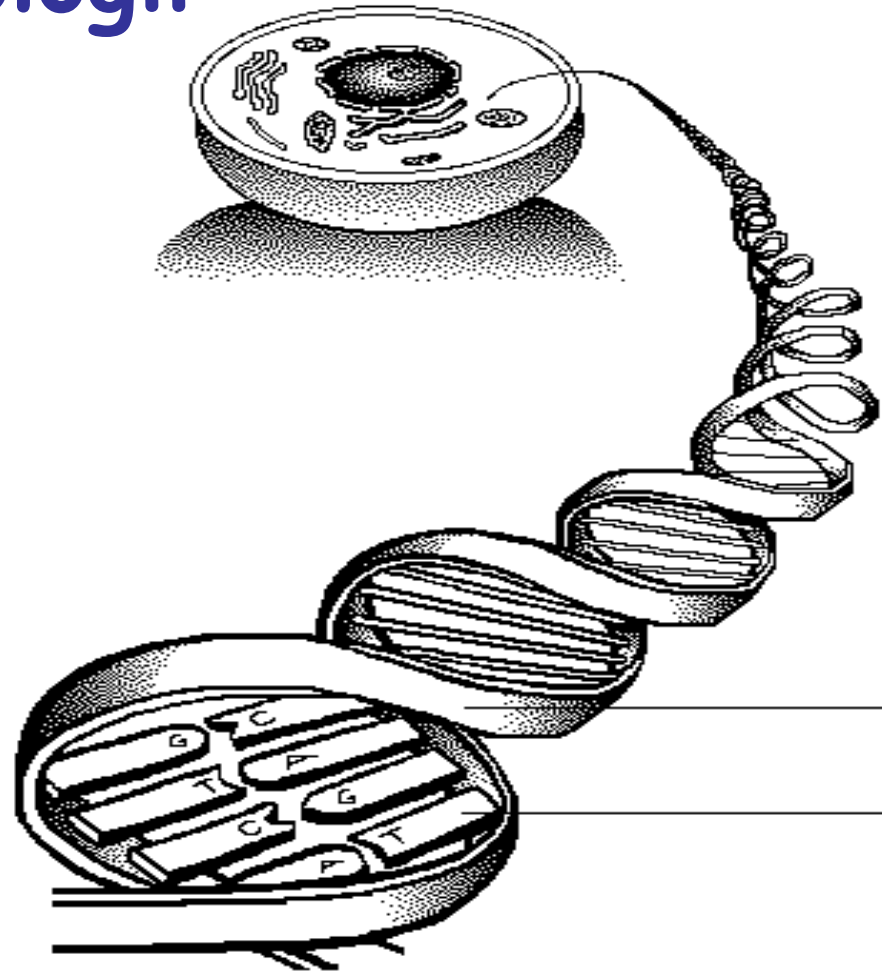


Základní metodické přístupy v experimentální onkologii & Modelové systémy



Experimentální modely v onkologii

Obecné zásady při výzkumu:

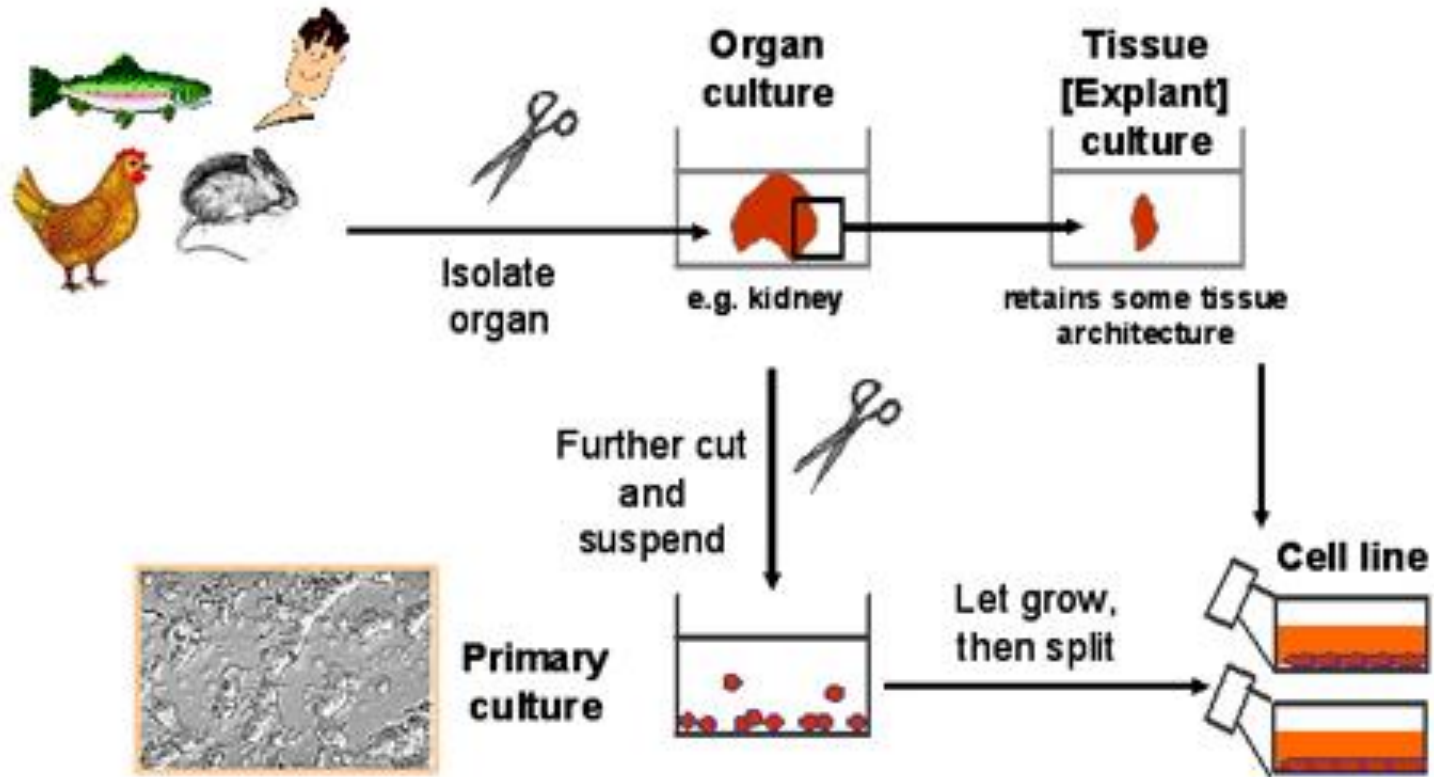
- Snaha porozumět fundamentálním procesům funkce a vývoje živých organismů
- Formulace přesně definovaných otázek ve vymezené oblasti výzkumu
- Výběr vhodného modelového systému (Mendel)
- Zjednodušený, ale impaktní systém umožňující testovat specifickou hypotézu a zda se dosáhne výsledného fenotypu

• Buněčné linie

- *Caenorhabditis elegans*
- *Drosophila melanogaster*
- Kvasinky
- *Danio rerio*

• *Mus musculus*

Příprava buněčných linií



Types of in vitro systems



Práce s eukaryotickými buněčnými liniemi

➤ Optimální podmínky kultivace (5-10% CO_2 , 37 C, pH, glukóza, růstové faktory, antibiotika)

➤ Nebezpečí kontaminace jinou buněčnou kulturou [DSMZ, ATCC (mikrosatelitní DNA fingerprinty)]

Buňky se dělí a rostou dokud neobsáhnou celý prostor, pak následuje:

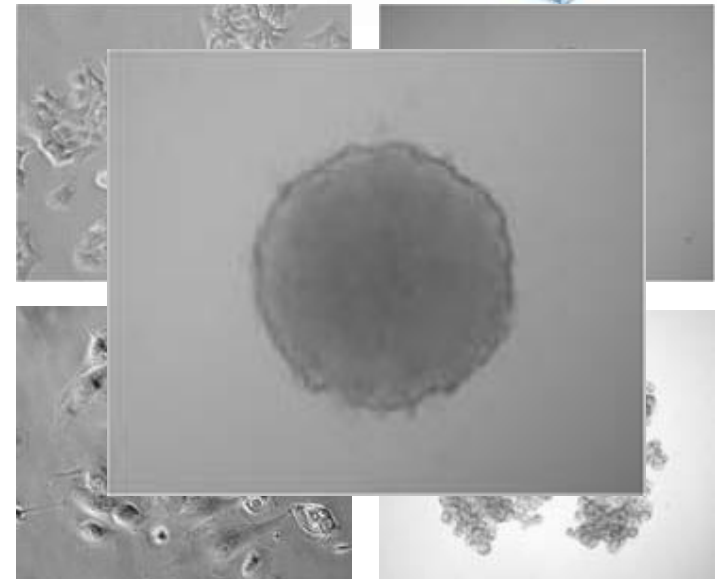
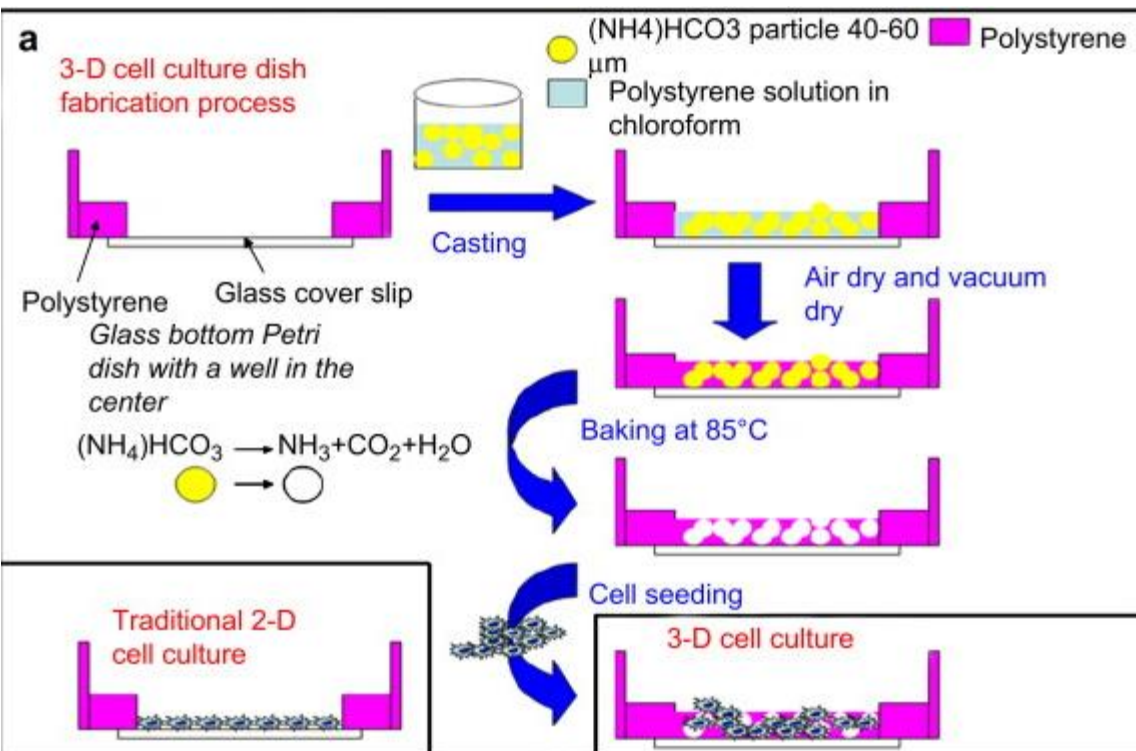
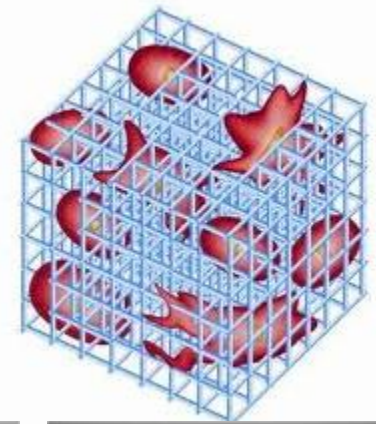
- Zástava b. dělení kontaktní inhibicí
- Indukce buněčné diferenciaci kontaktní inhibicí
- Akumulace apoptotických a nekrotických buněk
- Deplece nutričních faktorů

➤ Výměna média (pH), pasážování buněk, kryoprezervace

➤ Konfluente buněk, suspenzní vs. adherentní buňky

➤ Genové manipulace

➤ 2D vs. 3D kultivace

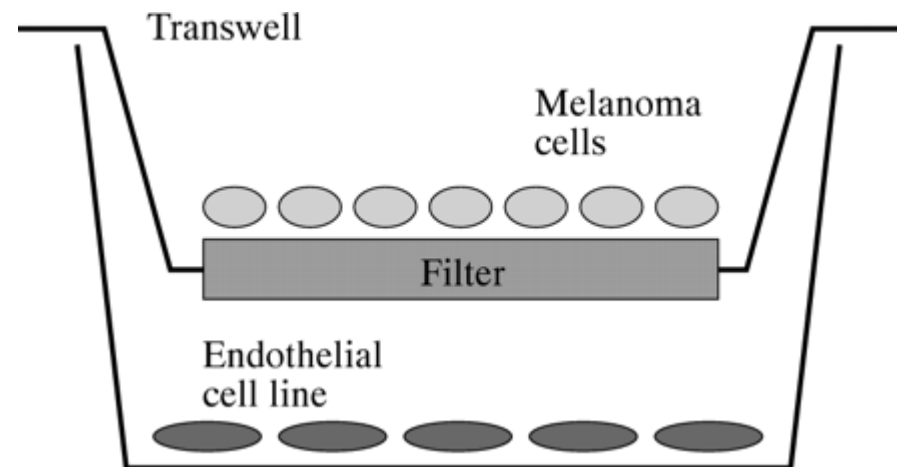


Výhody a nevýhody buněčných linií

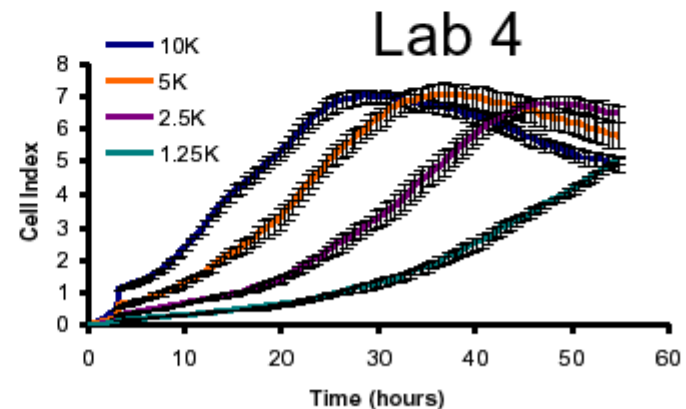
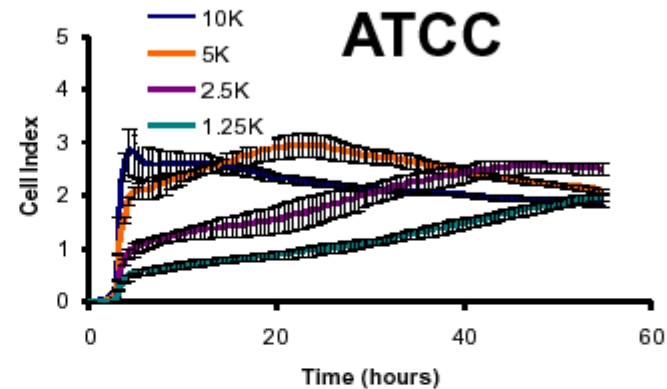
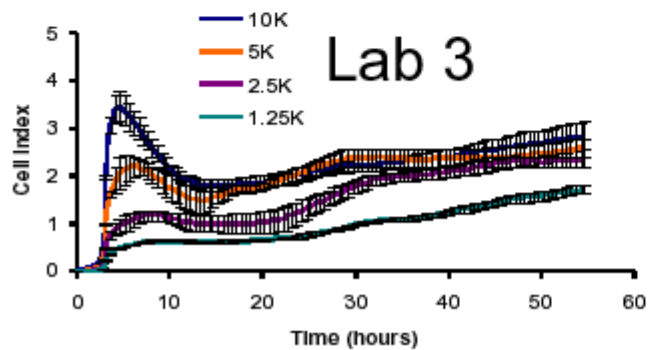
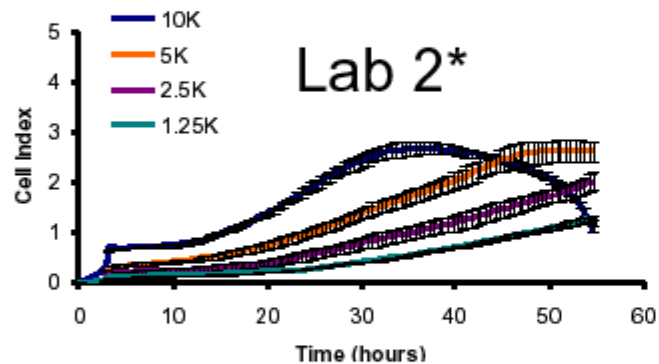
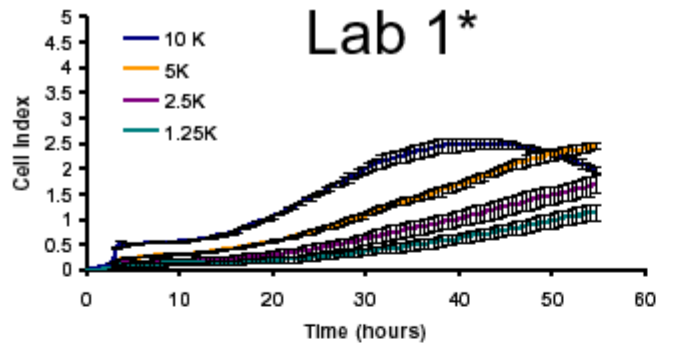
- Prakticky neomezená životnost
- Kontinuální a rychlá proliferace
- Snadná práce
- Možnost připravit stabilní KO, transientní transfekce, a další genetické manipulace



- Atypické okolí nádorových buněk
- Nebezpečí kros-kontaminací
- Kumulace dalších změn



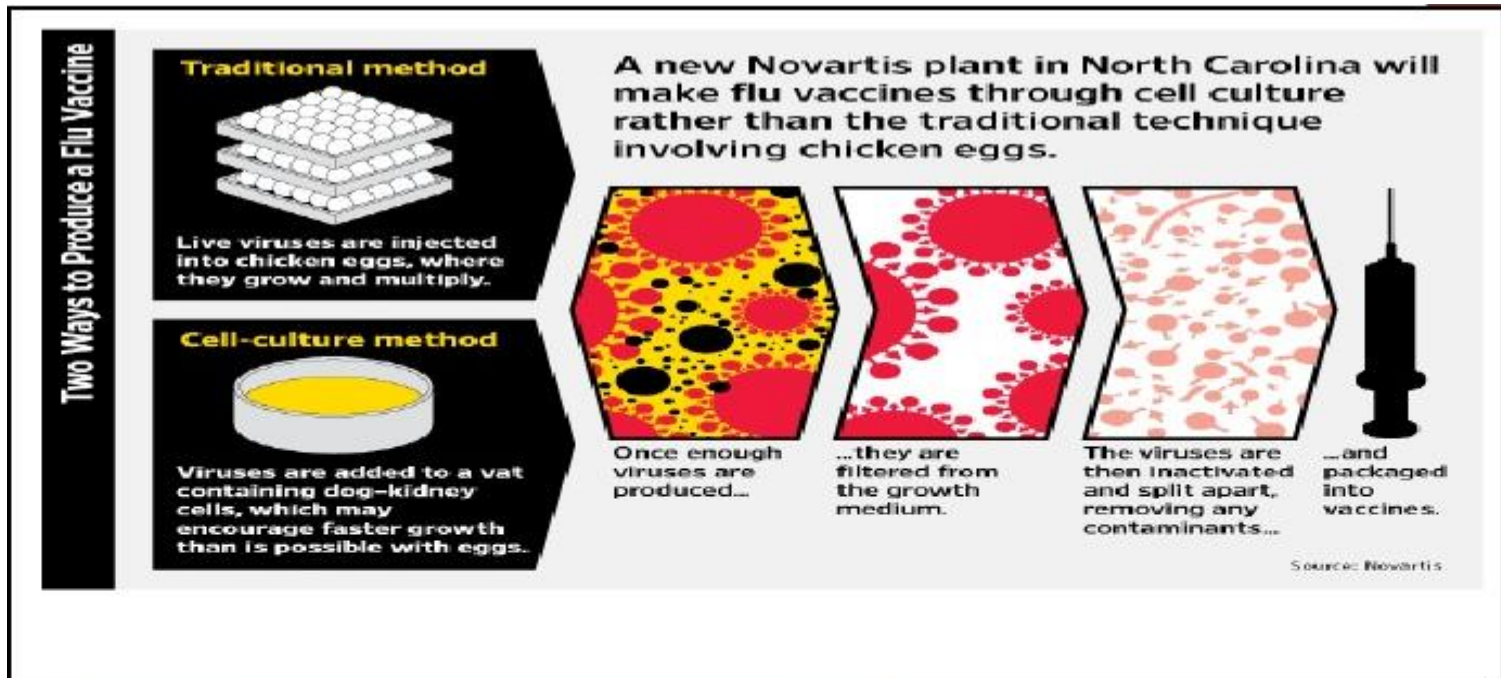
Buněčné linie



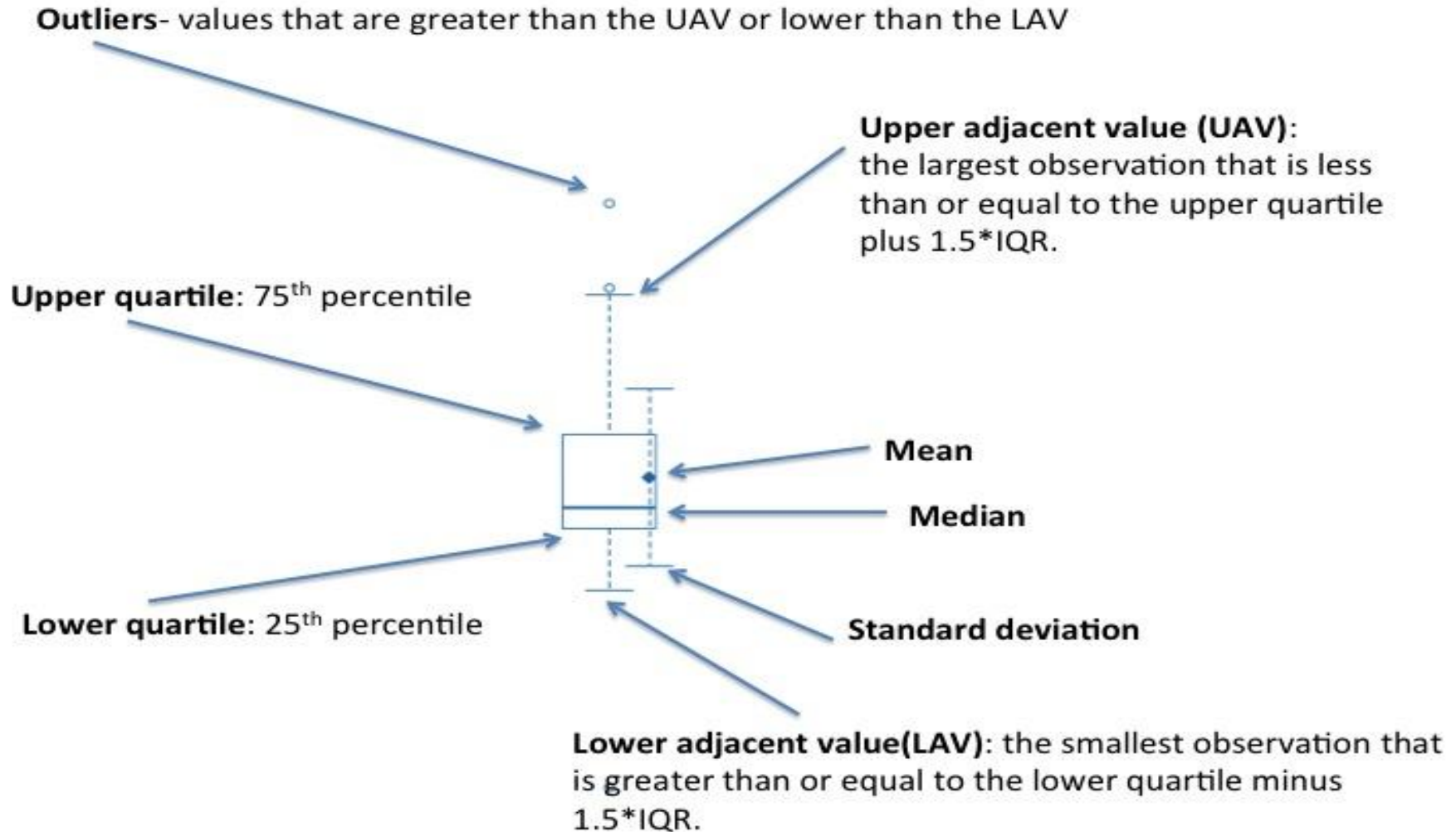
* These labs were from the same institute

Využití buněčných linií v biotechnologii

- Příprava monoklonálních protilátek
- Vývoj buněčných vakcín



Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) projekt



Caenorhabditis elegans

Dobře pěstovatelný na petriho misce

Velikost genomu 8×10^7 bp

Pohlaví determinováno chromosomem X

Drosophila melanogaster

Malé, snadno pěstovatelné, krátký životní cyklus (2 týdny), relativně malý genom ($1,4 \times 10^8$ bp), existence polytenních chromosomů, řada mobilních genetických elementů.

Transformační systém využívající mobilní genetický element P, po injikaci do embrya - tvorba mozajek (využití např. při studiu tkáňově specifické exprese)

Kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*)

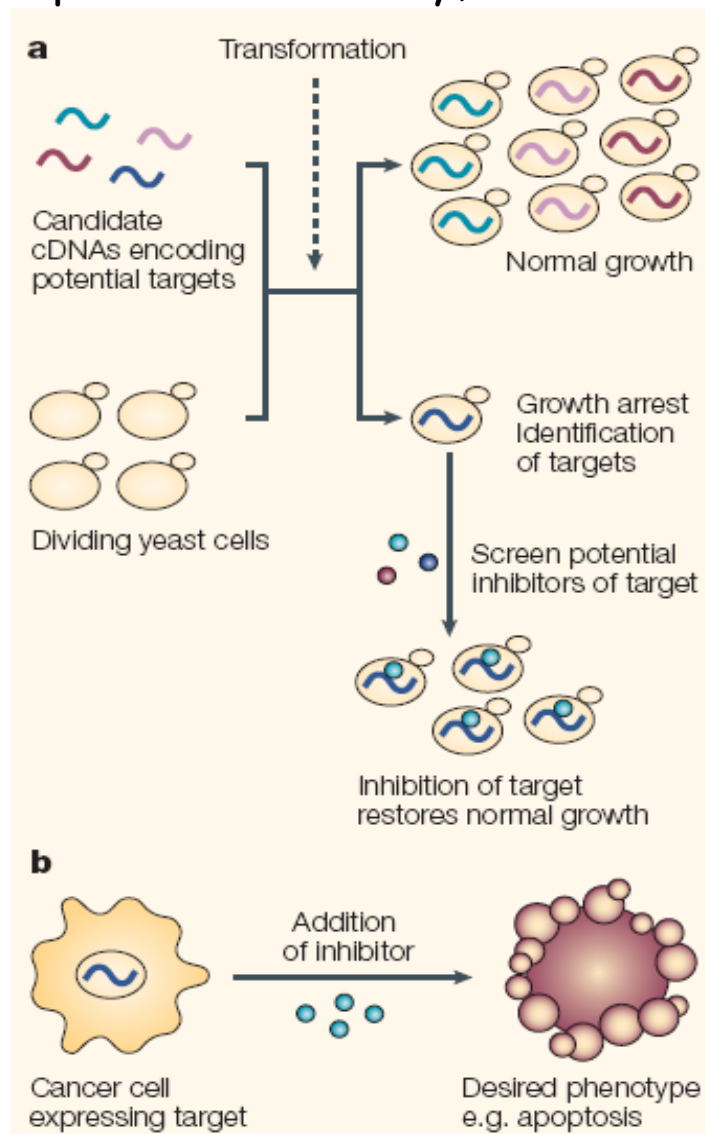
Snadno kultivovatelné, 1. eukaryotický organismus plně osekvenovaný, celá řada funkčních homologů se savčími buňkami

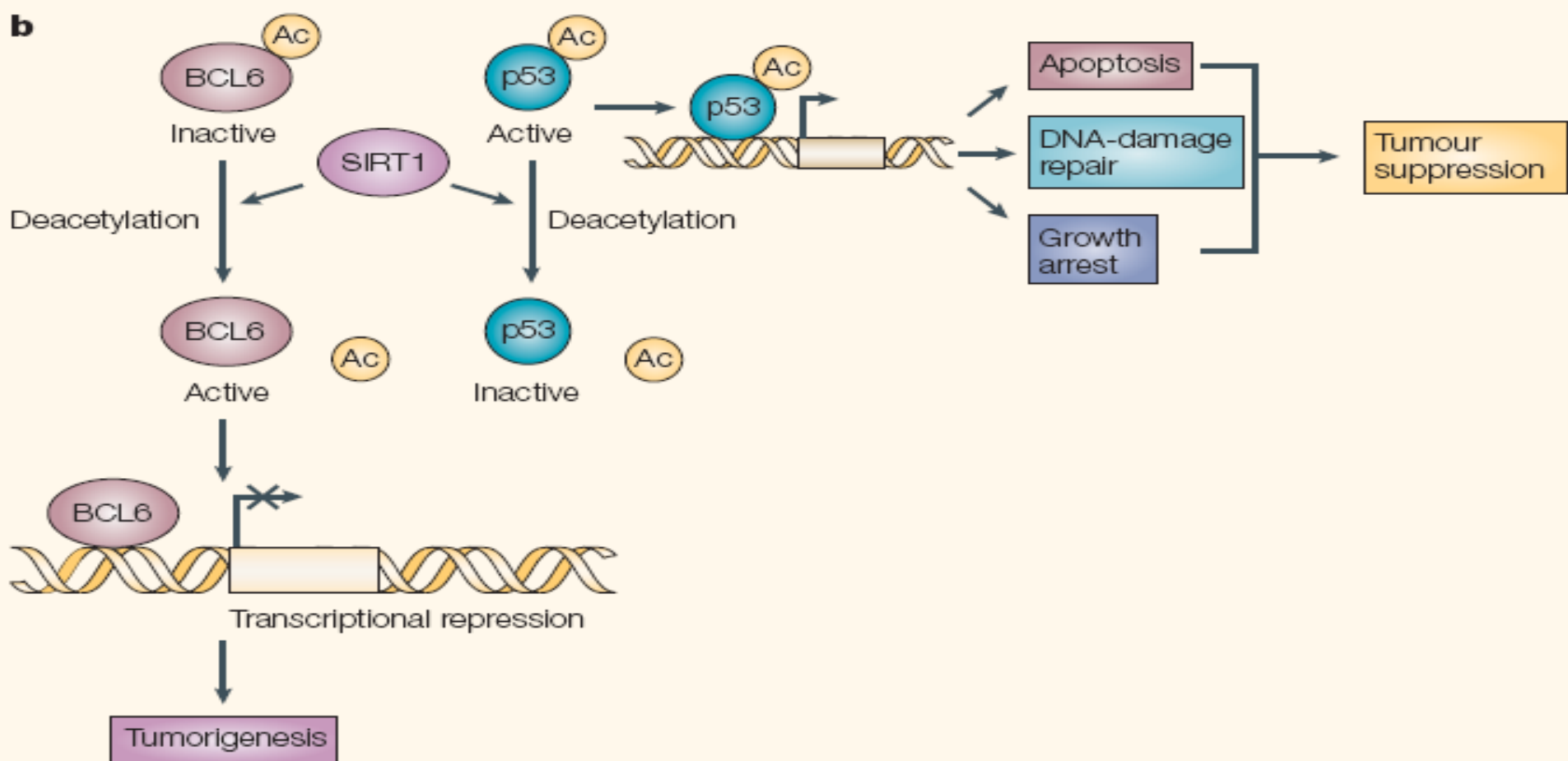
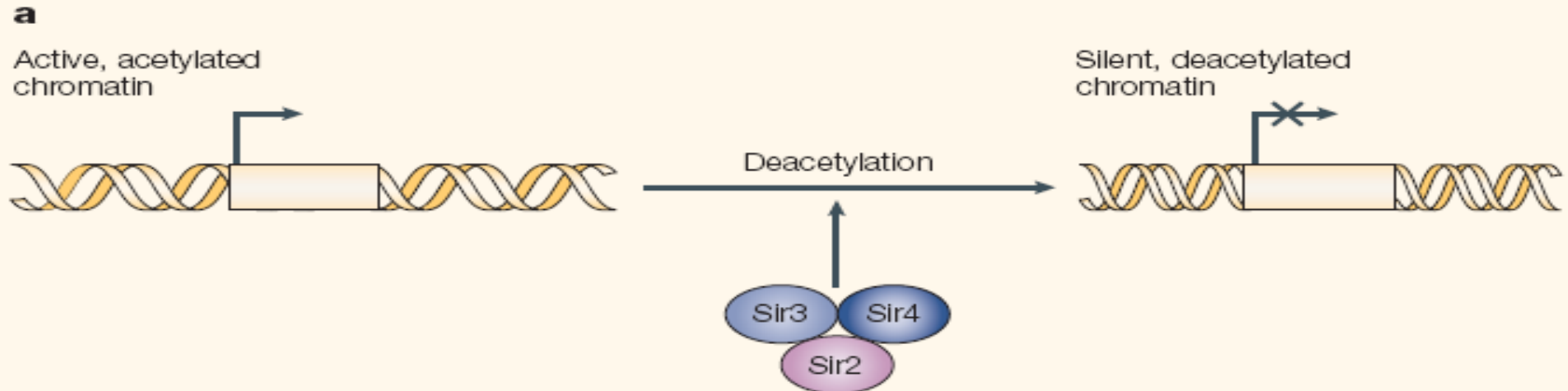
➡️ Vhodný model pro screening protinádorových léčiv

Table 1 | Conservation between yeast and human pathways altered in cancer

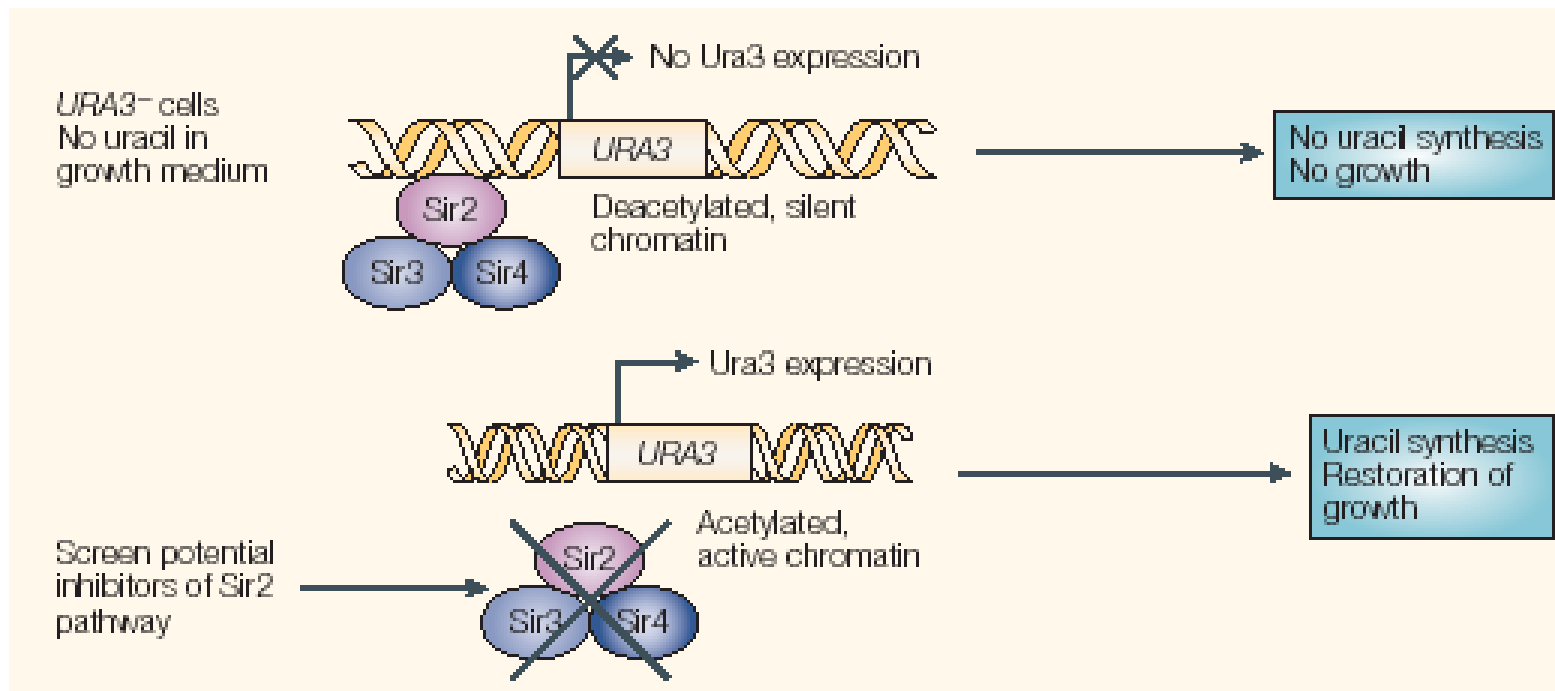
Cancer-related pathway	Human genes	Yeast genes
DNA-damage checkpoint	<i>ATM, ATR</i>	<i>RAD53</i>
Replication checkpoint	<i>BLM, WRN1</i>	<i>SGS1</i>
Mitotic-spindle-assembly checkpoint	<i>BUB1, BUBR1</i>	<i>BUB1</i>
Mismatch repair	<i>MLH1</i>	<i>MLH1</i>
Repair of DNA double-strand breaks	<i>BRCA1</i>	<i>RAD50, RAD52</i>
G1- to S-phase transition	<i>Cyclin D1, cyclin E</i>	<i>CLN2</i>
Response to mitogenic stimuli	<i>TOR</i>	<i>TOR1</i>

Pozitivní selekční screening





Příklad využití kvasinek při screeningu b. signalních drah při testování nových látek



Drosophila melanogaster

Malé, snadno pěstovatelné, krátký životní cyklus (2 týdny), relativně malý genom ($1,4 \times 10^8$ bp), existence polytenních chromosomů, řada mobilních genetických elementů.

Transformační systém využívající mobilní genetický element P, po injekci do embrya - tvorba mozajek (využití např. při studiu tkáňově specifické exprese)

Danio rerio (Zebrafish) jako model pro p53

p53-mutant vznik tumorů ze Schwanných buněk

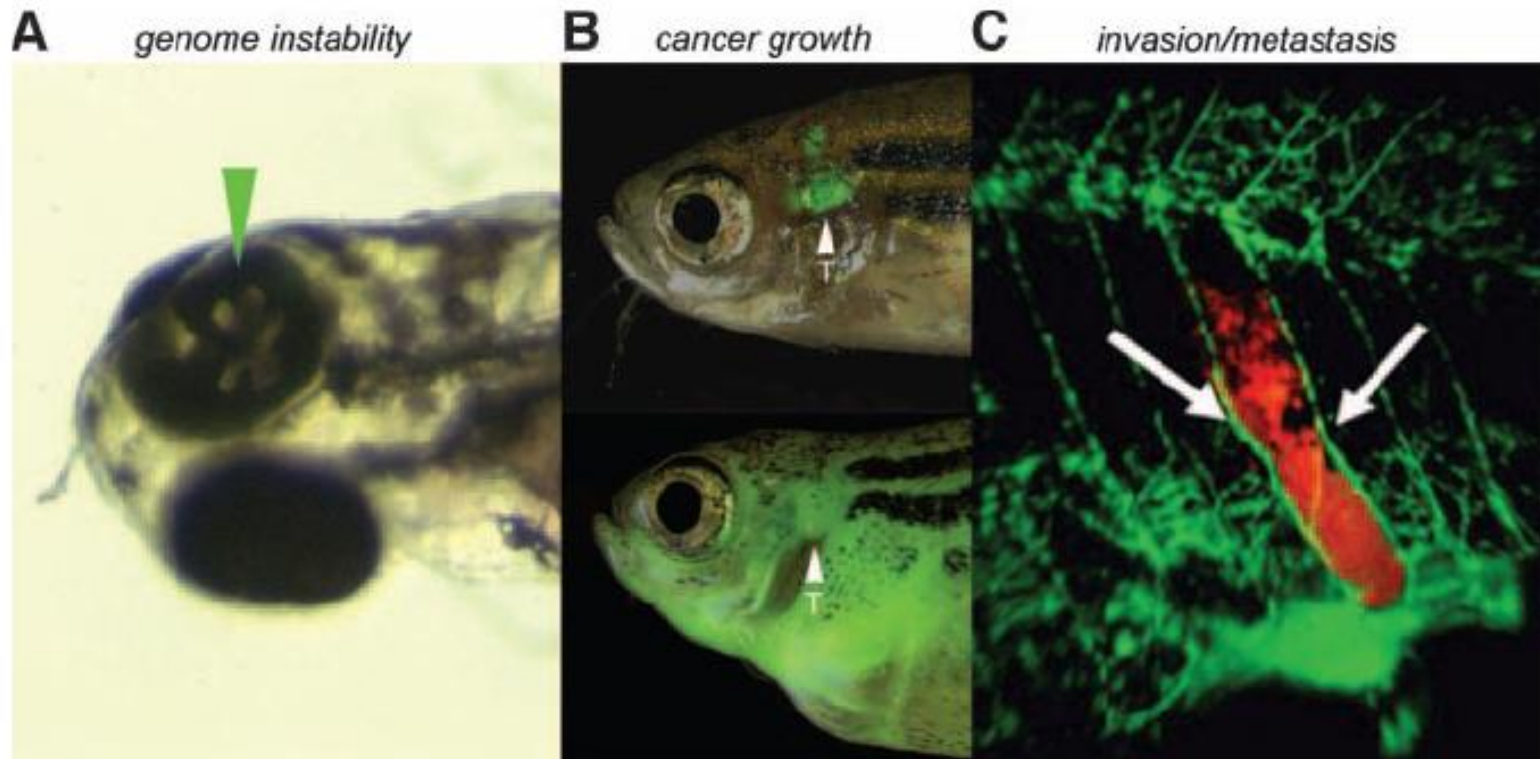
p53-mutace + mutace B-raf vznik maligního melanomu

Chemoterapie (jednoduchá aplikace, velké množství ryb, dlouhodobá léčba x nespecifická, predominance jaterních tumorů, potenciální riziko pro výzkumníka)

Transplantace savčích buněk (rychlost, průhledná embrya, lidské nádory, fluorescence x, nízká penetrance tumorů)

Genetické knockouty (Inaktivace jednoho specifického genu - N-ethyl-N-nitrosourea mutageneze, „Human-like cancer“ mutace x slabá penetrance, genové duplikace, rozdílné spektrum tumorů, „background“ mutace)

Expres transgenů (jednoduše generovatelné injekcí, použití lidských genů, použití fluorescence, tkáňově specifická exprese x nedostatek specifických promotorů)



Mus musculus

Příprava inbredních kmenů - možnost pokusů na geneticky uniformních organismech (více jak 700 mutovaných kmenů).

Obvykle se provádí tzv. „gene knockout“, tzn. funkční geny jsou nahrazeny nefunkčními nebo mírně pozměněnými variantami jež odpovídají genetickým změnám vzniklým v nádorové buňce.

Nejvýznamnější příspěvek k pochopení mechanismů lidských nádorových onemocnění.

Mus musculus

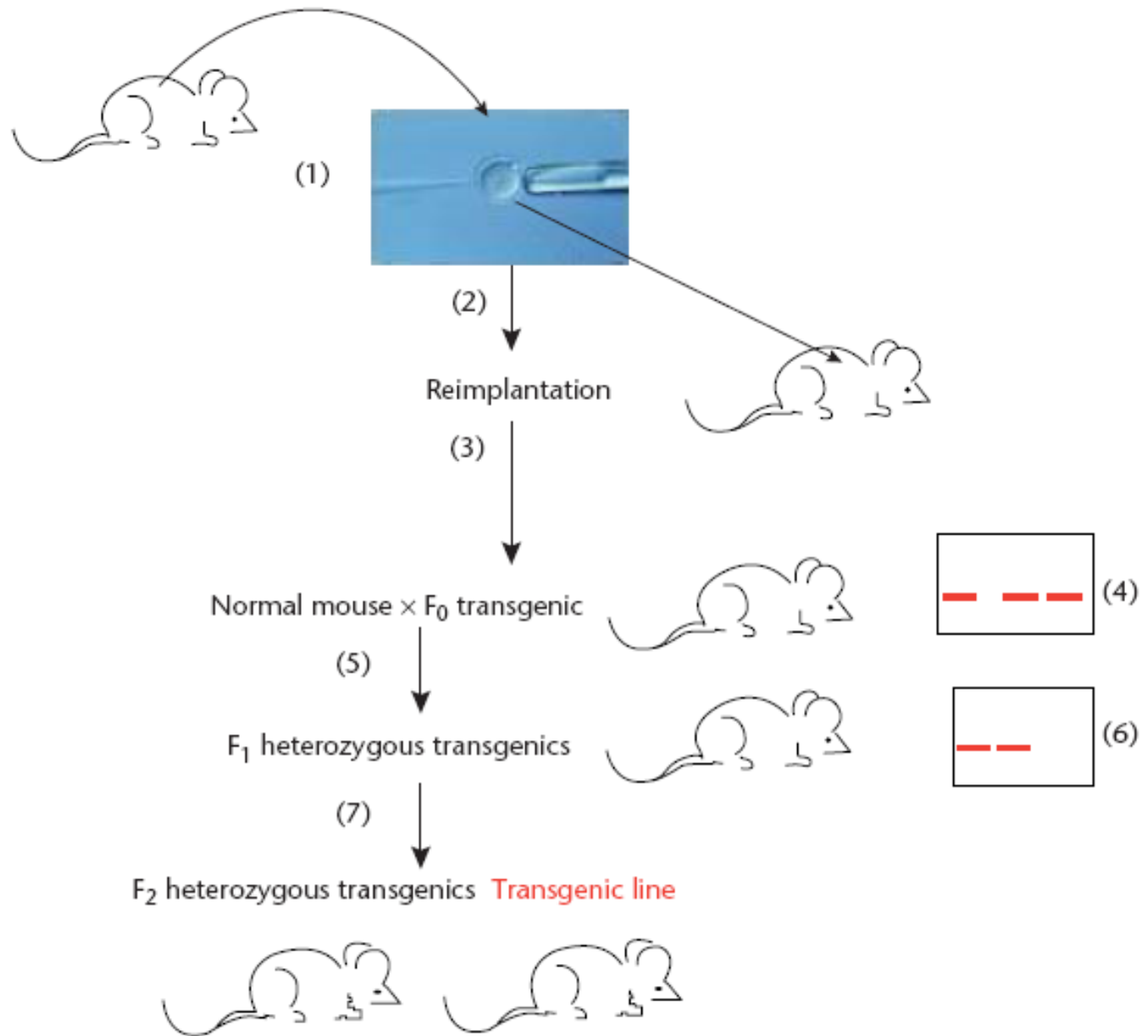
Příprava inbredních kmenů - možnost pokusů na geneticky uniformních organismech (více jak 700 mutovaných kmenů).

Obvykle se provádí tzv. „gene knockout“, tzn. funkční geny jsou nahrazeny nefunkčními nebo mírně pozměněnými variantami jež odpovídají genetickým změnám vzniklým v nádorové buňce.

Nejvýznamnější příspěvek k pochopení mechanismů lidských nádorových onemocnění.

4 metody přenosu GI:

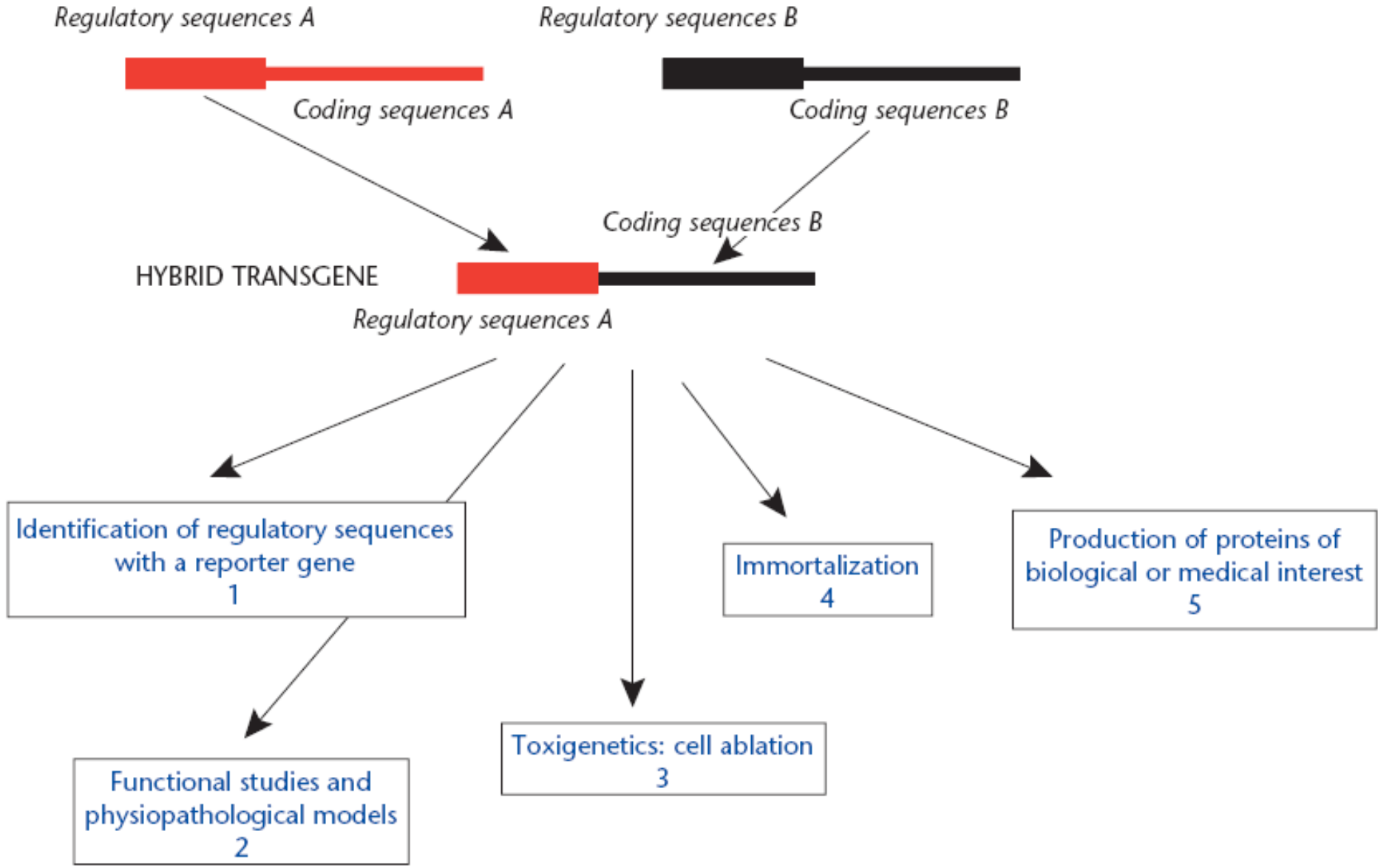
- Infekce buněk kostní dřeně rekombinantním retrovirem umožní expresi přeneseného genu v infikovaném zvířeti
- Infekce embrya pomocí rekombinantního retrovirového vektoru
- Transformace embryonálních kmenových buněk
- Klonovaná DNA může být mikroinjikována do fertilizovaných oocytů a přenesena do náhradní matky

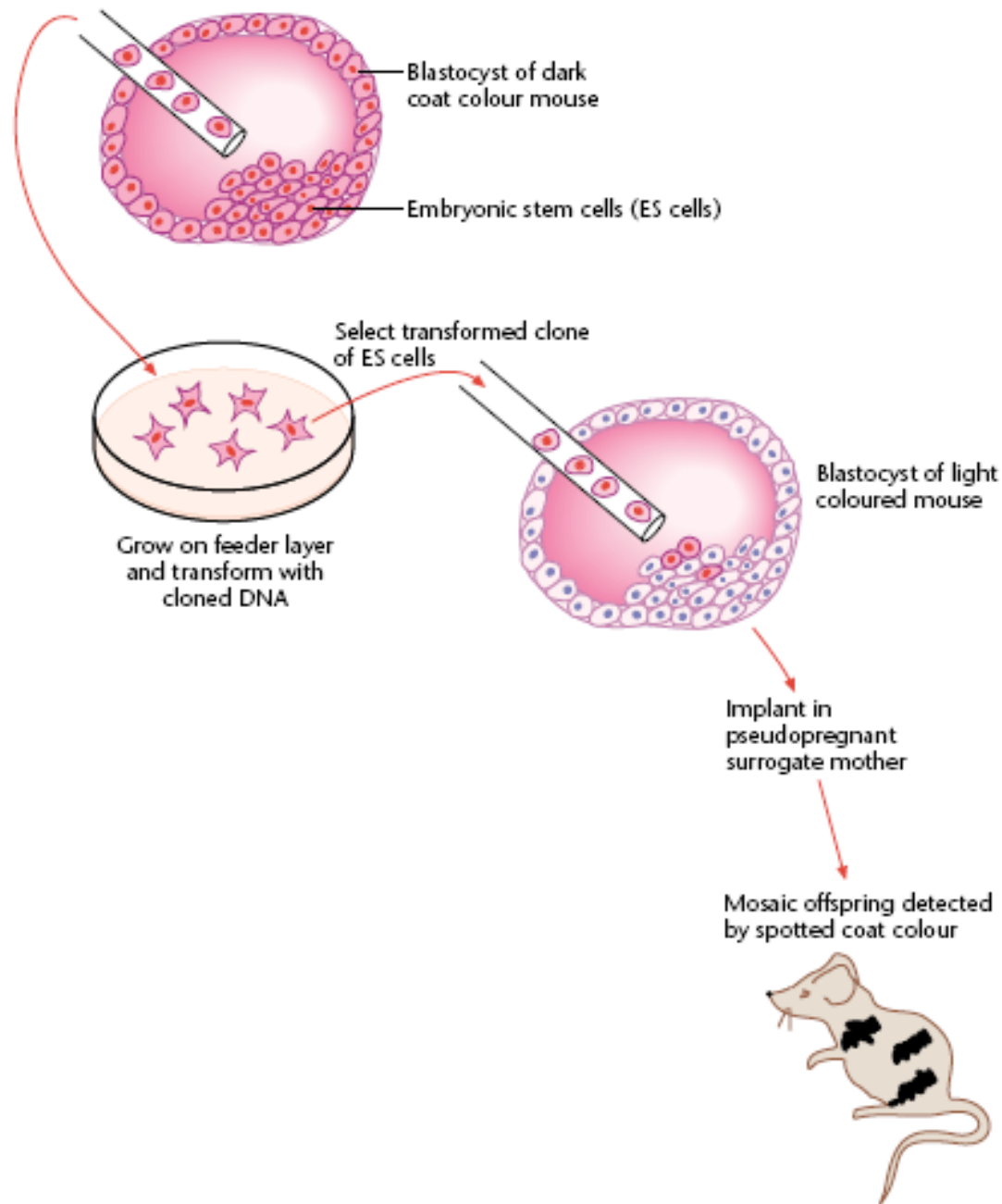


*Poprvé gen pro elastázu, nezbytná 134 bp regulační oblast pro správnou funkci

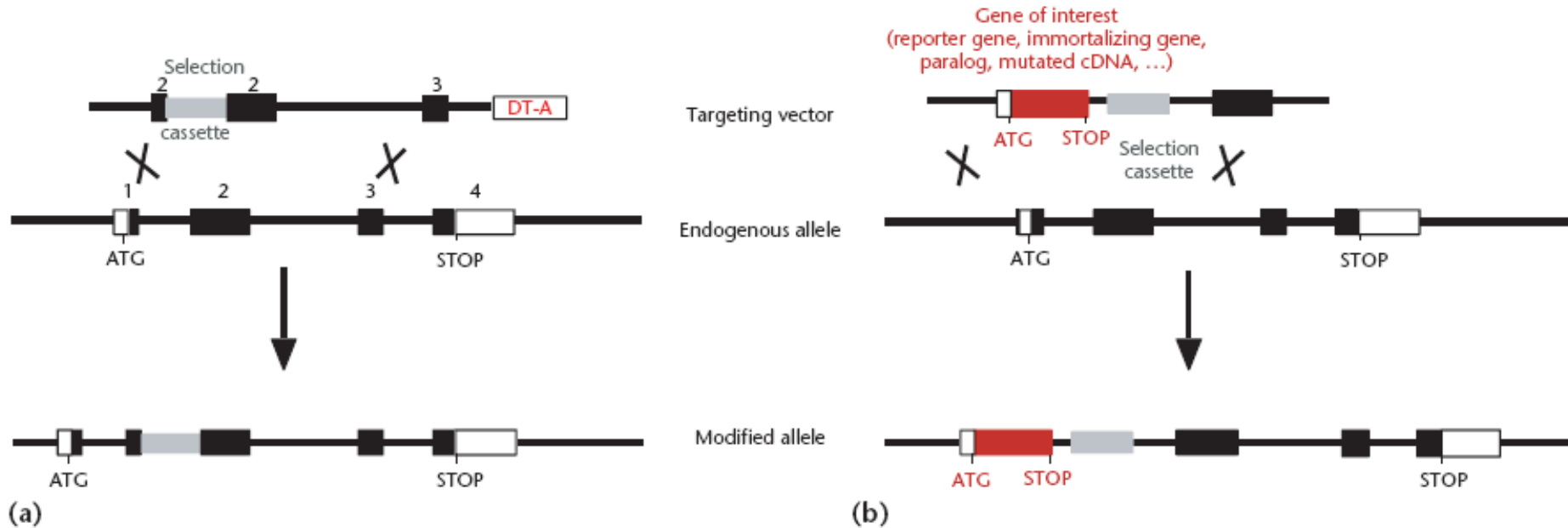
*Náhodný charakter integrace \rightarrow poziční efekt !!! (YACs & BACs)

„Hybridní transgen“





Knockout and knockin



Využití homologní rekombinace u ES buněk (více jak 1000 genů "KO")

Odběr biologického materiálu

Obecné zásady při odběru klinického materiálu:

- „logistika“ zpracování
- manipulace s odběrovými nástroji
- načasování

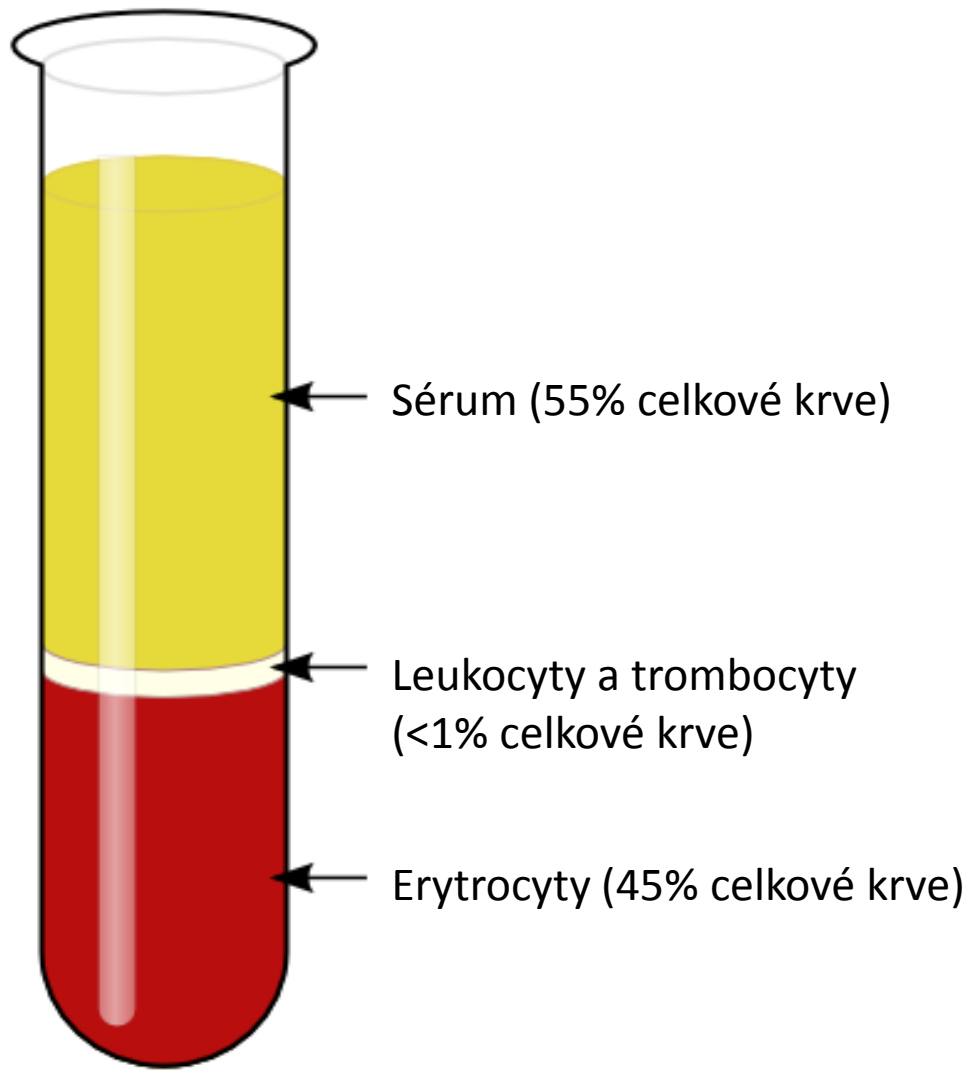
Krev (5-10 ml, chelatační činidla, vyšetření zánětlivých determinant, hladiny cukrů, hormonů, onkomarkerů, bílkovin krevního séra a dalších.)

Separace krevních buněk

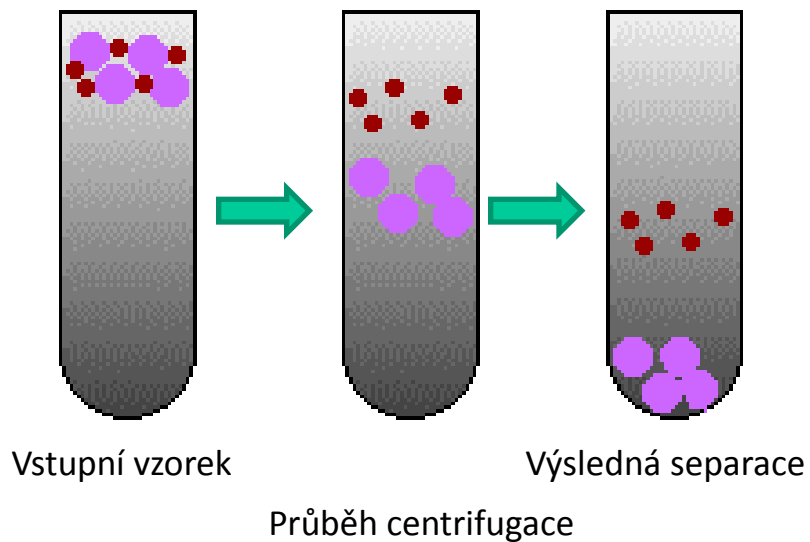
- Imunoafinitní separace
- Imunomagnetická separace
- Sortování buněk

Základní separační techniky

A

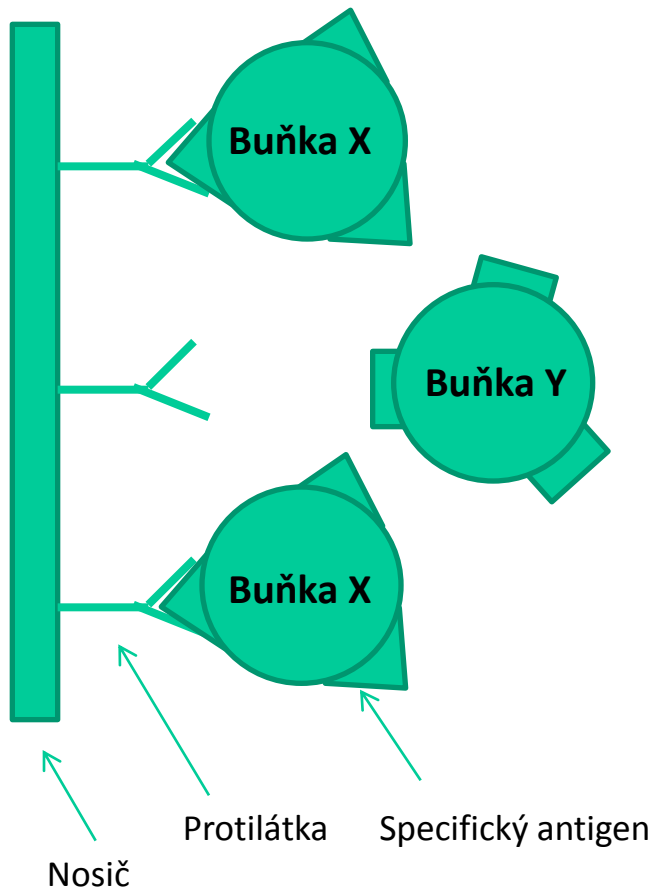


B

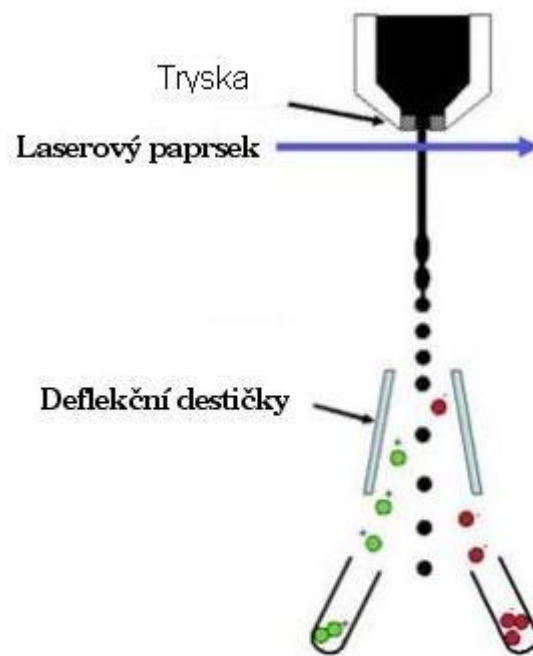


Separační techniky využívající monoklonální protilátky

A

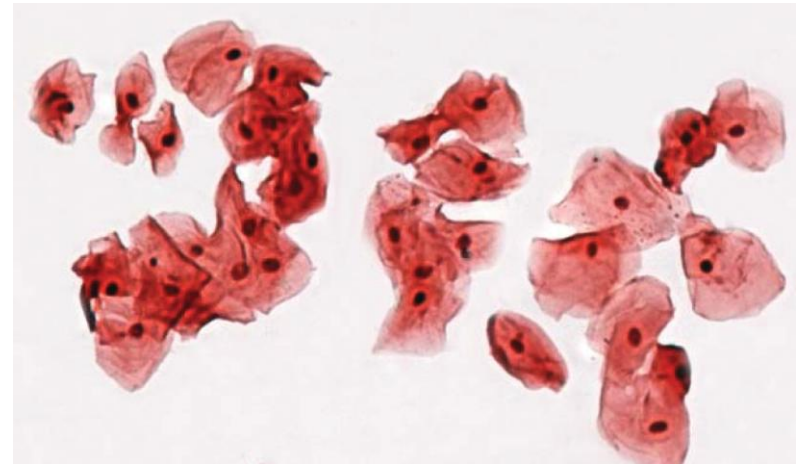


B



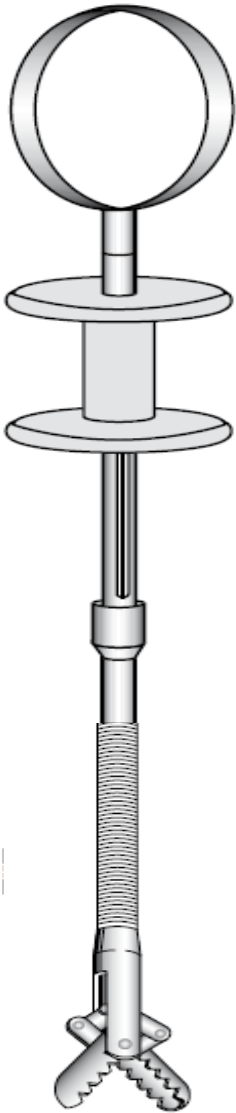
Další biologický materiál

- Kostní dřeň
- Moč
- Sliny
- Bukální sliznice
- Plodová voda
- Choriové klky
- Fibroblasty (kožní biopsie)
- Tkáně - N2
 - FFPE

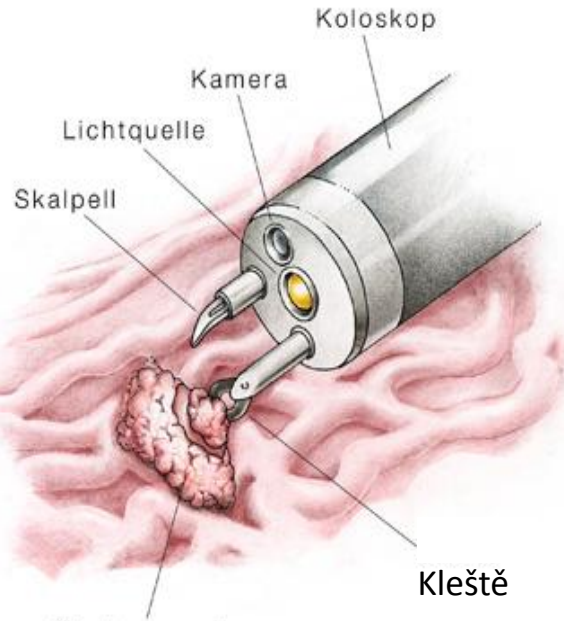


Přehled způsobů odběru tkáně

A



B

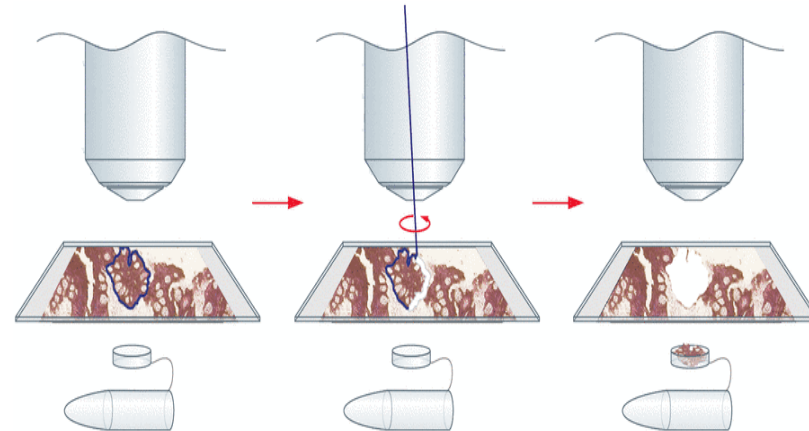


Dysplazie střevní sliznice

C



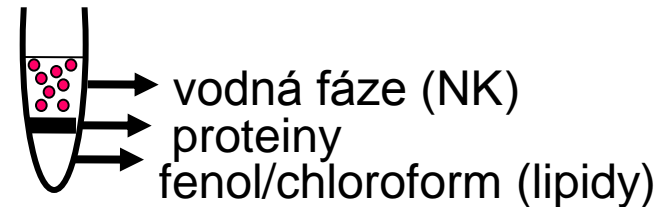
D



Izolace nukleových kyselin

- Umístění buněk/tkání do extrakčního pufu
- Dlouhodobé uchování (RNA later, chelatační činidla)

Fenol/chloroformová extrakce a následně etanolová nebo isopropanolová precipitace



Metody adsorpční

Adsorpce NK na silikagel v přítomnosti chaotropních solí (guanidin isothiokyanát, NaI), eluce přes kolonky

Metody vysolovací

obchází použití organických rozpouštědel, při izolaci z krve nejprve hemolýza, následuje izolace DNA z leukocytů

Koncentrace, kontrola čistoty a kvality DNA / RNA

A260 = 1, c(dsDNA) = 50 µg/ml

A260 = 1, c(ssDNA) = 33 µg/ml

A260 = 1, c(ssRNA) = 40 µg/ml

A260/A280 v rozmezí 1,7 - 1,8 čistá DNA

A260/A280 < 1,7 DNA znečištěná proteiny nebo organickými látkami

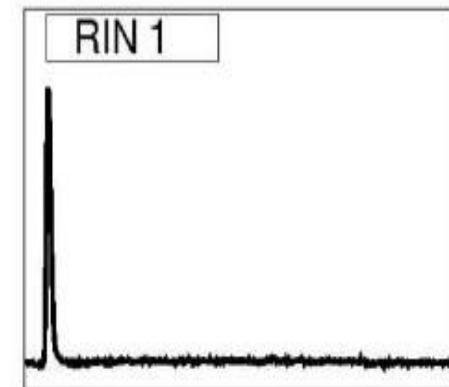
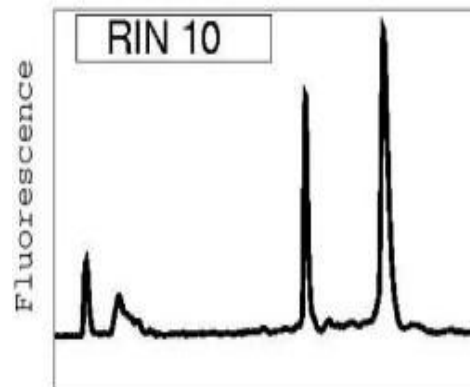
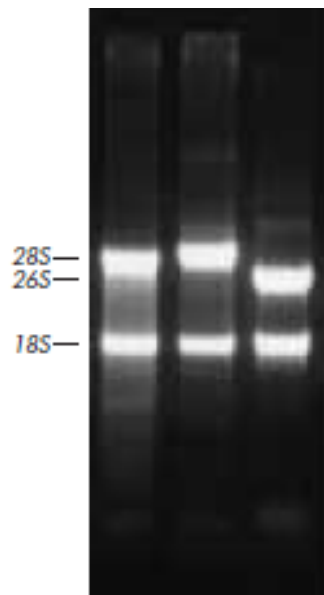
A260/A280 > 1,9 DNA znečištěná RNA nebo organickými látkami

A260/A280 = 1,9 – 2,1

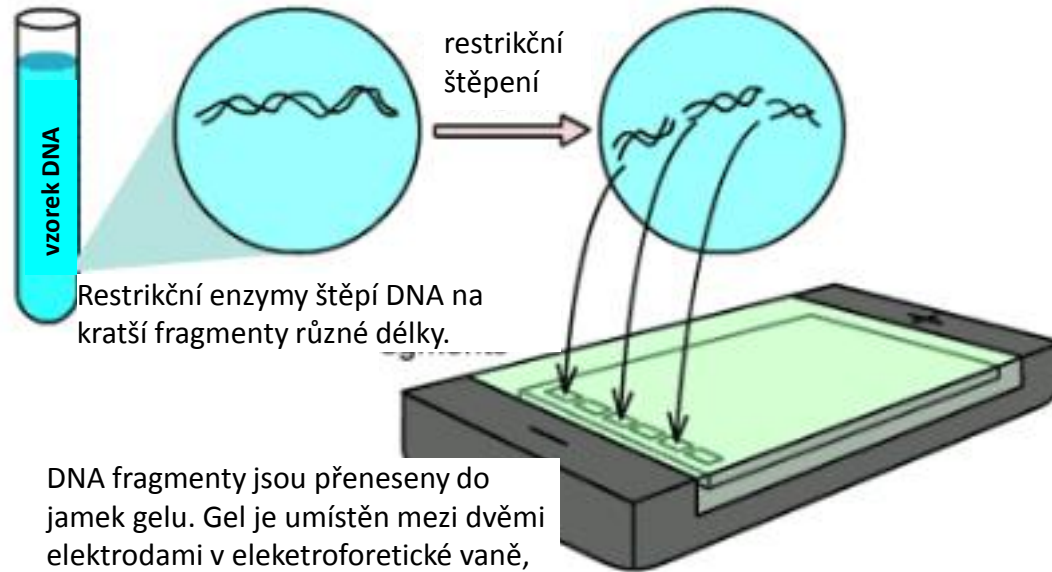
čistá RNA

A260/A280 < 1,9

RNA znečištěná proteiny nebo organickými látkami

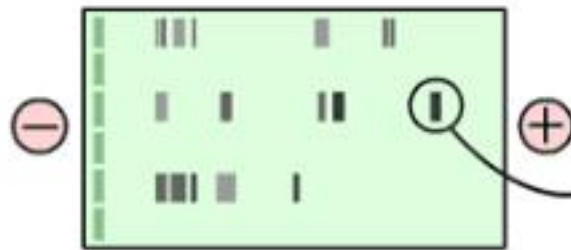


Gelová elektroforéza nukleových kyselin



DNA fragmenty jsou přeneseny do jamek gelu. Gel je umístěn mezi dvěma elektrodami v elektroforetické vaně, která je naplněna elektroforetickým pufrům.

DNA fragmenty migrují v elektrickém poli ke kladně nabitě anodě.



Kratší fragmenty migrují v gelu snadněji a tedy rychleji oproti delším fragmentům a v časovém intervalu urazí v gelu větší vzdálenost.

Další elektroforetické metody

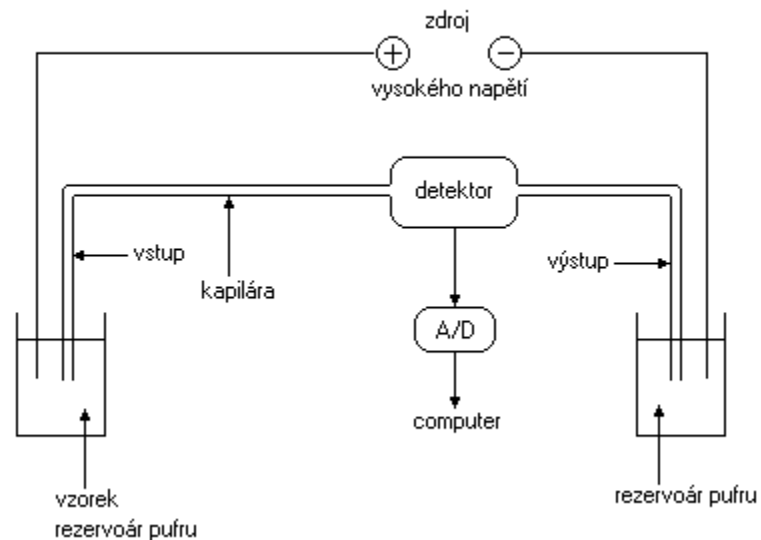
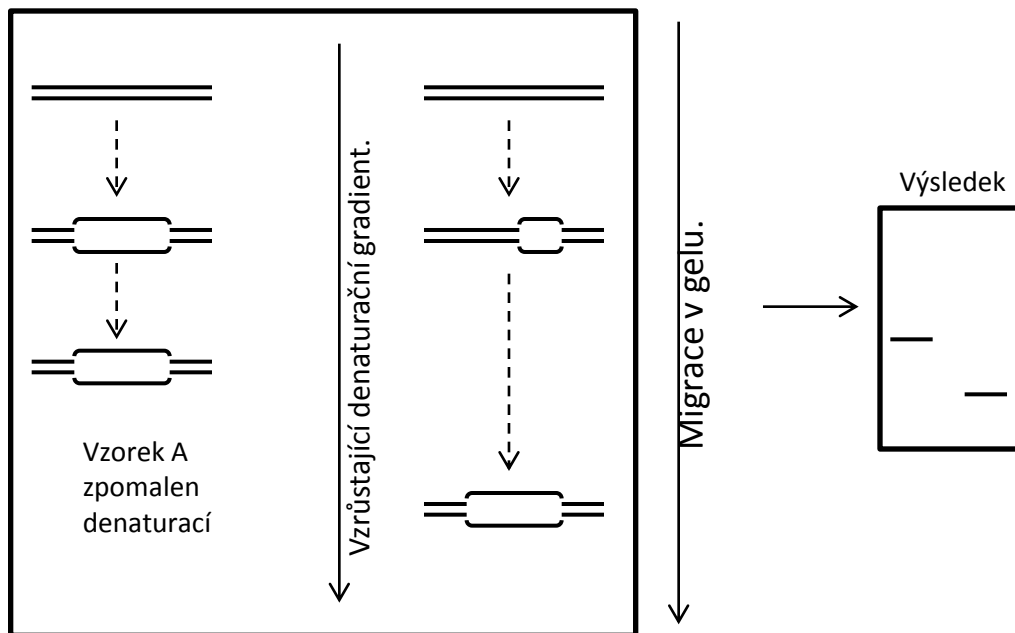
PFGE

DGGE

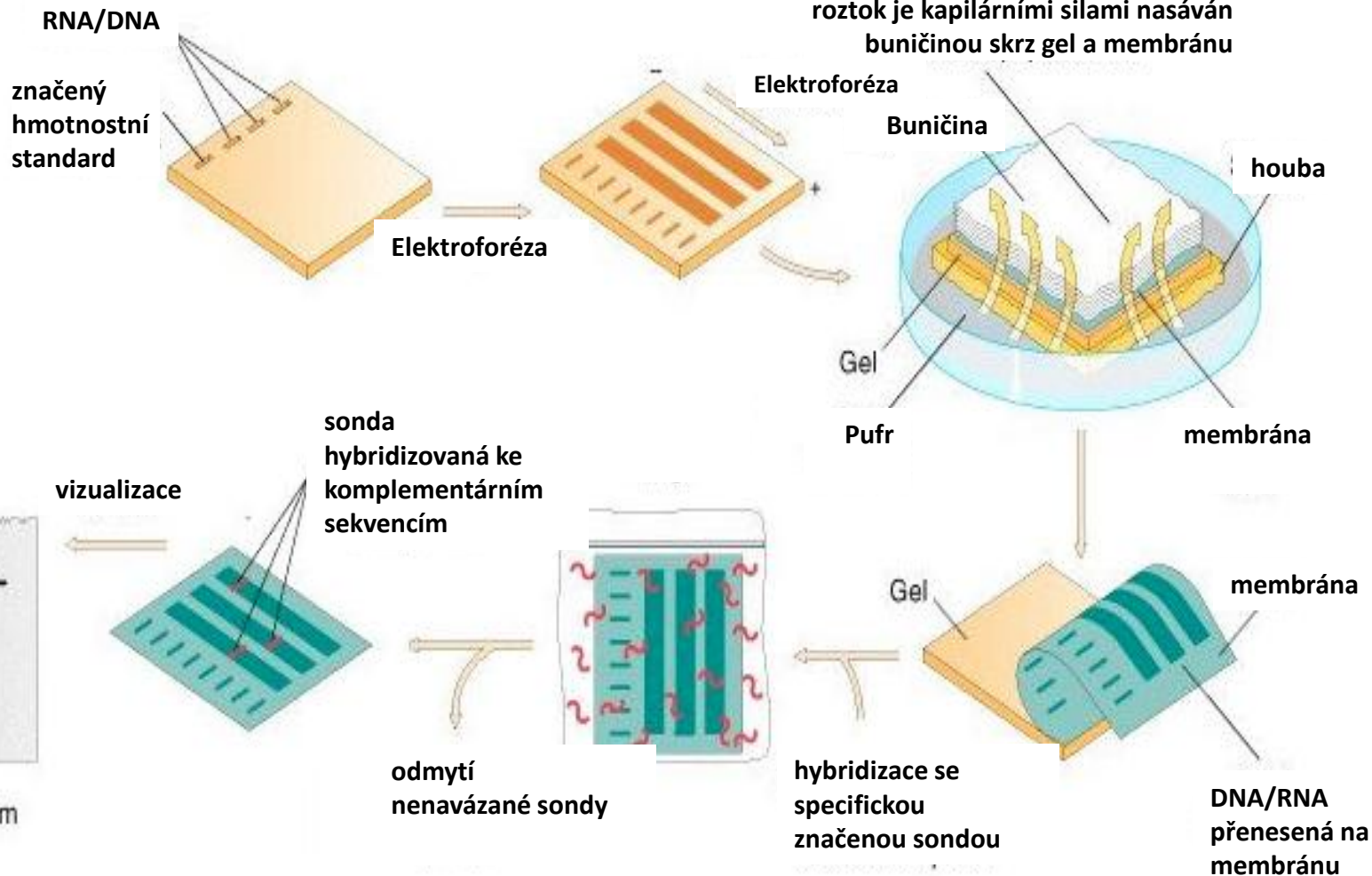
Kapilární elfo

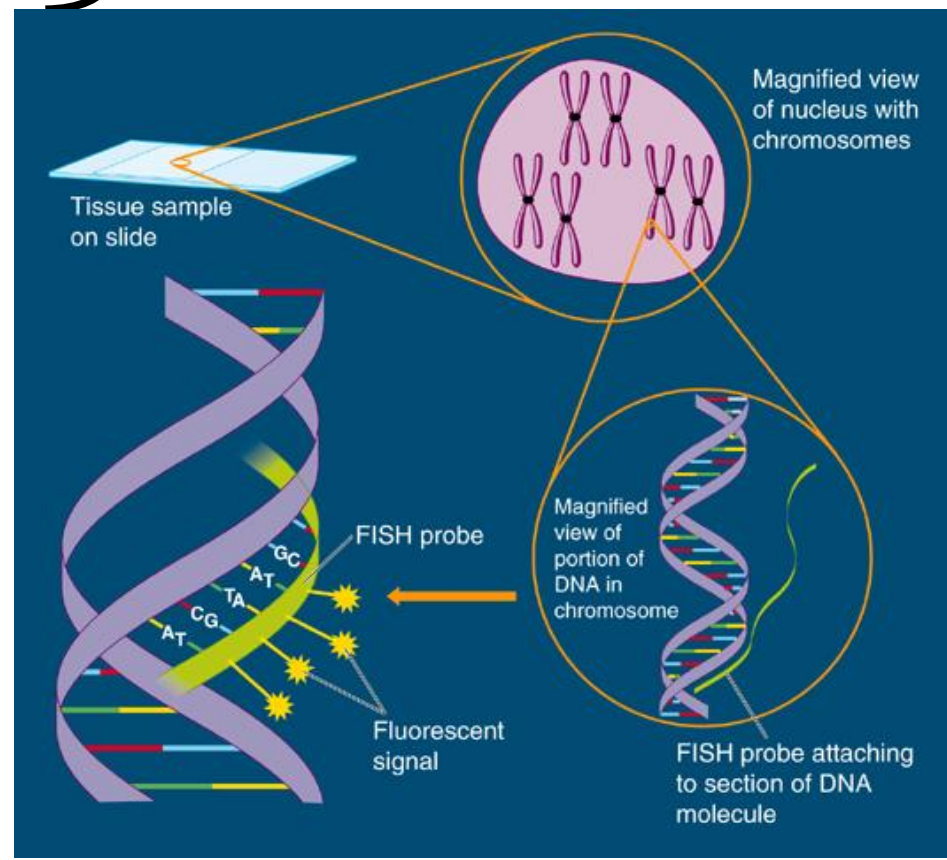
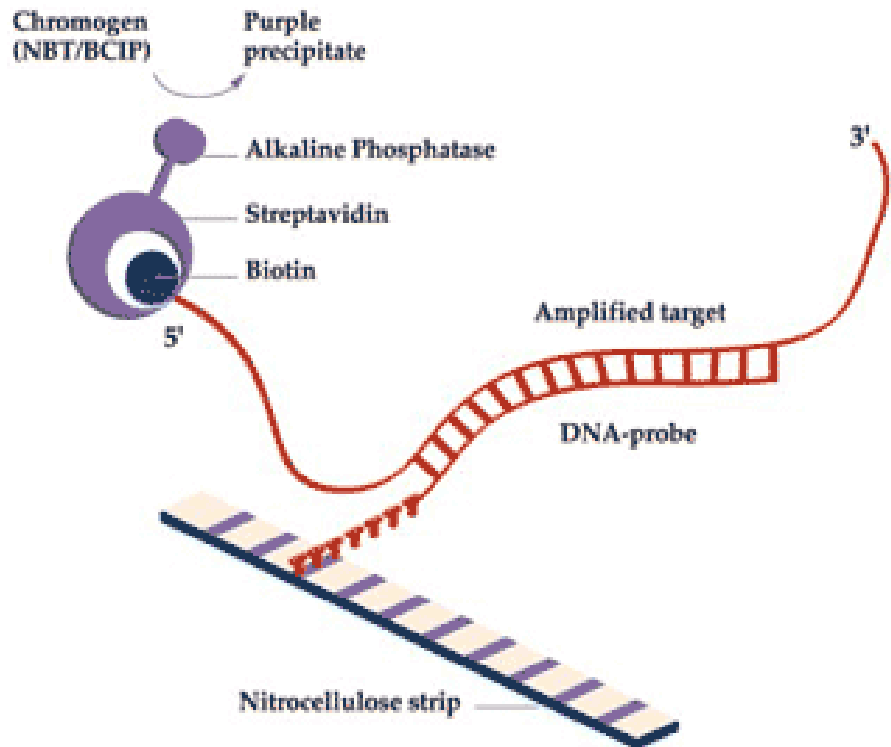
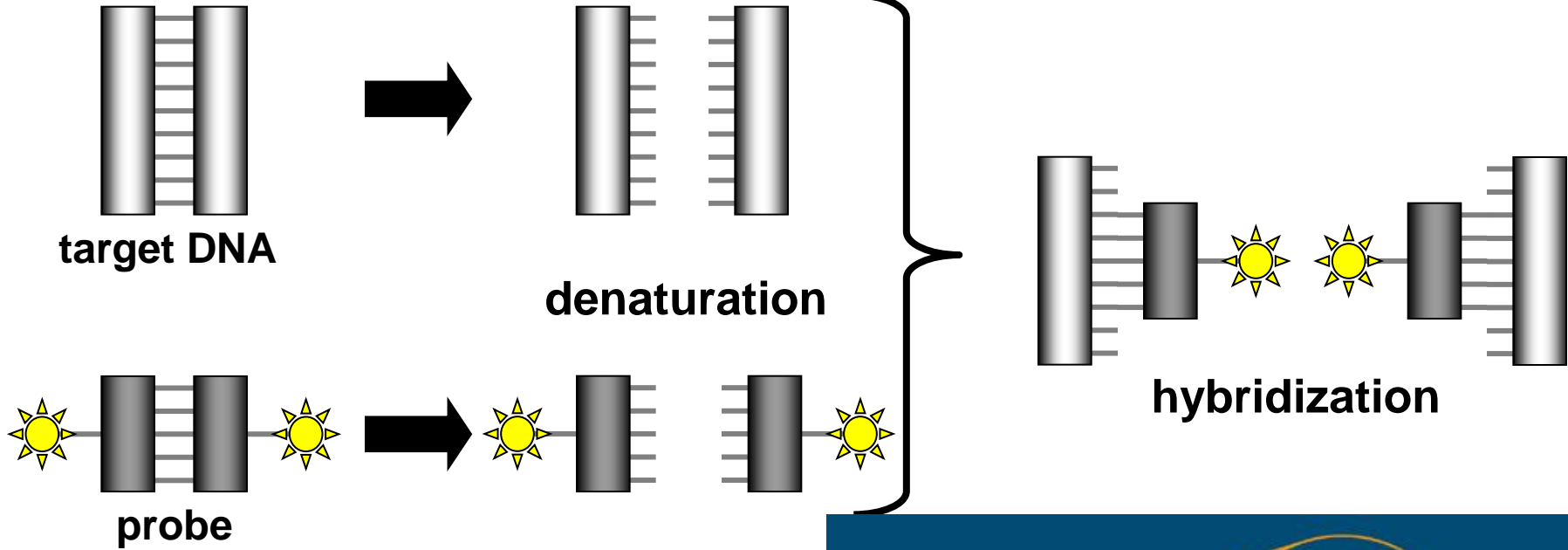


↓ Elektroforéza



Southernův přenos

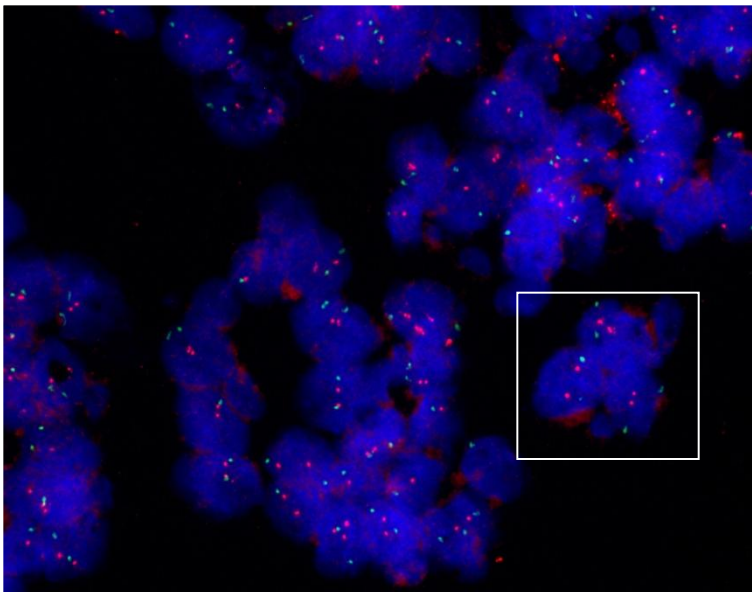




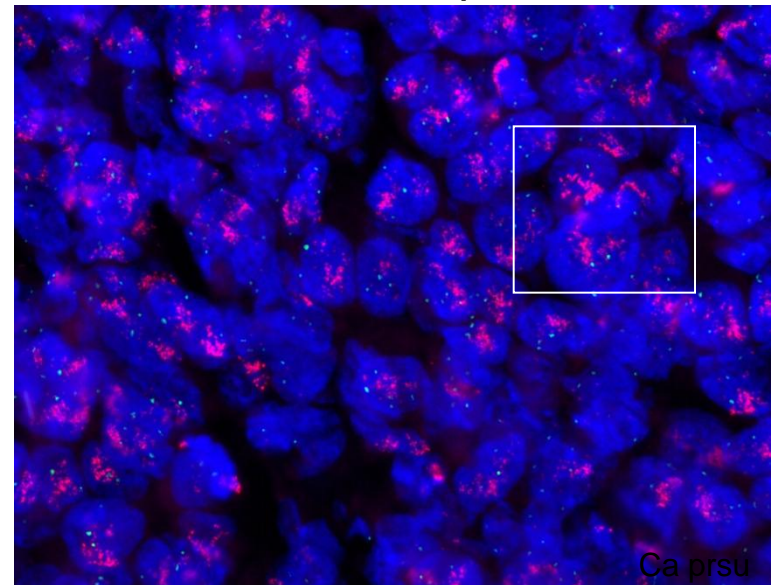
- **Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)**

- Lokalizace vybraných nukleotidových sekvencí přímo v buňkách
- Schopnost jednořetězcové sondy vázat komplementární úsek cílové DNA fixované na mikroskopickém skle
- TOP2A, EGFR, Her-2/neu

TOP2A normál



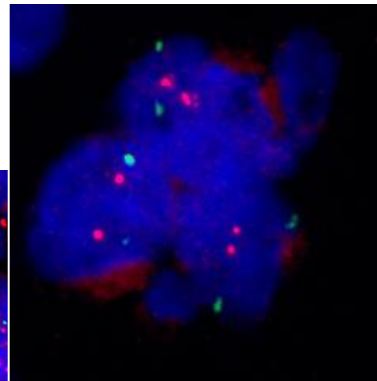
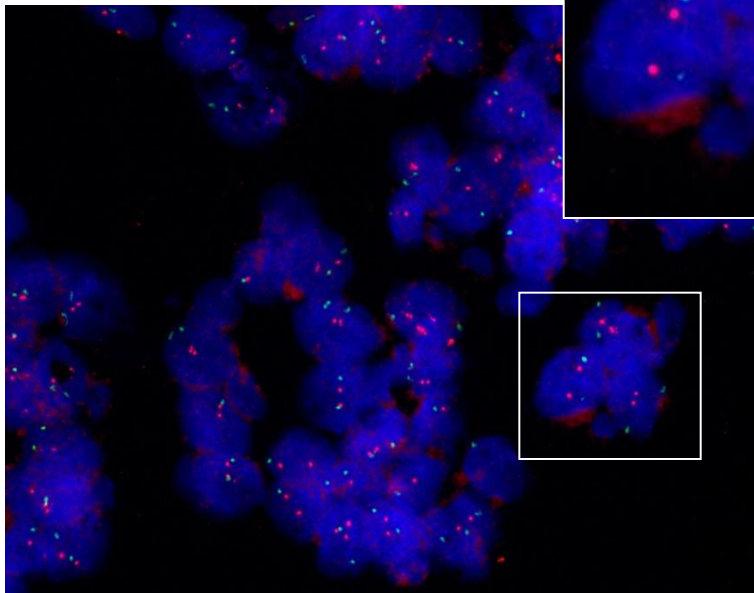
TOP2A rozsáhlá amplifikace



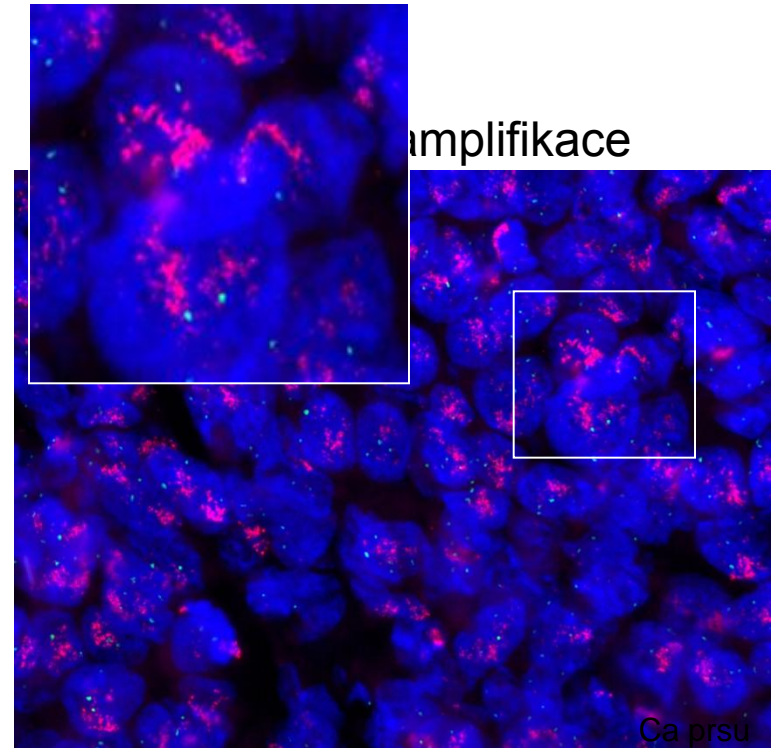
- **Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)**

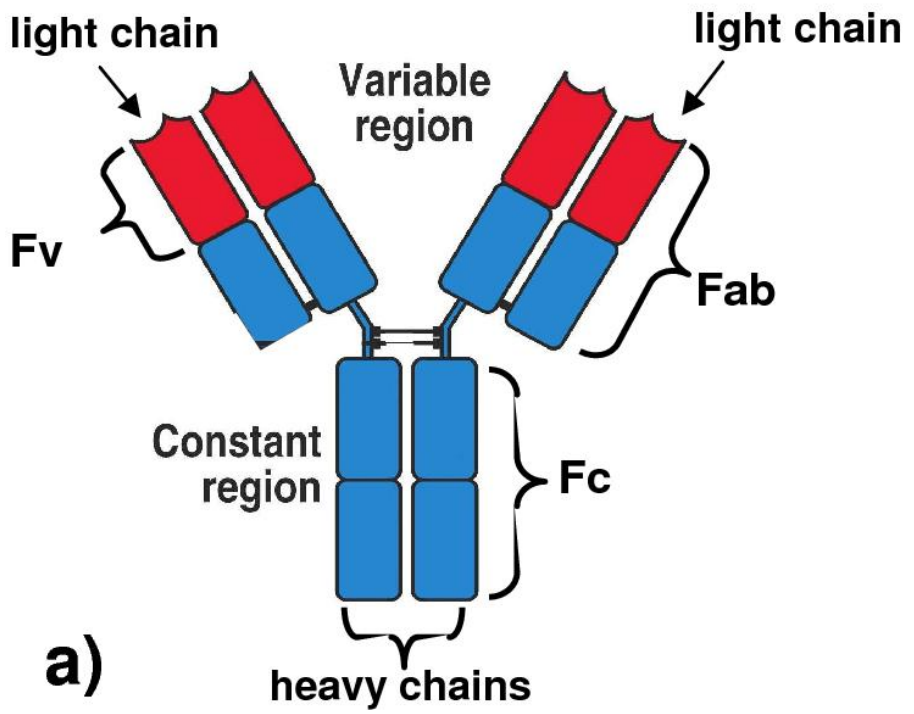
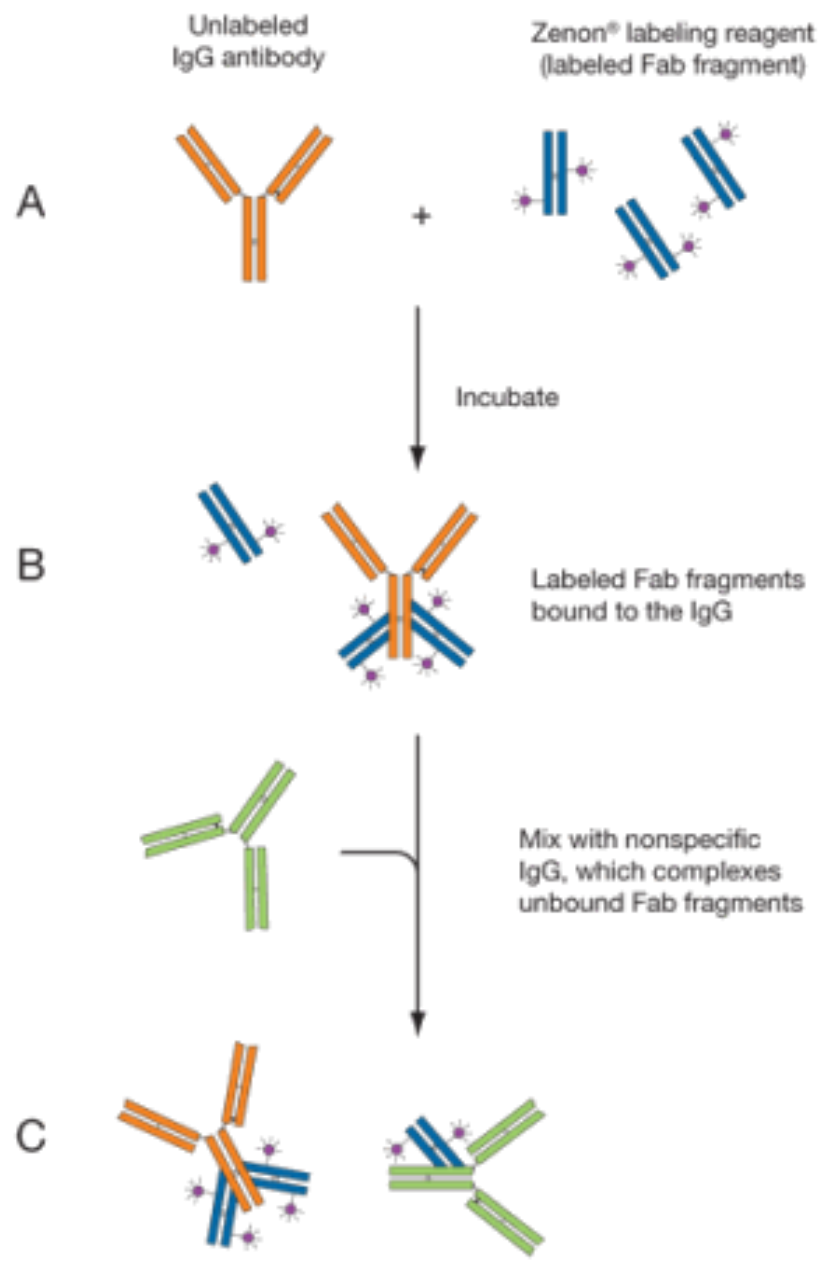
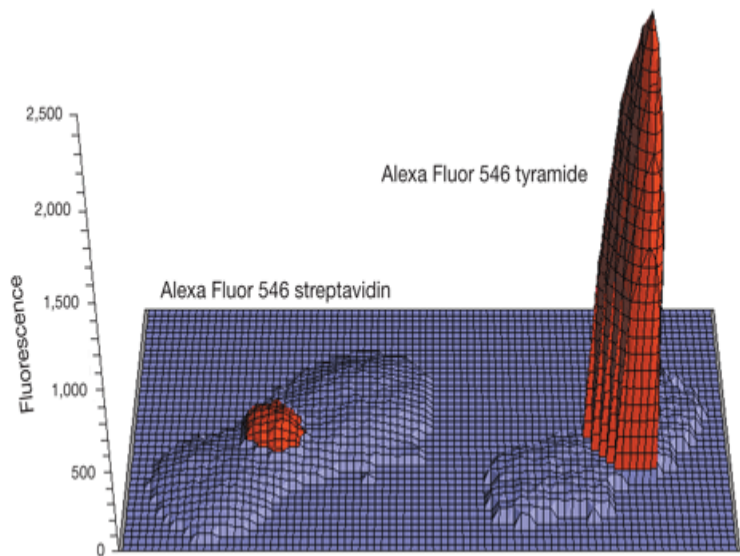
- Lokalizace vybraných nukleotidových sekvencí přímo v buňkách
- Schopnost jednořetězcové sondy vázat komplementární úsek cílové DNA fixované na mikroskopickém skle
- TOP2A, EGFR, Her-2/neu

TOP2A norma



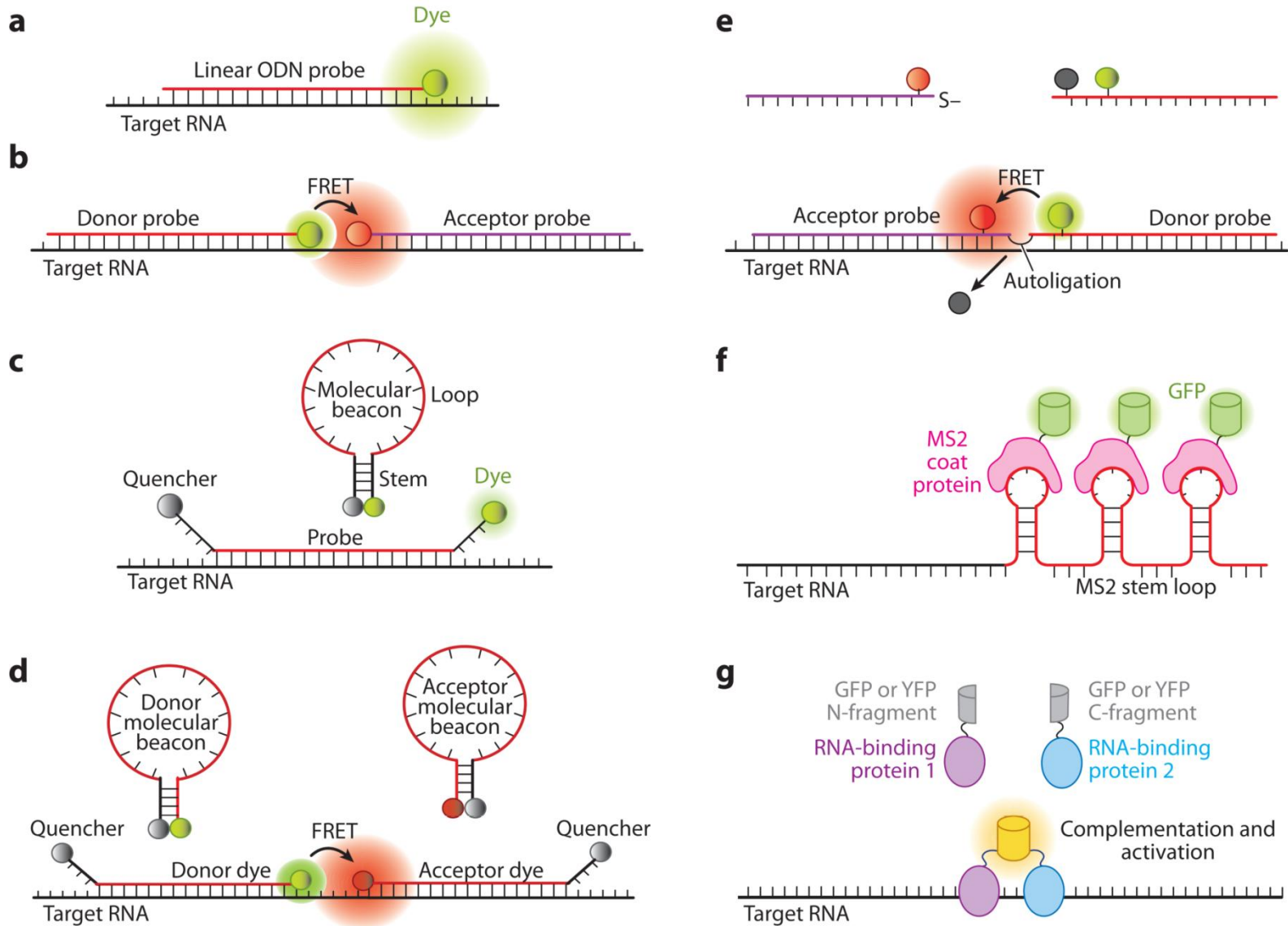
amplifikace



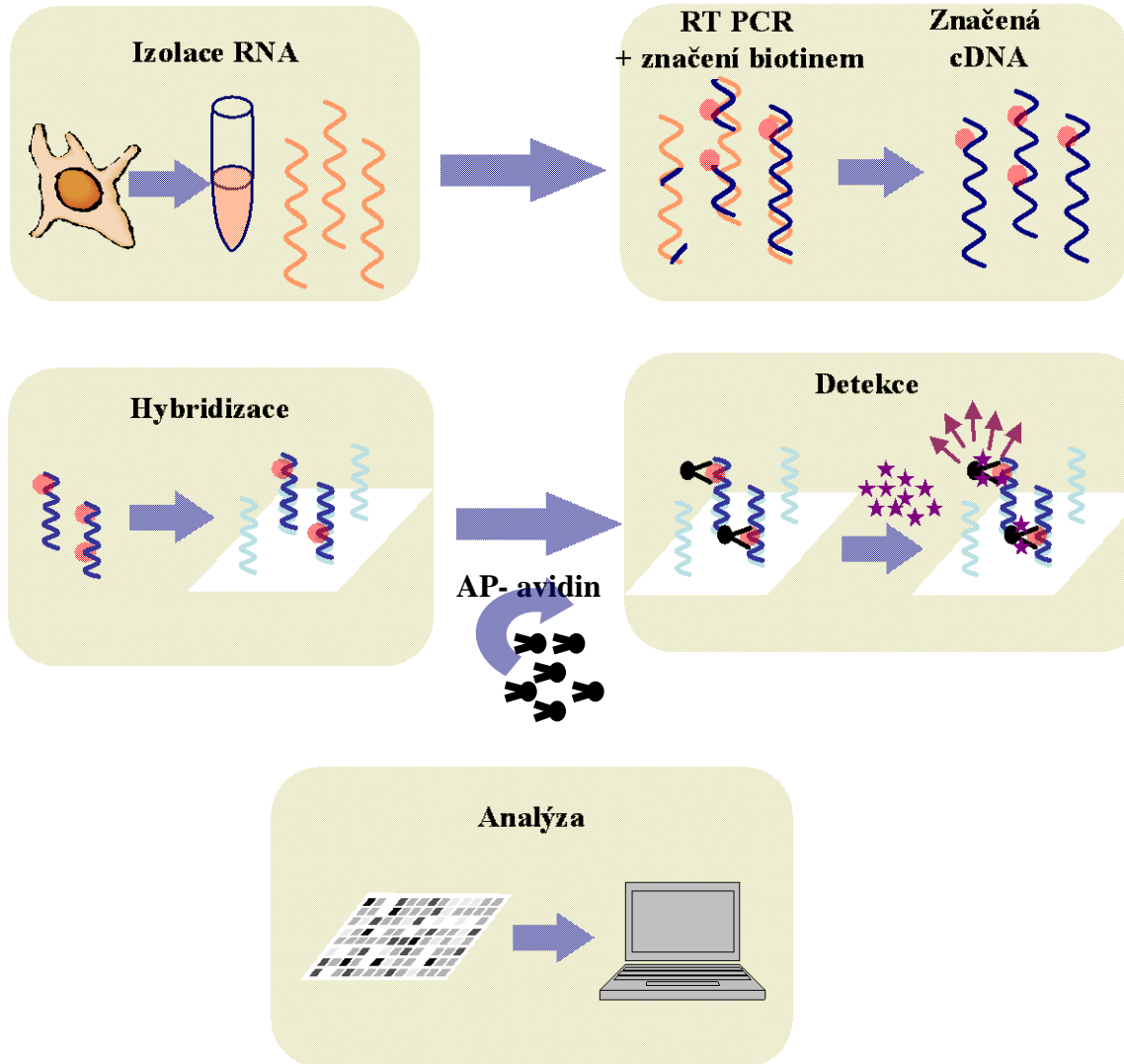


a)

RNA sondy



Nízkohustotní arrays

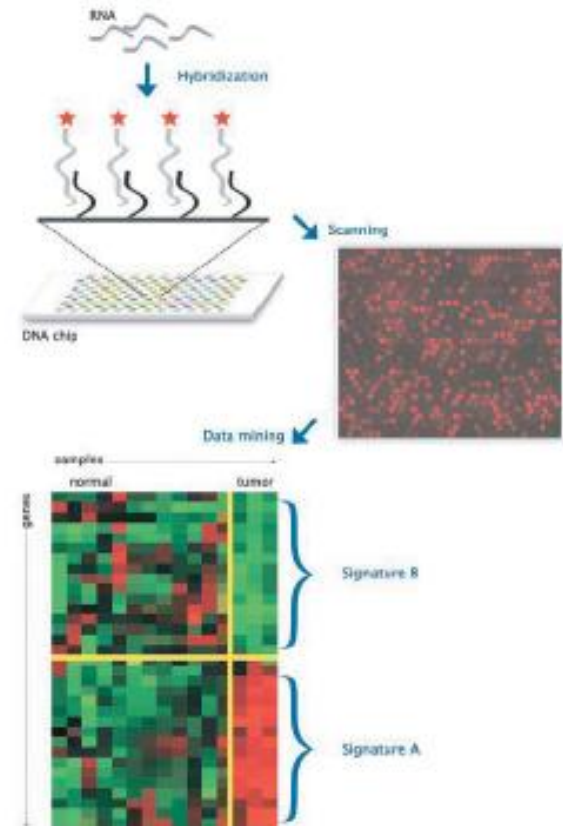


Průkaz onkologických markerů pomocí DNA-mikroarray testů

Tato technika spočívá v umístění tisíců imobilizovaných DNA sekvencí oligonukleotidových značek v miniaturizovaném čipu. Povrchy jako je sklo nebo plast umožnily využít fluorescenční signály, zvýšení reproducibility a rychlosti hybr. kinetiky.

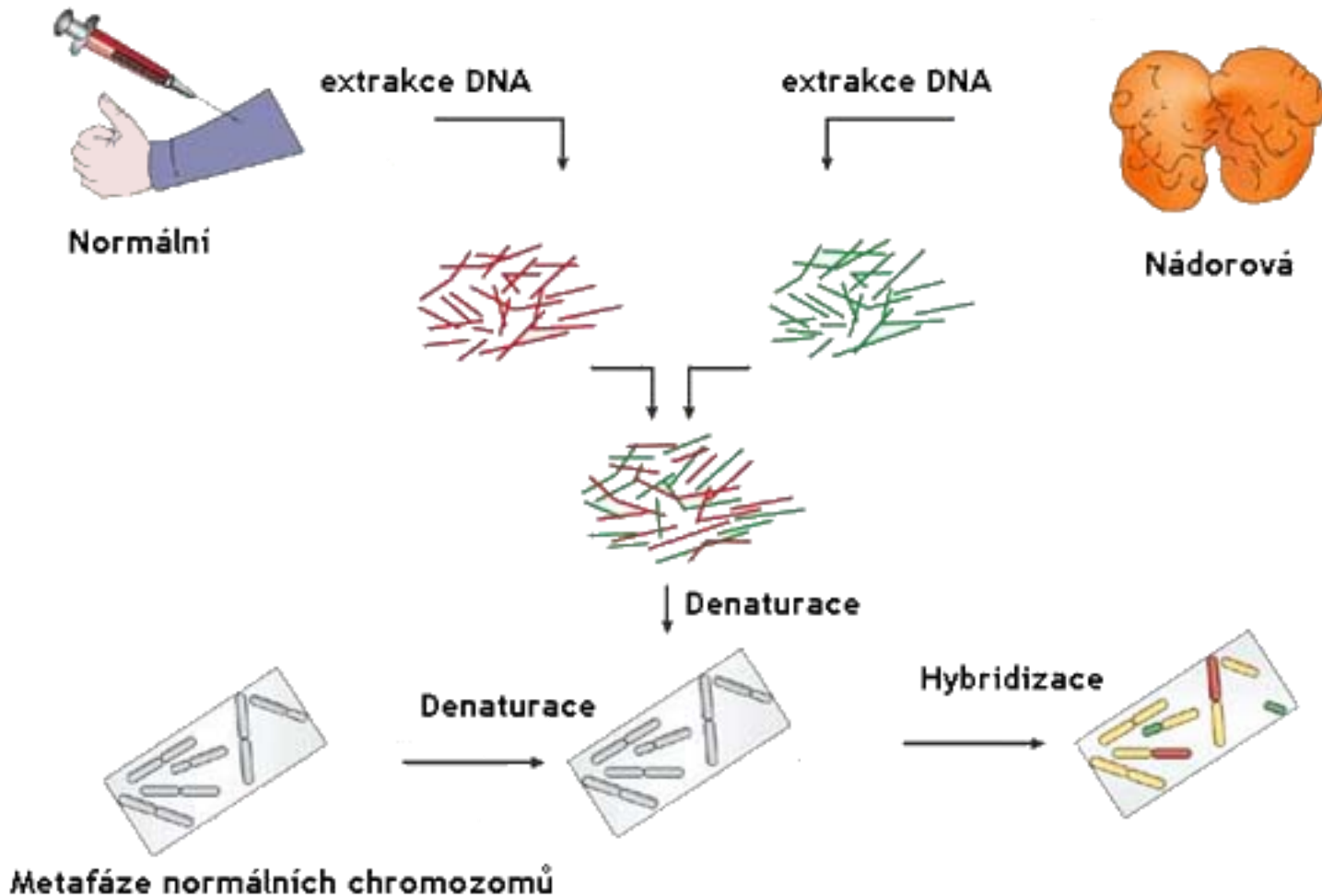
Velmi zjednodušeně lze princip metody: Nejprve se izoluje vzorek DNA z buněk odebraných vyšetřované osobě a ten se označí fluorescenčním činidlem. Označená DNA se pak hybridizuje se vzorky určitých DNA sekvencí (DNA array) na destičce. Po promytí se měří fluorescence na „DNA-array“ a hodnotí pomocí počítače.

- genová exprese
- komparativní genomická hybridizace
- SNP
- sekvenace

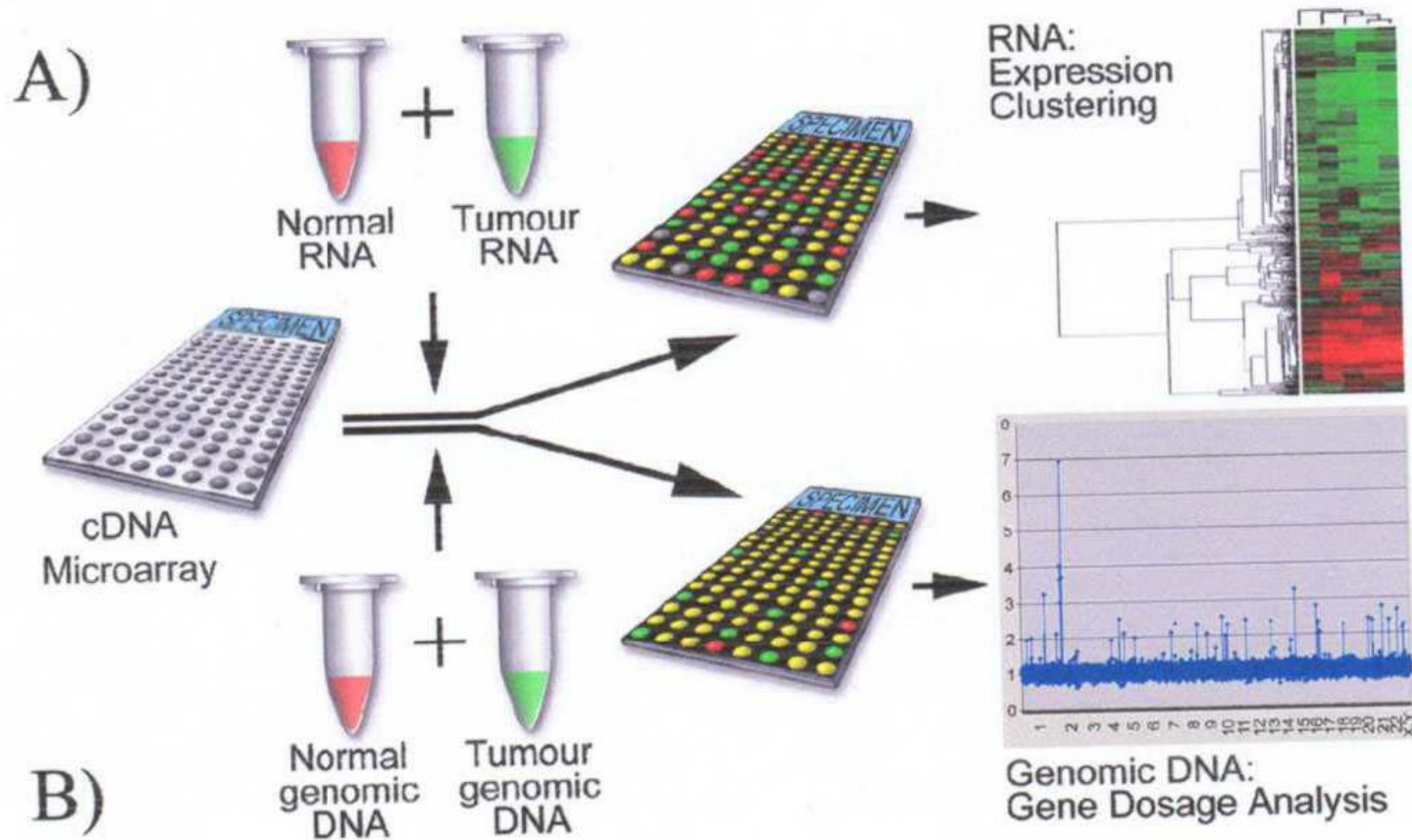


Komparativní genomová hybridizace

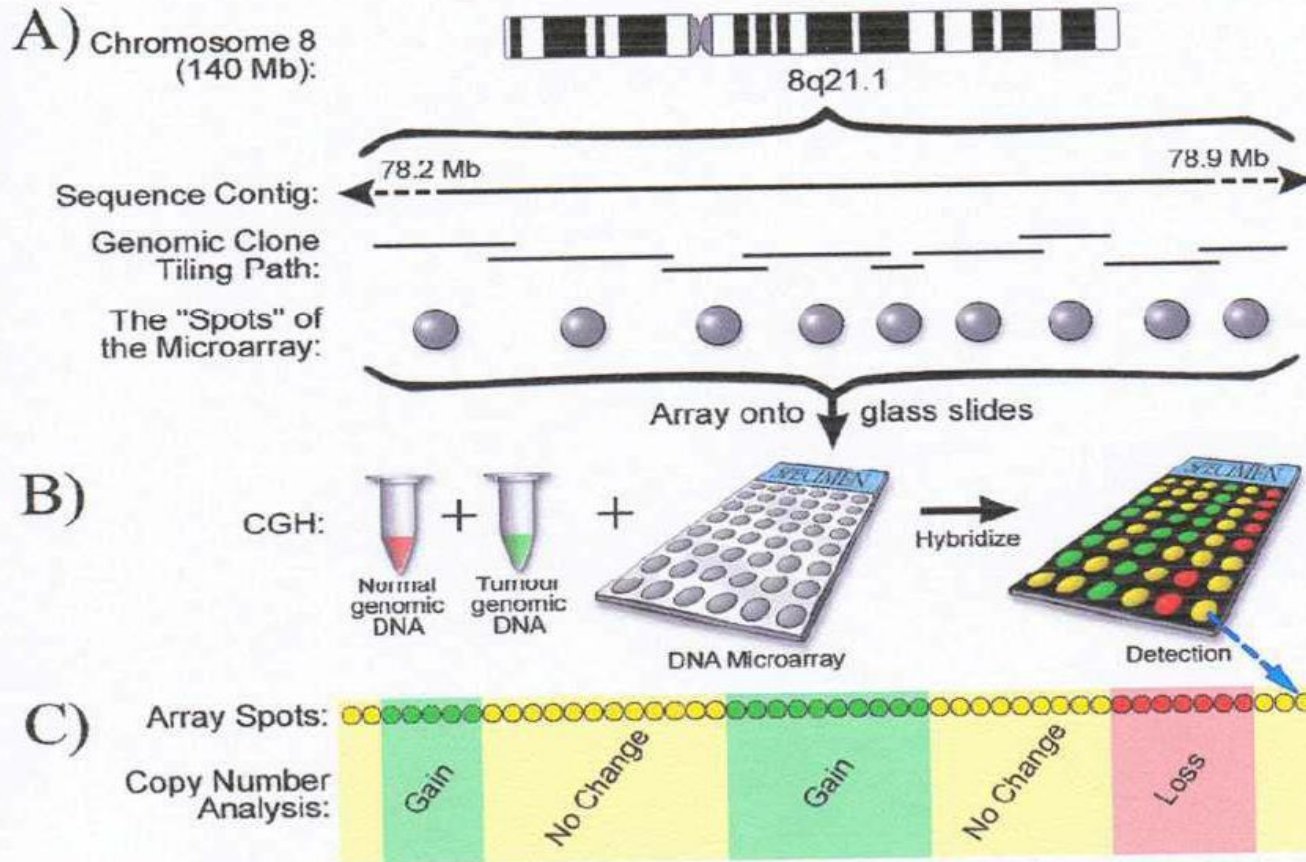
Současná hybridizace dvou vzorků DNA značených odlišnými fluorochromy na normální metafázní chromozomy
DNA pacienta (nádorová) značena **zeleně** (FITC)
kontrolní DNA (zdr. jedinec) značena **červeně** (TRITC)



Komparativní genomová hybridizace



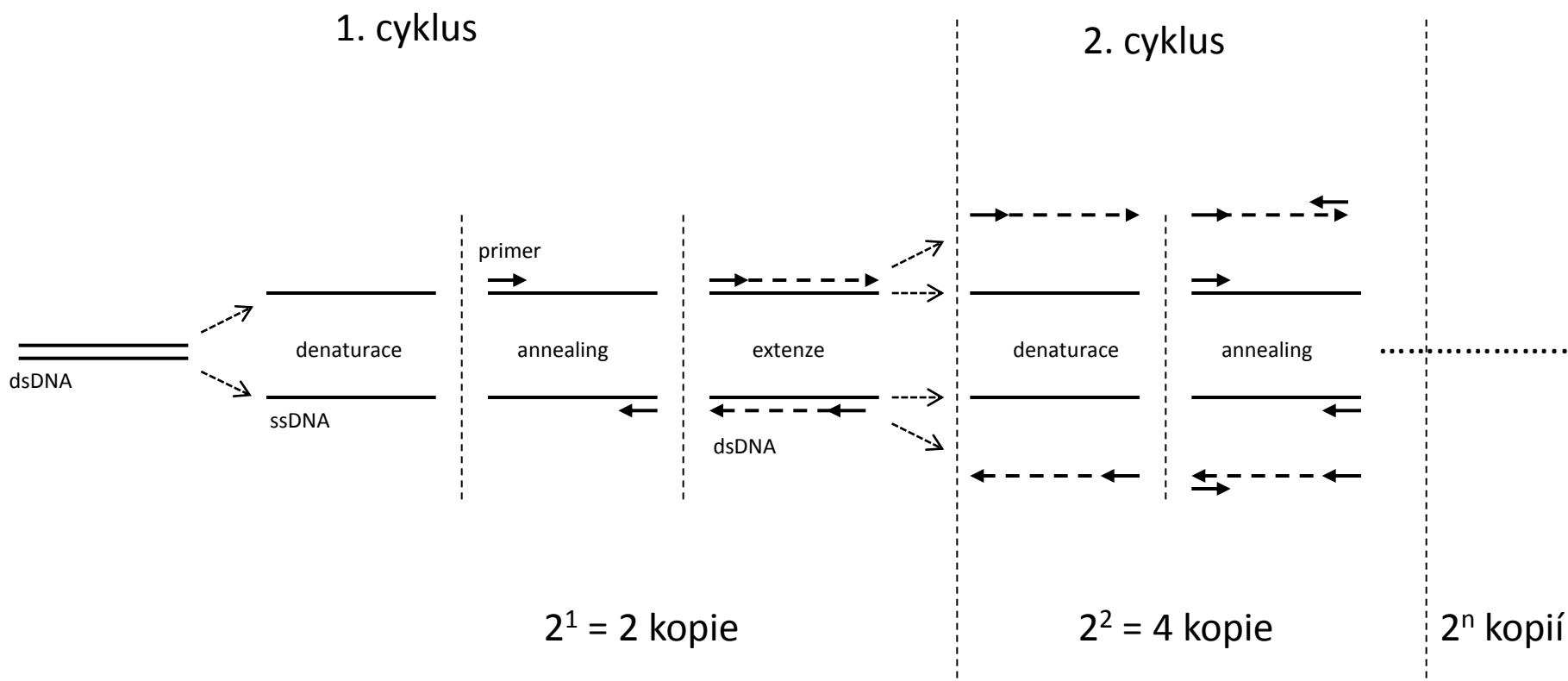
Genomová array CGH



Výhody a nevýhody

- není zapotřebí kultivace buněk
- (použití interfázních chromozomů)
- odhalí delece a amplifikace všech chromozomů buňky v jednom pokusu
- možná diagnostika neznámé aberace
- malé množství vzorku lze amplifikovat PCR
- nelze zjistit balancované změny (translokace, inverze)
- nelze odlišit diploidní a tetraploidní tumory
- nelze vyšetřit změny v telomerických a v heterochromatinových pericentromerických oblastech
- nutné aby alespoň 50% buněk neslo změnu

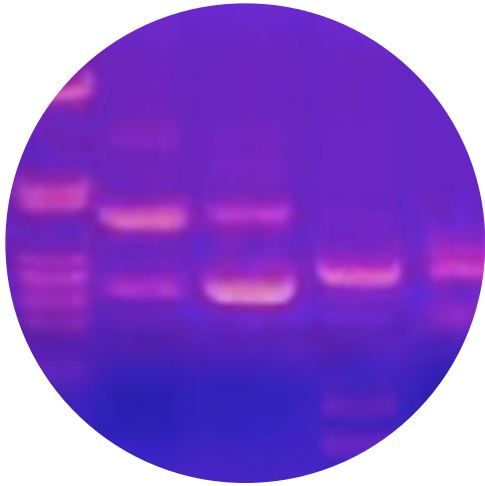
Princip PCR



PCR umožňuje detekovat jediný leukocyt infikovaný HIV mezi 10^5 neinfikovaných bílých krvinek. K tomu je třeba onen jediný leukocyt, obsahující sekvenci typickou pro HIV, pomocí PCR rozmnožit. Při 30 PCR cyklech se původní počet cílových sekvencí znásobí 10^6 až 10^9 .

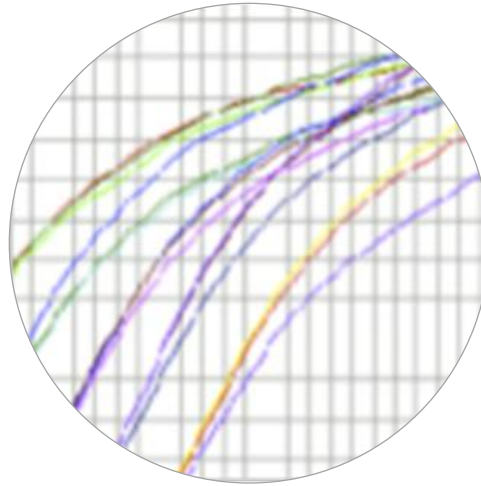
Vývoj PCR metod

1st



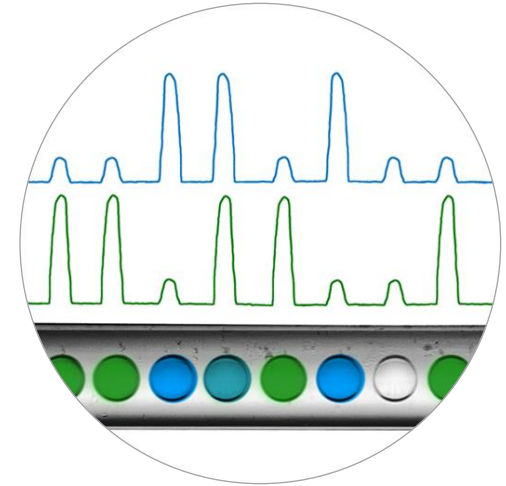
PCR

2nd



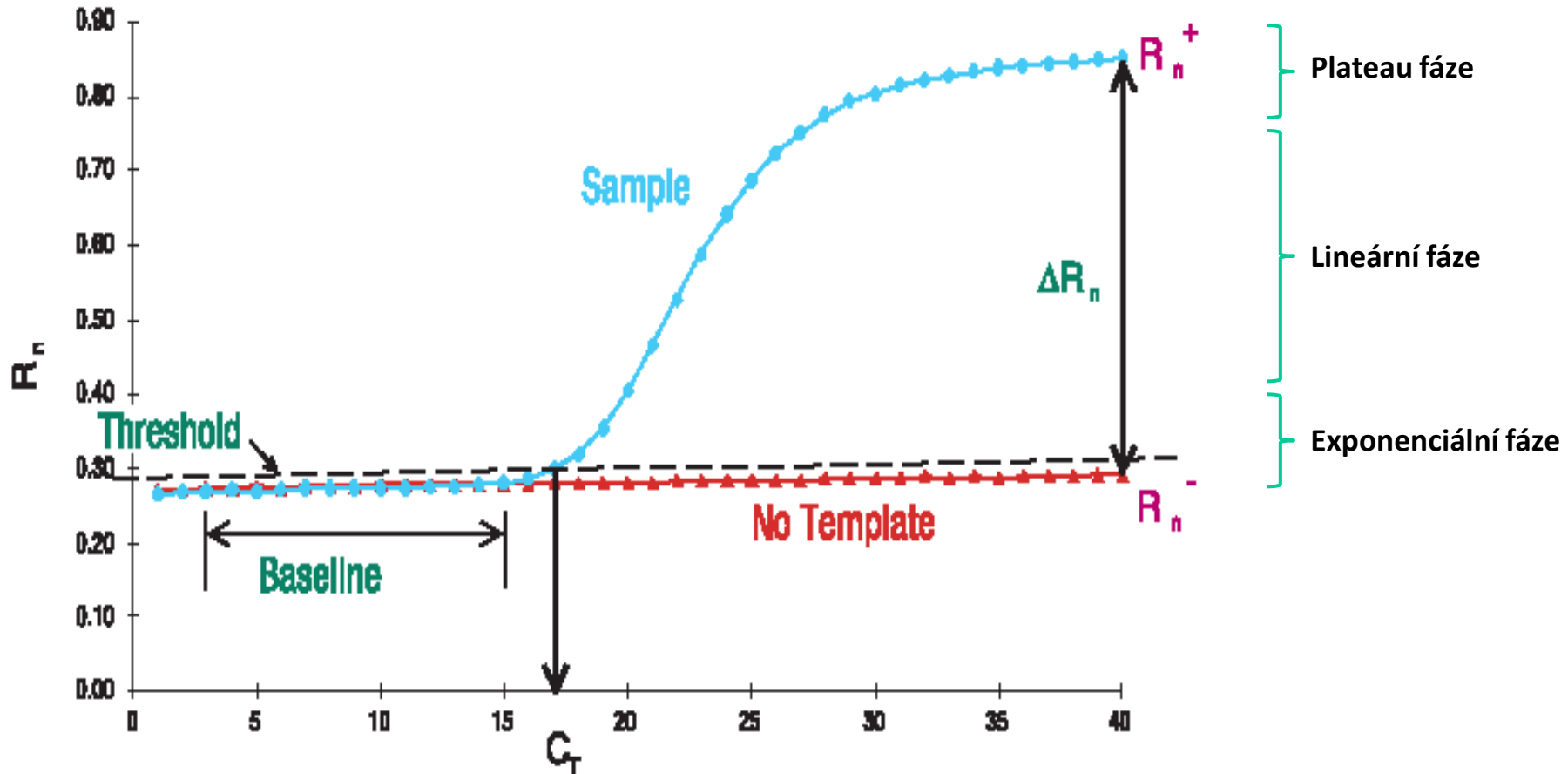
Real-time PCR

3rd

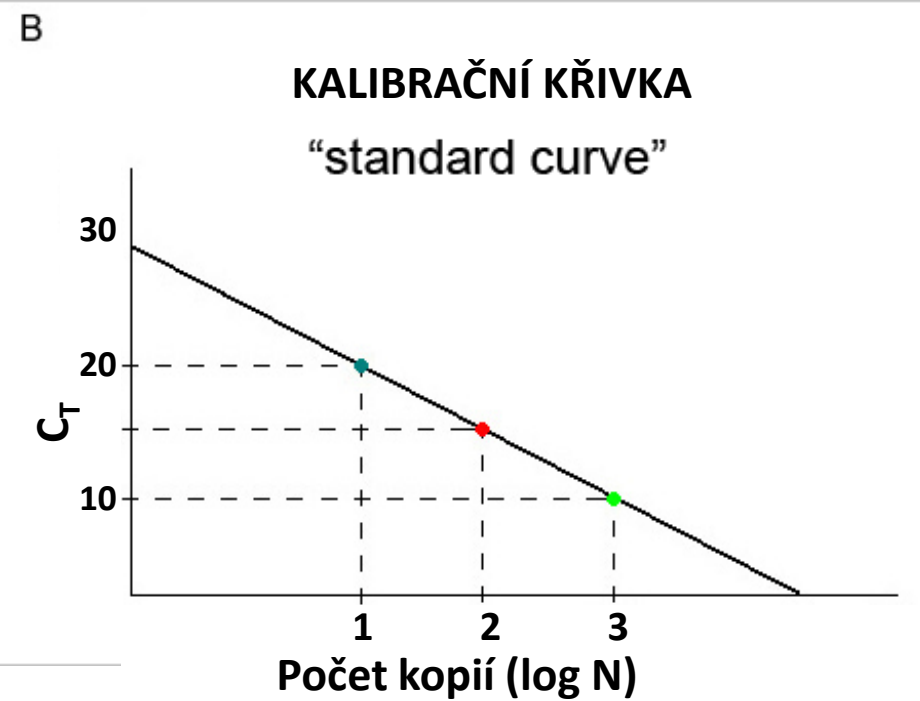
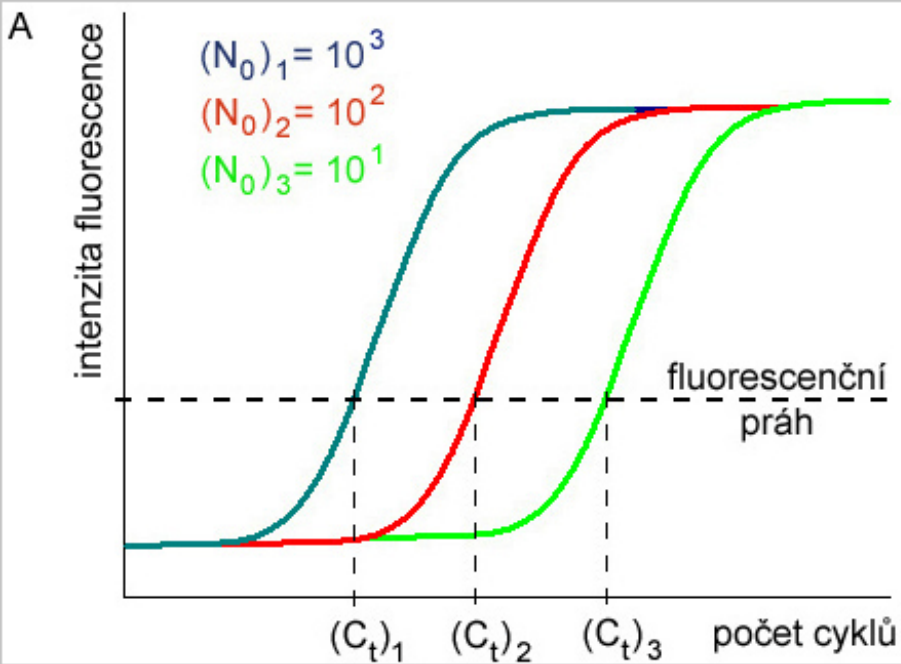


Droplet Digital PCR

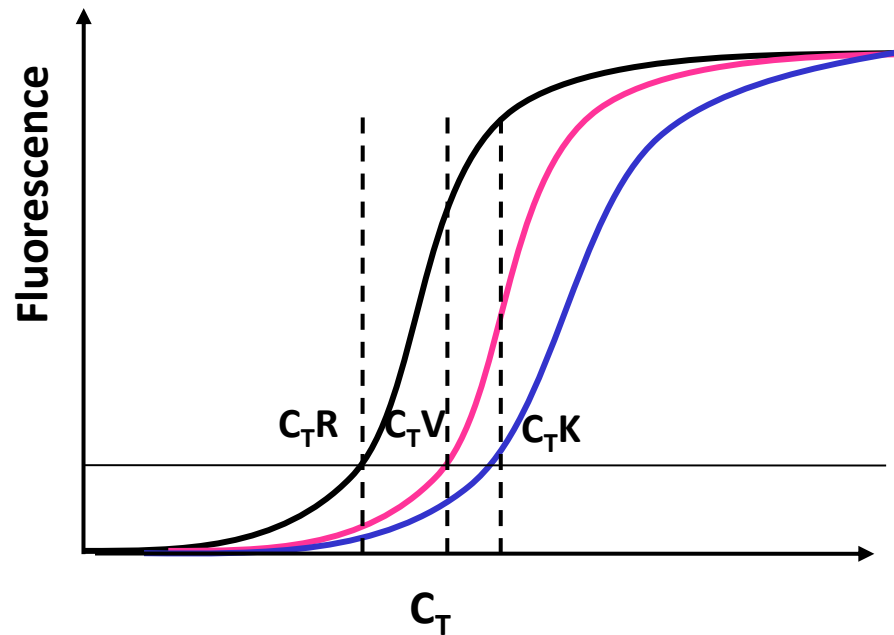
Průběh qPCR



Absolutní kvantifikace



Relativní kvantifikace

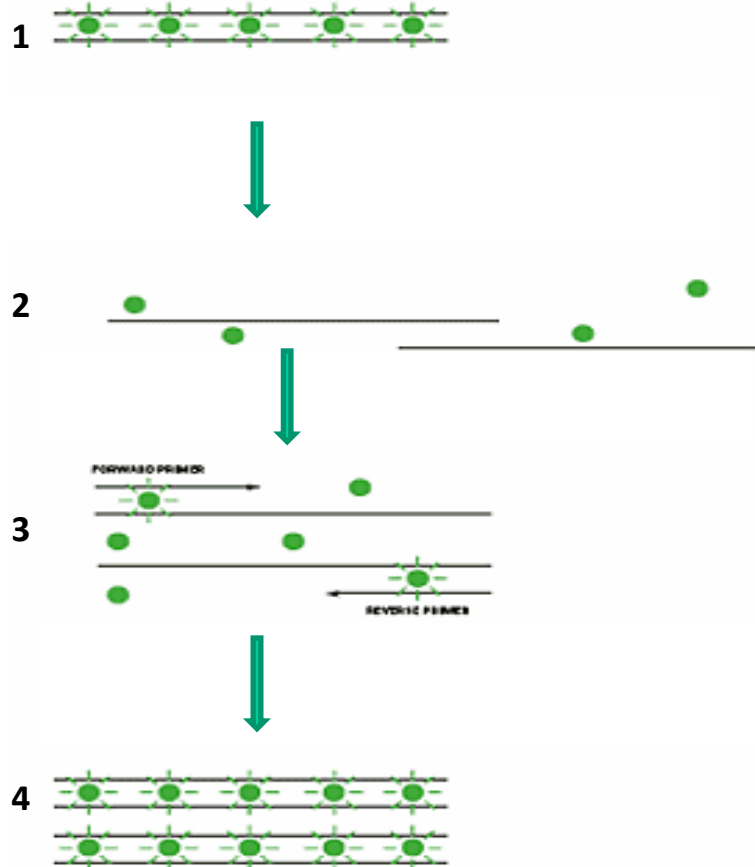


V případě relativní kvantifikace je nejdříve provedena normalizace a získána tak hodnota ΔC_T definovaná jako $\Delta C_T = C_T V$ (cílový gen) – $C_T R$ (referenční gen). Následně je stanovena $\Delta\Delta C_T$ jako: $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T V - \Delta C_T K$ (kontrolní vzorek). Relativní kvantifikace vzorku vzhledem ke kontrolnímu vzorku je získána umocněním $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

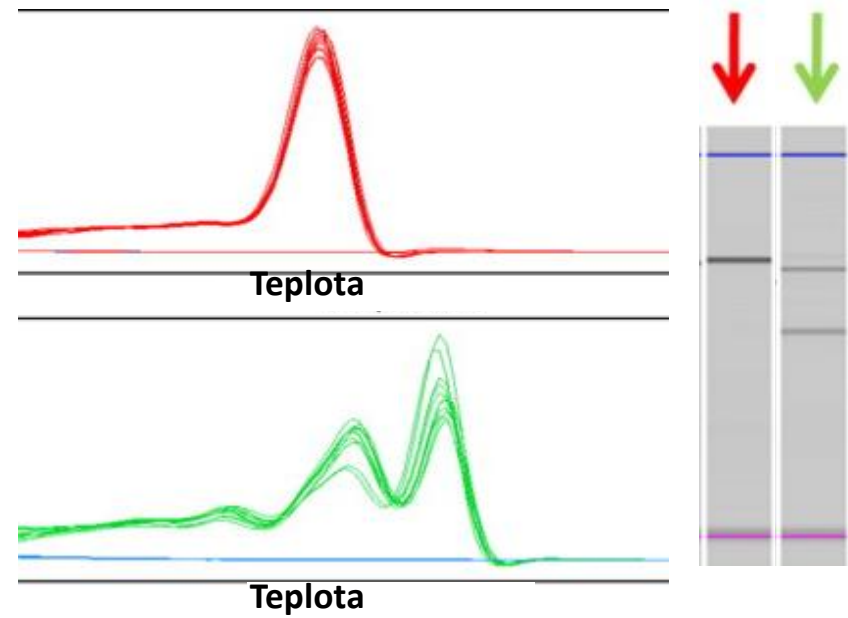
Typy sond:

1. Nespecifické (např. interkalační barviva)
2. Specifické (fluorescenčně značené sondy)
3. Fluorescenčně značené primery

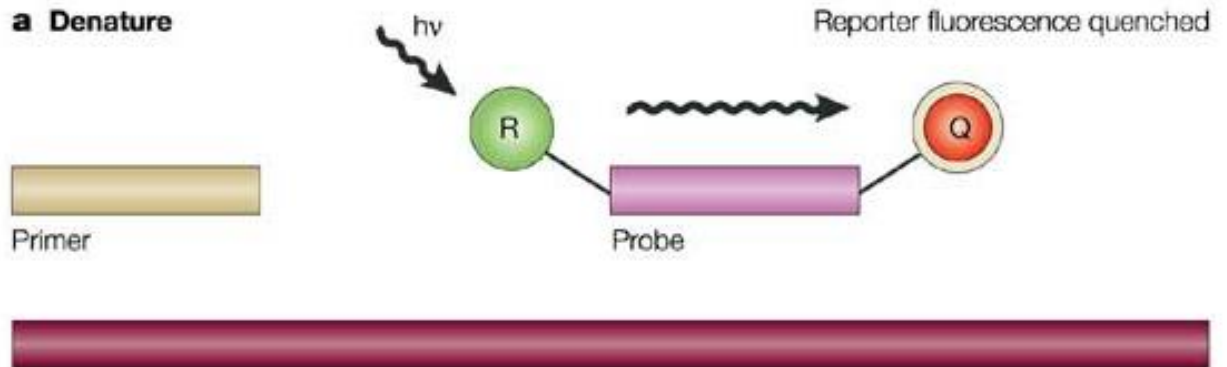
A



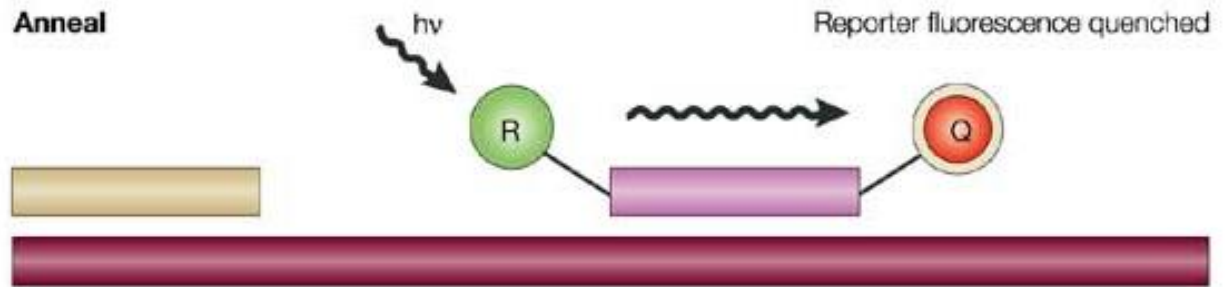
B



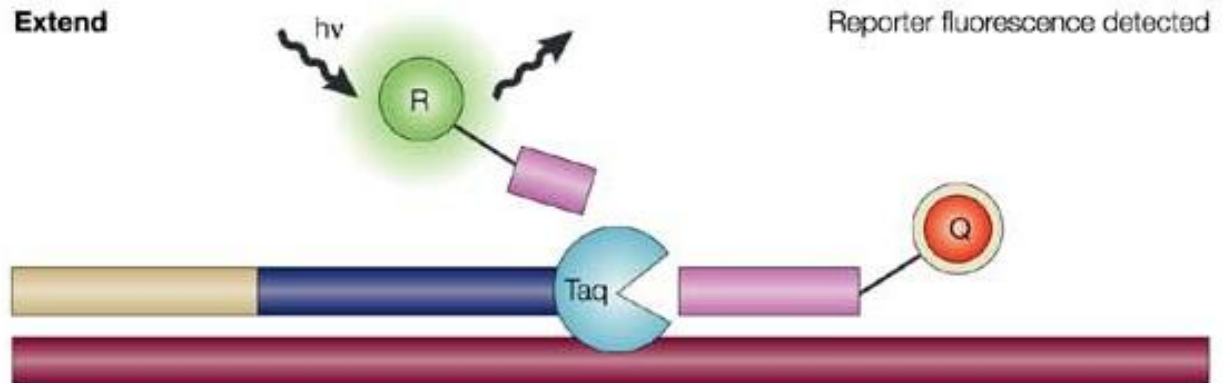
a Denature



Anneal



Extend



FRET

3 donorový fluorofor



Sonda 1

5 akceptorový fluorofor



Sonda 2

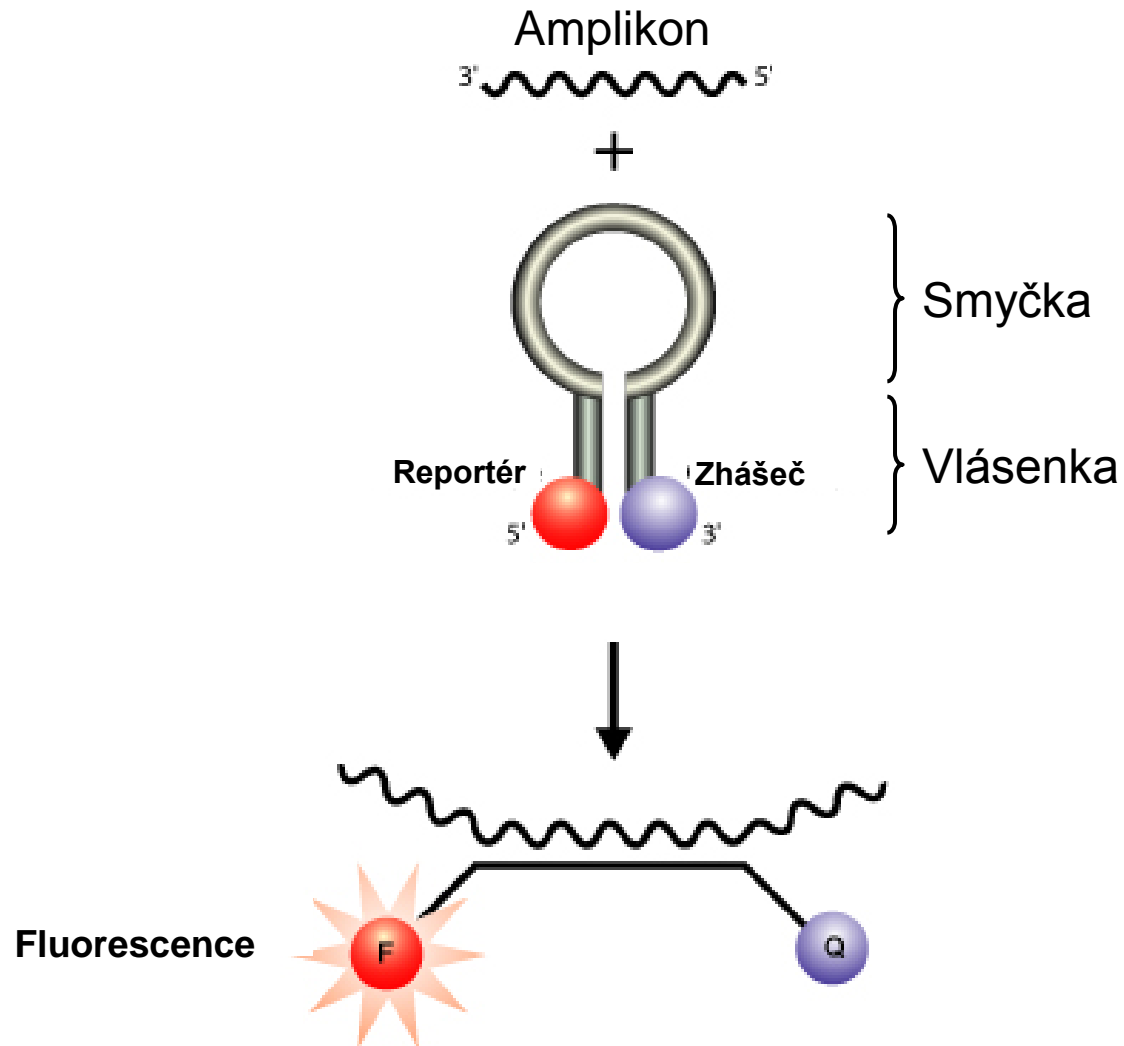


Amplifikovaná cílová DNA

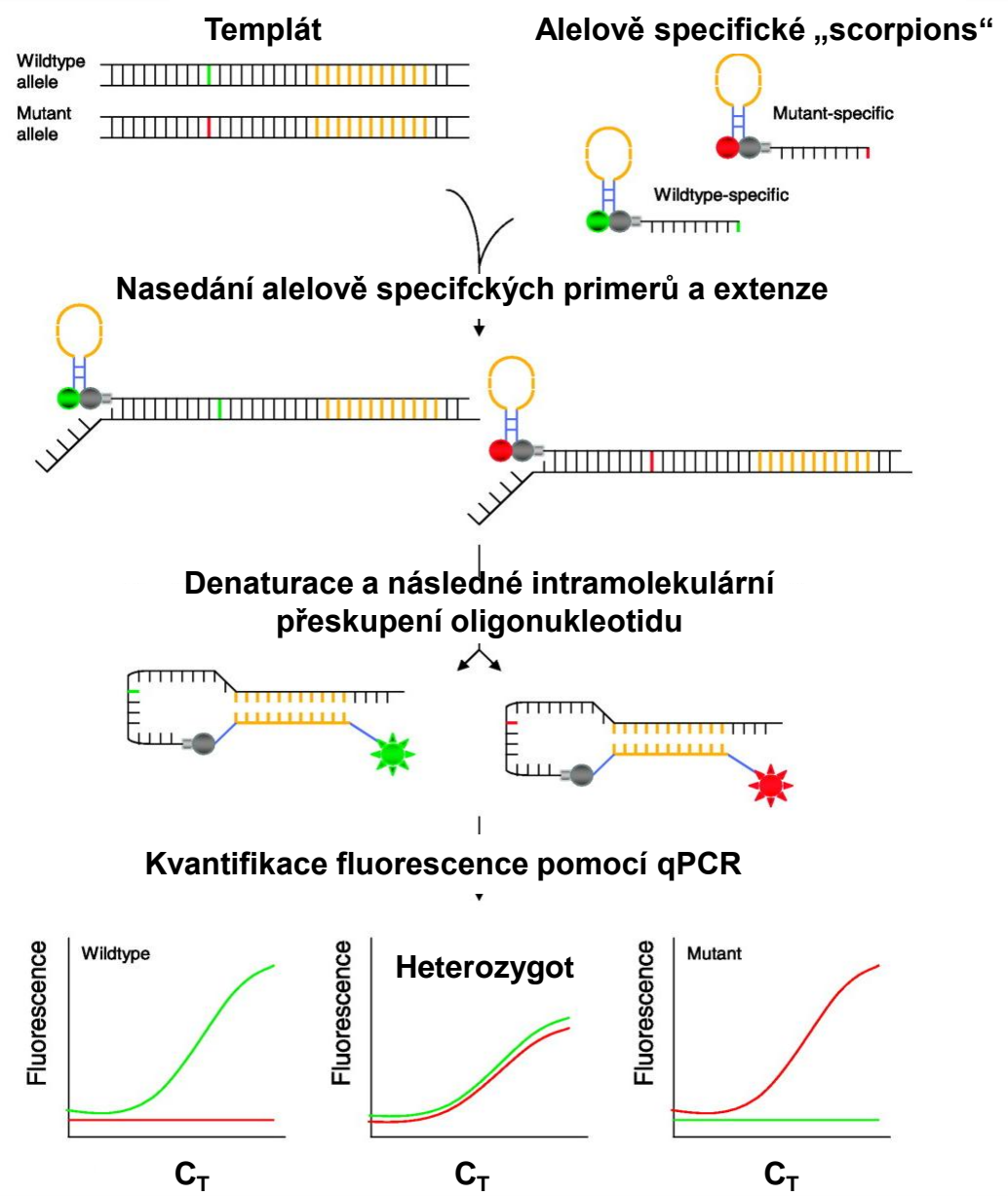
1. Probes in solution emit low fluorescence

2. Emission through fluorescence resonance energy transfer

Princip molekulárních majáků

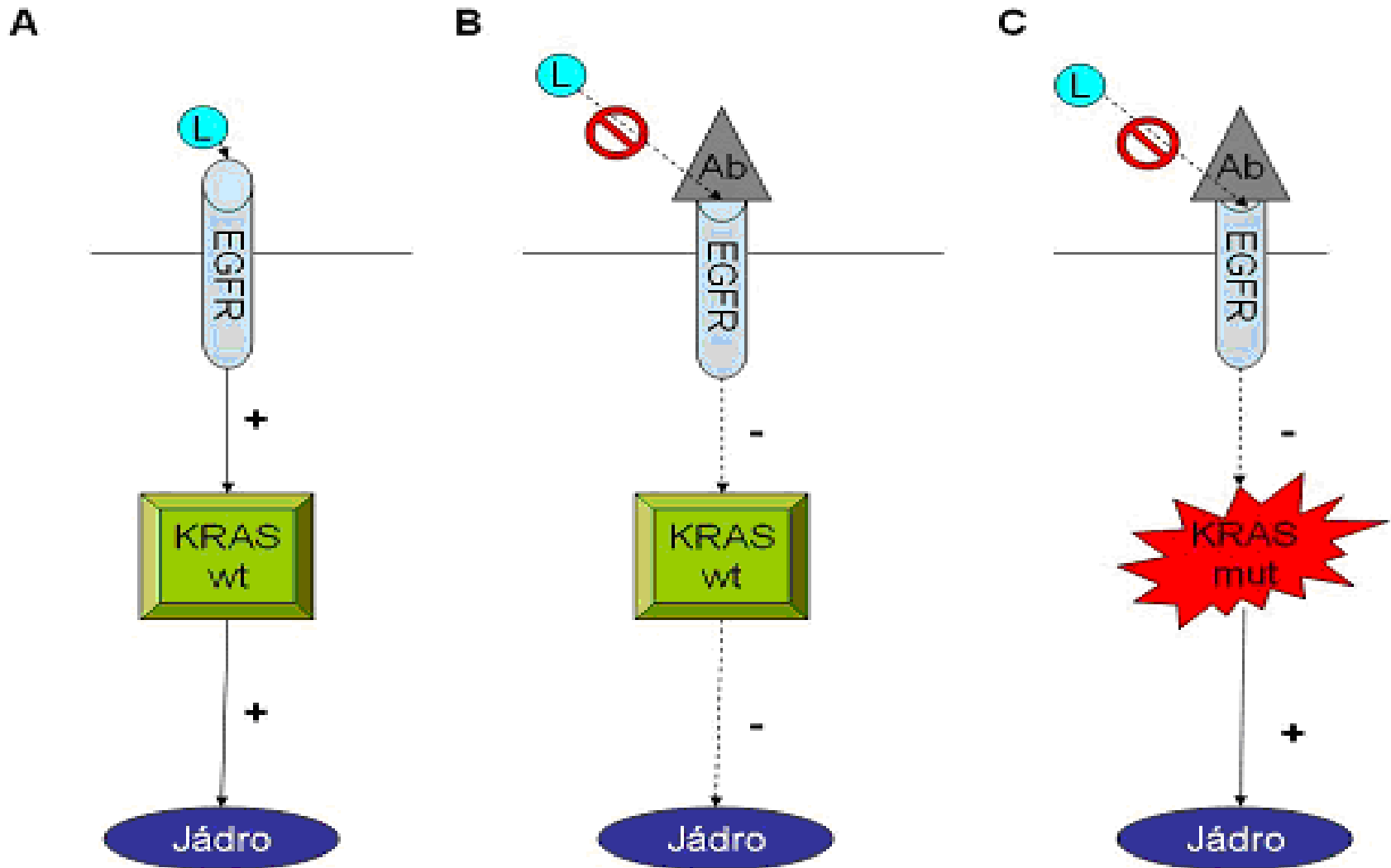


Stanovení mutací pomocí bi-funkčních molekul „scorpions“



Ad 4) techniky založené na kvantifikaci DNA

PCR s alelově-specifickými primery ARMS (Amplification Refractory Mutation System) v kombinaci se systémem „Scorpion“



Mutační analýza onkologických onemocnění

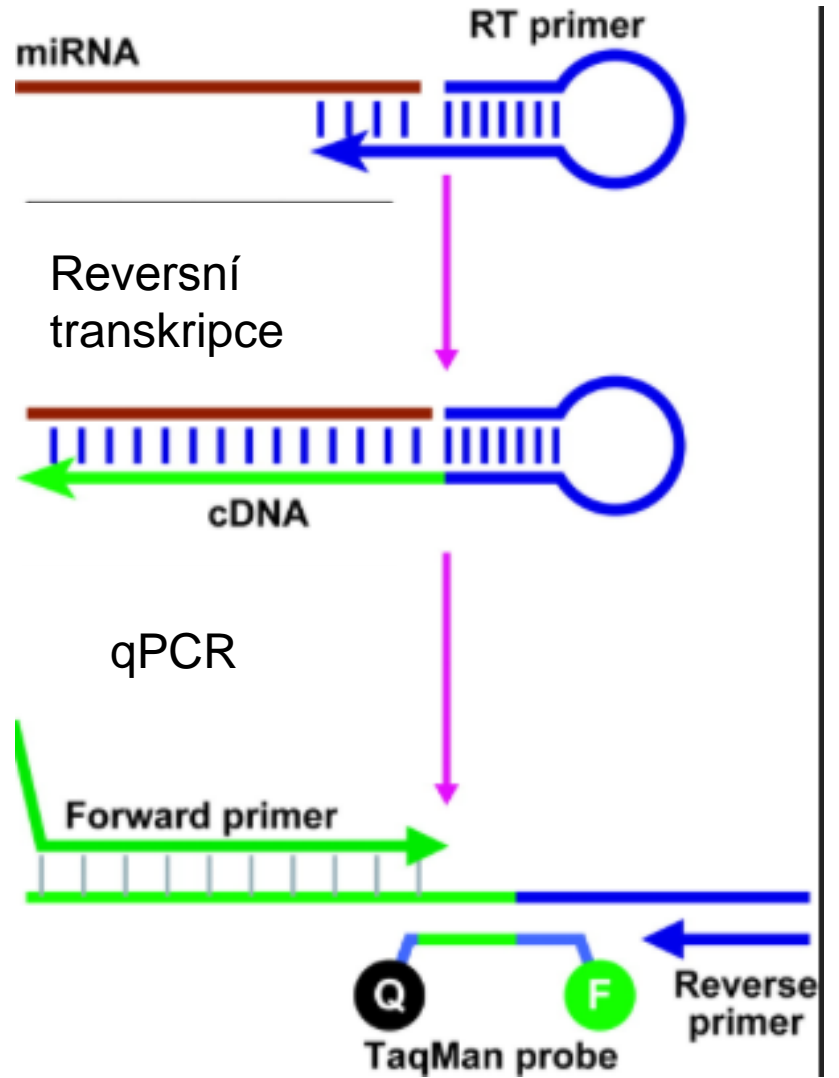
Kolorektální karcinom, který patří k nejrozšířenějším nádorovým onemocněním v rozvinutých zemích, může být při velmi časně diagnóze úspěšně léčitelný (v lokalizovaném stadiu až 90 %).

Existují genetické abnormality, které vedou nejprve k benigní proliferaci buněk sliznice tlustého střeva tj. k tvorbě polypů, dále pak adenomů a nakonec ke vzniku adenokarcinomu, popřípadě adenokarcinomu brzy metastazujícímu.

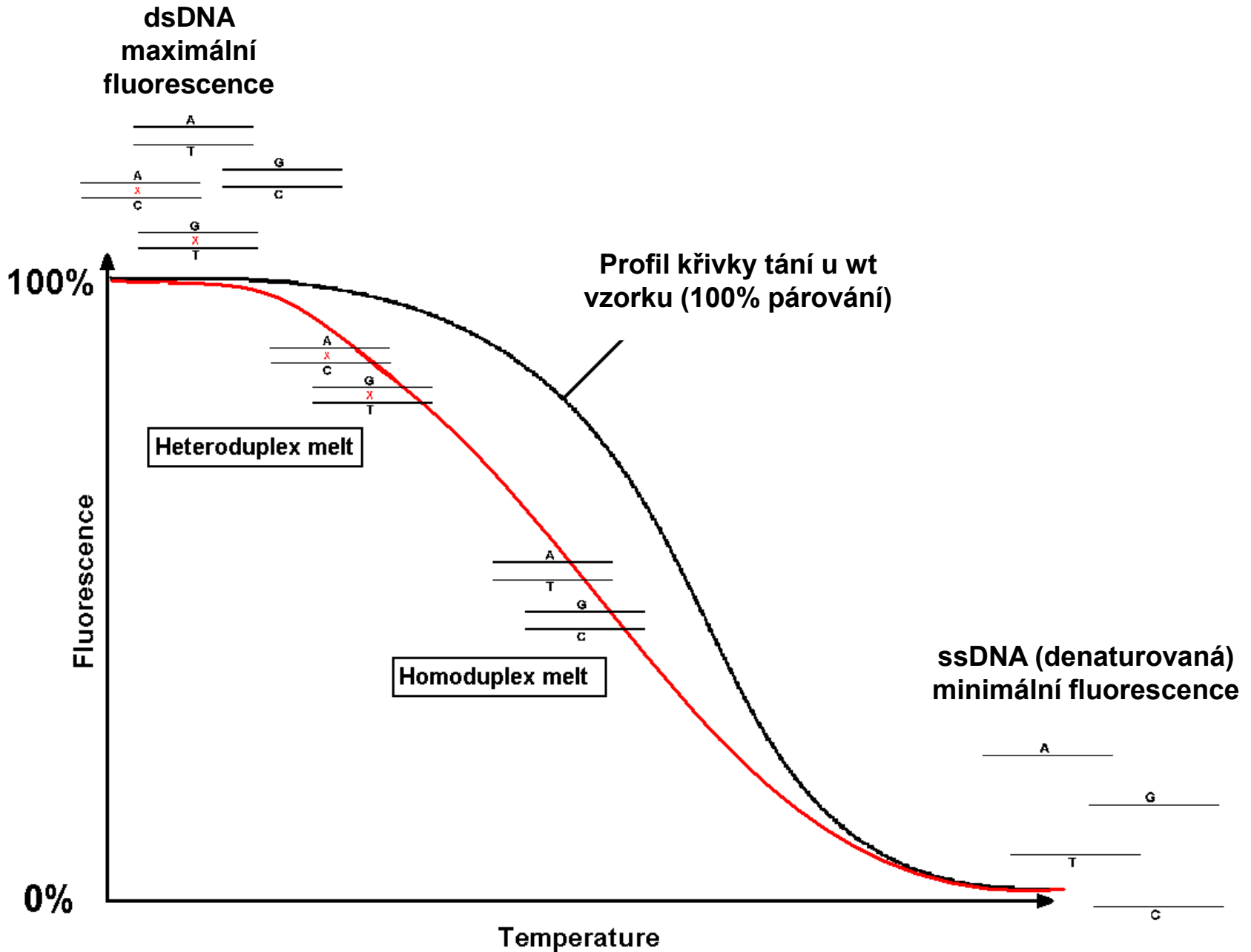
Asi 1/3 populace mívá po padesátce adenomy tlustého střeva; ale jen u 10 % vznikne karcinom. Tyto adenomy možno klasifikovat podle jejich velikosti, patologie (makroskopická struktura) a dysplazie (mikroskopická struktura) na málo a na vysoce rizikové.

Histopatologická kritéria nejsou však dostatečně objektivní. Mnohem lepší je průkaz mutace genu K-ras, který patří k protoonkogenům, uplatňujícím se v kaskádě transdukce signálu a je tedy částečně odpovědný za přeměnu adenomu na adenokarcinom. Mutace genu K-ras se většinou objevují v exonu 1, a to buď na kodónu 12 (GGT) nebo 13 (GGC). Oba triplety (GGT i GGC) kódují glycin. Vznikne-li mutace na jedné z obou bazí (kupř. GGT®GCT), pak v sekvenci polypeptidu je glycin nahrazen alaninem.

Stanovení hladiny miRNA

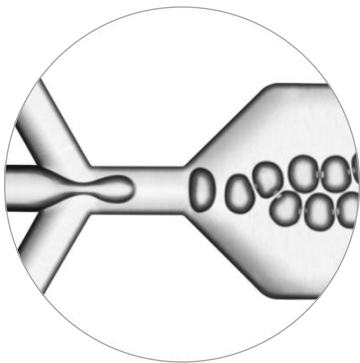


Princip HRM

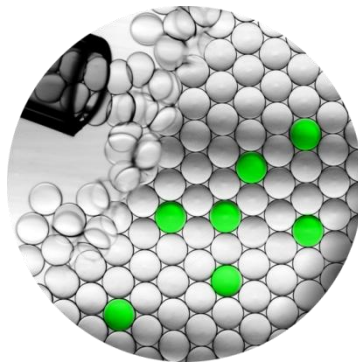


Digitální PCR

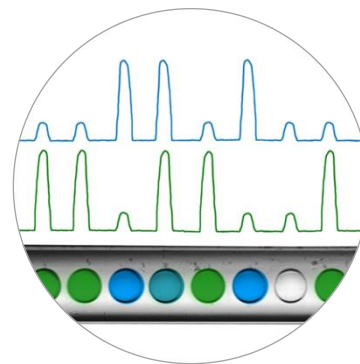
- Partition reagents and sample into 20,000 droplets
- Perform conventional PCR on thermal cycler
- Quantify target nucleic acid by counting sample partitions with a positive PCR product (fluorescent) and a negative PCR product
- Digital readout provides absolute measure of target DNA



Make Droplets



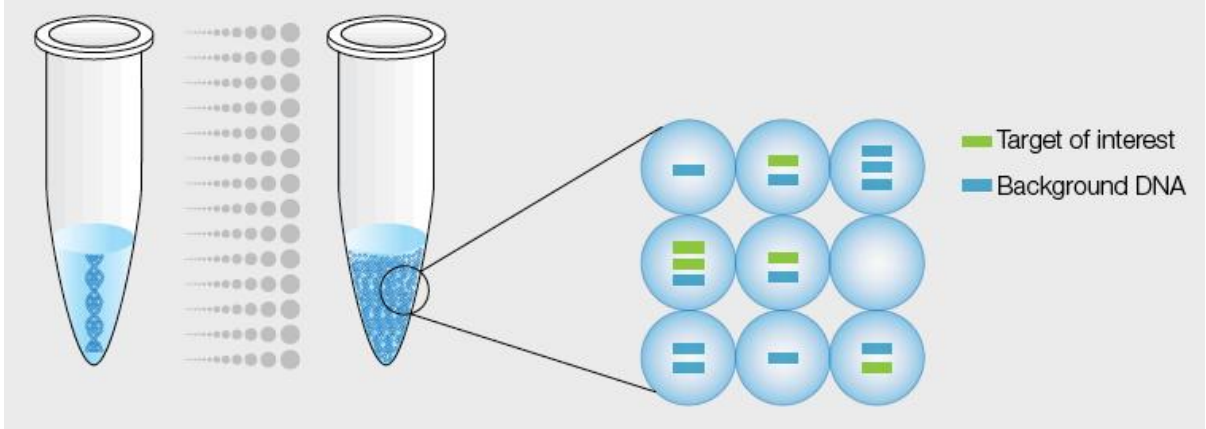
PCR Droplets



Read Droplets

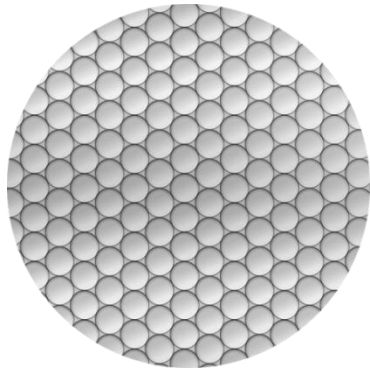


Results



Siméon Denis Poisson (1781-1840)

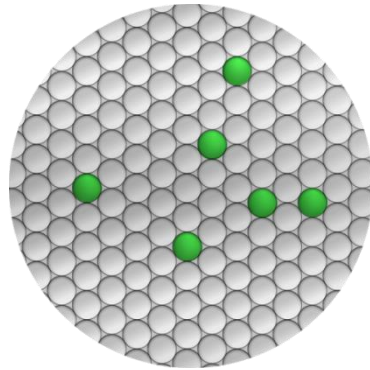
Sample 1



NO
targets

p=0 positive/143 total

Sample 2

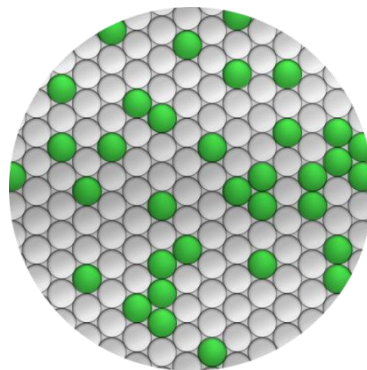


Low
concentration

p=6/143

Poisson corrected
6.2/143

Sample 3

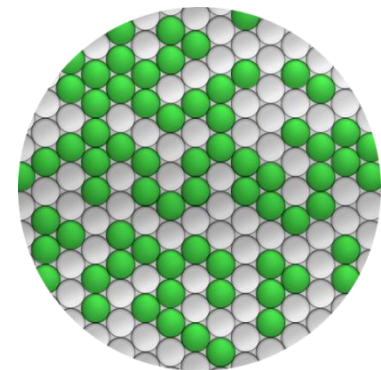


Medium
concentration

p=34/143

Poisson corrected
38/143

Sample 4



High
concentration

p=70/143

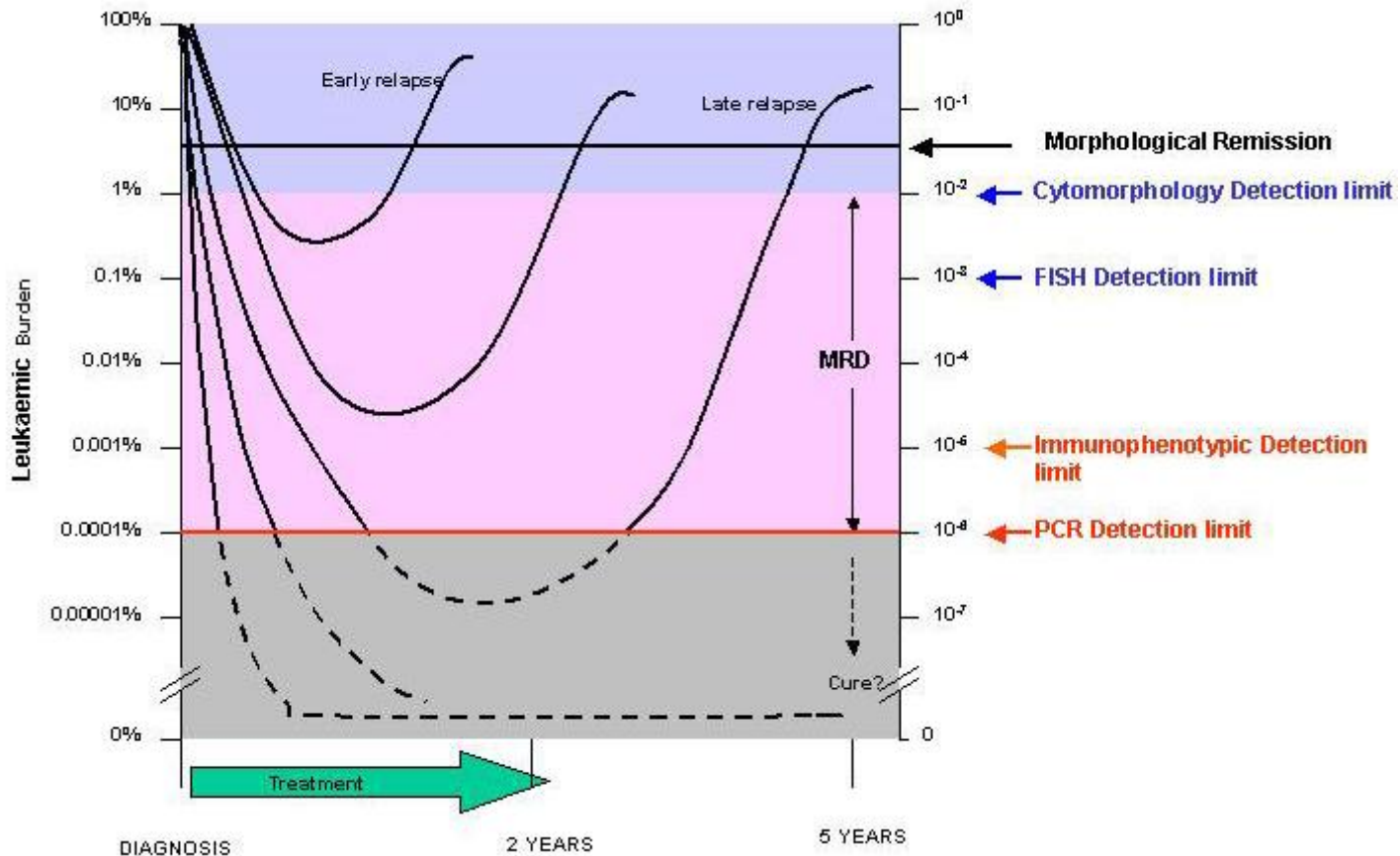
Poisson corrected
96/143

Analýza exprese u onkologických onemocnění

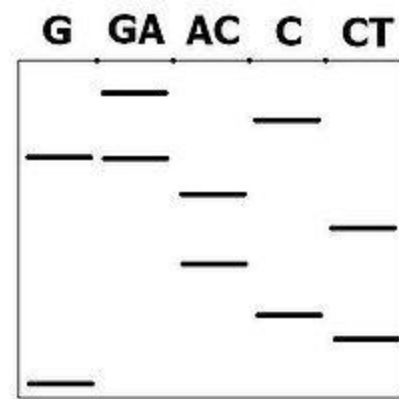
Rozdíl v expresních profilech zdravá x nádorová buňka

Nejčastější markery: MGB1, CEA, CK20, EGFR1, C-MYC, TH, TS, ...

Detekce MRD



Sekvencování



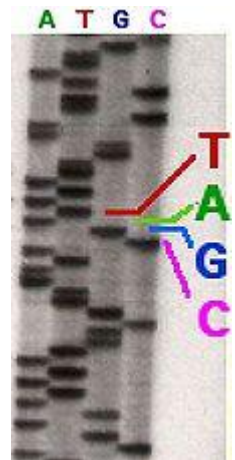
Chemické (Maxam-Gilbetovo) sekvencování

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

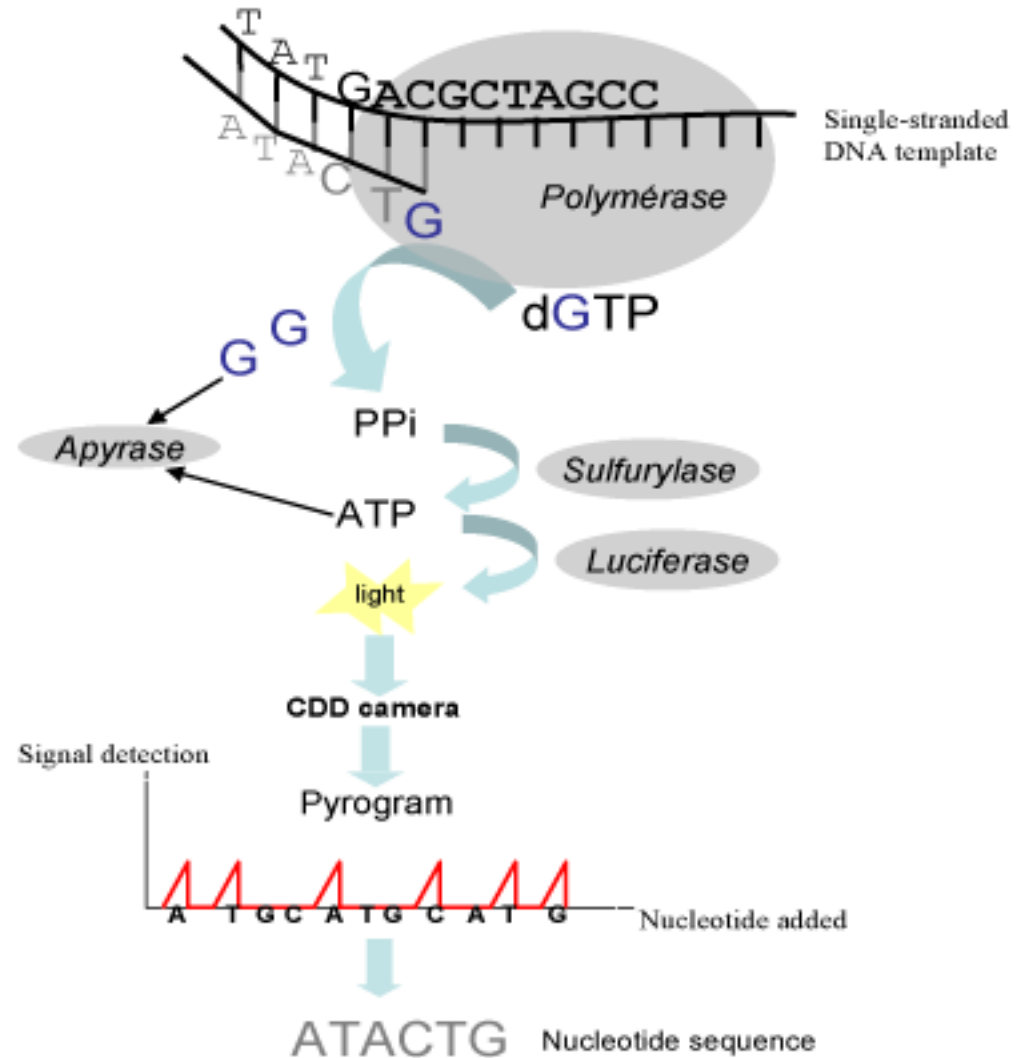
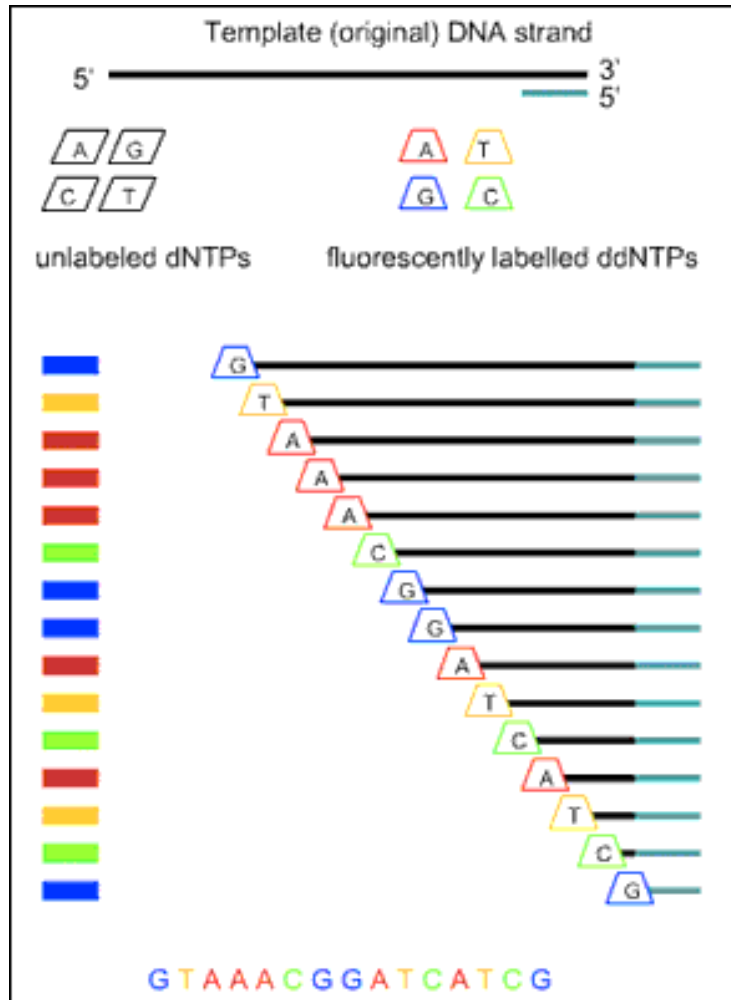
□

Enzymatické (Sangerovo) sekvencování

- Syntéza komplementárního vlákna k sekvenci kterou identifikujeme
- 4 paralelní vzorky - do každého jeden dideoxyribonukleotid



Pyrosekvencování



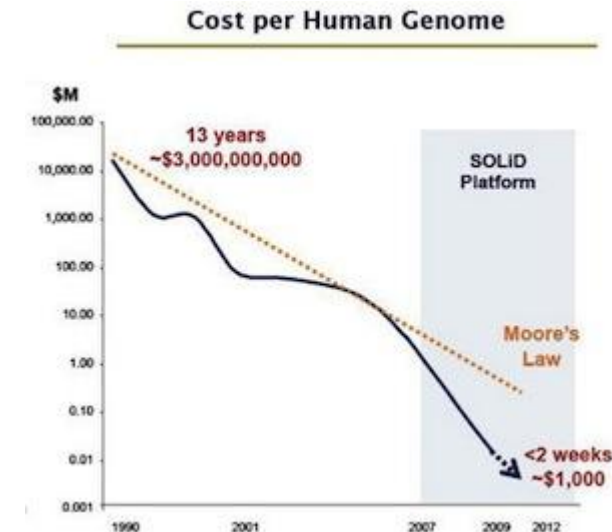
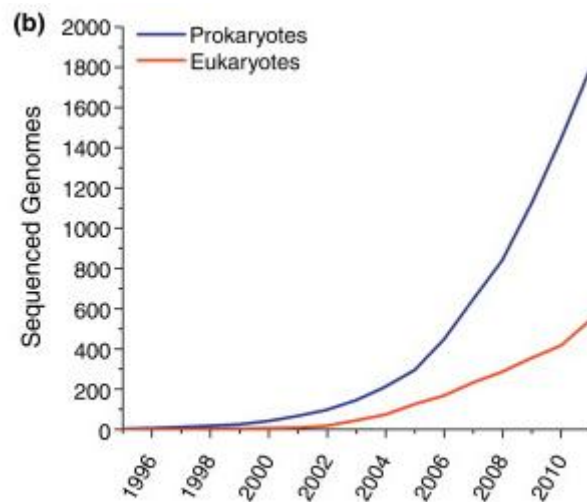
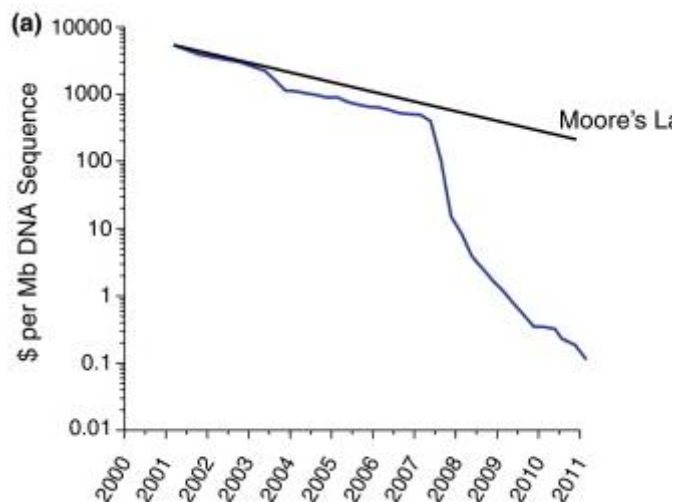
Nová generace sekvencování (NGS)

Výhody:

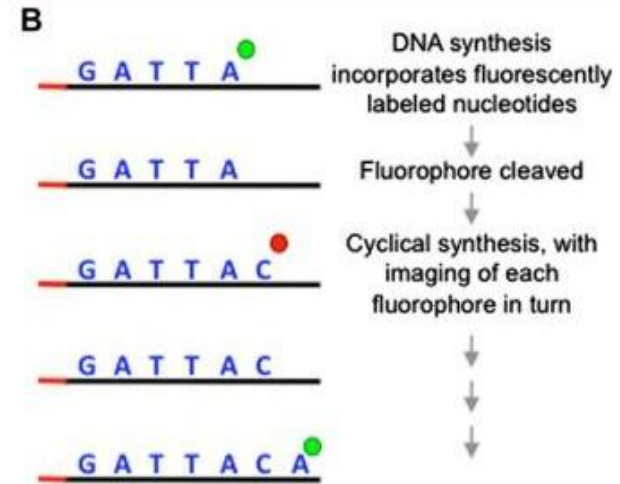
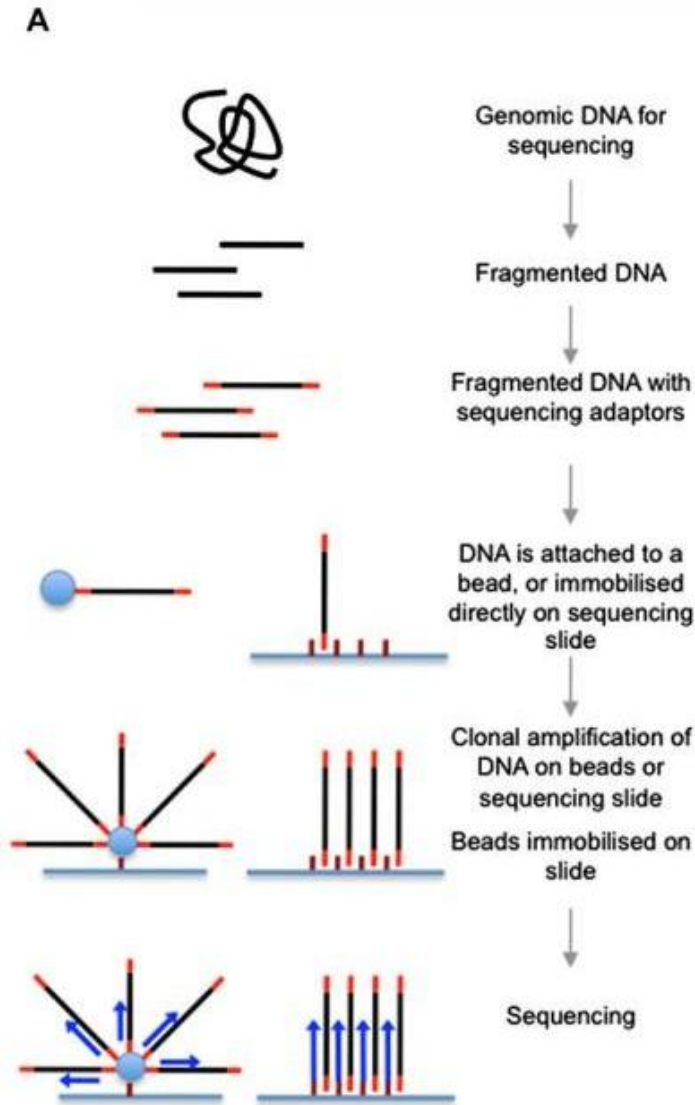
- levnější a robustnější („high-throughput“) technologie (masivní paralelní sekvencování)
- „high-throughput“ sekvencování umožňuje objev genů a regulačních elementů spojených např. se studovaným onemocněním
- Cílené resequencování - identifikace mutací
- RNA sekvencování - analýza celého transkriptomu

Limitace:

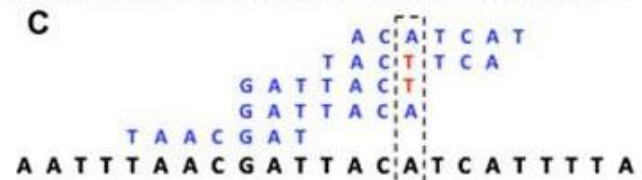
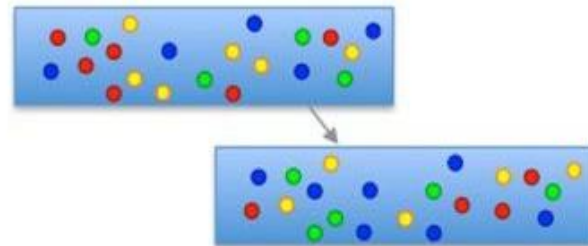
- Značná pořizovací cena, relativně drahé analýzy pro menší rutinní laboratoře
- Méně přesné čtení templátu (homopolymery), kratší délky sekvencovaných oblastí (cca 150-500 nukleotidů)
- Náročná analýza dat



NGS: postup

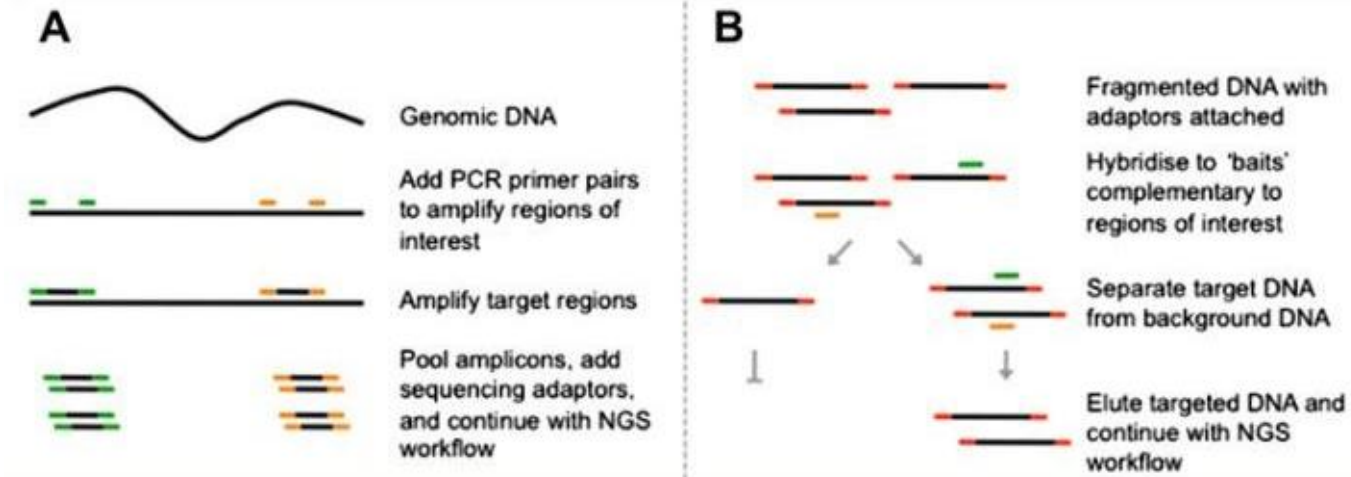


Many molecules sequenced in parallel by imaging cyclical synthesis on a sequencing slide

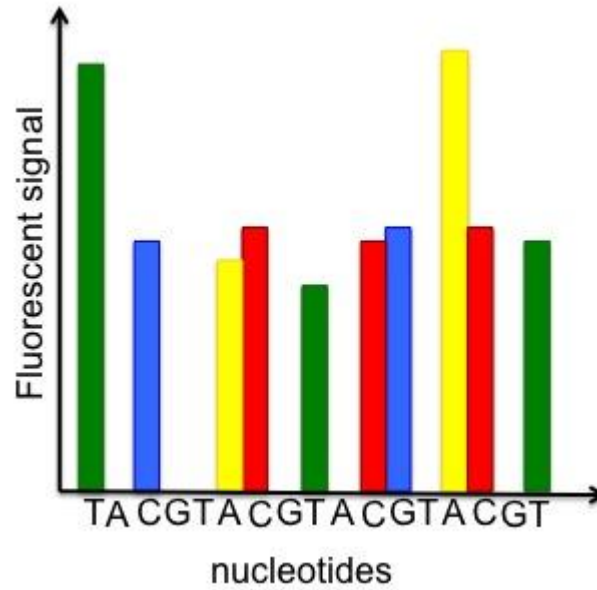
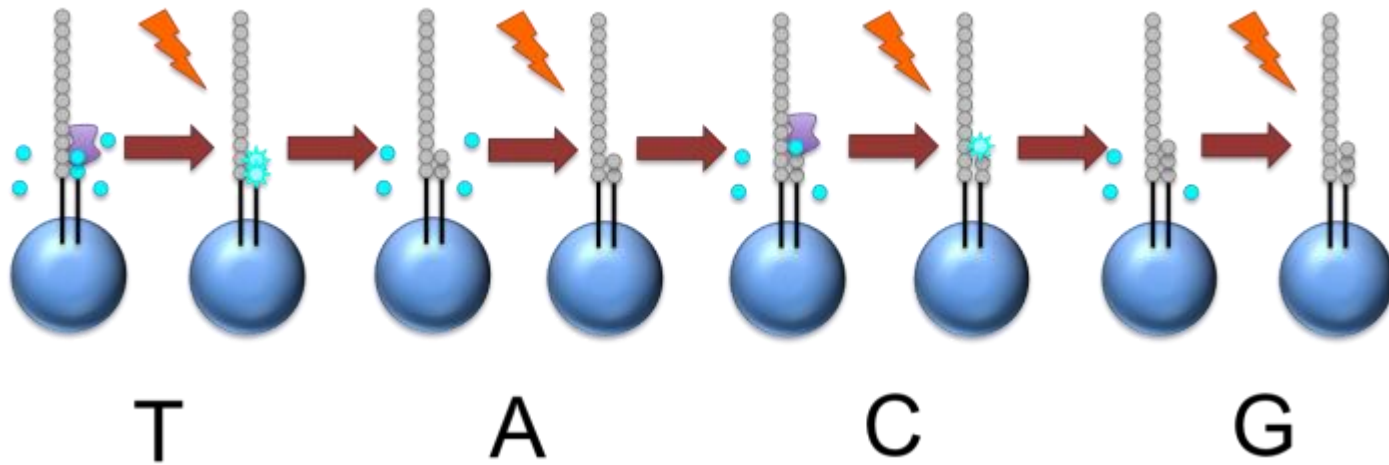


Each sequence fragment is bioinformatically aligned to the genome, and potential sequence variants identified. Here we see a possible heterozygous A>T single nucleotide polymorphism

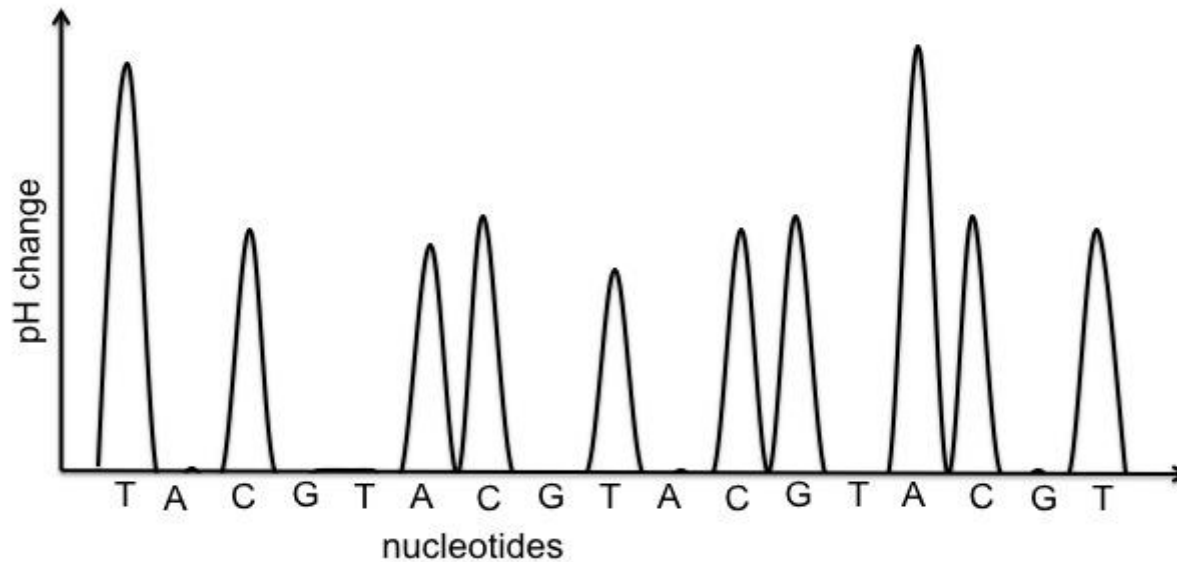
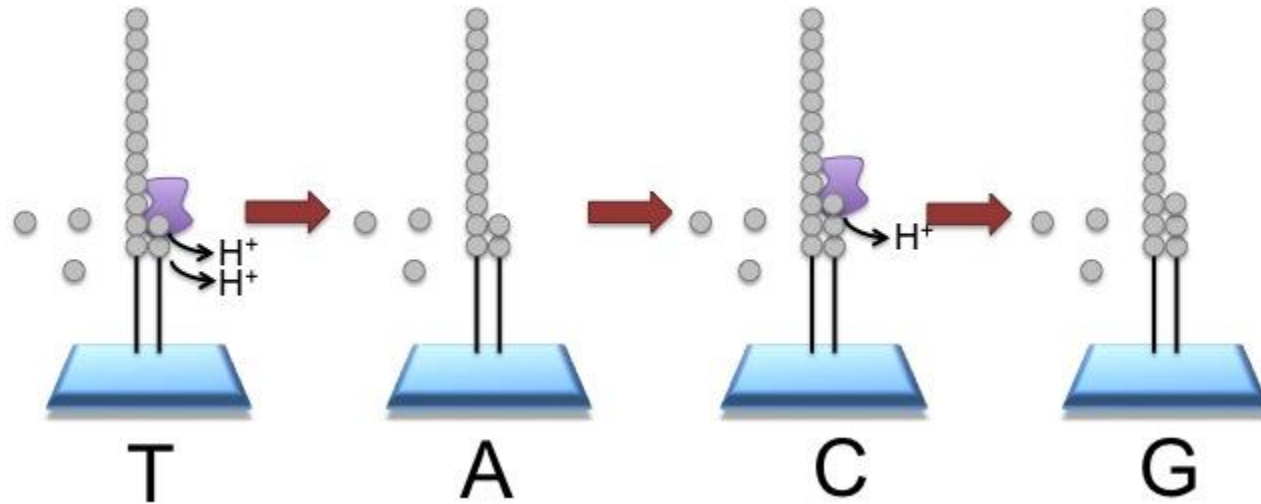
DNA enrichment



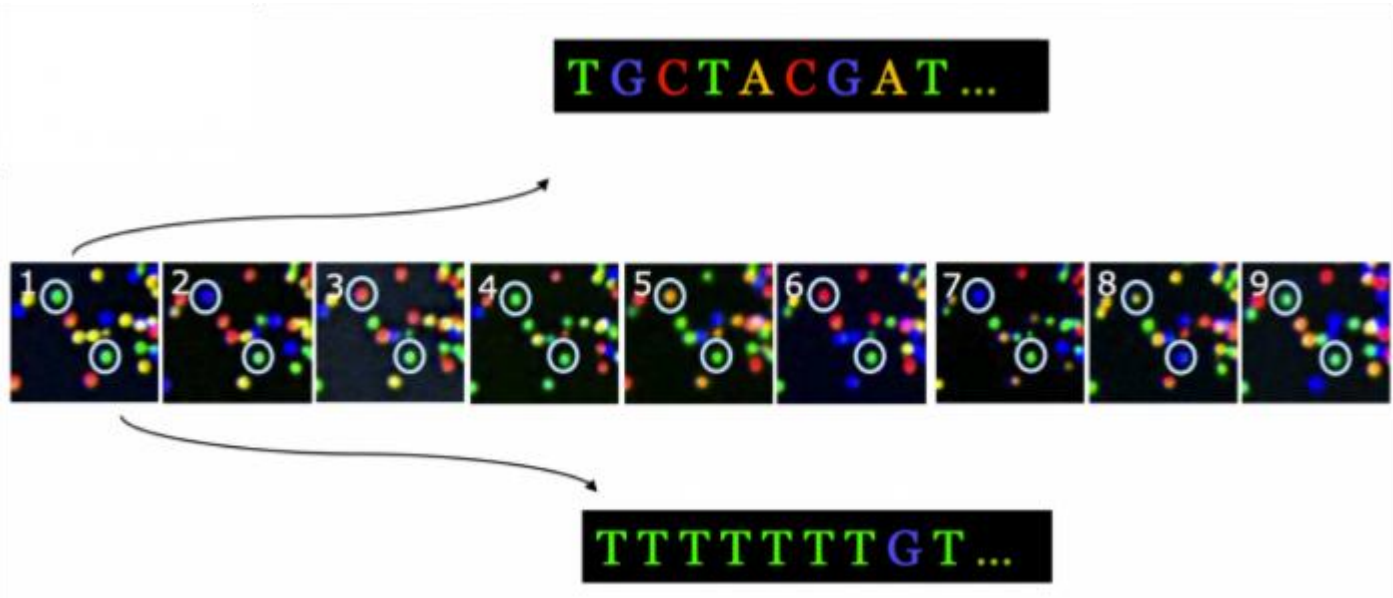
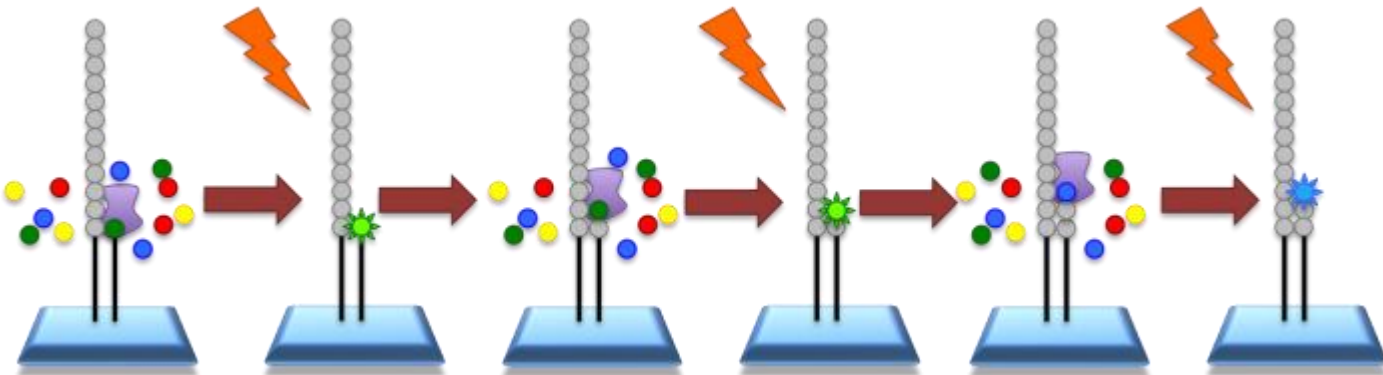
454



Ion Torrent/Proton



Illumina

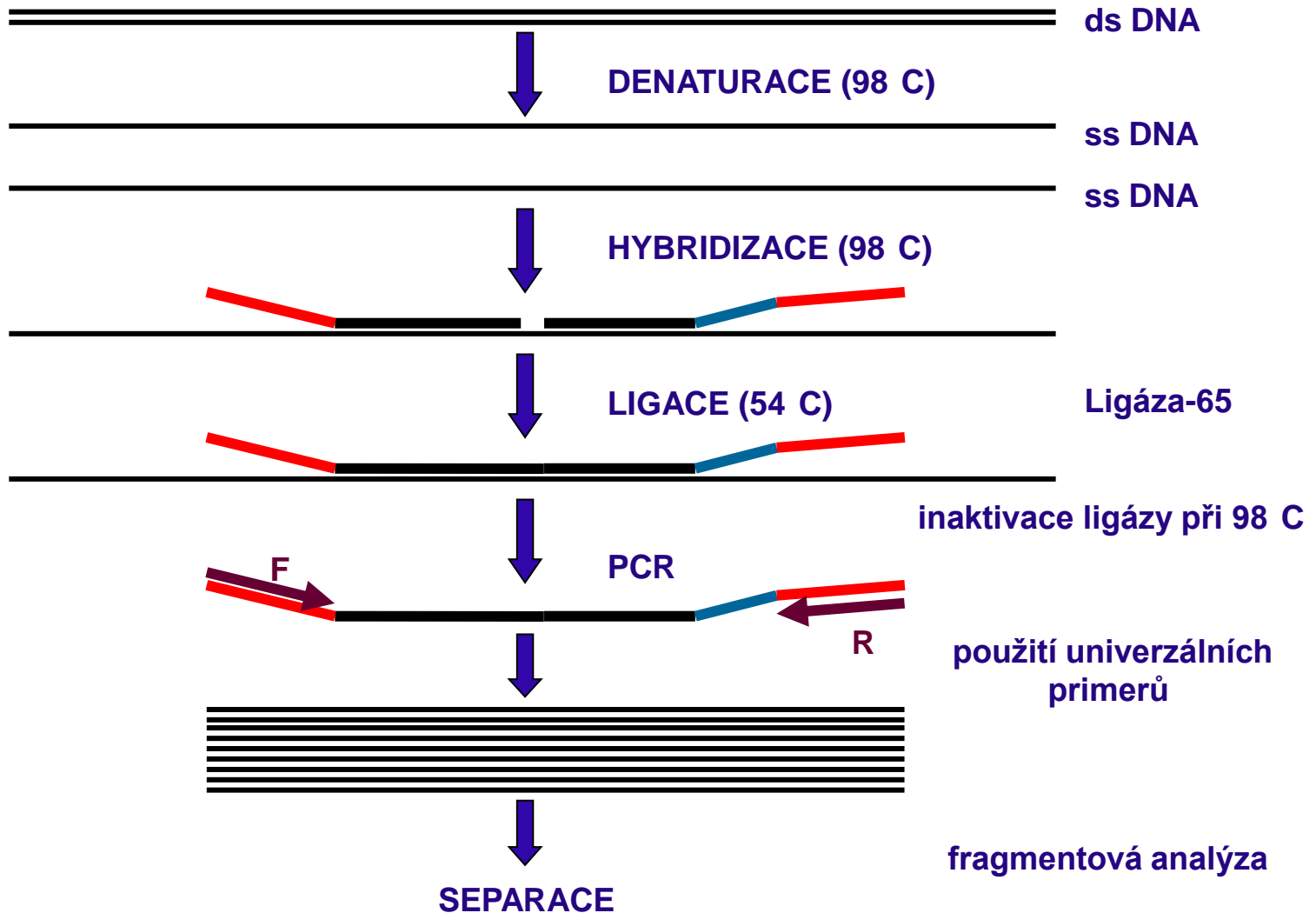


Porovnání jednotlivých přístupů

Method	Ion semiconductor (Ion Torrent sequencing)	Pyrosequencing (454)	Sequencing by synthesis (Illumina)	Sequencing by ligation (SOLiD sequencing)	Chain termination (Sanger sequencing)
Read length	up to 400 bp	700 bp	50 to 250 bp	50+35 or 50+50 bp	400 to 900 bp
Accuracy	98%	99.9%	98%	99.9%	99.9%
Reads per run	up to 80 million	1 million	up to 3 billion	1.2 to 1.4 billion	N/A
Time per run	2 hours	24 hours	1 to 10 days, depending upon sequencer and specified read length	1 to 2 weeks	20 minutes to 3 hours
Cost per 1 million bases (in US\$)	\$1	\$10	\$0.05 to \$0.15	\$0.13	\$2400
Advantages	Less expensive equipment. Fast.	Long read size. Fast.	Potential for high sequence yield, depending upon sequencer model and desired application.	Low cost per base.	Long individual reads. Useful for many applications.
Disadvantages	Homopolymer errors.	Runs are expensive. Homopolymer errors.	Equipment can be very expensive.	Slower than other methods. Have issue sequencing palindromic sequence.	More expensive and impractical for larger sequencing projects.

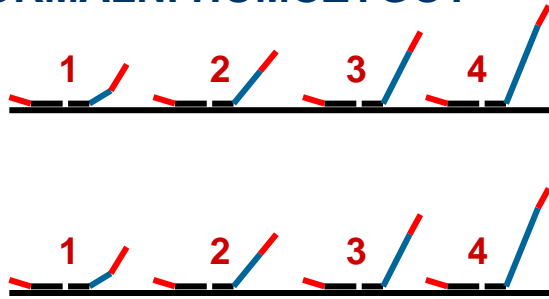
Princip MLPA

(Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)

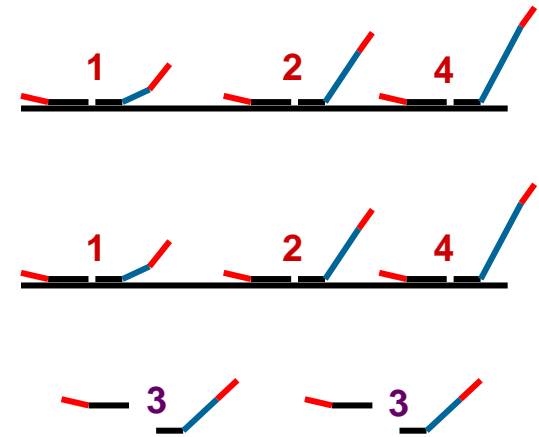


Detekce delecí

A) NORMÁLNÍ HOMOZYGOT

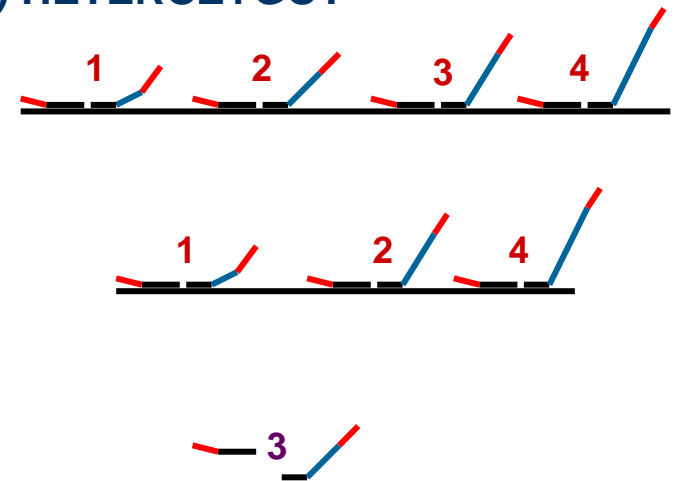


B) DELETOVANÝ HOMOZYGOT



	A	B	C
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1	————	————	————
2	————	————	————
3	————		————
4	————	————	————

C) HETEROZYGOT



DNA metylace a nádory

Distribuce metylace je v genomu nádorových buněk často pozměněna:

rozsáhlé hypometylované oblasti

hypermetylace ve specifických oblastech

v nádorových buňkách dochází k rozsáhlým demetylacím repetitivních sekvencí a stupeň hypometylace koreluje s progresí onemocnění.

hypometylace repetitivních sekvencí může být časou událostí kancerogeneze a může predisponovat buňku k přestavbám genomu mechanismem rekombinace

změny specifické genové exprese

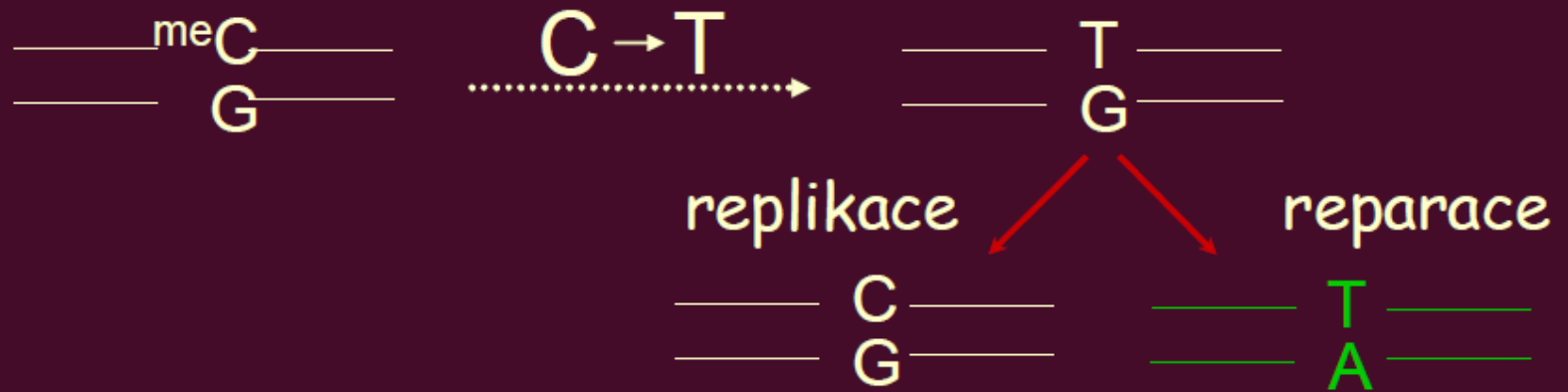
hypermetylace se v nádorových buňkách objevuje v promotorech genů pro nádorové supresory, genů účastnících se mezibuněčných adhezí, oprav DNA, ...

epigenetické změny mohou být postupné: DNA metylace a acetylace histonů fungují jako tzv. „transkripční reostat“

hypermetylace promotorů potenciálně reverzibilní: epigenetická plasticita může odrážet dynamiku některých procesů během kancerogeneze - např. během tvorby metastáz

změna aktivity i hladiny DNMT

Mutace zprostředkované metylací



Evoluce genů x nádory:

- 1) amplifikace sekvencí navodí metylaci
- 2) reverzibilní inaktivace
- 3) mutace meC - irreverzibilní inaktivace
- 4) vzniklý pseudogen - masivní mutace (bez selekčního tlaku)
- 5) vznik a reaktivace genu s novou funkcí
- x) mutace u nádorů - nové funkce aktivovaných genů

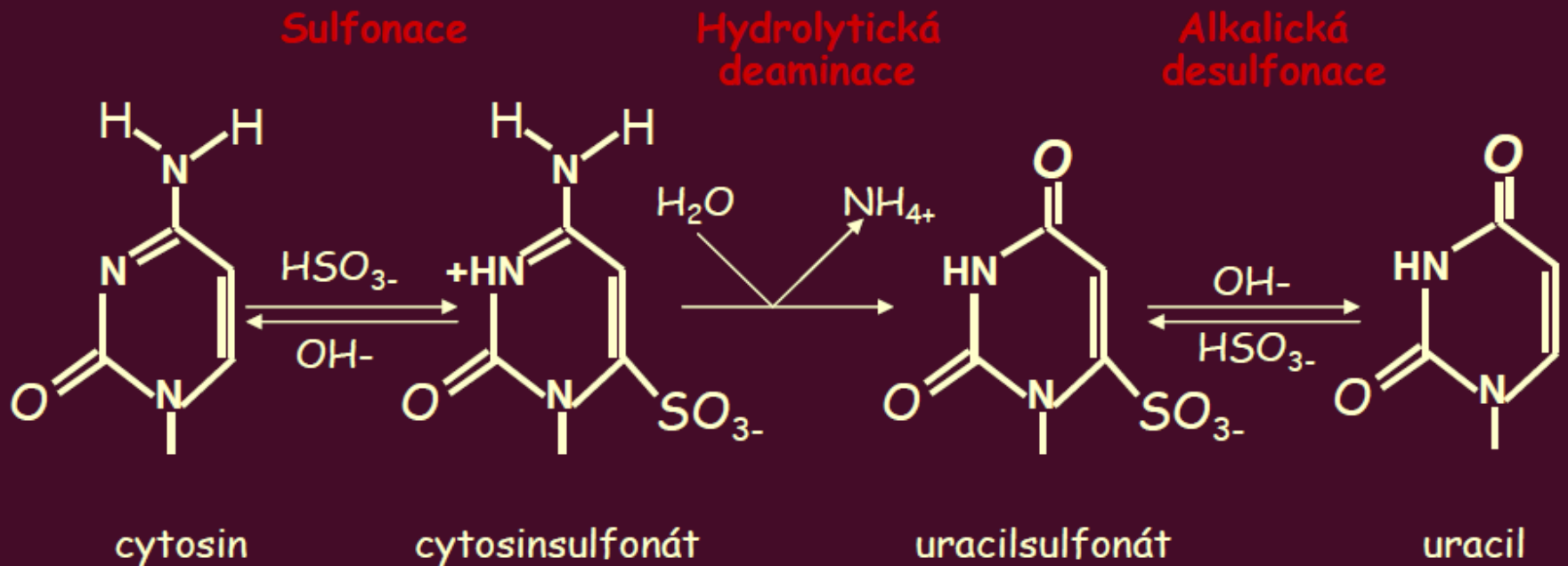
Bisulfitové mapování

NaHSO₃, zvýšené pH

1. denaturace
2. modifikace C na U (5metC nezměněn)
3. PCR, sekvenace

původní sekvence - metylovaná

modifikovaná sekvence - UNM



Restrikční štěpení

