



RNA/cDNA analyser fra dyrkede lymfocytter i rutinediagnostikken

Christa Schmidt

Avdeling for patologi og medisinsk
genetikk,

St. Olavs Hospital, Trondheim



Formål RNA/cDNA-analyser

(1) Mutasjonsscreening

- Rutinemessig ved nevrofibromatose typ 1 og 2: NF1 og NF2-genet (DNA fra EDTA-blod)
- Ingen funn ved DNA-screening og sikkert klinikk
 - dype intronvarianter
 - Delesjoner/duplikasjoner av enkelte eksoner som ikke detekteres med MLPA

(2) Effekt av VUSer ift spleising

Tilbud RNA-analyser MedGen St. Olav

Nevro-
fribromatose

NF1
NF2

+ EDTA-blod

Arvelig
tykktarmkreft

Lynch syndrom
MMR-gener

FAP
APC

Brystkreft
(2015)

BRCA1/2

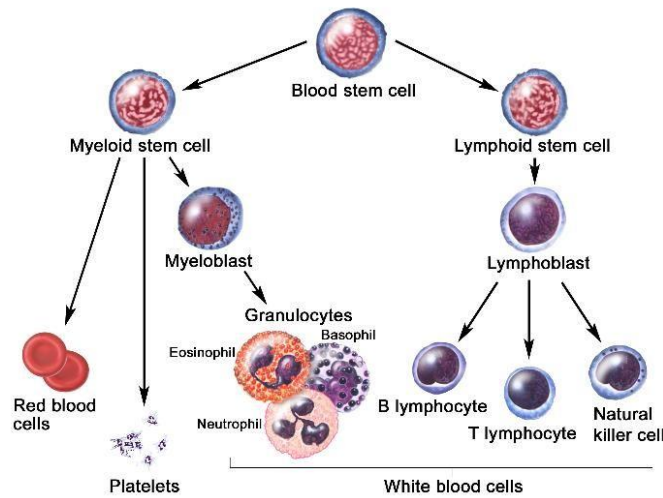
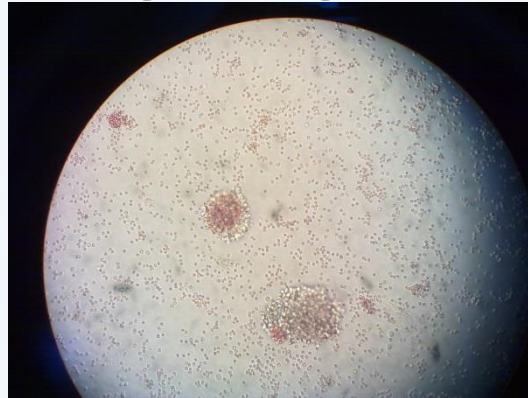
Andre arvelige
kreftsykdommer

Gorlin syndrom
PTCH1

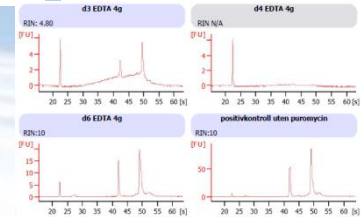
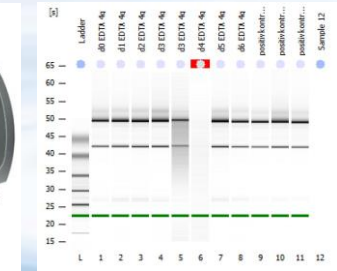
PJS
STK11

JPS
BMP1A, SMAD4

fremgangsmåte

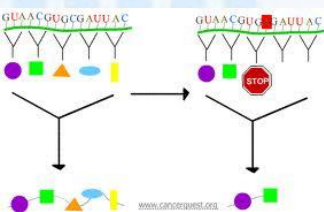
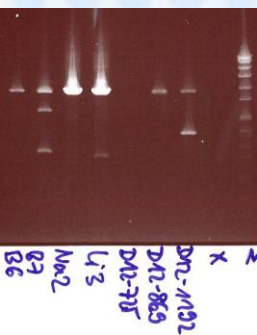


© 2007 Teresa Winslow
U.S. Govt. has certain rights



PAX-blod vs. korttidskultur

- varierende resultater på RNA fra PAX blod pga dårlig RNA kvalitet og analysemetoden
- artefakt pga illegitimt spleising => falsk positive svar
- degradering eller lav dose av transkript med tidelig stoppkodon (pga spleisefeil, frameshiftmutasjoner, nonsensemutasjoner) => falsk negative svar
- påliteligere resultater
- enklere analyse
- opprinnelig spleising gjenopprettes under korttidscellekultur, mindre artefakt
- preservering av transkript med tidelig stoppkodon med/gjennom translasjonsheggeren puromycin i cellekultur, tydeligere resultater
- øke deteksjonsraten



Design

- med omhu i forhold til
 - vurdering av alternative transkript/isoformer
 - amplifisering av helet genet med en gang eller i overlappende fragment (2-4 kb)
 - primerplassering (SNPs)
 - onestep/tostep (Superscript III + Platinum High Fidelity polymerase)
 - agarosegelsjekk
 - direkte Sanger sekvensering gir mindre artefakt



sekvensanalyse

- finnes det heterosygotier på DNA nivå?
- finnes dem igjen på RNA/cDNA nivå?
- hvis heterosygotier er bort på cDNA nivå
 - ligger primere på en SNP som kan føre til allel dropout?
 - ekspressjonsanalyse
- før oversikt over alternative transkript
- Bekreft funn på DNA-nivå

Resultater

- God RNA-kvalitet, konsentrasjon $>30\text{ng}/\mu\text{l}$: gode resultater
- Puromycin hemmer degradering effektiv
- Svartid NF1 2-4 uker
- Funn av deep-intron-varianter
- Funn av mutasjoner som var ikke synlig/oversett på DNA-nivå
- Bekreftelse av MLPA-funn
- Funksjonell analyse inkludert: noen stopppmutasjoner påvirker spleising




begrensninger/restriksjoner/ ulempes

- funksjonelle analysen omfatter kun kodende regionen plus primerområde (ikke promoter og 3'utr)
- mutasjoner i primerområde fører til alleldropout, dvs vi må avvise analyser når det foreligger VUSer i primerområde
- 2% av prøvene ga dårlig RNA-utbytte, måtte rekvirere ny blodprøve
- holdbarhet heparinblod og prøvetaking



Referanser

- Mutation Analysis of the NF1 Gene by cDNA-based Sequencing of the Coding Region. Ludwine Messiaen and Katharina Wimmer, 2011. 
- Analysis and Interpretation of RNA Splicing Alterations in Genes Involved in Genetic Disorders. Maaïke P.G. Vreeswijk and Heleen M. Van der Klift, 2012.
- The Nonsense-Mediated Decay RNA Surveillance Pathway. Yao-Fu Chang, J. Saadi Imam, and Miles F. Wilkinson. 2007.