

C7188 Úvod do molekulární medicíny 3/12



**Moderní metodické přístupy
v molekulární medicíně I**



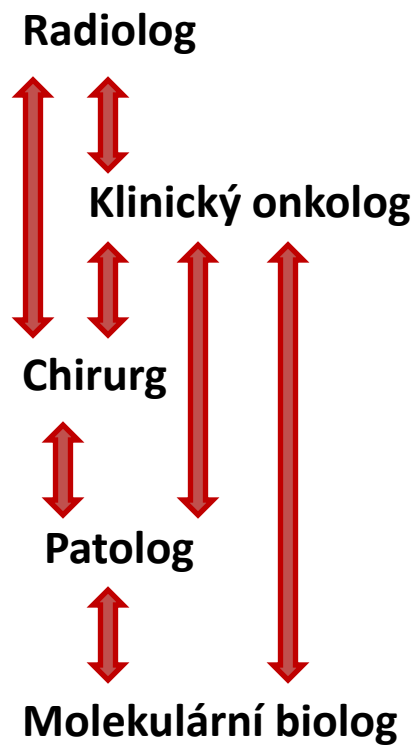
BIOLOGICKÝ MATERIÁL, GENOMIKA I



Ondřej Slabý & Jiří Šána
*Lékařská fakulta & CEITEC, Masarykova univerzita
Masarykův onkologický ústav
Fakultní nemocnice Brno*

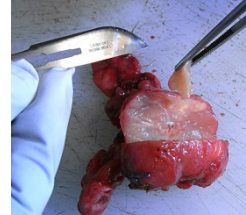


Interdisciplinární charakter biomedicínského výzkumu – příklad onkologického výzkumu



Biologický materiál užívaný pro účely molekulární medicíny

Tkáň (nativní vs. fixovaná – př. FFPE-formalin fixed paraffin-embedded tissue; chirurgický resekát, biopsie)



Plná krev (plazma + buňky)

Plazma (tekutina po odstranění krevních elementů, obsahuje faktory hemokoagulace)

Sérum (tekutina nad sraženinou, bez faktorů krevního srážení)

Moč

Kostní dřeň, bronchiální aspirát, ejakulát, bronchoalveolární laváž, kloubní tekutiny, mozkomíšní mok, sputum, stolice, výtěry...

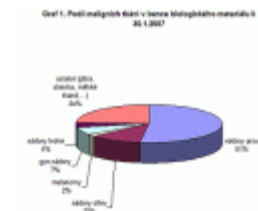


Banky biologického materiálu

archivace vzorků v parách kapalného dusíku při teplotě -160°C

K archivovanému vzorku nativní tkáň

uložen fixovaný parablok=morfologický korelát



Odběr klinického materiálu

Klíčový moment rozhodující a kvalitě celého výzkumu!!!!!!

Všechny odběry musí probíhat stejně, a celý proces musí být přísně kontrolován!



Doba transportu na patologii

Fixace vzorku



Kontrolovaná
archivace vzorku

DNA 4°C

RNA -70°C

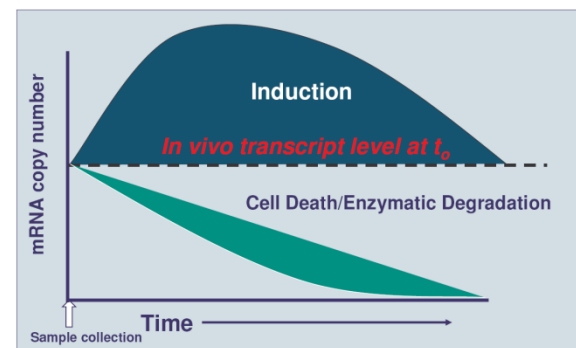


Zaznamenání času podvázání cév

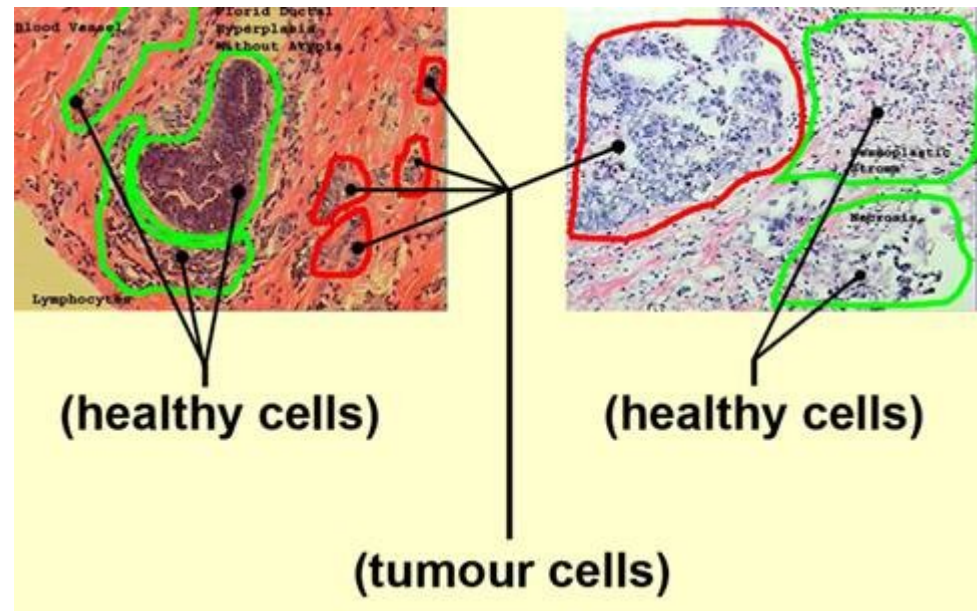
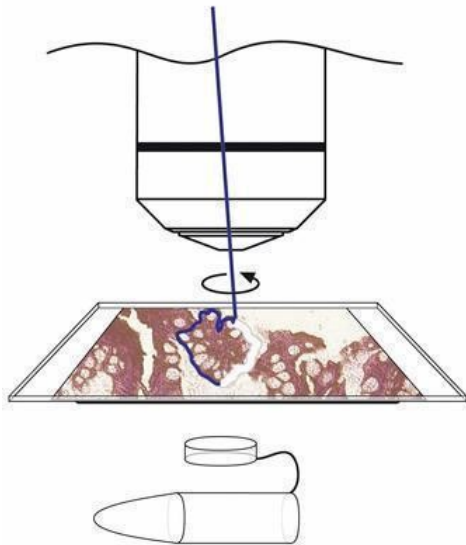
Tzv. ischemické zdržení

Vysoké nároky na stabilizaci především při práci s RNA

Nejčastěji používáme stabilizační činidlo RNAlater



Laserová mikrodisekce – nástroj k získání vybraných buněčných populací *laser capture microdissection (LCM)*



Izolace nukleových kyselin

Homogenizace tkáně (ultrazvuk, mechanicka, rotor-stator)

Lyze buněk (enzymaticky-proteináza K, chemicky-SDS, EDTA, fyzikálně-zahřívání...)

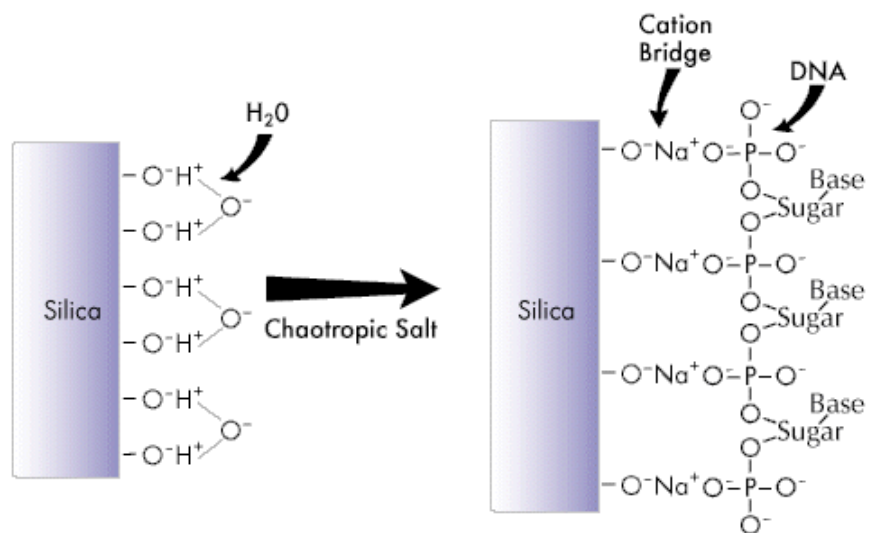
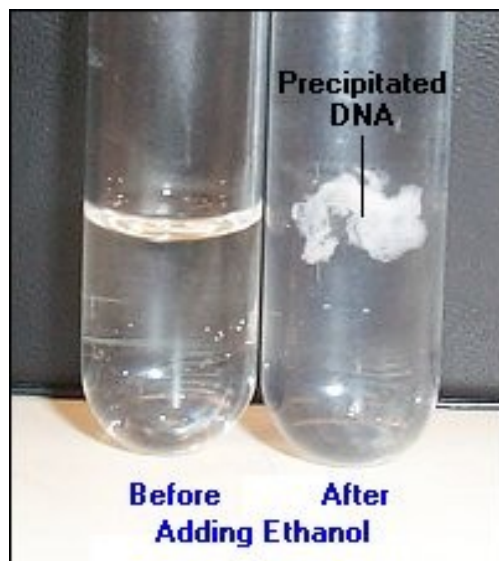
RNA méně stabilní než DNA! (homogenizace beta-ME, DTT)

Extrakce směsí fenol-chloroform

Srážení nukleových kyselin alkoholem

Přečištění enzymy

Purifikace nukleových kyselin chromatografií (adsorpce na silikát)





Krok 1: příprava lyzátu

Umístit na kolonku

Krok 2: navázání na silikát

NK se naváží zatímco kontaminanty protečou

Centrifugace

Silica-gel membrane

Nukleové kyseliny

Krok 3: Promývání

Flow through (discard)

Centrifugace

Wash buffer

Nucleic acids

Nukleové kyseliny

Flow through (discard)

Step 4: Eluce nukleové kyseliny

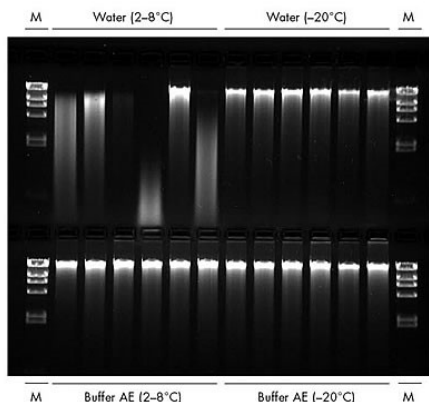
Centrifugace

Elution buffer

Nucleic acids

Nukleové kyseliny

Eluční pufr vytváří podmínky znemožňující vazbu NK na silikát



An RNA Isolation Solution for Every Application



WEB RESOURCES:

MagMAX™ Kits
www.appliedbiosystems.com/magmax

Cells-to-Ct™ Kits
www.appliedbiosystems.com/c2ct

miRNA Solutions
mima.appliedbiosystems.com and
www.ambion.com/mirna

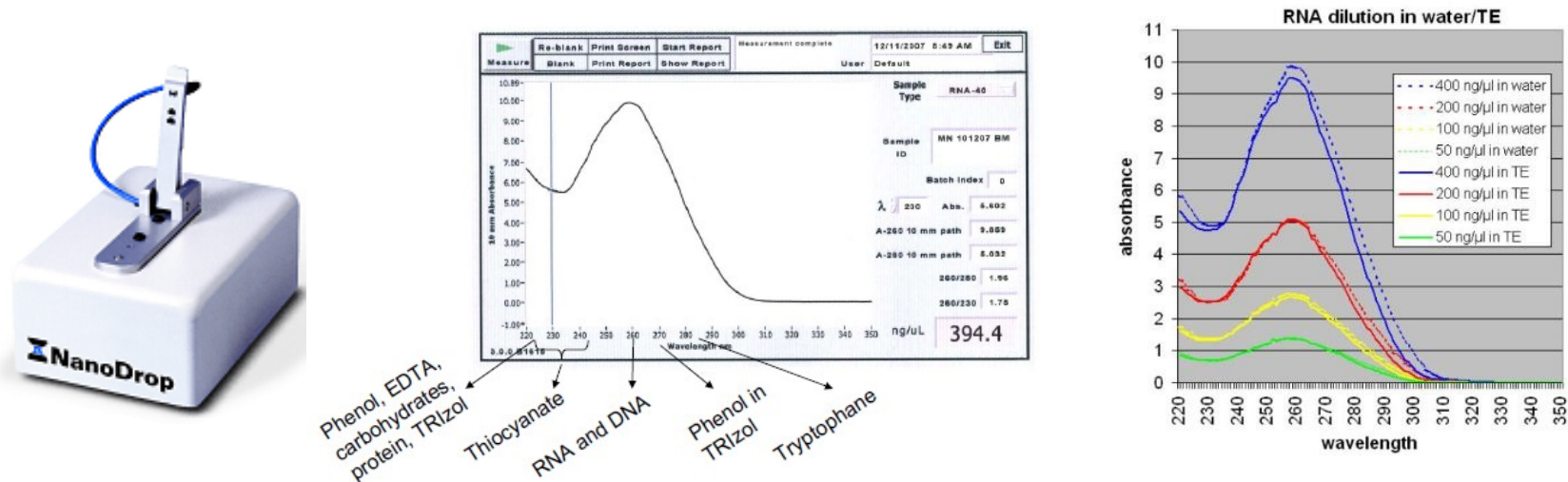
General RNA Isolation Information
www.ambion.com

Spektrofotometrická kvantifikace a čistota nukleových kyselin

Roztok dvouřetězcové DNA má při 260nm absorbanci 1 při koncentraci 50ug/ul

Roztok jednořetězcové DNA má při 260nm absorbanci 1 při koncentraci 30ug/ul

Roztok jednořetězcové RNA má při 260nm absorbanci 1 při koncentraci 40ug/ul



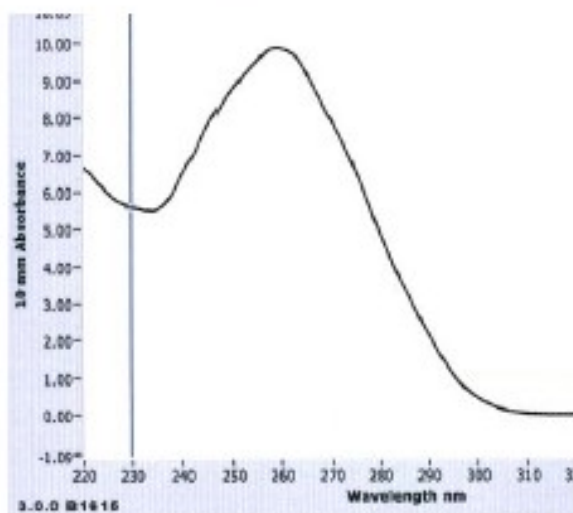
Proteiny mají díky aromatickým aminokyselinám absorpční maximum při 280 nm

Poměr A_{260}/A_{280} se má u nekontaminované DNA pohybovat v rozmezí 1,8 až 2,0

Poměr $A_{260}/A_{230} < 1,7$ indikuje kontaminaci chaotropními solemi a fenolem

Nanodrop ND1000 – umožňuje kvantifikaci pouze v 1ul vzorku

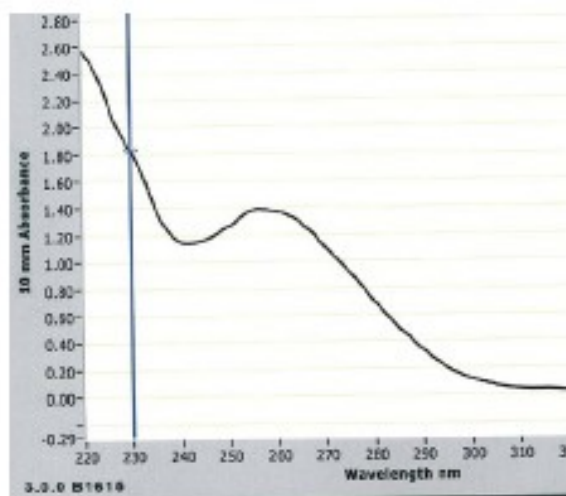
Křivky z Nanodropu



260/280: 1,96

260/230: 1,75

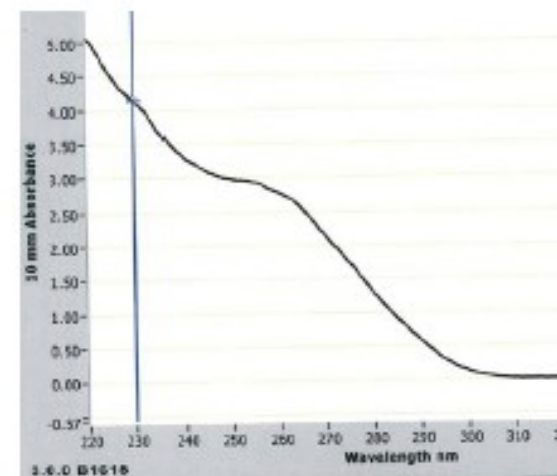
Conc: 394,4



260/280: 1,91

260/230: 0,75

Conc: 54,9



260/280: 2,09

260/230: 0,67

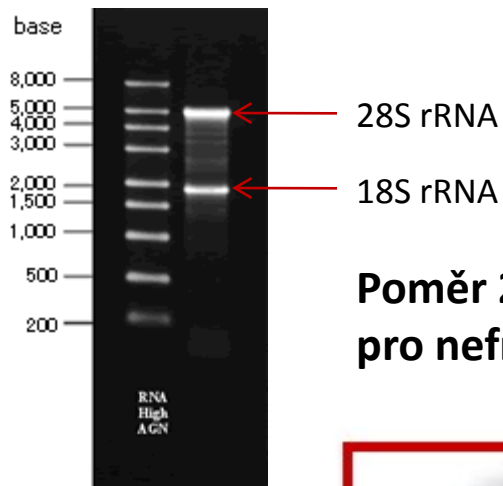
Conc: 111,4

Integrita nukleových kyselin

Agilent Bioanalyzer 2100

Lab on a chip (LOC) technology

Je miniaturizované zařízení implentující kapilární gelovou elektroforézu pro účely analýzy NK



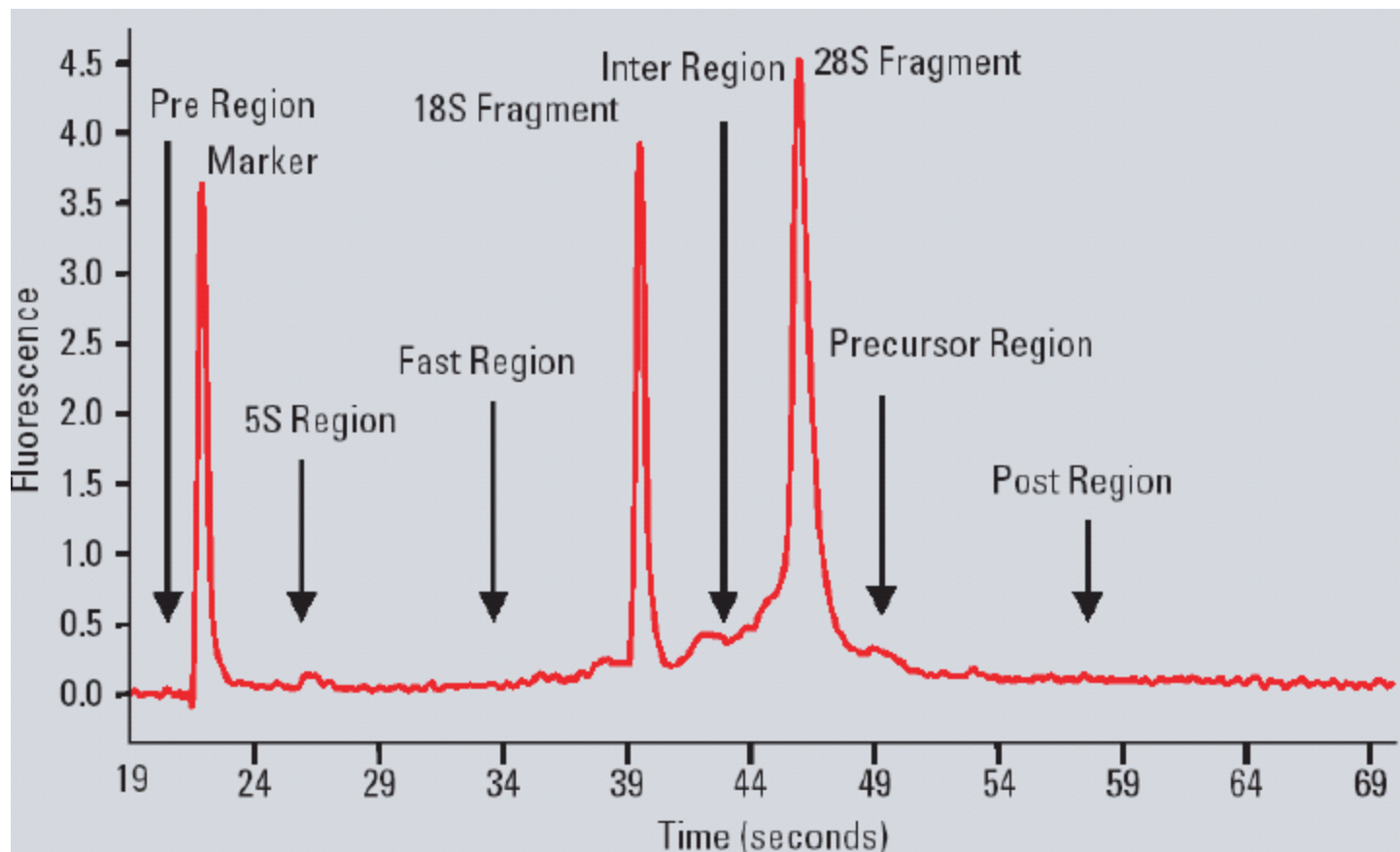
**Poměr 28S/18S ~ 2,0
pro nefragmentovanou RNA**



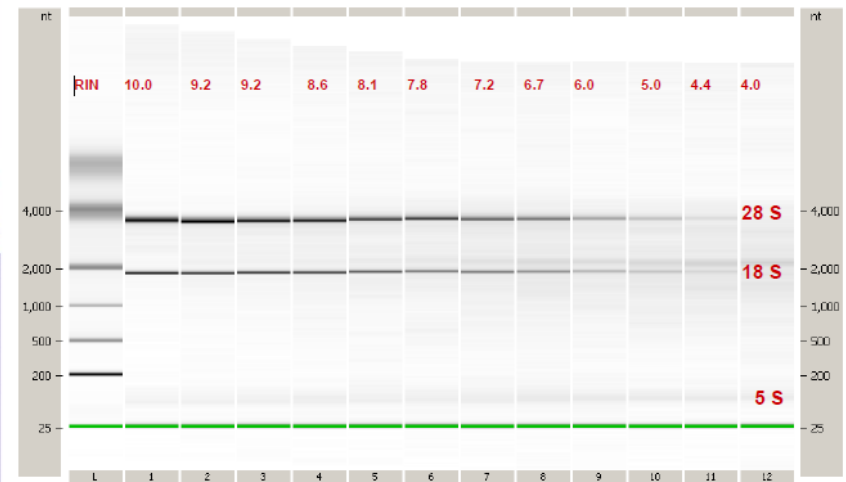
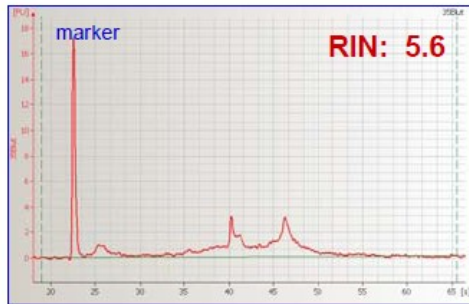
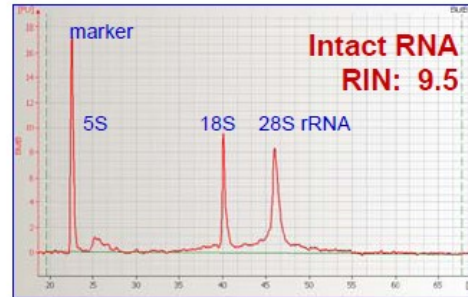
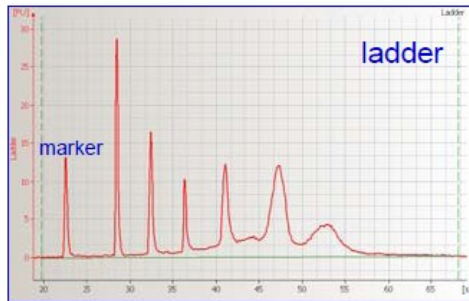
80% rRNA
10-20% tRNA
1-5% mRNA



Integrita nukleových kyselin



Integrita nukleových kyselin



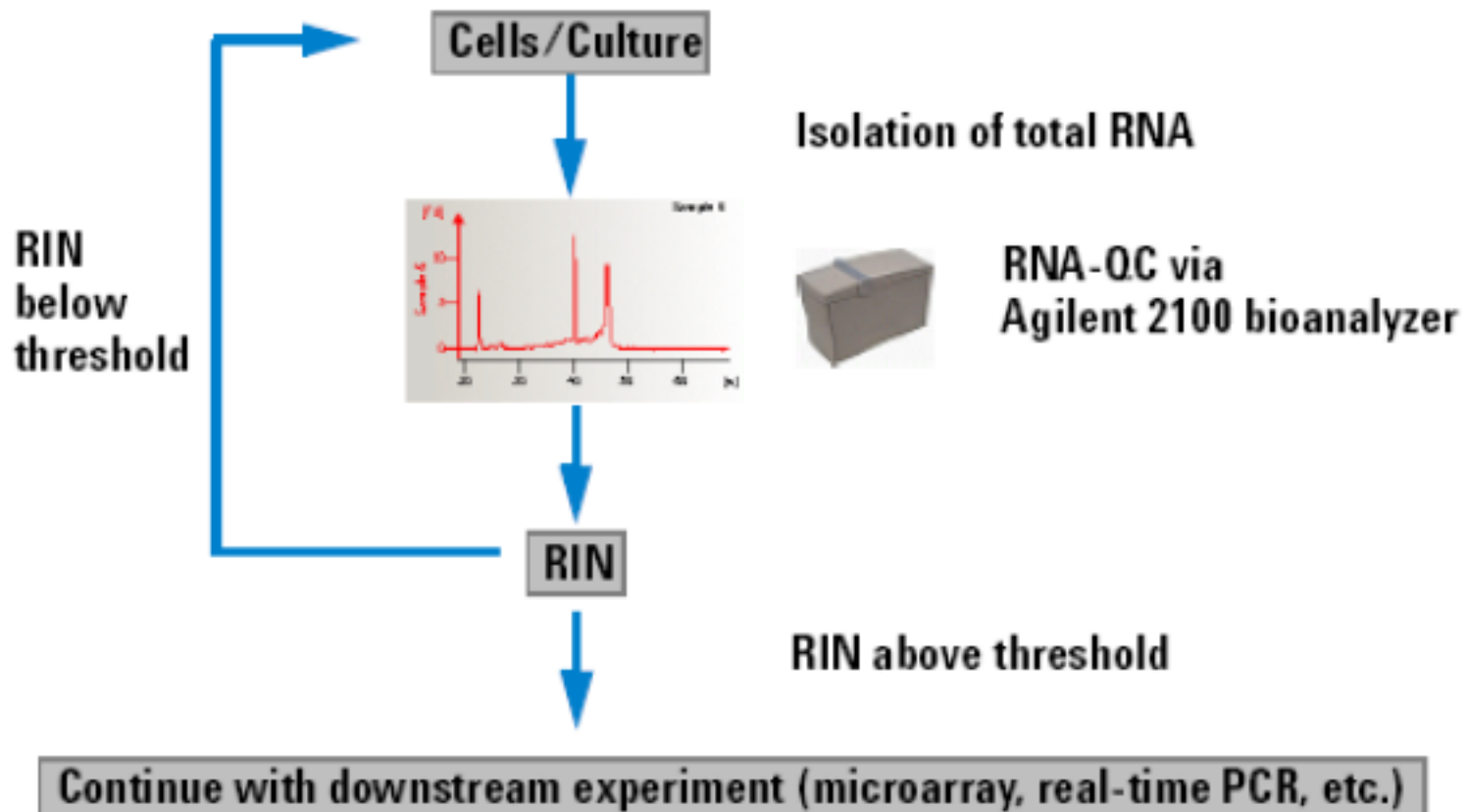
The intensity of bands decreases with increasing degradation

RIN = RNA Integrity Number (0 – 10)

The RIN value: Schroeder *et al*, 2006

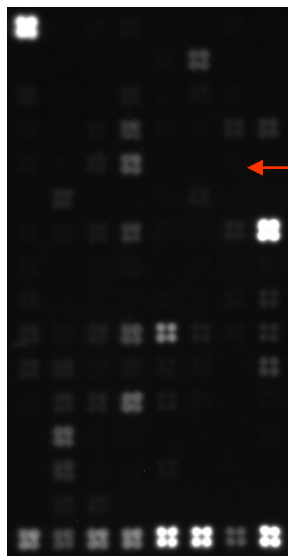
Integrita nukleových kyselin

Run standard experiment and use RIN to determine if sample integrity is sufficient:

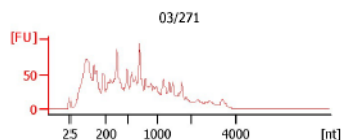
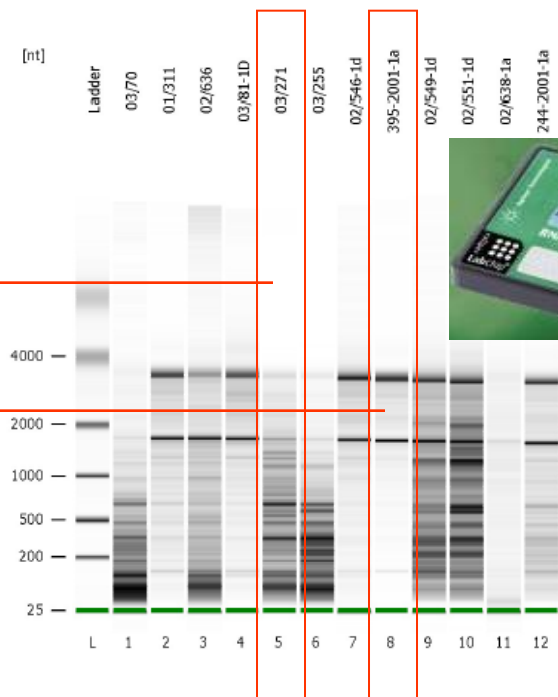
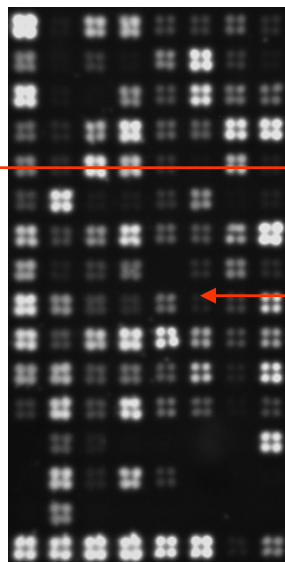


Izolace RNA a vliv její integrity na analýzu expresních profilů

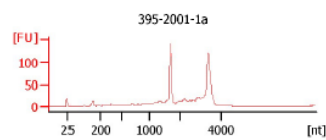
Vzorek č. 03/271
RIN = 2,8



Vzorek č. 395-2001-1a
RIN = 8,4



$c = 0,4412 \text{ ug/ul}$
 $A260/A280 = 1,93$
 $A260/A230 = 1,79$

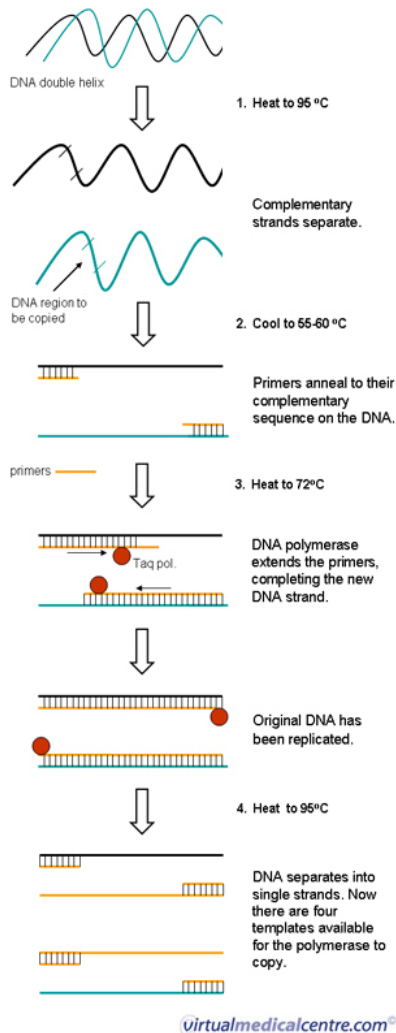


$c = 0,2412 \text{ ug/ul}$
 $A260/A280 = 2,03$
 $A260/A230 = 1,82$

**Jako minimální RIN vzorku
byla stanovena hodnota 7.**

RIN = RNA Integrity Number (0 – 10)

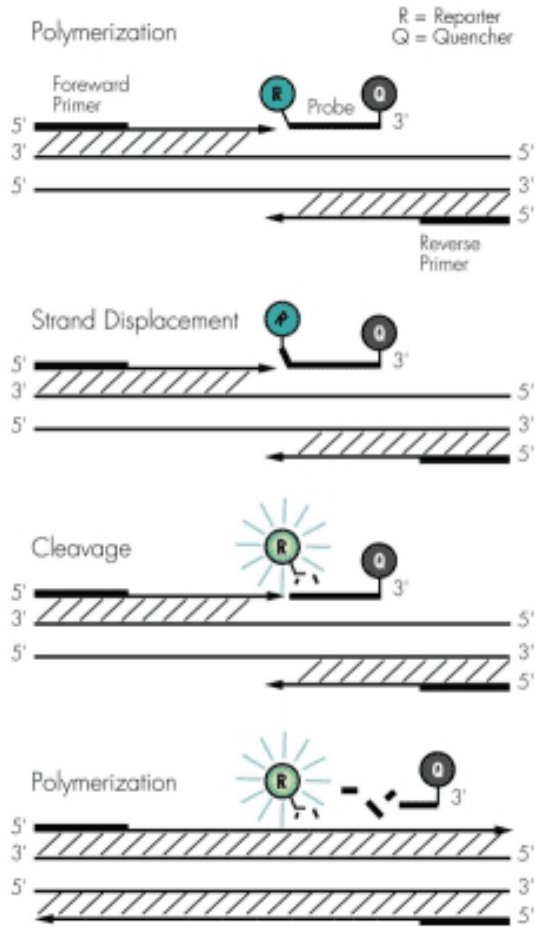
Real-Time PCR – nejpoužívanější a nejstandardnější metoda studia genové exprese



Real-time PCR je založena na sledování průběhu polymerázové řetězové reakce (PCR) přímo během reakce (tzv. „*in reálném čase*“) pomocí fluorescenčních sond či barviv, které detekují množství PCR produktu během reakce zvýšením své fluorescenční aktivity. Její výhodou oproti konvenční PCR je možnost přesného stanovení výchozího počtu kopií cílové templátové sekvence DNA, čili schopnost kvantifikace. Real-time PCR se provádí s pomocí přístrojů zvaných **cyclery**, které umožňují jak provádění teplotního cyklování, tak detekci fluorescence v každém cyklu PCR.

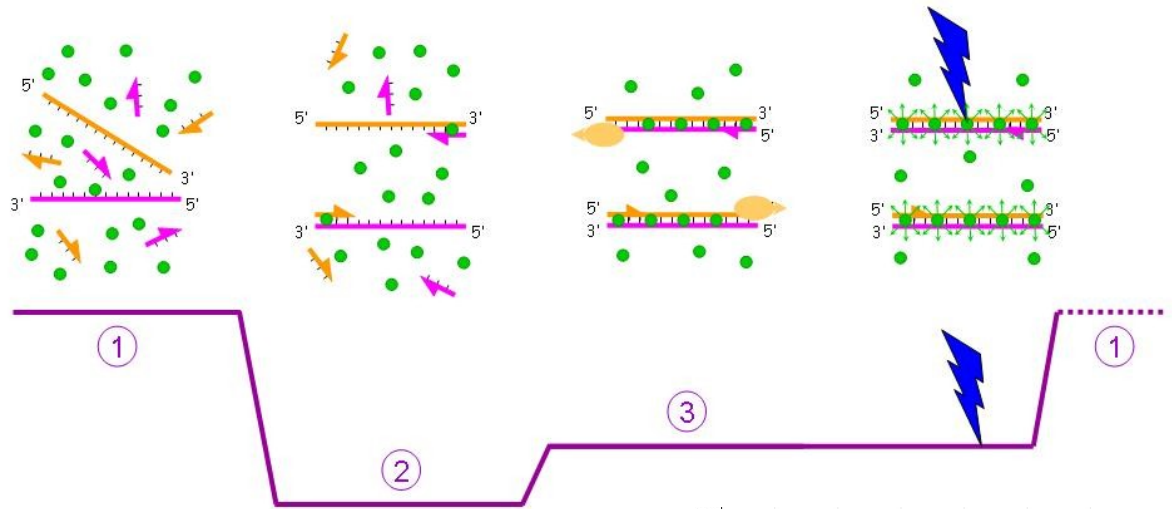


Real-Time PCR – nejpoužívanější a nejstandardnější metoda studia genové exprese

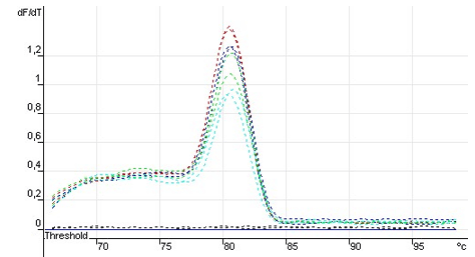


Specifické TaqMan sondy

Nejčastější způsoby detekce amplifikačního produktu

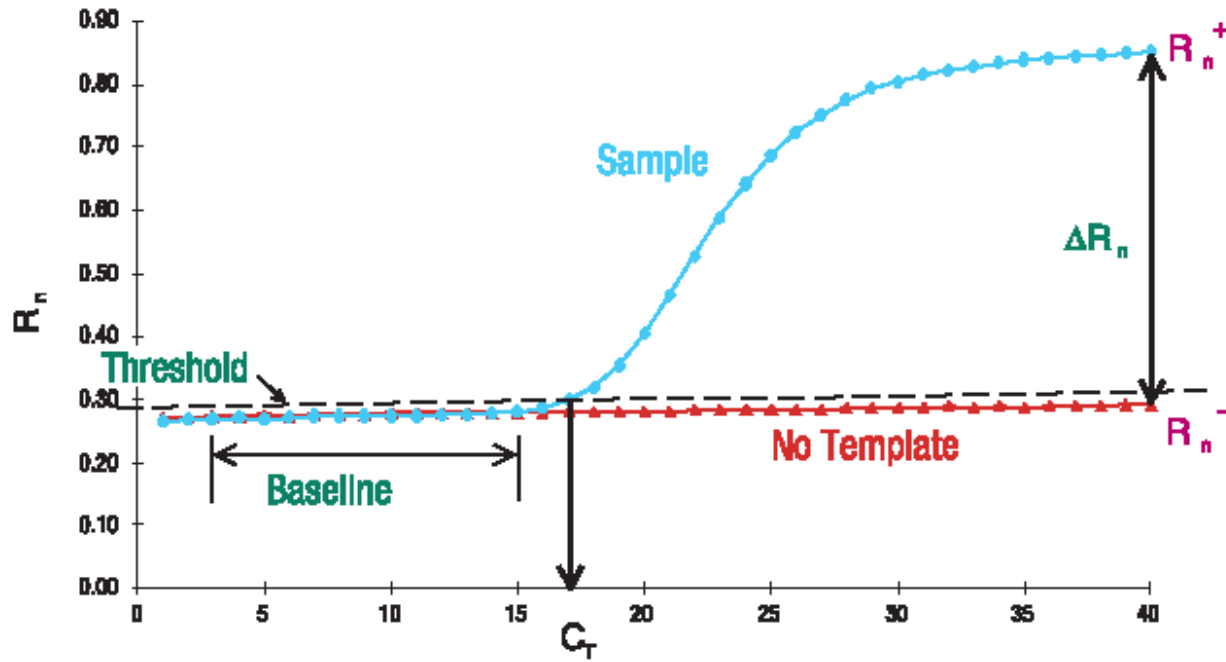


Interkalační barvivo SYBR green



Denaturační křivka kontrola specificity reakce

Real-Time PCR – nejpoužívanější a nejstandardnější metoda studia genové exprese



- 1) **Baseline** - fluorescenční signál je pod detekovatelným limitem detektoru
- 2) **fluorescence exponenciálně narůstá** společně s produktem amplifikace. Ovšem společně s pokračující amplifikací se snižuje i poměr polymeráza : PCR produkty.
- 3) **plateau fáze** - koncentrace vytvořených ampliconů dosáhne koncentrace 10^{-8} M, zastaví se exponenciální růst, od koncentrace 10^{-7} M už R_n dále nenarůstá.

správně navržené primery jsou komplementární pouze k jediné sekvenci



důsledkem je vznik pouze jediného produktu, do kterého je inkorporováno fluorescenční barvivo



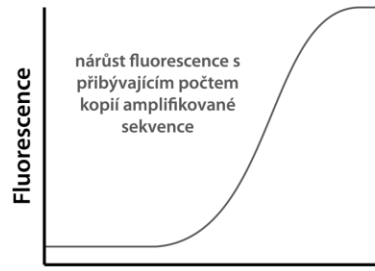
špatně navržené primery jsou komplementární k více sekvencím



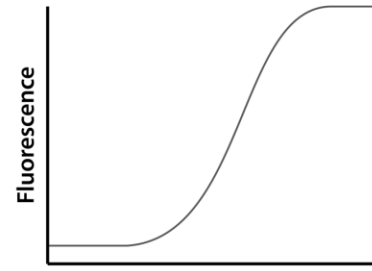
důsledkem je vznik více produktů, do kterých je inkorporováno fluorescenční barvivo



na amplifikační křivce, jež je grafickým výstupem real-time PCR, nelze přítomnost více produktů v jedné reakci rozeznat

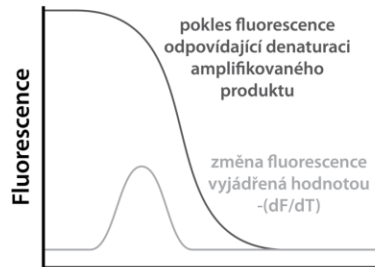


Cyklus

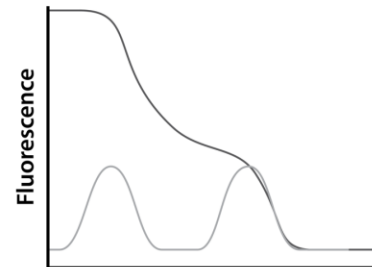


Cyklus

množství různých produktů v jedné reakci lze však rozeznat pomocí disociační analýzy, jež je založena na různých teplotách tání (T_m) u odlišných dsDNA sekvencí

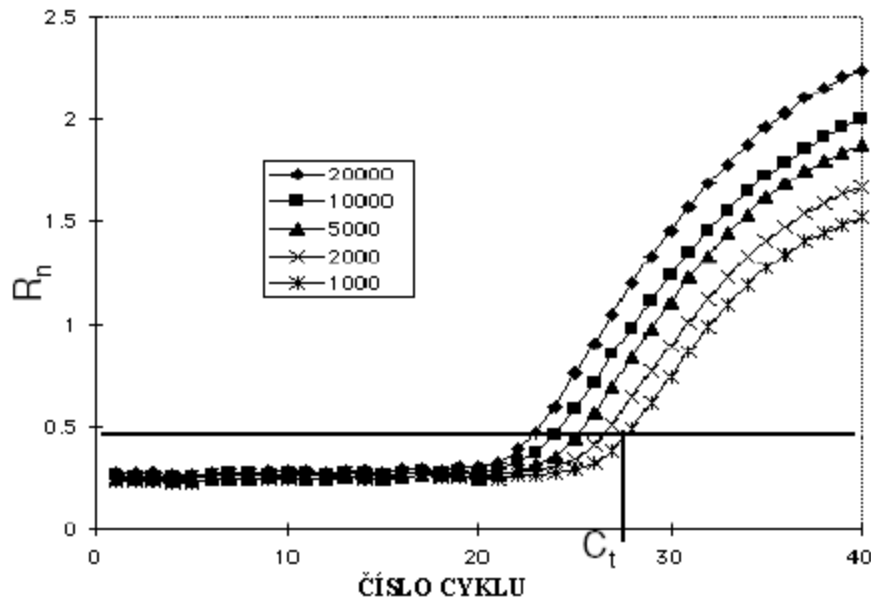


Teplota

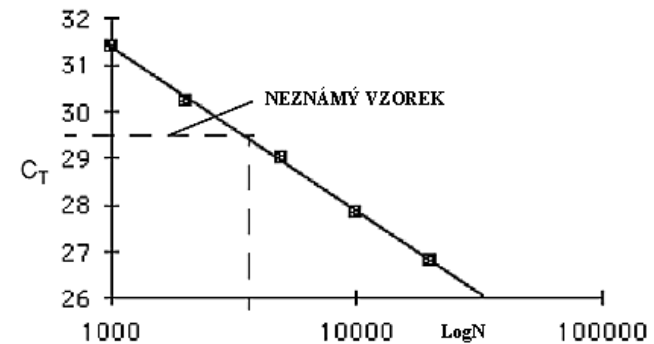


Teplota

Real-Time PCR – nejpoužívanější a nejstandardnější metoda studia genové exprese



Absolutní kvantifikace



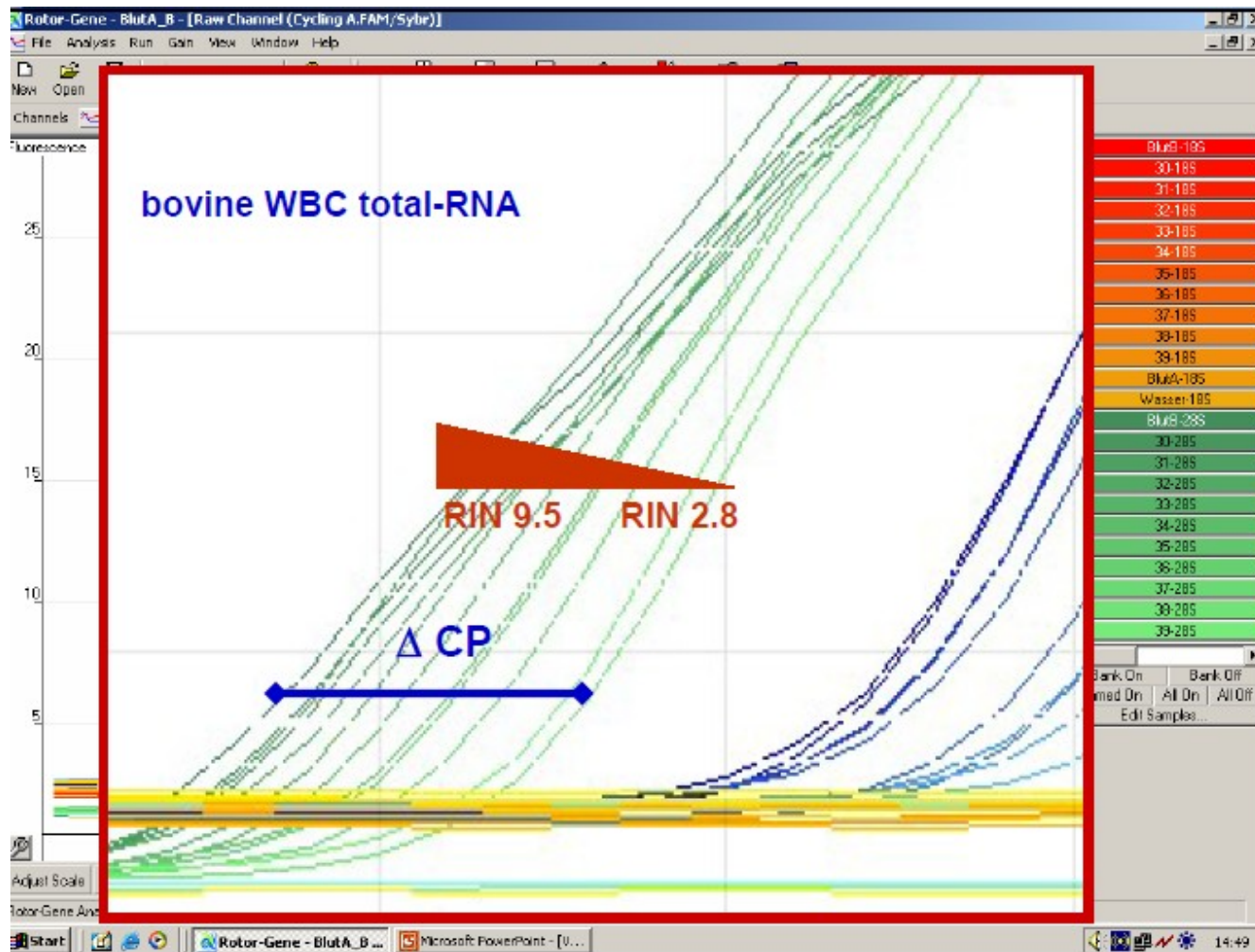
Treshold (prahový) cyklus C_T –

cyklus, při kterém R_n signály začnou odpovídat exponenciálnímu růstu množství amplifikačního produktu
Pro určení C_T vyhodnocovací software vypočítá průměrnou odchylku R_n v několika prvních cyklech a na základě této odchylky rozpozná následnou změnu vedoucí od baseline (kterou obvykle představuje asi prvních 15 cyklů) k exponenciálnímu průběhu

(treshold změna R_n je definovaná jako desetinásobek průměrné odchylky v baseline fázi PCR)

C_T je závislé na koncentraci DNA templátu, účinnosti amplifikace a funkčnosti fluoroforového systému.

Vztah integrity RNA a Ct prahového cyklu při měření stejného transkriptu v analogickém vzorku



Real-Time PCR – nejpoužívanější a nejstandardnější metoda studia genové exprese

Normalizace pomocí endogenní kontroly – relativní kvantifikace metoda $\Delta \Delta Ct$

Reference – obvykle nějaký housekeepingové geny

jsou aktivní ve všech buňkách zajišťují základní funkce buněčného metabolismu: syntéza nukleových kyselin a proteosyntéza, transport živin a jejich zpracování, biosyntéza cytoskeletu a organel (GAPDH, HPRT1, ACTB, B2M,....)

$\Delta Ct_1 = Ct(\text{gen}) - \Delta Ct(\text{reference})$ – v kalibračním vzorku (např. nenádorový střevní epitel)

$\Delta Ct_2 = Ct(\text{gen}) - \Delta Ct(\text{reference})$ – v analyzovaném vzorku (např. kolorektální karcinom)

$$\Delta \Delta Ct = \Delta Ct_2 - \Delta Ct_1$$

$$2^{-\Delta \Delta Ct} = [\text{gen ve vzorku}] / [\text{gen v kalibrátoru}]$$

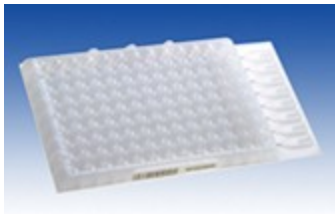
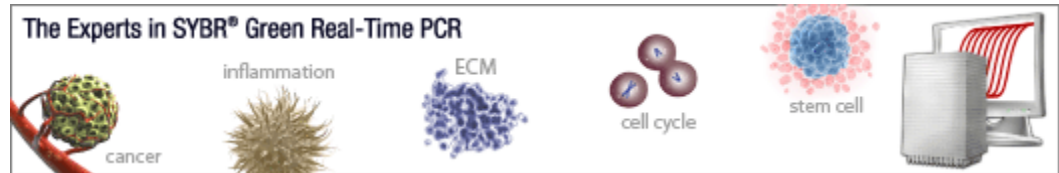
(př. 3 znamená, že normalizovaná hladina stanovovaného genu je 3x vyšší v kolorektálním karcinomu než v nenádorovém epitelu)

$$2^{-\Delta Ct_1} = [\text{gene}] / [\text{reference}]$$

Rozdíly v množství celkové RNA ve vzorcích a asi 20% chyba reverzní transkripce

Real-Time PCR arrays

obvykle cílené na geny konkrétní signální dráhy nebo biologického procesu



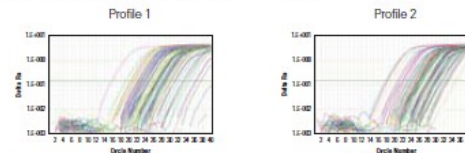
1. Convert Total RNA to cDNA.



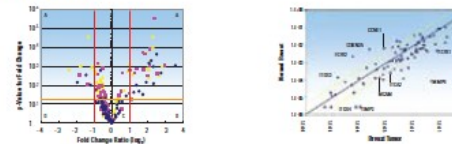
2. Add cDNA to RT² qPCR Master Mix & Aliquot Mixture Across PCR Array.



3. Run in Your Real-Time PCR Instrument.



4. Data Analysis.

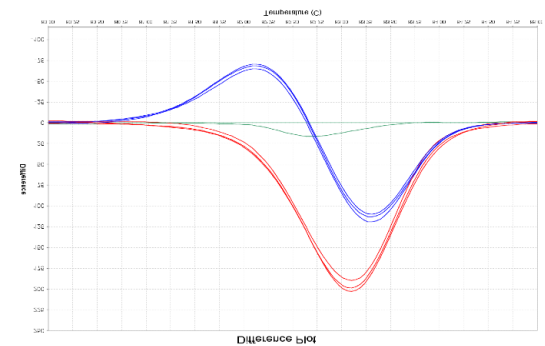
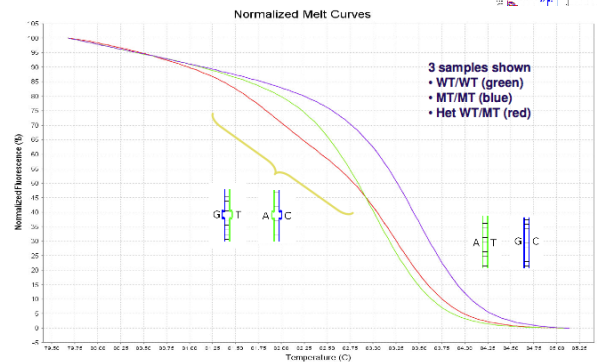
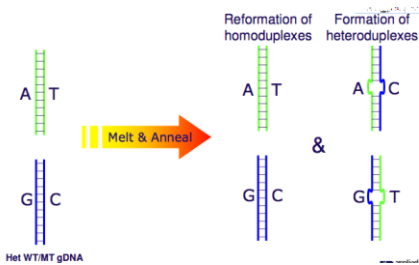
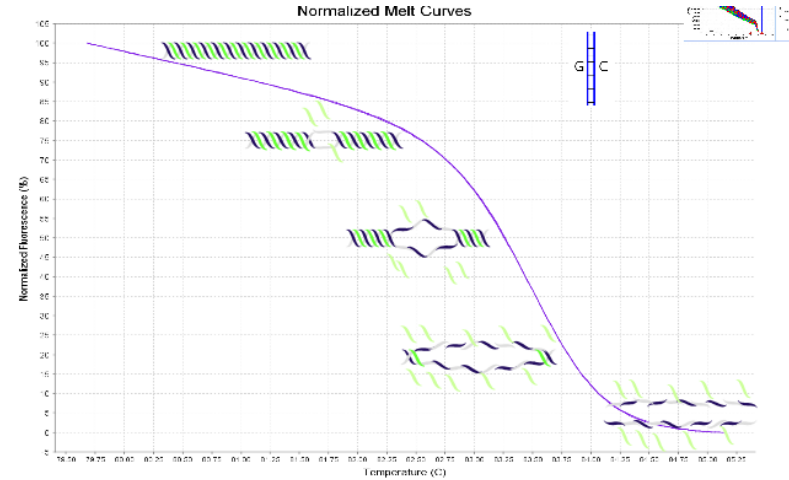


High resolution melting (HRM) – analýza tání s vysokým rozlišením

SNP Class	Base Change	Typical T_m Curve Shift	Occurrence in the Human Genome
1	C/T & G/A	Large (>0.5, avg. of 1.0°C)	64%
2	C/A & G/T	Large (>0.5, avg. of 1.0°C)	20%
3	C/G	Small (0.2–0.5°C)	9%
4	A/T	Very small (<0.2°C)	7%

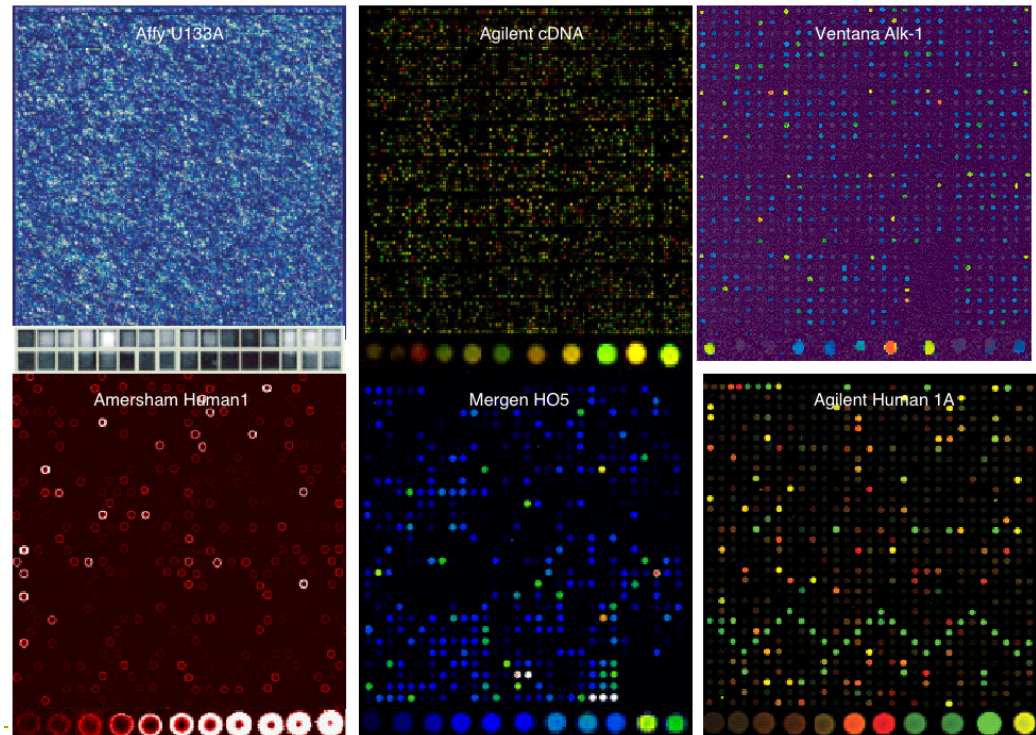
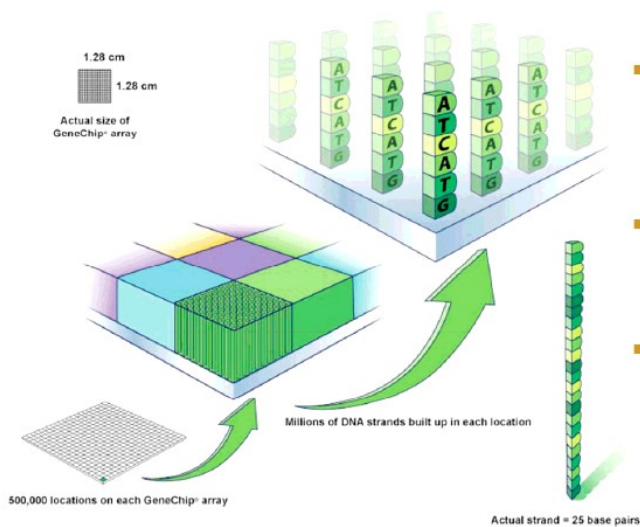
Table 1. Human Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) Occurrence and T_m .

HRM can detect all SNP classes



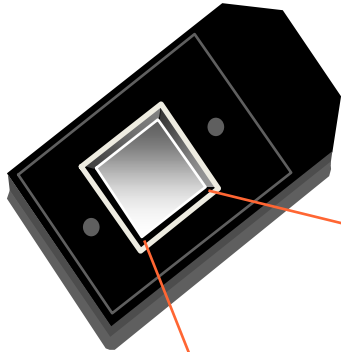
DNA microarrays (čipy) – definice a ukázky

Miniaturizované zařízení nesoucí na svém povrchu imobilizované fragmenty nukleových kyselin v přesně určeném uspořádání. Tyto fragmenty jsou sekvenčně derivované tak, aby mohly specificky hybridizovat s testovaným genetickým materiálem, který je předem speciálně označen za účelem posthybridizační detekce

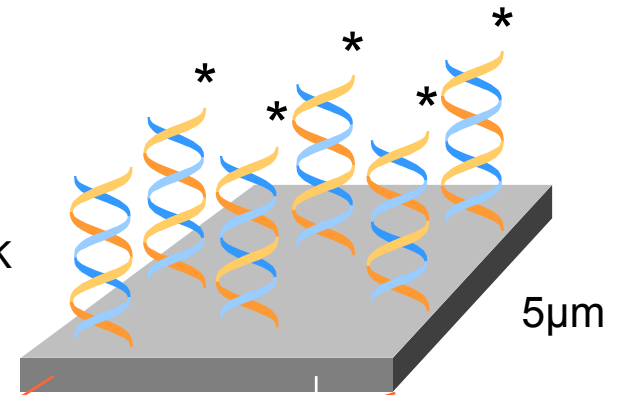


DNA čip (Affymetrix GeneChip U133A)

GeneChip U133A - DNA čip



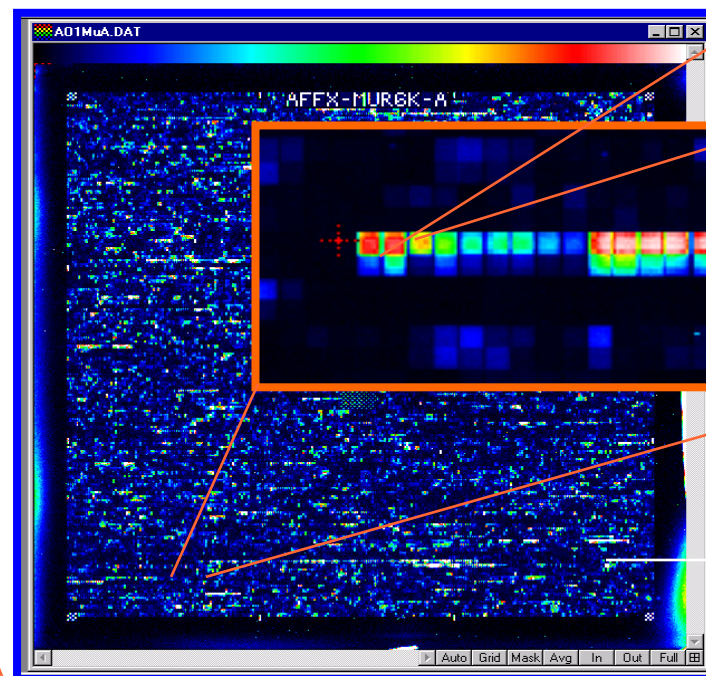
Testovaná NK
Sonda = fragment NK



1.28cm

Milióny kopií jedné sondy

Hybridizační jednotka



Přes 6 500 000
hybridizačních jednotek

U133 set (A+B)
-33 000 lidských
genů
-1 000 000 hybridizačních jednotek

Základní dělení DNA čipů

Dle charakteru detekce

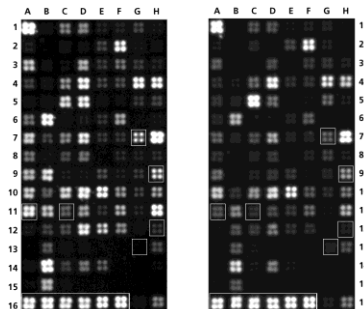
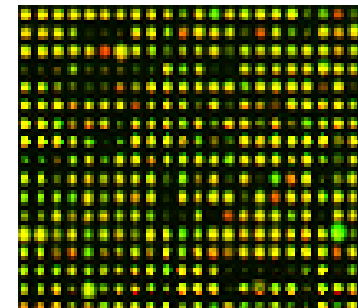
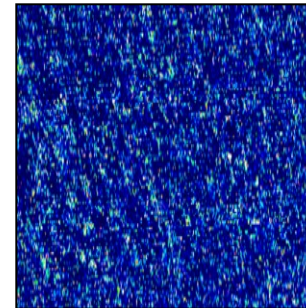
- 1) pasivní – pracovní podmínky pro všechny hybridizační jednotky jsou stejné – Affymetrix, Agilent
- 1) aktivní – pracovní podmínky každé hybridizační jednotky lze ovlivňovat individuálně – Nanogen

Dle typu sond

- 1) cDNA čipy – Agilent
- 2) oligonukleotidové čipy - Affymetrix

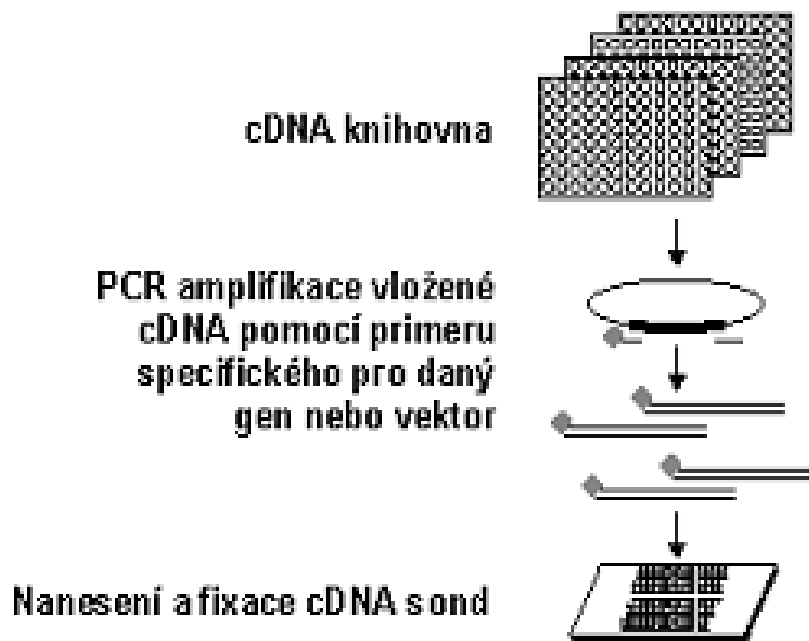
Dle počtu sond

- 1) vysokohustotní DNA čipy (celogenomové) – Affymetrix, Agilent, ...
- 2) nízkohustotní DNA čipy (stovky genů) – Eppendorf, Superarray, ...



Výroba cDNA ČIPŮ

dvouvláknové fragmenty komplementární (complementary) cDNA o délce 300-400 párů bazí



cDNA EXPRESNÍ KNIHOVNA

mRNA -> reverzní transkripce

-> cDNA -> fragmentace

-> + univerzální vektor

-> inkorporace do plasmidů

-> transfekce bakterií

-> uskladnění bakteriálních

klonů v jamkových

destičkách

->

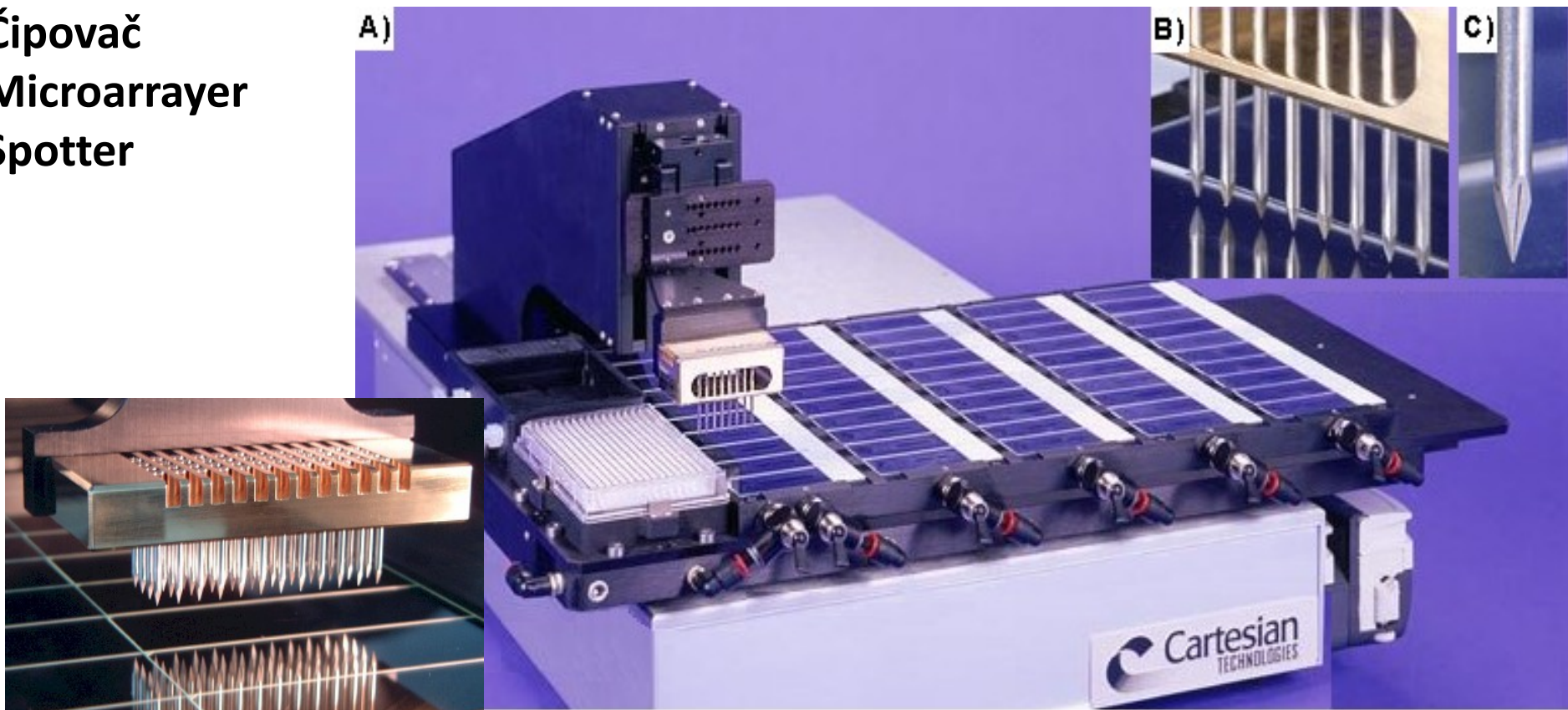
->(1 bakteriální klon obsahuje

plasmid s jedním cDNA

fragmentem)

Výroba cDNA ČIPŮ

Čipovač Microarrayer Spotter

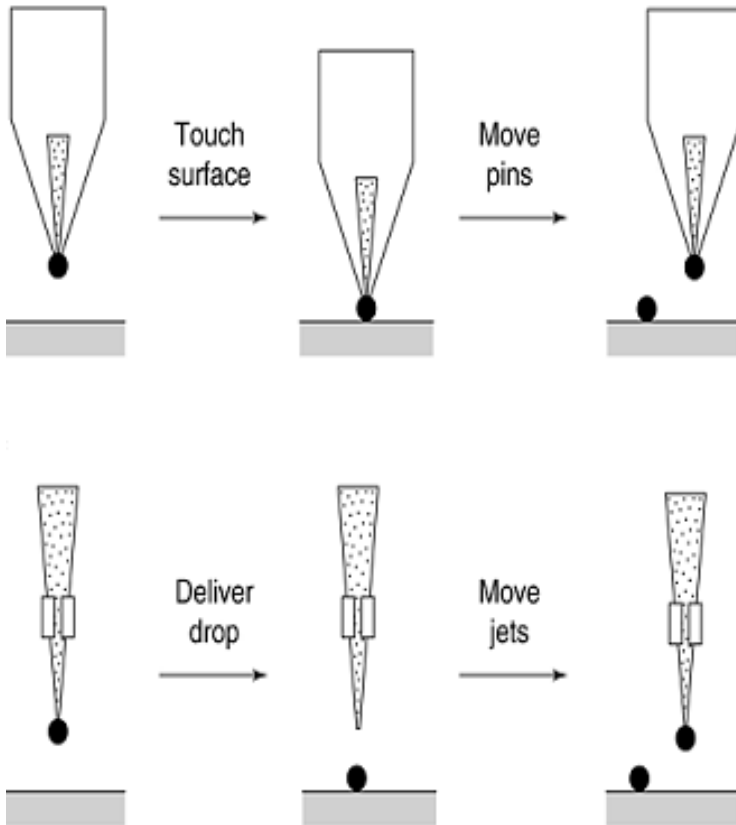


Obr. č. 1. A) Pohled na výkonnou část čipovacího přístroje společnosti Cartesian Technologies. Detailní snímek na: B) pracovní hlavu osazenou nanášecími tělesy (NT) a C) kontaktní NT – štěrbinovitý hrot.

<http://cmgm.stanford.edu/pbrown/mguide/index.html>

Výroba cDNA ČIPŮ

Nanášecí tělesa



I) Kontaktní systémy

a) bez zásobníku

- plné hroty (solid pins)

b) se zásobníkem (250-1000nl)

- přepraví 0,25 – 5nl, což vytvoří hybridizační jednotku 75-350um v průměru

- štěrbinovité hroty (split pins)

- pinzetovité hroty (tweezers)

II) Bezkontaktní systémy

a) „ink-jet“ (kapacita až 10000nl)

- piezoelektrický (4-100nl)

- elektromagnetický (0,05-10nl)

b) „bubble-jet“

1.28 x 1.28+ cm plocha čipu

HJ ~100 μm průměr separovány ~100 μm.

(≈ 5,000 – 20,000 probes)

Výroba cDNA ČIPŮ

Povrchová úprava nosné plochy – hydrofóbních skel



**Po nanesení sond – fixace:
např. UV záření
blokace: volných míst
montáž: cartridge**

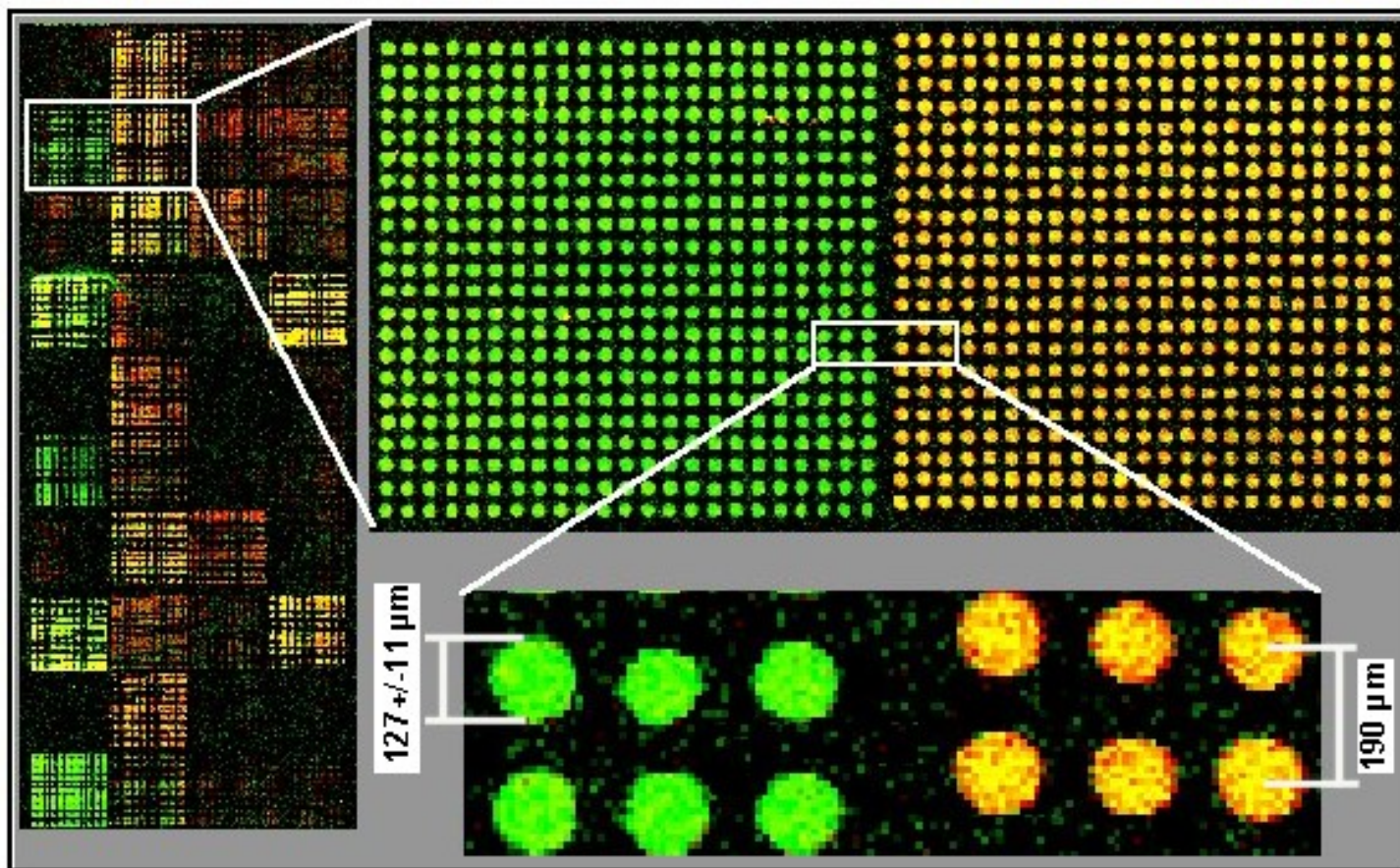
I) Kovalentní

- čip pokryt např. modifikovanými silany mající aldehydovou skupinu. 5' - konce sond jsou modifikovány a nesou aminovou skupinu – kontaktem vznikne pevná Schiffova báze

II) Nekovalentní

- čip pokryt např. poly-L-lysinem, ke kterému se molekula cDNA váže elektrostatickými interakcemi a vodíkovými můstky

Výroba cDNA ČIPŮ



Obr. č. 2. cDNA čip obsahující přes 25.000 hybridizačních jednotek (HJ), k jehož výrobě byl použit přístroj MicroSpot 2500 společnosti BioRobotics. Průměr HJ přibližně 127 μm . Vzdálenost mezi centry dvou HJ 190 μm . Převzato a upraveno od BioRobotics.

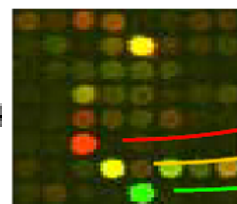
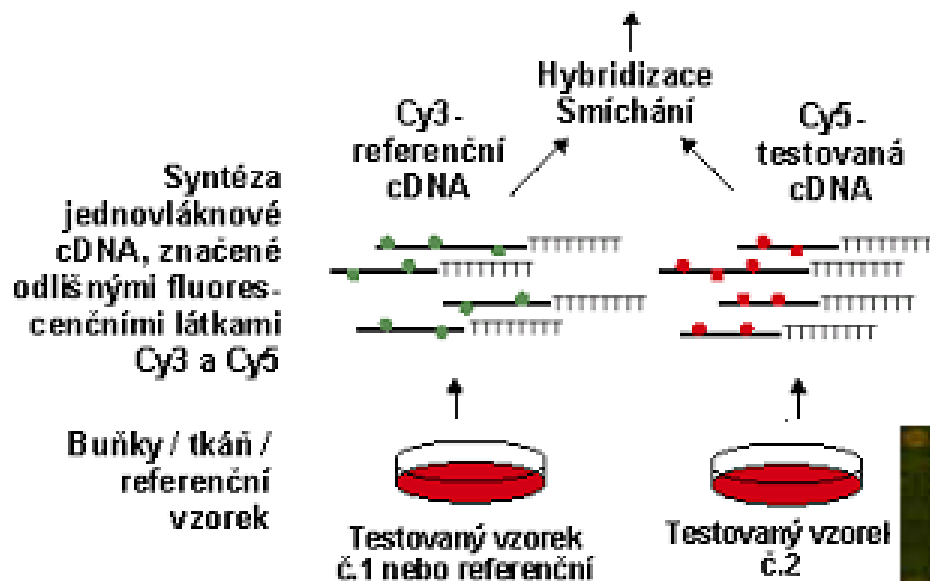
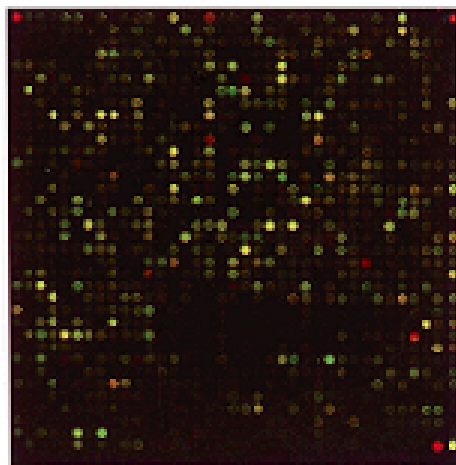
cDNA čipový experiment

U cDNA čipů hybridizujeme na jednom čipu značenou ss-cDNA získanou z testovaného a referenčního vzorku.

Proto je nutno každou ss-cDNA označit rozdílným fluorochromem. Standardně: referenční ss-cDNA je Cy-3 – zeleně a testovaná ss-cDNA Cy5 – červeně

Po hybridizaci následuje vymytí přebytečného materiálu a čtení (skenování) čipu pomocí fluorescenčního skeneru

Excitace hybridizačních jednotek dvěma laserovými paprsky. Intenzita záření emitovaného odlišnými fluorochromy odpovídá obsahu testované (Cy5) a referenční (Cy3) cDNA na příslušné jednotce. Poměr $Cy5/Cy3$ je vyjádřen v pseudobarevném zobrazení



Cy3 Snížená exprese genu
Cy5 Zvýšená exprese genu

Cy3	Cy5	$\frac{Cy5}{Cy3}$	$\log_2 \left(\frac{Cy5}{Cy3} \right)$
200	10000	50.00	5.64
4800	4800	1.00	0.00
9000	300	0.03	-4.91



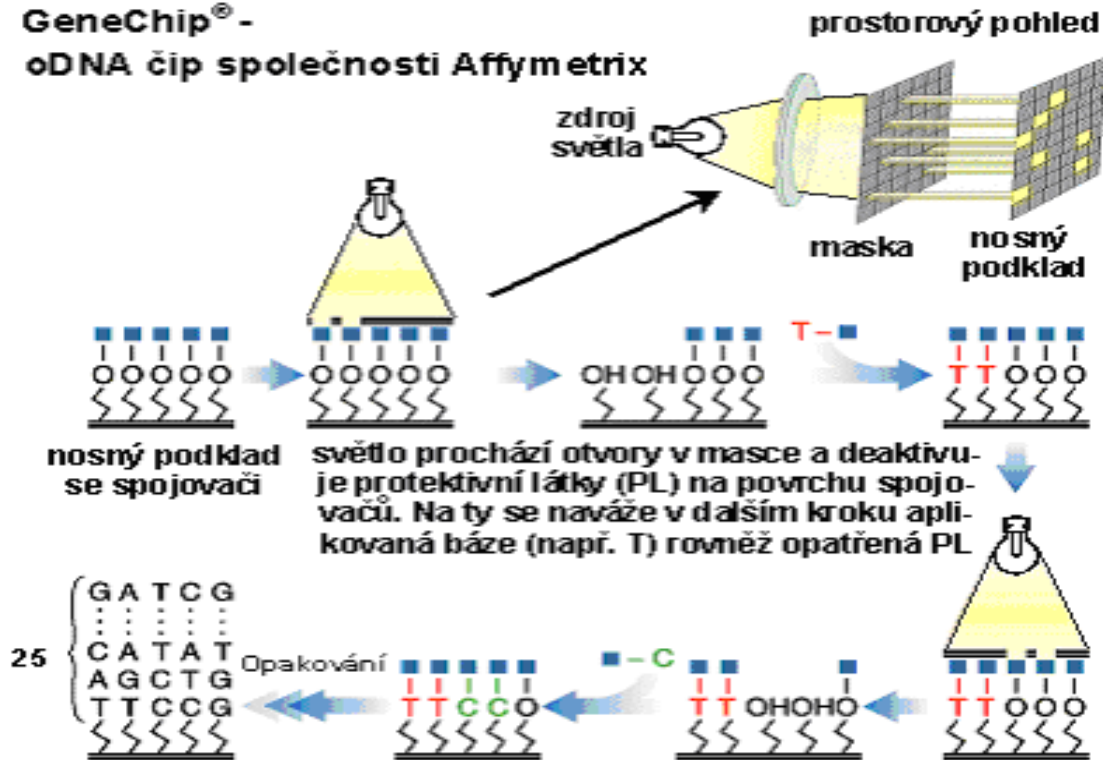
oDNA čipy - Affymetrix

-oligonukleotidové čipy, jednovláknové fragmenty NK o délce ≈25 bází

FOTOLITOGRAFICKÁ SYNTÉZA

GeneChip® -

oDNA čip společnosti Affymetrix



Pomocí odlišných masek jsou postupně deaktivovány PL zbylých spojovaců a následně aplikovány dosud nepoužité nukleotidy.

K syntéze libovolného počtu sond je zapotřebí takový počet masek a příslušných kroků, který odpovídá množství nukleotidů v jedné sondě (25) násobeném počtem bází (4).

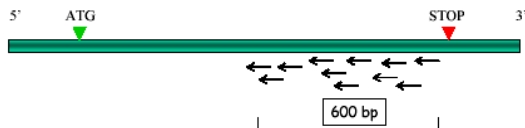
1.28 x 1.28+ cm plocha čipu
 HJ ~5 x 5 μm průměr plocha
 (≈ miliony sond na 6,500,000 HJ)

Affymetrix GeneChip

PŘÍPRAVA OLIGONUKLEOTIDOVÝCH SOND

Probe Design

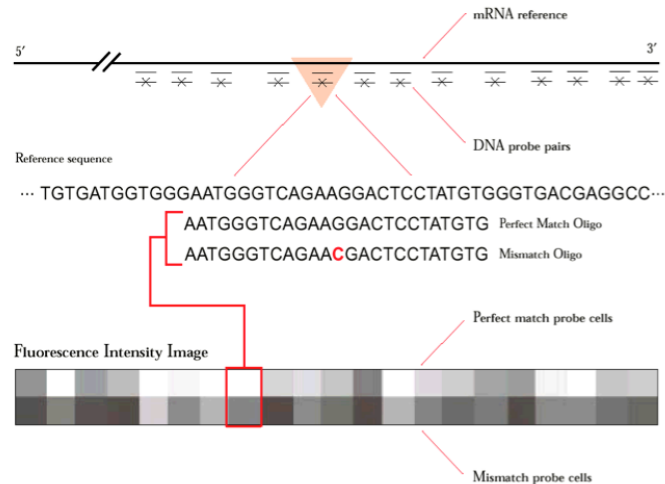
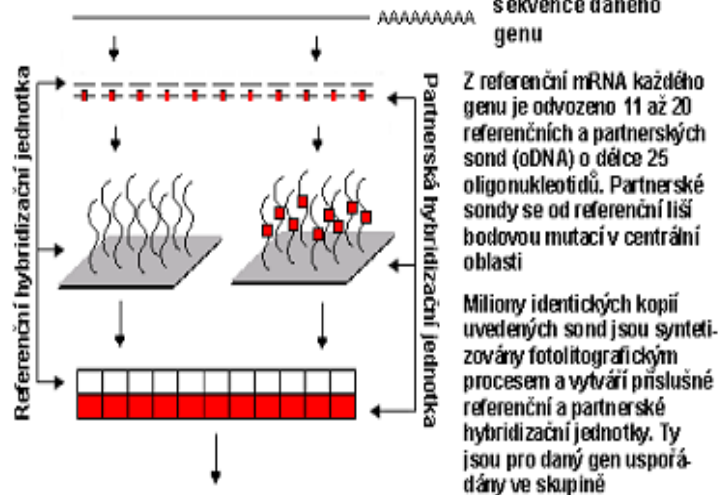
Combining databases, empiric knowledge



- Probe set: - at least 11 unique oligos (25-mers)
 - spread over 600 bp 3'-end
 - spread over the whole chip
 - match-mismatch oligos



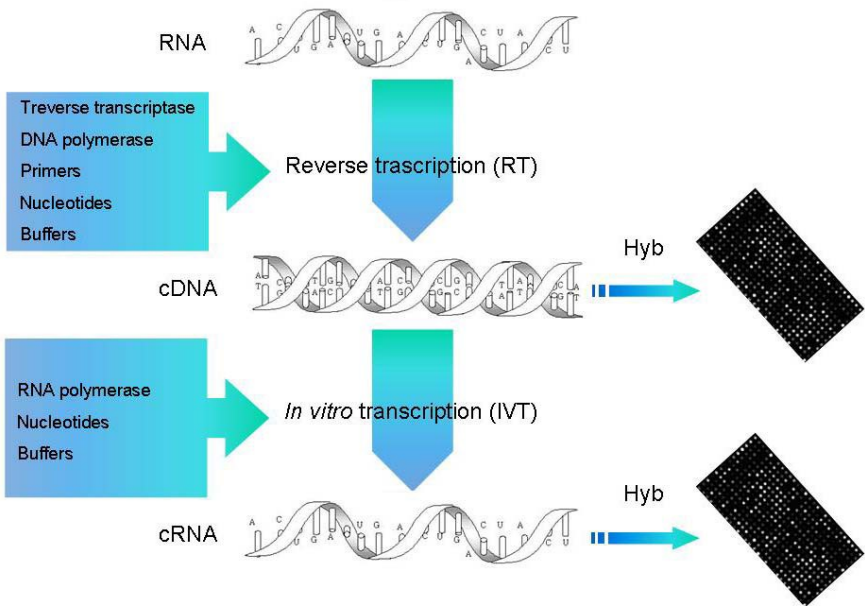
mRNA referenční
sekvence daného
genu



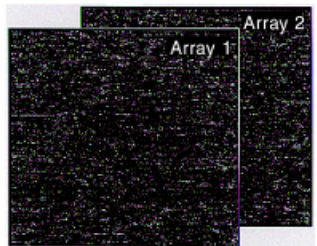
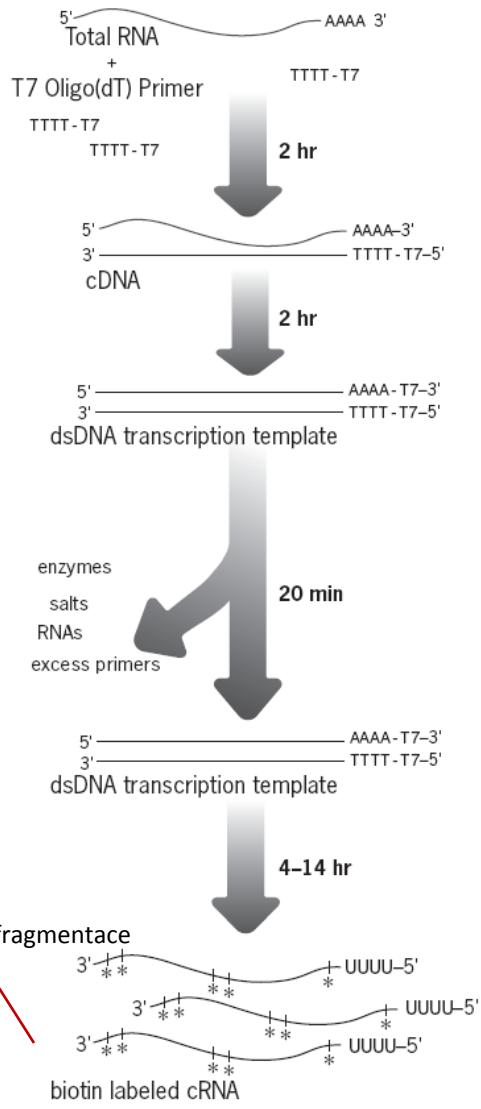
mRNA sekvence daného genu -> virtuálně vyselektováno 11-20 specifických oligonukleotidových úseků reprezentujících daný gen-> reverzní transkripce do sekvence cDNA -> fotolitografická syntéza přímo na povrchu čipu

Referenční a partnerské sondy v referenčních a partnerských hybridizačních jednotkách. Liší se cílenou záměnou jednoho nukleotidu v centrální oblasti (negativní kontrola).

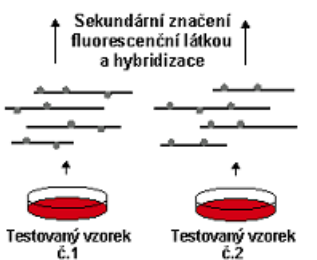
IVT, značení cRNA biotinem a posthybridizační detekce



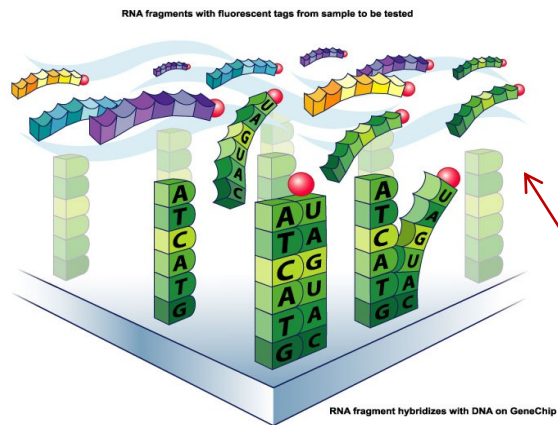
Izolace RNA / mRNA
 -> reverzní transkripce
 -> ss-cDNA
 -> PCR syntéza ds-DNA s T7 promotory
 -> lineární amplifikace a zároveň in-vitro reverzní transkripce s inkorporací NTPs (pseudouridin nesoucí biotin - nepřímá metoda)
 -> biotinem značená cRNA
 -> hybridizace



Hybridizační jednotky jsou excitovány jedním laserovým paprskem. Obecně je gen považován za exprimovaný, pokud hodnota intenzity emitovaného záření z jeho referenčních jednotek převyšuje po odečtení fluorescenčního pozadí hodnotu z jednotek partnerských

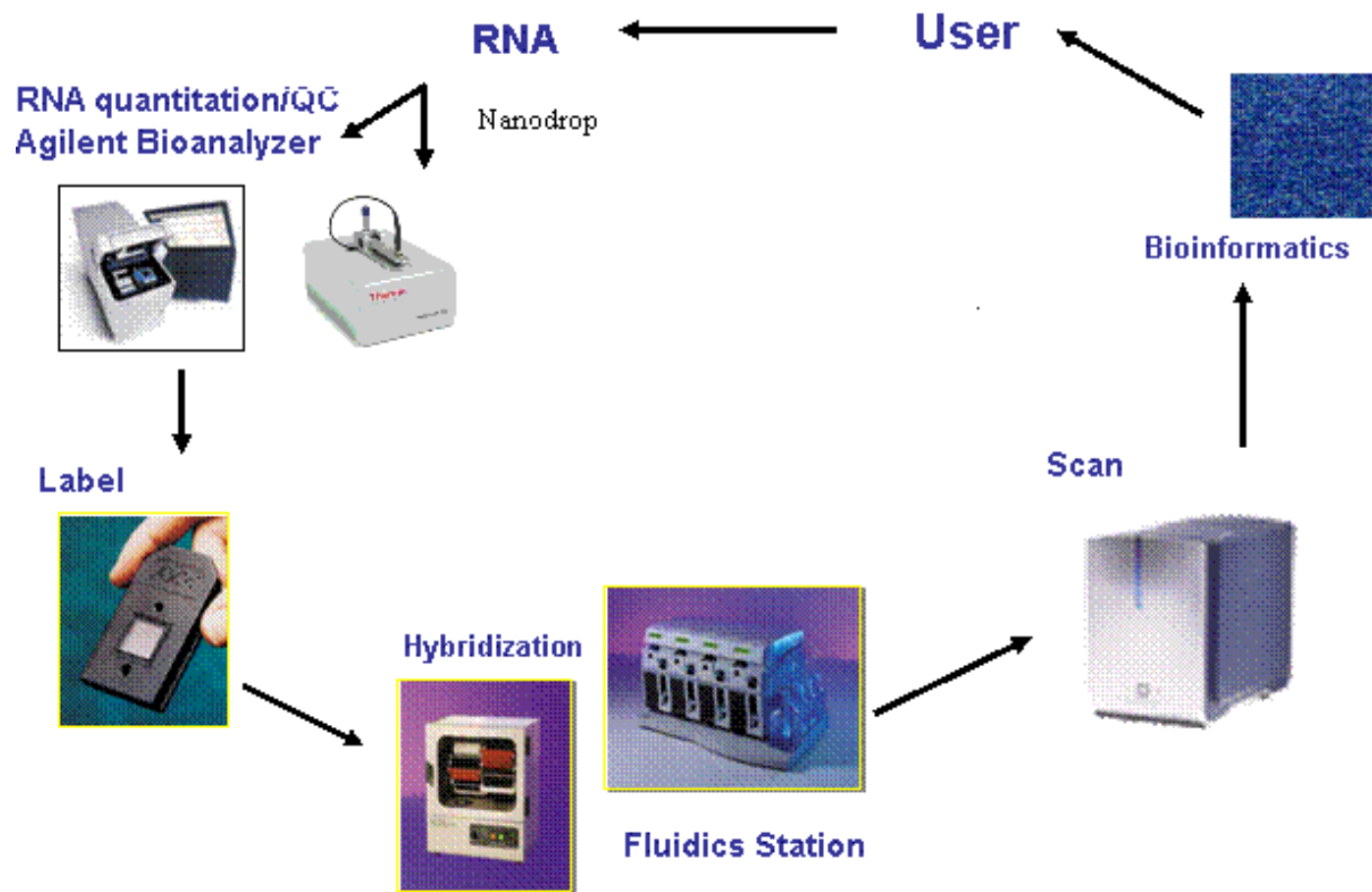


Buňky / tkáň



Experiment s DNA čipem

Microarray sample processing workflow

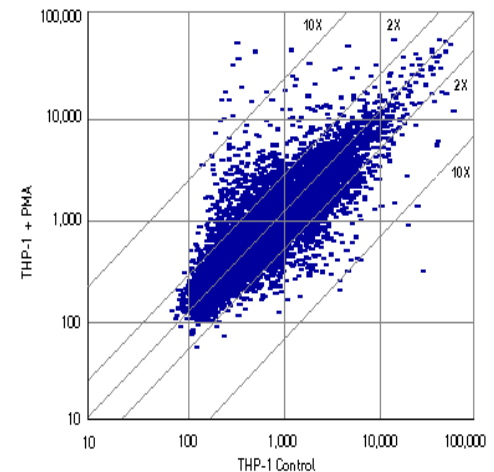
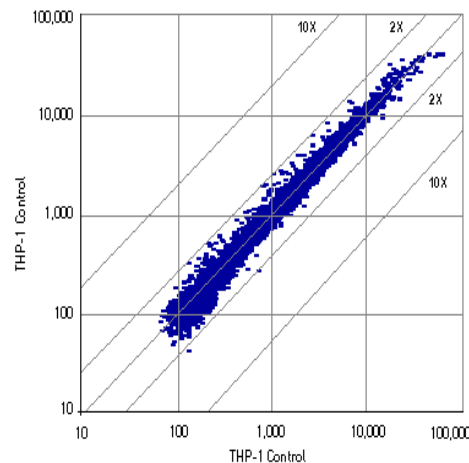


Faktory ovlivňující čipové analýzy

heterogenita souboru pacientů, kvalita vstupního materiálu, rozdílnost čipových platforem, validace výsledků

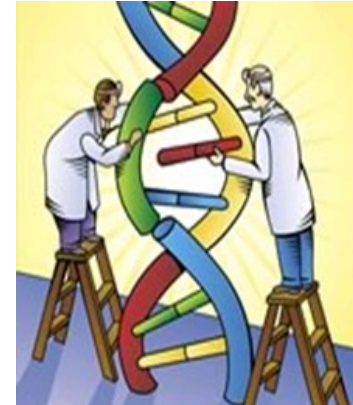
Biologická variabilita = charakteristika individua nebo systému (genetický základ a jeho variace, vývojové stádium, fyziologický stav, teplota, kultivační podmínky, sledované experimentální podmínky, atd.)

Biologickou variabilitu odlišit od **technologické variability** (zpracování a nanášení vzorku, čipy a jejich výroba, značení cDNA, hybridizace, RNA a cDNA amplifikace, skenování a skener)
 odlišit -pozadí od biologicky důležitých genů včetně těch exprimovaných na nízké úrovni
 -odlišit nespecifické změny (stresové reakce), atd.
 -kontaminace jinými buněčnými populacemi



Take home

Interdisciplinární charakter biomedicínského výzkumu
Biologický materiál užívaný pro účely molekulární medicíny
Odběr klinického materiálu (stabilita, archivace)
Laserová mikrodisekce
Izolace nukleových kyselin
Kvantifikace a stanovení kvality nukleových kyselin
Real-Time PCR (definice, způsoby detekce, absolutní a relativní kvantifikace)
Real-Time PCR arrays
DNA čipy (definice a základní členění)
cDNA čipy
oligonukleotidové čipy
Faktory ovlivňující čipové analýzy



Náplň příští přednášky

Moderní metodické přístupy v molekulární medicíně II – faktory ovlivňující čipové analýzy, základní statistické přístupy k analýze čipových dat, další čipové technologií SNP čipy, CGH čipy, mikroRNA čipy, ChiP–on-chip, využití genomiky pro molekulární klasifikaci nádorových onemocnění, jak navrhovat studie a jak číst publikace – výhody a limitace genomických metod

Dotazy?

