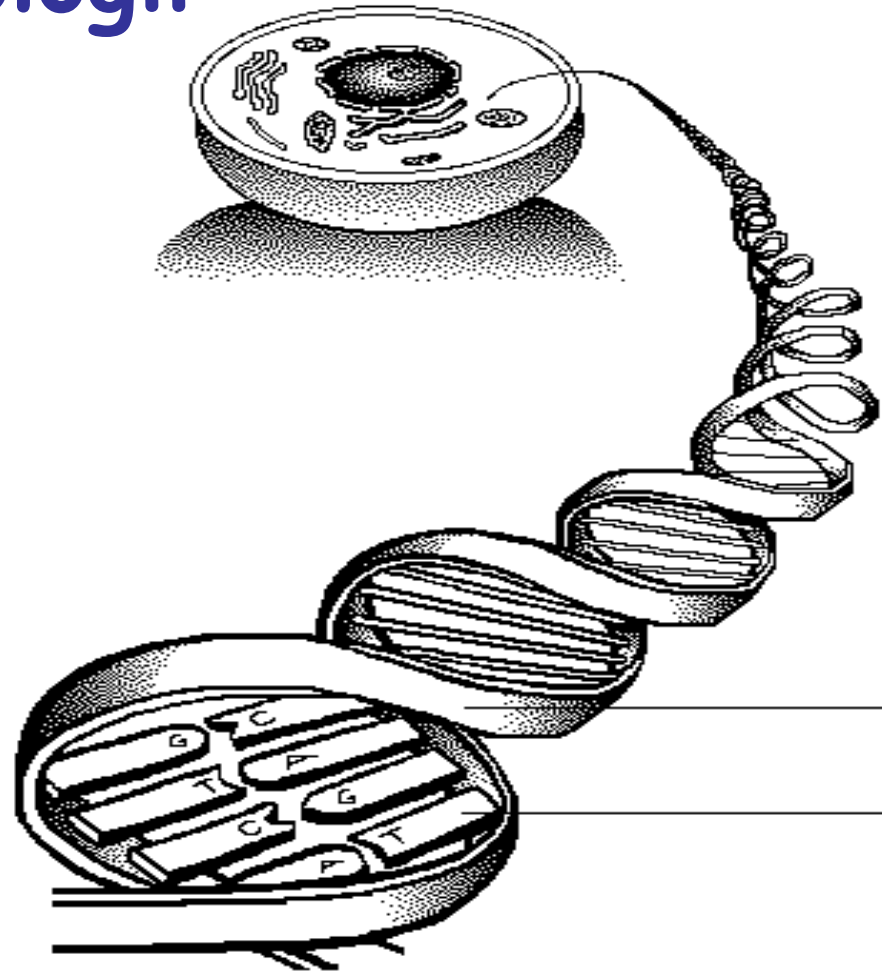


Základní metodické přístupy v experimentální onkologii & Modelové systémy



Experimentální modely v onkologii

Obecné zásady při výzkumu:

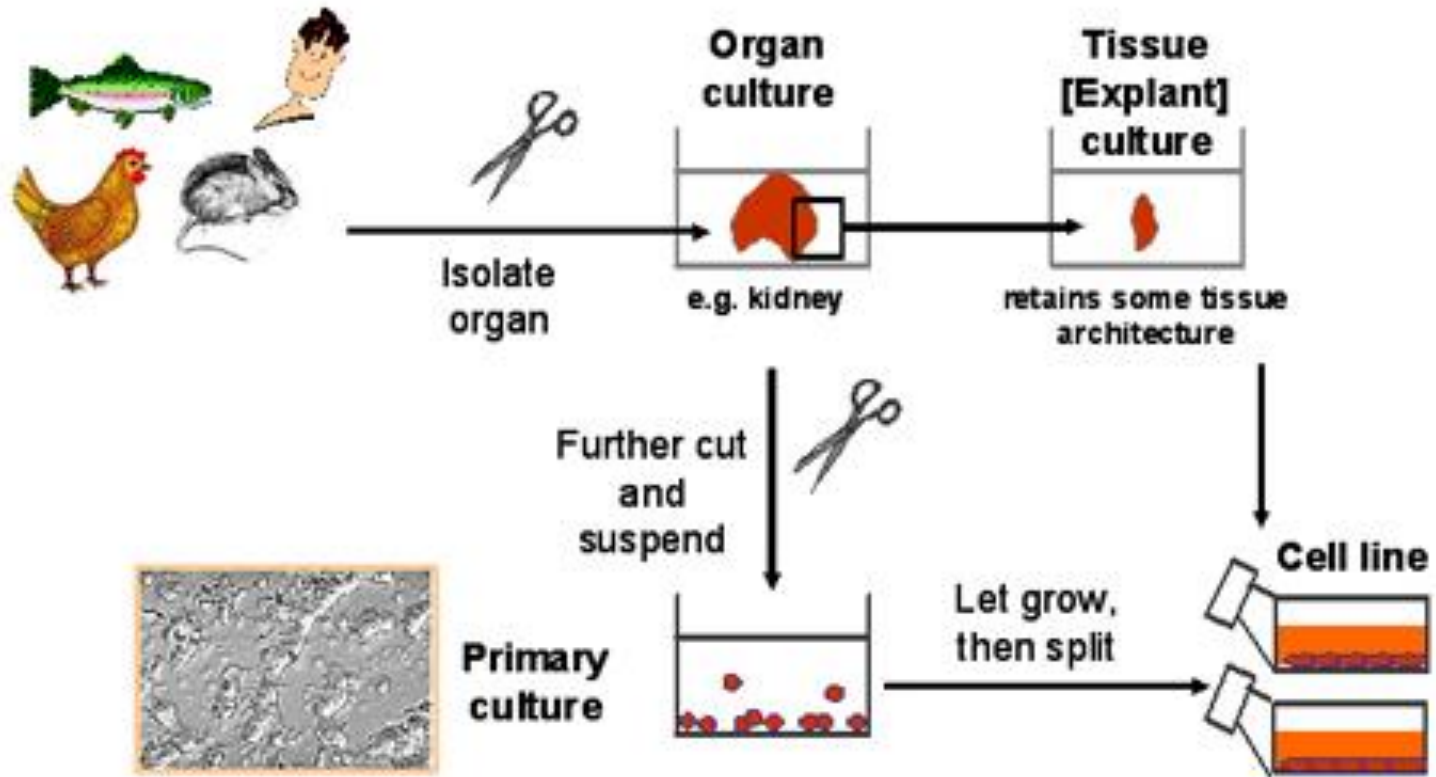
- Snaha porozumět fundamentálním procesům funkce a vývoje živých organismů
- Formulace přesně definovaných otázek ve vymezené oblasti výzkumu
- Výběr vhodného modelového systému (Mendel)
- Zjednodušený, ale impaktní systém umožňující testovat specifickou hypotézu a zda se dosáhne výsledného fenotypu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

• 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:

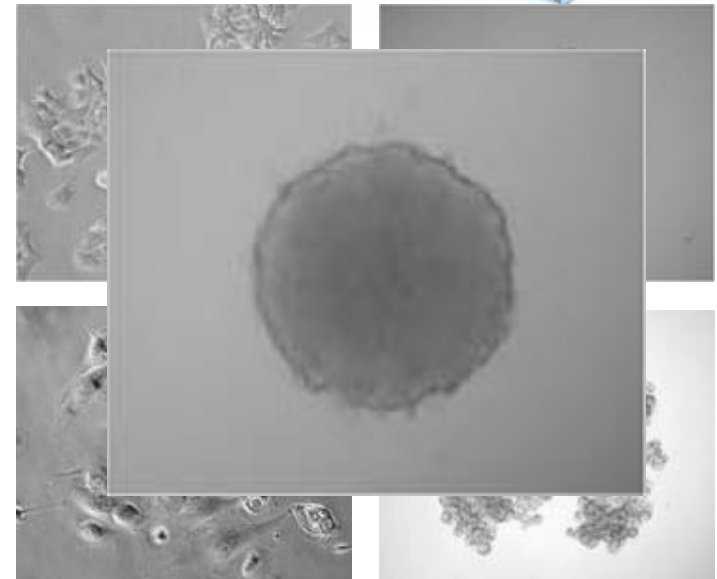
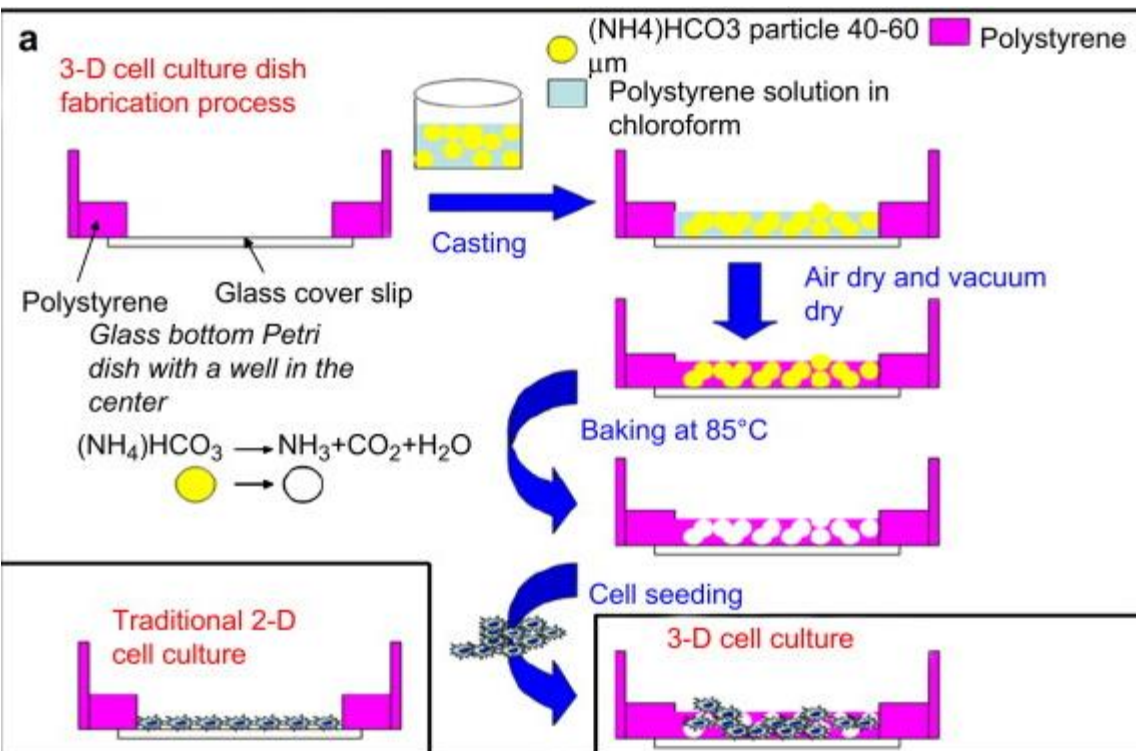
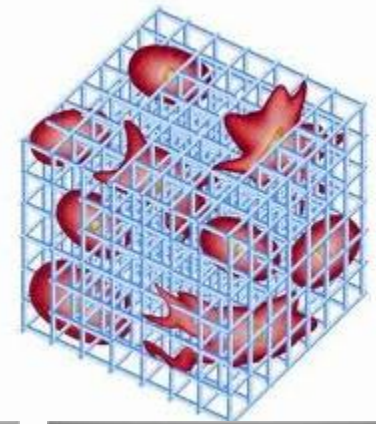
- Zástava b. dělení kontaktní inhibicí
- Indukce buněčné diferenciaci kontaktní inhibicí
- Akumulace apoptotických a nekrotických buněk
- Deplece nutričních faktorů

➤ Výměna média (pH), pasážování buněk, kryoprezervace

➤ Konfluente buněk, suspenzní vs. adherentní buňky

➤ Genové manipulace

➤ 2D vs. 3D kultivace

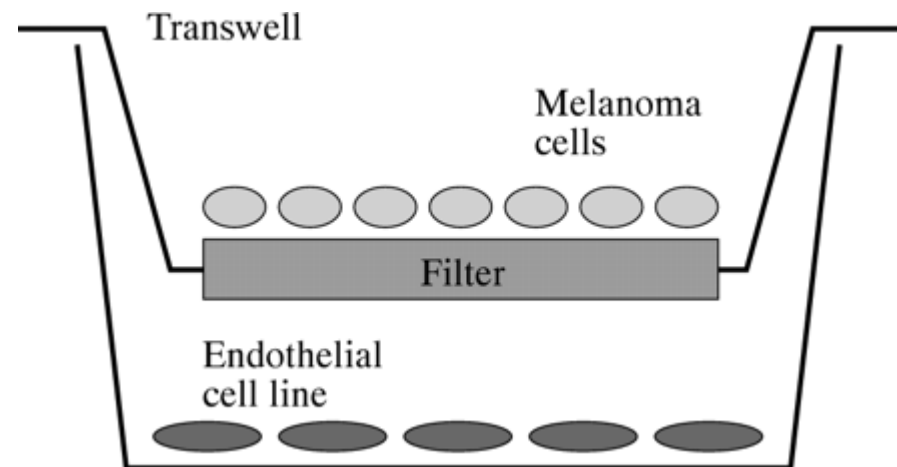


Výhody a nevýhody buněčných linií

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



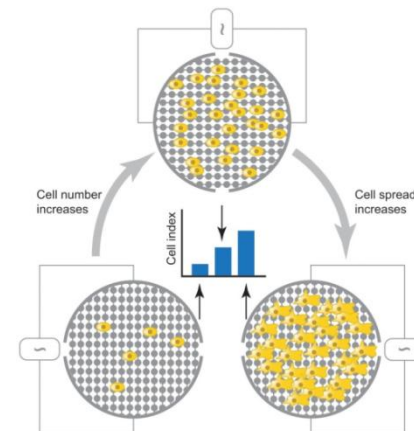
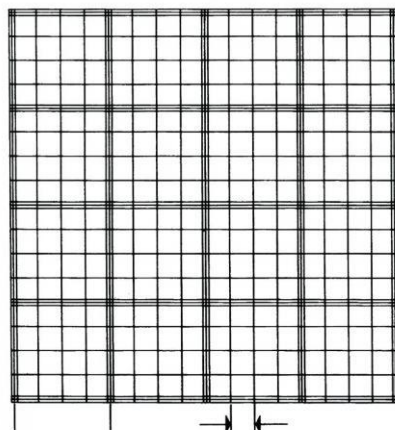
- Atypické okolí nádorových buněk
- Nebezpečí kros-kontaminací
- Kumulace dalších změn



Stanovení počtu a viability buněk



Bürkerova komůrka



xCELLigence RTCA

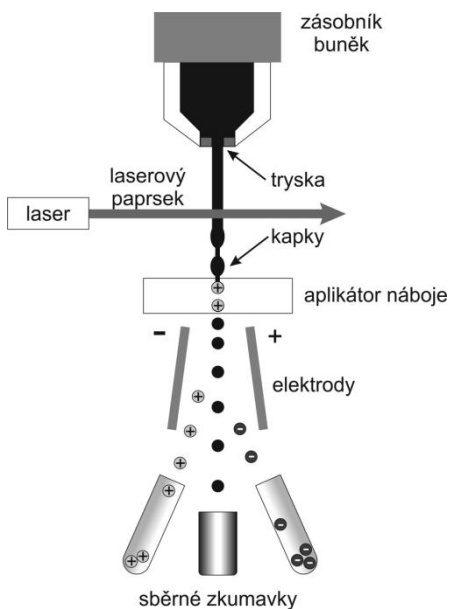
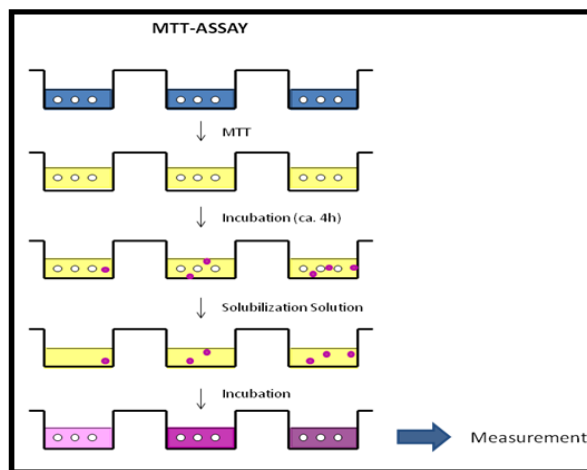
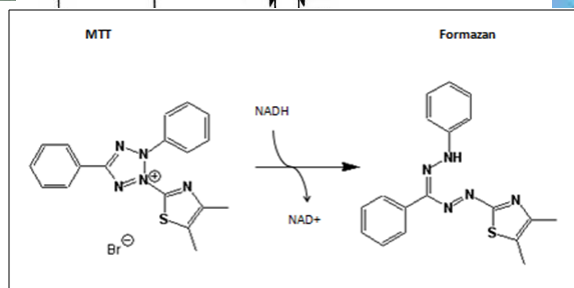
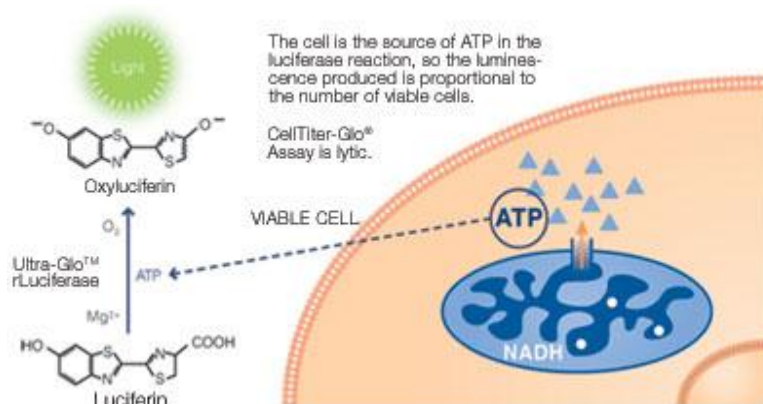


Schéma sorteru

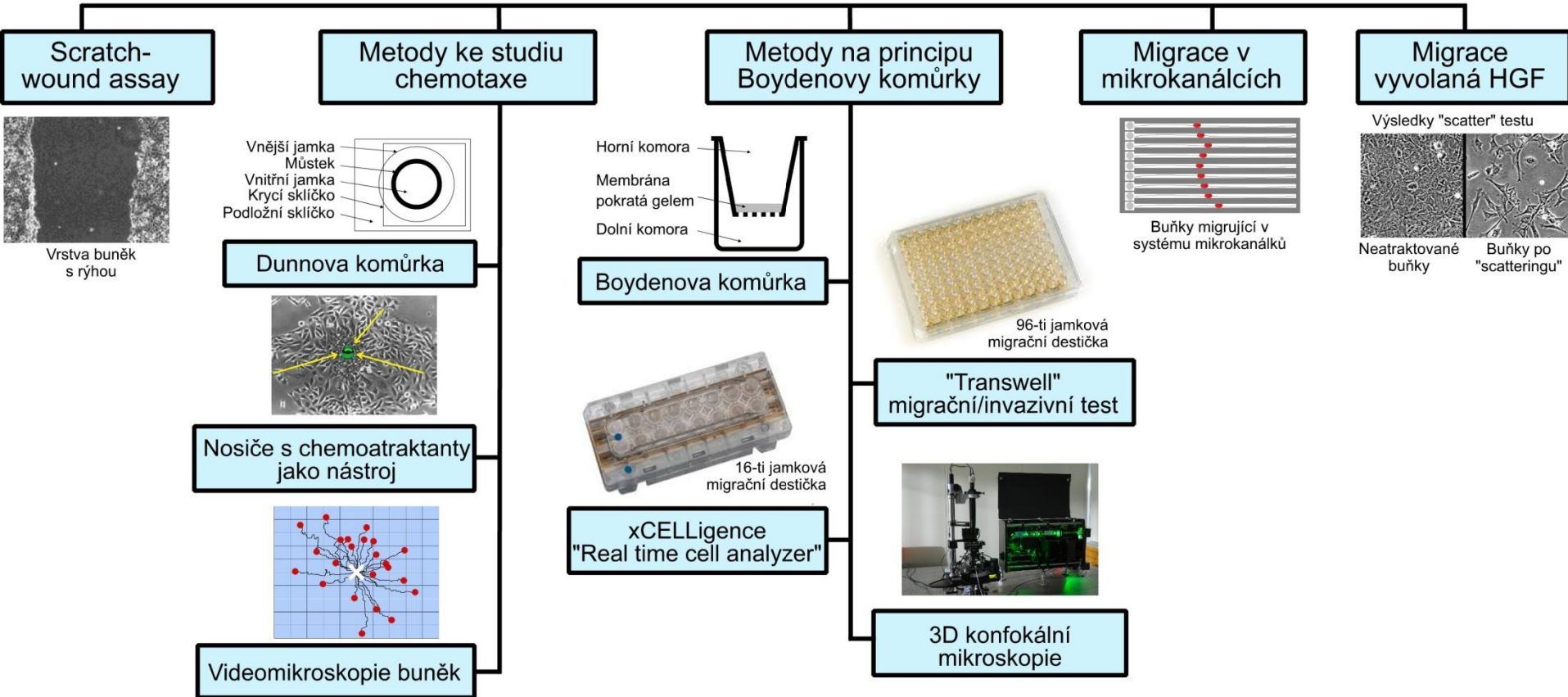


MTT test

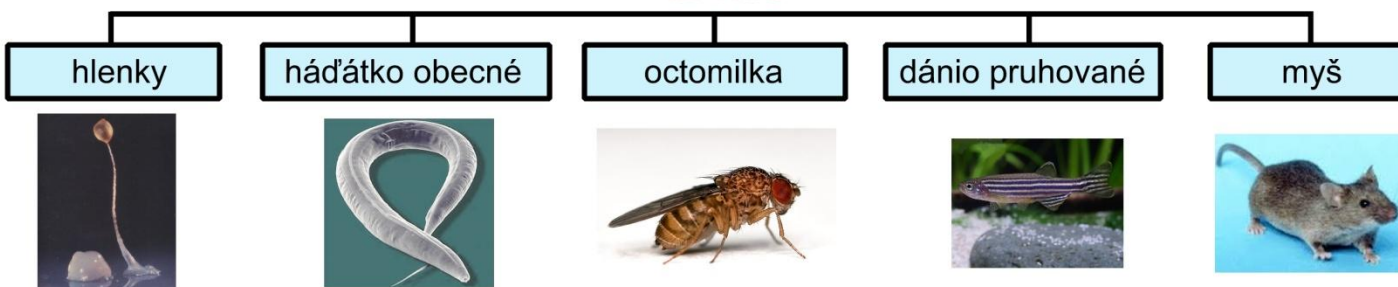


Metody studia buněčné migrace a invazivity

In vitro

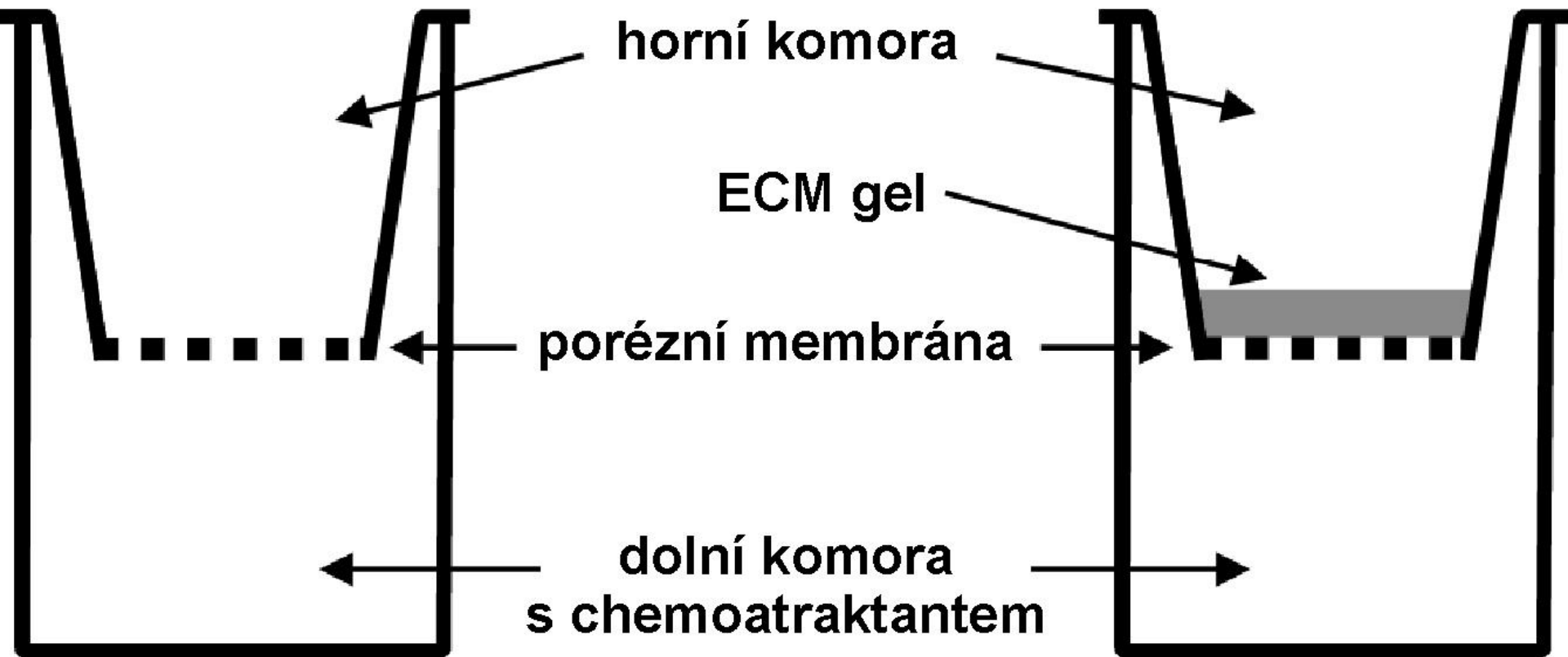


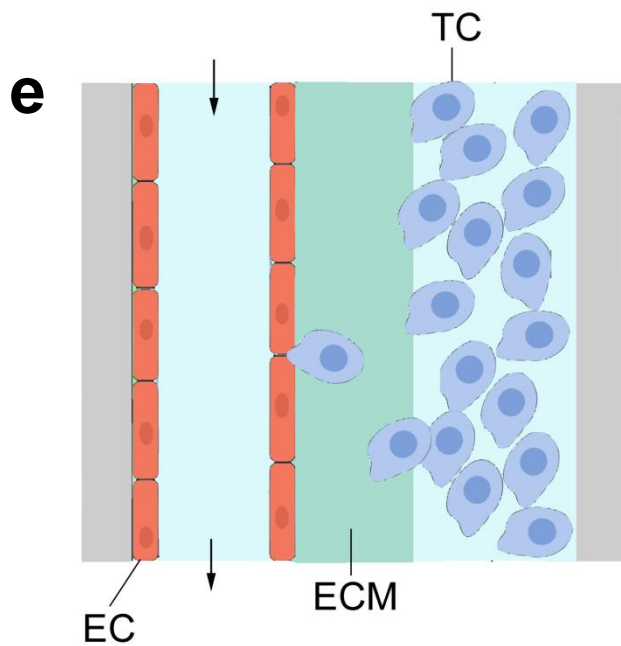
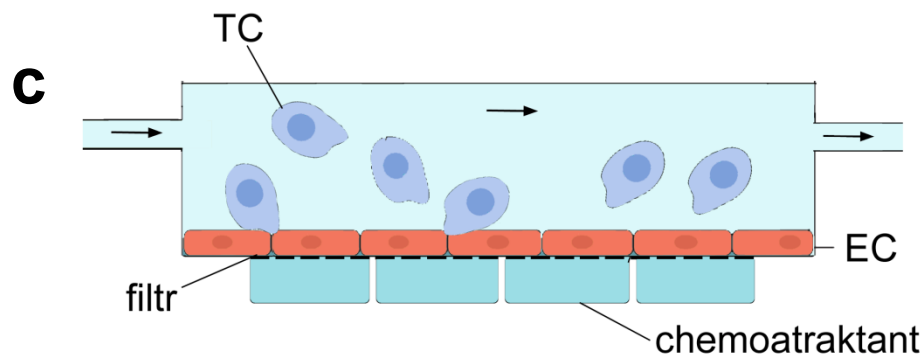
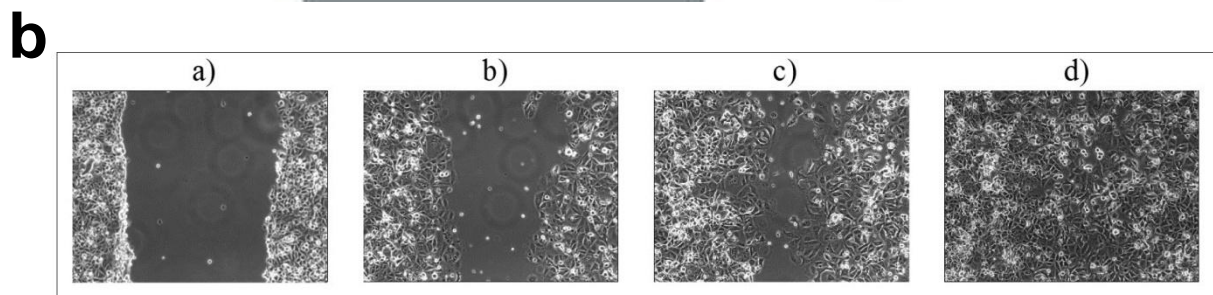
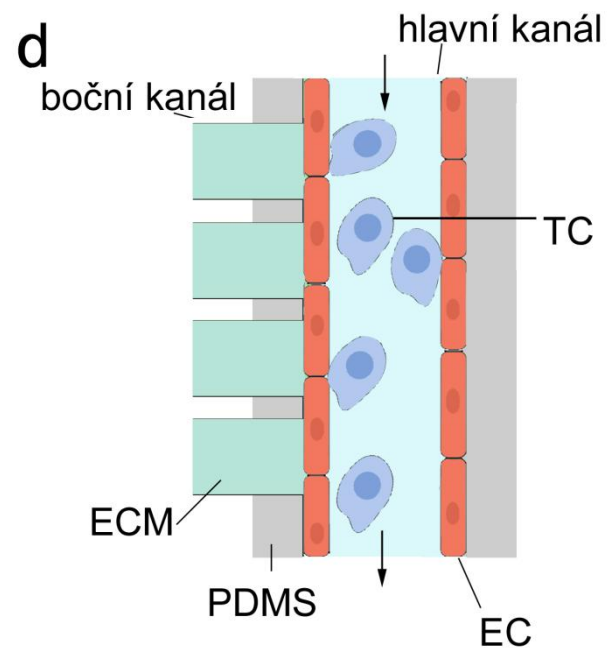
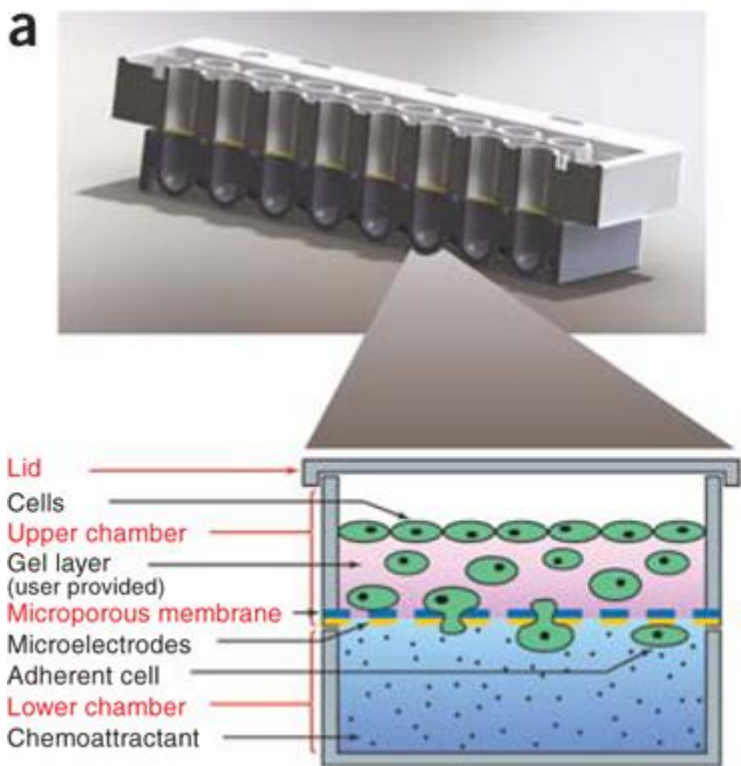
In vivo



MIGRACE

INVAZIVITA

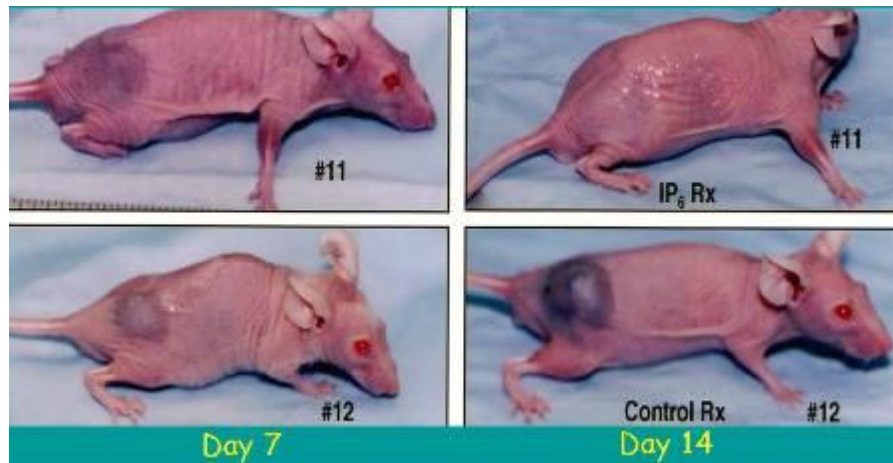




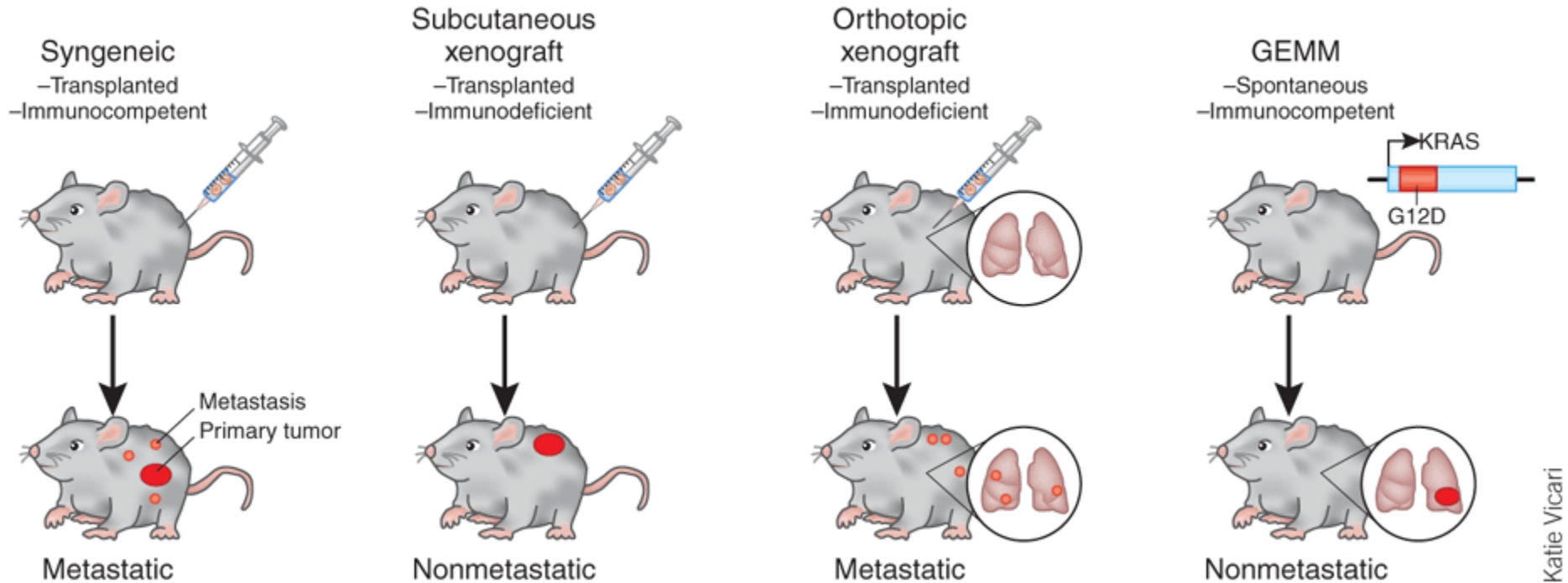
Studium metastázování *in vivo*

Nejčastěji myší model:

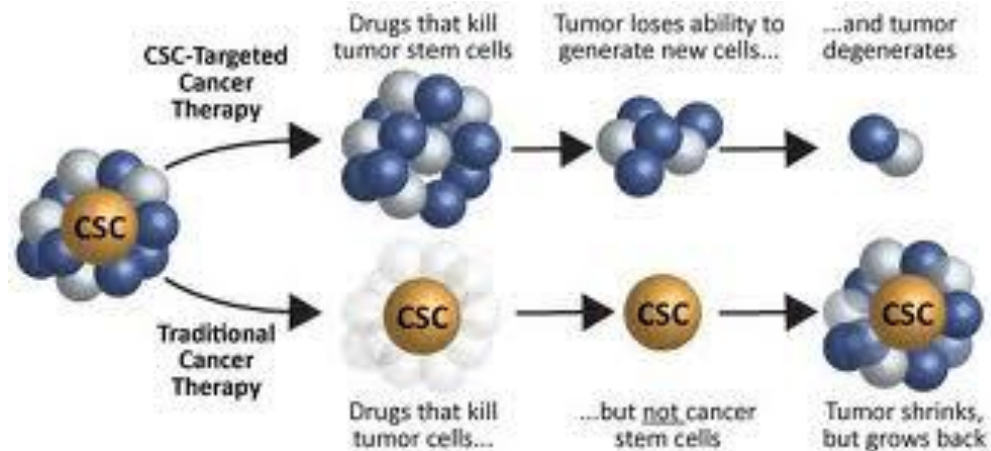
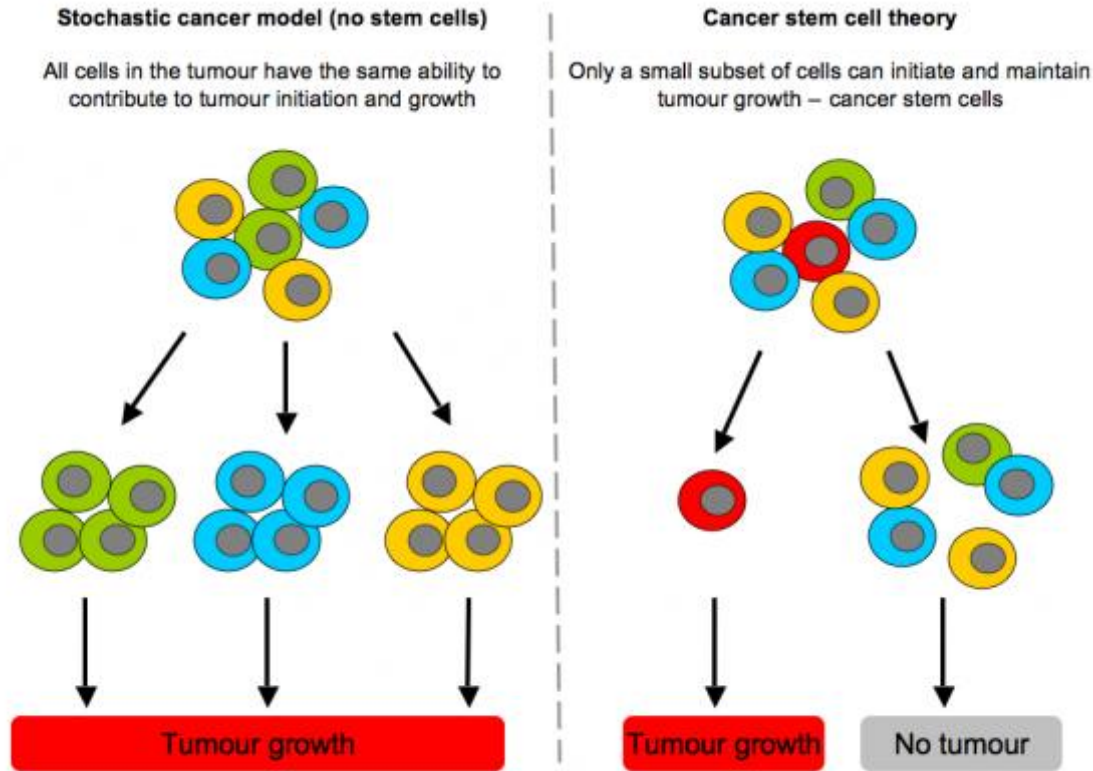
- BALB/c (kmen inbredních laboratorních myší)
- transgenní myši
- imunodeficientní kmeny
 - Athymické Nu/Nu myši (chybí brzlík, neprodukují T-buňky)
 - SCID myši (autozomálně recesivní mutace SCID = těžká kombinovaná imunodeficience, chybí protilátková i T-buněčná imunita)

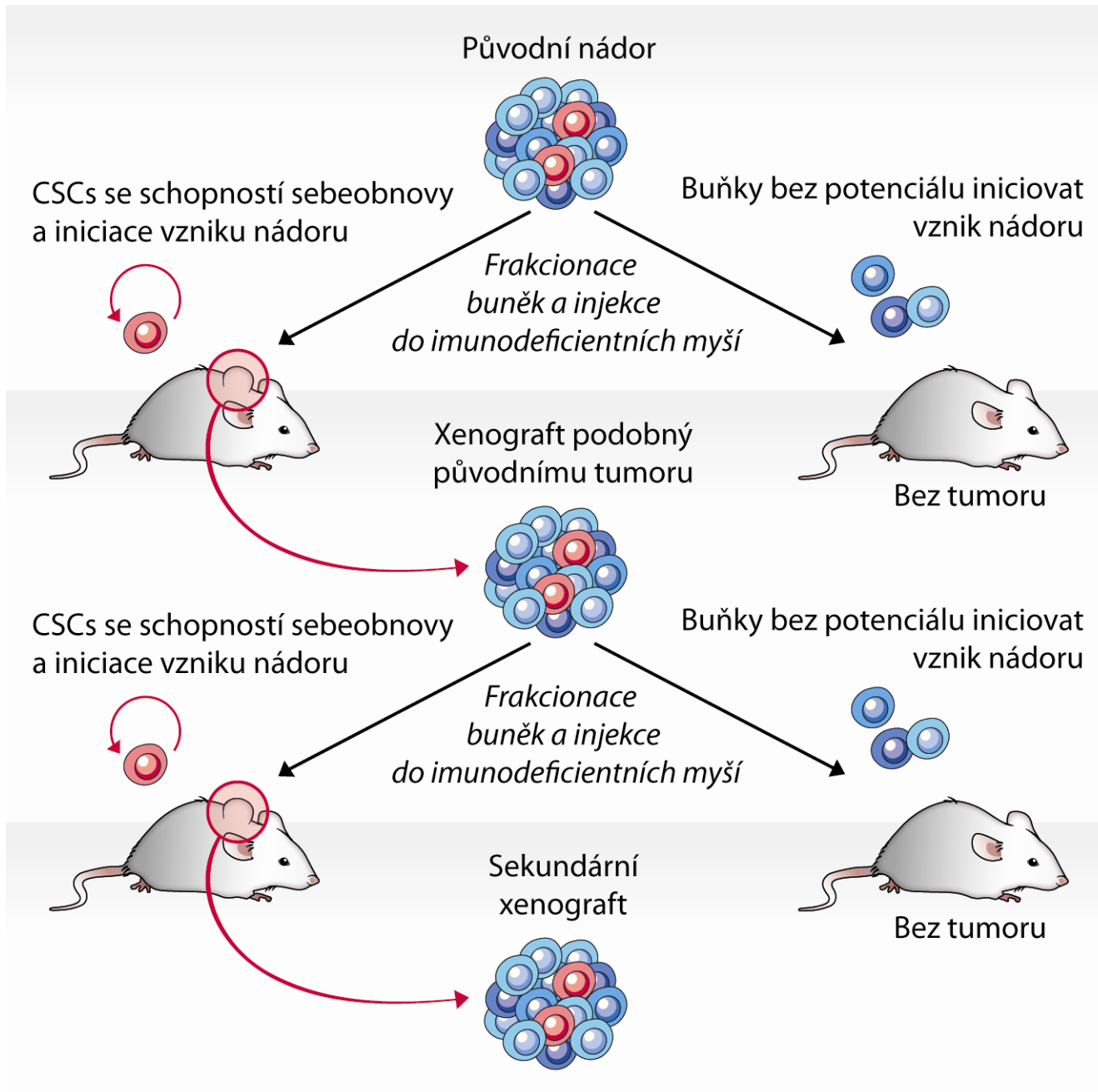


Typy myších modelů v onkologickém výzkumu



Klonalita nádorů vs. Nádorové kmenové buňky





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

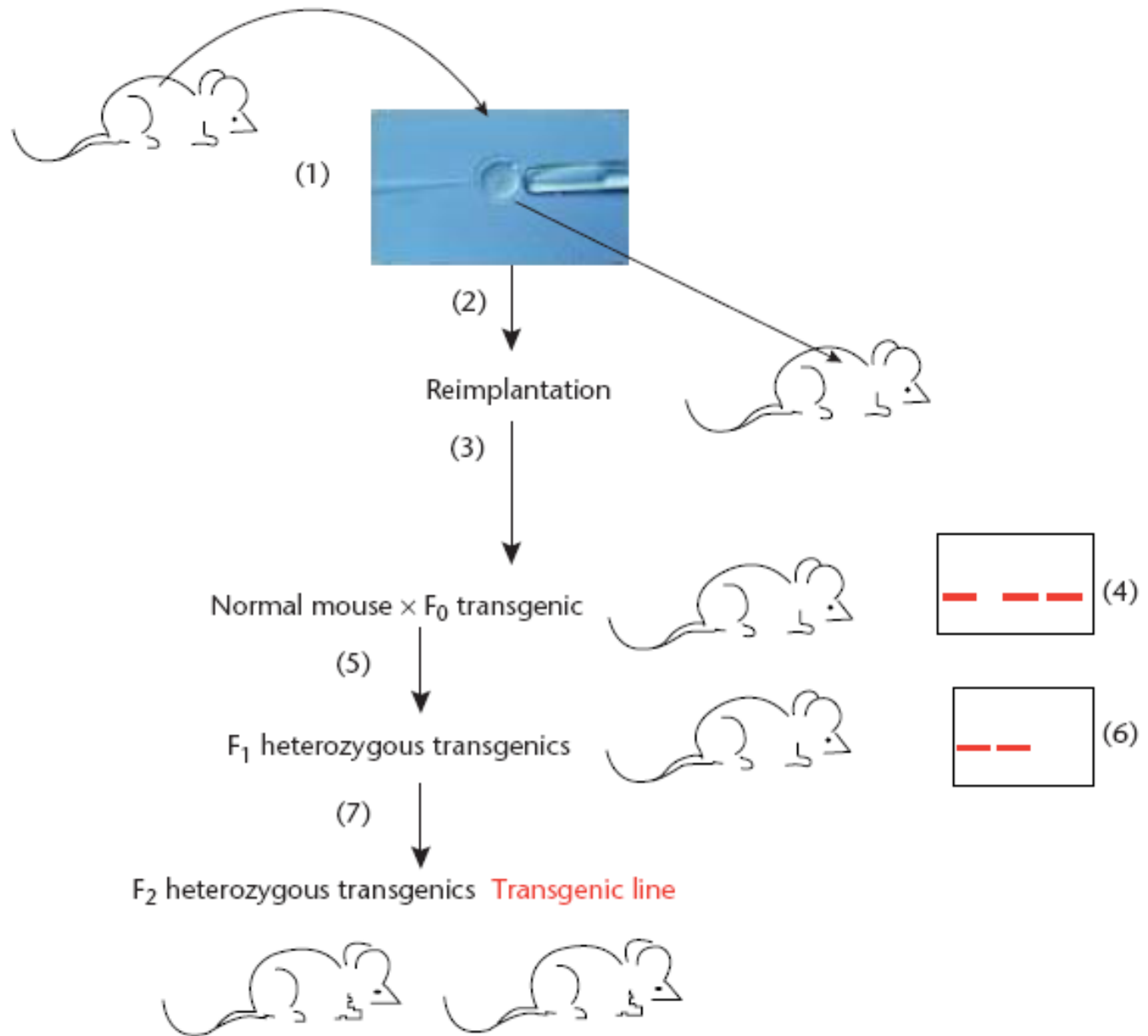
Příprava inbredních kmenů - možnost pokusů na geneticky uniformních organismech (více jak 700 mutovaných kmenů).

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.

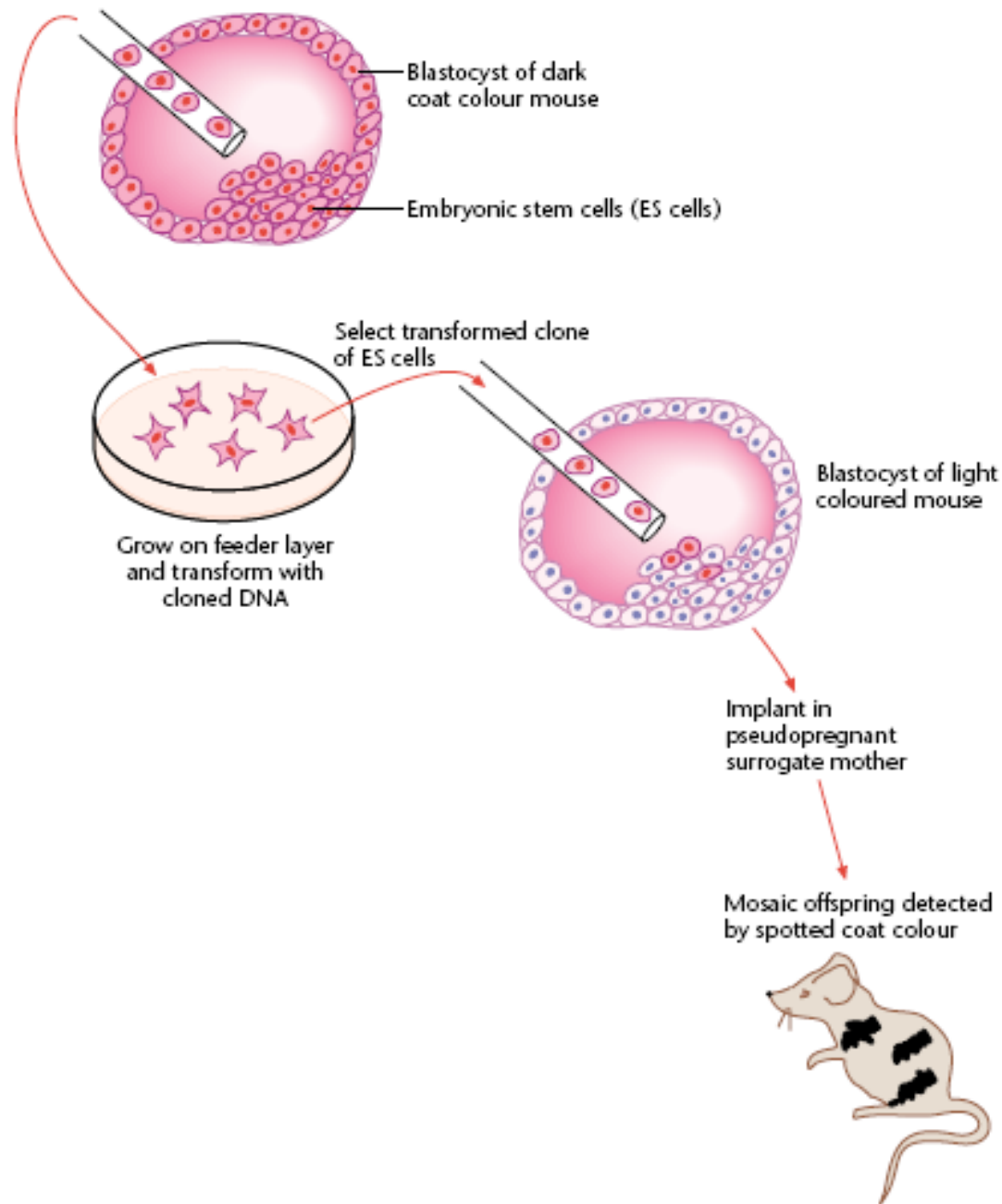
4 metody přenosu GI:

- 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

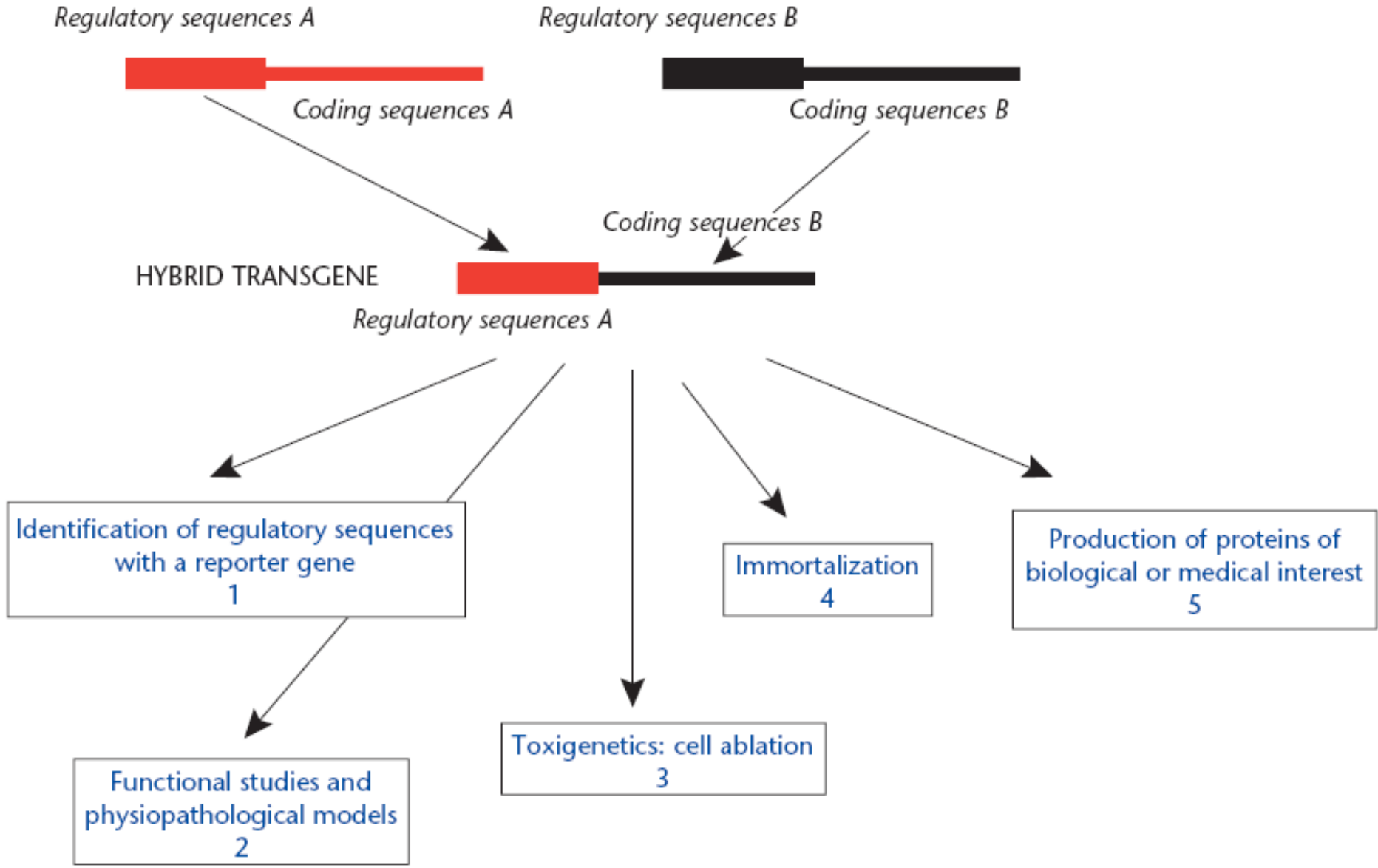


*Poprvé gen pro elastázu, nezbytná 134 bp regulační oblast pro správnou funkci

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

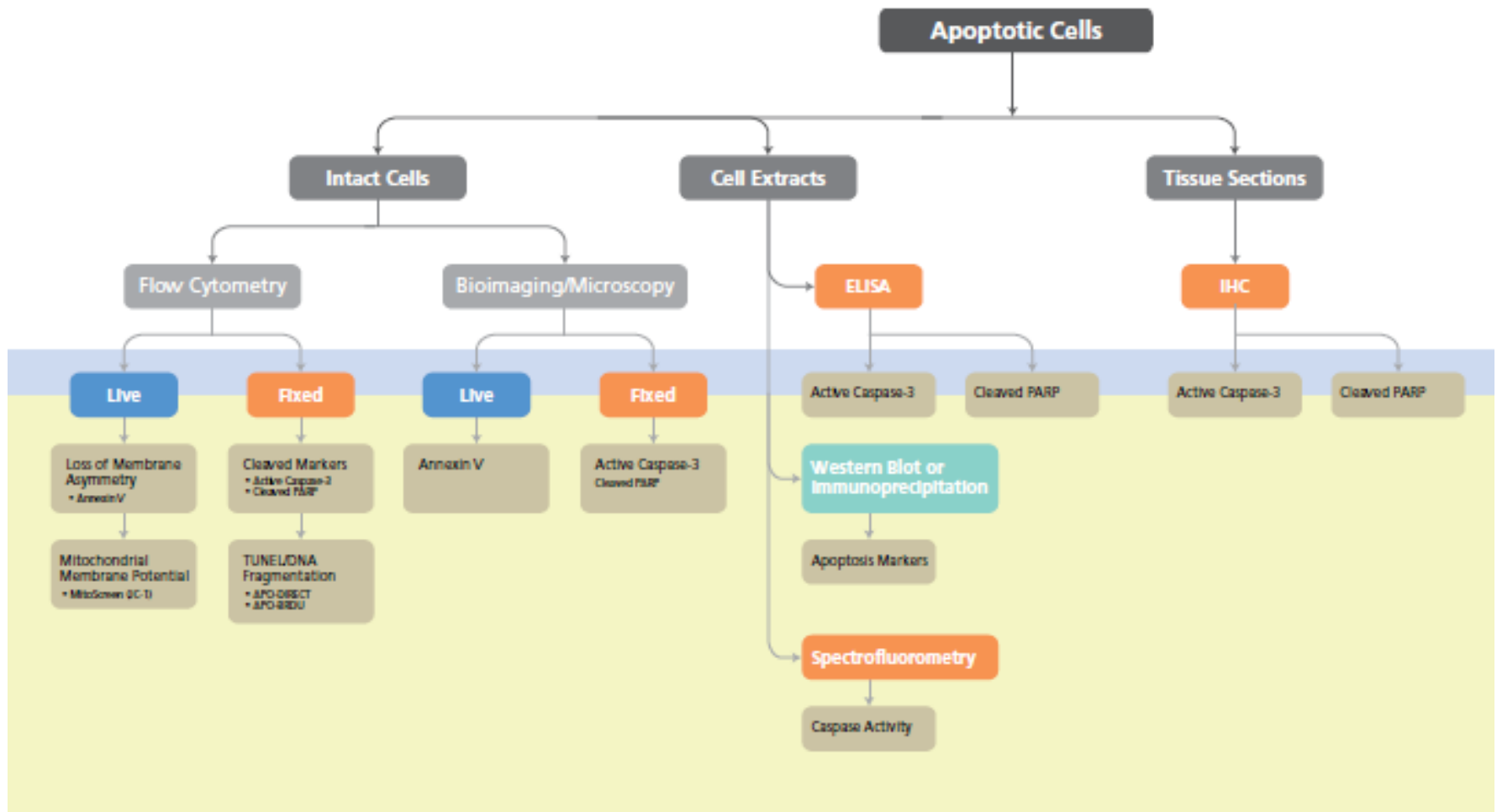


„Hybridní transgen“

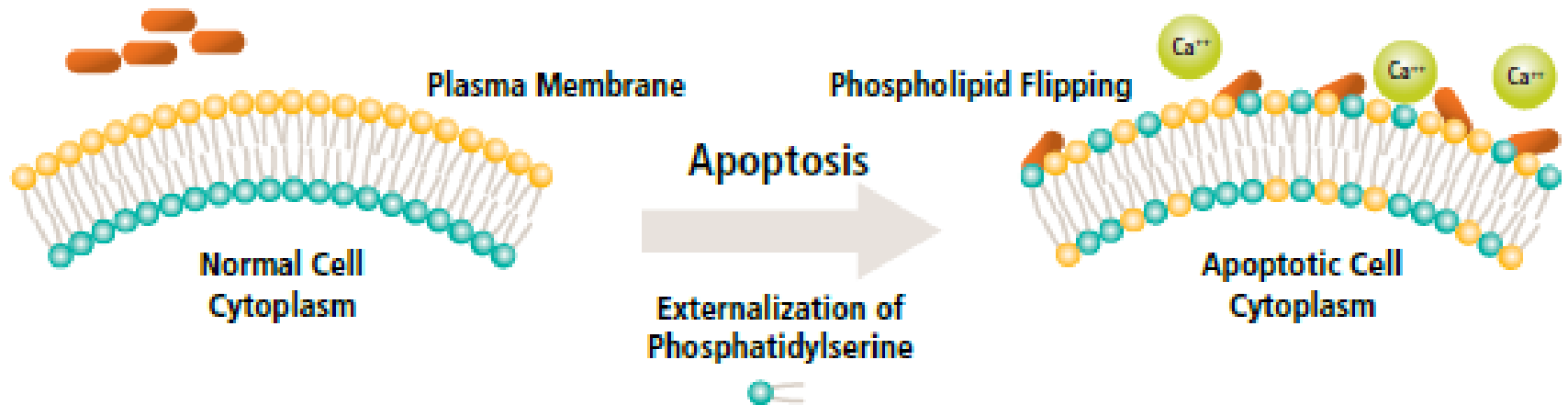


Studium apoptózy

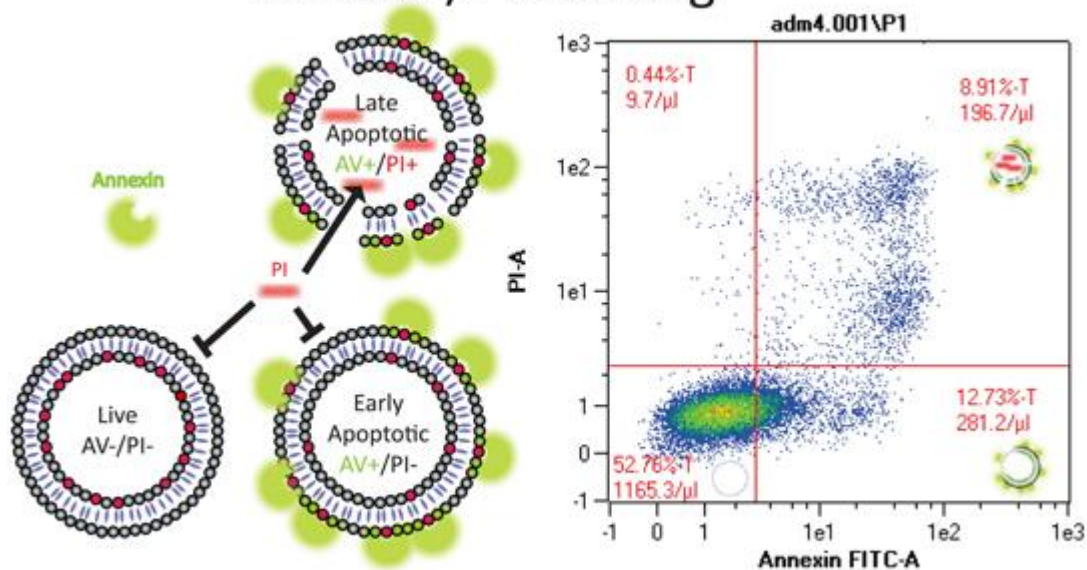
Indukce hladiny biomarkerů x Funkční testy

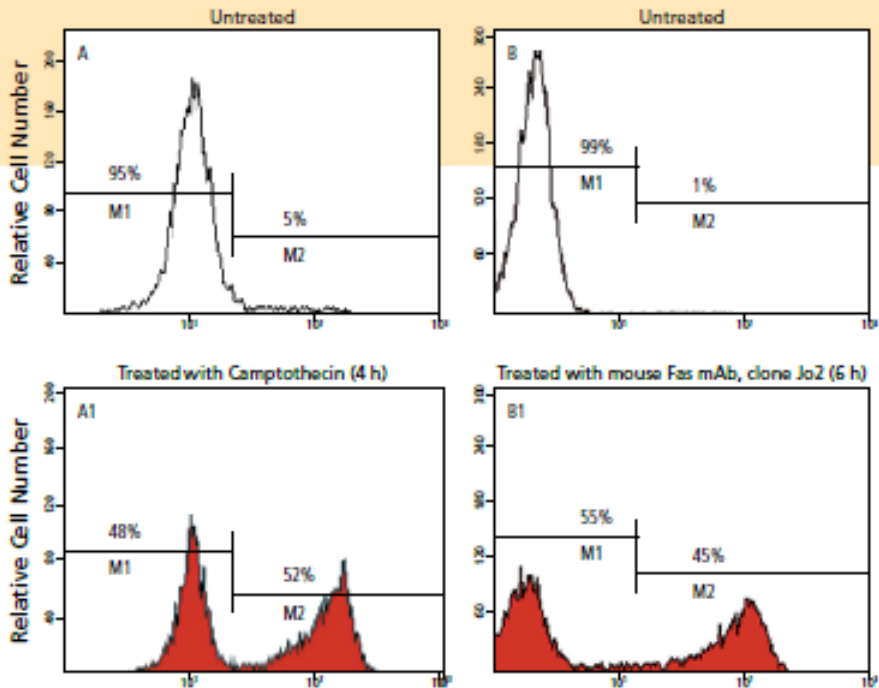


Annexin V-PE Conjugate



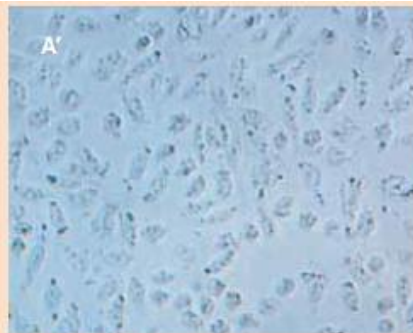
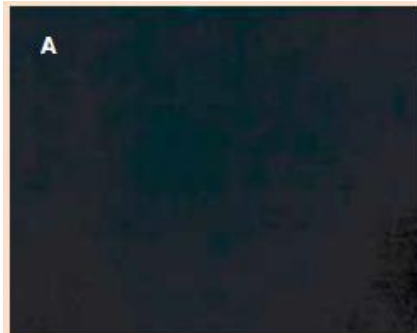
Annexin/PI Staining





Průtoková cytometrie:
Stanovení aktivity kaspázy 3
pomocí specifických protilátek

Kontrola →



FITC-anti-PARP Ab

Staurosporin →



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

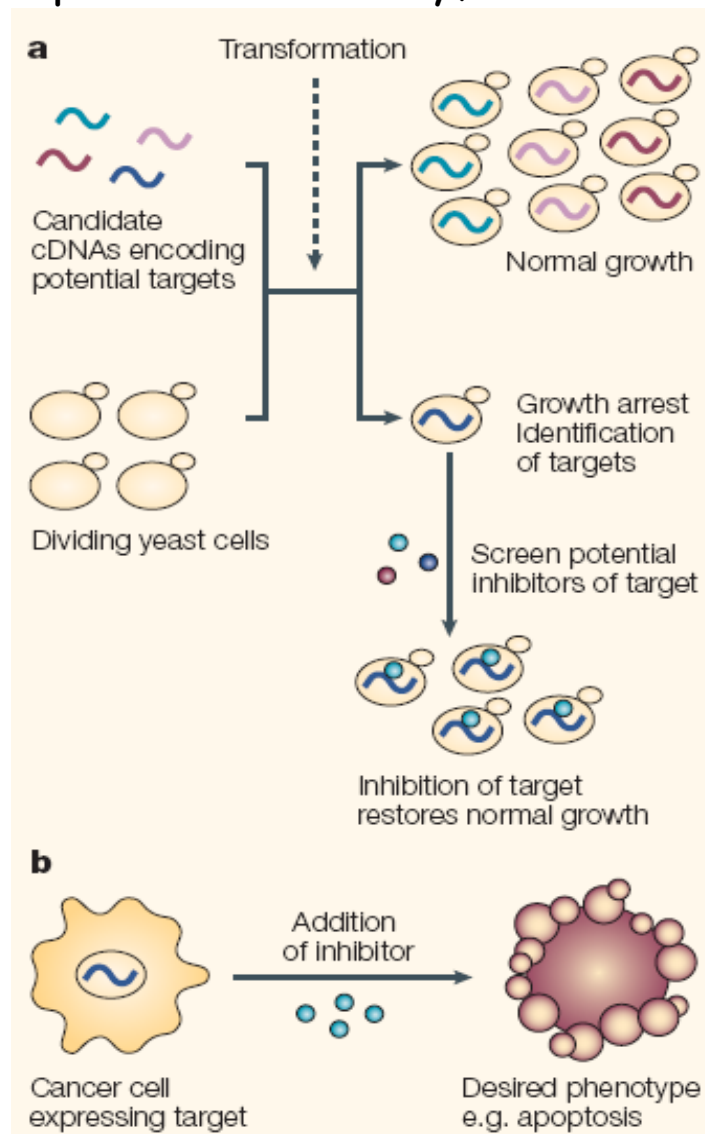
Snadno kultivovatelné, 1. eukaryotický organismus plně osekvenovaný, celá řada funkčních homologů se savčími buňkami

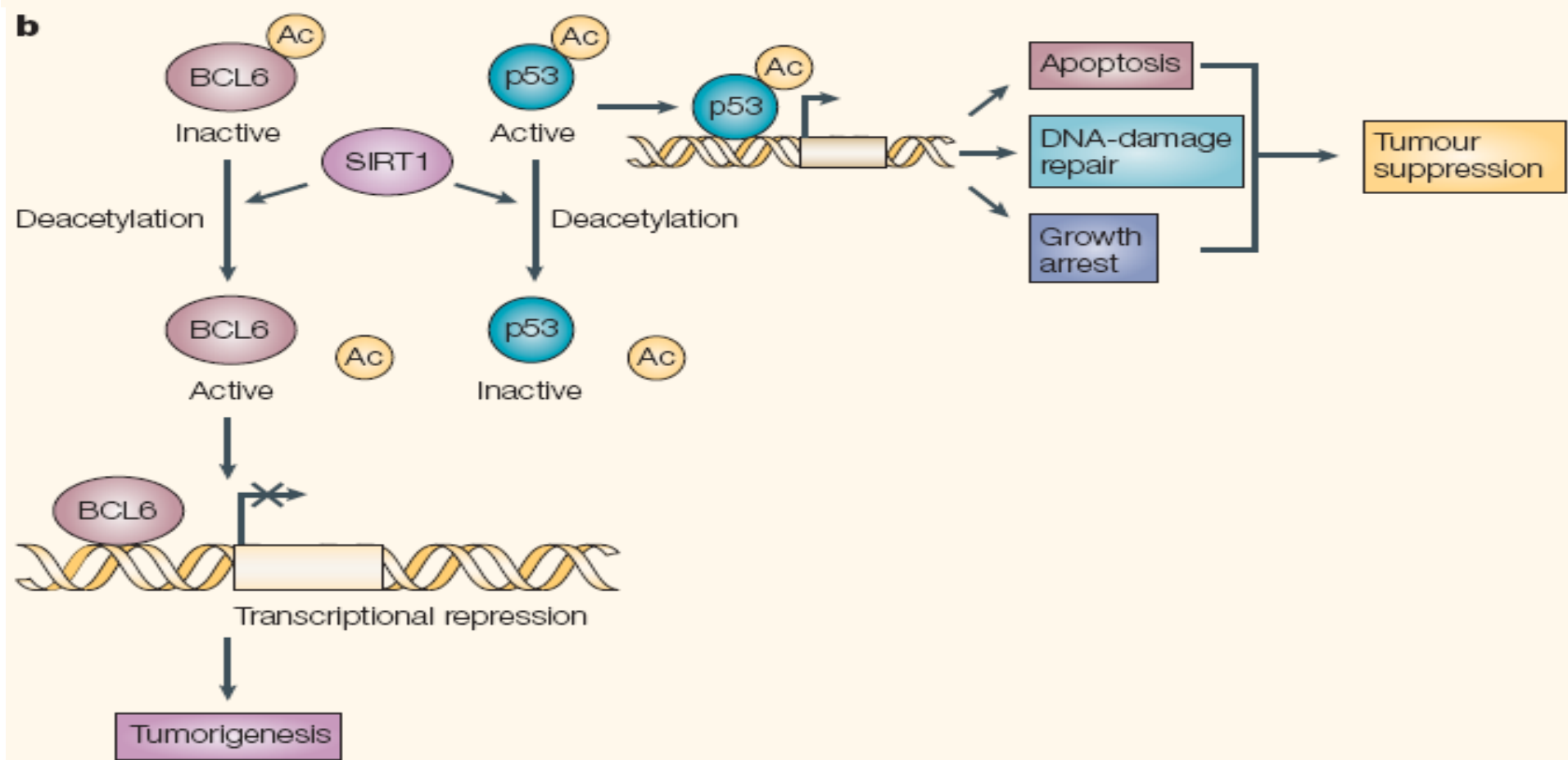
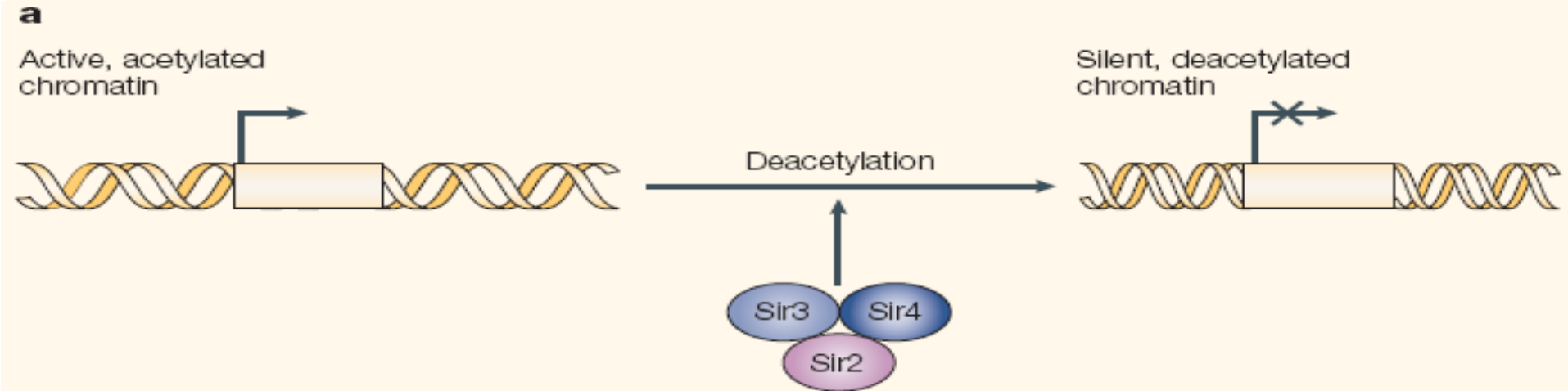
➡️ Vhodný model pro screening protinádorových léčiv

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

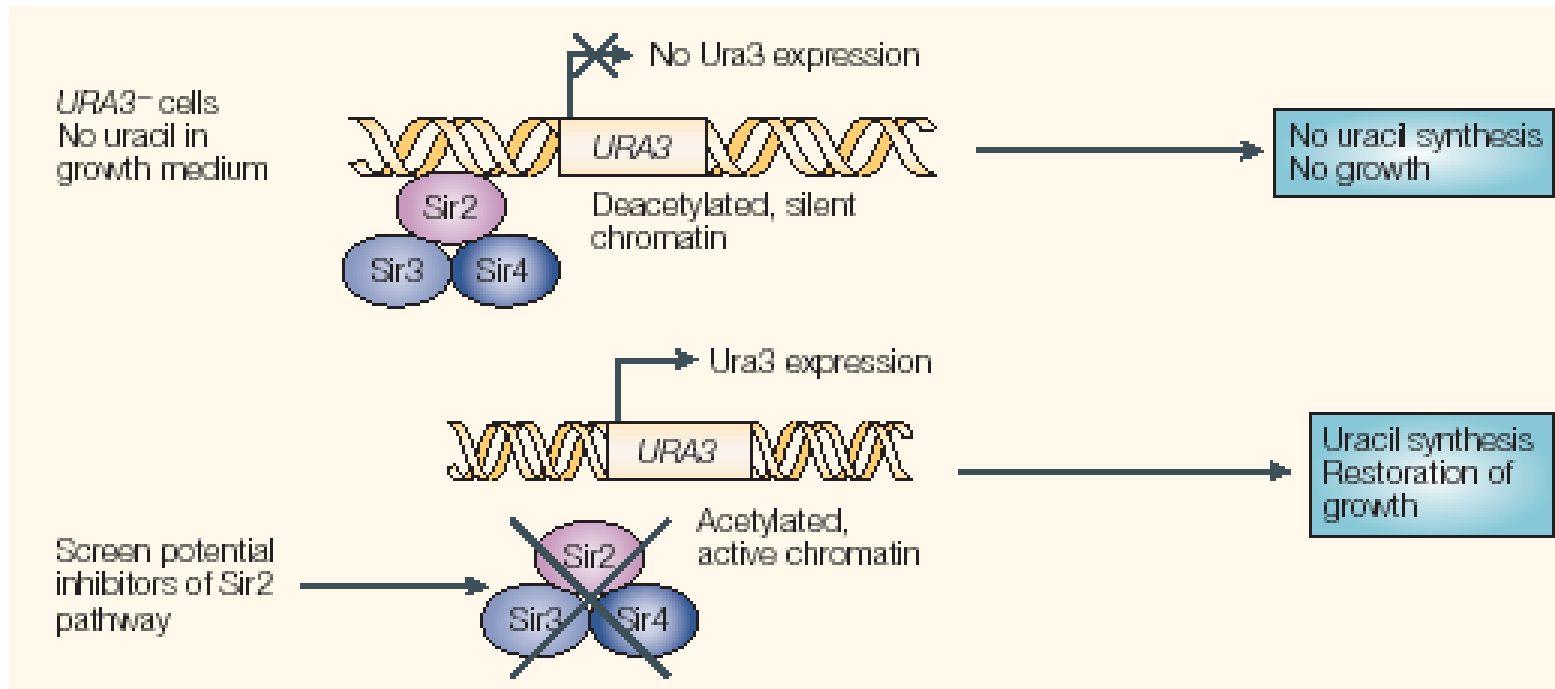
Cancer-related pathway	Human genes	Yeast genes
DNA-damage checkpoint	<i>ATM, ATR</i>	<i>RAD53</i>
Replication checkpoint	<i>BLM, WRN1</i>	<i>SGS1</i>
Mitotic-spindle-assembly checkpoint	<i>BUB1, BUBR1</i>	<i>BUB1</i>
Mismatch repair	<i>MLH1</i>	<i>MLH1</i>
Repair of DNA double-strand breaks	<i>BRCA1</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

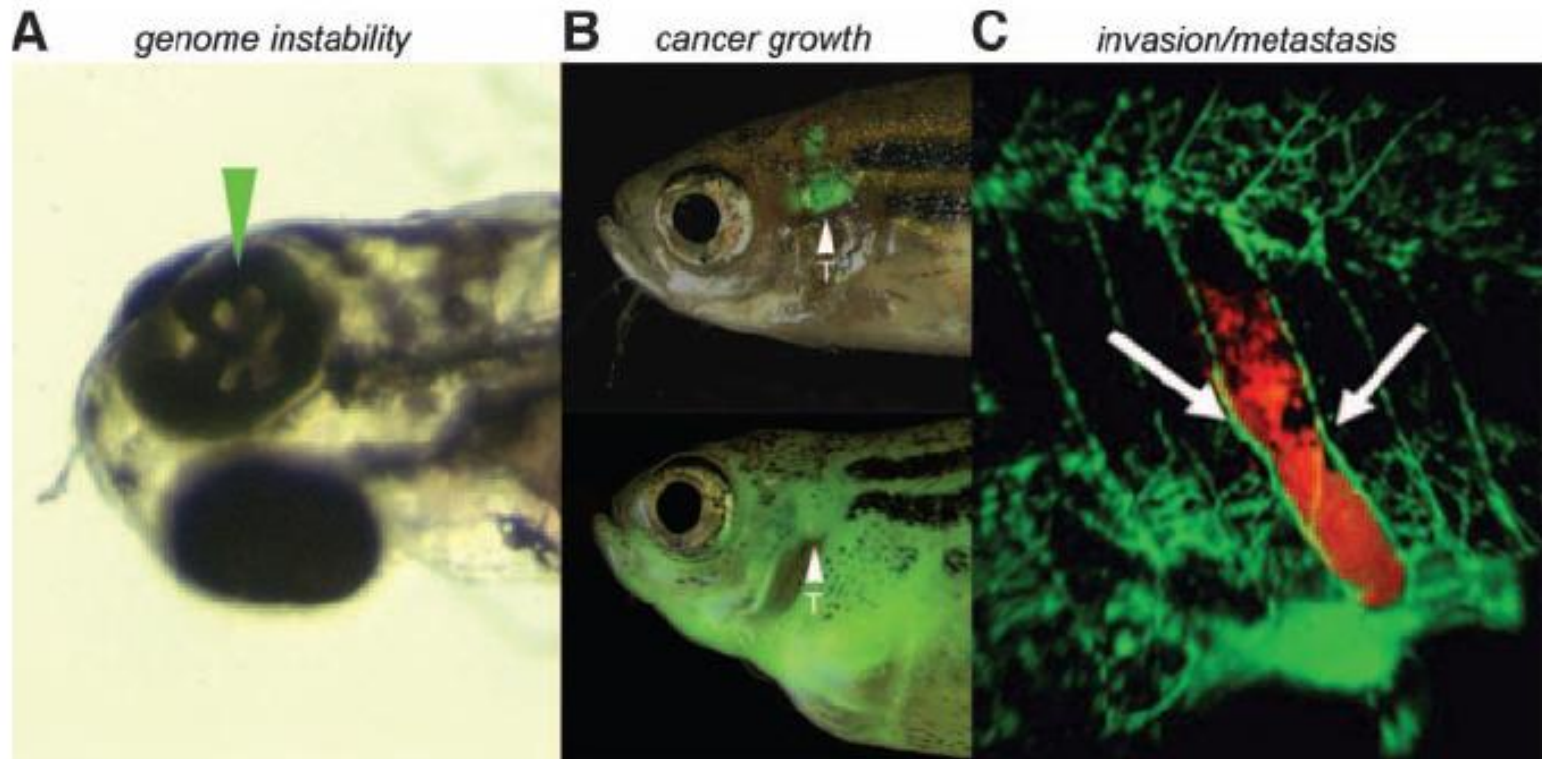


Chemoterapie (jednoduchá aplikace, velké množství ryb, dlouhodobá léčba x nespecifická, predominance jaterních tumorů, potenciální riziko pro výzkumníka)

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)



Odběr biologického materiálu

Obecné zásady při odběru klinického materiálu:

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

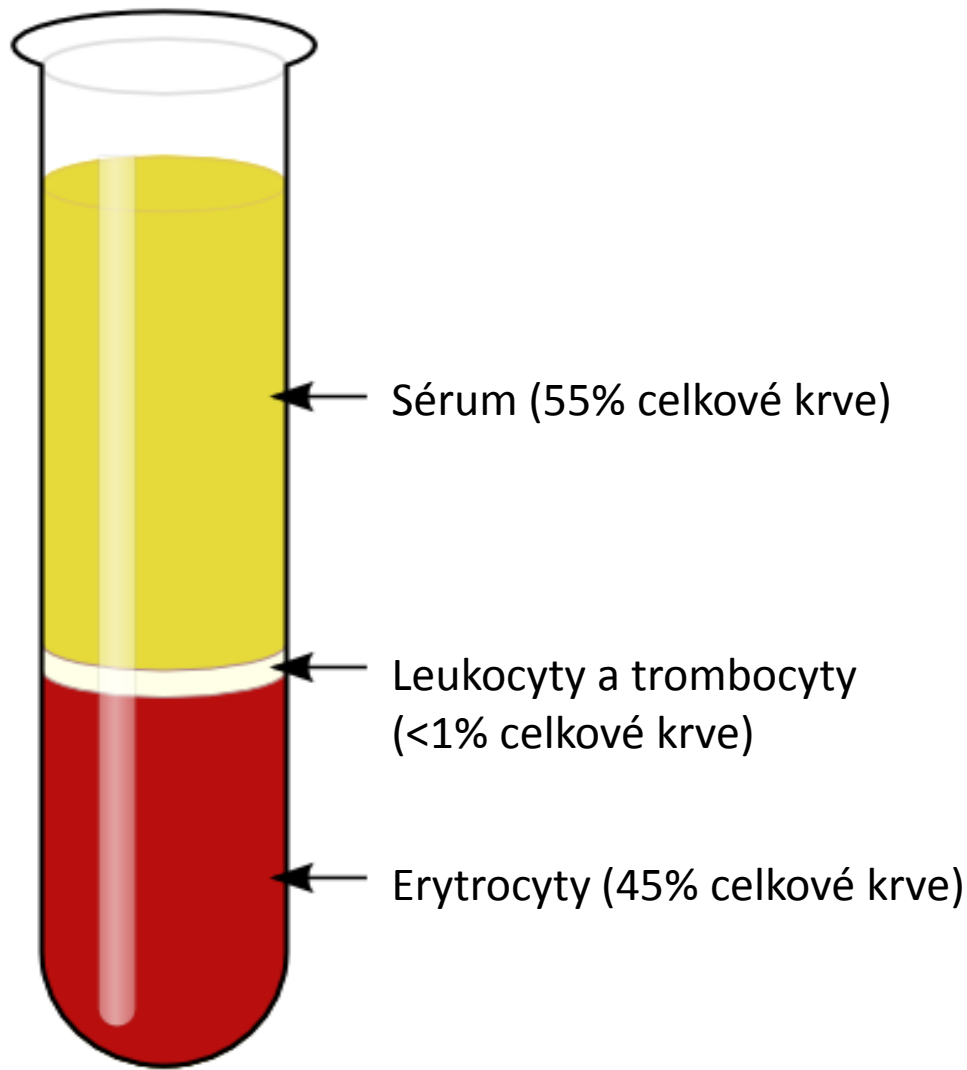
Krev (5-10 ml, chelatační činidla, vyšetření zánětlivých determinant, hladiny cukrů, hormonů, onkomarkerů, bílkovin krevního séra a dalších.)

Separace krevních buněk

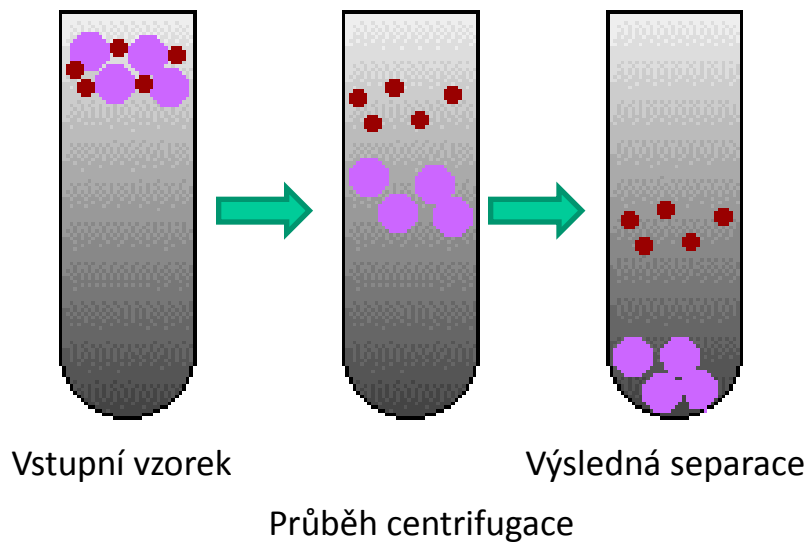
- Centrifugace
- Imunoafinitní separace
- Imunomagnetická separace
- Sortování buněk

Základní separační techniky

A

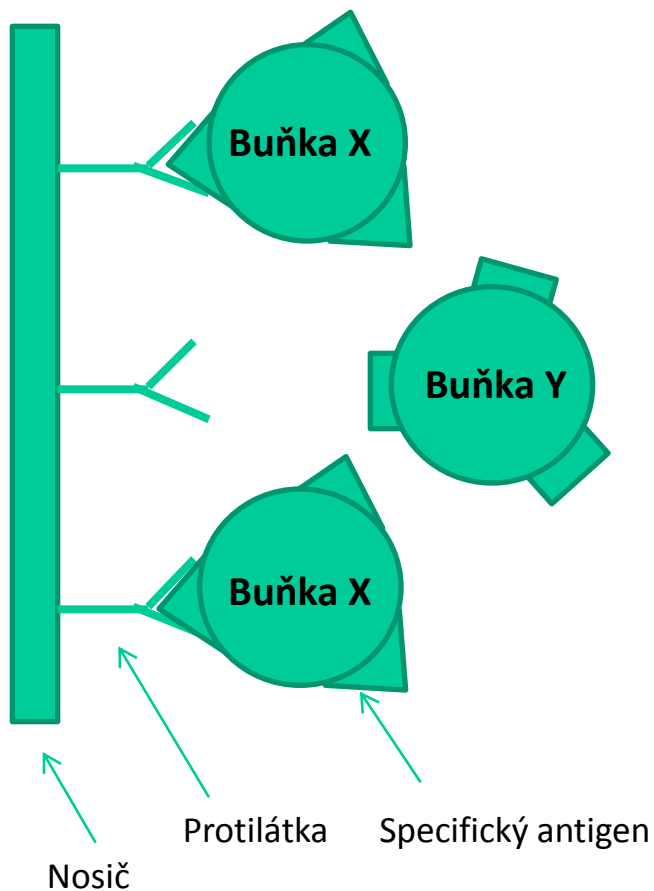


B

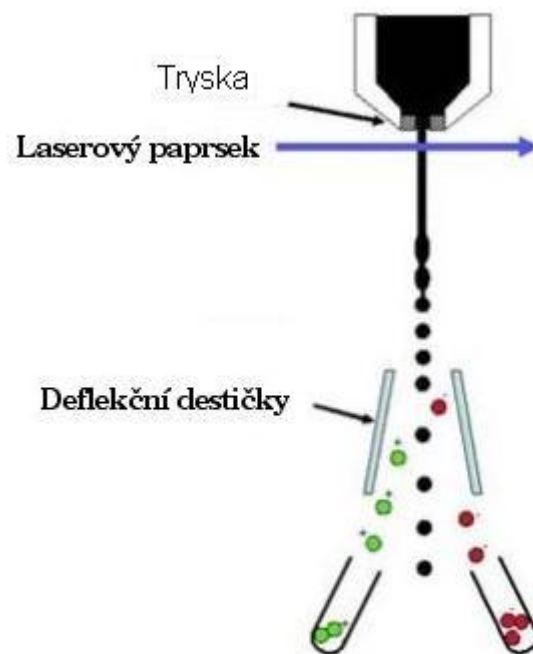


Separační techniky využívající monoklonální protilátky

A

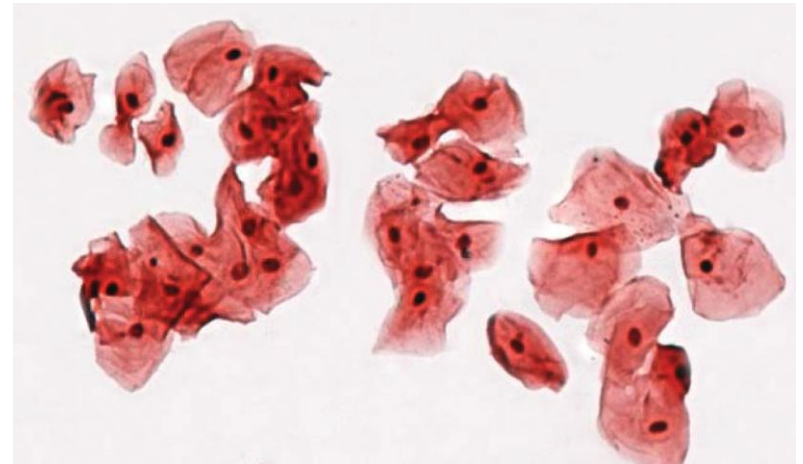


B



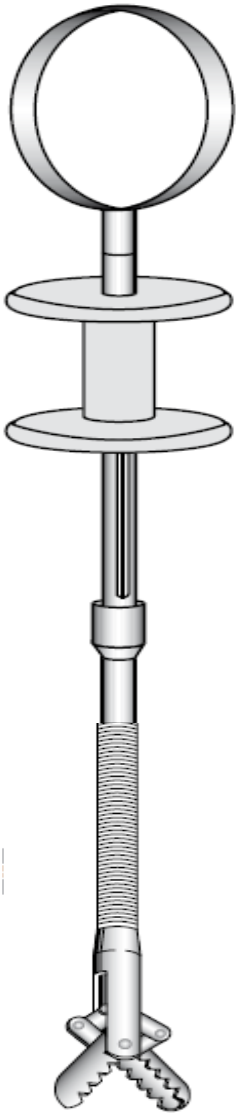
Další biologický materiál

- Kostní dřeň
- Moč
- Sliny
- Bukální sliznice
- Plodová voda (16-18 týden)
- Choriové klky (12-14 týden)
- Fibroblasty (kožní biopsie)
- Tkáně - N2
 - FFPE
 - Izolace NK

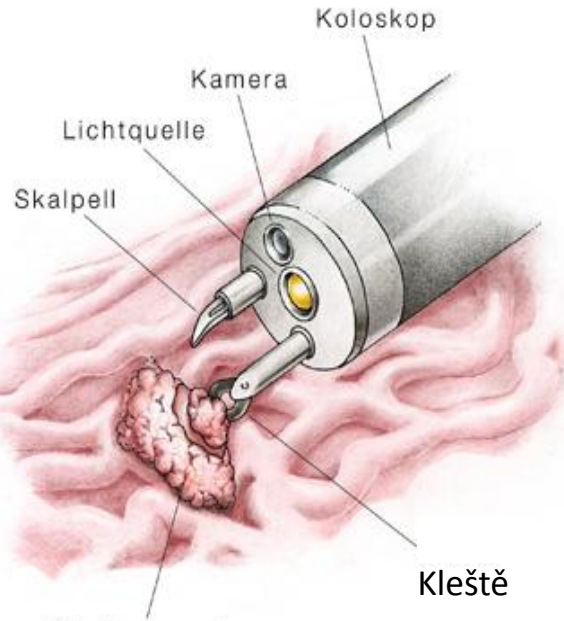


Přehled způsobů odběru tkáně

A



B

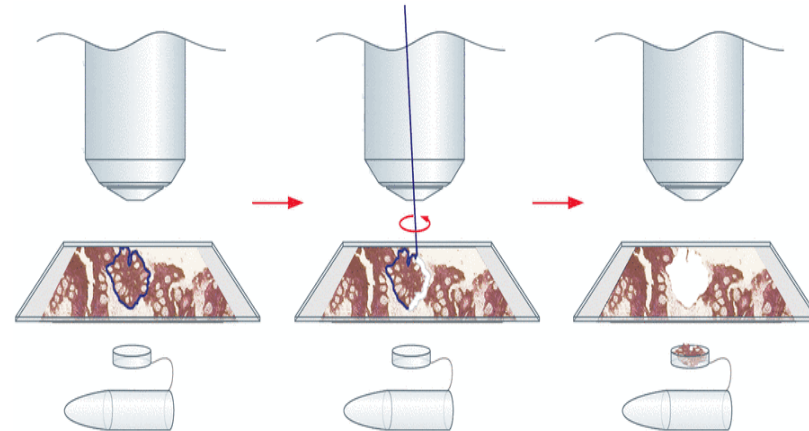


Dysplazie střevní sliznice

C



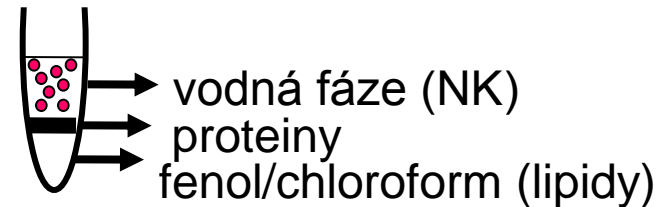
D



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

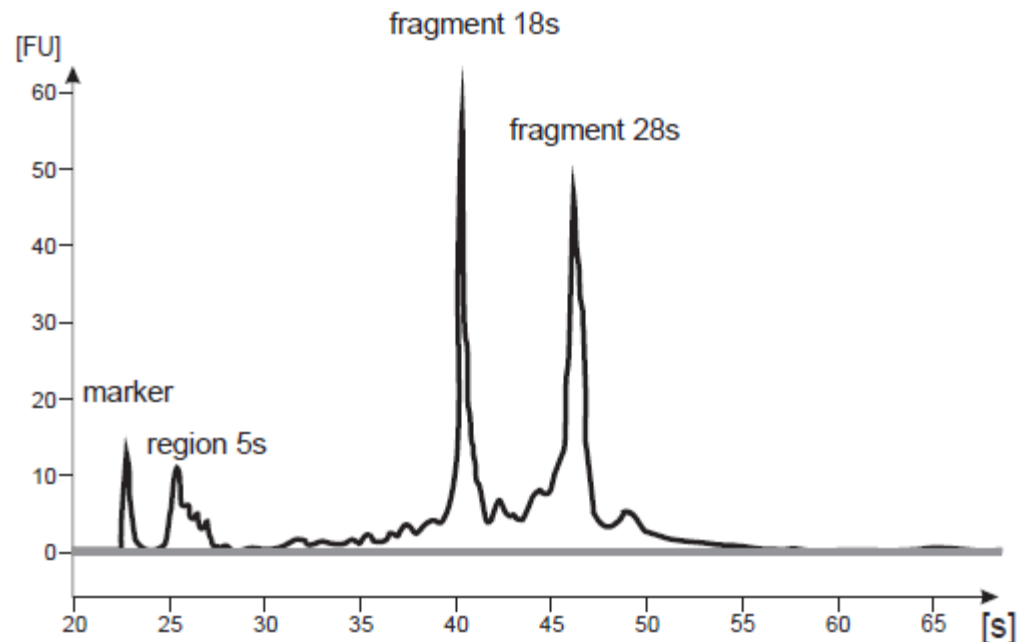
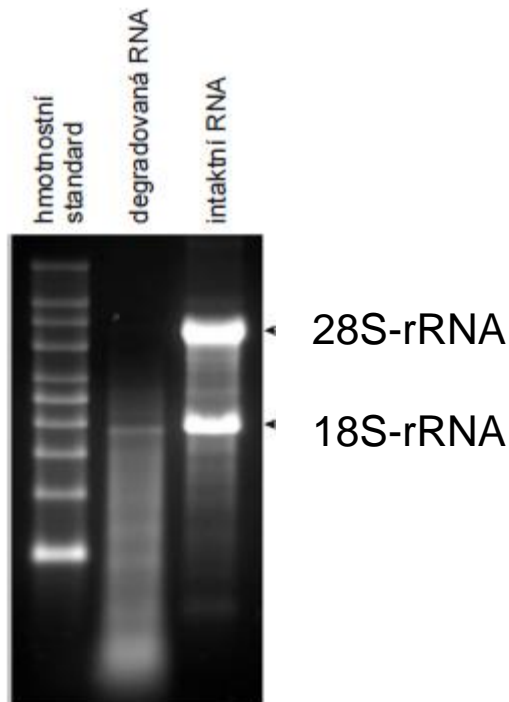
DNA znečištěná RNA nebo organickými látkami

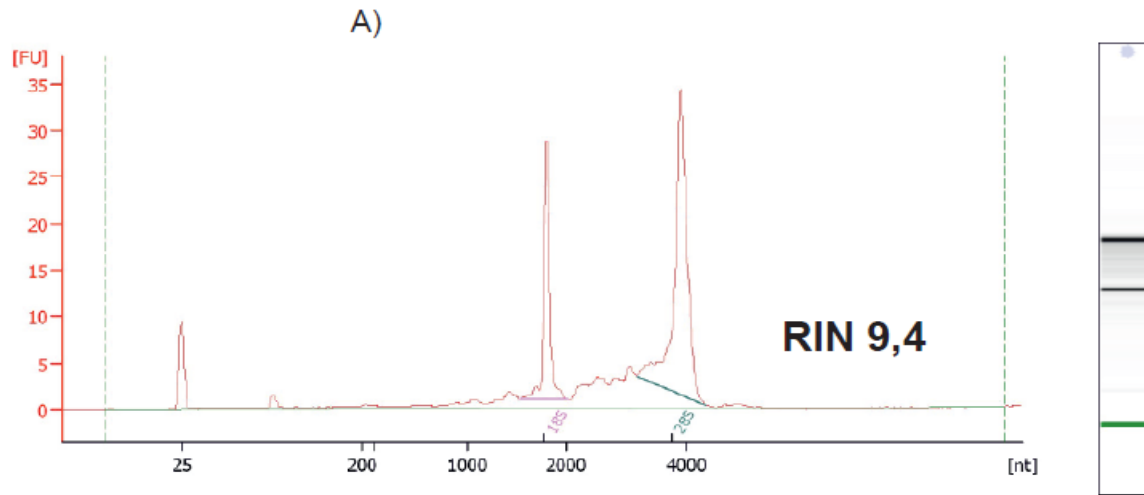
A260/A280 = 1,9 – 2,1

čistá RNA

A260/A280 < 1,9

RNA znečištěná proteiny nebo organickými látkami



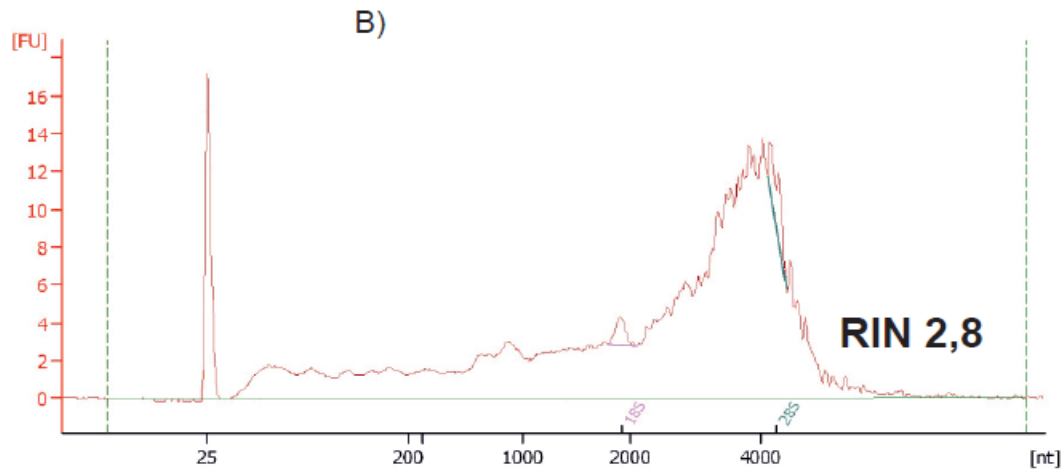


Overall Results for sample 1 : sample

RNA Area:	138,2	RNA Integrity Number (RIN):	9,4 (B.02.05)
RNA Concentration:	159 ng/ μ l	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	2,1	Result Flagging Label:	RIN: 9.40

Fragment table for sample 1 : sample

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1 534	2 020	25,1	18,2
28S	3 164	4 308	52,1	37,7



Enzymy používané k úpravě nukleových kyselin

Enzymy syntetizující:

- Polymerázy (DNA, RNA)
- Reverzní transkriptázy
- Terminální transferáza

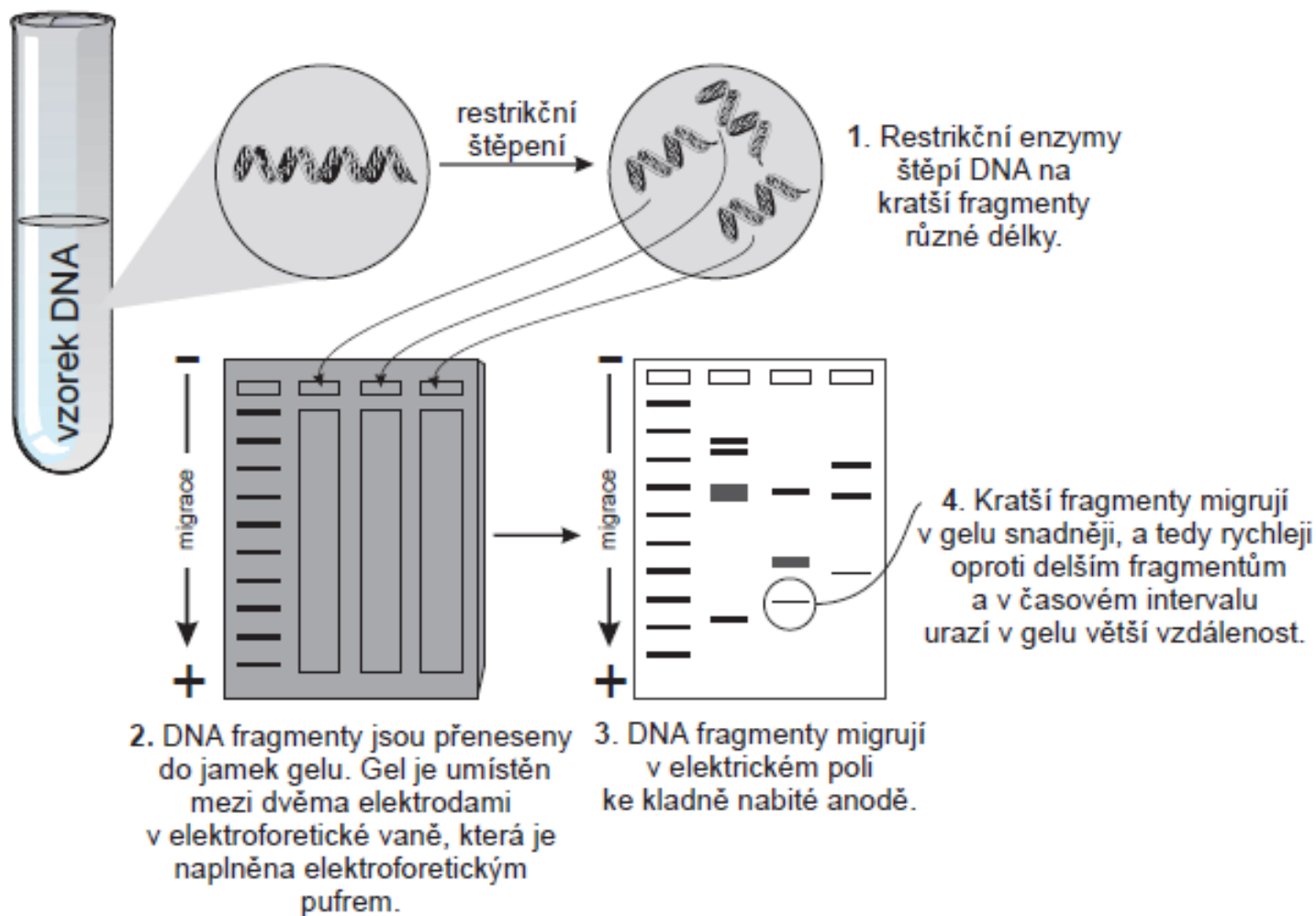
Enzymy odbourávající:

- Dnázy
- Rnázy

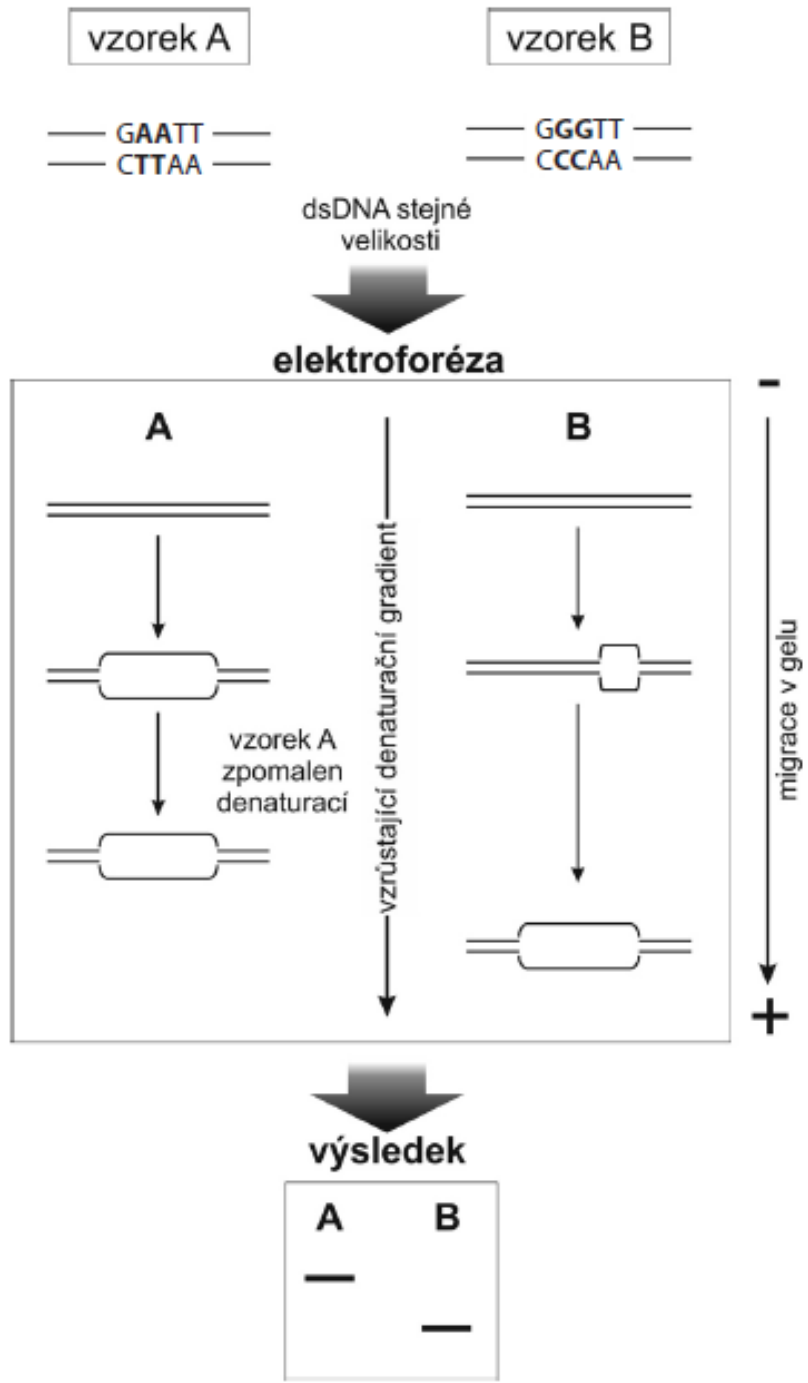
Enzymy modifikující: fosfatázy (alkalická fosfatáza *E. coli*), kinázy (T4-polynukleotid kináza), metylázy

Enzymy spojující: DNA-ligázy (katalyzují tvorbu fosfodiesterové vazby mezi 5'P a 3'OH konci dsDNA)

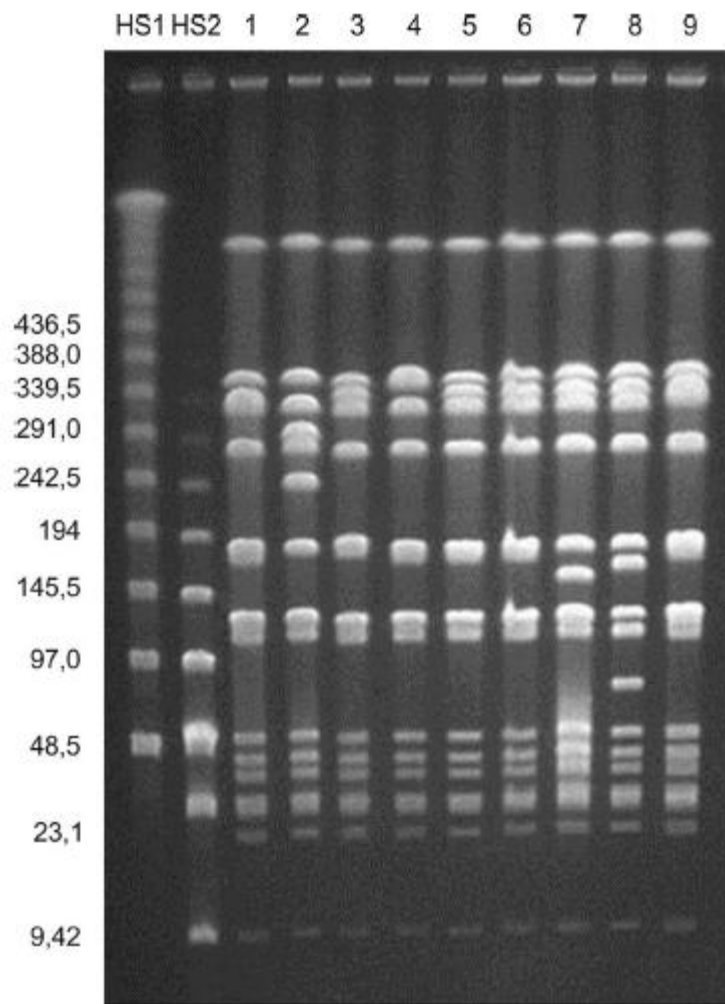
Elektroforetické metody



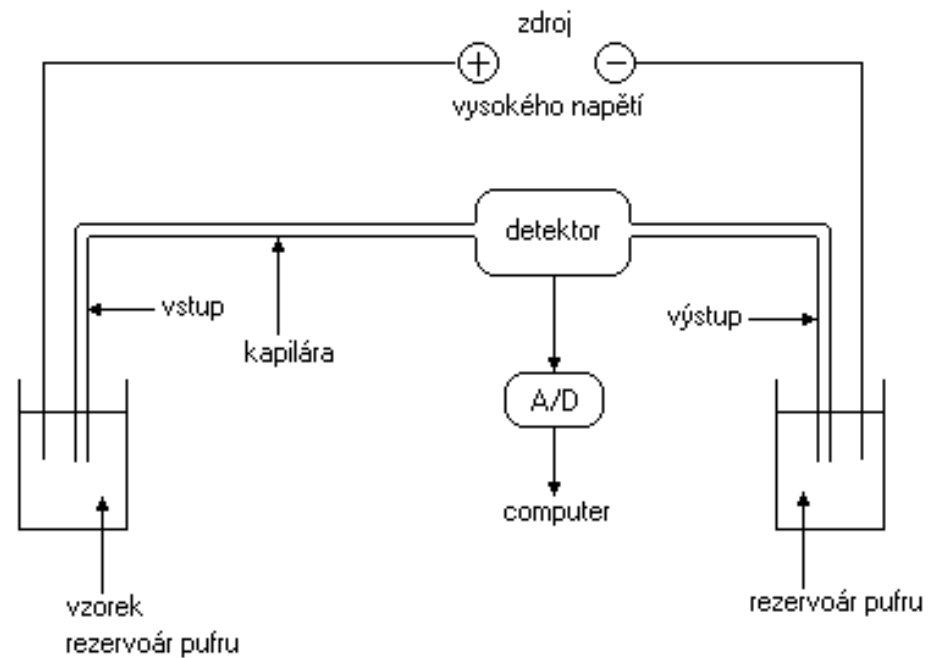
DGGE



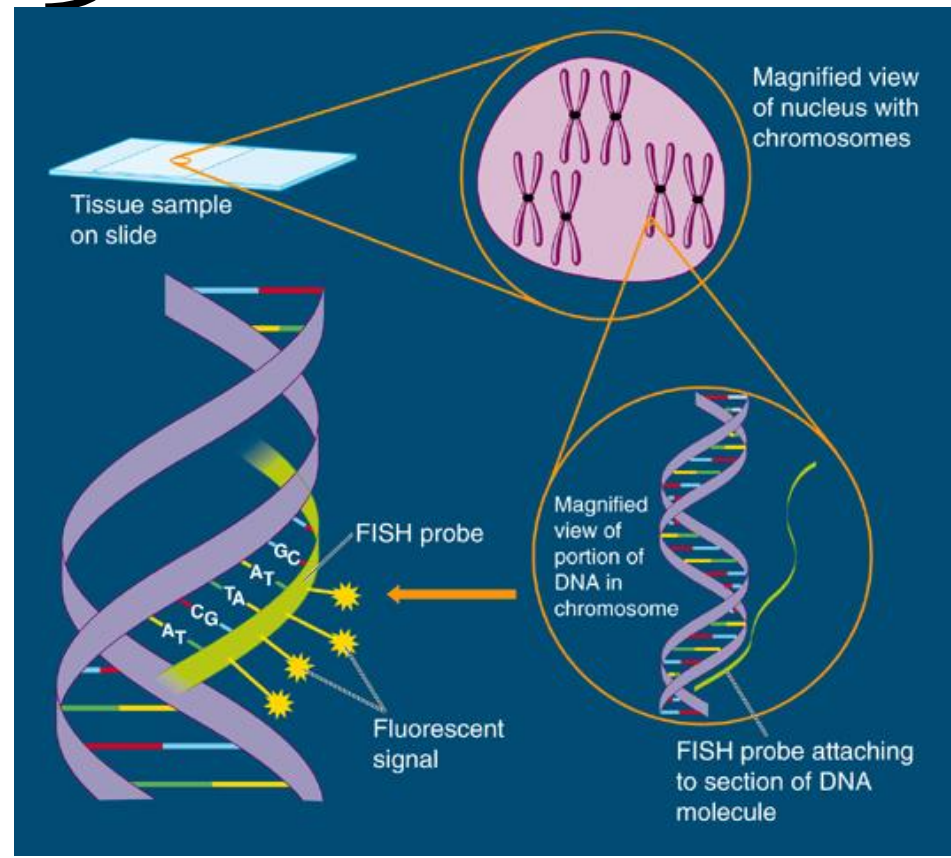
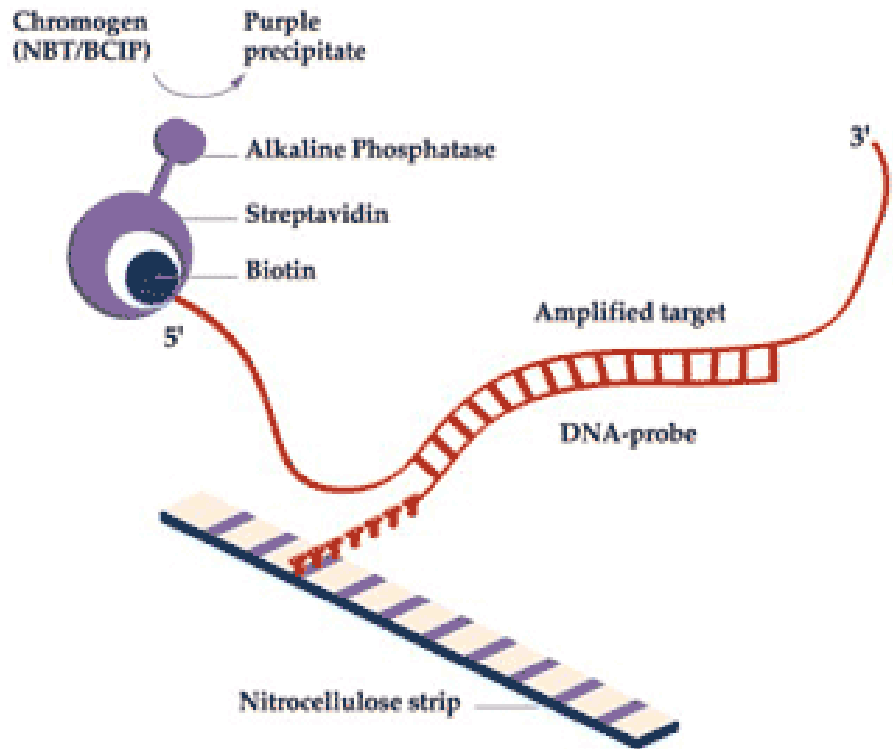
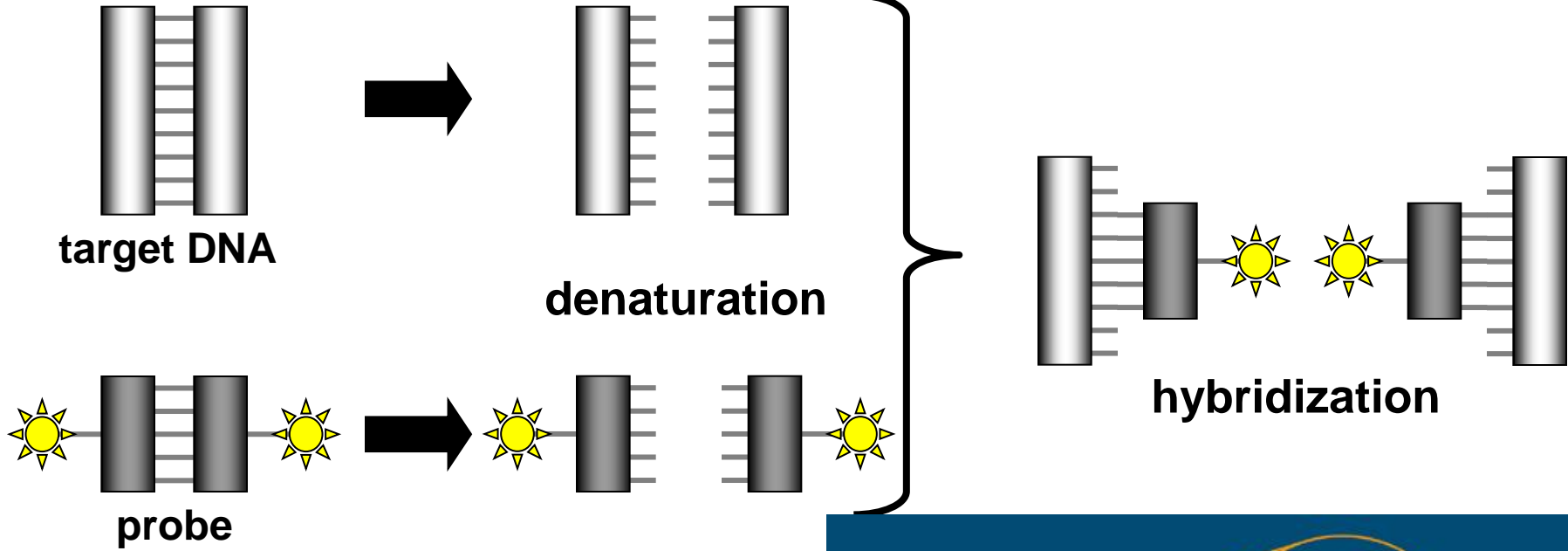
Další elektroforetické metody



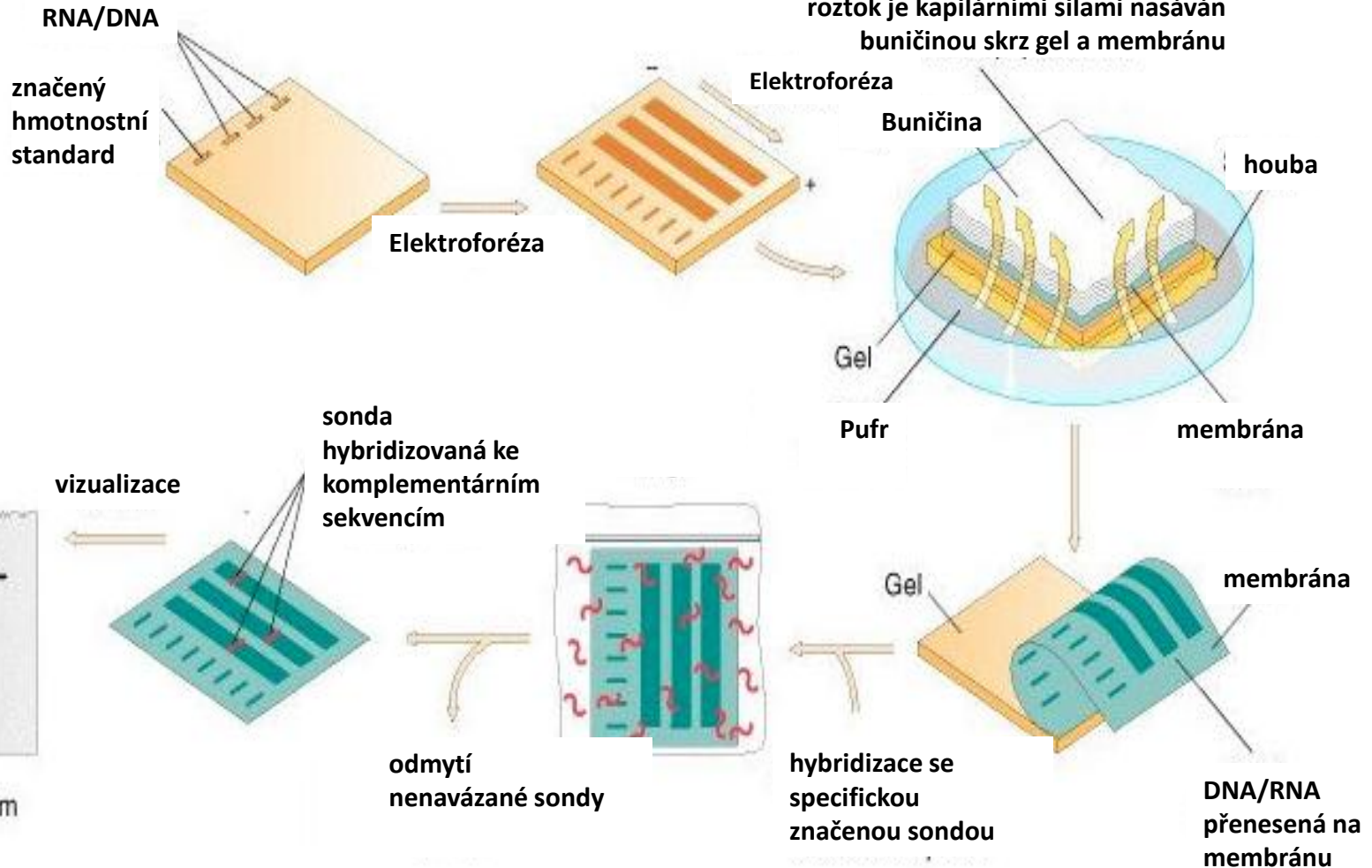
PFGE



Kapilární elfo



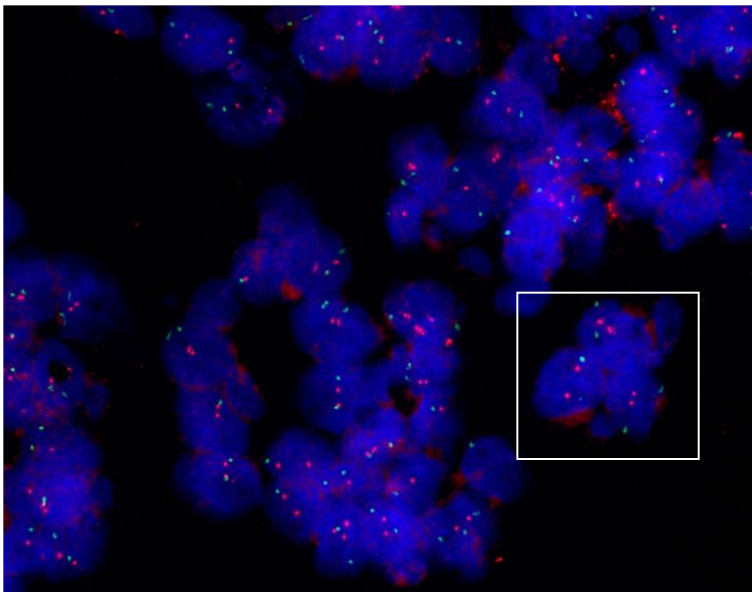
Přenos NK a jejich detekce



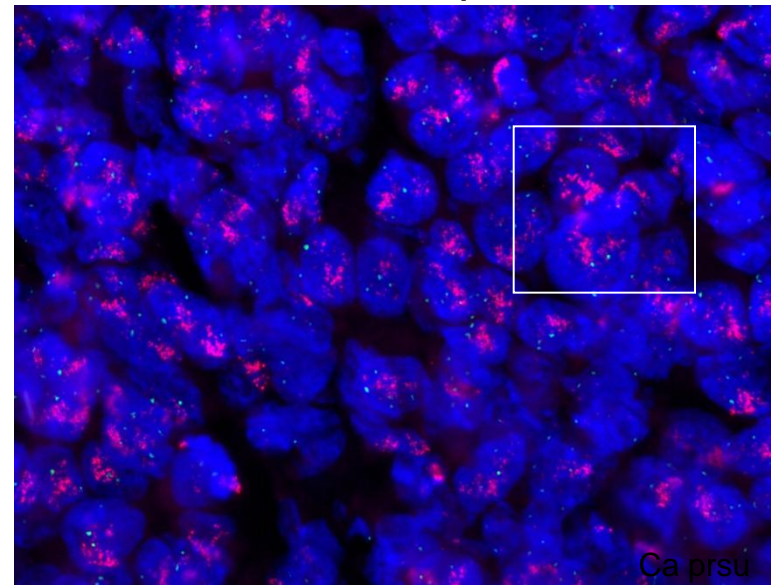
- **Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)**

- 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



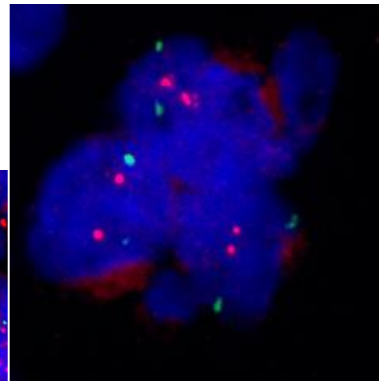
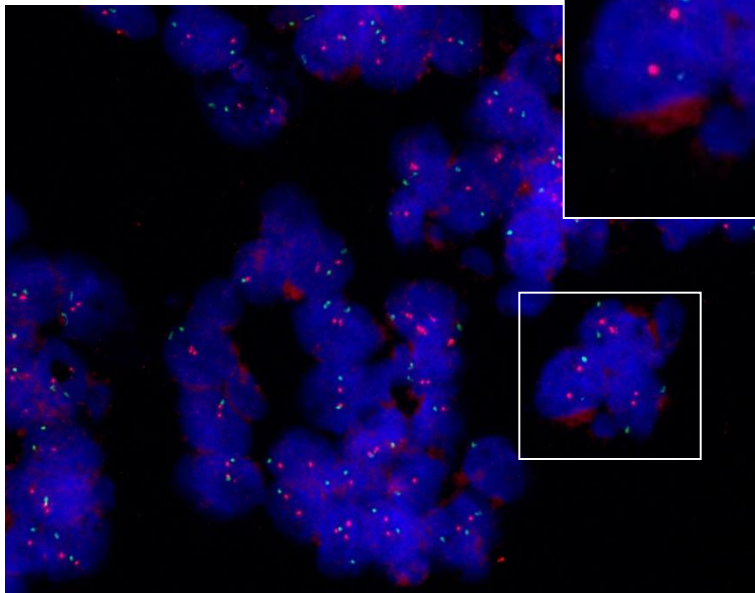
TOP2A rozsáhlá amplifikace



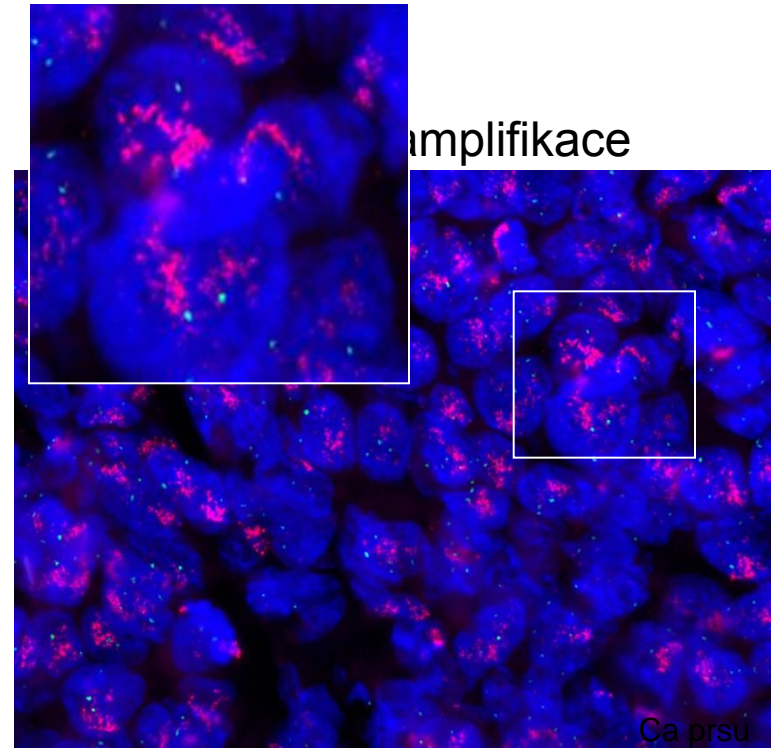
- **Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)**

- 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

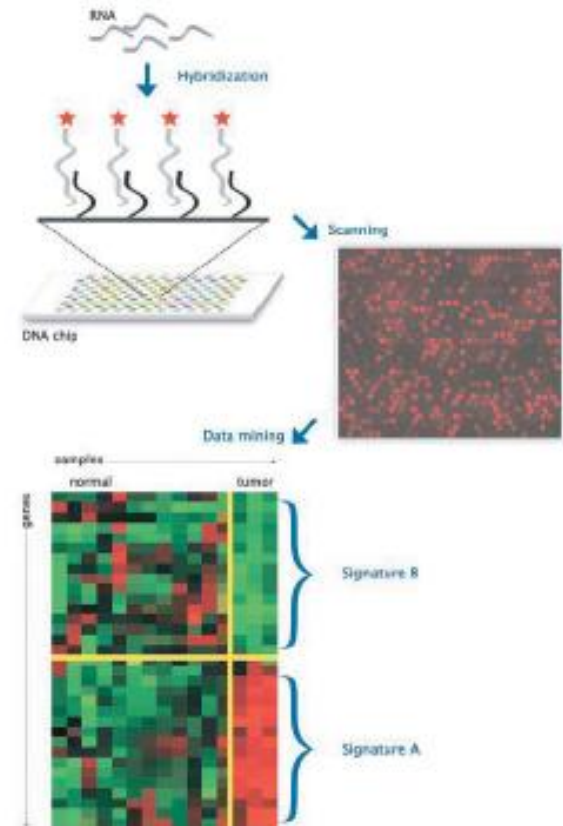


Průkaz onkologických markerů pomocí DNA-mikroarray testů

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.

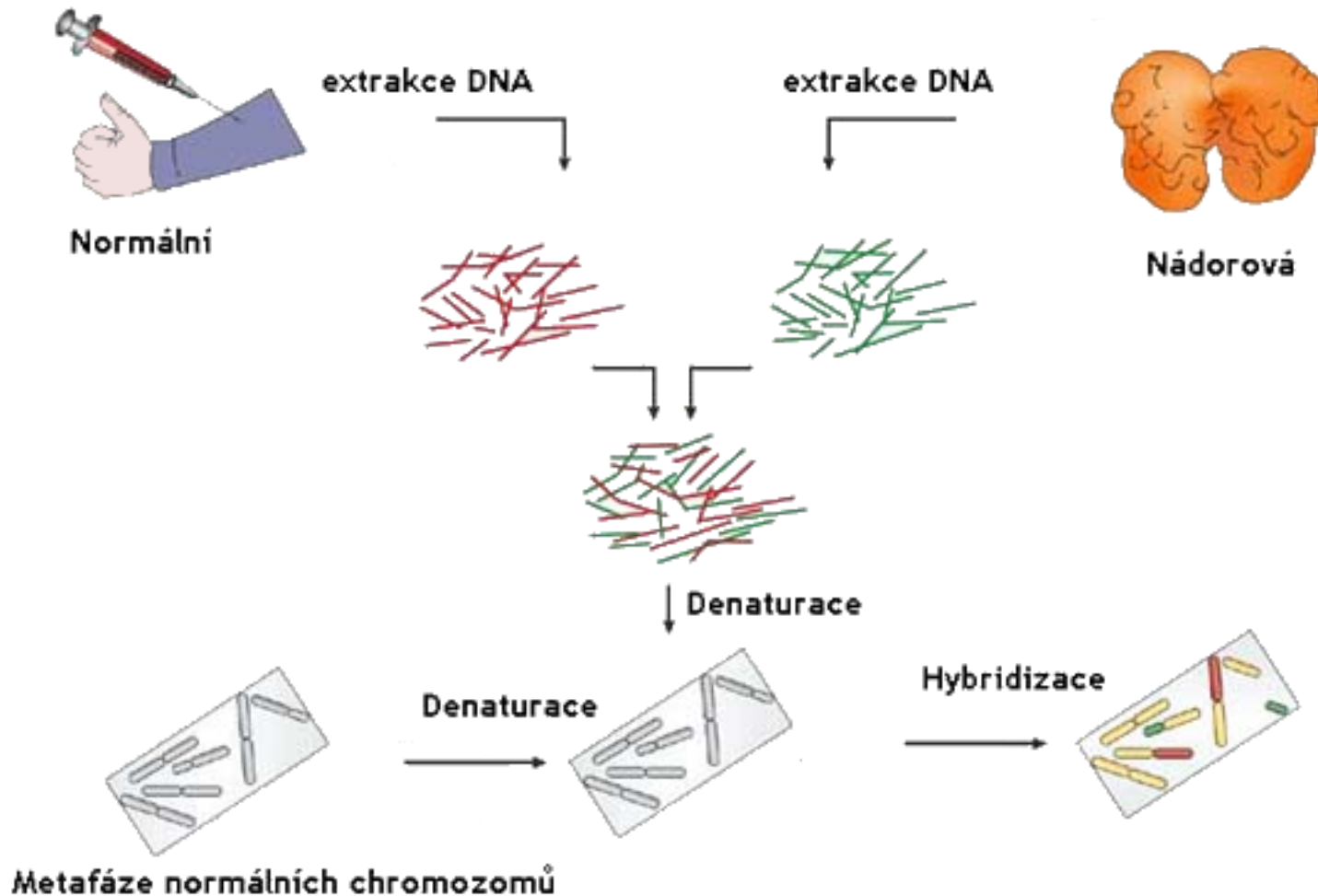
Velmi zjednodušeně lze princip metody: Nejprve se izoluje vzorek DNA z buněk odebraných vyšetřované osobě a ten se označí fluorescenčním činidlem. Označená DNA se pak hybridizuje se vzorky určitých DNA sekvencí (DNA array) na destičce. Po promytí se měří fluorescence na „DNA-array“ a hodnotí pomocí počítače.

- genová exprese
- komparativní genomická hybridizace
- SNP
- sekvenace

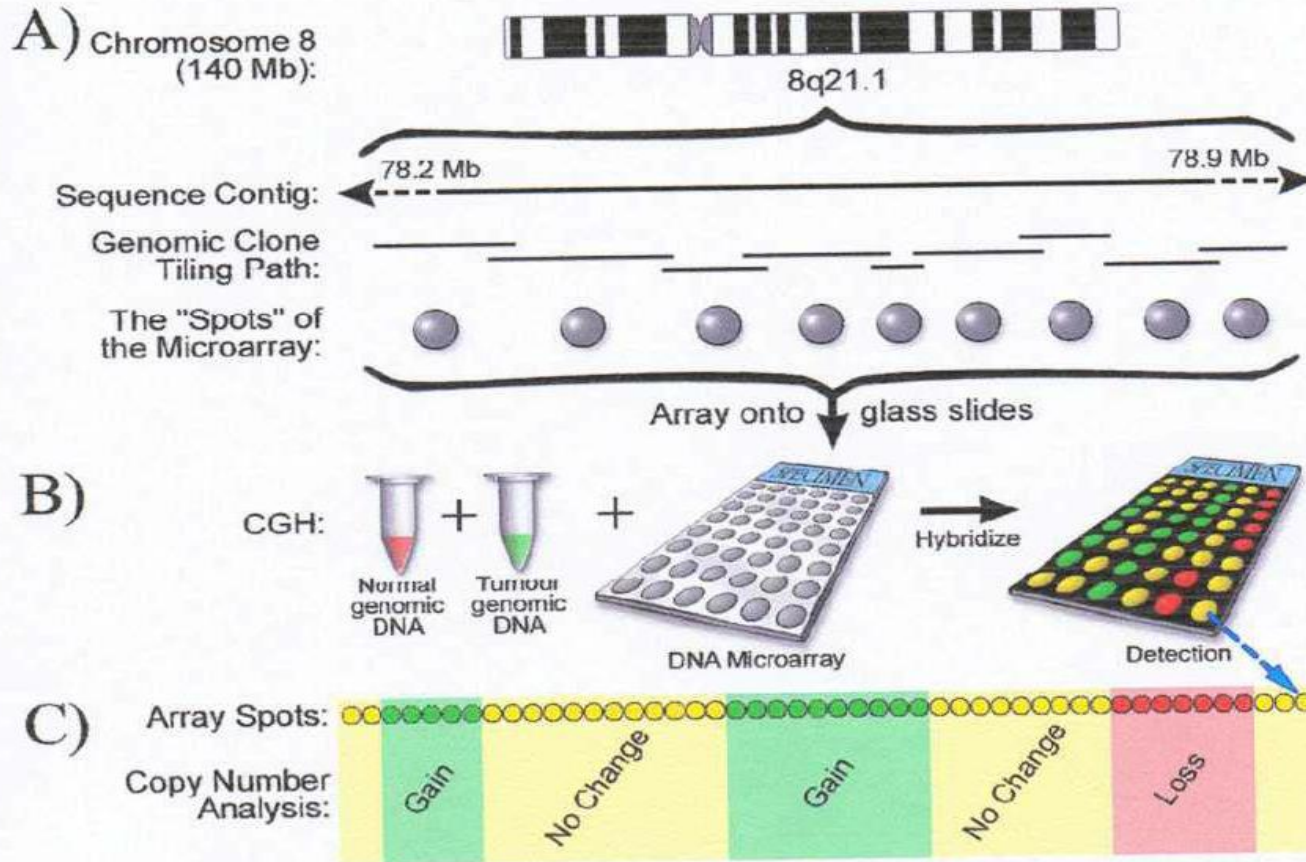


Komparativní genomová hybridizace

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)



Genomová array CGH



Identifikace mutací

- 1) přístupy zaměřené na stanovení délky DNA fragmentů (RFLP),
- 2) techniky založené na hybridizaci (ASO = allele-specific oligonucleotide; OLA = oligonucleotide ligation assay),
- 3) metody založené na principu heteroduplexní analýzy (DHPLC = denaturing high-performance liquid chromatography),
- 4) PTT test (protein truncation test),
- 5) MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification),
- 6) DNA sekvenování, je popsáno v rámci kapitoly zaměřené na sekvenování,
- 7) techniky založené na kvantifikaci DNA (qPCR),
- 8) HRM (high resolution melting point)

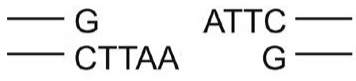
ad1)

vzorek A

vzorek B



1. restrikční štěpení

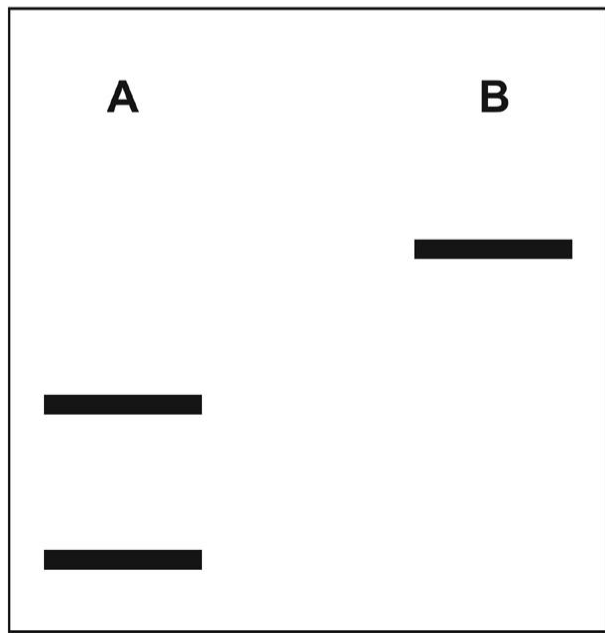


vzorek A je štěpěn

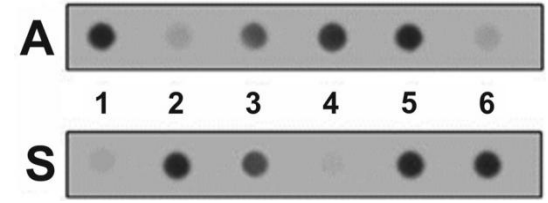
vzorek B vlivem polymorfizmu restrikčního místa není štěpen



2. elektroforéza



ad2)



ad3)

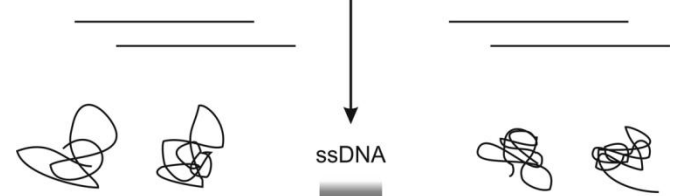
vzorek A

vzorek B

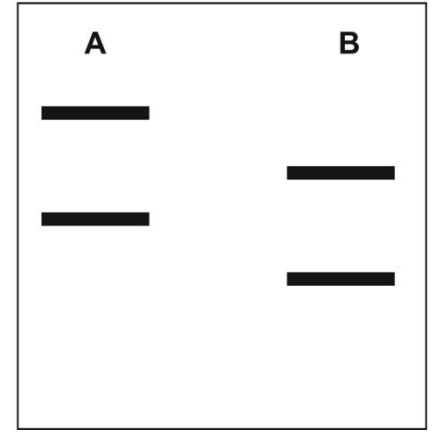


dsDNA stejné velikosti, odlišná sekvence

denaturace



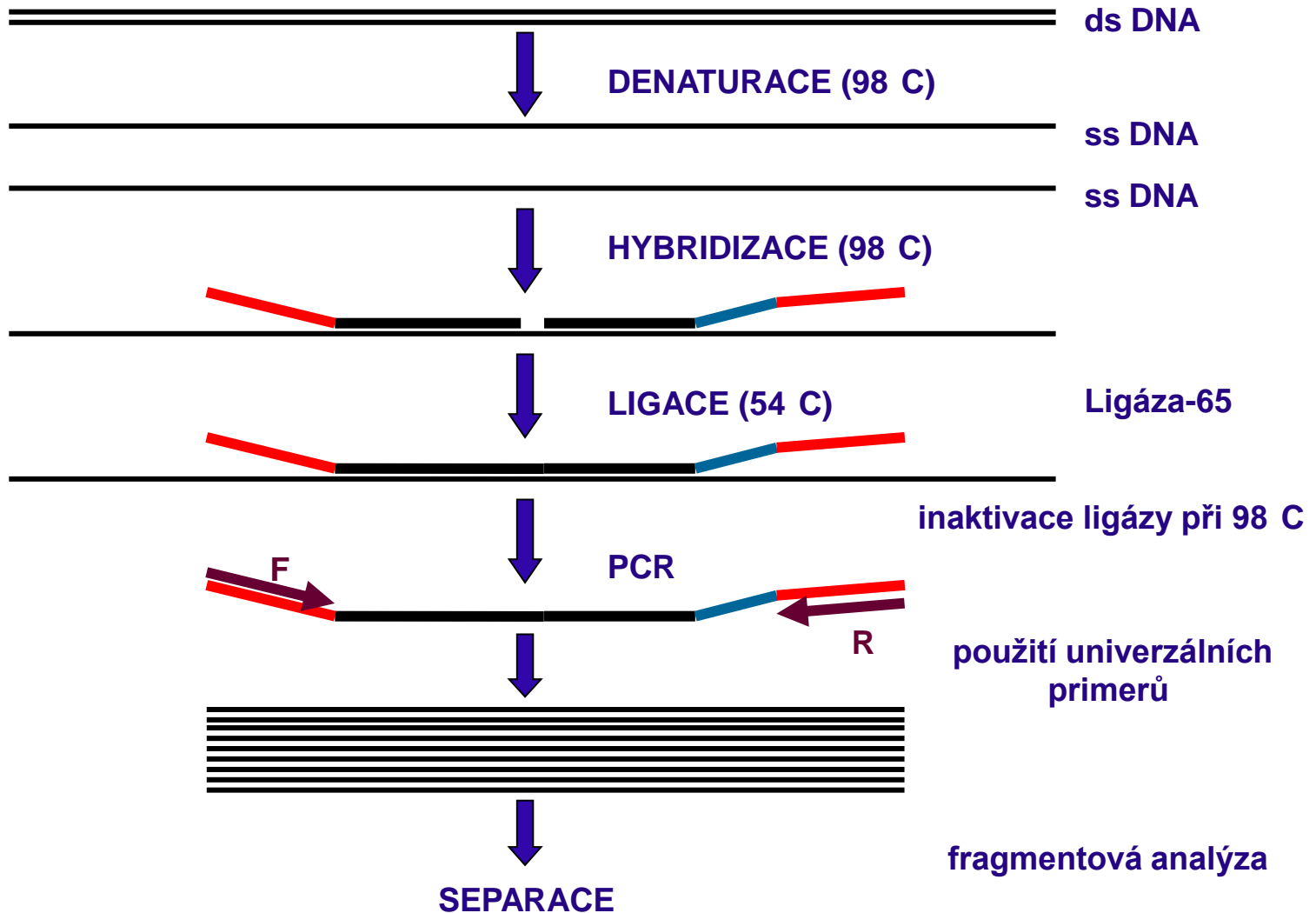
elektroforéza za nenedaturačních podmínek



ad5)

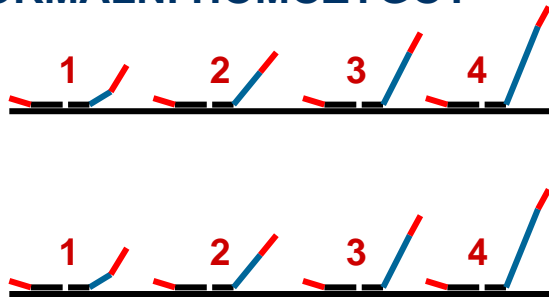
Princip MLPA

(Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)

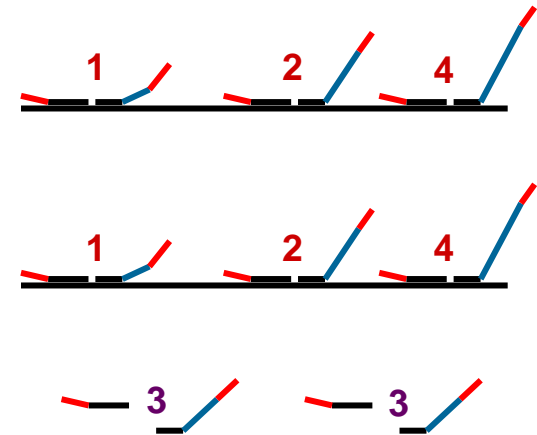


Detekce delecí

A) NORMÁLNÍ HOMOZYGOT

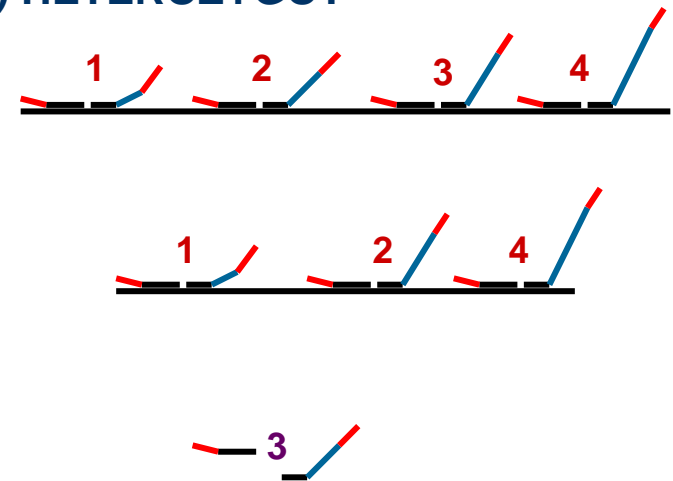


B) DELETOVANÝ HOMOZYGOT

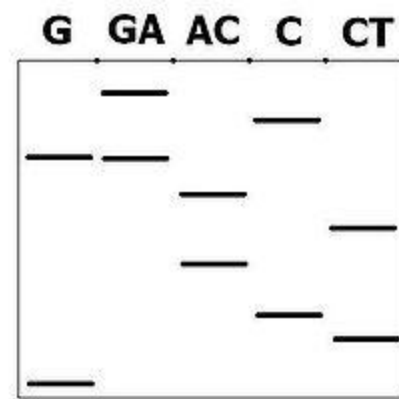


	A	B	C
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1	—	—	—
2	—	—	—
3	—		—
4	—	—	—

C) HETEROZYGOT



Sekvencování

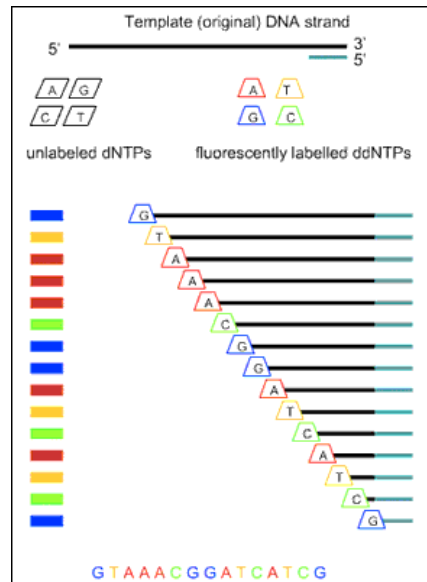
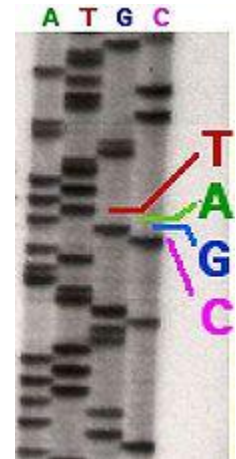


Chemické (Maxam-Gilbetovo) sekvencování

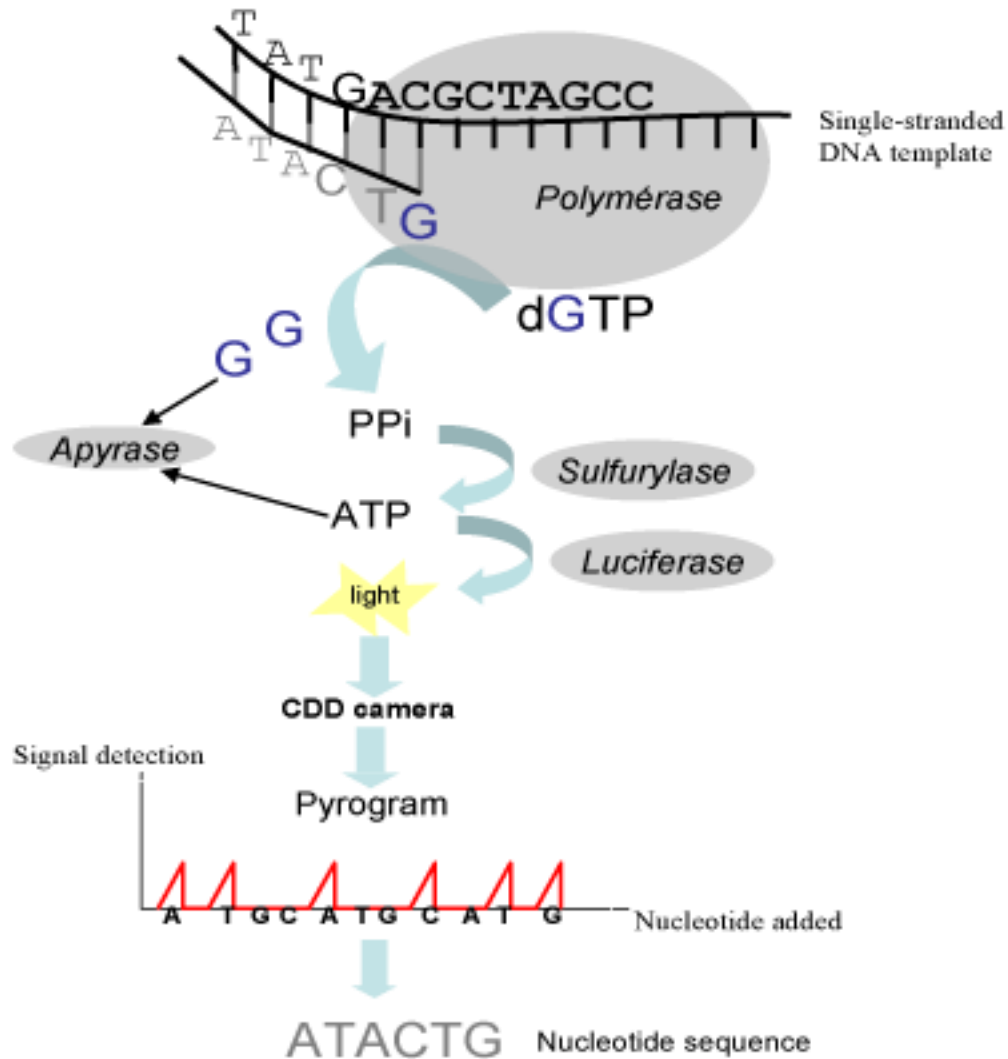
- příprava koncově značených jednořetězcových fragmentů
- 4 paralelní vzorky - modifikace jednoho typu báze, kde je fragment štěpen

Enzymatické (Sangerovo) sekvencování

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



Pyrosekvencování



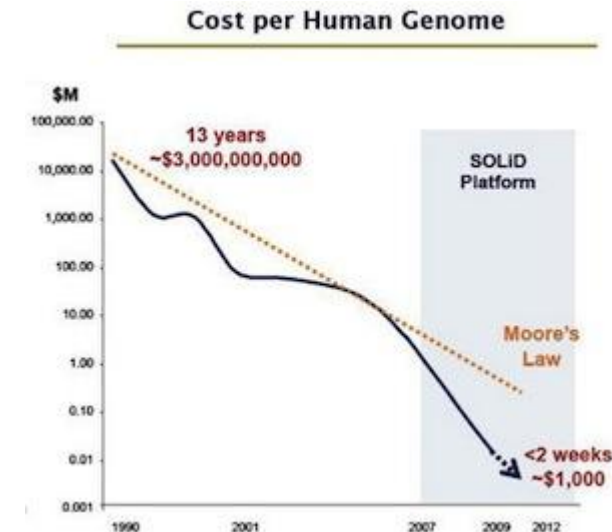
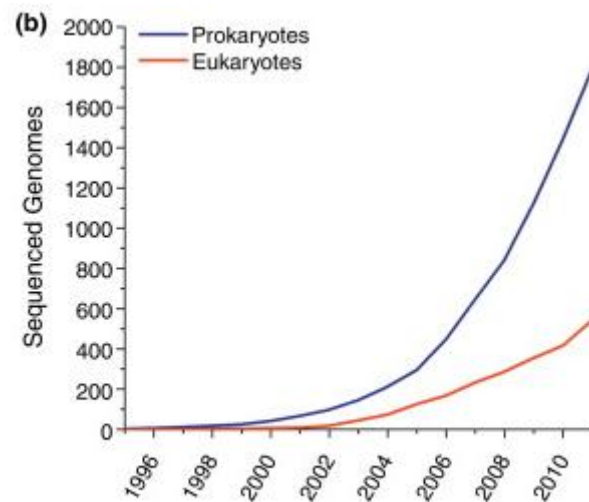
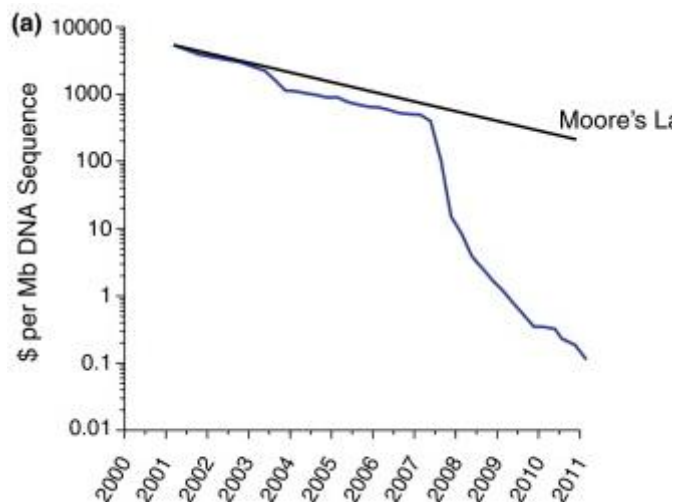
Nová generace sekvencování (NGS)

Výhody:

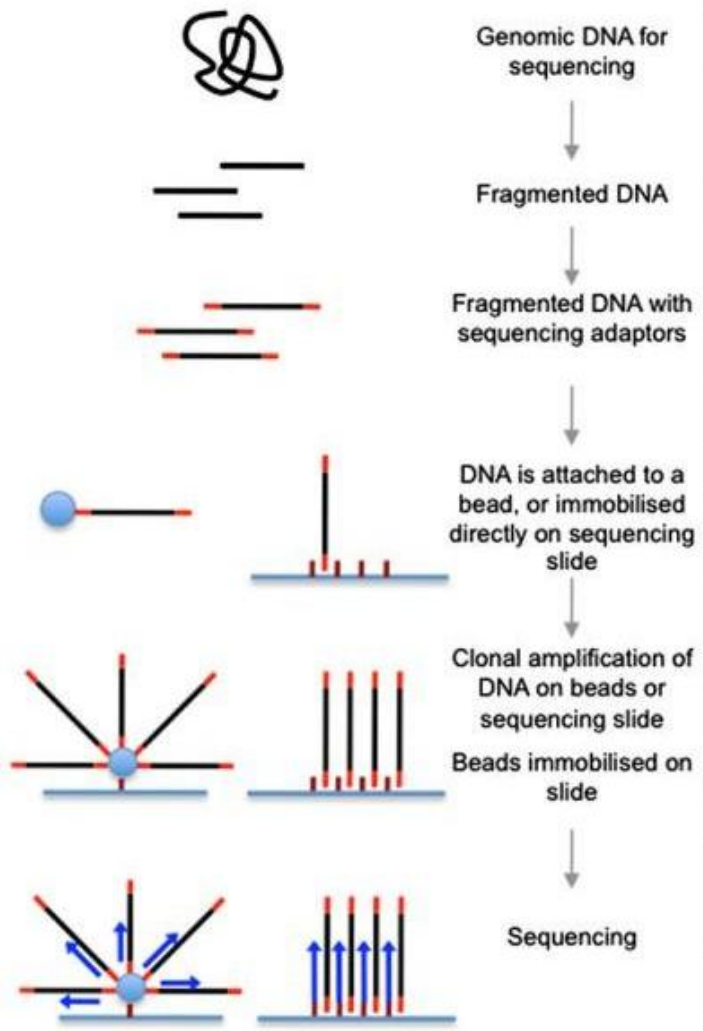
- levnější a robustnější („high-throughput“) technologie (masivní paralelní sekvencování)
- „high-throughput“ sekvencování umožňuje objev genů a regulačních elementů spojených např. se studovaným onemocněním
- Cílené resequencování - identifikace mutací
- RNA sekvencování - analýza celého transkriptomu

Limitace:

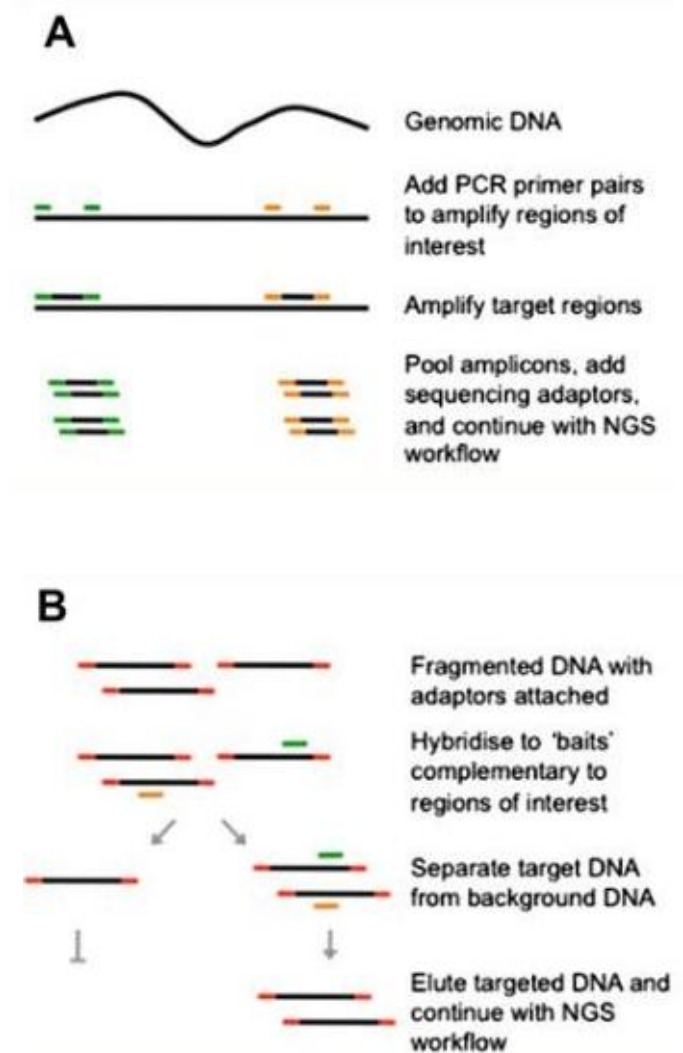
- Značná pořizovací cena, relativně drahé analýzy pro menší rutinní laboratoře
- Méně přesné čtení templátu (homopolymery), kratší délky sekvencovaných oblastí (cca 150-500 nukleotidů)
- Náročná analýza dat



NGS: postup

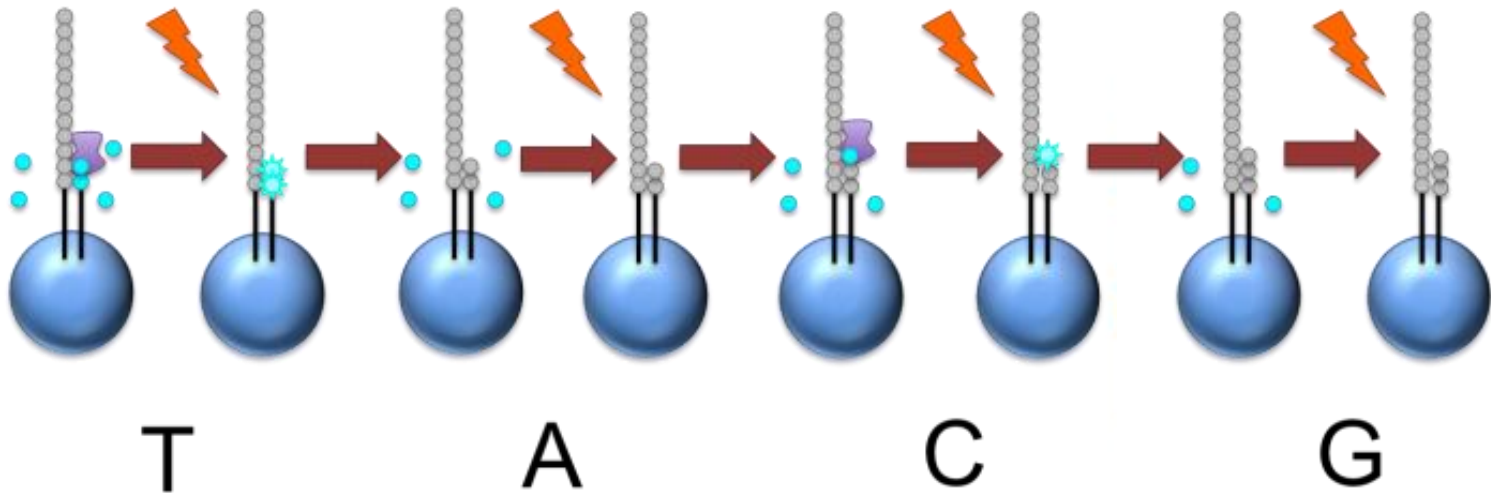
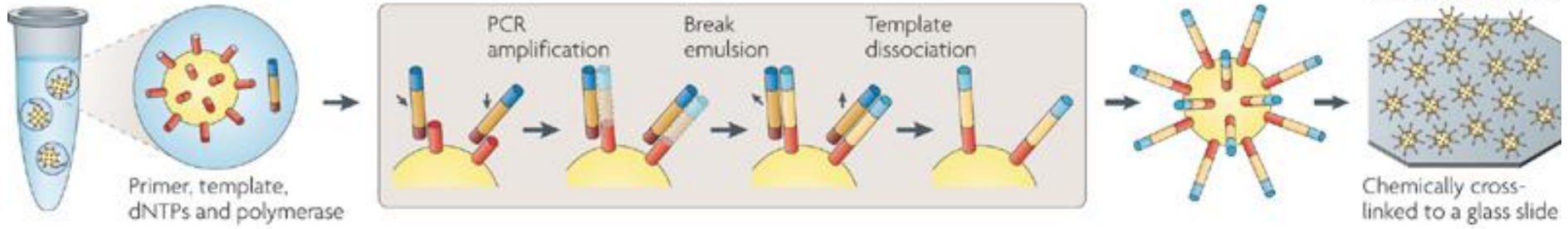


DNA obohacení

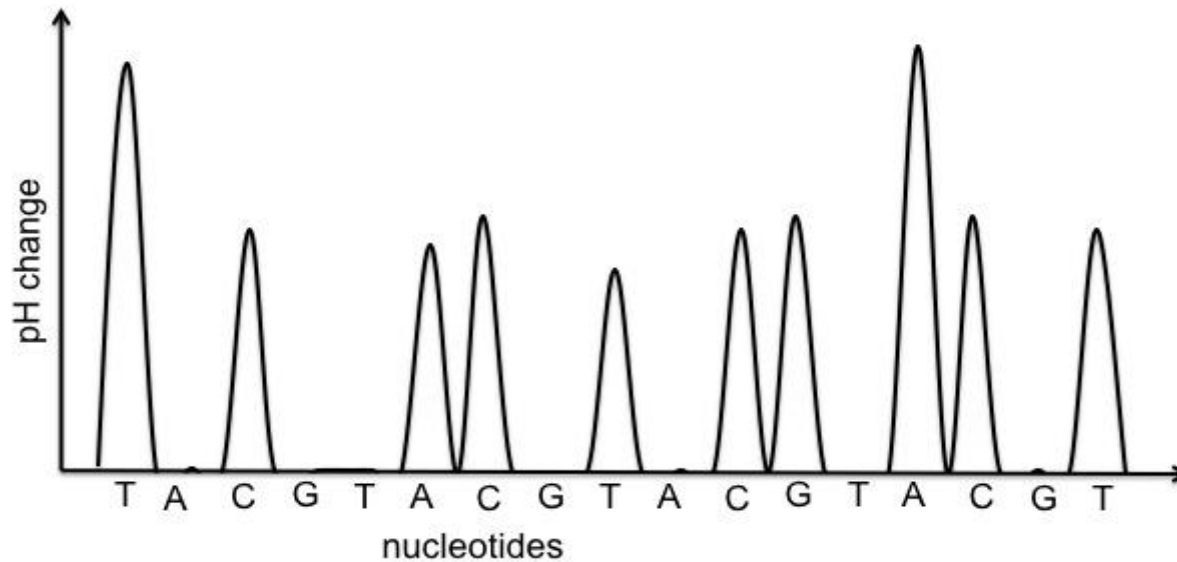
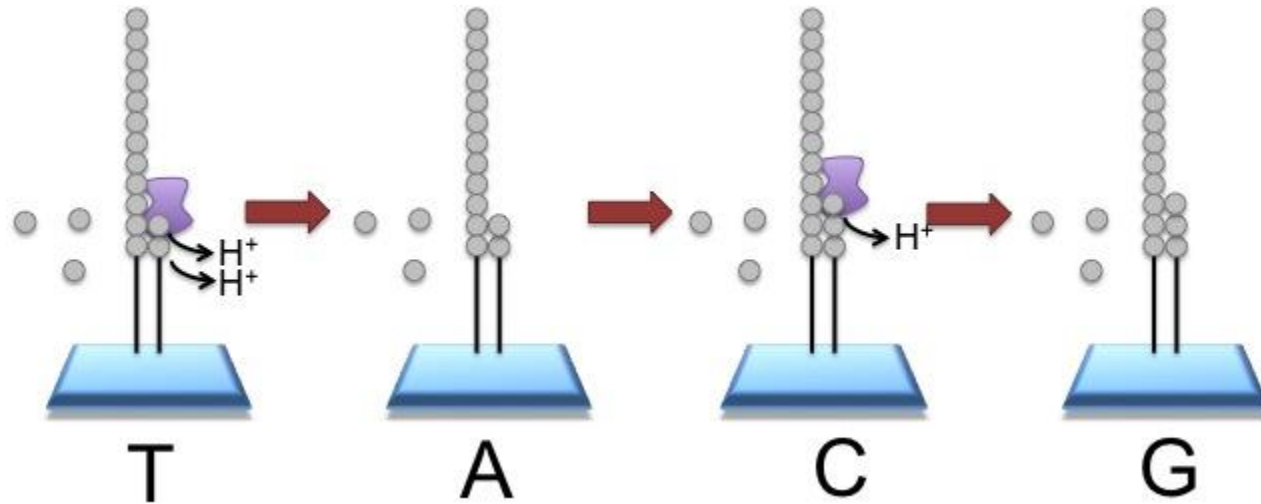


a Roche/454, Life/APG, Polonator Emulsion PCR

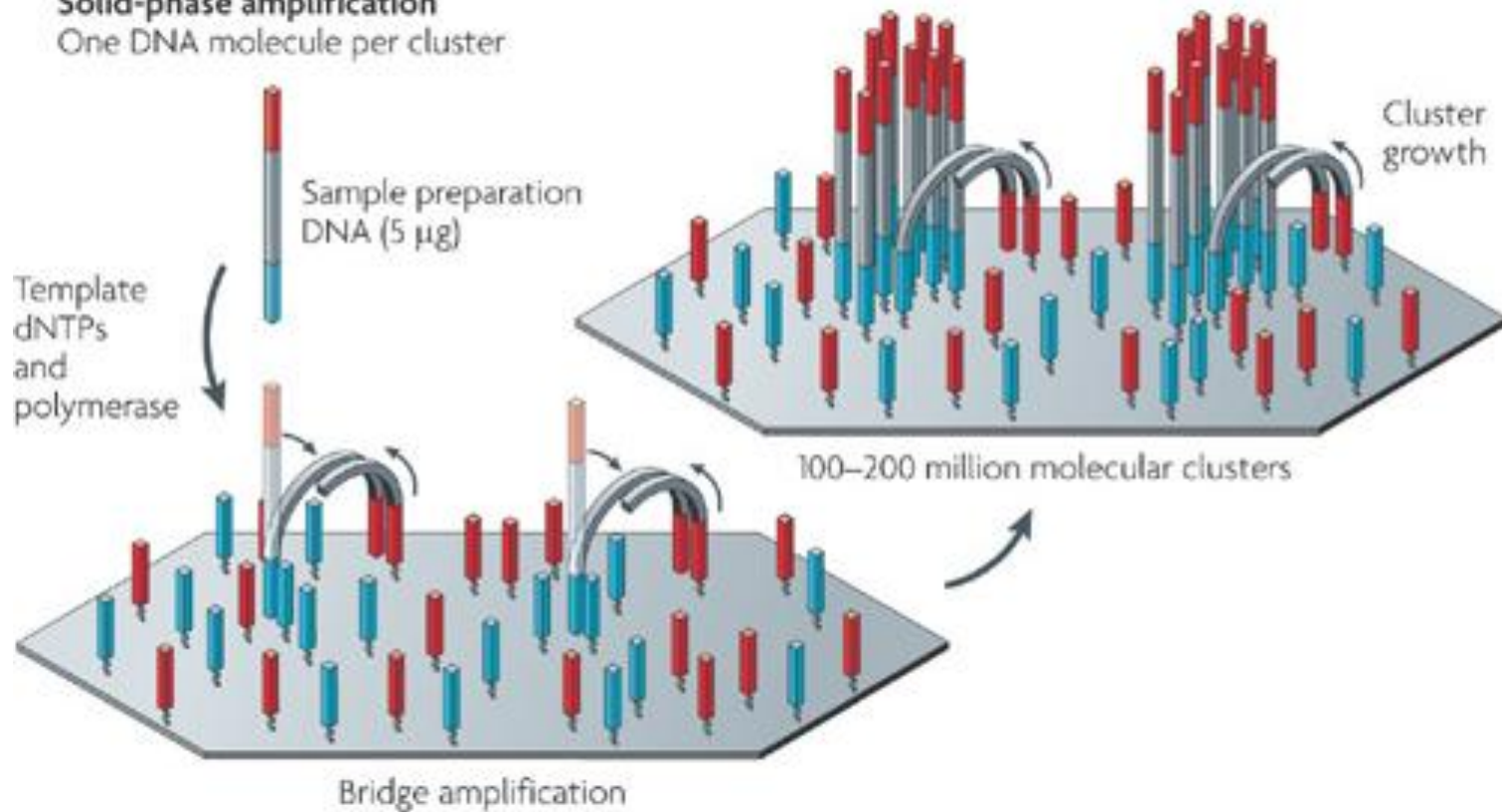
One DNA molecule per bead. Clonal amplification to thousands of copies occurs in microreactors in an emulsion



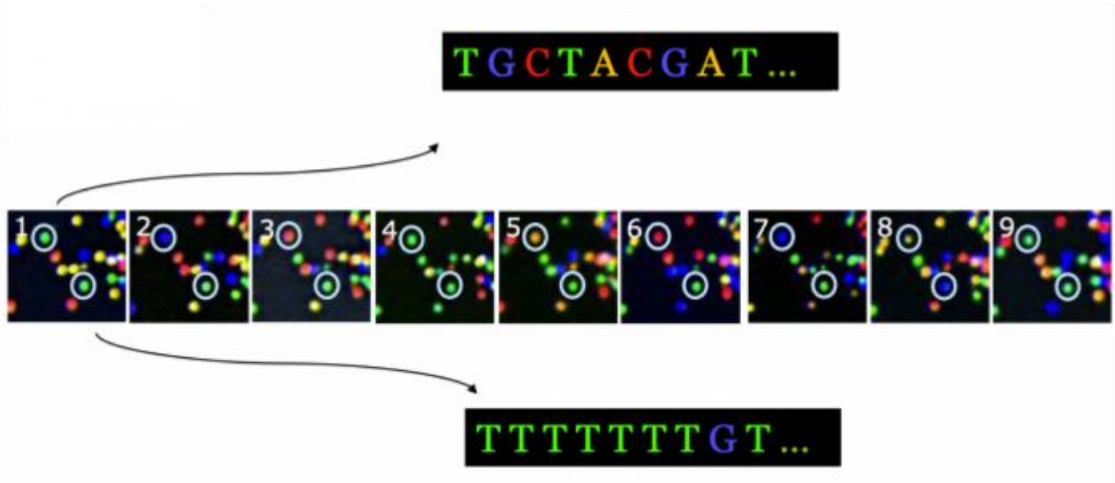
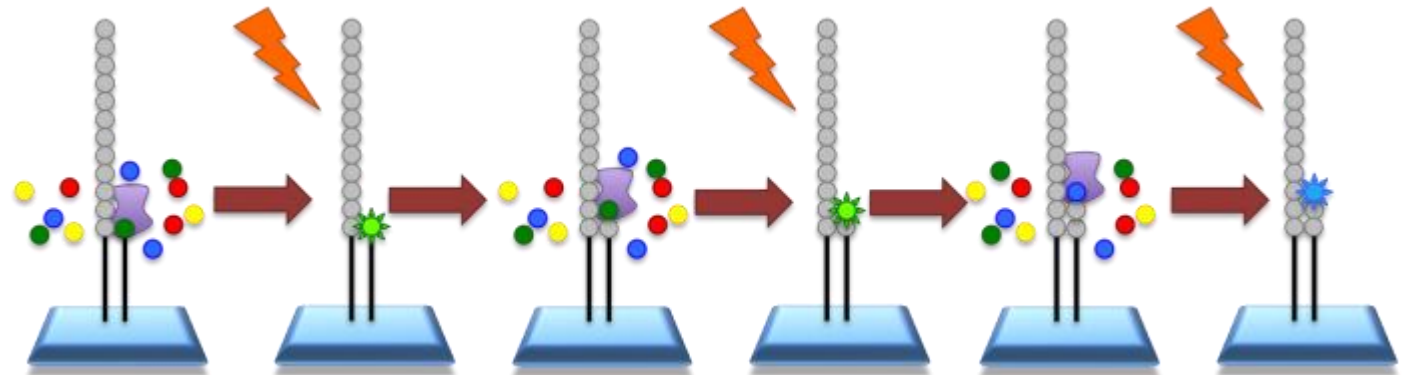
Ion Torrent/Proton



Illumina/Solexa
Solid-phase amplification
One DNA molecule per cluster



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.