

# Úvod do molekulární medicíny C7188



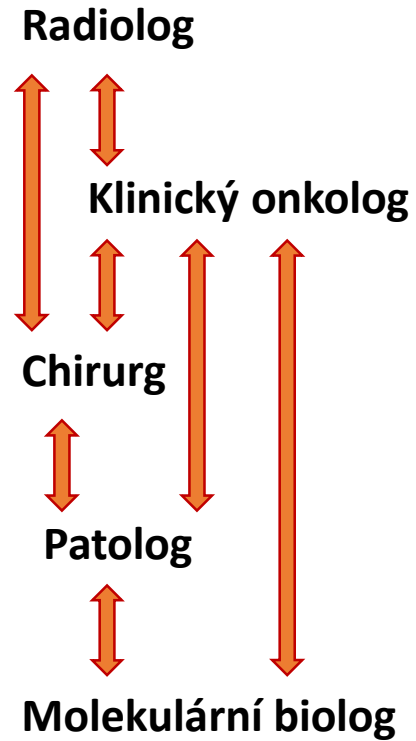
## 3. Biologický materiál, mikroRNA, RT qPCR

**Mgr. Júlia Bohošová, Ph.D.**

**podzim 2024**

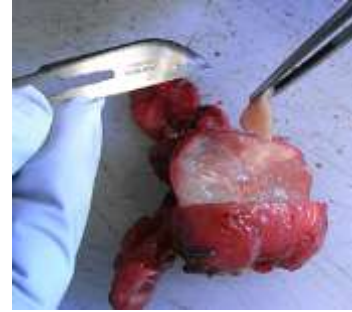
# Interdisciplinární charakter biomedicínského výzkumu

*příklad onkologického výzkumu*



# Biologický materiál užívaný pro účely molekulární medicíny

**Tkáň** – nativní vs. fixovaná  
- chirurgický resekát, biopsie



**Formalin Fixed Paraffin-Embedded tissue (FFPE)**



**Čerstvá tkáň** – s tkání je třeba zacházet velmi opatrně, po odběru se může snadno poškodit

**Tekuté fixační činidlo** – vzorek musí být umístěn do 10% **formalínu** (formaldehyd) -> změna konfigurace bílkovin, včetně enzymů (6-24 hodin v závislosti na velikosti a typu vzorku tkáně)

**Dehydratace etanolem** – opakované ponoření tkáně do ethanolu o zvyšující se koncentraci, která končí 100% koncentrací ethanol

**Čistící prostředek** (xylen, isopropanol) – vytěsnění ethanolu a odstranění tuku z tkáně (ztěžuje pronikání vosku)

**Parafínový vosk** – v této fázi lze tkáň napustit parafínem o teplotě kolem 60 °C a poté ji nechat vychladnout, aby ztuhla a dala se snadno rozřezat na řezy

# Biologický materiál užívaný pro účely molekulární medicíny

**Plná krev** (plazma + buňky)

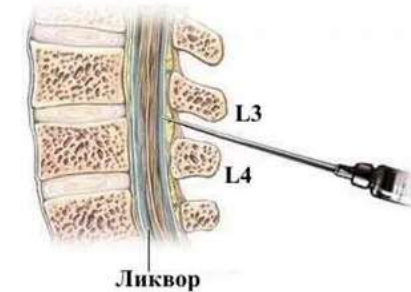
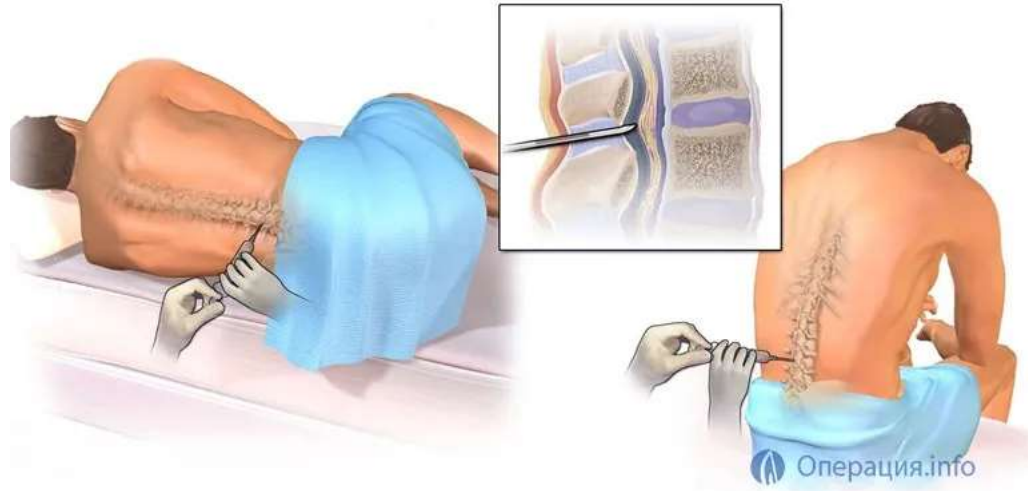
**Plazma** (tekutina po odstranění krevních elementů, obsahuje faktory hemokoagulace)

**Sérum** (tekutina nad sraženinou, bez faktorů krevního srážení)

**Moč**

**Mozkomíšňní mok**

Kostní dřeň, bronchiální aspirát, ejakulát,  
bronchoalveolární laváž, kloubní tekutiny,  
mozkomíšňní mok, sputum, stolice, výtěry...

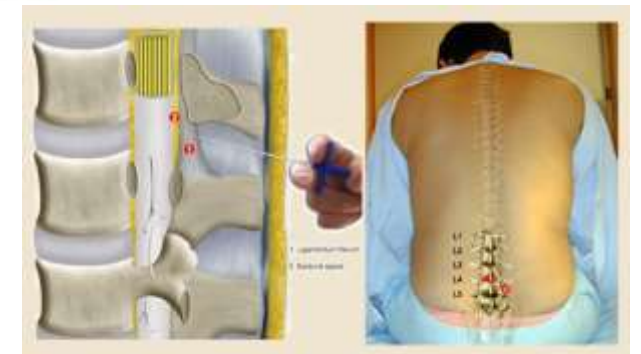


## Banky biologického materiálu

archivace vzorků v parách kapalného dusíku při teplotě  $-160^{\circ}\text{C}$

K archivovanému vzorku nativní tkáň

uložen fixovaný parablok=morfologický korelát



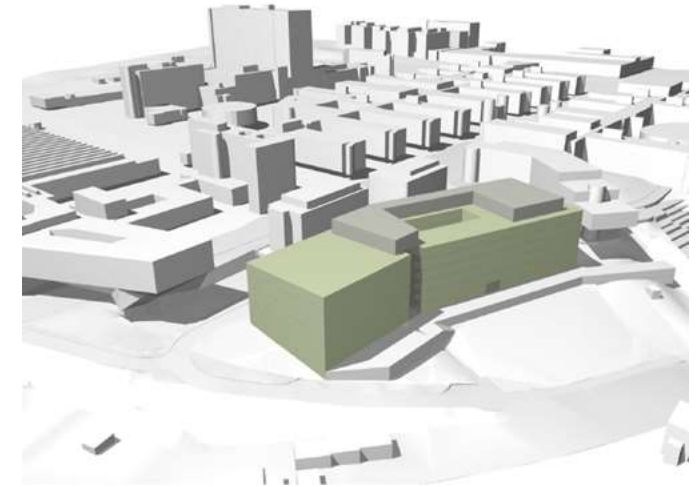
# Biologický materiál užívaný pro účely molekulární medicíny

**Masarykův onkologický ústav & RECETOX**

**BioPharma Hub**

Preklinické centrum a centrum molekulární medicíny Masarykovy univerzity

**Biobanka** – plánovaná kapacita 171 tis. vzorků při  $-160\text{ °C}$  a 93 tis. vzorků při  $-70\text{ °C}$



# Odběr klinického materiálu

**Klíčový moment rozhodující a kvalitě celého výzkumu!!!!!!**

Všechny odběry musí probíhat stejně, a celý proces musí být přísně kontrolován!



Doba transportu na patologii  
Fixace vzorku



Kontrolovaná  
archivace vzorku

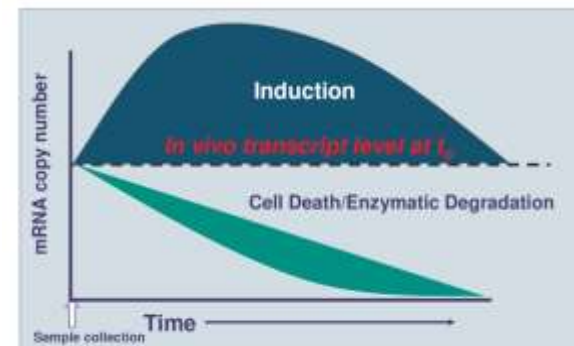
DNA 4°C

RNA -70°C



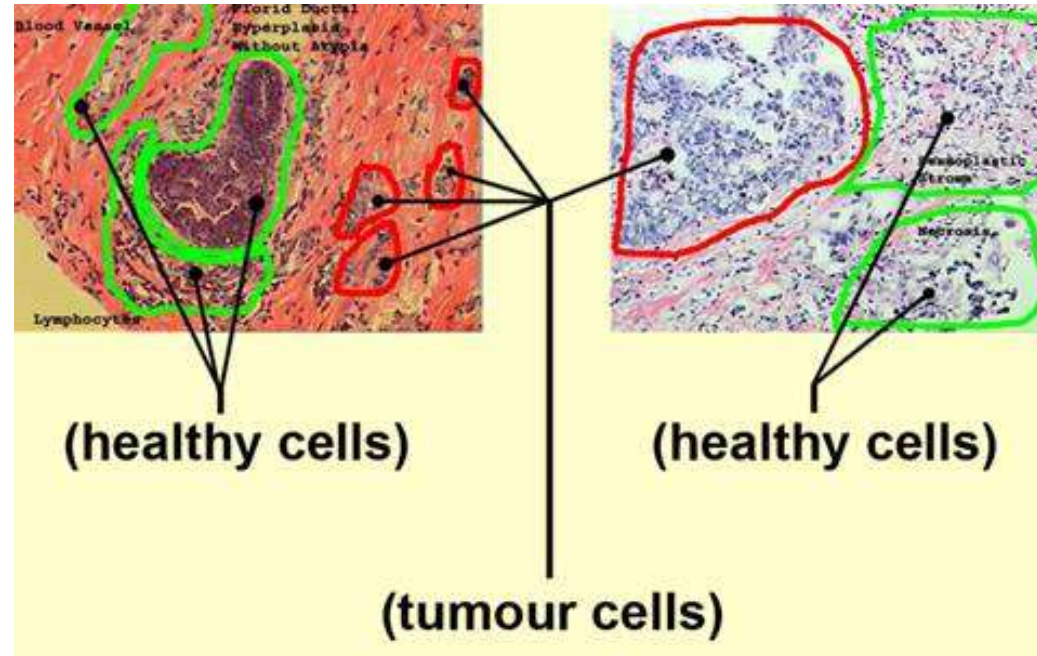
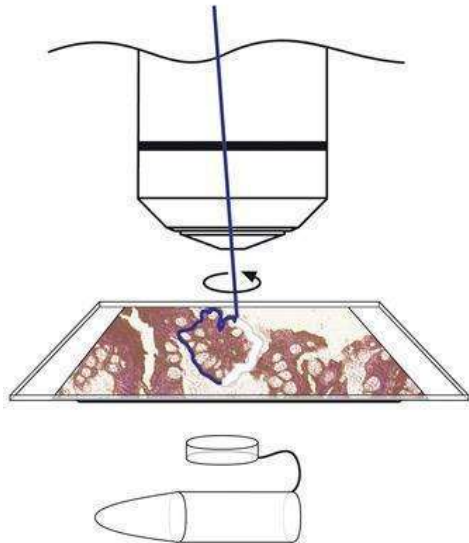
Zaznamenání času podvázání cév  
Tzv. ischemické zdržení

Vysoké nároky na stabilizaci především při práci s RNA  
Nejčastěji používáme stabilizační činidlo RNAlater



# Laserová mikrodisekce – nástroj k získání vybraných buněčných populací

*laser capture microdissection (LCM)*



# Izolace nukleových kyselin

**Homogenizace tkáně** (ultrazvuk, mechanicka, rotor-stator)

**Lyze buněk** (enzymaticky-proteináza K, chemicky-SDS, EDTA, fyzikálně-zahřívání...)

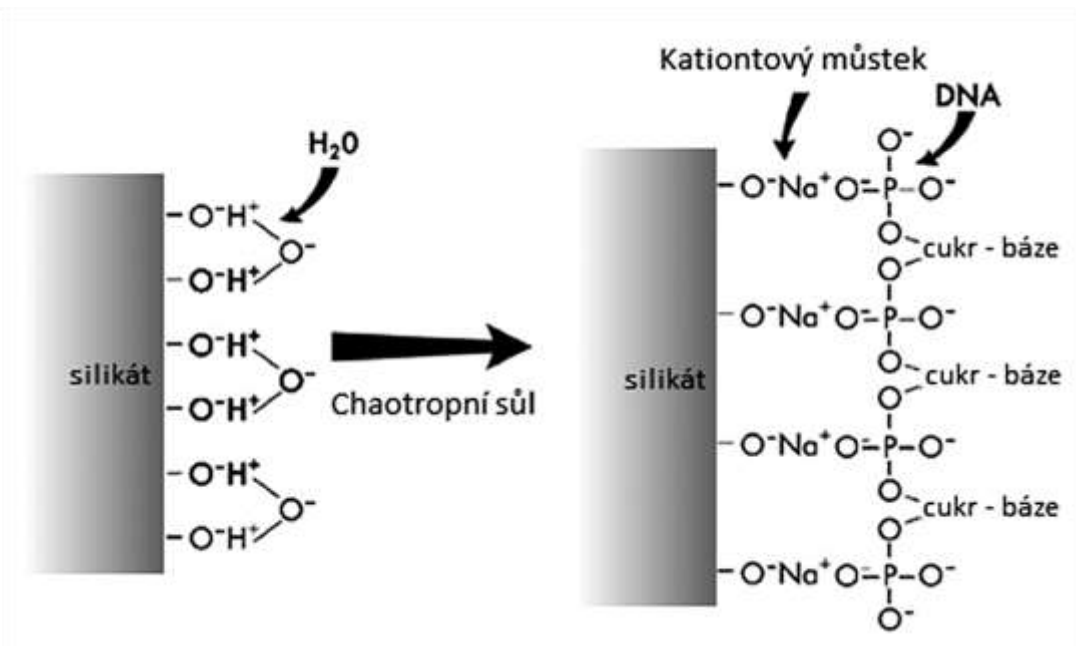
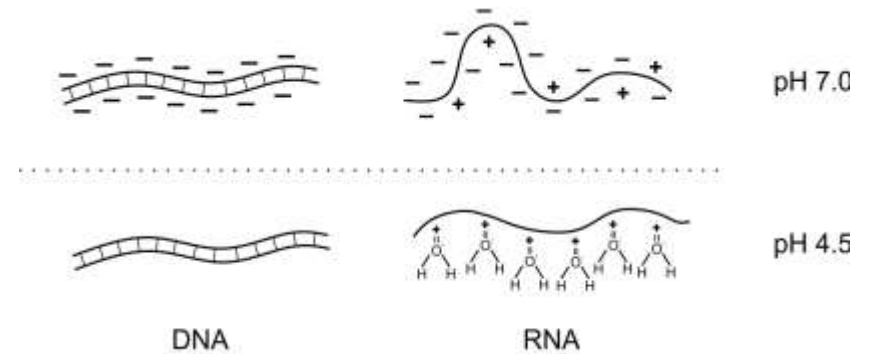
**RNA méně stabilní než DNA!**

**Extrakce směsí fenol-chloroform**

**Srážení nukleových kyselin alkoholem**

**Přečištění enzymy**

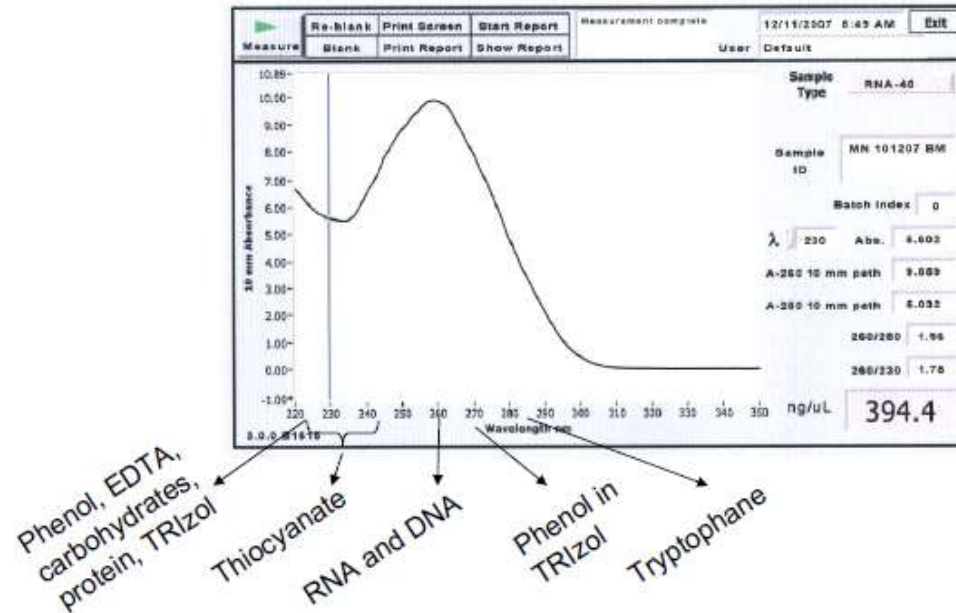
**Purifikace nukleových kyselin chromatografií (adsorpce na silikát)**





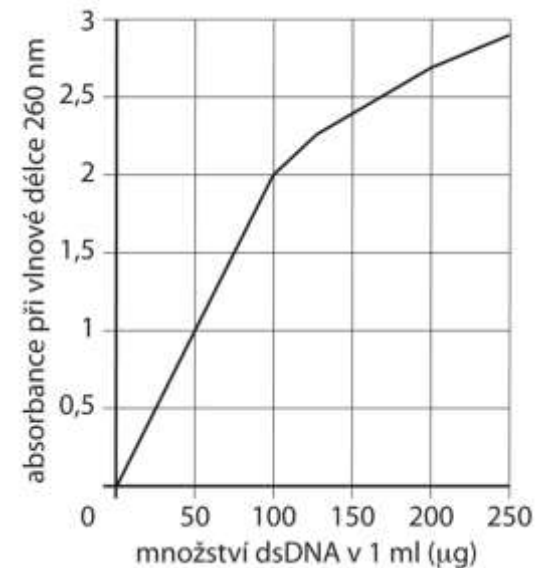
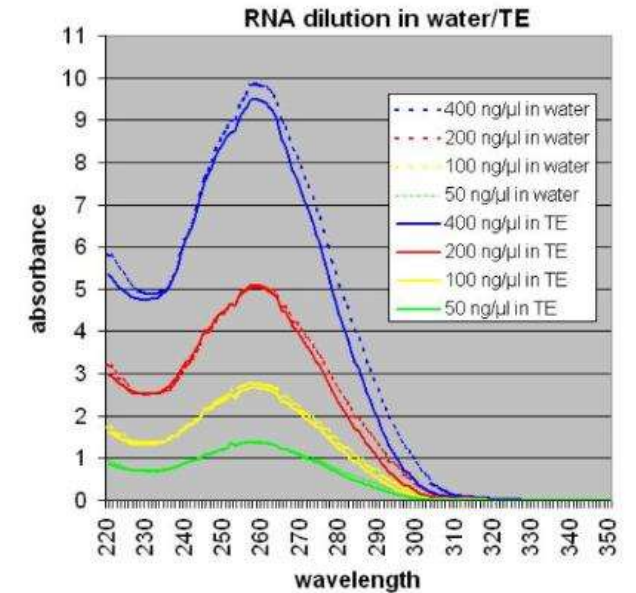
# Spektrofotometrická kvantifikace a čistota nukleových kyselin

Roztok dvouřetězcové DNA má při 260nm absorbanci 1 při koncentraci 50 $\mu$ g/ $\mu$ l  
Roztok jednořetězcové DNA má při 260nm absorbanci 1 při koncentraci 30 $\mu$ g/ $\mu$ l  
Roztok jednořetězcové RNA má při 260nm absorbanci 1 při koncentraci 40 $\mu$ g/ $\mu$ l



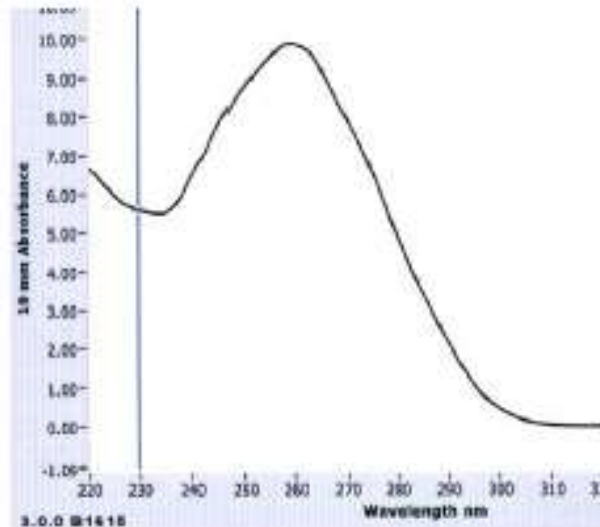
Proteiny mají díky aromatickým aminokyselinám absorpční maximum při 280 nm  
Poměr A260/A280 se má u nekontaminované DNA pohybovat v rozmezí 1,8 až 2,0  
Poměr A260/A230 < 1,7 indikuje kontaminaci chaotropními solemi a fenolem

Nanodrop ND1000 – umožňuje kvantifikaci pouze v 1 $\mu$ l vzorku



# Spektrofotometrická kvantifikace a čistota nukleových kyselin

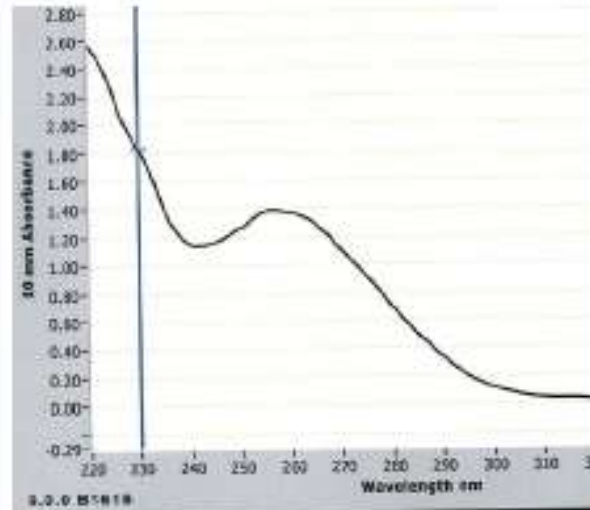
křivky z Nanodropu



260/280: 1,96

260/230: 1,75

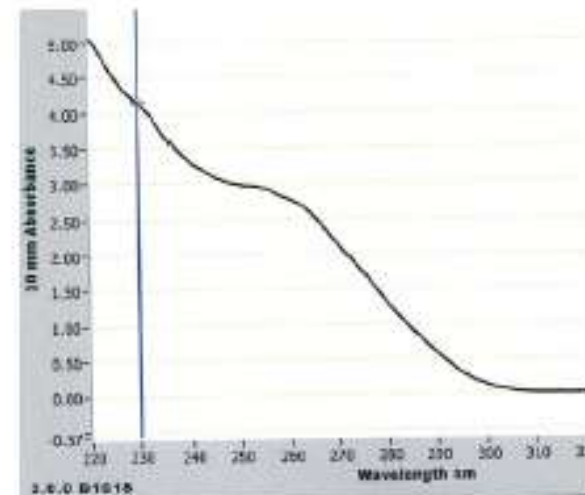
Conc: 394,4



260/280: 1,91

260/230: 0,75

Conc: 54,9

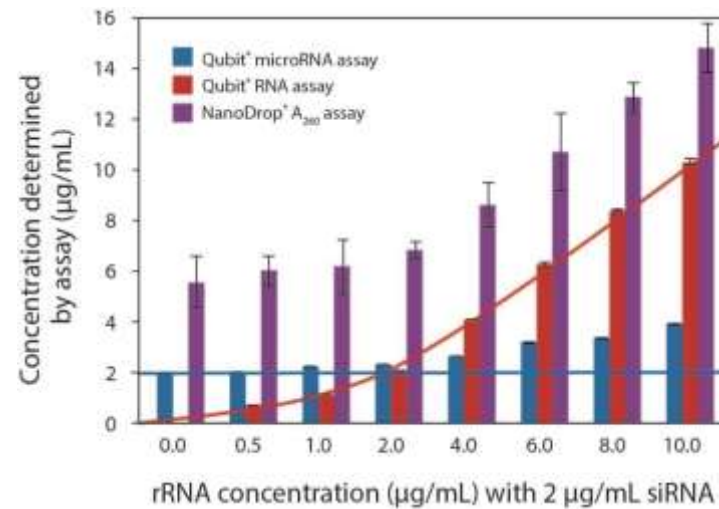
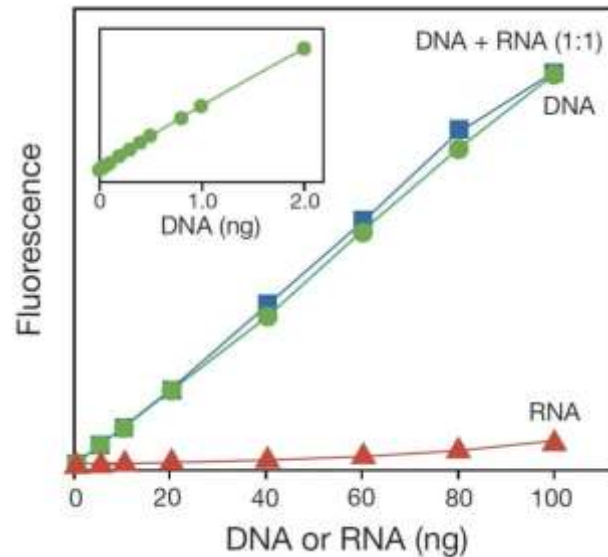
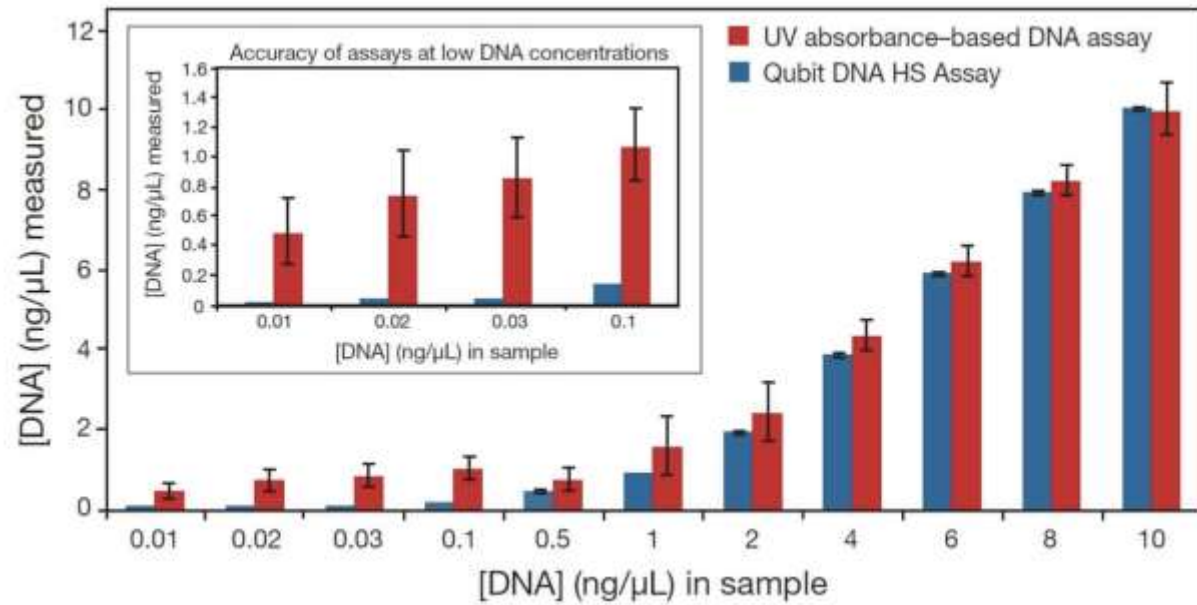


260/280: 2,09

260/230: 0,67

Conc: 111,4

# Fluorometrická kvantifikace nukleových kyselin

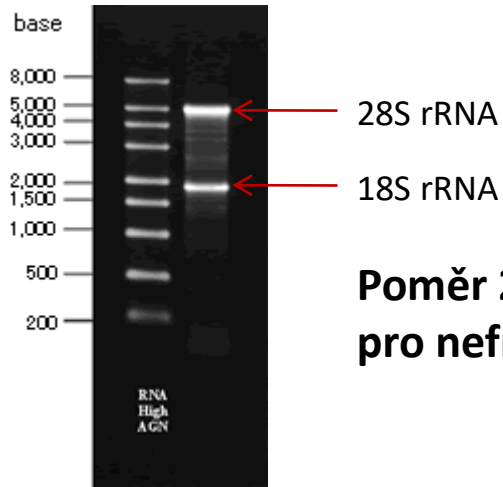


Nelze stanovit čistotu!

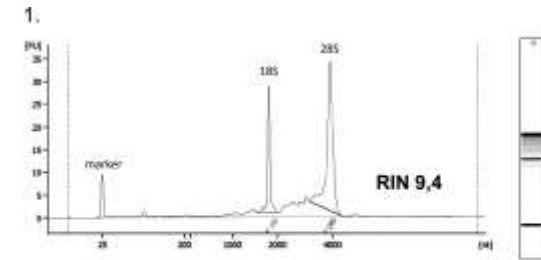
# Integrita nukleových kyselin

Agilent Bioanalyzer 2100  
Agilent TapeStation 2200

- miniaturizované zařízení implementující kapilární gelovou elektroforézu pro účely analýzy NK



Poměr 28S/18S ~ 2,0  
pro nefragmentovanou RNA

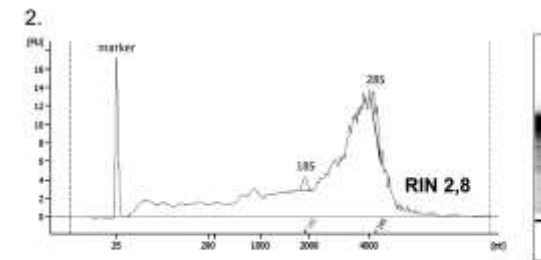


Overall Results for sample 1 : 889250

RNA Area	138,2	RNA Integrity Number (RIN)	9,4 (9,02-9,8)
RNA Concentration	189 ng/μl	RNA Flapping Color	Green
rRNA Ratio (28S / 18S)	2,1	RNA Flapping Label	RNA 0.08

Fragment table for sample 1 : 889250

Name	Start Size (nt)	End Size (nt)	Area	% of total Area
18S	1 534	2 028	25,1	18,2
28S	3 184	4 308	52,1	37,7



Overall Results for sample 1 : 889250

RNA Area	248,0	RNA Integrity Number (RIN)	2,8 (0,02-8,9)
RNA Concentration	213 ng/μl	RNA Flapping Color	Red
rRNA Ratio (28S / 18S)	2,8	RNA Flapping Label	RNA 2.00

Fragment table for sample 1 : 889250

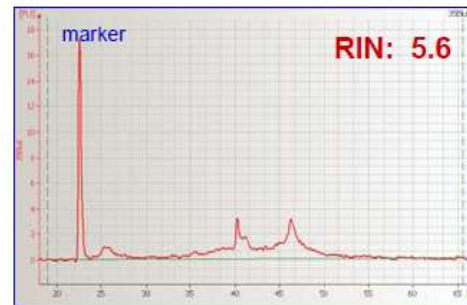
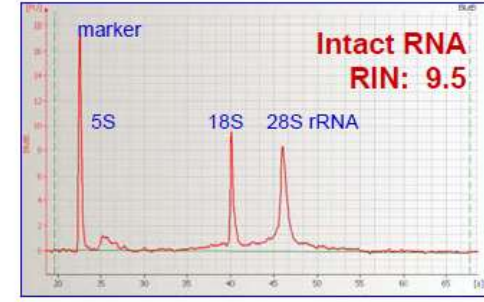
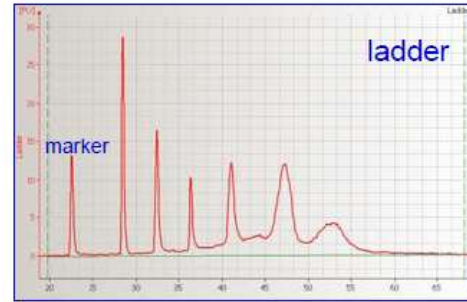
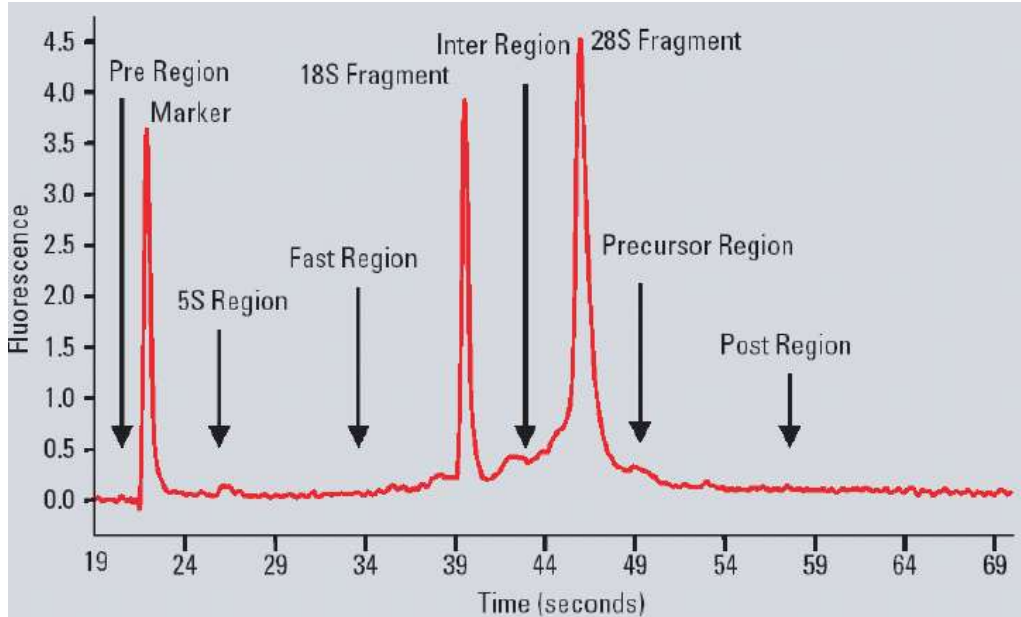
Name	Start Size (nt)	End Size (nt)	Area	% of total Area
18S	1 782	2 895	5,9	2,4
28S	4 185	4 915	3,7	1,5



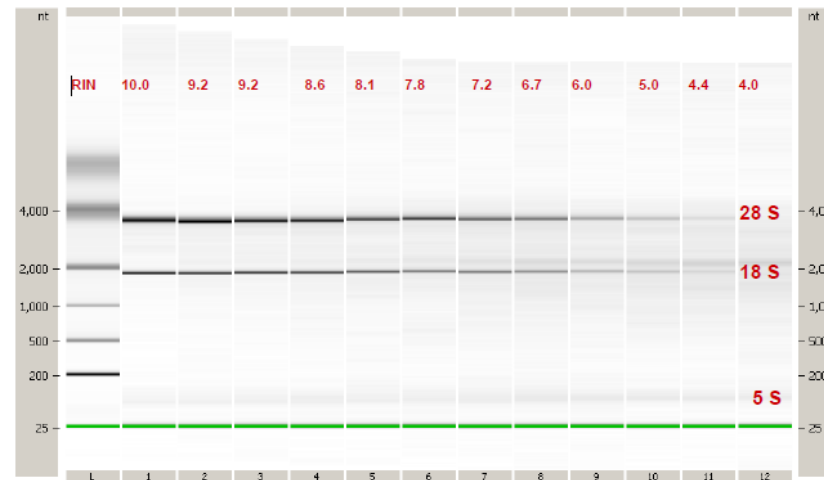
80% rRNA  
10-20% tRNA  
1-5% mRNA



# Integrita nukleových kyselin



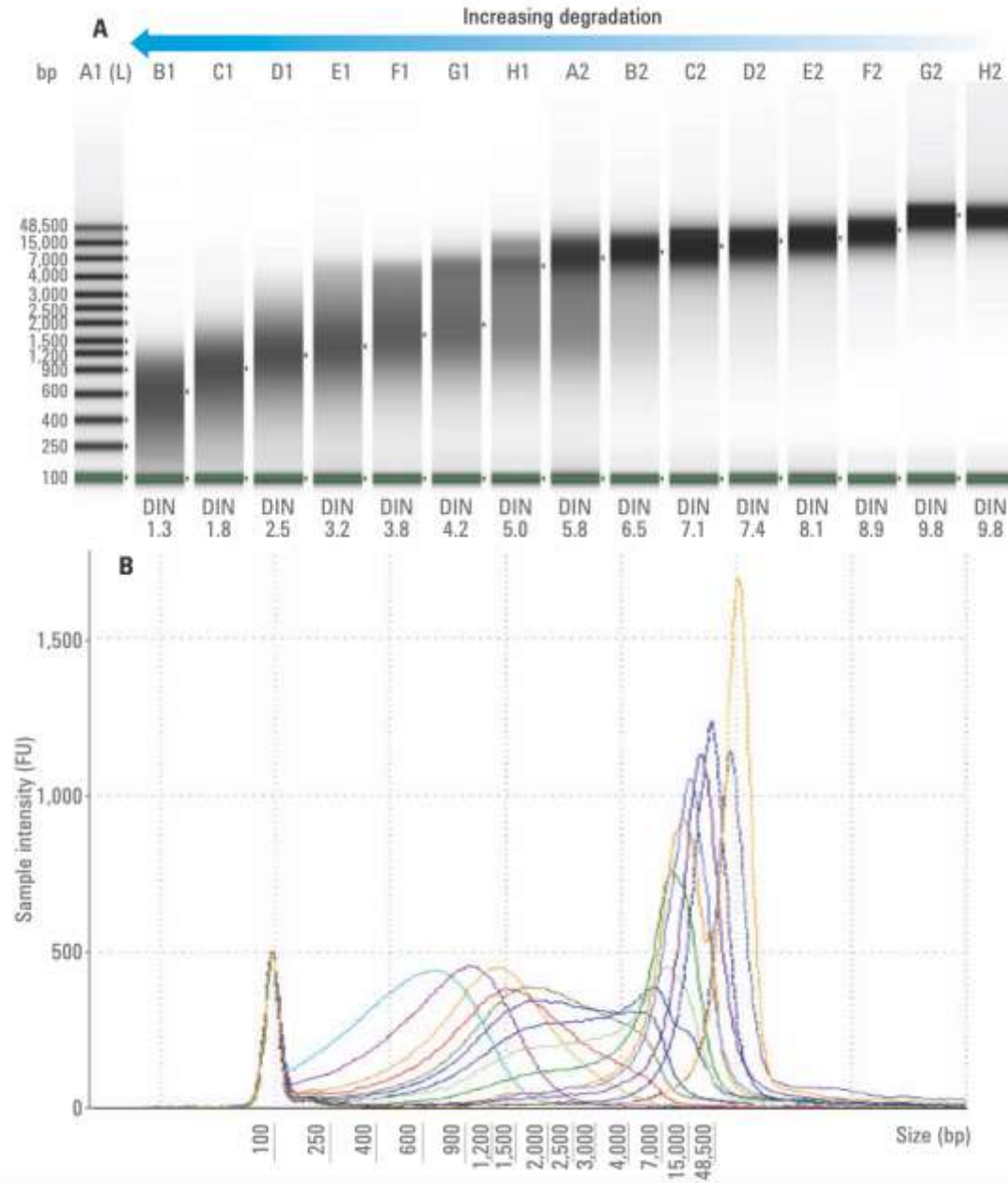
**RIN = RNA Integrity Number (0 – 10)**



The intensity of bands decreases with increasing degradation

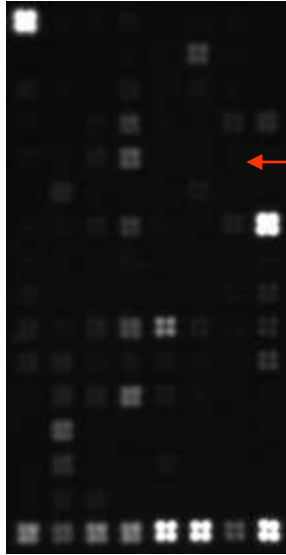
# Integrita nukleových kyselin

*DIN – DNA integrity number*

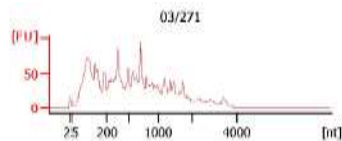
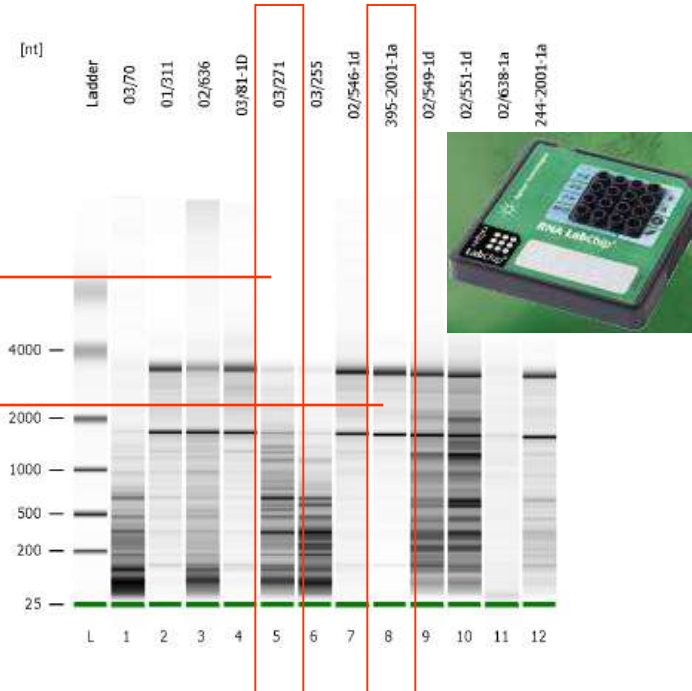
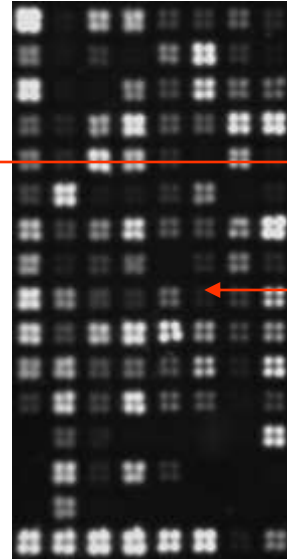


# Vliv integrity RNA na analýzu expresních profilů

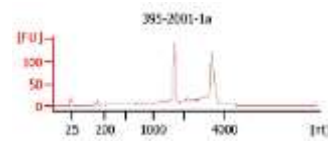
Vzorek č. 03/271  
RIN = 2,8



Vzorek č. 395-2001-1a  
RIN = 8,4



$c = 0,4412 \text{ ug/ul}$   
 $A_{260}/A_{280} = 1,93$   
 $A_{260}/A_{230} = 1,79$



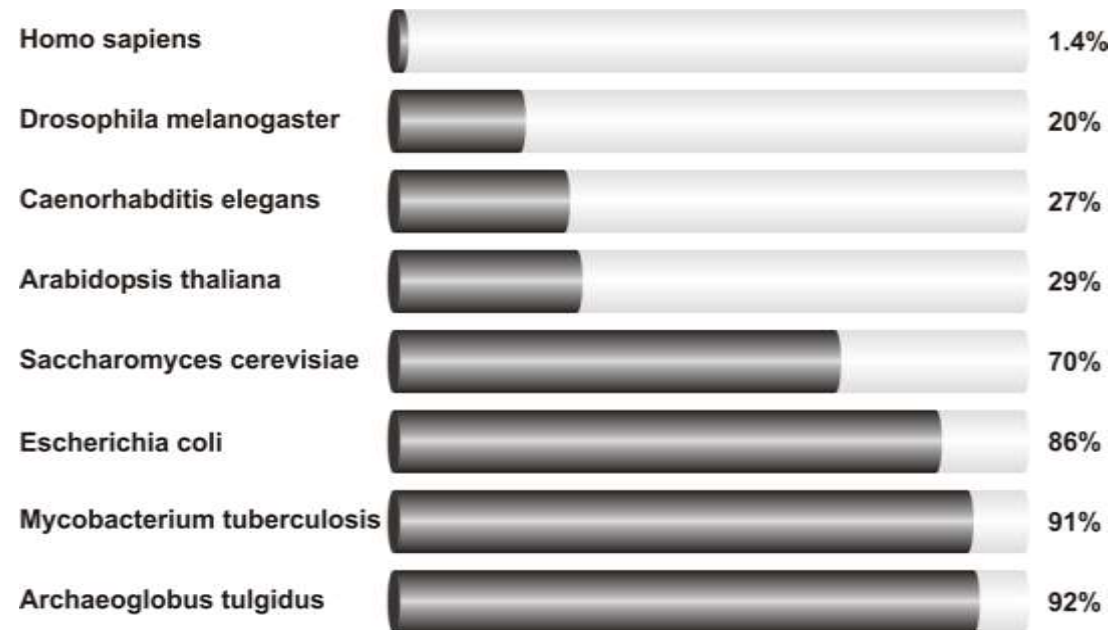
$c = 0,2412 \text{ ug/ul}$   
 $A_{260}/A_{280} = 2,03$   
 $A_{260}/A_{230} = 1,82$

**Jako minimální RIN vzorku  
byla stanovena hodnota 7.**

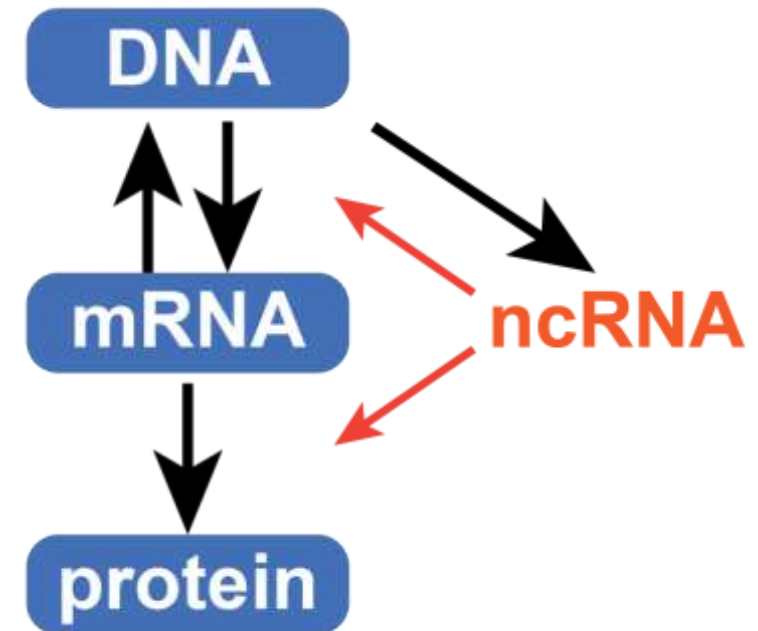
*RIN = RNA Integrity Number (0 – 10)*

# Nekódující RNA

- Protein-kódující geny zastupují 2 % genomu
- 90 % genomu je aktivně transkribováno
- S rostoucí komplexitou organismu narůstá podíl nekódujících RNA v jeho genomu

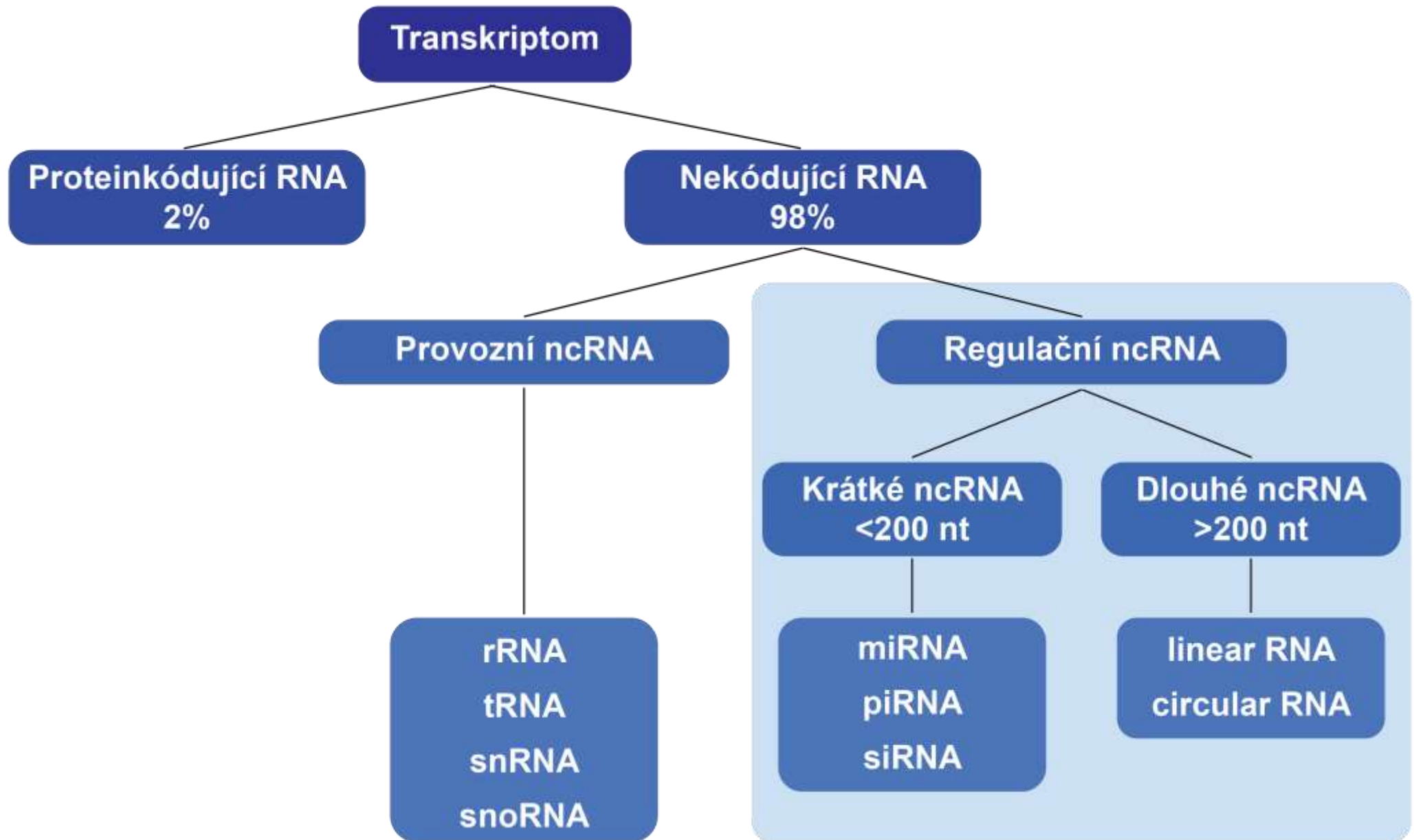


*Sana et al.; J Transl Med (2012)*

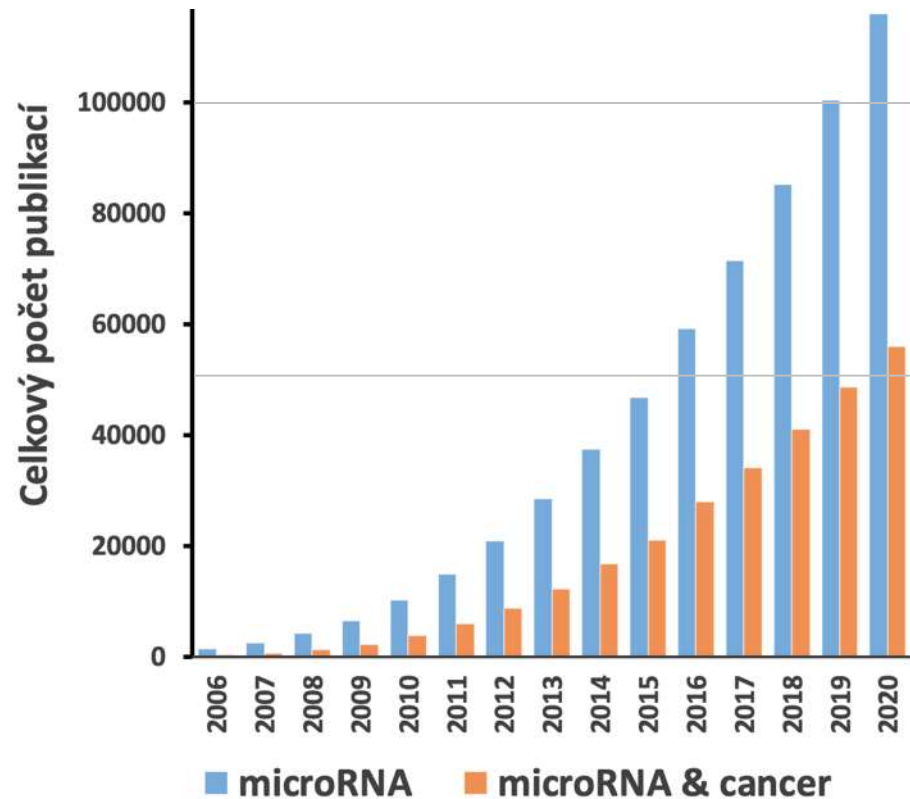




# Klasifikace RNA



# Nové třídy nekódujících regulačních RNA



Sana et al. *Journal of Translational Medicine* 2012, **10**:103  
<http://www.translational-medicine.com/content/10/1/103>



REVIEW

Open Access

## Novel classes of non-coding RNAs and cancer

Jiri Sana<sup>1,2</sup>, Petra Faltejškova<sup>1,2</sup>, Marek Svoboda<sup>1</sup> and Ondrej Slaby<sup>1,2,3\*</sup>

> 160-krát citována

Class	Symbol	Characteristic	Disease / biological function associations
<b>MicroRNAs</b>	miRNAs	18–25 nt; account 1–2% of the human genome; control the 50% of protein-coding genes; guide suppression of translation; Drosha and Dicer dependent small ncRNAs	initiation of various disorders including many, if not all, cancers / regulation of proliferation, differentiation, and apoptosis involved in human development
<b>Small interfering RNAs</b>	siRNAs	19–23 nt; made by Dicer processing; guide sequence specific degradation of target mRNA	great potential in diseases treatment / posttranscriptional gene silencing mainly through RISC degradation mechanism; defence against pathogenic nucleic acids
<b>Piwi-interacting RNAs</b>	piRNAs	26–30 nt; bind Piwi proteins; Dicer independent; exist in genome clusters; principally restricted to the germline and somatic cells bordering the germline	relationship between piRNAs and diseases has not yet been discovered / involved in germ cell development, stem self-renewal, and retrotransposon silencing
<b>Small nucleolar RNAs</b>	snoRNAs	60–300 nt; enriched in the nucleolus; in vertebrate are excised from pre-mRNA introns; bind snoRNP proteins	association with development of some cancers / important function in the maturation of other non-coding RNAs, above all, rRNAs and snRNAs; miRNA-like snoRNAs regulate mRNAs
<b>Promoter-associated small RNAs</b>	PASRs	20–200 nt; modified 5' (capped) ends; coincide with the transcriptional start sites of protein- and non-coding genes; made from transcription of short capped transcripts	relationship with diseases has not yet been discovered / involved in the regulation of the transcription of protein-coding genes by targeting epigenetic silencing complexes
<b>Transcription initiation RNAs</b>	tiRNAs	~ 18 nt ; have the highest density just downstream of transcriptional start sites; show patterns of positional conservation; preferentially located in GC-rich promoters	
<b>Centromere repeat associated small interacting RNAs</b>	crasiRNAs	34–42 nt; processed from long dsRNAs	relationship between crasiRNAs and diseases has not yet been discovered / involved in the recruitment of heterochromatin and/or centromeric proteins
<b>Telomere-specific small RNAs</b>	tel-sRNAs	~ 24 nt; Dicer independent; 2'-O-methylated at the 3' terminus; evolutionarily conserved from protozoa to mammals; have not been described in human up to now	relationship between tel-sRNAs and diseases has not yet been discovered / epigenetic regulation
<b>Pyknons</b>		subset of patterns of variable length; form mosaics in untranslated and protein-coding regions; more frequently in 3' UTR	expected association with cancer biology / possible link with posttranscriptional silencing of genes, mainly involved in cell communication, regulation of transcription, signaling, transport, etc.

Sana et al.; *J Transl Med* (2012)

**Gary Ruvkun & Victor Ambros**

**1993 Popis regulace genu lin-14 skrze RNA lin-4 u C. elegans**



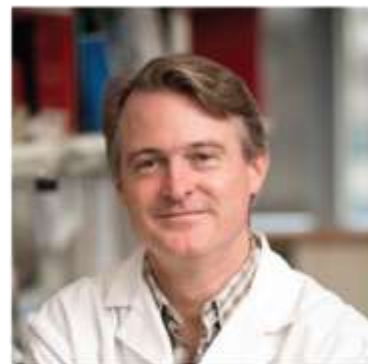
**Andrew Fire & Craig Mello**

**1998 Objev mechanismu RNA interference**



**Gary Ruvkun & Frank Slack**

**2000 Objev regulačního vztahu mezi let-7 a mRNA lin-41**



**Zamore, Tuschl, Sharp, Bartel**

**2000 RNAi: na ATP závislá degradace; 21-23 nt fragmenty**



**Gregory Hannon**

**2000 - 2001 Ago2, Dicer**



**Gyorgy Hutvagner & Philip Zamore**

**2002 Popis efektorové dráhy mikroRNA**

**Carlo Croce & George Calin**

**2002 Popis funkce miR-15/16 u CLL**

**Frank Slack**

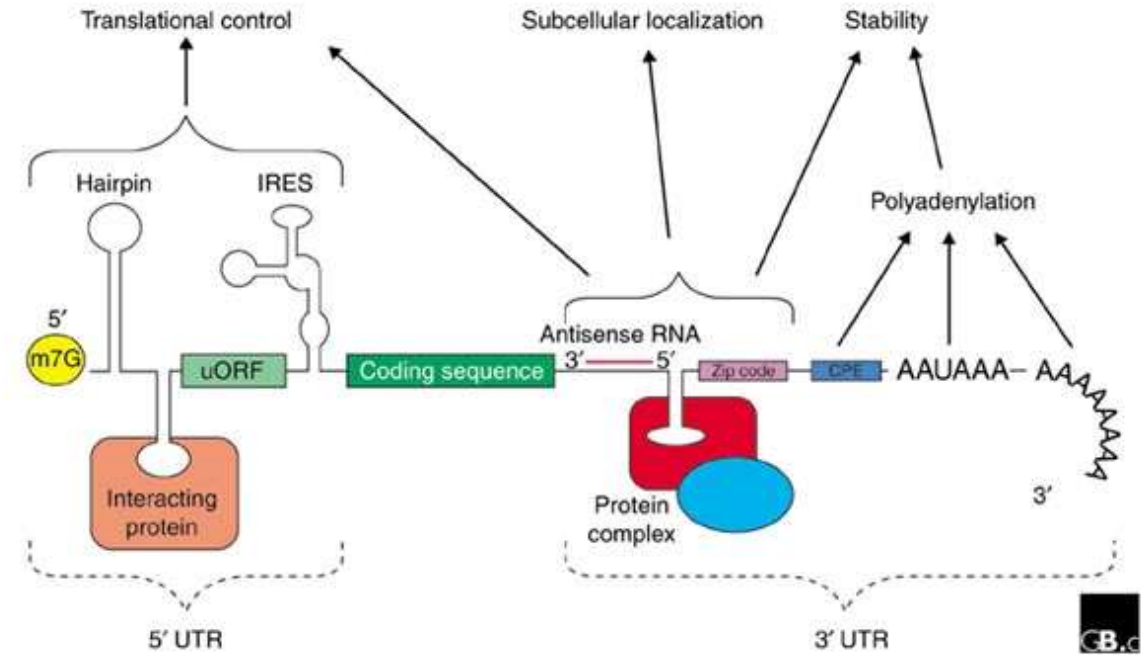
**2005**

**Asociace mezi let-7, onkogenem RAS a karcinomem plic**



# MikroRNA

- Jednořetězcové nekódující RNA molekuly (18 – 25 nt)
- Posttranskripční regulace genové exprese
- Jednotlivé miRNA mohou regulovat až stovky cílových genů
- Jeden gen může být regulován více miRNA
- Geny kódující **miRNA jsou často klastrovány** (klastr miR-17)
- Geny miRNA jsou lokalizovány v mezigenových oblastech, v intronových oblastech nebo antisense řetězcích známých genů
- Vysoce stabilní molekuly -> vhodné biologické markery
- Deregulace některých miRNA pozorována u mnoha nádorových onemocnění

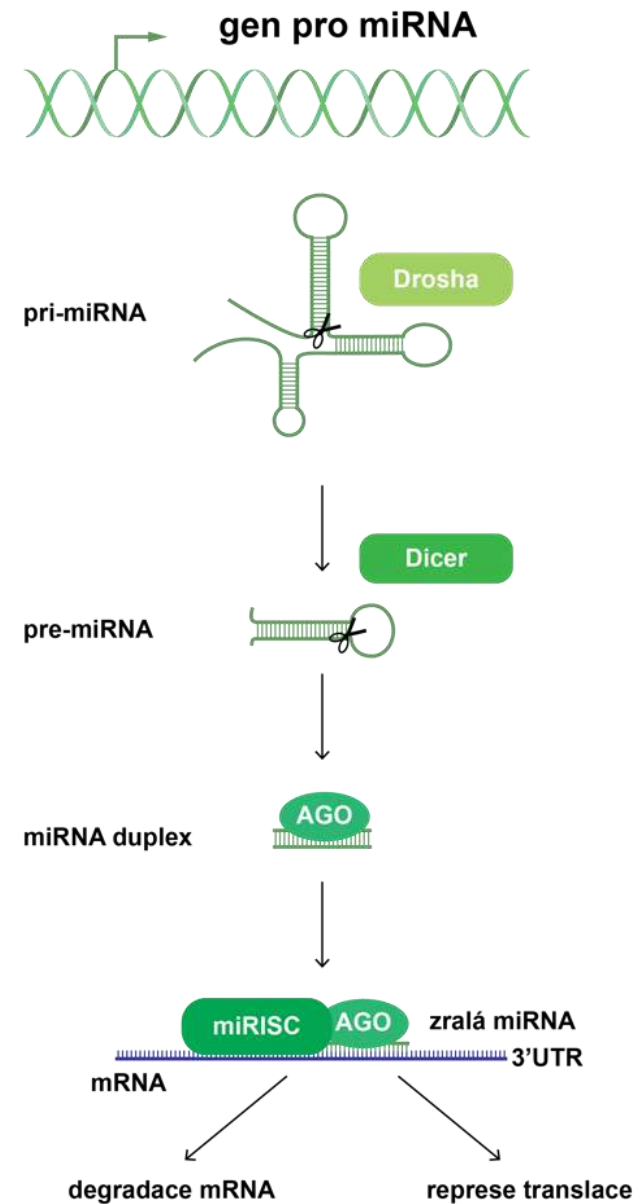
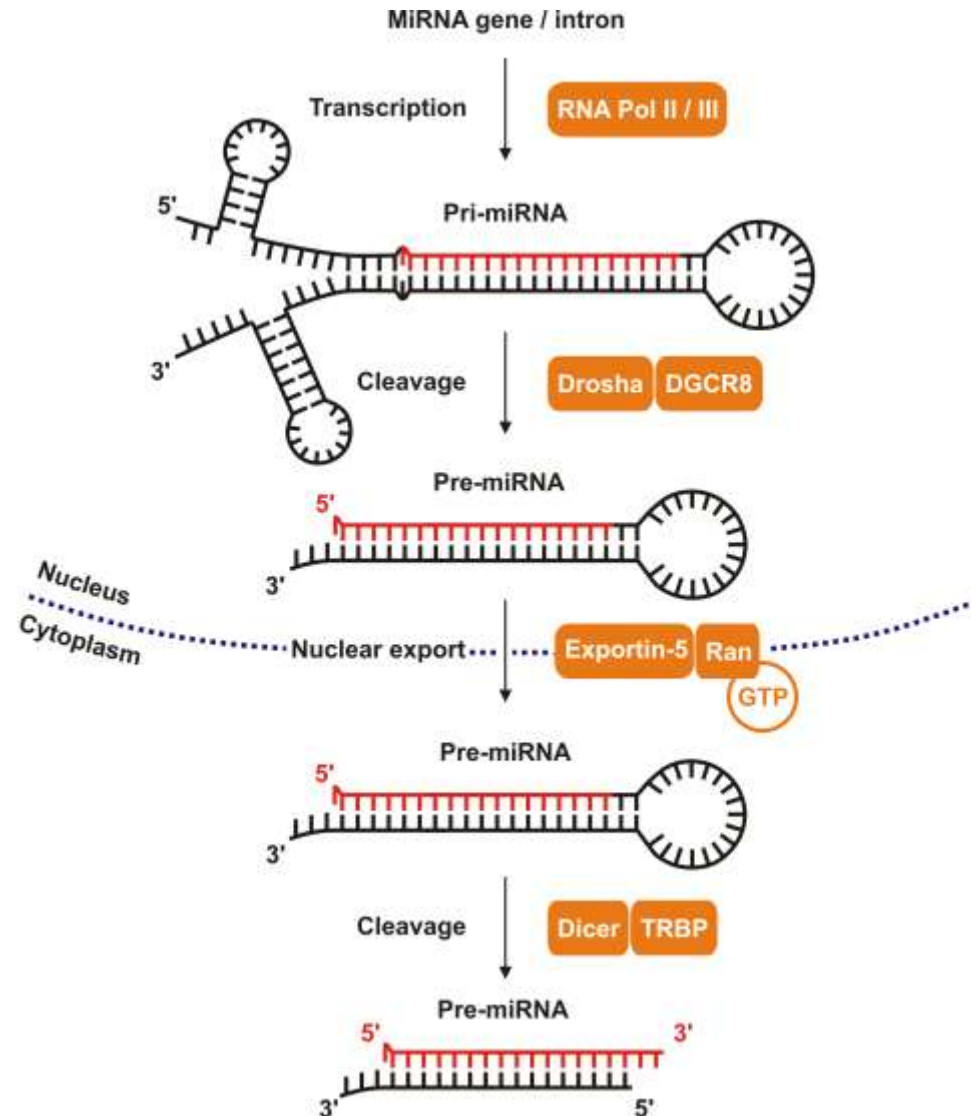


## miRNA rodiny

miRNA family members can be very similar eg let-7 family:

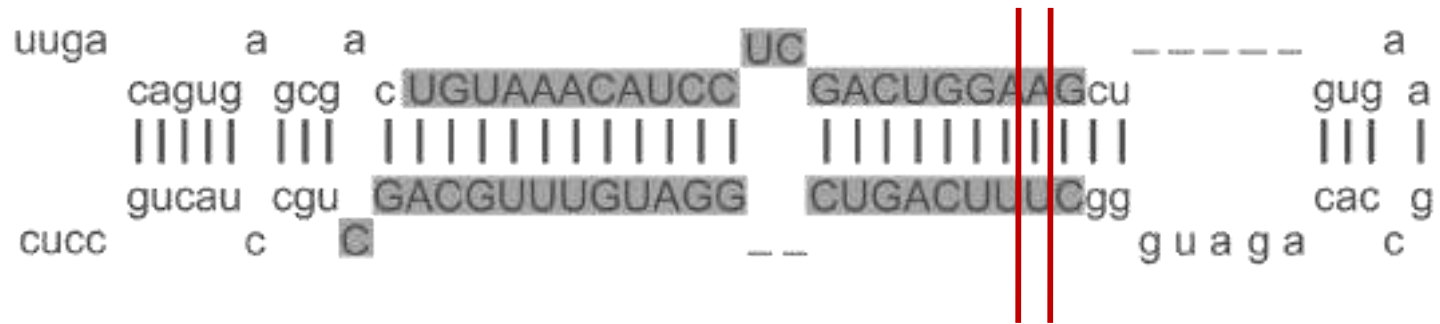
```
mmu-let-7a: UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU
mmu-let-7b: UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
mmu-let-7c: UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU
mmu-let-7d: AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU
mmu-let-7e: UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUU
mmu-let-7f: UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU
mmu-let-7g: UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU
mmu-let-7i: UGAGGUAGUAGUUUGUCUGUU
```

# MikroRNA - biogeneze



# IsomiRNA

„Zpracování prekurzorových struktur enzymy Drosha a Dicer není vždy identické..“

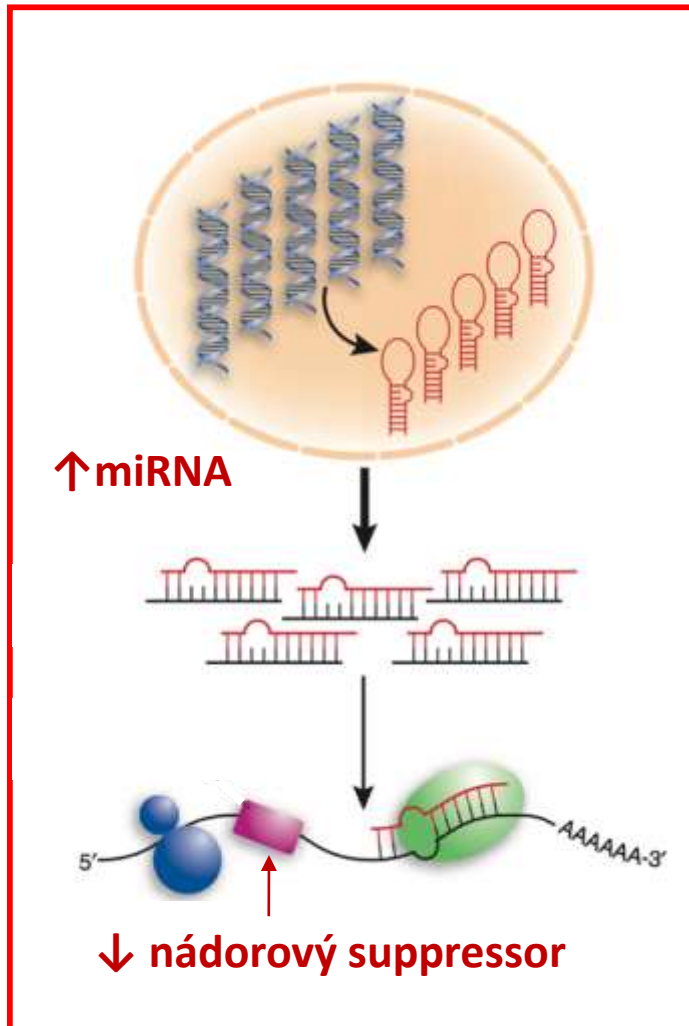


Nesprávné nasednutí enzymu – vznik sekvenčních variant respektujících prekurzor

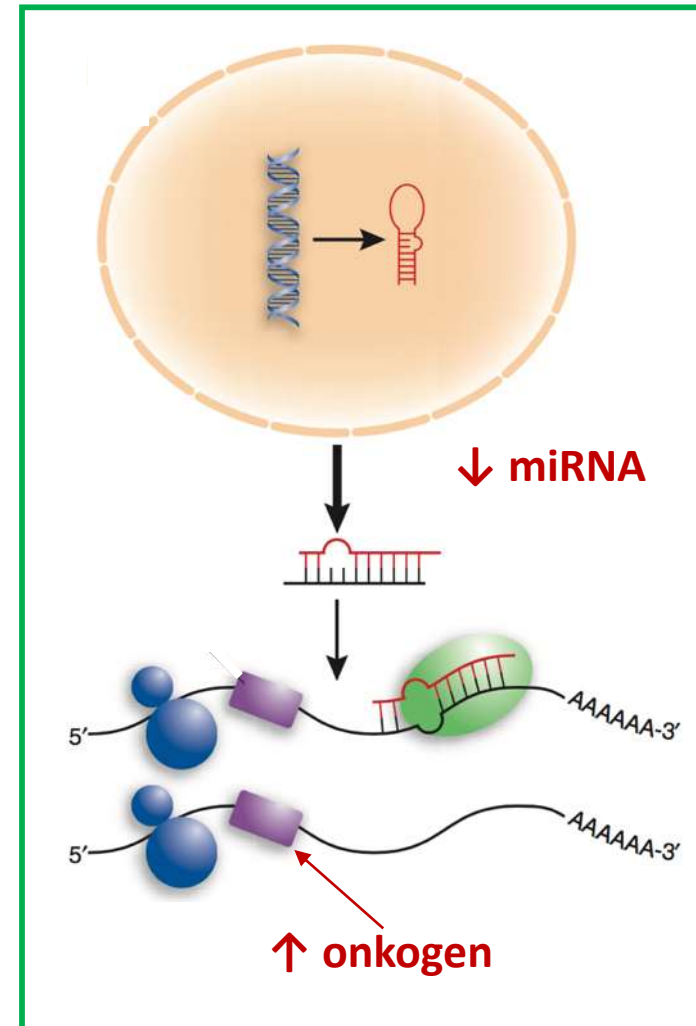
**miRNA izoformy, tzv. isomiRs**

# Onkogenní vs. nádorově supresorové miRNA

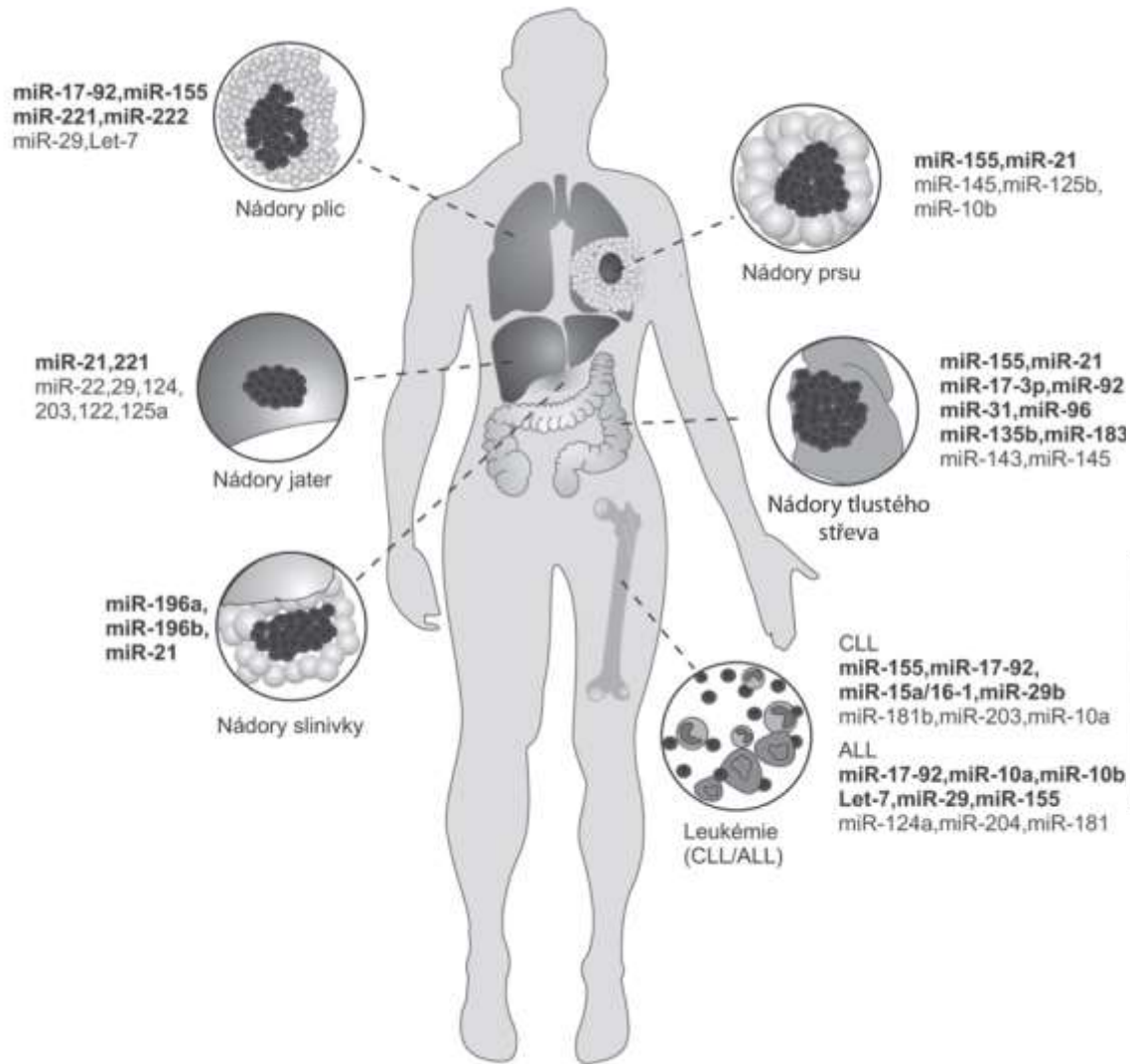
## ONKOGENNÍ MIKRORNA



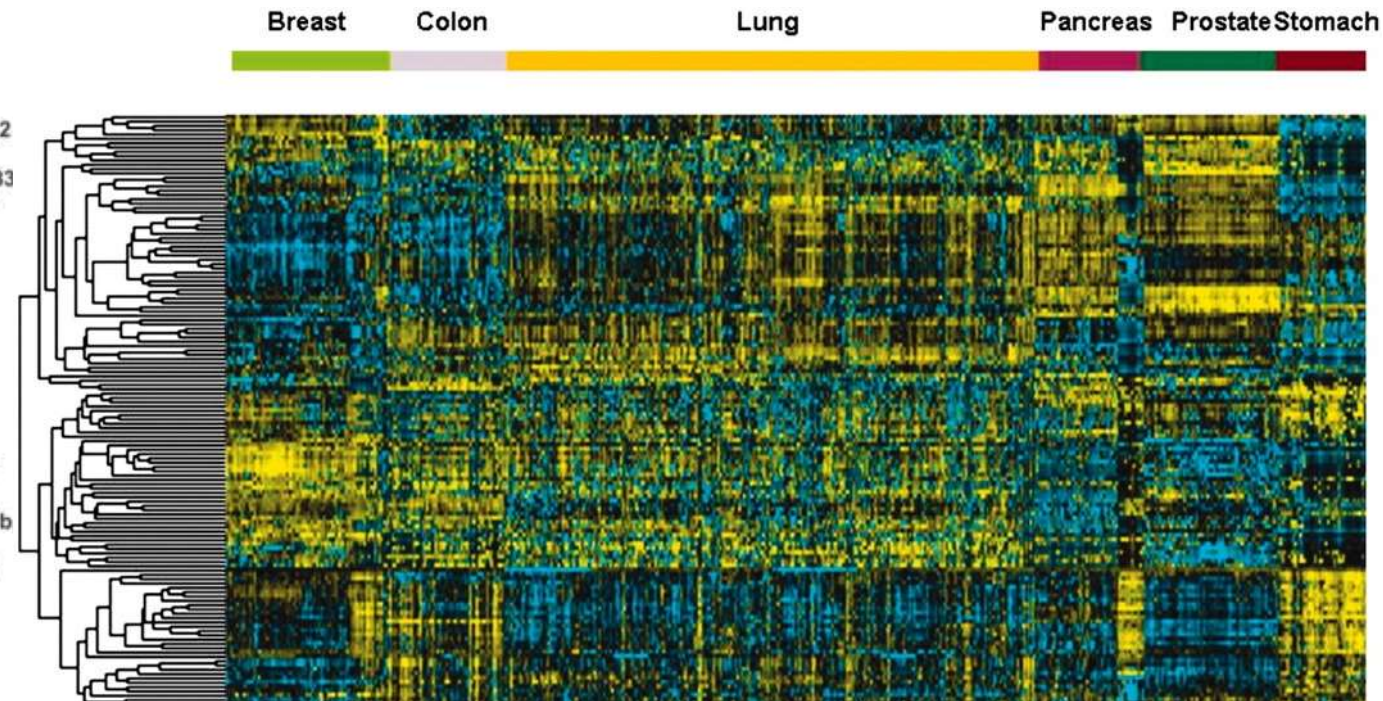
## NÁDOROVĚ SUPRESOROVÁ MIKRORNA



# mikroRNA jako nádorové biomarkery

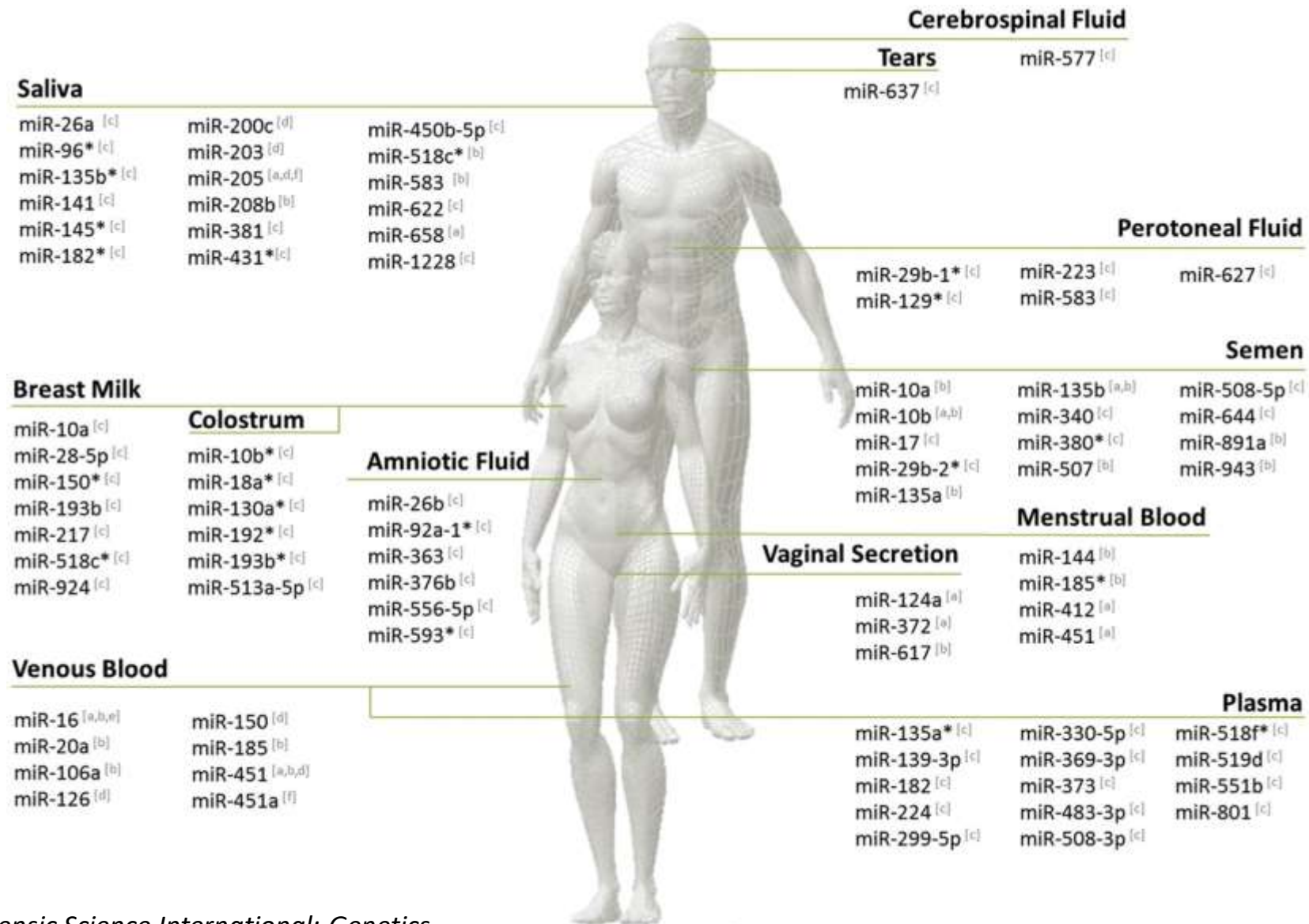


## Shluková analýza 540 vzorků z šesti typů nádorů založená na expresi 137 miRNA

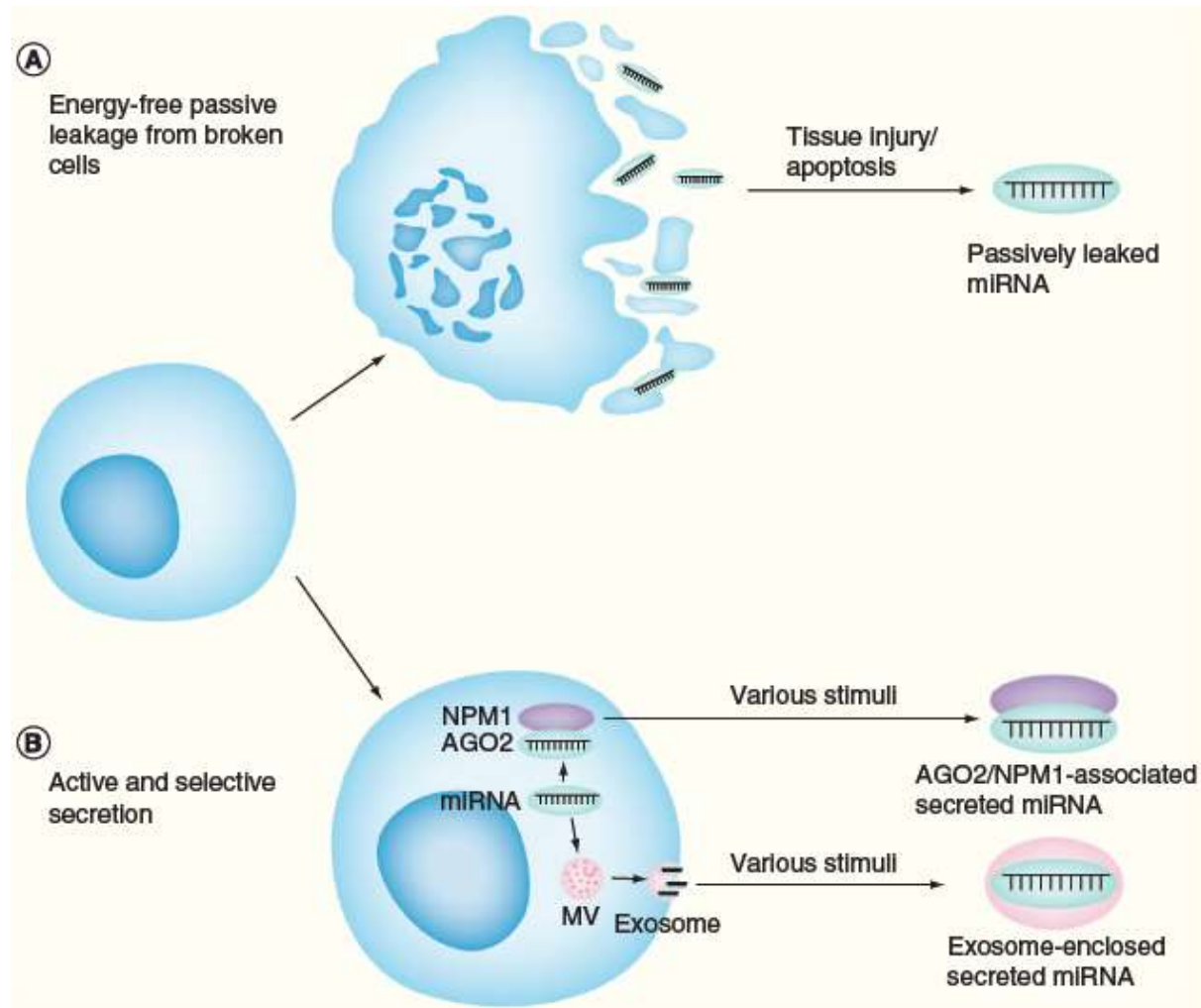




# mikroRNA v tělních tekutinách



# Původ cirkulujících mikroRNA



# Biotechnologické společnosti zaměřené na miRNA diagnostiku

Společnost	Produkt	miRNA	Typ onemocnění	Fáze vývoje
MiRXES	GASTROClear	Panel s 12 miRNA	Nádor žaludku	Dostupné
Interpace Diagnostics/Asuragen	ThyraMIR/ThyGENX	miR-29b-1-5p miR-31-5p miR-138-1-3p miR-139-5p miR-146b-5p miR-155 miR-204-5p miR-222-3p miR-375 miR-551b-3p	Nádory slinivky a štítné žlázy	Dostupné
Rosetta Genomics/Precision Therapeutics	miRview mets	Panel (neznámé)	Identifikuje původ nádoru	Dostupné
Genoptix	Reveal	Panel (neznámé)	Nádor štítné žlázy	Dostupné
TA miRNA	OsteomiR	Panel s 19 miRNA	Osteoporóza	Dostupné
	ThrombomiR	Panel s 11 miRNA	Kardiovaskulární onemocnění	Dostupné
Hummingbird Diagnostics	-	Panely (neznámé)	Nádory, srdce, mozek	Fáze I
DiamiR	CogniMIR	Panel (neznámé)	Alzheimer	Fáze I
	-	Panel (neznámé)	Onemocnění mozku	Fáze I
Mirnext	-	Panel s miR 423-5p	Srdeční selhání	Preklinická fáze
Quanterix/DestiNA Genomics	Simoa	miR-122	Jaterní toxicita	Preklinická fáze

# mikroRNA jako terapeutické cíle

Výrobce	Název léčiva	Účinná látka	Cílové onemocnění	Klinická fáze	Status
Santaris Pharma/Roche	Miravirsen	AntimiR-122	Hepatitida C	Fáze II	dokončeno
	RG-101	AntimiR-122	Chronická hepatitida C	Fáze II	dokončeno
Regulus Therapeutics	RG-125	AntimiR-103/107	Nealkoholická steatohepatitida	Fáze I	probíhá
	RG-012 Lademirsen	AntimiR-21	Dědičná nefritida	Fáze II	probíhá
	RGLS4326	AntimiR-17	Autozomálně dominantní polycystické onemocnění ledvin	Fáze I	probíhá
miRagen Therapeutics	MRG-106	AntimiR-155	Kožní T-buněčný lymfom, mykóza fungoides	Fáze II	probíhá
	MRG-110	AntimiR-92	Poranění	Fáze I	dokončeno
	MRG-201	miR-29 mimic	Keloidní jizvy / Scleroderma	Fáze II	probíhá
EnGeneIC	TargomiRs	miR-16 mimic	Maligní mezoteliom pleury; nemalobuněčný karcinom plic	Fáze I	dokončeno
Mirna Therapeutics Inc.	MRX-34	miR-34 mimic	Různé solidní nádory	Fáze I	ukončeno

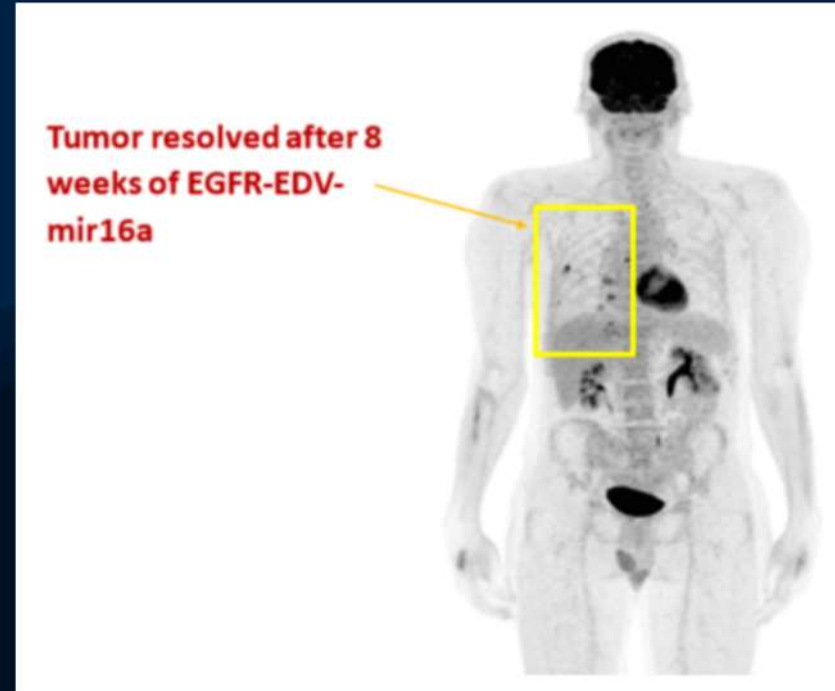
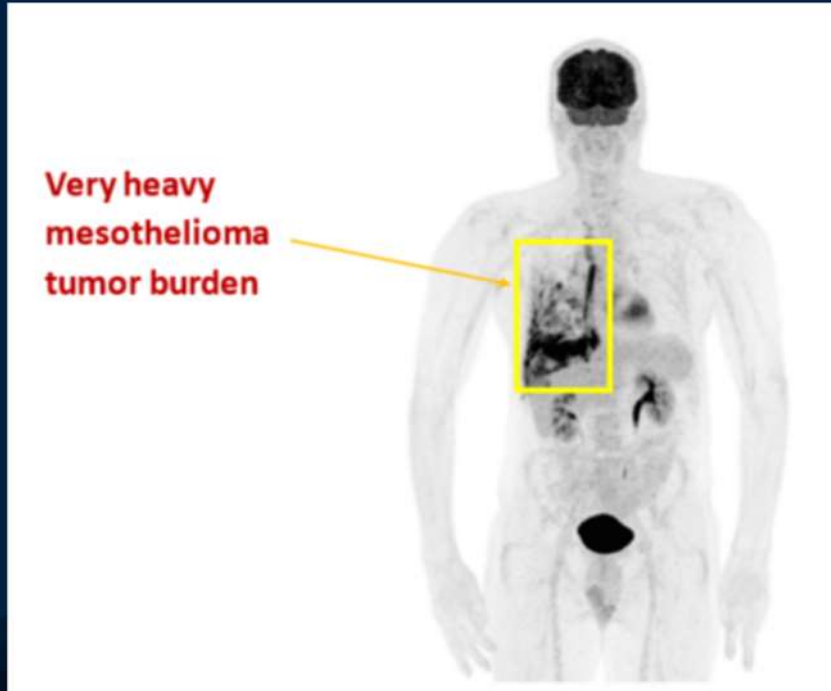
ENGEN

# Not just a chemotherapeutic payload but delivering functional nucleic acids too

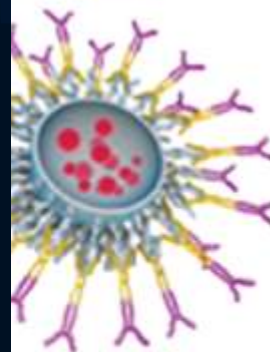
- A Phase I trial in patients with end-stage mesothelioma and who had failed standard therapies was conducted with EGFR-EDVs loaded with a microRNA 16a. The mir15/16 family is associated with unsuppressed cell growth when it is lost in malignant mesothelioma
- Despite this trial being a safety trial, those patients who completed at least one cycle of EGFR-EDV-mir16a (16 out of 22 patients) showed a clinical response and median survival was much longer than expected in this group of patients at 41 weeks post commencement of EDV treatment (*Kao et al., American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 191(12): 1467-1469 (2015); Van Zandwijk et al, Lancet Oncology (2017)*)

TargomiR

- EGFR
- u MPM
- miR-1



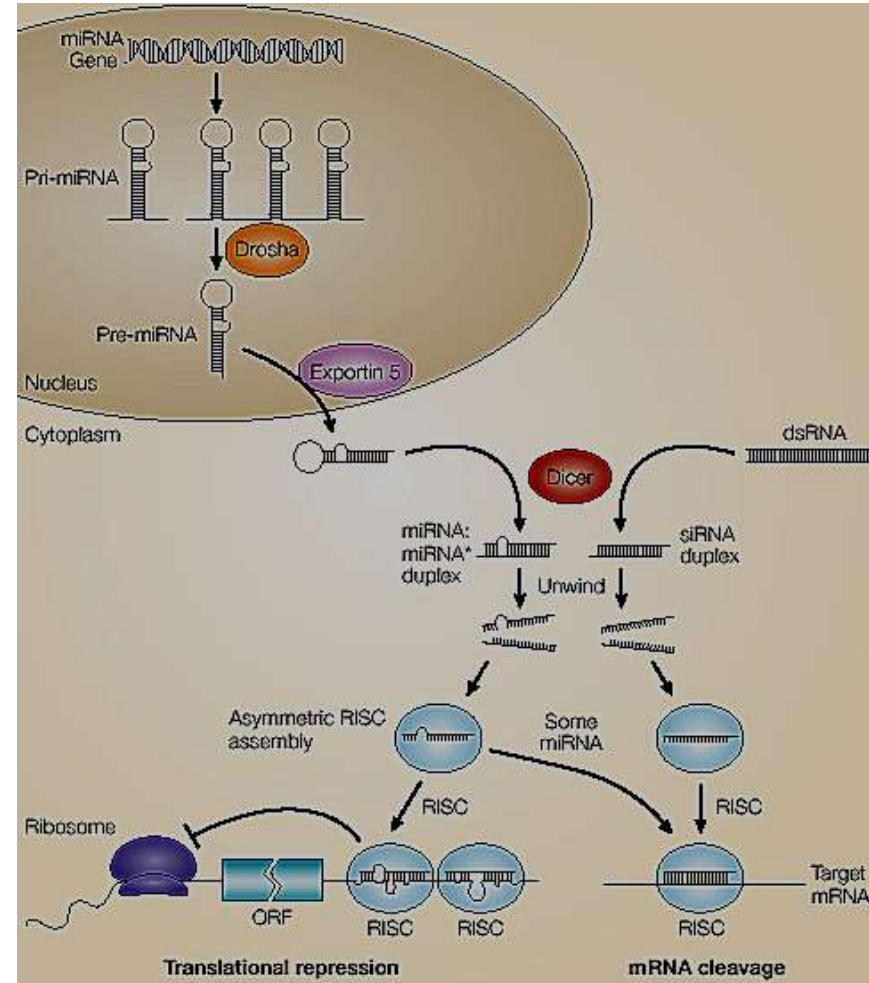
zaná na EGFR  
ádorové buňky



navázanými  
ými protilátkami

# Jaký je rozdíl mezi miRNA a siRNA?

- Funkce obou je regulace exprese
- siRNA je původem dsRNA
- siRNA souvisí s cizorodou RNA (obvykle virovou) a je 100% komplementární
- miRNA je původně ssRNA, která formuje vlásenkové dsRNA struktury
- miRNA reguluje post-transkripční genovou expresi



# Základní metodické přístupy analýzy nukleových kyselin

## **Typ technologie**

Amplifikační

Hybridizační

Sekvenační

## **Hlavní princip**

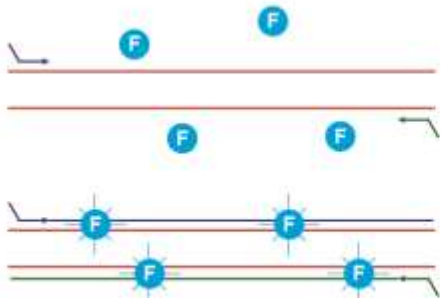
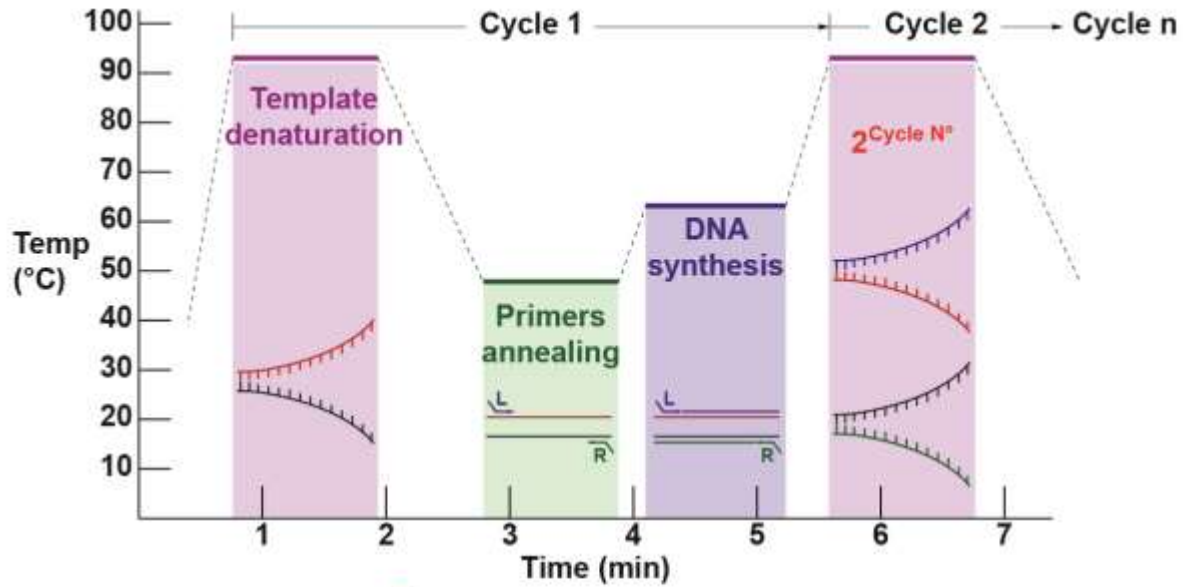
Kvantitativní PCR

DNA hybridizace

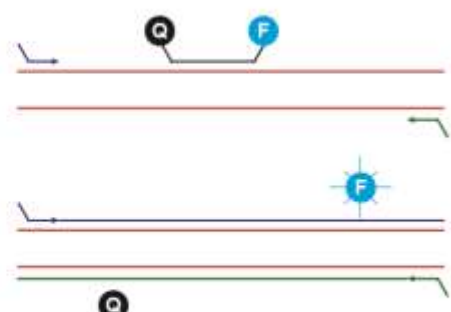
Sekvenování

# Real-Time PCR

*nejpoužívanější a nejstandardnější metoda studia genové exprese*

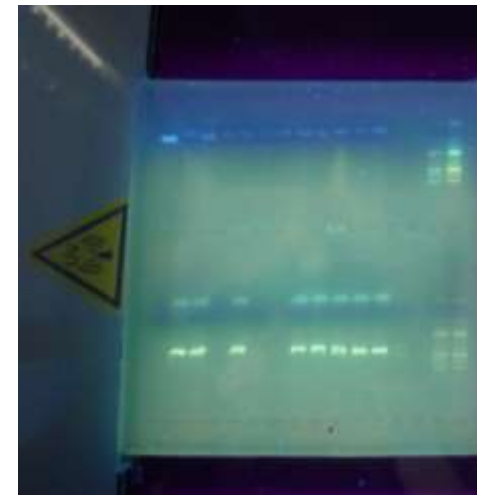
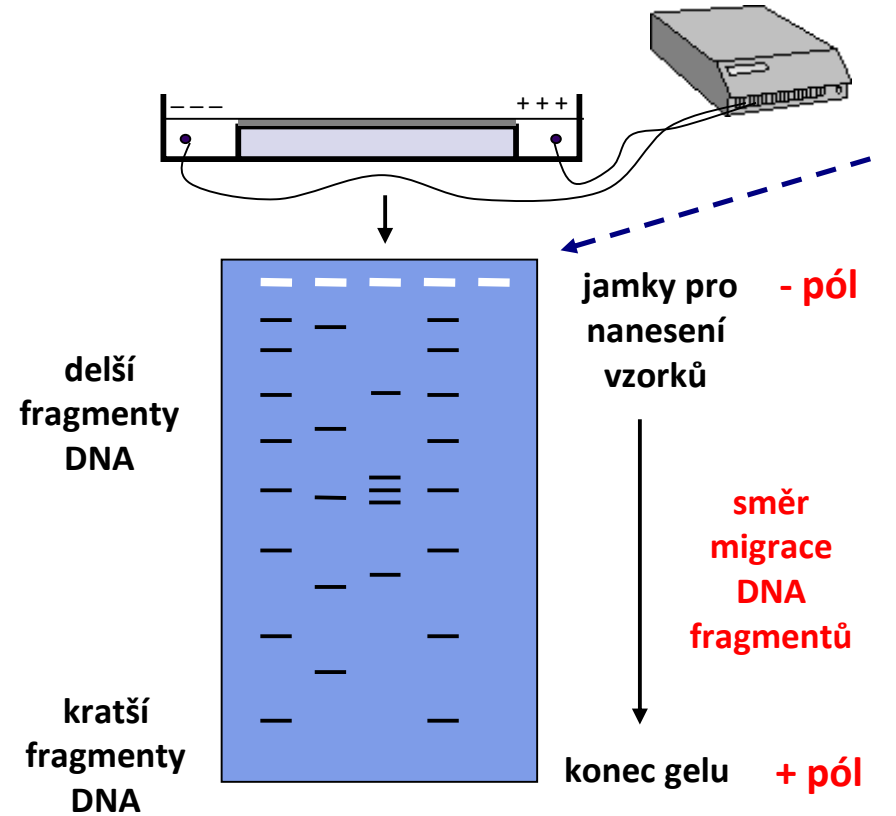


Non-specific intercalation of fluorescent dye (e.g. SYBR green) into dsDNA



The probe is disrupted by the 5' exonuclease activity of Taq polymerase -> The fluorescent dye moves away from the quencher and emits a signal.

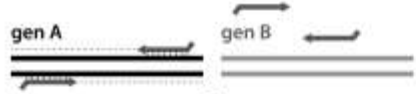
**vs. end-point PCR**





# Real-Time PCR – způsoby detekce

správně navržené primery jsou komplementární pouze k jediné sekvenci



důsledkem je vznik pouze jediného produktu, do kterého je inkorporováno fluorescenční barvivo



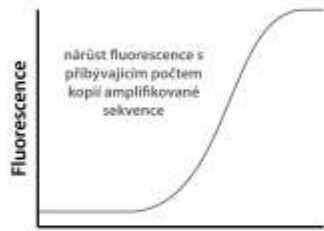
špatně navržené primery jsou komplementární k více sekvencím



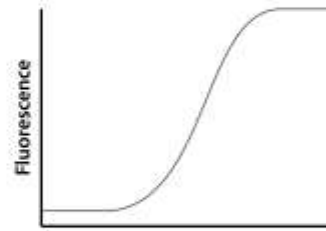
důsledkem je vznik více produktů, do kterých je inkorporováno fluorescenční barvivo



na amplifikační křivce, jež je grafickým výstupem real-time PCR, nelze přítomnost více produktů v jedné reakci rozeznat

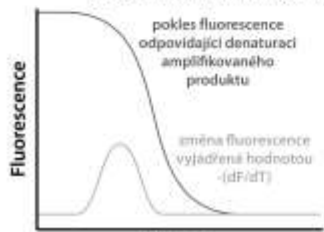


Cyklus

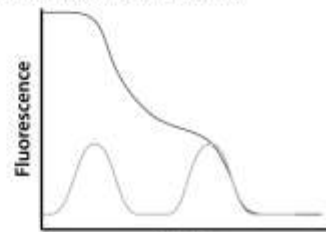


Cyklus

množství různých produktů v jedné reakci lze však rozeznat pomocí disociační analýzy, jež je založena na různých teplotách tání ( $T_m$ ) u odlišných dsDNA sekvencí



Teplota

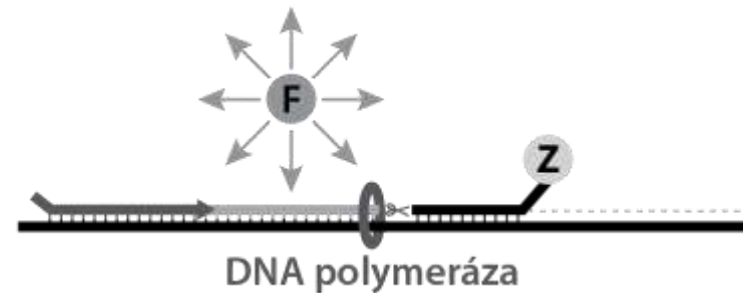


Teplota

zhášec (Z) vázaný společně s fluorescenční značkou (F) na sondě pohlcuje záření touto značkou emitované

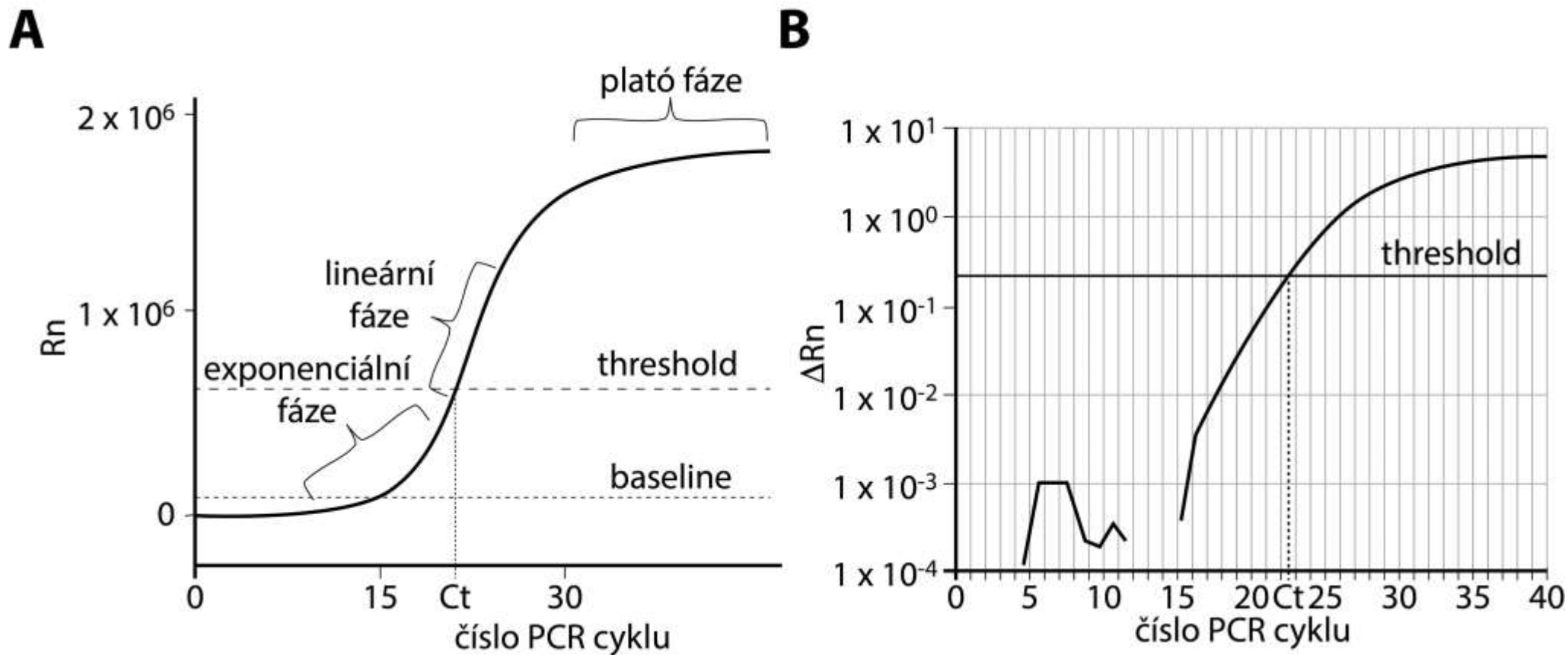


exonukleázová aktivita DNA polymerázy uvolní fluorescenční značku (F) ze sondy specificky hybridizované k cDNA templátu



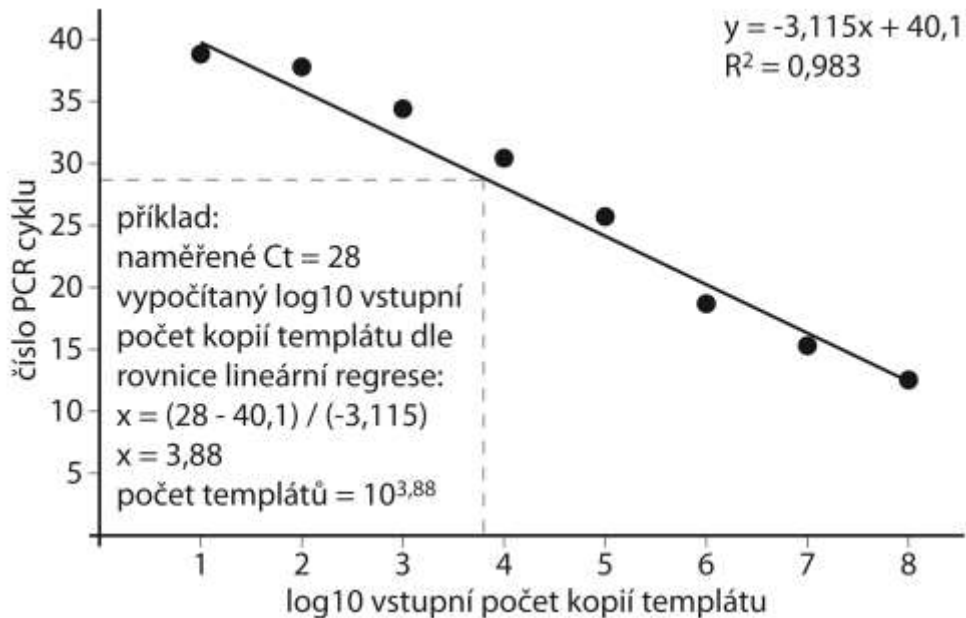
# Real-Time PCR

*nejpoužívanější a nejstandardnější metoda studia genové exprese*



# Real-Time PCR

## absolutní vs. relativní kvantifikace



## Reference – obvykle nějaký housekeepingové geny

jsou aktivní ve všech buňkách zajišťují základní funkce buněčného metabolismu:

syntéza nukleových kyselin a proteosyntéza, transport živin a jejich zpracování, biosyntéza cytoskeletu a organel (GAPDH, HPRT1, ACTB, B2M,....)

**A)** Výpočet relativní exprese konkrétního genu (a) pomocí normalizace jeho expresní hladiny na expresní hladinu referenčního genu (ref).  
 $Ct_a = 24,38$ ;  $Ct_{ref} = 25,32$ .

$$2^{-\Delta Ct} = 2^{-(Ct_a - Ct_{ref})}$$

$$2^{-(24,38 - 25,32)} = \underline{1,92}$$

Exprese genu a je 1,92krát vyšší než exprese referenčního genu.

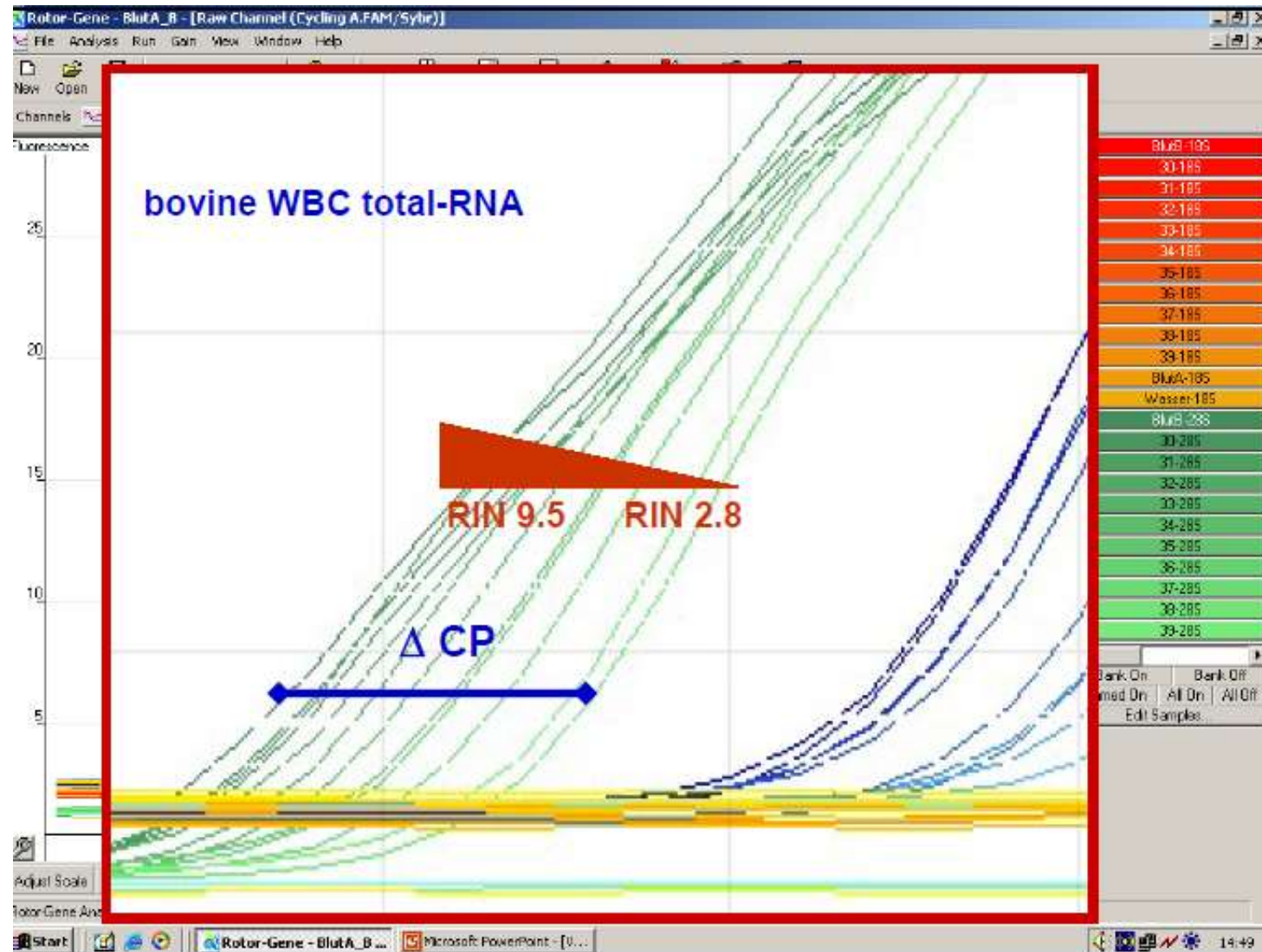
**B)** Výpočet násobného zvýšení exprese konkrétního genu (a) normalizovaného na referenční gen (ref) u zkoumaného vzorku (Z) na stejným způsobem normalizovanou hladinu téhož genu u kontrolního vzorku (K).  $Ct_{aZ} = 24,38$ ;  $Ct_{aK} = 26,98$ ;  $Ct_{refZ} = 25,32$ ;  $Ct_{refK} = 25,49$ .

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(Ct_{aZ} - Ct_{refZ}) - (Ct_{aK} - Ct_{refK})}$$

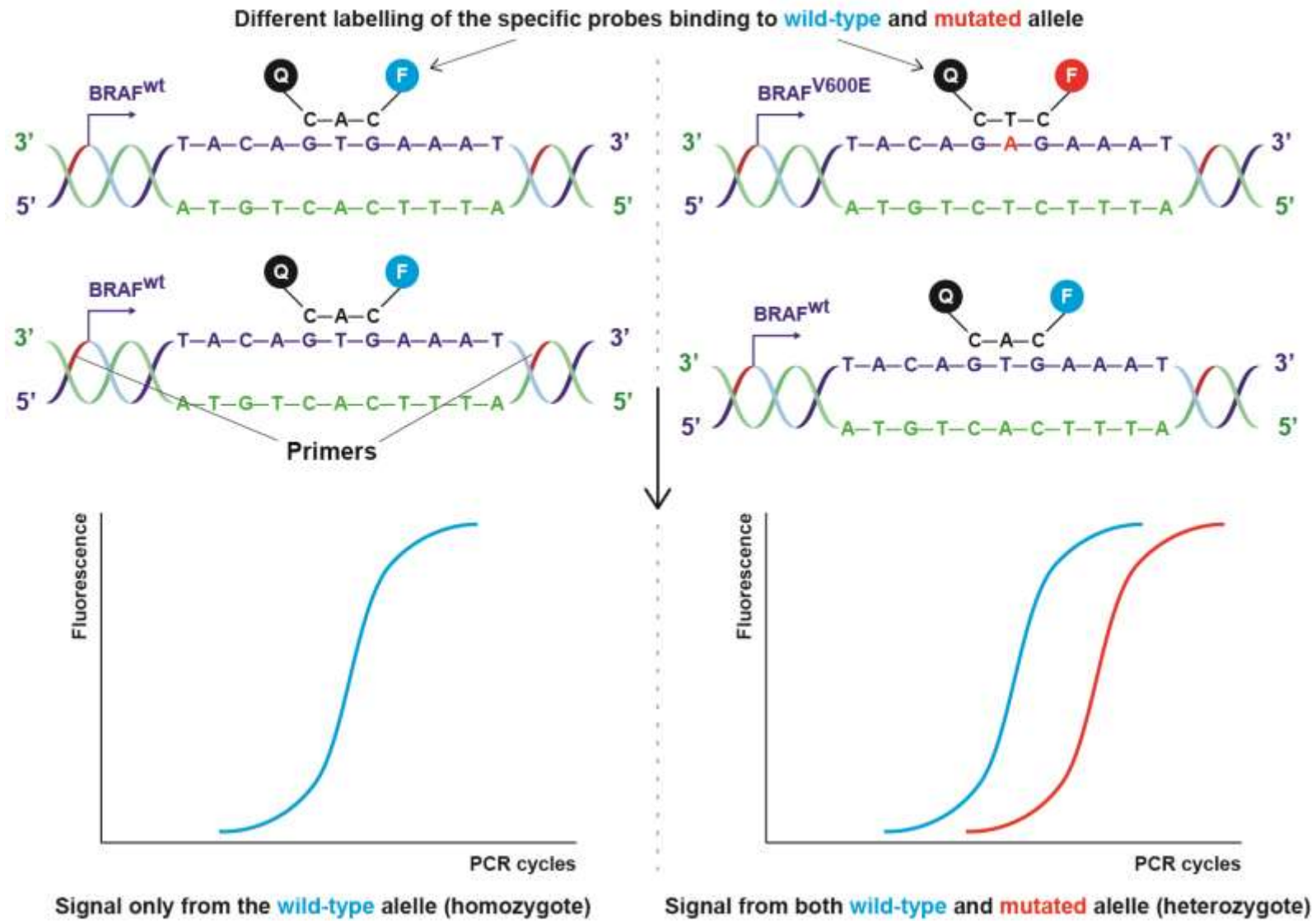
$$2^{-(24,38 - 25,32) - (26,98 - 25,49)} = 2^{-(-2,43)} = \underline{5,39}$$

Normalizovaná exprese genu a ve zkoumaném vzorku Z je 5,39krát vyšší než stejným způsobem normalizovaná exprese téhož genu v kontrolním vzorku K.

# Vztah integrity RNA a Ct prahového cyklu



# Real-Time PCR specifická pro konkrétní mutace



# Analýza mutací v genu EGFR pomocí Real-Time PCR



Exon	Mutations detected	Mutation report call
18	G719A, G719C, G719S	G719X
19	29 deletions	Exon 19 deletion
20	T790M S768I 5 insertions	T790M S768I Exon 20 insertion
21	L858R (2 variants*)	L858R

EGFR, epidermal growth factor receptor; PCR, polymerase chain reaction.  
\*2573 T > G; 2573\_2574TG > GT.

**cobas® 4800**

**cobas EGFR Plasma P1 Test Report**

Start of run:	26-May-2020 10:51:36	MWP ID:	LD3692114
System:	c4C200338M0R	cDNA Sample Prep Kit-ID #1:	AD3F130379K001H
Serial No.:	2 400 54048	Lot / Exp. Date:	F13637 / Nov-2020
Test version:	1.0.1	EGFR Mut. Test v2 Kit-ID #1:	IA1F1285AK0000
Operator:	Labmanager	Lot / Exp. Date:	F12853 / Nov-2020
Printed By:	Labmanager		

**Run name** 200628-EGFR HS 26-MAY-2020 10:51

**Test status:** VALID

**Controls**

Position	Sample ID	KI	Control Type	Result	Flags	Accepted by
AD1/AD2/AD3	IA1F1285AK0000	1	Mutant Control	Valid		Labmanager
B01/B02/B03	IA1F1285AK0000	1	Negative Control	Valid		Labmanager

**Specimens**

Position	Sample ID	KI	Result 1	Result 2	Result 3	Flags	Accepted by
C01/C02/C03	AD 59	1	Mutation Detected	Ex19Del: 17928	Ex19Del: 14.64 T790M: 0.99		Labmanager

**Comments:**

Operator: \_\_\_\_\_ Date: \_\_\_\_\_ Signature: \_\_\_\_\_

Reviewer: \_\_\_\_\_ Date: \_\_\_\_\_ Signature: \_\_\_\_\_

**cobas® 4800**

**cobas EGFR Plasma P1 Test Report**

Start of run:	27-Aug-2020 13:01:06	MWP ID:	WD3394038
System:	c4C200338M0R	cDNA Sample Prep Kit-ID #1:	AD3F29630AK0089V
Serial No.:	2 400 54048	Lot / Exp. Date:	F29630 / Nov-2020
Test version:	1.0.1	EGFR Mut. Test v2 Kit-ID #1:	IA1F25697AL003B
Operator:	Labmanager	Lot / Exp. Date:	F25697 / Sep-2021
Printed By:	Labmanager		

**Run name** 200827-EGFR-plazma-AK 27-AUG-2020 13:01

**Test status:** VALID

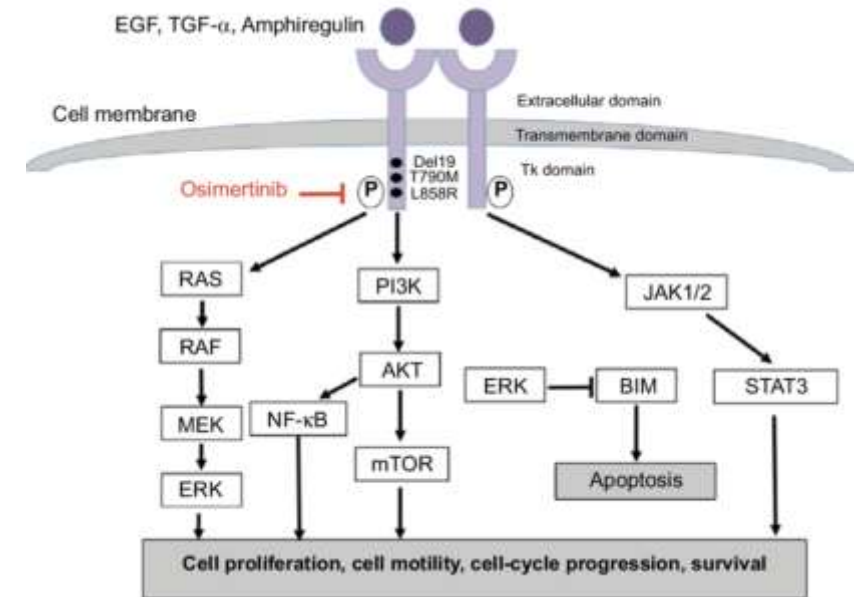
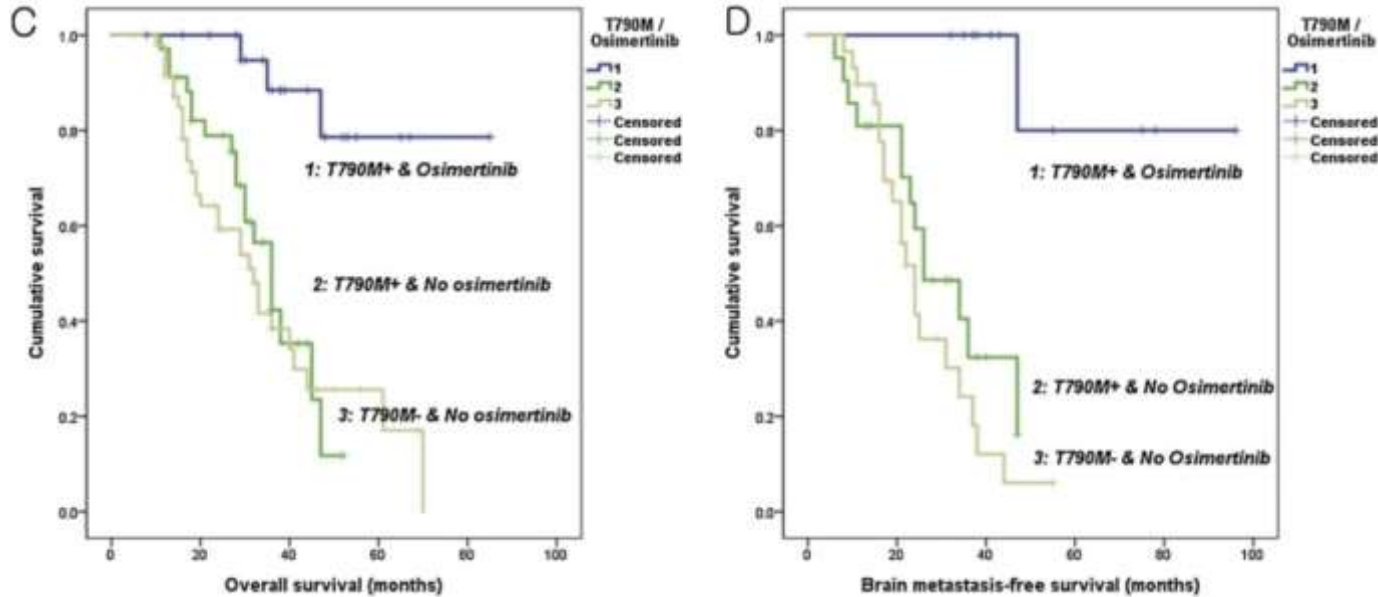
**Controls**

Position	Sample ID	KI	Control Type	Result	Flags	Accepted by
AD1/AD2/AD3	IA1F25697AL003B	1	Mutant Control	Valid		
B01/B02/B03	IA1F25697AL003B	1	Negative Control	Valid		

**Specimens**

Position	Sample ID	KI	Result 1	Result 2	Result 3	Flags	Accepted by
C01/C02/C03	AD150	1	Mutation Detected	L858R: 1.888%	L858R: 4.92		
D01/D02/D03	AD151	1	Mutation Detected	Ex19Del: 11.87	Ex19Del: 11.87		
E01/E02/E03	AD154	1	Mutation Detected	Ex19Del: 18.30	Ex19Del: 18.30		

# Analýza mutací v genu EGFR pomocí Real-Time PCR

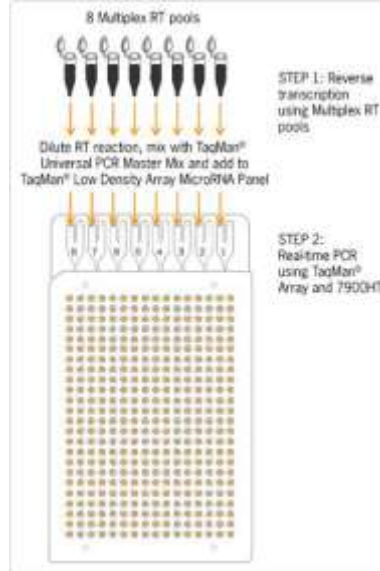


Osimertinib se používá k léčbě lokálně pokročilého nebo metastazujícího nemalobuněčného karcinomu plic, pokud jsou nádorové buňky pozitivní na mutaci T790M v genu kódujícím EGFR nebo na aktivační mutace EGFR. Mutace T790M může být de novo nebo získaná po léčbě první linie jinými inhibitory tyrozinkinázy EGFR, jako jsou gefitinib nebo erlotinib.



# Real-Time PCR arrays

- TaqMan Low Density Array (ThermoFisher Scientific)
  - 80 ng celkové RNA
  - 730 miRNA
- microRNA Ready-to-USE PCR panels (Exiqon)
  - 40 ng celkové RNA
  - 752 miRNA



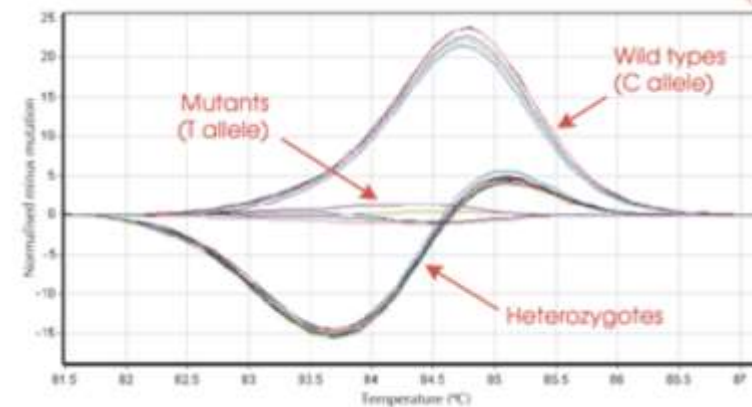
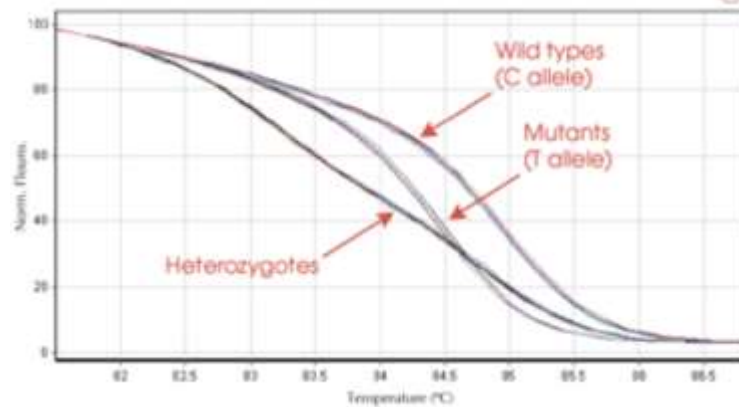
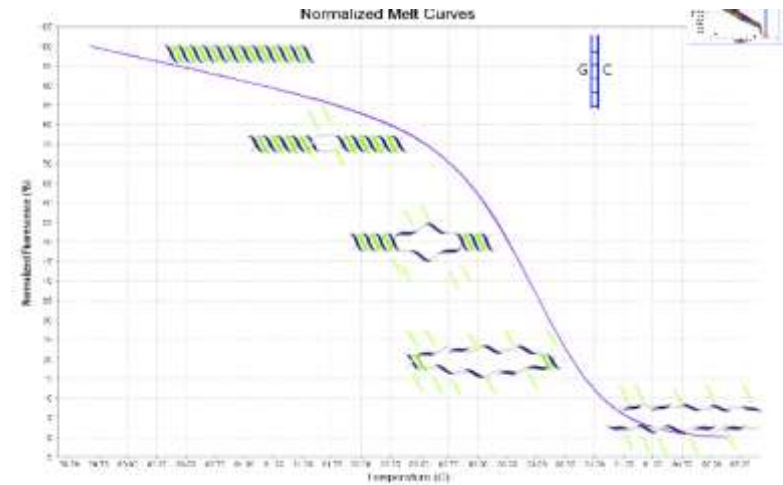


# High resolution melting (HRM) – analýza tání s vysokým rozlišením

SNP Class	Base Change	Typical $T_m$ Curve Shift	Occurrence in the Human Genome
1	C/T & G/A	Large (>0.5, avg. of 1.0°C)	64%
2	C/A & G/T	Large (>0.5, avg. of 1.0°C)	20%
3	C/G	Small (0.2–0.5°C)	9%
4	A/T	Very small (<0.2°C)	7%

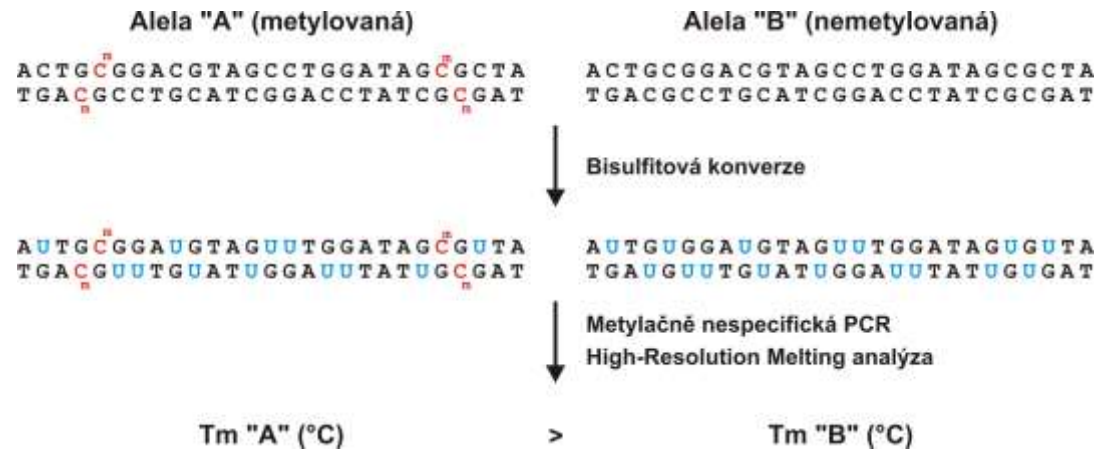
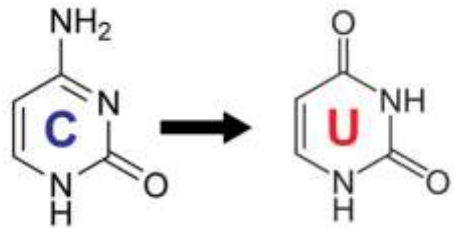
Table 1. Human Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) Occurrence and  $T_m$ .

HRM *can* detect all SNP classes

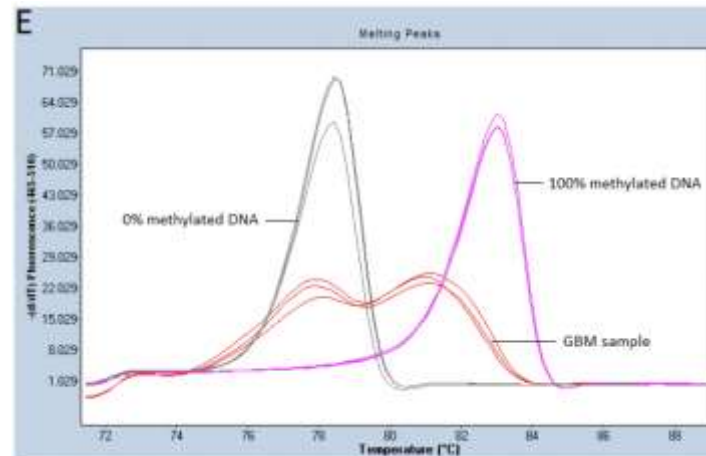
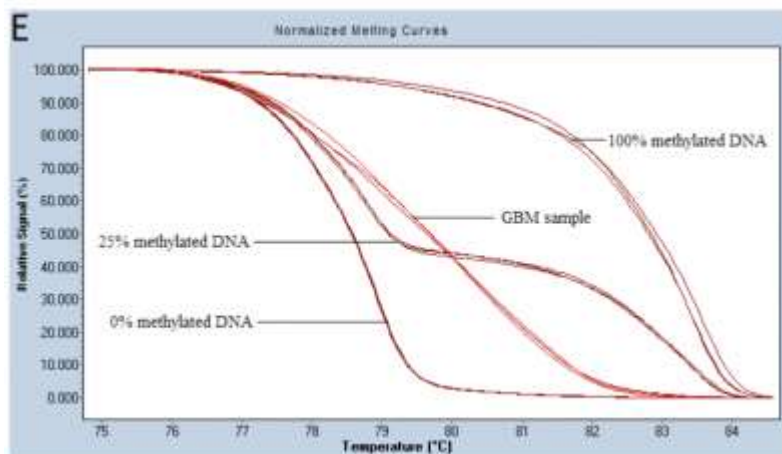


# Analýza metylačního stavu promotoru pro gen MGMT pomocí HRM

Bisulfitová konverze - EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen)

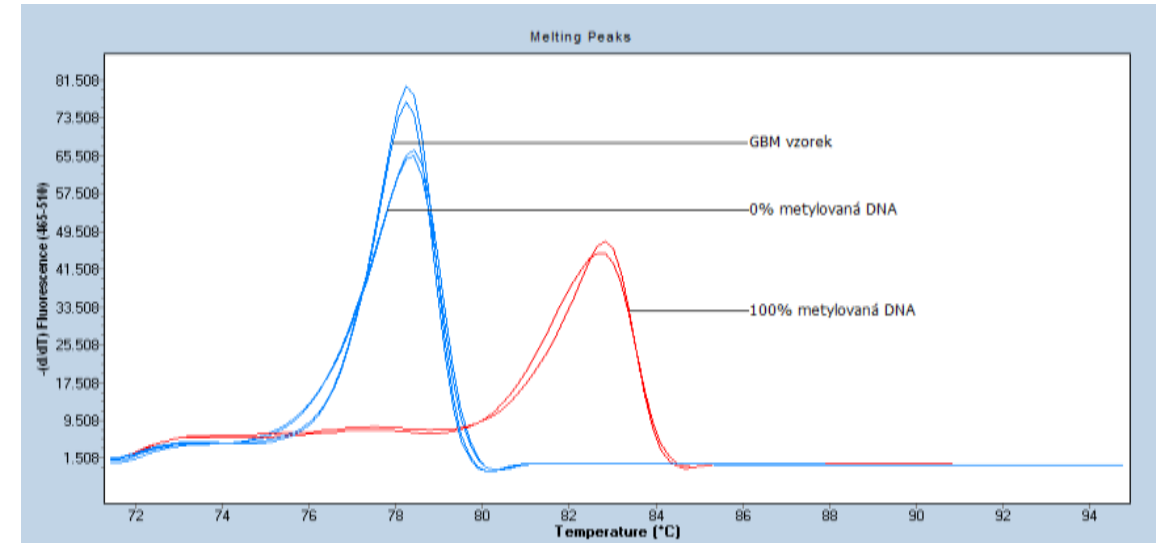
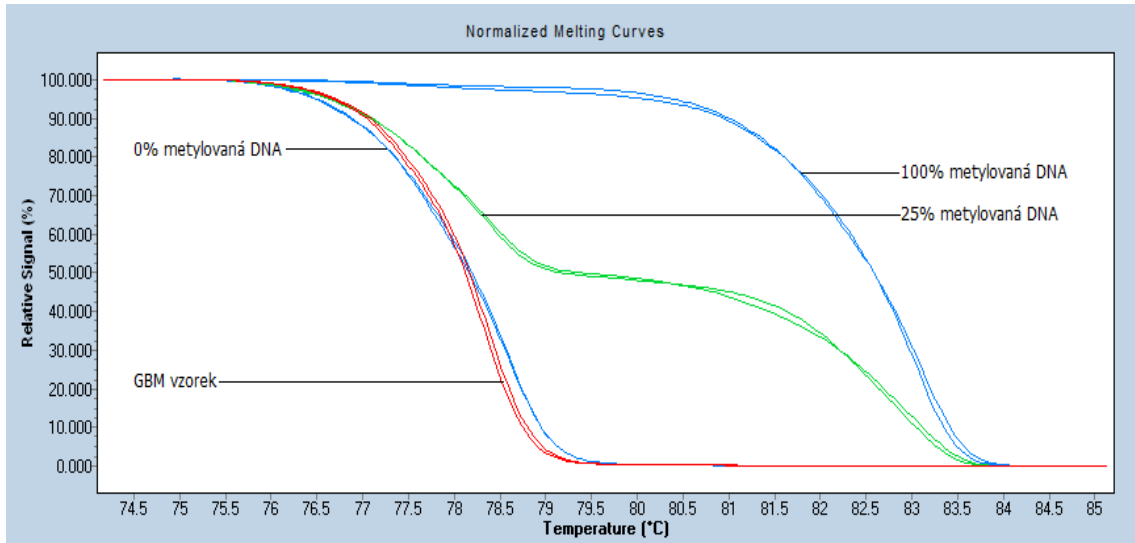


High-resolution melting (HRM) analysis - LightCycler 480 High Resolution Melting Master kit (Roche)

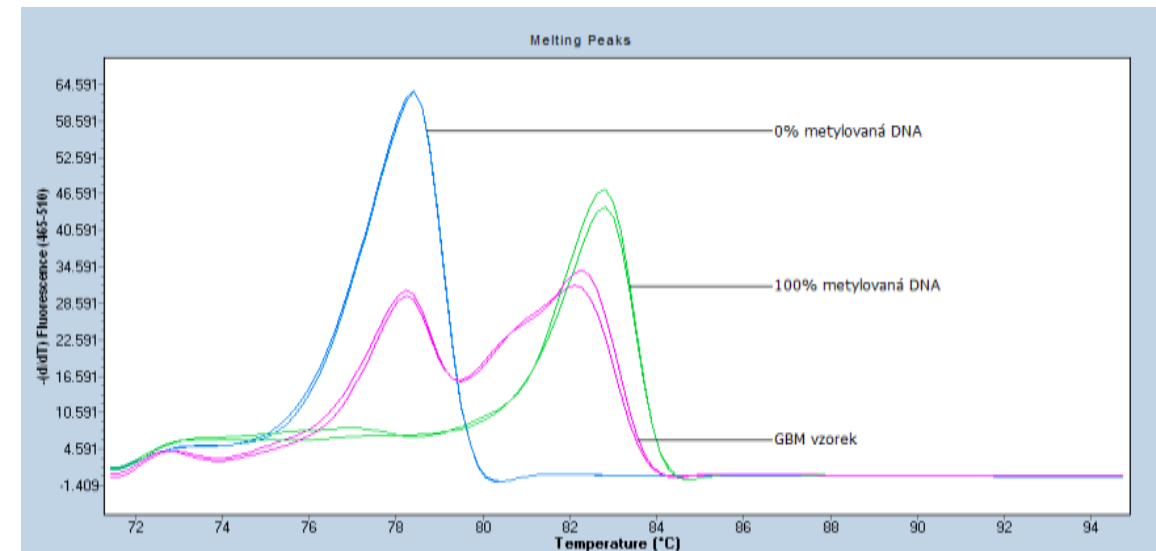
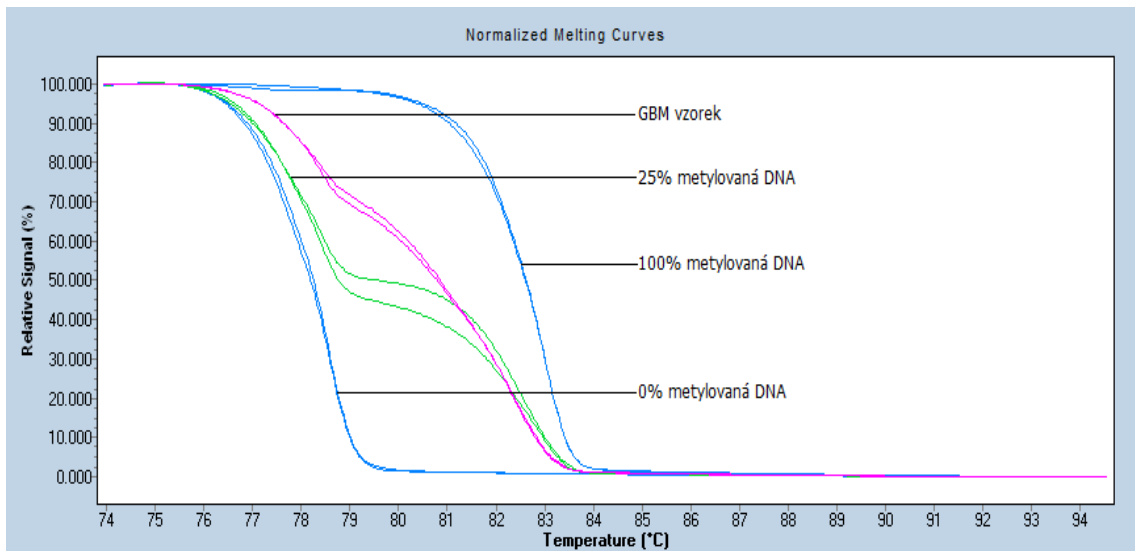


# Analýza metylačního stavu promotoru pro gen MGMT pomocí HRM

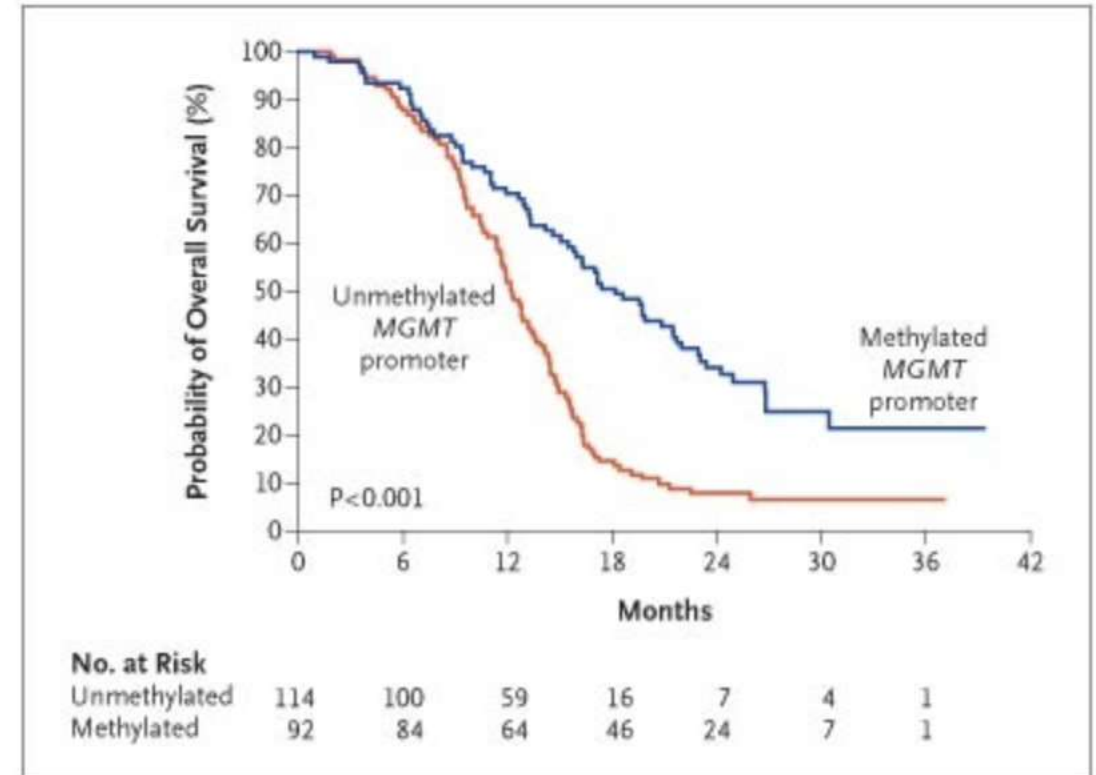
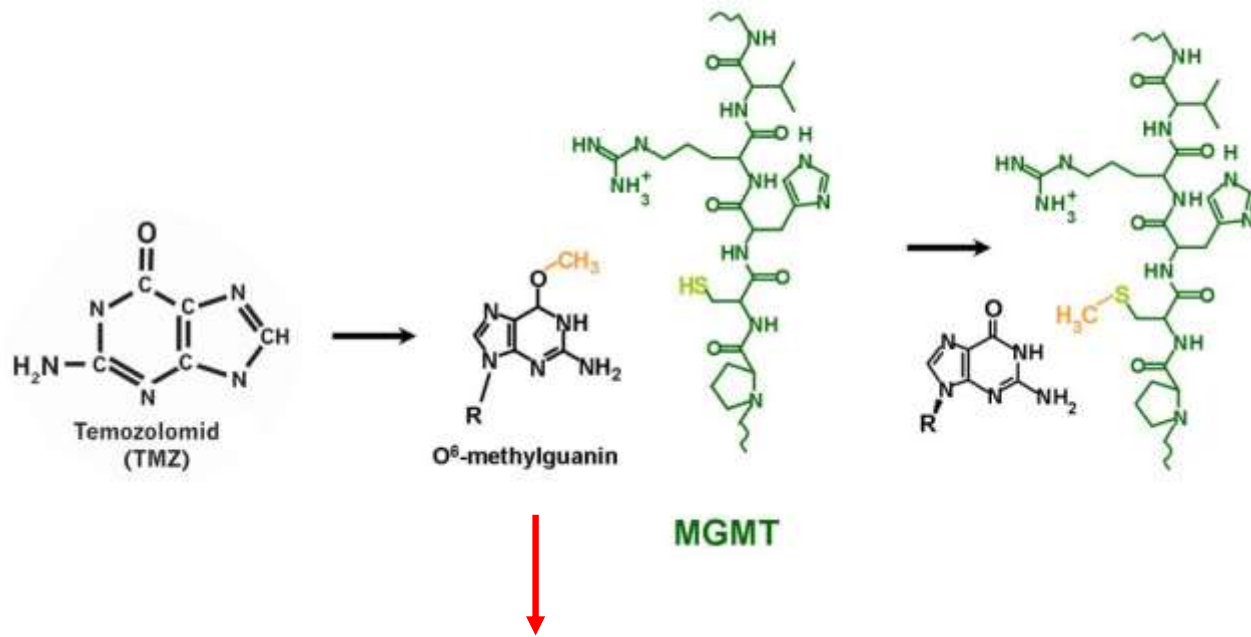
Pacient A



Pacient B



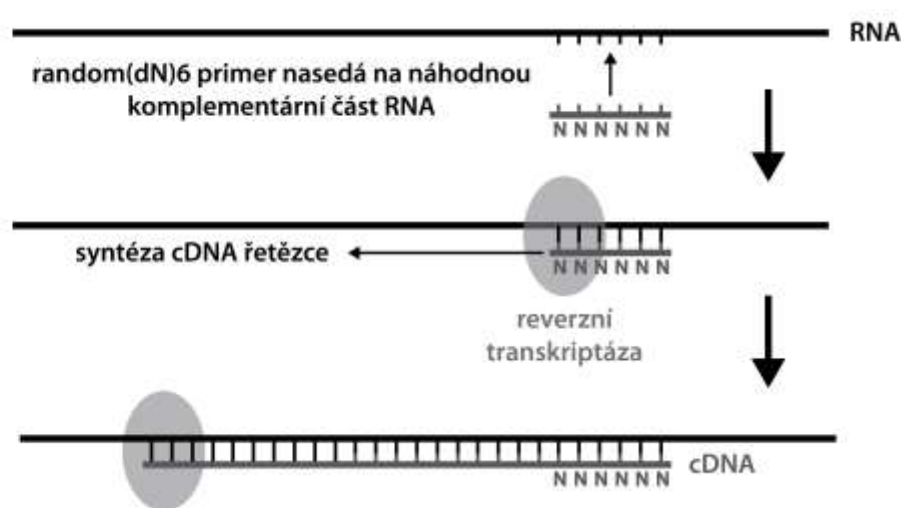
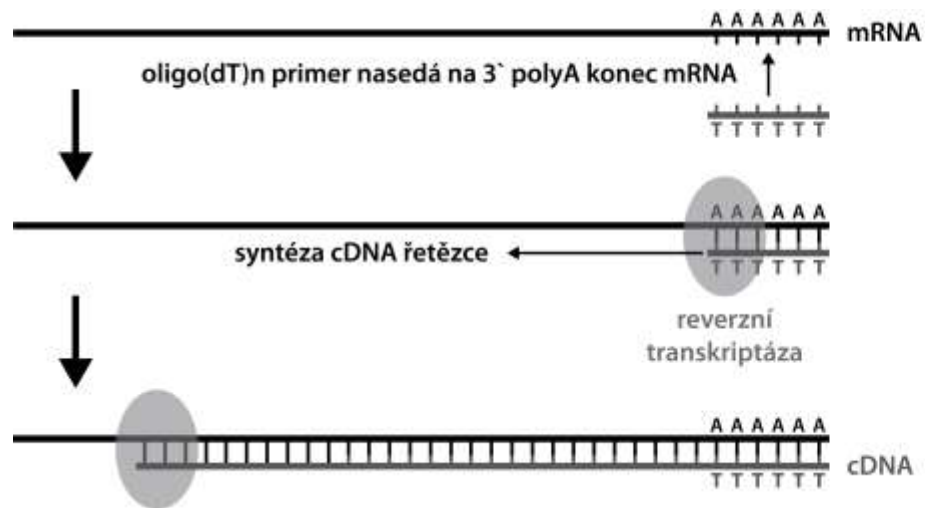
# Umlčení genu MGMT a přínos temozolomidu u pacientů s glioblastomem



Hegi et al., 2005 The New England Journal of Medicine

# Reverzní transkripce

- Přepis RNA do cDNA (vyšší stabilita)
- Katalyzováno reverzní transkriptázou (retroviry)
  - reverzní transkriptázy využívají retroviry (např. virus Rousova sarkomu, virus lidské imunodeficiency - HIV)
- Primery: random (hexamery), oligo-dT, specifické



# Reverzní transkripce - mikroRNA

