

Š. Pospíšilová (1), A. Brisuda (2), V. Soukup (3), J. Hrbáček (2), O. Čapoun (3), J. Mareš (4), E. Pazourková (1), M. Koraběná (1), A. Hořínek (1), T. Hanuš (3), M. Babjuk (2)

1 Ústav biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN, Praha; 2 Urologická klinika 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Motol, Praha
3 Urologická klinika 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné Fakultní nemocnice, Praha; 4 Ústav biologie a lékařské genetiky 2. LF UK, Praha

Cíl:

MikroRNA (miRNA) jsou krátké nekódující RNA molekuly, které ovlivňují expresi genů a tím se podílí na mnoha fyziologických i patologických procesech. Cílem práce bylo nalezení panelu miRNA detekovatelných v lidské moči, které mají potenciální význam v diagnostice pacientů s karcinomem močového měchýře (KMM) a stanovení jejich prognózy.

Metodika:

Celkem byla vyšetřena moč od 61 probandů. Získáno bylo 15 kontrol a 46 pacientů s KMM různých stádií (Tab.1, Tab.2). Moč byla vždy sterilní (negativní kultivace), odebírána standardizovaným způsobem. V první části analýzy bylo u každého vzorku moči vyšetřováno najednou celkem 381 miRNA na TaqMan MicroRNA Array (Foto 1, Graf 1). Získané výsledky byly zpracovány ve druhé části analýzy, ve které byly použity TaqMan MicroRNA Assays pro jednotlivé miRNA (Foto 2, Graf 2). U obou analýz byla použita relativní kvantifikace metodou real-time PCR. Pro normalizaci míry exprese byly použity tři miRNA vybrané geNorm analýzou v rámci programu qBase⁺ (miR-191, miR-28-3p a miR-200b). Ke statistickému zpracování byl použit Mann-Whitney v U test s Benjamini-Hochbergovou korekcí.

Výsledky:

V první části analýzy bylo identifikováno celkem 58 miRNA s významným rozdílem v expresi mezi kontrolami a pacienty ($p < 0,05$). Deset z těchto miRNA bylo verifikováno druhou částí analýzy (Tab. 3). Šest miRNA bylo exprimováno 3-10x více u kontrol, 4 miRNA byly exprimovány 2-4x více u pacientů s KMM (Graf 3).

Závěr:

Nalezli jsme celkem 10 miRNA vykazujících vysoký rozdíl v expresi mezi kontrolami a pacienty. Tyto miRNA budou dále analyzovány v rámci validační studie a testovány na jejich schopnost predikce stádia nebo buněčné diferenciace a na schopnost predikce časné recidivy po transuretrální resekci.

Tab. 1: Charakteristika souboru

	Pacienti	Kontroly
n	46	15
Muži	31	9
Ženy	15	6
Věk (rozdíl)	39 - 84	27 - 80

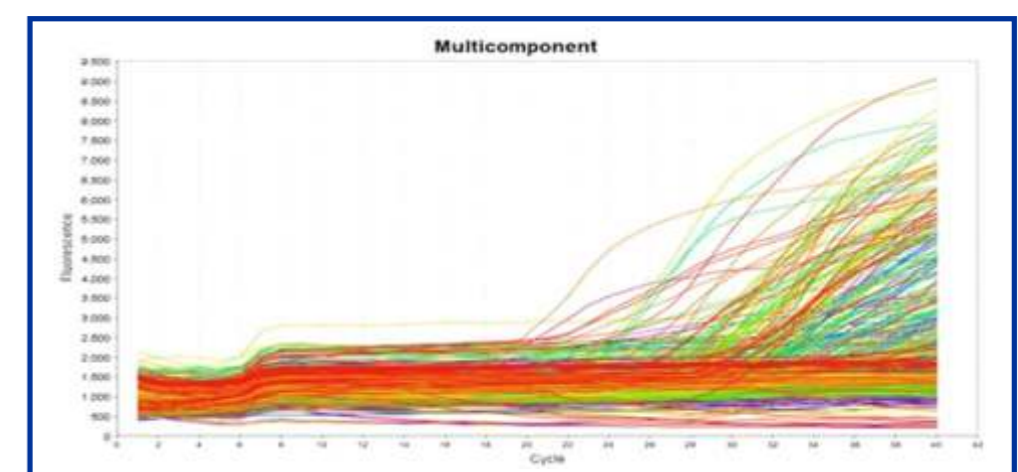
Tab. 2: Rozložení stádií

Stádia (n)	
pTa	8
pT1	14
pT2	9
pT3	8
pT4	7

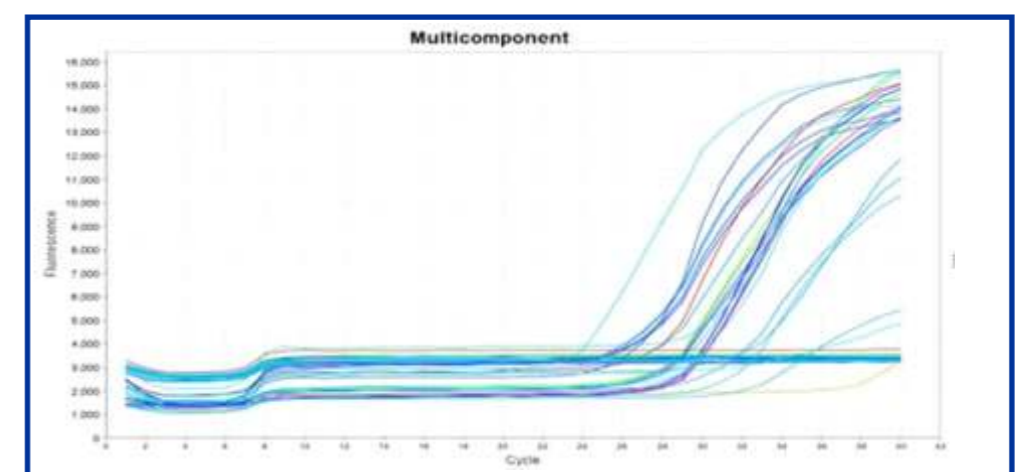
Tab. 3: Rozdíl poměru exprese mezi kontrolami a pacienty

MikroRNA	Hodnota p	Poměr exprese kontrola/pacient
let-7c	0,00009	9
125b	0,00009	10
204	0,00009	8
425	0,0002	0,4
532-3p	0,0003	3
99a	0,0003	6,4
miR-16	0,0003	0,3
30b	0,0003	3,6
93	0,0005	0,5
199a-3p	0,02	0,4

Graf 1: Příklad amplifikační křivky jednoho pacienta z micro array karty s 384 miRNA. Na vodorovné ose jsou znázorněny jednotlivé cykly polymerázové řetězové reakce, na svislé ose množství amplifikované miRNA. V číselném řádku stoupá křivka pro konkrétní miRNA, čím je jí ve vzorku obsaženo více.



Graf 2: Amplifikační křivky miRNA totožného pacienta z 16 assayů



Graf 3: Box plot relativní kvantity exprese jednotlivých miRNA ukazující rozdíly mezi pacienty a kontrolami.

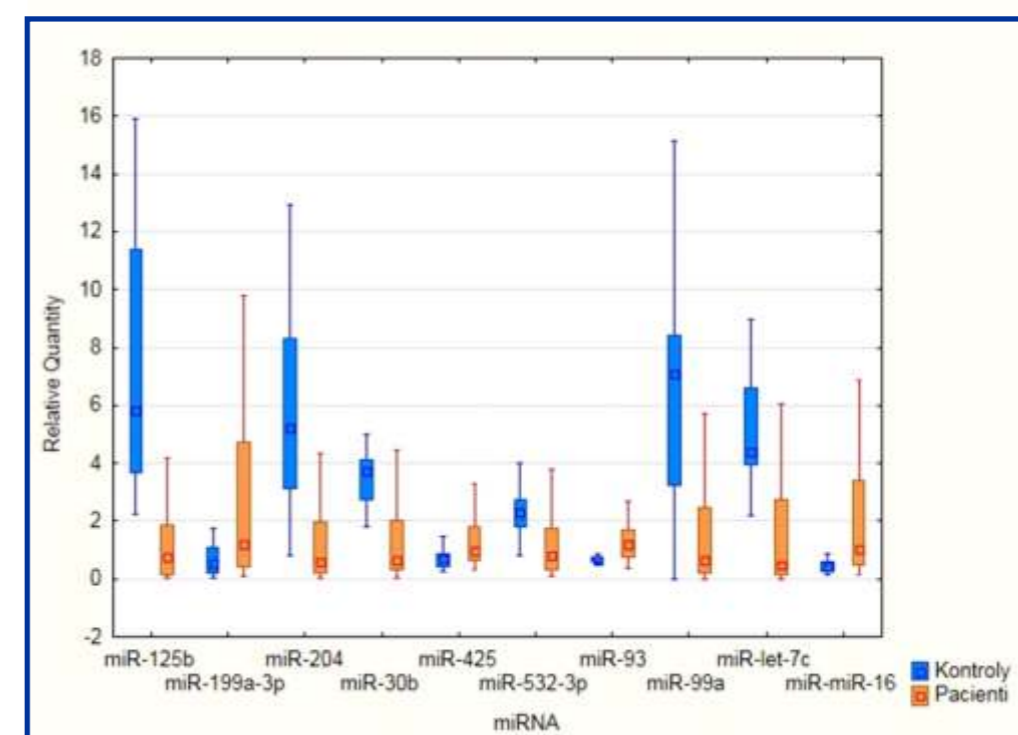


Foto 1: Destička TaqMan MicroRNA Array. Reverzní transkripce probíhá v jedné zkumavce pro všechny miRNA najednou. Následuje preamplifikace cDNA a poté PCR na kartě, kde je 384 jamek. Každá jamka obsahuje 1 µl reakční směsi. Tato metoda je méně přesná než TaqMan MicroRNA Assays.

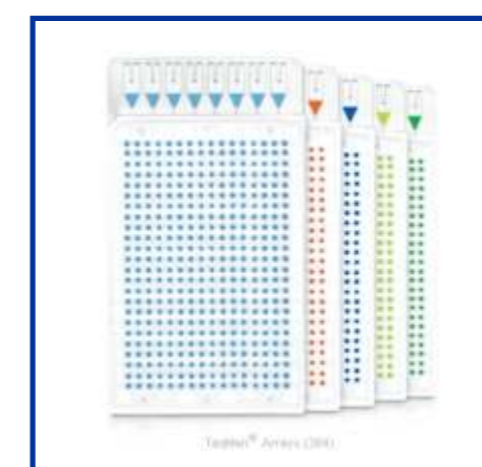


Foto 2: TaqMan MicroRNA Assays. Jedná se o 96-jamkové destičky. Reverzní transkripce probíhá zvlášť pro každou miRNA v samostatné zkumavce. Preamplifikace cDNA není třeba. PCR probíhá na destičce, kde v každé jamce je 15 µl reakční směsi.

