

# C7188 Úvod do molekulární medicíny 3/12



**Moderní metodické přístupy  
v molekulární medicíně I**



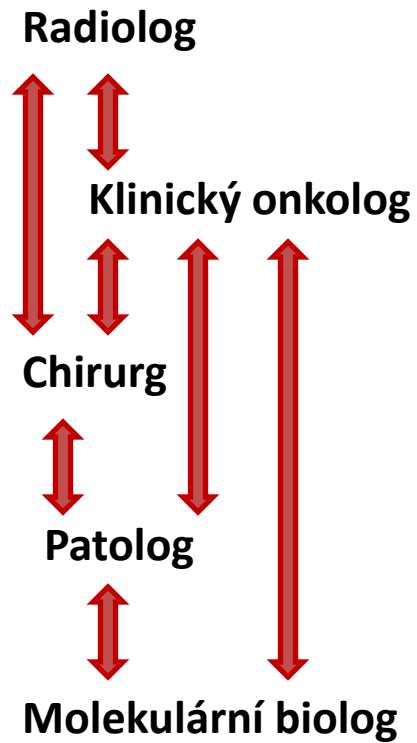
**BIOLOGICKÝ MATERIÁL, GENOMIKA I**



**Ondřej Slabý, Ph.D.**  
*Masarykův onkologický ústav  
Lékařská fakulta Masarykovy univerzity  
CEITEC*

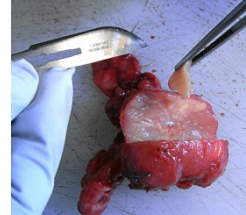


## Interdisciplinární charakter biomedicínského výzkumu – příklad onkologického výzkumu



## Biologický materiál užívaný pro účely molekulární medicíny

**Tkáň** (nativní vs. fixovaná – př. FFPE-formalin fixed paraffin-embedded tissue; chirurgický resekát, biopsie)



**Plná krev** (plazma + buňky)

**Plazma** (tekutina po odstranění krevních elementů, obsahuje faktory hemokoagulace)

**Sérum** (tekutina nad sraženinou, bez faktorů krevního srážení)

**Moč**

Kostní dřeň, bronchiální aspirát, ejakulát, bronchoalveolární laváž, kloubní tekutiny, mozkomíšní mok, sputum, stolice, výtěry...



### Banky biologického materiálu

archivace vzorků v parách kapalného dusíku při teplotě  $-160^{\circ}\text{C}$

**K archivovanému vzorku nativní tkáň**

uložen fixovaný parablok=morfologický korelát



## Odběr klinického materiálu

**Klíčový moment rozhodující a kvalitě celého výzkumu!!!!!!**

Všechny odběry musí probíhat stejně, a celý proces musí být přísně kontrolován!



Doba transportu na patologii

Fixace vzorku



Kontrolovaná  
archivace vzorku

DNA 4°C

RNA -70°C

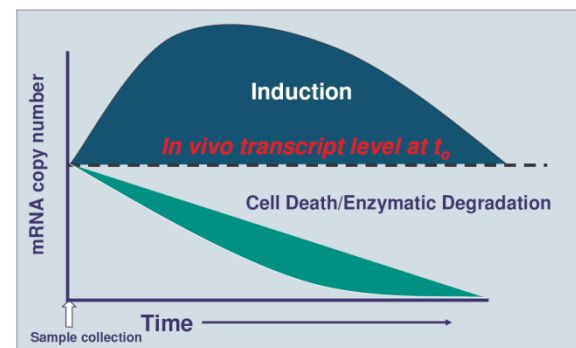


Zaznamenání času podvázání cév

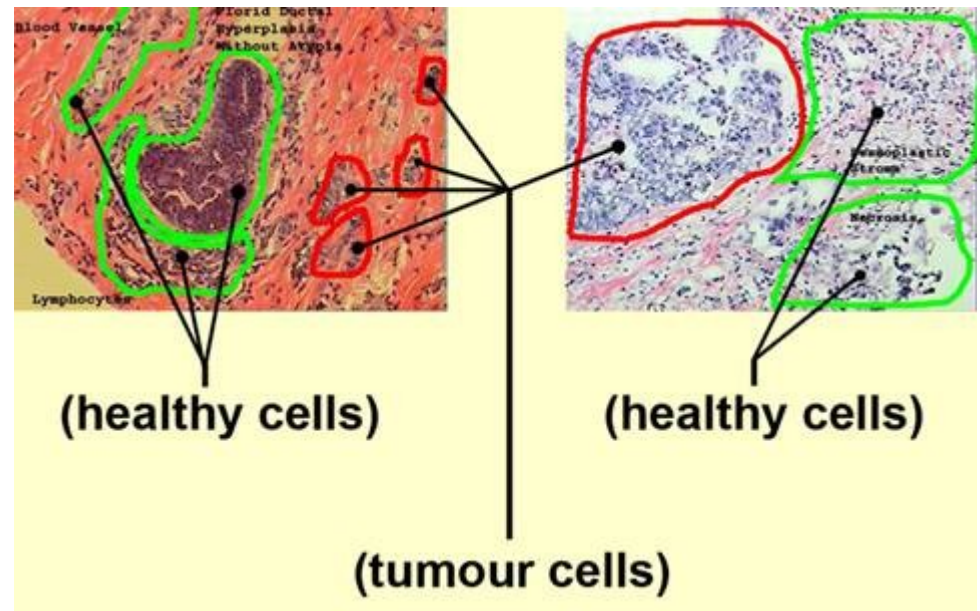
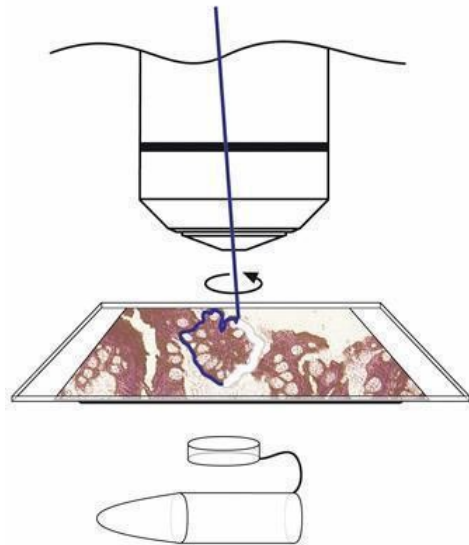
Tzv. ischemické zdržení

Vysoké nároky na stabilizaci především při práci s RNA

Nejčastěji používáme stabilizační činidlo RNAlater



## Laserová mikrodisekce – nástroj k získání vybraných buněčných populací *laser capture microdissection (LCM)*



## Izolace nukleových kyselin

**Homogenizace tkáně** (ultrazvuk, mechanicka, rotor-stator)

**Lyze buněk** (enzymaticky-proteináza K, chemicky-SDS, EDTA, fyzikálně-zahřívání...)

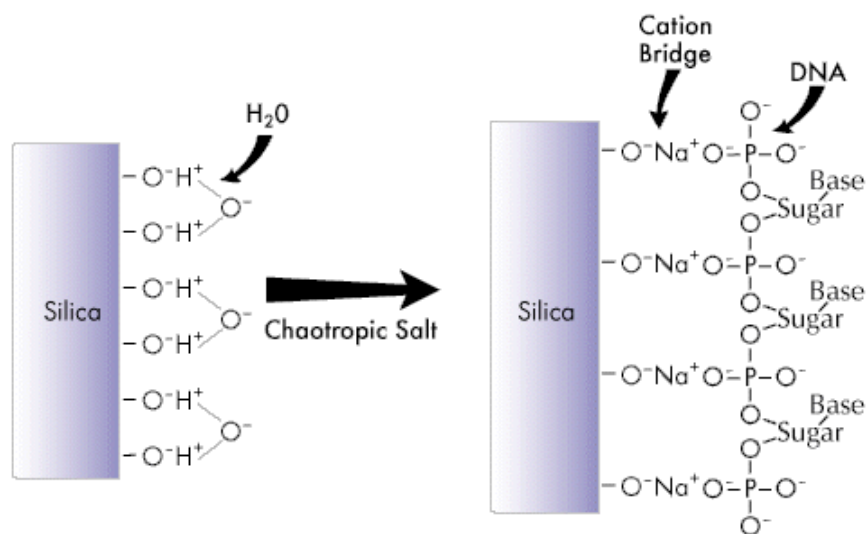
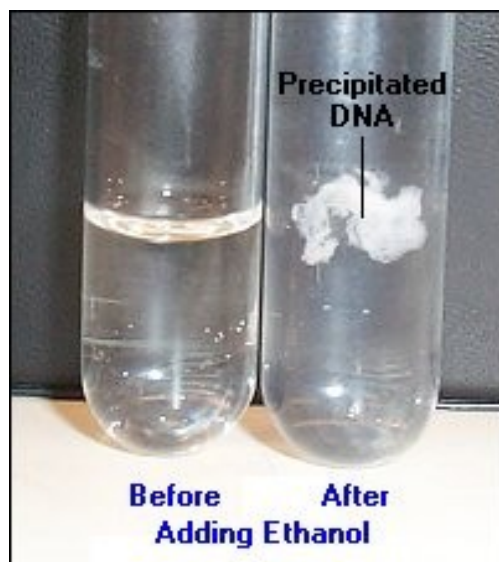
**RNA méně stabilní než DNA!** (homogenizace beta-ME, DTT)

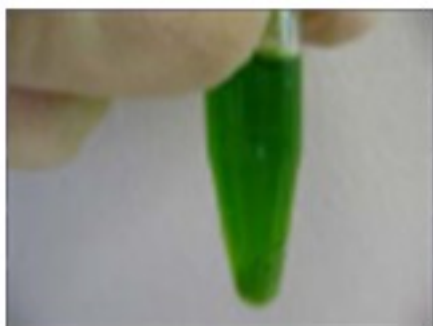
**Extrakce směsí fenol-chloroform**

**Srážení nukleových kyselin alkoholem**

**Přečištění enzymy**

**Purifikace nukleových kyselin chromatografií** (adsorpce na silikát)





Krok 1: příprava lyzátu

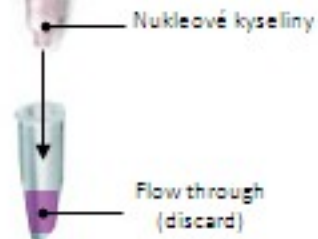
Umístit na kolonku

Krok 2: navázání na silikát

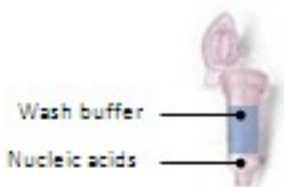


Centrifugace

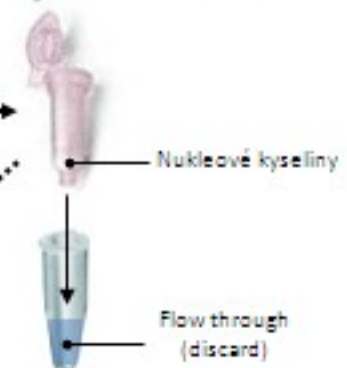
NK se naváží zatímco kontaminanty protečou



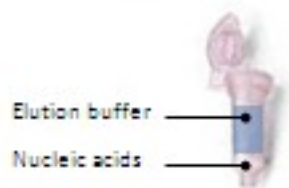
Krok 3: Promývání



Centrifugace



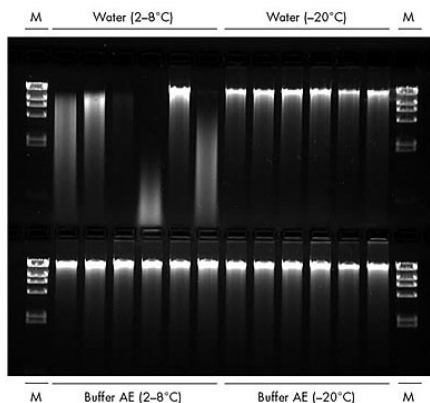
Step 4: Eluce nukleové kyseliny



Centrifugace



Eluční pufr vytváří podmínky znemožňující vazbu NK na silikát





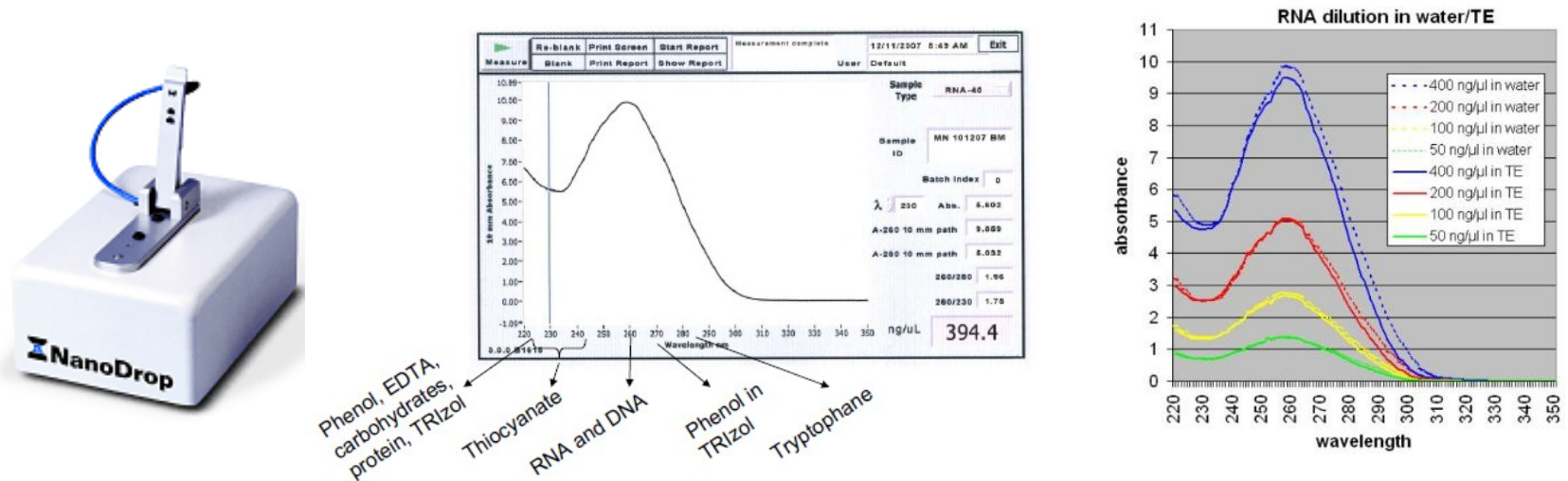


## Spektrofotometrická kvantifikace a čistota nukleových kyselin

Roztok dvouřetězcové DNA má při 260nm absorpenci 1 při koncentraci 50ug/ul

Roztok jednořetězcové DNA má při 260nm absorpenci 1 při koncentraci 30ug/ul

Roztok jednořetězcové RNA má při 260nm absorpenci 1 při koncentraci 40ug/ul



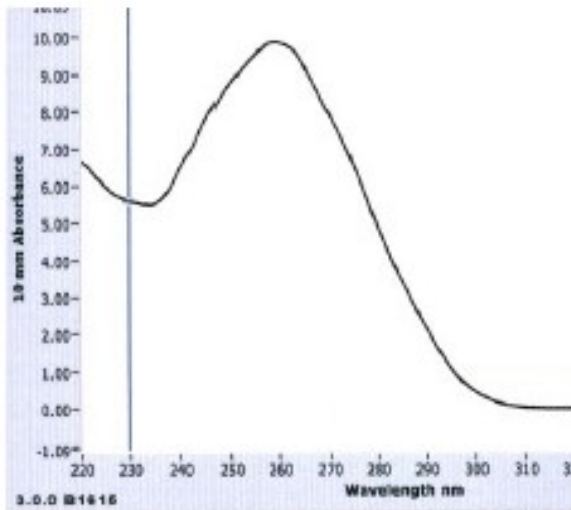
Proteiny mají díky aromatickým aminokyselinám absorpční maximum při 280 nm

Poměr A260/A280 se má u nekontaminované DNA pohybovat v rozmezí 1,8 až 2,0

Poměr A260/A230 < 1,7 indikuje kontaminaci chaotropními solemi a fenolem

Nanodrop ND1000 – umožňuje kvantifikaci pouze v 1ul vzorku

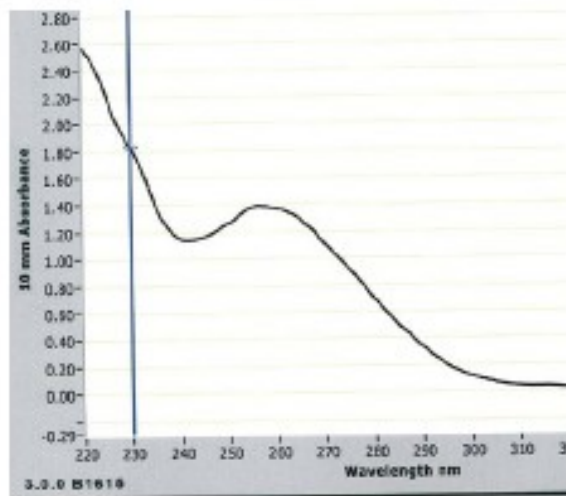
## Křivky z Nanodropu



260/280: 1,96

260/230: 1,75

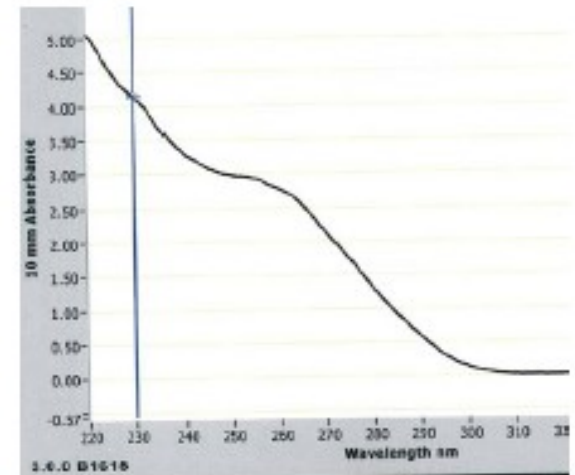
Conc: 394,4



260/280: 1,91

260/230: 0,75

Conc: 54,9



260/280: 2,09

260/230: 0,67

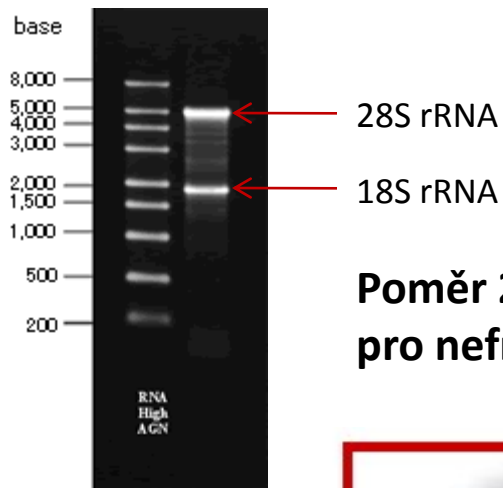
Conc: 111,4

## Integrita nukleových kyselin

### Agilent Bioanalyzer 2100

Lab on a chip (LOC) technology

Je miniaturizované zařízení implentující kapilární gelovou elektroforézu pro účely analýzy NK



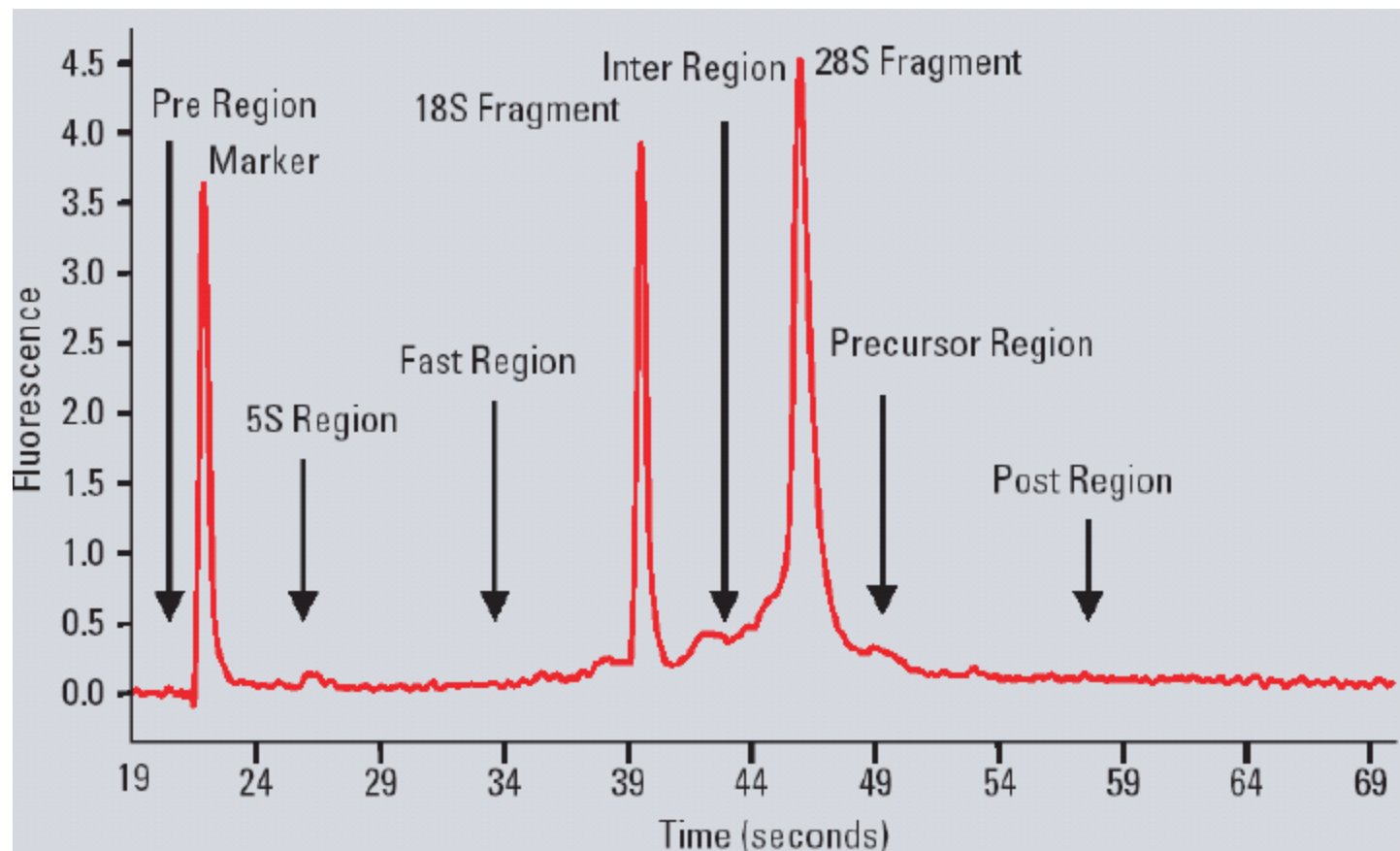
**Poměr 28S/18S ~ 2,0  
pro nefragmentovanou RNA**



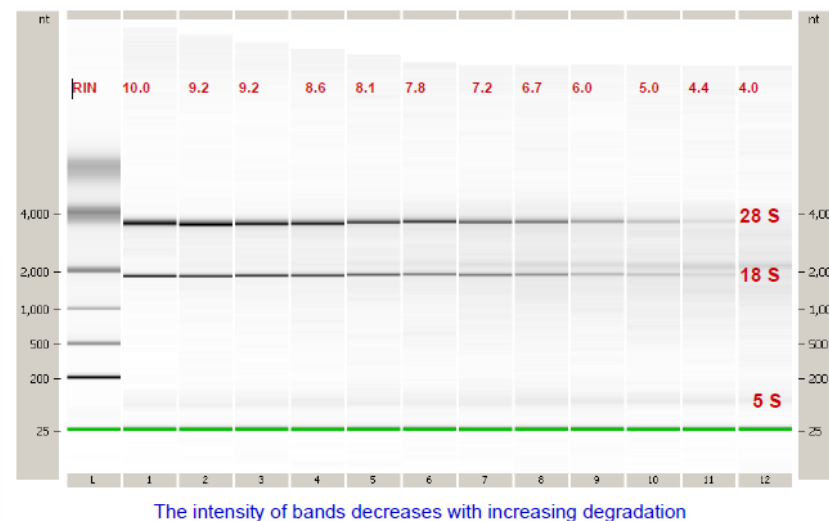
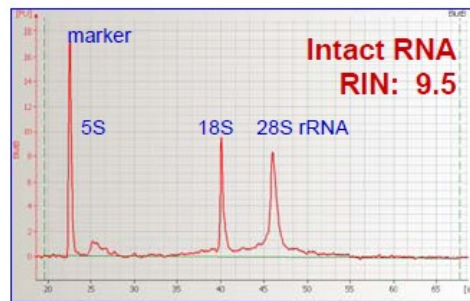
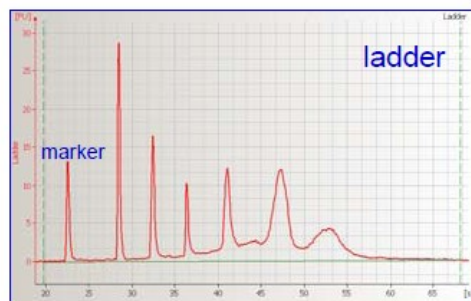
80% rRNA  
10-20% tRNA  
1-5% mRNA



## Integrita nukleových kyselin



## Integrita nukleových kyselin

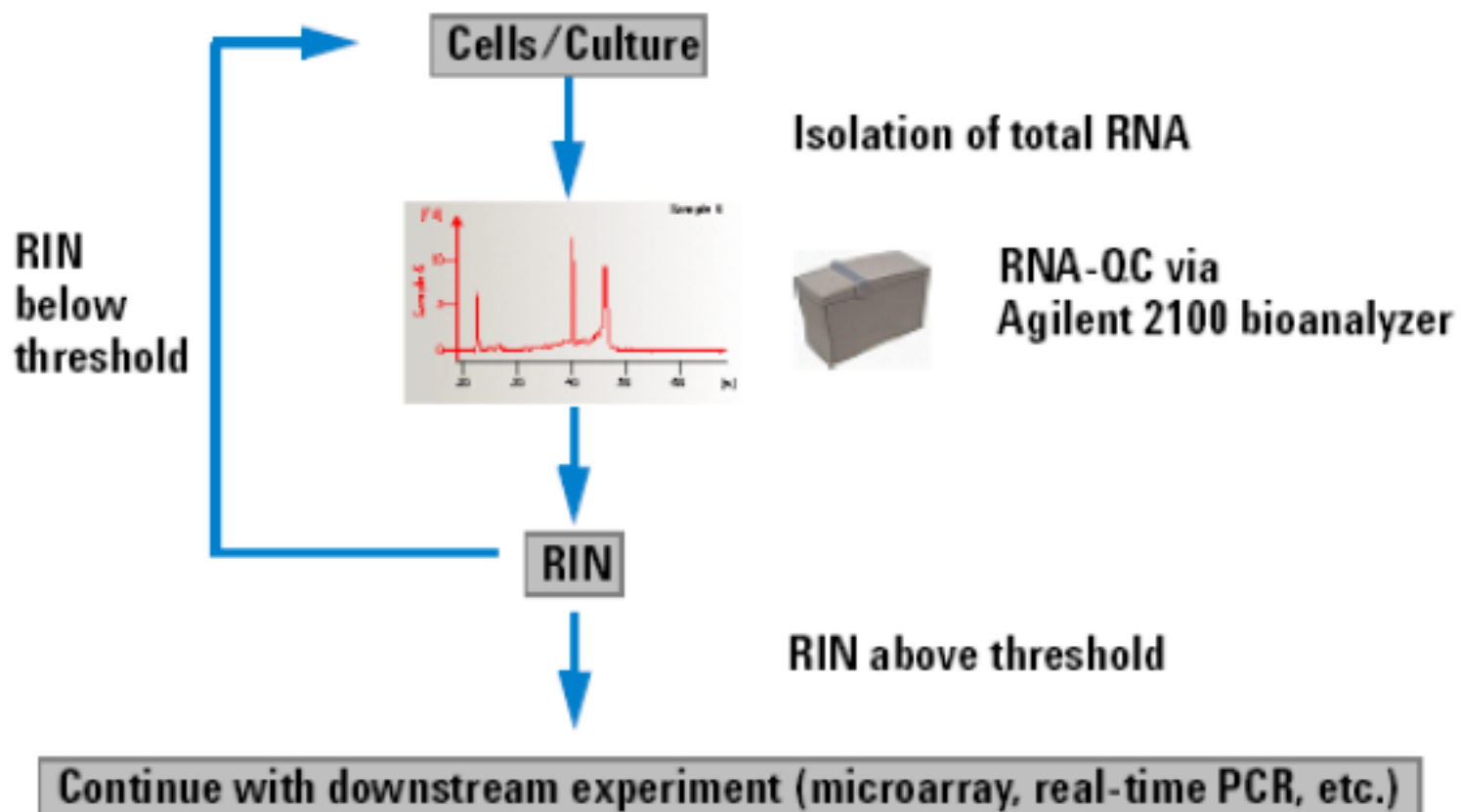


***RIN = RNA Integrity Number (0 – 10)***

The RIN value: Schroeder *et al*, 2006

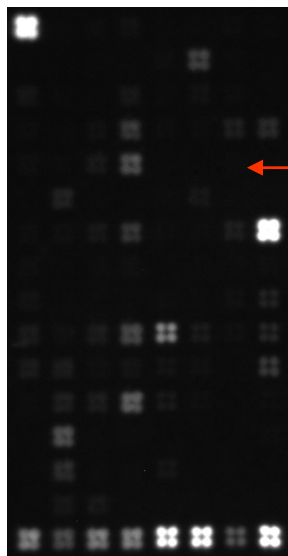
## Integrita nukleových kyselin

Run standard experiment and use RIN to determine if sample integrity is sufficient:

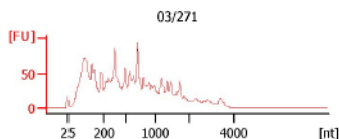
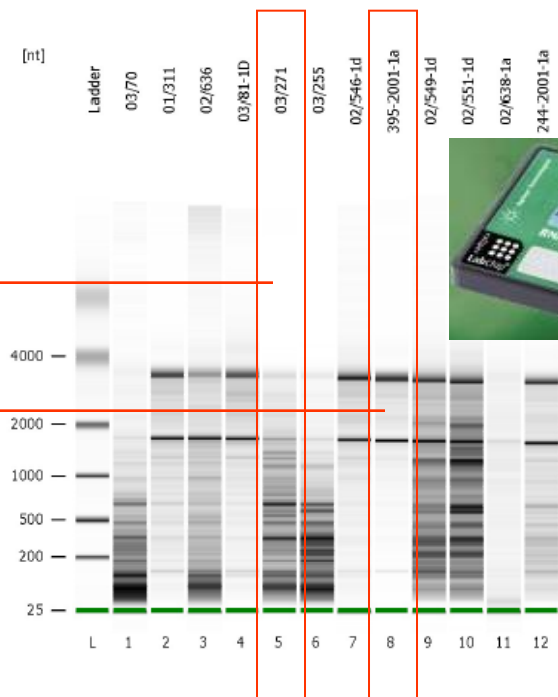
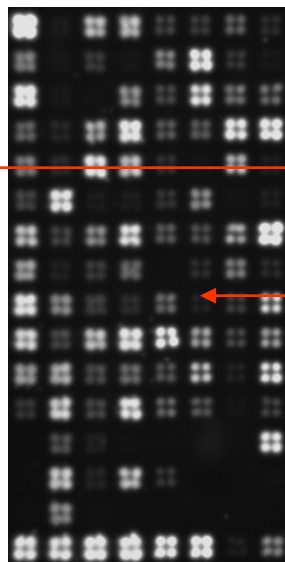


## Izolace RNA a vliv její integrity na analýzu expresních profilů

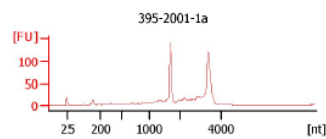
Vzorek č. 03/271  
RIN = 2,8



Vzorek č. 395-2001-1a  
RIN = 8,4



$c = 0,4412 \text{ ug/ul}$   
 $A260/A280 = 1,93$   
 $A260/A230 = 1,79$

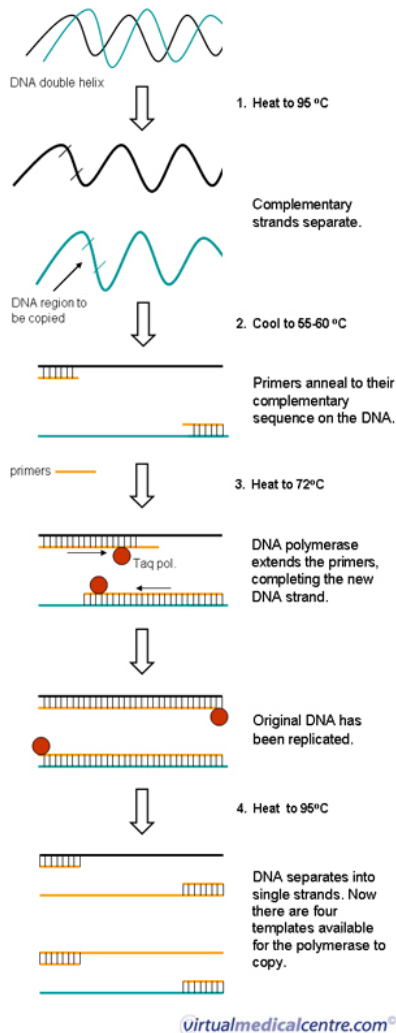


$c = 0,2412 \text{ ug/ul}$   
 $A260/A280 = 2,03$   
 $A260/A230 = 1,82$

**Jako minimální RIN vzorku  
byla stanovena hodnota 7.**

*RIN = RNA Integrity Number (0 – 10)*

## Real-Time PCR – nejpoužívanější a nejstandardnější metoda studia genové exprese

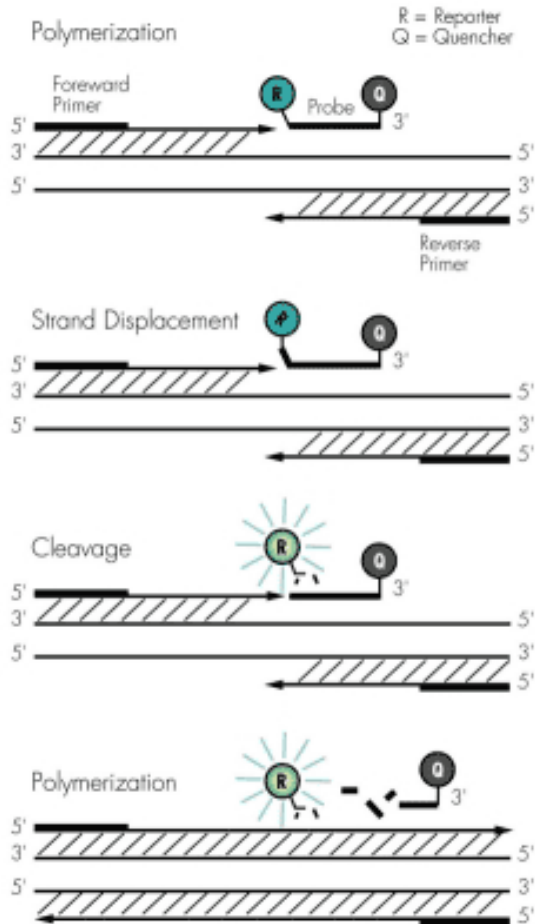


**Real-time PCR** je založena na sledování průběhu polymerázové řetězové reakce (PCR) přímo během reakce (tzv. „*in real time*“) pomocí fluorescenčních sond či barviv, které detekují množství PCR produktu během reakce zvýšením své fluorescenční aktivity. Její výhodou oproti konvenční PCR je možnost přesného stanovení výchozího počtu kopií cílové templátové sekvence DNA, čili schopnost kvantifikace. Real-time PCR se provádí s pomocí přístrojů zvaných **cyclery**, které umožňují jak provádění teplotního cyklování, tak detekci fluorescence v každém cyklu PCR.



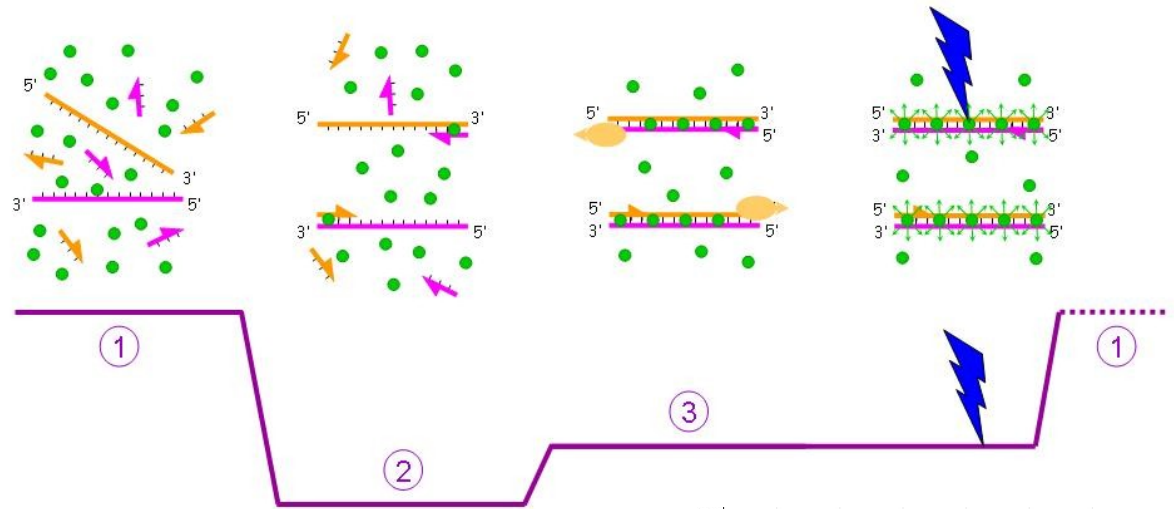


# Real-Time PCR – nejpoužívanější a nejstandardnější metoda studia genové exprese

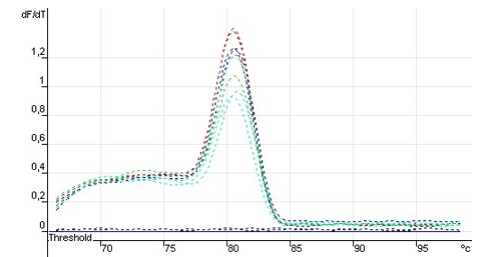


Specifické TaqMan sondy

## Nejčastější způsoby detekce amplifikačního produktu

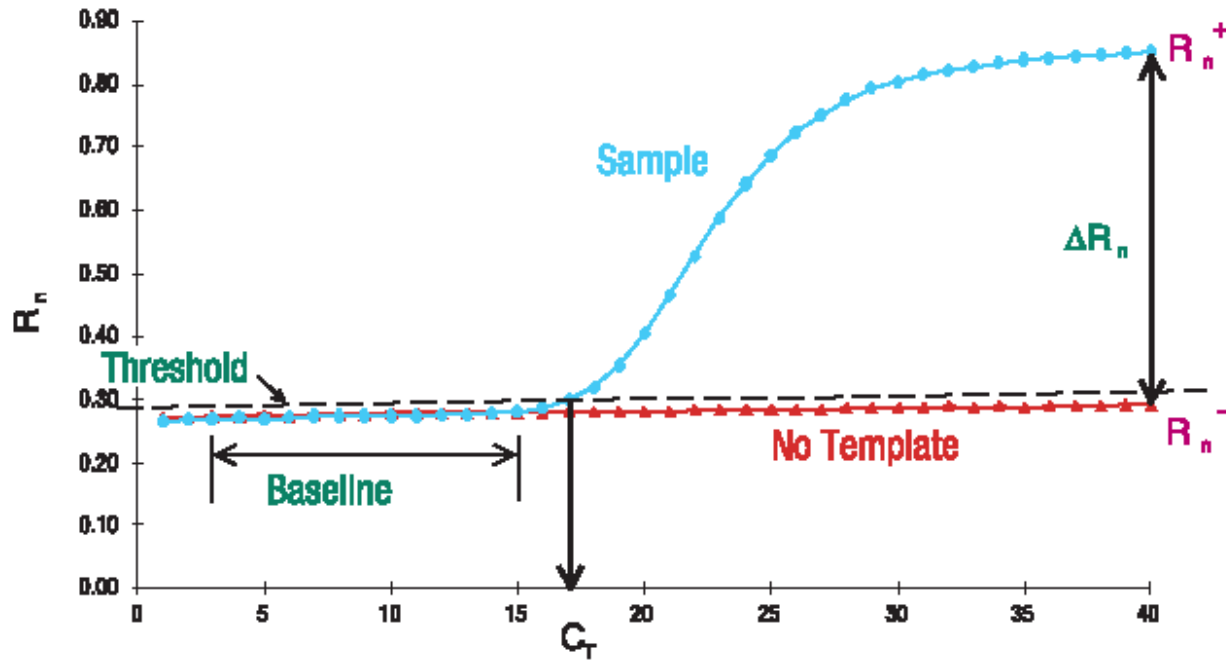


Interkalační barvivo SYBR green



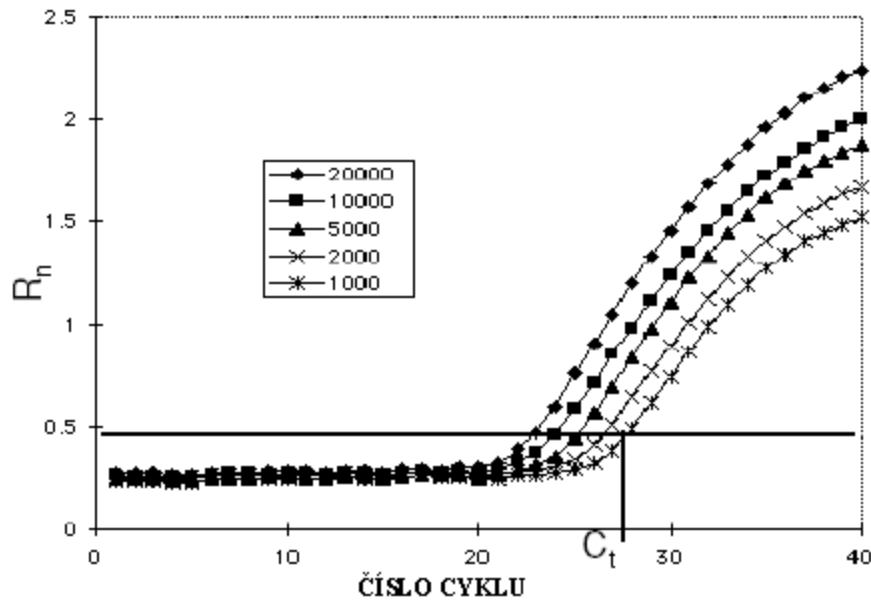
Denaturační křivka kontrola specificity reakce

## Real-Time PCR – nejpoužívanější a nejstandardnější metoda studia genové exprese

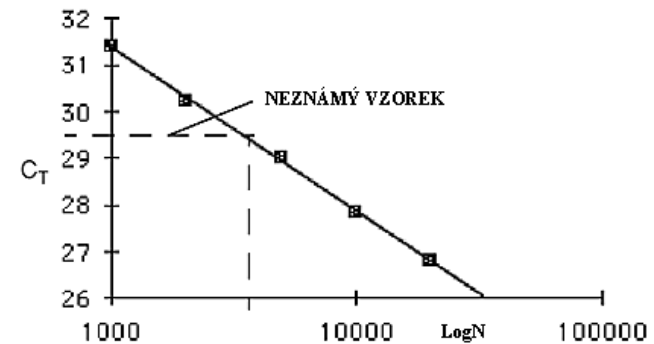


- 1) **Baseline** - fluorescenční signál je pod detekovatelným limitem detektoru
- 2) **fluorescence exponenciálně narůstá** společně s produktem amplifikace. Ovšem společně s pokračující amplifikací se snižuje i poměr polymeráza : PCR produkty.
- 3) **plateau fáze** - koncentrace vytvořených ampliconů dosáhne koncentrace  $10^{-8}$  M, zastaví se exponenciální růst, od koncentrace  $10^{-7}$  M už  $R_n$  dále nenarůstá.

## Real-Time PCR – nejpoužívanější a nejstandardnější metoda studia genové exprese



### Absolutní kvantifikace



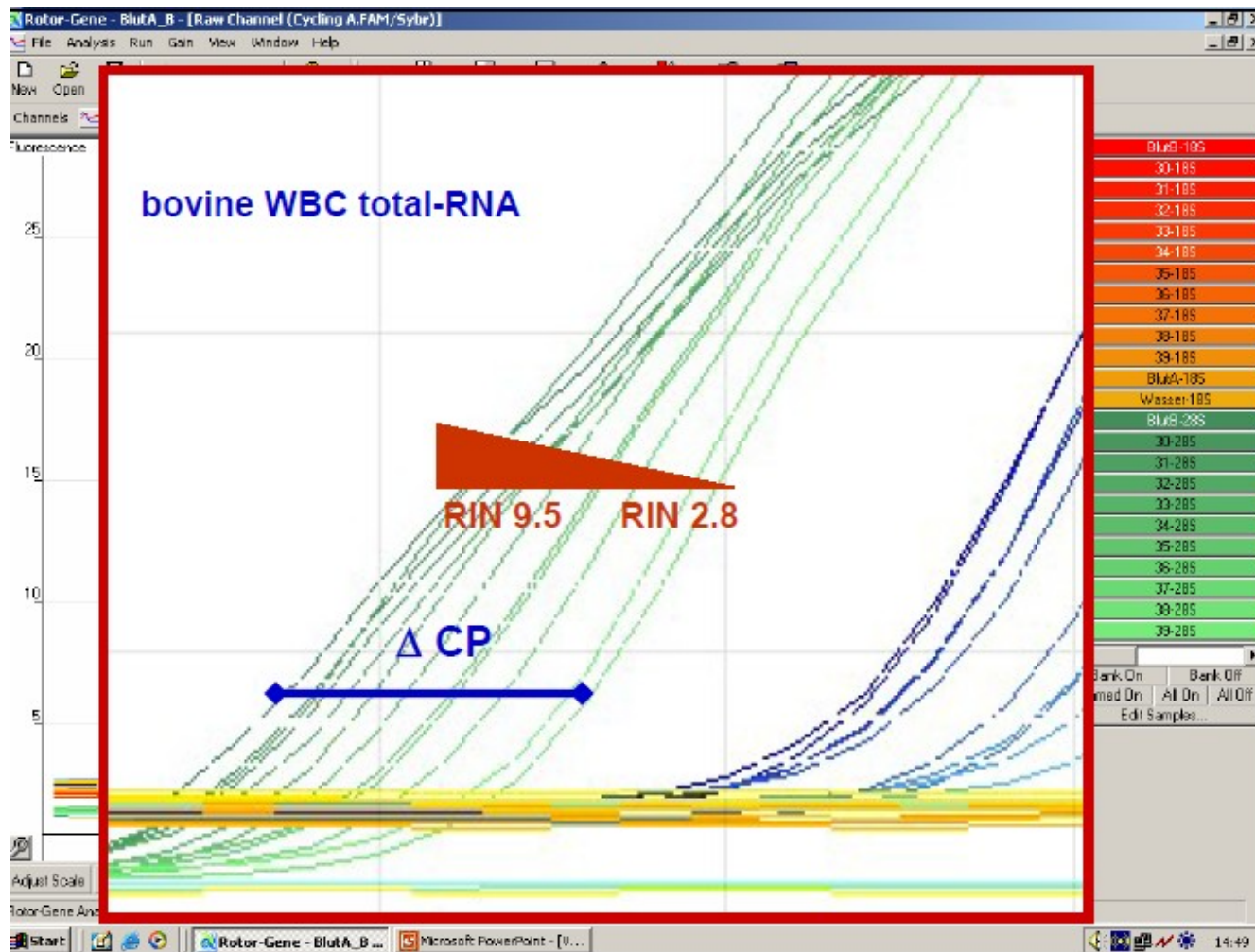
#### Threshold (prahový) cyklus $C_T$ –

cyklus, při kterém  $R_n$  signály začnou odpovídat exponenciálnímu růstu množství amplifikačního produktu  
Pro určení  $C_T$  vyhodnocovací software vypočítá průměrnou odchylku  $R_n$  v několika prvních cyklech a na základě této odchylky rozpozná následnou změnu vedoucí od baseline (kterou obvykle představuje asi prvních 15 cyklů) k exponenciálnímu průběhu

(threshold změna  $R_n$  je definovaná jako desetinásobek průměrné odchylky v baseline fázi PCR)

$C_T$  je závislé na koncentraci DNA templátu, účinnosti amplifikace a funkčnosti fluoroforového systému.

## Vztah integrity RNA a Ct prahového cyklu při měření stejného transkriptu v analogickém vzorku



## Real-Time PCR – nejpoužívanější a nejstandardnější metoda studia genové exprese

### Normalizace pomocí endogenní kontroly – relativní kvantifikace metoda $\Delta \Delta Ct$

#### Reference – obvykle nějaké housekeepingové geny

jsou aktivní ve všech buňkách zajišťují základní funkce buněčného metabolismu: syntéza nukleových kyselin a proteosyntéza, transport živin a jejich zpracování, biosyntéza cytoskeletu a organel (GAPDH, HPRT1, ACTB, B2M,....)

$\Delta Ct_1 = Ct(\text{gen}) - \Delta Ct(\text{reference})$  – v kalibračním vzorku (např. nenádorový střevná epitel)

$\Delta Ct_2 = Ct(\text{gen}) - \Delta Ct(\text{reference})$  – v analyzovaném vzorku (např. kolorektální karcinom)

$$\Delta \Delta Ct = \Delta Ct_2 - \Delta Ct_1$$

$$2^{-\Delta \Delta Ct} = [\text{gen ve vzorku}] / [\text{gen v kalibrátoru}]$$

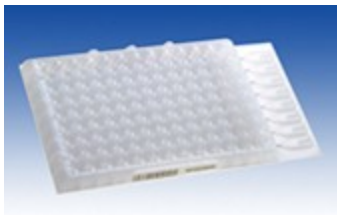
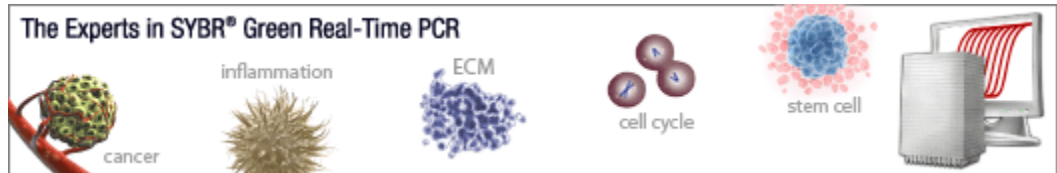
(př. 3 znamená, že normalizovaná hladina stanovovaného genu je 3x vyšší v kolorektálním karcinomu než v nenádorovém epitelu)

$$2^{-\Delta Ct_1} = [\text{gene}] / [\text{reference}]$$

*Rozdíly v množství celkové RNA ve vzorcích a asi 20% chyba reverzní transkripce*

## Real-Time PCR arrays

obvykle cílené na geny konkrétní signální dráhy nebo biologického procesu



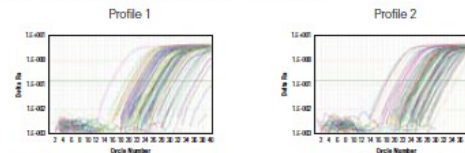
1. Convert Total RNA to cDNA.



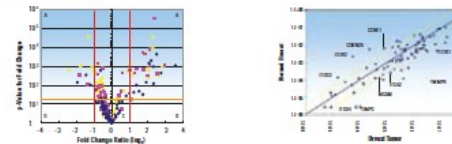
2. Add cDNA to RT<sup>2</sup> qPCR Master Mix & Aliquot Mixture Across PCR Array.



3. Run in Your Real-Time PCR Instrument.



4. Data Analysis.



[www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)

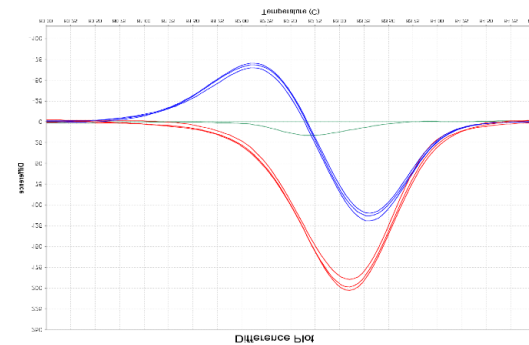
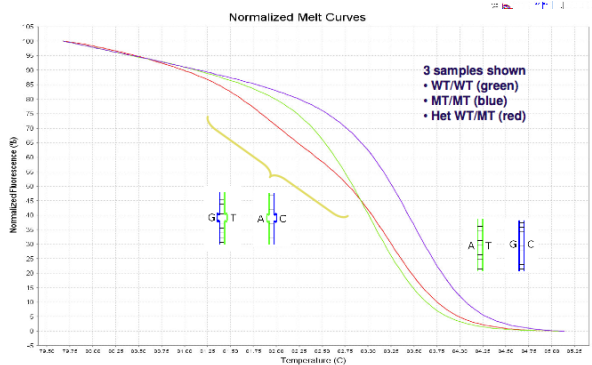
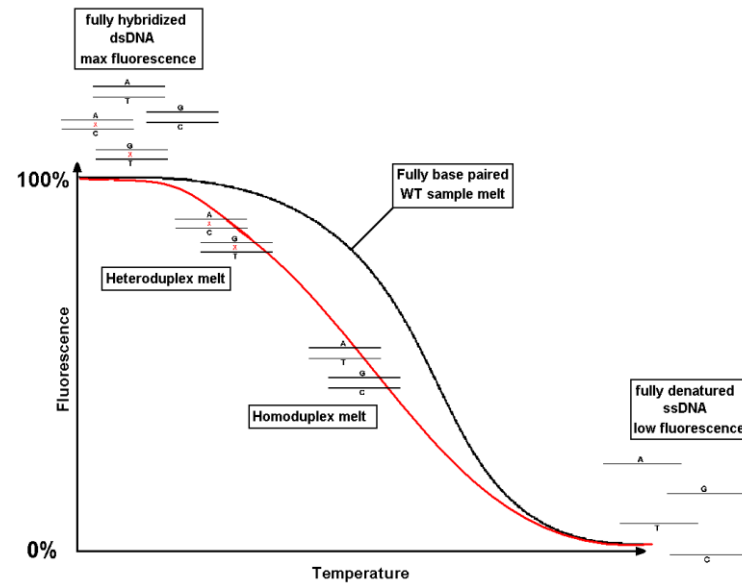
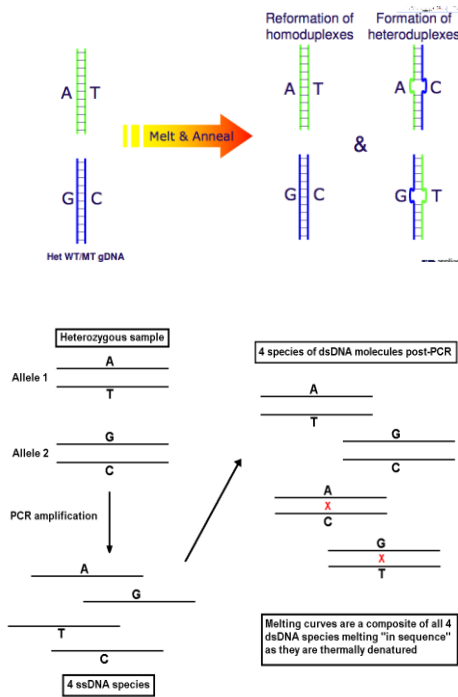
[www.sabiosciences.com](http://www.sabiosciences.com)

# High resolution melting (HRM) – analýza tání s vysokým rozlišením

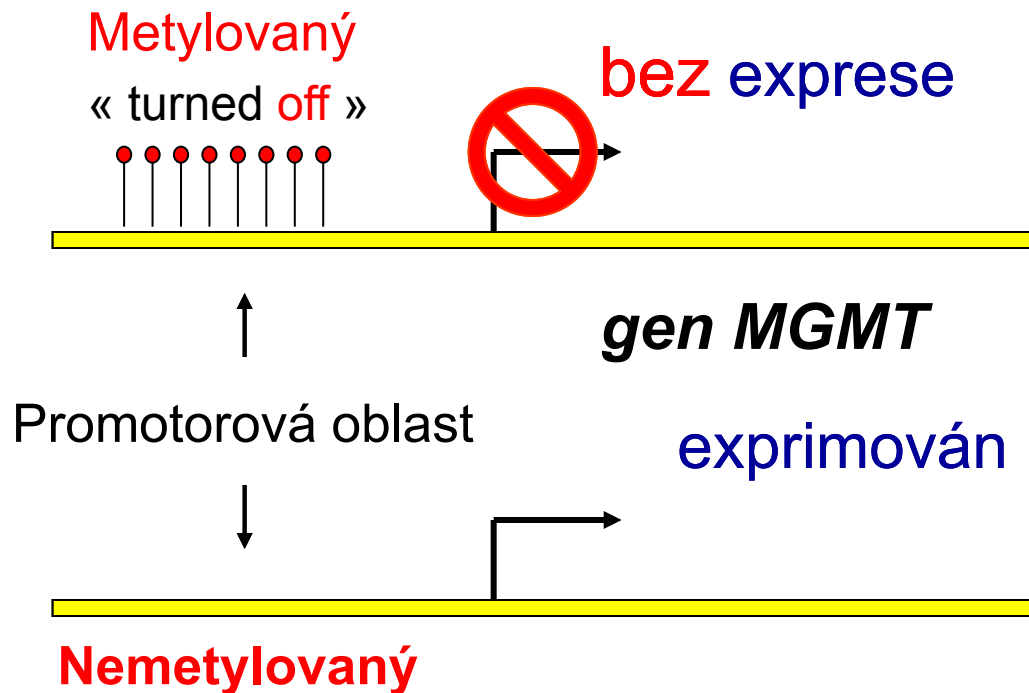
SNP Class	Base Change	Typical $T_m$ Curve Shift	Occurrence in the Human Genome
1	C/T & G/A	Large (>0.5, avg. of 1.0°C)	64%
2	C/A & G/T	Large (>0.5, avg. of 1.0°C)	20%
3	C/G	Small (0.2–0.5°C)	9%
4	A/T	Very small (<0.2°C)	7%

Table 1. Human Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) Occurrence and  $T_m$ .

HRM can detect all SNP classes



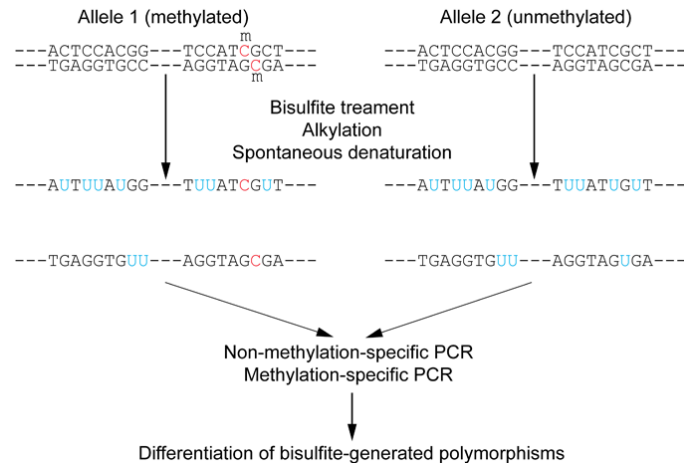
## O<sup>6</sup>-metylguanin-DNA metyltransferáza (MGMT) v predikci odpovědi na léčbu temozolomidem (TMZ)



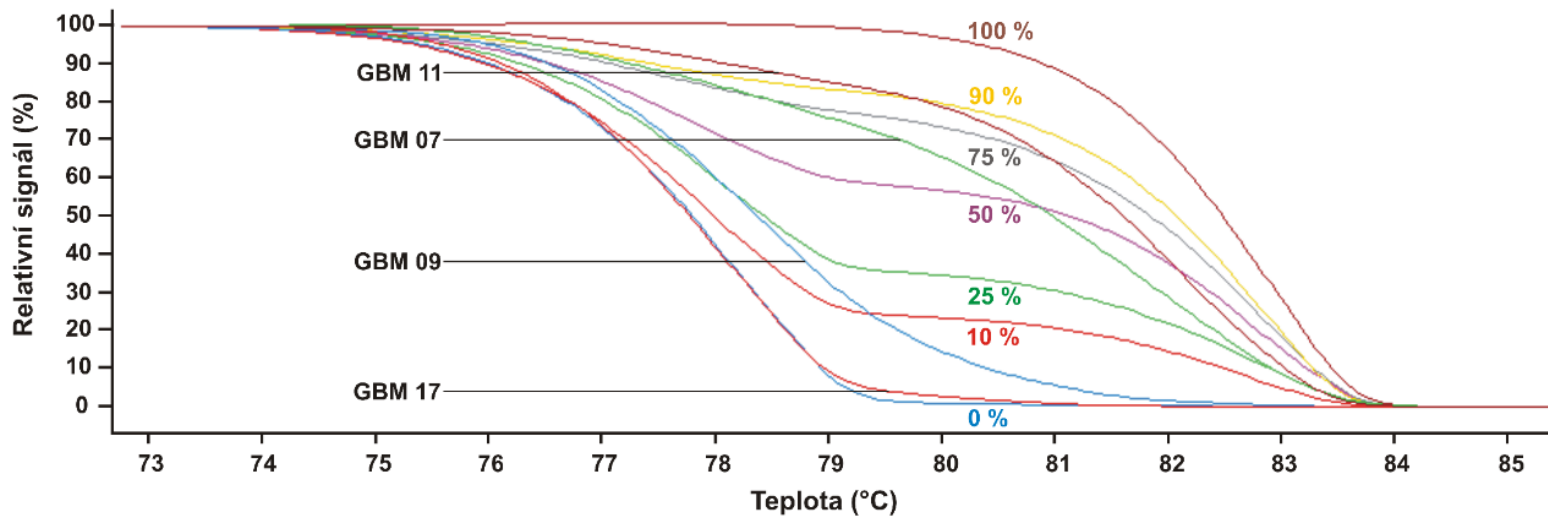
### *GBM s metylovaným promotorem MGMT*

- **Není** reparační protein DNA - MGMT
- **Nejsou** opravována poškození DNA indukovaná účinkem temozolomidu
- Lepší odpověď na léčbu
- Lepší přežití pacientů s glioblastomem





**Obr. 1: Normalizované křivky tání promotoru pro MGMT**

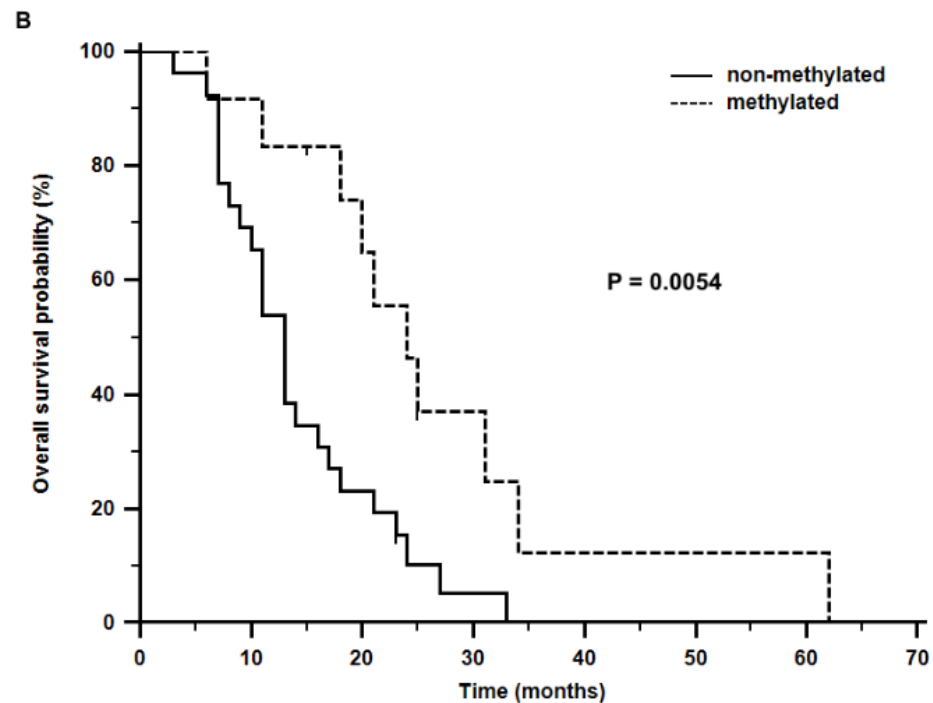
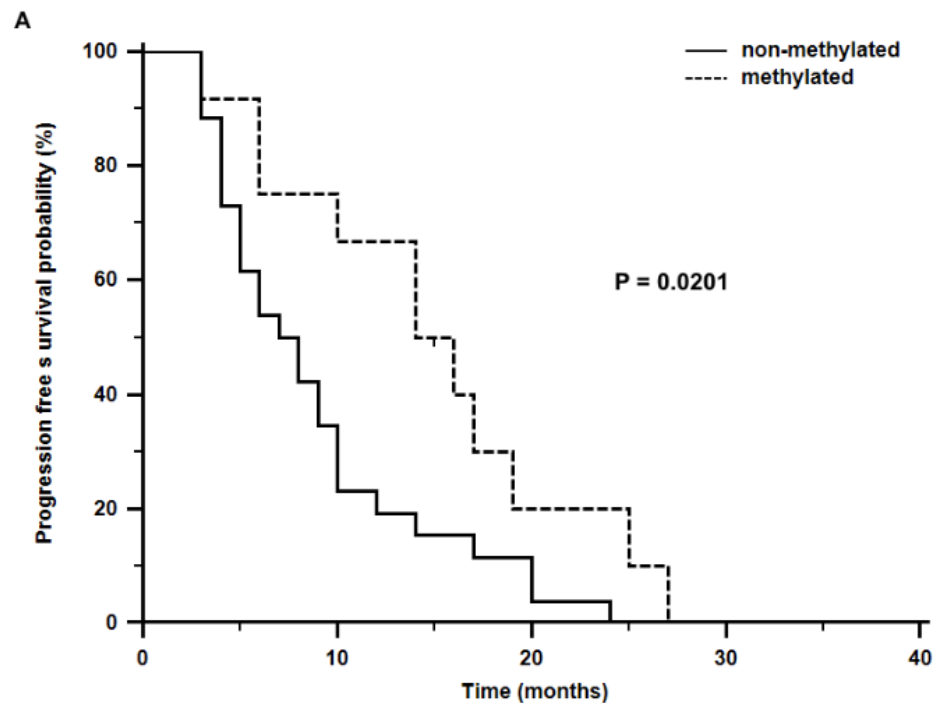


Kalibrační vzorky s 0 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 90 %, 100 % metylovanou DNA  
Glioblastomové vzorky GBM 07, GBM 09, GBM 11, GBM 17

## Prediktivní význam metylace MGMT u pacientů s multifórním glioblastomem – odpověď na nové alkylační agens temozolomid

Stav metylace promotoru genu pro reparační protein MGMT stanovený metodou HRM

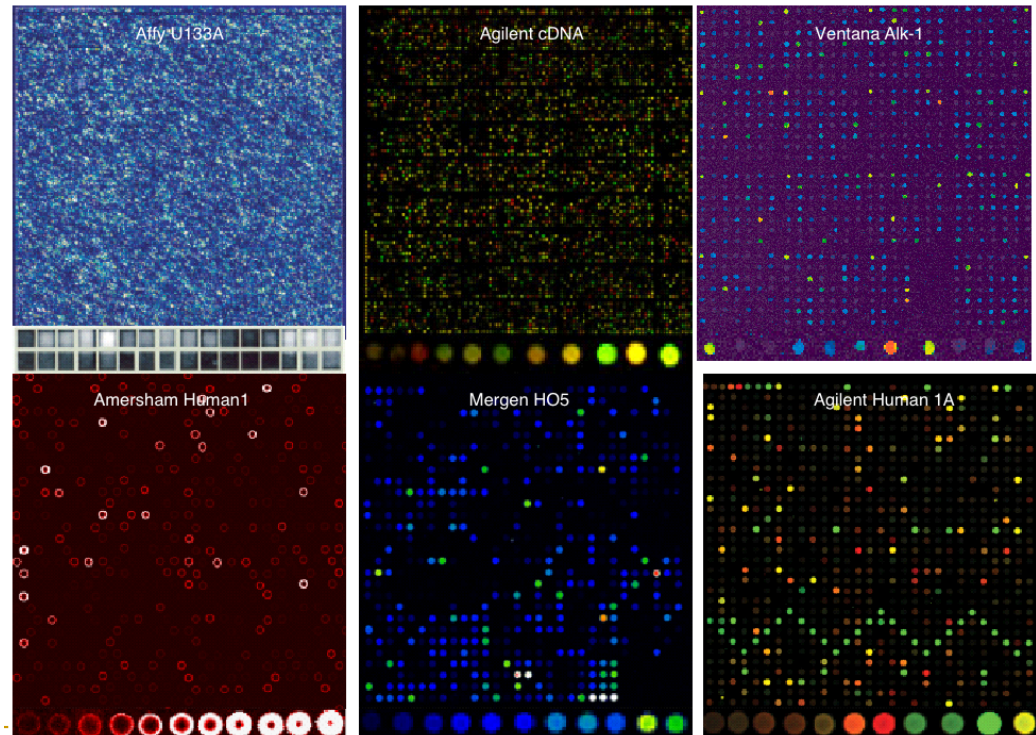
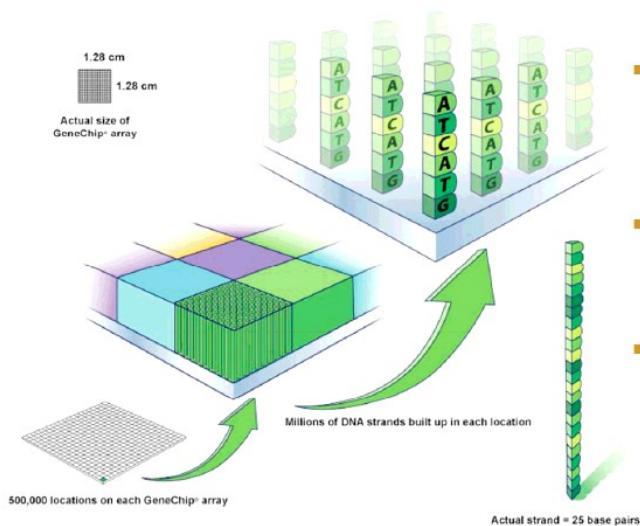
Nemetylovaný promotor, Vyšší hladiny MGMT, Vyšší DNA reparační kapacita (- prognostický faktor)  
Metylovaný promotor, Nižší hladiny MGMT (+ prognostický faktor)



Slaby et al., Cancer Science, 2011

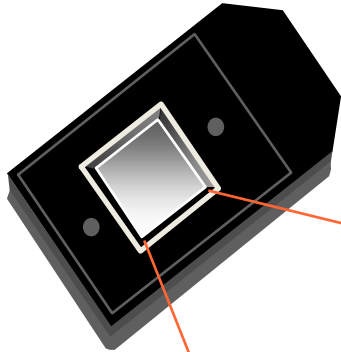
## DNA microarrays (čipy) – definice a ukázky

Miniaturizované zařízení nesoucí na svém povrchu imobilizované fragmenty nukleových kyselin v přesně určeném uspořádání. Tyto fragmenty jsou sekvenčně derivované tak, aby mohly specificky hybridizovat s testovaným genetickým materiálem, který je předem speciálně označen za účelem posthybridizační detekce

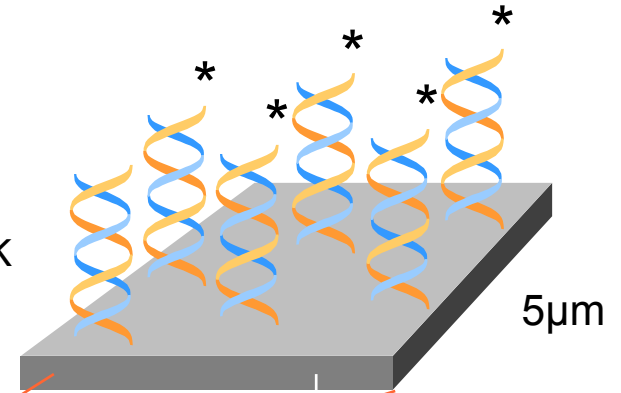


# DNA čip (Affymetrix GeneChip U133A)

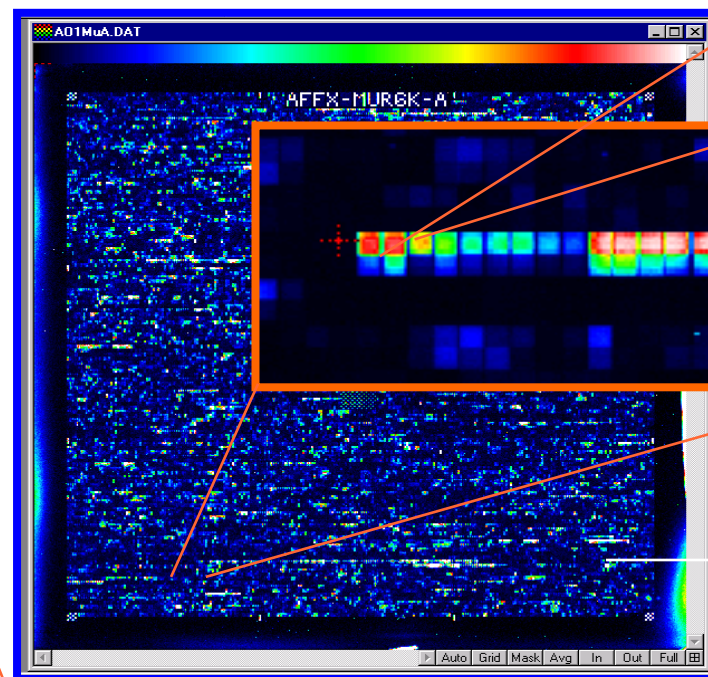
GeneChip U133A - DNA čip



Testovaná NK  
Sonda = fragment NK



1.28cm



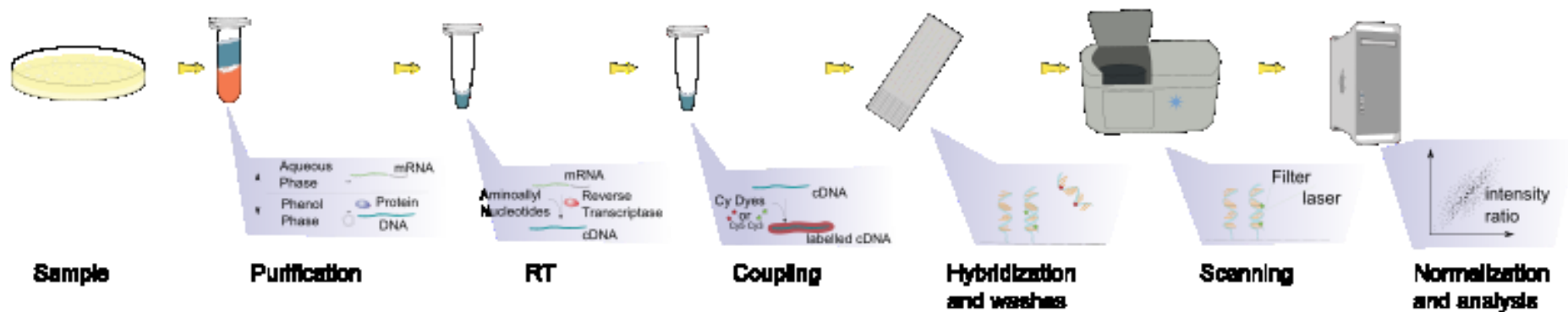
Milióny kopií jedné sondy

Hybridizační jednotka

Přes 6 500 000  
hybridizačních jednotek

U133 set (A+B)  
-33 000 lidských  
genů  
-1 000 000 hybridizačních jednotek

# Experiment s DNA čipem



## Základní dělení DNA čipů

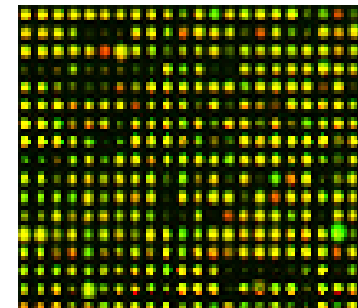
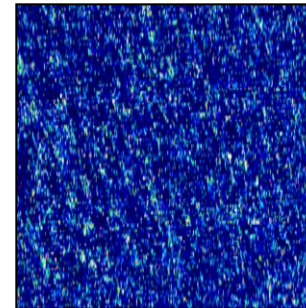
Dle charakteru detekce

- 1) pasivní – pracovní podmínky pro všechny hybridizační jednotky jsou stejné – Affymetrix, Agilent
- 1) aktivní – pracovní podmínky každé hybridizační jednotky lze ovlivňovat individuálně – Nanogen



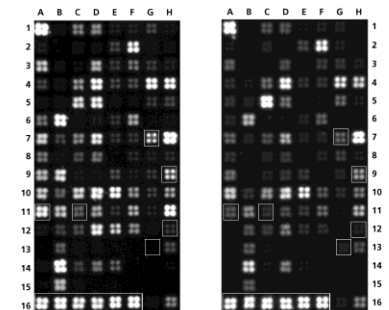
Dle typu sond

- 1) cDNA čipy – historicky Agilent
- 2) oligonukleotidové čipy – Affymetrix (25mers), Agilent (60mers)



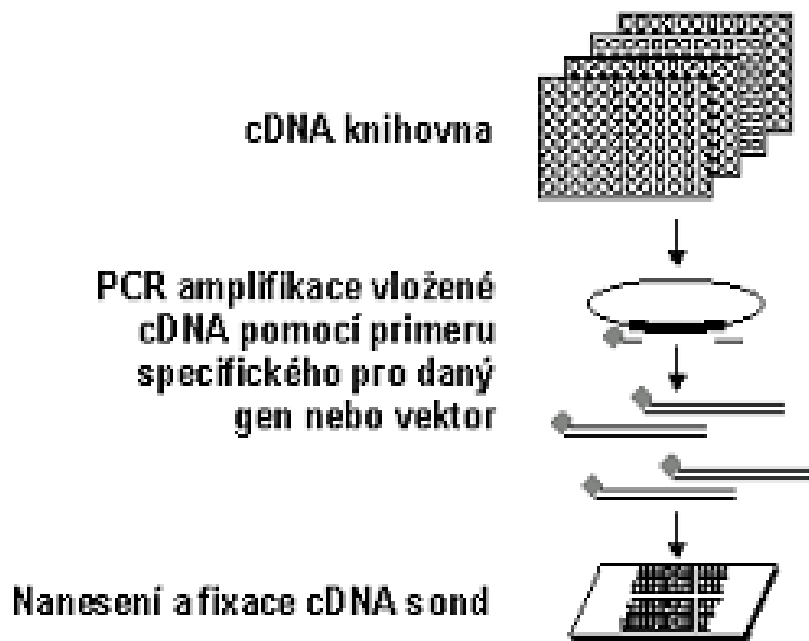
Dle počtu sond

- 1) vysokohustotní DNA čipy (celogenomové) – Affymetrix, Agilent, ...
- 2) nízkohustotní DNA čipy (stovky genů) – Eppendorf, Superarray, ...



## Výroba in house cDNA ČIPŮ

dvouvláknové fragmenty komplementární (complementary) cDNA o délce 300-400 párů bází



### cDNA EXPRESNÍ KNIHOVNA

mRNA -> reverzní transkripce

-> cDNA -> fragmentace

-> + univerzální vektor

-> inkorporace do plasmidů

-> transfekce bakterií

-> uskladnění bakteriálních

klonů v jamkových

destičkách

->

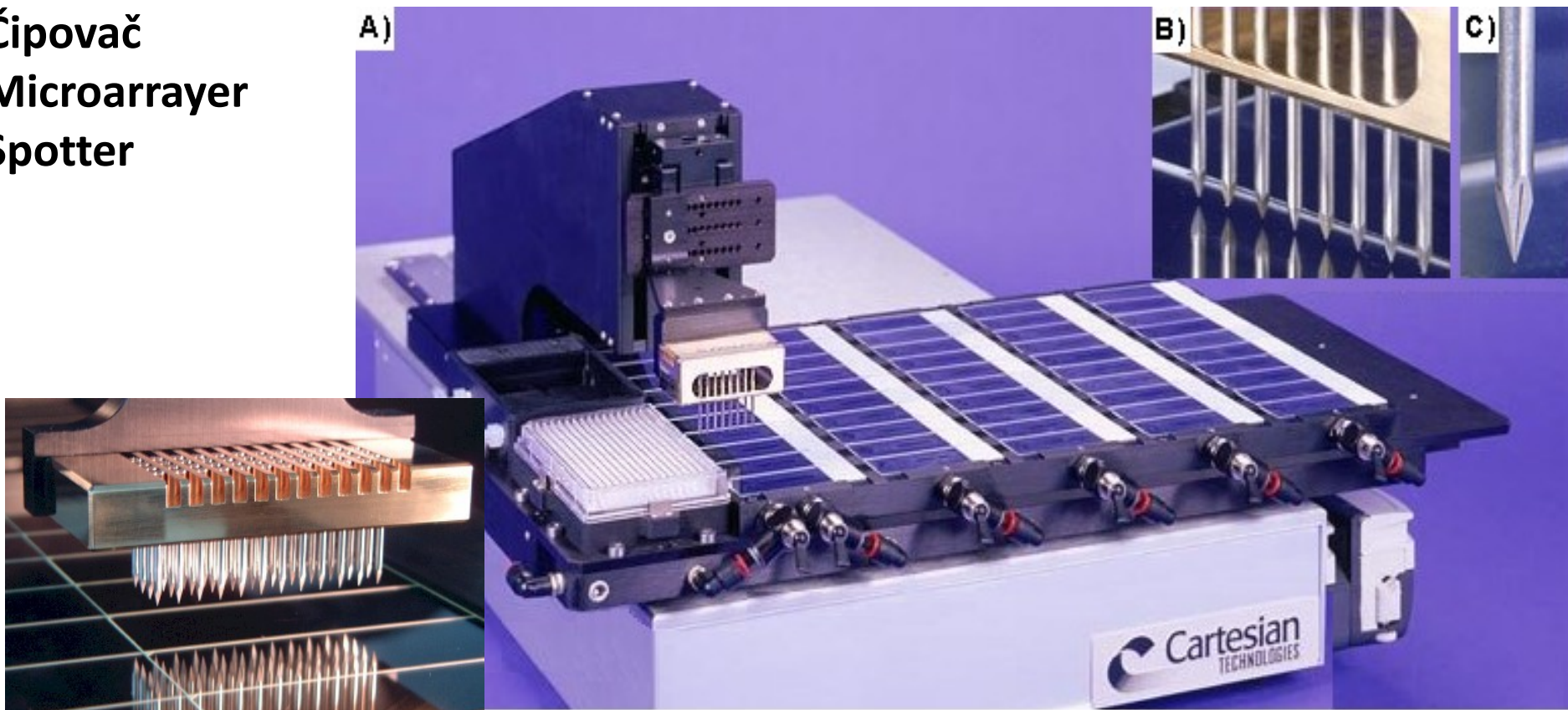
->(1 bakteriální klon obsahuje

plasmid s jedním cDNA

fragmentem)

## Výroba DNA ČIPŮ spotováním

Čipovač  
Microarrayer  
Spotter



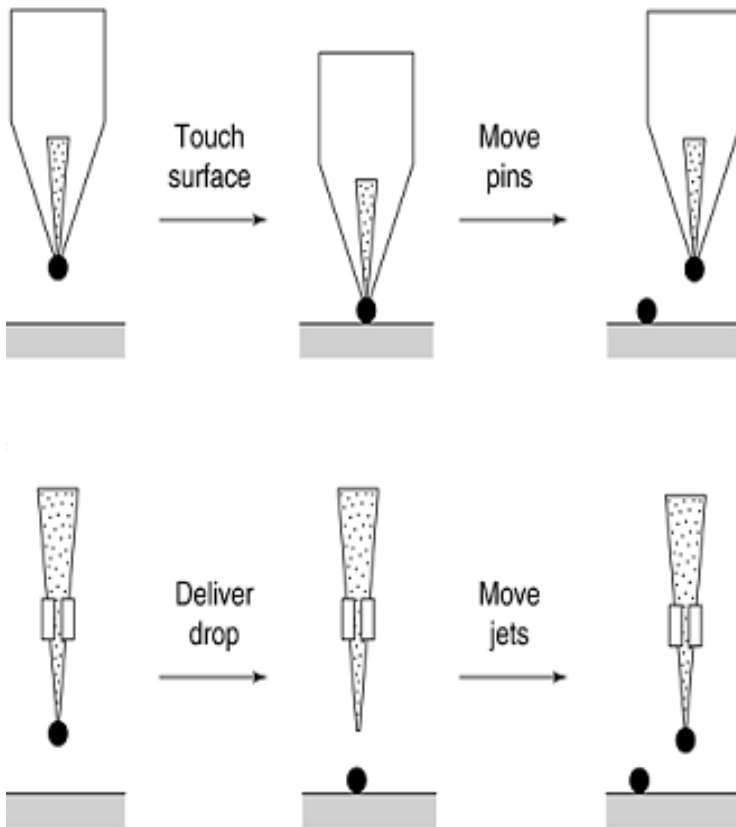
Obr. č. 1. A) Pohled na výkonnou část čipovacího přístroje společnosti Cartesian Technologies. Detailní snímek na: B) pracovní hlavu osazenou nanášecími tělesy (NT) a C) kontaktní NT – štěrbinovitý hrot.

<http://cmgm.stanford.edu/pbrown/mguide/index.html>



## Výroba ČIPŮ spotováním

### Nanášecí tělesa



### I) Kontaktní systémy

#### a) bez zásobníku

- plné hroty (solid pins)

#### b) se zásobníkem (250-1000nl)

- přepraví 0,25 – 5nl, což vytvoří hybridizační jednotku 75-350um v průměru

- štěrbinovité hroty (split pins)

- pinzetovité hroty (tweezers)

### II) Bezkontaktní systémy

#### a) „ink-jet“ (kapacita až 10000nl)

- piezoelektrický (4-100nl)

- elektromagnetický (0,05-10nl)

#### b) „bubble-jet“

1.28 x 1.28+ cm plocha čipu

HJ ~100 μm průměr separovány ~100 μm.

(≈ 5,000 – 20,000 probes)

## Výroba DNA ČIPŮ SPOTOVÁNÍM

**Povrchová úprava nosné  
plochy – hydrofóbních skel**



**Po nanesení sond – fixace:  
např. UV záření  
blokace: volných míst  
montáž: cartridge**

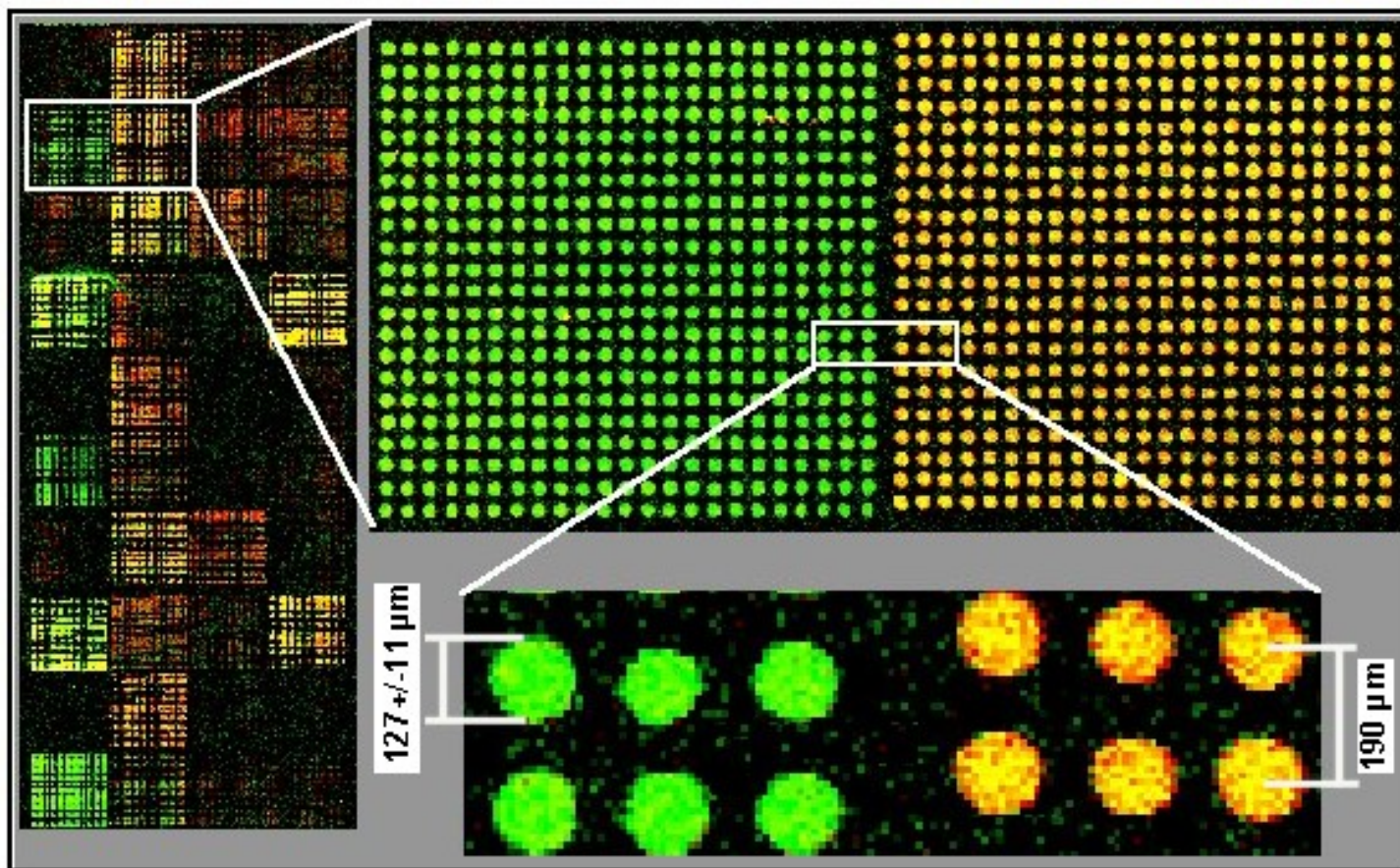
### **I) Kovalentní**

**- čip pokryt např. modifikovanými silany  
mající aldehydovou skupinu. 5' -  
konce sond jsou modifikovány a  
nesou aminovou skupinu –  
kontaktem vznikne pevná Schiffova  
báze**

### **II) Nekovalentní**

**- čip pokryt např. poly-L-lysinem, ke  
kterému se molekula cDNA váže  
elektrostatickými interakcemi a  
vodíkovými můstky**

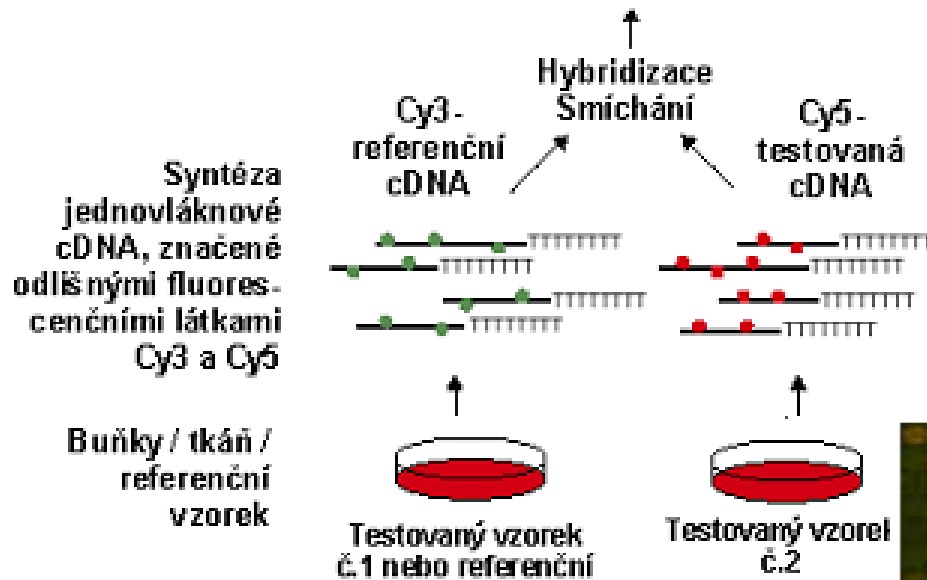
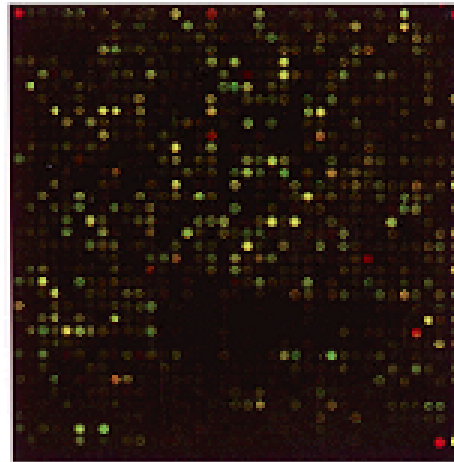
## Výroba cDNA ČIPŮ



Obr. č. 2. cDNA čip obsahující přes 25.000 hybridizačních jednotek (HJ), k jehož výrobě byl použit přístroj MicroSpot 2500 společnosti BioRobotics. Průměr HJ přibližně 127  $\mu\text{m}$ . Vzdálenost mezi centry dvou HJ 190  $\mu\text{m}$ . Převzato a upraveno od BioRobotics.

## Dvoubarevný čipový experiment (cDNA, Agilent)

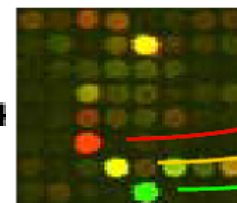
Excitace hybridizačních jednotek dvěma laserovými paprsky. Intenzita záření emitovaného odlišnými fluorochromy odpovídá obsahu testované (Cy5) a referenční (Cy3) cDNA na příslušné jednotce. Poměr Cy5/Cy3 je vyjádřen v pseudobarevném zobrazení



U cDNA čipů hybridizujeme na jednom čipu značenou ss-cDNA získanou z testovaného a referenčního vzorku.

Proto je nutno každou ss-cDNA označit rozdílným fluorochromem. Standardně: referenční ss-cDNA je Cy-3 – zeleně a testovaná ss-cDNA Cy5 – červeně

Po hybridizaci následuje vymytí přebytečného materiálu a čtení (skenování) čipu pomocí fluorescenčního skeneru



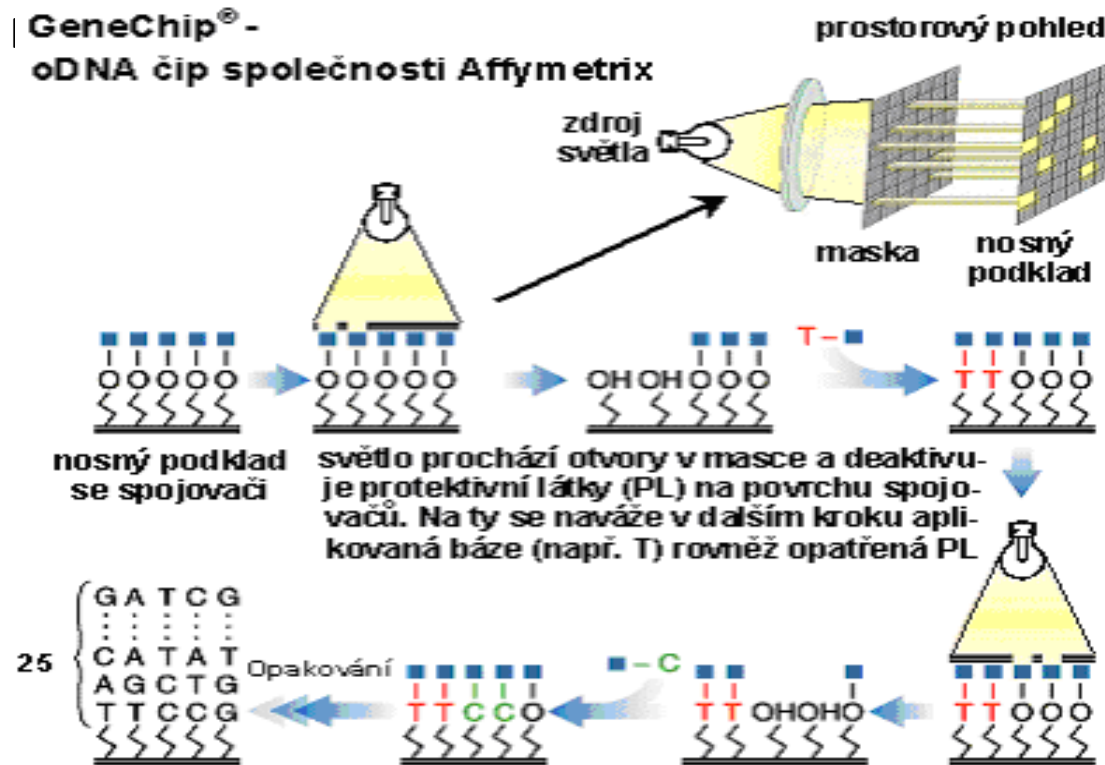
Cy3 Snížená exprese genu  
Cy5 Zvýšená exprese genu

Cy3	Cy5	$\frac{Cy5}{Cy3}$	$\log_2 \left( \frac{Cy5}{Cy3} \right)$
200	10000	50.00	5.64
4800	4800	1.00	0.00
9000	300	0.03	-4.91



# Oligonukleotidové DNA čipy – Affymetrix – výroba syntézou in situ

-oligonukleotidové čipy, jednovláknové fragmenty NK o délce ≈25 bází



Pomocí odlišných masek jsou postupně deaktivovány PL zbylých spojovačů a následně aplikovány dosud nepoužité nukleotidy. K syntéze libovolného počtu sond je zapotřebí takový počet masek a příslušných kroků, který odpovídá množství nukleotidů v jedné sondě (25) násobeném počtem bází (4).

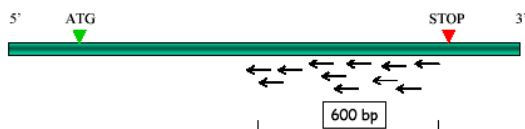
1.28 x 1.28+ cm plocha čipu  
HJ ~5 x 5 μm průměr plocha  
(≈ miliony sond na 6,500,000 HJ)

# Affymetrix GeneChip

## PŘÍPRAVA OLIGONUKLEOTIDOVÝCH SOND

### Probe Design

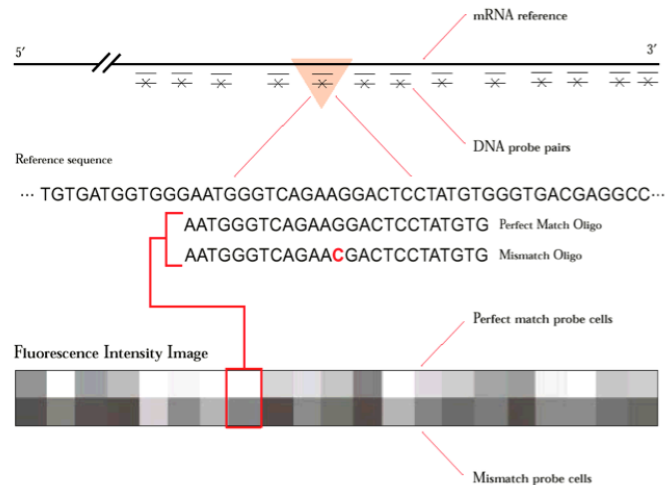
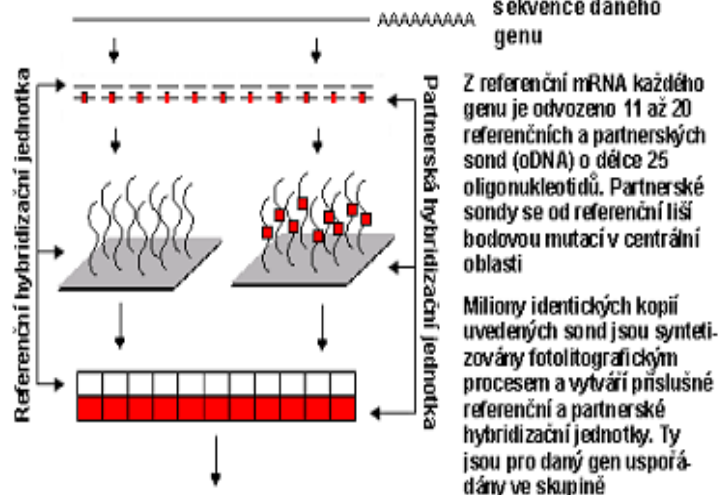
Combining databases, empiric knowledge



- Probe set: - at least 11 unique oligos (25-mers)  
 - spread over 600 bp 3'-end  
 - spread over the whole chip  
 - match-mismatch oligos



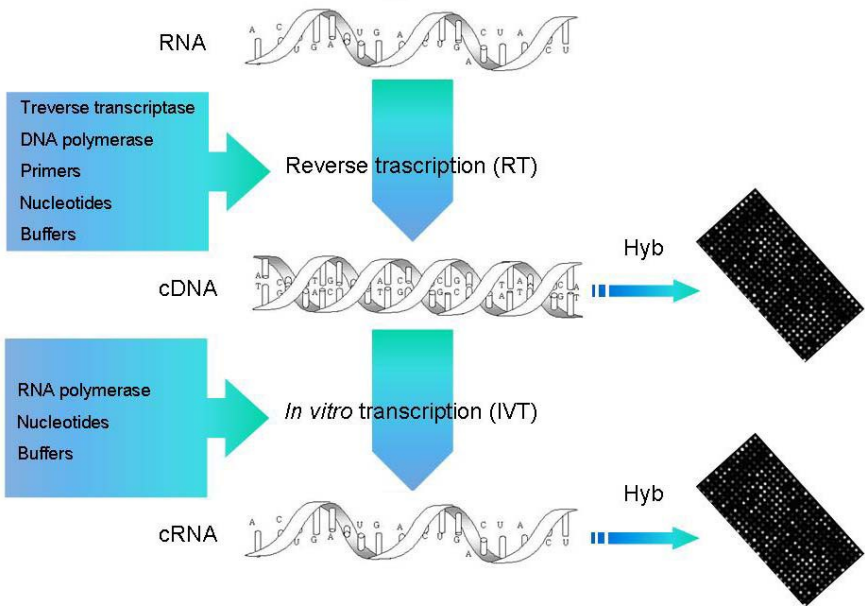
mRNA referenční  
sekvence daného  
genu



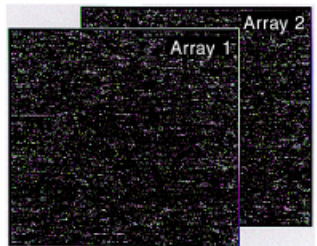
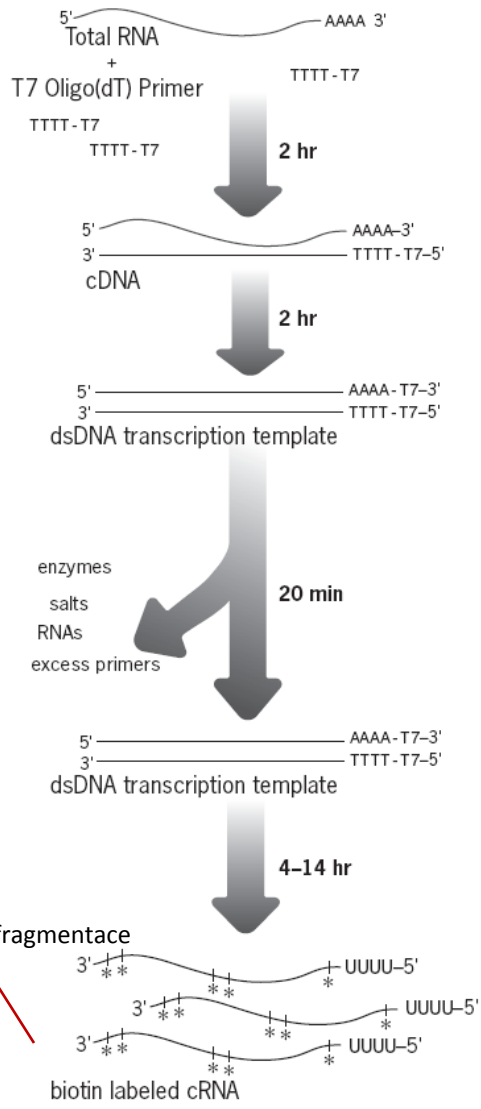
mRNA sekvence daného genu -> virtuálně vyselektováno 11-20 specifických oligonukleotidových úseků reprezentujících daný gen-> reverzní transkripce do sekvence cDNA -> fotolitografická syntéza přímo na povrchu čipu

Referenční a partnerské sondy v referenčních a partnerských hybridizačních jednotkách. Liší se cílenou záměnou jednoho nukleotidu v centrální oblasti (negativní kontrola).

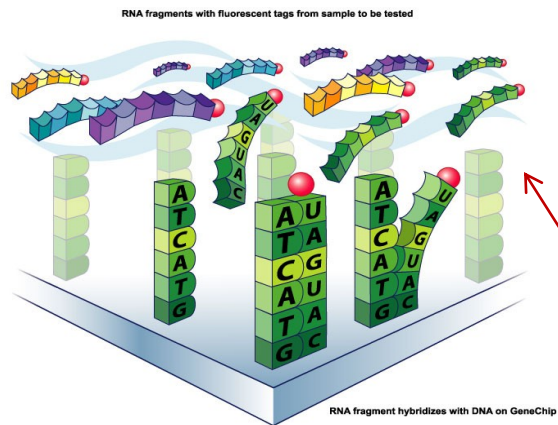
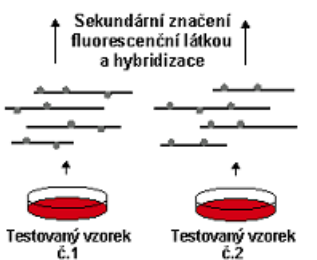
# IVT, značení cRNA biotinem a posthybridizační detekce



**Izolace RNA / mRNA**  
 -> reverzní transkripce  
 -> ss-cDNA  
 -> PCR syntéza ds-DNA s T7 promotory  
 -> lineární amplifikace a zároveň in-vitro reverzní transkripce s inkorporací NTPs (pseudouridin nesoucí biotin - nepřímá metoda)  
 -> biotinem značená cRNA  
 -> hybridizace



Hybridizační jednotky jsou excitovány jedním laserovým paprskem. Obecně je gen považován za exprimovaný, pokud hodnota intenzity emitovaného záření z jeho referenčních jednotek převyšuje po odečtení fluorescenčního pozadí hodnotu z jednotek partnerských

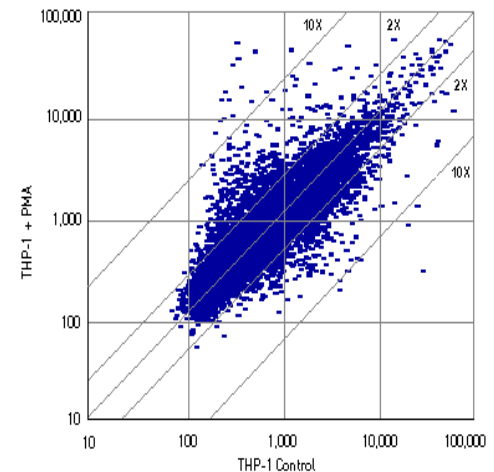
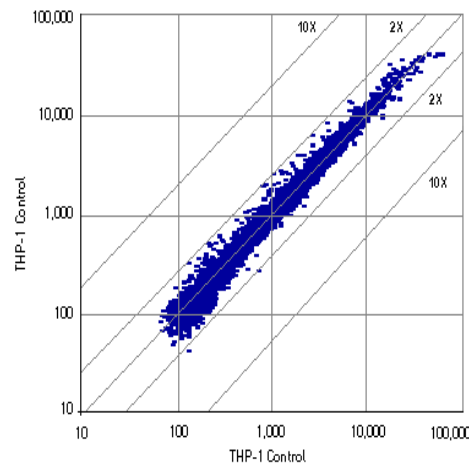


## Faktory ovlivňující čipové analýzy

heterogenita souboru pacientů, kvalita vstupního materiálu, rozdílnost čipových platforem, validace výsledků

**Biologická variabilita** = charakteristika individua nebo systému (genetický základ a jeho variace, vývojové stádium, fyziologický stav, teplota, kultivační podmínky, sledované experimentální podmínky, atd.)

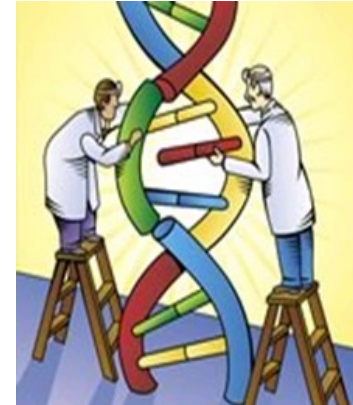
Biologickou variabilitu odlišit od **technologické variability** (zpracování a nanášení vzorku, čipy a jejich výroba, značení cDNA, hybridizace, RNA a cDNA amplifikace, skenování a skener)  
 odlišit -pozadí od biologicky důležitých genů včetně těch exprimovaných na nízké úrovni  
 -odlišit nespecifické změny (stresové reakce), atd.  
 -kontaminace jinými buněčnými populacemi





## Take home

Interdisciplinární charakter biomedicínského výzkumu  
Biologický materiál užívaný pro účely molekulární medicíny  
Odběr klinického materiálu (stabilita, archivace)  
Laserová mikrodisekce  
Izolace nukleových kyselin  
Kvantifikace a stanovení kvality nukleových kyselin  
Real-Time PCR (definice, způsoby detekce, absolutní a relativní kvantifikace)  
Real-Time PCR arrays  
DNA čipy (definice a základní členění)  
cDNA čipy  
oligonukleotidové čipy  
Faktory ovlivňující čipové analýzy



## Náplň příští přednášky

Moderní metodické přístupy v molekulární medicíně II – faktory ovlivňující čipové analýzy, základní statistické přístupy k analýze čipových dat, další čipové technologie SNP čipy, CGH čipy, mikroRNA čipy, ChiP–on-chip, využití genomiky pro molekulární klasifikaci nádorových onemocnění, jak navrhovat studie a jak číst publikace – výhody a limity genomických metod

## Dotazy?

