

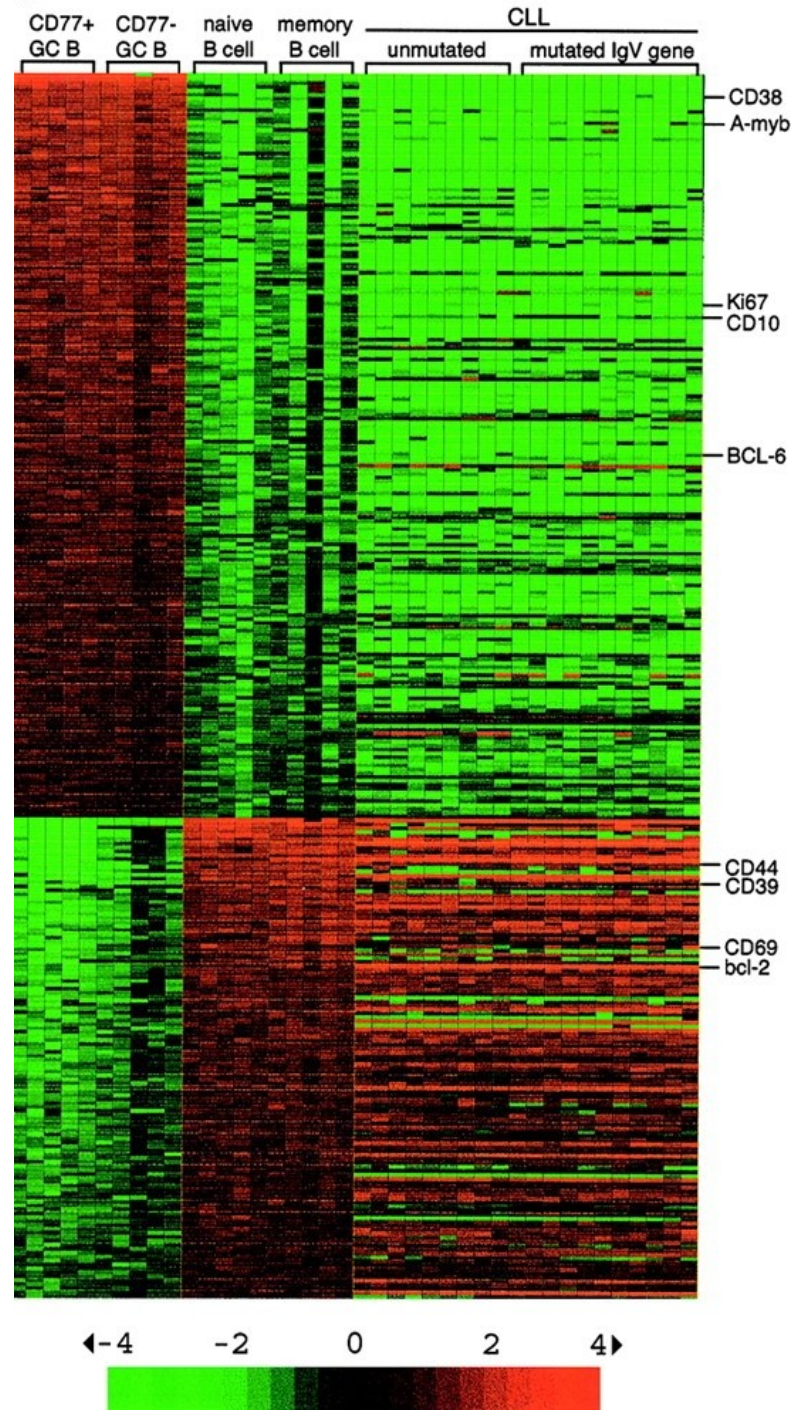
Výzkumné strategie pro využití čipových technologií

Dr. Martin Trbušek

Fakultní nemocnice Brno

Základní typy „microarrays“

- **Expresní čipy (mRNA, microRNA) GEP**
- **Genomické čipy (aCGH, SNP-čipy)**
- **Resekvenační čipy**

A

Přinést zásadní nový poznatek pomocí „čipů“ není jen tak

Na co vždy pamatovat:

- *Microarrays* jsou technicky velmi náročné
- Časově velmi náročné a pěkně drahé
- Vyžadují doprovodné metodiky pro ověření výsledků – např. u expresních čipů real-time PCR, Western blot atd.

(čipem nic nekončí!)

- Musí stavět na silném intelektuálním zázemí výzkumné skupiny

(velký problém – málokdy splněno!)

A dále....

- **Měly by stavět na originálním uspořádání experimentu**
také málokdy splněno, zkoumá se vyzkoumané;
naš největší kamarád je PubMed! (www.pubmed.com)
- **Vyžadují vědeckou upřímnost**
nepřikrášlovat si výsledky, „ani když už jsem do toho tolik investoval...“, např. vynechání *nepohodlných* vzorků.
Fujtajksl.

Moderní technologie velmi rychle stárnou.....

- **Microarrays – vrchol zhruba 2000-2005**

Mezitím vývoj různých platforem....Agilent vs. Affymetrix; aCGH vs. SNP čipy

- **A pak přišlo sekvenování nové generace (NGS)**

A můžeme začínat znovu.....

Čipy se nejčastěji používají v onkologii

Základní společné rysy nádorových buňky

Deregulace buněčného cyklu (**narušení kontrolního bodu G1/S**)

Únik před apoptózou (programovanou buněčnou smrtí)

Udržování „životaschopné“ délky telomér

Zajištění „kvalitní“ opravy DNA (**zejména v G2 / M-fázi buněčného cyklu**)

Invazivita v primární tkáni

Angiogeneze

Metastázování

Selekce nových rezistentních klonů léčbou

Nádorová buňka a buněčný cyklus

G1 → S → G2 → M

Kontrolní body

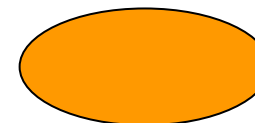
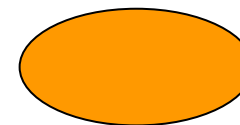
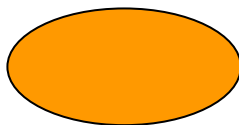
G1/S

S

G2/M

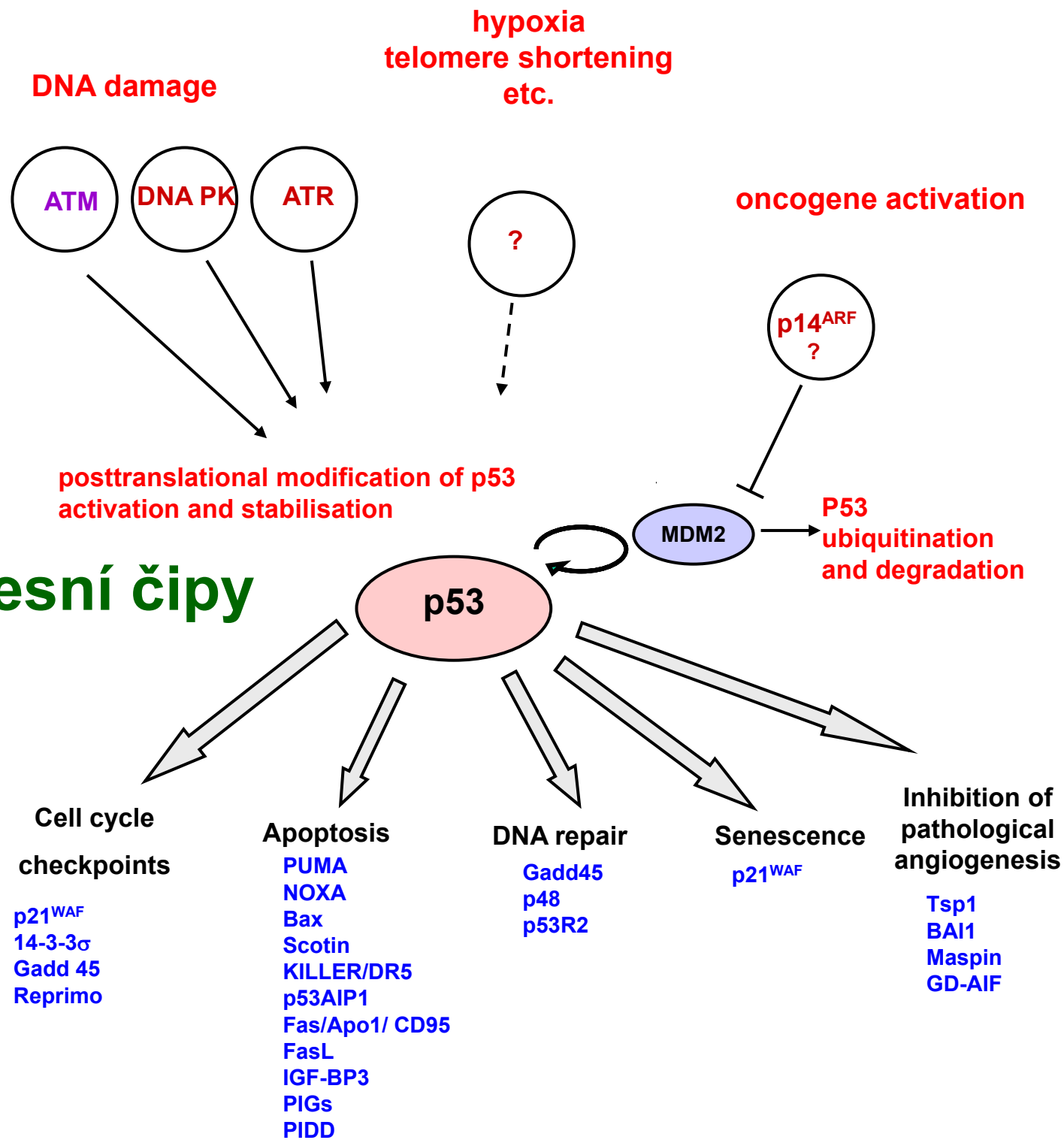
Univerzální
inaktivace
v nádorových buňkách

Mutace p53, Rb,
Atm,
p16 a jiné



Modelová situace I

p53 a expresní čipy

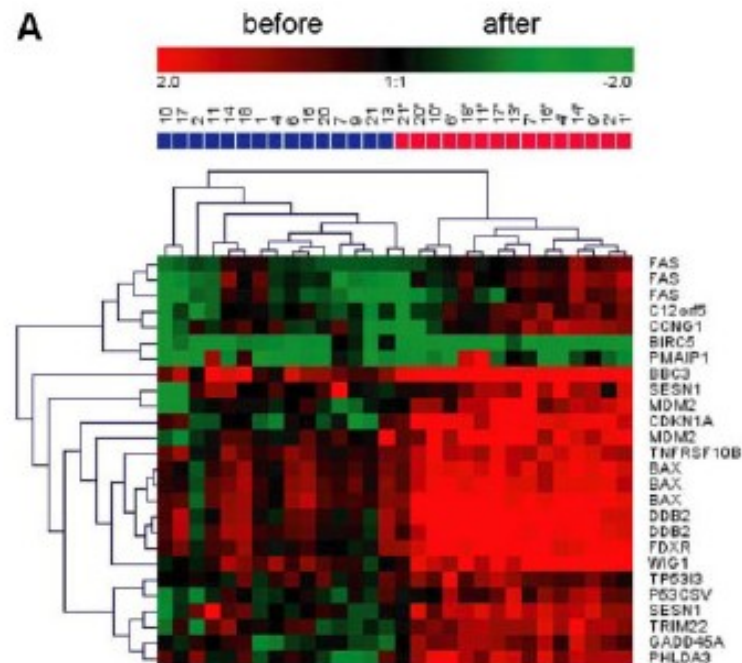


Nádory reagují dobře na „low-dose RT“ (ovšem jen ty s wt-p53)

In vivo p53 response and immune reaction underlie highly effective low-dose radiotherapy in follicular lymphoma

Laurent Knoops,^{1,2} Rick Haas,³ Sanne de Kemp,⁴ Donné Majoor,¹ Annegien Broeks,⁴ Eric Eldering,⁵ Jan Paul de Boer,⁶ Marcel Verheij,³ Conny van Ostrom,⁶ Annemieke de Vries,⁶ Laura van't Veer,^{1,4} and Daphne de Jong¹

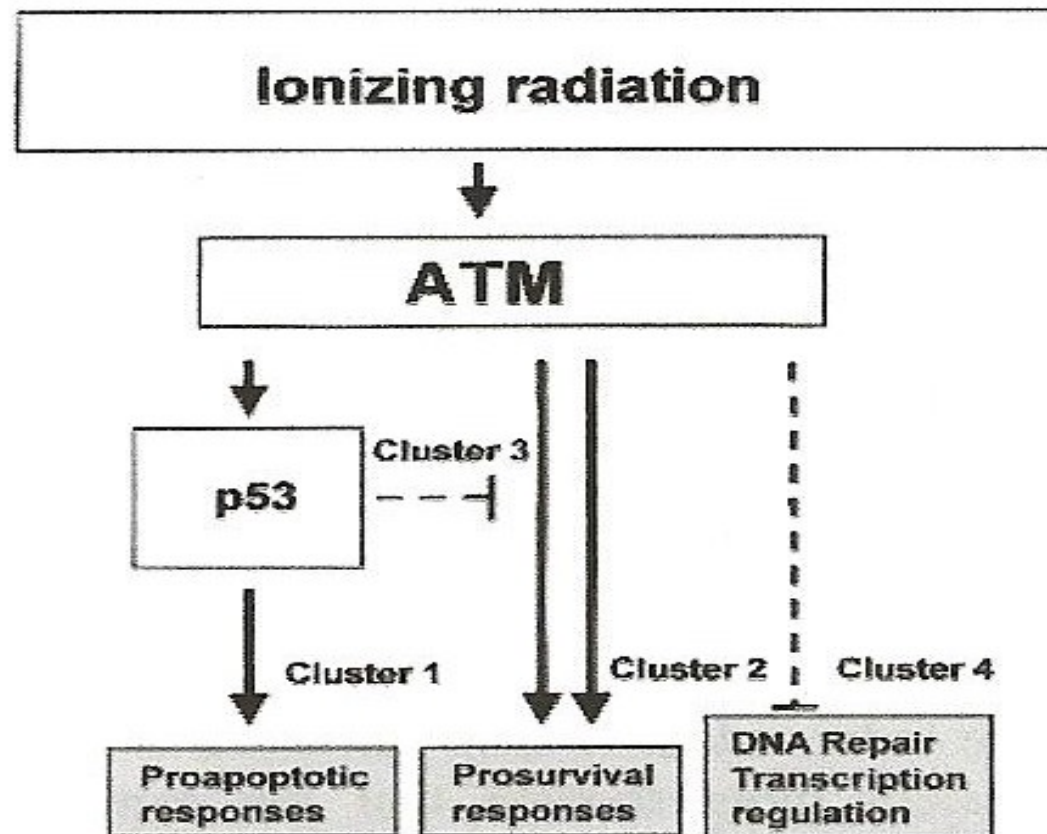
¹Department of Pathology, The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, the Netherlands; ²Experimental Medicine and Hematology Units, Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgium; Departments of ³Radiotherapy, ⁴Experimental Therapy and Diagnostic Oncology, and ⁶Hematology, The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, the Netherlands; ⁵Department of Experimental Immunology, Academic Medical Centre, Amsterdam, the Netherlands; ⁶Laboratory of Toxicology, Pathology and Genetics, National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, the Netherlands



Analýza expresních čipů profituje zejména z dokonalé znalosti funkce studovaných genů

(to umožňuje přejít od genů k procesům)

A pak to stojí za to



IR indukuje > 1 000 genů

Přibližně 1/3 v dráze p53

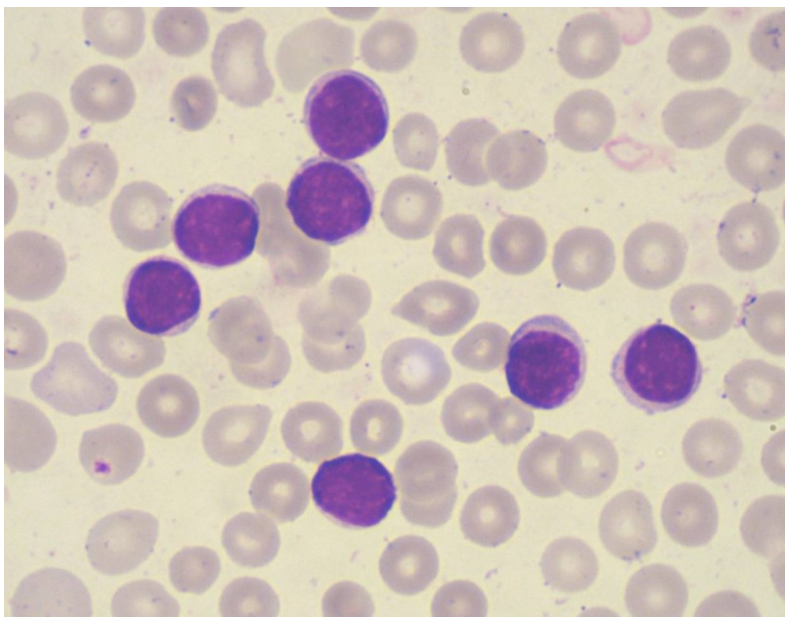
Stankovic et al., Microarray analysis reveals that TP53- and ATM-mutant B-CLLs share a defect in activating proapoptotic responses after DNA damage but are distinguished by major differences in activating prosurvival responses. *Blood* 2004

Procesy jsou fajn, ale kam nás zavedou?

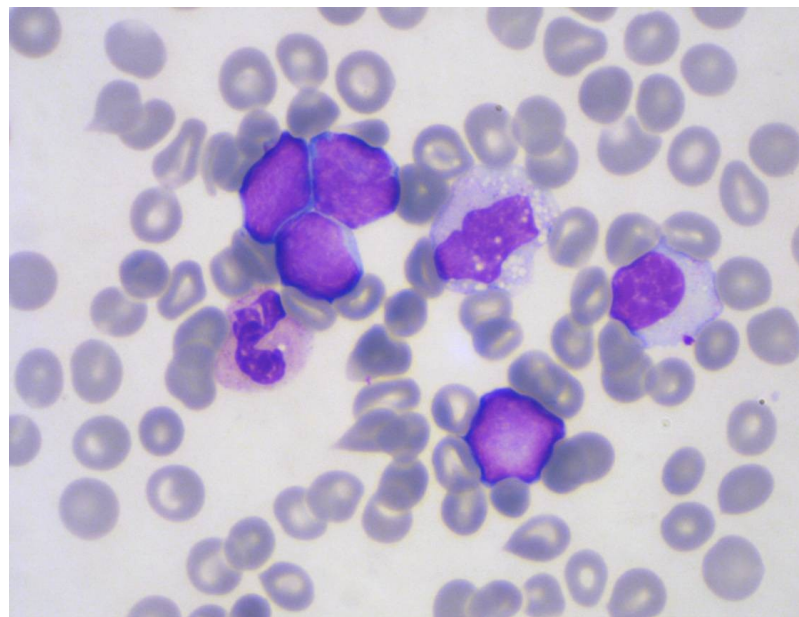
- Výsledkem GEP může opravdu být objevení zajímavých genů, ale co dál?
- Máme na to a chceme vůbec zkoumat jevy vzdálené od našeho hlavního tématu?

Výrazná změna genomu se dá očekávat
pouze při zásadních jevech

CLL

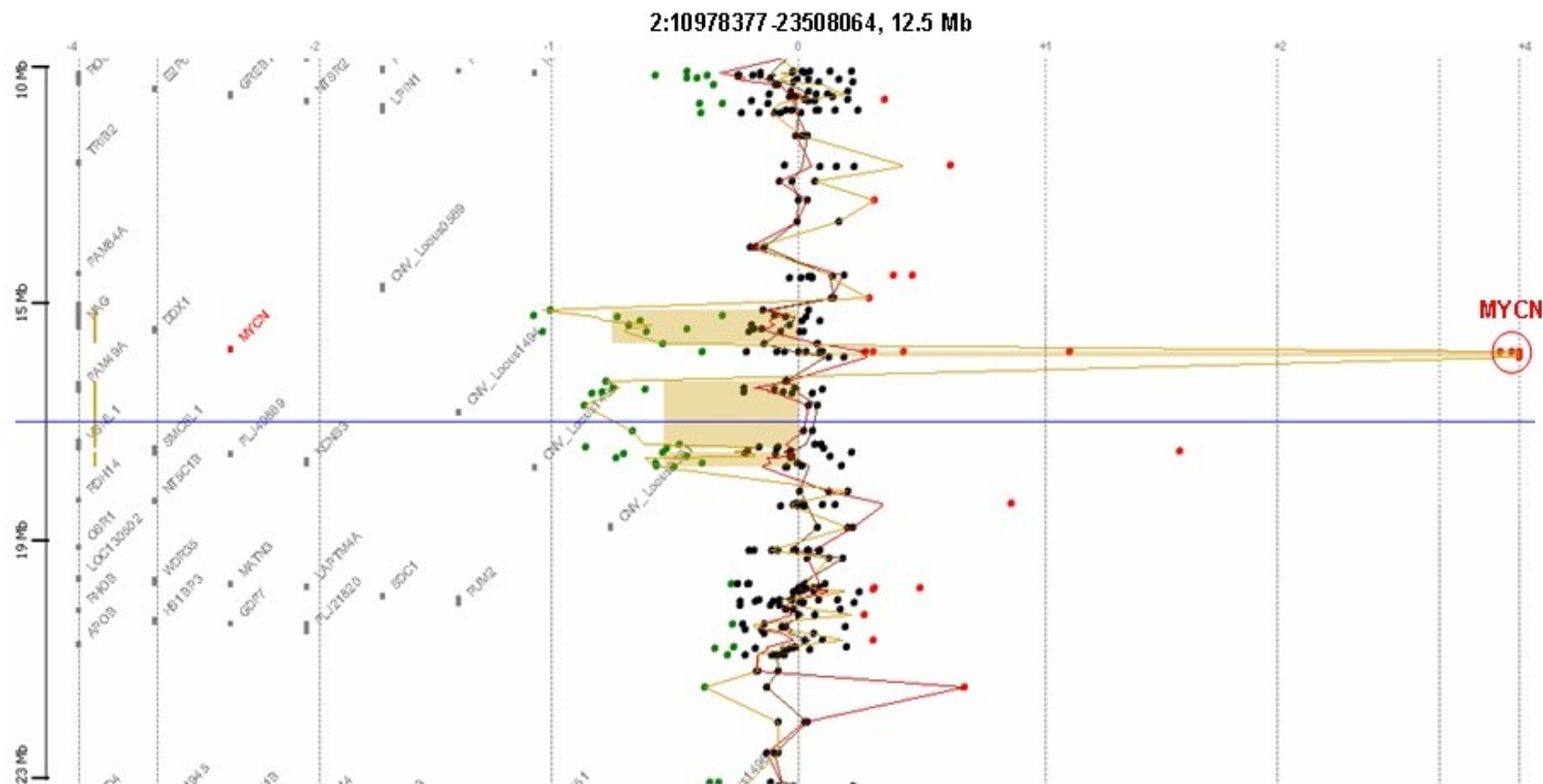


Lymfoblastický relaps

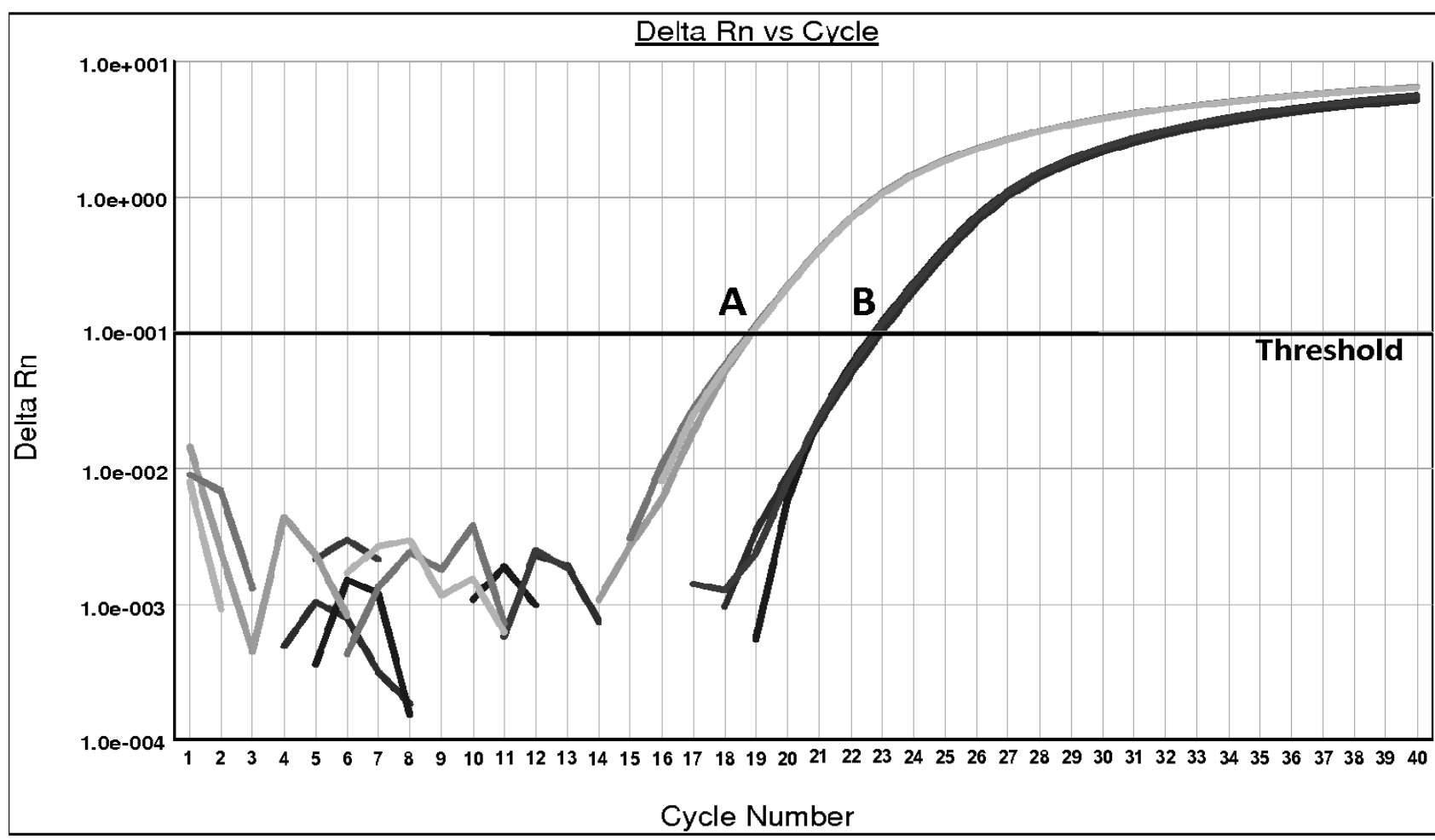


Prominentní amplifikace onkogenu *MYC-N* v buňkách z relapsu

Array CGH



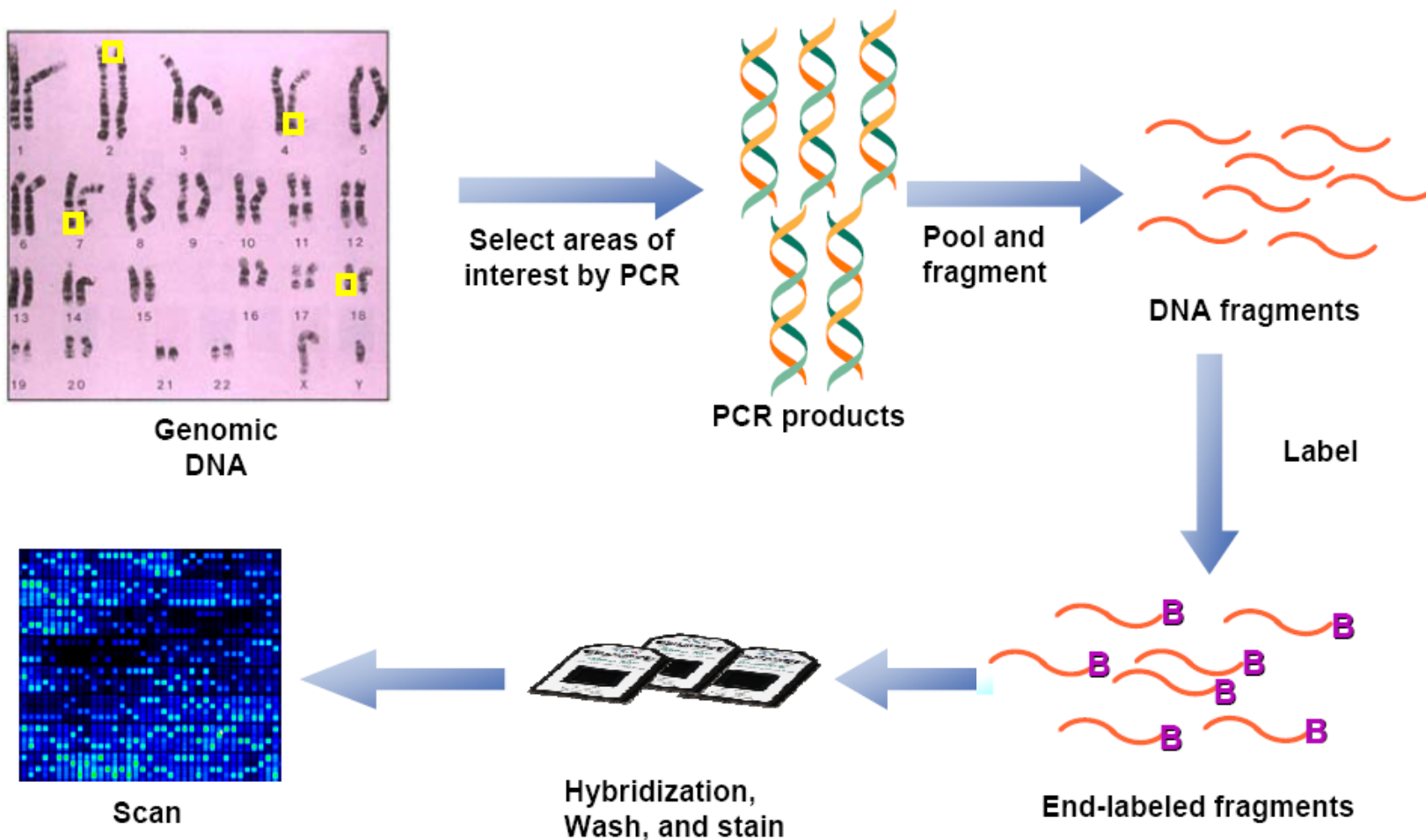
Potvrzená pomocí *real-time* PCR.....



Resekvenace na čipech



genomic DNA → long-range PCR → quantification (PicoGreen) → pooling
→ purification → fragmentation (20-200 bp) → labelling → hybridization
(16 h) → staining and washing → scan → data analysis



Resekvenace - výstup

The screenshot displays the GeneChip DNA Analysis Software interface for resequencing analysis. The main window shows a list of data files on the left and a sequence alignment table in the center. The table includes columns for 'Seq Pos' and sequence data for various probes (pows041a_pd01 to pd09). A reference sequence is provided at the top of the alignment table.

Key annotations in the image:

- No calls:** A red box highlights a region in the genomic map and a corresponding area in the alignment table where no data points are present.
- Homozygous SNP:** A yellow 'y' is highlighted in the sequence data for powrs041a_pd02 at position 1450, indicating a homozygous variant.
- Heterozygous SNP:** Blue 'n' and green 'c' are highlighted in the sequence data for powrs041a_pd05 and powrs041a_pd09 at position 1450, indicating a heterozygous variant.

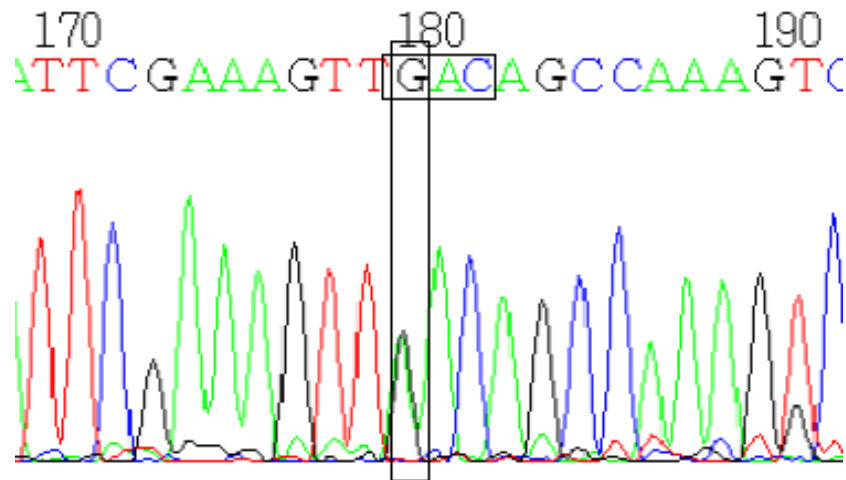
Seq Pos	Reference	1425	1430	1440	1450	1460	1470	1480	
pows041a_pd01	ctgttttgtggcattttctttggttagagaaccaatcaagtgattttatatagttgataa	ctg	ttt	gtg	gc	att	ttt	ctt	ggt
pows041a_pd02	ctgttttgtggcattttctttggttagagaaccaatcaagtgattttatatagttgataa	ctg	ttt	gtg	gc	att	ttt	ctt	ggt
pows041a_pd03	ctgttttgtggcattttctttggttagagaaccaatcaagtgattttatatagttgataa	ctg	ttt	gtg	gc	att	ttt	ctt	ggt
pows041a_pd04	ctgttttgtggcattttctttggttagagaaccaatcaagtgattttatatagttgataa	ctg	ttt	gtg	gc	att	ttt	ctt	ggt
pows041a_pd05	ctgttttgtggcattttctttggttagagaaccaatcaagtgattttatatagttgataa	ctg	ttt	gtg	gc	att	ttt	ctt	ggt
pows041a_pd06	ctgttttgtggcattttctttggttagagaaccaatcaagtgattttatatagttgataa	ctg	ttt	gtg	gc	att	ttt	ctt	ggt
pows041a_pd07	ctgttttgtggcattttctttggttagagaaccaatcaagtgattttatatagttgataa	ctg	ttt	gtg	gc	att	ttt	ctt	ggt
pows041a_pd08	ctgttttgtggcattttctttggttagagaaccaatcaagtgattttatatagttgataa	ctg	ttt	gtg	gc	att	ttt	ctt	ggt
pows041a_pd09	ctgttttgtggcattttctttggttagagaaccaatcaagtgattttatatagttgataa	ctg	ttt	gtg	gc	att	ttt	ctt	ggt

Doprovodná data: jsou esenciální

exon 9 - 735 C>Y (245 Val>Val)

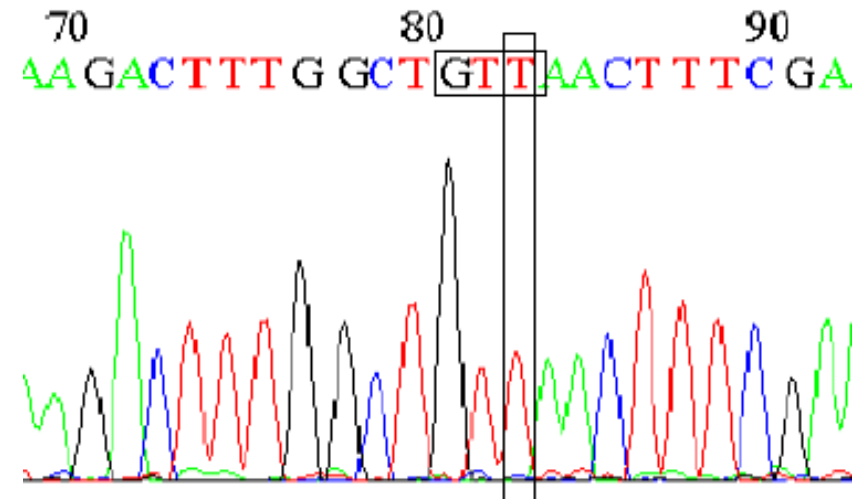
association with **skipping of exon 9** (Gronbeg *et al.*, 2002)

Sample 1 (reverse)



heterozygous mutation, both alleles of ATM gene are preserved

Sample 2 (forward)

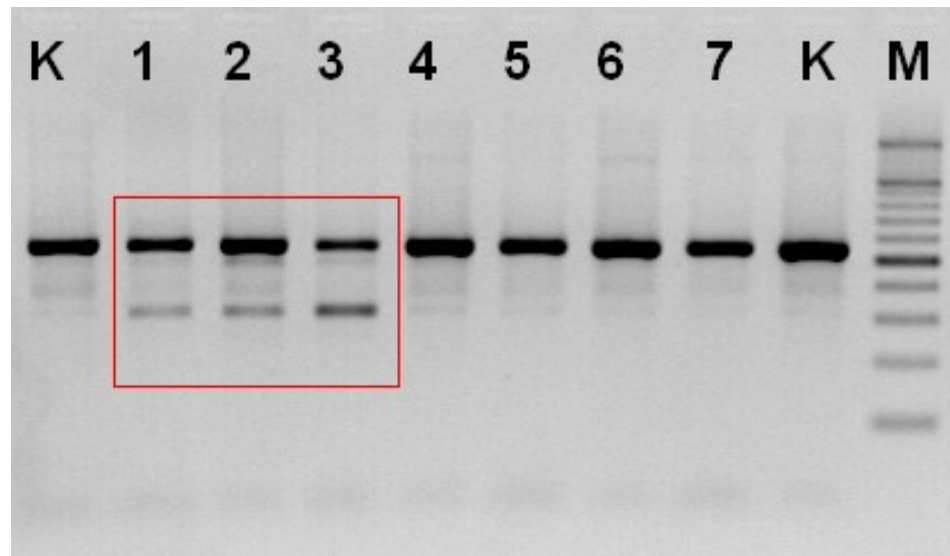


homozygous mutation, one allele of ATM gene is deleted (98% of cells)

...pro správnou interpretaci...

RT- PCR → PCR with cDNA primers →
electrophoresis:

samples 1-3 with mutation, samples 4-7 without
mutation

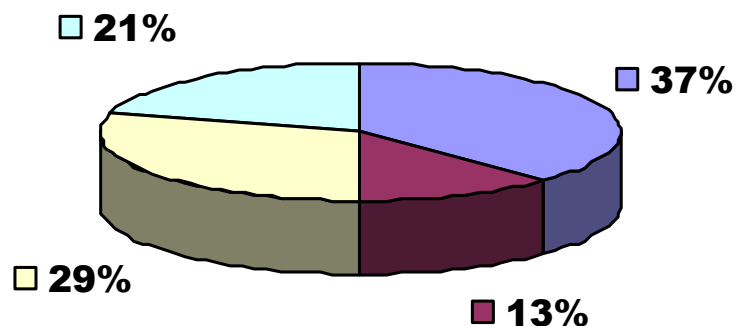


excision of bands → direct sequencing: **the skipping of exon 9 is confirmed!!**

A po čipech: žádná nuda v Brně

110 CLL pacientů; sekvenace genu ATM; 62 exonů, 3056 aa, 9168 nt

Graf č. 1: Nalezené aberace genu ATM pomocí resekvenačních čipů



- Známé mutace v genu ATM**
- Polymorfismy asociované s predispozicí k rakovině**
- Běžné polymorfismy**
- Neznámé aberace**

Cesta k úspěchu s microarrays - 1. část

- 1) K těmto metodikám přistoupit až po několika letech práce v laboratoři (min. 2-3 roky); to se týká zejména GEP
- 2) Být si jistý, že opravdu chci dělat *microarrays*
- 3) Důkladně projít PubMed pro studované téma a anticipovat nejbližší možné výsledky!!!
- 4) Nenápadně zjistit, zda je náš vedoucí „v obraze“ – jeho pomoc budeme potřebovat!
- 5) Mít k dispozici doprovodné metodiky, které určitě budeme potřebovat (real-time PCR, Western blot)
- 6) Mít k dispozici funkční tým, kde každý něco opravdu UMÍ

Cesta k úspěchu s microarrays – 2. část

7) Mít velmi dobře charakterizované vzorky

(mutace není delece apod.)

8) Před započítím experimentování se spojit s velmi dobrým statistikem (konzultovat mj. velikost souboru)

9) Neukvapovat se po prvních *pozitivních* výsledcích

10) Pokud se dostaneme až k psaní manuskriptu, dát jej přečíst co nejvíce (relevantním) lidem

11) Připomínky *reviewers* brát vážně

Takže děkuji za pozornost

....a uvidíme se (asi) v prosinci