

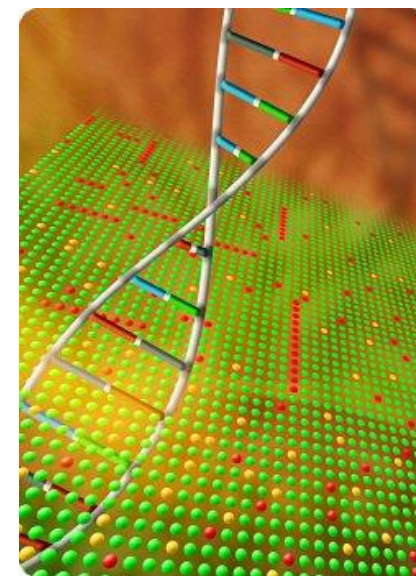
Středoevropský technologický institut (MU)
a
Interní hematologická a onkologická klinika (FN Brno)

Výzkumné strategie pro využití čipových technologií, využití v onkologii

Veronika Navrkalová

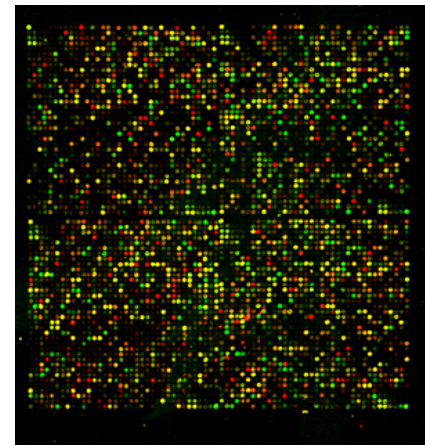
Obsah

- Obecné využití čipových technologií
- Příklady využití v různých biologických oborech
- Využití v biomedicíně a onkologii
- Konkrétní příklady z hematoonkologického výzkumu – lymfomy a leukémie
- Aplikace při studiu CLL a využití na našem pracovišti



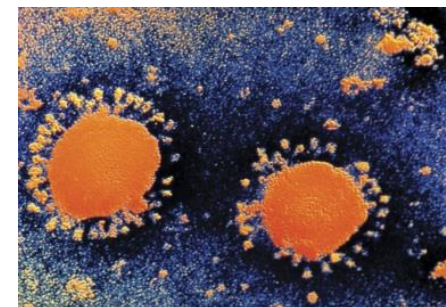
Obecné využití

- profilování genové exprese (GEP)
→ porovnání odpovědi buněk na stres, vliv prostředí na organismy, identifikace úrovně rezistence, detekce koexprimovaných genů (mohou spolu funkčně souviset)
- genotypizace → detekce mutací, SNPs
- analýzy CNVs, exprese mikroRNA, detekce CpG metylací
- studium interakcí DNA s bílkovinami
- funkční analýzy genů



Mezioborové využití

- Biomedicína: široké využití, hlavně v onkologii
 - určení správné diagnózy, klasifikace nádorů, nasazení efektivní léčby, včasná detekce markerů onemocnění
- Biochemie: proteinové čipy
 - analytické - detekce proteinů ve směsi (SARS, *Treponema pallidum*)
 - funkční - studování intermolekulárních interakcí, identifikace vazebných míst pro léčiva



- Mikrobiologie a virologie:

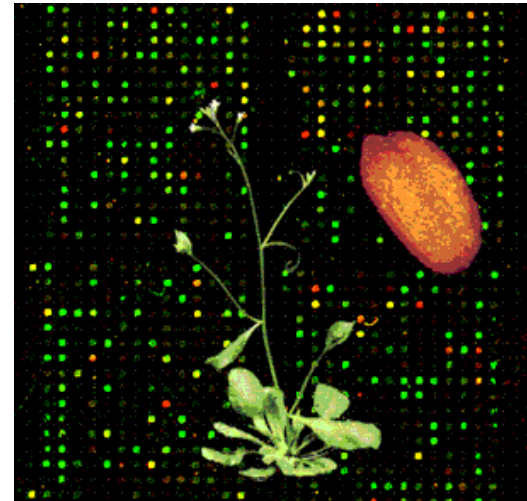
- detekce původců onemocnění (hrozba terorismu-
čip pro detekci 18 patogenních mikroorganismů,
např. *Bacillus anthracis*, *Clostridium botulinum*,
Ebola virus a další (Wilson et al., 2002)
- komparativní genomika - porovnávání genomů
příbuzných organismů, druhů, poddruhů a izolátů →
odhalení faktorů virulence, genetické různorodosti
(př. *Mycobacterium avium*)
- vyhledávání mutací v genech
zodpovědných za vznik resistance
na antibiotika (*Mycobacterium
tuberculosis* - genu proB a rifampicin)



- Metagenomika:
 - studium mikroorganismů bez jejich předchozí kultivace → lepší pochopení biologické diverzity
 - vzorky jsou posbírány přímo v daném prostředí → izolace DNA → přímá analýza
 - využití v medicíně, ekologii, zemědělství, atd.
- Farmacie: vývoj nových léčiv, vyhledávání potenciálních cílů terapie (genů, proteinů)



- Forezní genetika:
 - SNParray (identifikace osob)
- Biologie rostlin:
 - funkční genomika - studium cirkadiálních rytmů, odpovědi na stres, vývoje semen, signalizačních drah, asimilace dusičnanů

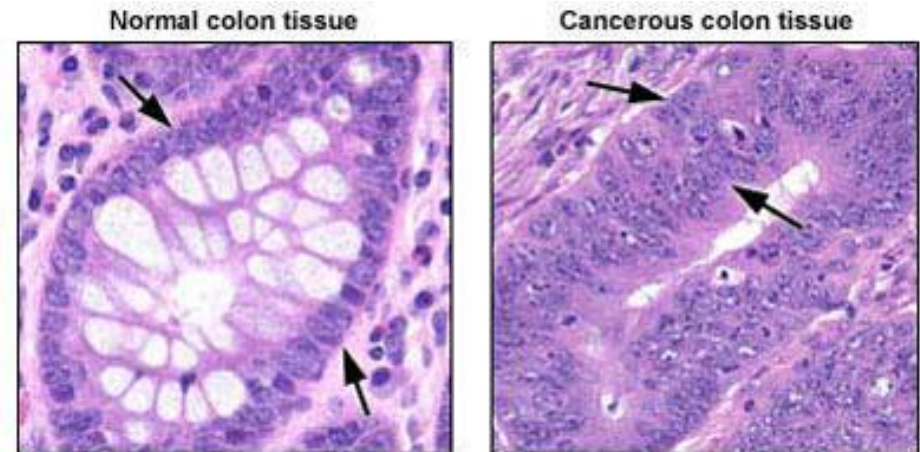


Využití v biomedicině



- detekce patogenů a studium vzniku rezistence na antibiotika
- studium geneticky podmíněných chorob:
 - detekce mutací; potvrzení/vyvrácení diagnózy; včasné odhalení onemocnění; sledování výskytu mutantních alel u rodinných příslušníků; prenatální testování u postižených matek
 - př. *BRCA1* (nádory prsu a vaječníku), *CFTR* (cystická fibróza), *ATM* (Ataxia telangiectasia), *TP53* (Li-fraumeni sy.)

- charakterizace nádorových tkání:
 - molekulární klasifikace nádorů
 - odlišení nádorové tkáně od normální
 - identifikace genových profilů predikujících metastázování a determinujících prognózu
 - navržení specifické léčby
 - př. nehodgkinské lymfomy a leukémie, nádory prsu a další solidní nádory



Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer

Laura J. van 't Veer^{*†}, Hongyue Dai^{†‡}, Marc J. van de Vijver^{*†},
Yudong D. He[‡], Augustinus A. M. Hart^{*}, Mao Mao[‡], Hans L. Peterse^{*},
Karin van der Kooy^{*}, Matthew J. Marton[‡], Anke T. Witteveen^{*},
George J. Schreiber[‡], Ron M. Kerkhoven^{*}, Chris Roberts[‡],
Peter S. Linsley[‡], René Bernards^{*} & Stephen H. Friend[‡]

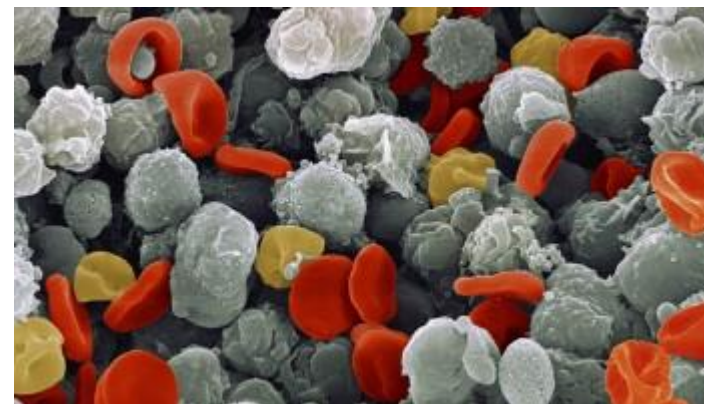
(Nature 2002)

- profilování genové exprese u pacientek s karcinomem prsu
- pomocí GEP 70 genů byli schopni predikovat vznik metastáz s 89% přesností
- výraznější individualizace protinádorové léčby (pacientky s nízkým rizikem relapsu by tak nemusely vůbec podstupovat adjuvantní chemoterapii)

Využití v hematologii

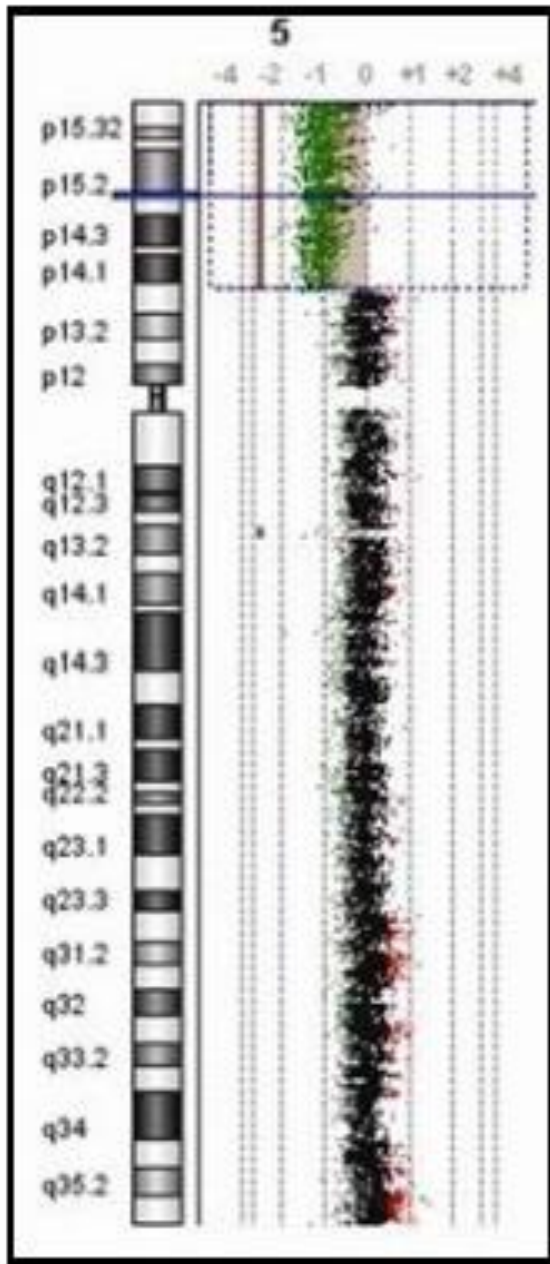
Profilování GE částečně odráží druh buňky, stádium diferenciaci, aktivitu vnitrobuněčných signálních drah, rychlost proliferace

- identifikace molekulárních markerů (diagnostické, prediktivní)
- klasifikace leukémií a lymfomů dle aberací
- vývoj nádorově specifické, individualizované terapie



Nejčastěji se používají:

- expresní čipy – studium odlišně exprimovaných genů např. před/po léčbě
- aCGH - detekce chromozomových aberací; srovnatelné s FISH (nižší detekční limit 25-30% vs. 10%, ale vyšší rozlišovací schopnost 100 kb vs. 5-10 Mb)
- SNP čipy – detekce SNPs a CNVs
- resekvenační čipy – mutační analýzy



Příklad aCGH

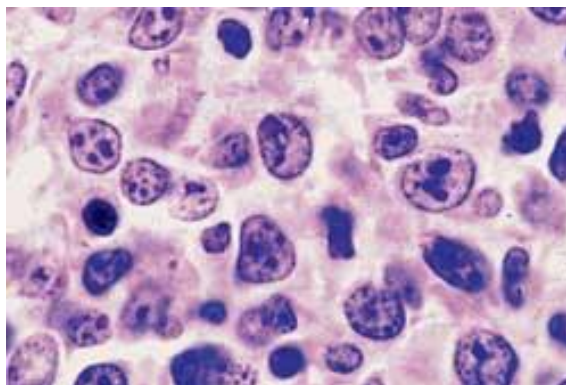
30,6 Mb delece v oblasti
5p15.33-13.3

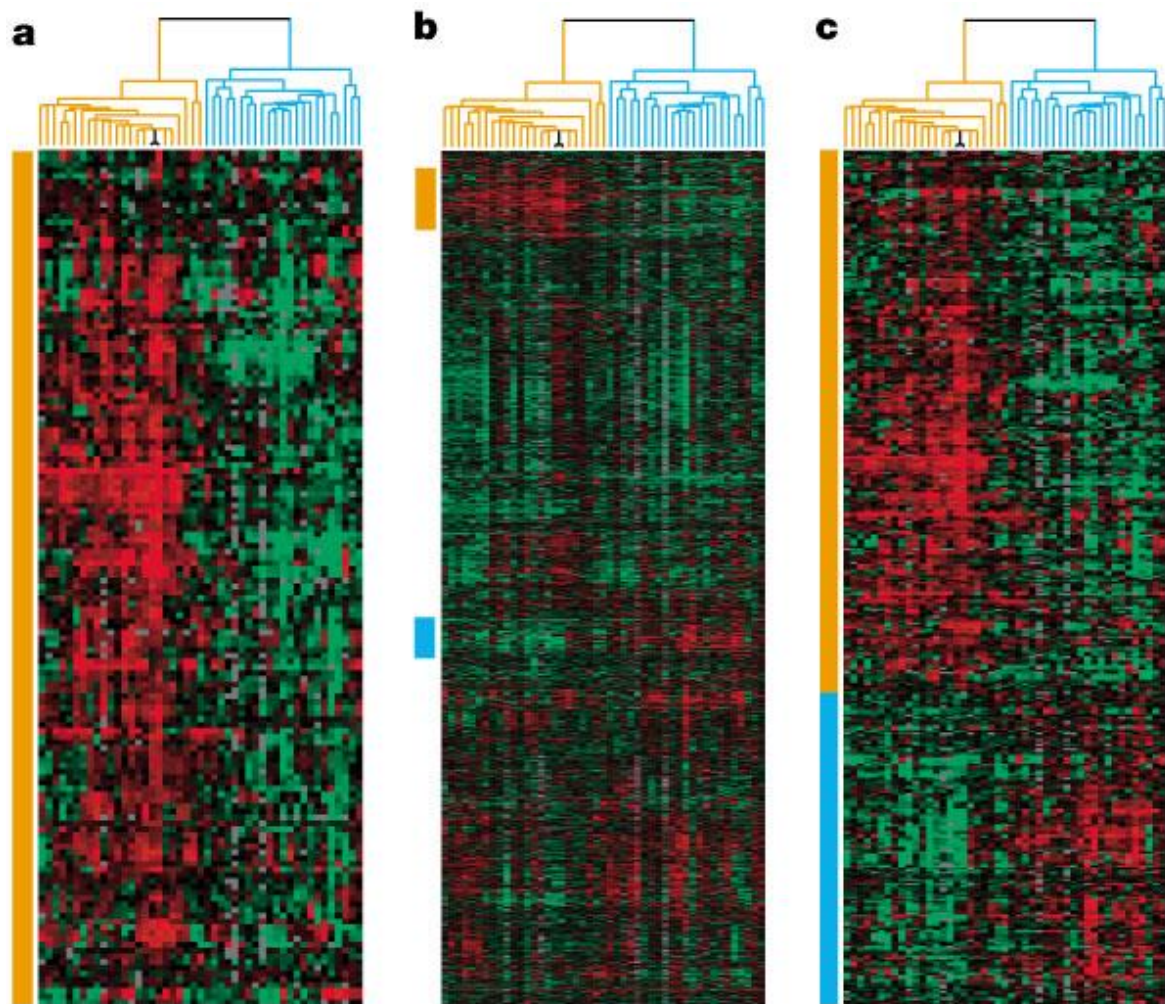
Aplikace u lymfomů

Difúzní velkobuněčný B-lymfom

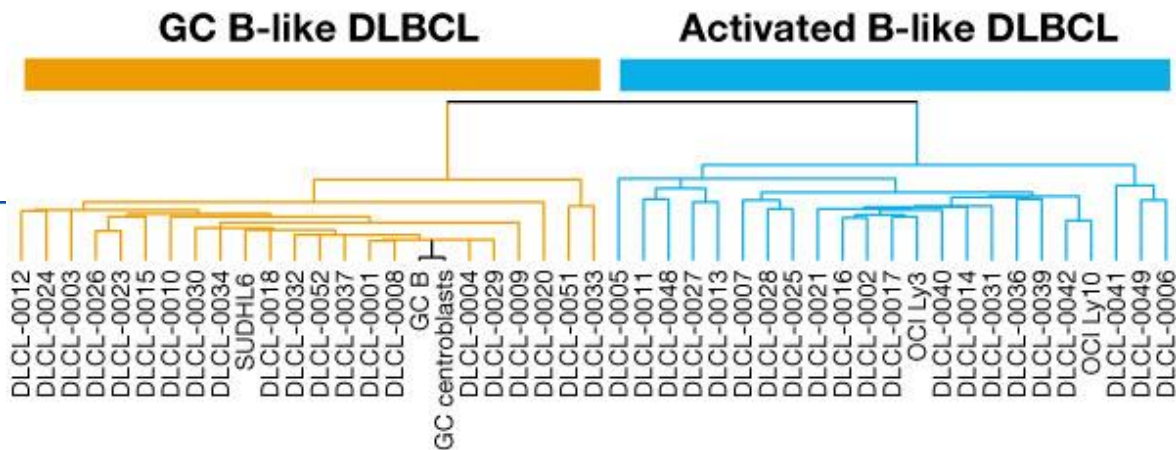
Profilování GE vedlo k objevu 2 podskupin DLBCL podle úrovně diferenciaci buněk:

- GCB typ - buňky germinálního centra
- ABC typ - *in vitro* aktivované periferní B-lymfocyty





Pacienti s GCB fenotypem měli výrazně lepší šanci na pětileté přežití oproti pacientům s ABC fenotypem (76% vs. 16%, $p=0,01$)
(Alizadeh et al., 2000)



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Folikulární lymfom

Expresní profil 191 vzorků rozlišil dvě skupiny FL, které silně korelovaly s přežitím pacientů (Dave et al., 2004)

GEP také umožnil rozlišení FL pacientů s indolentním nebo agresivním onemocněním → možnost nasazení vhodnější léčby (Glas et al., 2005)

Burkittův lymfom

GEP je vhodný nástroj pro odlišení BL a DLBCL (liší se agresivitou a léčbou) (Dave et al., 2006)

Lymfom pláštěvé zóny

Stanovení typického profilu pro MCL a jasného rozdílu mezi cyklin D1 pozitivní a negativní skupinou MCL (Rosenwald et al., 2003)

Analýzou GE bylo identifikováno 300-400 genů s odlišnou expresí pro MCL ve srovnání s normálními B-lymfocyty (Sara et al, 2002)

Aplikace u leukémií

Rozlišení základních 4 druhů leukémie podle genové exprese - 49 genů reprezentujících jednotlivé typy leukémií (AML, ALL, CML, CLL) (Song *et al.*, 2006)

Akutní myeloidní leukémie

Rozlišení pacientů s příznivou a nepříznivou prognózou (Yagi *et al.*, 2003)

Pomocí aCGH zjištěny časté amplifikace na chr.21 zahrnující geny *ERG*, *ETS2* a *APP* (Baldus *et al.*, 2004).

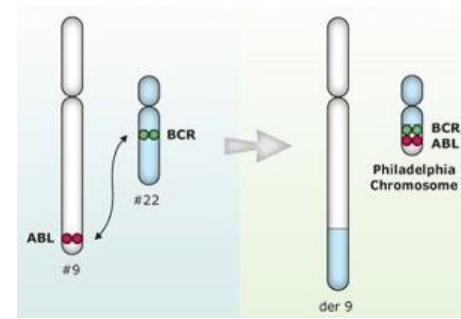
Akutní lymfoblastická leukémie

Rozdělení ALL do sedmi podskupin na základě profilu genové exprese - 1. T-ALL, 2. hyperploidní karyotyp (do 50 chromozómů), 3. *BCR/ABL*, 4. *E2A-PBX1*, 5. *TEL-AML1*, 6. *MLL*, 7. *unspecified ALL* (Yeoh *et al.*, 2002)

Podle expresního profilu 95 genů je možné stanovovat citlivost ALL buněk k inhibitoru tyrozin kináz STI571 (imatinib) používaného pro léčbu CML (Hofmann *et al.*, 2002)

Chronická myeloidní leukémie

Odlišné profily GE v různých fázích CML (chronická fáze vs. blastická krize) (Wu et al., 2004)



Objasnění rezistence na TKIs (imatinib) a predikce odpovědi na léčbu (Tipping et al., 2003)

Pomocí tkáňových čipů byla zjištěna vyšší exprese kinázy Fyn ve stádiu blastického zvratu než v chronické fázi CML (onkogen BCR-ABL1 up-reguluje Fyn) (Ban et al., 2008)

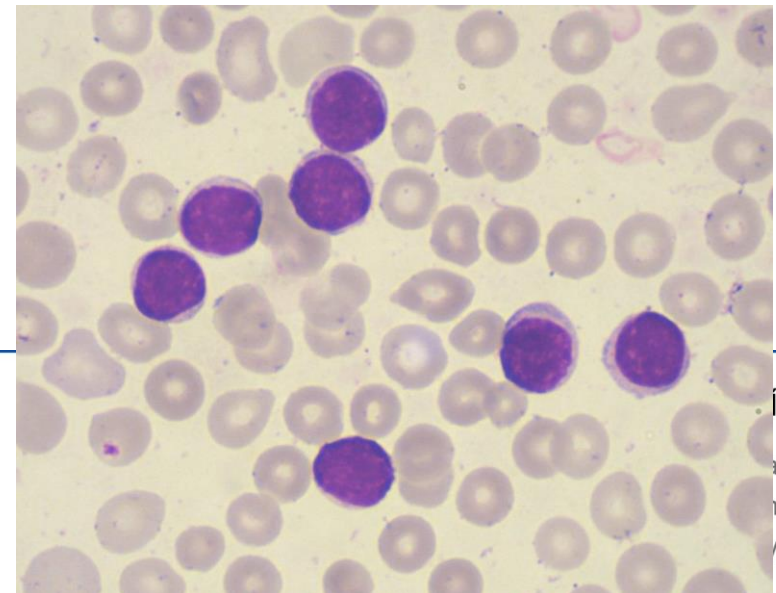
Chronická lymfocytární leukémie

Analýza exprese CD antigenů různých leukemických buněk pomocí protilátkových čipů: rozlišení normálních a CLL buněk poskytují antigeny CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25 a CD37 (Belov *et al.*, 2001)

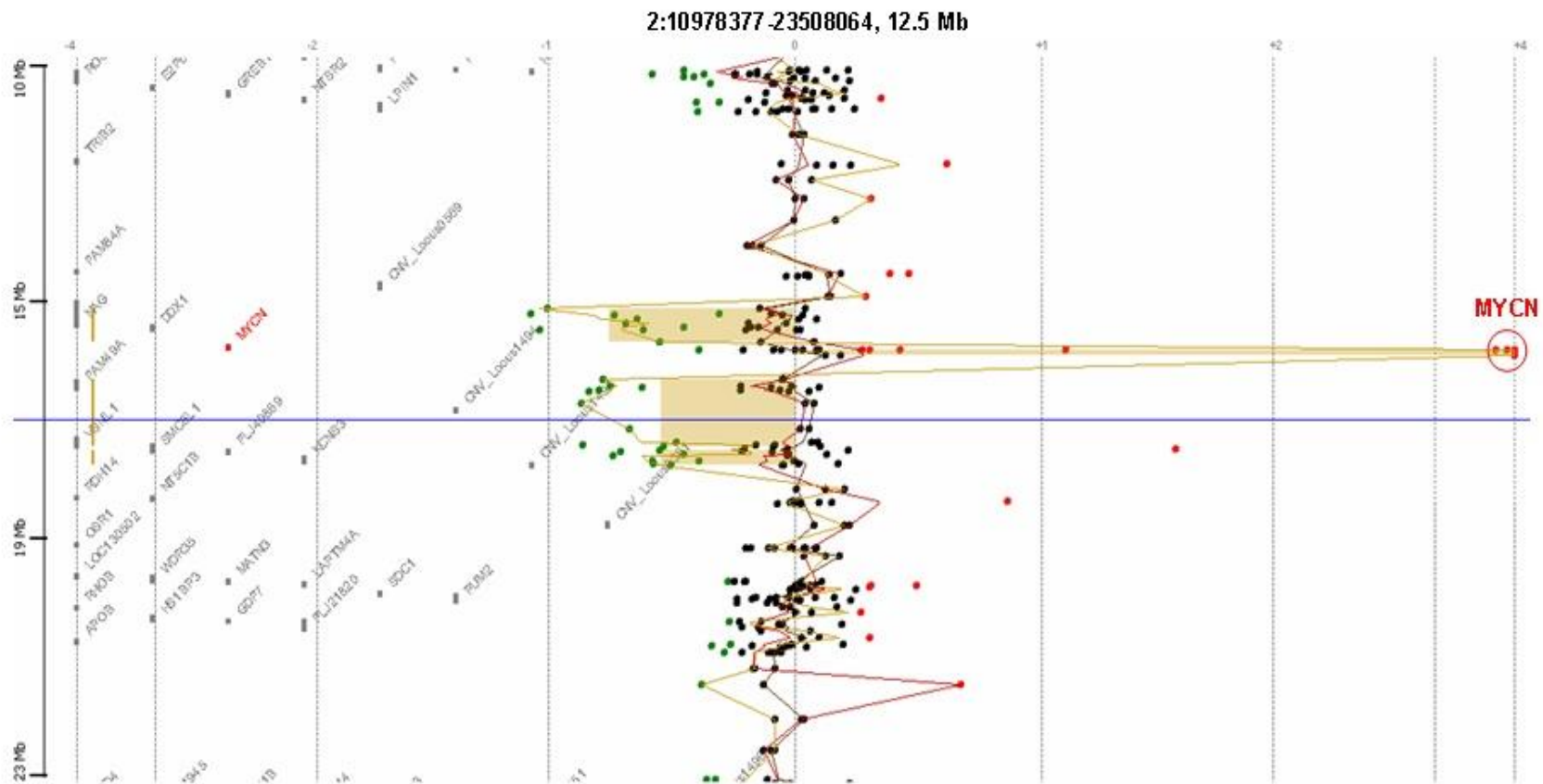
Stanovení charakteristického profilu genové exprese pro CLL: nezávislý na mutačním stavu IGHV, podobný paměťovým B-lymfocytům (Klein *et al.*, 2001, Rosenwald *et al.*, 2001).

Korelace několika genů s nemutovaným IGHV: objev *ZAP-70* patří k nejvýznamnějším příspěvkům DNA čipů do klinické praxe v oblasti prediktivní diagnostiky (Rosenwald *et al.*, 2001)

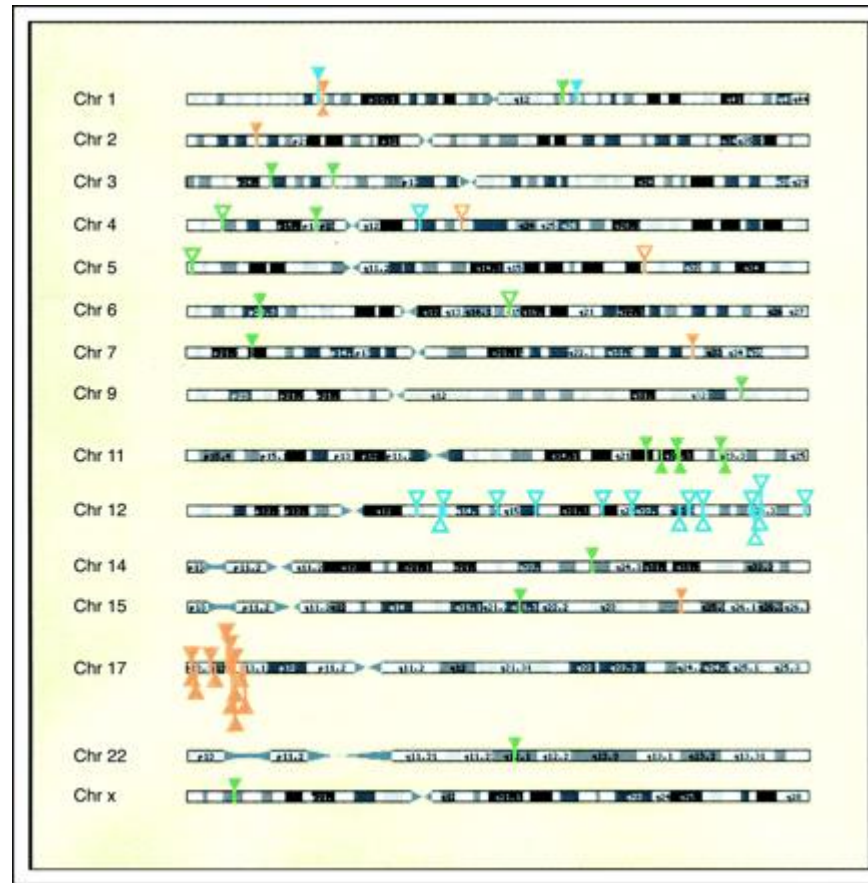
Pacienti s del13q jako jedinou cytogenetickou aberací byly pomocí GEP rozděleni na dvě skupiny: $\geq 80\%$ ztrátou 13q přežívají kratší dobu a mají kratší čas do první terapie než pacienti se ztrátou $\leq 80\%$
(Hernandez *et al.*, 2009)



Pomocí array CGH byly u CLL nalezeny další chromozómové aberace: kromě rekurentních del13q, del17p, del11q, tri12 také trizomie 19 a amplifikace onkogenu *MYCN* na chrom. 2p24 (Schwaenen *et al.*, 2004)



Korelace nejčastějších genomických aberací s redukovanou expresí genů ležících v těchto oblastech (del11q-*ATM*, del 17p-*TP53* aj.) (Haslinger *et al.*, 2004) → efekt dózy genů u CLL

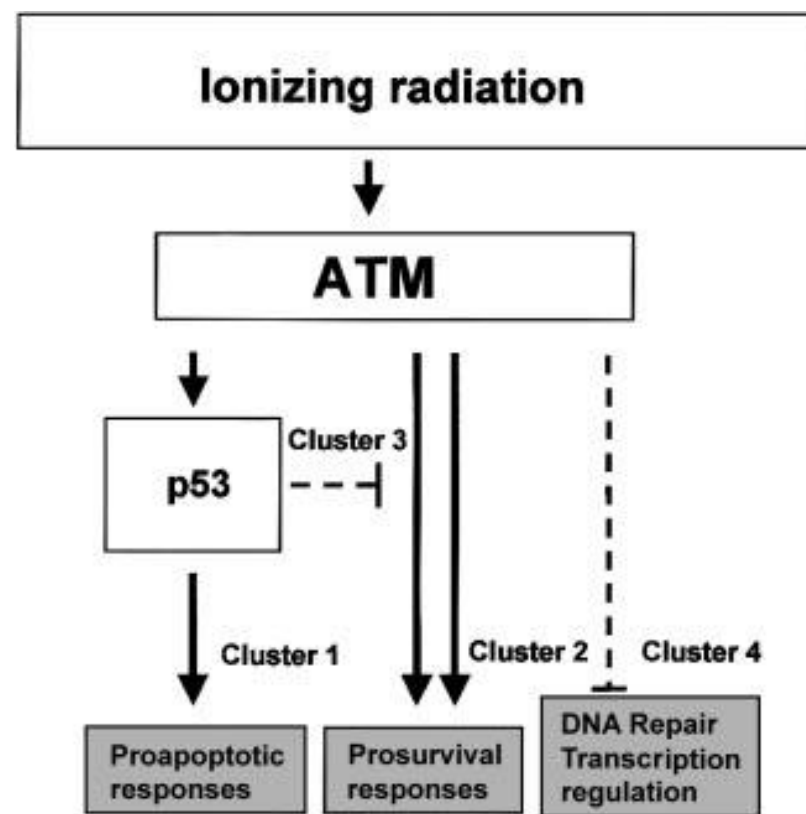


Studium DDR (DNA damage response) dráhy

Analýza ATM-mut, TP53-mut a wt vzorků odhalila, že transkripční odpověď na poškození DNA (IR) je dvojitá:

- p53 proapoptická odpověď (zahrnuje pouze část ATM transkripční odpovědi)
- ATM odpověď směřující k přežití buněk (nezávisle na p53)

(Stankovic et al., 2004)



MicroRNA a CLL

Mikročip pro profilování exprese miRNA (245 lidských a myších genů): CLL specifický profil miRNA (Liu et al., 2004)

Profilování exprese odhalilo unikátní miRNA profil 13 genů, které jsou specifické pro ZAP-70+ a IGHV nemut případy s progresí choroby (Calin et al., 2005)

Výzkumné účely – naše pracoviště (IHOK FN Brno a CEITEC)

Expresní čipy: rozlišení nejčastějších B-buněčných lymfomů (DLBCL, FL, MCL, BL)

aCGH: detekce nebalancovaných chromozomových aberací u CLL

Resekvenační čipy: mutační analýza několika desítek genů zároveň – TP53, ATM, Rb1, geny pro miRNA, atd.

SNP čipy: detekce CNVs u CLL



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

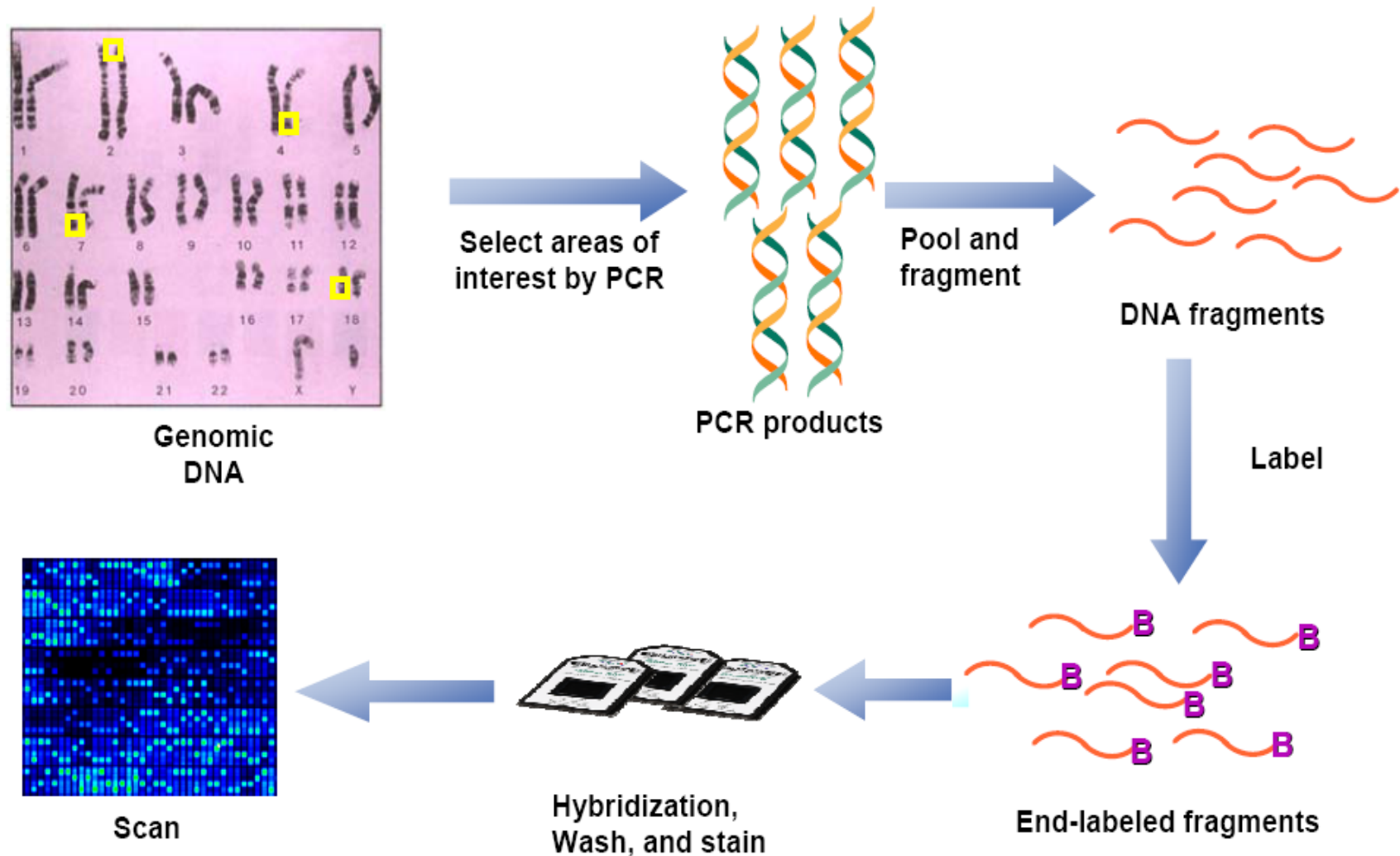
CustomSeq® Resequencing Array

Navržen pro detekci mutací v genech asociovaných s patogenezí CLL: DDR geny, apoptické geny, miRNA, kontrola buněčného cyklu, proliferace a diferenciace, ...

Kapacita 50kb dsDNA

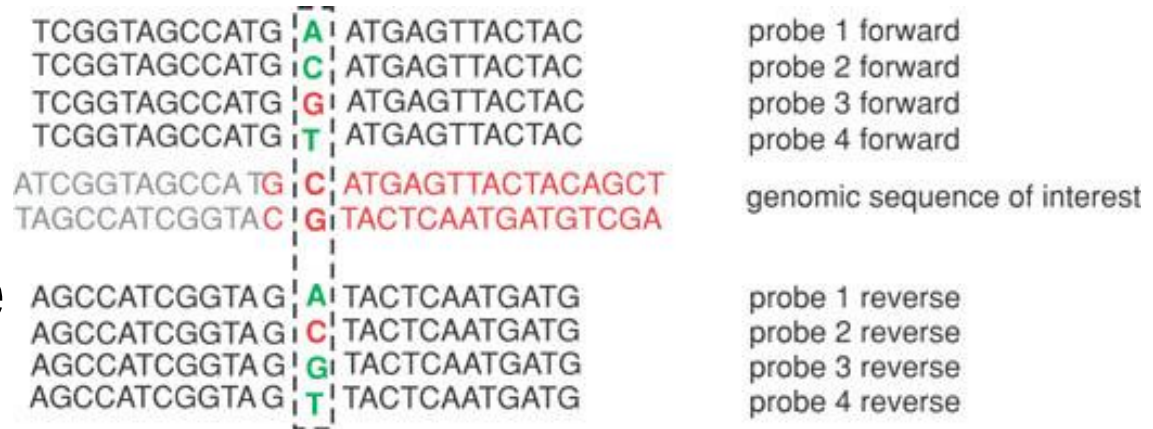


gDNA → long-range PCR → kvantifikace (PicoGreen) → pooling → purifikace → fragmentace (20-200 bp) → značení → hybridizace (16 h) → barvení a promývání → skenování → analýza dat

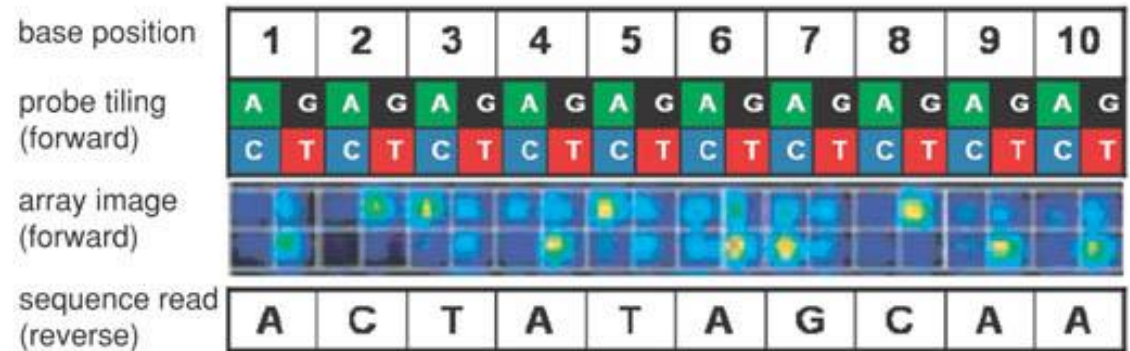


Princip

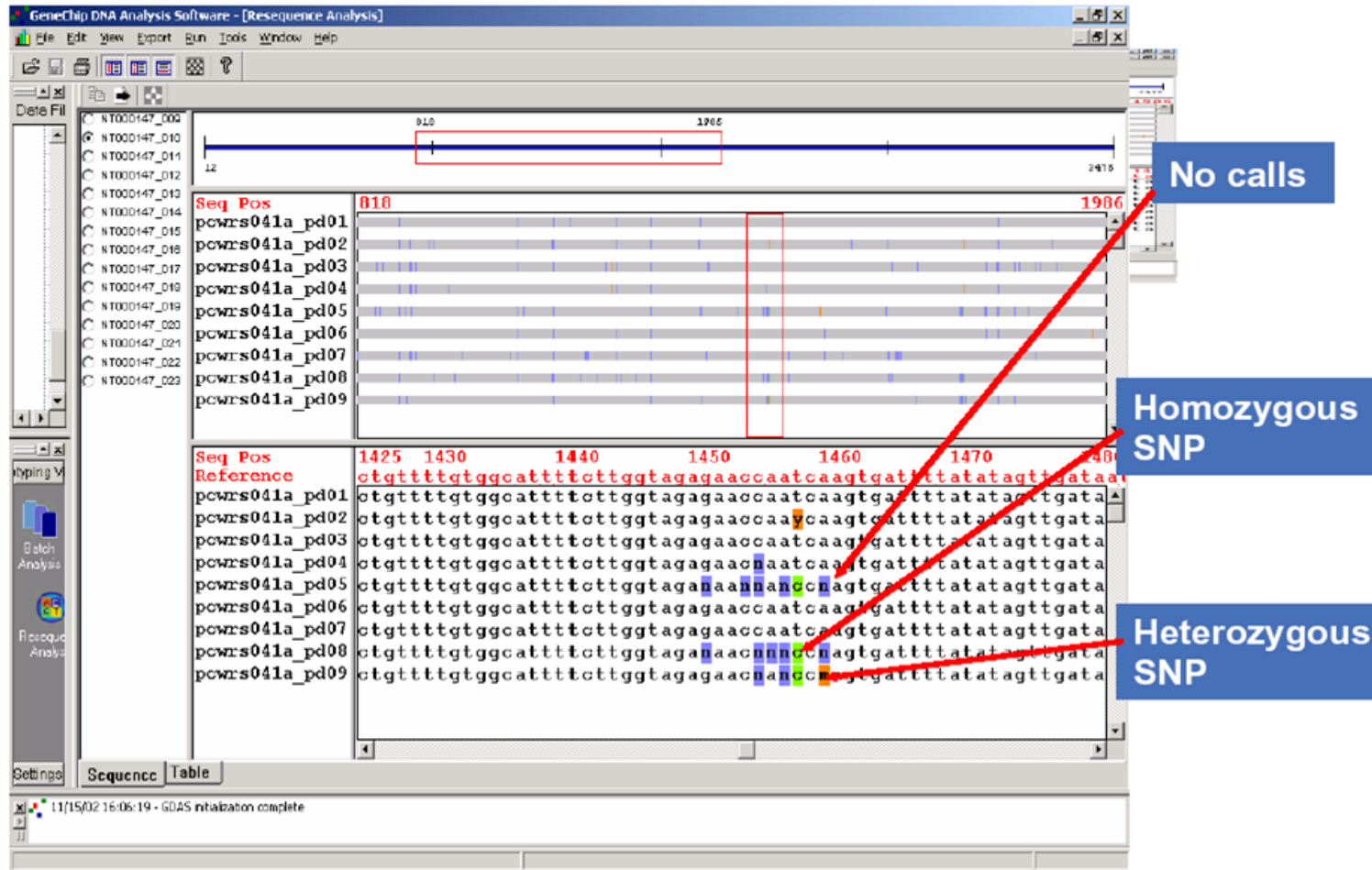
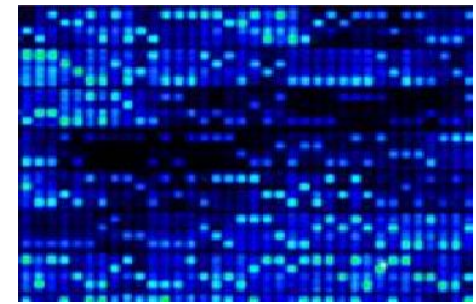
Hybridizace cílových úseků DNA na oligonukleotidové sondy imobilizované na čipu



8 unikátních prób (25-mer) pro každou bázi, próby se liší v centrální pozici



Výstup



Výhody a nevýhody

Robustnost, nižší cena, menší časová náročnost, senzitivita (10% vs. 20% Sanger), paralelní analýzy několika genů naráz, předběžná mutační/SNP analýza

Neschopost detekovat krátké inserce a delece, nutnost confirmace výsledků jinými metodami

Současný stav

Nahrazování čipových technologií **sekvenováním nové generace (NGS)**

Limity čipů: spolehlivost a reprodukovatelnost (nedostatečně homogenními soubory pacientů, rozdílná kvalita izolované RNA, variabilita statistických metod a různá kritéria statistické významnosti), problém s detekcí inzercí/delecí

Výhody NGS: flexibilita, snižování ceny, citlivost, robustnost

Děkuji za pozornost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky