

Diagnostický potenciál volných nukleových kyselin



Marie Korabečná

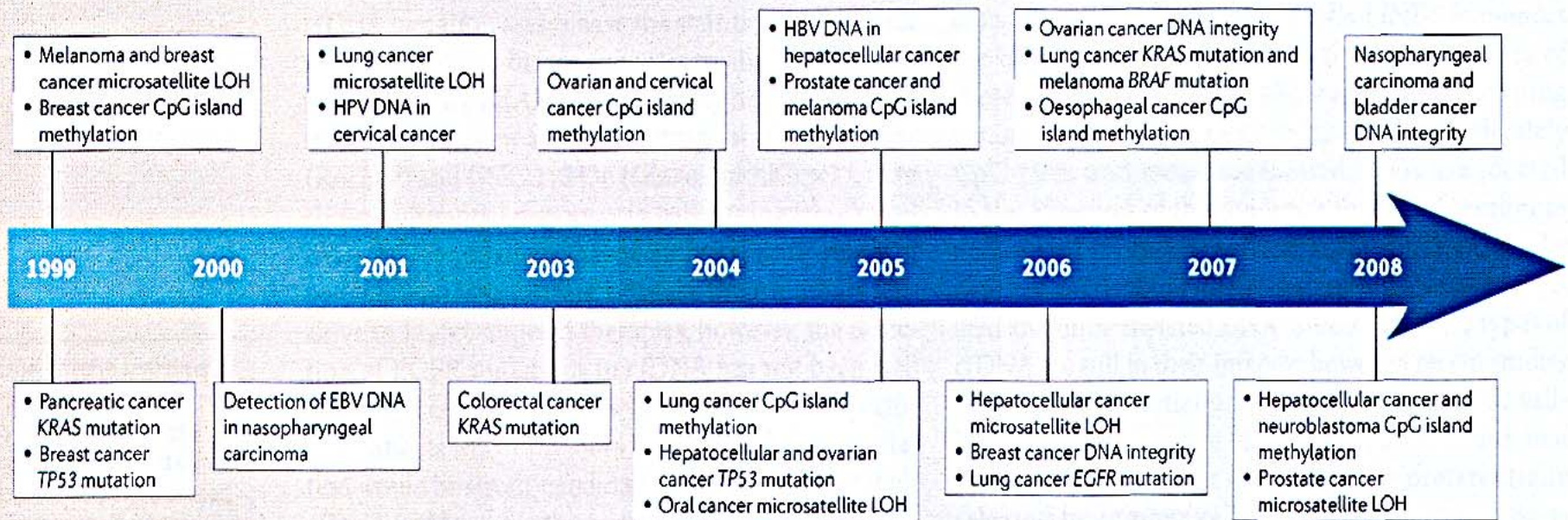
Ústav biologie a lékařské genetiky 1.LF UK

Objev a historie poznávání volných nukleových kyselin

1948	popsána přítomnost volné DNA v plazmě	<i>Mandel P. et Metais P. CR Acad Sci Paris 1948,142: 241-243.</i>
1951 – 1966	cfDNA studována u pacientů s autoimunními chorobami	<i>Tan E.M. et al. J Clin Invest 1966, 30: 1732-1740.</i>
1977	cfDNA sledována v závislosti na radioterapii	<i>Leon S.A. et al. Cancer Res 1977, 37: 646-650.</i>
1989 - 1994	na základě cfDNA detekovány nádorově specifické bodové mutace	<i>Vasioukhin V. et al. Br J Haematol 1994,86: 774-779.</i>
1997	demonstrována přítomnost fetální cfDNA v mateřské plazmě	<i>Lo Y.M. et al. Lancet 1997,350:485-487.</i>
1999	Teorie genometastáz – cfDNA ze zvířat s násorem transformovala buňky v TK	<i>Lo Y.M. et al. Clin Chem 2000, 46: 319-323 Rainer T.H. et al. Clin Chem 2003, 49: 562-569</i>

Objev a historie poznávání volných nukleových kyselin

Timeline | Detection of various forms of cfDNA in patients with different types of cancer



The development of the detection of genetic and epigenetic alterations, as well as the measurement of DNA integrity and viral DNA, in blood from patients with different tumour types over the past decade is shown. We show only significant, prognostic findings from >40 patients with serum, plasma or bodily fluid detection of cell-free DNA (cfDNA) from individual cancers. This timeline is not meant to be comprehensive and is based on our own personal view of what have been important clinical translational events. EBV, Epstein-Barr virus; EGFR, epidermal growth factor receptor; HBV, hepatitis B virus; HPV, human papilloma virus; LOH, loss of heterozygosity.

Objev a historie poznávání volných nukleových kyselin

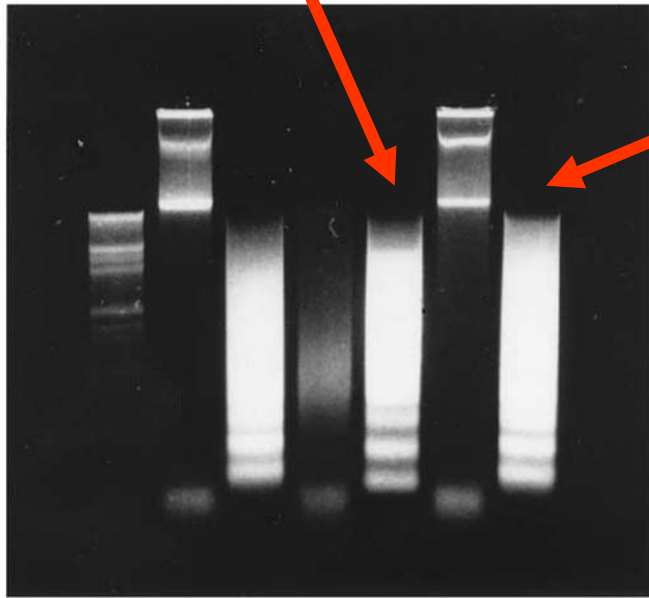
2000 – 2003	využití cfDNA v traumatologii a jako prognostického markeru u pacientů s akutním infarktem	<i>Lo Y.M. et al. Clin Chem 2000, 46: 319-323</i> <i>Rainer T.H. et al. Clin Chem 2003, 49: 562-569</i>
2004	Nalezeny zvýšené hodnoty cfDNA u maratónců po závodě	<i>Atamaniuk J. et al. Clin Chem 2004, 50: 523-526</i>
2008	NGS pro porovnání cfDNA a genomické DNA u zdravých osob, nalezeno vyšší zastoupení Alu sekvencí v cfDNA	<i>Van der Vaart M and Pretorius P.J. Ann N Y Acad Sci 2008:1137:92-97.</i>
2008 -	Nukleové kyseliny jako součásti exosomů a aktivní modulátory imunitního systému	
2011	Zaveden termín <i>nukleom</i> pro všechny formy extracelulární DNA (vesikly, nukleosomy a virtosomy)	<i>Peters D.I. and Pretorius P.J. 2011. Clin Chim Acta 412:806-811</i>

Původ volně cirkulující DNA

Apoptóza

Aktivní uvolňování
živými buňkami

Nekróza



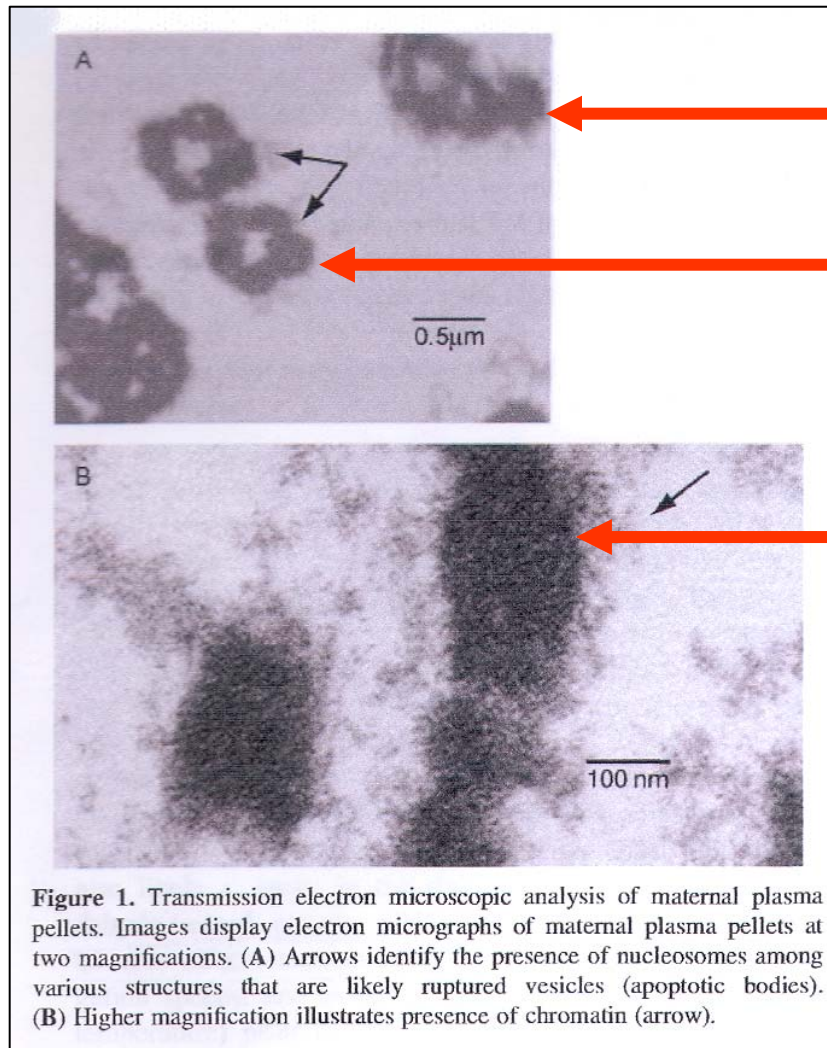
M 1 1' 2 2' 3 3'

Fig. 1. Gel electrophoresis of cellular and extracellular DNA of HL-60 cells treated for 20 h with staurosporine, z-VAD-fmk or without additive M: MW marker. 1: Control cellular DNA. 1': Control extracellular DNA. 2: Staurosporine cellular DNA. 2': Staurosporine extracellular DNA. 3: z-VAD cellular DNA. 3': z-VAD extracellular DNA.

Stroun M. et al. About the possible origin and mechanism of circulating DNA.

Apoptosis and active DNA release. Clin Chem Acta 2001, 313: 139 - 142

Charakter volně cirkulující DNA

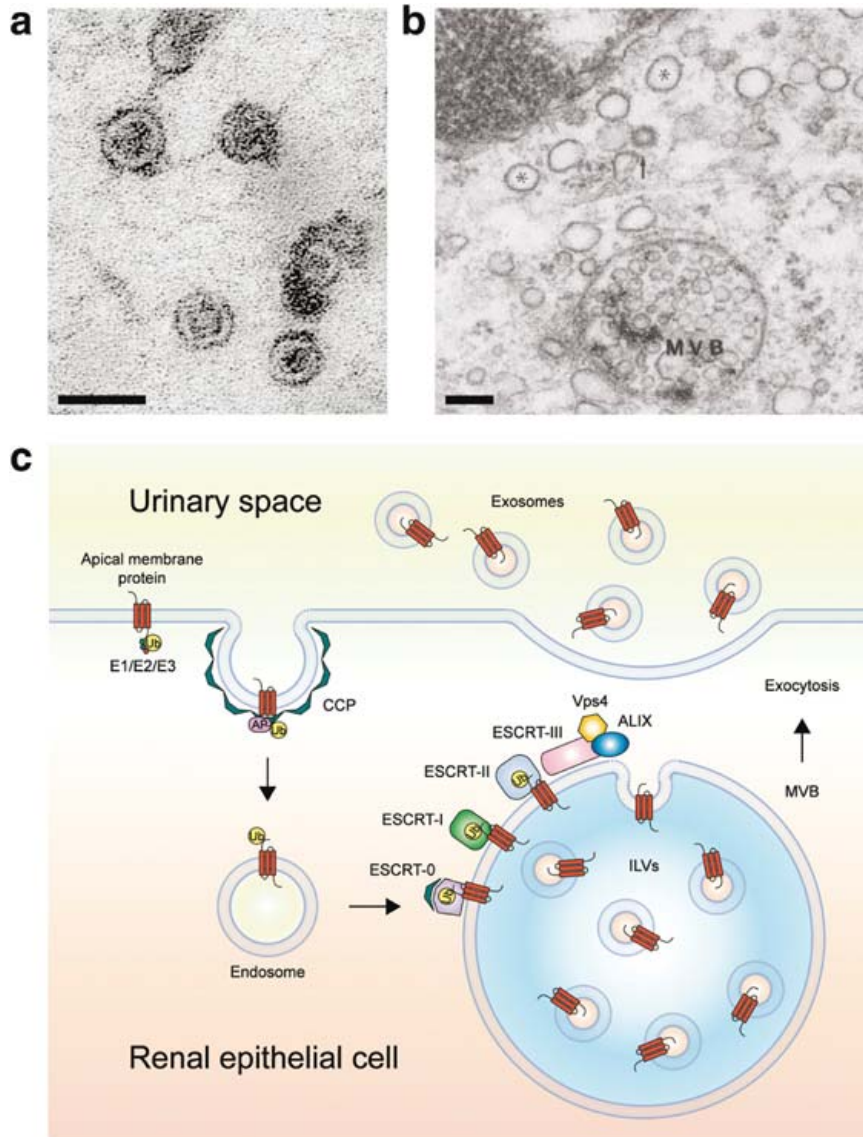


Apoptická tělíška

Nukleosomy

Chromatin

Bischoff F.Z. et al. Cell-free fetal DNA in maternal blood: kinetics, source and structure. Hum Reprod Update 2005, 11(1): 59 – 67.



<http://dir.nhlbi.nih.gov>

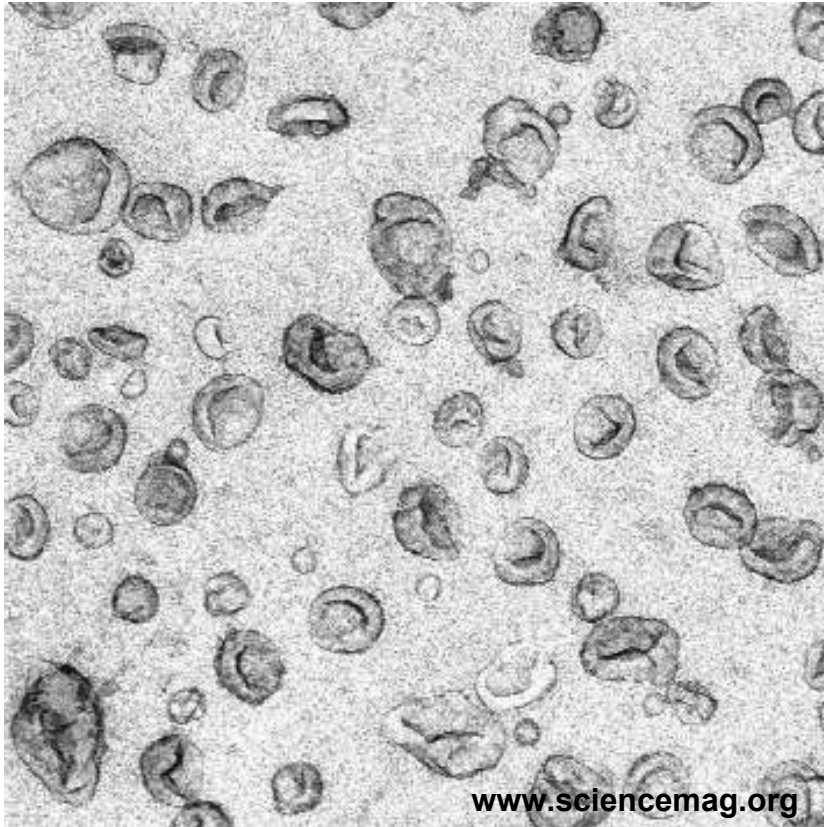
Exosomy

- 40 – 100 nm
membránou obalené
vesikly
- Obsahují více než 2300
proteinů a 270 micro
RNA
- V různých tělních
tekutinách – krev, moč
plodová voda mateřské
mléko, synoviální
tekutina
- Není jasné, zda obsahují
DNA

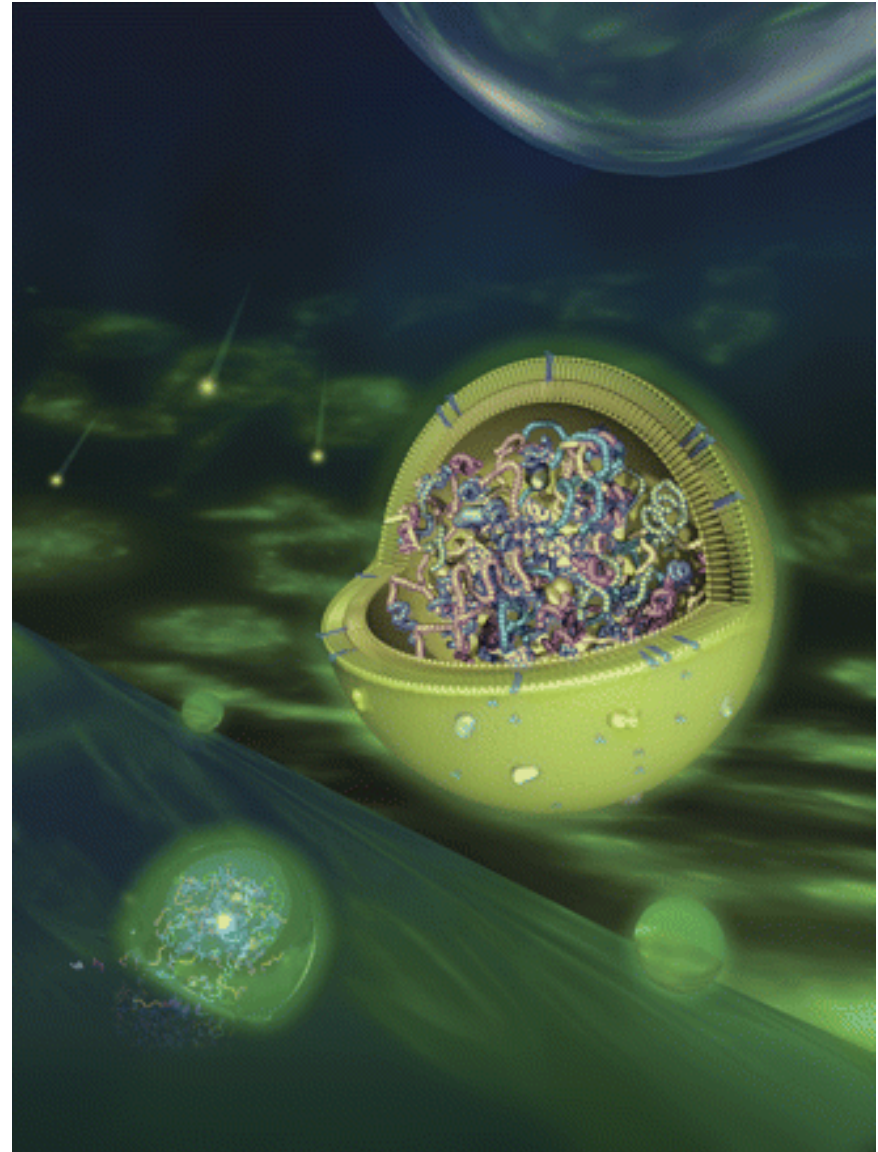
*Taylor D.D. et al. Methods in Molecular
Biology, 2011, 728:235-246*

Simpson R.J. et al. Proteomics, 2008, 8: 4083-4099

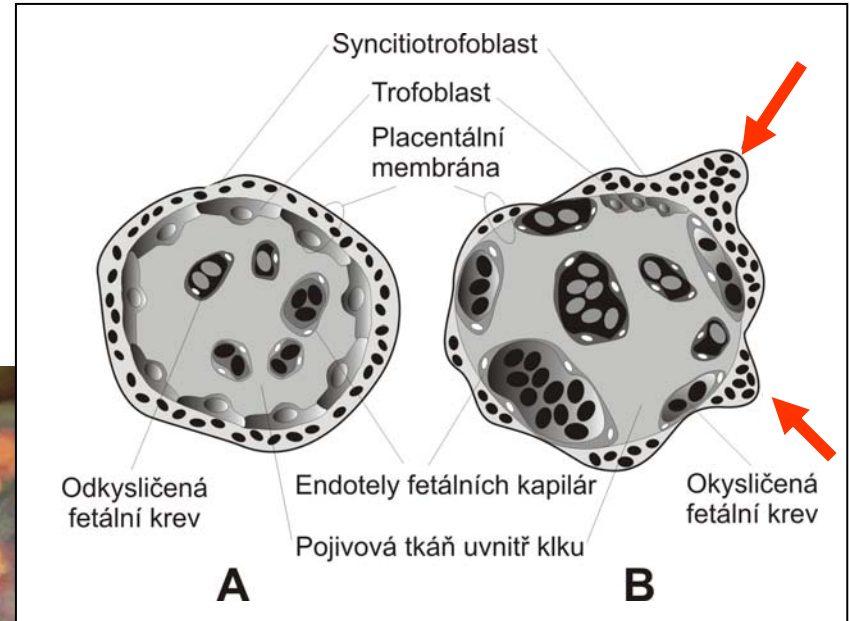
Exosomy



Secreted microRNAs are contained in the exosomes, which are enriched in ceramide (*blue*), and their secretion was controlled by neutral sphingomyelinase 2. Secreted microRNAs are transferable and functional in the recipient cells. The background image shows recipient cells having accumulated exosomes labeled with fluorescent dye, the exosomes of which are secreted from donor cells. The cover design was done by Dr. Eiji Takaoki –**The Journal of Biological Chemistry** 4, 2010



Původ fetální cfDNA v mateřské plazmě



Bianchi D.W. Fetal cells in the maternal circulation: feasibility for prenatal diagnosis. Placenta 2004, 25: S93-S101

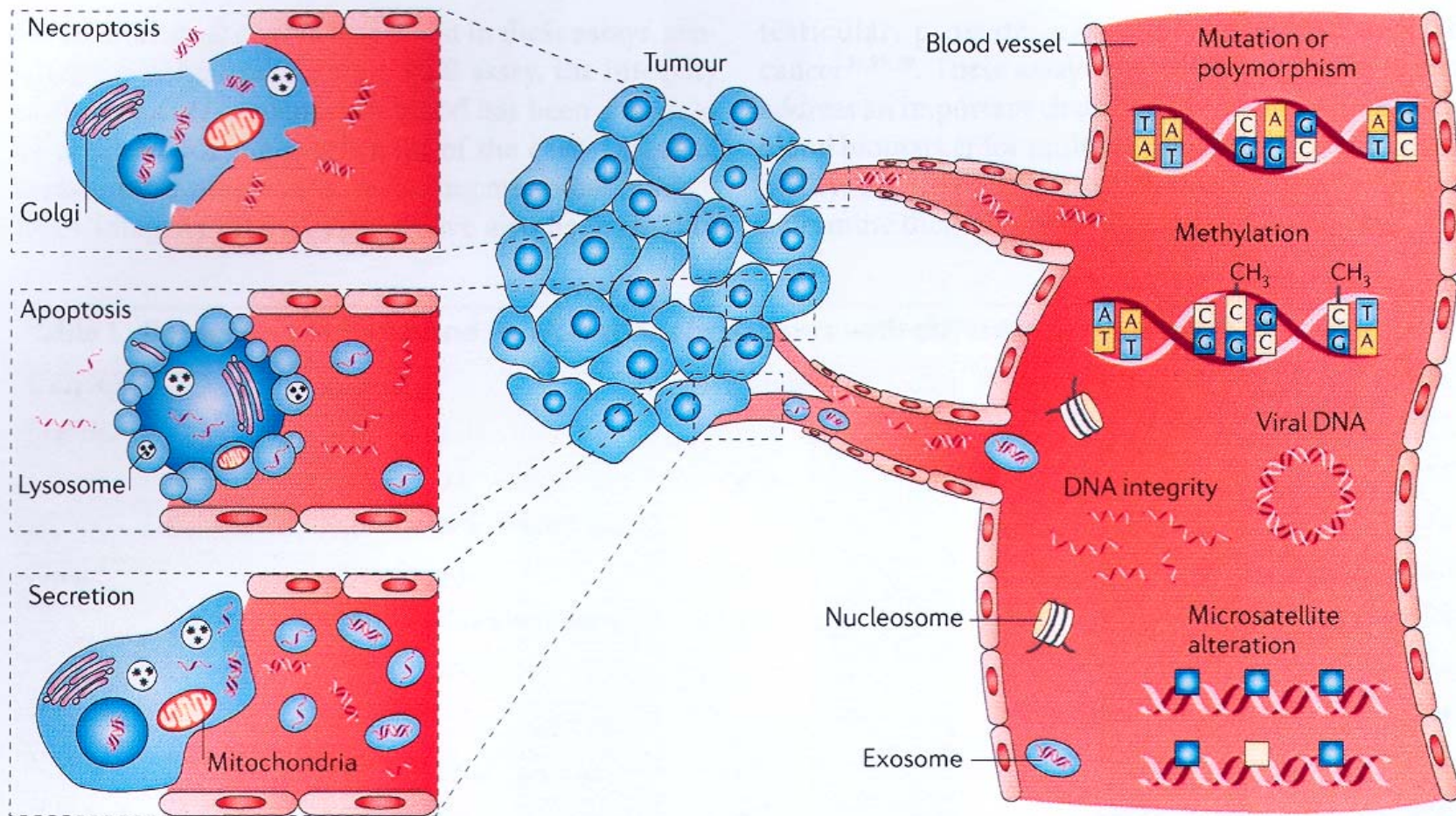


Figure 1 | **Cell-free nucleic acids in the blood.** Mutations, methylation, DNA integrity, microsatellite alterations and viral DNA can be detected in cell-free DNA (cfDNA) in blood. Tumour-related cfDNA, which circulates in the blood of cancer patients, is released by tumour cells in different forms and at different levels. DNA can be shed as both single-stranded and double-stranded DNA. The release of DNA from tumour cells can be through various cell physiological events such as apoptosis, necrosis and secretion. The physiology and rate of release is still not well understood; tumour burden and tumour cell proliferation rate may have a substantial role in these events. Individual tumour types can release more than one form of cfDNA.

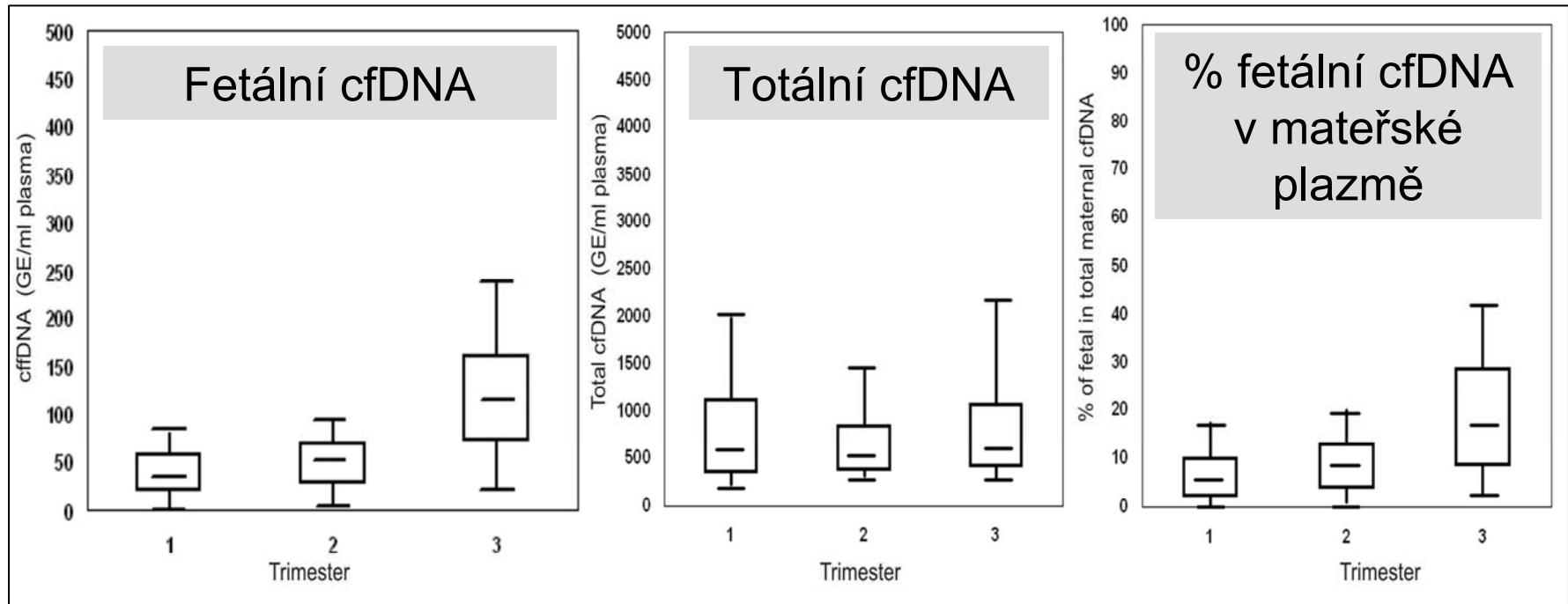
Možnosti diagnostického využití volně cirkulujících nukleových kyselin

- Gynekologie a porodnictví
- Interní lékařství
- Traumatologie
- Klinická genetika – prenatální diagnostika
- Onkologie

Kvantifikace fetální cfDNA v gynekologii a porodnictví

↑	Preeclampsia	<i>Zhong X.Y. et al. Am J Obstet Gynecol 2001, 184: 414-419</i>
↑	Předčasný porod	<i>Leung T.N. et al. Lancet 1998, 352:1904-1905</i>
↑	Polyhydramnion	<i>Zhong X.Y. et al. Prenat Diagn 2000, 2: 838-841.</i>
↑	Mimoděložní těhotenství	<i>Lazar L. et al. Clin Chem 2006, 52: 1599-1601.</i>
↑	Růstová retardace plodu - IUGR	<i>Caramelli E. et al. Prenat Diagn 2003, 23: 367-371.</i>
↑	Invazivní placentace	<i>Sekizawa A. et al. Clin Chem 2002, 48: 353-354</i>

Kvantifikace fetální cfDNA v gynekologii a porodnictví



Horinek A., Korabecna M. et al. Cell-free fetal DNA in maternal plasma during physiological single male pregnancies: methodology issues and kinetics. Fetal Diagn Therapy 2008, 24 (1):15-21

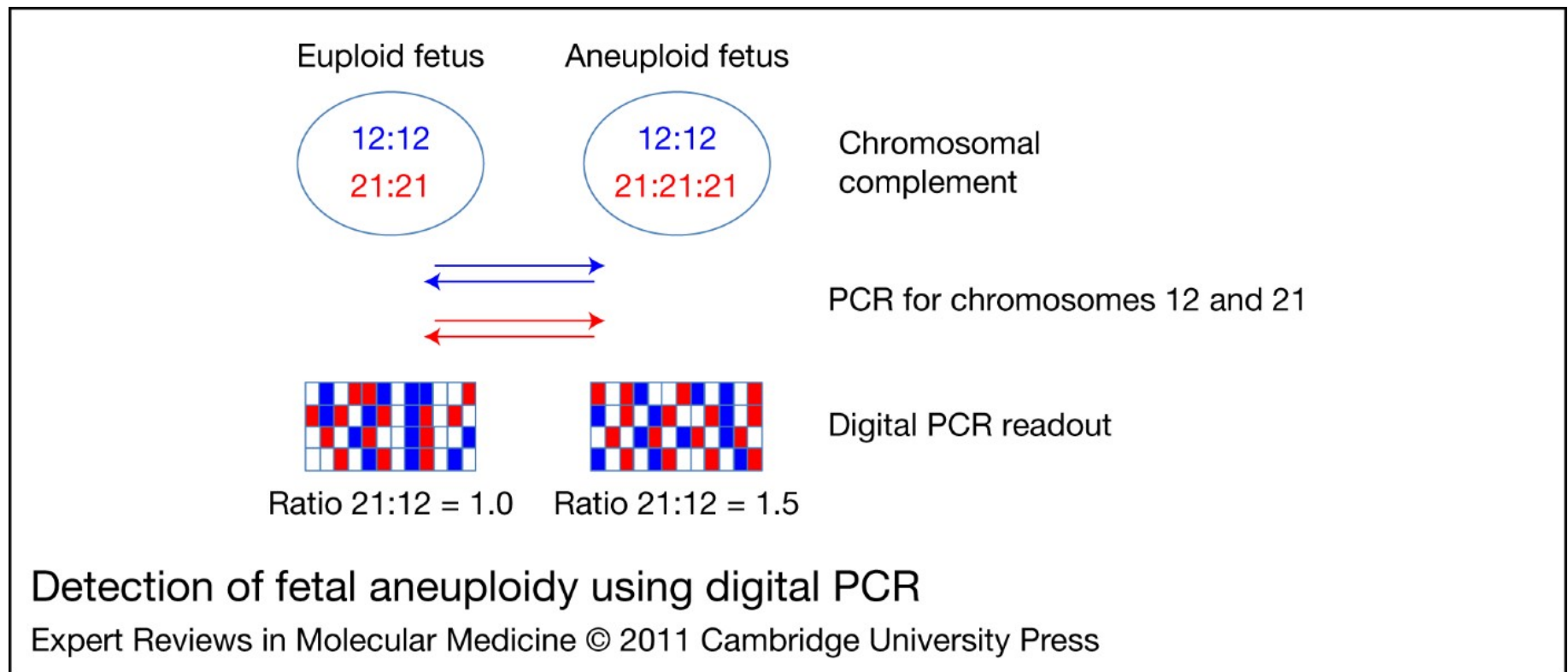
Kvalitativní vyšetření fetální cfDNA v prenatální diagnostice

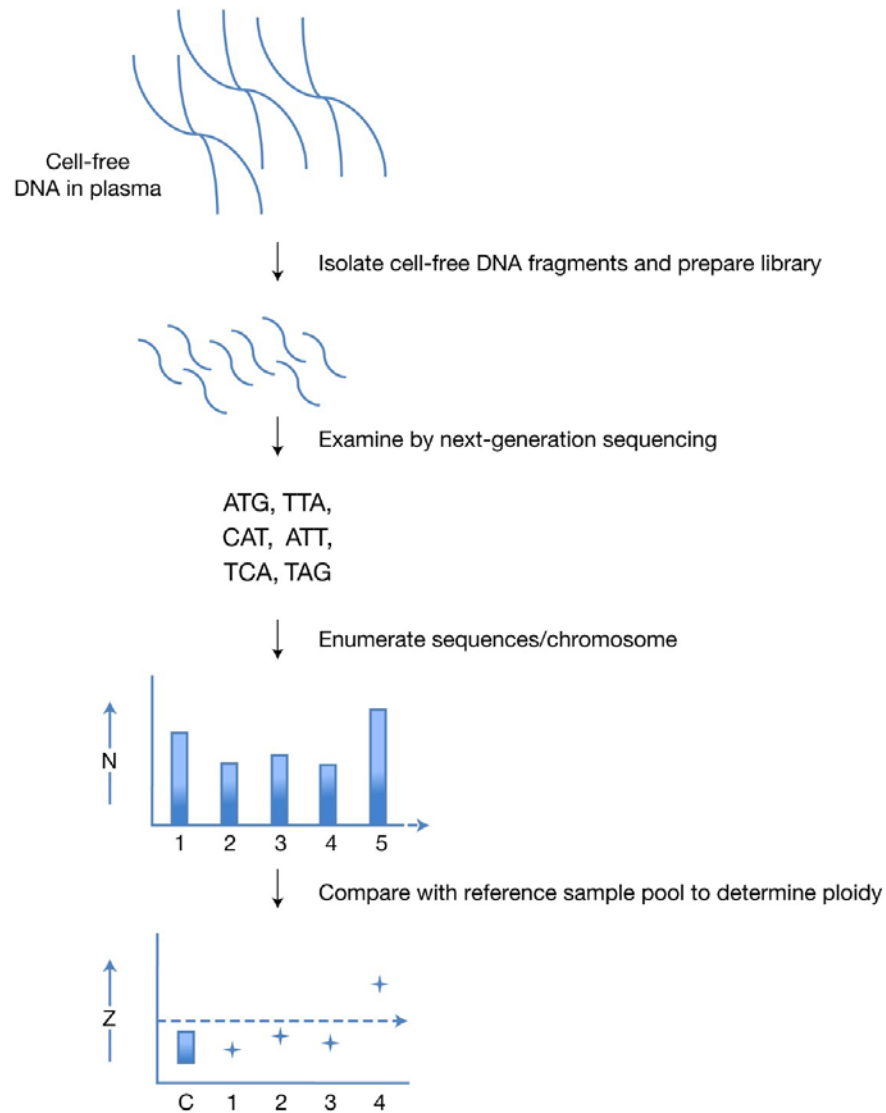
Klinická aplikace	Citace
Určení pohlaví počínaje 5.týdnem těhotenství	<i>Honda H. et al. Hum Genet 2002;110: 75 - 79</i>
Myotonní dystrofie	<i>Amicucci P. et al. Clin Chem 2000, 46: 301 - 302</i>
RhD genotypizace	<i>Finning K.M. et al. Transfusion 2002,42: 1079 - 1085</i>
Kongenitální adrenální hyperplasie	<i>Rijnders R.J. et al. Obstet Gynecol 2001, 98: 374 - 378</i>
β -thalasémie	<i>Chiu R.W. et al. Lancet 2002, 360: 998 - 1000</i>
Cystická fibróza	<i>Gonzalez – Gonzalez M.C. et al. Prenat Diagn 2003, 23: 232 – 234</i>

Testované metodické přístupy pro neinvazivní detekci fetálních aneuploidií založené na cfDNA

<p><u>Problém</u>: Odlišení malé frakce fetální cfDNA na pozadí maternální cfDNA</p> <p><u>Řešení</u>: využití genů o rozdílné expresi v maternálních tkáních a placentě (PLAC 4 – placenta-specific 4, chrom. 21) a porovnání SNPs transkriptů (allelic transcript ratio)</p> <p><u>Slabina</u>: Předpoklad stejné intenzity transkripce ze všech přítomných fetálních alel</p>	<p>Lo Y.M. et al. 2007. Nature Medicine 13:218-223</p>
<p><u>Problém</u>: Odlišení malé frakce fetální cfDNA na pozadí maternální cfDNA</p> <p><u>Řešení</u>: využití epigenetických rozdílů mezi maternálními tkáněmi a placentou (promotor genu SERPINB5 pro maspin, chrom. 18 hypometylován v placentě a hypermetylován v mateřských buňkách) a po bisiulfidové modifikaci vyšetřen poměr SNPs (epigenetic allelic ratio)</p> <p><u>Slabina</u>: Bisulfidová modifikace degraduje DNA a snižuje analyzovatelné množství, hledány jiné metody obohacení fetální hypermetylované frakce</p>	<p>Tong Y.K et al. 2006. Clinical Chemistry 52:2194-2202</p>

Neinvazivní detekce fetálních aneuploidií založená na cfDNA





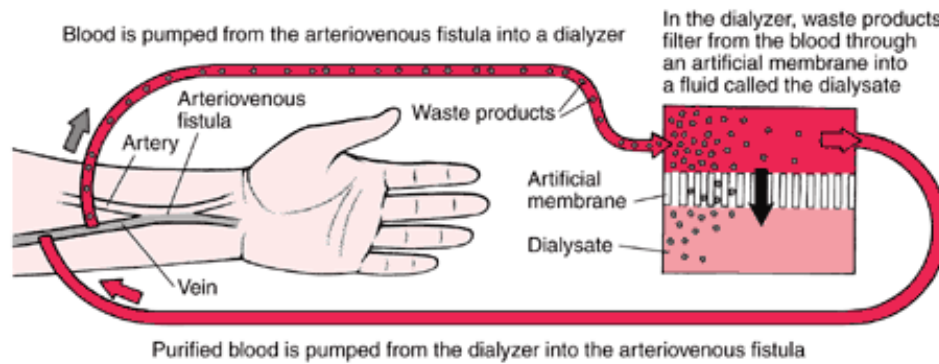
Detection of fetal aneuploidy using next-generation sequencing
 Expert Reviews in Molecular Medicine © 2011 Cambridge University Press

Neinvazivní detekce fetálních aneuploidií založená na cfDNA

Význam kvantifikace cfDNA v traumatologii a interní medicíně

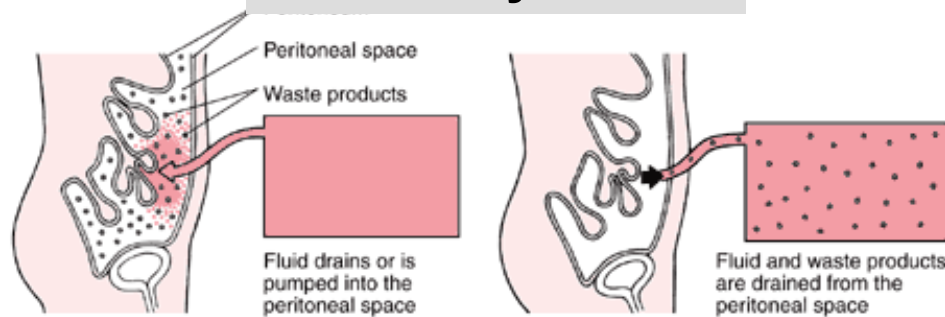
↑	Polytrauma	<i>Lo Y.M. et al. Clin Chem 2000, 46:319 -323</i>
↑	Akutní infarkt myokardu, mortalita	<i>Rainer T.H. et al. Clin Chim Acta 2007 (1-2):190-196</i>
↑	Rejekce transplantátu	<i>Gadi V.K. et al. Clin Chem 2006, 52: 379 – 382</i> <i>Zhong X.Y. et al. Ann NY Acad Sci 2001: 945: 250-257</i>

Způsoby náhrady renálních funkcí:



Hemodialysis

Hemodialýza- HD

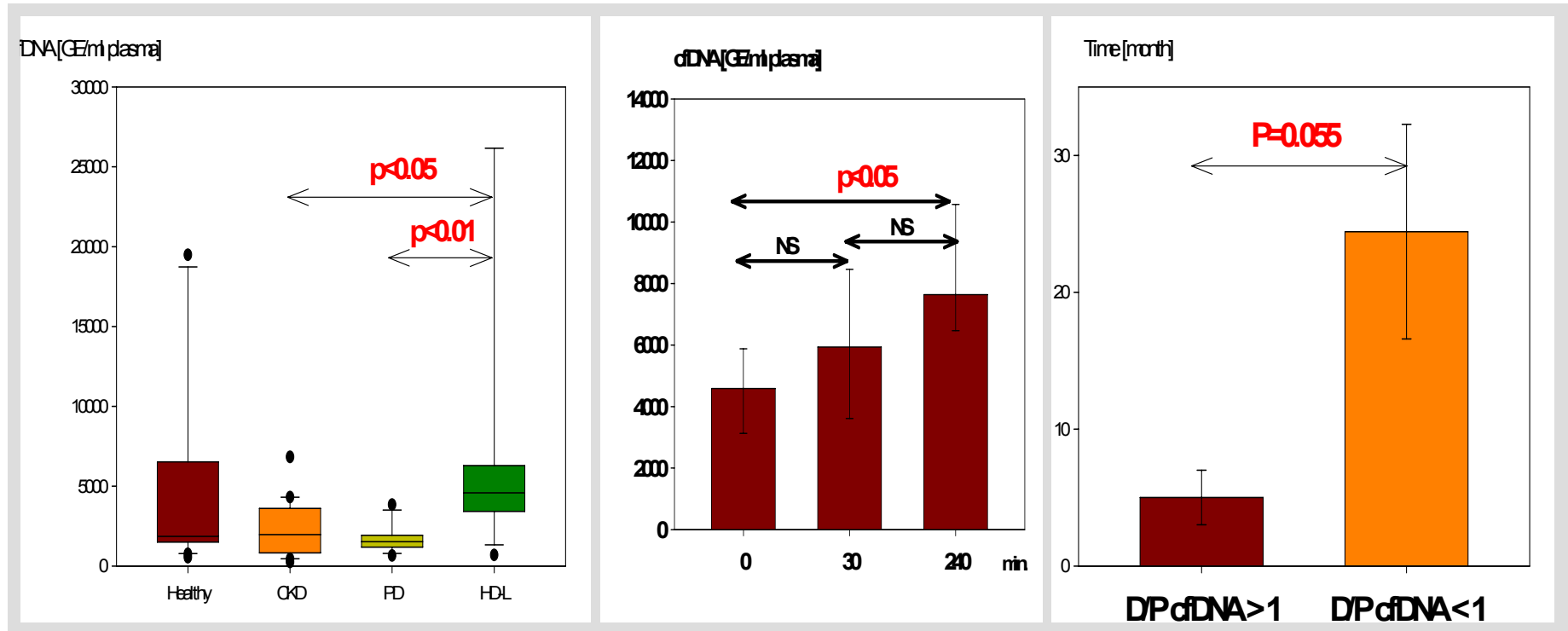


Peritoneální dialýza - PD

Country	HD(%)	PD(%)
Czech Republic	92.8	7.2
Russia	83.5	6.5
Poland	89.5	10.5
Slovakia	83.8	6.5
Slovenia	80.5	9.5

Rutkowski B. Highlights of the epidemiology of renal replacement therapy in central and Eastern Europe. Nephrol Dial Transplant 2006, 21: 4 - 10

Kvantifikace cfDNA ve vztahu k hemodialýze a peritoneální dialýze

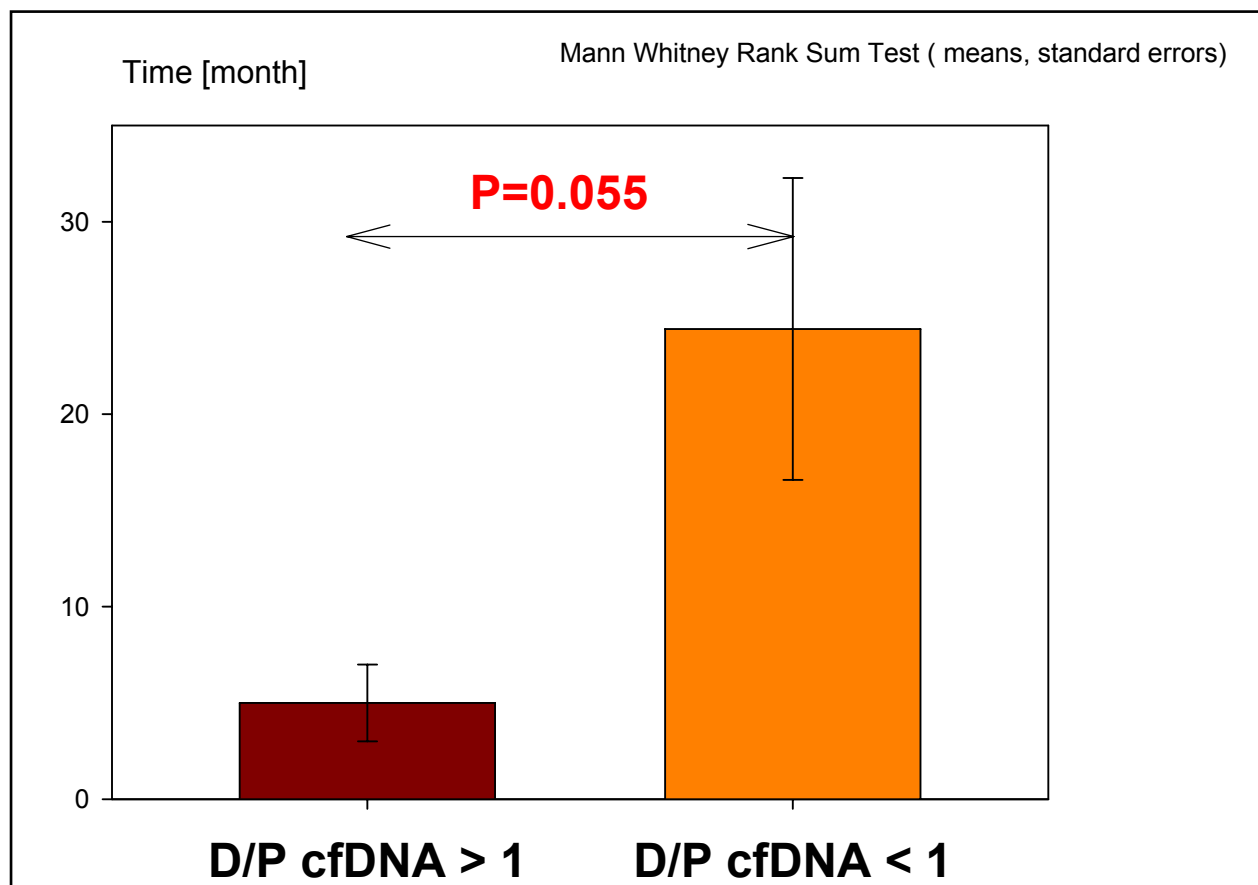


Atamaniuk J. et al. Cell-free plasma DNA: a marker for apoptosis during hemodialysis. *Clin Chem* 2006, 52: 523 – 526

Moreira V.G. et al. Increase in and clearance of cell-free plasma DNA in hemodialysis quantified by real-time PCR. *Clin Chem Lab Med* 2006, 44(12):1410-1415

Korabecna et al.: Cell-free plasma DNA during peritoneal dialysis, hemodialysis, and in patients with chronic kidney disease. *Ann NY Acad Sci*, 2008, 1137: 296-301

Poměr cf DNA v dialyzátu : cfDNA v plazmě (D/P cfDNA) u pacientů na peritoneální dialýze



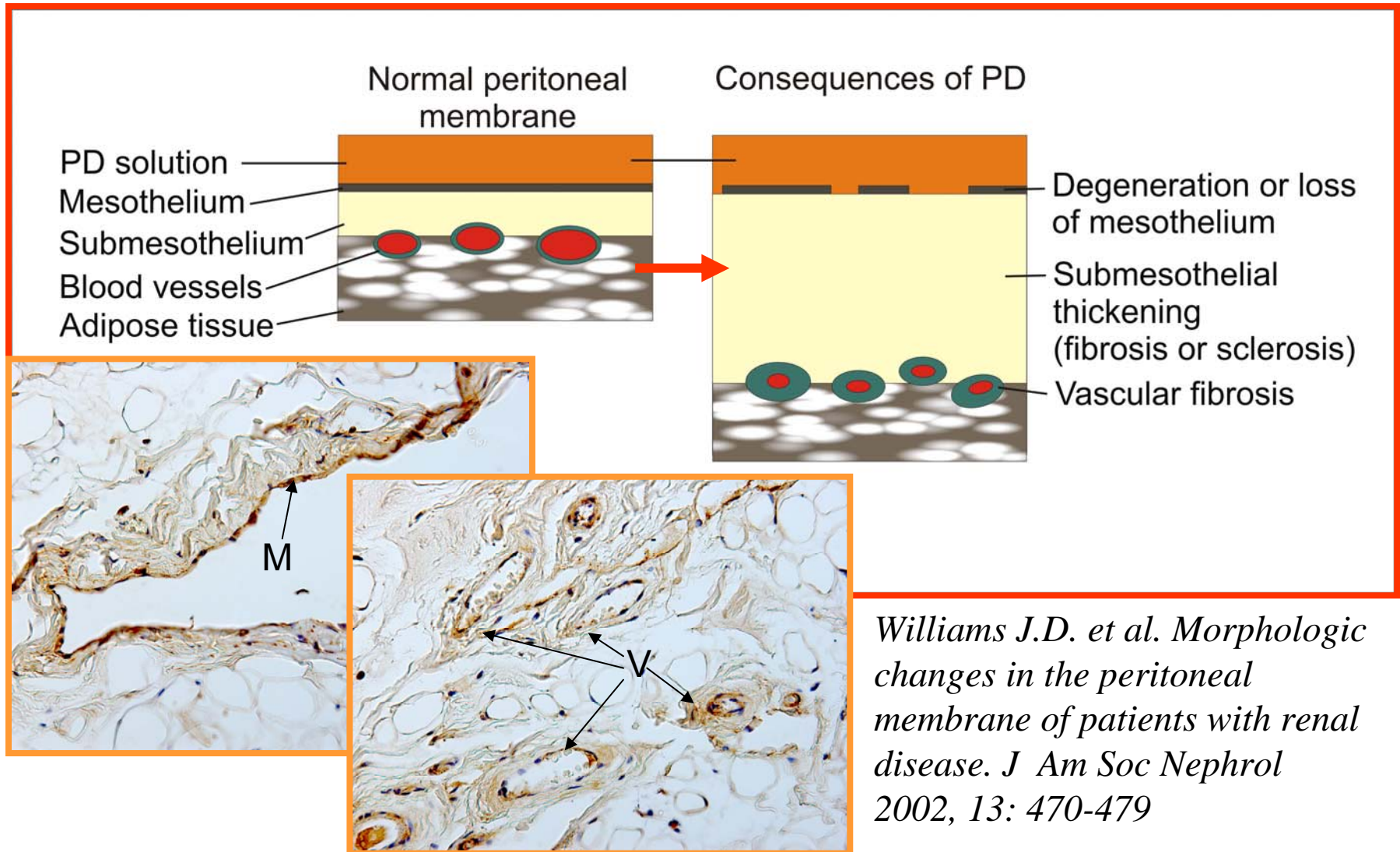
$r = -0,619$

$p = 0.008$

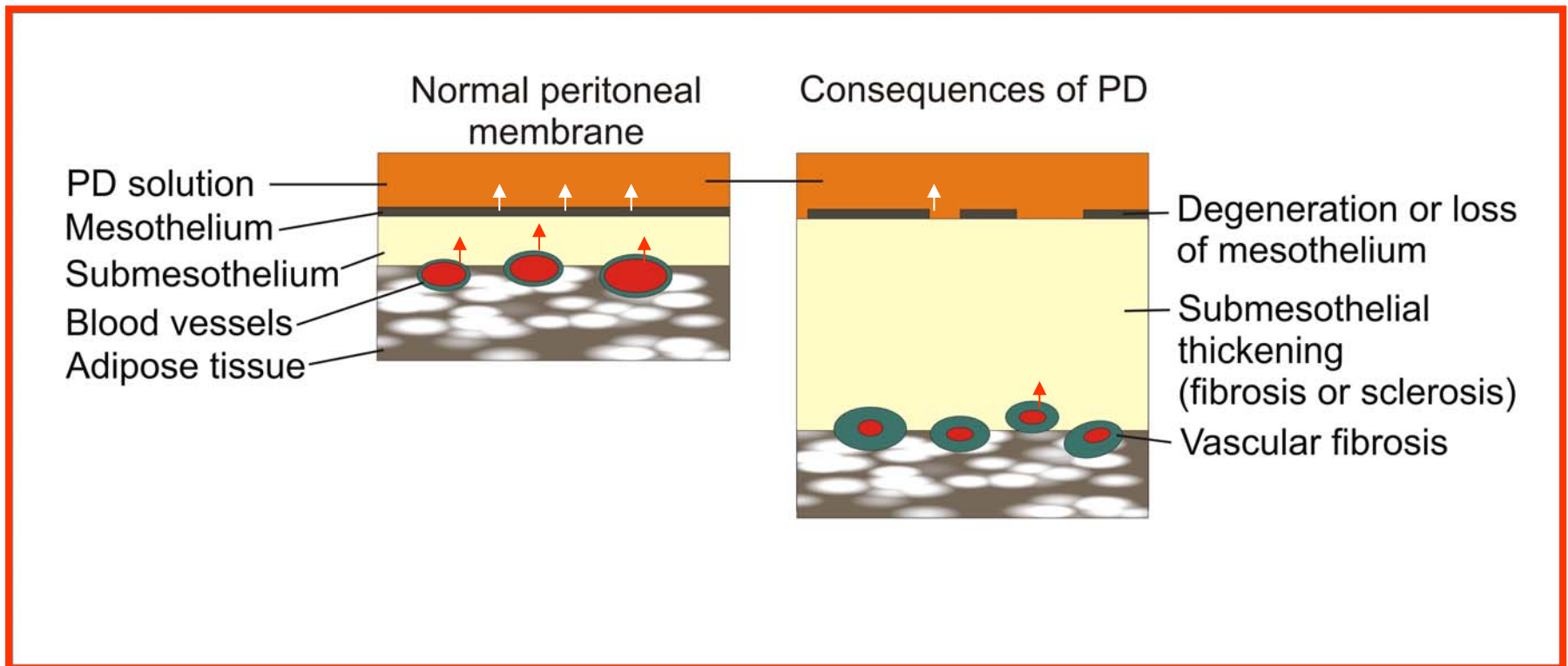
Spearmanův test pro závislost koncentrace cfDNA v dialyzátu na době, po kterou pacienti na PD

*Korabecna et al.:
Cell-free plasma DNA during peritoneal dialysis, hemodialysis, and in patients with chronic kidney disease. Ann NY Acad Sci 2008, 1137: 296-301*

Histopatologické změny během peritoneální dialýzy



Možné zdroje cfDNA v dialyzátu



Možnosti analýzy cfDNA v patologii a onkologii

Detekce mutací v N-ras, K-ras	MDS, AML, kolorektální ca
Detekce chromozomálních přestaveb	Lymfomy, ALL
Analýza instability mikrosatelitů a ztráty heterozygoty	široké spektrum tumorů, korelace s progresí a rekurencí
Studium hypermetylace promotorů tumor supresorových genů	Nemalobuněčný karcinom plic
Detekce DNA virů asociovaných s nádory	EBV – nasofaryngeální karcinom, HPV- cervikální léze

PubMed: “cell-free nucleic acids and cancer“ 8223 citací (310 reviews)

Závěry

- 1. Analýza volných nukleových je zdrojem nových markerů s řadou potenciálních aplikací, vyšetření je neinvazivní a rychlé.**
- 2. Ke správné aplikaci je nezbytná mezinárodní standardizace metod a statistické vyhodnocení dostatečně velkých souborů jak kontrolních, tak patologických vzorků.**
- 3. Hlubší poznání mechanismů uvolňování a přetrvávání volných nukleových kyselin v plazmě může přinést překvapení i pro teoretickou biologii ve vztahu k mezibuněčné komunikaci a modulaci funkcí imunitního systému**

Poděkování

Problematika fetální cfDNA:

Z. Ulčová-Gallová, A. Hořínek,
A. Panczak, K. Nouzová, P. Calda
Grant GAČR č. 203/03/1025



Problematika cfDNA v nefrologii:

S. Opatrná, J. Wirth, F. Šefrna, J. Eiselt, K. Rulcová, A. Horinek,
E. Pazourkova, M. Mokrejšová, V. Tesař
Výzkumné záměry MSM 0021620819 a MSM 0021620807
Projekt TIP MPO č. I/328