

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

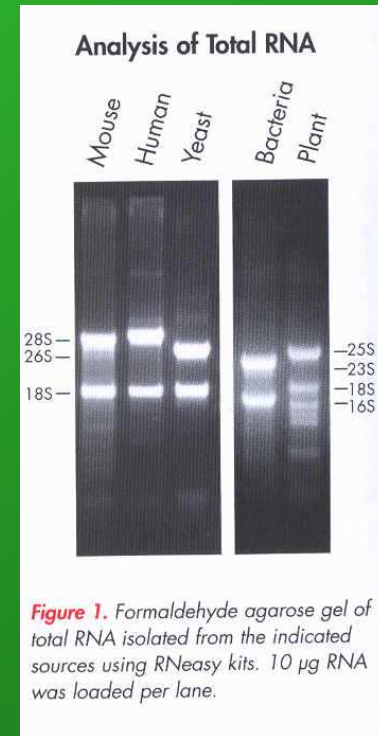


Table 3. mRNA classification based on abundance

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

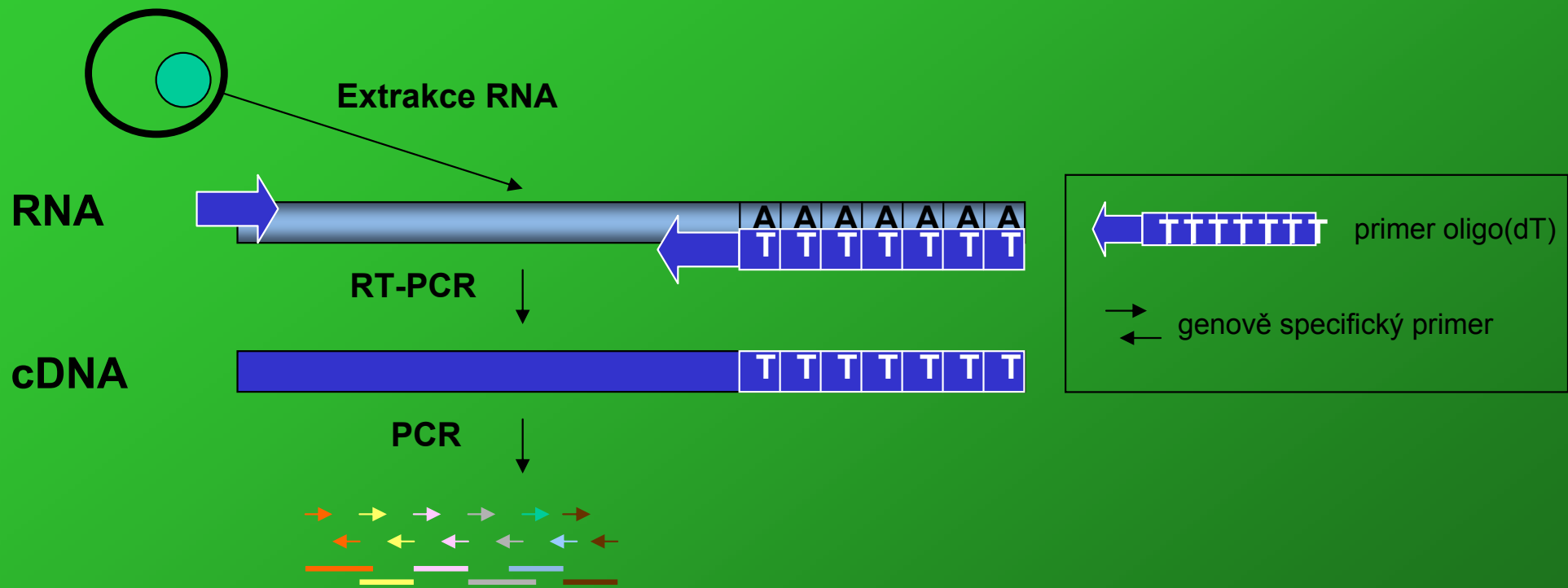
gene-expresní analýza: analyzovaná RNA musí reprezentovat *in vivo* expresi vzorku

- 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°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)

RNA v diagnostice

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

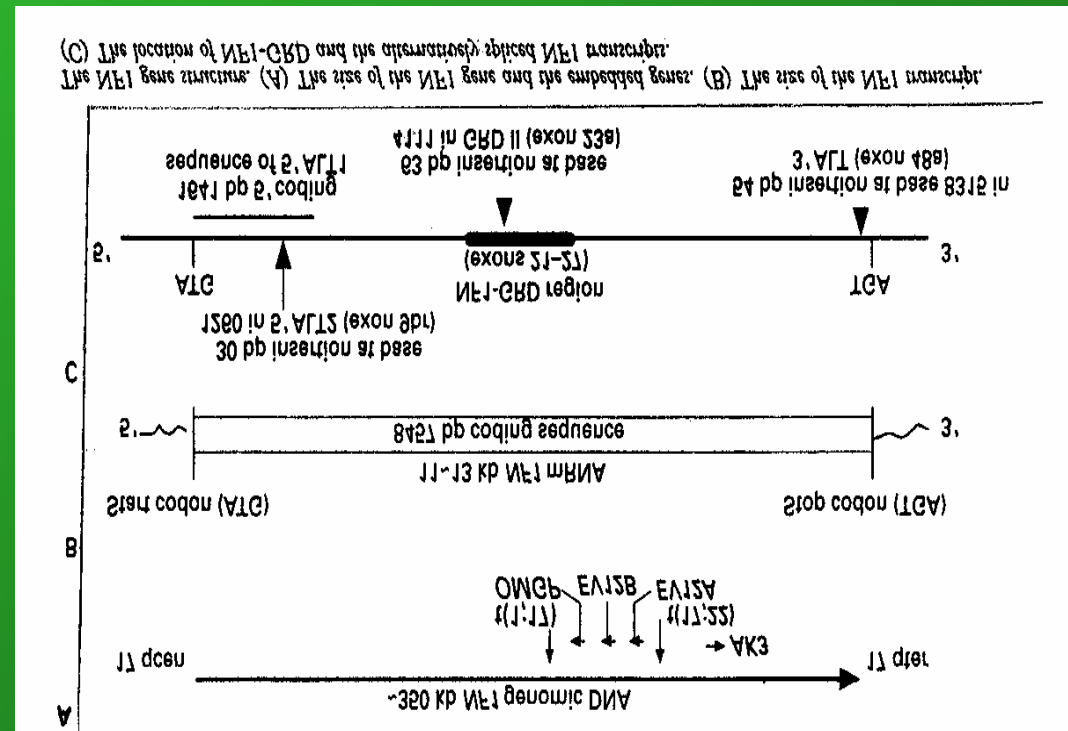
Přímá RNA diagnostika



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

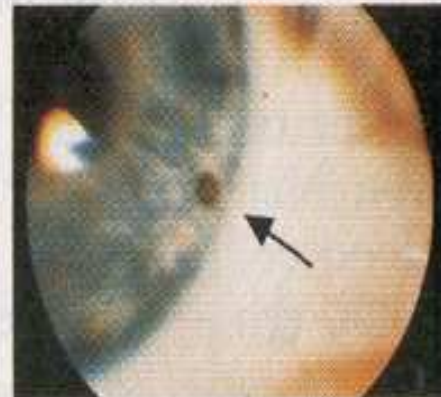
Lisch nodules in the iris

Multiple neurofibromas

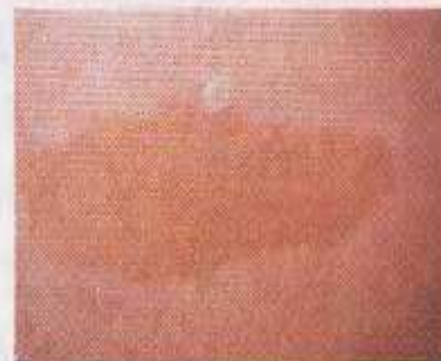
Skeletal anomalies

Predisposition to tumors
of the nervous system

50% new mutations



1. Lisch nodule



2. Café-au-lait spot



3. Neurofibromas

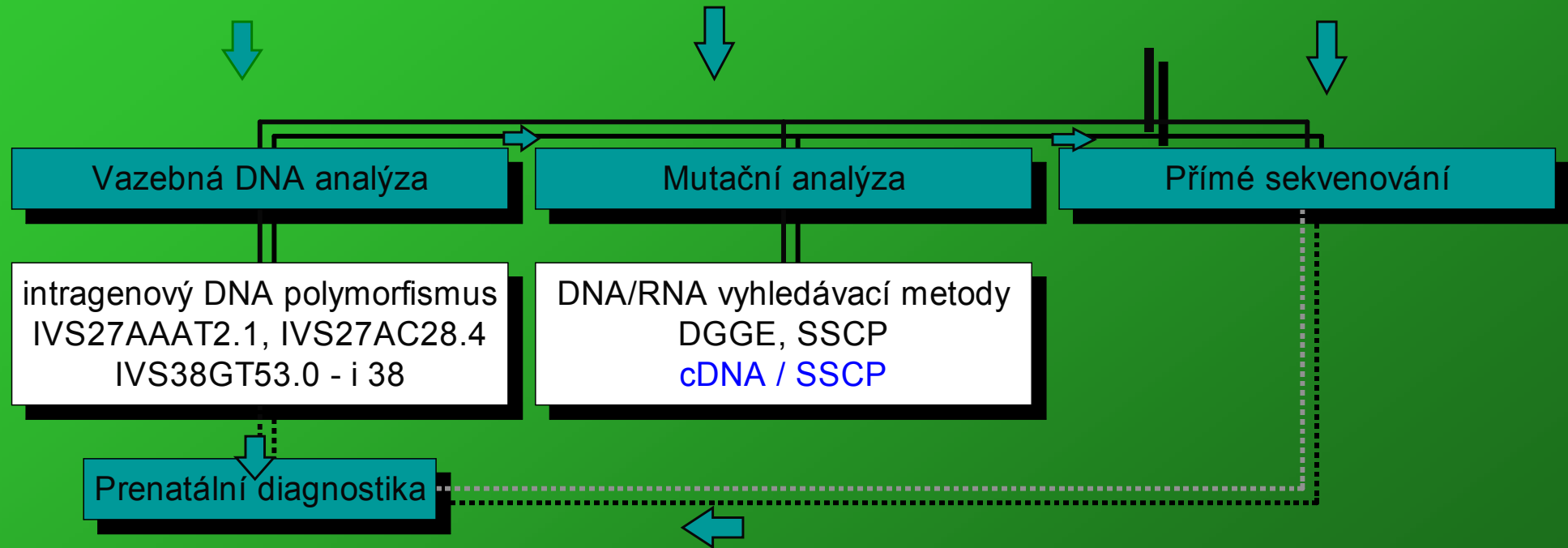
A. Main manifestations of neurofibromatosis 1

Komplikace při molekulární diagnostice NF1

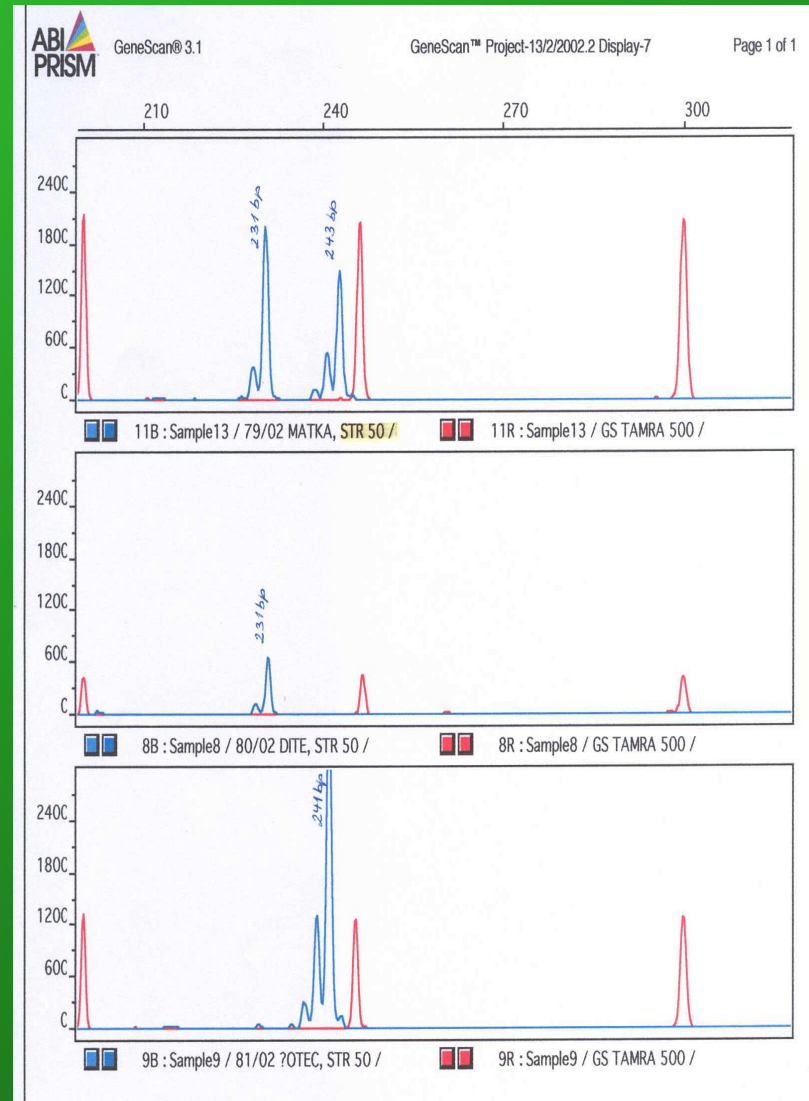
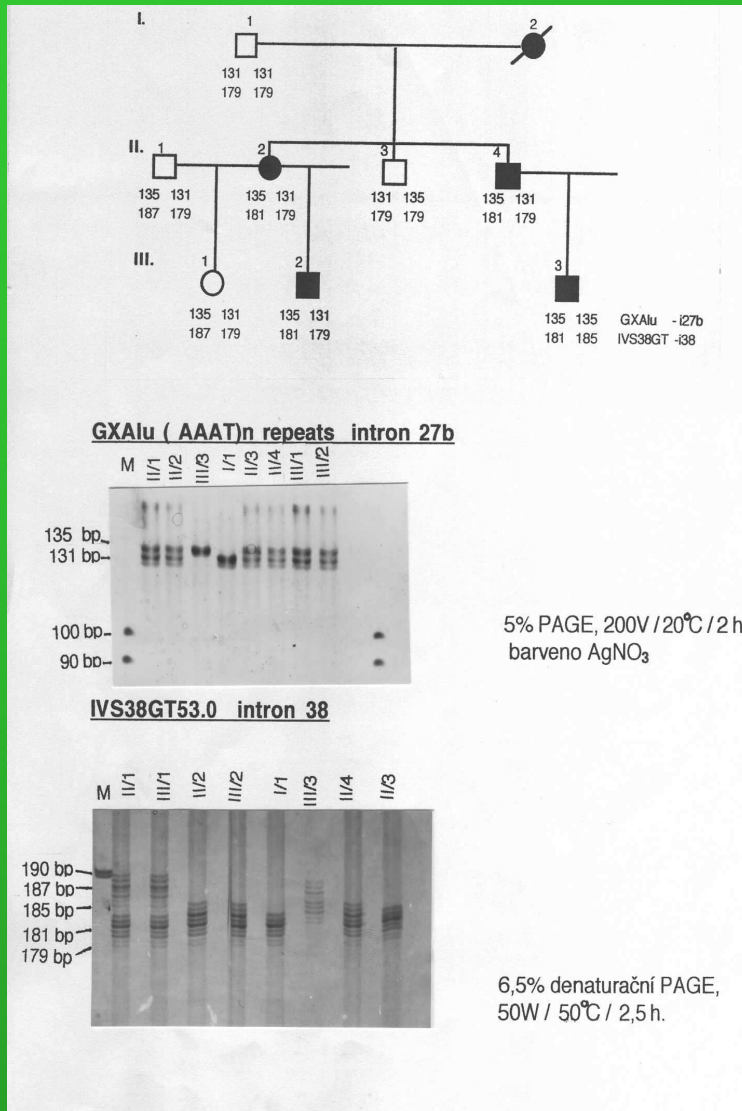
- problematická klinická diagnostika
- až 50 % případů *de novo*
- vysoká mutační rychlost
- velikost genu (350 kb, 60 exonů)
- absence hot spot oblastí - nutnost vyhledávání v celém genu
- nejasná korelace mezi typem mutace a formou postižení
- neurofibromin - známa funkce pouze jeho centrální domény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

Strategie molekulárně-genetického testování NF1 pacientů

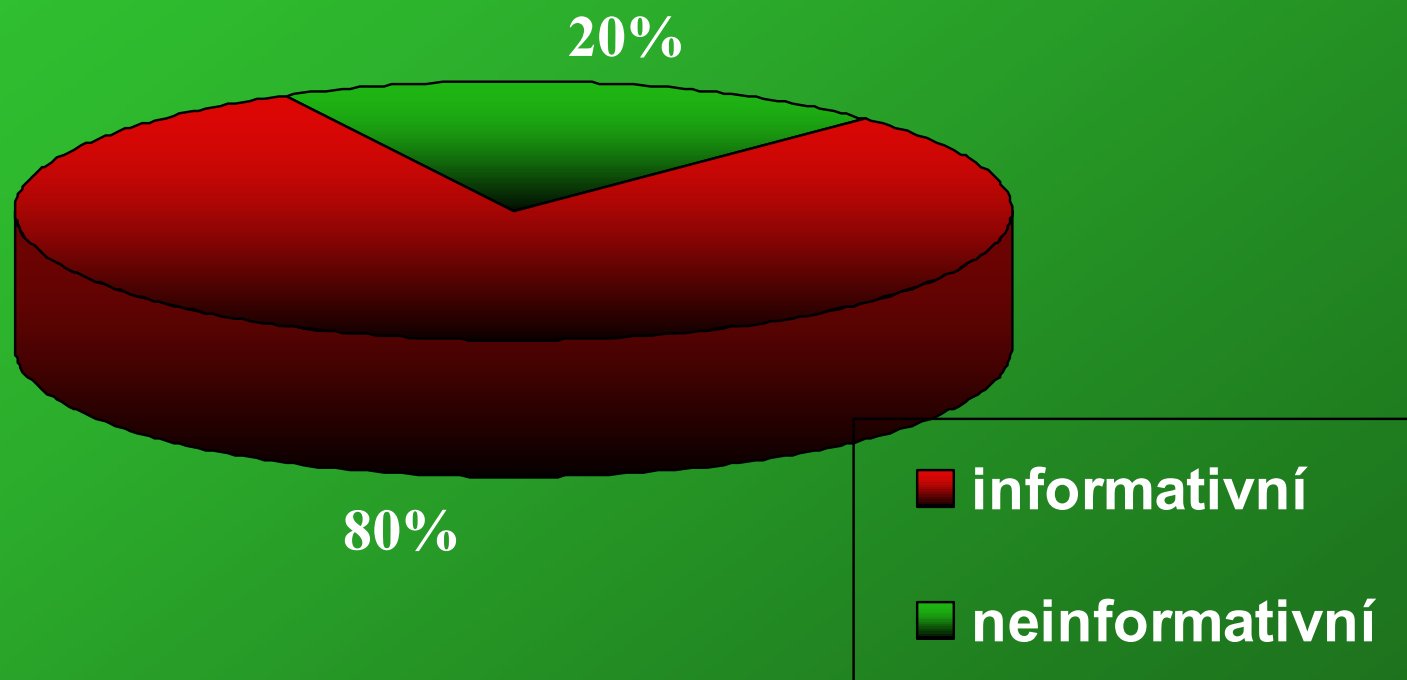
DNA / RNA NF1 pacienta



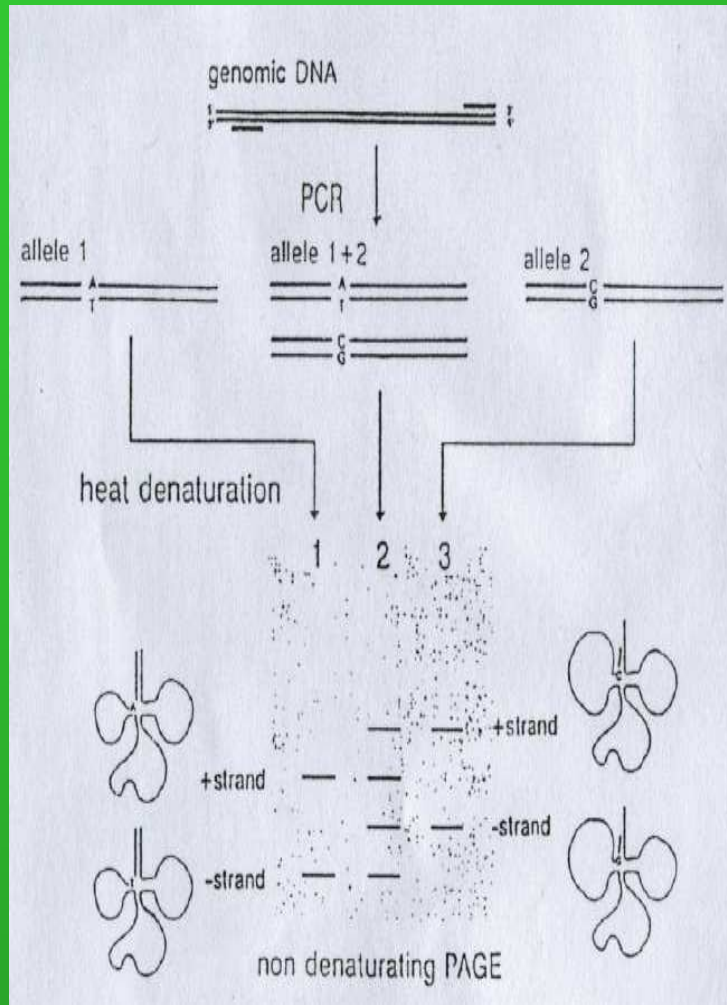
Vazebná DNA analýza v rodinách s výskytem NF1 onemocnění



Vazebná DNA analýza v rodinách s výskytem NF1 onemocnění



SSCP



standardní
+ DNA řetězec

-DNA řetězec



mt řetězec

1

2

3

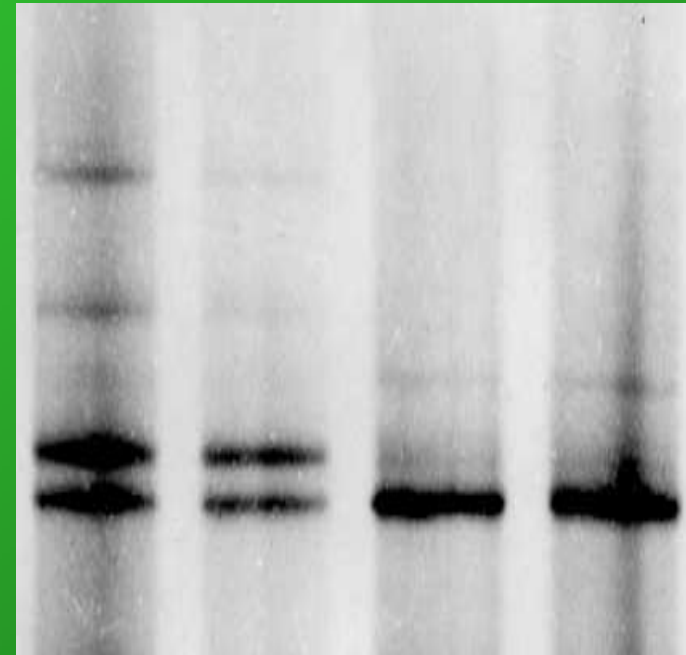
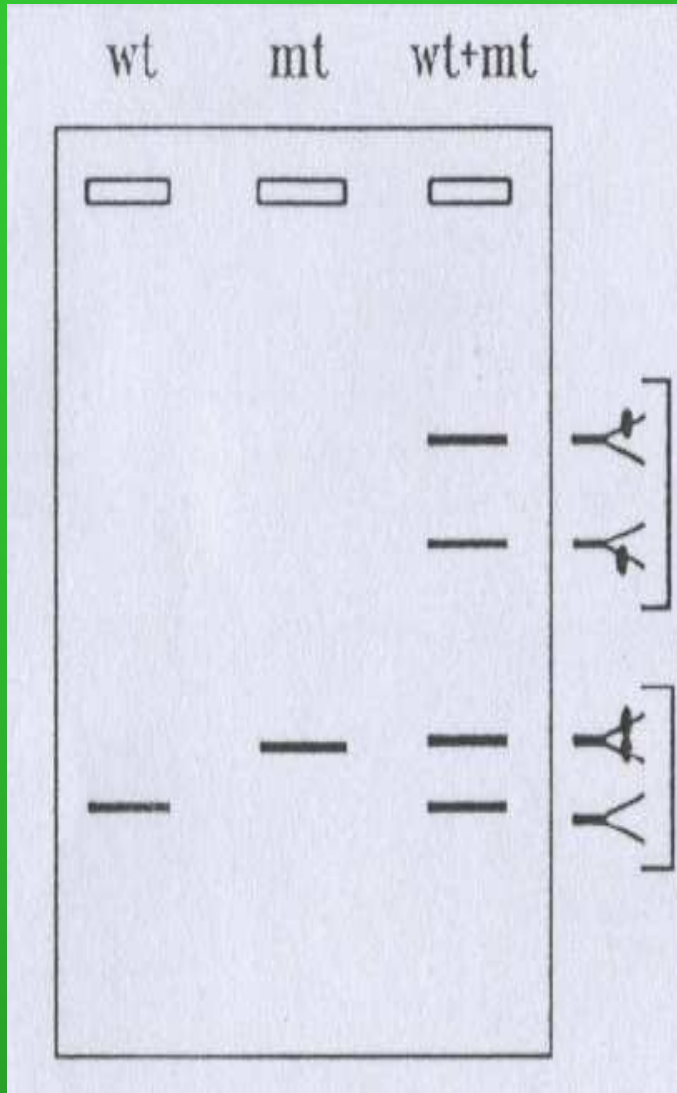
Obr. 1: SSCP analýza exonu 29 NF1 genu
12% PAG(40:1), 150V/16hod/10° C

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

dráha 3: NF1 pacient (C5242T)

DGGE

směr elektroforézy
koncentrace denaturantů



heteroduplexy

homoduplexy

Obr. 4: DGGE analýza NF1 exonu 31

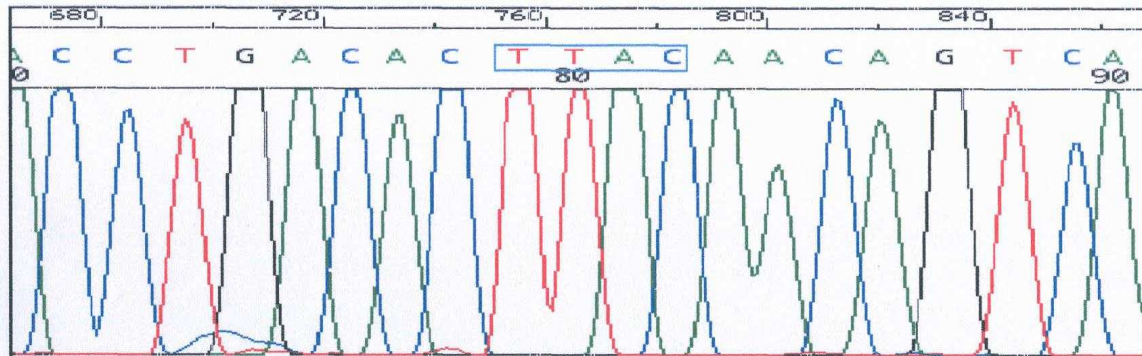
7.5% PAG(37,5:1), 10% - 40% denaturantů,
150V/ 3,5 hod / 60°C

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

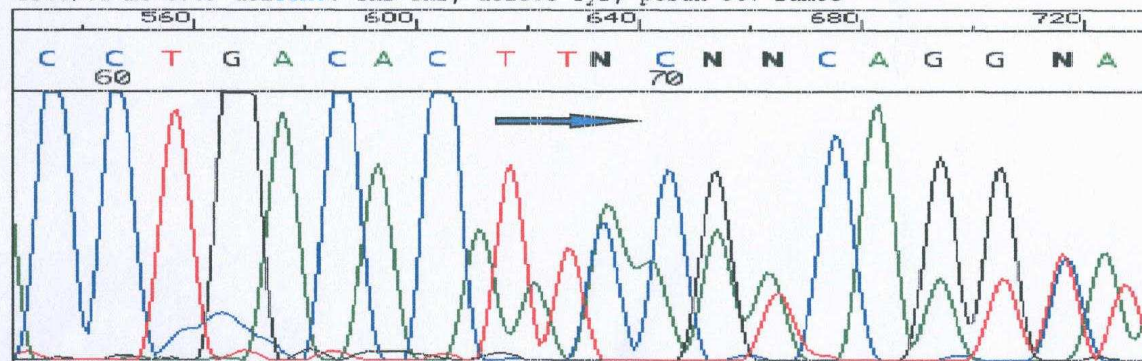
Sekvence vzorku DNA s odlišnou elektroforetickou mobilitou

GEN NF1 - exon 37

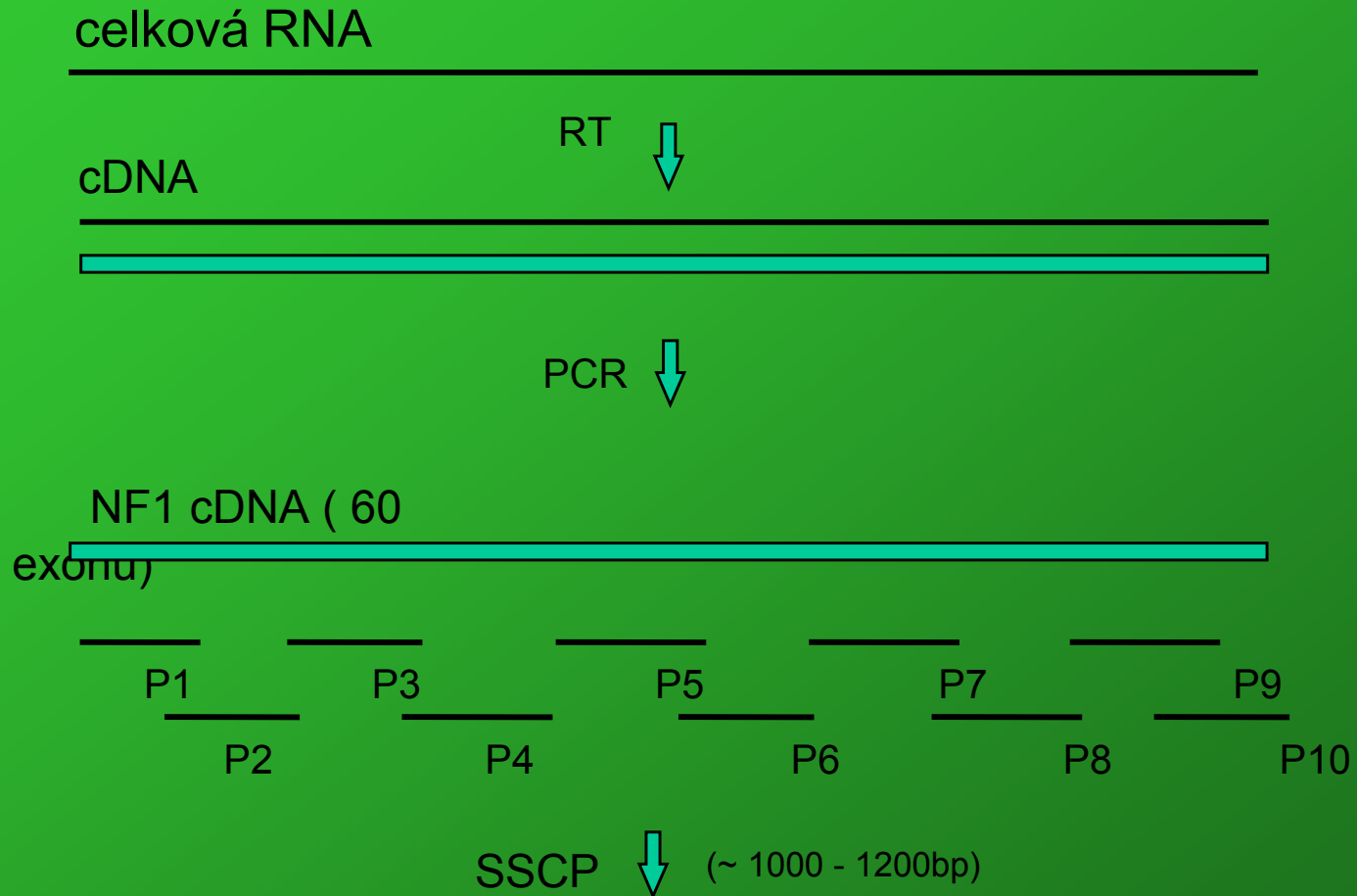
standard DNA



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



cDNA - SSCP analýza



Sekvenační analýza

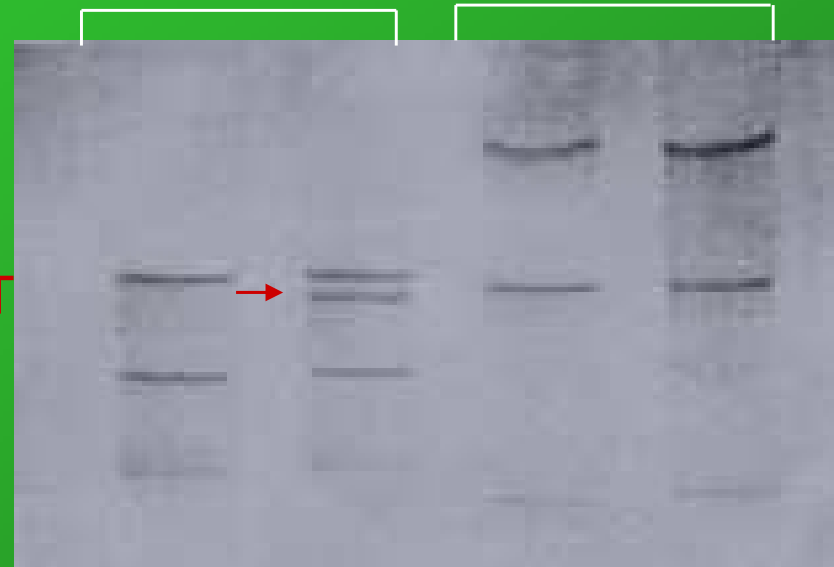
cDNA SSCP

semi-nested PCR cDNA (segment P7)

P7 A (560bp)

P7 B (614 bp)

mt C5242T



wt

C62

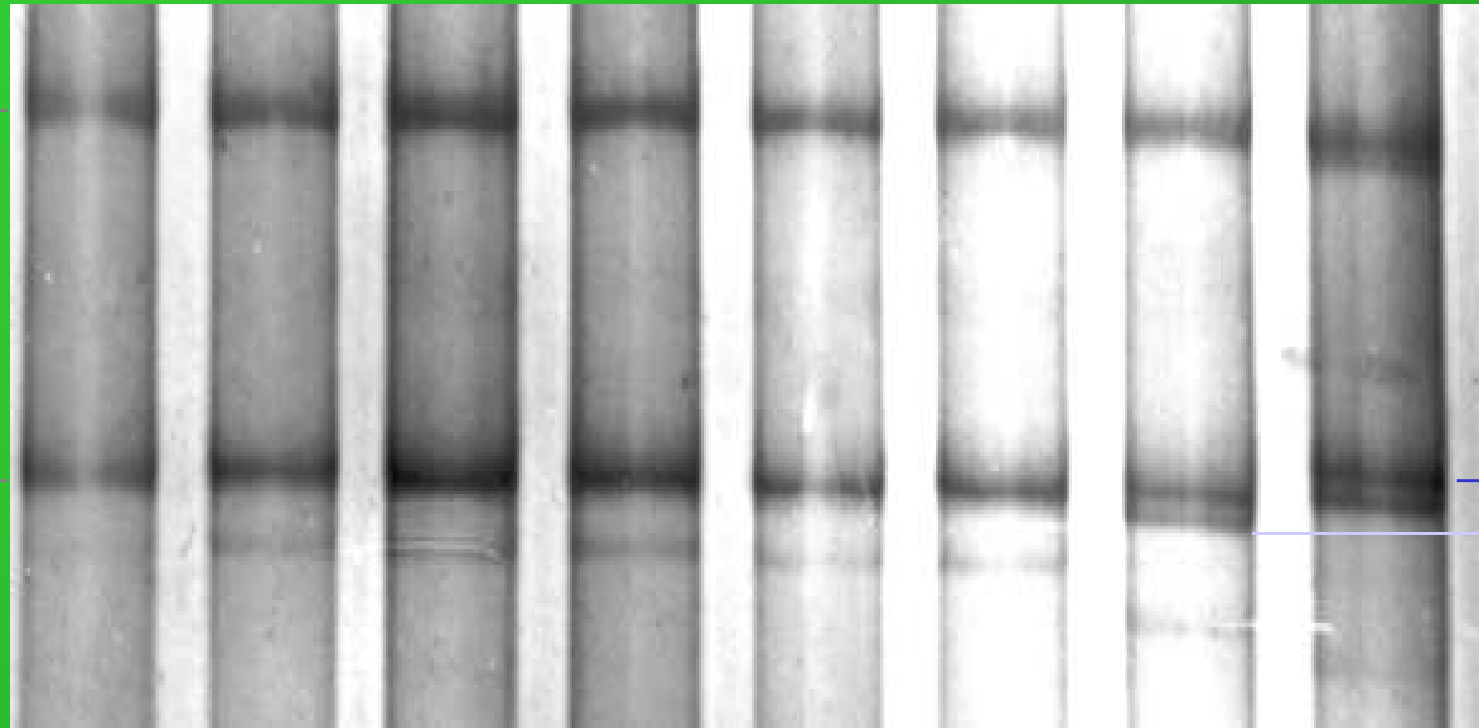
wt

C62

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

standardní
+ssDNA

- ssDNA



mt ssDN

mt ssDN

1 2 3 4 5 6 7

8

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

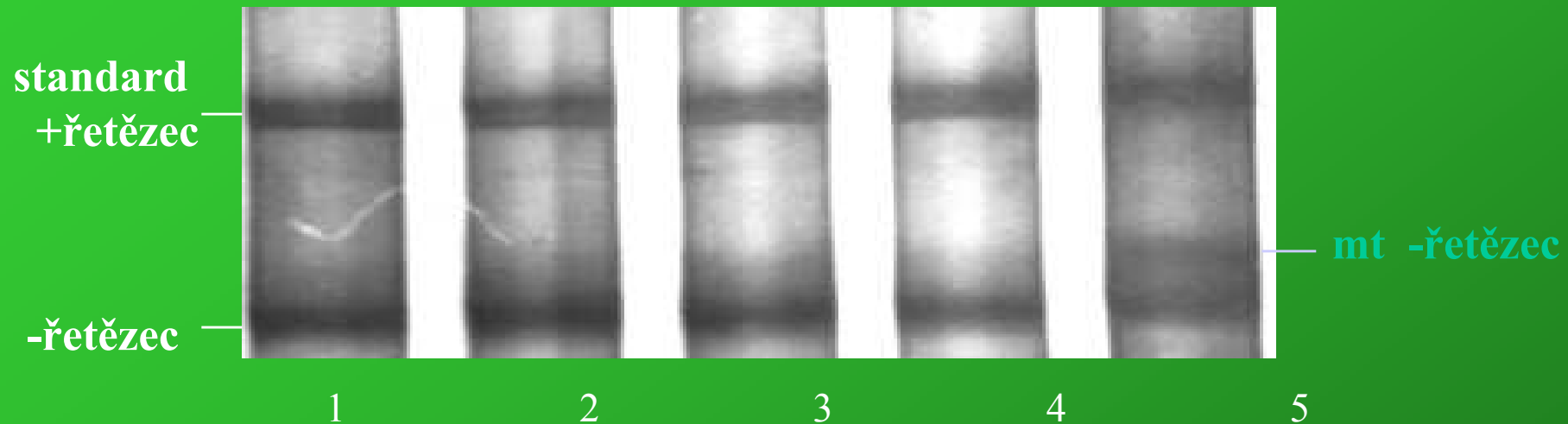
dráha 1: standardní DNA

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

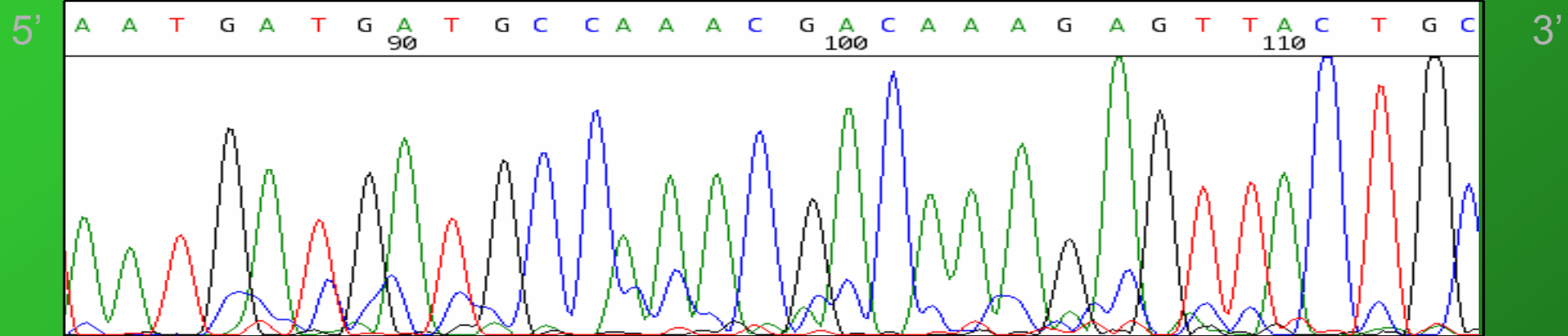
10% PAGE (60 : 1), 600V / 4.5hod / 14°C

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

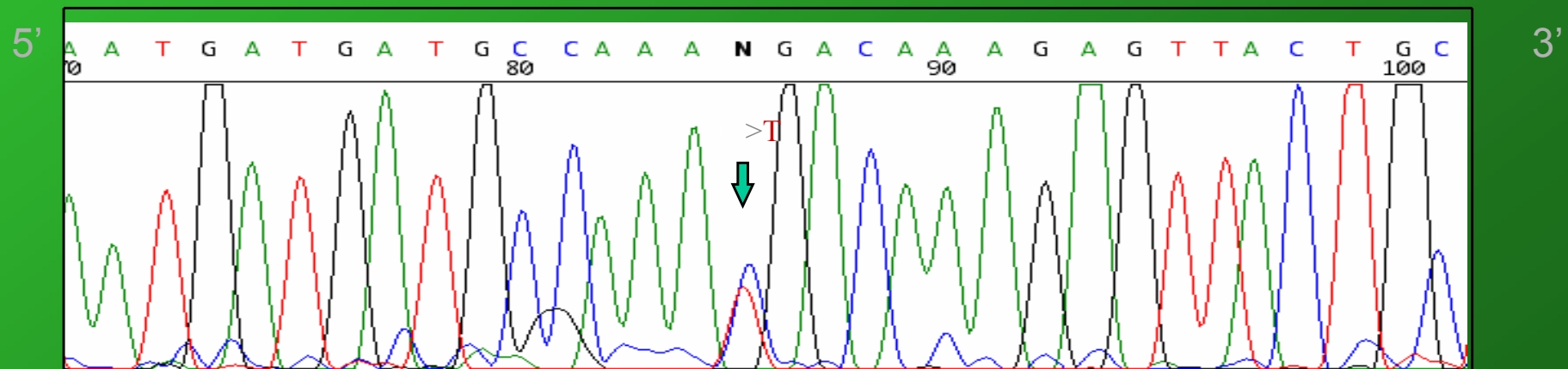
dráha 5: NF1 pacient (C5839T) (aberrantní patern NF1 segmentu P7)

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

standardní cDNA



cDNA NF1 pacienta, mt C5839T (Arg > STOP)



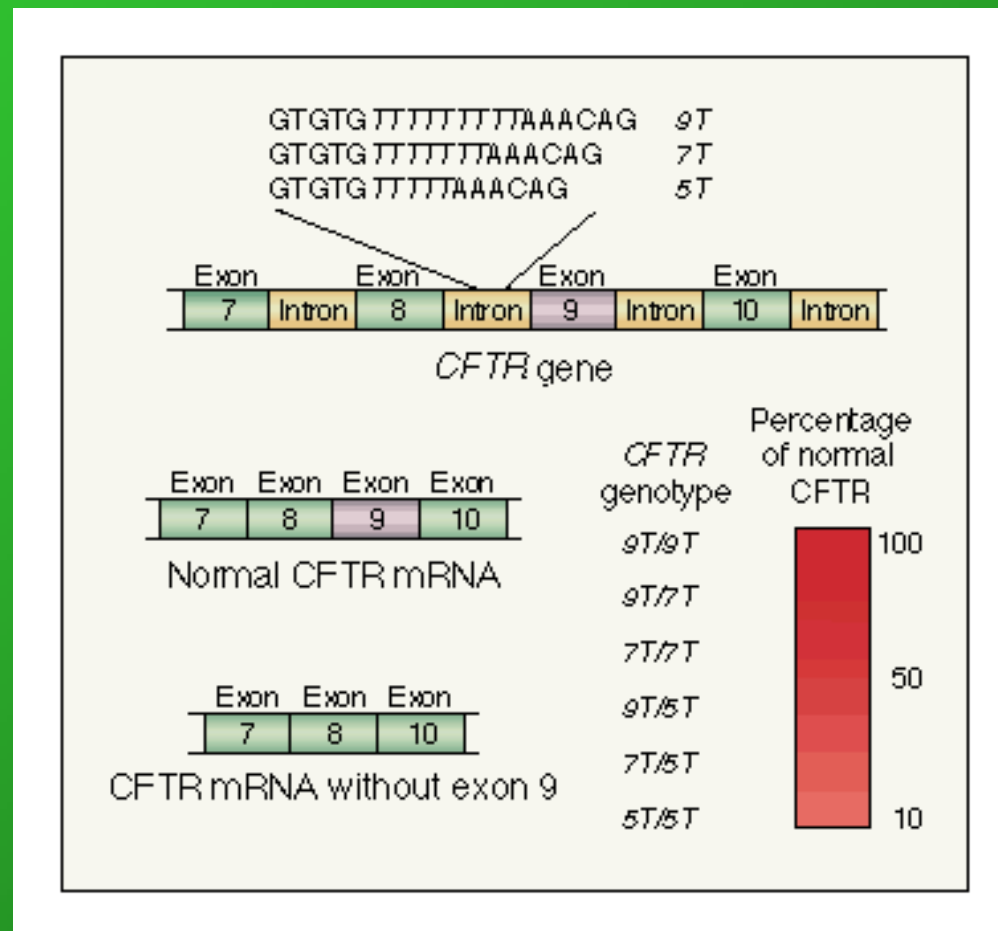
Výhody a nevýhody RNA dignostiky genu NF1

- 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!)

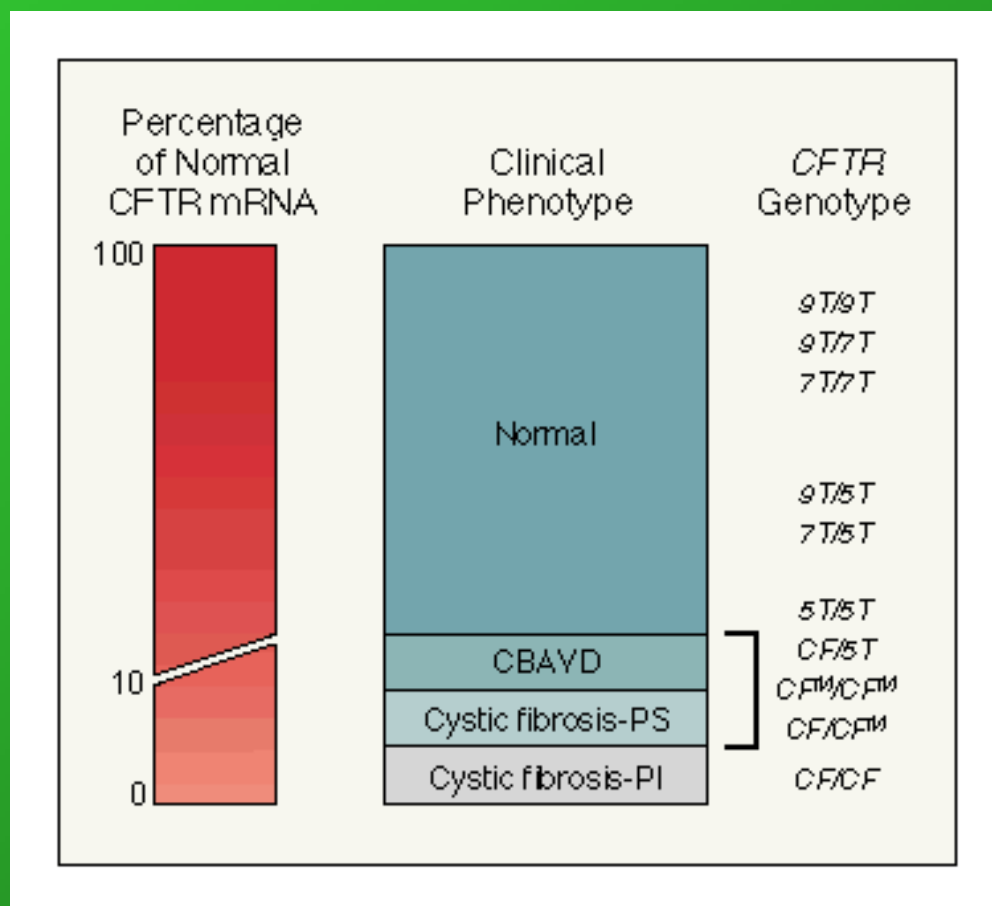
Expresní analýza

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

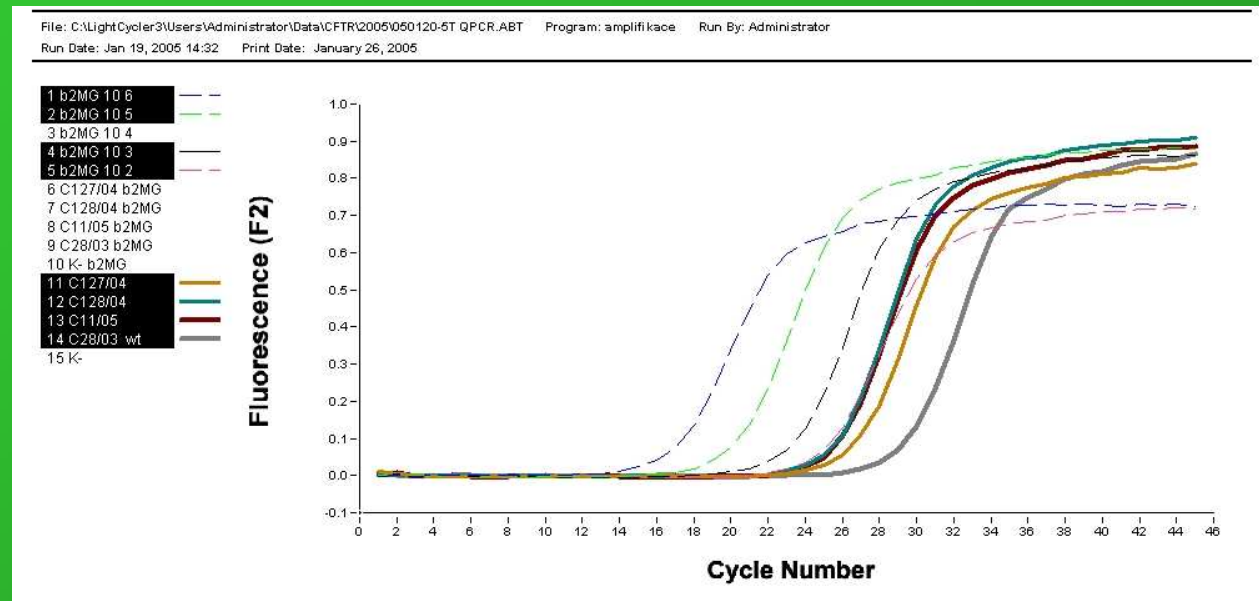
- nested PCR
- restriční štěpení
- ELFO

(5% PAG, silver stained)



Kvantifikace cDNA PCR produktu CFTR exon 9 na LightCycler

Transcripty 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)

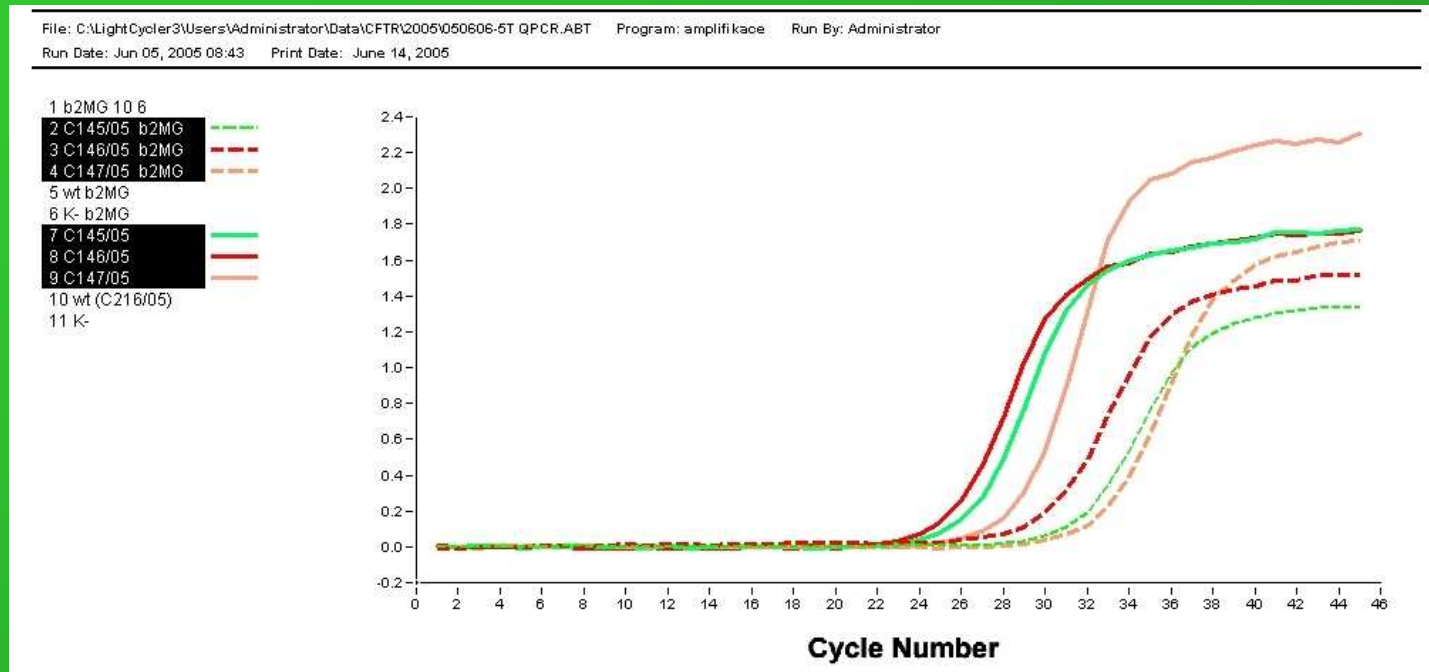
— 2.Case (patient C128/04)

— 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)

Detekce minimální reziduální choroby u solidních nádorů

- Detekce izolovaných nádorových buněk v krvi, kostní dřeni nebo lymfatickém systému pacienta
 - izolované nádorové buňky – prekutzory metastáz
 - koncentrace nádorových buněk je hluboko pod detekčním limitem standartních vyšetřovacích metod (imunohistochemie, průtoková cytometrie)

- Nejcitlivější metoda –

reverzně- transkriptázová PCR v reálném čase

Studium genové exprese, kdy hledaným znakem epiteliálních nádorových buněk je mRNA

Nádorové buňky se od zdravých buněk liší expresním profilem

nádorová buňka exprimuje jiné geny ze své výbavy
projeví se změnou množství a spektra expromované mRNA

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

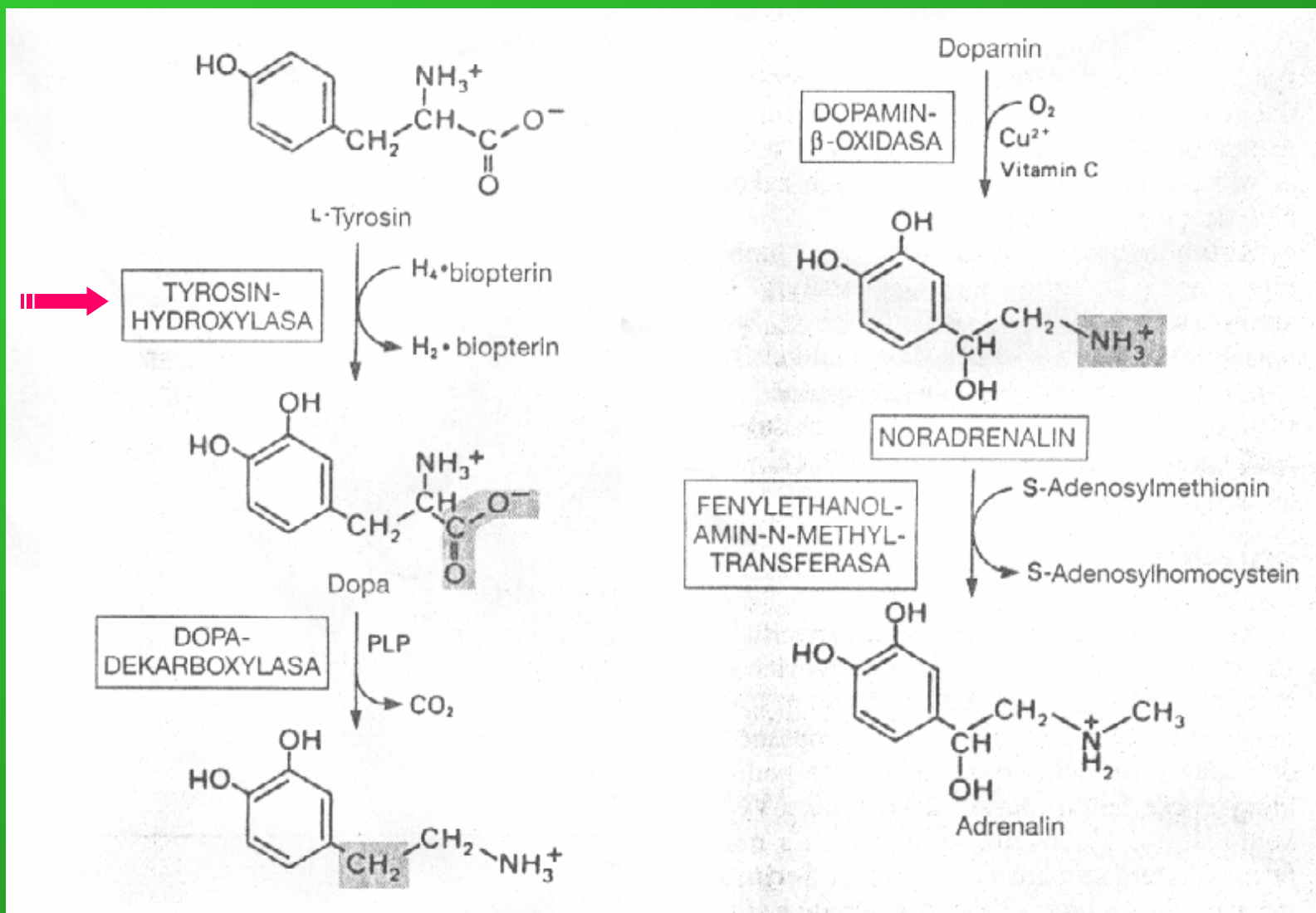
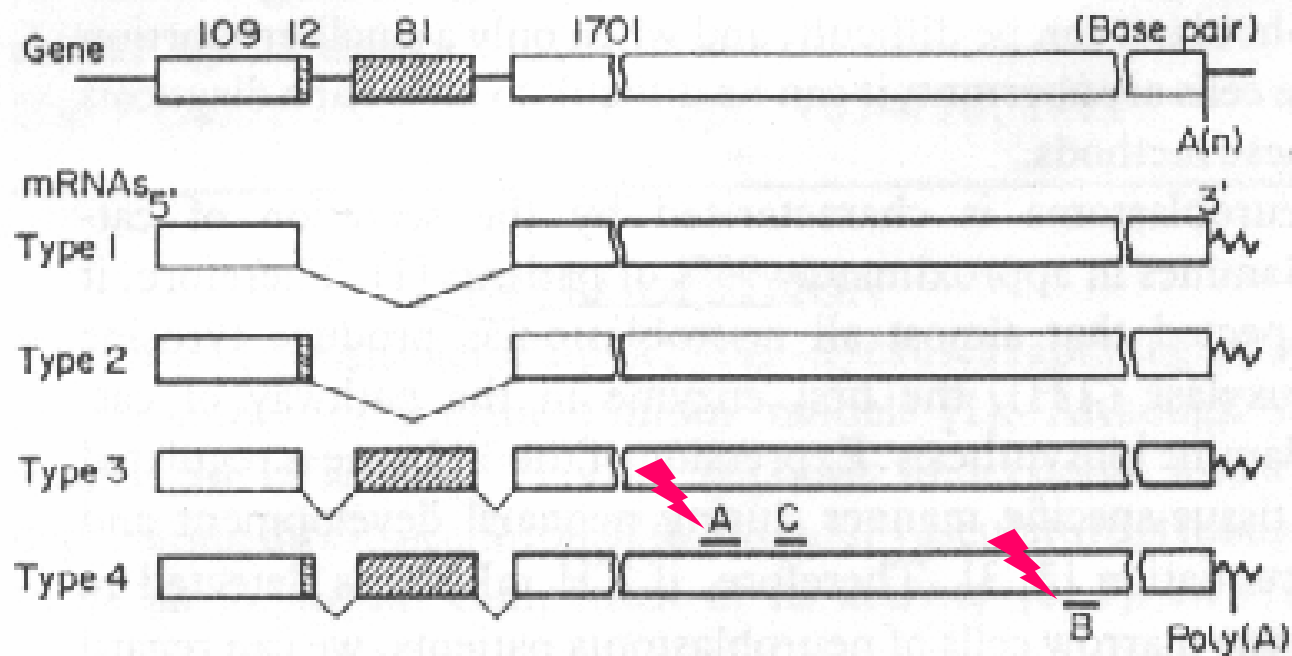


Schéma TH mRNA

- 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

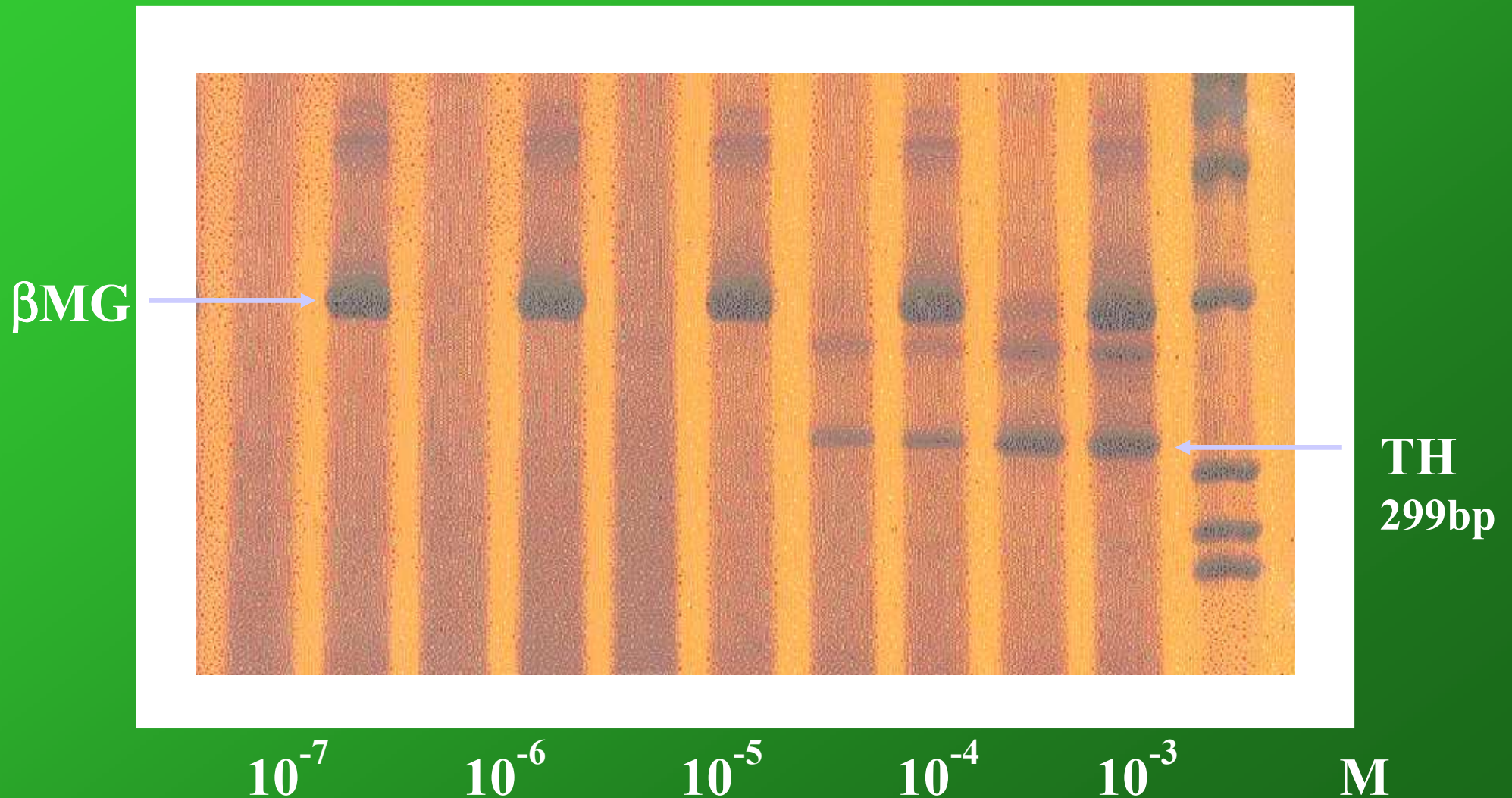
✦ PCR ⇒ syntéza úseku DNA odpovídajícího mRNA pro TH

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

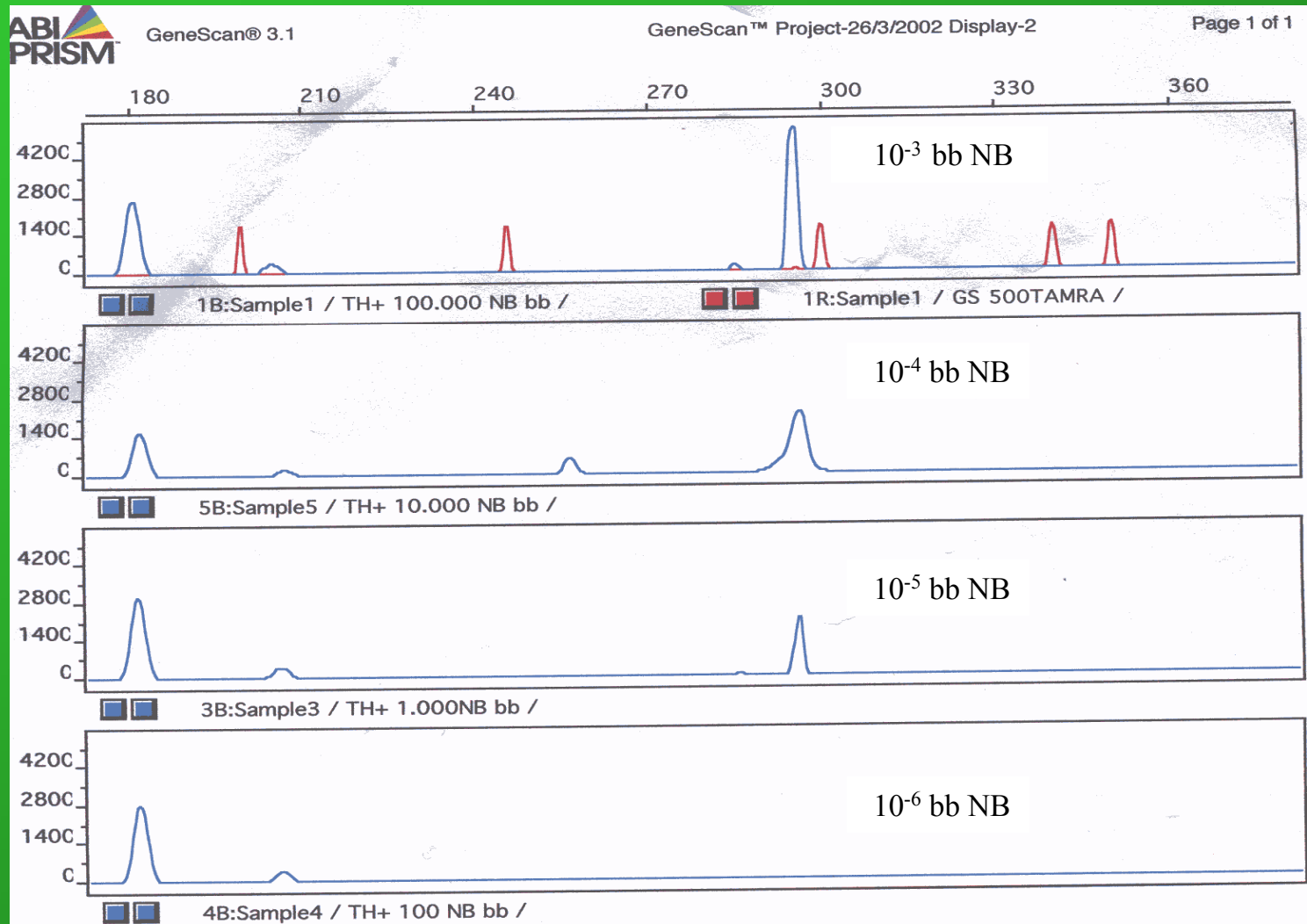
✦ ELFO - 5% PAGE, barvení stříbrem
~ Fragmentační analýza (ABI PRISM)

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

Citlivost detekce TH mRNA - PAGE



Citlivost detekce TH mRNA - fragmentační analýza



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...)

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

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 PK pozitivní	Nmyc - 1p36 -	KD, metastázy v obratlech bederní páteře 1.blok CHT
30.4.01	PK KD(PS,LS, sternum) 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 gain17q -	před 2. PBSC (1-4.11.01) VGPR
5.11.01	0	N-myc -	
16.11.01	0	N-myc -	
22.11.01	ABCD štěpy negativní KD,PK negativní	0	
25.1.02	PK negativní	0	před vysoce dávkovanou CHT s transplantací PBSC
27.2.02	PK negativní	0	kontrola po transplantaci
29.3.02	KD-LS negativní KD-PS pozitivní		molekulární relaps
26.4.02			klinický relaps

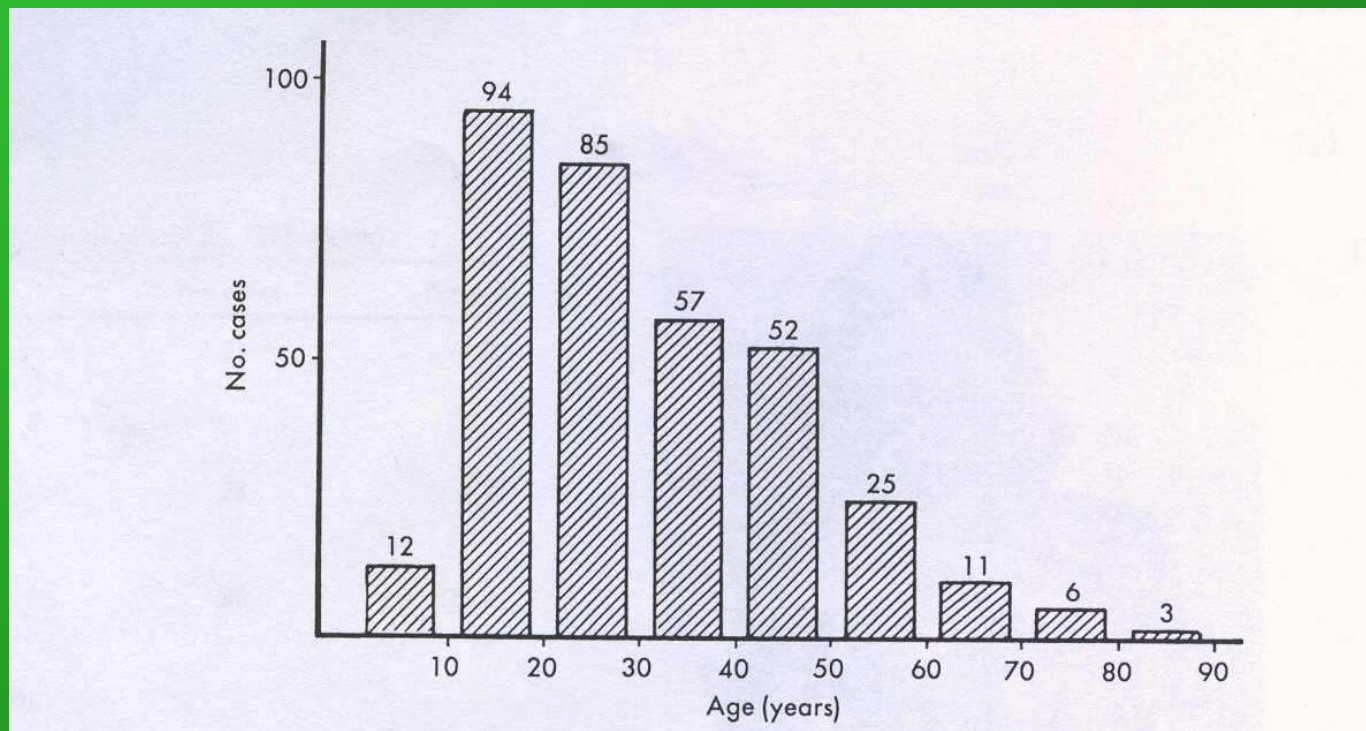
Synoviální sarkom

- 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

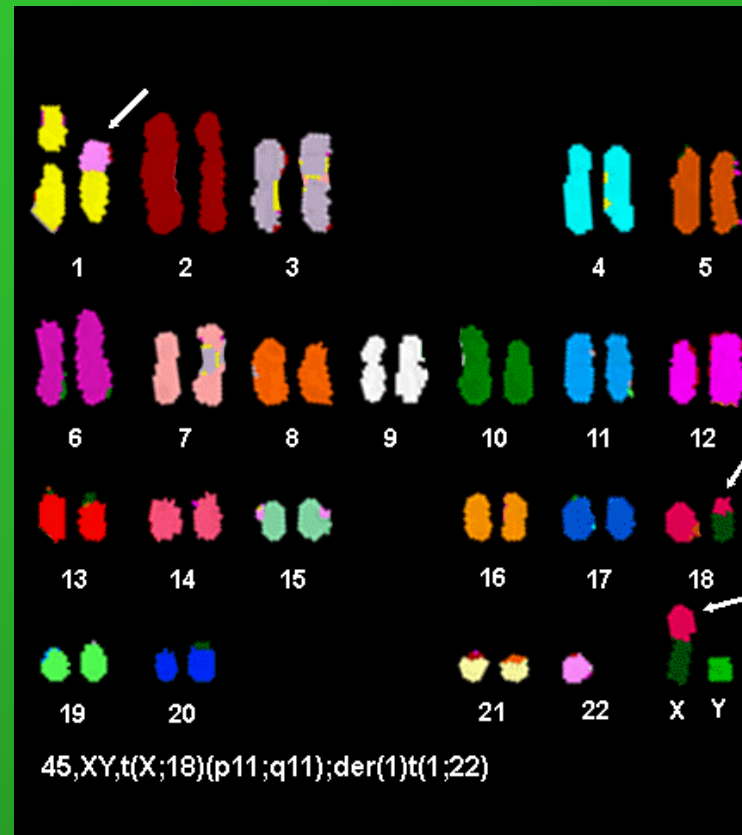
*References 11, 27-29, 45, 111, 117, 151.

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 chromozomálními 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

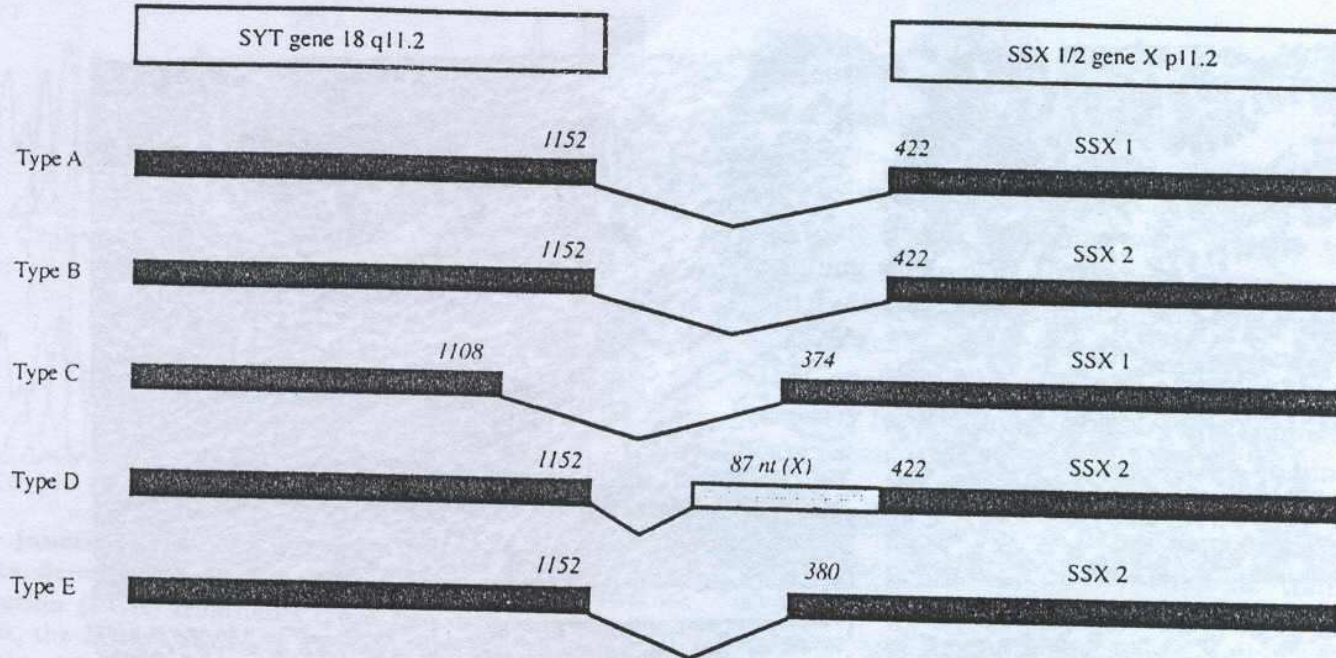



Figure 1. Structure of variant chimeric fusion transcripts of SYT-SSX1/2 [7, 9]. Enumeration of the nucleotides is given for the SYT gene (GenBank #HSSYT) and the SSX1/2 genes (GenBank # X86174 and X86175). In the type D transcript, the grey box indicates 87 nucleotides which were mapped to the X chromosome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

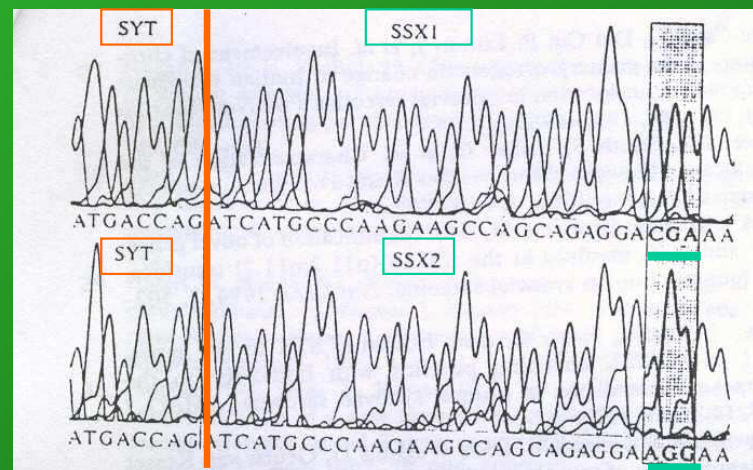
dráha 2: PCR pacienta (SYT/SSX1,2)

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)