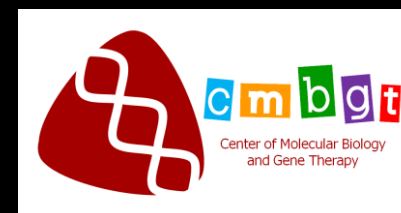
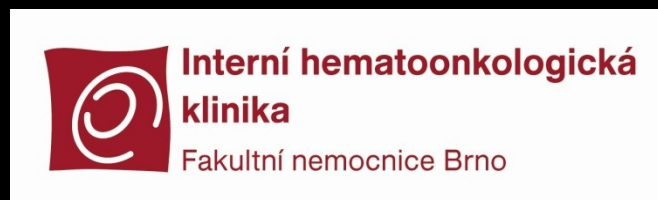




LÉKAŘSKÁ FAKULTA MASARYKOVY UNIVERSITY
Interní hematologická klinika LF MU a FN Brno
Centrum molekulární biologie a genové terapie



Moderní metody analýzy genomu

Čipové technologie II

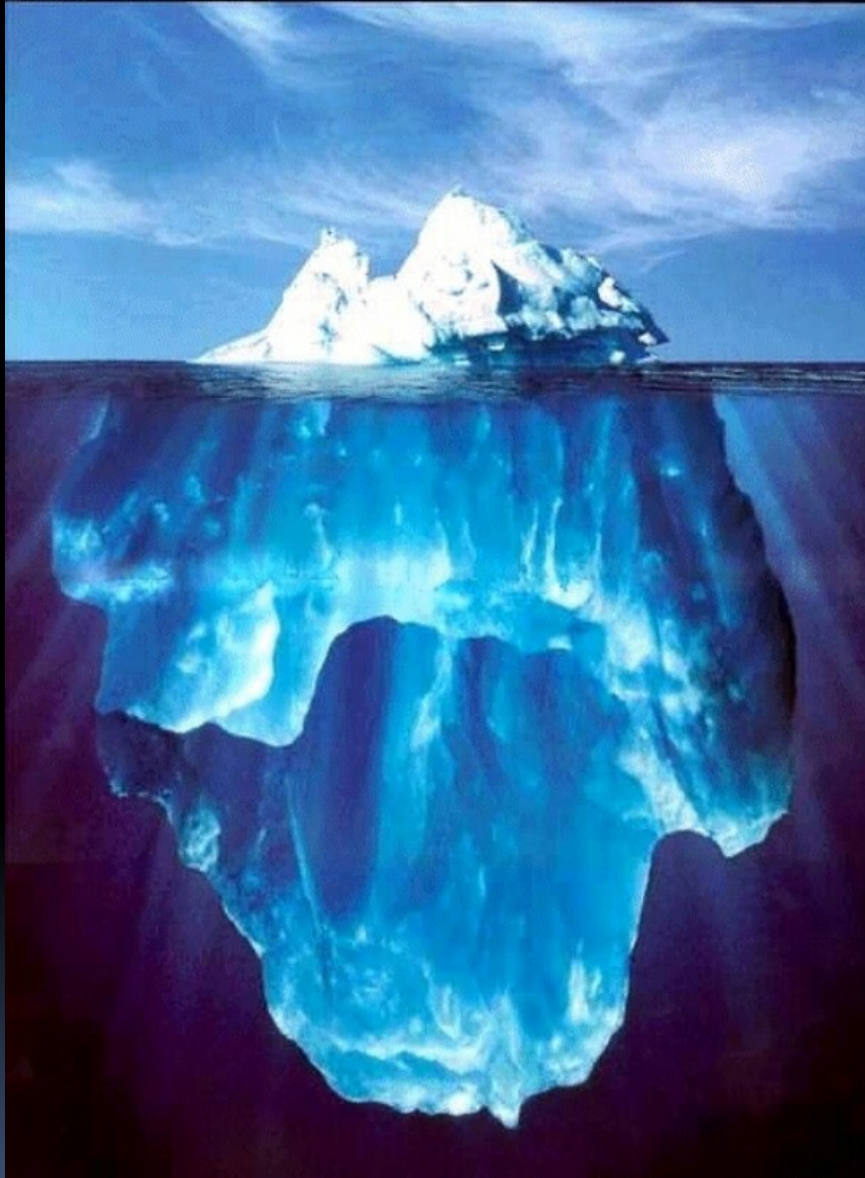
10.3.2011

Jitka Malčíková



Čipové aplikace

- Analýza genomových aberací, genotypizace
 - CGH, SNP čipy
 - Resekvenační čipy
- Exprese
 - mRNA, miRNA
 - Proteiny
 - Buňky, tkáně
- Epigenomika
 - Mapování vazby proteinů na DNA (ChIP-on-chip)
 - Mapování metylované DNA (MeDIP-chip)



Genom (20-25 tis genů)

- Transkripce
- Posttranskripční modifikace
- Alternativní sestřih

Transkriptom

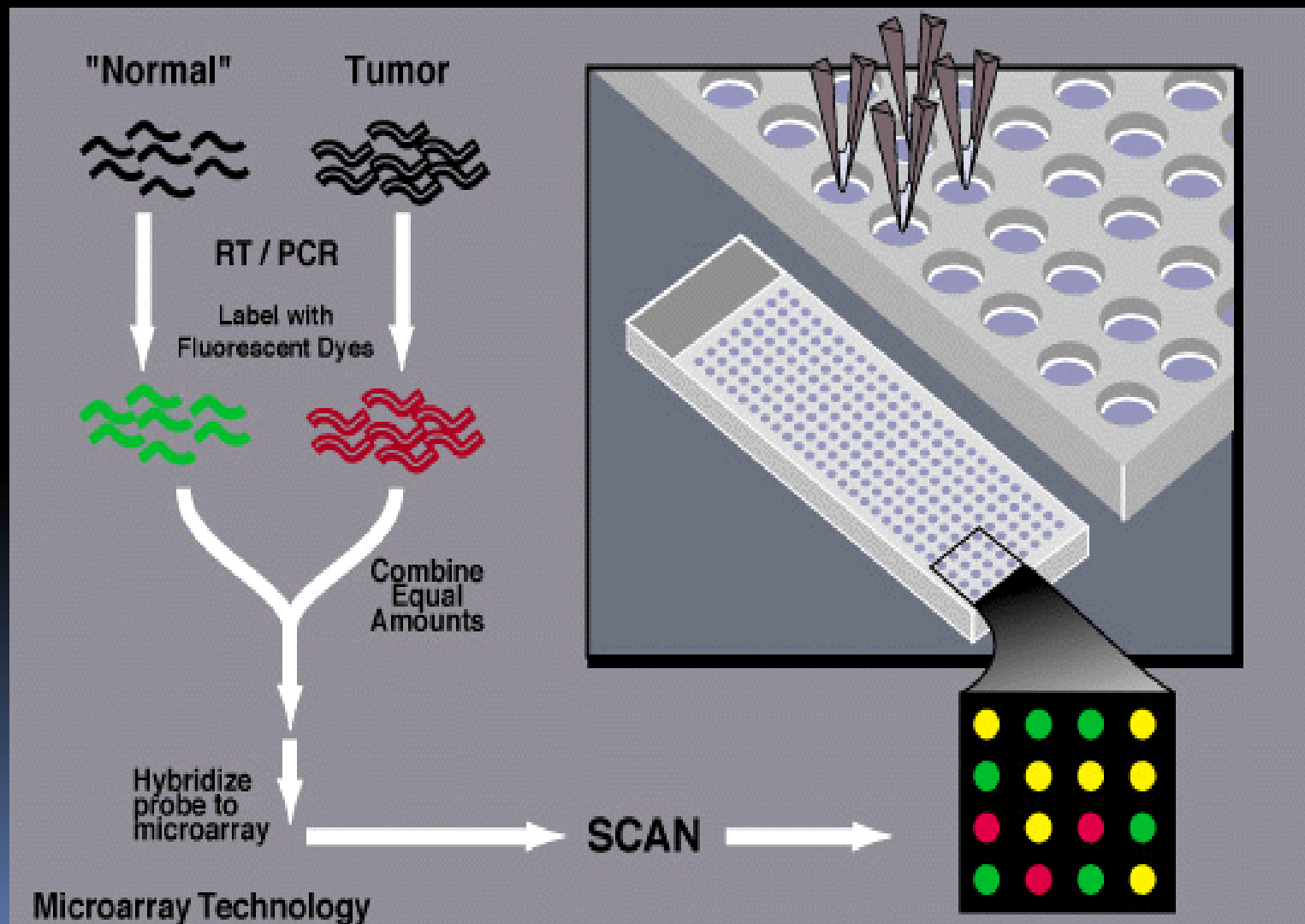
- Translace
- Posttranslační modifikace
- Alternativní konformace

Proteom (miliony proteinů)

- Dynamický systém – odráží momentální stav buňky
- Hladina proteinu často nekoreluje s hladinou mRNA

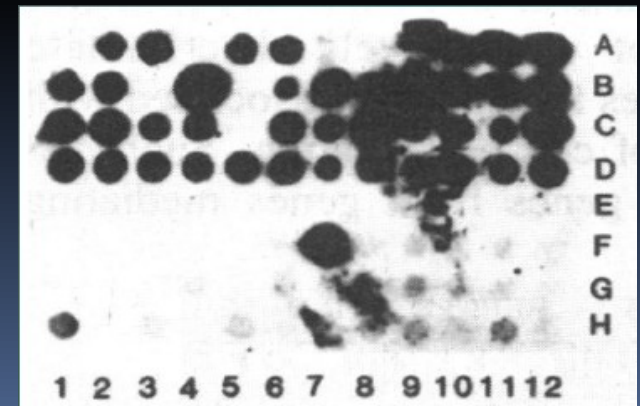
Expresní čipy - princip

 **Buňky kontrolní**  **Buňky sledované**



Historie

- 1987 Kulesh et al. - cDNA knihovna na papírovém filtru
- Přelom 80./90. - E. Southern – in-situ syntéza oligonukleotidů
- 1991 – Fodor et al. - světlem řízená paralelní syntéza
- 1995 – Schena et al. - cDNA expresní microarray
- 1996 – lidská cDNA microarray
- 1997 – celogenomová (kvasinka)
 - cDNA microarray
- 1997 – celogenomová (kvasinka)
 - oligonukleotidová microarray



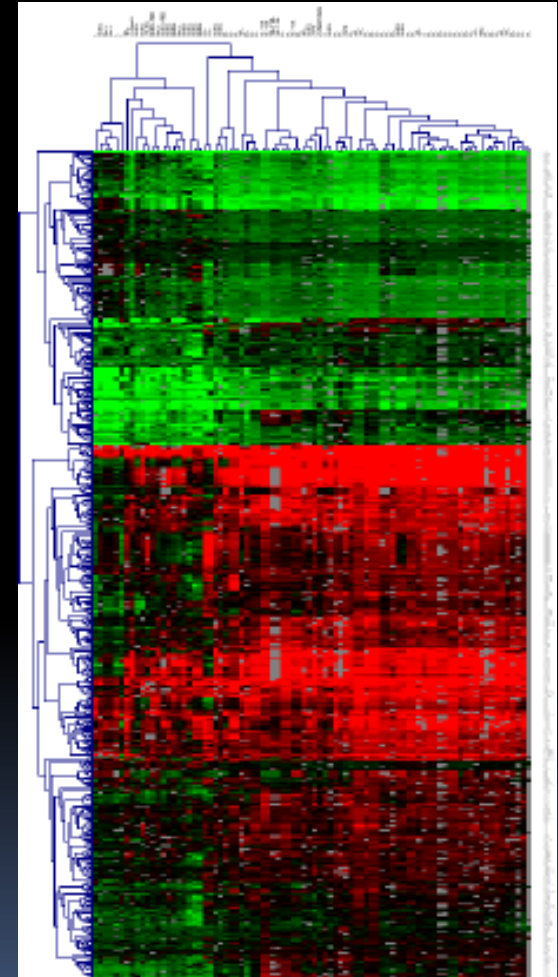


Expresní čipy - typy

- Studium exprese mRNA (miRNA)
 - Celogenomové
 - Exonové (whole transcript)
 - Cílené – konkrétní dráhy, diagnózy
- High- i low- density
- Sondy – krátké i dlouhé oligonukleotidy, cDNA
- Sklíčka, cartridge, mikrokuličky, membrány
- Jedno- a dvou- kanálové

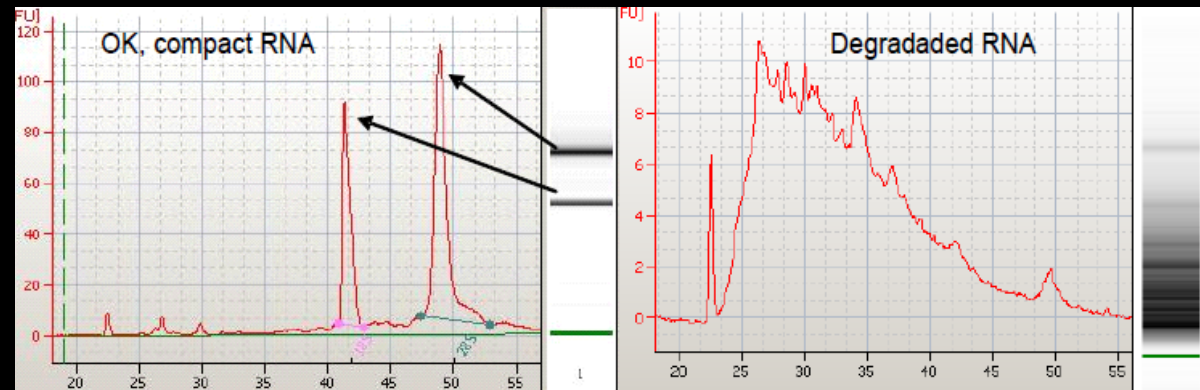
Aplikace

- Studium efektů stimulů na genovou expresi
 - Chemikálie (např. léčiva)
 - Fyzikální faktory (záření)
 - Gene knock-out (siRNA)
 - Gene transfection (např. transkripční faktory, mutantní alely)
- Studium rozdílů mezi vzorky
 - Tkáně a orgány
 - Diagnózy



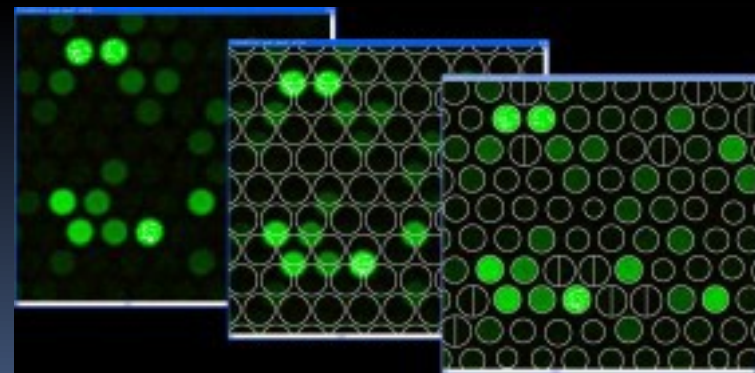
Postup

- Izolace RNA
- Kvantita, kontrola kvality
- Přepis RNA
 - Oligo-dT priming
 - Kvalitní RNA
 - 3' biased sondy
 - Random priming – hexa-, okta-, nona-mery
 - I degradovaná RNA
 - Celý transkript

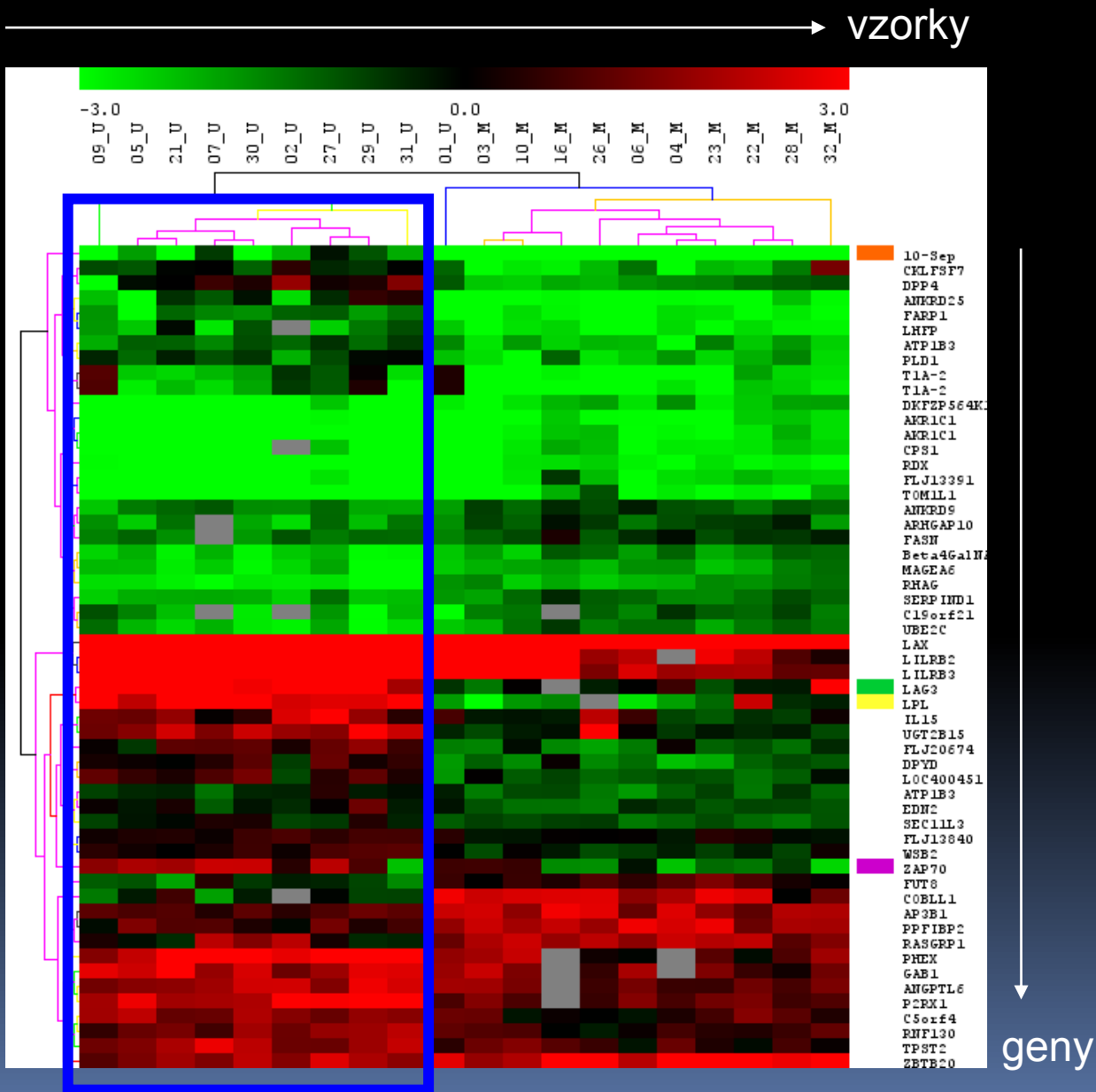


- Značení - fluorescence
- Hybridizace, odmytí
- Skenování
- Analýza dat

- Zpracování obrazu
- Normalizace
- Klastrová analýza (supervised, unsupervised)
- Integrace s dalšími daty – gene ontology, genové interakce, funkční vztahy

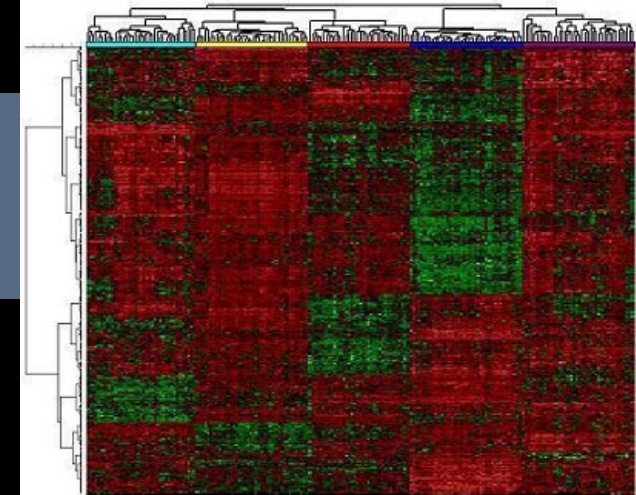


Výsledky

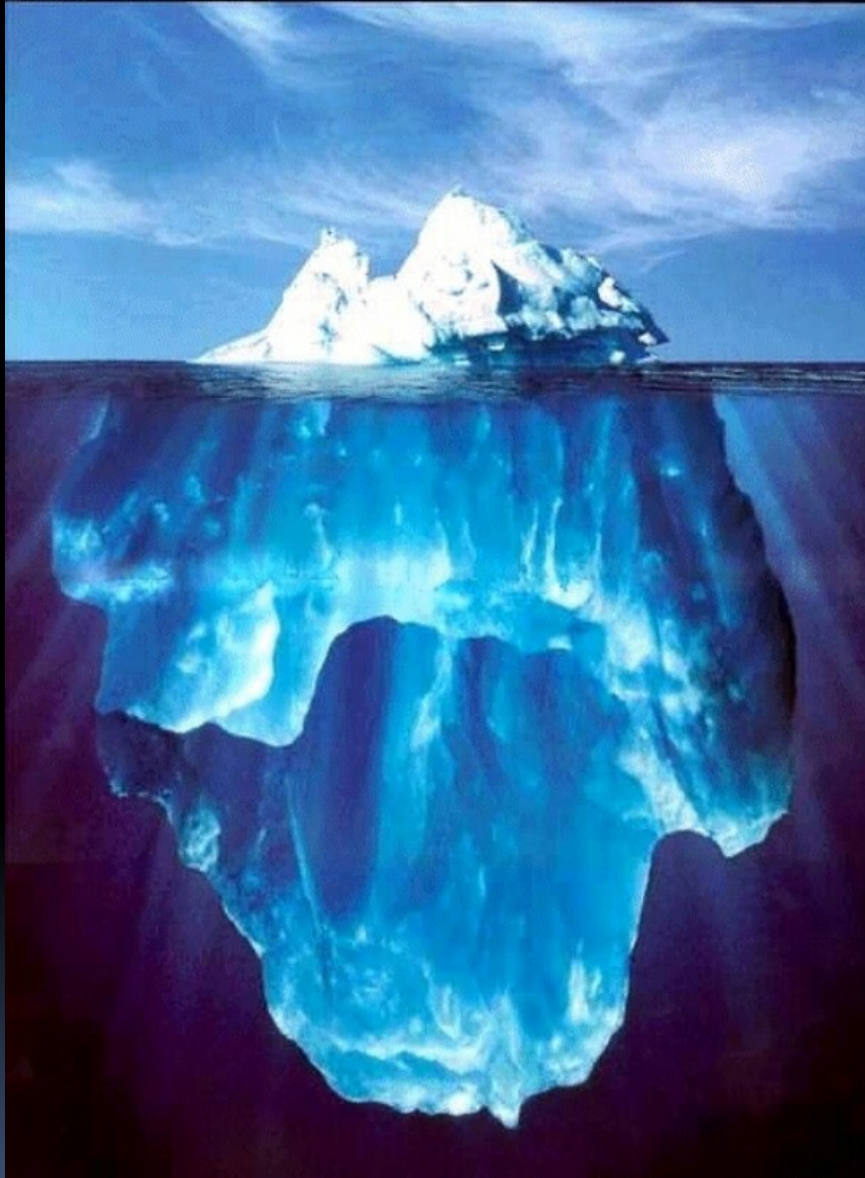


- Identifikace genů rozdílně exprimovaných u konkrétních skupin vzorků
- Ověření pomocí real-time PCR

Využití



- Pochopení molekulárních mechanismů
- Studium biomarkerů – diagnostické, prognostické, prediktivní
- Komerčně dostupné pro *in vitro* diagnostiku
 - FDA cleared / IVDMA (In Vitro Diagnostic Multivariate Index Assays)
 - MammaPrint®
 - Stanovení rizika metastázování po chirurgickém odstranění nádoru prsu u pacientek v časných stádiích
 - nízké riziko – hormonální terapie X vysoké riziko – agresivnější léčba (chemoterapie)
 - 70 genů
 - Tissue of Origin Test
 - Identifikace původu nádorů – metastáze, nediferencované nebo málo diferencované nádory
 - > 2000 genů
 - Řada dalších bez certifikace pro IVD (ColoPrint....)



Genom (20-25 tis genů)

- Transkripce
- Posttranskripční modifikace
- Alternativní sestřih

Transkriptom

- Translace
- Posttranslační modifikace
- Alternativní konformace

Proteom (miliony proteinů)

- Dynamický systém – odráží momentální stav buňky
- Hladina proteinu často nekoreluje s hladinou mRNA



Proteomika

- Proteom - soubor všech proteinů v daném biologickém systému (buňka, tkáň, organizmus)
- Klinická proteomika - studuje celkový buněčný proteom v klinických vzorcích
 - Cíl - identifikovat a charakterizovat proteiny zapojené do vzniku a vývoje onemocnění

Proteomické metody

- Dvourozměrná gelová elektroforéza (2-DE)

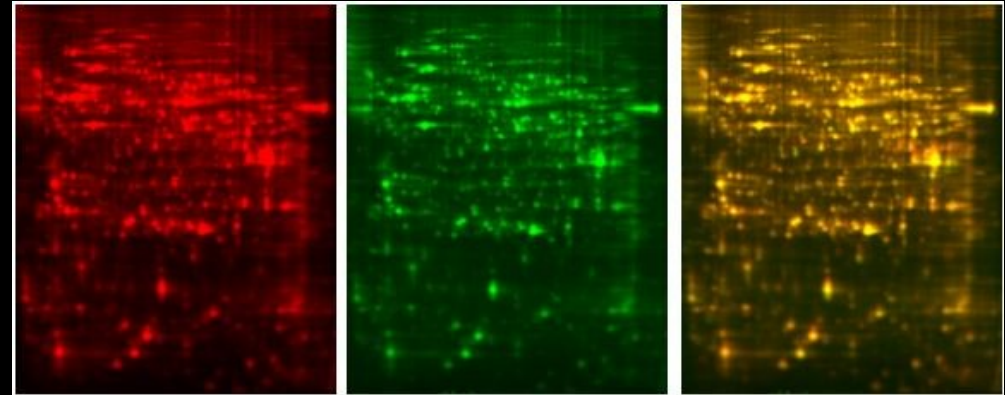
- Časově, finančně náročné
- Dvoubarevné značení – DIGE

- 2D Kapilární elektroforéza

- Hmotnostní spektrometrie

- Proteinové čipy

- Vysokokapacitní
- Poměrně jednoduché zpracování
- Expresní i funkční studie
- Vyžadováno minimální množství vzorku



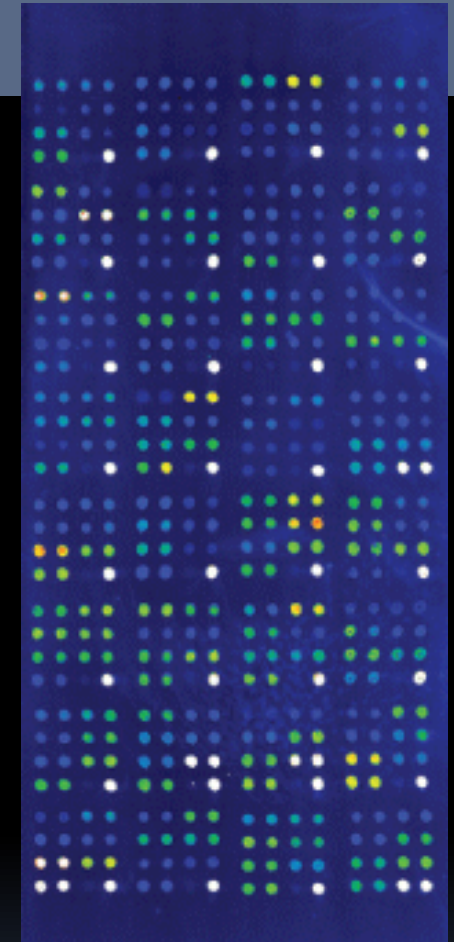
Proteinové čipy

■ Expresní

- stanovení přítomnosti a koncentrace proteinů v komplexních vzorcích
 - Protilátkové čipy
 - Lyzátové čipy
 - Antigen čipy

■ Funkční

- studium interakce proteinů s jinými molekulami
 - proteiny, peptidy, nízkomolekulární látky, oligosacharidy, DNA



Princip proteinových čipů



- Vazba protilátka-antigen - mikrosopot ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
 - Systém využívající malé množství vázané protilátky a malého objemu vzorku je citlivější než systém se stonásobně větším objemem materiálu
 - Citlivost řádově ve femtomolech - 10^6 molekul/ml
 - Stanovení koncentrace analytu ve vzorku
 - Koncentraci přímo odpovídá množství vázaného analytu

(Ekins RP, J Pharm Biomed Anal. 1989)

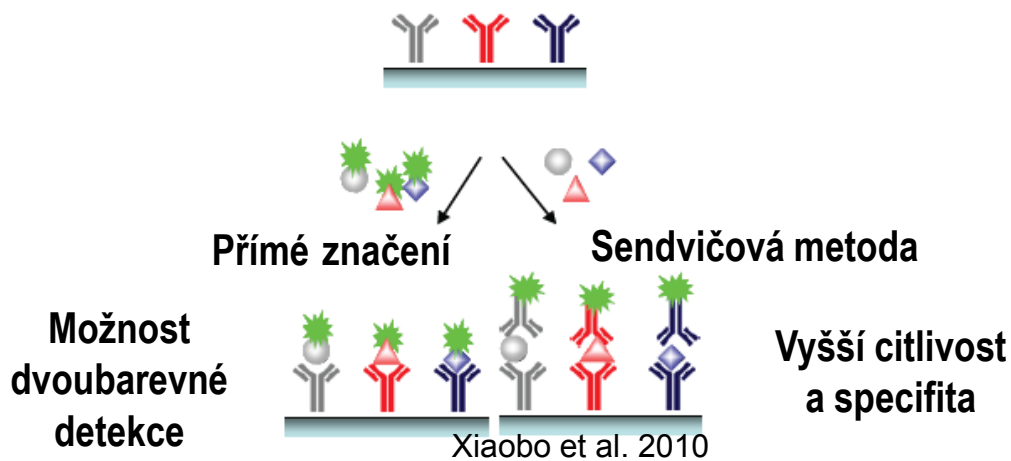
Princip proteinových čipů

- Stovky – tisíce proteinů imobilizovaných ve formě mikrospotů na pevném povrchu
 - membrány (polystyrenové, PVDF - polyvinyliden fluorid, nitrocelulosové)
 - standardní mikroskopická sklíčka
 - s chemicky modifikovaným povrchem (poly-lysin, aldehydické skupiny)
 - potažená membránou
- Detekční metody
 - Nejčastěji fluorescence
 - Enzymaticky – značení alkalickou fosfatázou, křenovou peroxidázou
 - Chemiluminiscence
 - Radioaktivita
 - Zvýšení signálu – značení biotinem – vazba na značený streptavidin
 - Hmotnostní spektrometrie

Čipy pro stanovení antigenů

Protilátkové čipy

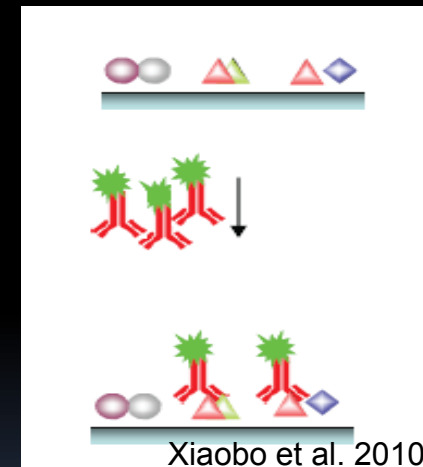
- Přímý formát (FPA- forward phase arrays)
- Na povrchu spotované protilátky
- Inkubace se vzorkem



- Detekce stovek antigenů ve vzorku
- Expresní profilování – „large-scale“ monitorování proteinové exprese
- Cílené na určité buněčné procesy (buněčný cyklus, cytokiny...)

Lyzátové čipy

- Zpětný formát (RPA – reverse phase arrays)
- Na povrchu spotované vzorky (proteinové, tkáňové lyzáty, sérum)
- Inkubace se specifickými značenými protilátkami

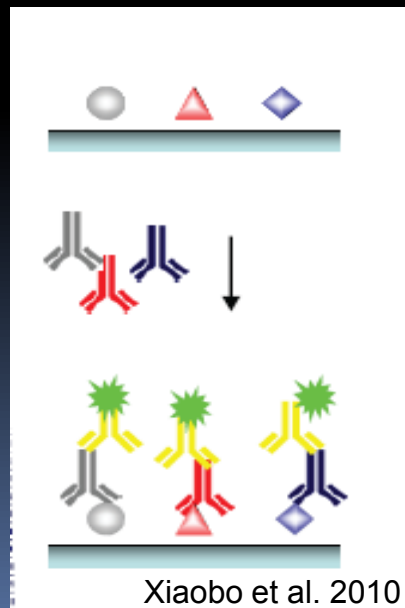


- Srovnání exprese až desítek antigenů u stovek různých vzorků
- Nevýhoda – malá hustota studovaných molekul ve spotu – pre-frafrakcionace pomocí 2D kapalinové chromatografie

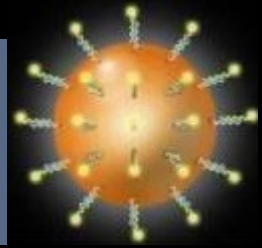
Čipy pro stanovení protilátek

Antigen čipy

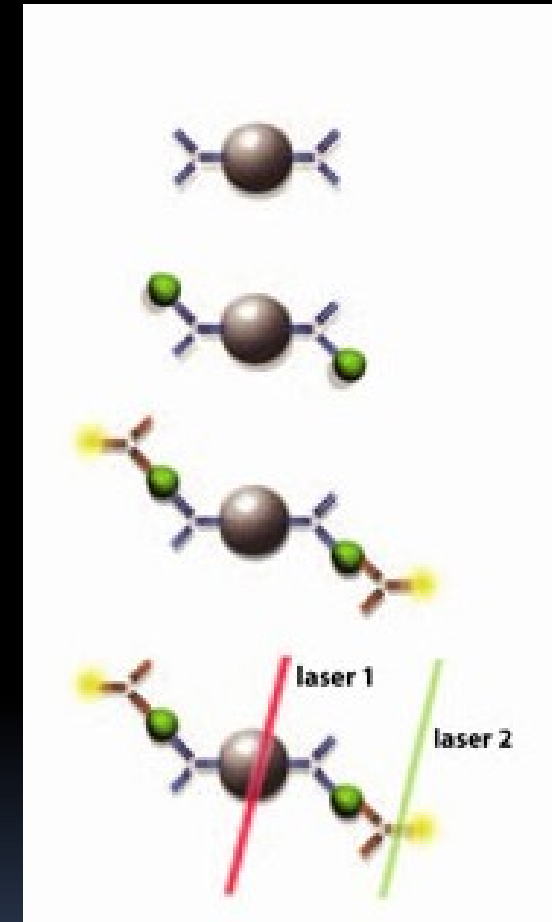
- Na povrchu spotované známé antigeny
 - syntetické proteiny, peptidy
- Inkubace se sérem obsahujícím studované protilátky
- Detekce přítomnosti protilátek ve vzorku, nejčastěji v séru



Bead array - mikrosféry



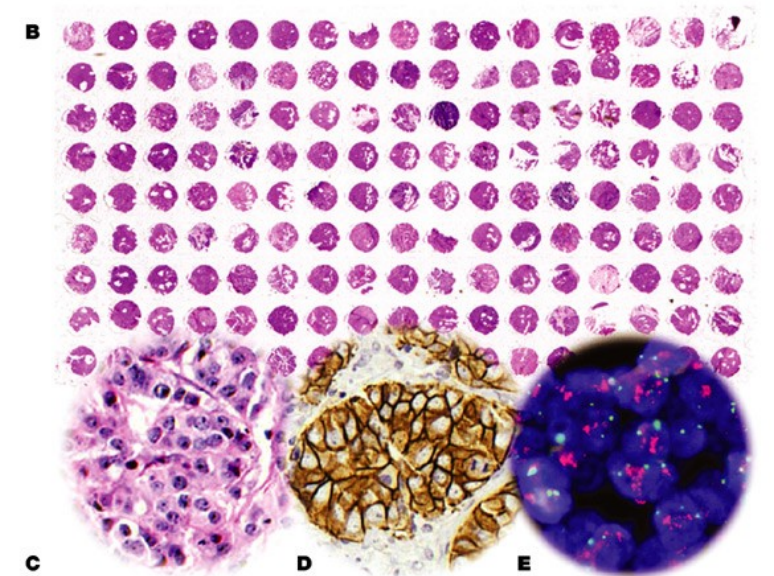
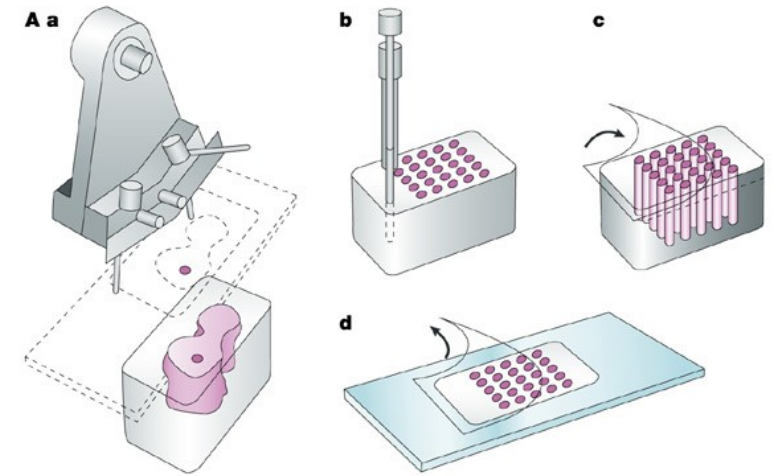
- průměr ~ 10 μm (velikost lymfocytu)
- polystyrenové nebo latexové kuličky
- „kódovány“ rozdílnými barvami nebo velikostmi
- Detekce - např. flow cytometricky
 - rozpoznávání rozdílně kódovaných mikrosfér
 - identifikace a kvantifikace proteinů ve vzorku
- Množství stanovovaných proteinů je limitováno počtem druhů mikrosfér (~100)
- Možnost automatizace
- Využití – cílené – zejména detekce cytokinů, ale např. i detekce fúzních proteinů a onkoproteinů



www.lucerna.chem.ch

Tkáňové čipy

- Varianta RPA čipů (zpětný formát)
- Spotují se celé vzorky tkání např. biopsických
- Inkubace se značenými protilátkami
- Velikost spotu 0,6 - 2mm



Buněčné čipy

- Přímý formát
 - Spotované protilátky
 - Inkubace s buněčnou suspenzí
 - Např. spotované CD molekuly – inkubace s leukocyty – charakterizace leukemických buněk
- „Transfekční čipy“ - buňky rostou na povrchu čipu s naspotovanou cDNA
 - Během růstu přijmou cDNA
 - Čip se spoty buněk exprimujících různé cizorodé proteiny
- Detekce
 - Přímou mikroskopicky na sklíčku
 - Další charakterizace značenými protilátkami

Funkční čipy

- Studium interakce s jinými molekulami
 - Inkubace s jinými proteiny, DNA, malými molekulami (oligosacharidy, terapeutika, ...)
- Studium posttranslačních modifikací
- Studium enzymatické aktivity
- Studium kofaktorů a inhibitorů
- Studium interakcí ligand-receptor



protein - DNA



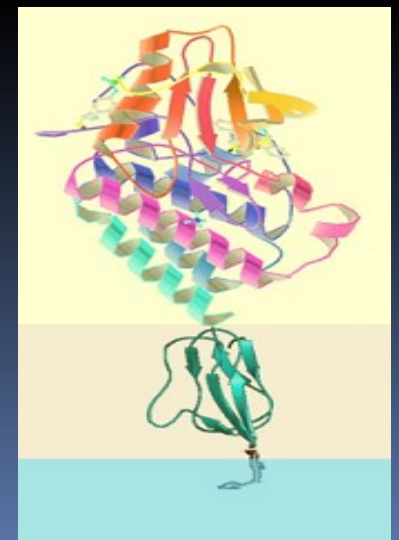
protein - protein



enzym - substrát

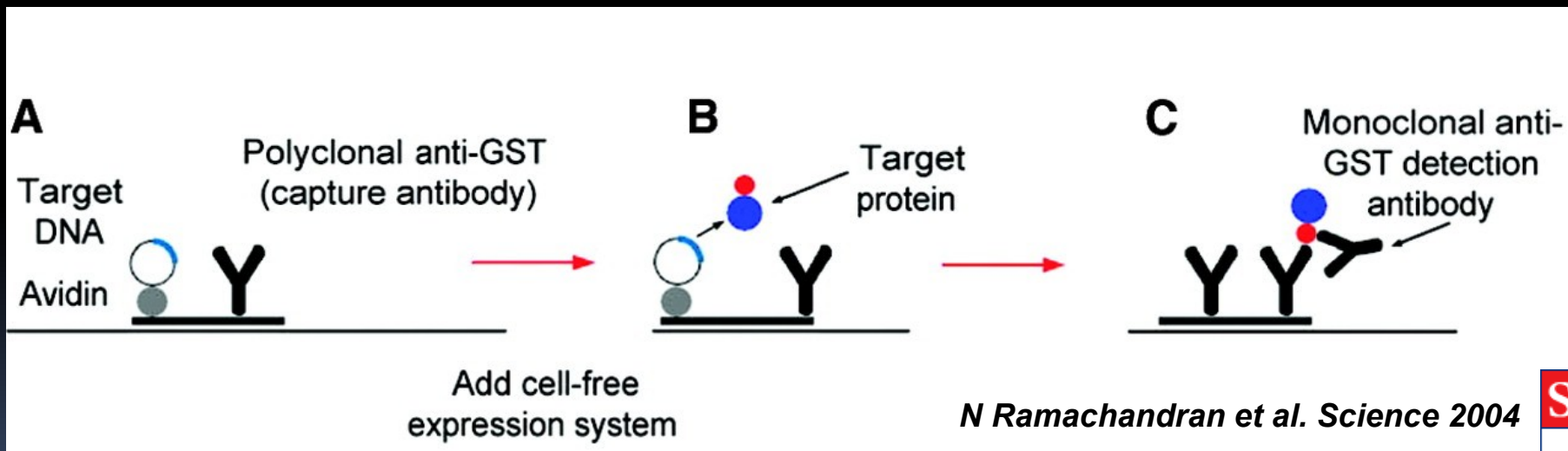
Spotovány nativní proteiny

- Potřeba zachování struktury a biologické aktivity
- Nespecifická vazba přímo na povrch
 - Adsorpce
 - Kovalentní vazba přirozených chemických skupin proteinu na upravený povrch
 - Aktivní část proteinu může být schovaná, problém zachování konformace
- Chemoselektivní vazba – připojení chemické skupiny na definovanou pozici proteinu → specifická reakce s komplementární chemickou skupinou na povrchu sklíčka
 - Orientovaná pozice na sklíčku
- Imobilizace přes specifický rekombinantní tag
 - Zachování orientace, konformace, funguje jako „spacer“



In situ syntetizované čipy

- „Samoskládací“ (Self-assembling)
- cDNA naspotovaná na sklíčku
 - *in vitro* translace
 - *in situ* imobilizace



Další typy funkčních čipů

- Doménové čipy
 - Spotovány pouze jednotlivé domény proteinu
 - Pochopení protein-proteinových interakcí
- Peptidové čipy
 - Inkubace s proteiny, DNA, malými molekulami (oligosacharidy, terapeutika, ...)
- Čipy s chemickými knihovnami
 - Inkubace s proteiny (enzymy, receptory...)
 - Studium inhibitorů, studium ligand-receptorových interakcí-
vyhledávání terapeutik

Typ čipu		Molekuly immobilizované na čipu	Stanovované molekuly	Inkubace	Počet spotů	Použití
expresní	protilátkové (přímý formát)	známé protilátky	antigeny	neznámý vzorek - proteinový lyzát	1000	proteinové profilování
	lyzátové (zpětný formát)	neznámý vzorek - proteinový lyzát	antigeny	známé protilátky	1000	proteinové profilování
	antigen čipy	známé antigeny	protilátky	neznámý vzorek – protilátky v séru	1000	stanovení přítomnosti protilátek v séru
funkční	protein-protein	známé proteiny v nativním, funkčním stavu nebo peptidy,		partnerské molekuly interagující s proteiny	100	studium interakcí proteinů s partnerským i molekulami
	protein-DNA, RNA					
	protein-nízkomolekulární látky					
	Enzym-substrát	chemické látky		nebo		



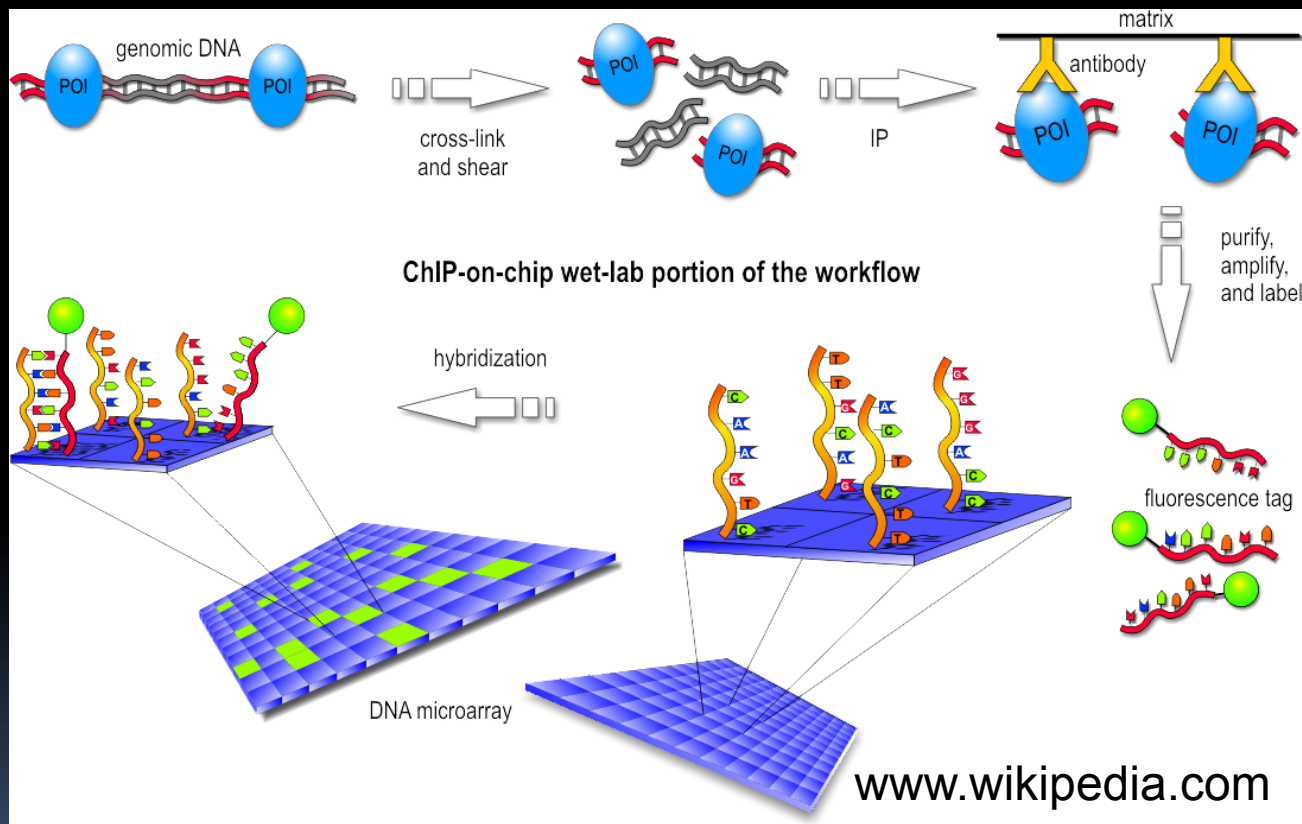
Využití

- Studium biomarkerů – diagnostické, prognostické, prediktivní
- Identifikace terapeutických cílů
- Detekce autoprotilátek, studium imunitní odpovědi

- *In vitro* diagnostika – více než u ostatních typů čipů
 - Nejčastěji diagnostika autoimunitních onemocnění
 - Diagnostika infekčních onemocnění

ChIP-on-chip (Chromatin immunoprecipitation)

- Mapování vazby proteinů na DNA
 - Např. transkripční faktory



- MeDIP-chip (Methyl-DNA immunoprecipitation)
 - Stejný princip – imunoprecipitace s protilátkou proti 5-metyl-cytosinu