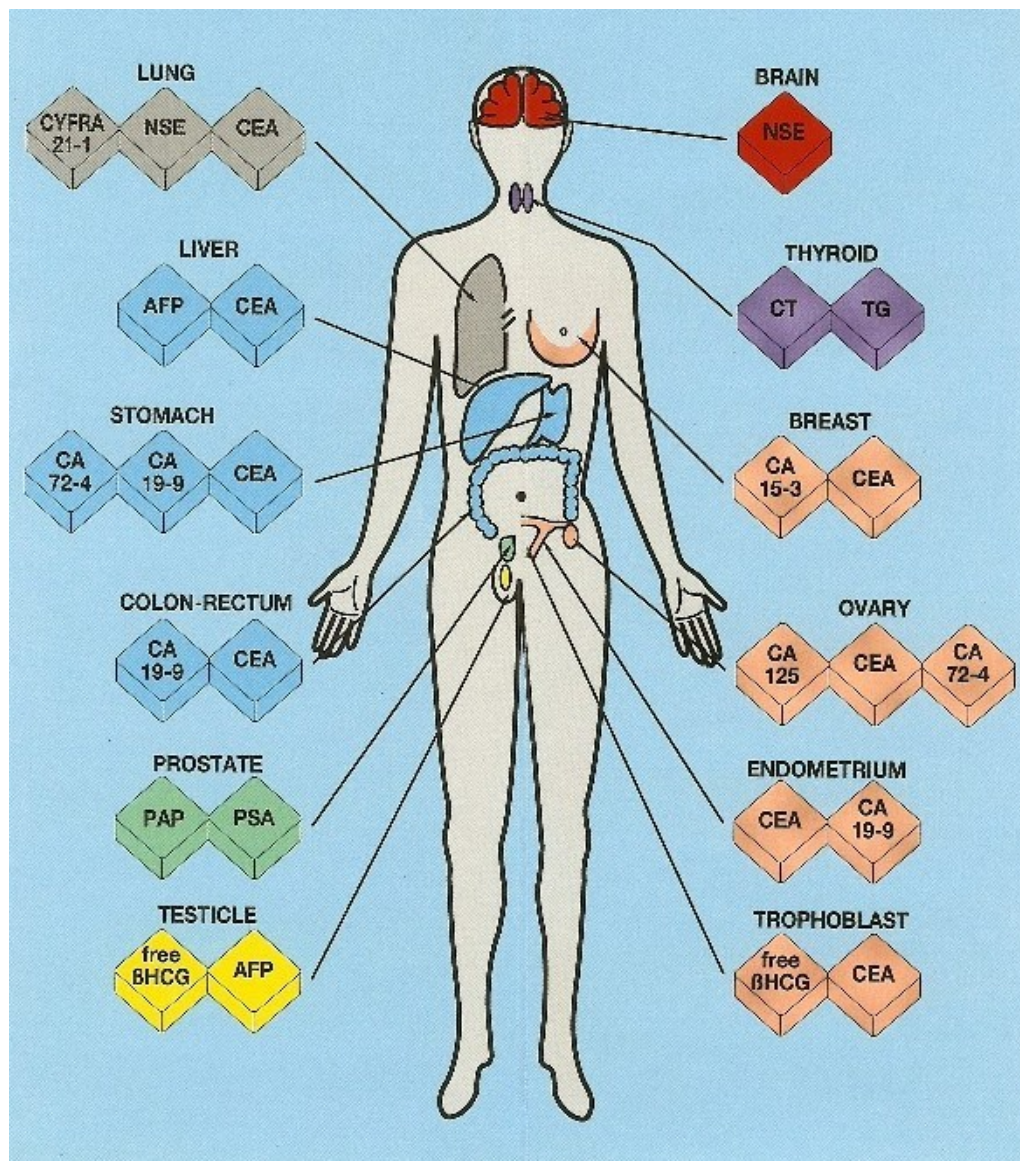
Kritéria ideálního onkomarkeru

- je produkován pouze u maligních onemocnění
- je orgánově specifický
- vyskytuje se ve vysokých koncentracích v biologických tekutinách
- hladina koreluje s velikostí nádoru
- hladina koreluje se stádiem onemocnění
- hladina koreluje s prognózou
- hladina koreluje s efektem léčby
- umožňuje průkaz zbytkové nádorové tkáně

Rozdělení onkomarkerů podle chemické struktury, nebo biologické funkce

- onkofetální antigeny
- enzymy
- hormony
- intracelulární onkomarkery
- ostatní blíže nespecifikovatelné látky

Onkomarkery: indikace podle orgánů



Zvýšení některých onkomarkerů za fyziologických, nebo nemaligních podmínek

<u>Podmínka</u>	<u>Fyziologicky zvýšené onkomarkery</u>
gravidita	AFP, hCG, Ca125, TPS, TG
menstruační cyklus	Ca125
kouření	CEA, TPS, TG
ethylismus	CEA, TPS
katetrizace moč. měch.	PAP, PSA

<u>Podmínka</u>	<u>Zvýšení onkomarkerů u jiných chorob</u>
Chron. onemocnění jater	CEA, TPS, Ca 15-3, Ca 19-9, Ca 125
Endometrióza	Ca 125
Pankreatitida	Ca 19-9, Ca 125
Hypertrofie prostaty	PAP, PSA
cukrovka	Ca 19-9

Co z toho plyne

Nádorové onkomarkery by se měly stanovovat jednou metodou v jediné laboratoři. Hodnoty onkomarkerů mohou být ovlivněny celou řadou procesů.

Pro kvalitní zhodnocení je nutná úzká spolupráce laboratoře a klinického pracoviště.

ALE...

... diagnostický práh onkomarkerů umožňuje v příznivých případech odhalit nádor o hmotnosti 1 mg, tedy asi 10^6 maligních buněk, zatímco klinická diagnóza bývá určena většinou až u nádoru, který obsahuje nejméně 10^9 buněk, tedy nádor v průměru 1 cm.

Aplikace a využití v onkologické praxi

Screening

Primární diagnostika

Diferenciální diagnostika

Staging

Sledování účinnosti terapie

Hodnocení léčebné odpovědi

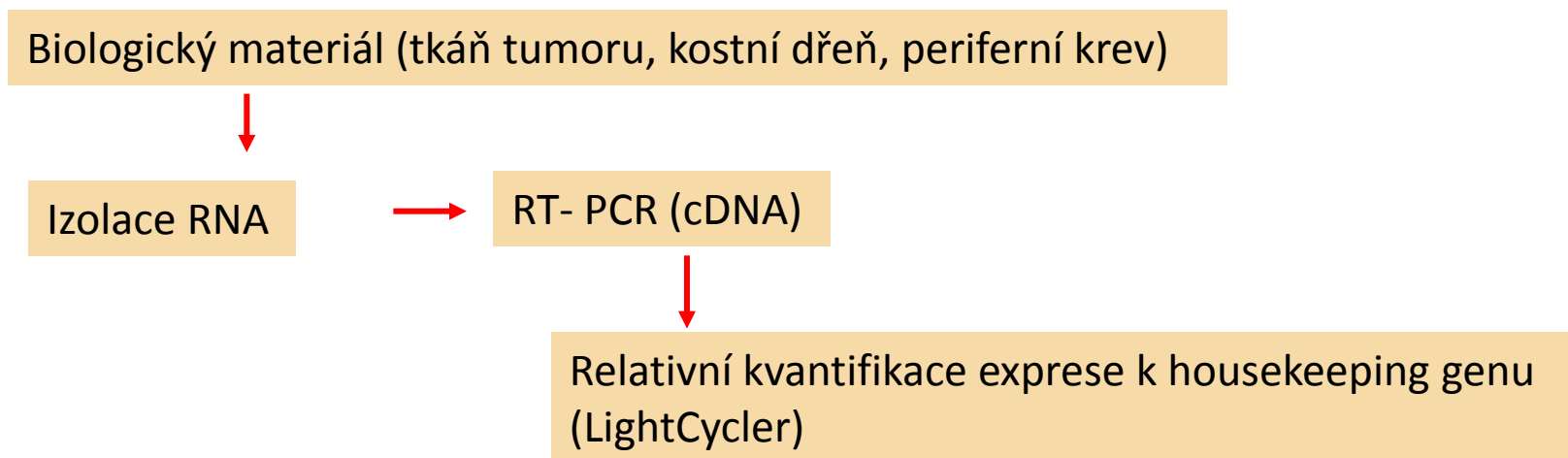
Sledování průběhu choroby

Autologní transplantace při HD chemoterapii

Prognóza

Predikce

Analýza exprese molekulárních onkomarkerů



- Pozitivní exprese markeru (např. TH, TrKC, c-myc...) může *upřesnit diagnózu* nebo poukáže na *remisi/ progresi* či na *odpovídavost na léčbu*.
- Odběry chodí opakovaně umožní sledovat minimální reziduální nemoc v čase.

Kvantifikace absolutní vs. relativní

ABSOLUTNÍ

- standardní křivka (ředění standardu)
- kvantifikace vzorku vzhledem ke standardní křivce

RELATIVNÍ

- užití housekeepingových genů
- kvantifikace cílového genu vzhledem k housekeepingovému u stejného vzorku → normalizovaný poměr → relativní kvantifikace
- ΔC_t je konstantní (poměr je vždy stejný)
- !brát v potaz účinnost reakce – nemusí být pro všechny stejná (2)!

Detekce minimální reziduální choroby

Detekujeme přítomnost izolovaných nádorových buněk v krvi, kostní dřeni a lymfatickém systému – možné prekurzory metastáz

Detekce MRD (minimal residual disease) – detekce znaků epiteliálních buněk v kompartmentech mesenchmálního původu

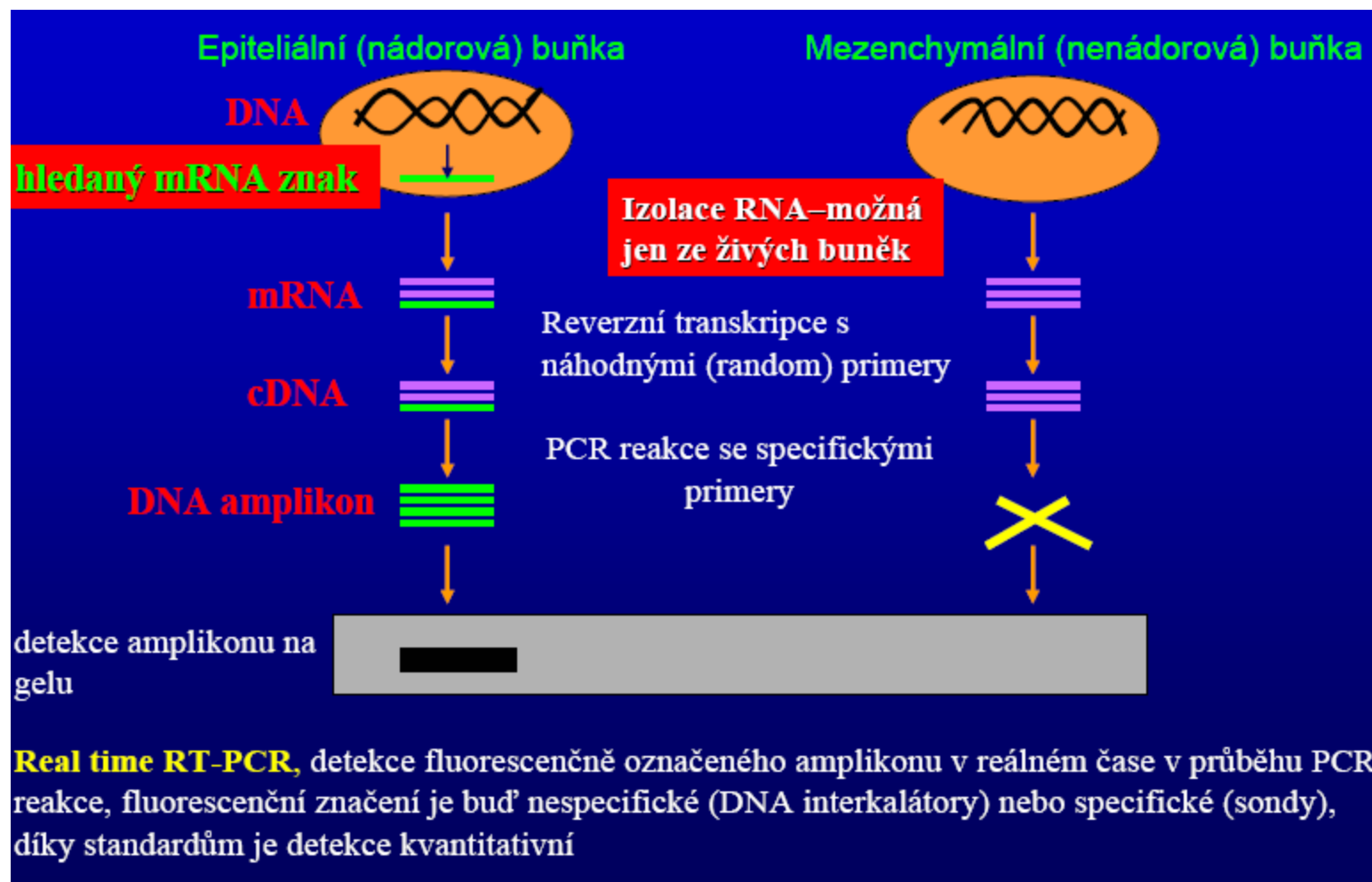
Imunohistochemie – citlivost 1 : 10 000

Průtoková cytometrie – citlivost 1 : 100 000

PCR – citlivost 1: 1 000 000

Real- time PCR – citlivost až 1 : 10 000 000

Princip detekce mimimální reziduální choroby metodou RT-PCR – studium genové exprese



Analysis

Fit Points

Second Derivative Maximum

Baseline Adjustment

None

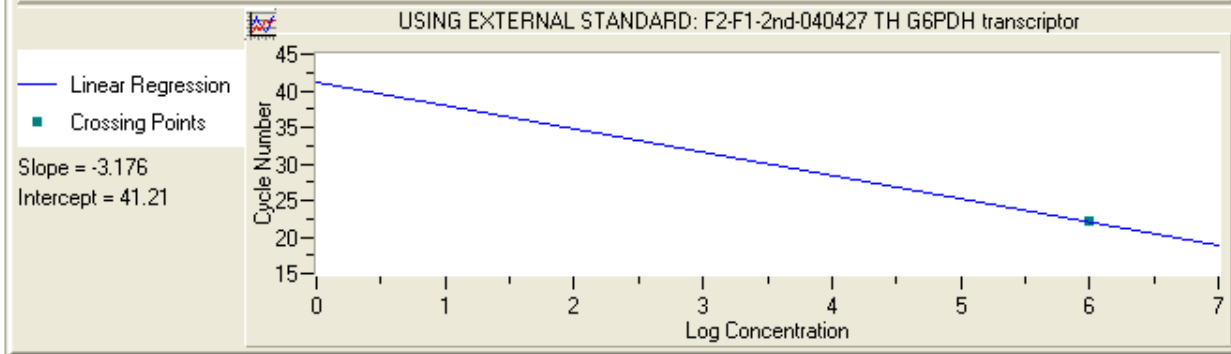
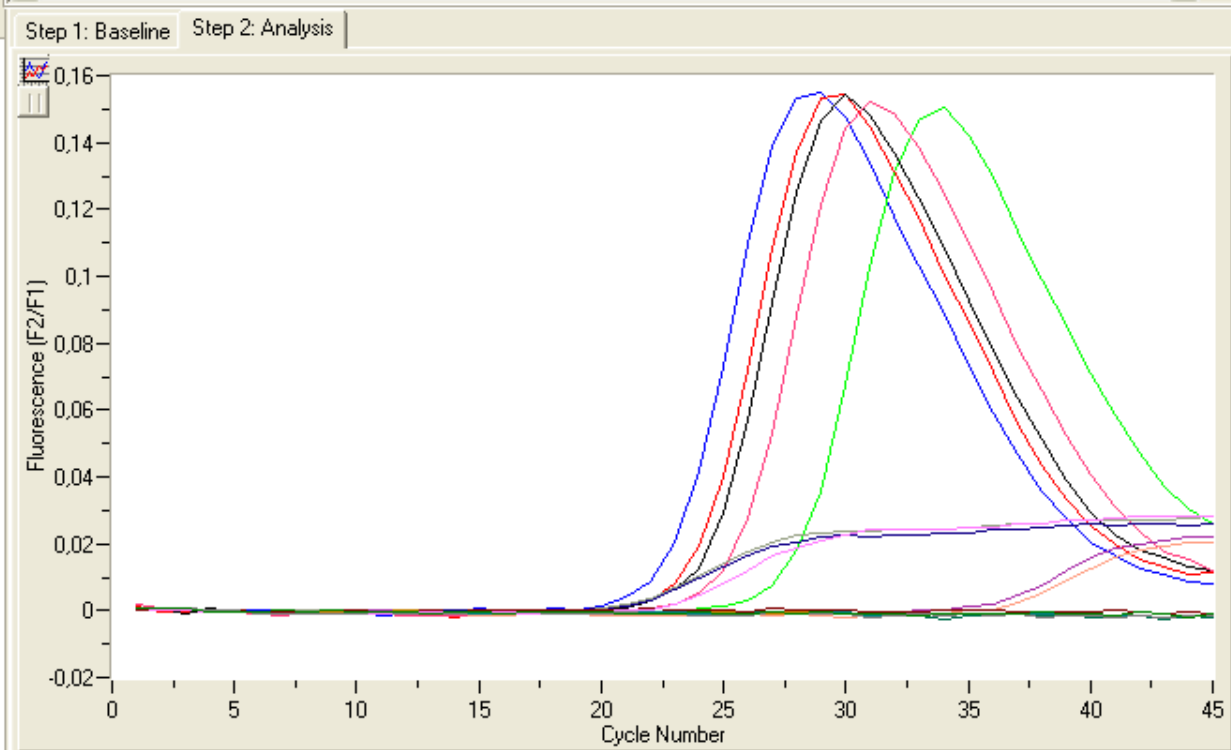
Arithmetic

Proportional

Normalized

Analysis Notes

P...	Name	Standard	Calculat...	Cro...
1	h-G6PDH 10 6	1.000E+06	1.000E+06	22.15
2	C31/07 h-G6PDH		2.445E+04	27.27
3	C232/07 h-G6PDH		4.777E+05	23.17
4	C233/07 h-G6PDH		3.315E+05	23.67
5	C234/07 h-G6PDH		1.533E+05	24.74
6	K- h-G6PDH			
7	C231/07 TH tkán		2.190E+06	21.07
8	C231/07 TH tkán		2.193E+06	21.07
9	C232/07 TH KD-L		4.415E+01	35.98
10	C232/07 TH KD-L		5.808E+01	35.60
11	C233/07 TH KD-P			
12	C233/07 TH KD-P			
13	C234/07 TH krev			
14	C234/07 TH krev			
15	K+ TH		7.100E+05	22.62
16	K- TH			



Analysis

Fit Points

Second Derivative Maximum

Baseline Adjustment

None

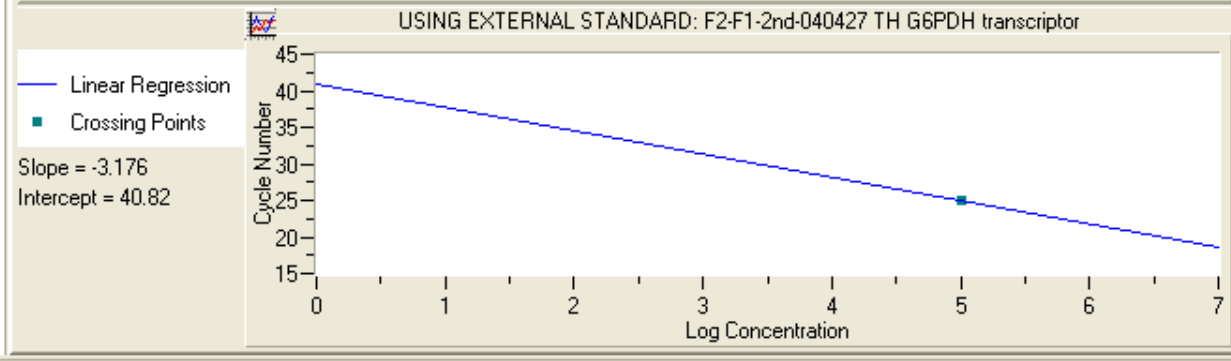
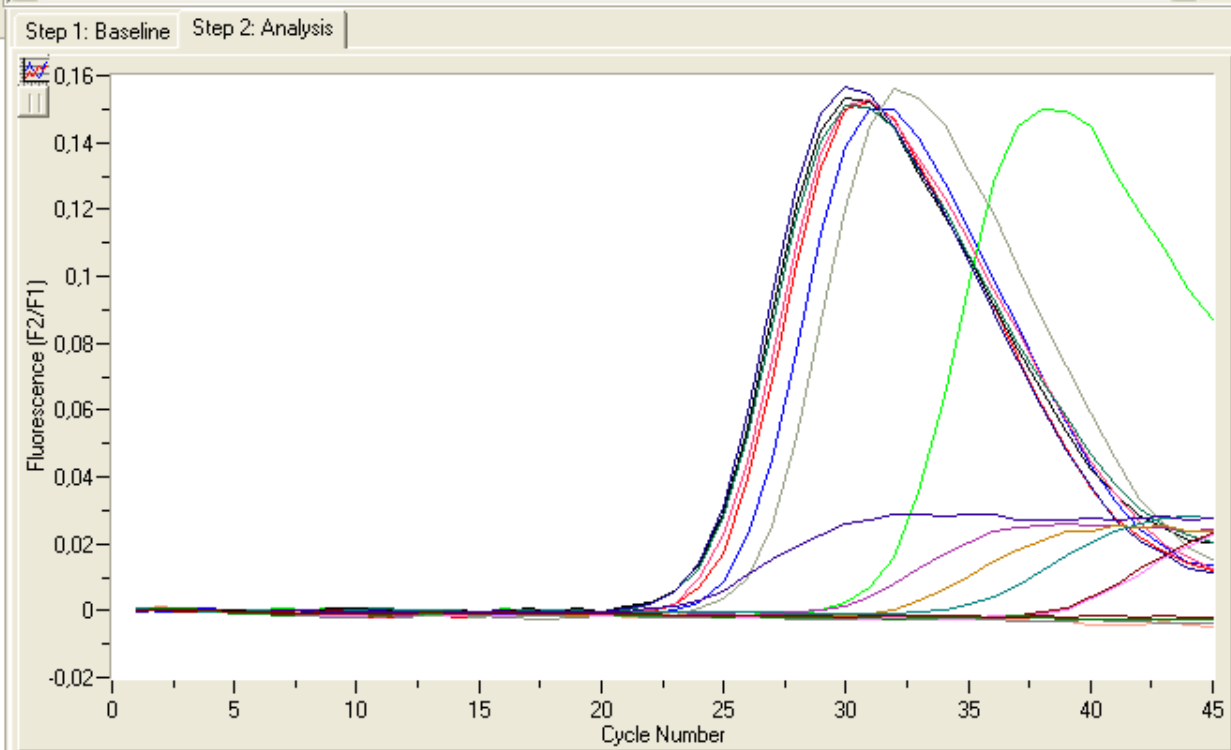
Arithmetic

Proportional

Normalized

Analysis Notes

P...	Name	Standard	Calculat...	Cro...
1	h-G6PDH 10 5	1.000E+05	1.000E+05	24.94
2	50% NB h-G6PDH		9.144E+02	31.41
3	10% NB h-G6PDH		1.706E+05	24.20
4	1% NB h-G6PDH		2.421E+05	23.72
5	0.1% NB h-G6PDH		1.965E+05	24.01
6	0.01% NB h-G6PDH		2.379E+05	23.74
7	0.001% NB h-G6PDH		2.591E+05	23.62
8	0.0001% NB h-G6PDH		5.373E+04	25.79
9	K- h-G6PDH			
10	50% NB TH		3.059E+03	29.75
11	10% NB TH		6.409E+02	31.90
12	1% NB TH		6.823E+01	34.99
13	0.1% NB TH		5.189E+00	38.55
14	0.01% NB TH			
15	0.001% NB TH		3.959E+00	38.92
16	0.0001% NB TH			
17	K+ TH		2.960E+05	23.44
18	K- TH			



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

datum odběru BM	exprese TH genu	FISH	klinický stav
1. 3. 07	KD pozitivní PK pozitivní	Nmyc - 1p36 -	KD, metastázy v obratlech bederní páteře 1.blok CHT
30.4.07	PK KD(PS,LS, sternum) slabě pozitivní	0	před 2. Blokem CHT
26.6.07	KD (LS,PS slabě pozitivní)	0	plánovaná separace PBSC
17.10.07	PK, KD negativní	lok. amp. N-myc gain17q -	před 2. PBSC (1-4.11.01) VGPR
5.11.07	0	N-myc -	
16.11.07	0	N-myc -	
22.11.07	ABCD štěpy negativní	0	
25.1.08	KD,PK negativní PK negativní	0	před vysoce dávkovanou CHT s transplantací PBSC
27.2.08	PK negativní	0	kontrola po transplantaci
29.3.08	KD-LS negativní KD-PS pozitivní		molekulární relaps
26.4.08			klinický relaps

Onkomarkery

Vyšetřování onkomarkerů je obrovským pokrokem při diagnóze a sledování efektu léčby nádorových onemocnění, jejichž počet se nejen v České republice, ale i v celé Evropě každoročně výrazně zvyšuje. Vzhledem k výše uvedeným podmínkám, pravidlům použití a značné finanční nákladnosti patří jejich využití v klinické praxi spíše do ordinací odborných lékařů než do ordinací praktických lékařů. Výjimku mohou tvořit skupiny s vysokým rizikem vzniku nádorového onemocnění, obecně skupiny s profesním rizikem vzniku karcinomu, nebo případy familiárních výskytů nádorových onemocnění, tedy skupiny kontrolované praktickými lékaři.

Volná cirkulující DNA („cell-free DNA“, cfDNA)

- ❖ je typ extracelulární DNA nachazející se v krevním oběhu
- ❖ vzniká aktivním uvolňováním živými buňkami, apoptózou či nekrotózou
- ❖ detekované množství cfDNA se může lišit u zdravých a nemocných jedinců a tak v závislosti na typu a případně i stádiu onemocnění.
- ❖ zvýšené hladiny se vyskytují u patologických stavů, jako je zánět, stres či autoimunitní onemocnění

CfDNA je využívána

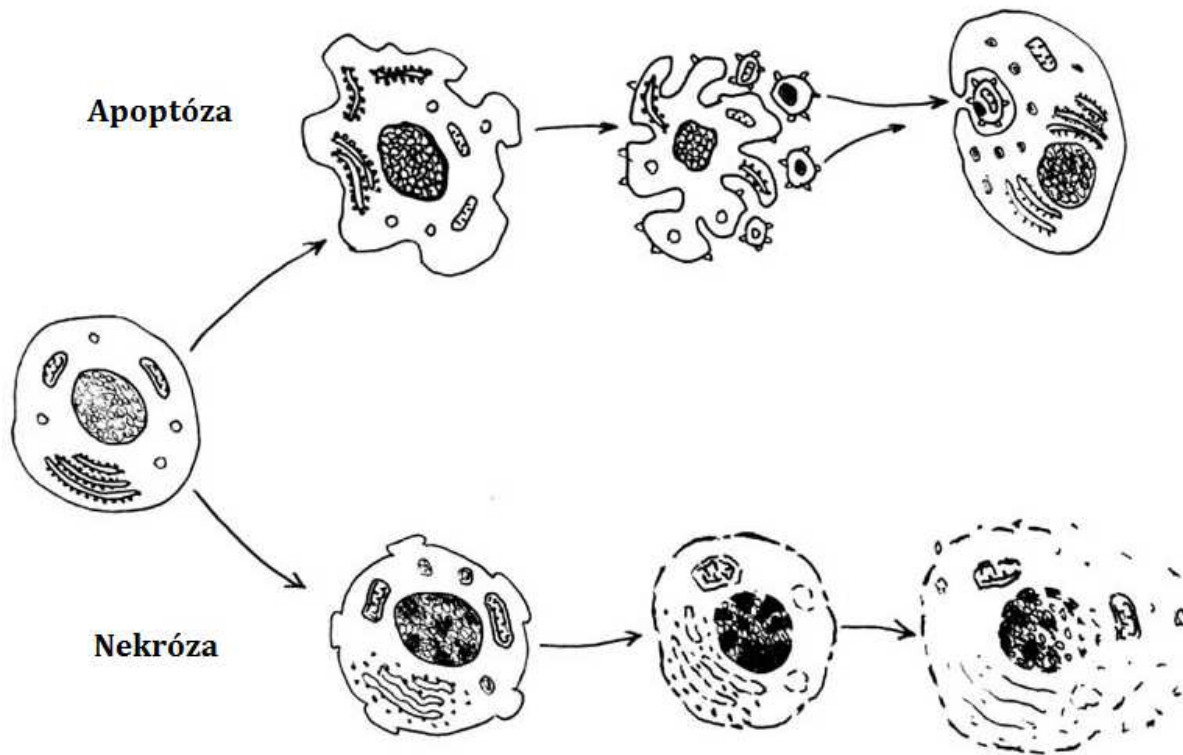
- ❖ neinvazivní metody v prenatální diagnostice k vyšetření fetálních aneuploidí a genotypizaci
- ❖ neinvazivní metody v diagnóze a prognóze nádorových onemocnění

Volná cirkulující DNA („cell-free DNA“, cfDNA)

Zdroje cfDNA

- 1. Apoptóza** je regulovaný mechanismus zajišťující eliminaci poškozených či nepotřebných buněk, kdy dochází ke smrštění buňky, fragmentaci jaderné DNA a rozpadu na apoptická tělíčka, která jsou následně makrofágy fagocytózou degradována. Fragmenty DNA vznikající při apoptóze jsou přibližně 180 bp dlouhé
- 2. Nekróza** je patologický proces vyvolaný mechanickými, chemickými či biologickými vlivy. Na rozdíl od apoptózy dochází k prasknutí cytoplazmatické membrány, narušení rovnováhy vnitřního prostředí buňky a následného vylití buněčného obsahu
- 3. Aktivní uvolňování živými buňkami**, které přednostně uvolňují nově nasyntetizovanou DNA v nukleoproteinovém komplexu. Tento způsob uvolňování cfDNA není limitován pouze na rakovinné buňky, jelikož nebyl pozorován významnější rozdíl mezi onkologickými pacienty a zdravými jedinci (Stroun *et al.*, 2001b).

Volná cirkulující DNA („cell-free DNA“, cfDNA)



Rozdíl mezi apoptózou a nekrózou.

Ačkoliv oba mechanismy končí smrti buňky, apoptóza je regulovaný proces zajišťující eliminaci poškozených či nepotřebných buněk, kdy dochází k rozpadu buňky na apoptická tělíška, zatímco u nekrózy se jedná o patologický proces vyvolaný různými vlivy končící prasknutím buňky a vylitím buněčného obsahu (upraveno dle Meer et al., 2010).

Volná cirkulující DNA („cell-free DNA“, cfDNA)

- ❖ je typ bezbuněčné DNA, která se nalézá v krevním oběhu ve formě fragmentů
- ❖ u zdravých jedinců ji můžeme nalézt především na povrchu krevních buněk
- ❖ sekvenační analýzou plazmové cfDNA zdravých jedinců bylo zjištěno, že se jedná o dvouřetězcovou molekulu s výrazným zastoupením CG párů. 5' konec molekuly byl bohatý na cytosin, zatímco 3' na guanin. Toto zastoupení může být důležité pro stabilitu cfDNA v plazmě.

- ❖ Při srovnání koncentrace cfDNA v plazmě a séru bylo zjištěno, že nejsou shodné. Ačkoli byla v plazmě cfDNA v nižší koncentraci, je stabilnější, a proto je i lepším zdrojem pro analýzy. V séru je koncentrace cfDNA výrazně vyšší, ale její stabilita v různých časových intervalech velice kolísá.

Volná cirkulující DNA a její potenciál v onkologii

- ❖ výrazné zvýšené hodnoty cf-DNA jsou patrné u pacientů s malignitami a to především v pokročilých stádiích nemoci.
- ❖ V takovém to případě je nádorově specifická cf-DNA uvolňována nekrózou z buněk primárního nádoru a metastáz
- ❖ cf-DNA hodnocena jako vhodný neinvazivní molekulární marker nádorových onemocnění.
- ❖ kvantitativní stanovení a detekce genetických a epigenetických změn v cf-DNA u pacientů
- ❖ u různých malignit má potenciální využití v molekulární diagnostice, prognóze, monitorování průběhu nemoci a odpovědi na léčbu
- ❖ využití cf-DNA jako krevního biomarkeru u vybraných solidních nádorů a hematologických malignit

Volná cirkulující DNA a její potenciál v onkologii

Biopsie

- ❖ odběr tkáně z živého organismu, která se dále zkoumá histologickým vyšetřením pod mikroskopem, aby mohlo být stanoveno, zda se jedná o maligní či benigní tkáň a případně typ a stadium nádoru.
- ❖ může být provedena různými způsoby v závislosti na odebírané tkáni
 - odběr vzorků může být proveden stěrem pomocí kartáčku, klíšťkami, dutou jehlou nebo při chirurgickém zákroku.
- ❖ délka samotného odběru a případná hospitalizace je individuální v závislosti na uložení ložiska
- ❖ úskalím klasické biopsie je, že nemusí zachytit heterogenitu nádoru
Každý nádor se může skládat z více buněčných subpopulací, které se mohou v genetických změnách lišit.

Volná cirkulující DNA a její potenciál v onkologii

Tekutá biopsie

U pacientů s karcinomy můžeme v krevním oběhu nalézt dva různé zdroje nádorově specifické DNA, které mohou být neinvazivně hodnoceny.

1. nádorová cirkulující volná DNA („tumor circulating free DNA“, tcfDNA)
2. nádorové cirkulující buňky („tumor circulating cells“, TCCs)

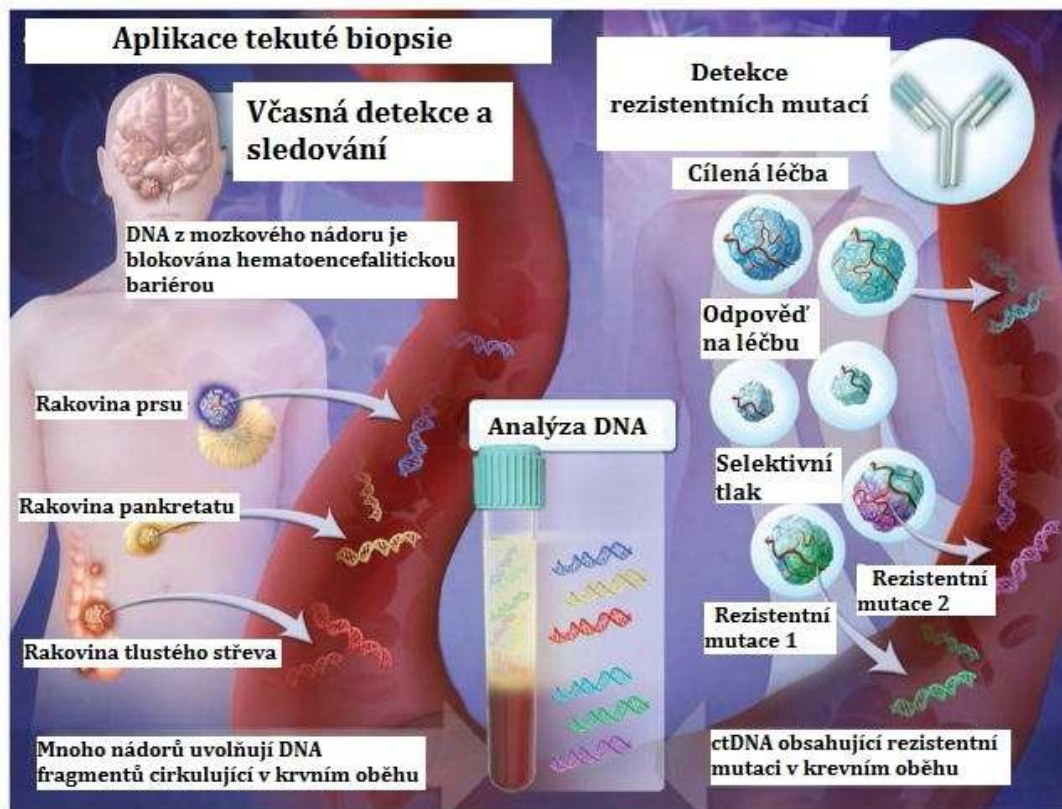
Tekutá biopsie

Představuje neinvazivní vyšetření nádorových složek vyskytujících se v krevním oběhu

Oproti biopsii klasické má tekutá biopsie určité výhody

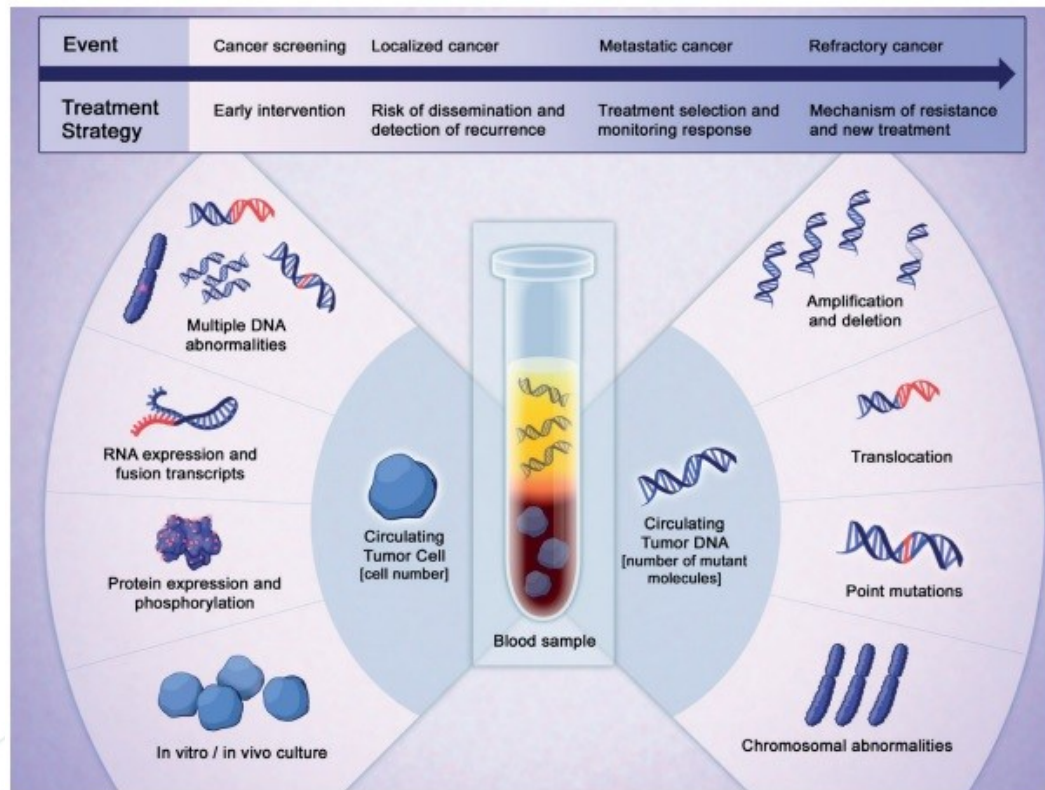
- ❖ je méně bolestivá
- ❖ představuje pro pacienta menší riziko
- ❖ je rychlá
- ❖ díky své citlivosti a specifitě může být použita pro identifikaci molekulárních změn, které jsou zodpovědné za onemocnění pacientů
- ❖ mohou být zjistitelné genetické změny jak u primárního, tak u metastazujícího karcinomu.

Volná cirkulující DNA a její potenciál v onkologii



Aplikace tekuté biopsie, kdy je z periferní krve detekována ctDNA, která nese stejné změny na molekulární úrovni jako primární i metastazující nádor, ze kterých je odvozena. Tekutá biopsie se dá aplikovat i při detekci rezistentních mutací, avšak není vhodná pro detekci ctDNA z mozkového nádoru. Důvodem je hematoencefalitická bariéra blokující průchod bezbuněčné DNA do krve

Volná cirkulující DNA a její potenciál v onkologii



Mutace, methylace, mikrostabilní nestabilita, ztráta heterozygoty („loss of heterozygosity“, LOH), chromosomální abnormality

Volná cirkulující DNA a její potenciál v onkologii

Komplexní workflow tekuté biopsie od vzorku krve po variantní data

Assay	DNA/RNA	Gene	Selected SNV hotspots	CNVs	Fusions	Extras	
Oncomine Lung cfDNA Assay	DNA & RNA	<i>ALK</i> <i>BRAF</i> <i>EGFR</i> <i>ERBB2</i> <i>KRAS</i> <i>MAP2K1</i> <i>MET</i> <i>NRAS</i> <i>PIK3CA</i> <i>RET</i> <i>ROS1</i> <i>TP53</i>	>150 hotspots including: <i>EGFR</i> : T790M, C797S, L858R, Exon 19 del <i>KRAS</i> : G12X, G13X, Q61X <i>BRAF</i> : V600E <i>ALK</i> : Exon 21-25 <i>PIK3CA</i> : E545K, H1047R, E542K	<i>MET</i>	<i>ALK</i> , <i>RET,ROS</i> 1	<i>MET</i> exon 14 skipping	
Oncomine Lung cfDNA Assay	DNA	<i>ALK</i> <i>BRAF</i> <i>EGFR</i> <i>ERBB2</i> <i>KRAS</i> <i>MAP2K1</i> <i>MET</i> <i>NRAS</i> <i>PIK3CA</i> <i>ROS1</i> <i>TP53</i>	>150 hotspots including: <i>EGFR</i> : T790M, C797S, L858R, Exon 19 del <i>KRAS</i> : G12X, G13X, Q61X <i>BRAF</i> : V600E <i>ALK</i> : Exon 21-25 <i>PIK3CA</i> : E545K, H1047R, E542K	---	---	Oncomine Breast cfDNA Assay v2 DNA <i>AKT1</i> <i>CCND1</i> <i>EGFR</i> <i>ERBB2</i> <i>ERBB3</i> <i>ESR1</i> <i>FBXW7</i> <i>FGFR1</i> <i>KRAS</i> <i>PIK3CA</i> <i>SF3B1</i> <i>TP53</i>	>150 hotspots including: <i>PIK3CA</i> : E545K, H1047R <i>AKT1</i> : E17K <i>ESR1</i> : mutations associated with anti-estrogen resistance <i>TP53</i> : mutations associated with loss of function <i>ERBB2</i> : mutations associated with sensitivity to anti-ERBB2 therapies
Oncomine Colon cfDNA Assay	DNA	<i>AKT1</i> <i>APC</i> <i>BRAF</i> <i>CTNNB1</i> <i>EGFR</i> <i>ERBB2</i> <i>FBXW7</i> <i>GNAS</i> <i>KRAS</i> <i>MAP2K1</i> <i>NRAS</i> <i>PIK3CA</i> <i>SMAD4</i> <i>TP53</i>	>240 hotspots including: <i>KRAS/NRAS</i> : G12/G13/Q61 <i>BRAF</i> : V600E <i>PIK3CA</i> : E545K, H1047R <i>TP53</i> : R175H <i>R273H/C/L</i> Recurrent deleterious APC mutations (including p.R876*, p.R1114*, p.Q1378*, p.R1450*) <i>SMAD4</i> : R361C/H <i>CTNNB1</i> : S45F, T41A				



PROMISKUITNÍ DNA

ENDOSYMBIOTIC GENE TRANSFER: ORGANELLE GENOMES FORGE EUKARYOTIC CHROMOSOMES

Jeremy N. Timmis^{}, Michael A. Ayliffe[‡], Chun Y. Huang^{*} and William Martin[§]*

Genome sequences reveal that a deluge of DNA from organelles has constantly been bombarding the nucleus since the origin of organelles. Recent experiments have shown that DNA is transferred from organelles to the nucleus at frequencies that were previously unimaginable. Endosymbiotic gene transfer is a ubiquitous, continuing and natural process that pervades nuclear DNA dynamics. This relentless influx of organelle DNA has abolished organelle autonomy and increased nuclear complexity.

“Promiscuous DNA” (Ellis, 1982)

**“Endosymbiotic gene transfer is ubiquitous...
... at frequencies that were previously unimaginable”.**

Nature Reviews Genetics, 2004

Organelové genomy – pozůstatky prokaryot

(a) chloroplast

20-200 kb

20-200 proteinů

progenitor - **cyanobacteria** (*Synechocystis*)

3.6 Mb

3000 proteinů

(b) mitochondrie

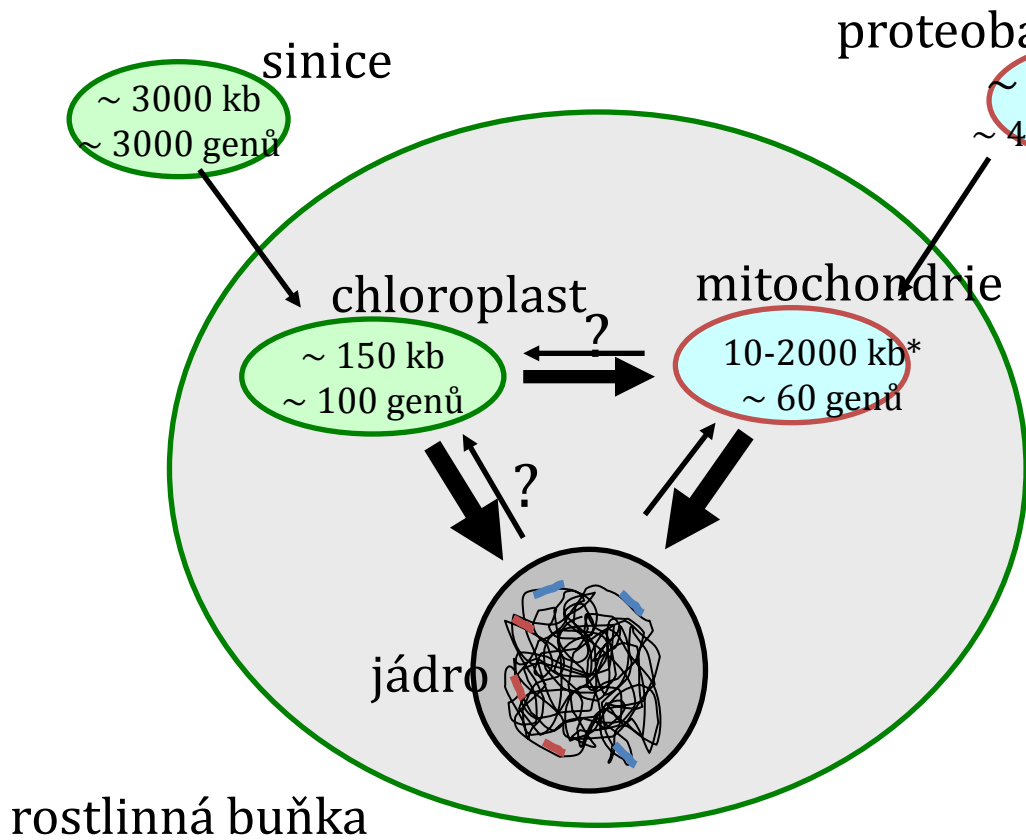
6-400 kb

3-67 proteinů

progenitor - **alpha-proteobacteria** (*Mesorhizobium loti*)

7 Mb

6 700 proteinů



```

BAC7H5 CCTTCGGGACCCGGACACAGGTGGTCATGGCTGTCTCAGCTCGTGCCGTAAAGTGT 43358
CTY16 -----G-CT-----C-----T---G-A----- 457

BAC7H5 GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTCTGTTTGTAGTTGCCACGTTTGGTTTGGAAC 43418
CTY16 -----A-C-----ACC-----T-A-T-----G-C----- 397

BAC7H5 CCTGAACAGACTCCGGTGATAAGCCGGAGGAGGTGAGGATGACGTCAAGTCAICATGC 43478
CTY16 TT-A-GSTA--C-----G-----C-----G----- 337

BAC7H5 CCCTTAIGCCCTGGGCGACACACGTGCTACAATGGCCGGGCAAAAGGGTCGCGATCCCGC 43538
CTY16 -----C-G-----T-----G-T---GT---CA--A-G-A--- 277

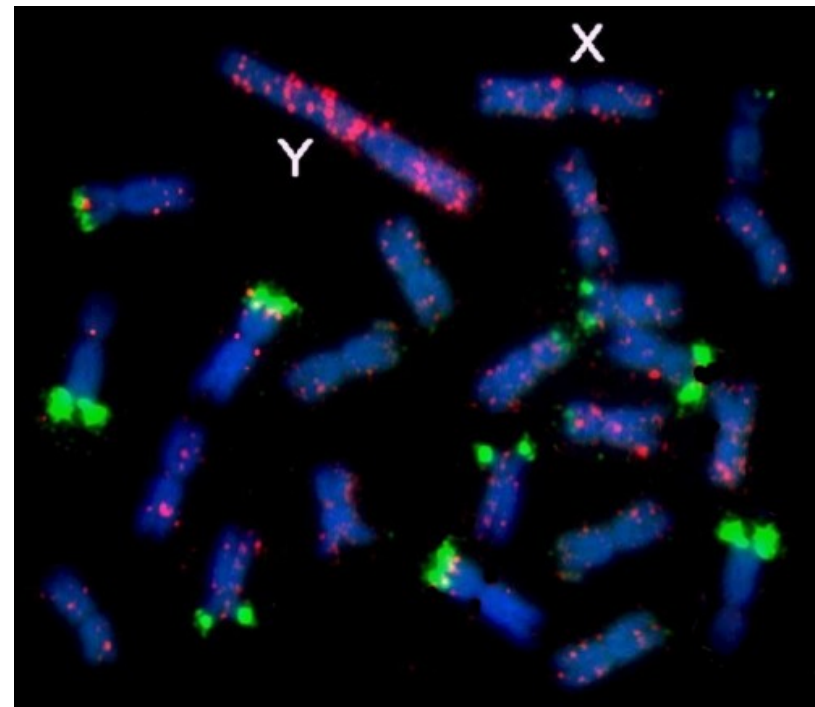
BAC7H5 GAGGGTGAAGTAAACCCAAAACCCGCTCTCAGTTCGGATTGCAAGGCTGCAACTCGCTG 43598
CTY16 --T-----T-T-C-----G---T-----TTCT-----AGA- 218

BAC7H5 CATGAAGCCGGAATCGTAGTAATCGCGGTTCAGCCATACGGCCGGTGAATTCGTTCCCGG 43658
CTY16 -----G-----G-A-----G-C-----A-----A----- 159

BAC7H5 GCCTTGTACACCCCGCCGTCACACTATGGGAGCTGGCCATGCCCGAAGTCGTTACCTTA 43718
CTY16 -----C-----ATTCA-----G---G-CC-- 99

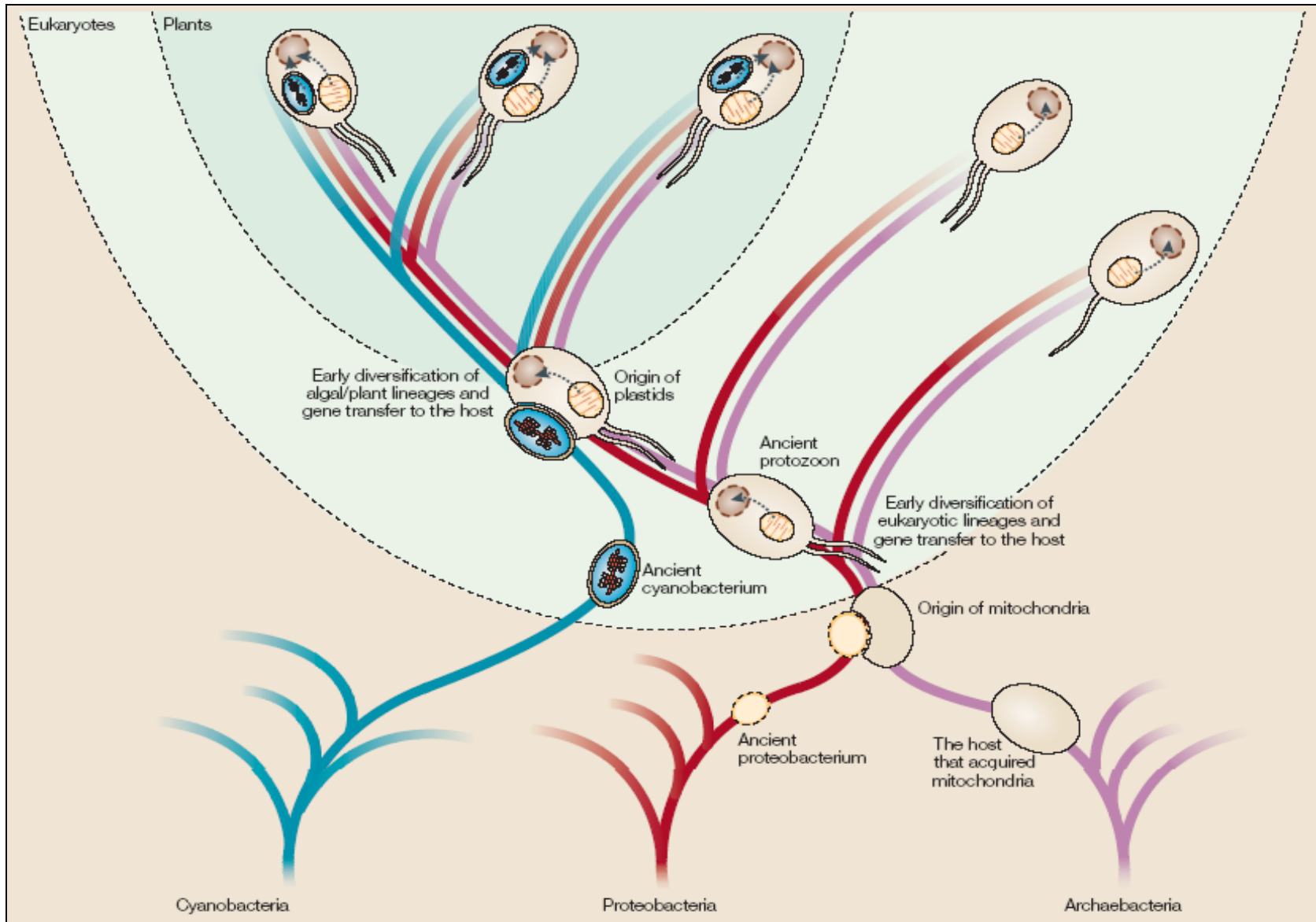
BAC7H5 AC=CGCAAAGAGGGGGATGCCGAAGGCAGGGCTAGTGACTGGAGTGAAGTCGTAACAAG 43776
CTY16 --T-----A---CA-GC-A-C-C--TG--TT--C-----G----- 39

BAC7H5 GTAGCCGTACTGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTT 43814
CTY16 -----GG---CC----- 1
  
```

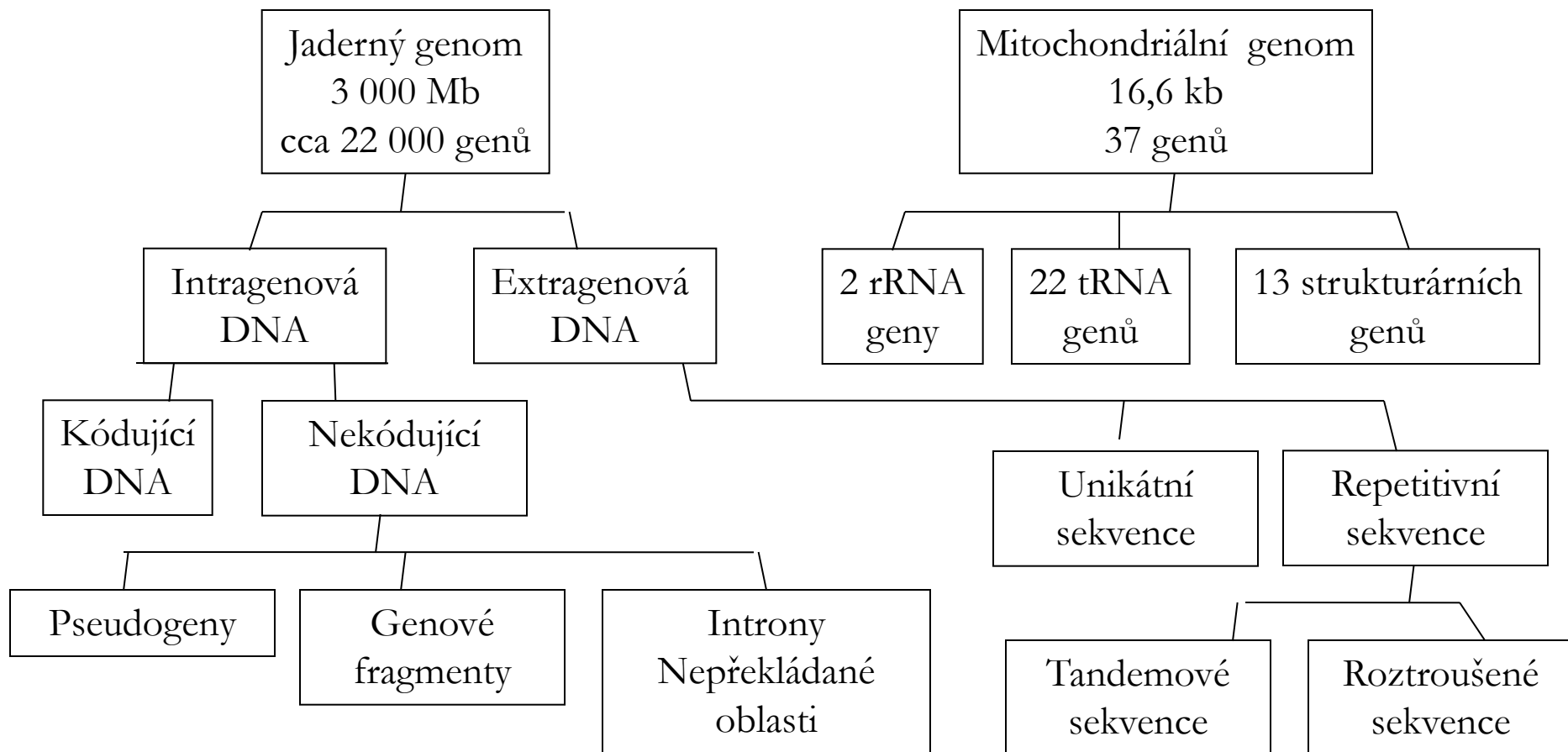


Hromadění cpDNA na chromosomu Y u *Silene latifolia*

Endosymbiotická evoluce a strom života



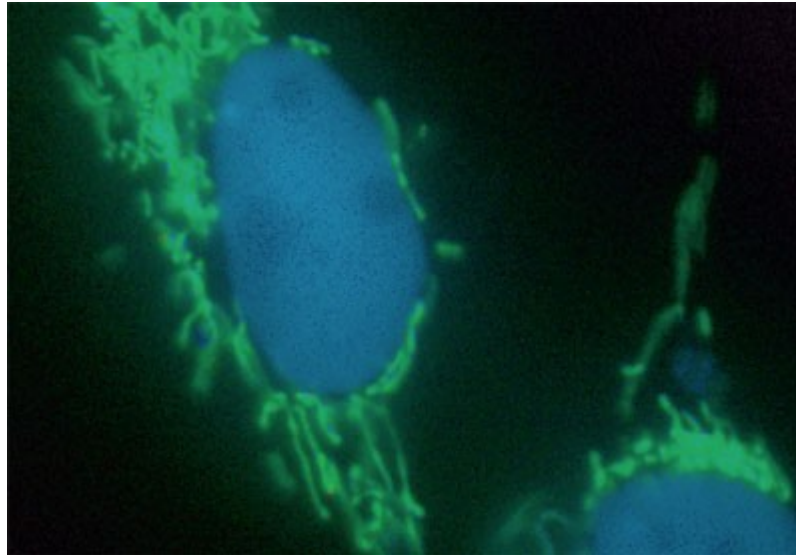
Lidský genom



1% DNA kóduje nějaké znaky

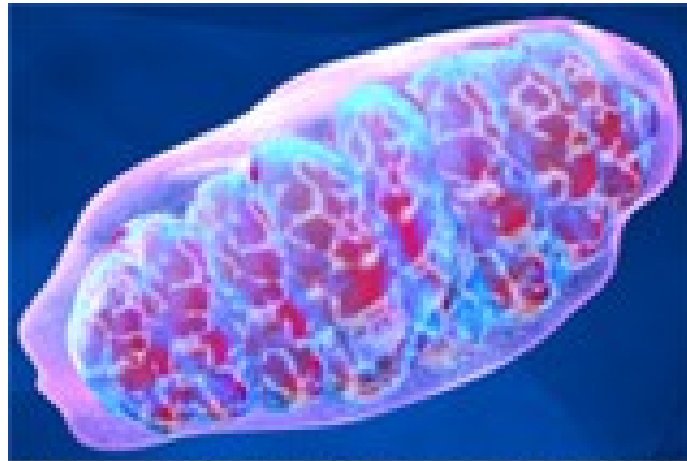
Lidský genom

- jaderný
- mitochondrialní



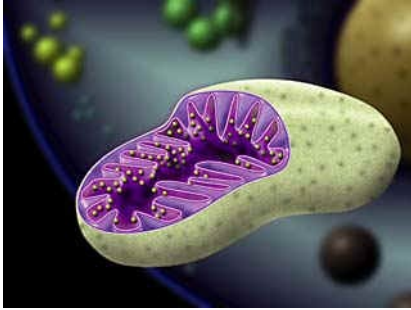
Buněčné jádro obklopené mitochondriemi

Mitochondriální genom



Many mitochondria are found in each cell, all containing mtDNA.

Mitochondriální genom



Mitochondriální dvoušroubovicová DNA tvoří jednu kruhovou molekulu

Mitochondriální genom

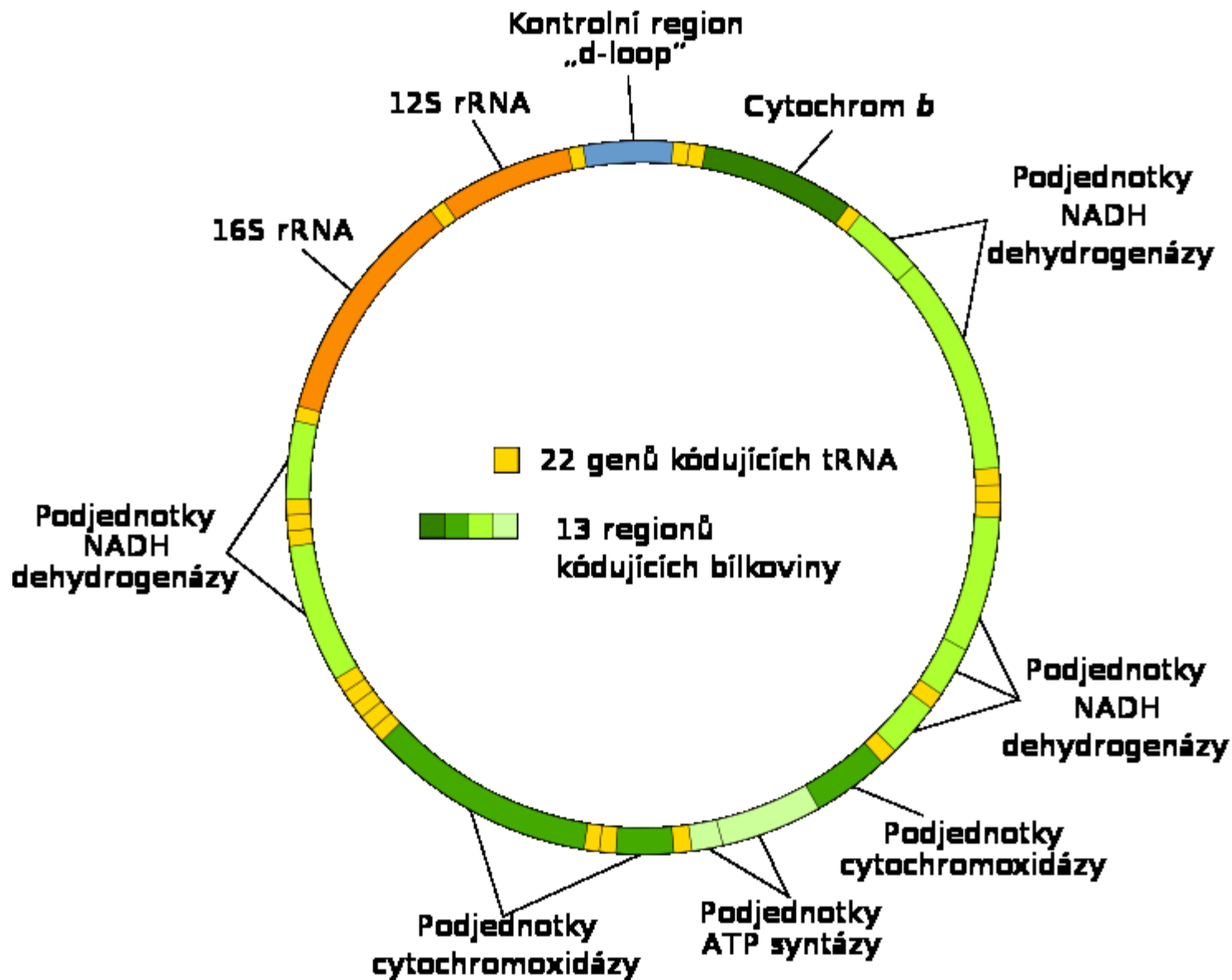
- Mitochondrie mají svoji vlastní DNA, relikv z dávné minulosti, kdy oni byli volně žijící organismy.
- Dokladem toho jsou mírně odlišné genetické kódy nalezené v nonplant mitochondriích. Například:

Organism	Code	Amino Acid (standard)
All nonplant species	UGA	Tryptophan (stop)
Mollusks	AGA	Serine (Arginine)
Yeast	CUU	Threonine (Leucine)

Mitochondrial genome



The male mtDNA within the sperm's tail is lost as it enters the egg



mtDNA vs. choroby

- **cyclic vomiting syndrome** –přestavby rozáhlých segmentů mtDNA
- **Leber hereditary optic neuropathy** - mutace v genech *MT-ND1*, *MT-ND4*, *MT-ND4L*, and *MT-ND6*
- **mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes**- mutace v genech *MT-ND1*, *MT-ND5*, *MT-TH*, *MT-TL1*, and *MT-TV*
- **myoclonic epilepsy with ragged-red fibers** - mutace v genech *MT-TK*, *MT-TL1*, *MT-TH*, and *MT-TS1*
- **neuropathy, ataxia, and retinitis pigmentosa** - mutace v genu *MT-ATP6*
- nonsyndromic deafness- mutace v genech *MT-RNR1* a *MT-TS1*
- **cancer, including breast, colon, stomach, liver, and kidney tumors, cancer of blood-forming tissue (leukemia) and cancer of immune system cells (lymphoma)** – somatické mutace
- **age-related disorders: heart disease, Alzheimer disease, and Parkinson disease** - somatické mutace

Heteroplasmie,

- daná buňka obsahuje určité procento mutovaných a normálních mitochondrií
- od množství mutovaných mitochondrií a také od postiženého orgánu se odvíjí tzv. **prahový efekt**. To je právě určité množství mutovaných mitochondrií, které právě způsobí daný defekt. Právě z těchto důvodů se **mitochondriální nemoci projevují ve kterémkoli věku a klinicky se projevují onemocněním zdánlivě nesouvisejících orgánů**.

mtDNA vs. choroby

Důvody, proč jsou mitochondrie asi 10 krát náchylnější na poškození DNA více než DNA jaderná, jsou tyto:

- mitochondriální DNA nemá takové **množství opravných systémů** jako jaderná DNA,
- **mitochondrií je v buňce mnoho**, tudíž jejich DNA se musí dělit stejně často, ale ne jen jedné mitochondrie ale všech mitochondrií v buňce, tudíž je větší pravděpodobnost chyby, než u jednoho jádra
- mitochondriální DNA nemá histony,
- mitochondriální DNA je **velice blízko dýchacímu řetězci** a tudíž i radikálům, které se při reakcích v dýchacím řetězci tvoří, tudíž je mnohem častější poškození její DNA těmito radikály

The human nuclear and mitochondrial genomes

	Nuclear genome	Mitochondrial genome
Size	3000 Mb	16.6 kb
No. of different DNA molecules	23 (in XX) or 24 (in XY) cells, all linear	One circular DNA molecule
Total no. of DNA molecules per cell	23 in haploid cells; 46 in diploid cells	Several $\times 10^3$
Associated protein	Several classes of histone and nonhistone protein	Largely free of protein
No. of genes	22 000	37
Gene density	~1/40 kb	1/0.45 kb
Repetitive DNA	Large fraction, see <i>Figure 7.1</i> .	Very little
Transcription	The great bulk of genes are transcribed individually	Continuous transcription of multiple genes
Introns	Found in most genes	Absent
% of coding DNA	1 – 2 %	~93%
Codon usage	See <i>Figure 1.22</i>	See <i>Figure 1.22</i>
Recombination	At least once for each pair of homologs at meiosis	None
Inheritance	Mendelian for sequences on X and autosomes; paternal for sequences on Y	Exclusively maternal



Makak dvou matek. Jaderný genom (chromozómy) pochází od jedné matky, mitochondriální (cytoplazma vajíčka) od druhé. Opička má dvě biologické matky a jednoho otce. (Oregon National Primate Research)