

# 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

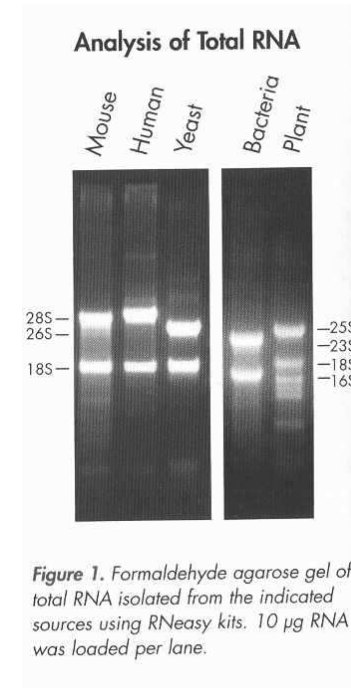
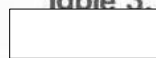


Table 3. mRNA classification based on abundance



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)

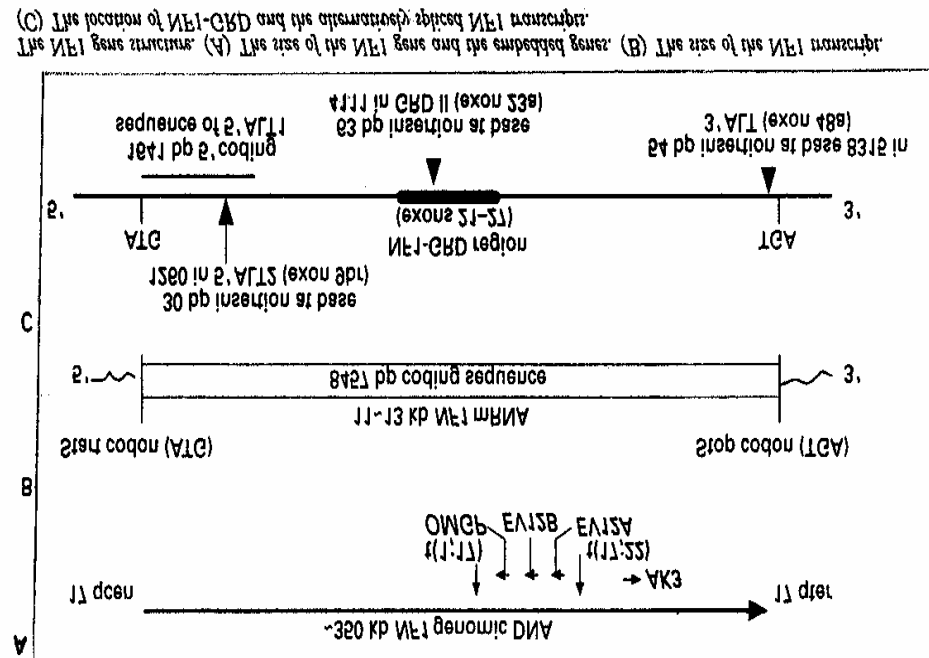
# RNA v diagnostice

- přímá RNA diagnostika - skrínování celé kódující oblasti příslušného genu
- gene - expresní analýza:
  - diferenciatční 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....

# 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

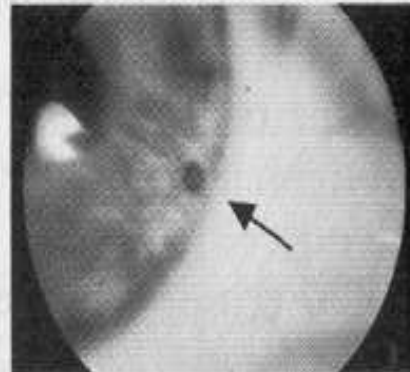
Lisch nodules in the iris

Multiple neurofibromas

Skeletal anomalies

Predisposition to tumors  
of the nervous system

50% new mutations



1. Lisch nodule



2. Café-au-lait spot



3. Neurofibromas

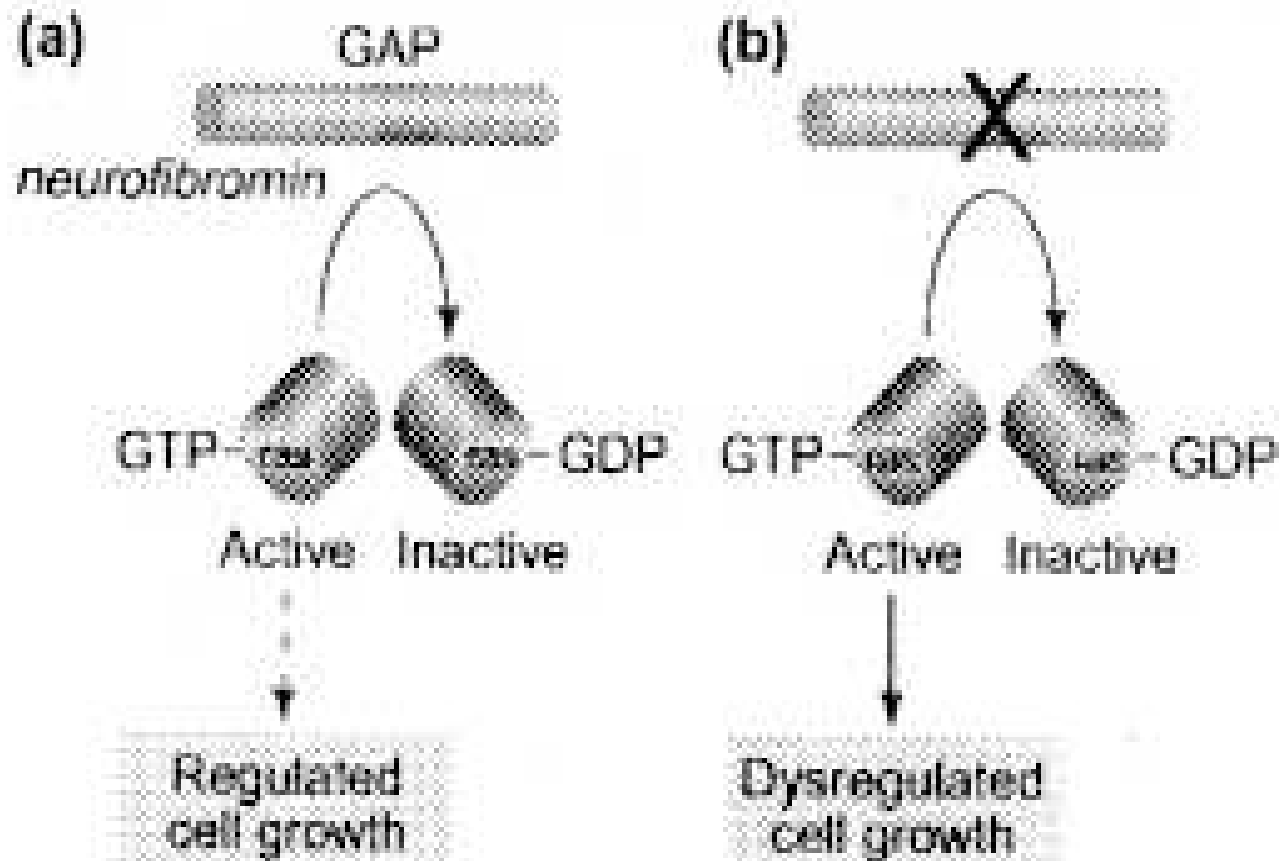
**A. Main manifestations of neurofibromatosis 1**

# 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

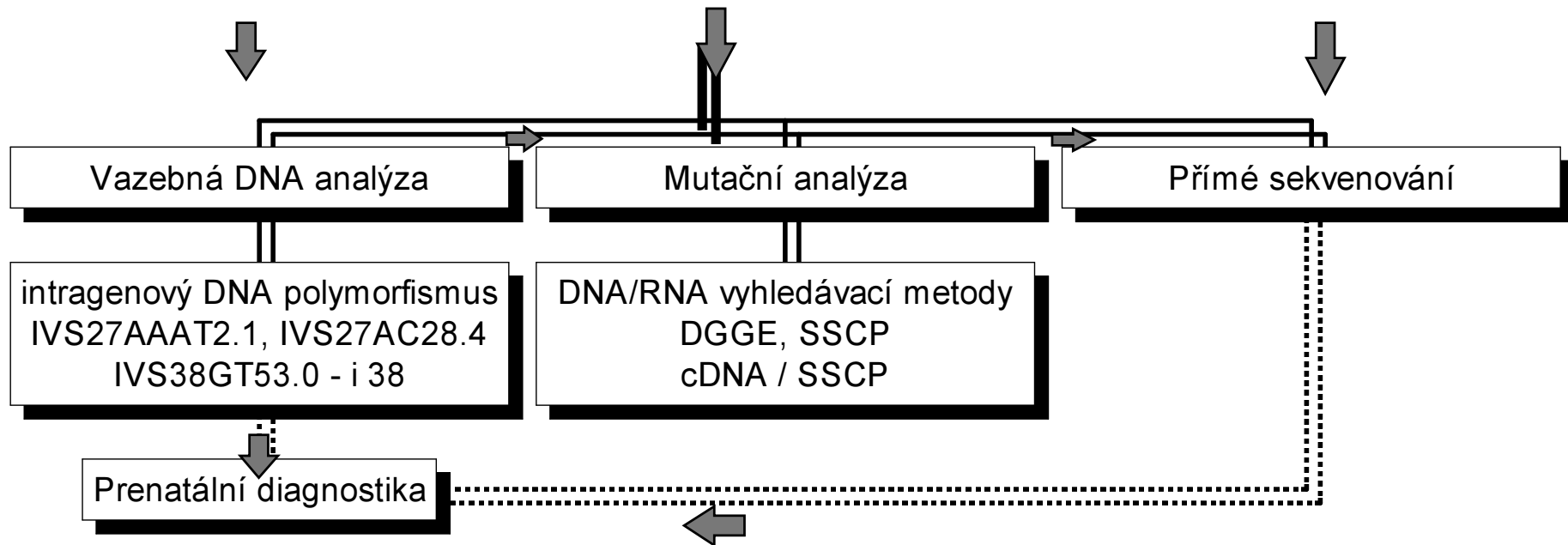
# Neurofibromin *ras* regulace



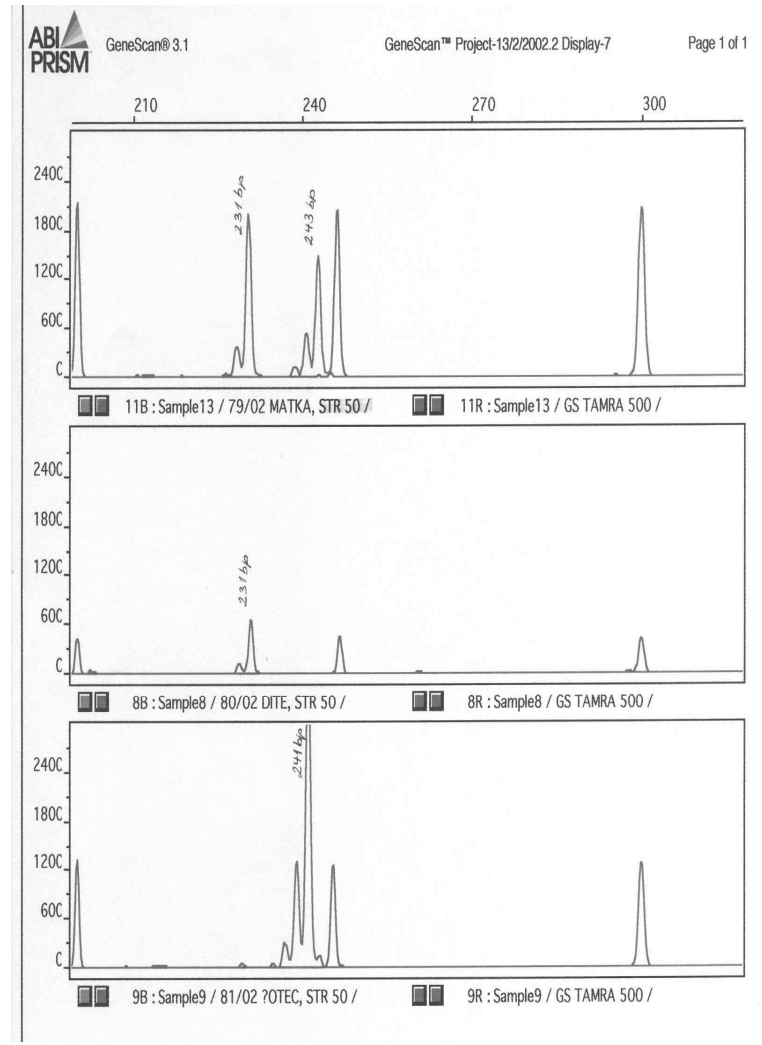
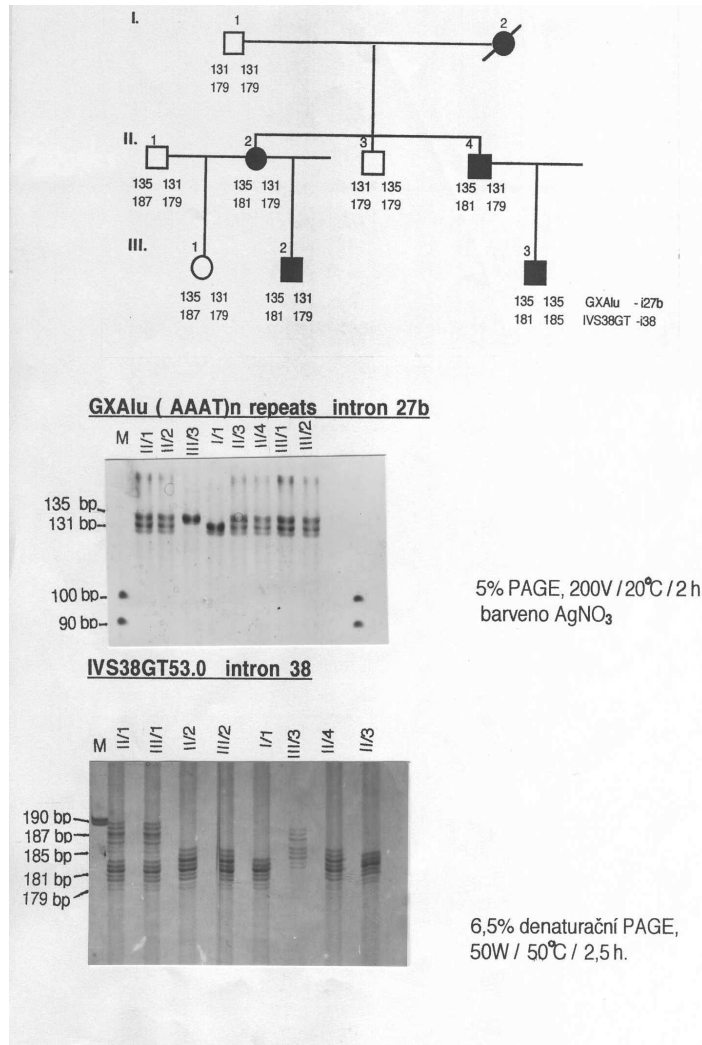


# Strategie molekulárně-genetického testování NF1 pacientů

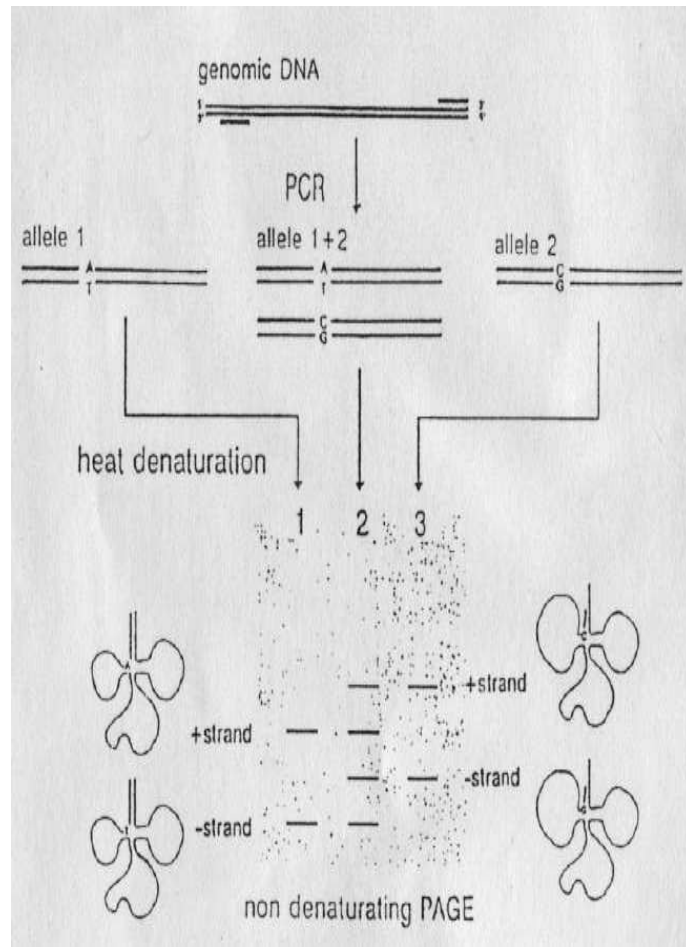
DNA / RNA NF1 pacienta



# Vazebná DNA analýza v rodinách s výskytem NF1 onemocnění

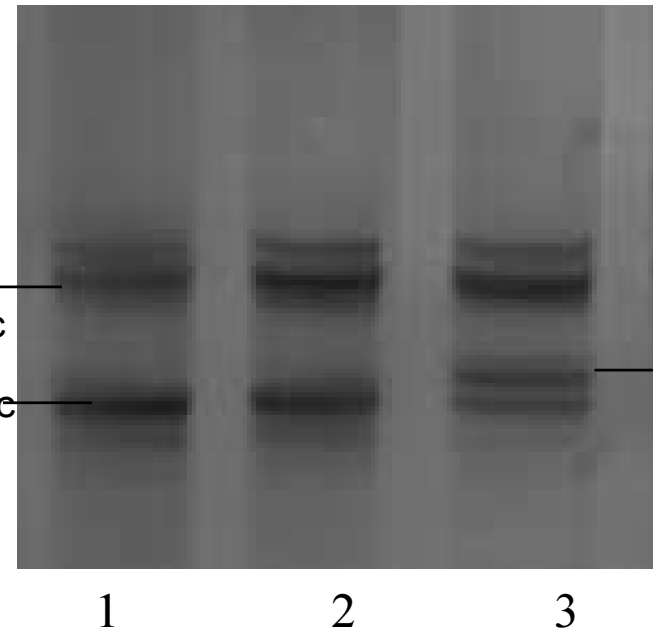


# SSCP



standardní  
+ DNA řetězec

--DNA řetězec



mt řetězec

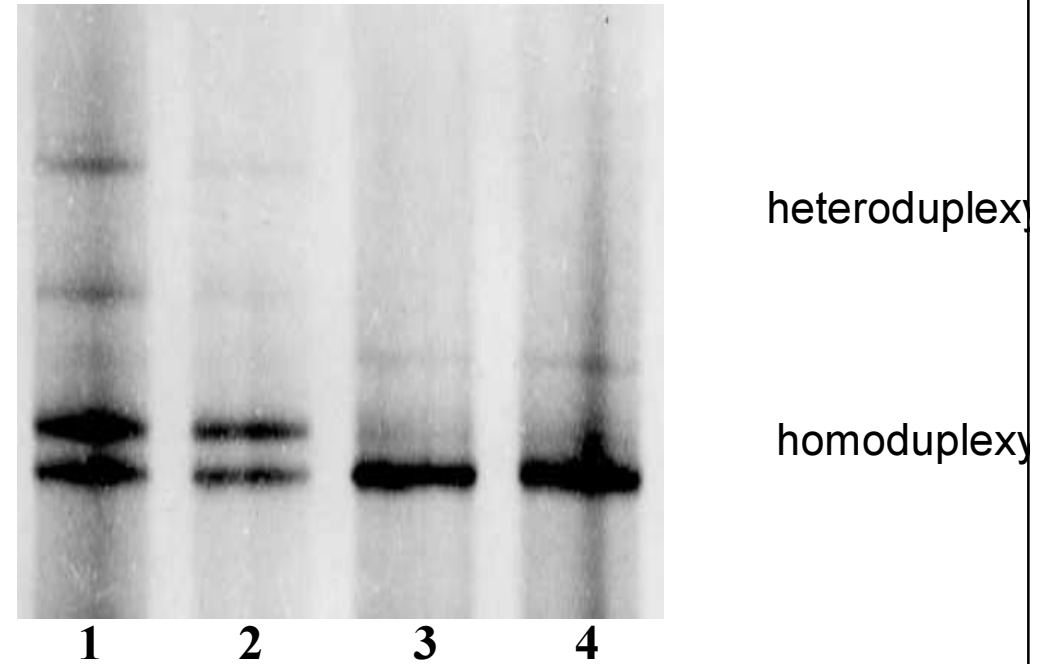
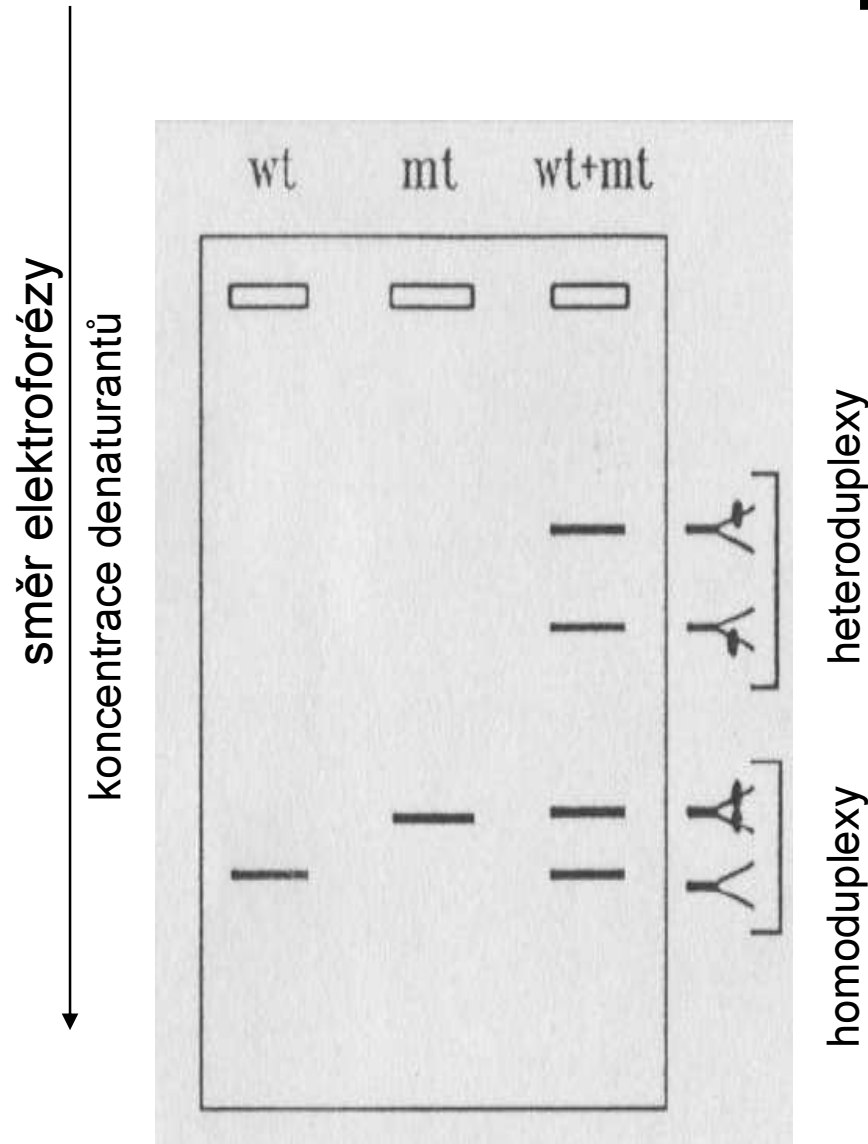
**Obr. 1: SSCP analýza exonu 29 NF1 genu**

12% PAG(40:1), 150V/16hod/10° C

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

**dráha 3:** NF1 pacient (C5242T)

# DGGE



Obr. 4: DGGE analýza NF1 exonu 31

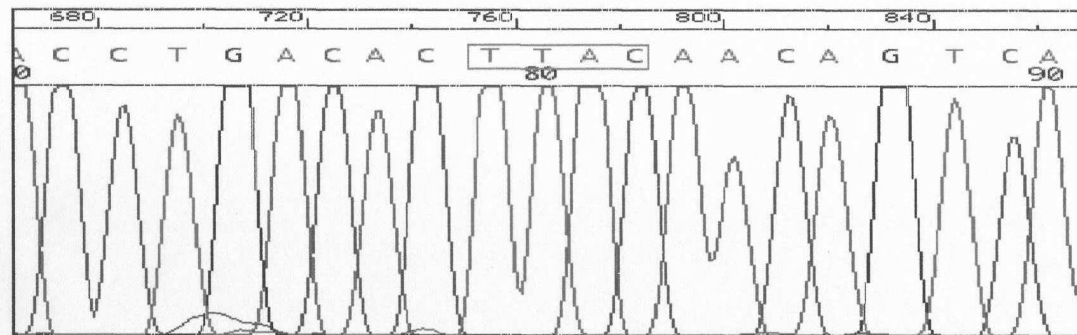
7.5% PAG(37,5:1), 10% - 40% denaturantů,  
150V/ 3,5 hod / 60°C

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

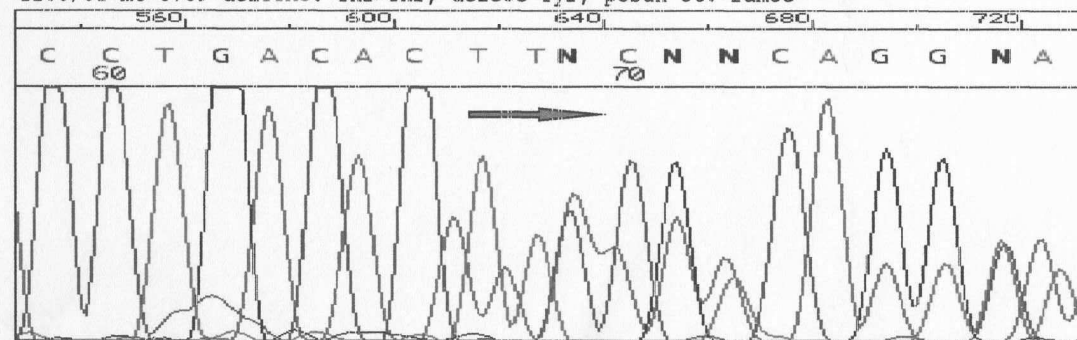
# Sekvenace vzorku DNA s odlišnou elektroforetickou mobilitou

GEN NF1 - exon 37

standard DNA



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



# cDNA - SSCP analýza

celková RNA



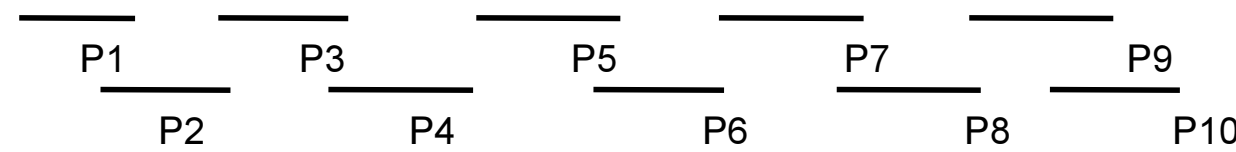

cDNA




PCR ↓



NF1 cDNA ( 60 exonu)



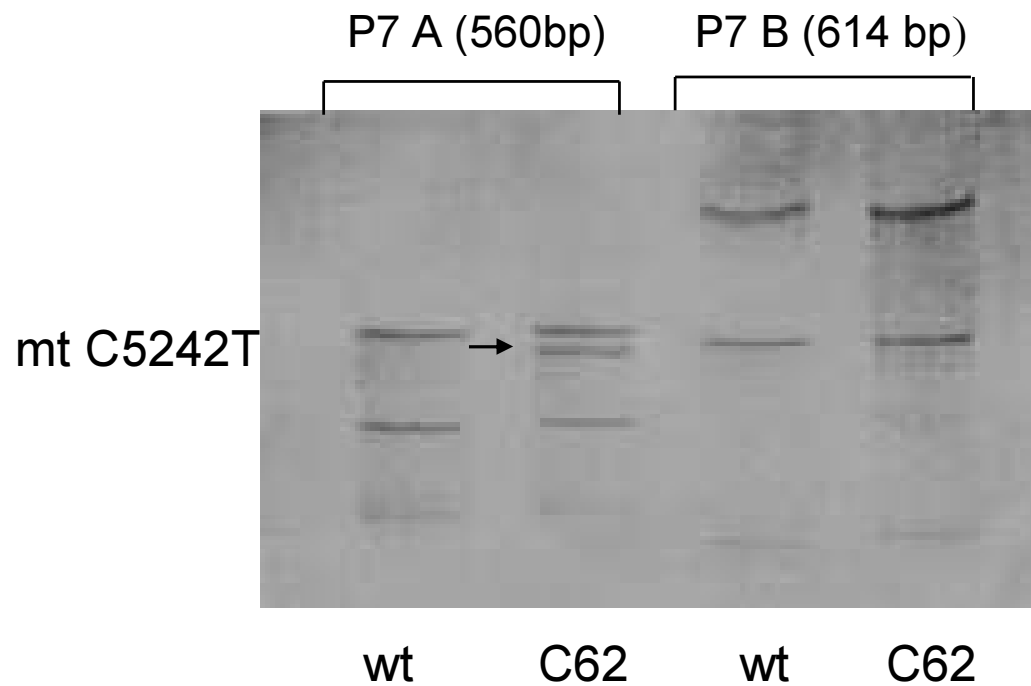
SSCP ↓ (~ 1000 - 1200bp)



Sekvenační analýza

# cDNA SSCP

semi-nested PCR cDNA (segment P7)



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

## Výhody a nevýhody RNA dignostiky genu NF1

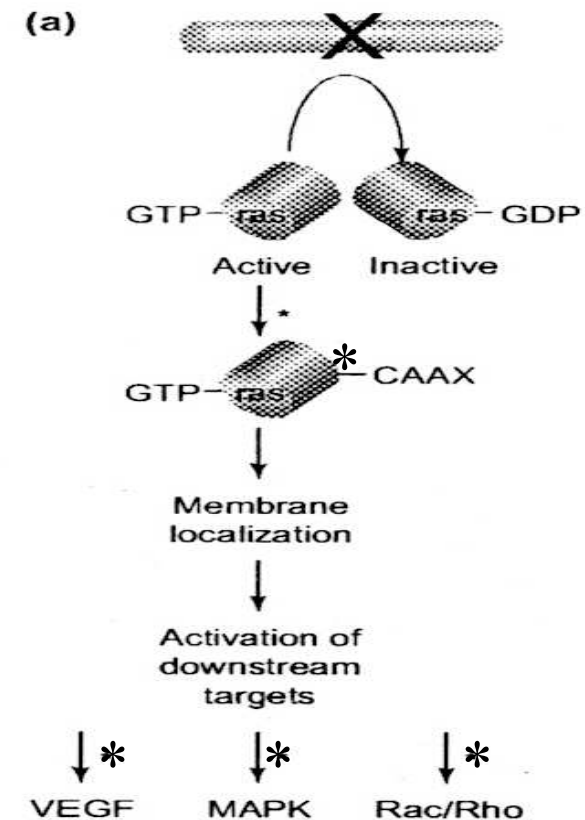
---

- 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!)



## Další kroky v diagnostice neurofibromatóz

- zavedení funkční analýzy proteinového produktu genu NF1,  
(rozlišení neutrálního polymorfismu od mutací způsobující změny)
- objasnění souvislosti konkrétní mutace a formy postižení
- genová terapie, cílená terapie:
  - blokování enzymů zapojených do farnesylace *ras*
  - blokování dalších cílů aktivovaných proteinem *ras* pro amplifikaci mitogenního signálu
- zavedení diagnostiky neurofibromatózy typu 2 na našem pracovišti



# Závěr

Užitím metod DNA-SSCP ( DNA single strand conformation polymorphism) a DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) bylo skrínováno 8 exonů NF1 genu ( exon 6, 12b, 16, 28, 29, 30, 31 a 37) v souboru 80 NF1 pacientů a pomocí RNA diagnostiky (cDNA - SSCP) byly v nedávné době identifikovány dvě delece celých exonů (exon 13 a 14), které by pomocí DNA diagnostiky byly zřejmě nedetekovatelné (tab. 1).

Většina NF1 mutací popsaných k dnešnímu dni dává vznik zkrácenému proteinu neurofibrominu (STOP mutace), avšak jen velmi málo studií se zabývá korelací mezi mutací v DNA NF1 genu a jejím efektem na úrovni mRNA. V naší práci jsme zavedli rychlou a účinnou strategii ke skrínování celé kódující oblasti NF1 genu: cDNA-SSCP analýzu, následovanou DNA sekvenováním. Identifikace mutací v NF1 genu u našich pacientů pomocí cDNA-SSCP metody naznačuje významný přínos a využití v molekulární diagnostice NF1, zvláště pro sporadické případy ( *Ars et al.;2000.*). Pro potvrzení patologického vlivu mutace na funkci proteinu by bylo vhodné zavést funkční analýzu neurofibrominu v kvasinkách.

exon DNA/segment cDNA	mutace	genet. materiál
6	919delCCT	DNA
6	G801A	DNA
12b	1889insG	DNA
29	C5242T	DNA
29	5233_5250delinsGATT	DNA
29	5500delGCTCAATAT	DNA
31	C5839T	DNA
37	6789_6792delTTAC	DNA
37	6791insA	DNA
intron 36	3' ss, C >A	DNA
P3	c2252_2325del	RNA
P3	c2002 -2251del	RNA

Tab.1: Mutace identifikované v NF1 genu v souboru pacientů

# RNA diagnostika neuroblastomu

---

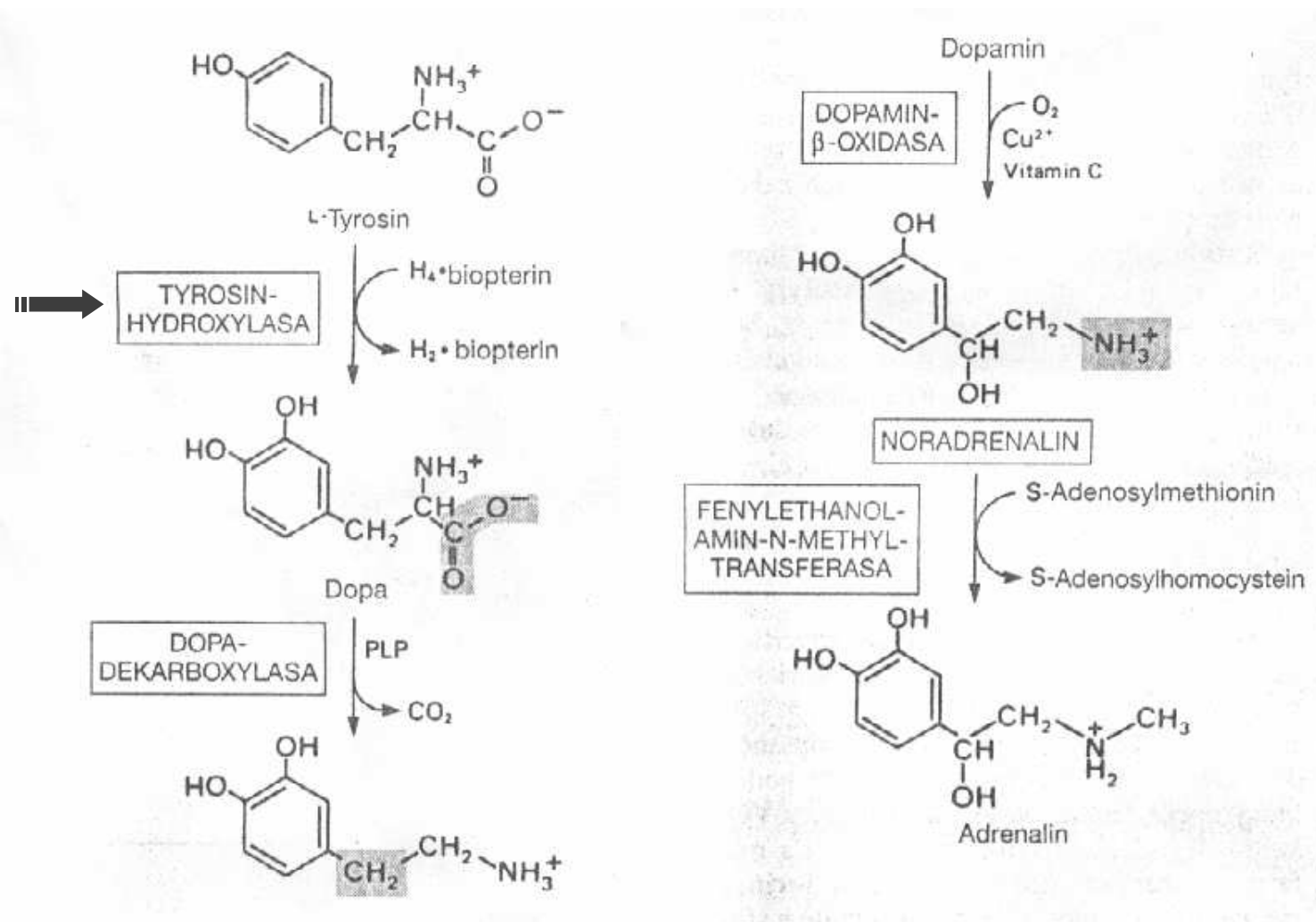
## 1) Detekce exprese *TH* genu

*Tyrosinhydroxyláza*

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

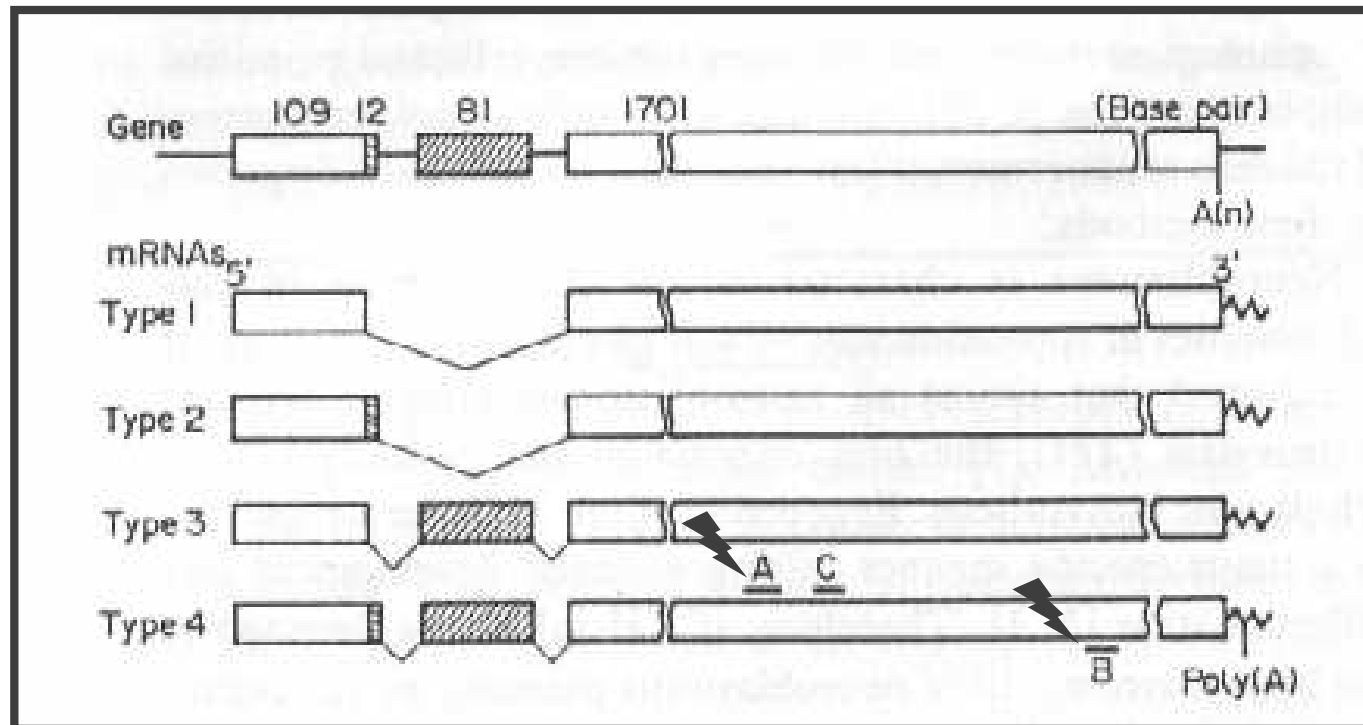
- 1. enzym dráhy syntézy katecholaminu
- katecholaminy - důležité neurotransmitery a hormony, regulují vnitřní funkce a motorickou koordinaci
  - jsou sekretovány 98% NB (NB je endokrinně aktivní)
  - jejich metabolity používány pro sledování průběhu onemocnění
- exprese TH genu je regulována tkáňově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

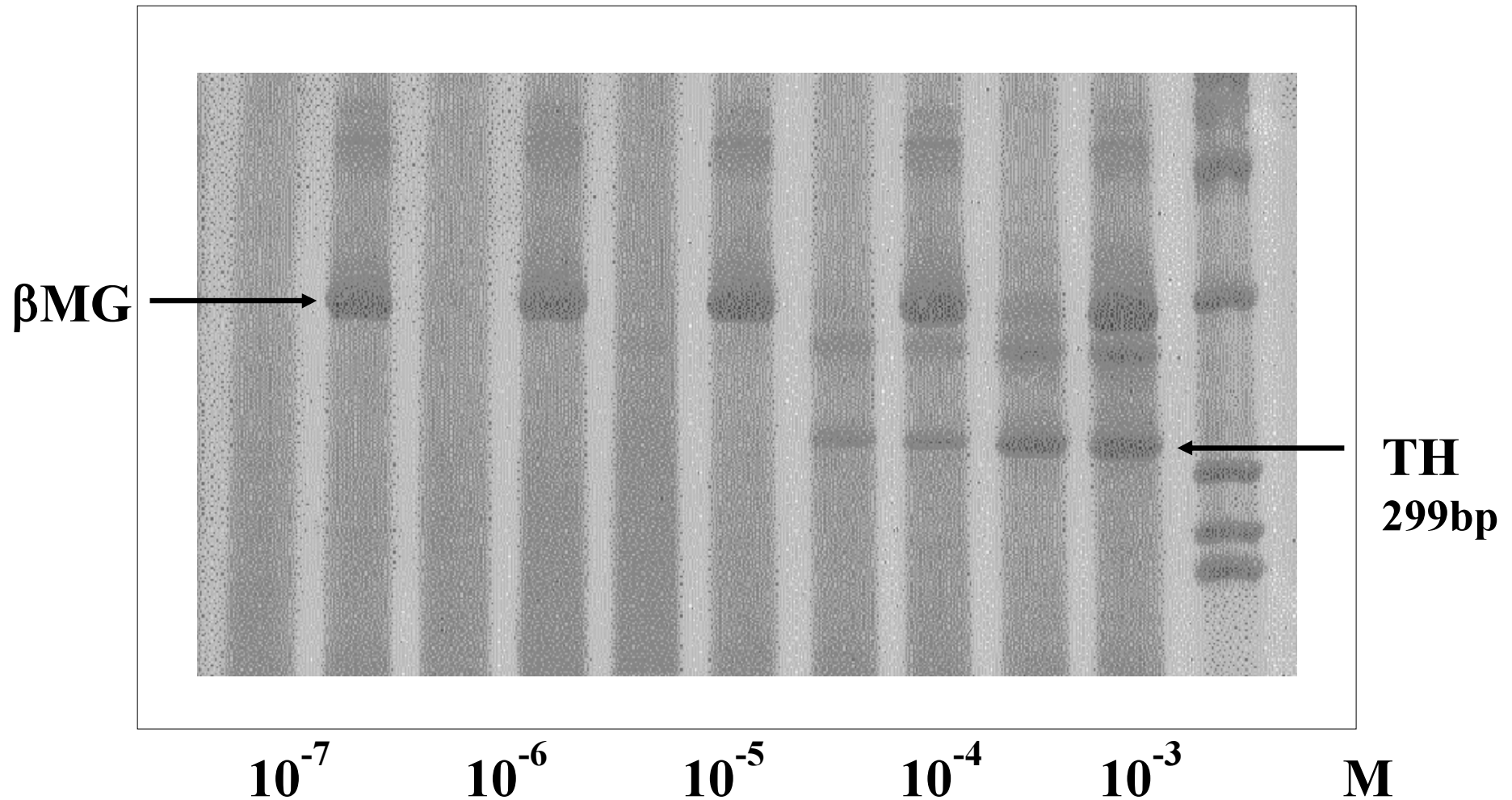
✦ PCR ⇒ syntéza úseku DNA odpovídajícího mRNA pro TH

⇒ syntéza DNA pro  $\beta\mu$ G (provozní gen)  
- kontrola kvality RNA a RT

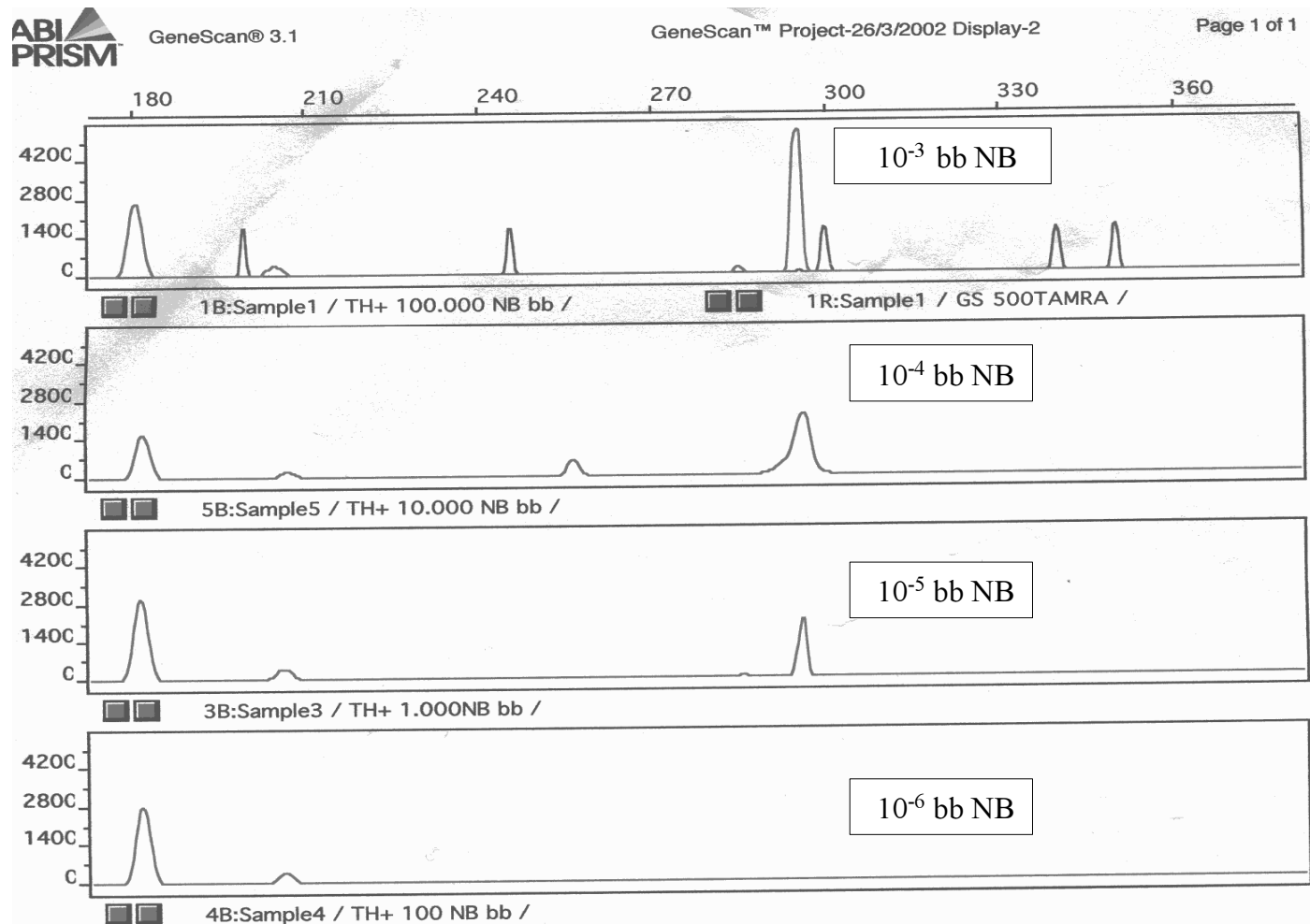
∅ ELFO - 5% PAGE, barvení stříbrem  
~ Fragmentační analýza (ABI PRISM)

∅ Stanovení citlivosti ⇒ RNA izolovaná z NB  
buněčné linie IMR-32

# Citlivost detekce TH mRNA - PAGE



# Citlivost detekce TH mRNA - fragmentační analýza





# 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 diagnózy
  - ↖ určení prognózy
  - ↖ sledování průběhu onemocnění (MRD, relaps)
  - ↖ detekci NB buněk v transplantátu před autologní transplantací

# Závěr

---

- Od r. 2001 bylo vyšetřeno **27 pacientů** s neuroblastomem , tj. celkem **200 vyšetření exprese Th** genu z různých biologických vzorků
- V měsíci listopadu: zahájena detekce antigenů MAGE, GAGE pro monitoring choroby u NB pacientů