

Moderní metody analýzy genomu

Úvod Čipové technologie

Jitka Malčíková

23.9.2016

Moderní metody analýzy genomu - sylabus

- 23.9. Úvod, příprava vzorků
Čipové technologie: expresní, CGH, SNP a proteinové čipy (Malčíková)
- 7.10. Sekvenování nové generace (NGS) – technologické aspekty různých NGS platforem (Tichý)
- 21.10. Příprava knihoven pro sekvenování nové generace (Tichý)
- 4.11. Metody pro analýzu nekódujících RNA – miRNA, lncRNA (Mráz)
- 11.11.** Analýza dat I (Tom)
- 25.11. Analýza dat II (Pál)
- 9.12. Aplikace - Využití moderních technologií, design experimentů (Trbušek)

Ukončení

- Test na internetu
- Alespoň polovina správných odpovědí

Trocha historie

- Kompletní diploidní sekvence konkrétního člověka
- J.C. Venter
- Sangerovo kapilární sekvenování
- Institut J. C. Ventera
- Cena 100 milionů \$

(Levy, S., et al. PloS Biol 2007)

První individuální genom



- James Watson
- Sekvenování nové generace
- Baylor College, Texas
- Osekvenováno za 4 měsíce
- < 1,5 milionu \$
- "the first of the rest of us"

(Wheeler, D.A., et al. Nature, 2008)

Druhý individuální genom



Publikování sekvence lidského genomu



1. komerčně dostupný NGS sekvenátor

Projekt 1000 genomů



PCR

1983

1. Microarray
Analýza exprese 45 genů
Arabidopsis

1995 1996

Affymetrix
GeneChip

2001

2005

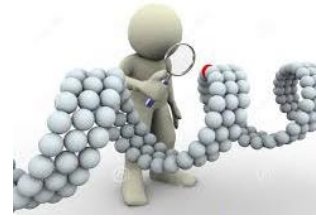
2007

2008

2010



- „large-scale“
 - Co nejširší
 - Exom, genom, tisíc genomů



- „ultra-deep“
 - Co nejhlubší
 - Jednotlivé buňky a molekuly

Lidský genom možno
osekvenovat za 50 hodin
a pod 1000 \$

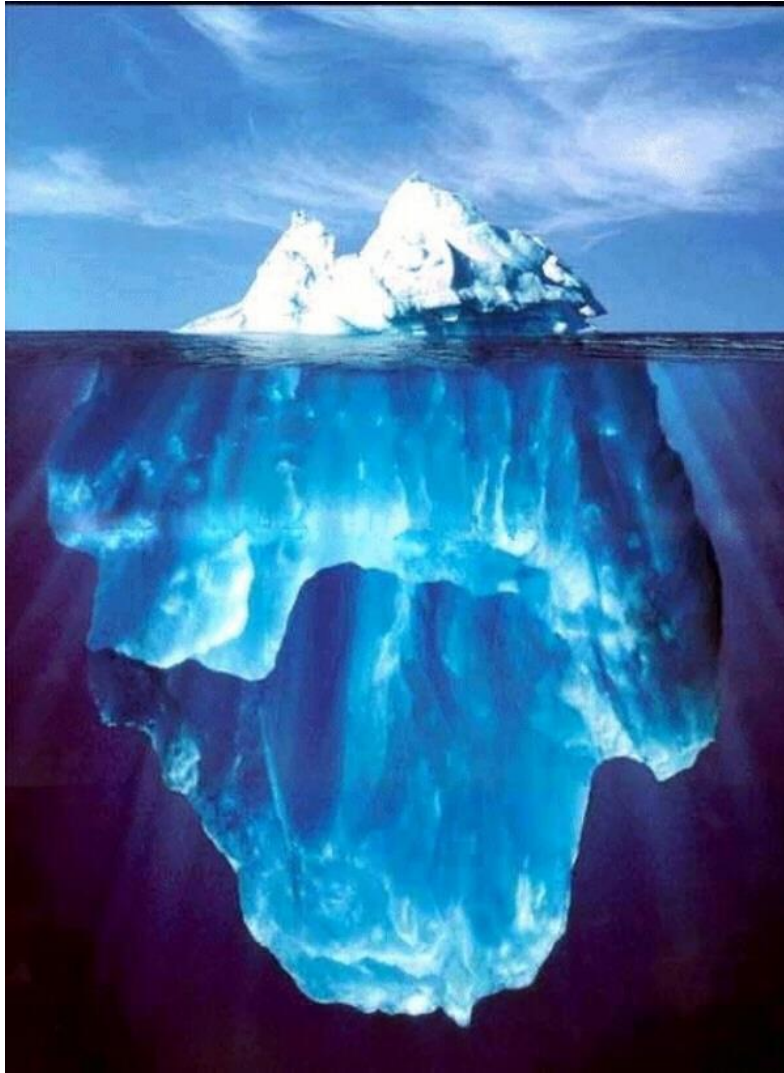


2016

Úskalí

- Interpretace
- „Unsolicited findings“ – nevyžádané nálezy
- Informované souhlasy
- Komerční „direct-to-consumer“ (DTC) genetic testing

Variabilita



Genom (3.2×10^9 bp, < 20 tis genů)

- Transkripce
- Posttranskripční modifikace
- Alternativní sestřih

Transkriptom

- Translace
- Posttranslační modifikace
- Alternativní konformace

Proteom (miliony proteinů)

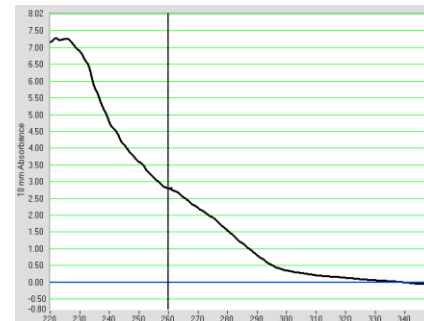
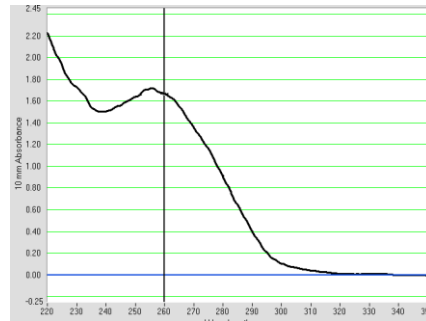
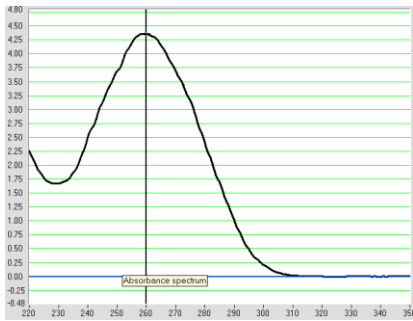
- Dynamický systém – odráží momentální stav buňky
- Hladina proteinu často nekoreluje s hladinou mRNA

PŘÍPRAVA VZORKU

Kvantifikace

■ Nanodrop

- Spektrofotometrická kvantifikace nukleových kyselin A260
- Měření čistoty:
 - $A_{260/280}$ 1.8-2.0 (<1,8 kontaminace proteiny)
 - $A_{260/230}$ >2.0 (<2 kontaminace organickými látkami)



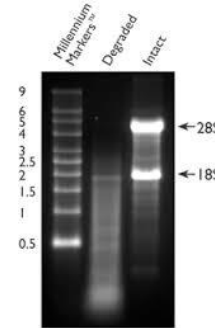
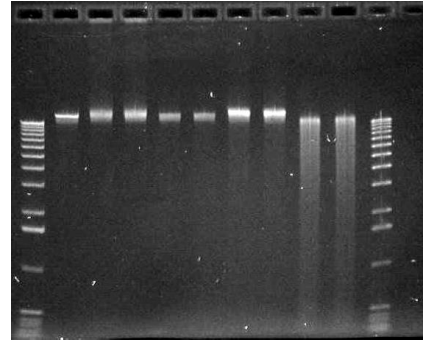
■ Qubit

- Fluorometrická kvantifikace
- Specifické značení dsDNA, RNA, proteinů



Kontrola kvality

- Elektroforéza



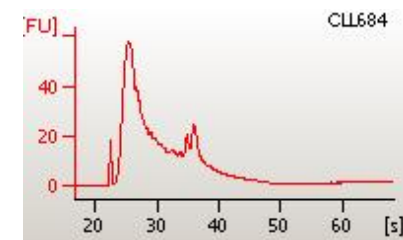
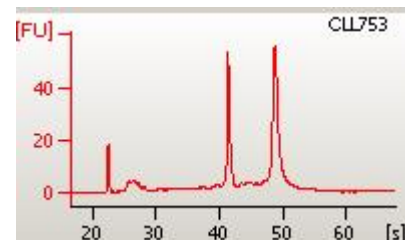
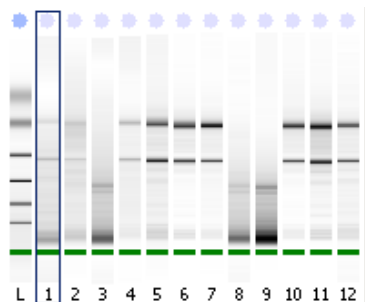
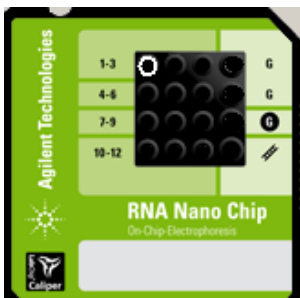
- „Lab on a chip“

 - Bioanalyser

 - Analýzy integrity RNA

 - RIN – RNA integrity number – poměr 28S a 18S rRNA

 - Nevhodný pro gDNA



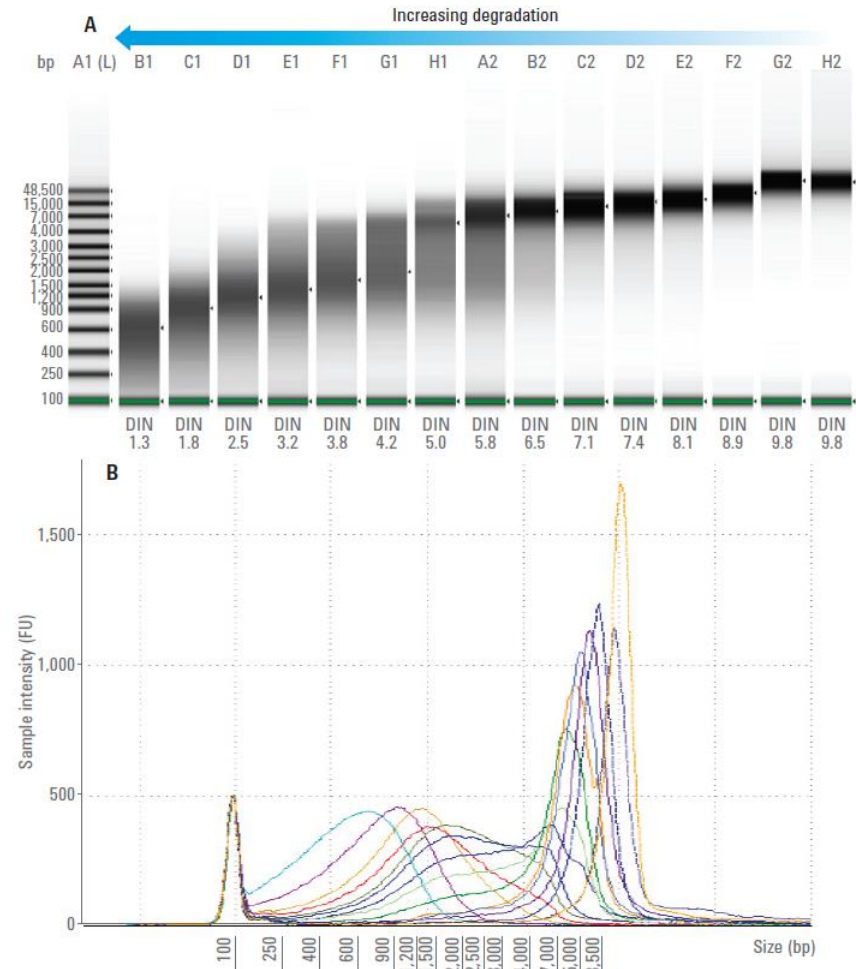
Kontrola kvality

□ Tapestation

- Umožňuje analyzovat i gDNA
- DIN - DNA integrity number
 - Stanovení na základě distribuce signálu v celém rozsahu velikostí fragmentů



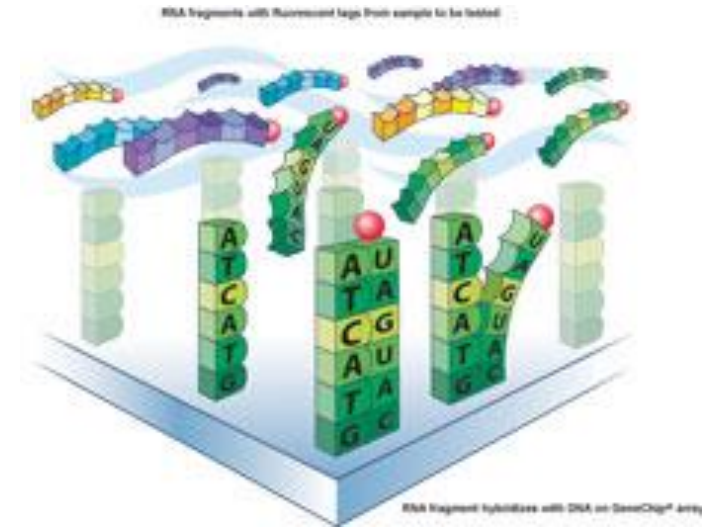
□ Fragment analyzer...



ČIPOVÉ TECHNOLOGIE

Princip čipových technologií

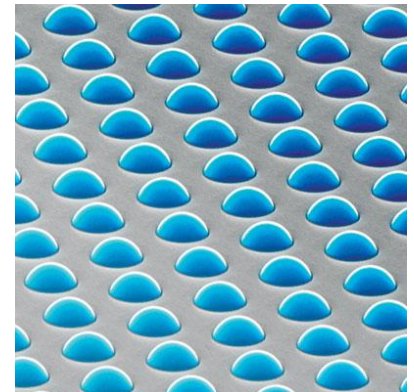
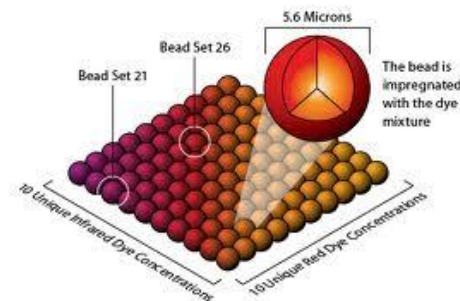
- Princip – sondy vázané na nosný podklad



- Různé dělení podle
 - Aplikace (genotypizace; exprese RNA, proteinů; epigenetika...)
 - Technologie výroby (in situ syntéza; deponování)
 - Typu sond (umělé chromozómy – BAC, PAC; cDNA; oligonukleotidy)
 - Značení (fluorescence – jedno/více-kanálové; autoradiografie, chemiluminiscence)

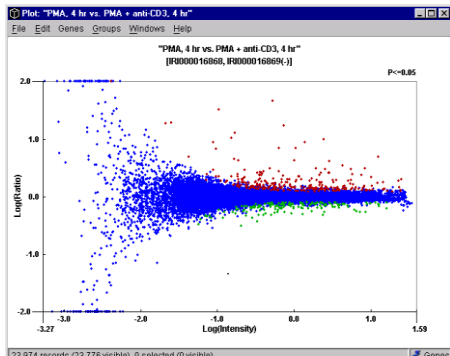
Nosný podklad

- Sklo
 - Mikroskopické sklíčko (25 x 75 mm)
 - Speciální formáty
 - Různé úpravy povrchu – aminosilan, epoxy atd.
- Nylonová nebo nitrocelulózová membrána
- Plast, gel
- Mikrokuličky
 - BeadArrays® (Illumina)
 - xMAP (Luminex)

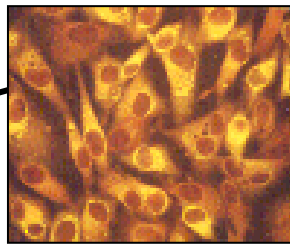


Aplikace

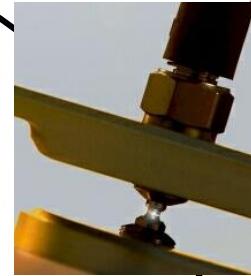
- Analýza genomových aberací, genotypizace
 - CGH, SNP čipy
 - Resekvenační čipy
- Epigenomika
 - Mapování vazby proteinů na DNA (ChIP-on-chip)
 - Mapování metylované DNA (MeDIP-chip)
- Exprese
 - mRNA, miRNA
 - Proteiny
 - Buňky, tkáně



**Analýza dat,
statistické
zpracování**



**Izolace DNA,
RNA,
proteinů...**

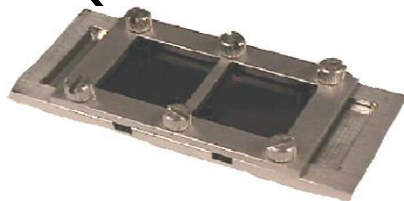


**Kvantifikace,
kontrola kvality**

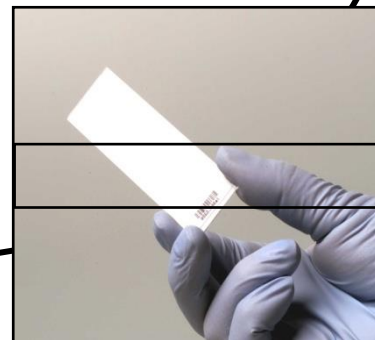
Čipová analýza



Skenování čipu



**Hybridizace materiálu
(RNA, proteinů...) s
čipem**



Příprava čipu



**Amplifikace a
značení**

ČIPY PRO ANALÝZU GENOMU

- Výchozí materiál - genomová DNA
- Detekce nebalancovaných genomových změn
 - Amplifikace, delece – CNV – copy number variations
 - Nedetekuje balancované chromozomální translokace
 - Array CGH
- Detekce uniparentální dizomie, genotypizace
 - SNP čipy
- Detekce mutací, polymorfismů
 - Resekvenační čipy

CGH - komparativní genomová hybridizace

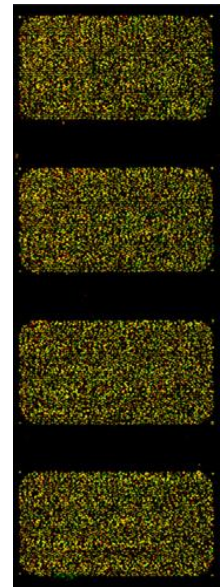
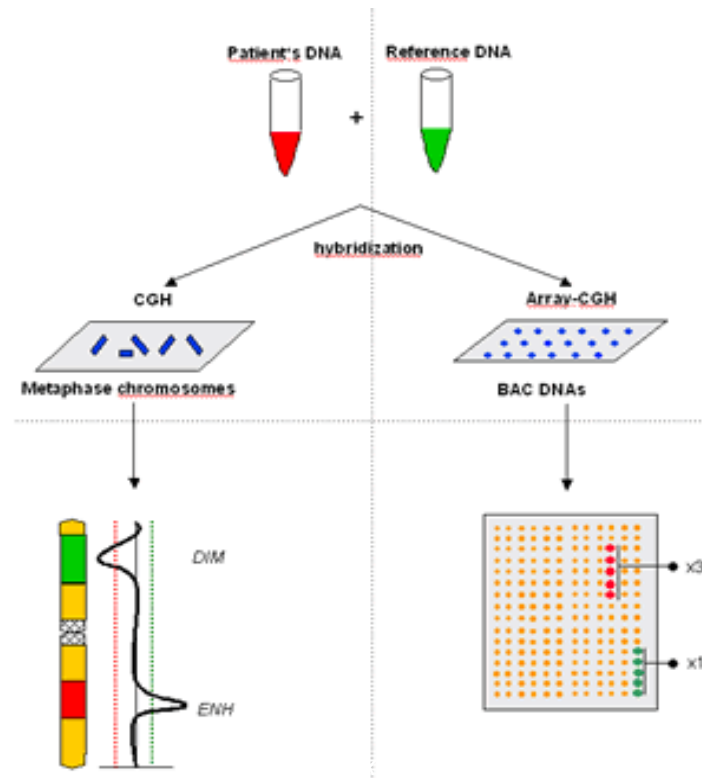
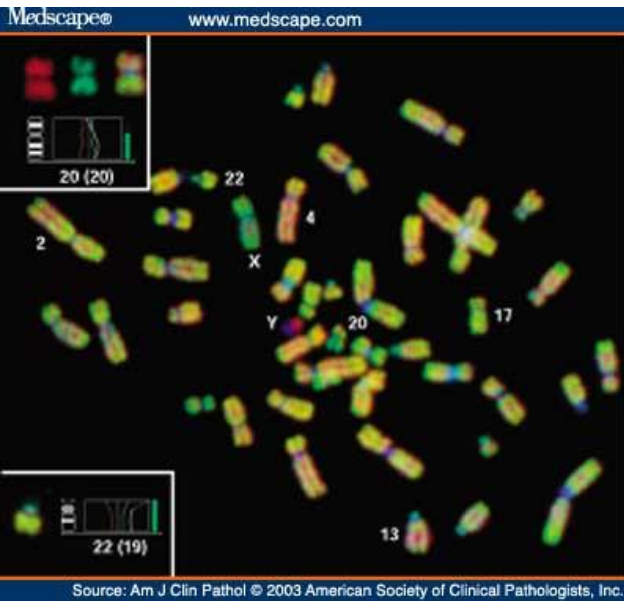
Kohybridizace značené **DNA vzorku** a **kontrolní DNA**

na normální metafázní chromozomy

- Klasická CGH, HR-CGH
- Metoda molekulární cytogenetiky

na sondy navázané na skličku

- array CGH – čipová technologie



Rozdělení aCGH podle typu sond

- Délka a hustota pokrytí DNA sond určuje rozlišení čipu
- Úseky genomové DNA vložené do vektorů
 - YAC (Yeast Artificial chromosome) - 200 -1000 kb
 - BAC (Bacterial Artificial chromosome) - 50–200 kb
 - PAC (Phage Artificial chromosome) - 75-200 kb
 - Kosmidy – 30-40 kb
 - Rozlišení ~ 1Mb
- cDNA - 1-2 kb
 - Pouze genové oblasti
 - Horší schopnost detekce jednokopiových změn
 - Rozlišení - 1-2 kb
- Oligonukleotidy - 25-85 bazí
 - Rozlišení - pod 1 kb

Rozdělení aCGH podle analyzované oblasti

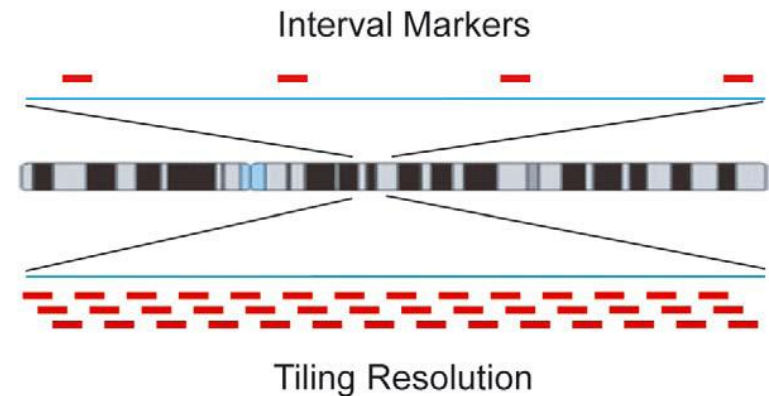
■ Cílené

- Analýza vybraných „hot spot“ oblastí spojených s konkrétním onemocněním

■ Chromozomové

■ Celogenomové

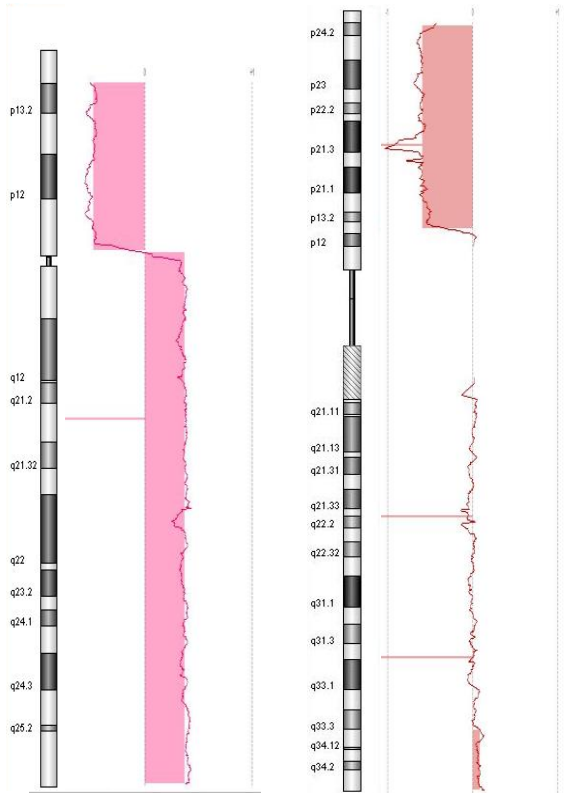
- Sondy rozmístěné
 - Rovnoměrně po genomu
 - V určitých intervalech
 - Tiling arrays – sondy se překrývají – vysoké rozlišení



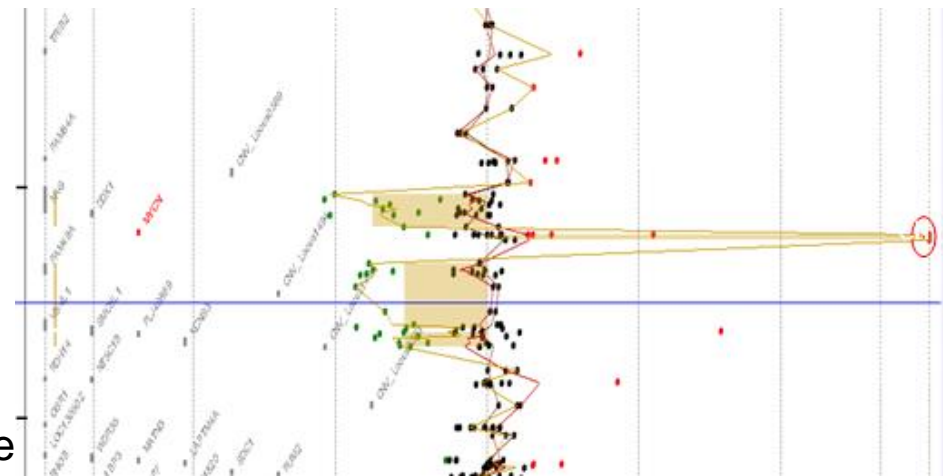
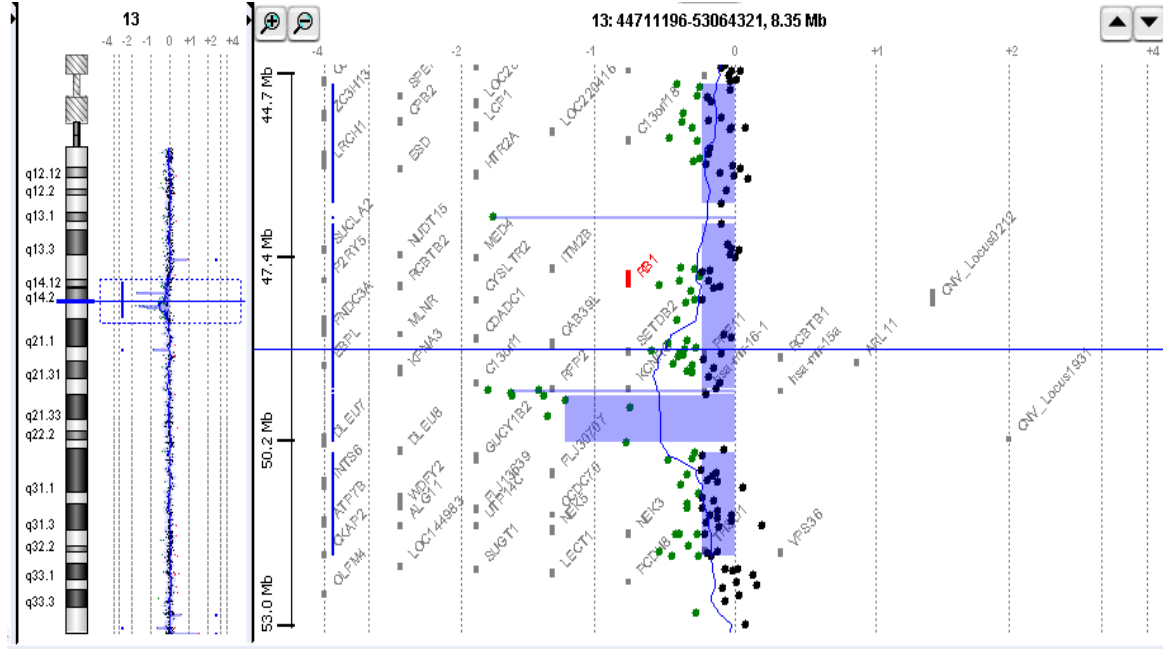
Davies et al., 2005

Výsledky aCGH

Izochromozom 17 Delece 9p

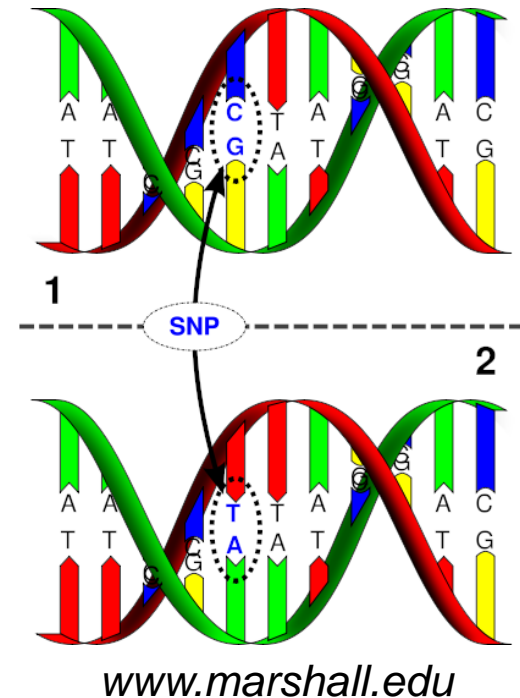


Krátká delece mono a bialelická



SNP čipy

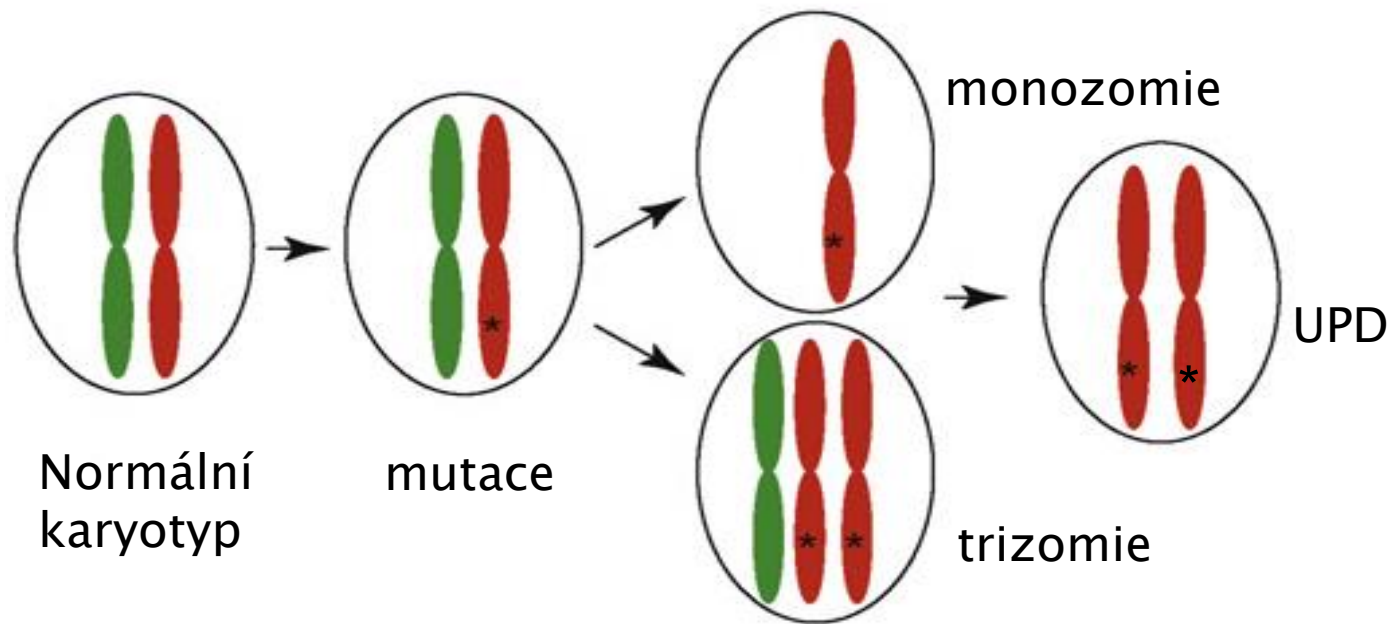
- Čipy umožňující rozlišit nejen CNV, ale i SNP
 - Sondy pro detekci CNV jako u CGH čipů + sondy speciálně navržené pro detekci SNP
- SNP – jednonukleotidové polymorfismy
- Určení alelového statusu, haplotypu
 - Genotypizace, asociační studie
- Detekce uniparentální dizomie



Uniparentální dizomie (UPD)

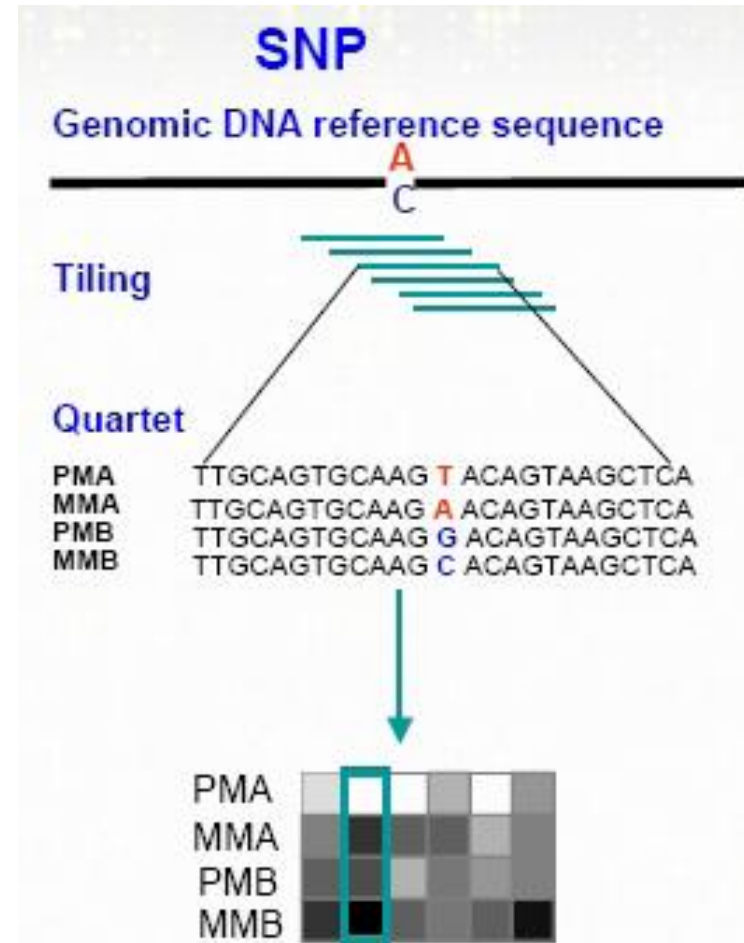
= CN LOH – copy neutral loss of heterozygosity

- Vrozená, získaná
- Heterodisomie vs isodisomie
- Vyskytuje se u řady onemocnění

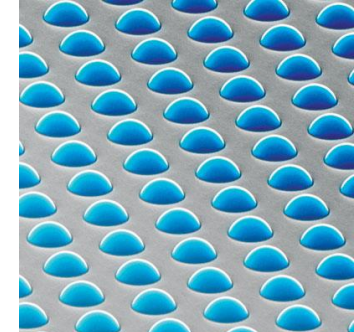


Princip SNP čipů - Affymetrix

- 25b sondy, záměna 13. nukleotidu - největší vliv na sílu vazby při neshodě
- Jednobarevná detekce
 - na čip se hybridizuje pouze označená testovaná DNA

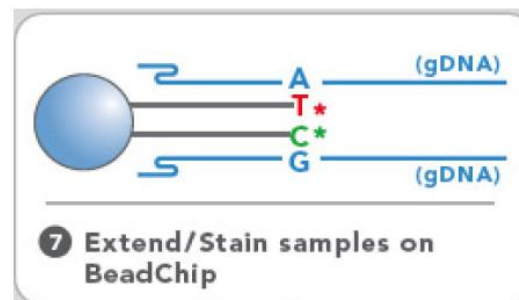
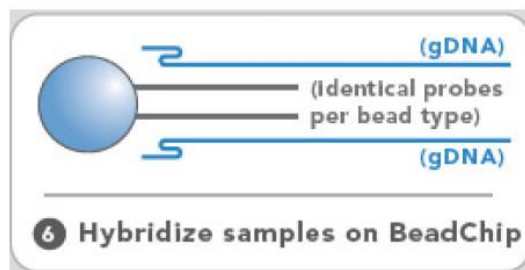


Princip SNP čipů - Illumina

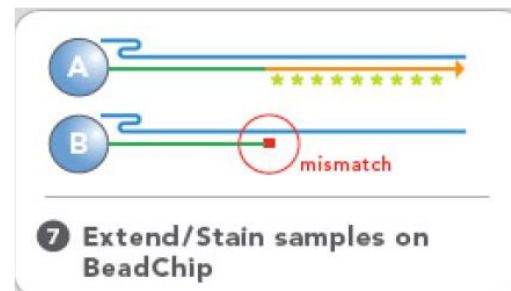
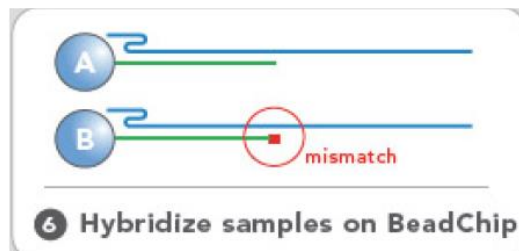


- 1x 50b, single base extension; pouze A/G, A/C, T/C, T/G (dvoubarevná metoda)
- 2X 50b, allele specific extension

Infinium II

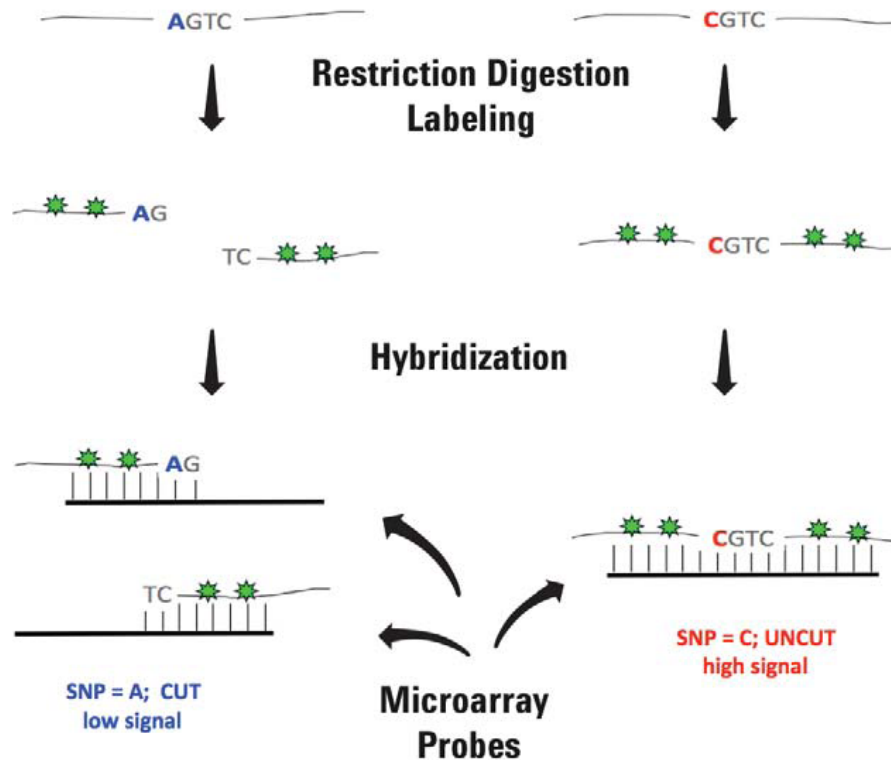


Infinium I



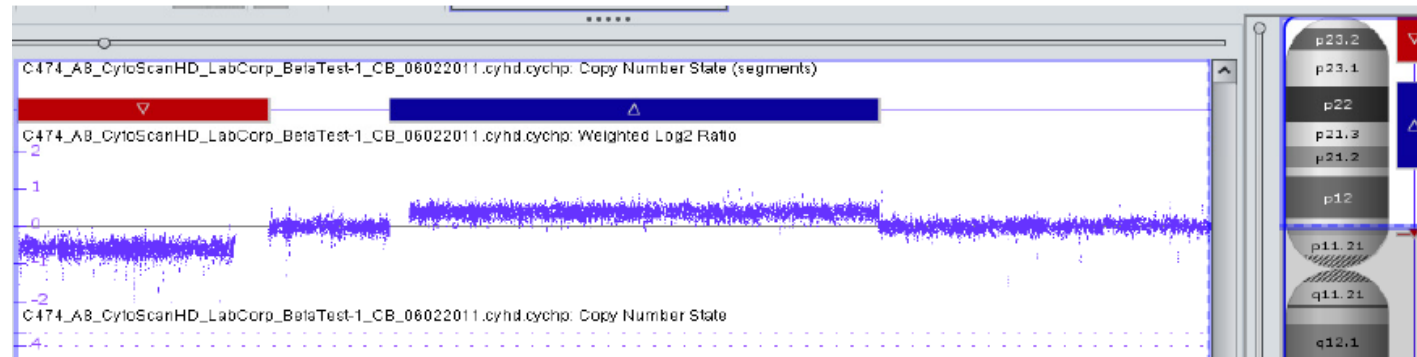
Princip SNP čipů - Agilent

- 60b, SNPs pouze v místech rozpoznávaných restričními endonukleázami

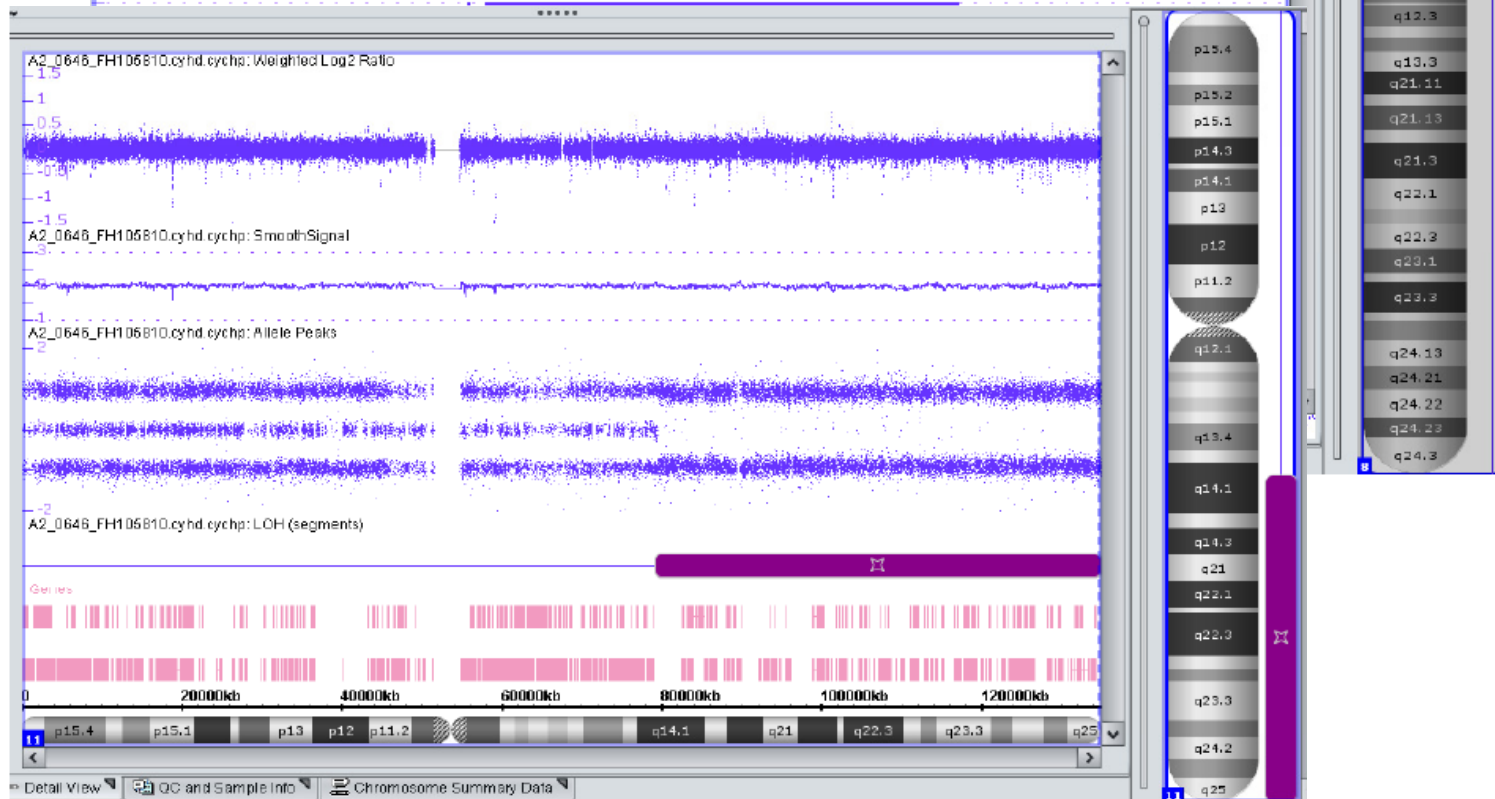


Výsledky SNP čipů

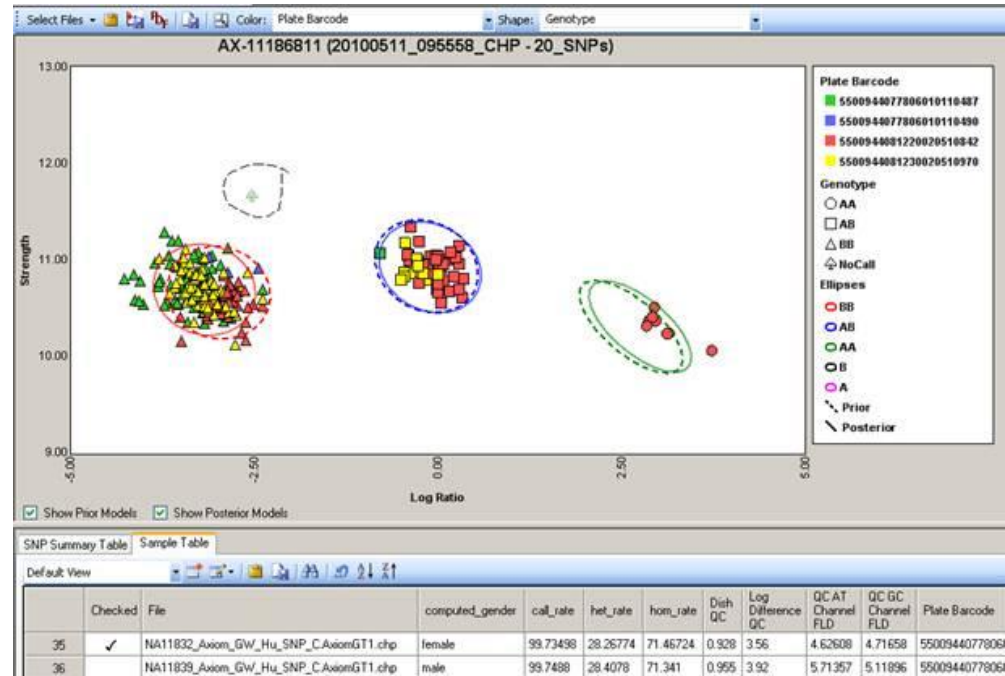
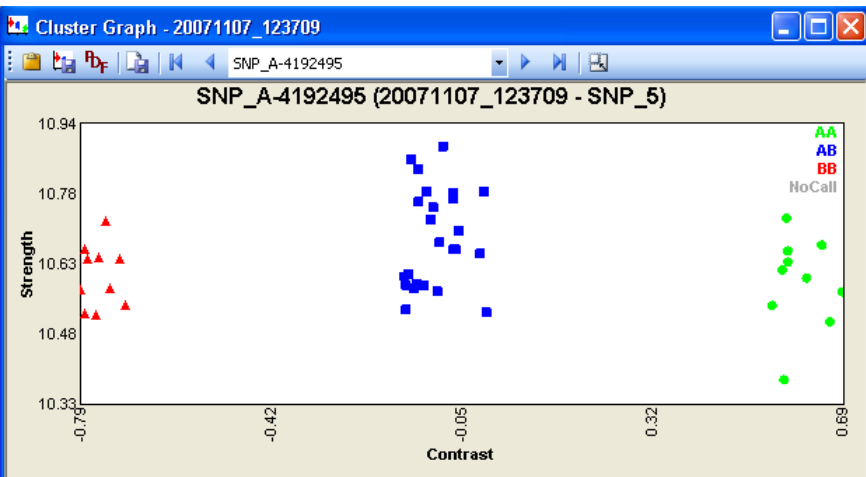
Amplifikace + delece



Uniparentální
dizomie



Výsledky SNP čipů - genotypizace



Využití CGH, SNP čipů

- **Nádorová genomika**
 - V nádorových buňkách často změny genomu – primární i sekundární
- **Klinická genetika**
 - Přesnější charakterizace mikrodelečních syndromů
 - Identifikace genomových změn u pacientů s mentální retardací i jinými vrozenými postiženími
- **Prenatální a preimplantační screening**
 - Sure24
 - Karyomapping – i vyšetření rodičů
 - Diagnostika monogenních onemocnění a zároveň screening aneuploidii
- **Asociační studie – asociace SNP i CNV s řadou onemocnění (revmatoidní artritida, diabetes, nádorová onemocnění, psychiatrická onemocnění)**
- **Evoluční studie**

Resekvenační čipy

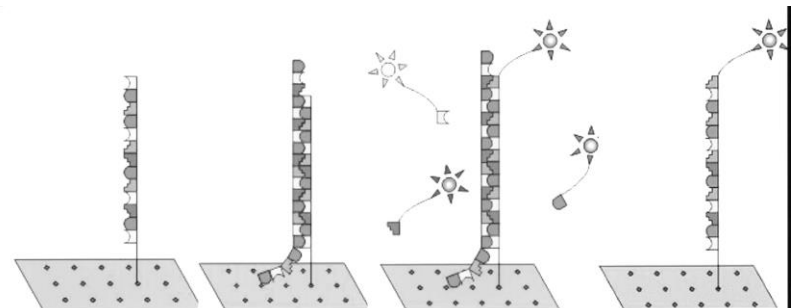
■ Affymetrix

- Stejný princip jako detekce SNP
- SNP = testovány 2 varianty X resekvenování = testovány 4 varianty

TCGGTAGCCATG A ATGAGTTACTAC	<i>Probe 1 Forward</i>
TCGGTAGCCATG C ATGAGTTACTAC	<i>Probe 2 Forward</i>
TCGGTAGCCATG G ATGAGTTACTAC	<i>Probe 3 Forward</i>
TCGGTAGCCATG T ATGAGTTACTAC	<i>Probe 4 Forward</i>
<i>ATCGGTAGCCATGCATGAGTTACTACAGCT</i>	<i>Genomic Sequence of interest</i>
<i>TAGCCATCGGTACTACTCAATGATGTCGA</i>	
AGCCATCGGTAG A TACTCAATGATG	<i>Probe 1 Reverse</i>
AGCCATCGGTAG C TACTCAATGATG	<i>Probe 2 Reverse</i>
AGCCATCGGTAG G TACTCAATGATG	<i>Probe 3 Reverse</i>
AGCCATCGGTAG T TACTCAATGATG	<i>Probe 4 Reverse</i>

■ APEX

- Arrayed Primer EXtension
- Prodloužení sondy o jeden nukleotid komplementární ke vzorku
- 4-barevná technologie – nutné speciální vybavení

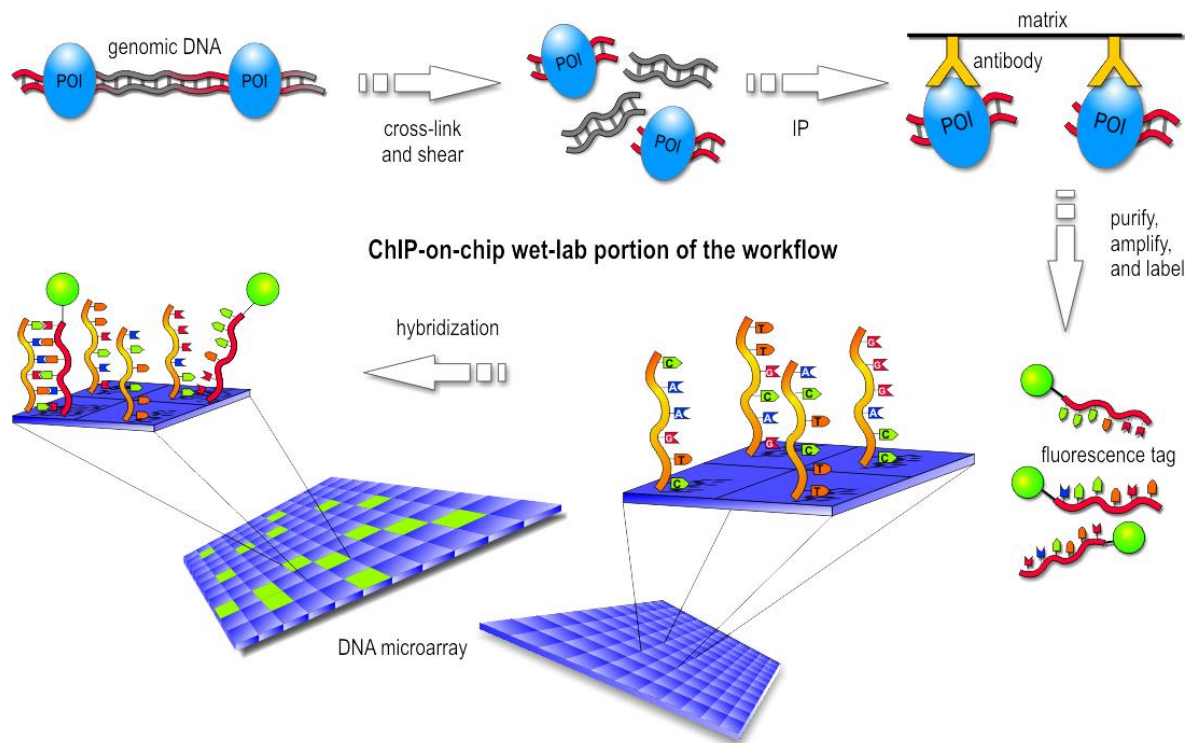


Resekvenační čipy – hudba minulosti

- Paralelní sekvenace více oblastí
- Detekce mutací, na které je čip navržen
- Screeningová metodika
- Custom arrays – nutno ověřit Sangerovým sekvenováním
- Komerčně dostupné „diagnostické“ čipy
 - Roche – platforma Affymetrix
 - Cytochrom P450
 - FDA approval, CE-IVD
 - Není nutné ověřovat výsledek
 - Jen 1 gen , ale velmi rychlé, „user friendly“ (protokol max 2 dny)
 - APEX
 - Dostupné čipy pro konkrétní geny + možný vlastní design
 - Nutné ověřit sekvenací
 - Research use only

ChIP-on-chip (Chromatin immunoprecipitation)

- Mapování vazby proteinů na DNA
 - Např. transkripční faktory

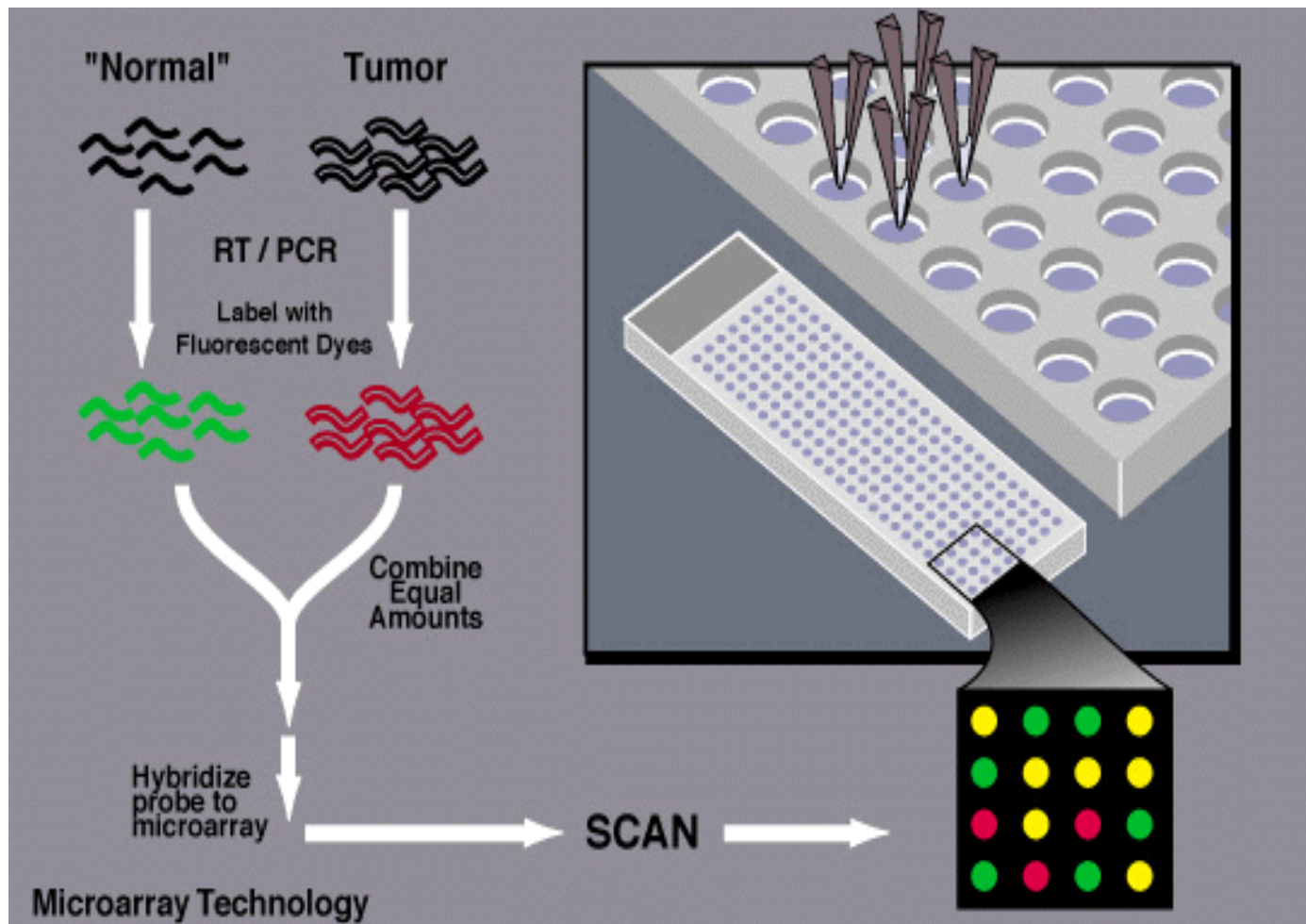


MeDIP-chip (Methyl-DNA immunoprecipitation)

- Stejný princip – imunoprecipitace s protilátkou proti 5-metyl-cytosinu

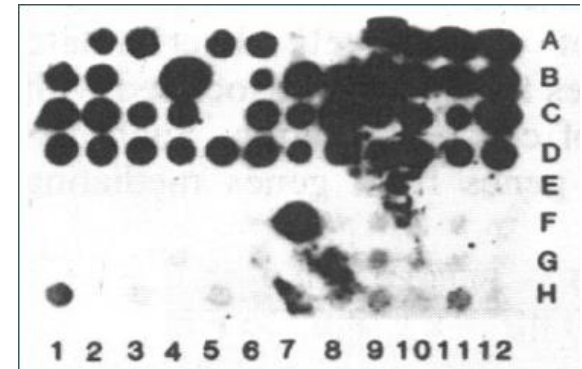
EXPRESNÍ ČIPY

 Buňky kontrolní  Buňky sledované



Historie

- 1987 Kulesh et al. - cDNA knihovna na papírovém filtru
- Přelom 80./90. - E. Southern – in-situ syntéza oligonukleotidů
- 1991 – Fodor et al. - světlem řízená paralelní syntéza
- 1995 – Schena et al. - cDNA expresní microarray
- 1996 – lidská cDNA microarray
- 1997 – celogenomová (kvasinka)
 - cDNA microarray
- 1997 – celogenomová (kvasinka)
 - oligonukleotidová microarray

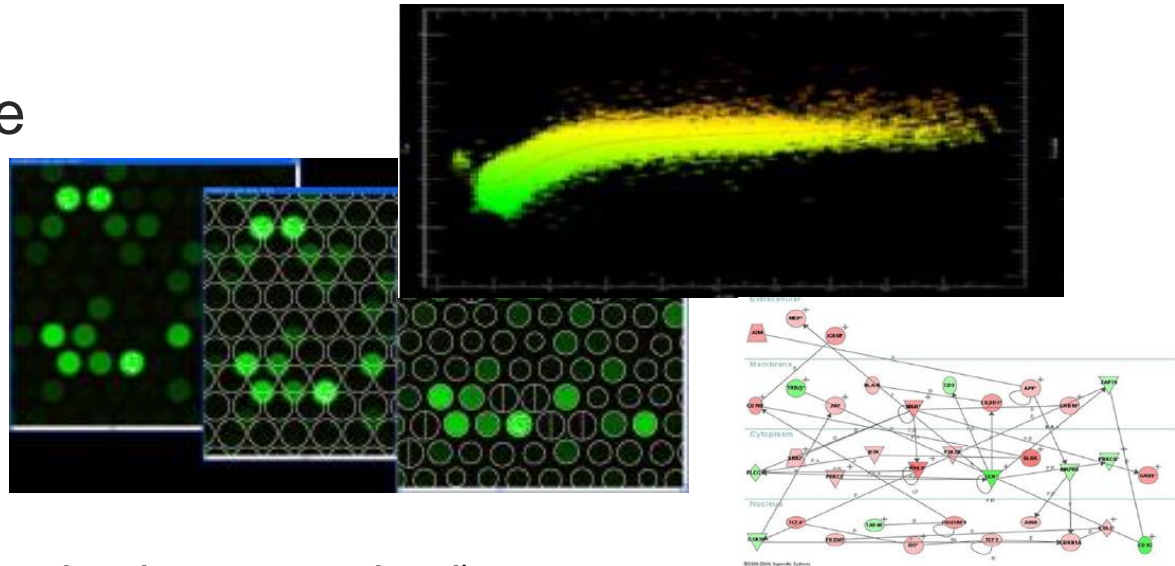


Expresní čipy - typy

- Studium exprese mRNA (miRNA)
 - Exonové (whole transcript)
 - Cílené – konkrétní dráhy, diagnózy
- High- i low- density
- Sondy – krátké i dlouhé oligonukleotidy, cDNA
- Sklíčka, cartridge, mikrokuličky, membrány
- Jedno- a dvou- kanálové

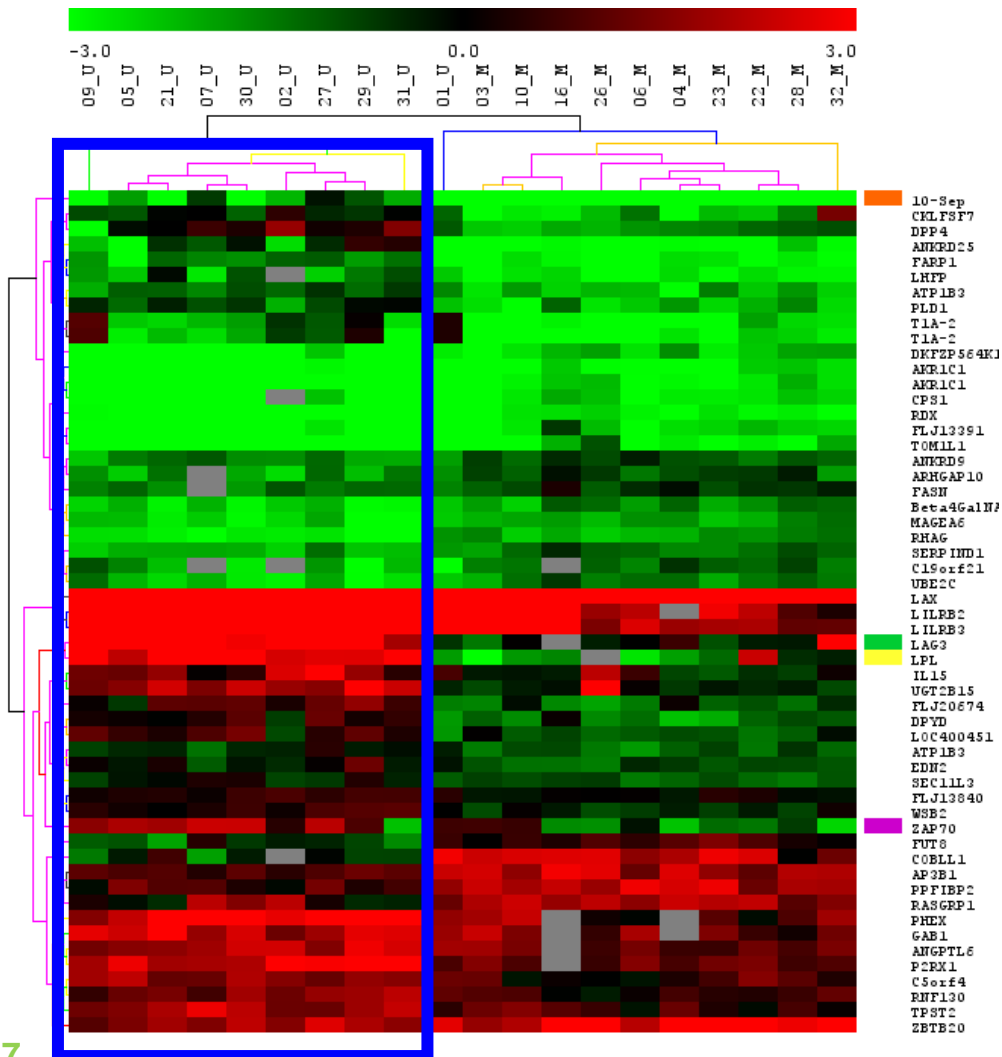
Postup

- Přepis RNA
 - Oligo-dT priming
 - Kvalitní RNA
 - 3' biased sondy
 - Random priming – hexa-, okta-, nona-mery
 - I degradovaná RNA
 - Celý transkript
- Značení - fluorescence
- Hybridizace, odmytí
- Skenování
- Analýza dat
 - Zpracování obrazu
 - Normalizace
 - Klastrová analýza (supervised, unsupervised)
 - Integrace s dalšími daty – gene ontology, genové interakce, funkční vztahy



Výsledky

→ vzorky

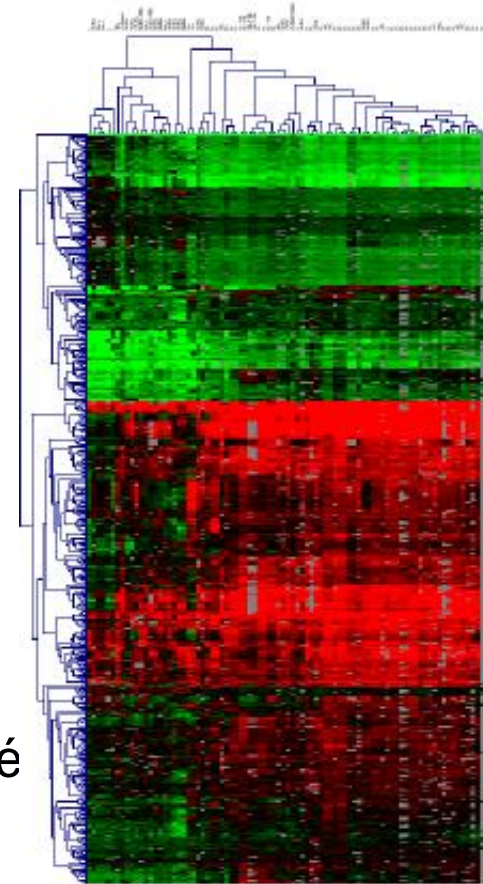


- Identifikace genů rozdílně exprimovaných u konkrétních skupin vzorků
- Ověření pomocí real-time PCR

geny

Využití

- Studium efektů stimulů na genovou expresi
 - Chemikálie (např. léčiva)
 - Fyzikální faktory (záření)
 - Gene knock-out (siRNAm, CRISPR)
 - Genová transfekce (např. transkripční faktory, mutantní alely)
- Studium rozdílů mezi vzorky
 - Tkáně a orgány
 - Diagnózy
 - Studium biomarkerů – diagnostické, prognostické, prediktivní

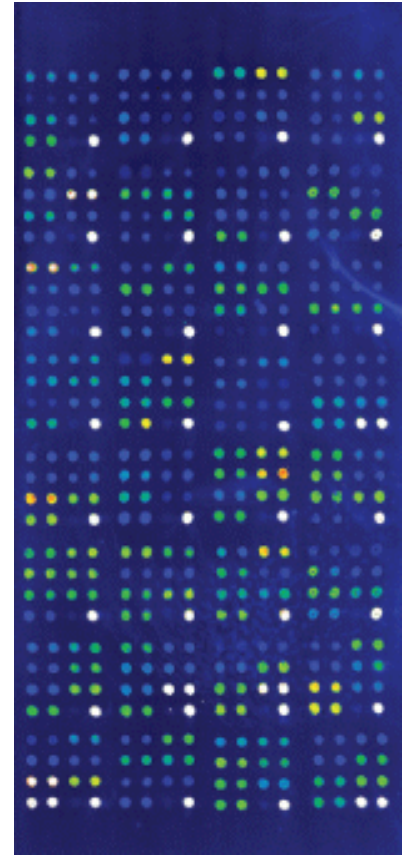


Využití

- Komerčně dostupné pro *in vitro* diagnostiku
 - FDA cleared / IVDMA (In Vitro Diagnostic Multivariate Index Assays)
 - MammaPrint®
 - Stanovení rizika metastázování po chirurgickém odstranění nádoru prsu u pacientek v časných stádiích
 - Nízké riziko – hormonální terapie X vysoké riziko – agresivnější léčba (chemoterapie)
 - 70 genů
 - Tissue of Origin Test
 - Identifikace původu nádorů – metastáze, nediferencované nebo málo diferencované nádory
 - > 2000 genů
- Řada dalších bez certifikace pro IVD (ColoPrint....)

PROTEINOVÉ ČIPY

- **Expresní**
 - Stanovení přítomnosti a koncentrace proteinů v komplexních vzorcích
 - Protilátkové čipy
 - Lyzátové čipy
 - Antigen čipy
- **Funkční**
 - Studium interakce proteinů s jinými molekulami
 - proteiny, peptidy, nízkomolekulární látky, oligosacharidy, DNA



Princip proteinových čipů



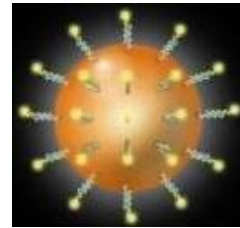
- Vazba protilátka-antigen - mikrospot ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
 - Systém využívající malé množství vázané protilátky a malého objemu vzorku je citlivější než systém se stonásobně větším objemem materiálu
 - Citlivost řádově ve femtomolech - 10^6 molekul/ml
 - Stanovení koncentrace analytu ve vzorku
 - Koncentraci přímo odpovídá množství vázaného analytu

(Ekins RP, J Pharm Biomed Anal. 1989)

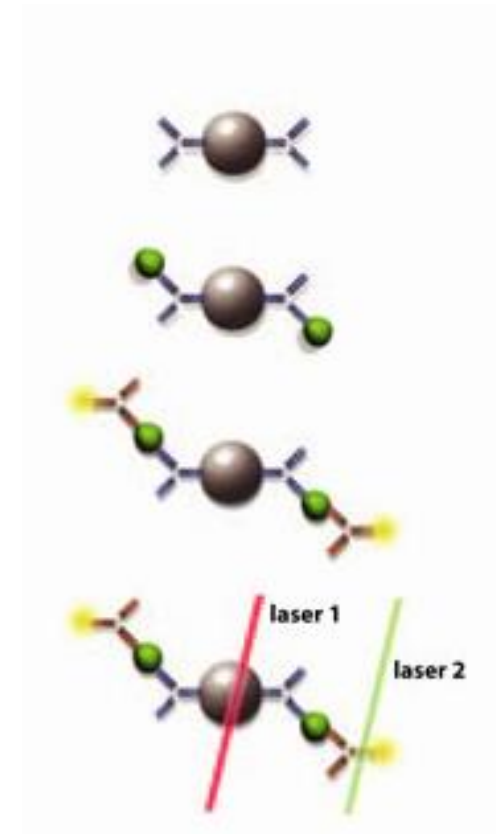
Princip proteinových čipů

- Stovky – tisíce proteinů imobilizovaných ve formě mikroskopů na pevném povrchu
 - Membrány (polystyrenové, PVDF - polyvinyliden fluorid, nitrocelulosevé)
 - Standardní mikroskopická sklíčka
 - S chemicky modifikovaným povrchem (poly-lysin, aldehydicke skupiny)
 - Potažená membránou
 - Kuličky
- Detekční metody
 - Nejčastěji fluorescence
 - Enzymaticky – značení alkalickou fosfatázou, křenovou peroxidázou
 - Chemiluminiscence
 - Radioaktivita
 - Zvýšení signálu – značení biotinem – vazba na značený streptavidin
 - Hmotnostní spektrometrie

Bead array - mikrosféry



- Průměr ~ 10 μm (velikost lymfocytu)
- Polystyrenové nebo latexové kuličky
- „Kódovány“ rozdílnými barvami nebo velikostmi
- Detekce - např. flow cytometricky
 - Rozpoznávání rozdílně kódovaných mikrosfér
 - Identifikace a kvantifikace proteinů ve vzorku
- Množství stanovovaných proteinů je limitováno počtem druhů mikrosfér (~1000)
 - Značení Quantum dots - teoreticky až 40 000
- Možnost automatizace
- Luminex xMAP™ - otevřený systém



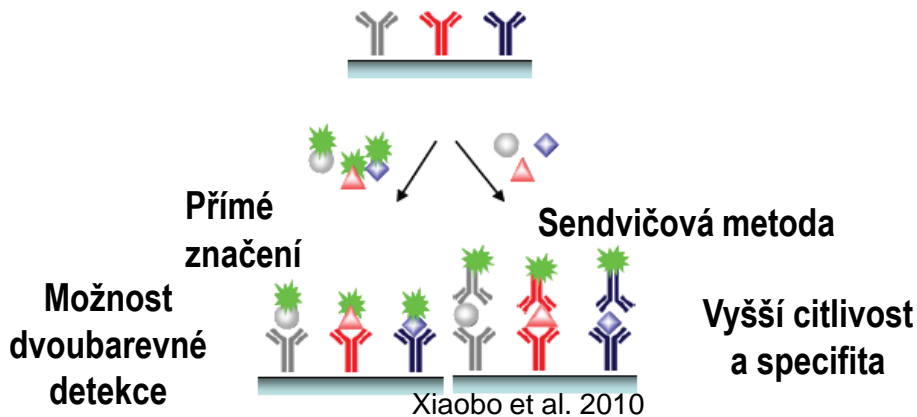
www.lucerna.chem.ch



Čipy pro stanovení antigenů

Protilátkové čipy

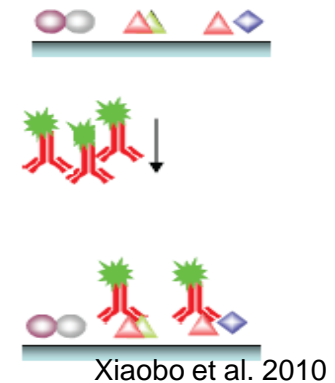
- Příímý formát (FPA- forward phase arrays)
- Na povrchu spotované protilátky
- Inkubace se vzorkem



- Detekce stovek antigenů ve vzorku
- Expresní profilování – „large-scale“ monitorování proteinové exprese
- Cílené na určité buněčné procesy (buněčný cyklus, cytokiny...)

Lyzátové čipy

- Zpětný formát (RPA – reverse phase arrays)
- Na povrchu spotované vzorky (proteinové, tkáňové lyzáty, sérum)
- Inkubace se specifickými značenými protilátkami

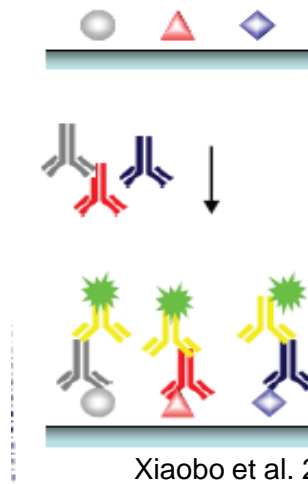


- Srovnání exprese až desítek antigenů u stovek různých vzorků
- Nevýhoda – malá hustota studovaných molekul ve spotu
– pre-frafrakcionace pomocí 2D kapalinové chromatografie

Čipy pro stanovení protilátek

Antigen čipy

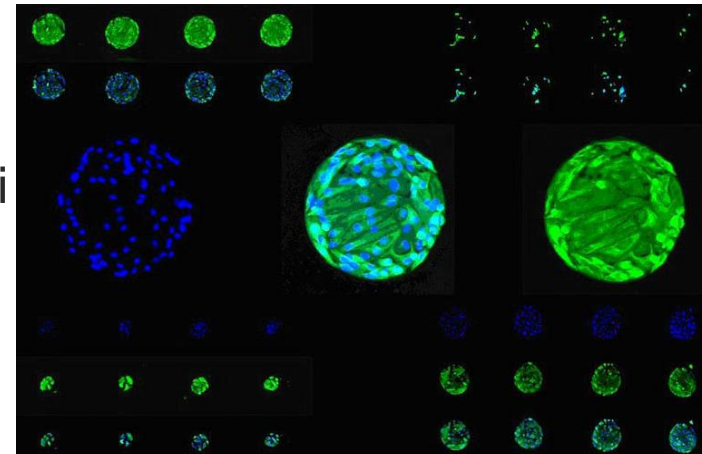
- Na povrchu spotované známé antigeny
 - Syntetické proteiny, peptidy
- Inkubace se sérem obsahujícím studované protilátky
- Detekce přítomnosti protilátek ve vzorku, nejčastěji v séru



Xiaobo et al. 2010

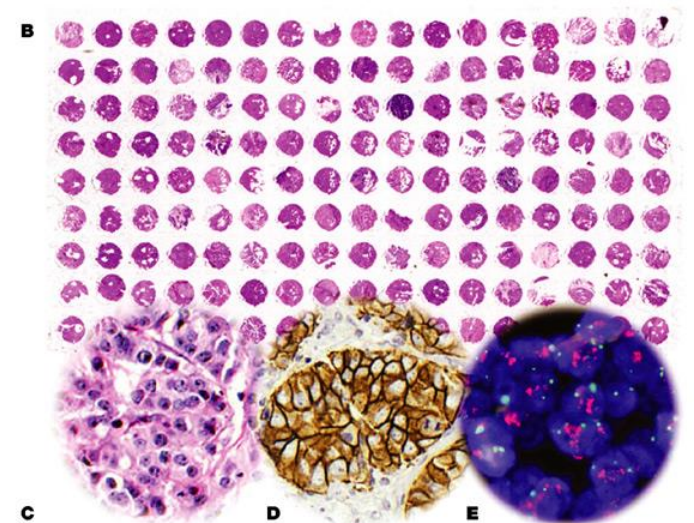
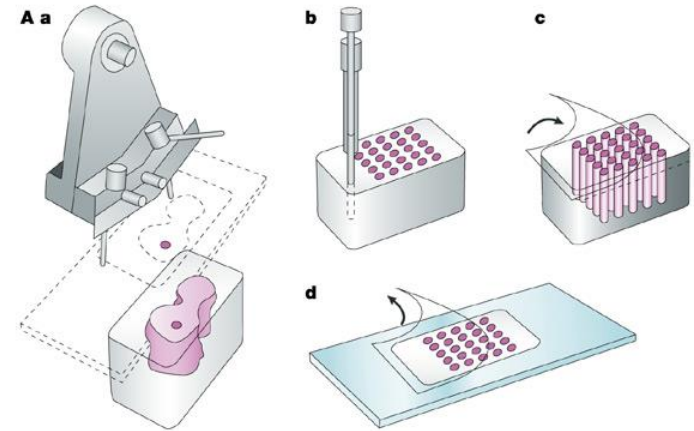
Buněčné čipy

- **Přímý formát**
 - Spotované protilátky
 - Inkubace s buněčnou suspenzí
- „Transfekční čipy“ - buňky rostou na povrchu čipu s naspotovanou cDNA
 - Během růstu přijmou cDNA
 - Čip se spoty buněk exprimujících různé cizorodé proteiny
- **Detekce**
 - Přímou mikroskopicky na sklíčku
 - Další charakterizace značenými protilátkami



Tkáňové čipy

- Varianta RPA čipů (zpětný formát)
- Spotují se celé vzorky tkáně např. bioptických
- Inkubace se značenými protilátkami
- Velikost spotu 0,6 - 2mm



Funkční čipy

- Studium interakce s jinými molekulami
 - Inkubace s jinými proteiny, DNA, malými molekulami (oligosacharidy, terapeutika, ...)
- Studium posttranslačních modifikací
- Studium enzymatické aktivity
- Studium kofaktorů a inhibitorů
- Studium interakcí ligand-receptor



protein - DNA



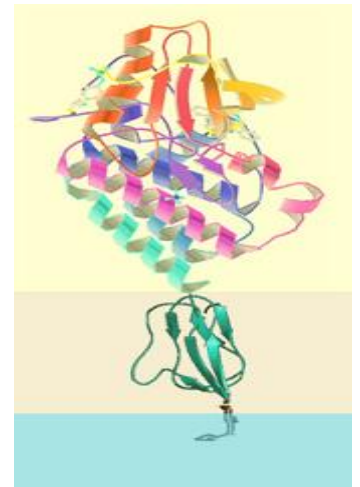
protein - protein



enzym - substrát

Spotovány nativní proteiny

- Potřeba zachování struktury a biologické aktivity
 - Nespecifická vazba přímo na povrch
 - Adsorpce
 - Kovalentní vazba přirozených chemických skupin proteinu na upravený povrch
 - Aktivní část proteinu může být schovaná, problém zachování konformace
 - Chemoselektivní vazba – připojení chemické skupiny na definovanou pozici proteinu → specifická reakce s komplementární chemickou skupinou na povrchu sklíčka
 - Orientovaná pozice na sklíčku
 - Imobilizace přes specifický rekombinantní tag
 - Zachování orientace, konformace, funguje jako „spacer“



Další typy funkčních čipů

- Doménové čipy
 - Spotovány pouze jednotlivé domény proteinu
 - Pochopení protein-proteinových interakcí
- Peptidové čipy
 - Inkubace s proteiny, DNA, malými molekulami (oligosacharidy, terapeutika, ...)
- Čipy s chemickými knihovnami
 - Inkubace s proteiny (enzymy, receptory...)
 - Studium inhibitorů, studium ligand-receptorových interakcí- vyhledávání terapeutik

Typ čipu		Molekuly imobilizované na čipu	Stanovované molekuly	Inkubace	Počet spotů	Použití
expresní	protilátkové (přímý formát)	známé protilátky	antigeny	neznámý vzorek - proteinový lyzát	> 1000	proteinové profilování
	lyzátové (zpětný formát)	neznámý vzorek - proteinový lyzát	antigeny	známé protilátky	>1000	proteinové profilování
	antigen čipy	známé antigeny	protilátky	neznámý vzorek – protilátky v séru	>1000	stanovení přítomnosti protilátek v séru
funkční	protein-protein	známé proteiny v nativním, funkčním stavu nebo peptidy,		partnerské molekuly interagující s proteiny	>100	studium interakcí proteinů s partnerskými molekulami
	protein-DNA, RNA					
	protein-nízkomolekulární látky	nebo		nebo		
	Enzym-substrát	chemické látky		proteiny		

Využití

- Studium biomarkerů
- Identifikace terapeutických cílů
- Detekce autoantilát, studium imunitní odpovědi, analýza alergenů

Využití

- *In vitro* diagnostika – více než u ostatních typů čipů
 - Nejčastěji diagnostika autoimunitních onemocnění, alergií
 - Diagnostika infekčních onemocnění
 - Profilování biomarkerů
 - Sepse a záněty
 - Neurodegenerativní onemocnění
 - Nádorová onemocnění

Company	Application	Product
Arrayit	Infection	Pathogen antigen microarrays
Aushon	Multiplex cytokine profiling	Ciraplex
R&D system	Acute phase protein profiling	Proteome Profiler Human Cytokine Array Kit
Radox	Adhesion molecule detection	Adhesion Molecule Array
	Cardiac risk prediction	Cardiac Array
	Nervous system disfaunction	Cerebral Array
	Multiplex cytokine profiling	Cytokine Array
	Endocrinology testing	Endocrine Array
	Fertility homones evaluation	Fertility Array
	Metabolic syndrome and associated disorders	Metabolic Array
	Cancer screening and monitoring	Tumor marker Arrays
	Tyroid function testing	Thyroid Array
RayBiotech	Obesity array	Quantibody®
	Angiogenesis	Quantibody®
	Periodontal disease	Quantibody®
	Ophthalmic array	Quantibody®
	Inflammation	Quantibody®
Quansys	Inflammation/acute phase protein profiling	Human chemokine/ cytokine
	Fertility homones evaluation	Human female hormone
Phadia	Allergy	ImmunoCAP® ISAC

Děkuji za pozornost

Příště:

Sekvenování nové generace - Next Generation Sequencing



Dotazy?