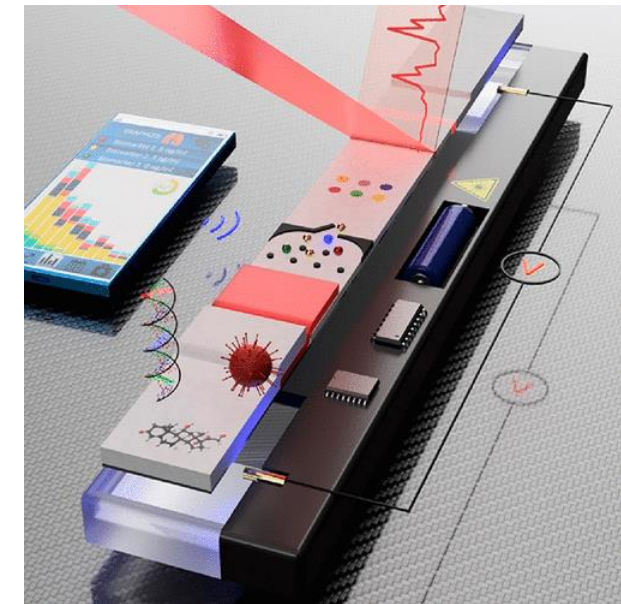
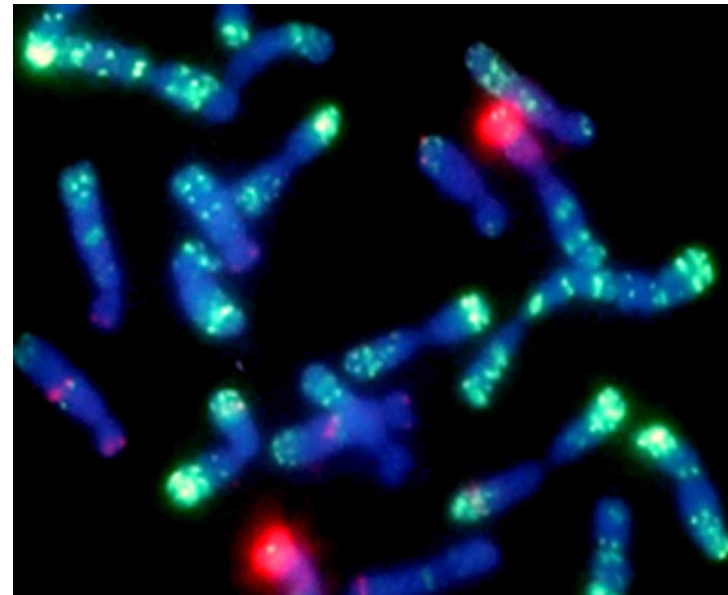
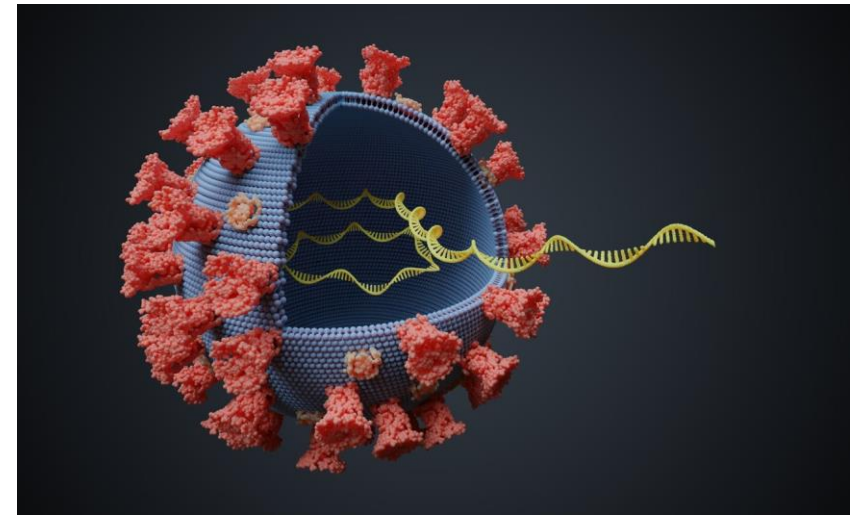


Základy klinické onkologie

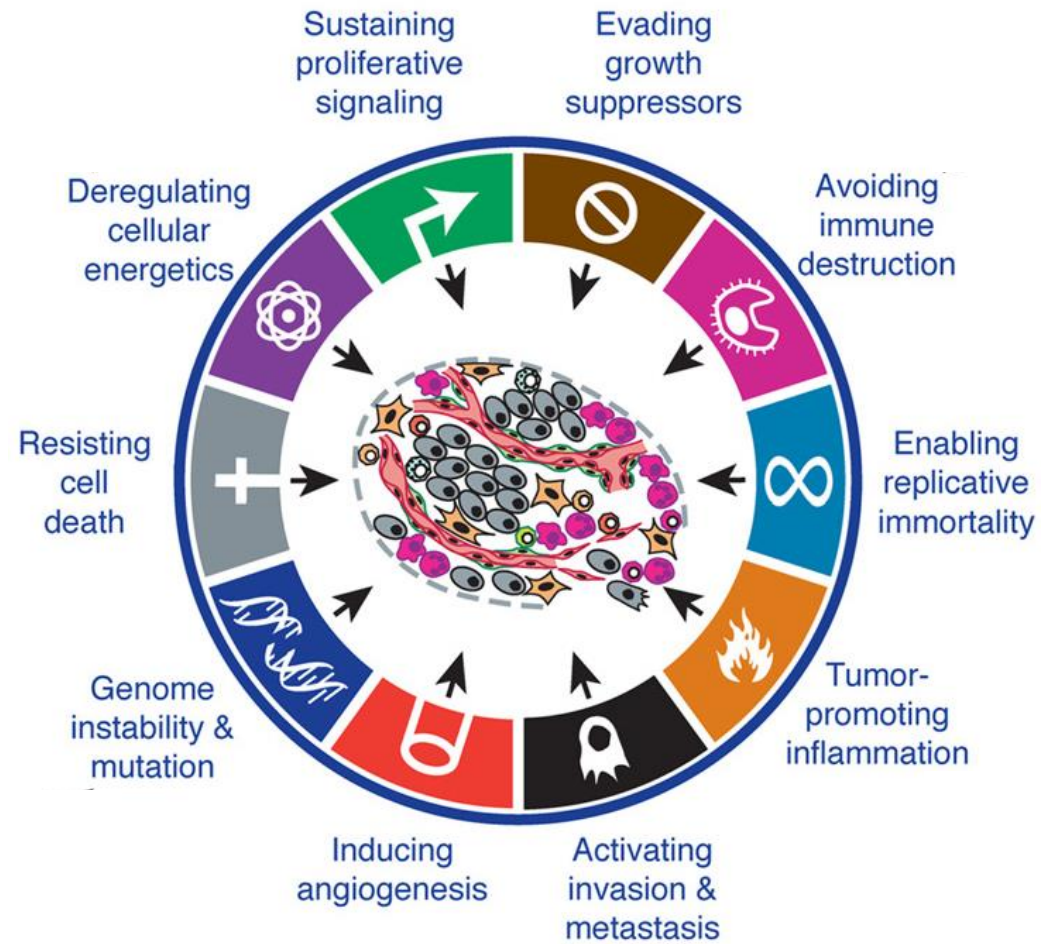
Experimentální metody v onkologii



Martin Bartošík, MOÚ

13.3.2024

Opáčko

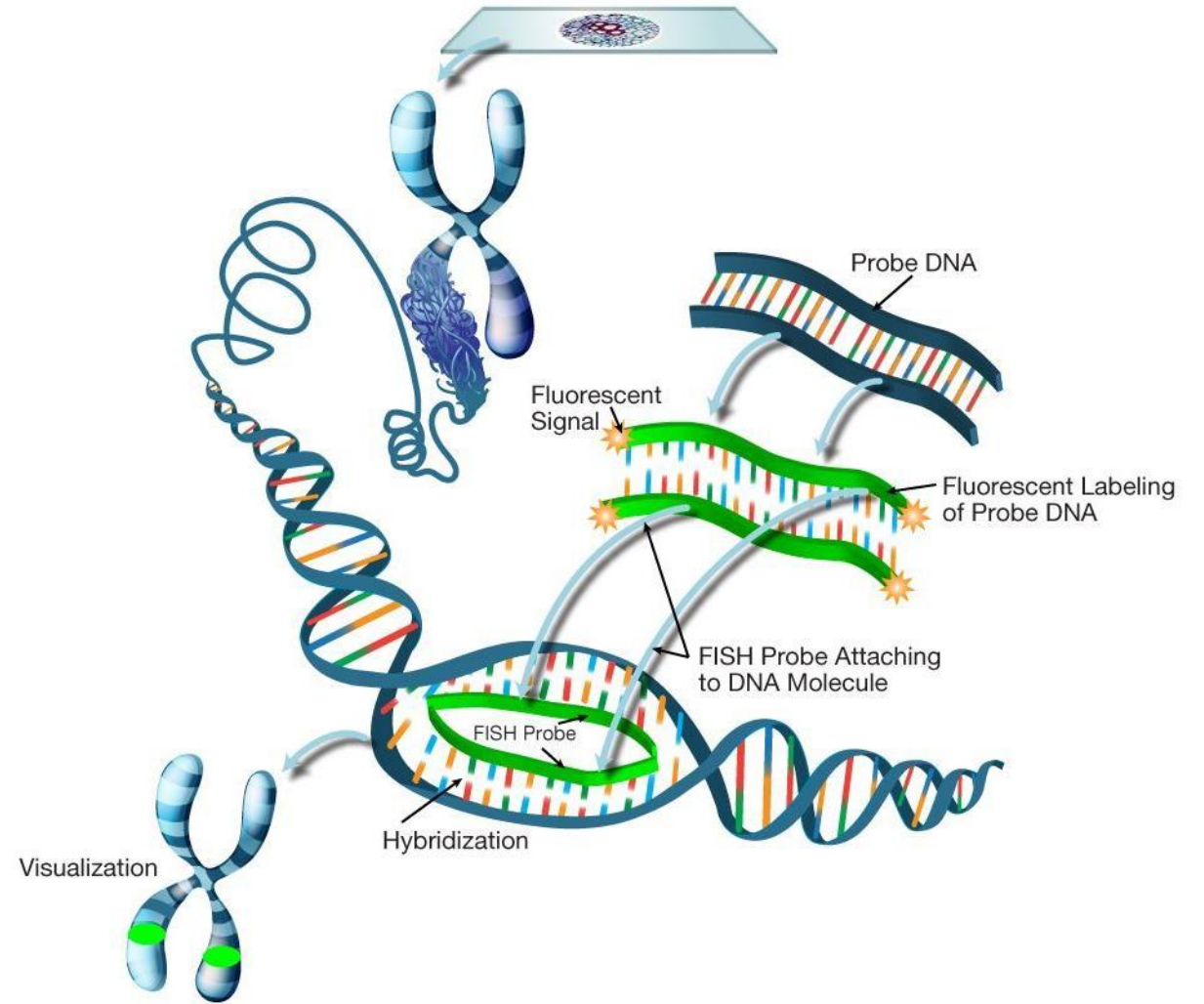


Obsah

- FISH
- PCR a varianty
- Izotermální amplifikační metody
- Sekvenování
- Detekce mutací
- Detekce DNA metylace
- Lateral flow assay

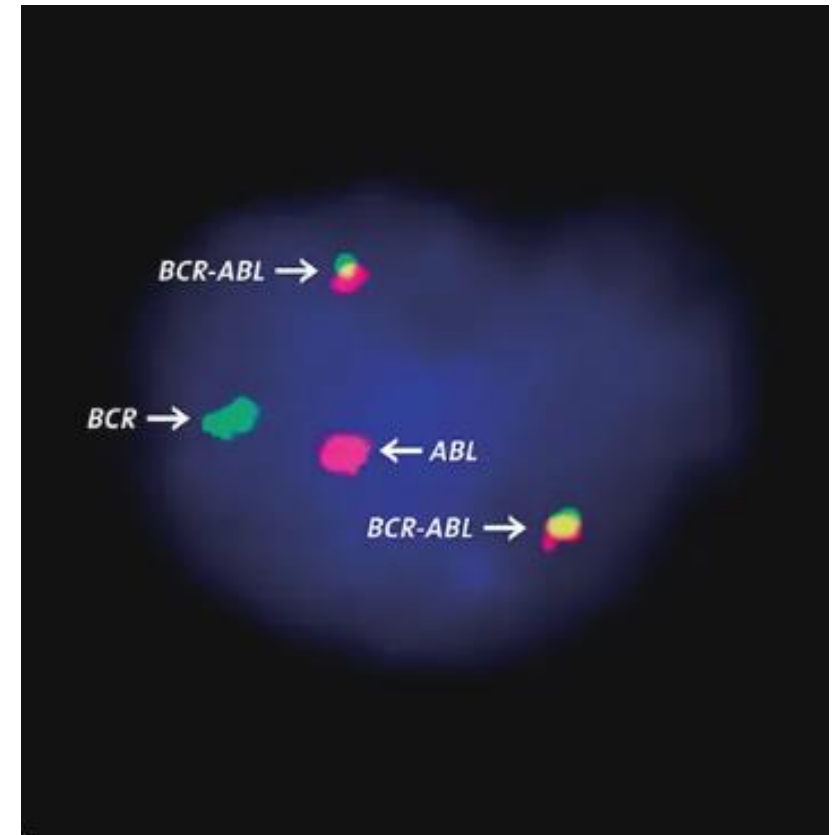
FISH

- Fluorescence in situ hybridization
- Lokalizace specifických sekvencí na chromozomech pomocí fluorescenčního mikroskopu
- Genetické poradenství, dědičné onemocnění, identifikace druhů (evoluční podobnost)



FISH

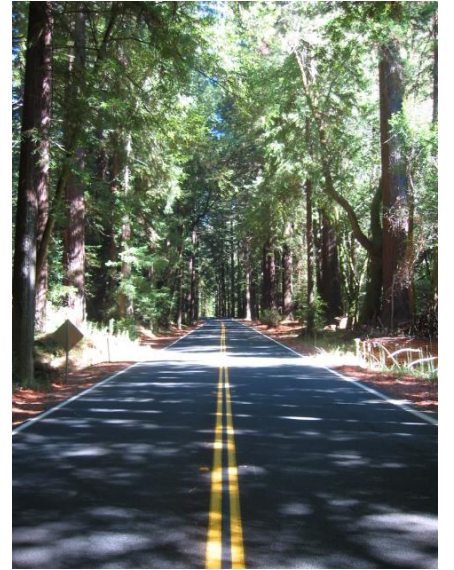
- Fúze genů na dvou různých chromosomech
- BCR (chromosom 22) a ABL (chromosom 9)
- BCR::ABL fúze → Filadelfský chromosom
- Diagnostika chronické myeloidní leukemie (CML) nebo specifického typu akutní lymfoblastické leukemie (ALL)



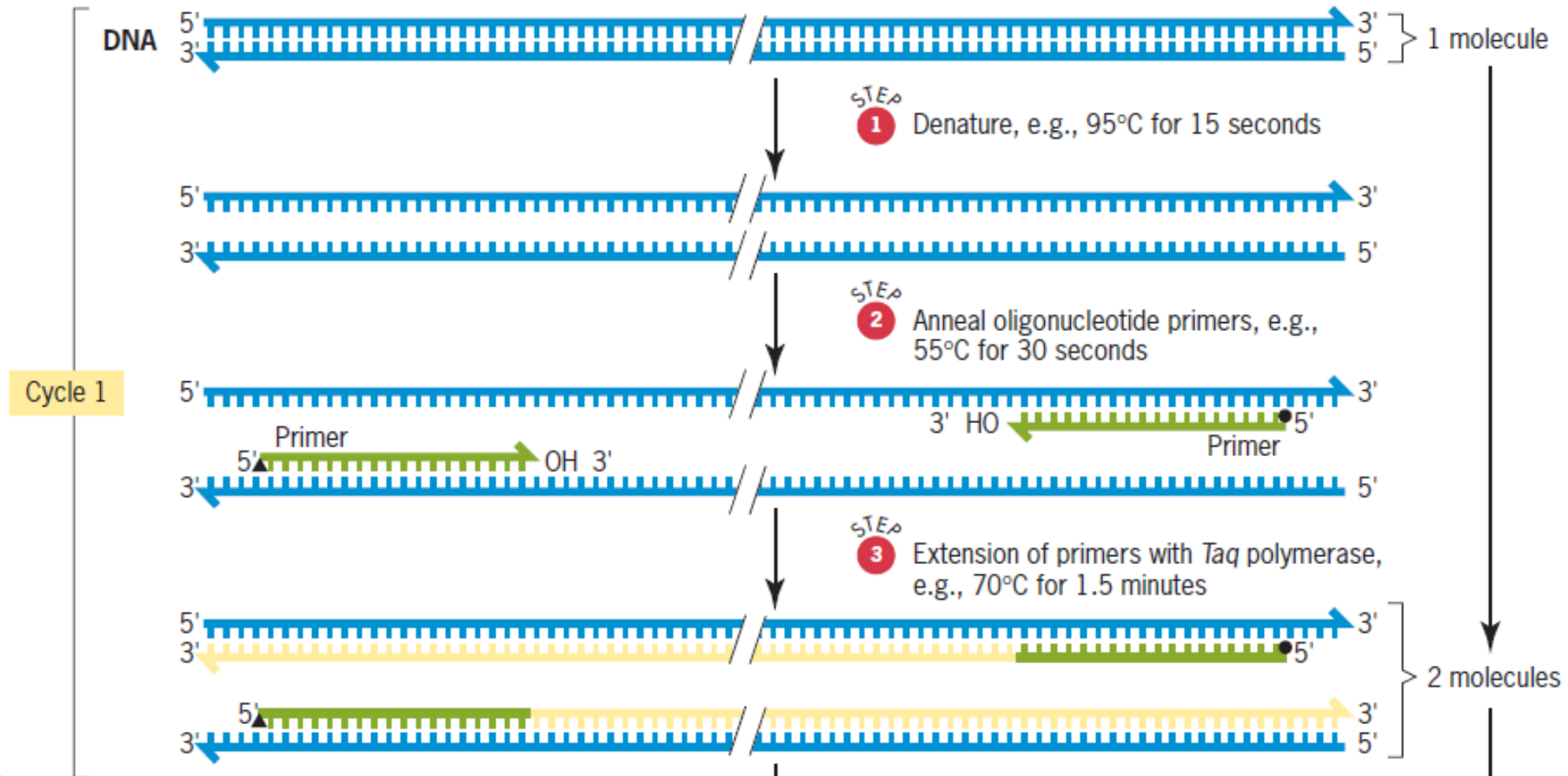
Polymerázová řetězová reakce

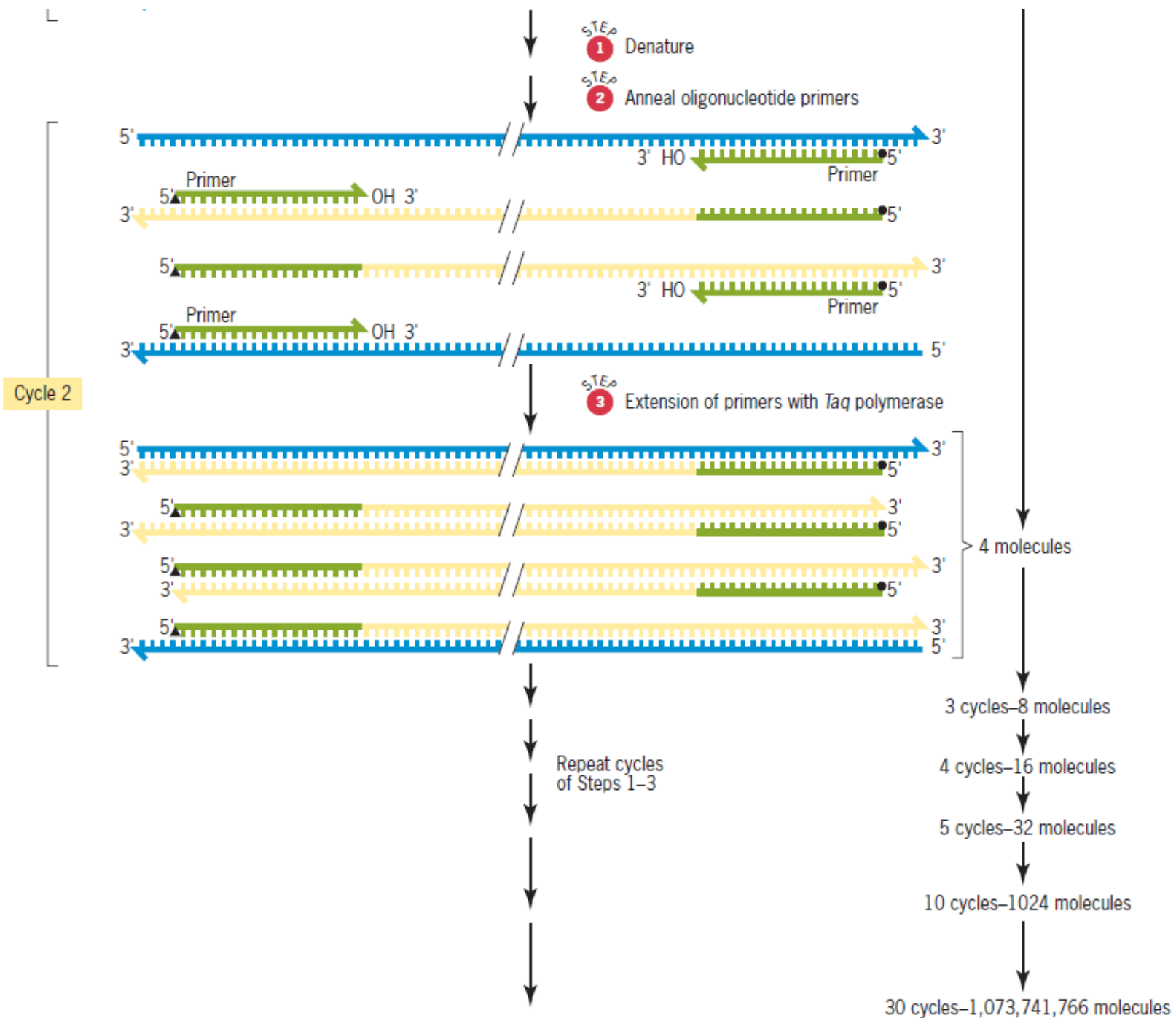
- PCR – exponenciální in vitro amplifikace krátkého úseku DNA
- 1983 – Kari Mullis (Nobelova cena 1993)
- Konečně to šlo bez klonování

- Potřebujeme: dva primery (forward a reverse), Taq polymeráza, deoxyribonukleotidy, termální cykler
- 3 opakující se kroky; 2^n kopií při n cyklech (30 cyklů ~ 10^9 kopií)



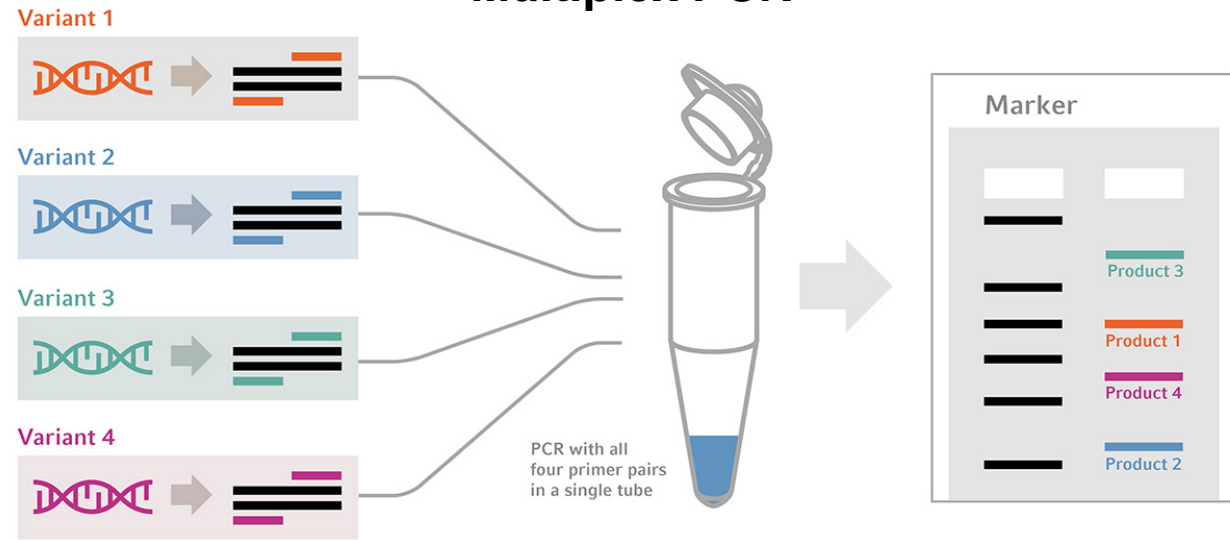
Polymerázová řetězová reakce





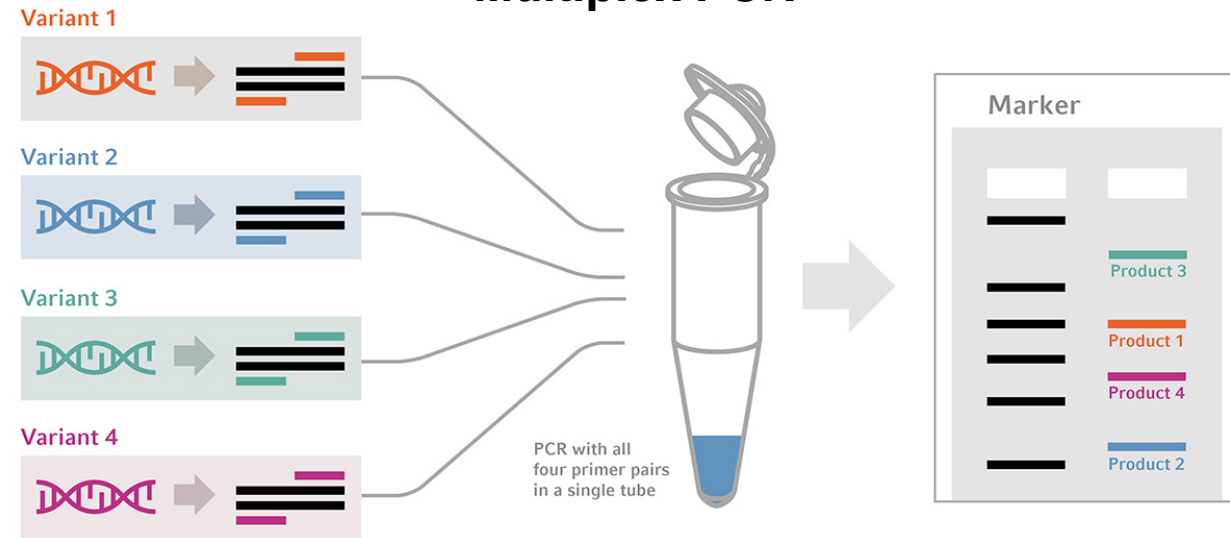
Variety PCR

Multiplex PCR



Varianty PCR

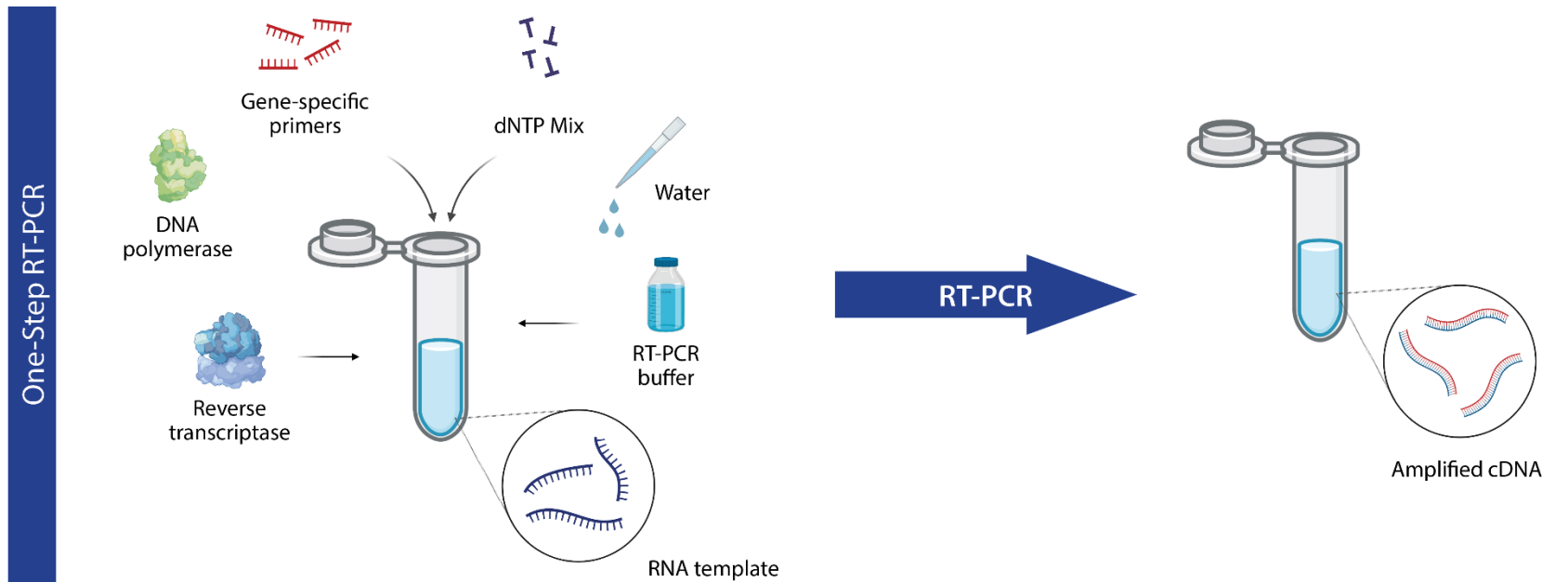
Multiplex PCR



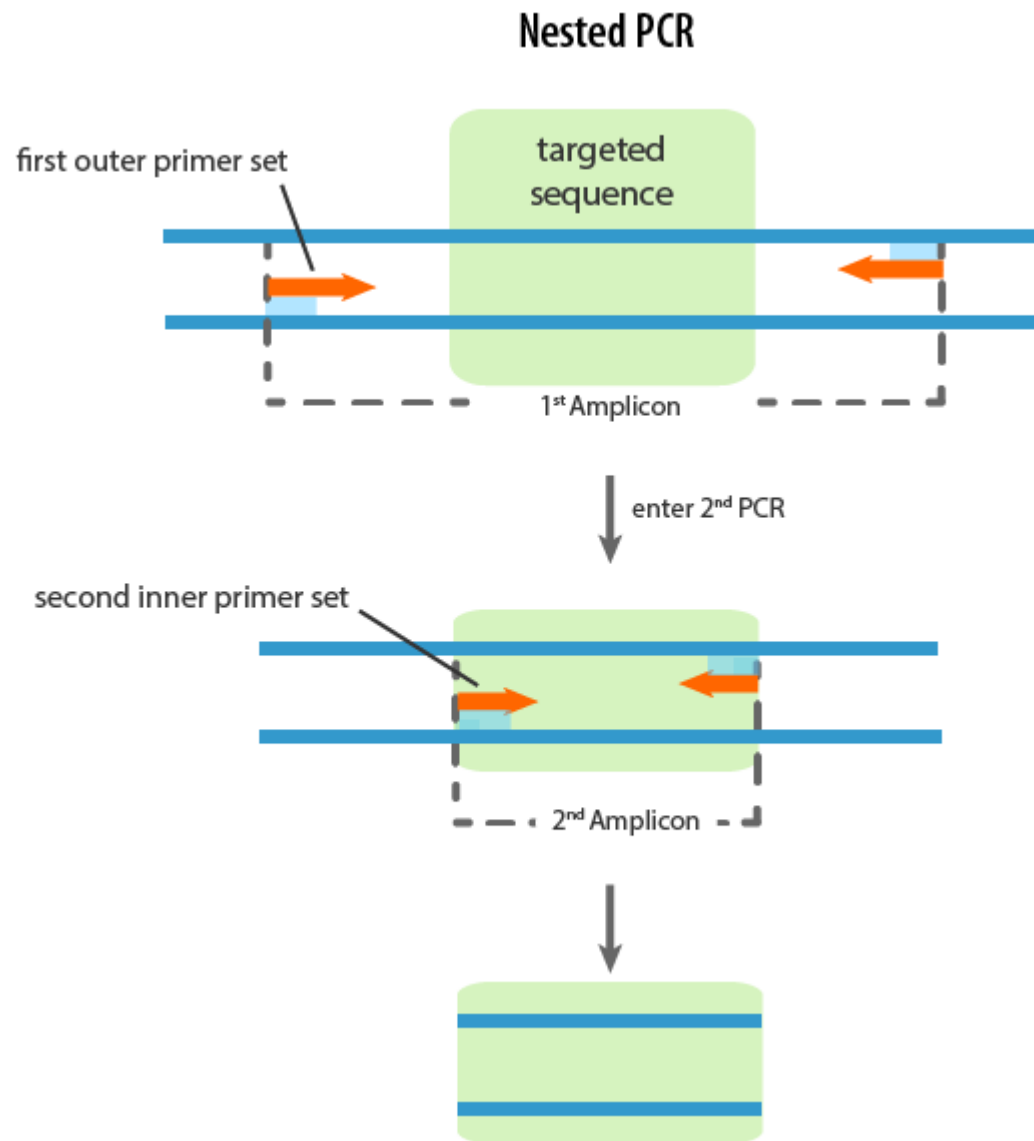
Reverse-transcription PCR (RT-PCR)

Templát: RNA

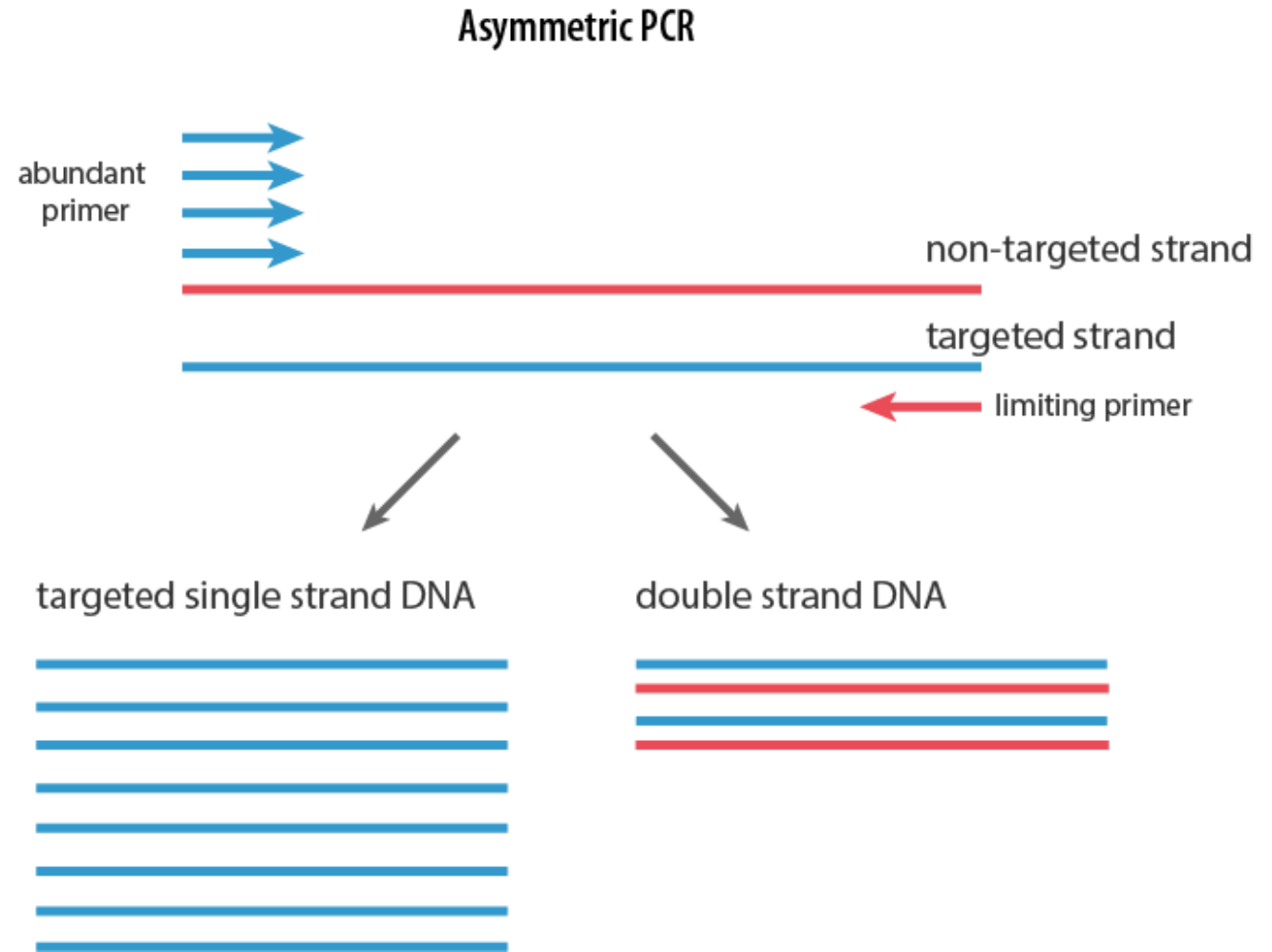
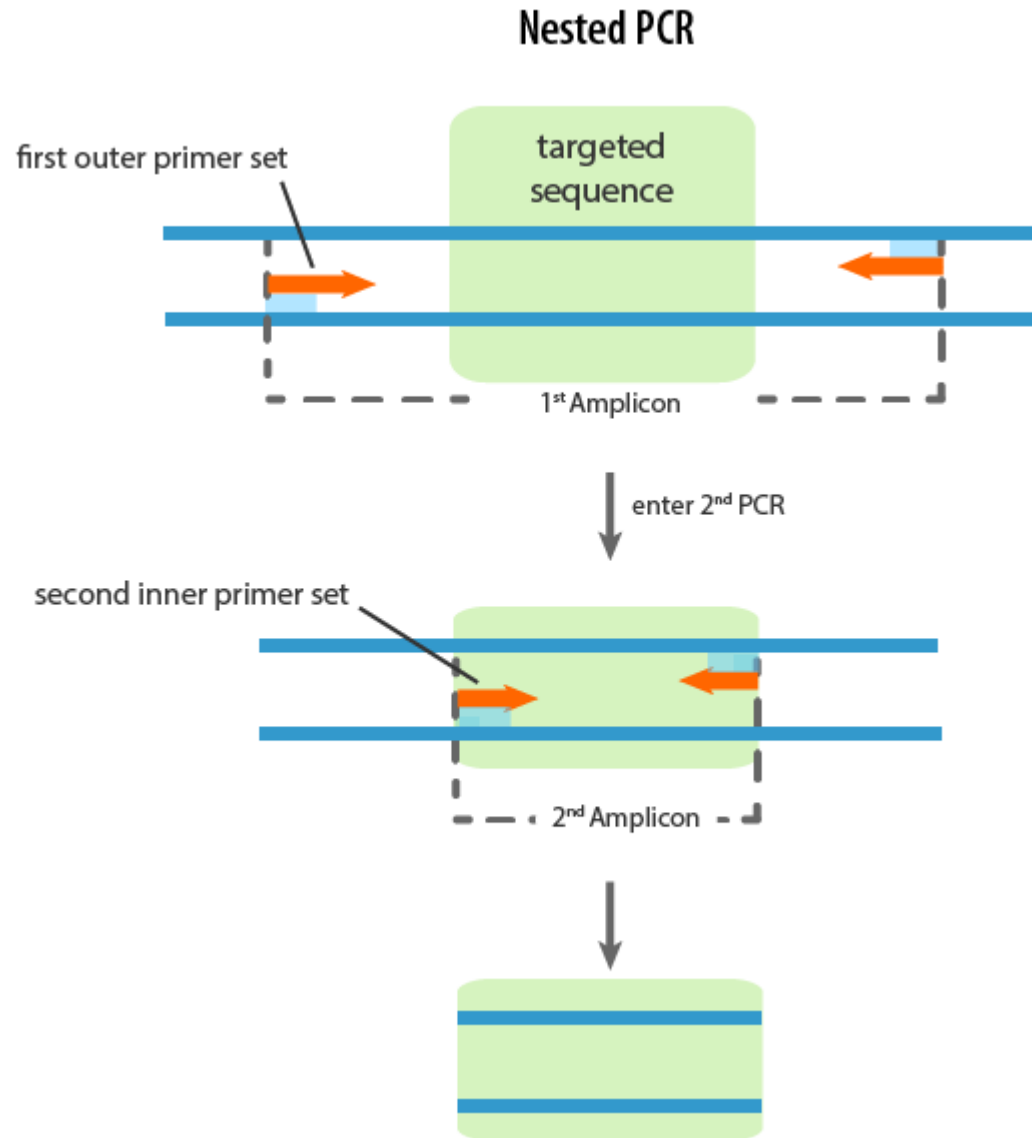
Single-step vs two-step



Variety PCR



Varianty PCR



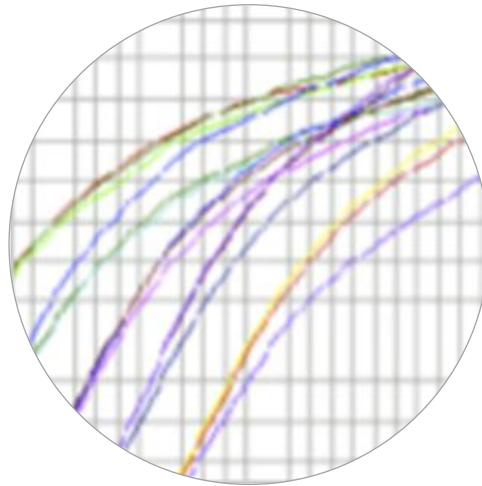
Vývoj PCR metod

1.



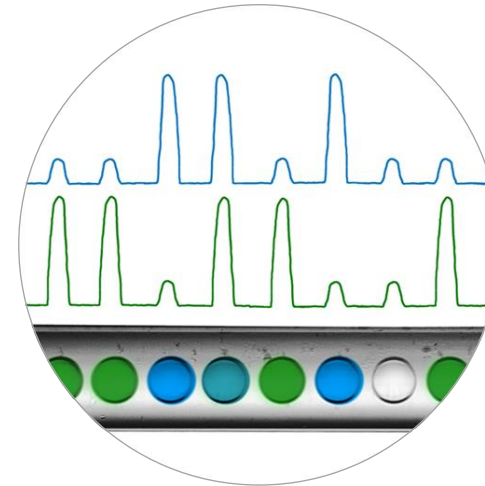
PCR
Kvalitativní

2.



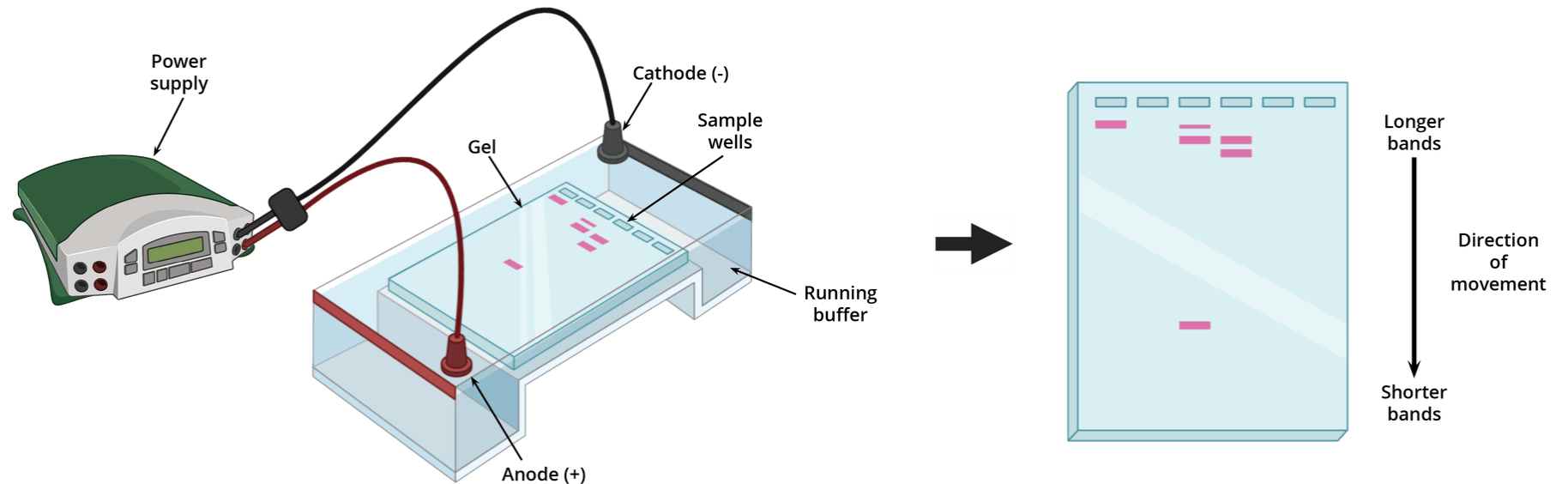
Real-time PCR
Relativní kvantifikace

3.

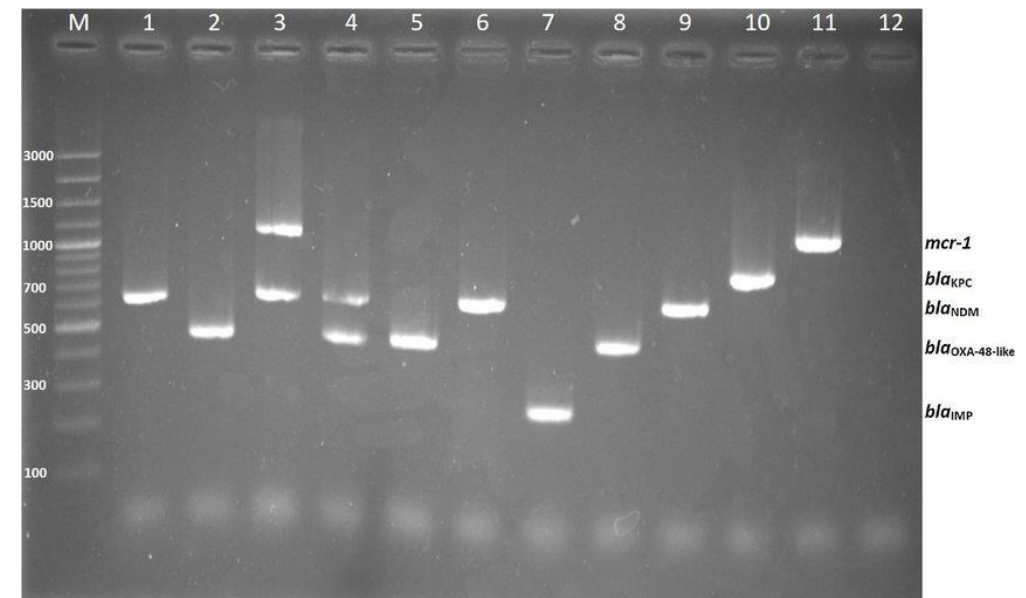


Droplet Digital PCR
Absolutní kvantifikace

Gelová elektroforéza – metoda detekce PCR produktů

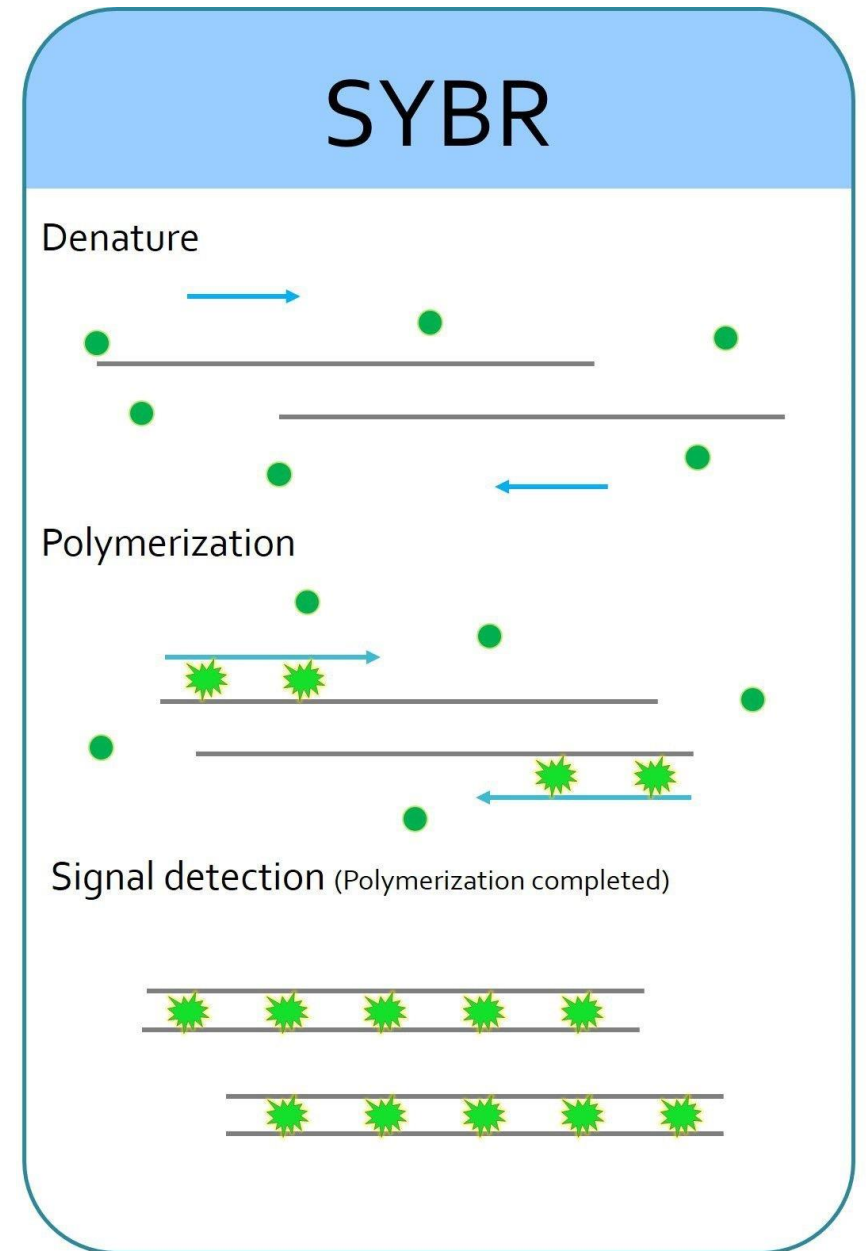
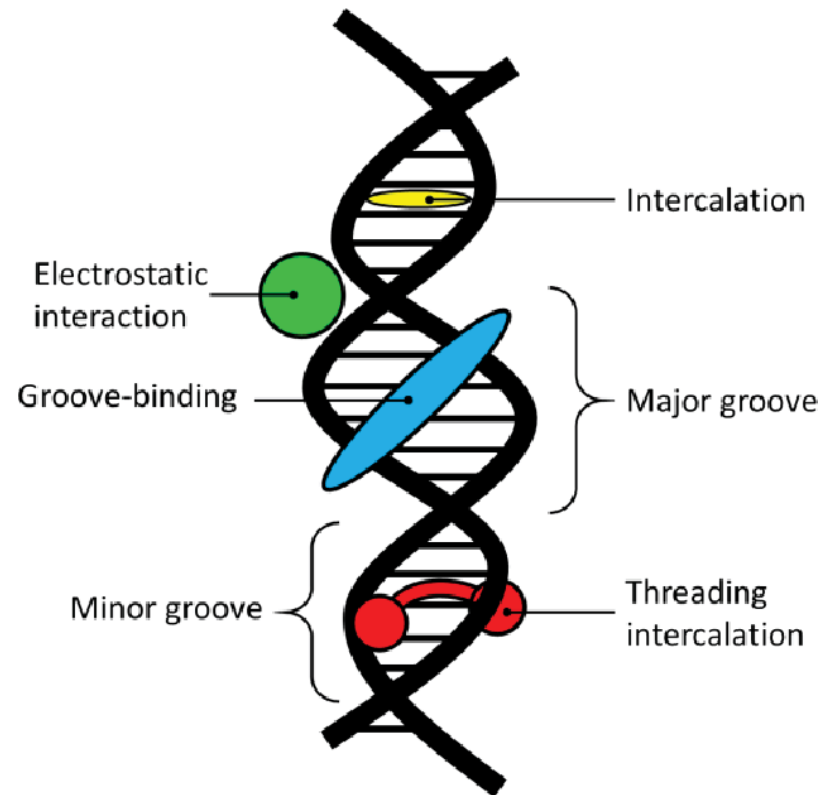


- Nejčastější koncová detekce PCR produktů
- Jednoduchá, účinná, relativně levná
- Méně citlivá, semi-kvantitativní, limitující množství vzorků



Real-Time PCR

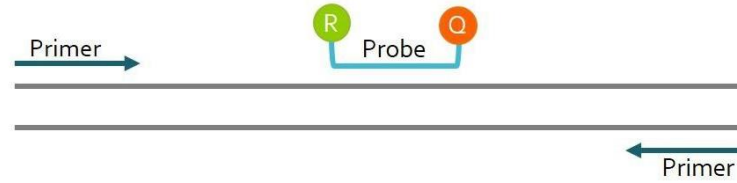
- Též qPCR, citlivá, sledování v reálném čase, dražší než klasická PCR
- Fluorescenční barvička interkaluje do dsDNA (SYBR Green)



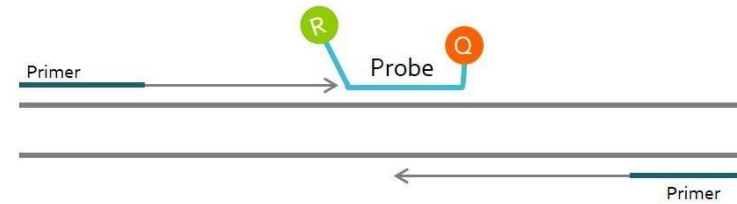
Real-Time PCR

TaqMan

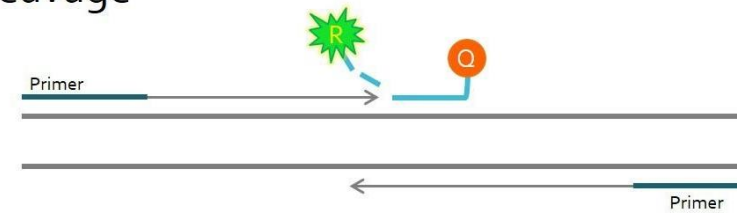
Annealing



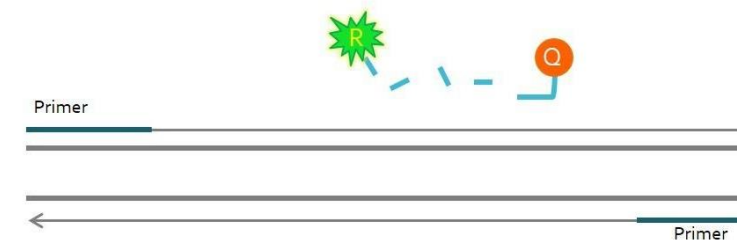
Polymerization & strand displacement



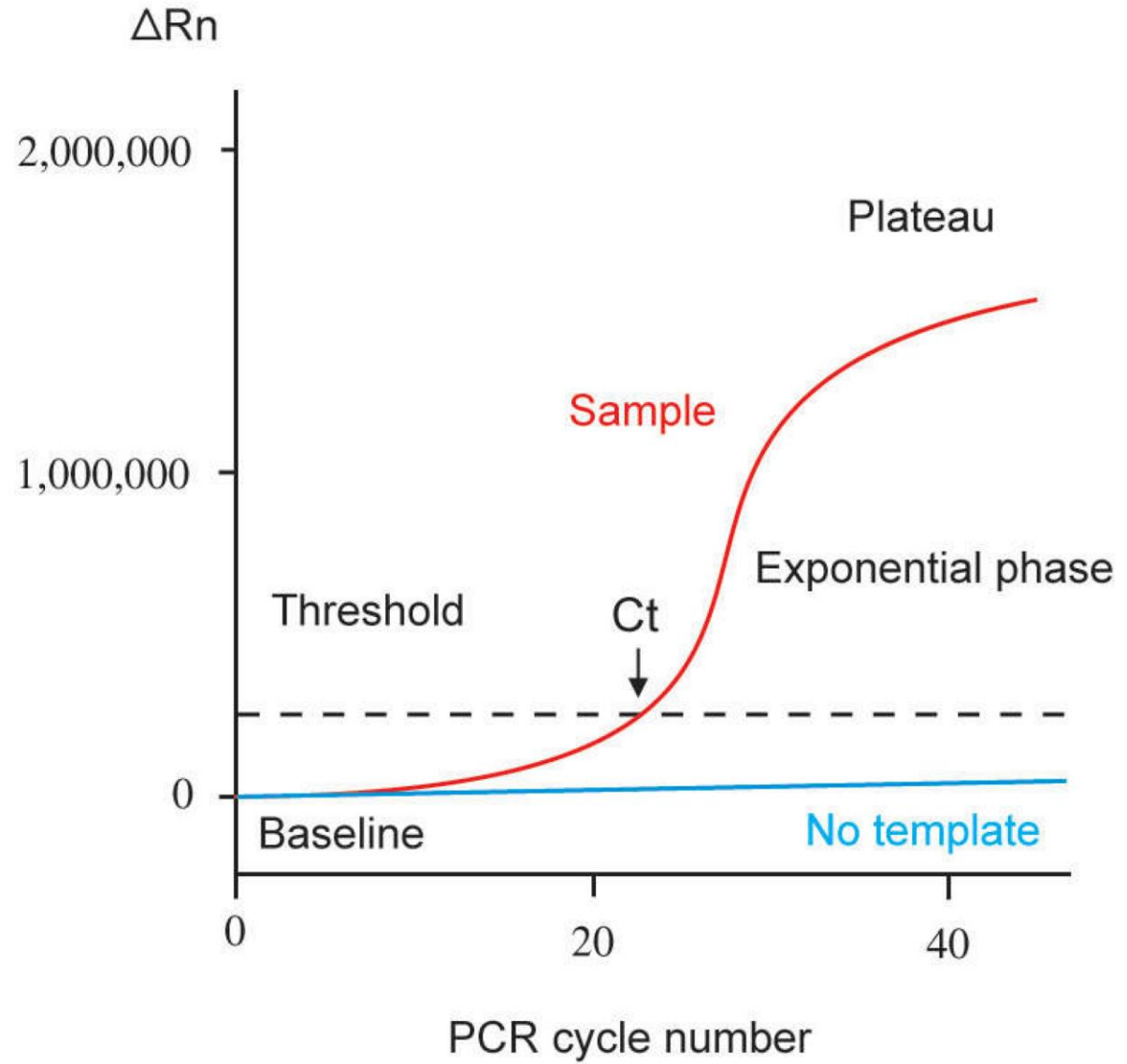
Cleavage



Signal detection (Polymerization completed)

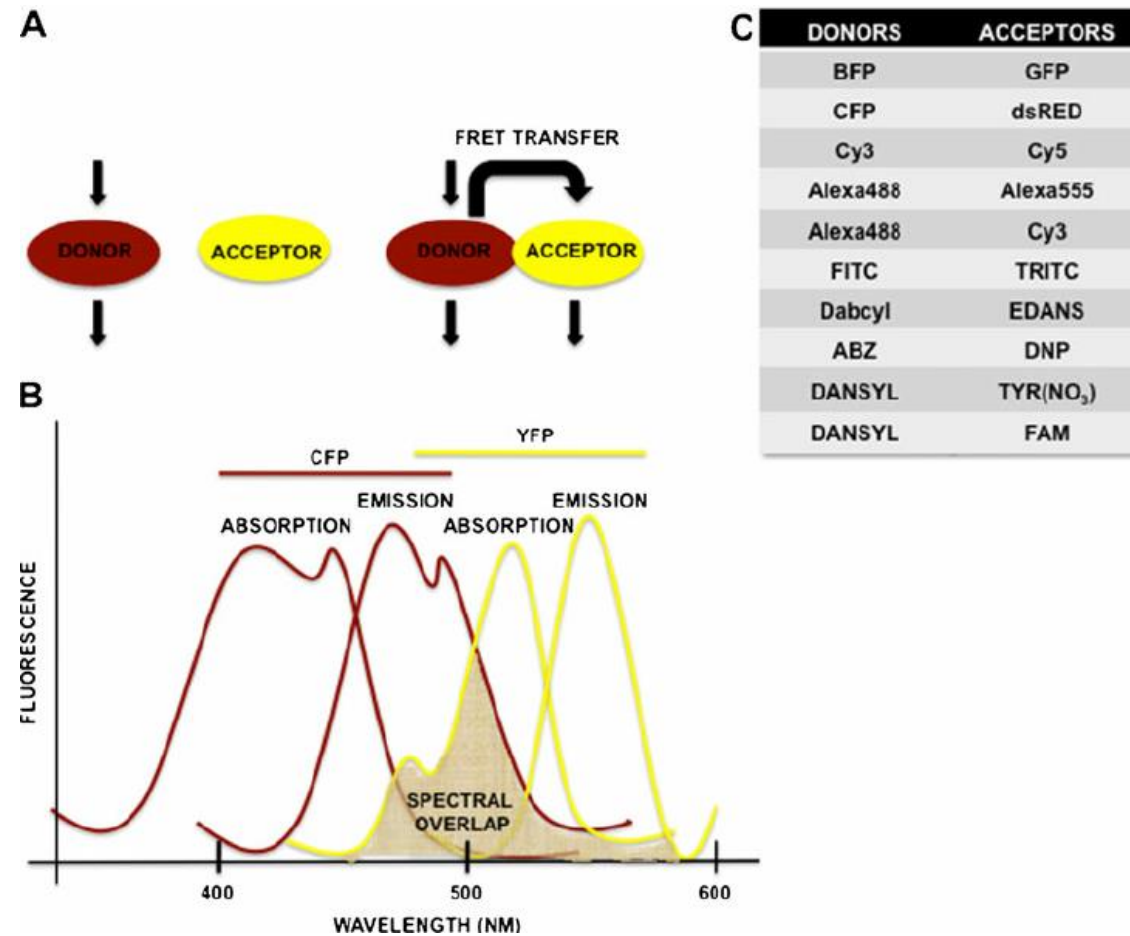


Real-Time PCR



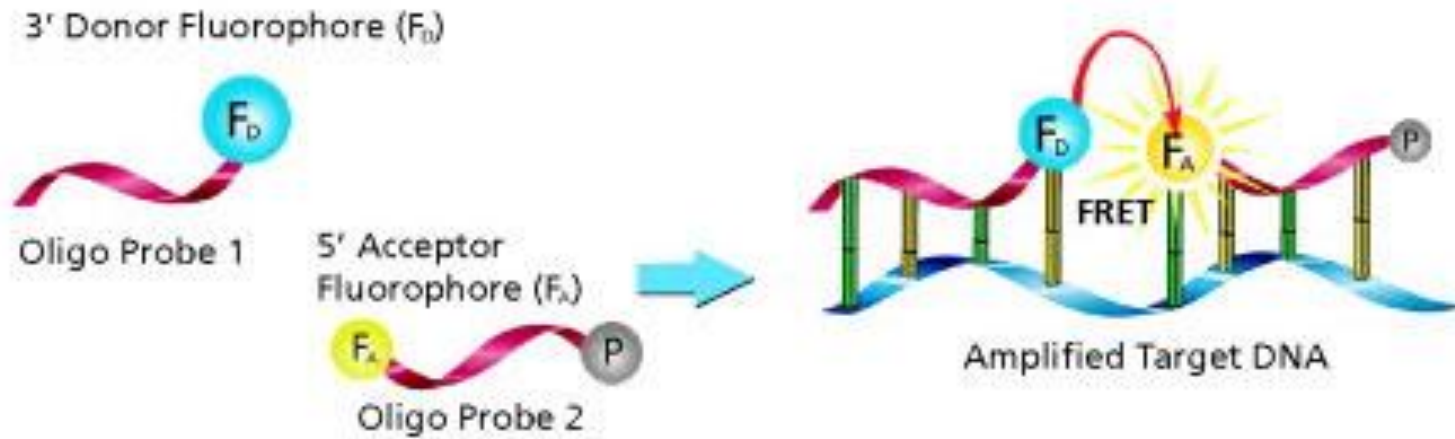
LightCycler (FRET)

- FRET = fluorescence resonance energy transfer



LightCycler (FRET)

- Využití v Real-Time PCR

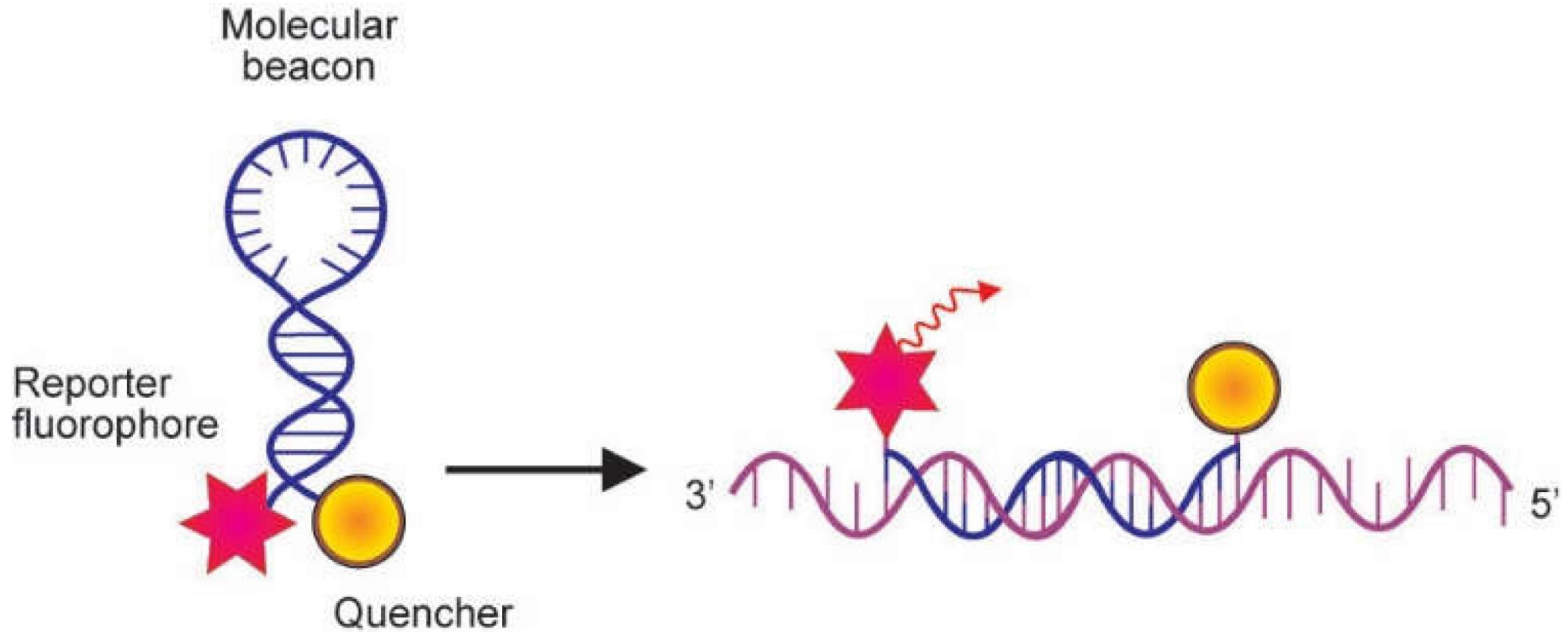


1. Probes in solution emit low fluorescence

2. Emission through fluorescence resonance energy transfer

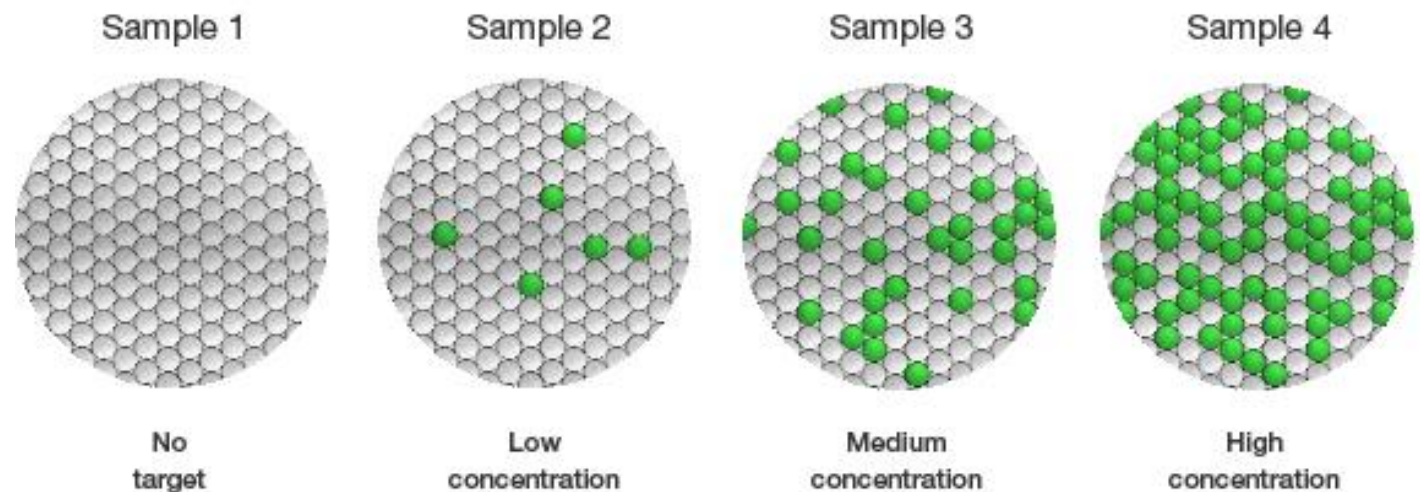
Molekulární majáky

- Využití v Real-Time PCR



ddPCR (Droplet digital PCR)

- Umožňuje absolutní kvantifikaci (počítá molekuly DNA v malých kapičkách s přesně definovaným objemem v nanolitrech)
- Kapičky – emulze voda/olej, jedna kapička „nahrazuje“ jednu zkumavku
- ddPCR systém rozdělí DNA vzorek na cca 20 000 kapiček, v každé probíhá nezávislá PCR reakce
- Analýza pomocí Poissonového rozdělení (výpočet původního množství DNA na základě fluorescence)



ddPCR (Droplet digital PCR)



1 Make droplets



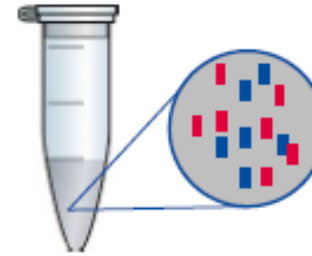
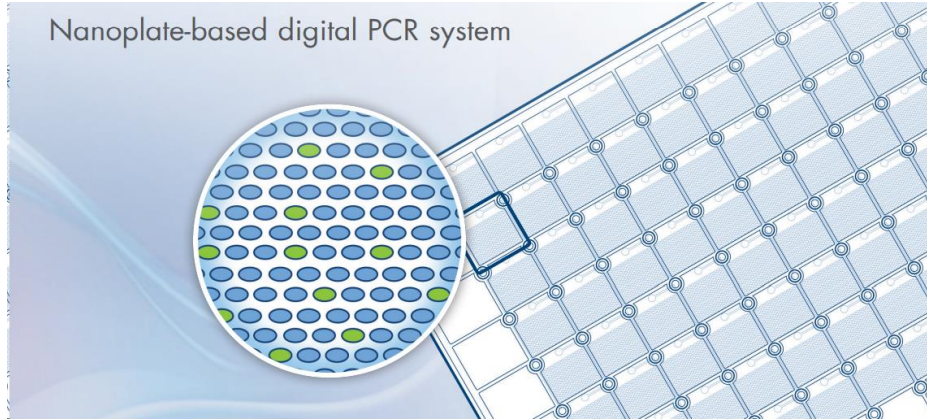
2 PCR DNA in droplets



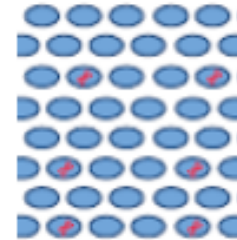
3 Read and analyze results



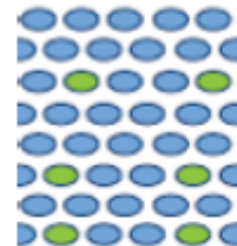
dPCR (Digitální PCR)



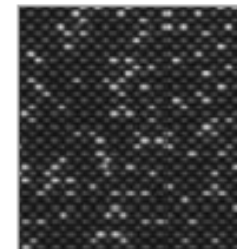
- Target
- Background (gDNA, cDNA; primers/probes; master mix)



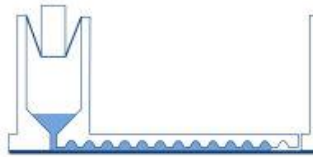
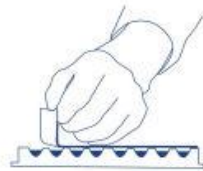
PCR reaction partitioning into thousands individual reactions



- Positive reactions
- Negative reactions



Absolute quantification

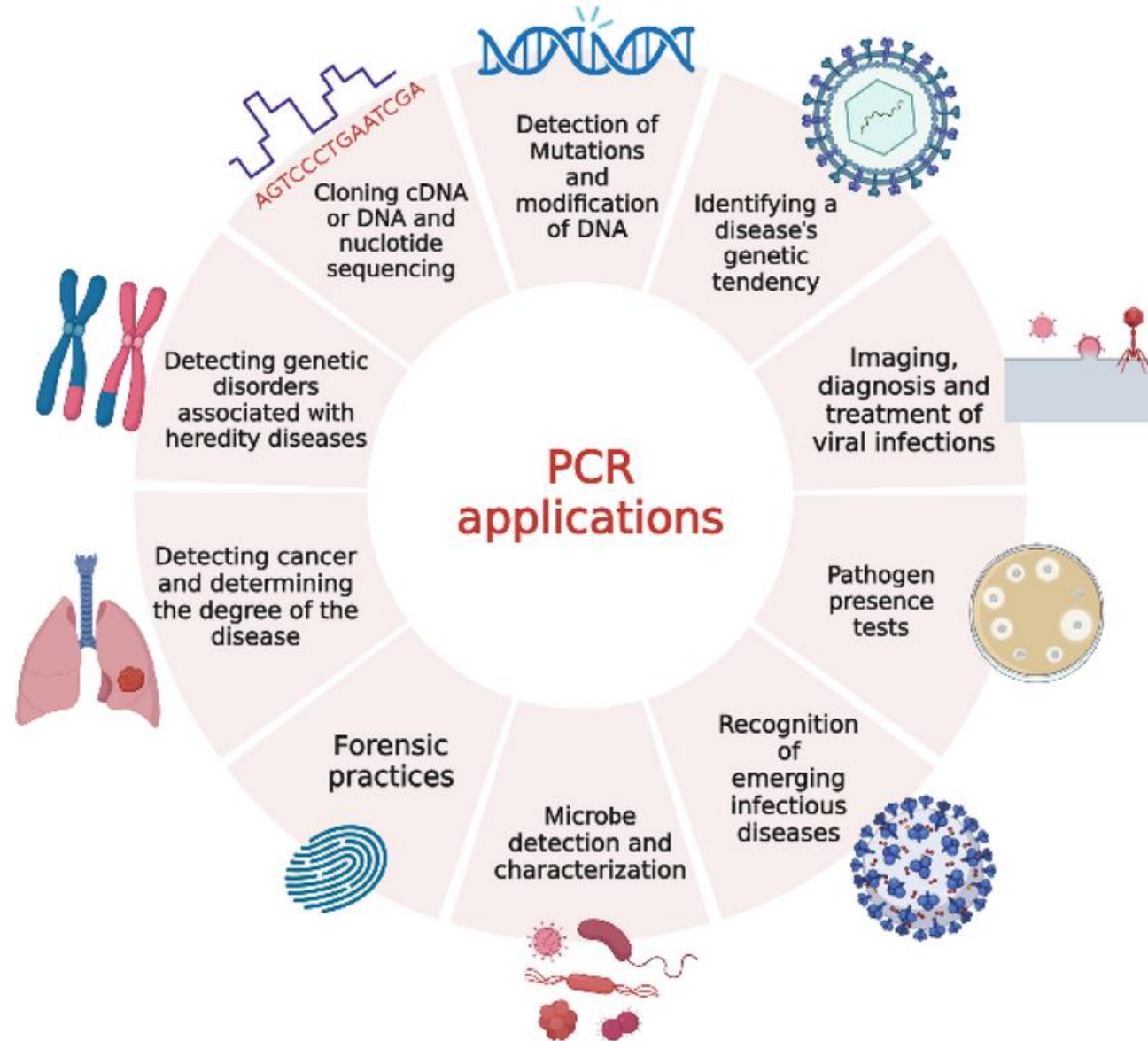


Pipette reaction mixtures to dPCR plate

Apply rubber plate seal to digital PCR plate and place in instrument

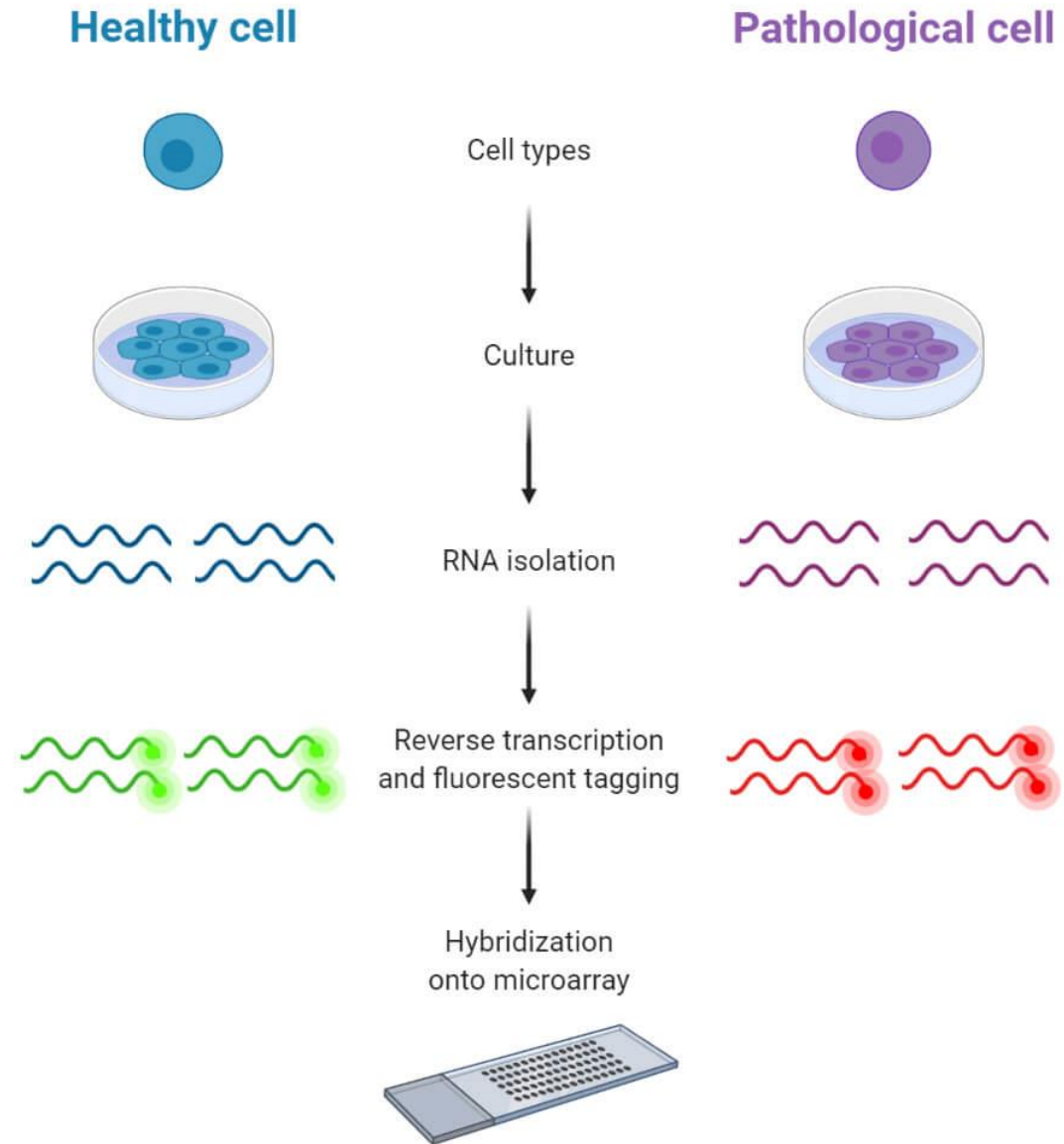
Instrument automatically partitions, thermal cycles, and reads plate

Aplikace



DNA microarrays

- Umístění tisíců DNA sond na deštičku, na každý spot jinou
- Cílová DNA/RNA je naznačena fluoroforem
- Po promytí hodnotí počítač
- Vhodné pro mikroRNA analýzu, genovou expresi, SNP,...



DNA microarrays

- Umístění tisíců DNA sond na deštičku, na každý spot jinou
- Cílová DNA/RNA je naznačena fluoroforem
- Po promytí hodnotí počítač
- Vhodné pro mikroRNA analýzu, genovou expresi, SNP,...

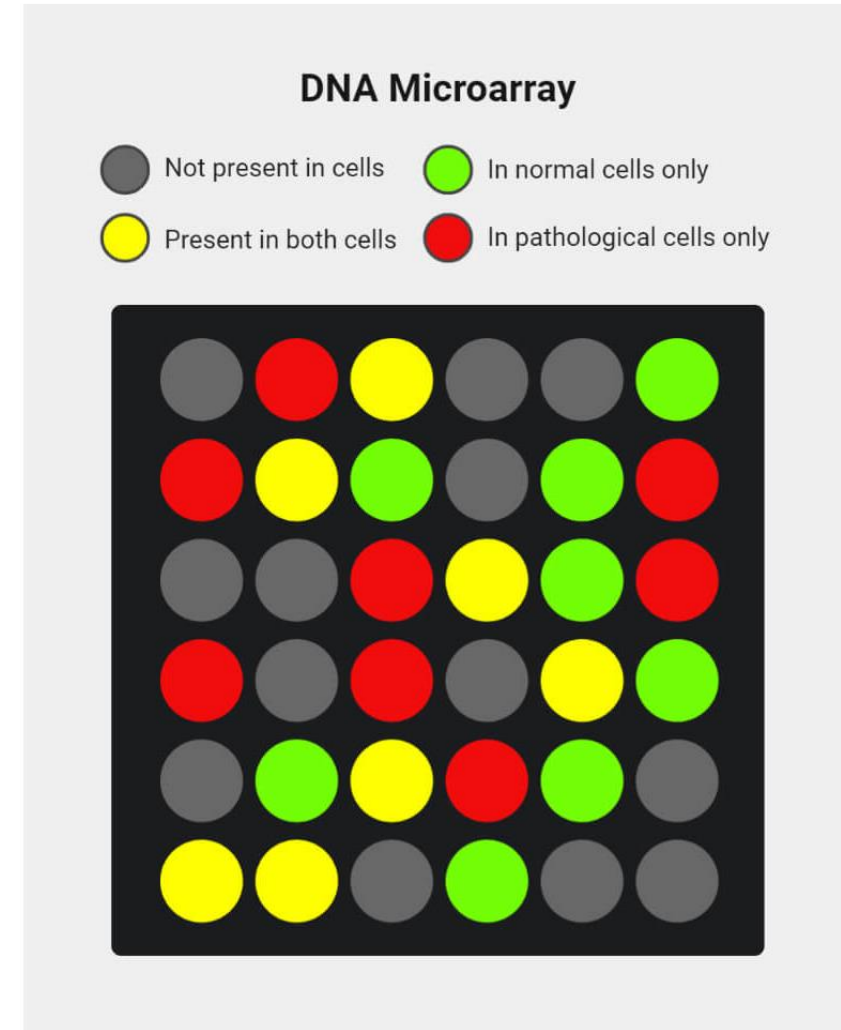
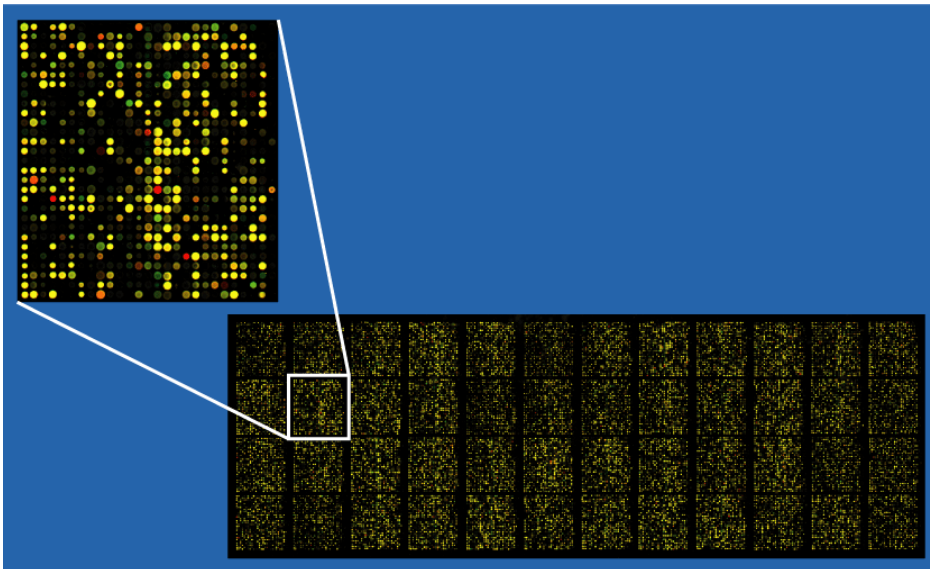


Image By Sagar Aryal, created using biorender.com

Izotermální amplifikační techniky

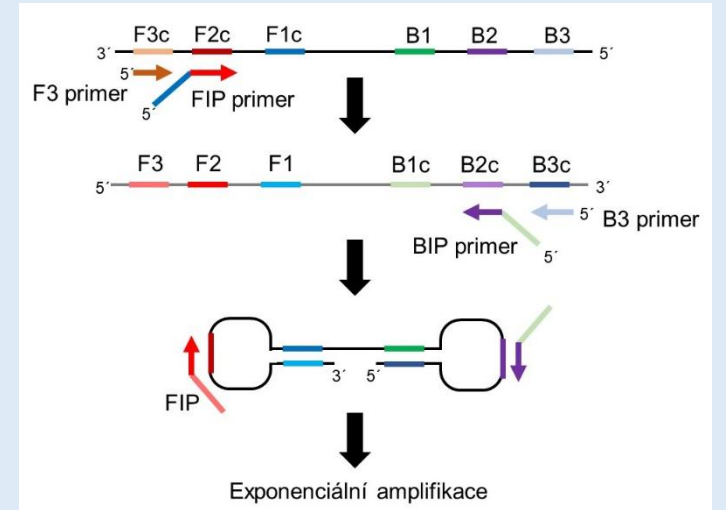
- enzymatické reakce s exponenciálním charakterem
- nevyžadují cyklování teplot, reakce probíhá při jedné teplotě
- vysoká rychlost amplifikace (20-30 min)
- tolerují PCR inhibitory

Izotermální amplifikační techniky

- enzymatické reakce s exponenciálním charakterem
- nevyžadují cyklování teplot, reakce probíhá při jedné teplotě
- vysoká rychlost amplifikace (20-30 min)
- tolerují PCR inhibitory

LAMP

- z angl. *loop-mediated amplification*
- probíhá při teplotě (cca 55-70 °C)
- ideální pro detekci patogenů
- RT-LAMP pro Covid-19



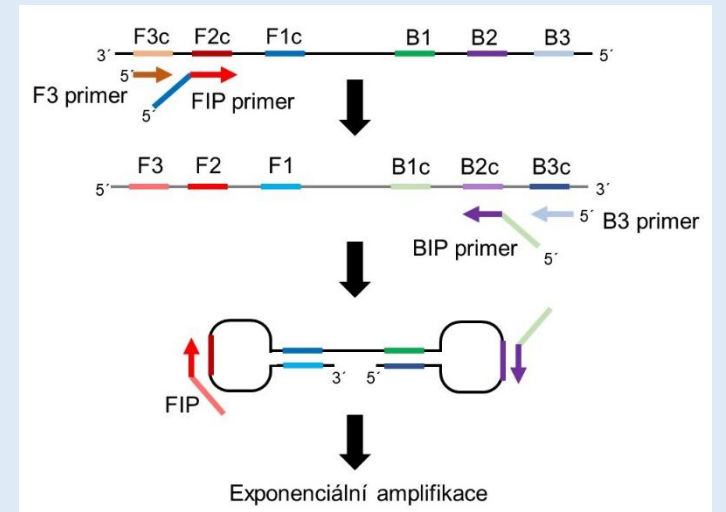
<https://www.youtube.com/watch?v=L5zi2P4lggw>

Izotermální amplifikační techniky

- enzymatické reakce s exponenciálním charakterem
- nevyžadují cyklování teplot, reakce probíhá při jedné teplotě
- vysoká rychlost amplifikace (20-30 min)
- tolerují PCR inhibitory

LAMP

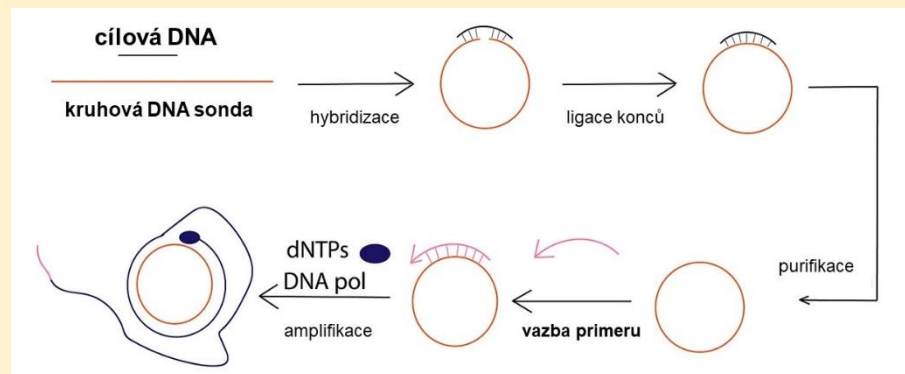
- z angl. *loop-mediated amplification*
- probíhá při teplotě (cca 55-70 °C)
- ideální pro detekci patogenů
- RT-LAMP pro Covid-19



<https://www.youtube.com/watch?v=L5zi2P4lggw>

RCA

- *rolling circle amplification*
- běží při teplotě 23-60°C
- vhodná pro mutační analýzu
- není exponenciální



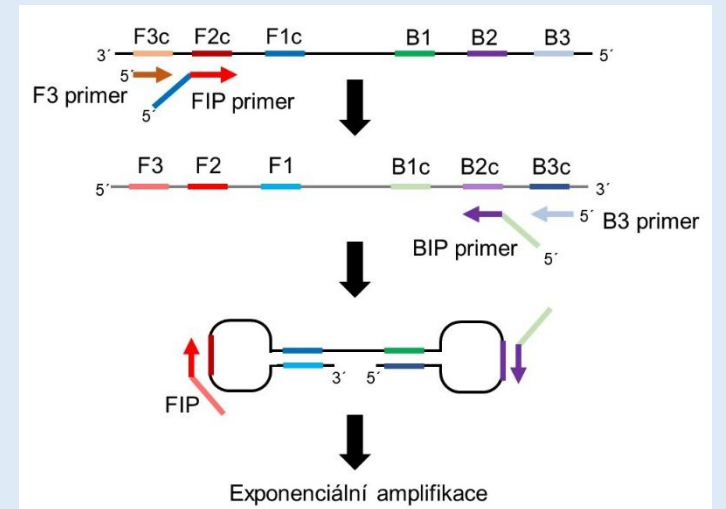
<https://www.youtube.com/watch?v=3N39R2as-84>

Izotermální amplifikační techniky

- enzymatické reakce s exponenciálním charakterem
- nevyžadují cyklování teplot, reakce probíhá při jedné teplotě
- vysoká rychlost amplifikace (20-30 min)
- tolerují PCR inhibitory

LAMP

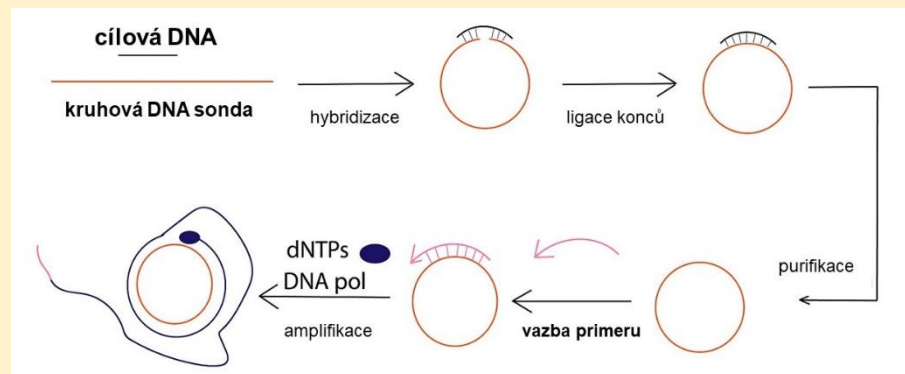
- z angl. *loop-mediated amplification*
- probíhá při teplotě (cca 55-70 °C)
- ideální pro detekci patogenů
- RT-LAMP pro Covid-19



<https://www.youtube.com/watch?v=L5zi2P4lggw>

RCA

- *rolling circle amplification*
- běží při teplotě 23-60°C
- vhodná pro mutační analýzu
- není exponenciální



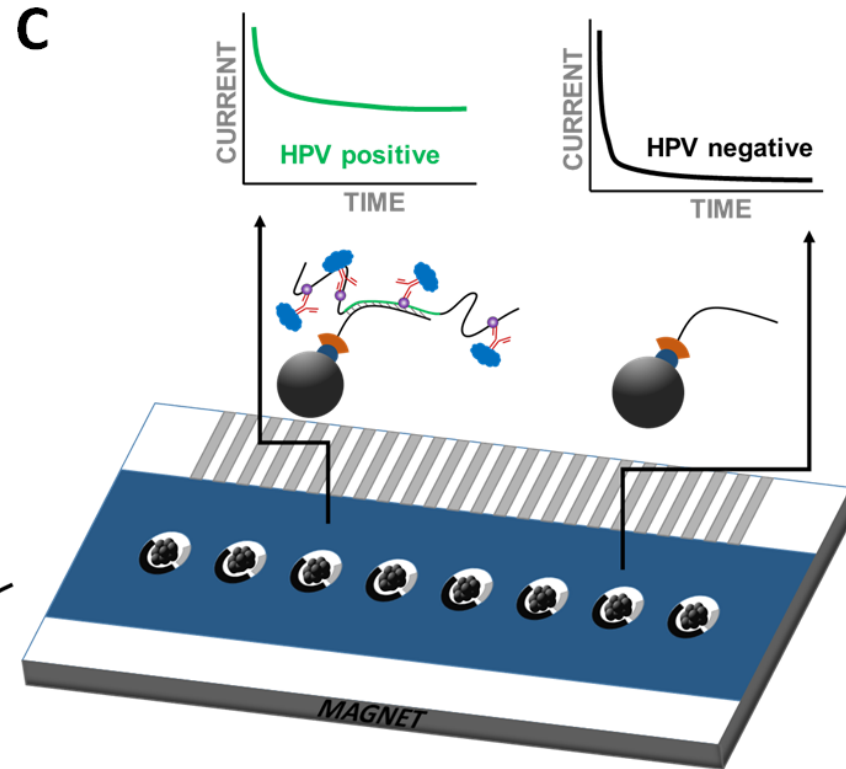
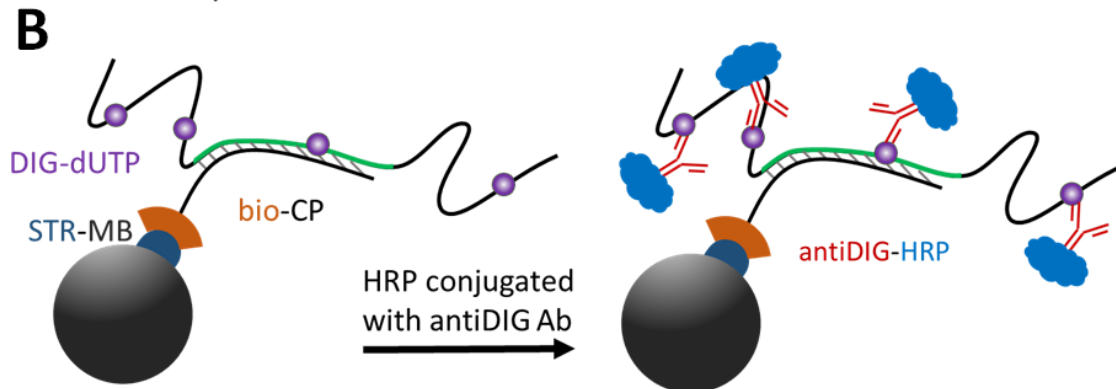
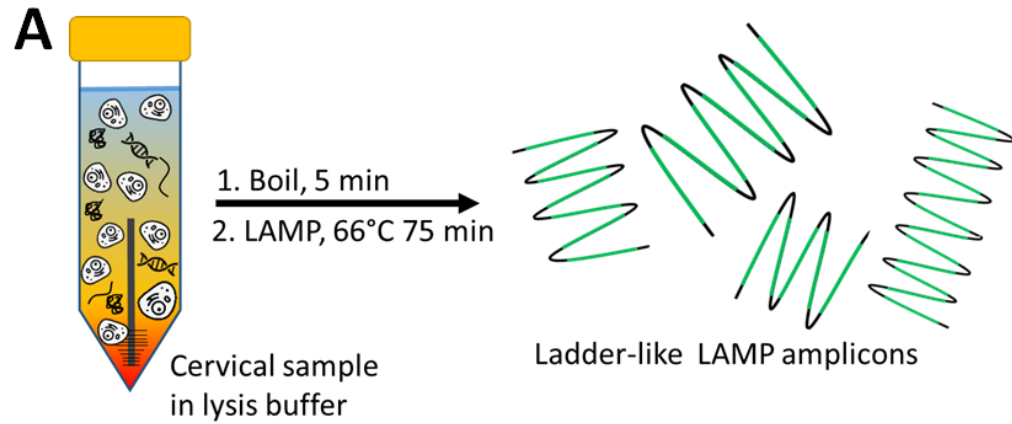
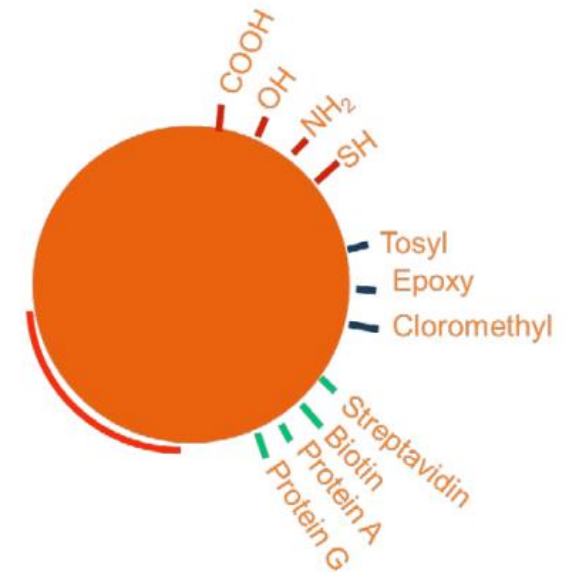
<https://www.youtube.com/watch?v=3N39R2as-84>

RPA

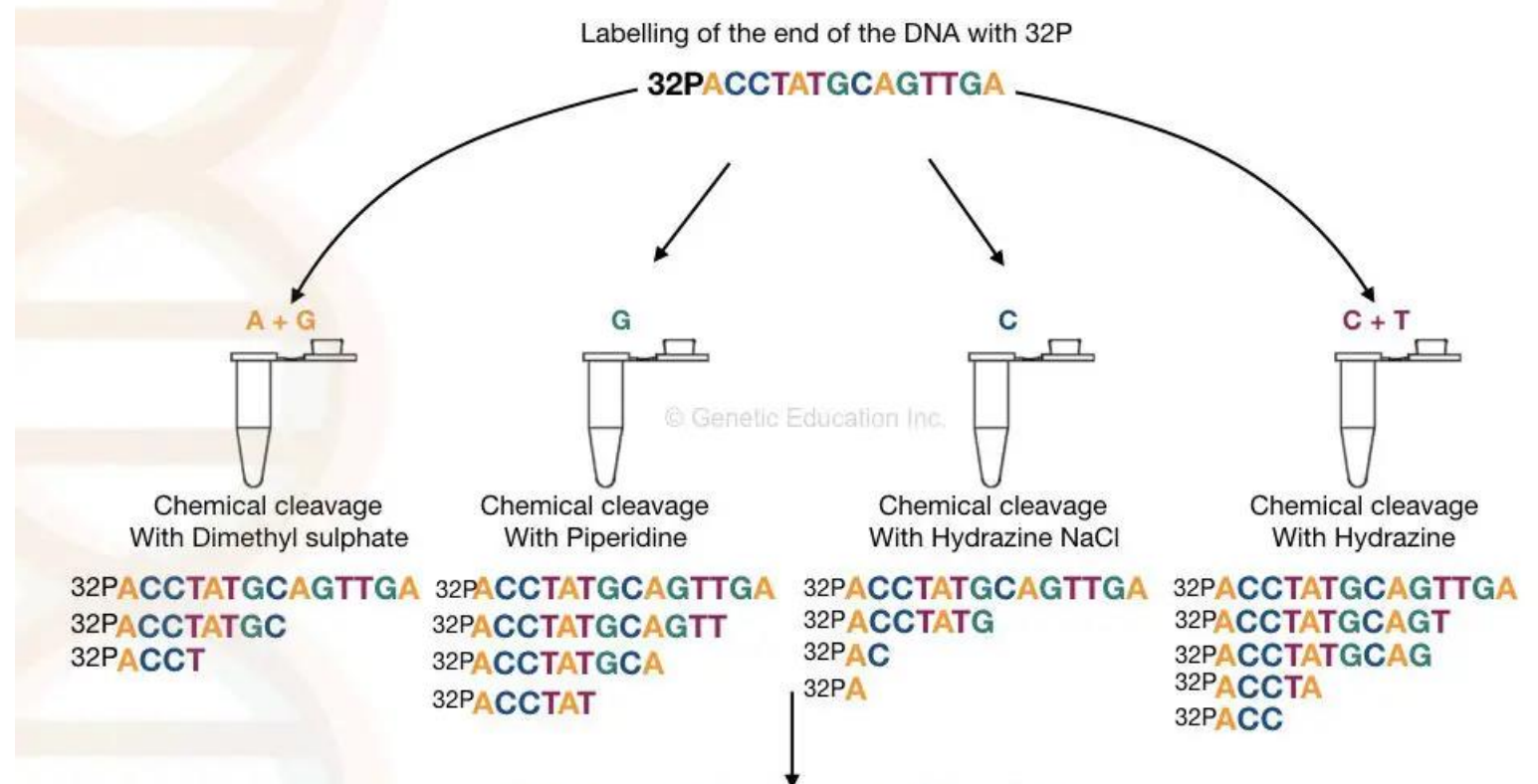
- *recombinase polymerase amplification*
- běží při teplotě 25-42°C
- exponenciální, rychlá (20 min)
- vhodná pro LFA

Izotermální amplifikační techniky

- Detekce vysoce rizikových kmenů HPV (způsobujících nádory děložního hrdla): HPV16 a HPV18

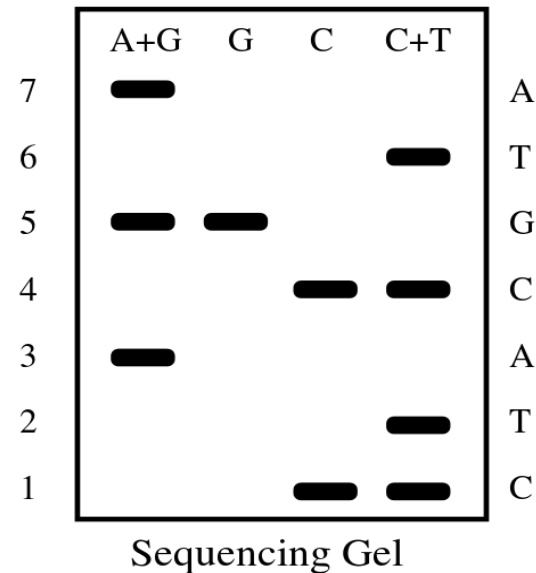


Sekvenování



Chemické (Maxam-Gilbertovo) sekvenování

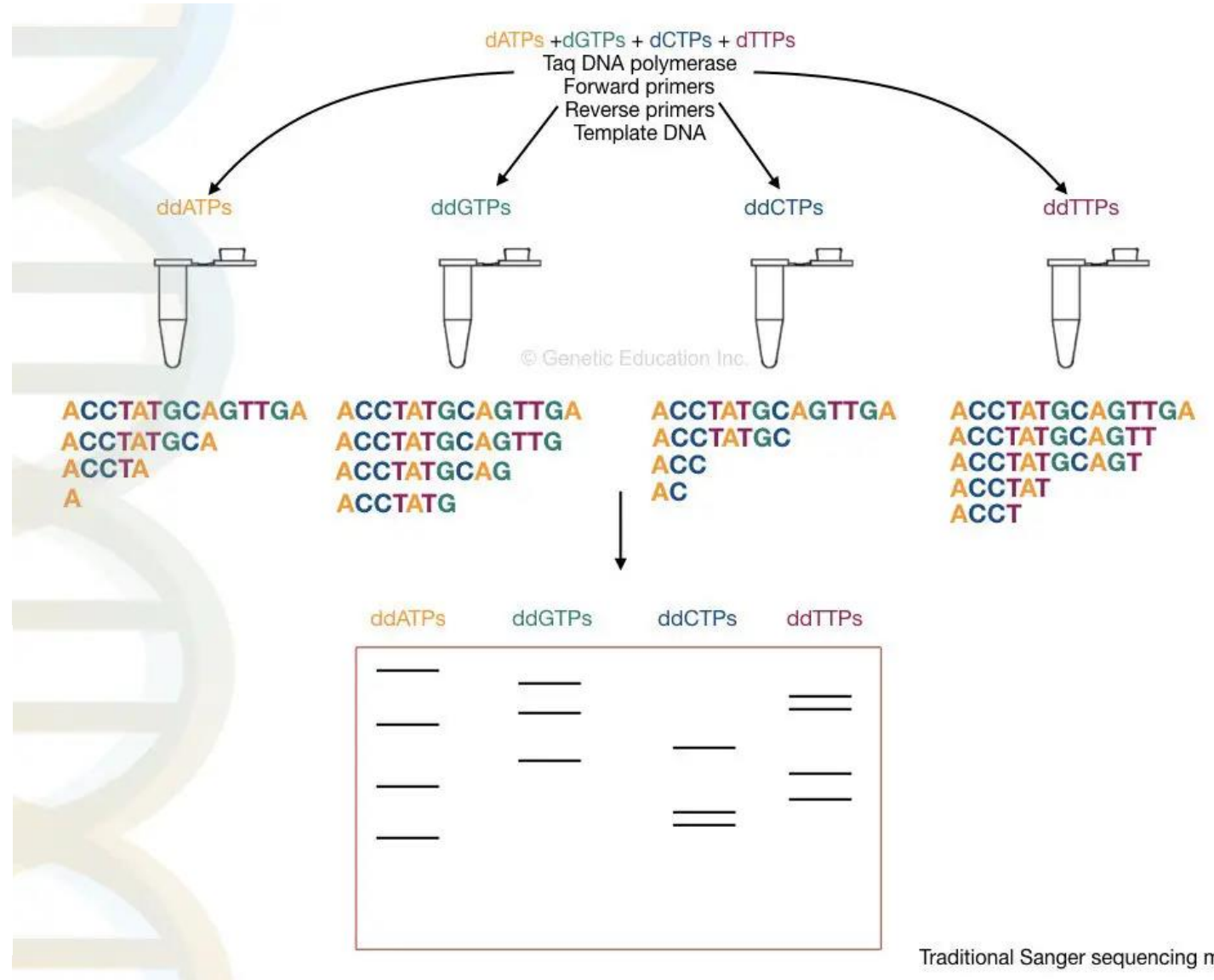
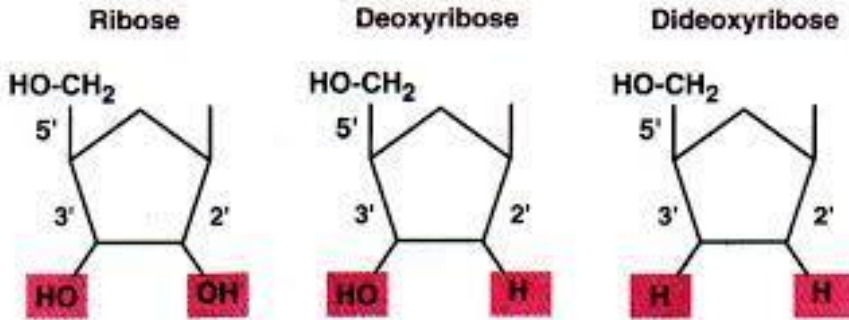
- rok 1976
- příprava koncově značených jednořetězcových fragmentů
- 4 paralelní vzorky: modifikace jednoho typu báze, kde je fragment štěpen



Sekvenování

Enzymatické (Sangerovo) sekvencování

- 1977
- Syntéza komplementárního vlákna k sekvenci kterou identifikujeme
- 4 paralelní vzorky: do každého jeden dideoxynukleotid který zastavuje amplifikaci



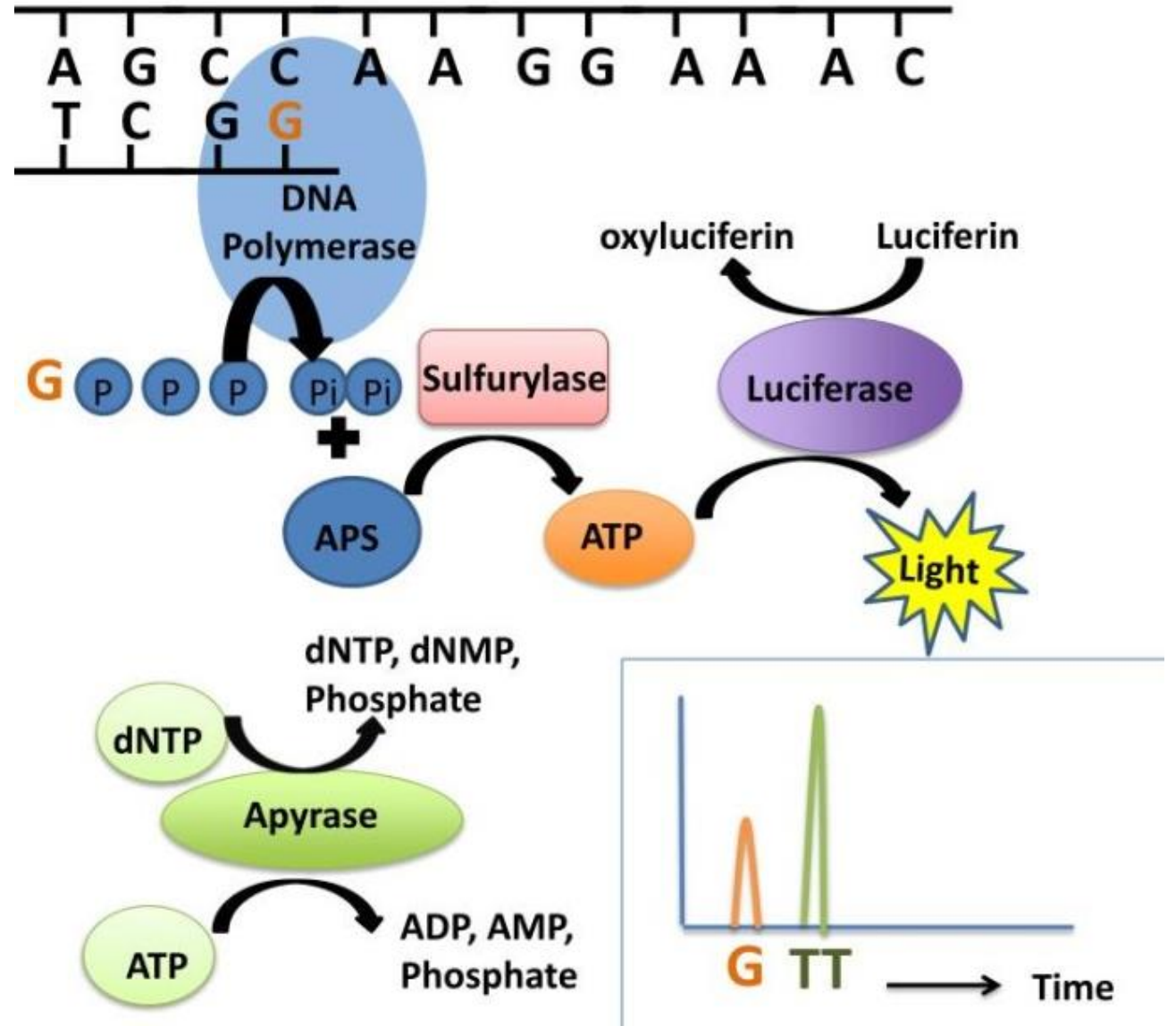
Sekvenování

Pyrosekvenování

- 1993

- Přidává se vždy po jednom dNTP, pokud se inkorporuje, vyzáří se světlo díky přítomnosti luciferázy

- Neintegrované dNTP jsou odstraněny apyrázou



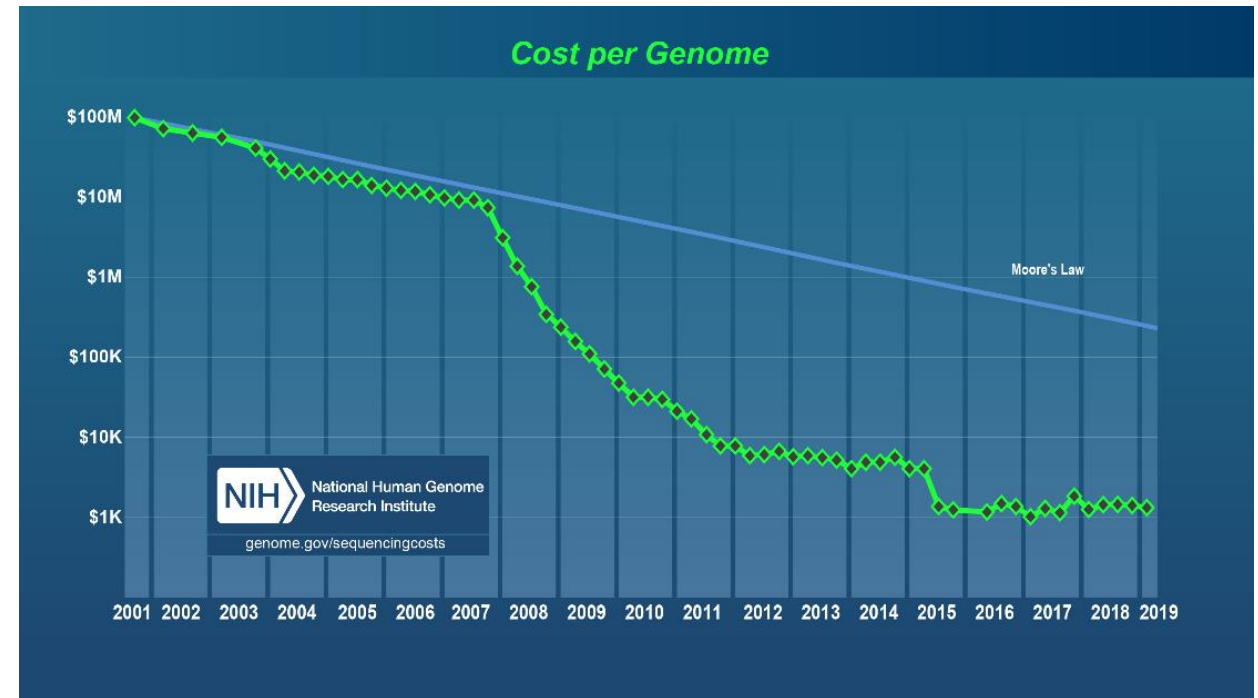
Sekvenování

Nová generace sekvenování (NGS)

- levnější a robustnější („high-throughput“) technologie (masivní paralelní sekvenování)
- miliony sekvencí jsou čteny najednou
- umožňuje objev genů a regulačních elementů, identifikaci mutací,...
- RNA sekvenování – analýza celého transkriptomu

Limitace:

- Značná pořizovací cena, relativně drahé analýzy pro menší rutinní laboratoře
- Méně přesné čtení templátu (homopolymery), kratší délky sekvenovaných oblastí (cca 150-500 nukleotidů)
- Náročná analýza dat



NGS

Four types of NGS applications

- 1 Whole Genome Sequencing (WGS)
- 2 Exome Sequencing (Exome-Seq)
- 3 RNA Sequencing (RNA-Seq)
- 4 Methylation Sequencing (Methyl-Seq)

NGS

ILLUMINA

Stručný protokol

Příprava knihovny

Vytvoření clusterů

Sekvenování

Analýza dat



MiniSeq System

Power and simplicity for targeted sequencing.



MiSeq Series

Small genome and targeted sequencing.



NextSeq Series

Everyday genome, exome transcriptome sequencing, and more.



HiSeq Series

Production-scale genome, exome, transcriptome sequencing, and more.



HiSeq X Series

Population- and production-scale human whole-genome sequencing.

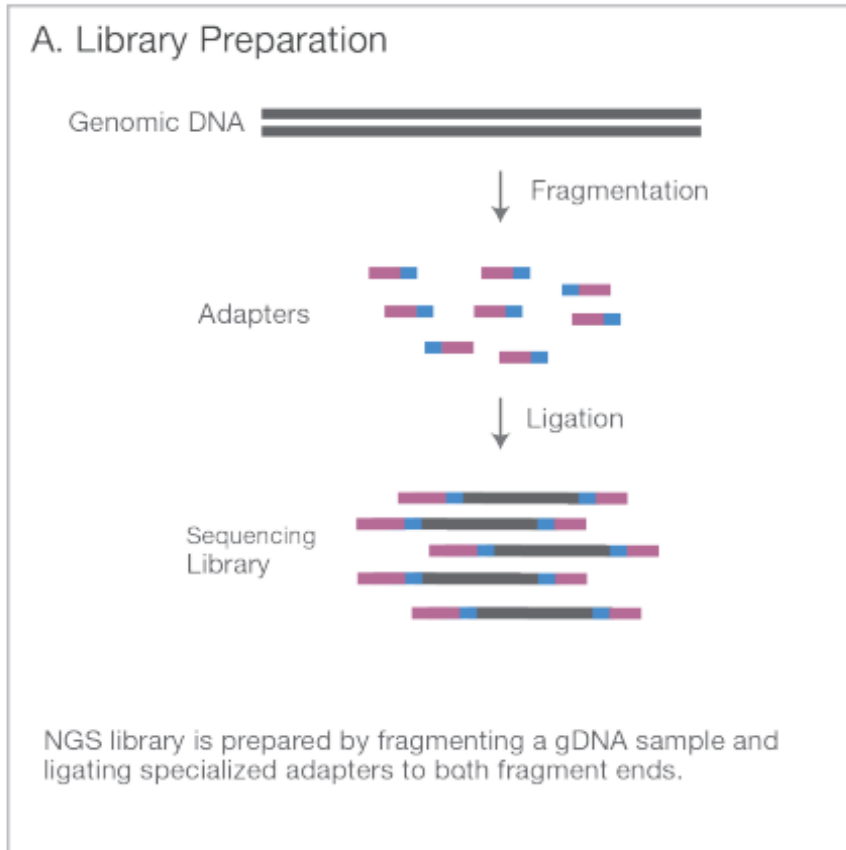


NovaSeq Series

Population- and production-scale genome, exome, transcriptome sequencing, and more.

NGS

Illumina



Fragmented input DNA

End Repair

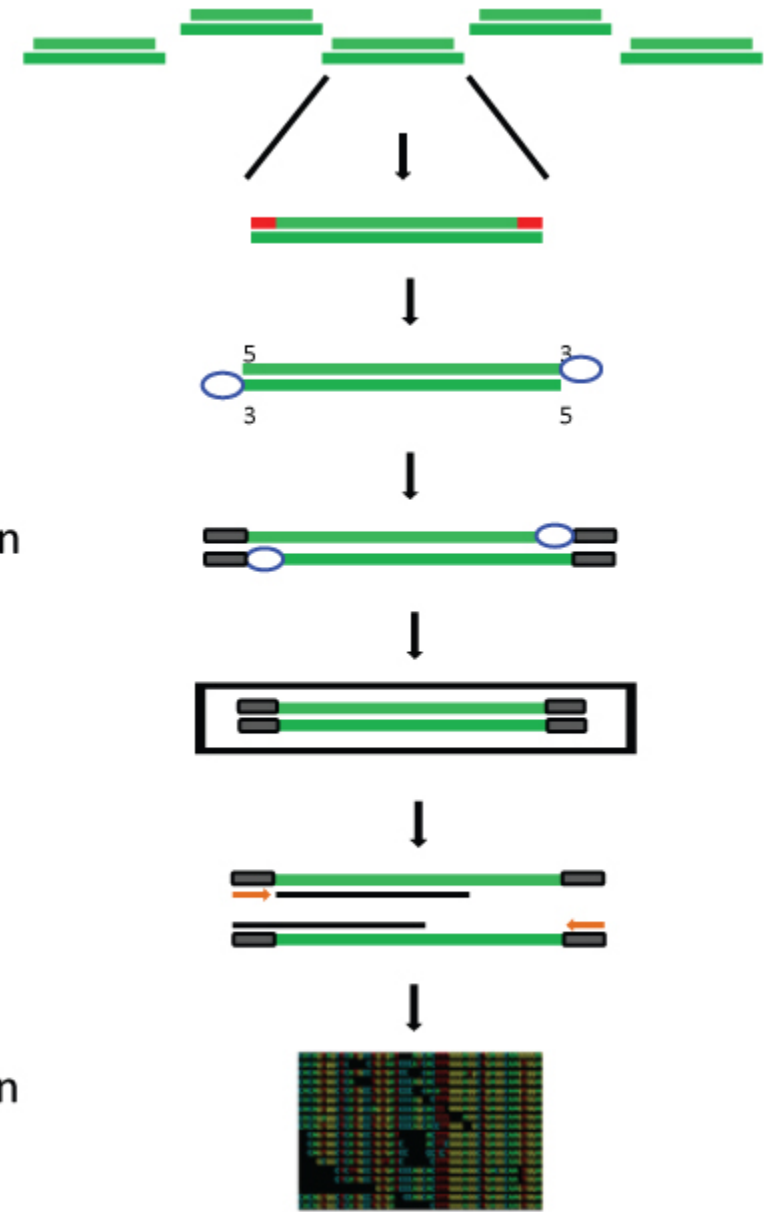
dA Tailing

Adaptor Ligation

Size Selection

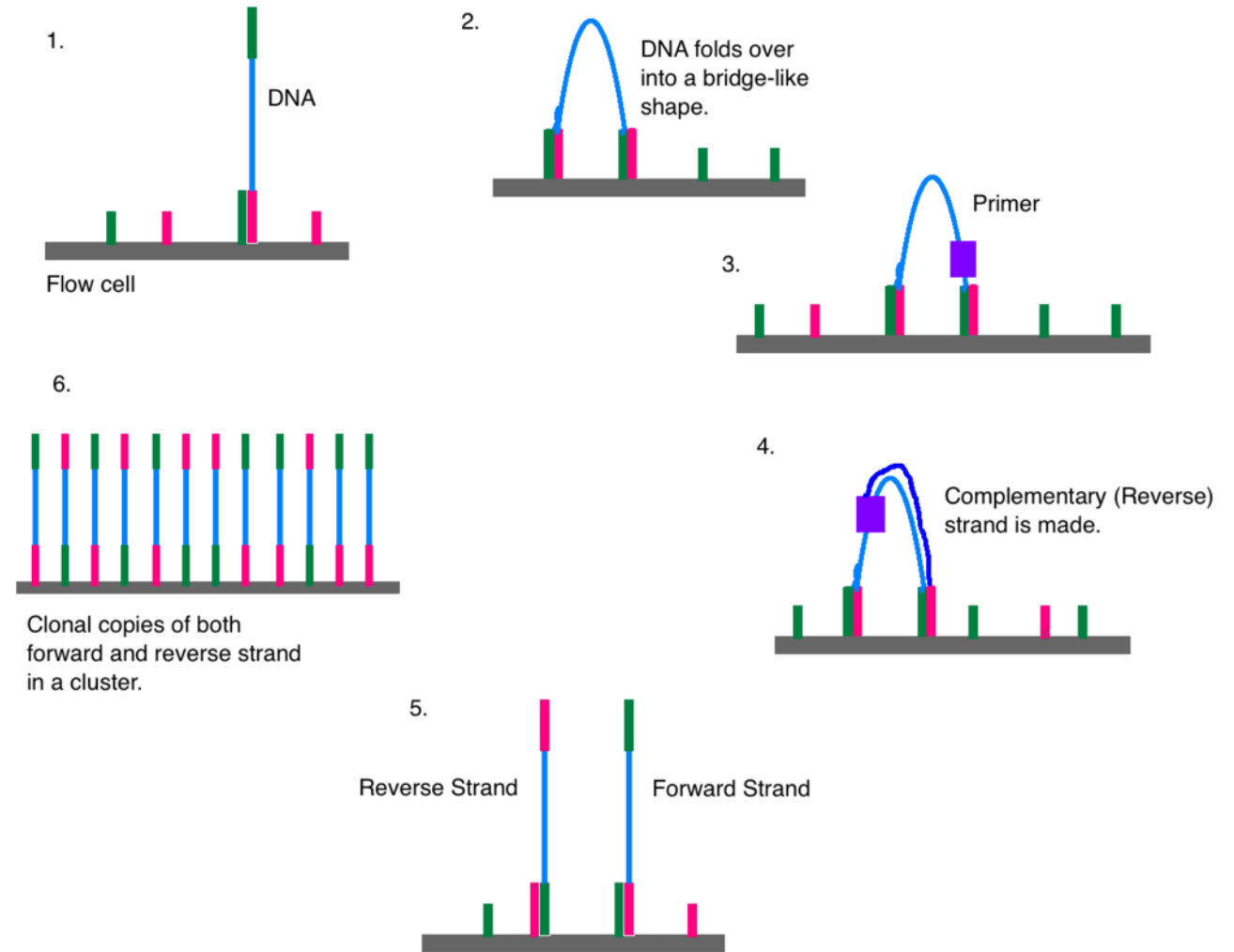
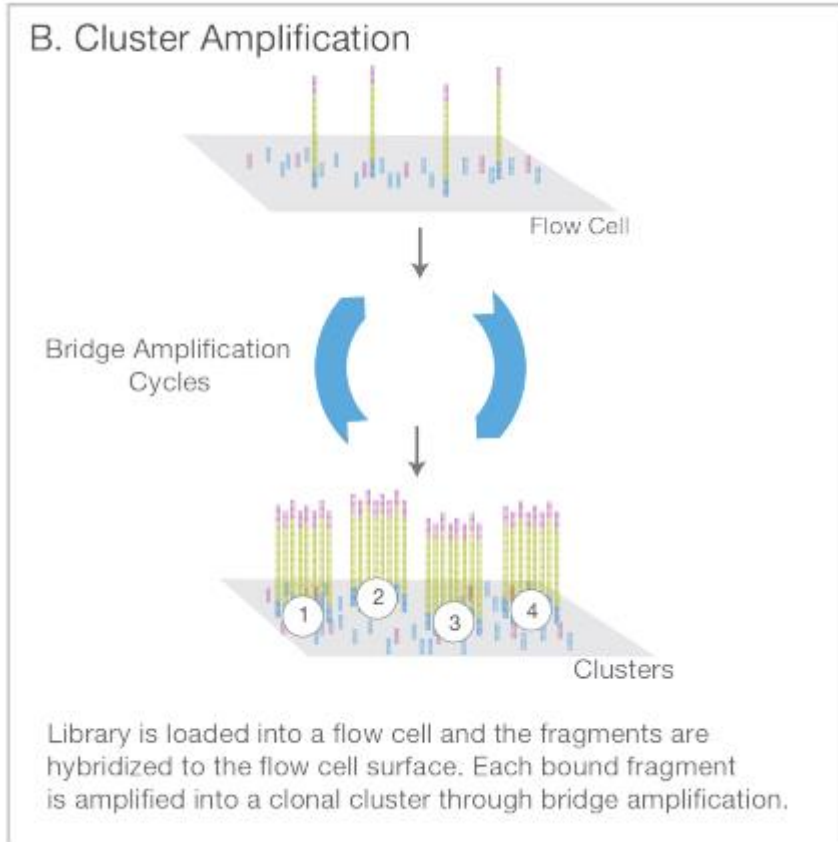
Amplification

Next Generation Sequencing



NGS

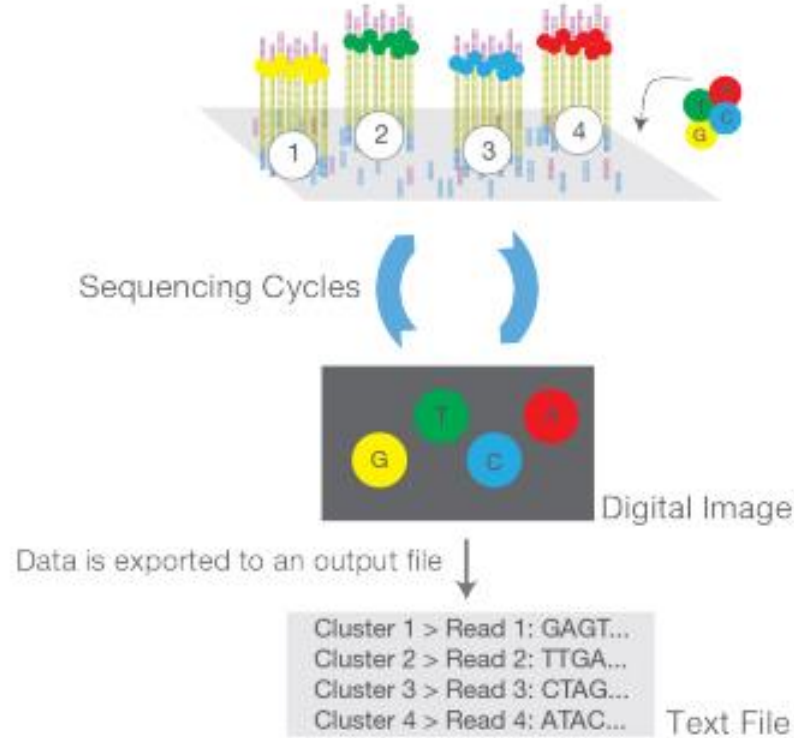
Illumina



NGS

Illumina

C. Sequencing



Sequencing reagents, including fluorescently labeled nucleotides, are added and the first base is incorporated. The flow cell is imaged and the emission from each cluster is recorded. The emission wavelength and intensity are used to identify the base. This cycle is repeated "n" times to create a read length of "n" bases.

NGS

Illumina

D. Alignment and Data Analysis

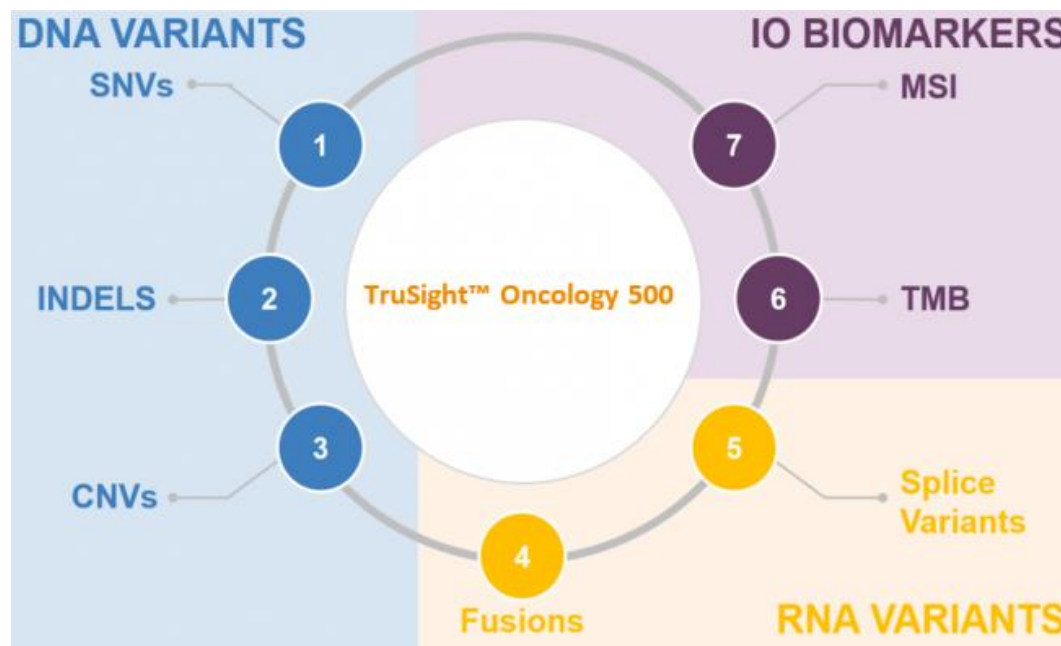
Reads	ATGGCATTGCAATTTGACAT
	TGGCATTGCAATTTG
	AGATGGTATTG
	GATGGCATTGCAA
	GCATTGCAATTTGAC
	ATGGCATTGCAATT
	AGATGGCATTGCAATTTG
	Reference Genome

Reads are aligned to a reference sequence with bioinformatics software. After alignment, differences between the reference genome and the newly sequenced reads can be identified.

NGS

Illumina

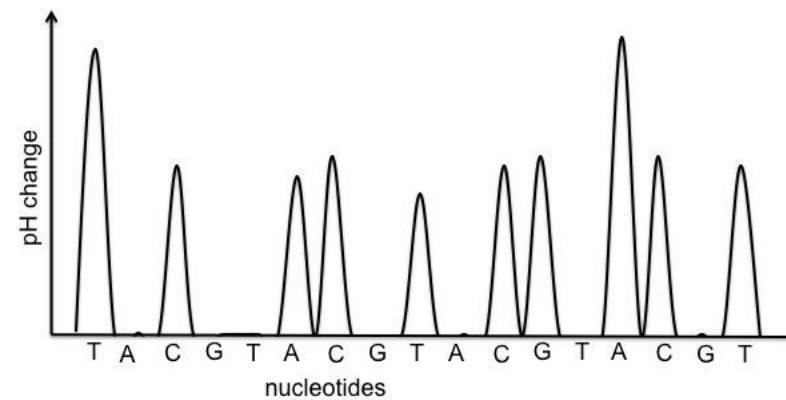
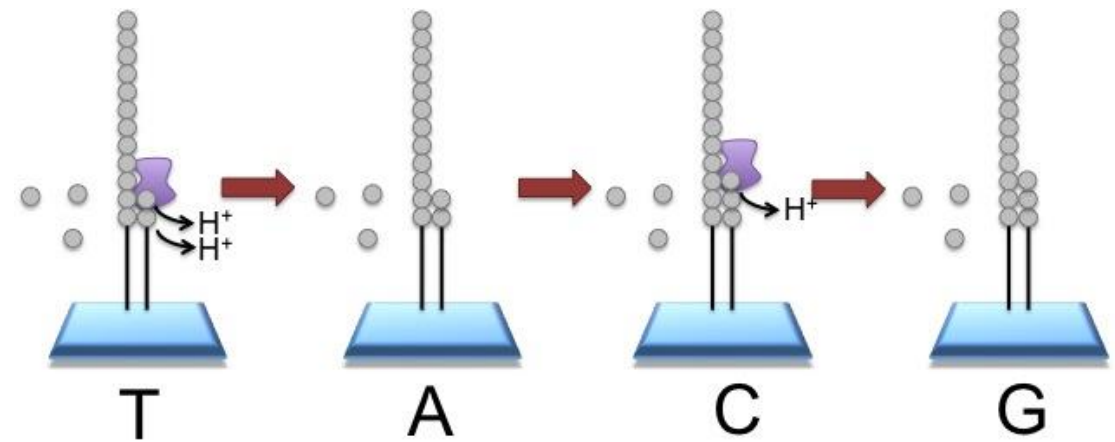
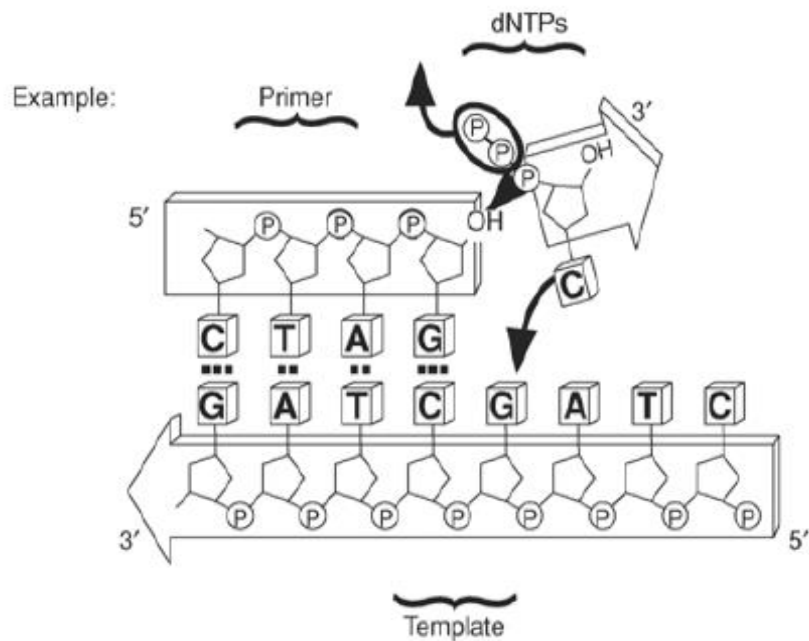
- v onkologii zejména **TruSight Oncology 500** = sekvenace panelu cca 500 genů (523)
- komplexní genomické profilování nádorů (z FFPE vzorků nebo krve)
- Analyzuje DNA i RNA
- stanovuje nádorovou mutační nálož (TMB) a mikrosatelitovou nestabilitu (MSI) jako imunoterapeutické markery



NGS

Ion Torrent

- Polovodičové sekvenování
- Změna pH při inkorporaci dNTP, měření ISFET
- Žádná optika, žádné modifikované nukleotidy

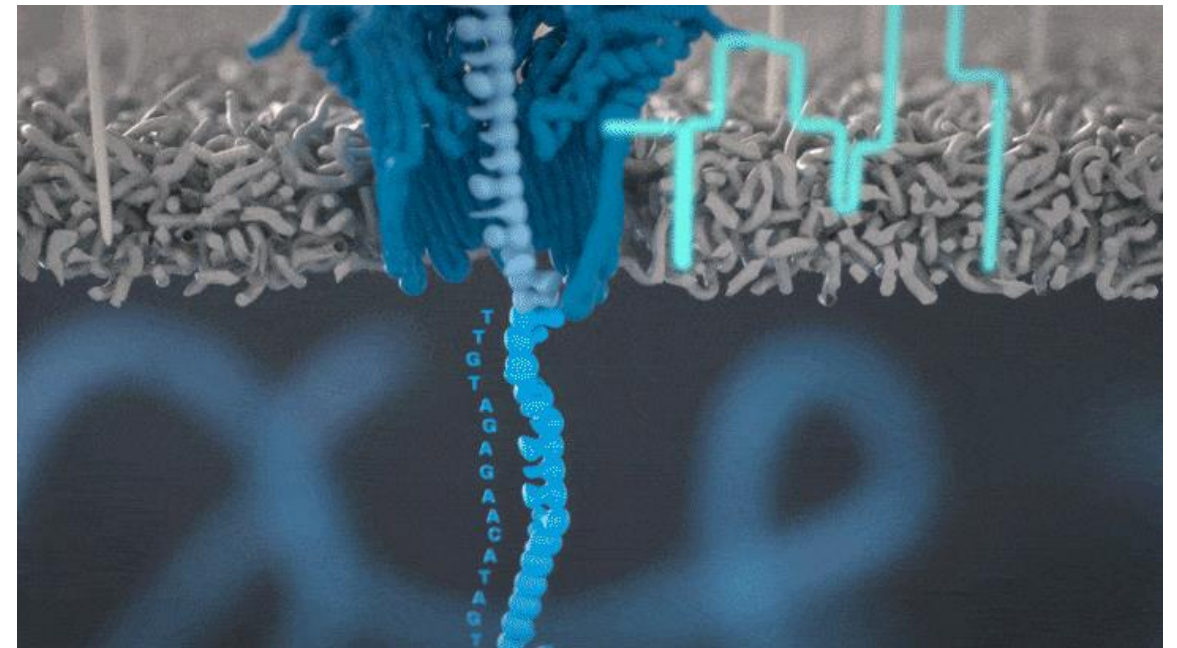


Ion Proton™ Sequencer

NGS

Oxford Nanopore

- Třetí generace sekvenování
- Změny elektrického potenciálu při průchodu nanopórem
- Délka čtení > 10 kb
- Přímé real-time sekvenování bez značení

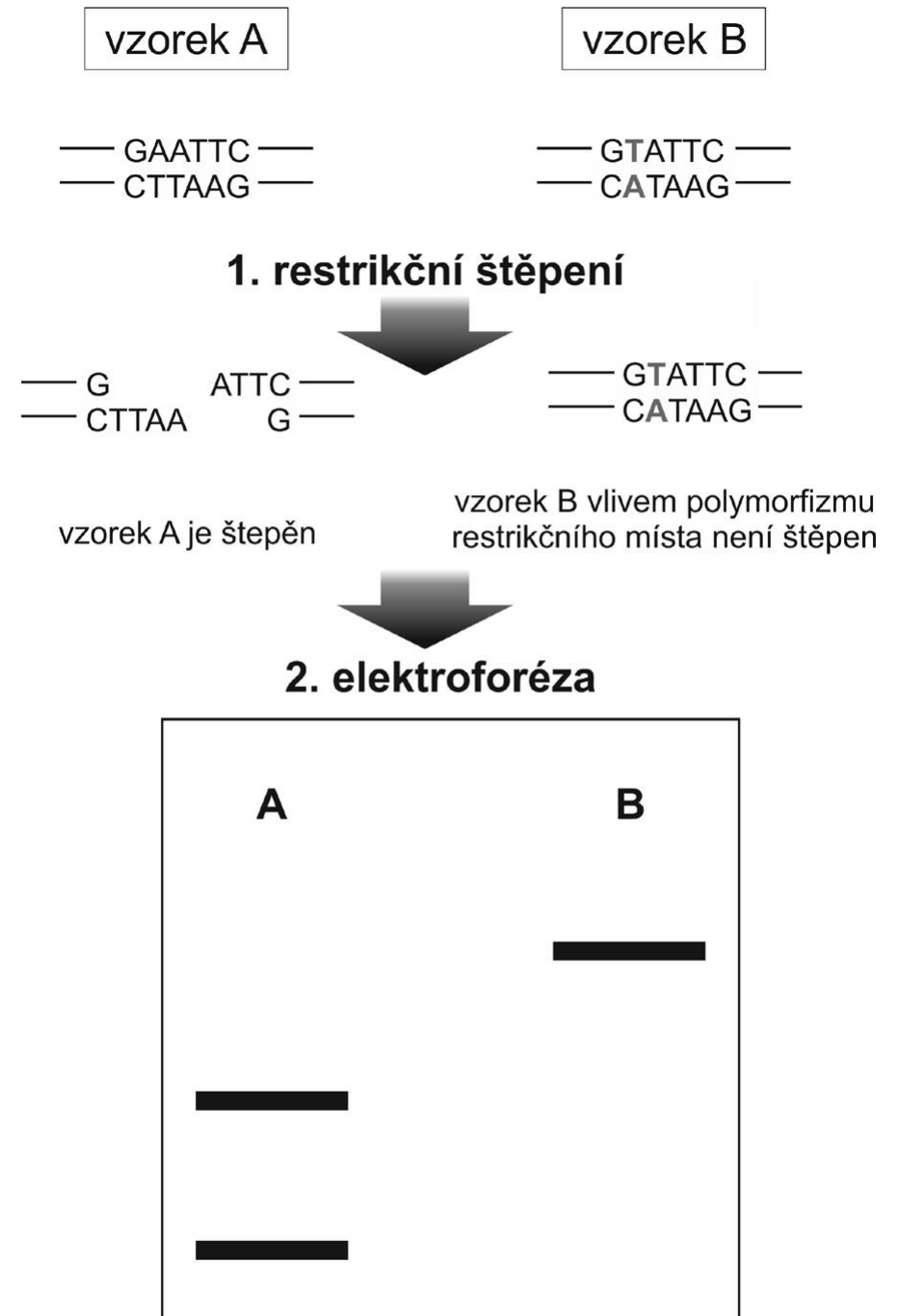


Metody na detekci DNA mutací

- Techniky založené na kvantifikaci DNA (qPCR)
- DNA sekvenování
- přístupy zaměřené na stanovení délky DNA fragmentů (RFLP)
- MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification)
- HRM (high-resolution melting analysis)

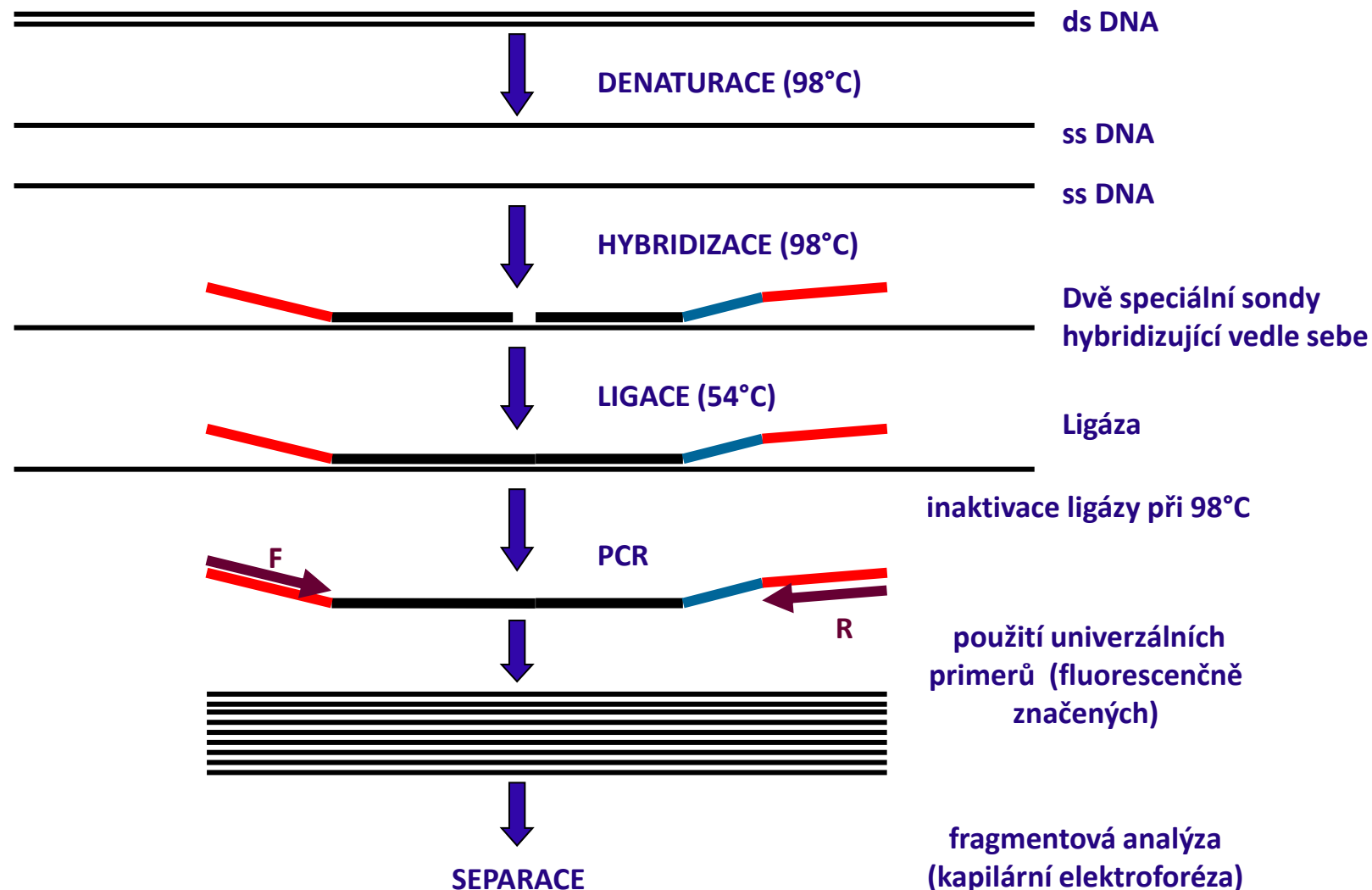
Metody na detekci DNA mutací

- RFLP (restriction fragment length polymorphism)



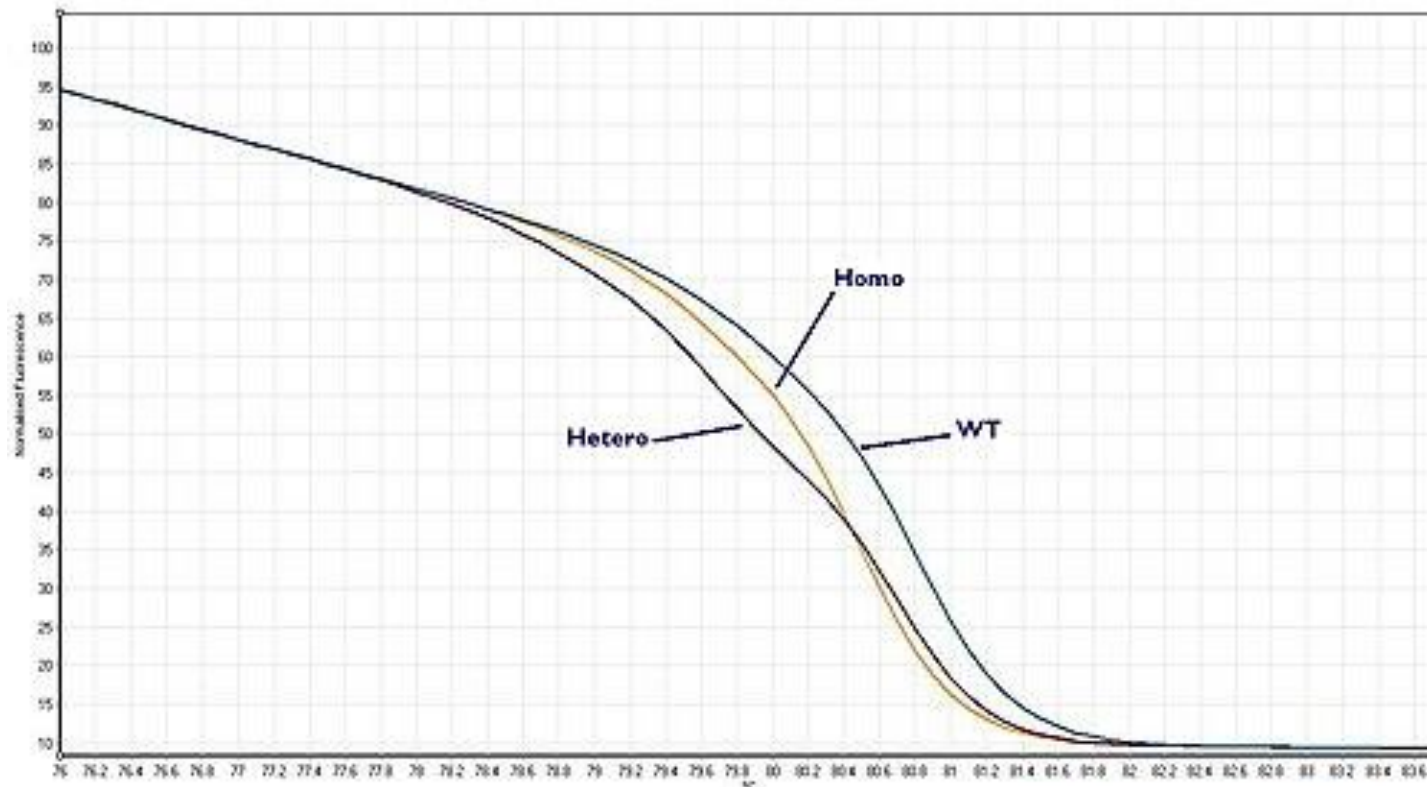
Metody na detekci DNA mutací

- MLPA
- Vhodné pro detekci delecí, inzercí, CNV nebo aneuploidie
- Stačí jeden set primerů na několik targetů



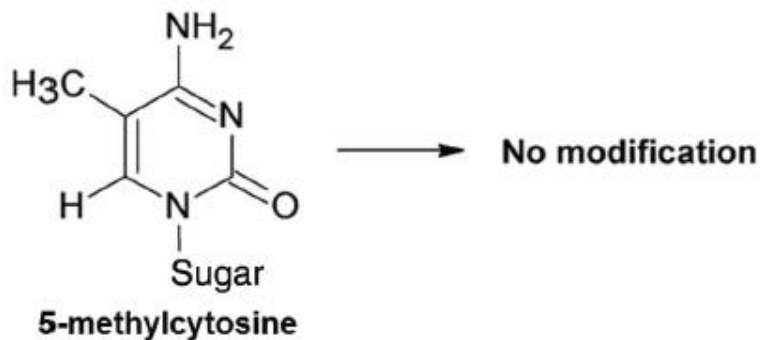
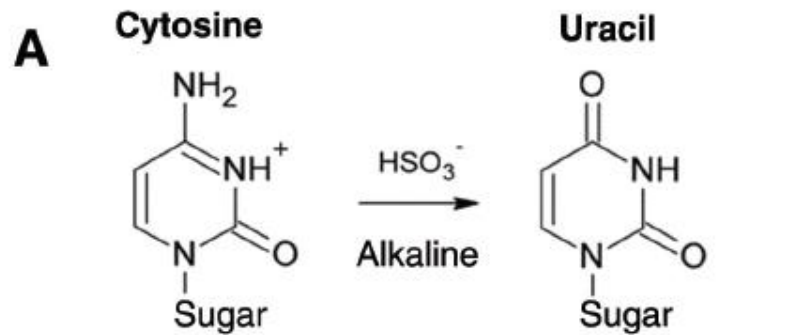
Metody na detekci DNA mutací

- HRM (high resolution melting)
- Detekce mutací, polymorfizmu nebo DNA metylace
- Plně komplementární duplexy mají vyšší teplotu tání než SNP duplexy
- Real-time monitorování separace duplexů zvyšováním teploty



DNA metylace – metody analýzy

- bisulfitová konverze + metyl-specifická PCR



B Original **unmethylated** DNA

After bisulfite treatment

After PCR amplification

A-G-C-T-C-G-A-C-G-T-C-A

A-G-U-T-U-G-A-U-G-T-U-A

A-G-T-T-T-G-A-T-G-T-T-A

Original **methylated** DNA

After bisulfite treatment

After PCR amplification

A-G-C-T-mC-G-A-mC-G-T-C-A

A-G-U-T-mC-G-A-mC-G-T-U-A

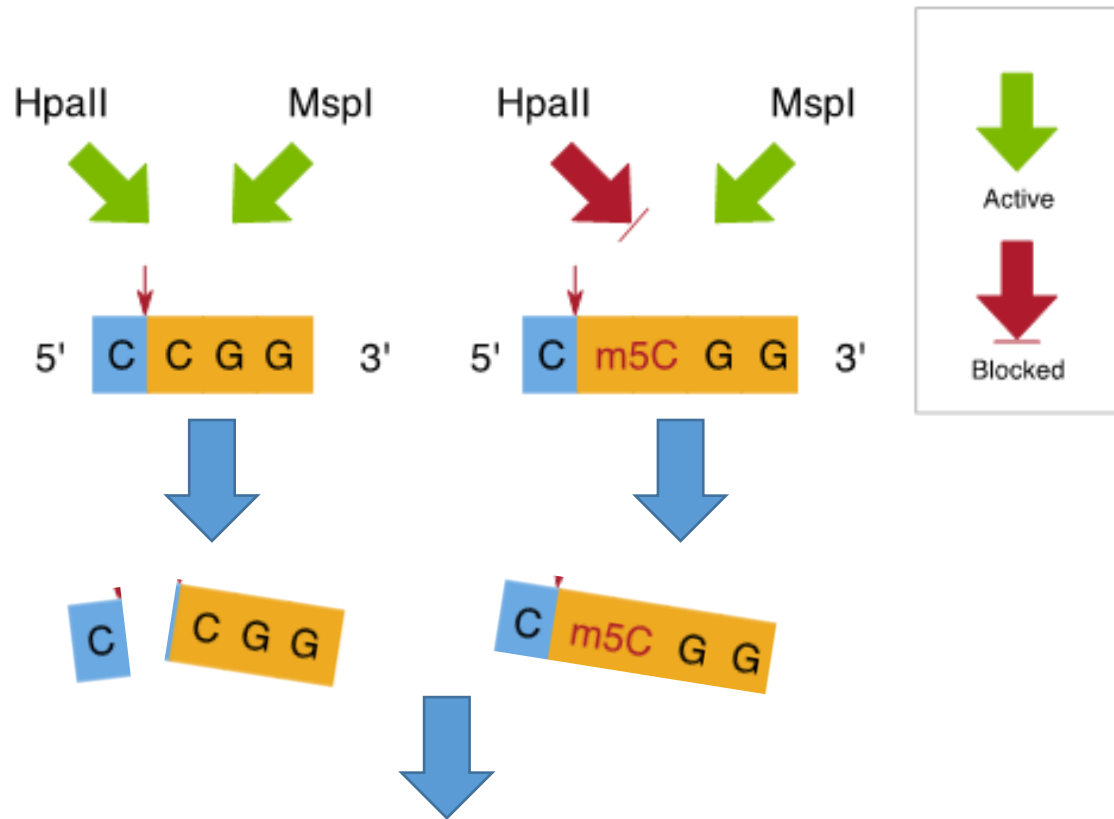
A-G-T-T-C-G-A-C-G-T-T-A

DNA metylace – metody analýzy

- restrikční štěpení pomocí metyl-senzitivních enzymů

nemetylovaná

metylovaná



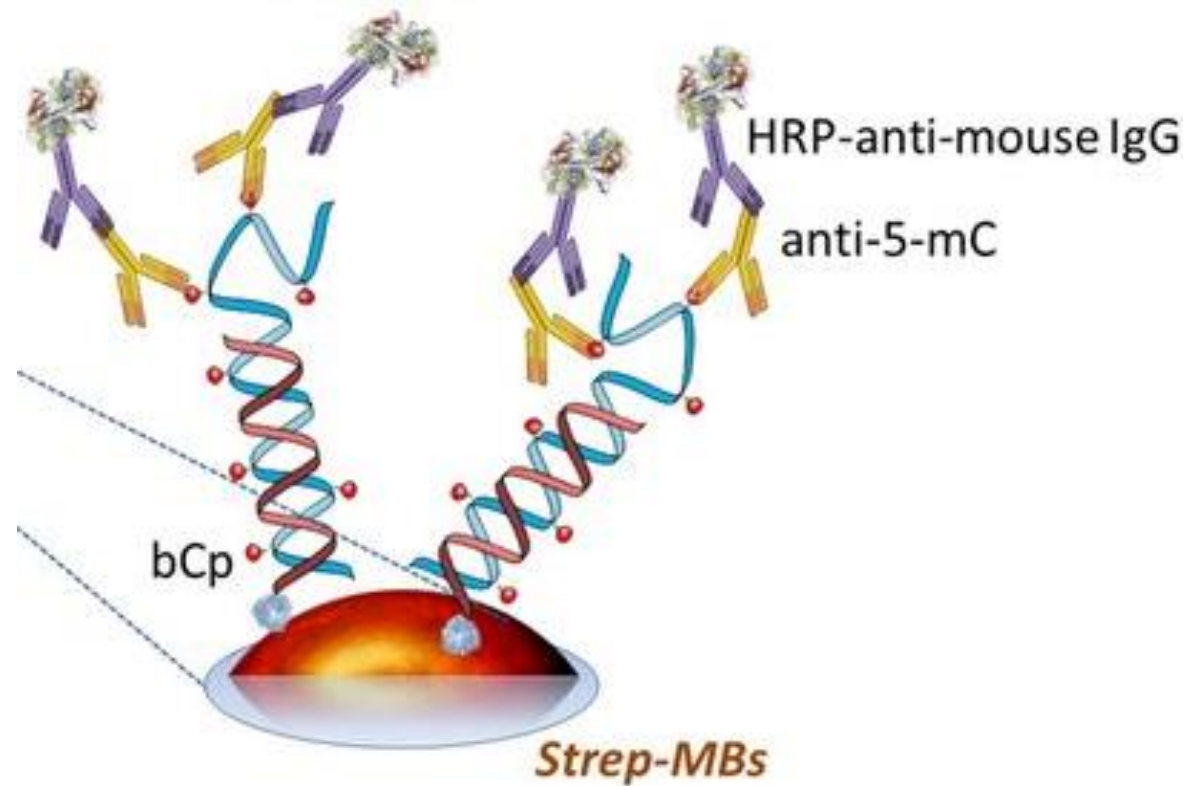
další analýza pomocí různých technik

A quick review of relevant DNA methylation restriction enzymes.

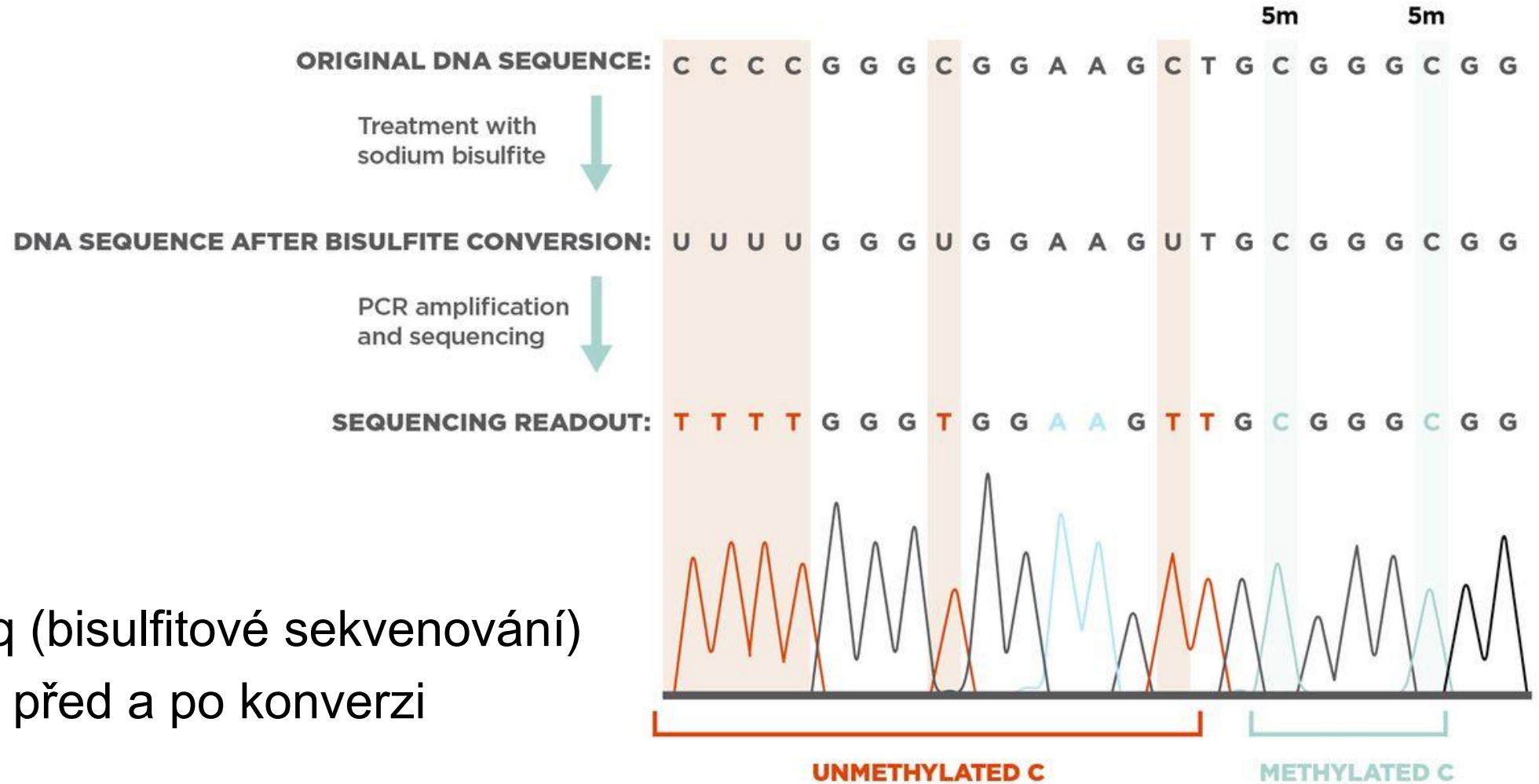
Product	DNA Methylation Application	Recognition Site
MspJI	Identify 5-hmC and 5-mC	5'.. ^m CNNR(n) ₉ ▼...3' 3'.. GNNY(N) ₁₁ ▲...5'
LpnPI	Identify 5-hmC and 5-mC	5'.. C ^m CDG(N) ₁₀ ▼...3' 3'.. GGHC(N) ₁₄ ▲...5'
FspEI	Identify 5-hmC and 5-mC	5'.. C ^m C(N) ₁₂ ▼...3' 3'.. GG(N) ₁₆ ▲...5'
DpnI	Identify 5-mA; used with DpnII	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ 5' \dots \text{GA} \text{TC} \dots 3' \\ \\ 3' \dots \text{CT} \text{AG} \dots 5' \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
DpnII	Identify 5-mA; used with DpnI	5'.. ▼GATC ...3' 3'.. CTAG ▲...5'
McrBC	Identify 5-mC	5'..Pu ^m C(N ₄₀₋₃₀₀₀)Pu ^m C...3'
MspI	Identify 5-mC; used with HpaII	5'.. C▼CGG ...3' 3'.. GGC▲C...5'
HpaII	Identify 5-mC; used with MspI	5'.. C▼CGG ...3' 3'.. GGC▲C...5'

DNA metylace – metody analýzy

- afinitní purifikace pomocí protilátek nebo MBD proteinů



DNA metylace – metody analýzy



- Methyl-seq (bisulfitové sekvenování)
- Porovnání před a po konverzi

DNA metylace – metody analýzy

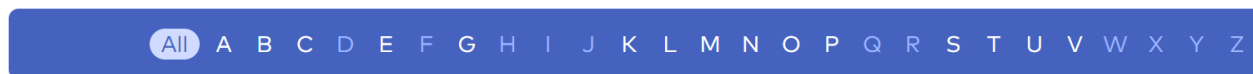
- Schválené diagnostické testy

Galleri test

- první multi-cancer early detection test (MCED test)
- detekce metylované DNA v krvi, analýza cirkulující nádorové DNA metodou NGS a „machine learning“, výsledek do 10 dní
- nehrazeno v USA, doplňkové vyšetření, u některých typů nádorů nízká přesnost

50+ cancer types

The Galleri test detects a signal shared by 50+ cancer types. In clinical studies, the following cancers were diagnosed after a Cancer Signal Detected result with the Galleri test.¹



A

Adrenal Cortical Carcinoma
Ampulla of Vater
Anus
Appendix, Carcinoma

B

Bile Ducts, Distal
Bile Ducts, Intrahepatic
Bile Ducts, Perihilar
Bladder, Urinary
Bone
Breast

C

Cervix
Colon and Rectum

E

Esophagus and
Esophagogastric Junction

<https://grail.com/galleri-test/>

<https://www.youtube.com/watch?v=ZqkuKb9yqVA&t=135s>

DNA metylace – metody analýzy

- Schválené diagnostické testy

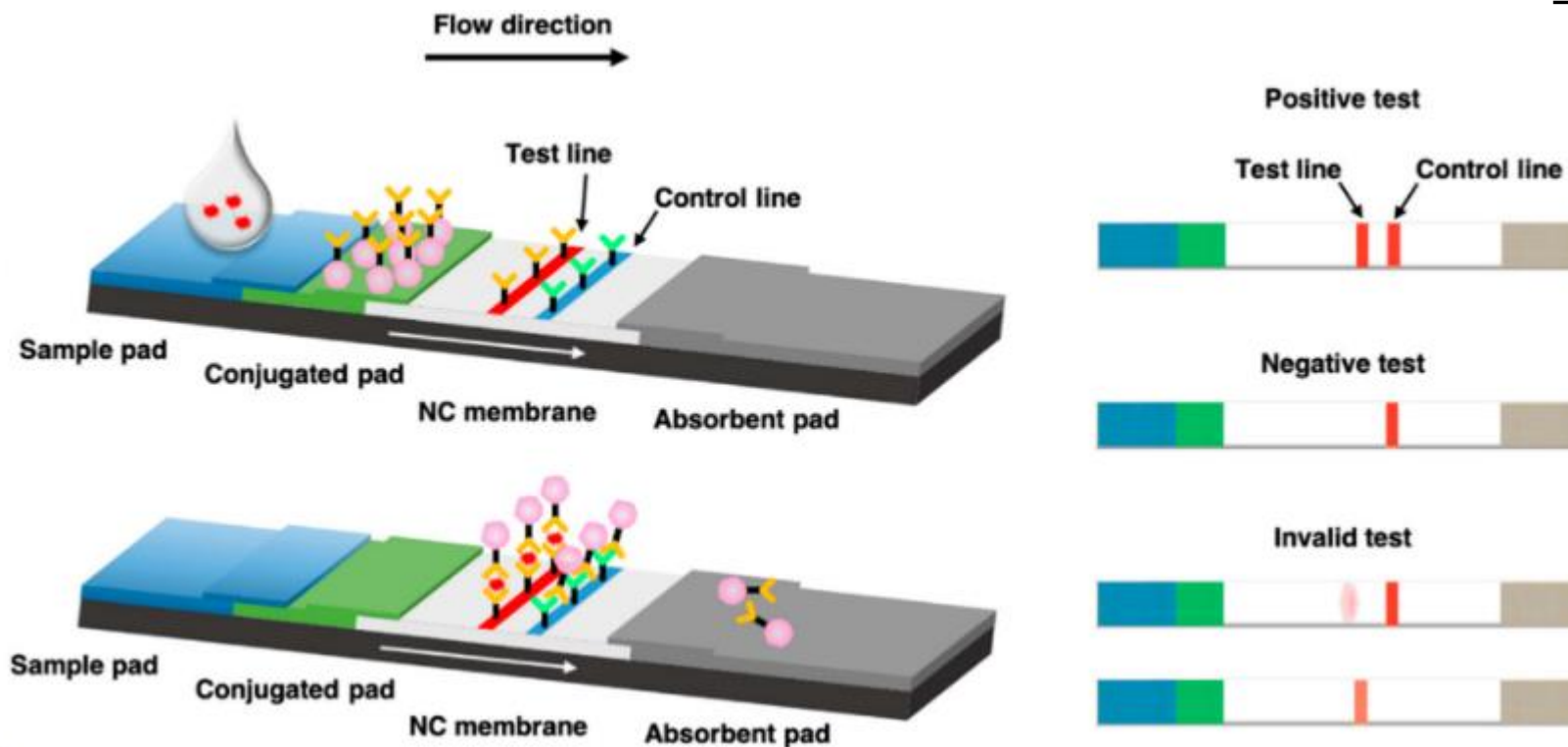
Epi proColon test

- první krevní test pro screening CRC schválen FDA
- pro pacienty kteří nechtějí kolonoskopii
- test detekuje hypermetylací promotoru genu *septin9* metodou Real-Time PCR s bisulfitovou konverzí
- negativní test = není přítomný CRC (specifičnosti testu: 94%)
- pozitivní test = 45,7% pravděpodobnost výskytu CRC, doporučena kolonoskopie (nízká citlivost)
- není hrazen ZP



Lateral flow assays

- Rychlé, levné, jednoduché (těhotenský test, antigen Covid test,...)
 - Paper-based, kvalitativní ale ne kvantitativní
 - Pozitivní výsledek ve formě proužku
 - Pro detekci proteinů i DNA/RNA
- Příklad v onkologii:
 - Přítomnost onkovirů
 - Detekce bodových mutací
 - Detekce onkomarkerů (proteinů)



Čas na hru

[Kahoot.it](https://kahoot.it)

