

C7188 Úvod do molekulární medicíny 4/12



Moderní metodické přístupy v molekulární medicíně II



GENOMIKA II



Ondřej Slabý, Ph.D.

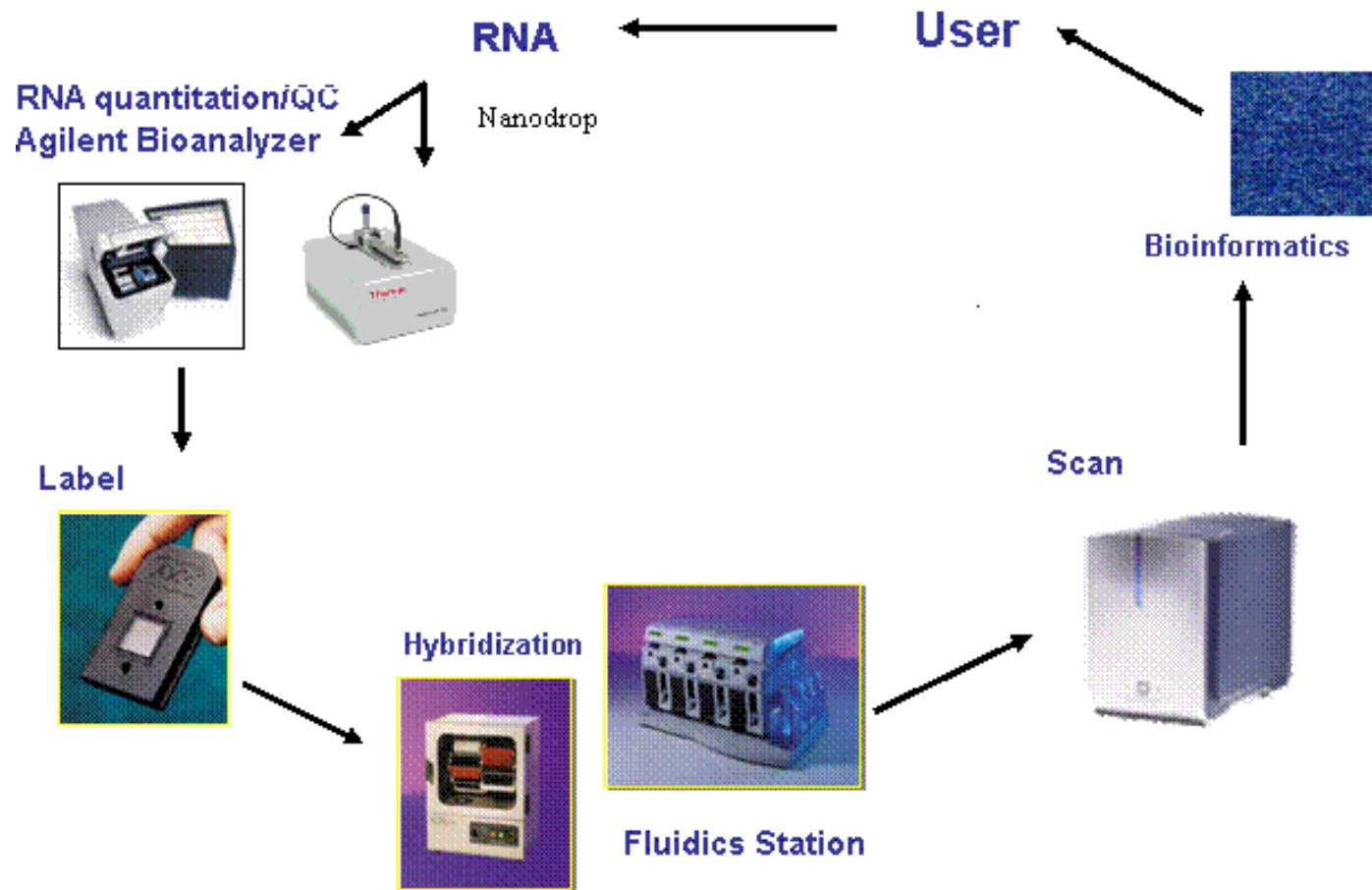
Masarykův onkologický ústav

Univerzitní centrum buněčné imunoterapie

Lékařská fakulta Masarykovy univerzity

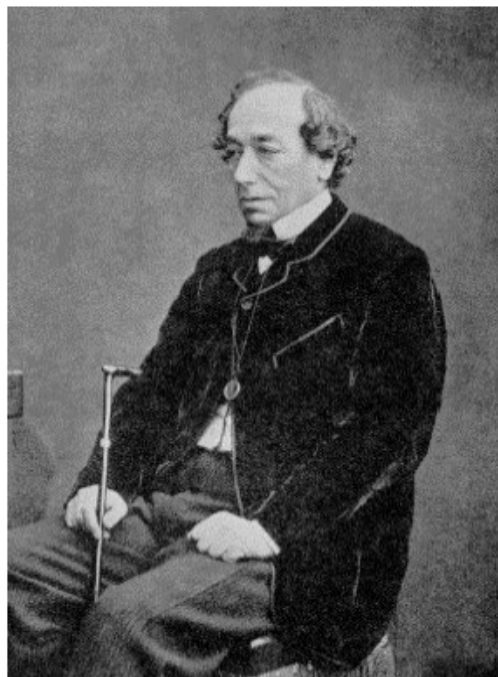
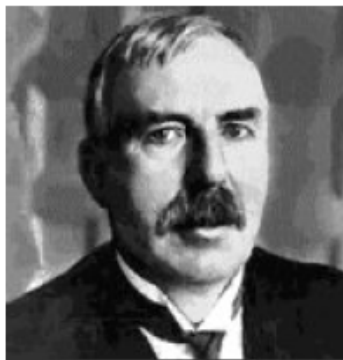


Microarray sample processing workflow



“If your experiment needs statistics, you should have done a better experiment.”

Ernest Rutherford



“There are three types of lies: lies, damn lies, and statistics!”

Benjamin Disraeli

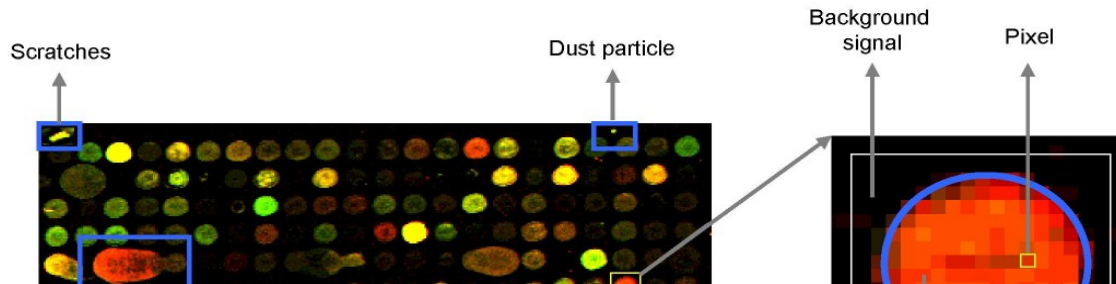
Analýza obrazu

Odečtení pozadí od „foreground“

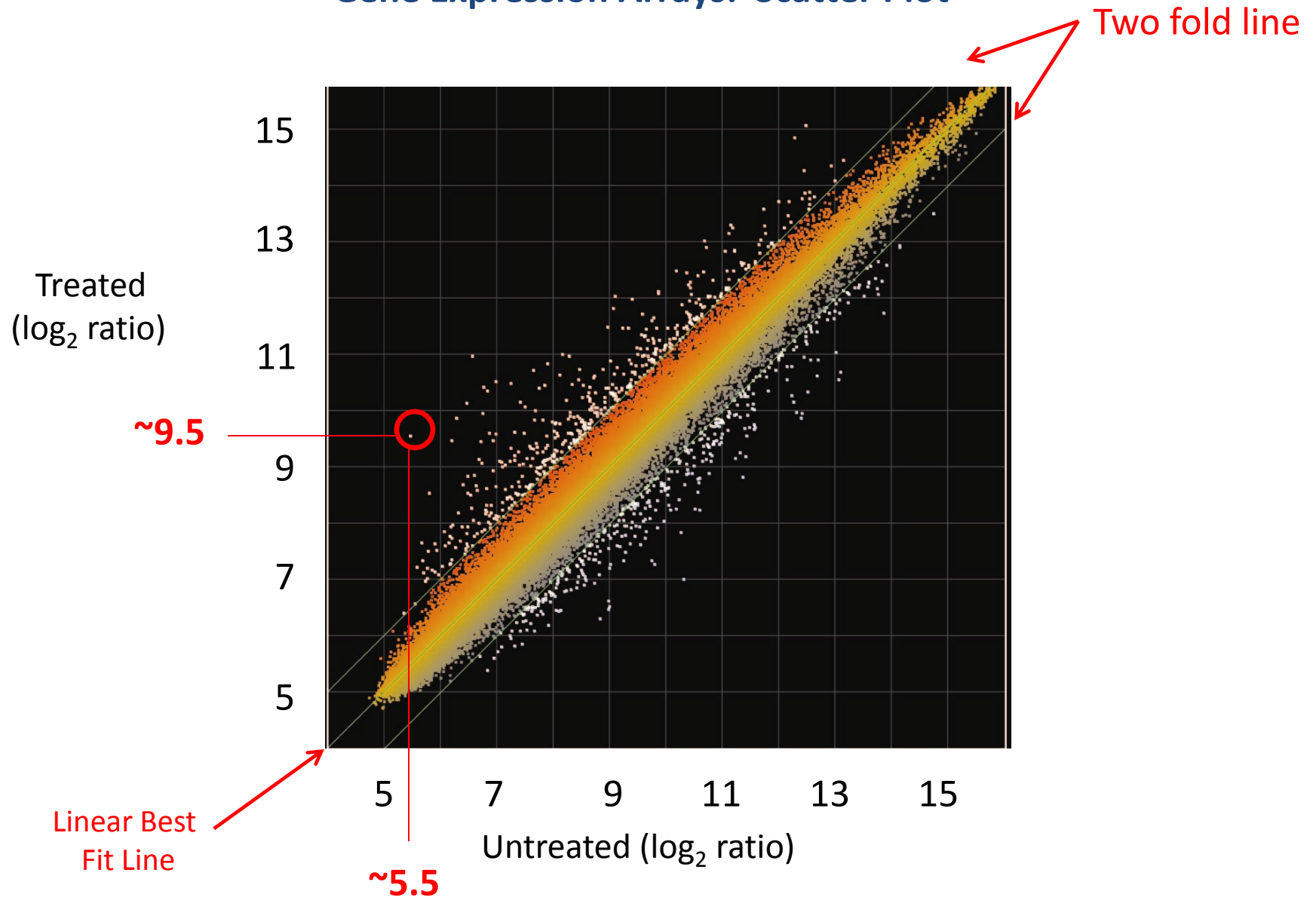
– background subtraction

(gridding, local background, median, empty spot,...)

-převod obrazové informace na numerická data



Gene Expression Arrays: Scatter Plot



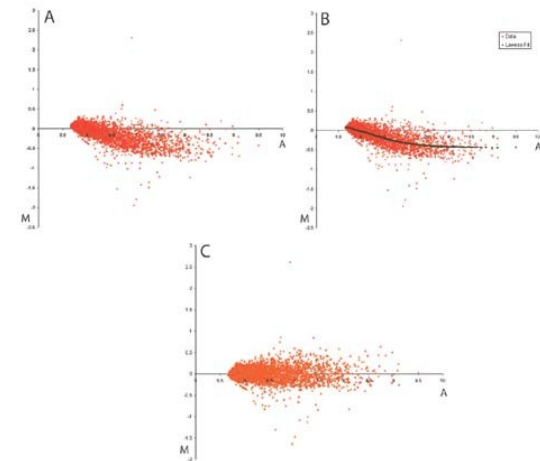
Normalizace dat

ukázky normalizačních metod

- minimalizace vlivu „nebiologických“ zdrojů variability
- kompenzace nelinearity dat mezi jednotlivými čipy a uvnitř daného čipu

Pozitivní kontroly:

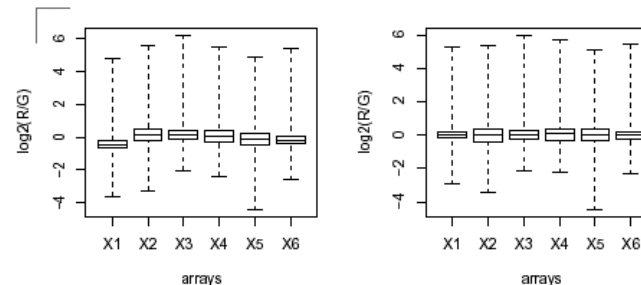
- Referenční geny s „konstantní“ expresí ve tkáních
- kontrolní genetický materiál (referenční vzorek)
- kontroly účinnosti hybridizace – arteficiální sekvence



Negativní kontrola:

- pozadí hybridizace
- Affymetrix - mutace v jednom nukleotidu sondy

Mean, median normalization



Subtract common mean or median:

old values: $y_{gi} = \log_2(R_{gi}/G_{gi})$ on array i

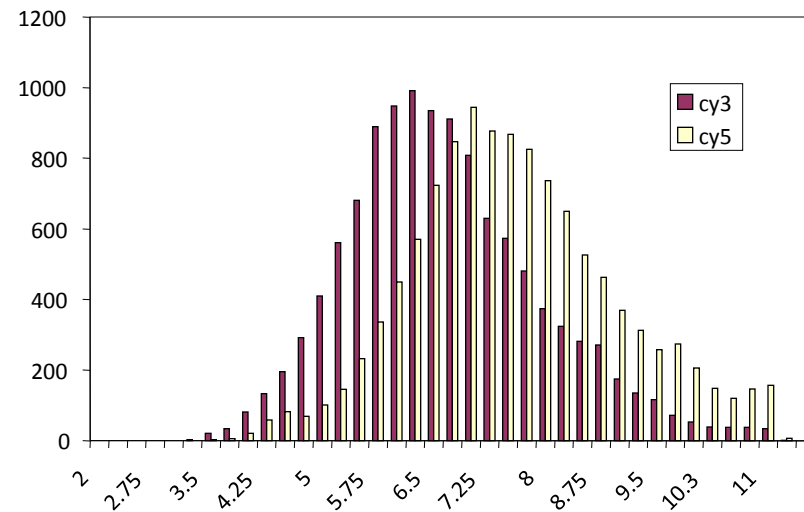
new values: $y_{gi}^{(n)} = y_{gi} - \text{mean}_i$

Normalizace dat Cy3 a Cy5

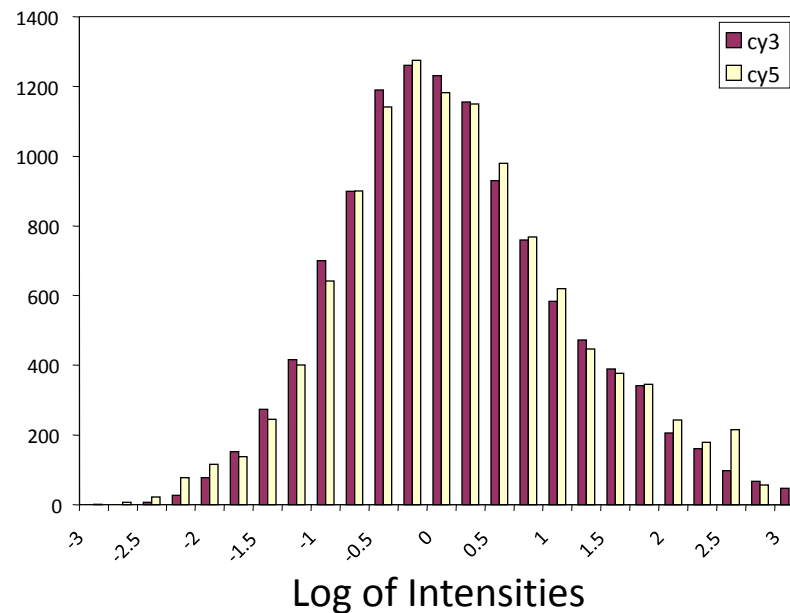
vybalancování rozdílného signálu ze značení Cy3 a Cy5

Jeho nerovnoměrnost může být způsobena:

- rozdílnou inkorporací barviva do NK
- rozdílným množstvím mRNA
- odlišnými parametry při skenování



Number of clones



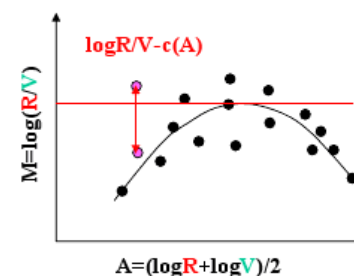
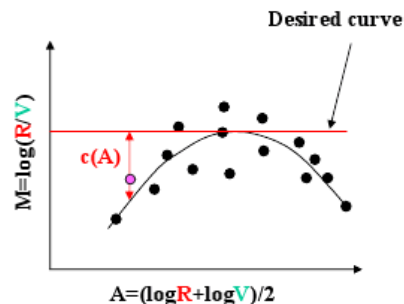
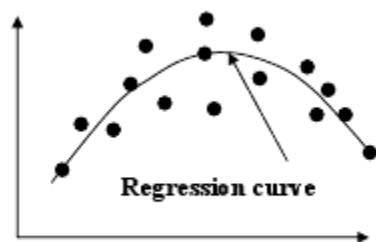
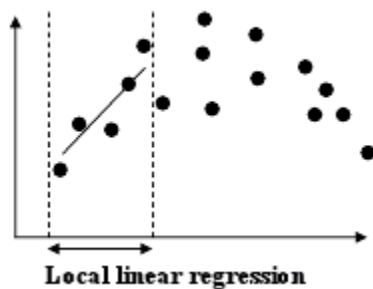
Normalizace Lowess: princip

Loess (or lowess) : Locally WEighted Scatterplot Smoothing (vyhlazování)

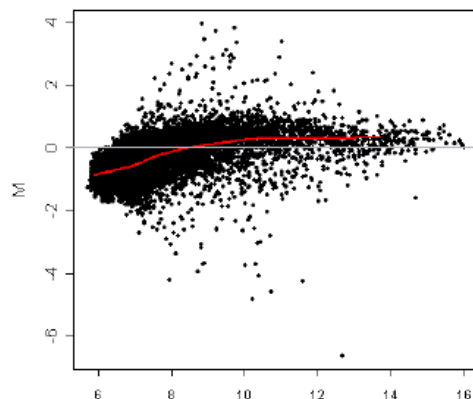
Normalizace závislá na intezitě signálu

Místní lineární regrese

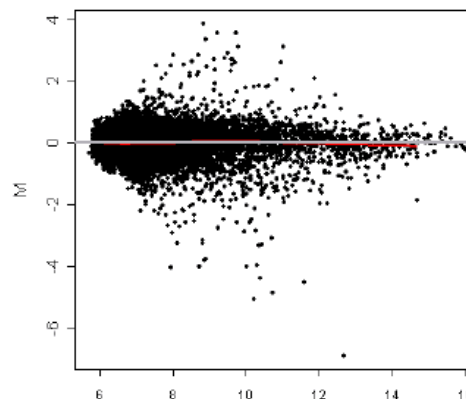
$$\log(R/V) \rightarrow \log(R/V) - c(A)$$



Before normalization



After normalization



Statistická analýza dat

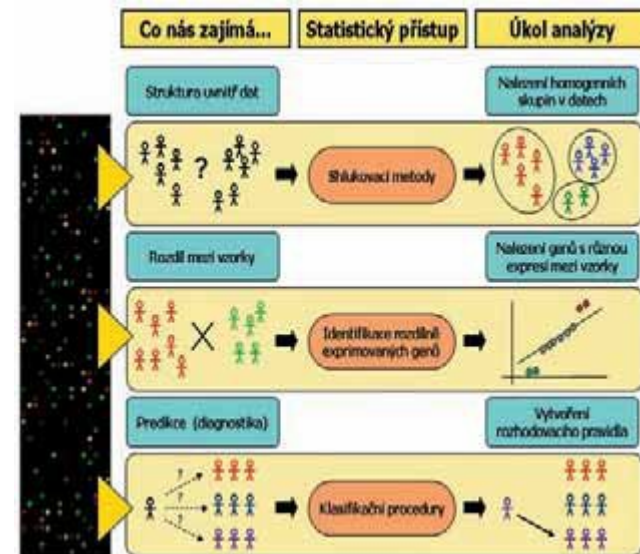
Základní dělení metod je na „supervised“ (klastrovací metody) a „unsupervised“ (identifikace biologicky významných genů, klasifikační metody)

Další skupina metod propojuje informaci o genové expresi s dostupnými informacemi o biologické funkci genů (analýzy signálních drah, informace z databáze GO „gene ontology“, a další)

1) Identifikace biologicky významných genů

- geny s reprodukovatelnou signifikantně rozdílnou expresí mezi jednotlivými podmínkami experimentu
- poměr exprese v jednotlivých experimentech (fold change)
- t-test (test rozdílnosti průměrů exprese v jednotlivých skupinách)
- neparametrické testy (Mann-Whitney, Wilcoxon test)
- Significance Analysis of Microarrays (SAM)
- Multifaktoriální ANOVA (nejsignifikantnější geny pro dané skupiny)

Hranice významnosti (1% = 1 ze 100, u čipu je to 200 falešně pozitivních z 20000, Bonferoniho korekce)



2) Ukázky multidimenzionálních metod analýzy čipových dat

Shlukovací analýzy

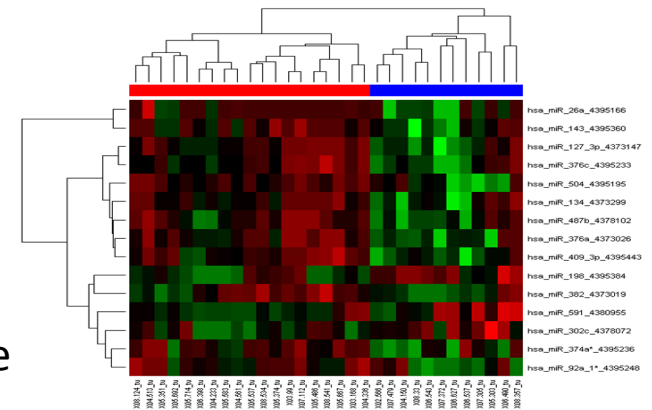
Shlukovací analýza je jednou z nejpoužívanějších vícerozměrných statistických metod

Jedná se o explorativní techniku, která se používá zejména v případech, kdy nemáme žádné *a priori znalosti* o struktuře uvnitř dat.

každý gen je reprezentován vektorem jehož souřadnice, jsou hodnoty exprese genu v jednotlivých experimentech (v jednotlivých vzorcích), vzdálenost je měřena mezi vektory nebo centroidy

Ukolem shlukovacích metod je tedy najít v datech skupiny prvků (shluky) tak, že prvky jednotlivých skupin budou v jistém smyslu více podobné než prvky z jiných skupin, tzn. nalezené skupiny prvků budou co nejvíce homogenní

Snažíme se nalézt mezi zkoumanými geny (resp. biologickými vzorky) skupinky genů (resp. biologických vzorků), které vykazují za specifických podmínek nebo u daného fenotypu, podobné chování.



Clustering methods

Hierarchical

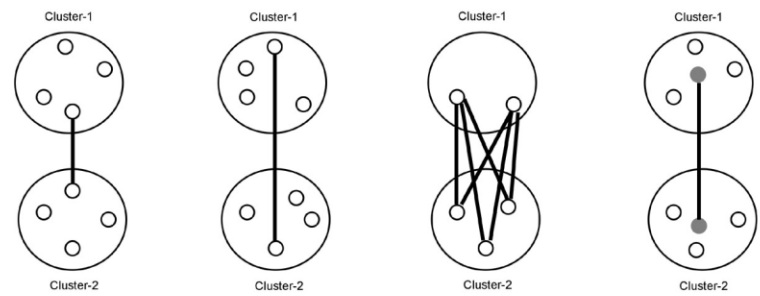
Non-hierarchical
e.g: K-means, SOMs

Agglomerative

Divisive

- Single linkage
- Complete linkage
- Average linkage
- Centroid linkage

Single linkage clustering Complete linkage clustering Average linkage clustering Centroid linkage clustering

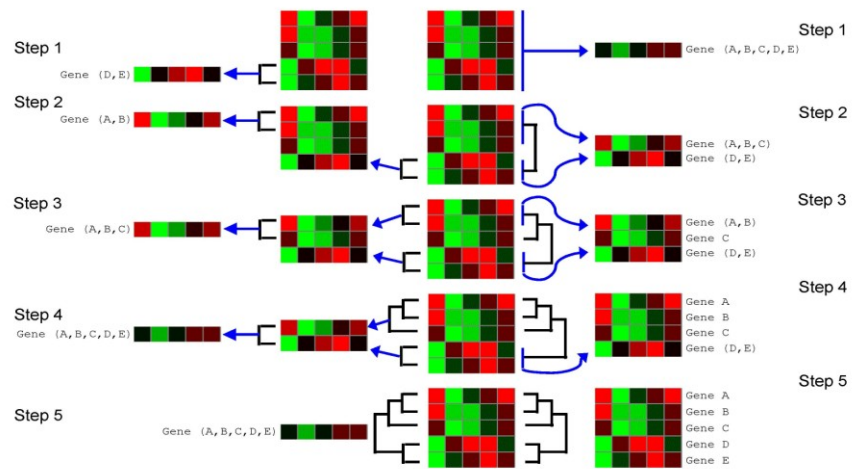


○ Object in a cluster (may be a gene or a sample expression profile)
 — Distance between clusters
 ● Centroid of a cluster (may be centroid of a gene or a sample expression profile)

Agglomerative clustering

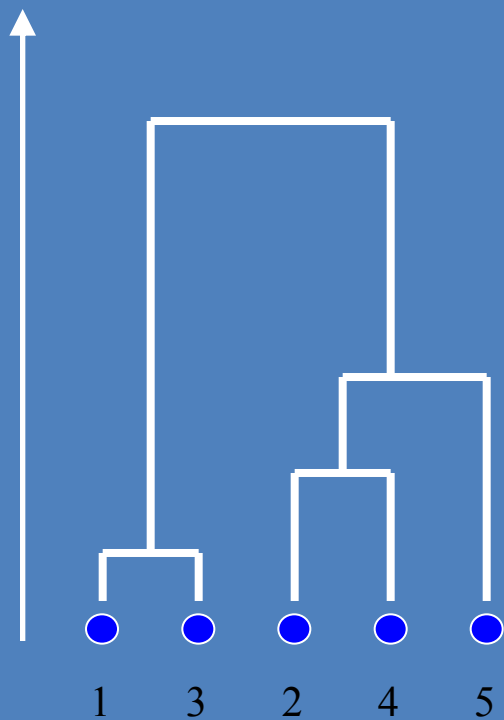
Divisive clustering

	C1	C2	C3	C4	C5
Gene A	Green	Green	Green	Red	Red
Gene B	Green	Green	Green	Red	Red
Gene C	Green	Green	Green	Red	Red
Gene D	Green	Green	Green	Red	Red
Gene E	Green	Green	Green	Red	Red



Hierarchické klastrování

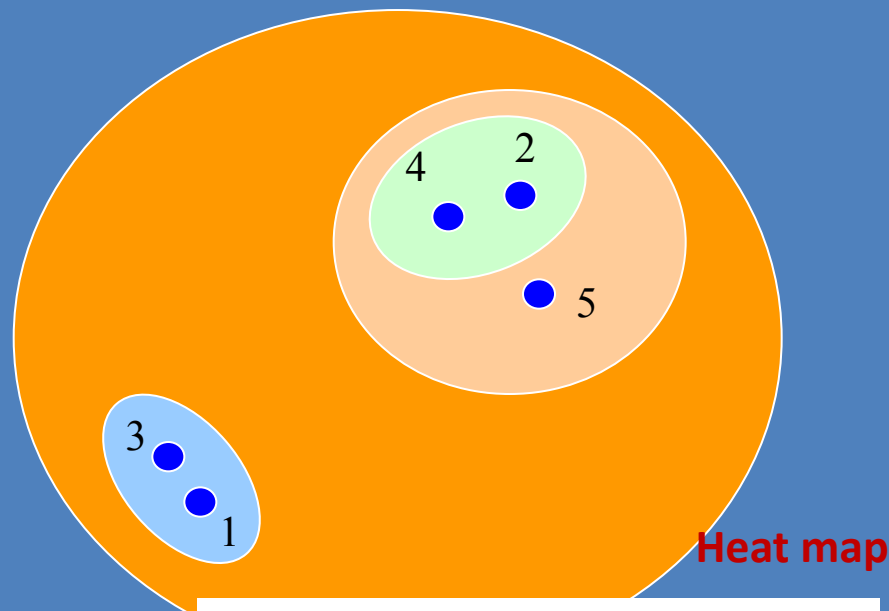
Vzdálenost mezi jednotlivými klastry



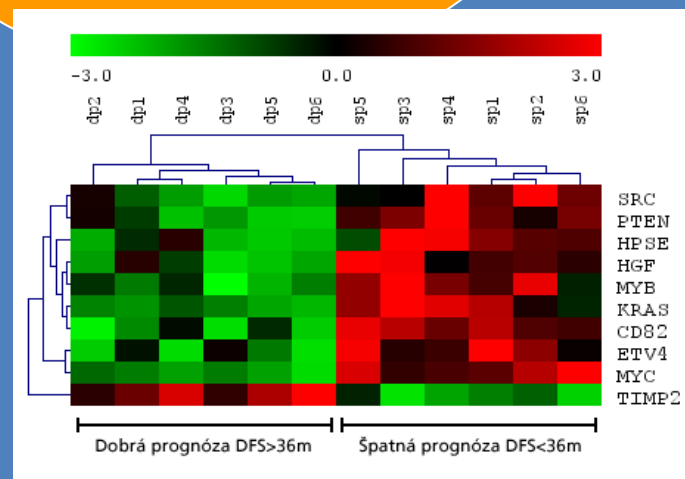
Dendrogram

Podobnost je vyjádřena hierarchickým stromem – dendrogram s teplotní mapou „heat-map“

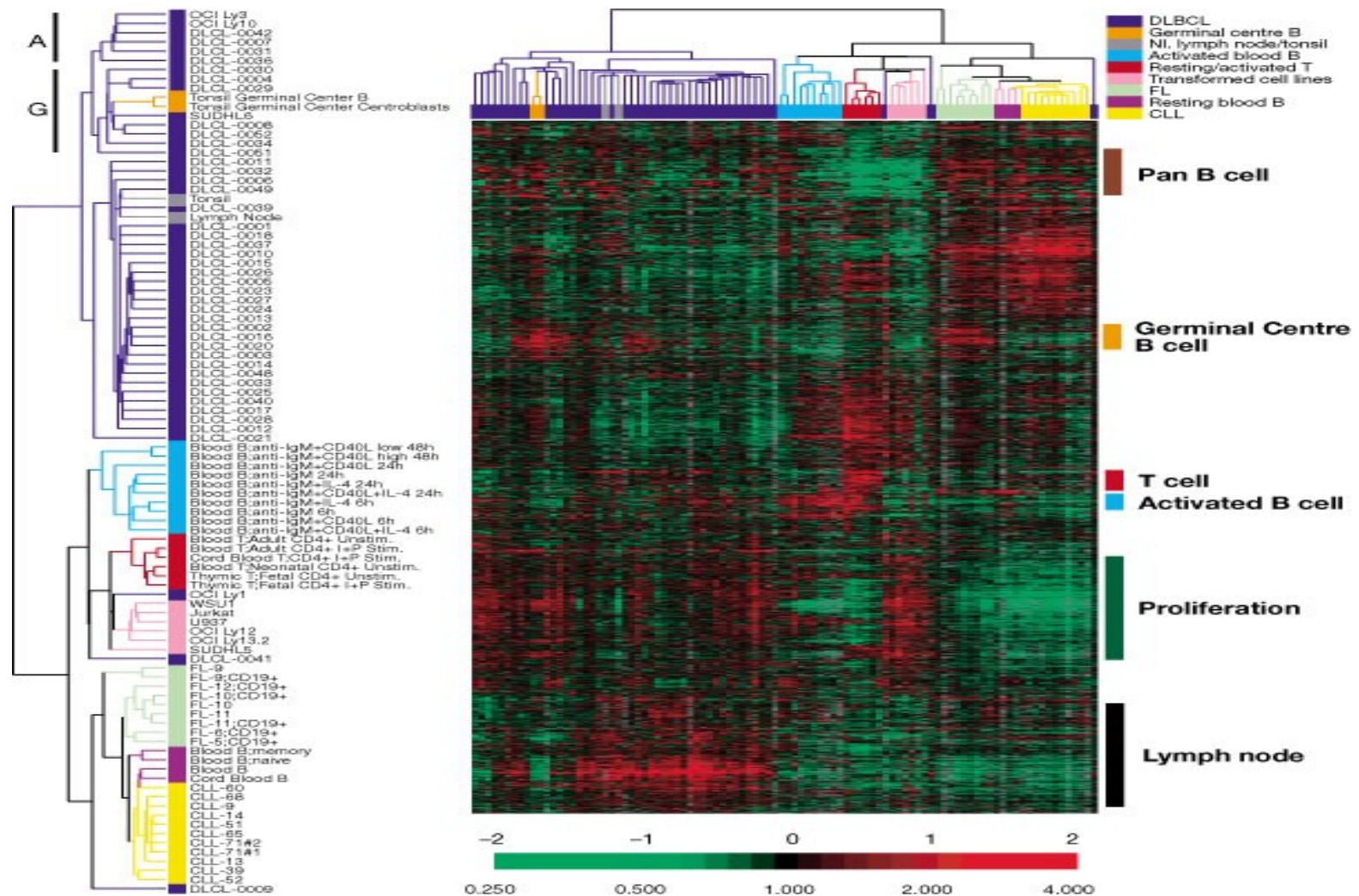
- kalkulace vzdálenosti mezi všemi geny a nalezení nejmenší. K ní se seskupí všechny jí podobné a vytvoří se klastr.
- po vytvoření X počtu clusterů se hledají vzdálenosti mezi klastry (hierarchical clustering)
- počet klastrů není omezen



Heat map

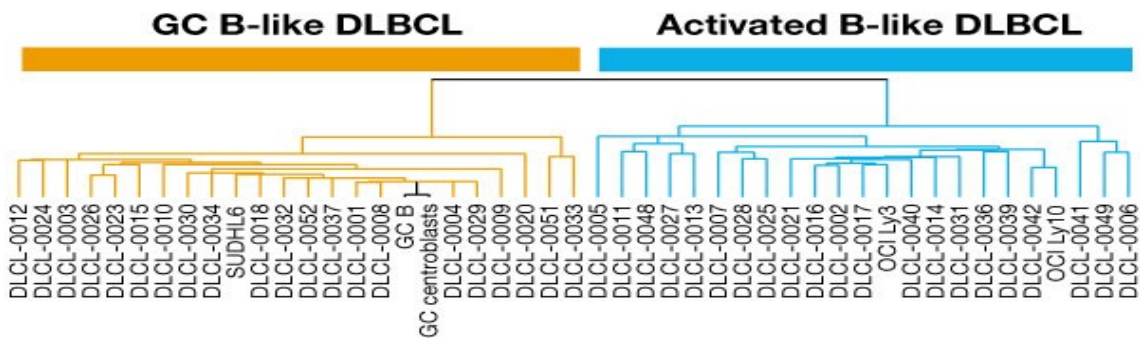
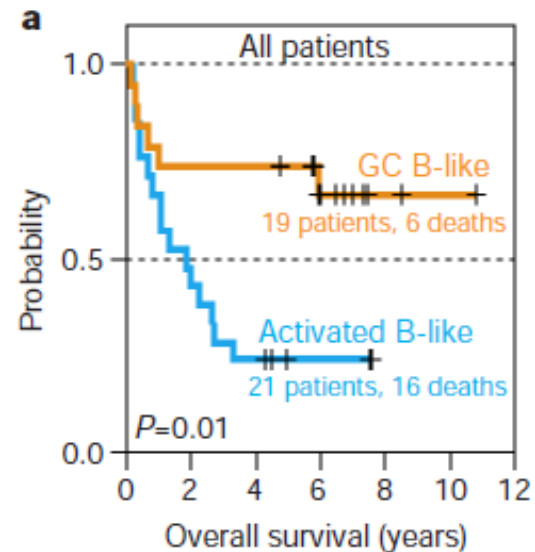
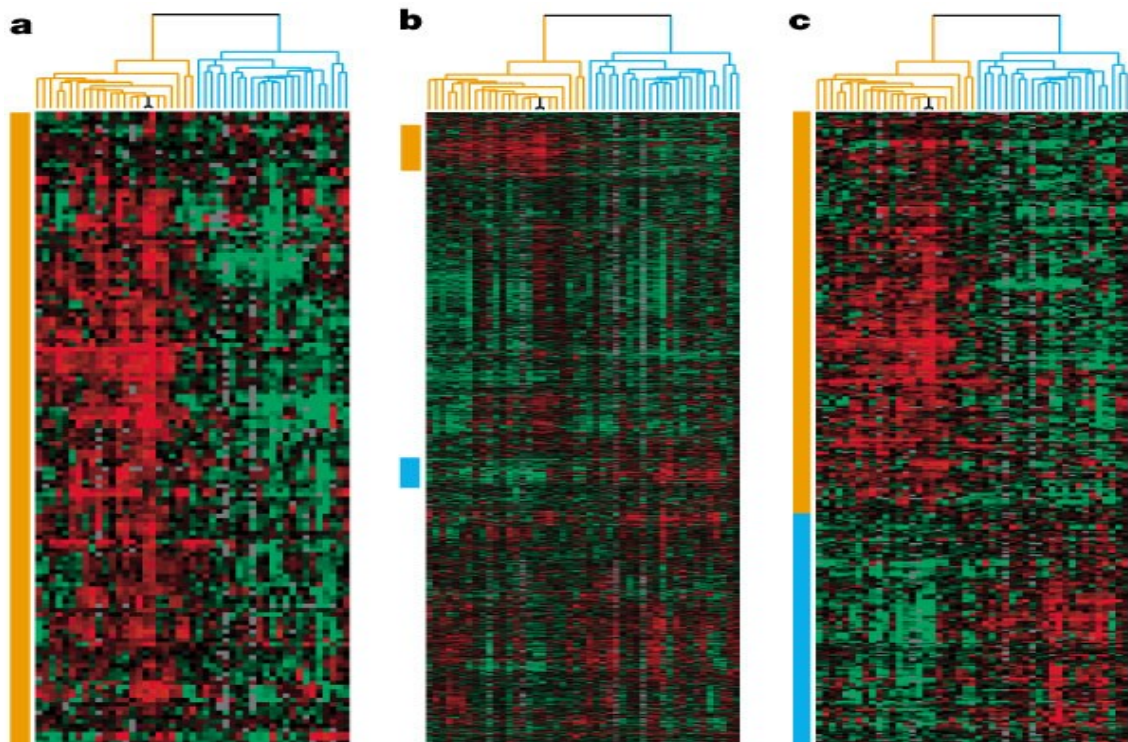


Příklad – difúzní velkobuněčný B-lymfom

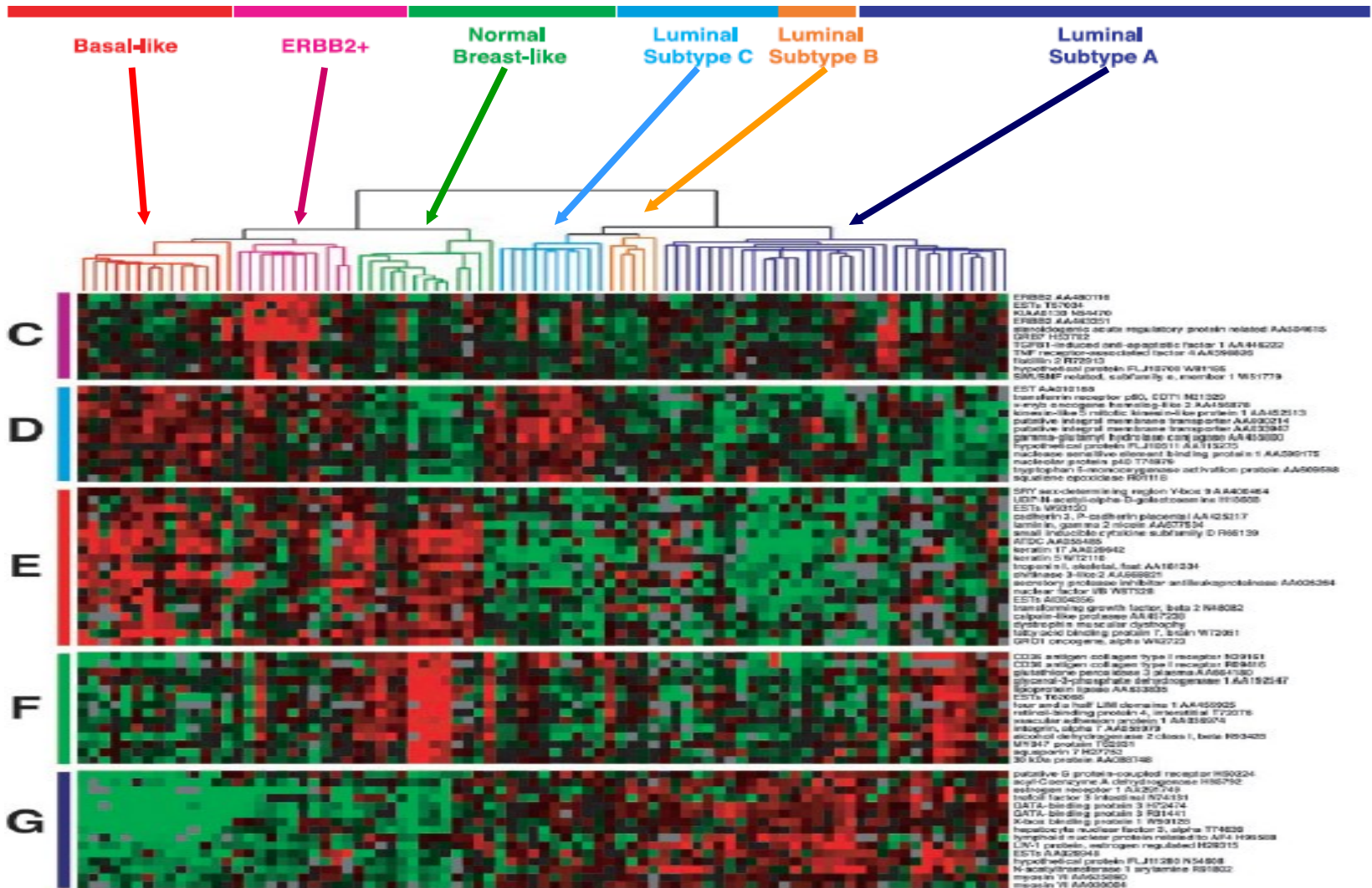


Vzato z: Nature February, 2000

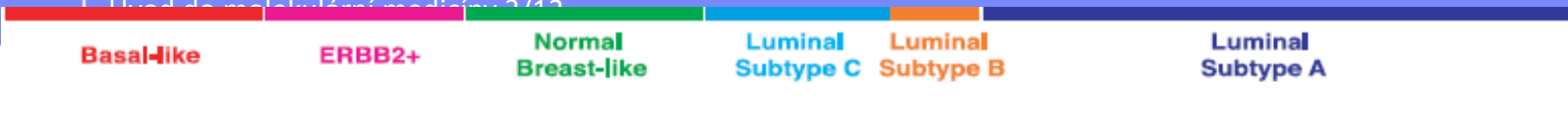
Paper by Allzadeh. A et al *Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by Gene expression profiling,*



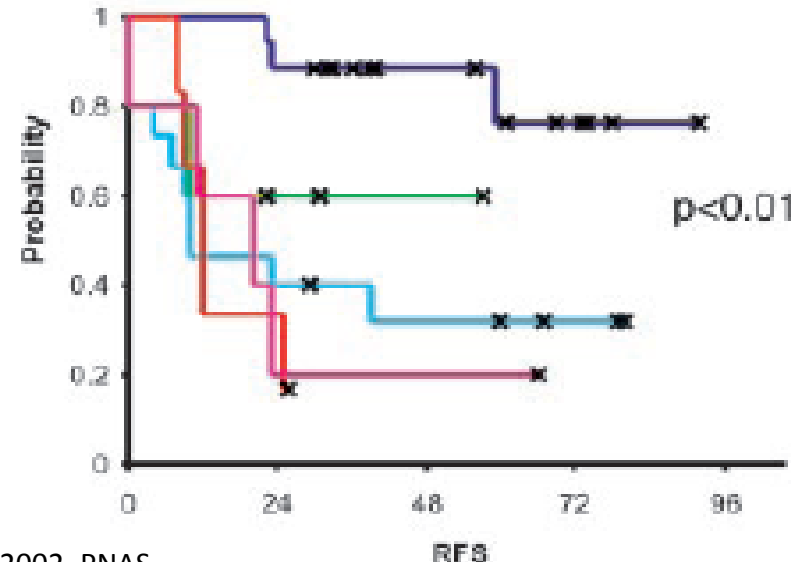
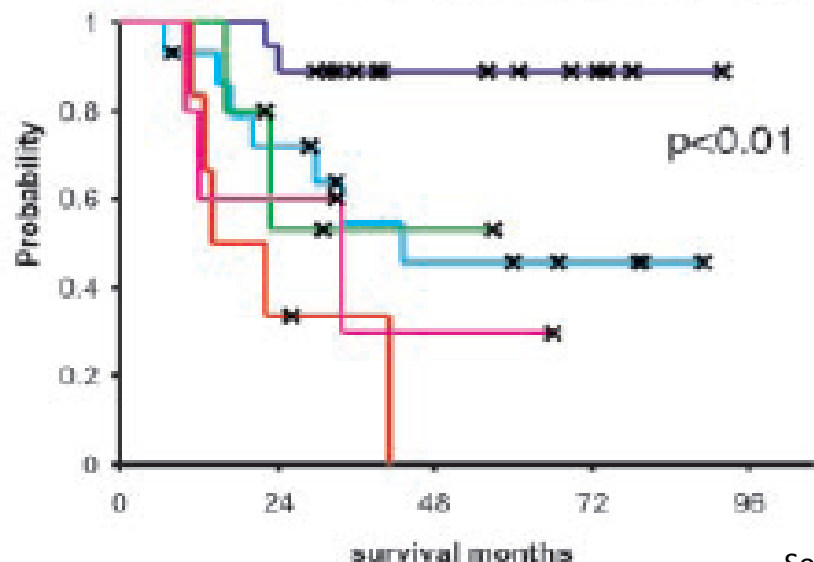
Klastrová analýza u karcinomu prsu



Sortie et al, 2002, PNAS



	Basal-like	ERBB2+	Normal Breast-like	Luminal Subtype C	Luminal Subtype B	Luminal Subtype A
ER	-/+	-/+	-/+	+ / +++	++	+++
HER2	-	+++	- / +	- / +	-	- / +
p53mut	82%	71%	33%	80%	40%	13%
CK 5/6, 17	+++	+/-	+++	-	-	-
CK 8/18	-	-	+	+ / +++	+ / +++	+++
c-myb / ost.	+++	+++	- / +	+++	-	-



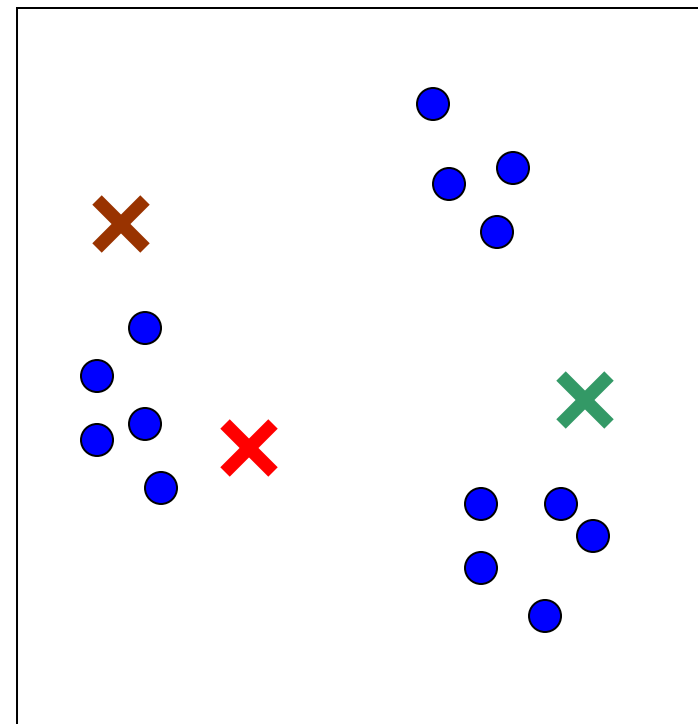
Sorlie et al, 2002, PNAS

— Lum A, — Lum B+C, — NorB-like, — Basal, — ERBB2+

Centroidové metody - K-means

*minimalizovaná vnitroshluková variabilita a zároveň
maximalizovaná mezishluková variabilita*

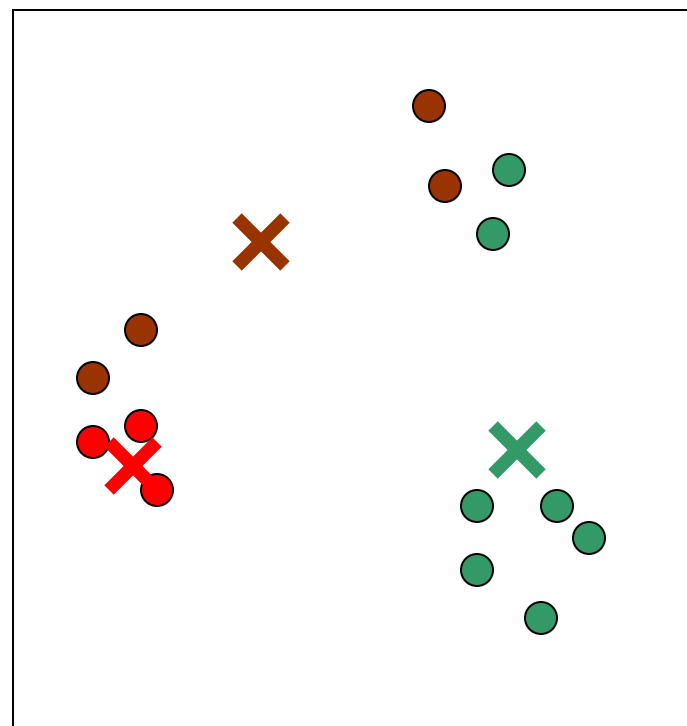
- start s náhodnou pozicí předem definovaného počtu K-centroidů
- opakovaný pohyb centroidů, dokud nedosáhnou stability a nezahrnou veškeré prvky systému



opakování = 0

Centroidové metody - K-means

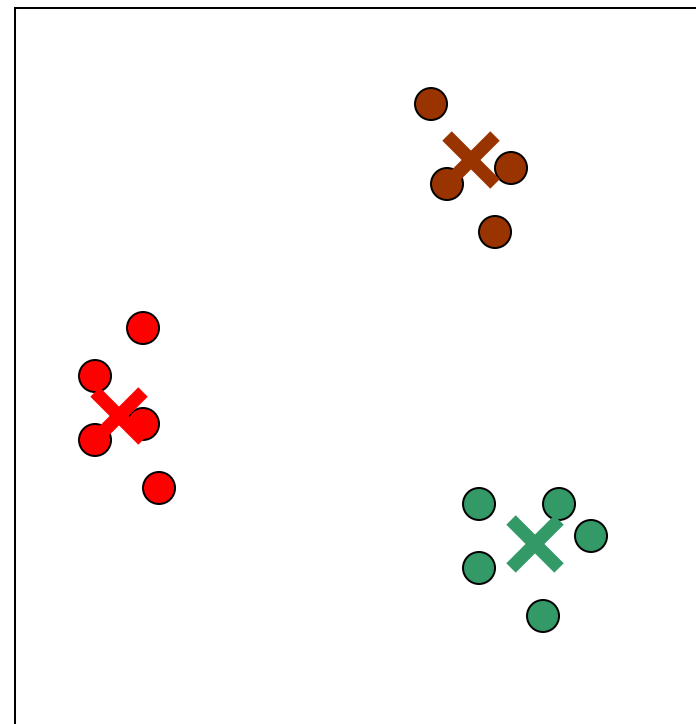
- start s náhodnou pozicí předem definovaného počtu K-centroidů
- opakovaný pohyb centroidů, dokud nedosáhnou stability a nezahrnou veškeré prvky systému



opakování = 1

Centroidové metody - K-means

- start s náhodnou pozicí předem definovaného počtu K-centroidů
- opakovaný pohyb centroidů, dokud nedosáhnou stability a nezahrnou veškeré prvky systému



opakování = 3

3) Klasifikační metody

Jejich podstatou je znalost informace o charakteru vzorku tzn. supervised přístup. Principem klasifikačních metod v analýze dat z DNA čipů je vytvoření rozhodovacího pravidla, které by na základě naměřených hodnot genové exprese umožňovalo přiřazení pacienta do jedné z předem definovaných tříd (například zdravý, nemocný). Z toho je zřejmé, že by se „dobré“ rozhodovací pravidlo založené na expresních datech mohlo zařadit po bok stavajících diagnostických metod a výrazně tak přispět ke zpřesnění diagnostiky závažných onemocnění (klasifikační stromy, Support Vector Machines (SVM), metoda k-nejbližších sousedů,..)

MOLEKULÁRNÍ KLASIFIKACE NÁDORŮ:

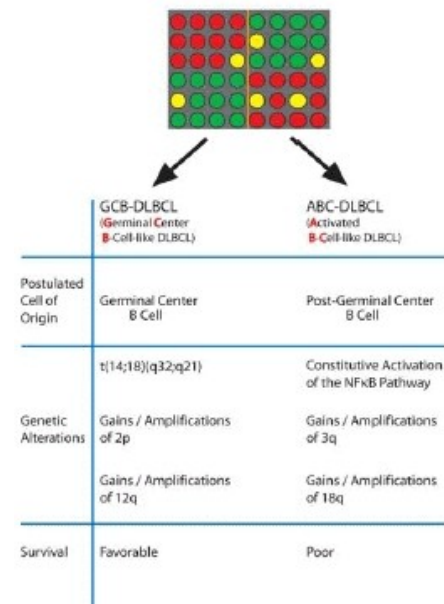
precizní klasifikace je základem léčebného úspěchu, současné metody jsou založeny na morfologii, imunohistochemii, genetice a klinické odpovědi

řada diagnostických nejasností (heterogenita)

ČIPY:

- identifikace nových jednotek na podkladě profilu genové exprese
- reklasifikace stávajících jednotek
- identifikace skupin či jednotlivých genů „markerů“ specifických pro dané jednotky

Identification of Molecular Subgroups of Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL)



Predikce metastatického potenciálu u pacientek s časnými stádii mamárního karcinomu

Van't Veer et al. (Nature, 2002)

96 sporadických mamárních karcinomů

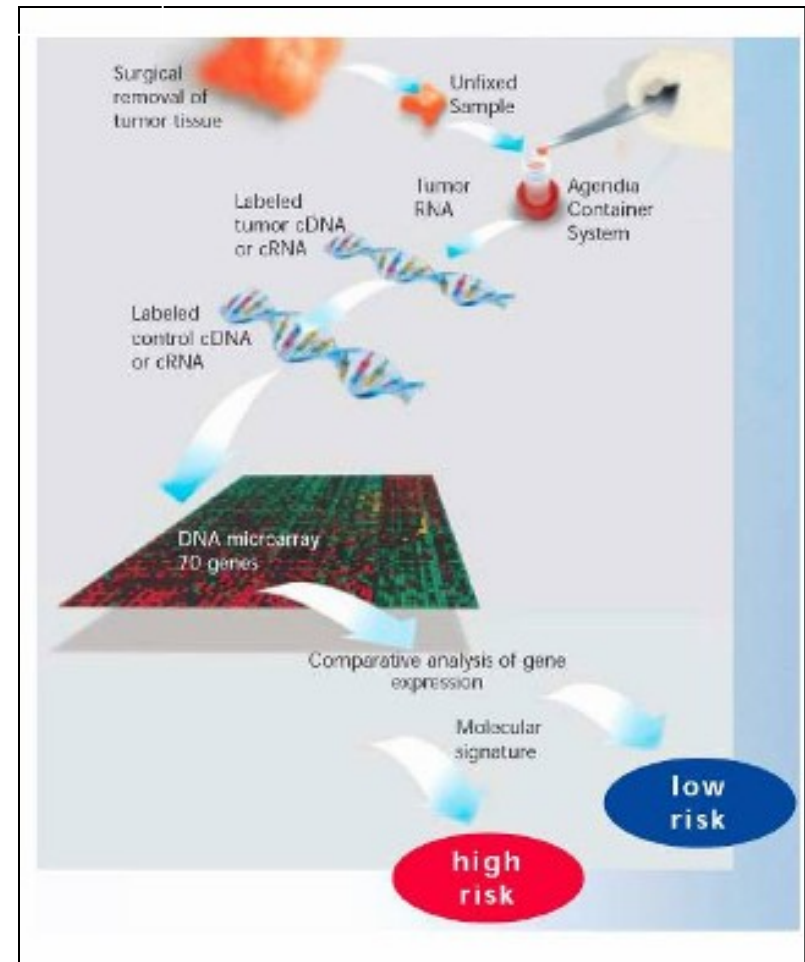
46 pacientek se špatnou prognózou (do 5 let se nevyvinuly vzdálené metastáze)

50 pacientek s dobrou prognózou (do 5 let se nevyvinuly vzdálené metastáze)

5852 genů se signifikantním rozdílem v expresi mezi skupinami

70 genů nejvíce korelujících s klinickým stavem použila pro klasifikaci

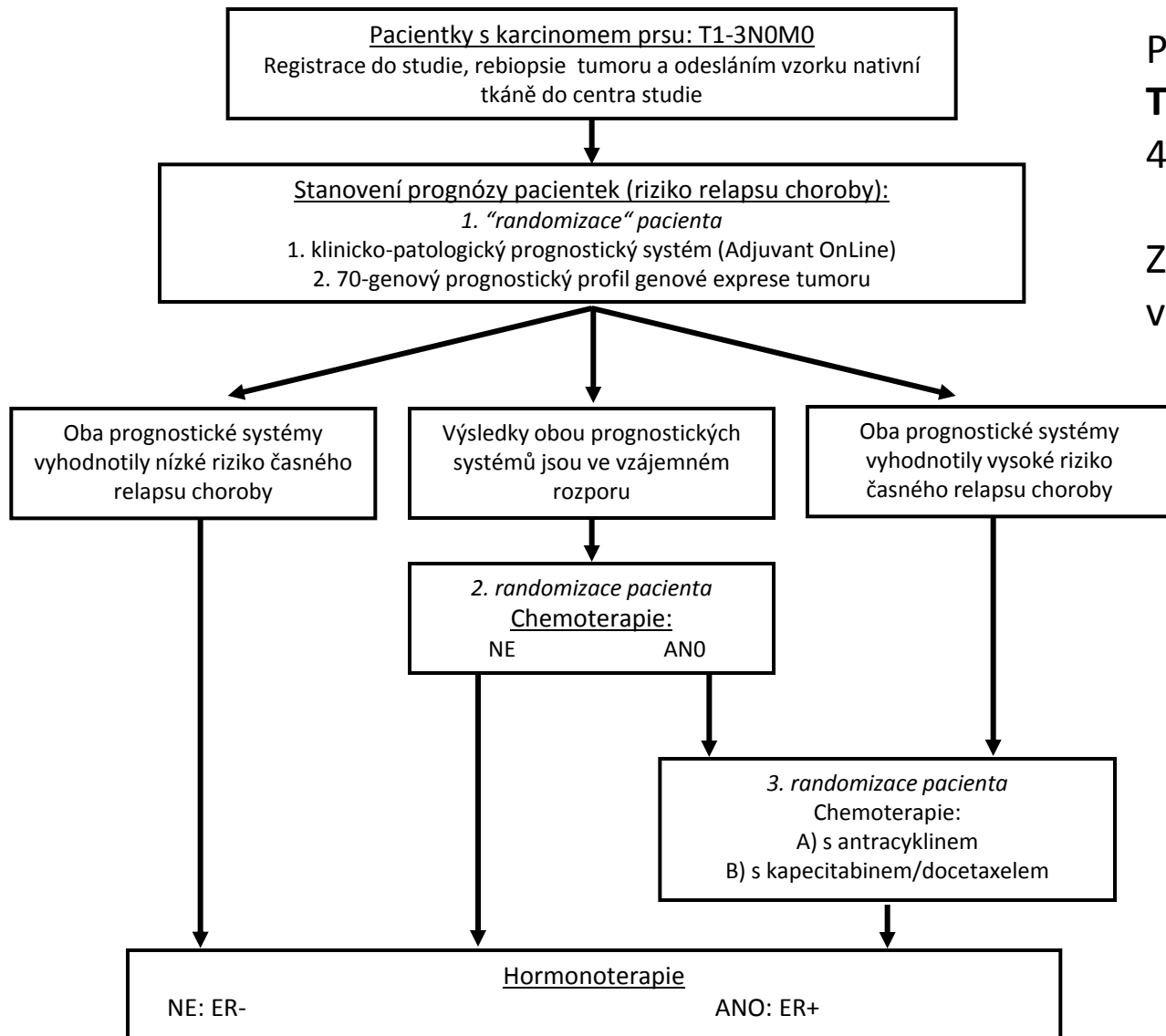
AGENDIA



Sada 70 genů - patent

PROTOKOL KLINICKÉ STUDIE „MINDACT“

(Microarray In Node negative Disease may Avoid Chemotherapy)



Rozpočet ~ 20 mil. EUR

Pořádá síť
TRANSBIG

40 institucí 21 zemí

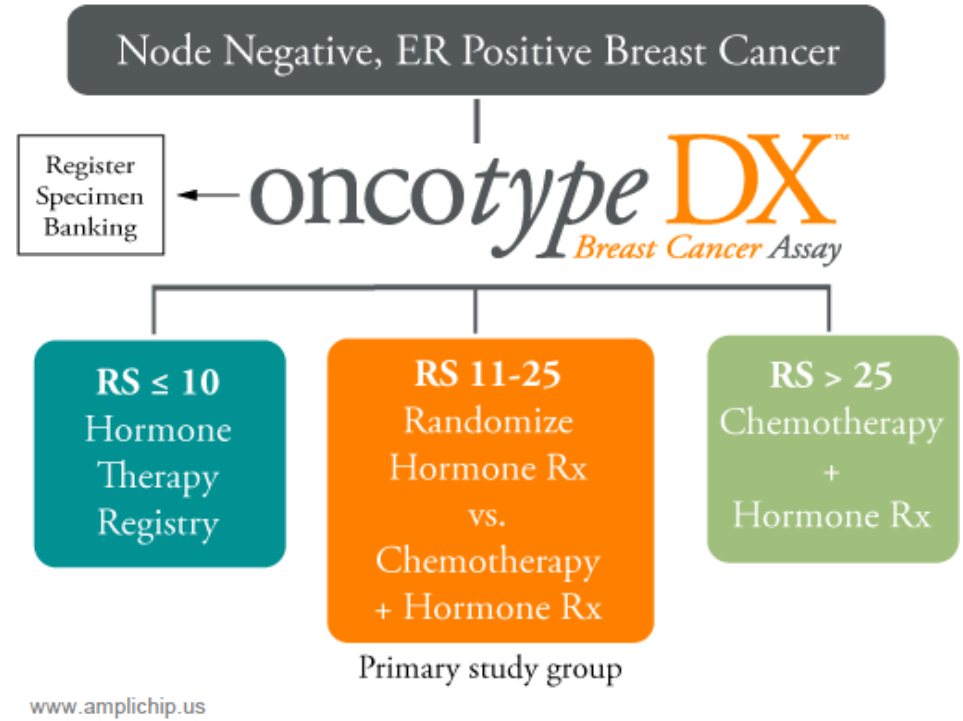
Zařazení 5000 pacientek
v prvních 3 letech

Roche AmpliChip CYP450

- Approved for clinical use in US and EU
- Gene variations of CYP2D6 and CYP2C19
 - Metabolism of ~25% of all prescription drugs
 - Determine phenotype: poor, intermediate, extensive, or ultrarapid metabolizer
- Intended to be an aid for physicians
 - Individualized treatment and dosage

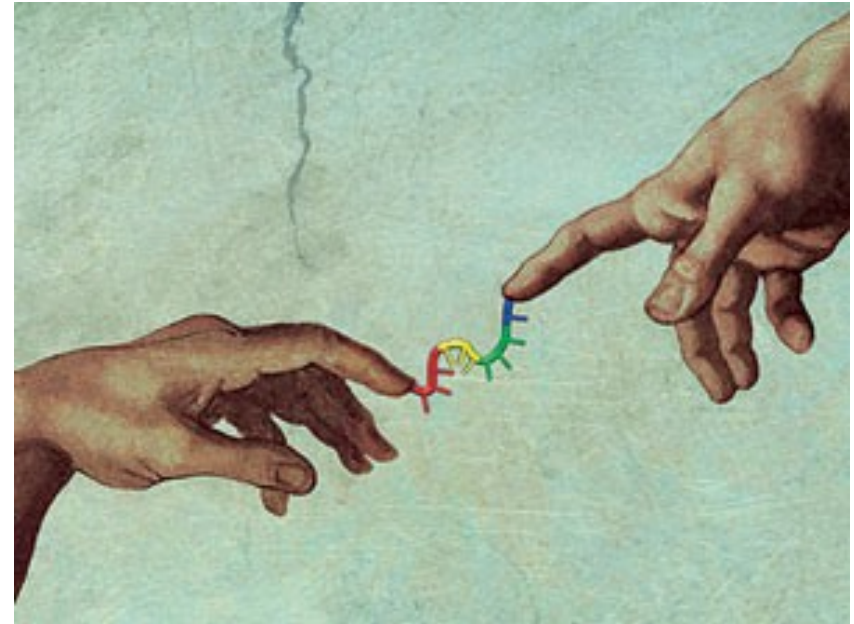
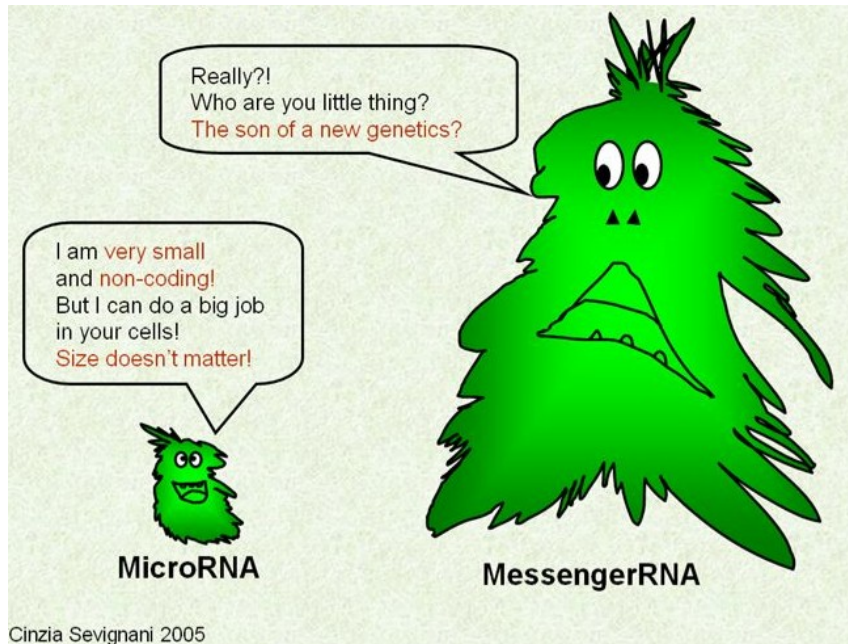


Schema: TAILORx

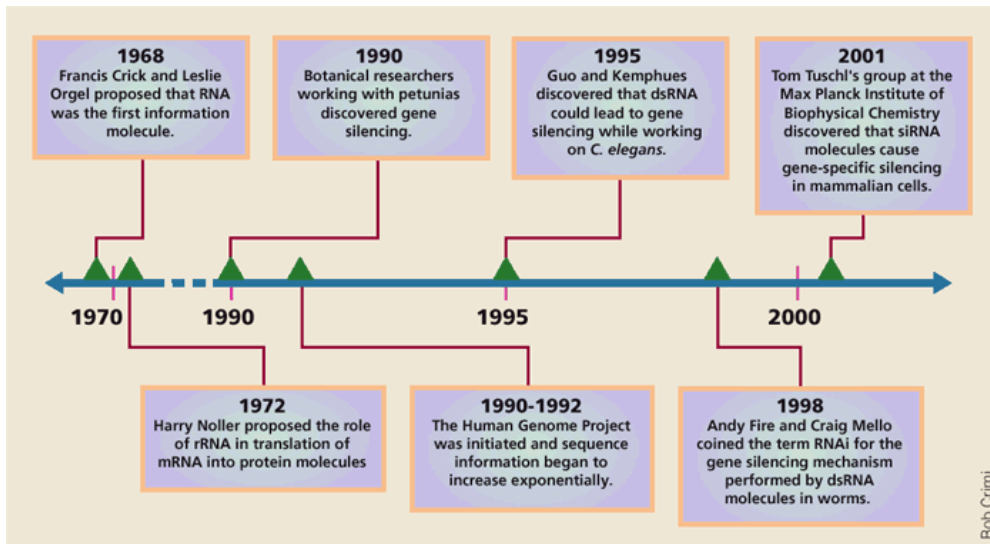


MikroRNA: biomarkery a potenciální terapeutické cíle v onkologii

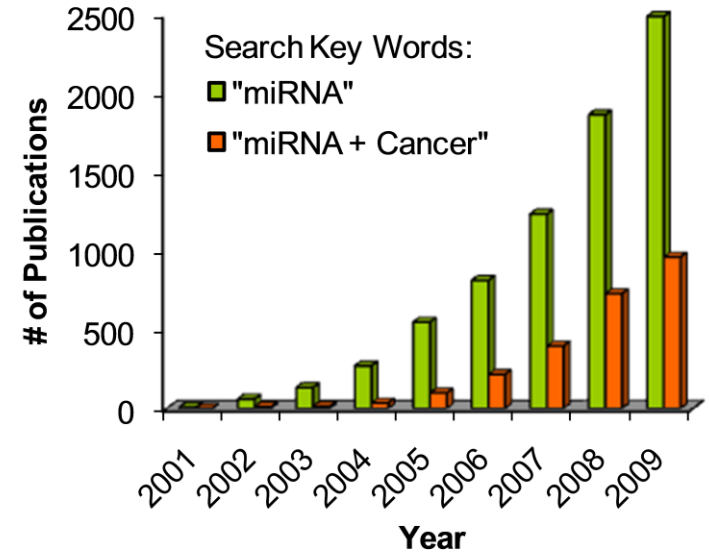
mikroRNA: nová úroveň regulace genové exprese **mikroRNA čipy**



Proč se zabývat výzkumem mikroRNA?



Nature Biotechnology 21, 1441 - 1446 (2003)



17.10.2009 PubMed - „MicroRNA AND Cancer“ – 5101 odkazů
 „MicroRNA“ – 13293 odkazů

Proč se zabývat výzkumem mikroRNA?

The colorectal microRNAome

Jordan M. Cummins¹, Yiping He², Rebecca J. Leary¹, Ray Pagliarini¹, Luis A. Diaz, Jr.¹, Tobias Sjöblom¹, Omer Barad², Zvi Bentwich², Anna E. Szafranska³, Emmanuel Labourier³, Christopher K. Raymond¹, Brian S. Roberts¹, Hartmut Juhl¹, Kenneth W. Kinzler¹, Bert Vogelstein^{1,††}, and Victor E. Velculescu^{1,††}

PNAS | March 7, 2006 | vol. 103 | no. 10 | 3687–3692

A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets

Stefano Volinia^{1,2,3}, George A. Calin^{1,2}, Chang-Gong Liu¹, Stefan Ambros³, Amelia Cimmino⁴, Fabio Petrocchi⁴, Rosa Visone⁴, Marilena Iorio⁴, Claudia Roldo⁴, Manuela Ferracin³, Robyn L. Pruett⁵, Nozomu Yanai⁶, Giovanni Lanza⁷, Aldo Scarpa⁸, Andrea Vecchione^{2,3}, Massimo Negrini⁹, Curtis C. Harris⁵, and Carlo M. Croce^{1,2,3}

PNAS | February 14, 2006 | vol. 103 | no. 7 | 2257–2261

A MicroRNA Signature Associated with Prognosis and Progression in Chronic Lymphocytic Leukemia

George Adrian Calin, M.D., Ph.D., Manuela Ferracin, Ph.D., Amelia Cimmino, M.D., Ph.D., Gianpiero Di Leva, Ph.D., Masayoshi Shimizu, B.S., Sylwia E. Wojcik, M.Sc., Marilena V. Iorio, Ph.D., Rosa Visone, Ph.D., Nurettin Ilfer Sever, Ph.D., Muller Fabbri, M.D., Rodolfo Iuliano, Ph.D., Tiziana Palumbo, Ph.D., Flavia Pichiorri, Ph.D., Claudia Roldo, M.D., Ramiro Garzon, M.D., Cinzia Sevignani, Ph.D., Laura Rassenti, Ph.D., Hansjuerg Alder, Ph.D., Stefano Volinia, Ph.D., Chang-gong Liu, Ph.D., Thomas J. Kipps, M.D., Ph.D., Massimo Negrini, Ph.D., and Carlo M. Croce, M.D.

N ENGL J MED 353:17 WWW.NEJM.ORG OCTOBER 27, 2005

MicroRNA Gene Expression Deregulation in Human Breast Cancer

Marilena V. Iorio¹, Manuela Ferracin², Chang-Gong Liu¹, Angelo Veronese², Riccardo Spizzo², Silvia Sabbioni³, Eros Magri³, Massimo Pedriali³, Muller Fabbri⁴, Manuela Campiglio⁴, Sylvie Ménard⁵, Juan P. Palazzo⁴, Anne Rosenberg⁵, Piero Musiani⁶, Stefano Volinia¹, Italo Nenci², George A. Calin¹, Patrizia Querzoli², Massimo Negrini², and Carlo M. Croce¹

Cancer Res 2005; 65: (16), August 15, 2005

Molecular Cancer



Review

MicroRNAs in colorectal cancer: translation of molecular biology into clinical application

Ondrej Slaby^{1,2}, Marek Svoboda¹, Jaroslav Michalek² and Rostislav Vyzula¹

Open Access

Biochemical and Biophysical Research Communications 385 (2009) 1–5



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc



Oncology

Laboratory/Clinical Translational Research

Oncology 2007;72:397–402
DOI: [10.1159/000113489](https://doi.org/10.1159/000113489)

Received: August 10, 2007
Accepted: August 10, 2007
Published online: January 15, 2008

Mini Review

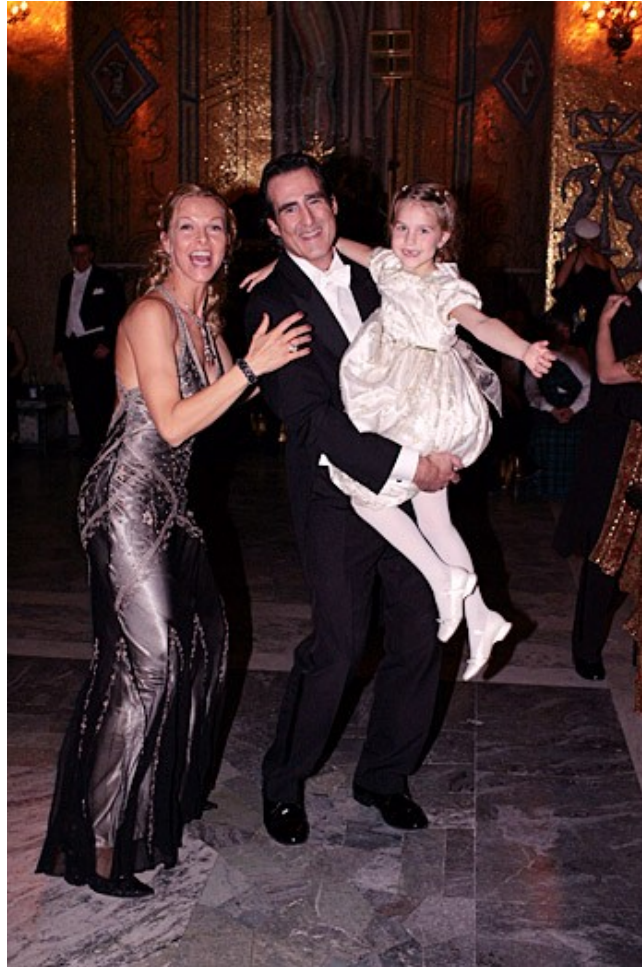
MicroRNA involvement in glioblastoma pathogenesis

Jana Novakova^{a,d}, Ondrej Slaby^{a,b,*}, Rostislav Vyzula^c, Jaroslav Michalek^a

Altered Expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 Is Related to Clinicopathologic Features of Colorectal Cancer

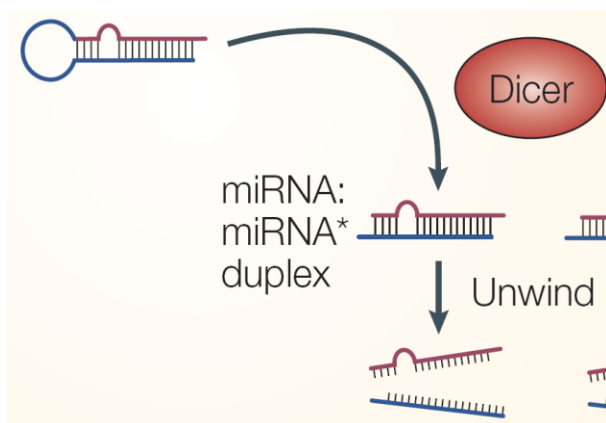
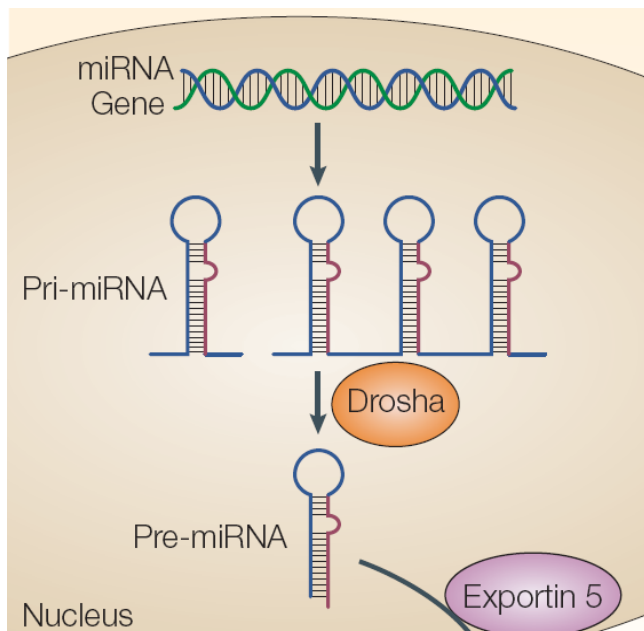
O. Slaby^{a,c}, M. Svoboda^{b,c}, P. Fabian^a, T. Smerdova^a, D. Knoflickova^a, M. Bednarikova^{b,c}, R. Nenutil^a, R. Vyzula^{b,c}

Proč se zabývat výzkumem mikroRNA?



Craig Mello na slavnostním banketu po udílení Nobelových cen za rok 2006.

Biogeneze a funkce mikroRNA

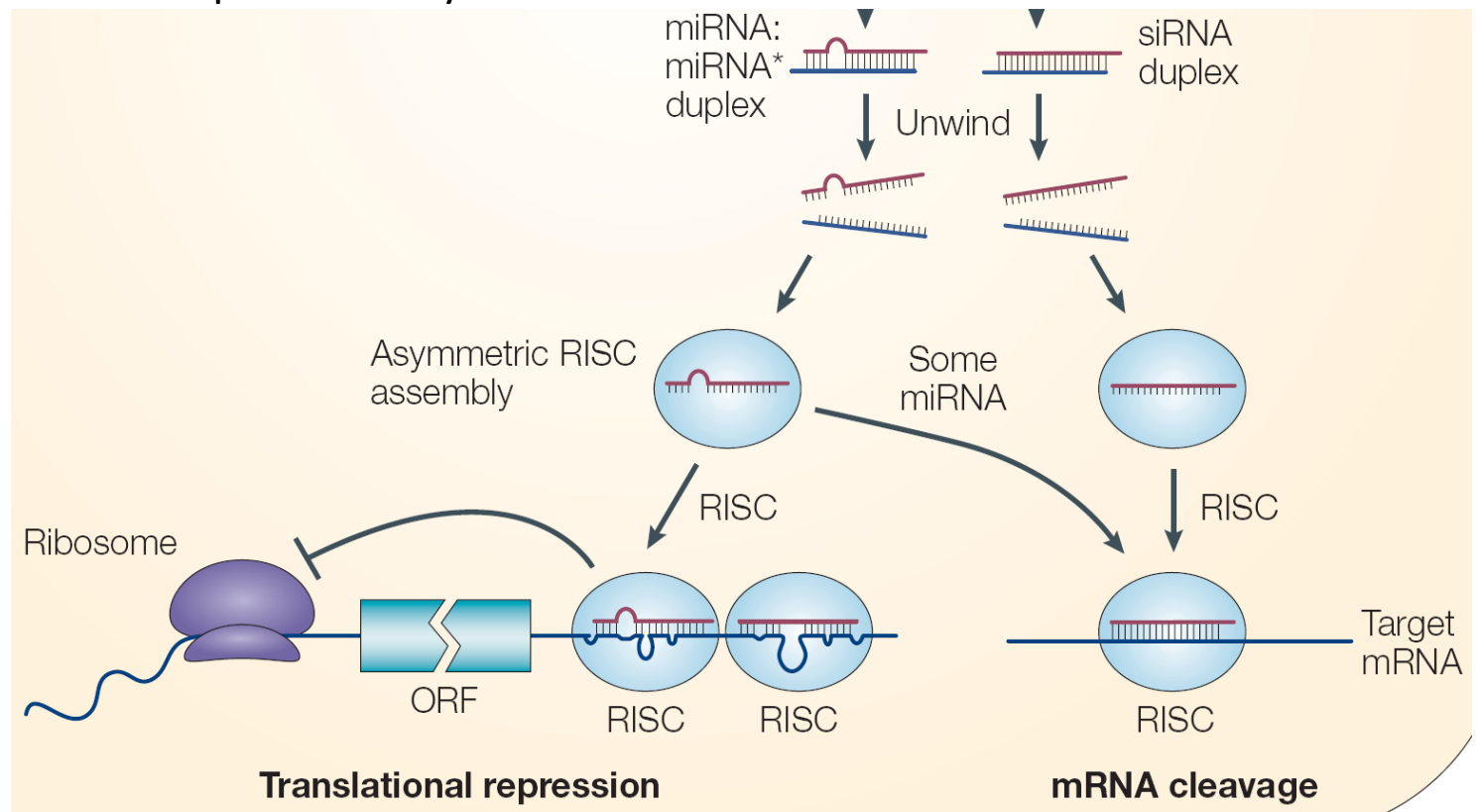


1. Transkripce miRNA genu
2. pri-miRNA jsou zpracovány pomocí RNáz Drosha a Pasha
3. pre-miRNA exportovány pomocí Exportinu 5 do cytoplazmy
4. Zpracování pomocí RNázy Dicer

microRNA: licensed to kill messenger

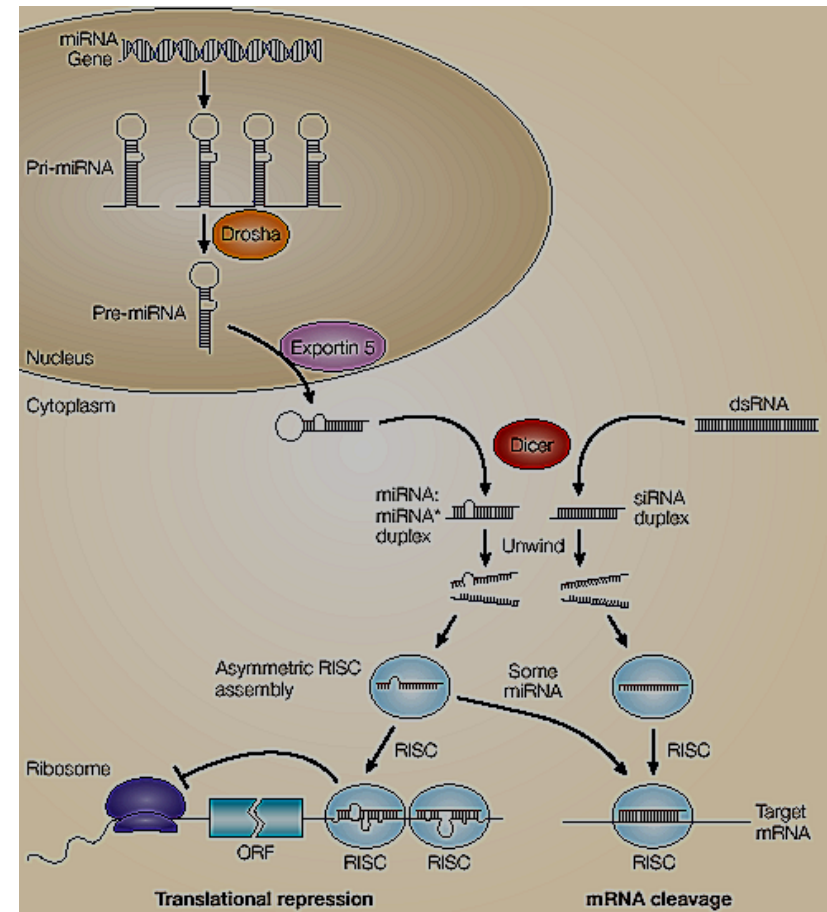
5. Aktivní vlákno je inkorporováno do komplexu RISC
6. Represe translace nebo degradace mRNA v závislosti na míře komplementarity

Biogeneze a funkce mikroRNA



Jaký je rozdíl mezi miRNA a siRNA?

- Funkce obou je regulace exprese
- siRNA je původem dsRNA
- siRNA souvisí s cizorodou RNA (obvykle virovou) a je 100% komplementární
- miRNA je původně ssRNA, která formuje vlásenkové dsRNA struktury
- miRNA reguluje post-transkripční genovou expresi



He and Hannon, *Nature Reviews Genetics*, 2004

Základní fakta o mikroRNA

miRNA poprvé popsal Ambros a kol. (1993) u *C. elegans* (lin-4)

Přibližně 3% predikovaných lidských genů jsou geny pro miRNA (přibližně 1000 miRNA)

miRNA mají potenciál regulovat asi 1/3 kódujících genů

Některé miRNA jsou kódovány více než jedním genem

Geny kódující miRNA jsou často klastrovány (klastr miR-17)

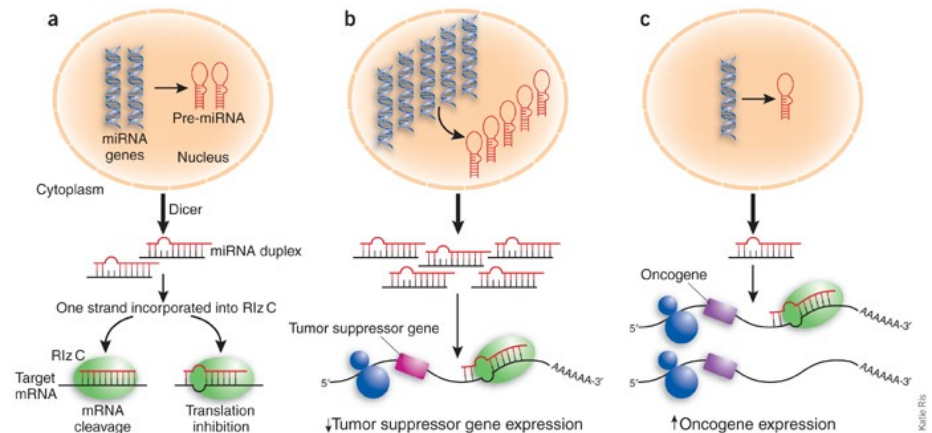
Geny miRNA jsou lokalizovány v mezigenových oblastech

v intronových oblastech nebo antisense řetězcích známých genů

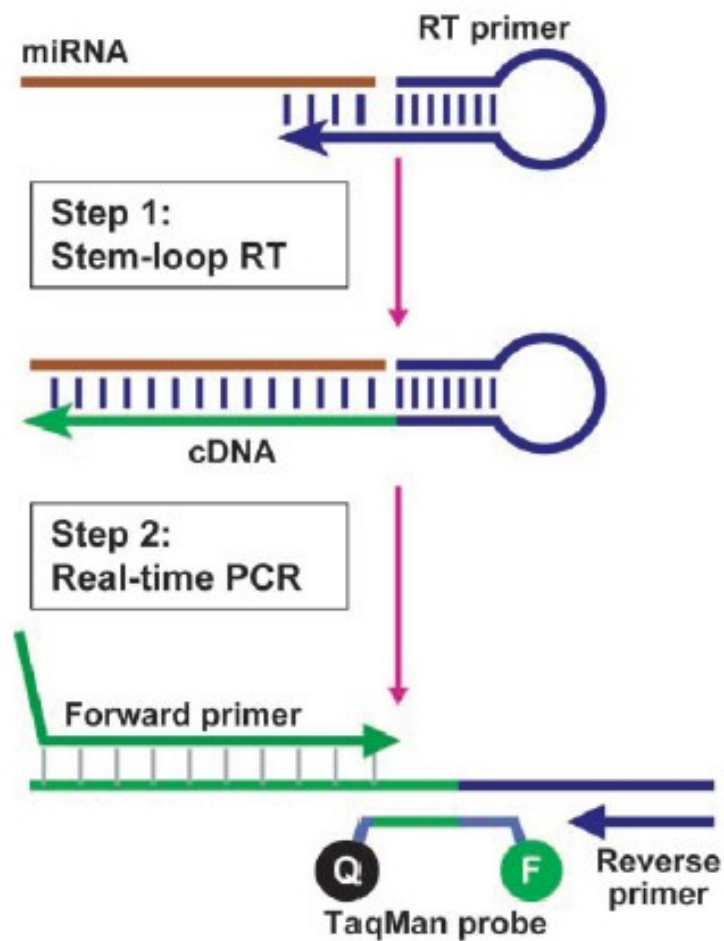
miRNA family members can be very similar eg let-7 family:

```

mmu-let-7a:  UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU
mmu-let-7b:  UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
mmu-let-7c:  UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU
mmu-let-7d:  AGAGGUAGUAGGUUGCCAUAGUU
mmu-let-7e:  UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUU
mmu-let-7f:  UGAGGUAGUAGAAUUGUAUAGUU
mmu-let-7g:  UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU
mmu-let-7i:  UGAGGUAGUAGUUUGUGCUGUU
  
```



Real-Time PCR – modifikovaná TaqMan technologie ke kvantifikaci miRNA



mikroRNA čipy

Hybridizační čipy – analogická technologie jako u DNA čipů

Ambion, Exiqon, Agilent, Affymetrix, Invitrogen NCode

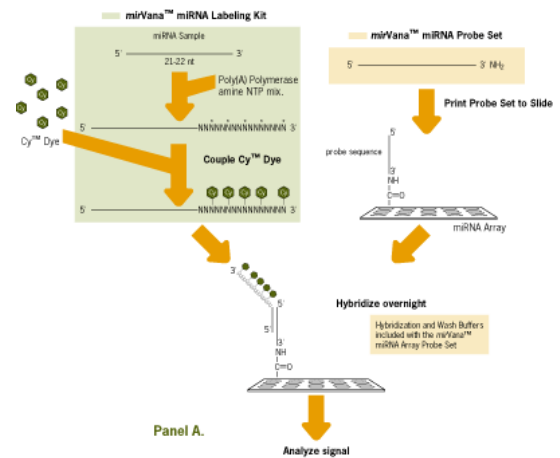
Real-Time PCR čipy

Applied Biosystems

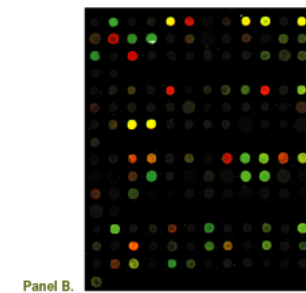
Low density arrays (LDA)

microRNA array verze 2.0 (panel A+B)

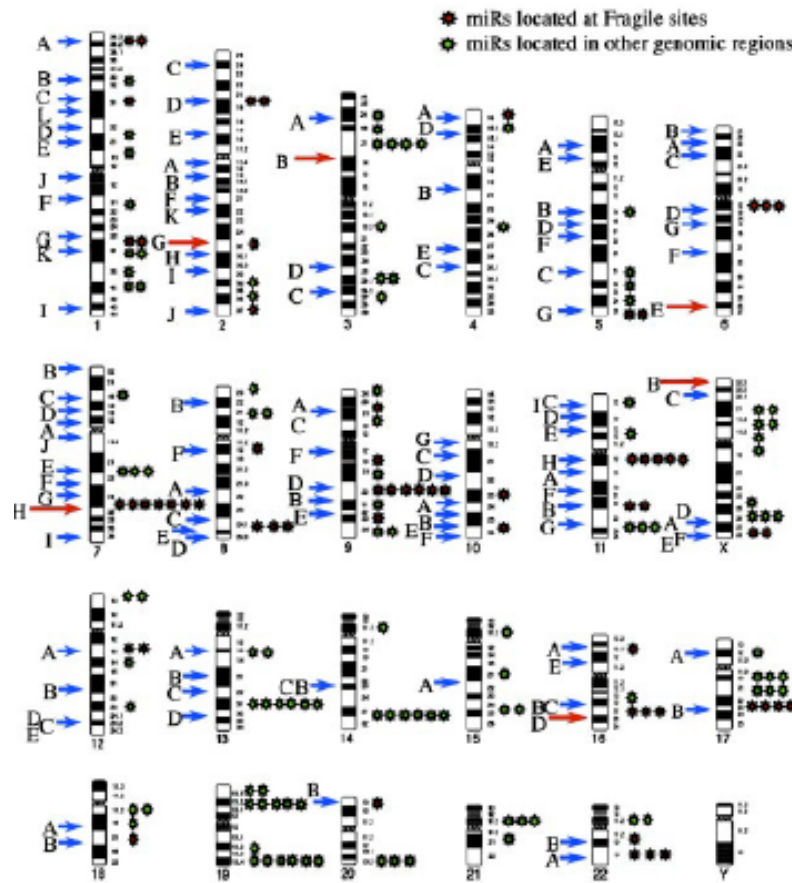
QuantiMir, SABiosciences, miRANDA



LDA mikrofluidní destička (384 miRNA)



Význam mikroRNA v nádorové biologii



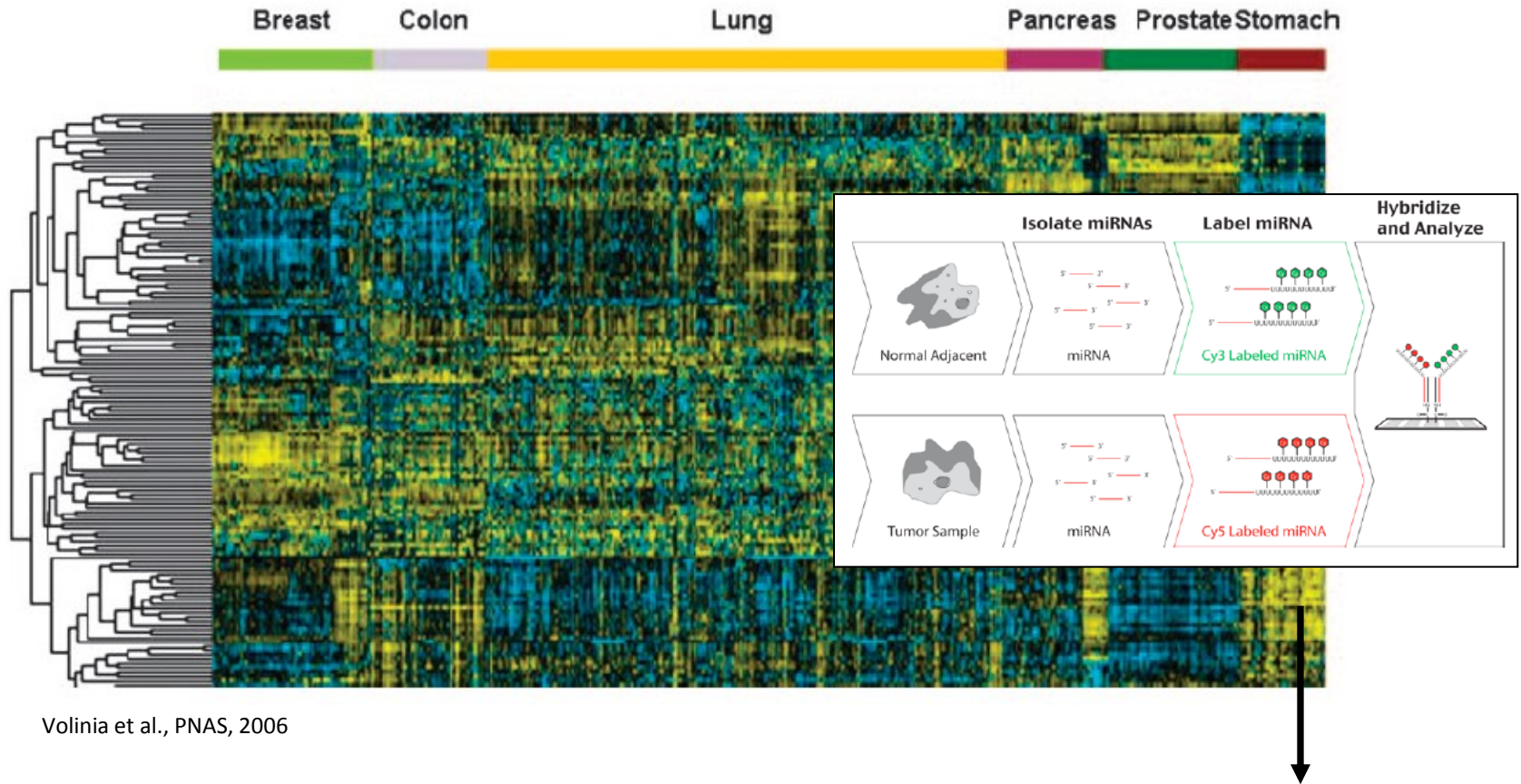
Calin et al., PNAS, 2004

Přibližně 50% miRNA genů se nachází na fragilních částech chromosomů, jejichž ztráta nebo amplifikace je často detekována u nádorových onemocnění.

Např. miR-15a a miR-16a jsou lokalizované v oblasti 13q14, často deletované u CLL

Význam mikroRNA v nádorové biologii

Rozdílné expresní profily mezi nádorovou a nenádorovou tkání

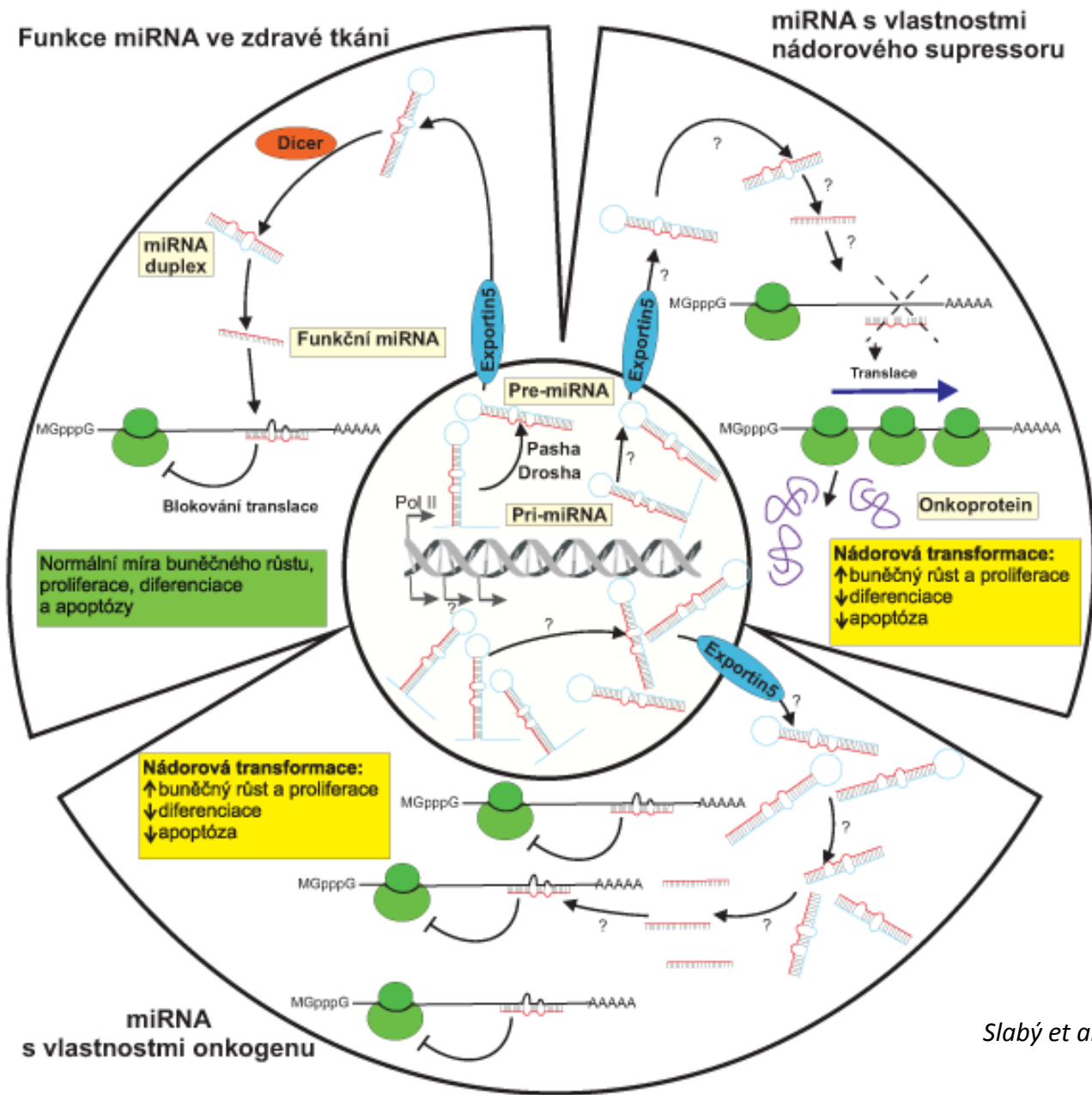


Volinia et al., PNAS, 2006

Shluková analýza 540 vzorků šesti druhů solidních nádorů a příslušných nenádorových tkání.

Žlutá znamená zvýšenou expresi oproti kontrolnímu (nenádorovému) vzorku

Význam mikroRNA v nádorové biologii



Význam mikroRNA v nádorové biologii

Tabulka 1: Přehled nejstudovanějších miRNA s onkogenní nebo nádorově supresorovou funkcí

miRNA	Lokalizace	OG/TS	Potvrzené cílové molekuly	Nádorové onemocnění	Reference
miR-15a miR-16-1	13q14	TS	BCL2	↓ CLL, mnohočetný myelom, lymfom z buněk pláště, karcinom prostaty	9, 23, 24
miR-143 miR-145	5q32-33	TS	ERK5 ?	↓ kolorektální a mamární karcinom	10–14
rodina let-7	různé	TS	RAS	↓ karcinom plic	15, 16
miR-34a	1p36.23	TS	E2F3	↓ neuroblastom	21
miR-21	17q23.2	OG	nepřímo BCL2	↑ glioblastom, mamární a kolorektální karcinom	10-14, 22
skupina miR-17-92	13q31-32	OG	E2F1, PTEN, TGFBR2	↑ difúzní velkobuněčný B-lymfom, karcinom plic	9, 37
BIC/miR-155	21q21	OG	AT1R	↑ Burkittův, Hodgkinův a difúzní velkobuněčný B-lymfom	25-27
miR-372 miR-373	?	OG	LATS2	↑ testikulární nádory z germinálních buněk	22
miR-221 miR-146b	?	OG	?	↑ papilární karcinom štítné žlázy	18

↑↓ - zvýšená resp. snížená hladina dané miRNA v nádorové tkáni oproti příslušné nenádorové tkáni či buňkám

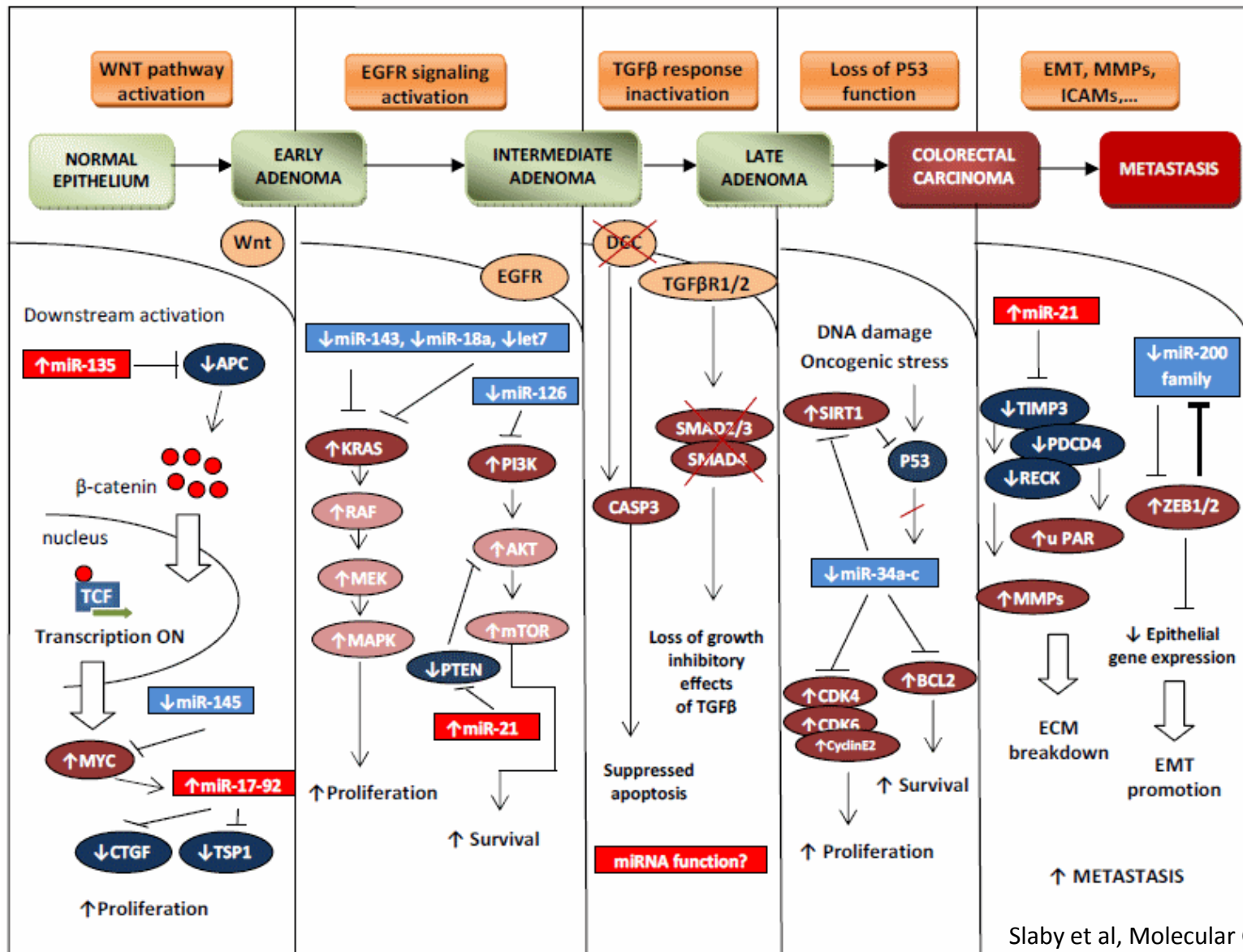
OG - onkogen, TS - tumor supresorový gen, CLL - chronická lymfocytární leukémie

ERK5 - extracelulárním signálem regulovaná kináza 5, PTEN - fosfatázový a tenzinový homolog

TGFBR2 - receptor typ 2 pro transformující růstový faktor, AT1R - receptor typ 1 pro angiotenzin II

LATS2 - large tumor supressor homolog 2 (inhibitor cyklin dependentní kinázy 2)

Zapojení mikroRNA do Vogelsteinova modelu kolorektálního karcinomu



Slaby et al, Molecular Cancer, 2009

Význam mikroRNA v nádorové biologii

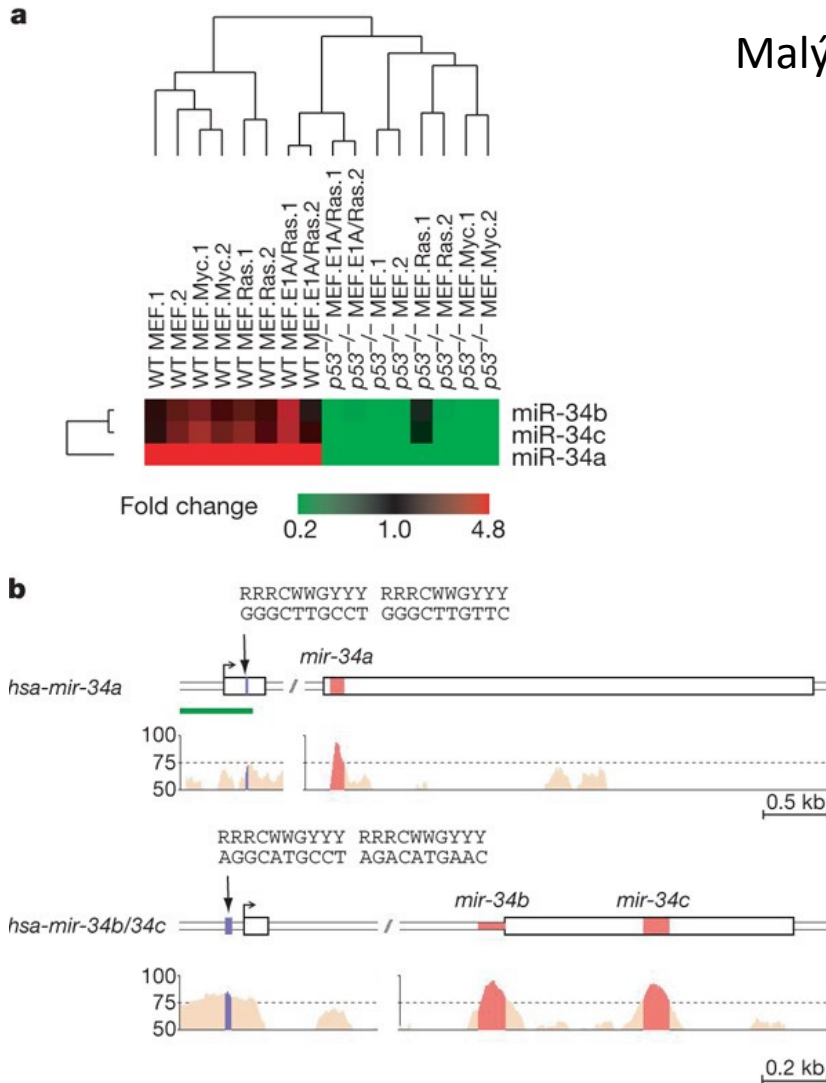
Malý pomocníci ve službách strážce genomu -
rodina mikroRNA-34 a p53

Pomocí exprese miR-34 (a-c) lze rozlišit
wt a p53 deficientní buněčné linie

Zvýšená exprese miR-34 (a-c) je spojena
se zástavou buněčného cyklu

miR-34-a až c jsou pod přímou
transkripční kontrolou p53

Le H, Nature, 2007



Význam mikroRNA v nádorové biologii - FFPE

MikroRNA nepodléhají degradačním procesům při fixaci formalinem a archivaci v parafinových bločcích tak významně jako mRNA

→ ZPŘÍSTUPNĚNÍ BOHATÝCH ARCHIVŮ NA PATOLOGIÍCH
K RETROSPEKTIVNÍCH STUDIÍM !!!

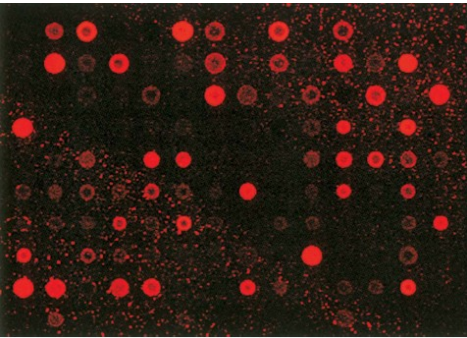
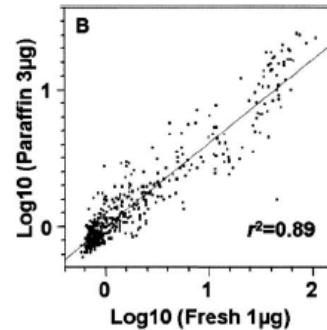
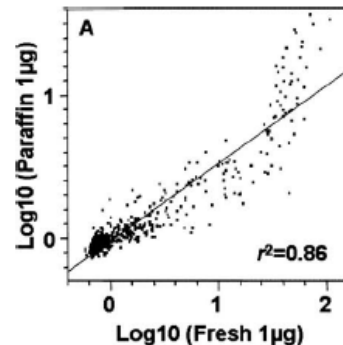


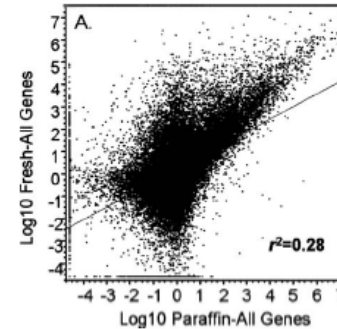
FIGURE 7. Representative miRNA array image from a 10-yr-old FFPE colon cancer sample.



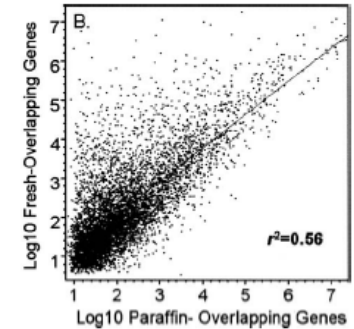
mikroRNA z FFPE



versus



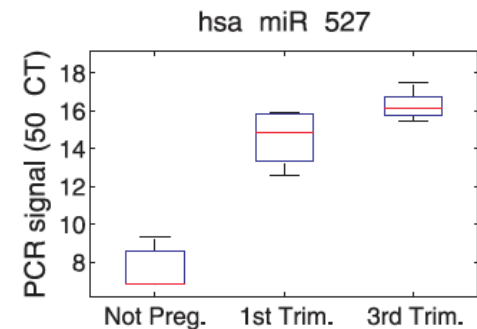
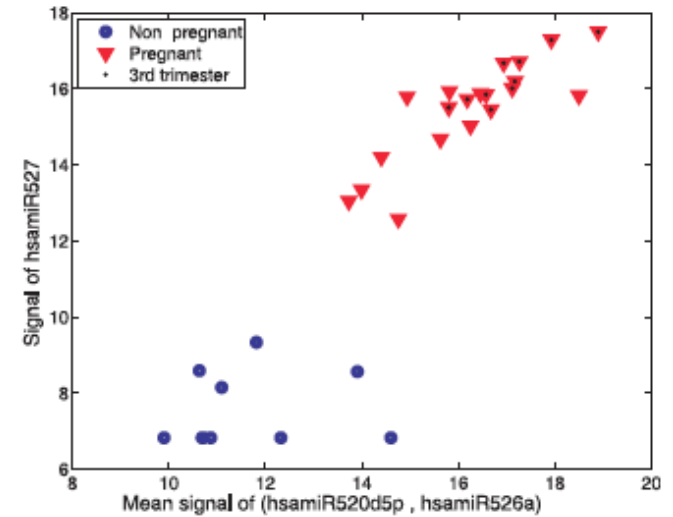
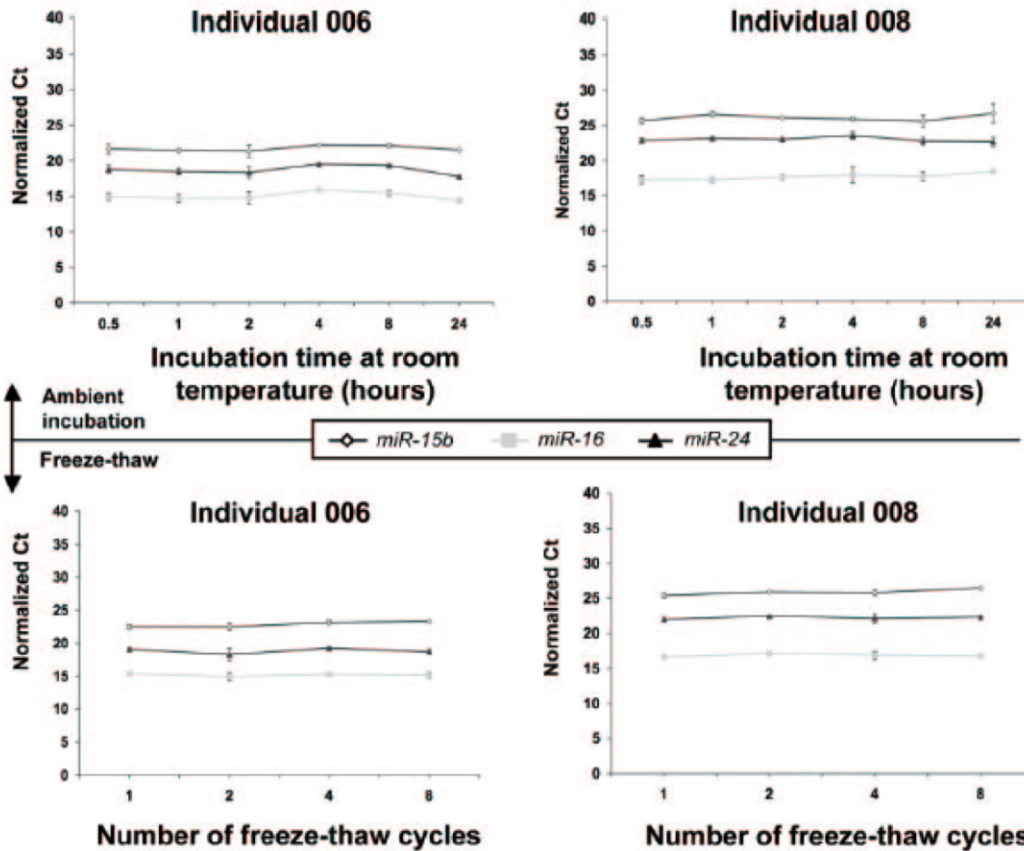
mRNA z FFPE



Yaguang Xi, RNA, 2007, 13:1-7

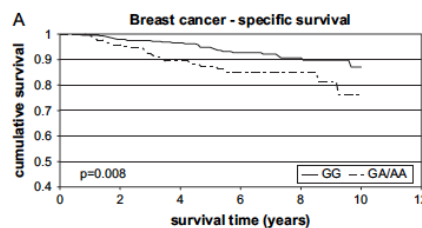
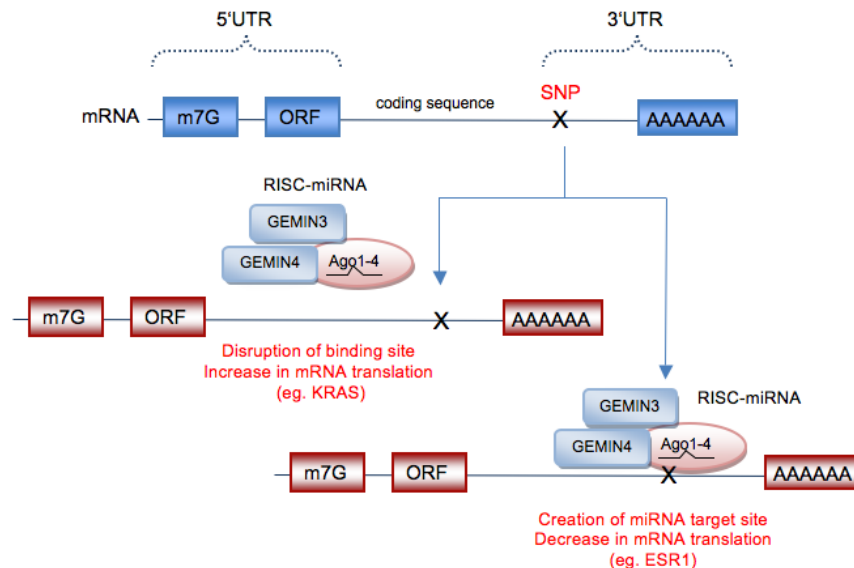
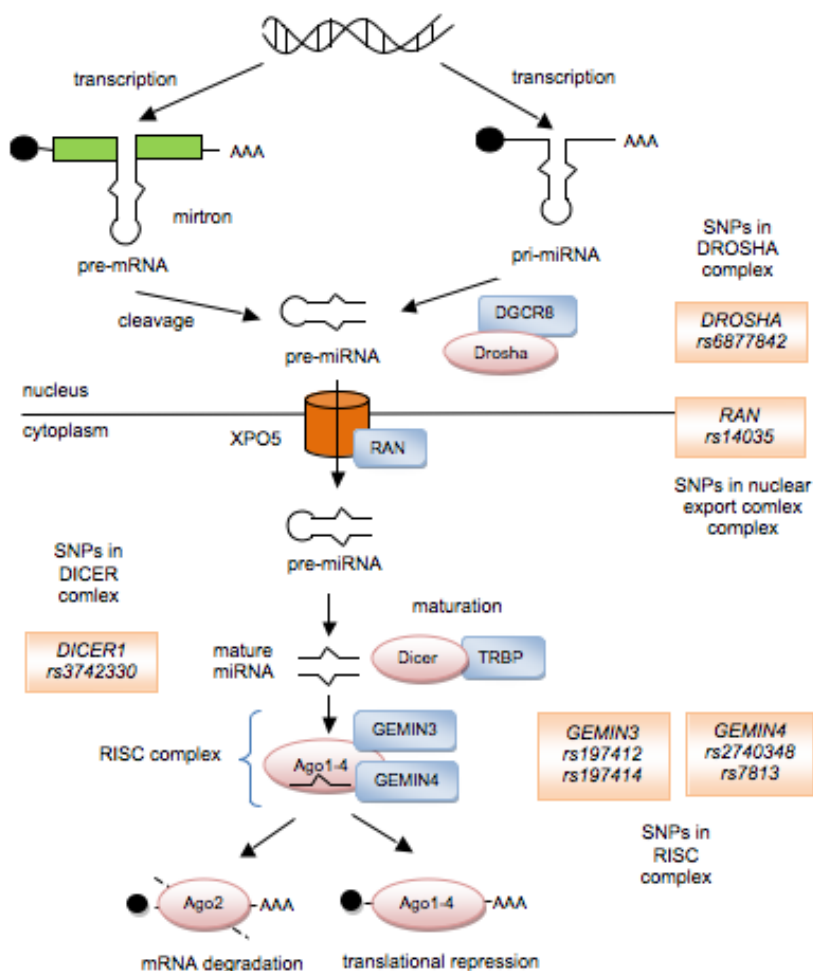
Význam mikroRNA v nádorové biologii – cirkulující mikroRNA!!!

A

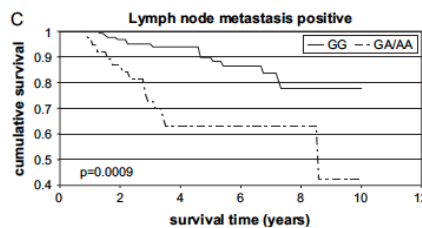


Význam mikroRNA v nádorové biologii – mikroRNA SNP -

nový směr molekulární epidemiologie nádorových onemocnění!!!



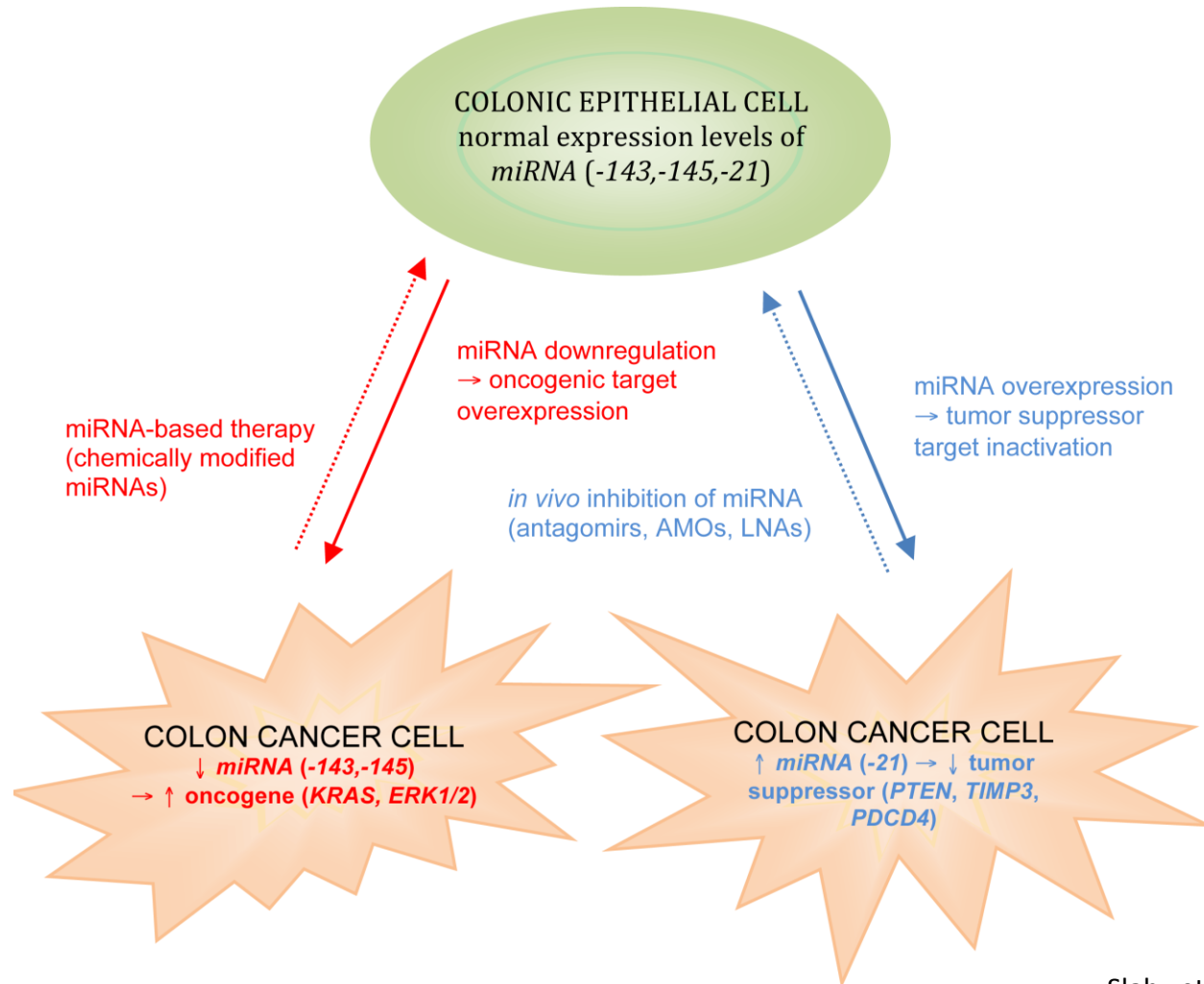
Slaby et al., 2010



1. SNP v biogenezi miRNA
2. SNP v pri-,pre- a miRNA sekvenci
3. SNP ve vazebných místech miRNA

G/A ITGB4 (miR-34a) Brendle et al, Carcinogenesis 2009

mikroRNA: potenciální využití v terapii nádorových onemocnění



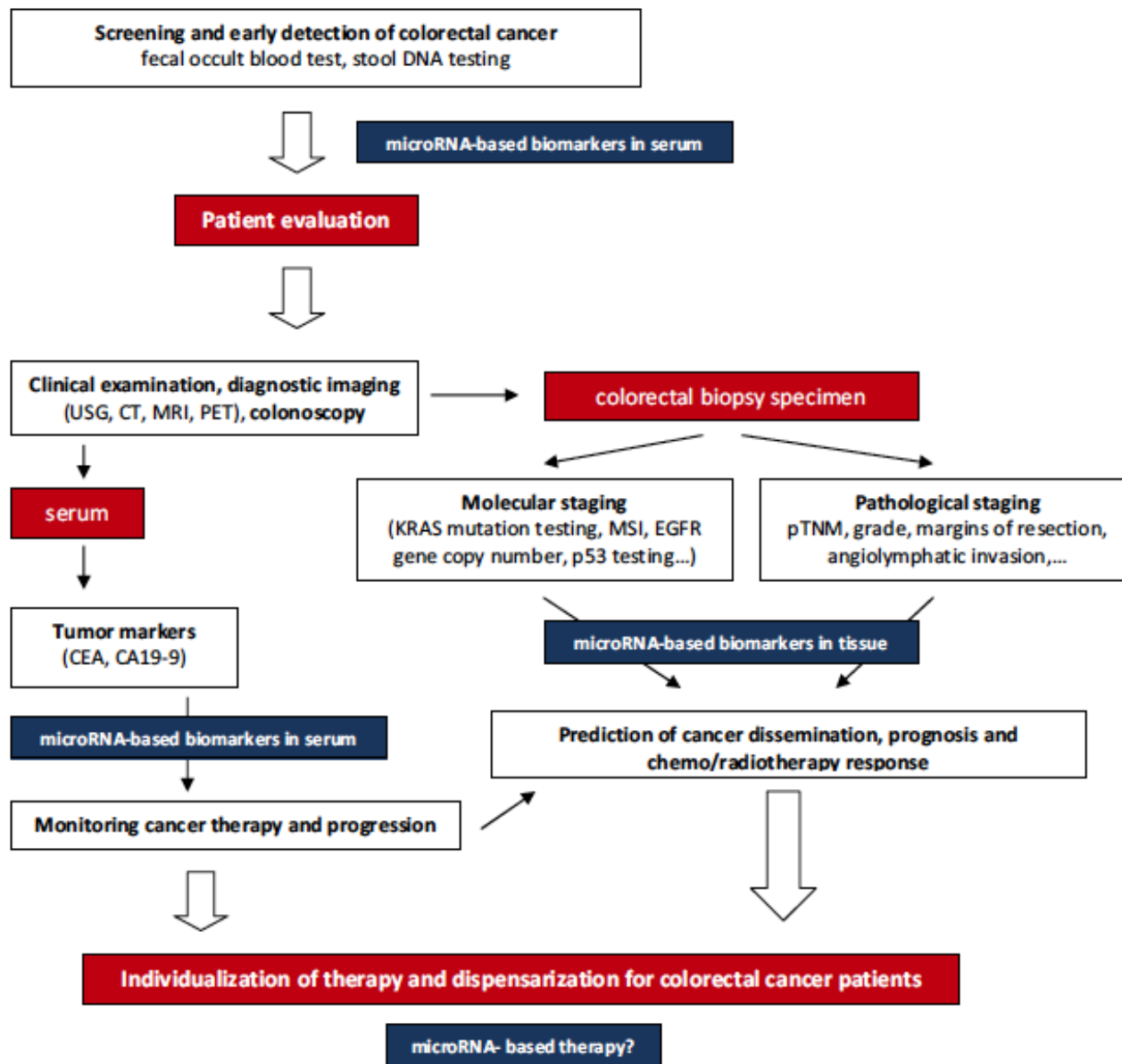
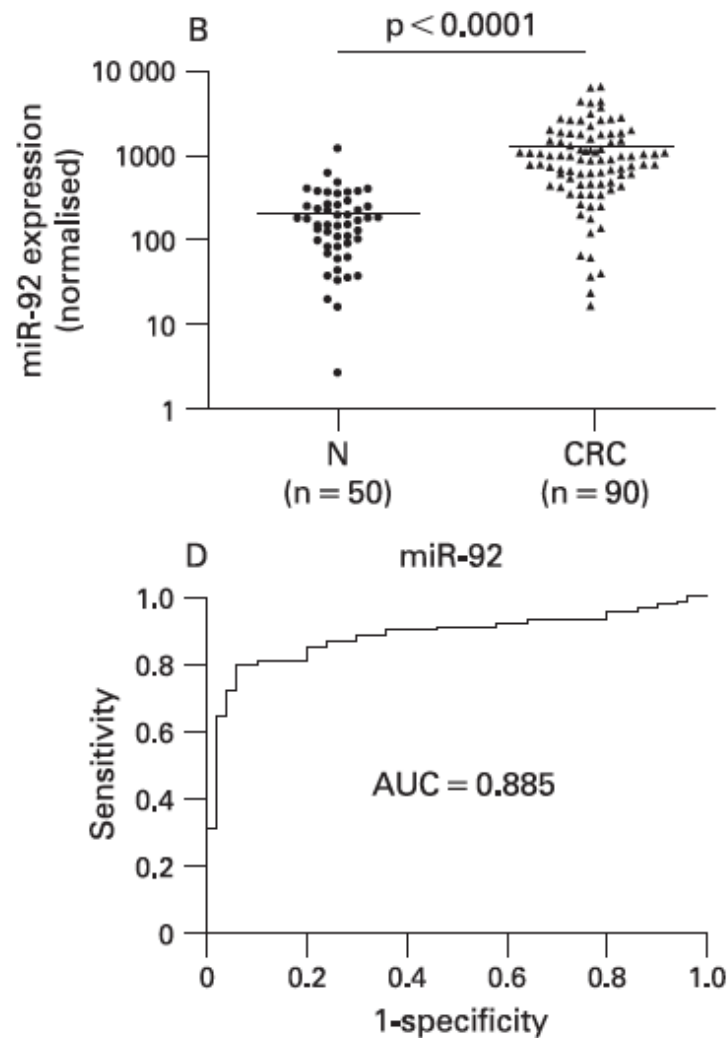
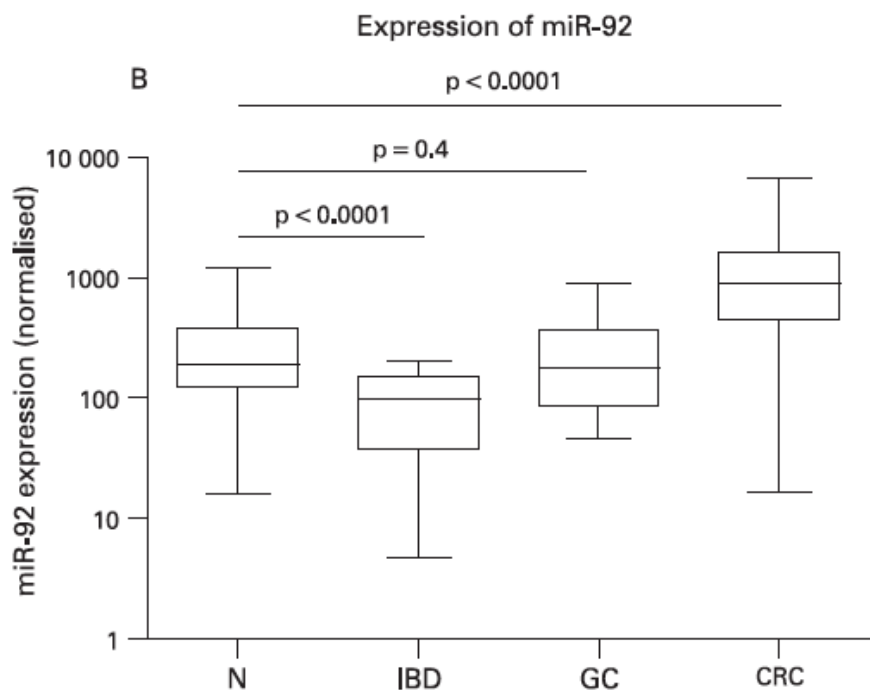


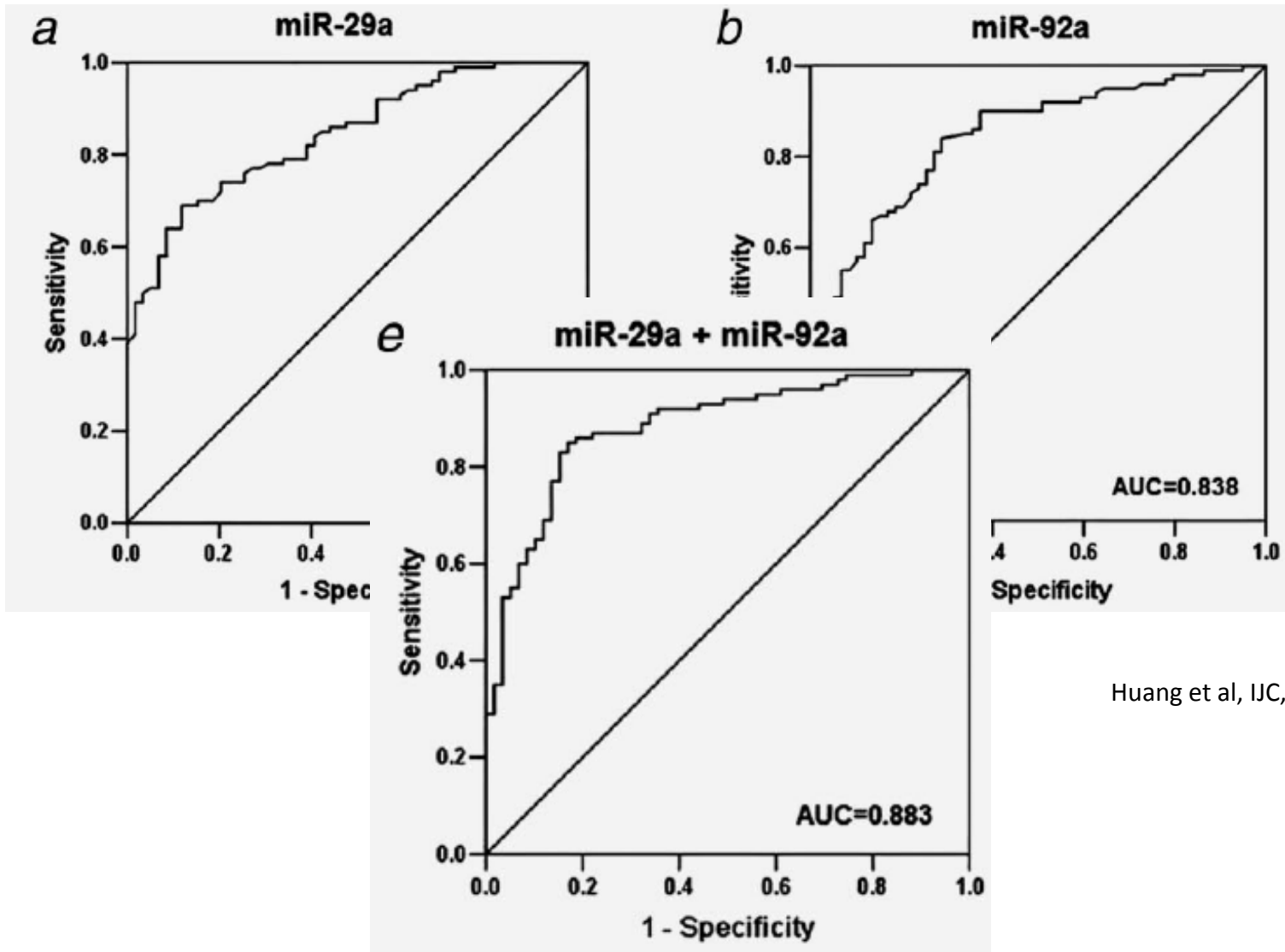
Figure 2
The potential usage of miRNAs in the clinical management of the colorectal cancer patients.

MikroRNA: markery časného záchytu kolorektálního karcinomu



mikroRNA vykazují vysokou míru stability v krevním séru
a jsou proto vhodnými kandidáty pro diagnostické markery

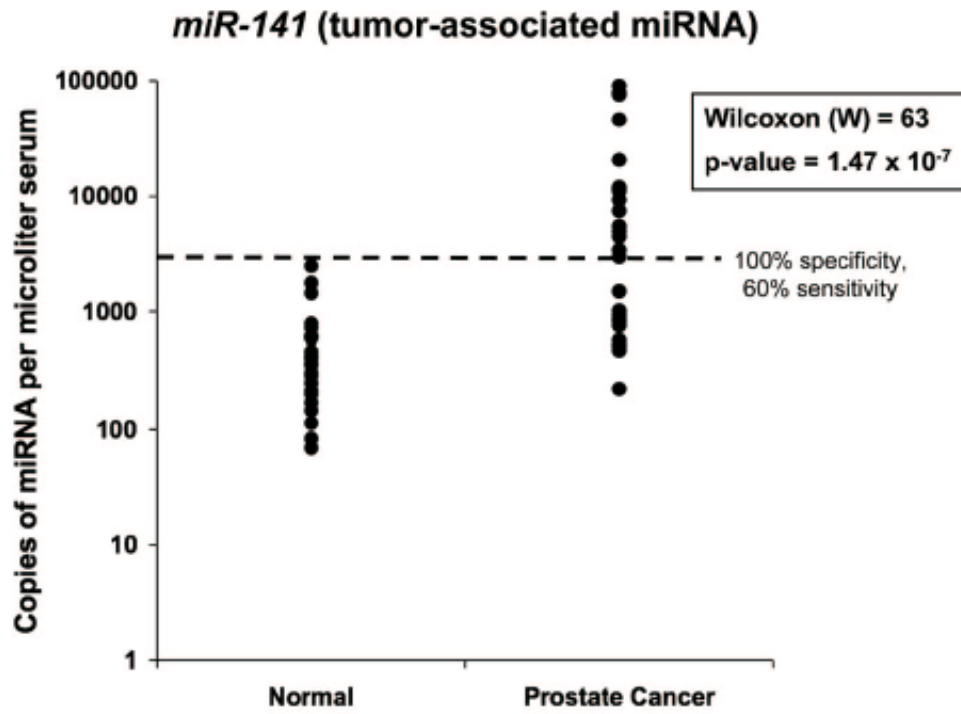
MikroRNA: markery časného záchytu kolorektálního karcinomu



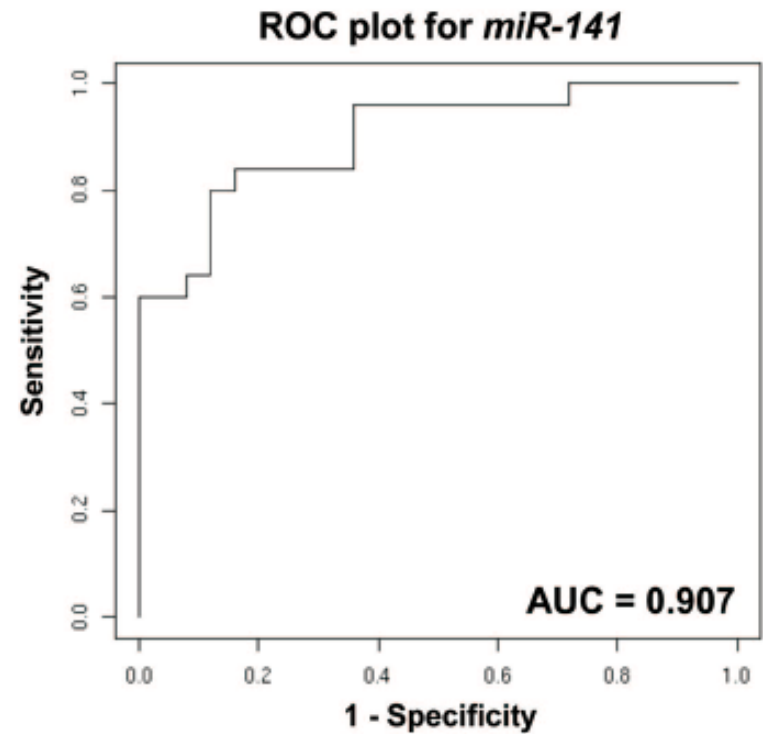
Huang et al, IJC, 2010

83% senzitivita, 85% specifita

miR-141 jako diagnostický marker karcinomu prostaty

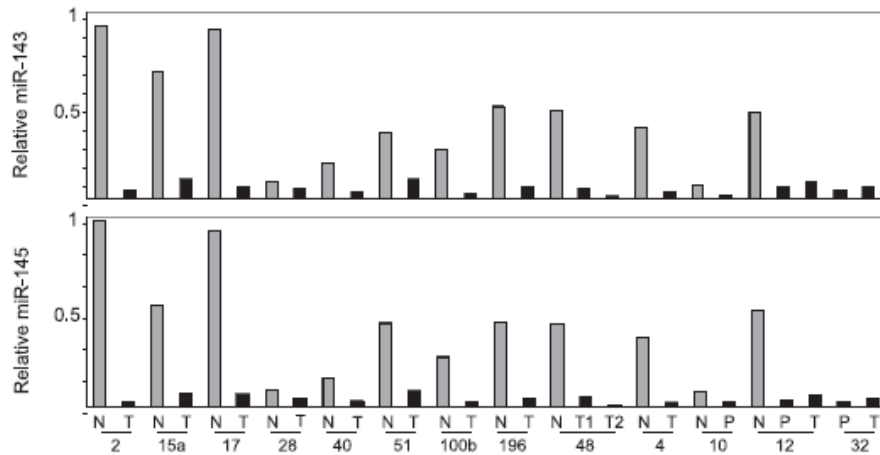
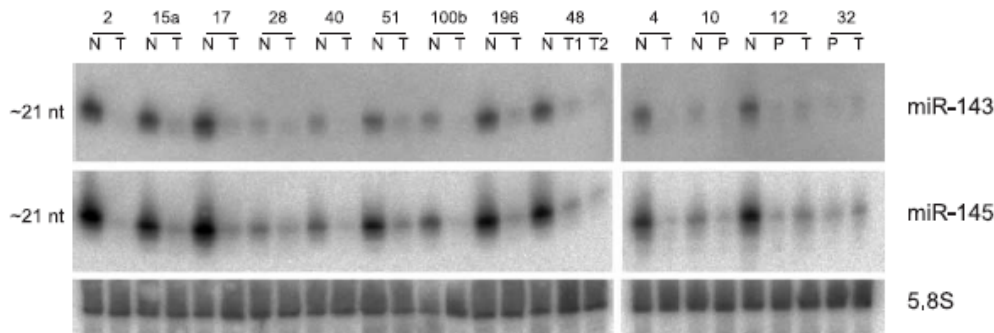


Vysoká míra korelace s PSA!



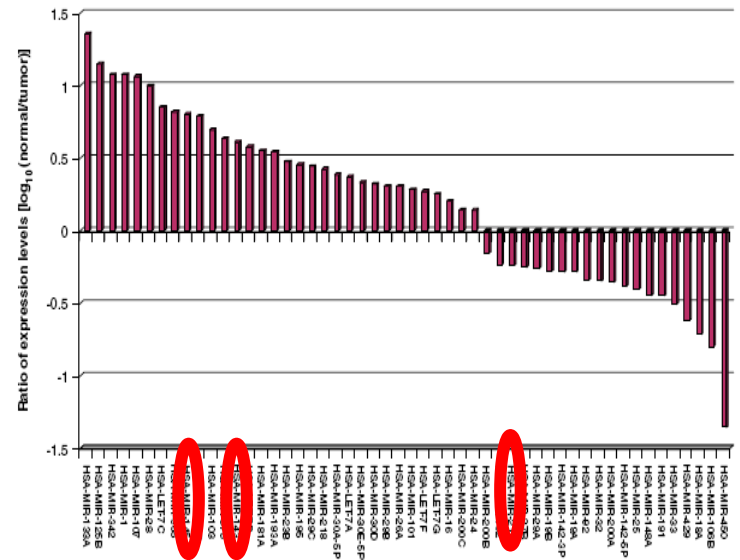
Mitchell, PNAS, 2008

Srovnání expresních profilů mikroRNA v CRC a nenádorové střevní tkáni



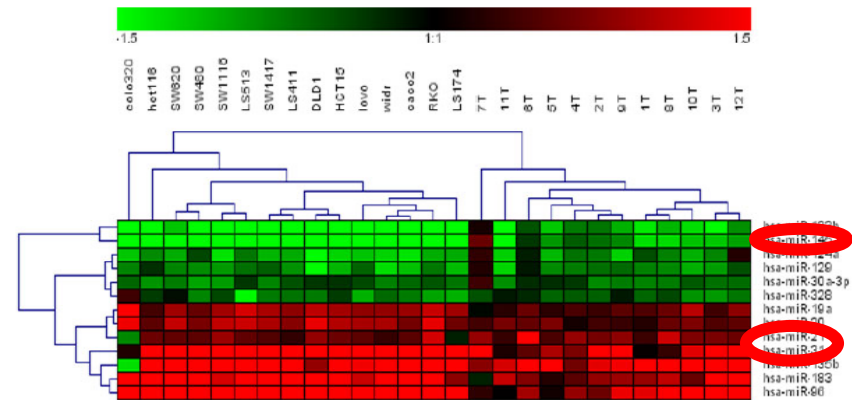
Michael et al., Molecular Cancer Research, 2003

Stanovení profilů miRNA metodou miRAGE



Cummins et al., PNAS, 2006

Srovnání profilů miRNA metodou Real-Time PCR



Bandres et al., Molecular Cancer, 2006

miR-21: diagnostický marker kolorektálního karcinomu

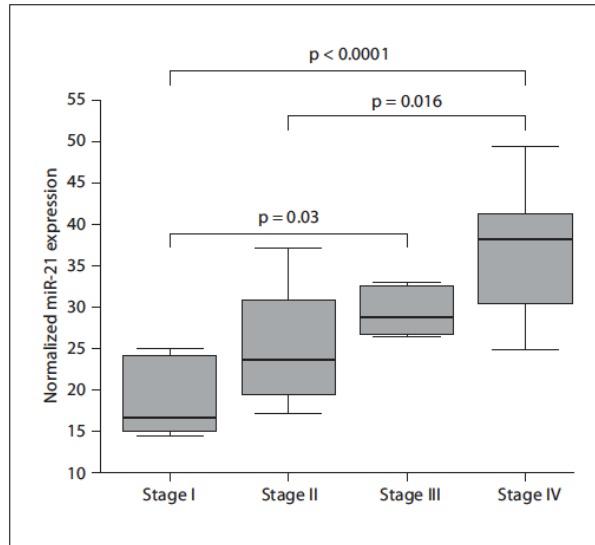
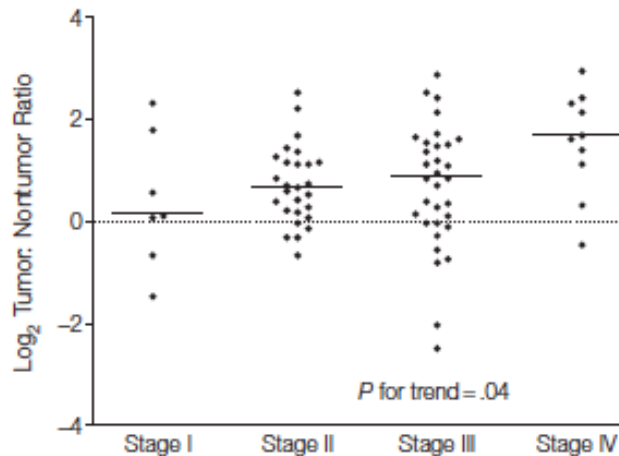


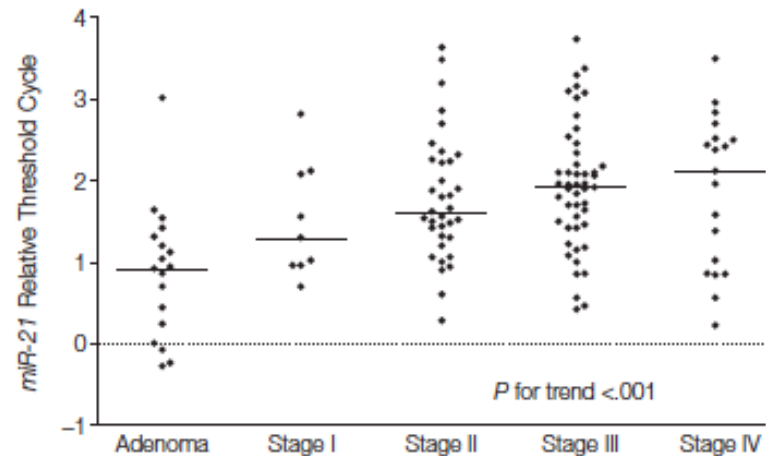
Fig. 1. Correlation between clinical stage and normalized expression of miR-21 in patients with CRC.

Slaby et al, Oncology,
Published online: January 15, 2008 ☺

A Maryland test cohort (microarray data)

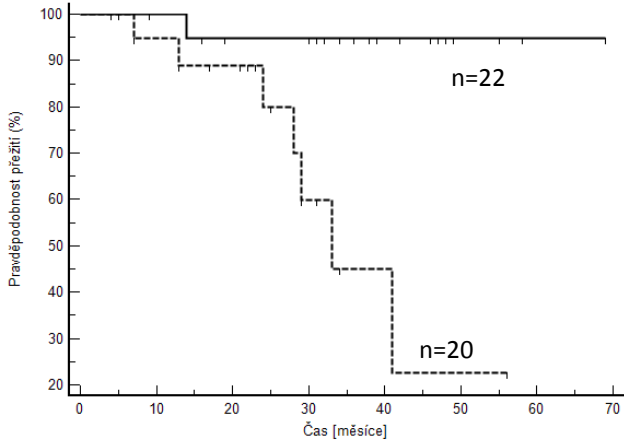


B Hong Kong validation (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction data)



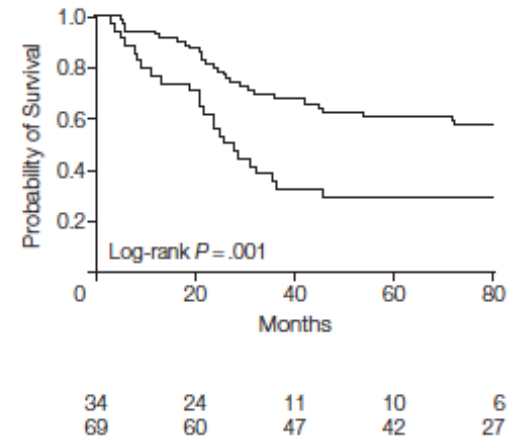
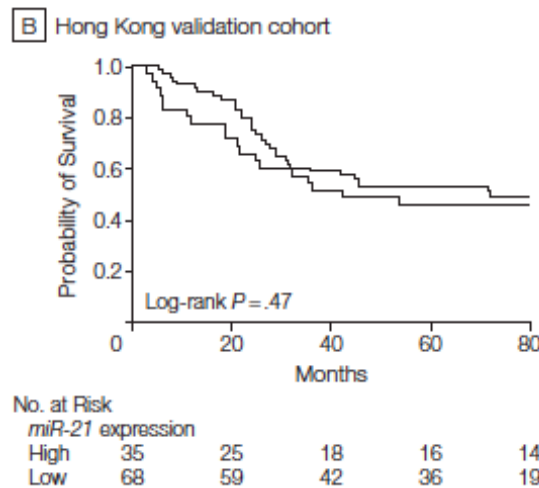
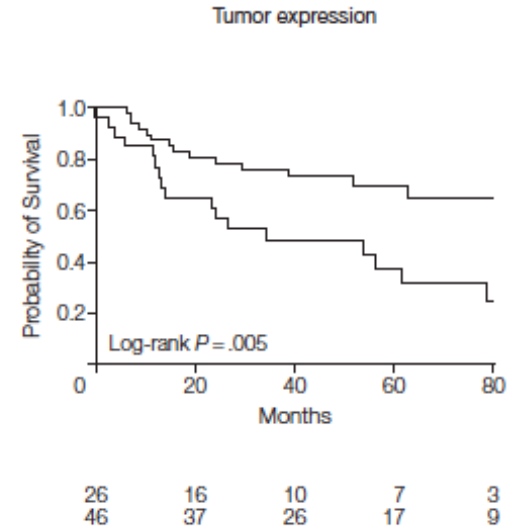
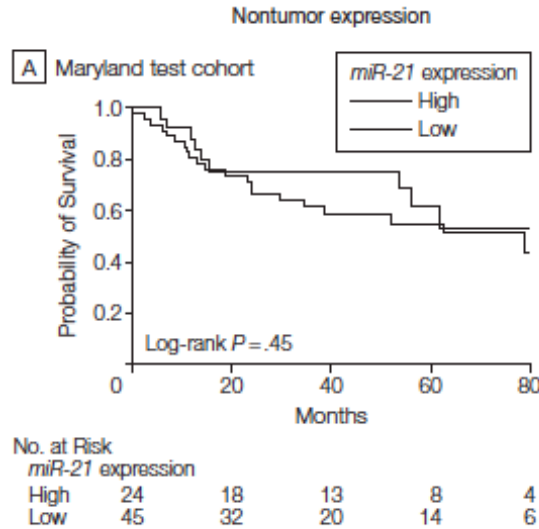
miR-21: prognostický a prediktivní marker kolorektálního karcinomu

Effect of miR-21 levels on overall survival of CRC patients



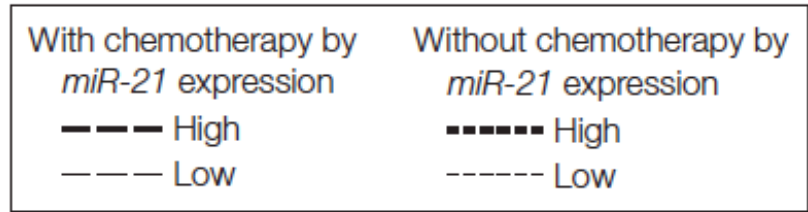
Long-rank $p=0,0015$

Slaby et al., 2010

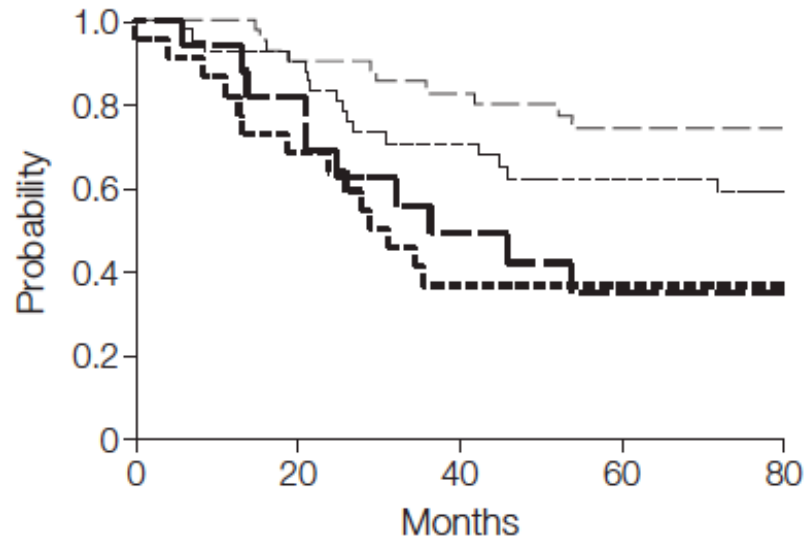


Schetter et al, JAMA, 2008

miR-21: prognostický a prediktivní marker kolorektálního karcinomu



miR-21 expression and adjuvant chemotherapy



No. at Risk

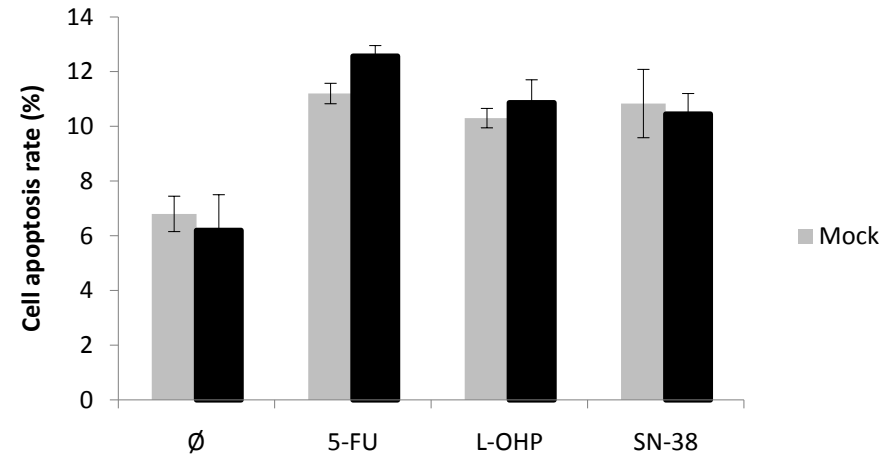
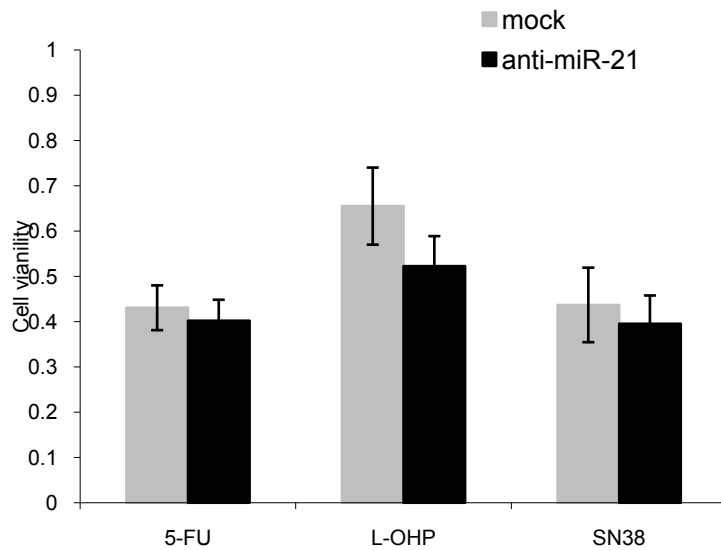
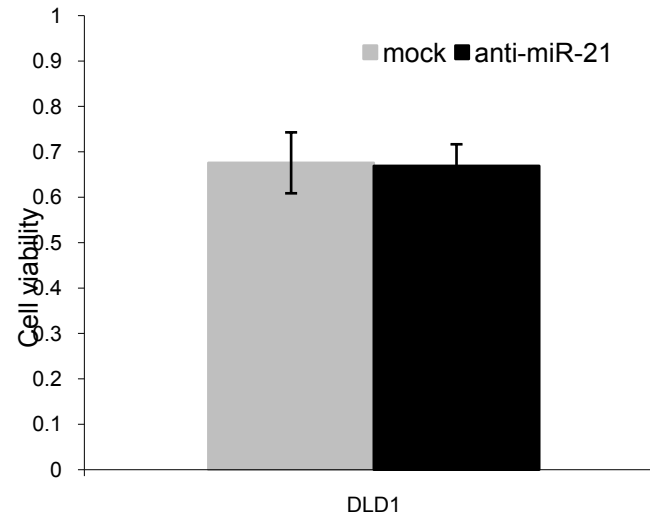
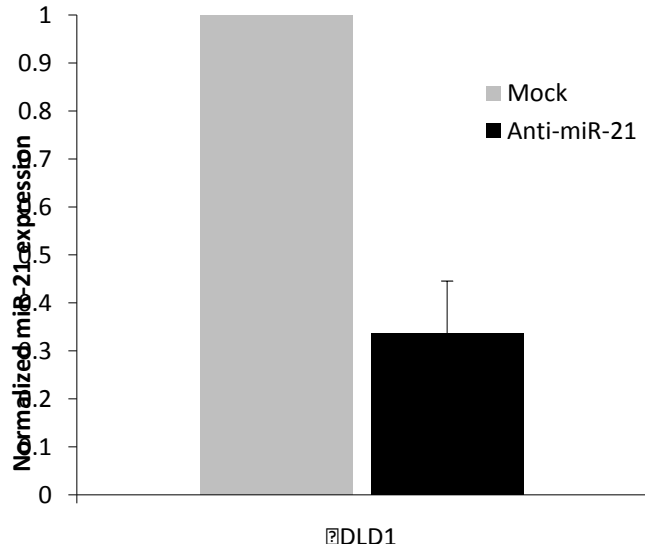
With chemotherapy by *miR-21* expression

High	16	13	7	5	2
Low	40	36	31	26	16

Without chemotherapy by *miR-21* expression

High	22	15	7	7	6
Low	41	37	26	20	14

Analýzy inhibitoru miR-21 u buněk kolorektálního karcinomu



Analýzy inhibitoru miR-21 u buněk kolorektálního karcinomu

Scratch assay – inhibice migrace buněk

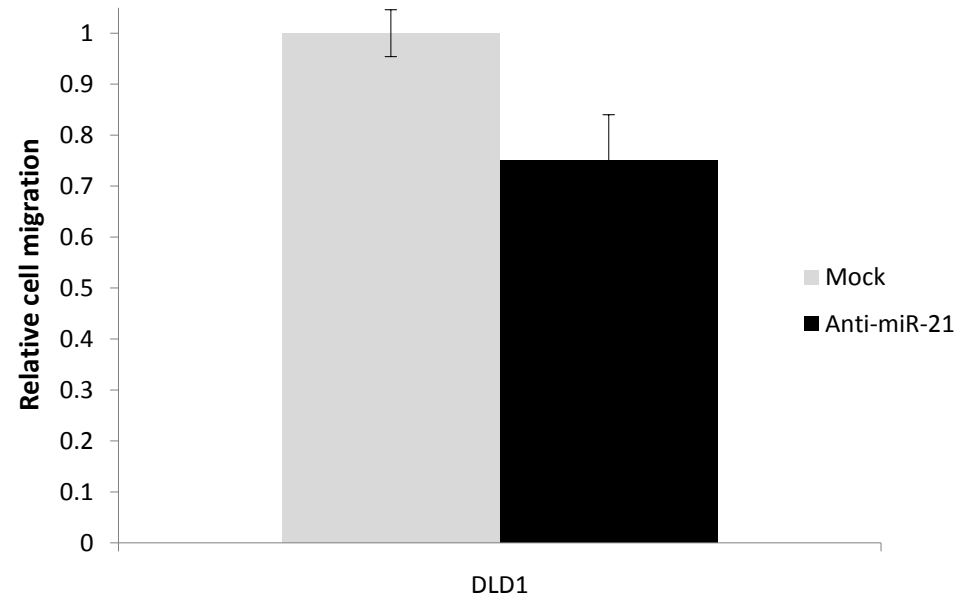
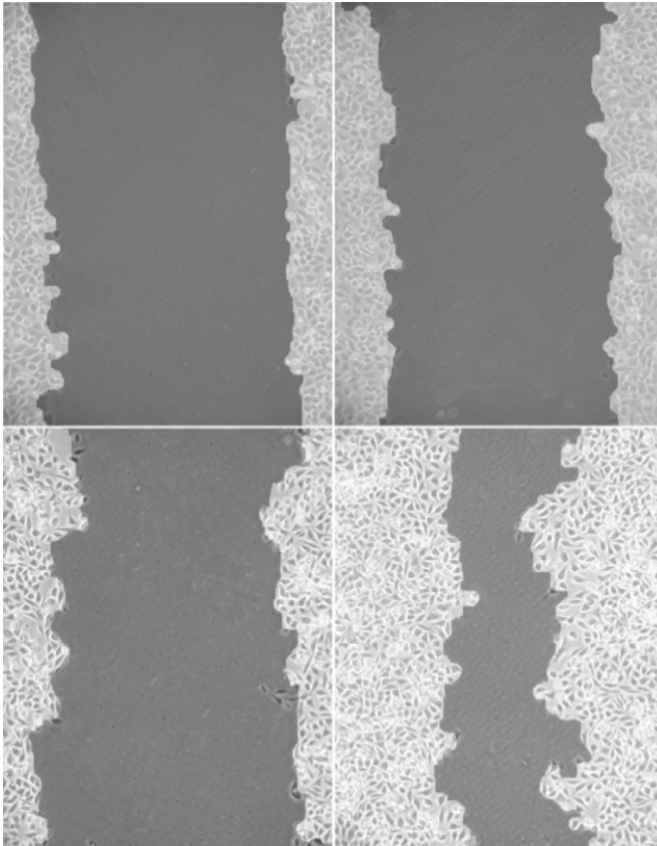


Figure 10 Relative cell motility po 24 hodinach (two-tailed t-test, $p=0.016$)

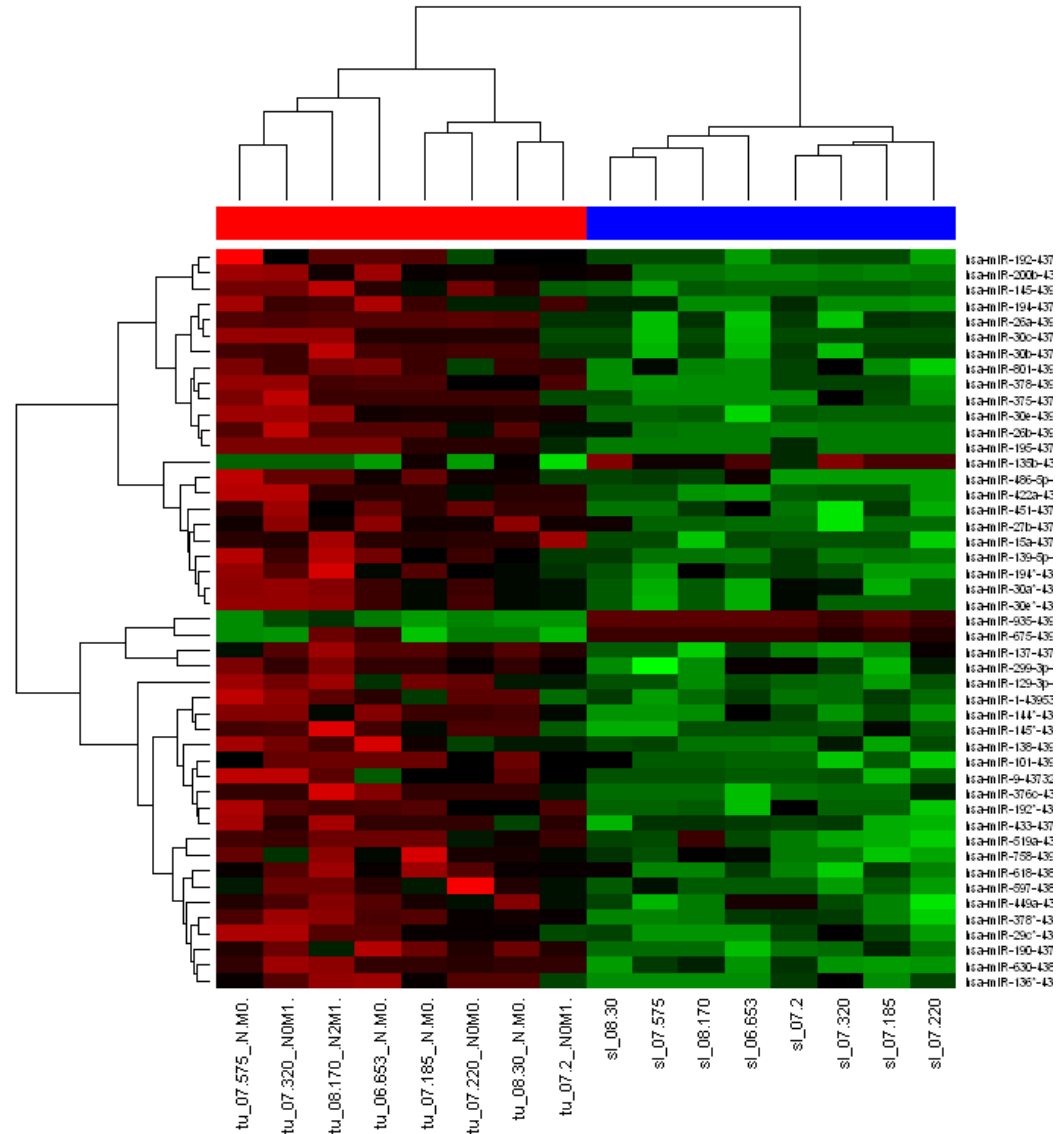
Comparison of miRNA expression profiles in CRC and matched non-tumoral tissue

Applied Biosystems microRNA Real-Time PCR cards version 2.0 (667 microRNAs)

47 microRNAs according to paired LIMMA ($p < 0.001$)

hsa-miR-935-4395289
hsa-miR-378-4395354
hsa-miR-195-4373105
hsa-miR-137-4373301
hsa-miR-378*-4373024
hsa-miR-422a-4395408
hsa-miR-190-4373110
hsa-miR-144*-4395259
hsa-miR-451-4373360
hsa-miR-630-4380970
hsa-miR-129-3p-4373297
hsa-miR-376c-4395233
hsa-miR-375-4373027
hsa-miR-26b-4395167
hsa-miR-192*-4395383
hsa-miR-139-5p-4395400
hsa-miR-801-4395183
hsa-miR-101-4395364
hsa-miR-519a-4395526
hsa-miR-618-4380996
hsa-miR-30e-4395334
hsa-miR-30e*-4373057
hsa-miR-145-4395389
hsa-miR-15a-4373123
hsa-miR-136*-4395211
hsa-miR-30a*-4373062
hsa-miR-135b-4395372
hsa-miR-299-3p-4373189
hsa-miR-1-4395333

...
by use of R, Bioconductor

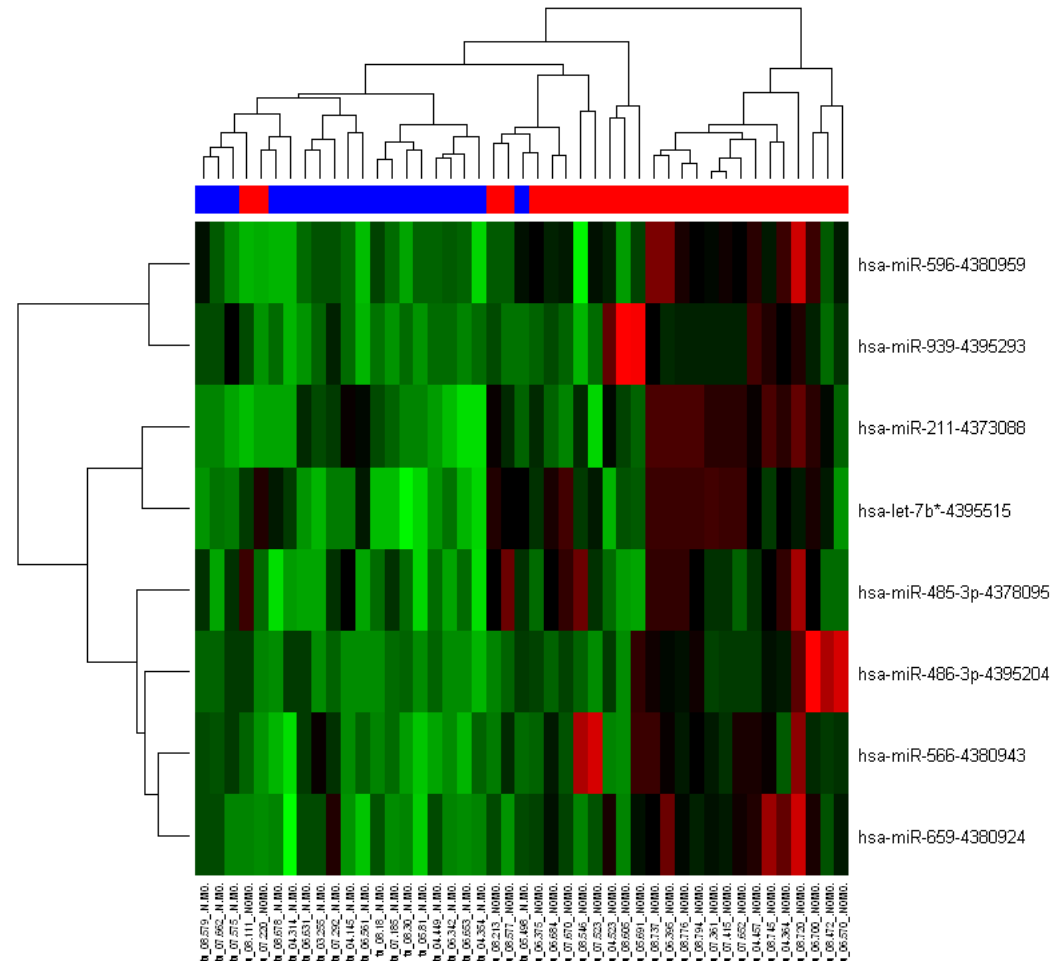


Detection of lymph nodes metastatic involvement from primary CRC tumor

N+M0...blue (20 patients)
 NOM0...res (25 patients)

According to LOOCV method
 Sensitivity 79%
 Specificity 81%
 Balanced accuracy 80%

		aucv
hsa-let-7b*-4395515	N+M0	0.88664
hsa-miR-566-4380943	N+M0	0.82996
hsa-miR-485-3p-4378095	N+M0	0.822874
hsa-miR-659-4380924	N+M0	0.819838
hsa-miR-211-4373088	N+M0	0.818826
hsa-miR-486-3p-4395204	N+M0	0.814777
hsa-miR-596-4380959	N+M0	0.811741
hsa-miR-939-4395293	N+M0	0.811741

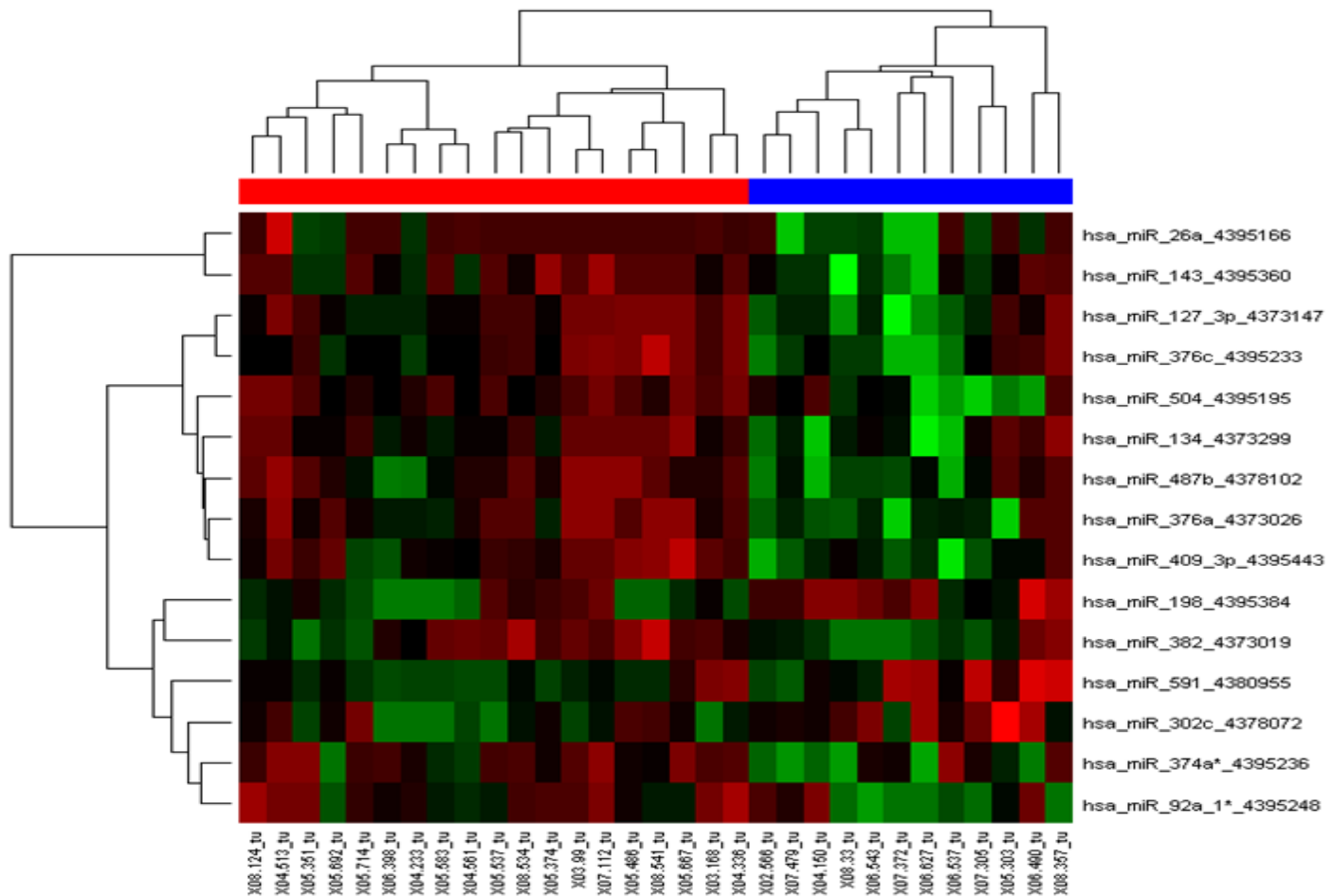


MikroRNA jako nové prognostické markery časného metastazování po nefrektomii

II a. Dobrá vs. špatná prognóza

15 mikroRNA – identifikace pacientů s dobrou prognózou (●) a špatnou prognózou, resp. rizikem časného relapsu po nefrektomii (●);

31 nepárových vzorků ccRCC; (●) snížená hladina, (●) zvýšená hladina





RESEARCH

Open Access

Expression of miRNA-106b in conventional renal cell carcinoma is a potential marker for prediction of early metastasis after nephrectomy

Ondrej Slaby^{*1,3}, Jana Jancovicova⁴, Radek Lakomy¹, Marek Svoboda¹, Alexandr Poprach¹, Pavel Fabian², Leos Kren⁵, Jaroslav Michalek³ and Rostislav Vyzula¹

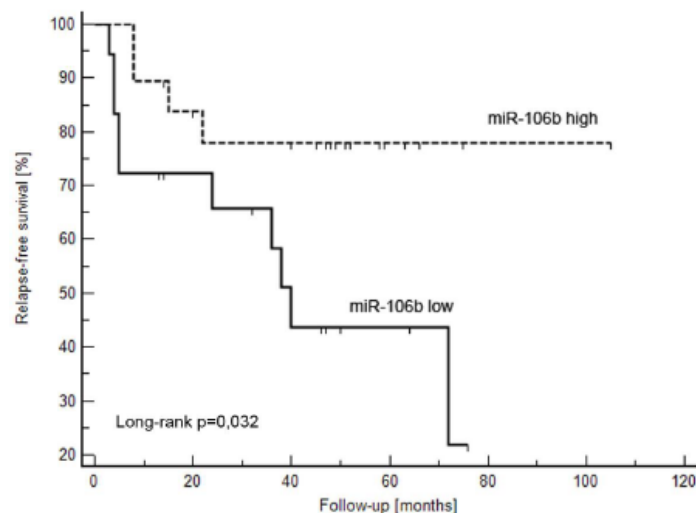
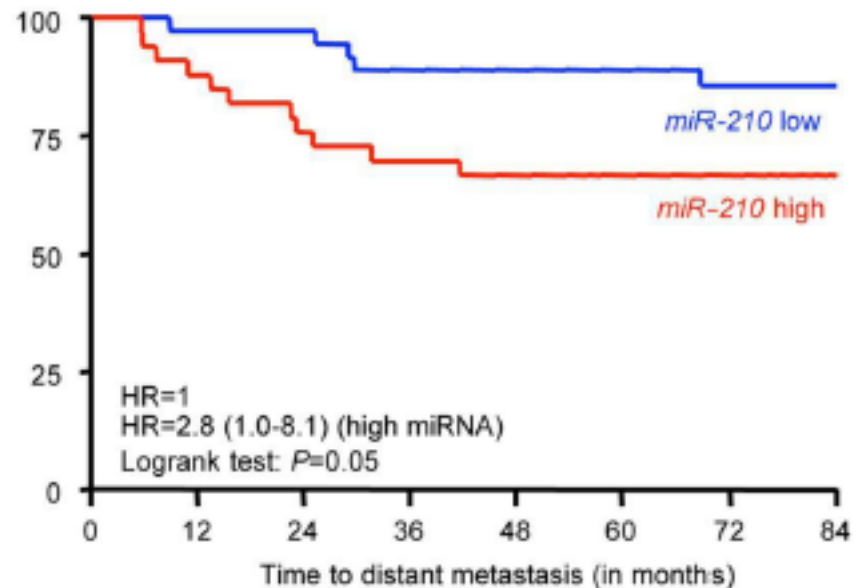
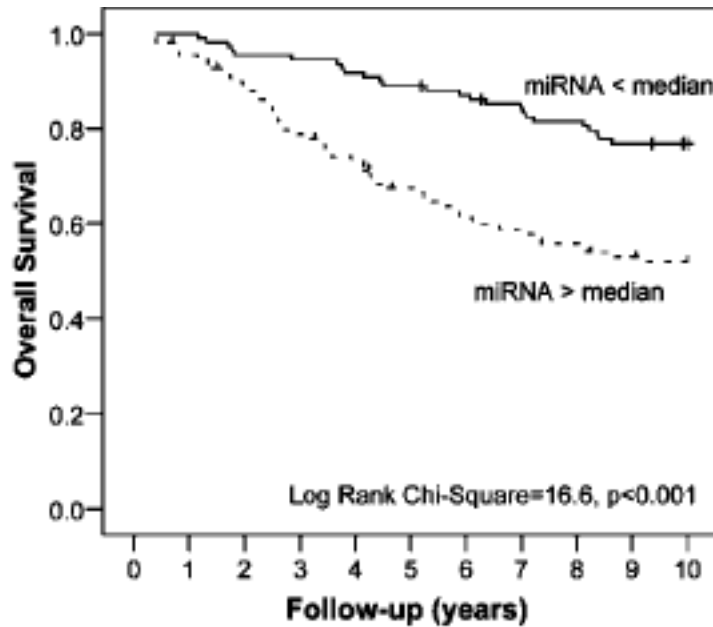


Figure 4 Relapse-free survival of patients with RCC based on the miR-106b expression levels (cutoff = median of miR-106b expression).

miR-210: prognostický marker u mamárního karcinomu



Camps et al, Clin Cancer Res, 2008

Foekens et al, PNAS, 2008

Iorio, Cancer Res 2006

miR-210 transkripčně kontrolován HIF1alfa
zapojen do procesů indukovaných hypoxií

miR-26a: prognostický a prediktivní marker hepatocelulárního karcinomu

D Survival According to miR-26a-1 Expression

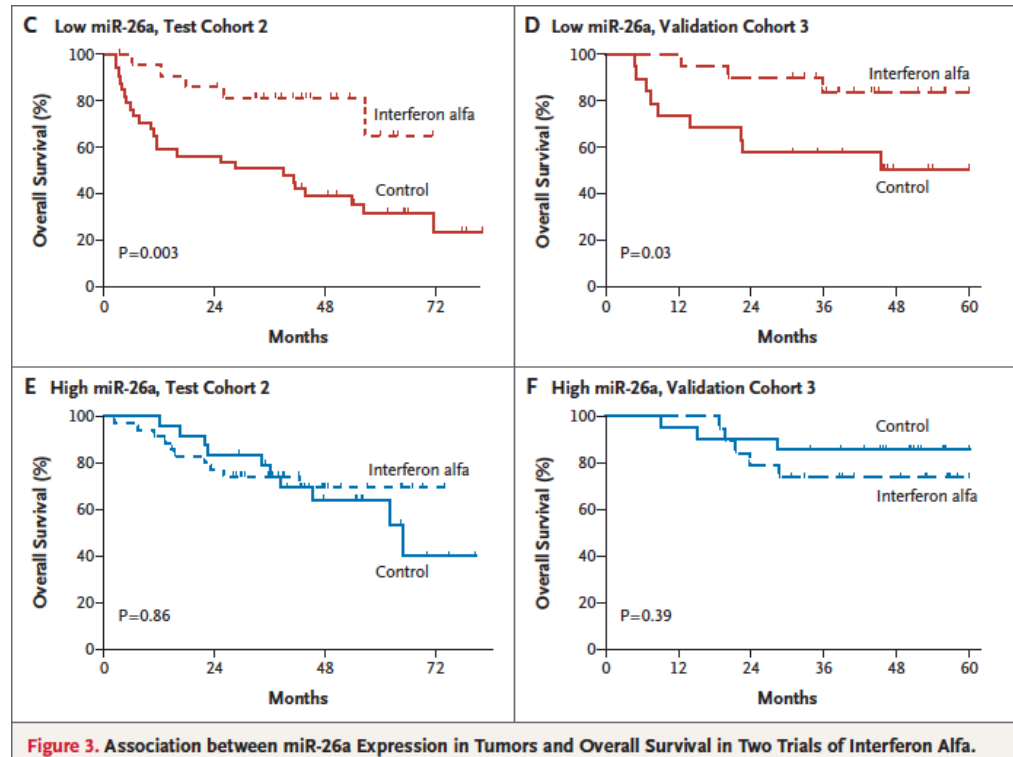
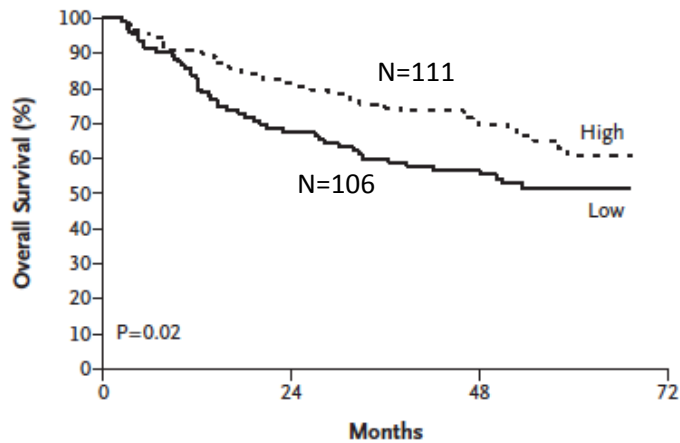


Figure 3. Association between miR-26a Expression in Tumors and Overall Survival in Two Trials of Interferon Alfa.

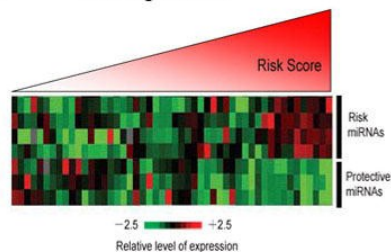
Junfang et al, NEJM, 2009

Predikce odpovědi na léčbu interferonem

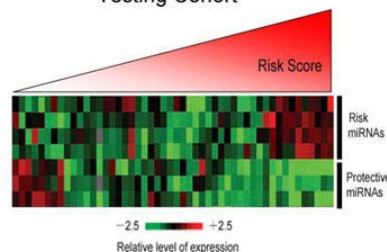
mikroRNA: prognostická sada 7 mikroRNA u karcinomu žaludku

fig-1(lxh)

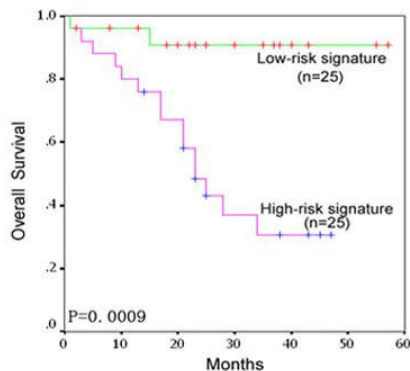
A. Training Cohort



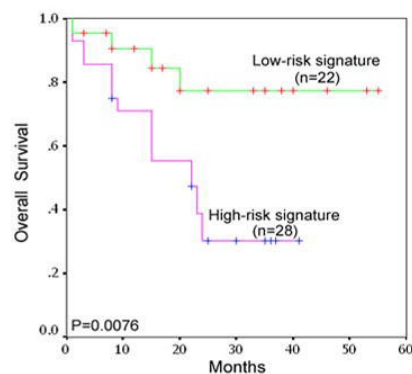
Testing Cohort



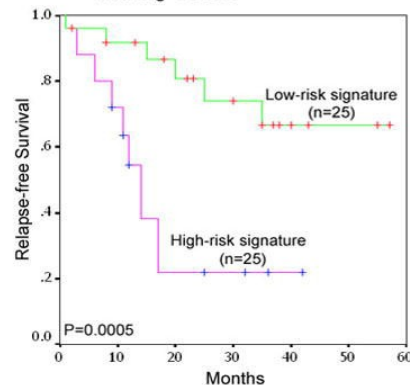
B. Training Cohort



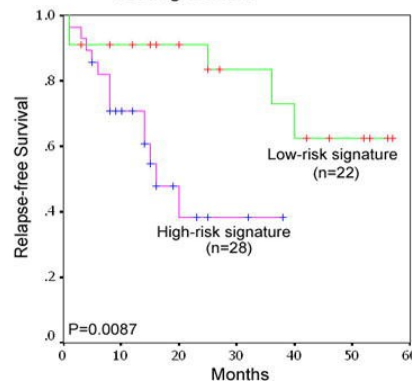
C. Testing Cohort



Training Cohort



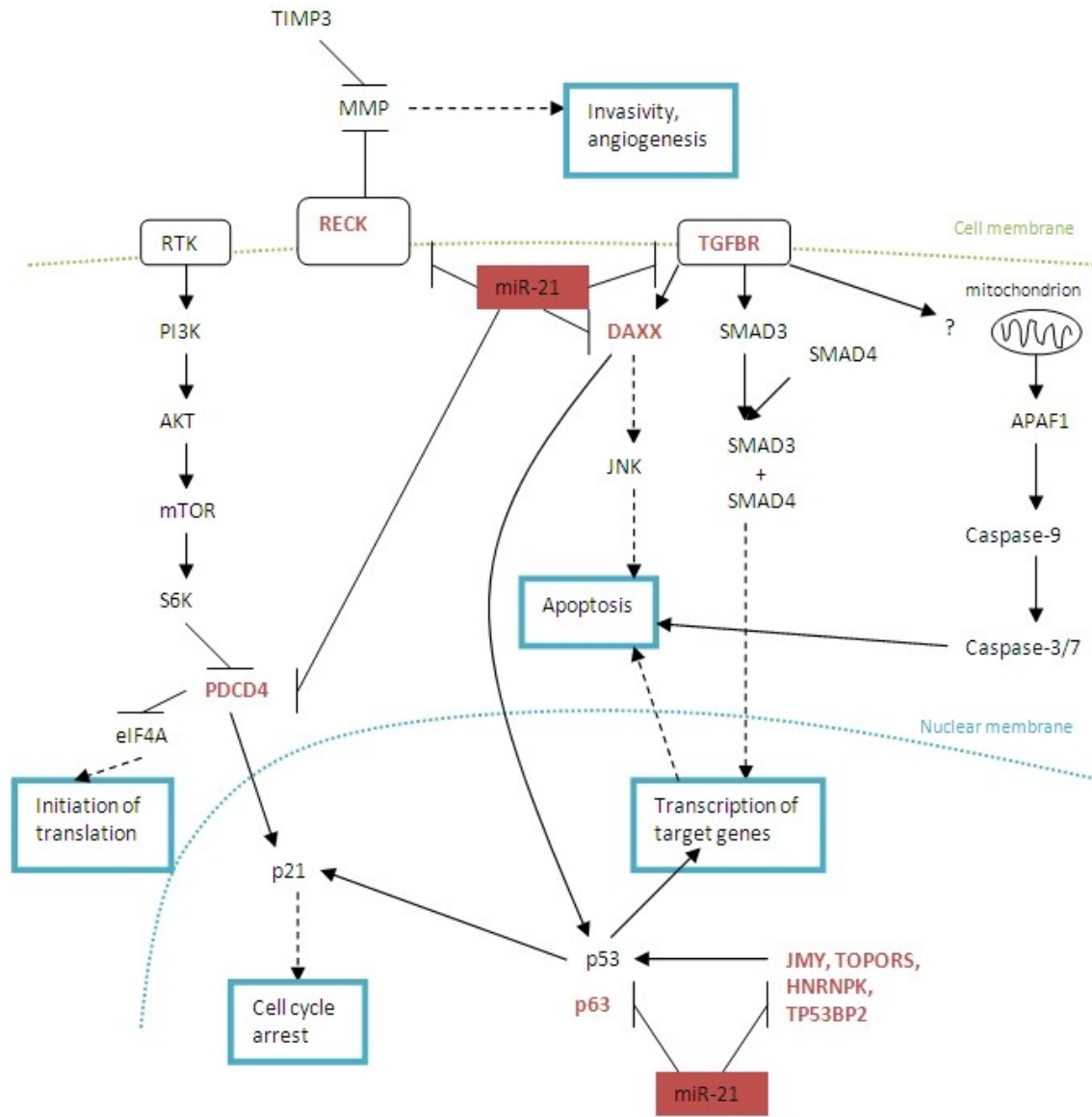
Testing Cohort



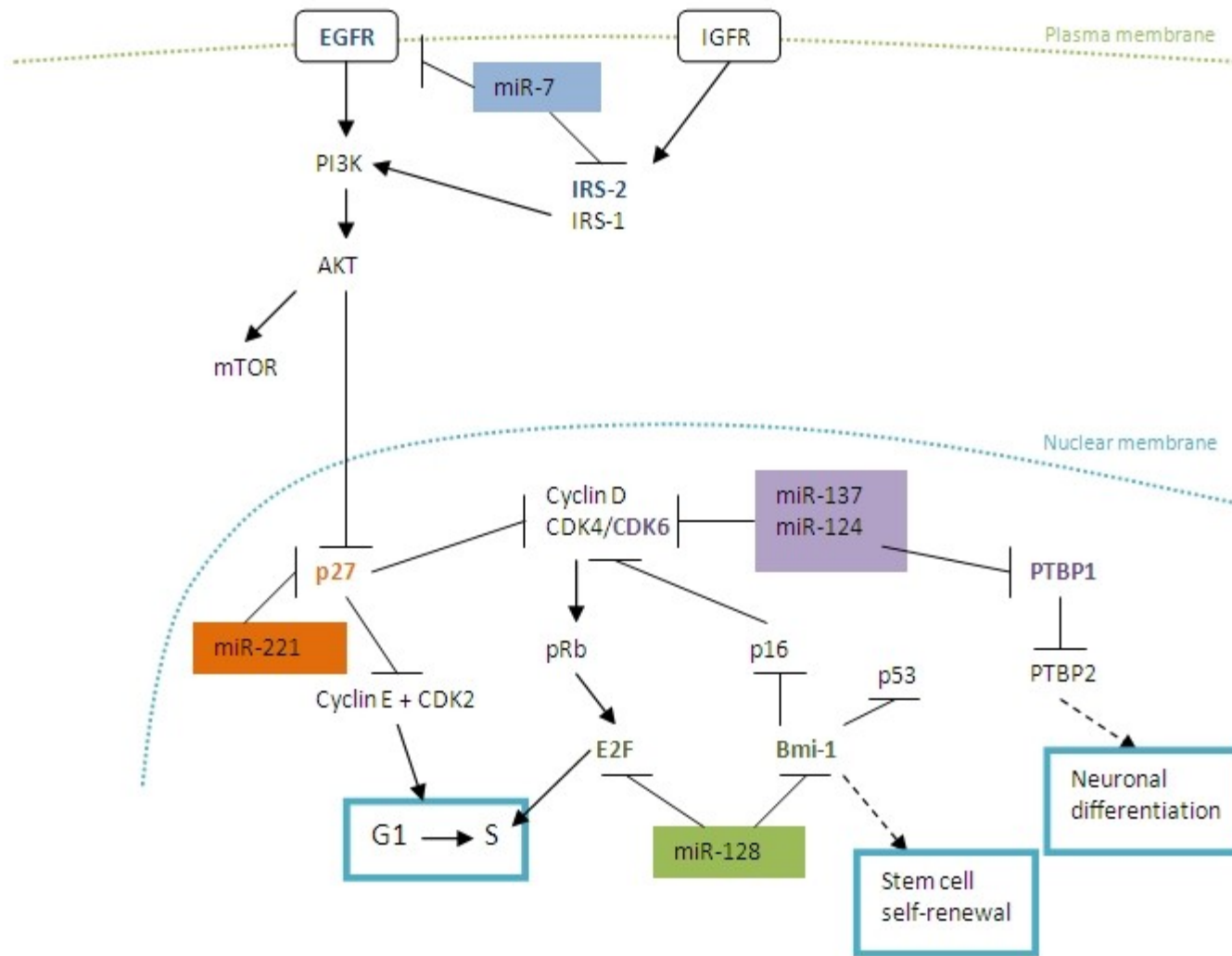
Xiaoh et al, Gut, 2010

miR-10b, miR-21, miR-223, miR-338, let-7a, miR-30a-5p, miR-126

MikroRNA v patogenezi glioblastomu



MikroRNA v patogenezi glioblastomu



MiR-195, miR-196b, miR-181c and miR-21 expression are associated with clinical outcome in glioblastoma patients

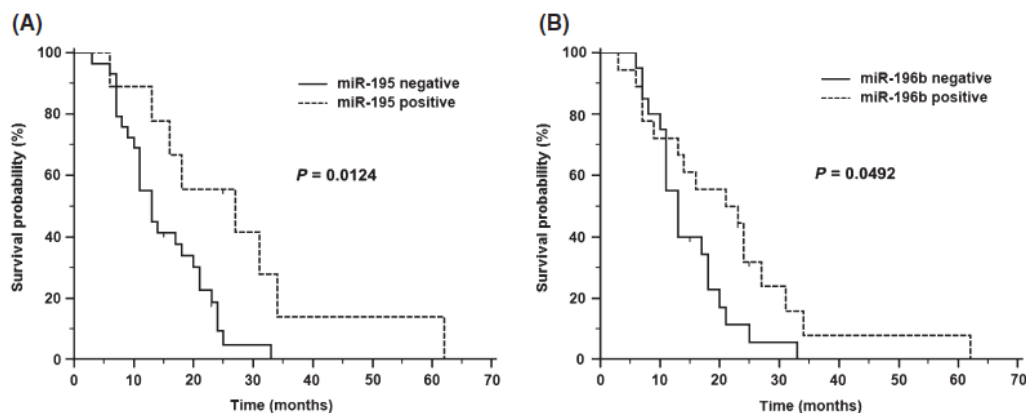


Fig. 2. Kaplan-Meier survival curves estimating overall survival in patients with glioblastoma multiforme, according to miR-195 (A) and miR-196b (B) expression levels.

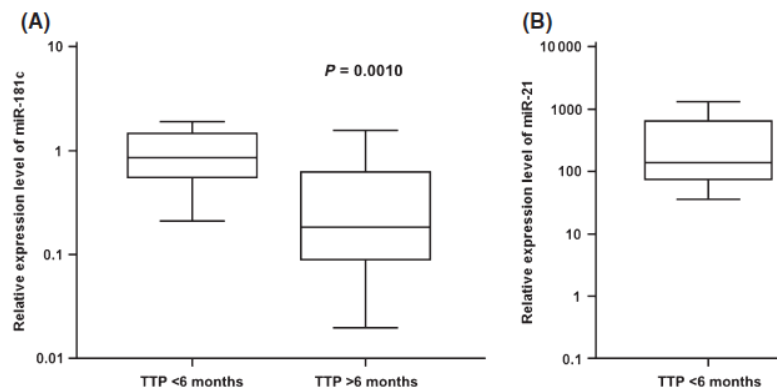


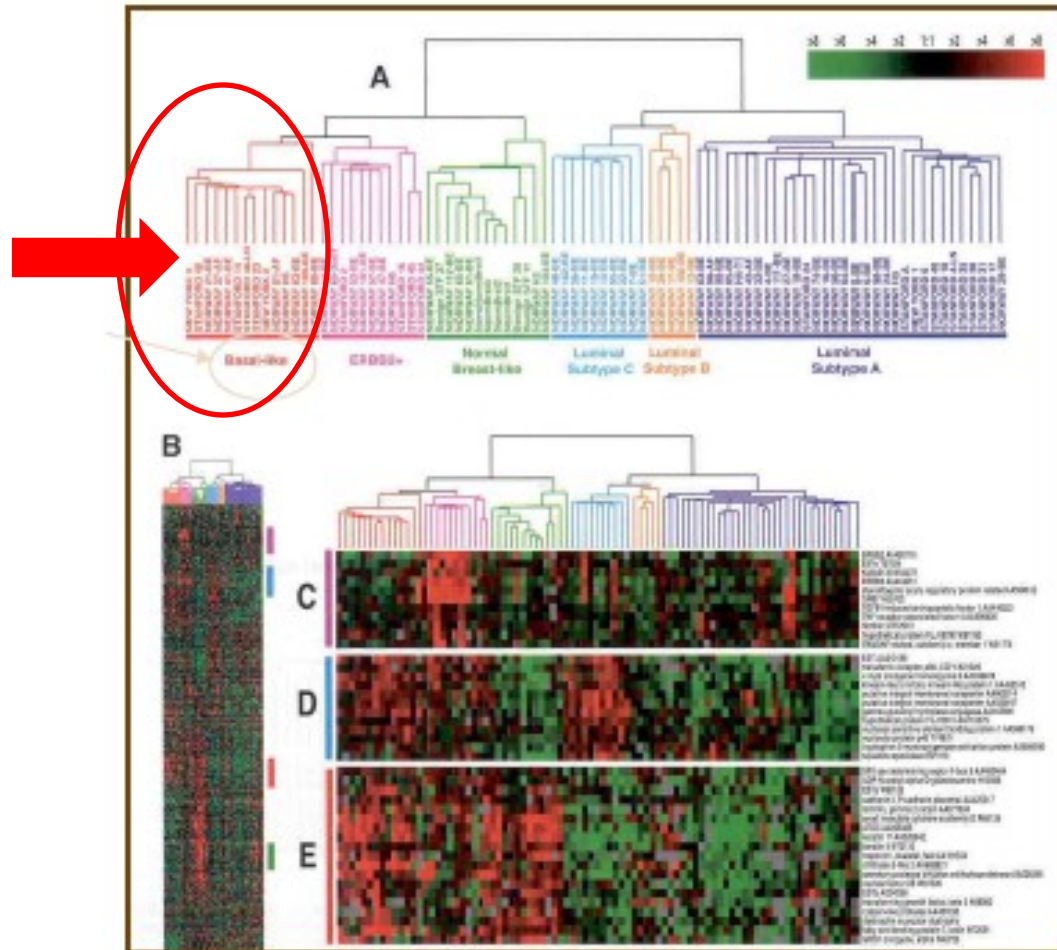
Fig. 3. Time to progression (TTP) up to 6 months in patients with glioblastoma multiforme, based on miR-181c (A) and miR-21 (B) expression levels. Central box represents values from the lower to upper quartiles (25th to 75th percentiles), and vertical line extends from minimum to maximum values. P-values were determined by Mann-Whitney *U*-test.

Table 4. Contingency table of glioblastoma patients stratified according to time to progression (TTP) and miR-21/miR-181c positivity

	No. of patients with TTP > 6 months	No. of patients with TTP < 6 months
miR-21 and miR-181c positivity	5	11
miR-21 and/or miR-181c negativity	21	1

Molekulární klasifikace karcinomu prsu

Basal-like
karcinom
prsu



Triple Negative (ER-, PR-, HER2-)

Zvýšená proliferace ($P < 0.0001$)

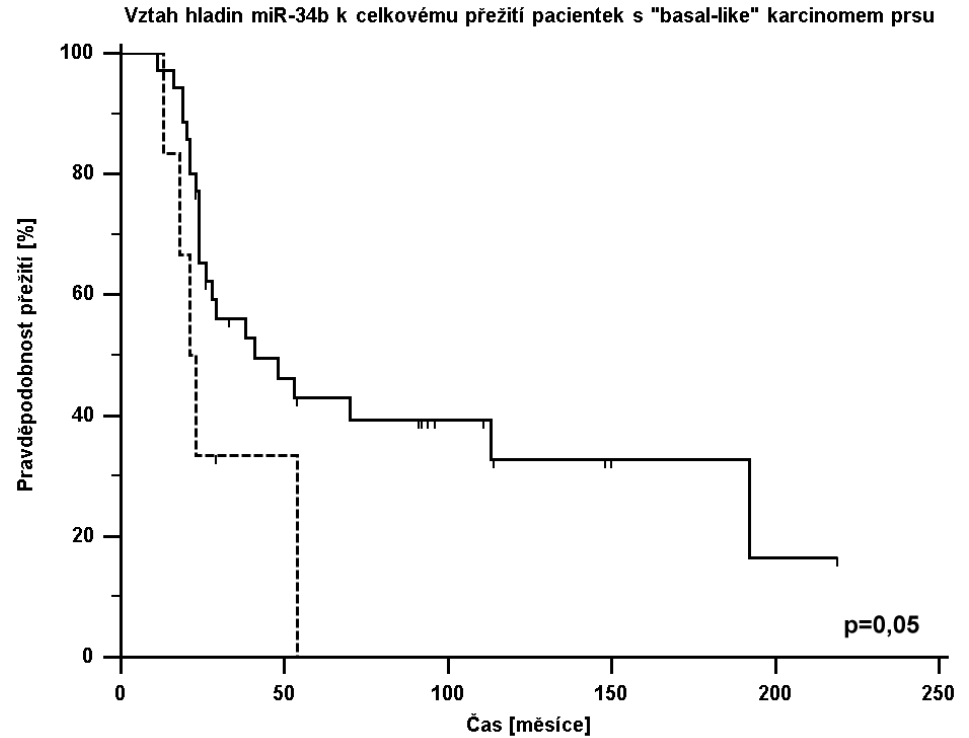
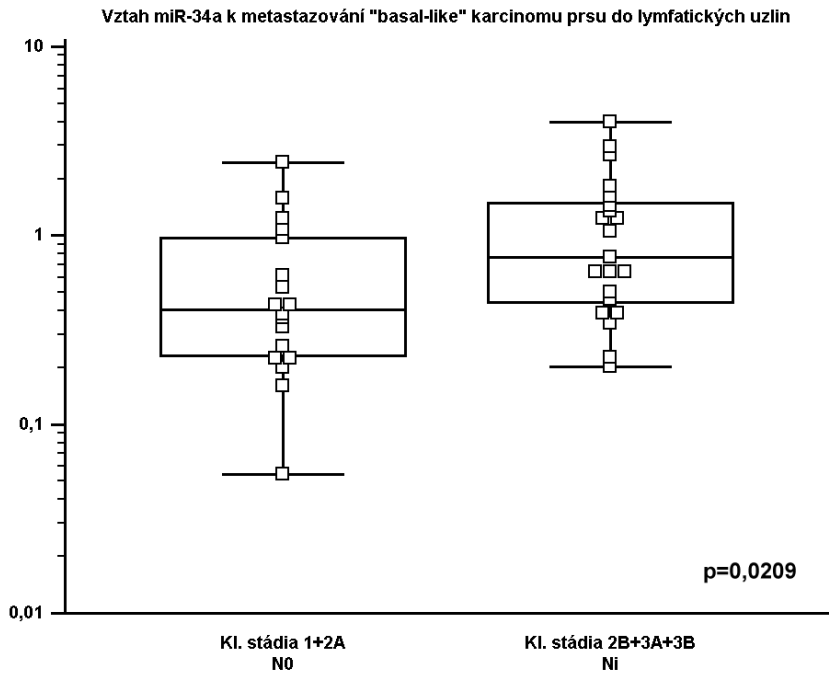
Nízká diferenciace ($P < 0.003$)

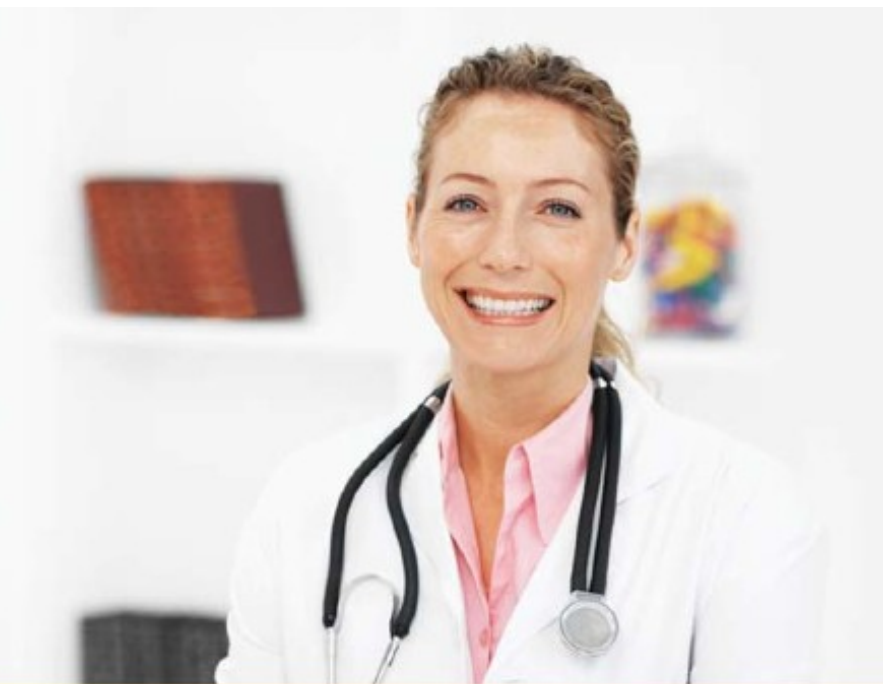
Výsoký grade ($P < 0.0001$)

Mutace v TP53 ($P < 0.001$)

Význam rodiny mikroRNA-34a-c u „basal-like“ mamárního karcinomu

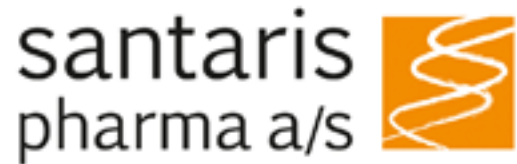
miR-34a je signifikantně zvýšená u pacientek s „basal-like“ karcinomy metastazujícími do uzlin.
miR-34b je silný negativní prognostický faktor.





miRview™ mets: Unsolving the Mystery of Cancer of Unknown Primary (CUP)

Identifying the primary origin of a metastasis



RNA Medicines for the 21st Century

Santaris Pharma begins human clinical testing of world's first microRNA *SPC3649* (*LNA-antimiR-122*) being developed as a potential new therapy for Hepatitis C virus (HCV) infection

May 28, 2008 – Santaris Pharma, the Danish biopharmaceutical company,

Děkuji Vám za pozornost

Poděkování

Masarykův onkologický ústav

prof. MUDr. Rostislav Vyzula, Ph.D.

MUDr. Marek Svoboda, Ph.D.

MUDr. Pavel Fabian, Ph.D.

MUDr. Rudolf Nenutil, Ph.D.

MUDr. Milana Šachlová, Ph.D.

MUDr. Radek Lakomý

MUDr. Eva Lžičařová

Mgr. Roman Hrstka, Ph.D.

FN Brno

Neurochirurgická klinika

MUDr. Pavel Fadrus, Ph.D.

prof. MUDr. Martin Smrčka, Ph.D.

Ústav patologie

MUDr. Leoš Křen, Ph.D.

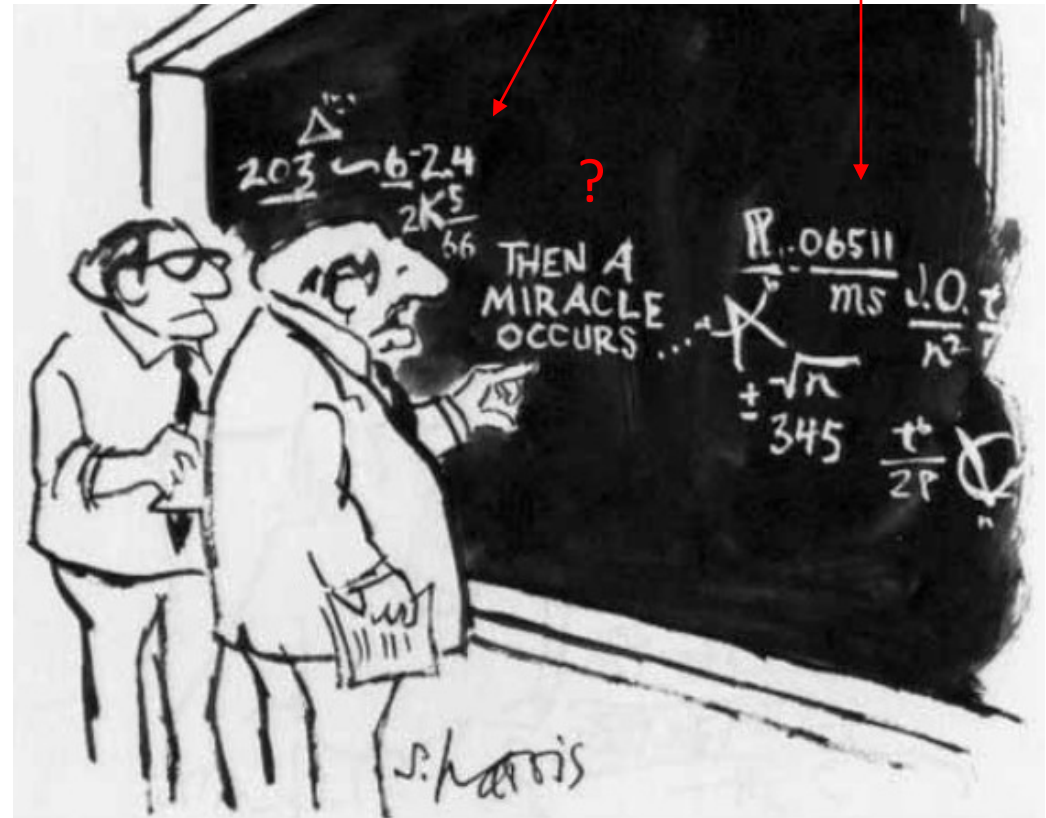
Univerzitní centrum

buněčné imunoterapie

prof. MUDr. Jaroslav Michálek, Ph.D.

deregulace hladin miRNA

klinická pozorování



"I think you should be more explicit here in step two."



Take home

Analýza čipových dat – pozadí, normalizace

Analýza čipových dat - identifikace biologicky významných genů

Analýza čipových dat -ukázky multidemenzionálních metod analýzy čipových dat - *Shlukovací analýzy*

Analýza čipových dat – klasifikační metody

Molekulární klasifikace nádorových onemocnění – ukázky

Aplikace čipových technologií do klinické praxe – studie MINDACT, Agendia, Roche AmpliChip CYP450

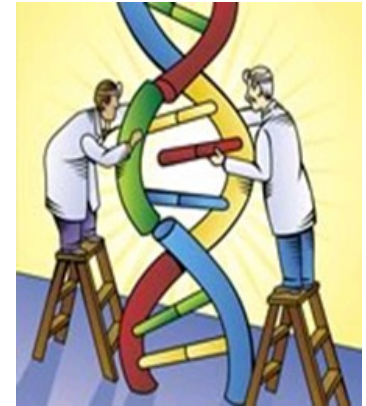
mikroRNA: nová úroveň regulace genové exprese – biogeneze a biologická funkce

mikroRNA v patogeneze nádorových onemocnění

mikroRNA jako biomarkery (SNP, tkáňové, sérové)

mikroRNA jako terapeutické cíle

mikroRNA čipy



Náplň příští přednášky

Moderní metodické přístupy v molekulární medicíně II – proteomika (dvojrozměrná elektroforéza, hmotnostní spektrometrie, proteinové čipy), využití proteomiky v diagnostice nádorových onemocnění

Molekulární epidemiologie – definice a vymezení oboru, identifikace molekulárních rizikových faktorů vzniku a rozvoje onemocnění, analýza vztahu molekulárních faktorů a vlivů prostředí na rozvoj nádorového onemocnění, význam molekulární epidemiologie u karcinomu plic a kolorektálního karcinomu

Dotazy?

