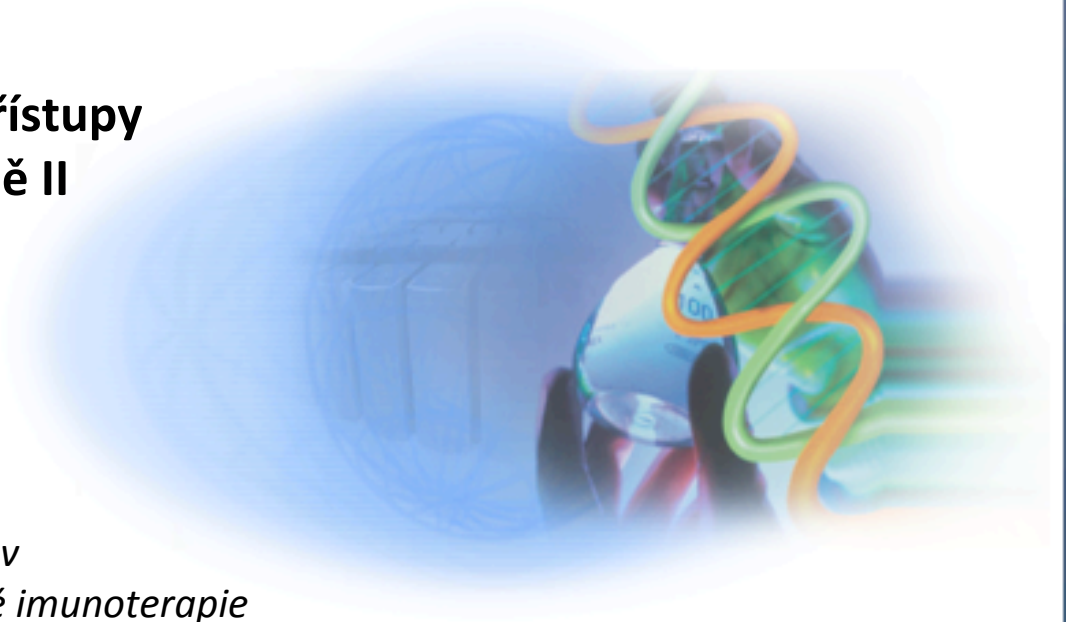
C7188 Úvod do molekulární medicíny 4/12

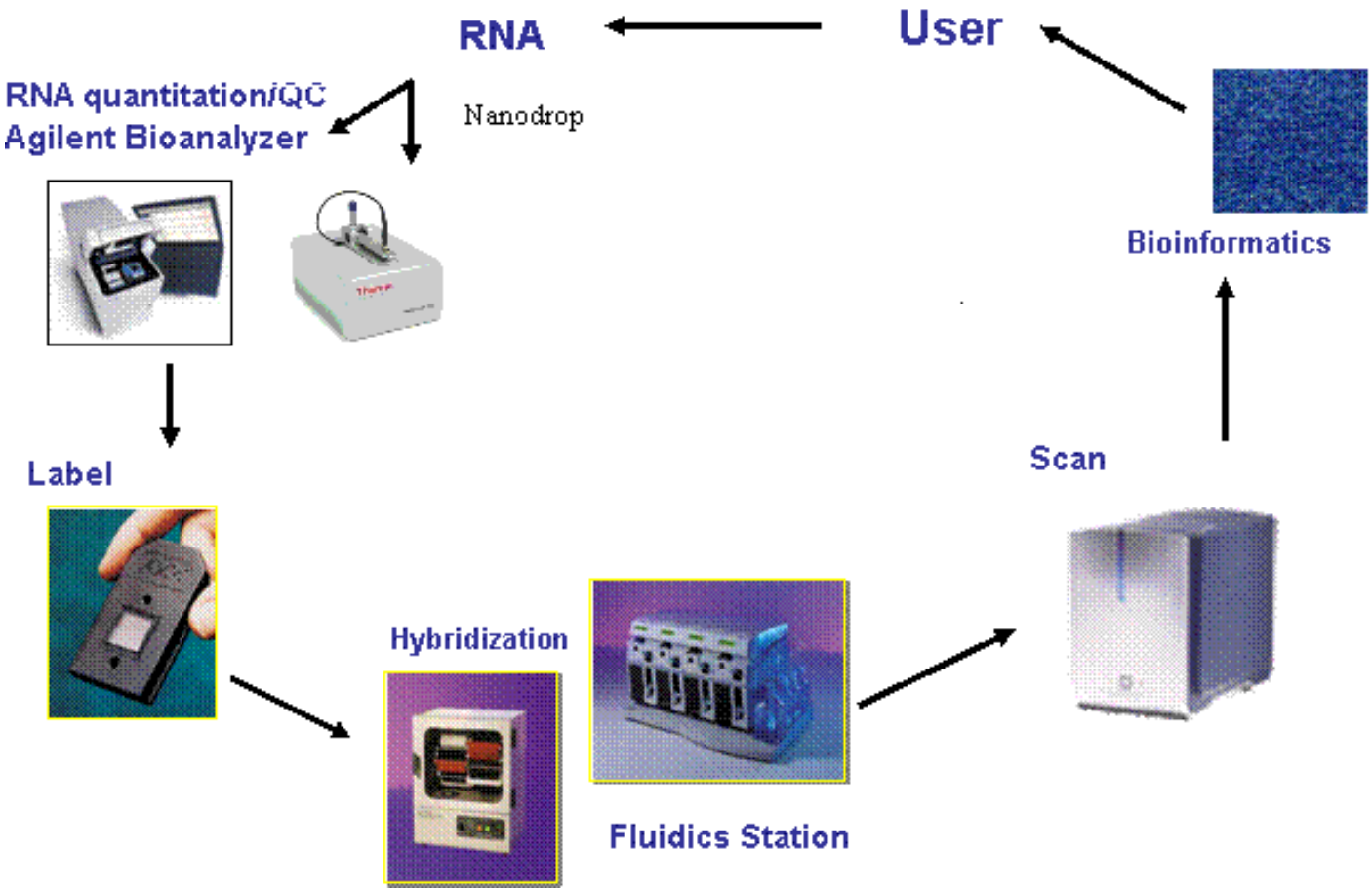
Moderní metodické přístupy v molekulární medicíně II

GENOMIKA II



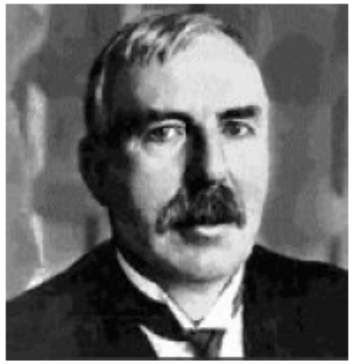
Ondřej Slabý, Ph.D.
Masarykův onkologický ústav
Univerzitní centrum buněčné imunoterapie
Lékařská fakulta Masarykovy univerzity

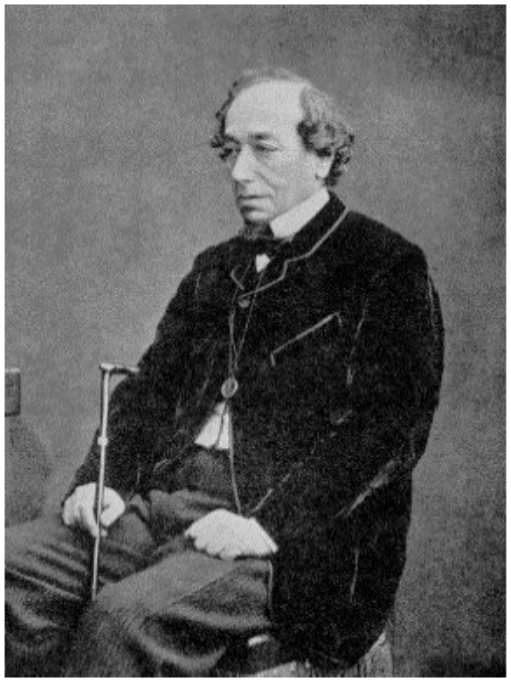
Microarray sample processing workflow



“If your experiment needs statistics, you should have done a better experiment.”

Ernest Rutherford



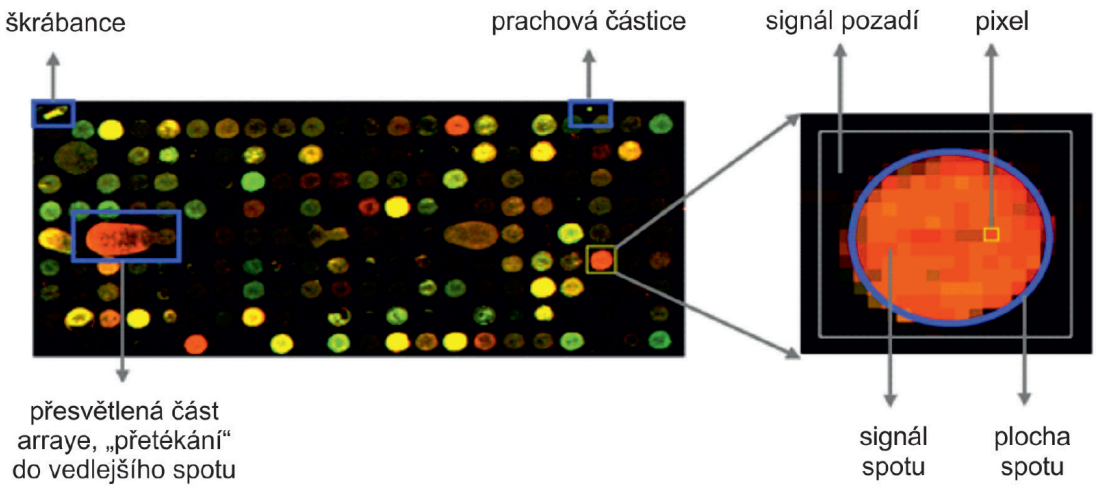


“There are three types of lies: lies, damn lies, and statistics!”

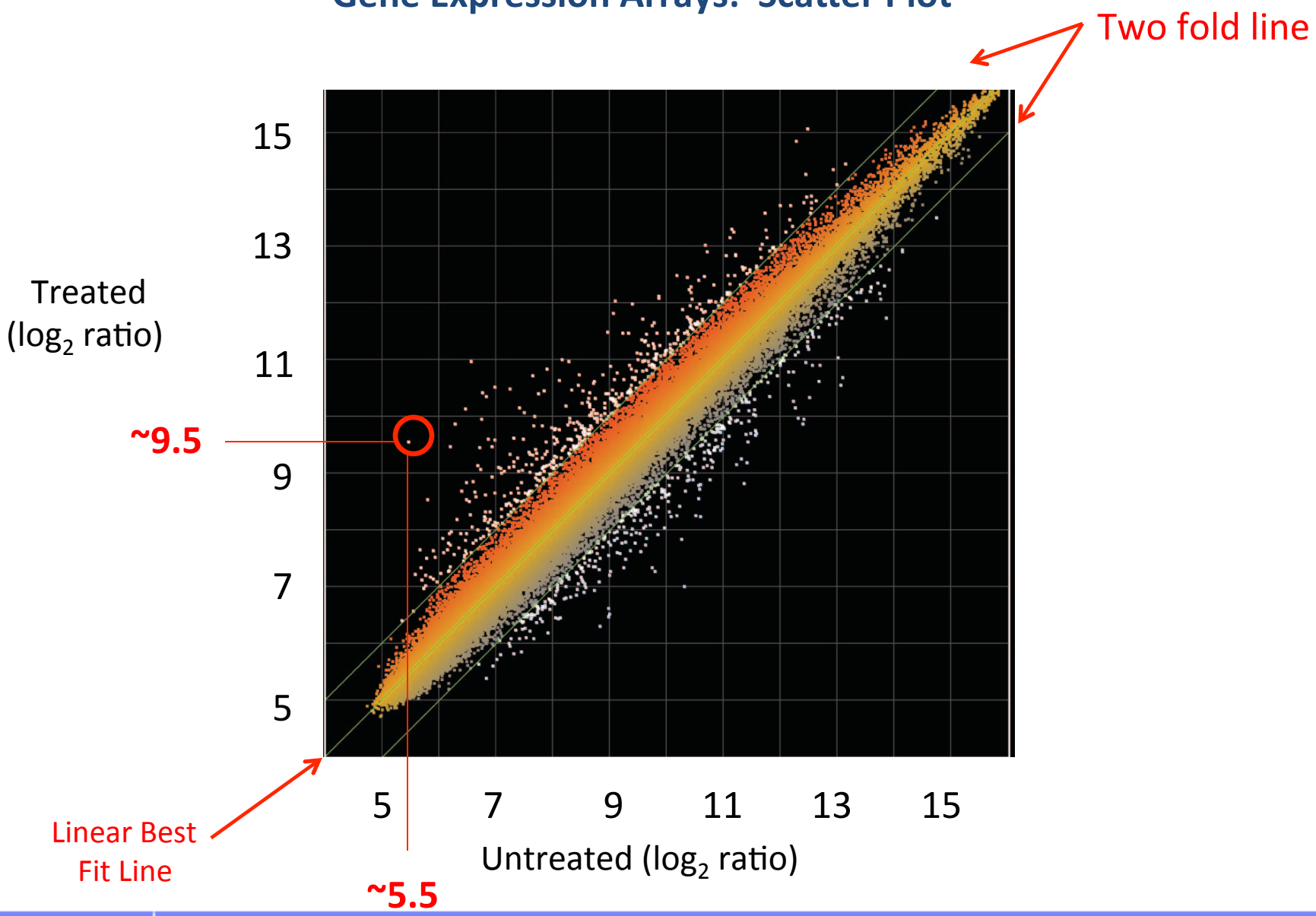
Benjamin Disraeli

Analýza obrazu

Odečtení pozadí od „foreground“
– background substraction
(griding,local background, median, empty spot,…)
SNR – „signal-to-noise ratio“, odstup intenzity popředí od šumu pozadí
-převod obrazové informace na numerická data

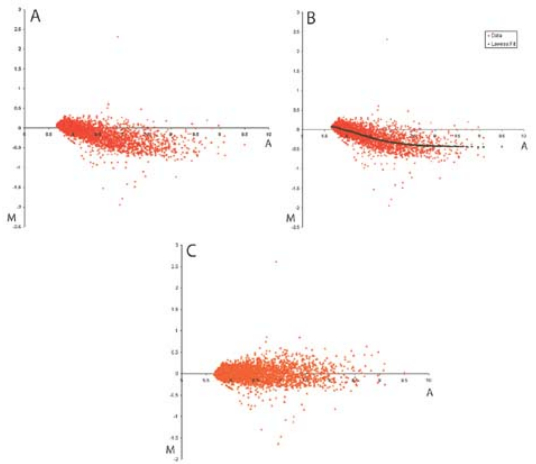


Gene Expression Arrays: Scatter Plot



Normalizace dat

ukázky normalizačních metod



Základem většiny normalizačních metod je předpoklad, že počet genů se změněnou mírou exprese je výrazně nižší než těch, jejichž exprese se nemění.

-minimalizace vlivu „nebiologických“ zdrojů variability

-kompenzace nelinearity dat mezi jednotlivými čipy a uvnitř daného čipu

Pozitivní kontroly:

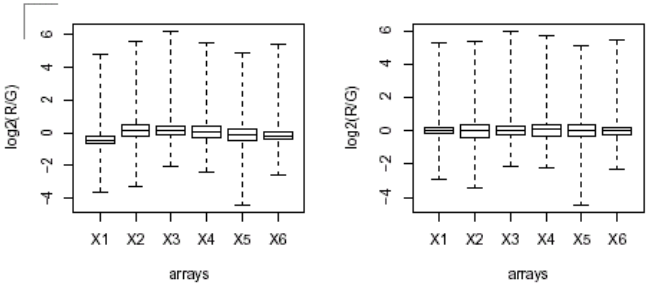
Referenční geny s „konstantní“ expresí ve tkáních
kontrolní genetický materiál (referenční vzorek)
kontroly účinnosti hybridizace – artreficiální sekvence

Negativní kontrola:

-pozadí hybridizace

-Affymetrix - mutace v jednom nukleotidu sondy

Mean, median normalization



Subtract common mean or median:

old values: $y_{gi} = \log_2(R_{gi}/G_{gi})$ on array i

new values: $y_{gi}^{(n)} = y_{gi} - \text{mean}_i$

Normalizace dat Cy3 a Cy5

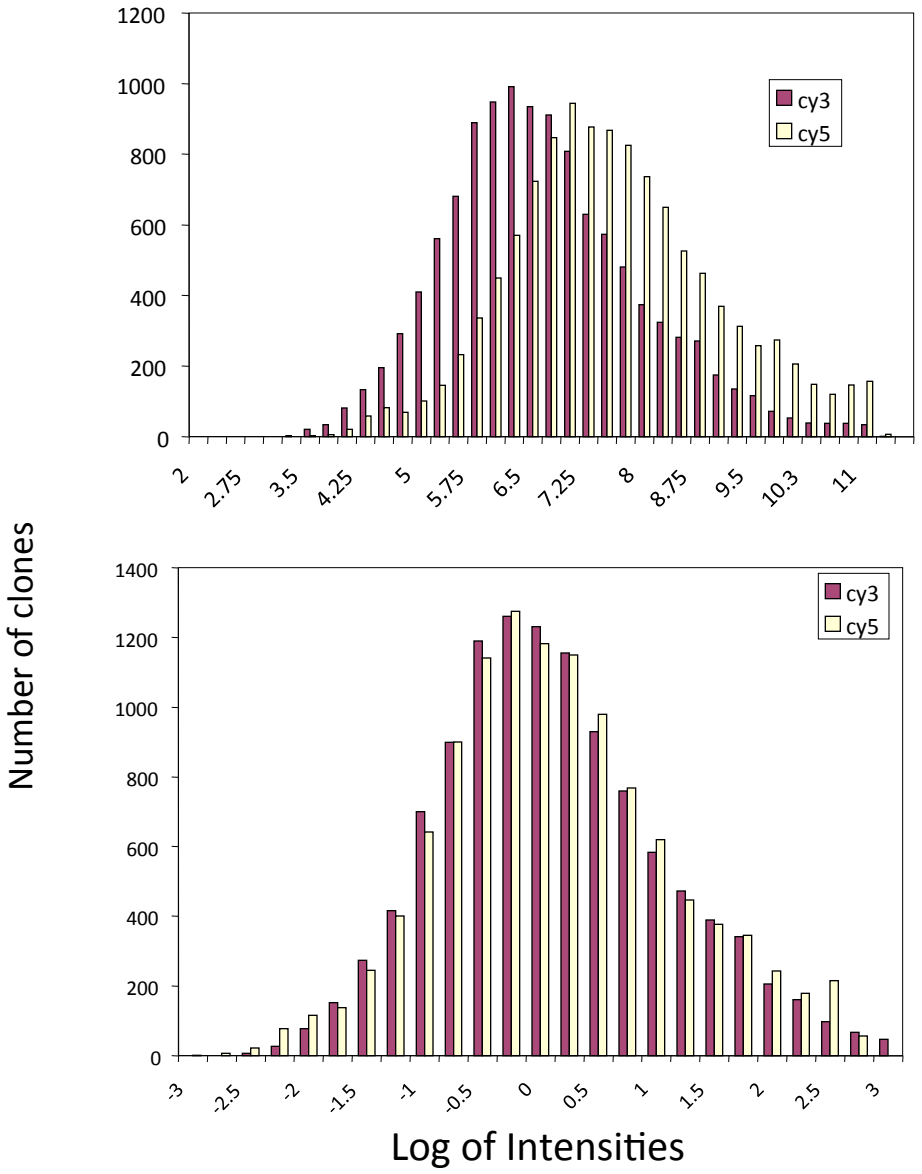
vybalancování rozdílného signálu ze značení Cy3 a Cy5

Jeho nerovnoměrnost může být způsobena:

-rozdílnou inkorporací barviva do NK

-rozdílným množstvím mRNA

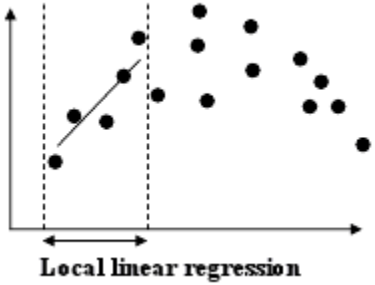
-odlišnými parametry při skenování

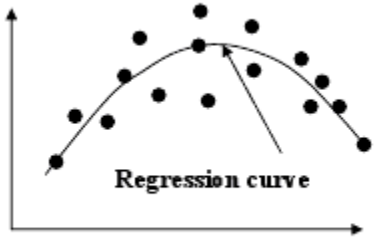


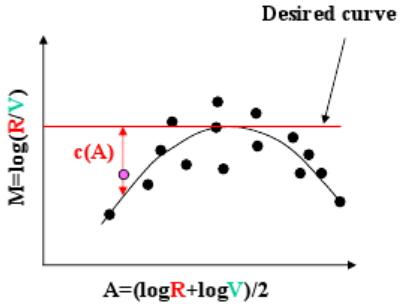
Normalizace Lowess: princip

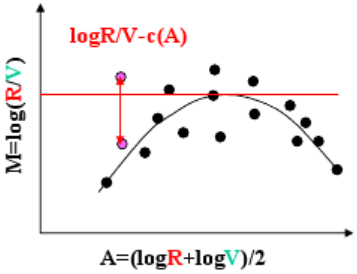
Loess (or lowess) : Locally WEighted Scatterplot Smoothing (vyhlazování)
Normalizace závislá na intezitě signálu
Místní lineární regrese

- $\log(R/V) \rightarrow \log(R/V) - c(A)$

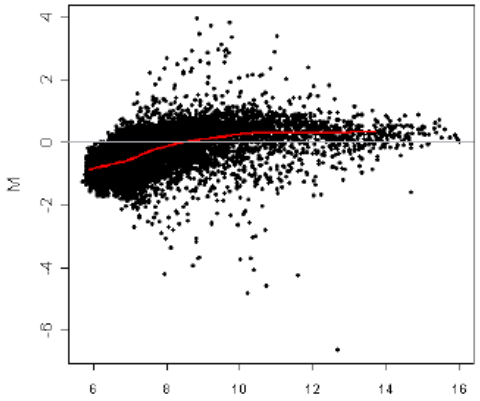




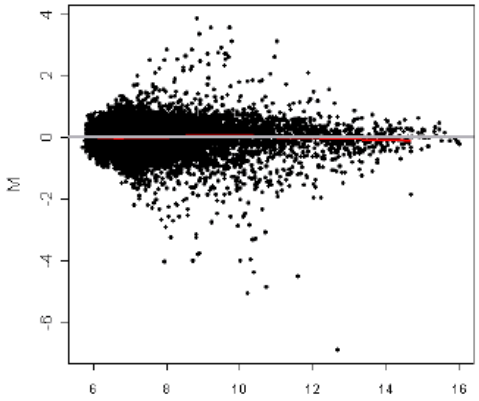




Before normalization



After normalization

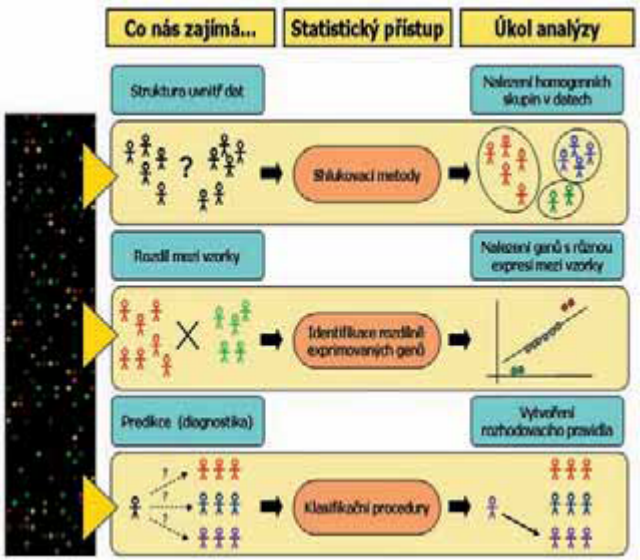


Statistická analýza dat

Základní dělení metod je na „unsupervised“ (využívají jako vstup pouze naměřené hodnoty bez informací o vzorcích, klastrovací metody) a „supervised“ (využívají i další známé informace o vzorcích, identifikace biologicky významných genů, klasifikační metody)

Další skupina metod propojuje informaci o genové expresi s dostupnými informacemi o biologické funkci genů (analýzy signálních drah, informace z databáze GO „gene ontology“, a další)

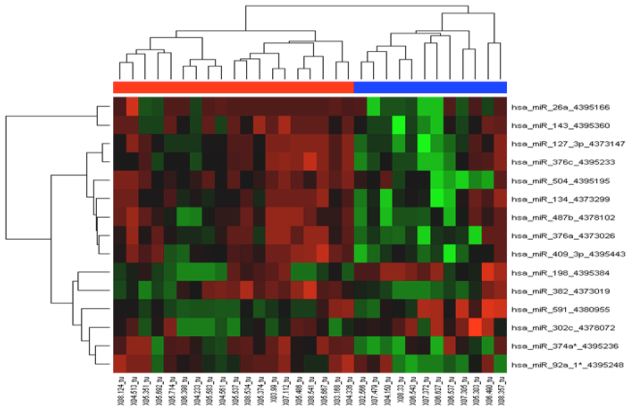
1) Identifikace biologicky významných genů



-geny s reprodukovatelnou signifikantně rozdílnou expresí mezi jednotlivými podmínkami experimentu
-poměr exprese v jednotlivých experimentech (fold change)
-t-test (test rozdílnosti průměrů exprese v jednotlivých skupinách)
-neparametrické testy (Mann-Whitney, Wilcoxon test)
-Significance Analysis of Microarrays (SAM)
-Multifaktoriální ANOVA (nejsignifikantnější geny pro dané skupiny)

Hranice významnosti (1% = 1 ze 100, u čipu je to 200 falešně pozitivních z 20000, Bonferoniho korekce)

2) Ukázky multidemenzionálních metod analýzy čipových dat
Shlukovací analýzy



Shlukova analýza je jednou z nejpoužívanějších vícerozměrných statistických metod

Jedna se o explorativni techniku, ktera se používá zejmena v případech, kdy nemame žadne *a priori znalosti* o struktuře uvnitř dat.

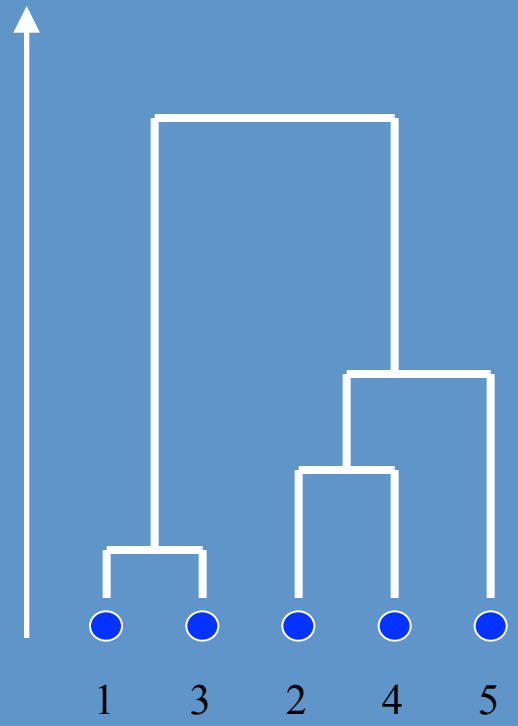
každý gen je reprezentován vektorem jehož souřadnice, jsou hodnoty exprese genu v jednotlivých experimentech (v jednotlivých vzorcích), vzdálenost je měřena mezi vektory.

Ukolem shlukovacích metod je tedy najit v datech skupiny prvků (shluky) tak, že prvky jednotlivých skupin budou v jistem smyslu více podobné než prvky z jiných skupin, tzn. nalezené skupiny prvků budou co nejvíce homogenní
Snažíme se nalézt mezi zkoumanými geny (resp. biologickými vzorky) skupinky genů (resp. biologických vzorků), ktere vykazují za specifických podminek nebo u daného fenotypu, podobné chování.

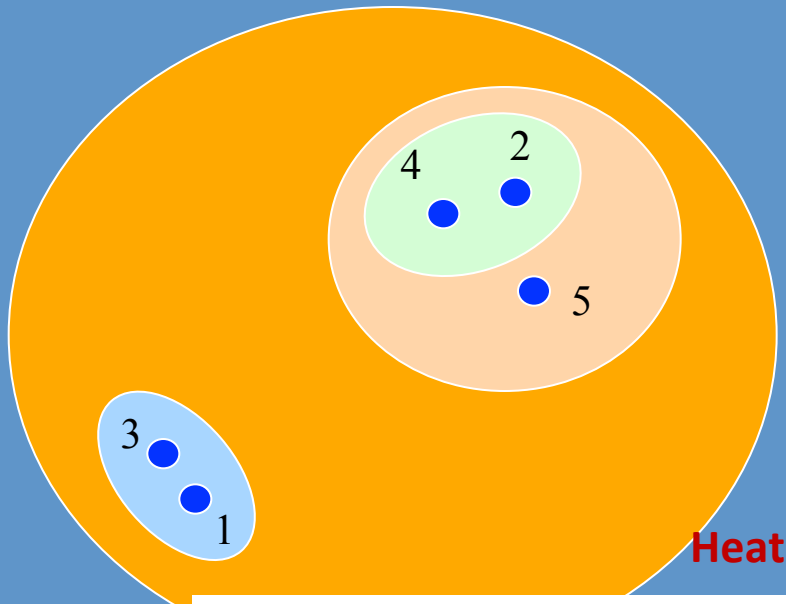
Hierarchické klastrování

-kalkulace vzdálenosti mezi všemi geny a nalezení nejmenší. K ní se seskupí všechny jí podobné a vytvoří se klastr.
-po vytvoření X počtu clusterů se hledají vzdálenosti mezi klastry (hierarchical clustering)
-počet klastrů není omezen

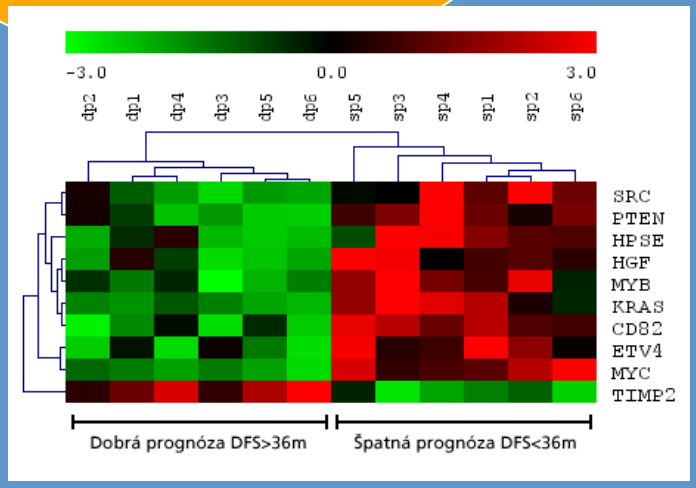
Vzdálenost mezi jednotlivými klastry



Dendrogram

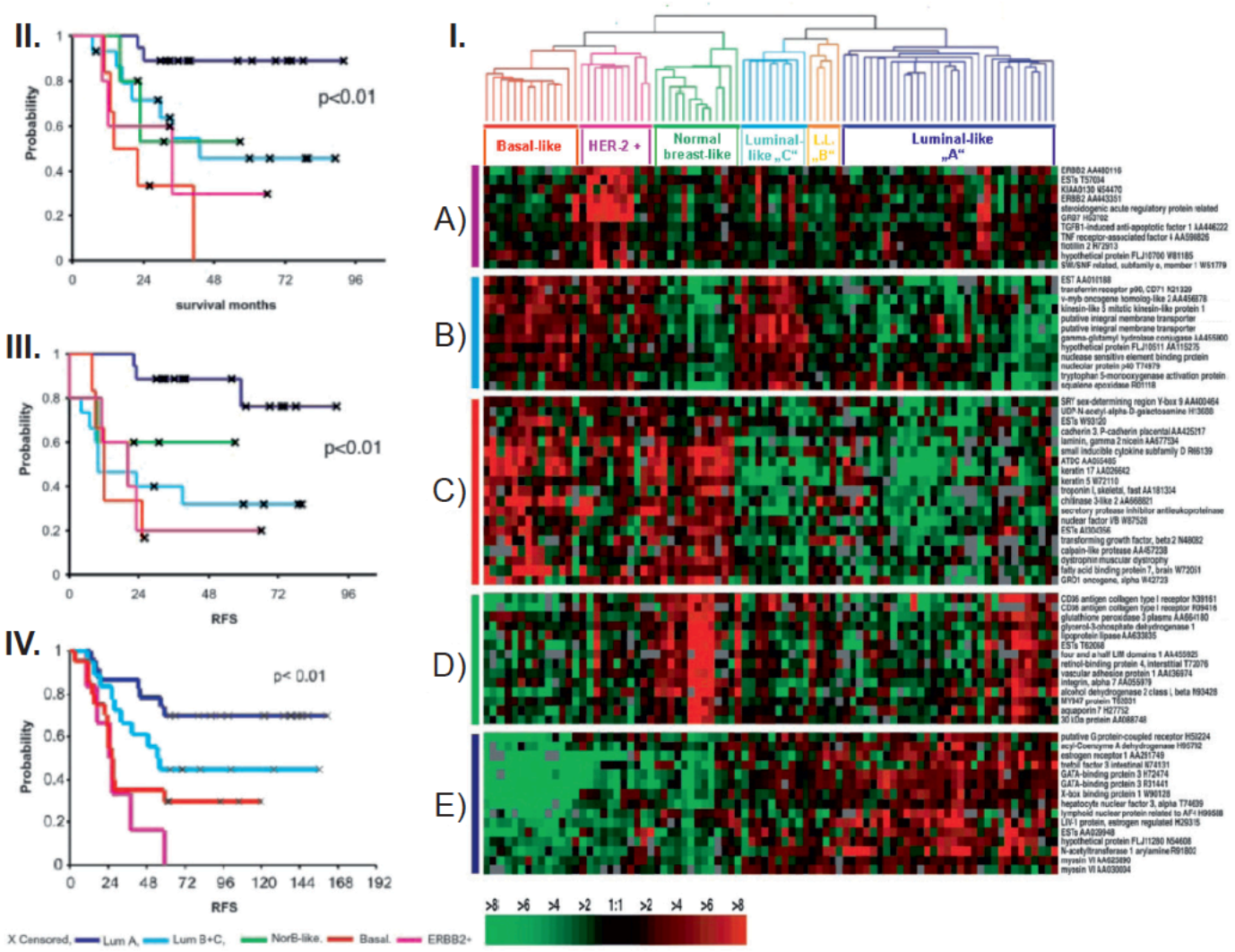


Heat map



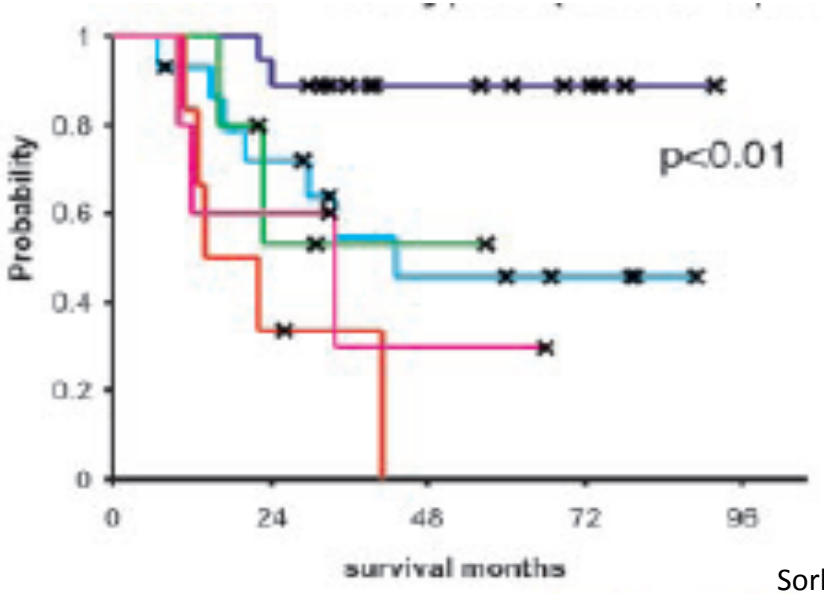
Podobnost je vyjádřena hierarchickým stromem – dendrogram s teplotní mapou „heat-map“

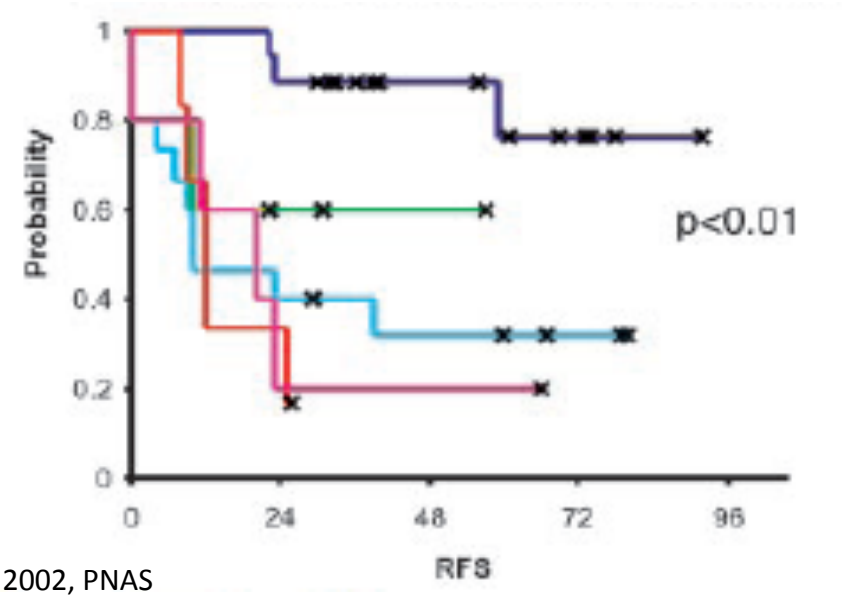
Klastrová analýza u karcinomu prsu



NAS

Basal-like	ERBB2+	Normal Breast-like	Luminal Subtype C	Luminal Subtype B	Luminal Subtype A
ER	-/+	-/+	-/+	+/++	++	+++
HER2	-	+++	- / +	- / +	-	- / +
p53mut	82%	71%	33%	80%	40%	13%
CK 5/6, 17	+++	+/-	+++	-	-	-
CK 8/18	-	-	+	+/++	+/++	+++
c-myb / ost.	+++	+++	-/+	+++	-	-





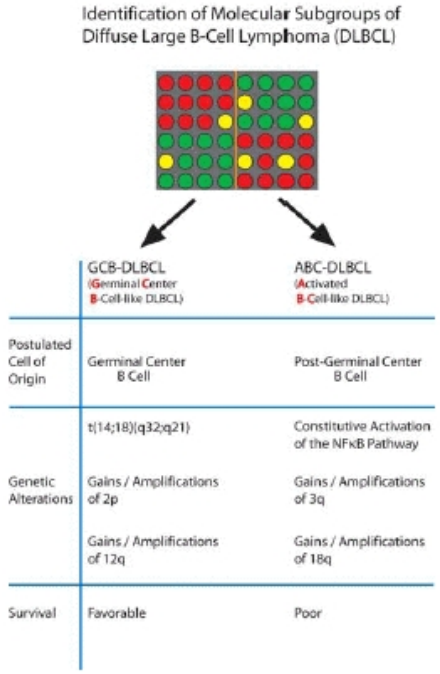
Sorlie et al, 2002, PNAS

Lum A Lum B+C NorB-like Basal ERBB2+

3) Klasifikační metody

Jejich podstatou je znalost informace o charakteru vzorku tzn. supervised přístup. Principem klasifikačních metod v analýze dat z DNA čipů je vytvoření rozhodovacího pravidla, ktere by na zakladě naměřených hodnot genové exprese umožňovalo přiřazení pacienta do jedne z předem definovaných tříd (například zdravý, nemocný). Z toho je zřejmé, že by se „dobré“ rozhodovací pravidlo založené na expresních datech mohlo zařadit po bok stavajících diagnostických metod a výrazně tak přispět ke zpřesnění diagnostiky závažných onemocnění (klasifikační stromy, Support Vector Machines (SVM), metoda k-nejbližších sousedů,..)

MOLEKULÁRNÍ KLASIFIKACE NÁDORŮ:
precizní klasifikace je základem léčebného úspěchu, současné metody jsou založeny na morfologii, imunohistochemii, genetice a klinické odpovědi
řada diagnostických nejasností (heterogenita)
ČIPY:
-identifikace nových jednotek na podkladě profilu genové exprese
-reklasifikace stávajících jednotek
-identifikace skupin či jednotlivých genů „markerů“ specifických pro dané jednotky



A)

Tab. 4.3.1. GO kategorie genů s významně odlišnou expresí mezi skupinou vysoce rizikových pacientek a skupinou pacientek s nízkým rizikem.
B) GO kategorie genů s významně odlišnou expresí mezi skupinou vysoce rizikových pacientek a skupinou pacientek s nízkým rizikem: 20 (z 83) nejsignifikantnějších kategorií z 1 381 genů v TGCA datasetu. Tučně jsou opět vyznačeny společné kategorie v japonském datasetu A a TCGA datasetu. Q-hodnota odpovídá Fischerovu exaktnímu testu s Benjaminiho-Yekuteliho korekcí na mnohonásobná porovnání.

GO kategorie	Geny v GO kategorii		-Log10 Q
	N	%	
immune system process (GO:0002376)	129	20,5	20,9
immune response (GO:0006955)	115	18,3	20,8
defense response (GO:0006952, 0002217, 0042829)	78	12,4	10,3
antigen processing and presentation (GO:0019882, 0030333)	25	4	8,4
inflammatory response (GO:0006954)	50	7,9	8,2
antigen processing and presentation of peptide antigen (GO:0048002)	13	2,1	6,9
antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen (GO:0002478)	6	1	5,2
MHC class I peptide loading complex (GO:0042824)	9	1,4	5,2
MHC protein complex (GO:0042611)	18	2,9	5,2
TAP complex (GO:00042825)	8	1,3	5,2
MHC protein binding (GO:0042287)	12	1,9	5,2
antigen processing and presentation of exogenous antigen (GO:0019884)	7	1,1	5
response to stimulus (GO:0050896, 0051869)	183	29	4,4
antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I (GO:0002474)	7	1,1	3,9
antigen processing and presentation of peptide or polysaccharide antigen via MHC class II (GO:0002504)	12	1,9	3,9
regulation of immune response (GO:0050776)	6	1	3,8
MHC class I protein binding (GO:0042288)	10	1,6	3,8
response to wounding (GO:0009611, 0002245)	50	7,9	3,8
positive regulation of immune response (GO:0050778)	6	1	3,8
positive regulation of immune system process (GO:0002684)	6	1	3,8

$-\log_{10}$(Q value)

Obr.
paci
nick
IPA (
data
barv
přežití (převzato z Yoshihara et al., 2012).

Predikce metastatického potenciálu u pacientek s časnými stádii mamárního karcinomu

Van't Veer et al. (Nature, 2002)

96 sporadických mamárních karcinomů

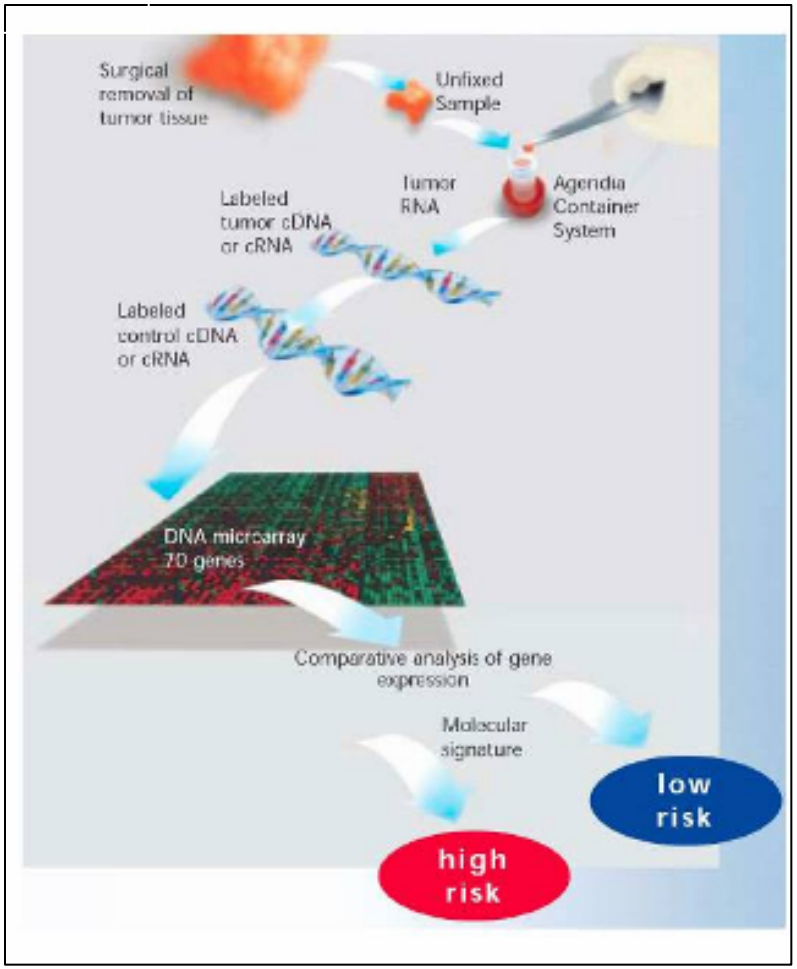
46 pacientek se špatnou prognózou (do 5 let se nevyvinuly vzdálené metastáze)

50 pacientek s dobrou prognózou (do 5 let se nevyvinuly vzdálené metastáze)

5852 genů se signifikantním rozdílem v expresi mezi skupinami

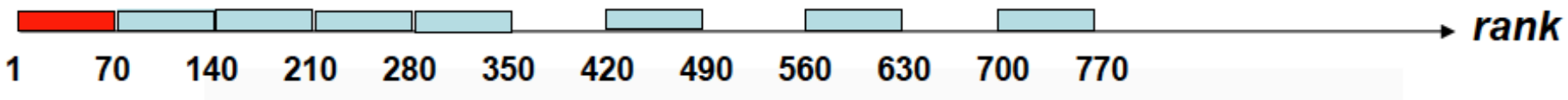
70 genů nejvíce korelujících s klinickým stavem použila pro klasifikaci

AGENDIA

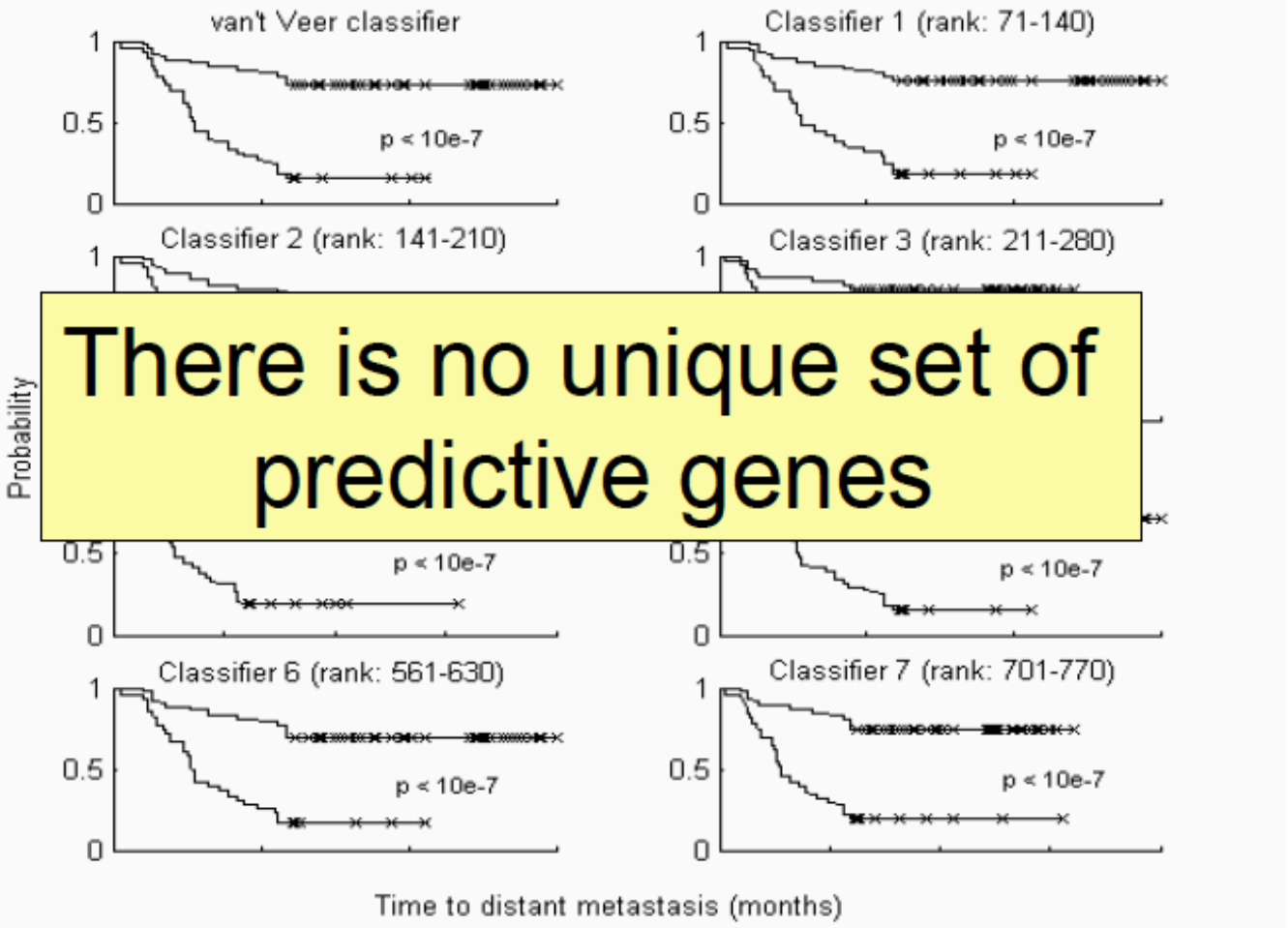


Sada 70 genů - patent

Many sets of 70 genes can be used to predict time to distance metastasis



Van't Veer



There is no unique set of predictive genes

Ein-Dor et al, Bioinformatics 2005

Results for Breast Cancer Data

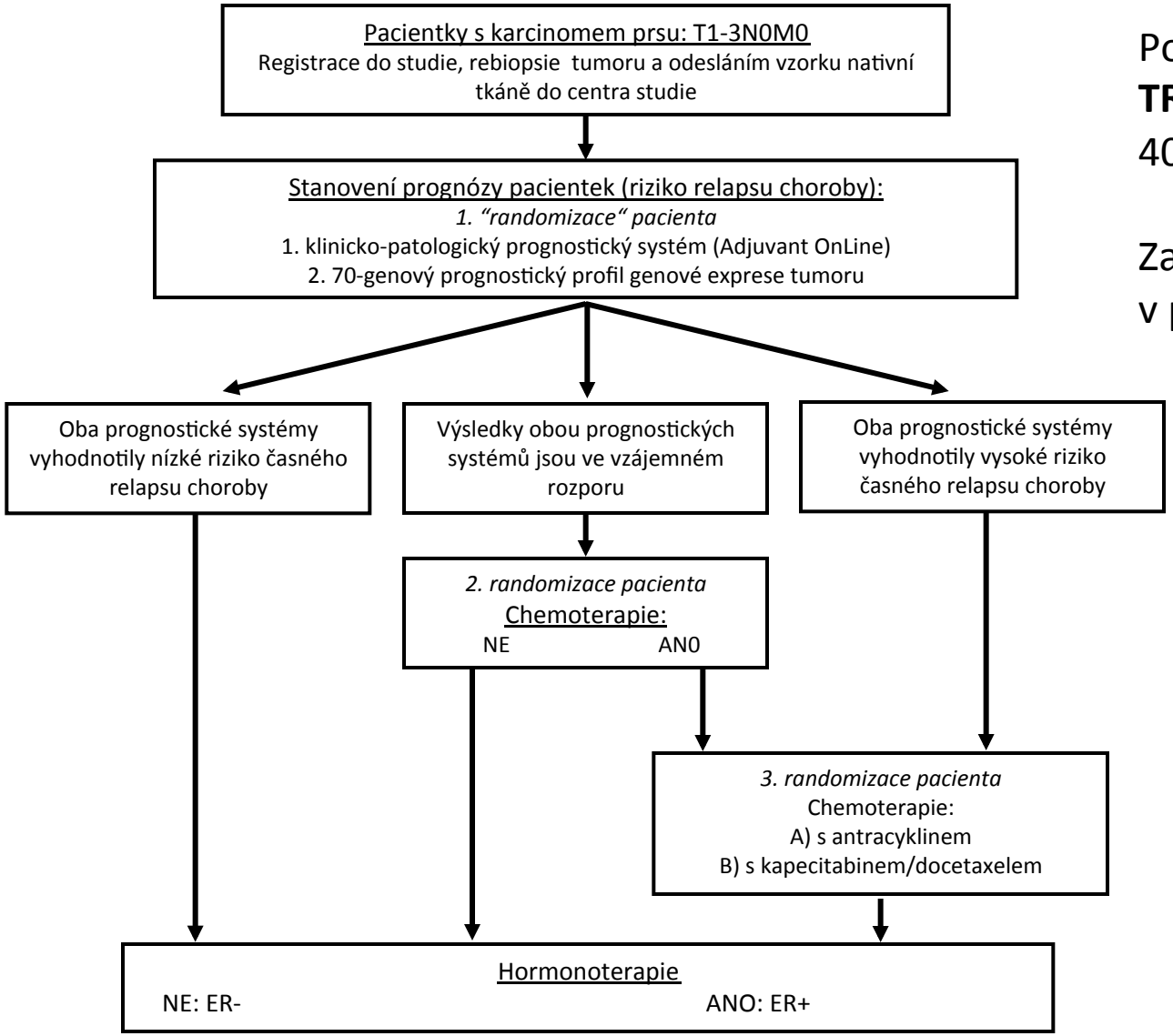
- For a typical overlap of 50% between two lists of 70 genes, more than 2300 patients are needed.

- The expected overlap between van't Veer's list and another list produced from similar experiment is less than 2%

Ein-Dor et al ***PNAS 2006***

PROTOKOL KLINICKÉ STUDIE „MINDACT“

(Microarray In Node negative Disease may Avoid ChemoTherapy)



Rozpočet ~ 20 mil. EUR

Pořádá síť
TRANSBIG
40 institucí 21 zemí

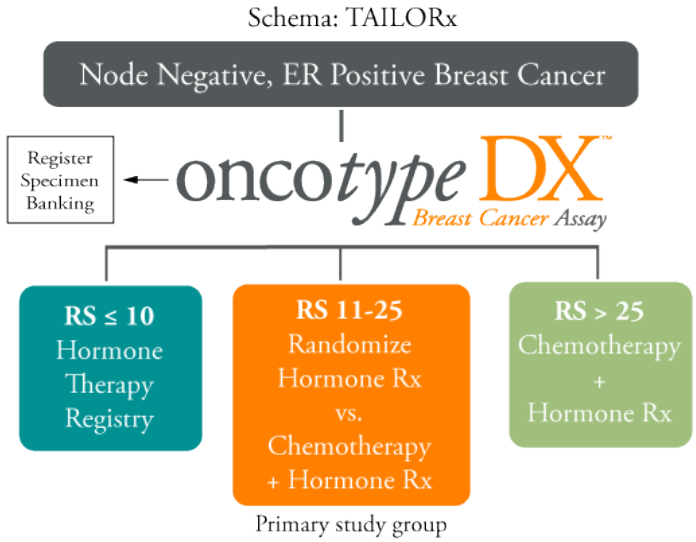
Zařazení 5000 pacientek
v prvních 3 letech

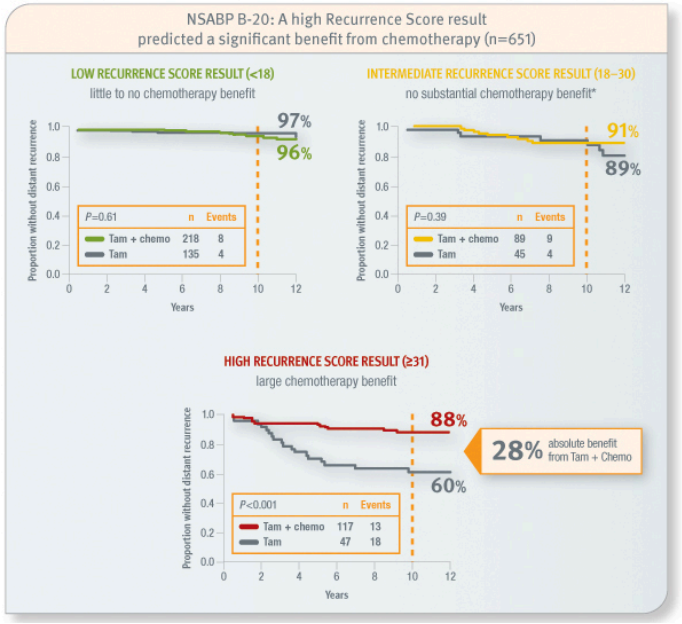
EORTC Protocol 10041 – BIG 3-04 - http://www.eortc.be/services/unit/mindact)

Roche AmpliChip CYP450

- Approved for clinical use in US and EU
- Gene variations of CYP2D6 and CYP2C19
  - Metabolism of ~25% of all prescription drugs
  - Determine phenotype:
    poor, intermediate, extensive, or ultrarapid metabolizer
- Intended to be an aid for physicians
  - Individualized treatment and dosage

www.roche.com
www.amplichip.us





Take home

Analýza čipových dat – pozadí, normalizace
Analýza čipových dat - identifikace biologicky významných genů
Analýza čipových dat -ukázky multidemenzionálních metod analýzy čipových dat - *Shlukovací analýzy*
Analýza čipových dat – klasifikační metody
Molekulární klasifikace nádorových onemocnění – ukázky
Aplikace čipových technologií do klinické praxe – studie MINDACT, Agendia, Roche AmpliChip CYP450
mikroRNA: nová úroveň regulace genové exprese – biogeneze a biologická funkce
mikroRNA v patogeneze nádorových onemocnění
mikroRNA jako biomarkery (SNP, tkáňové, sérové)
mikroRNA jako terapeutické cíle
mikroRNA čipy

Naplň příští přednášky

Moderní metodické přístupy v molekulární medicíně II – proteomika (dvojrozměrná elektroforéza, hmotnostní spektrometrie, proteinové čipy), využití proteomiky v diagnostice nádorových onemocnění
Molekulární epidemiologie – definice a vymezení oboru, identifikace molekulárních rizikových faktorů vzniku a rozvoje onemocnění, analýza vztahu molekulárních faktorů a vlivů prostředí na rozvoj nádorového onemocnění, význam molekulární epidemiologie u karcinomu plic a kolorektálního karcinomu

Dotazy?