

C7188 Úvod do molekulární medicíny 4/12



Moderní metodické přístupy v molekulární medicíně II



GENOMIKA II



Ondřej Slabý & Jiří Šána

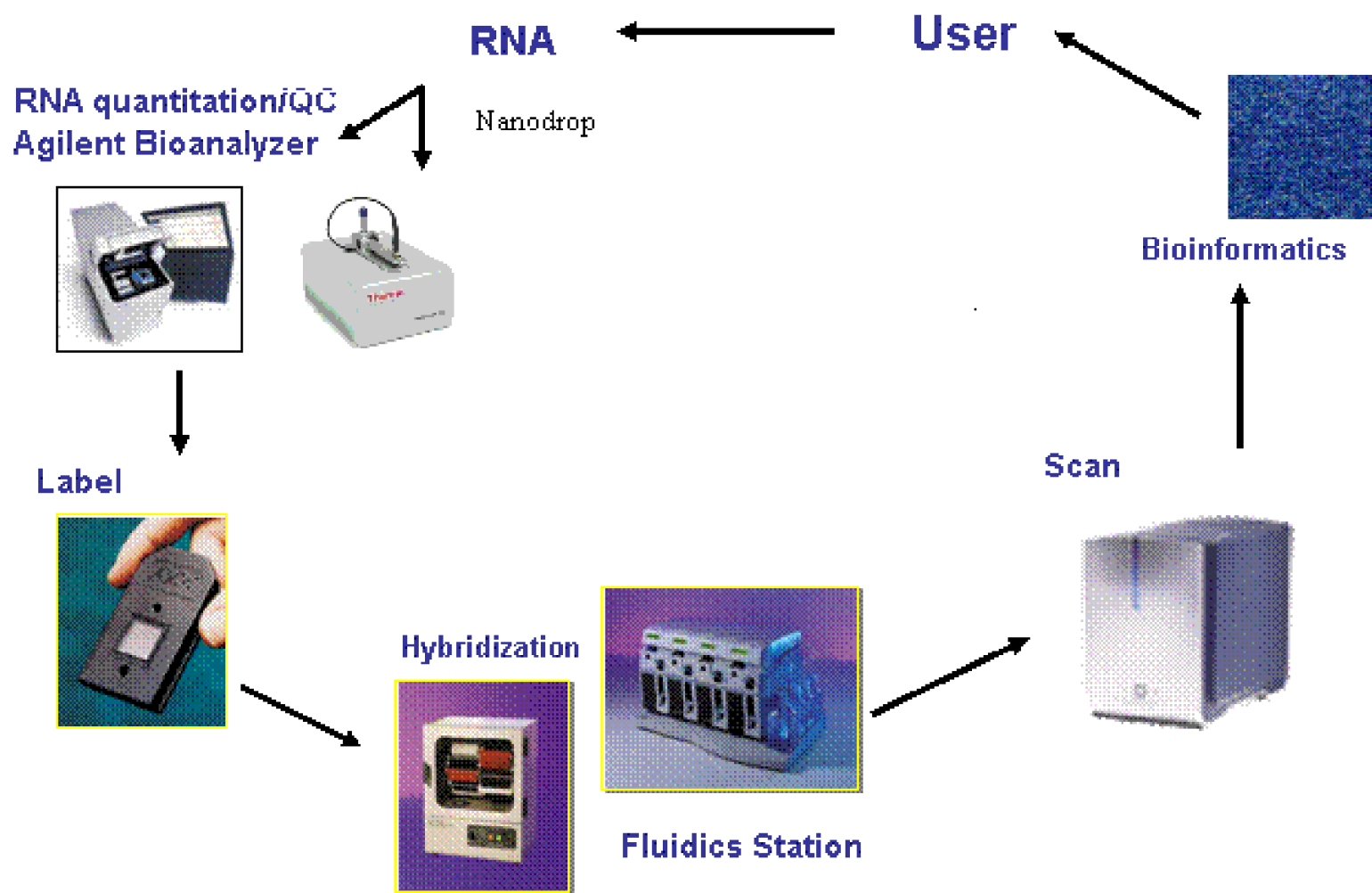
Lékařská fakulta & CEITEC, Masarykova univerzita

Masarykův onkologický ústav

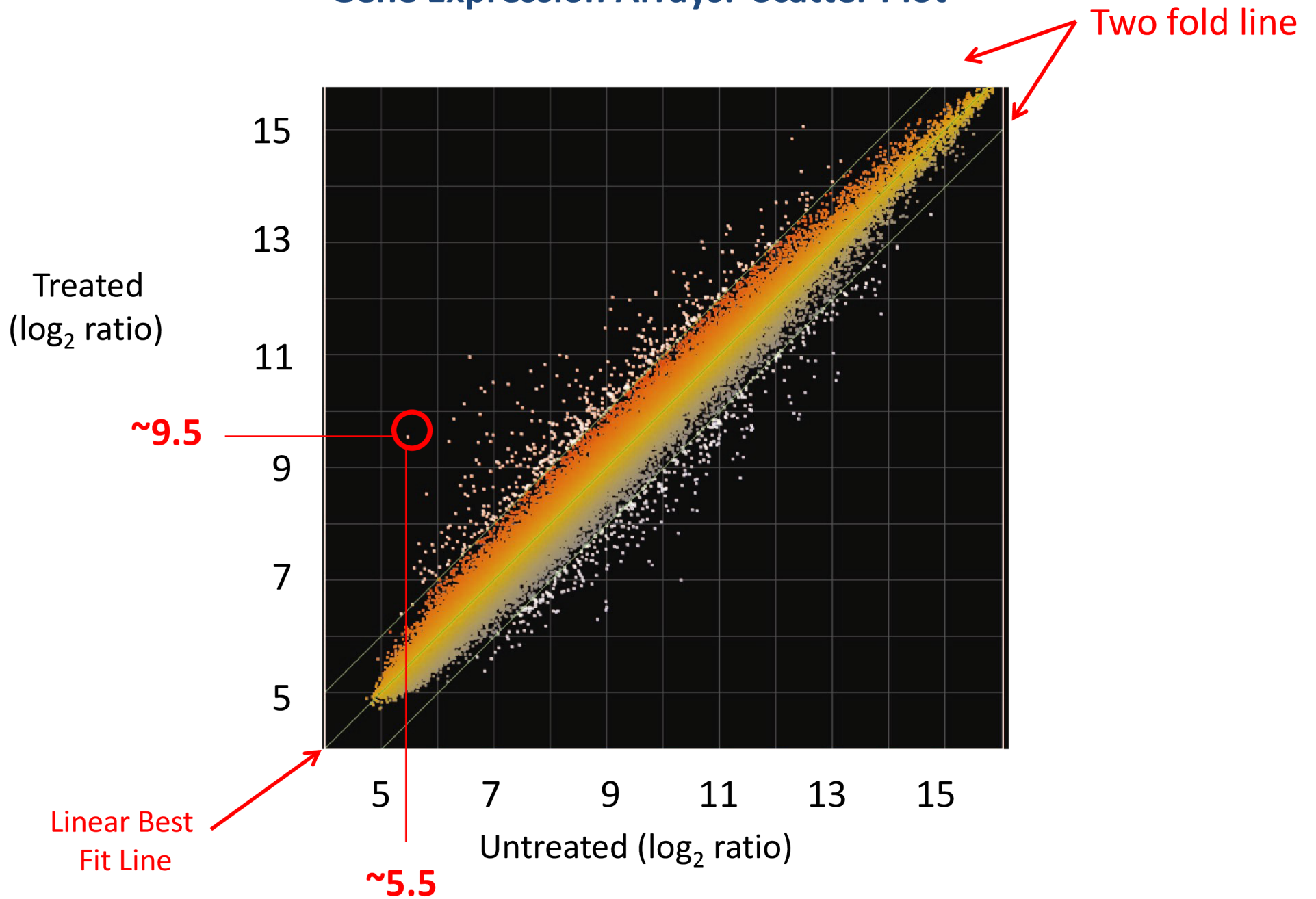
Fakultní nemocnice Brno



Microarray sample processing workflow



Gene Expression Arrays: Scatter Plot



Normalizace dat

ukázky normalizačních metod

-kompenzace nelinearity dat mezi jednotlivými čipy a uvnitř daného čipu

Pozitivní kontroly:

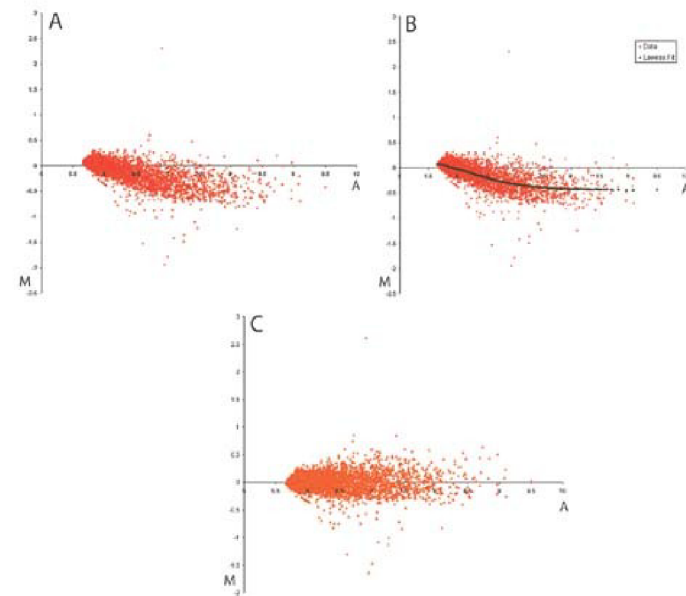
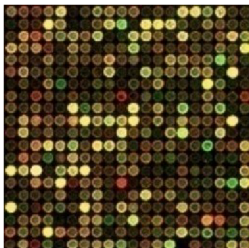
- “Housekeeping” geny s „konstantní“ expresí ve tkáních
- kontrolní genetický materiál (referenční vzorek)
- kontroly účinnosti hybridizace – arteficiální sekvence

Negativní kontrola:

- pozadí hybridizace
- Affymetrix - mutace v jednom nukleotidu sondy

Odečtení pozadí

– background subtraction (gridding, local background, median, empty spot,...)

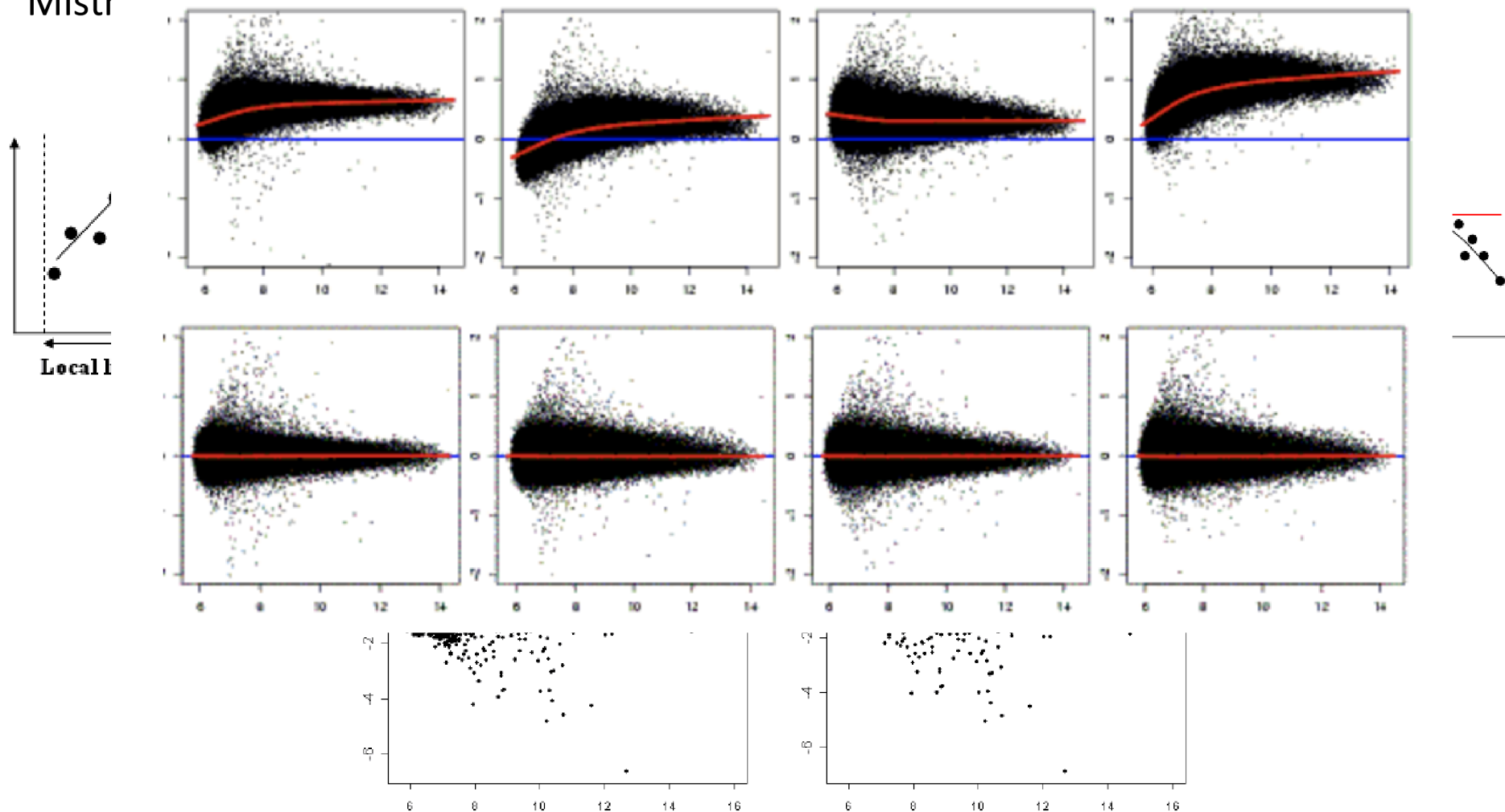


Normalizace Lowess: princip

Loess (or lowess) : Locally WEighted Scatterplot Smoothing (vyhlazování)

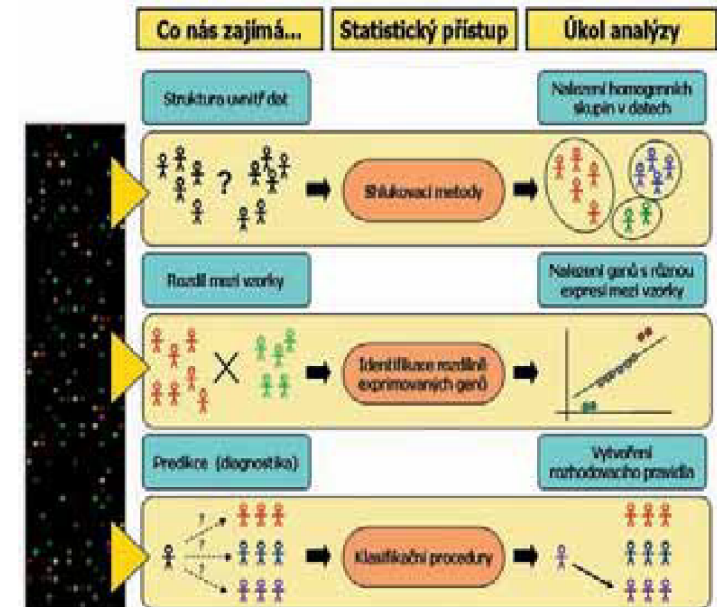
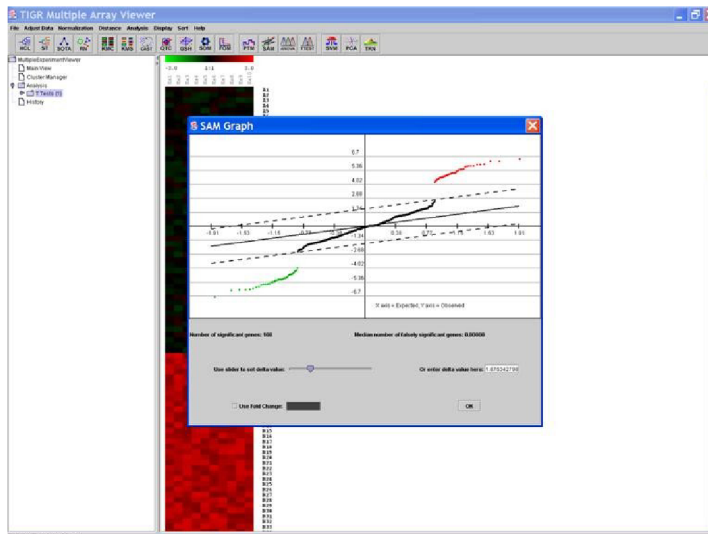
Normalizace závislá na intenzitě signálu

Místi



1) Identifikace biologicky významných genů

- geny s reprodukovatelnou signifikantně rozdílnou expresí mezi jednotlivými podmínkami experimentu
- poměr exprese v jednotlivých experimentech
- t-test (test rozdílnosti průměrů exprese v jednotlivých skupinách)
- Significance Analysis of Microarrays (SAM)** založeno na t-testu
- Multifaktoriální ANOVA (nejsignifikantnější geny pro dané skupiny)



TIGR MultipleExperiment Viewer (TMEV)
<http://www.tm4.org/>

2) Ukázky multidimenzionálních metod analýzy čipových dat

Shlukovací analýzy

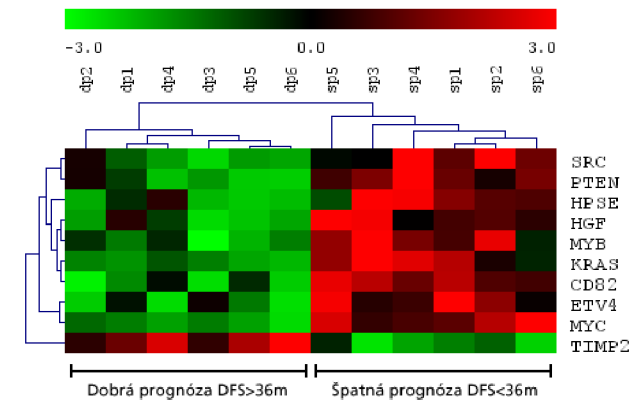
Shlukovací analýza je jednou z nejpoužívanějších vícerozměrných statistických metod

Jedná se o explorativní techniku, která se používá zejména v případech, kdy nemáme žádné *a priori znalosti* o struktuře uvnitř dat.

každý gen je reprezentován vektorem jehož souřadnice, jsou hodnoty exprese genu v jednotlivých experimentech, vzdálenost je měřena mezi vektory nebo centroidy

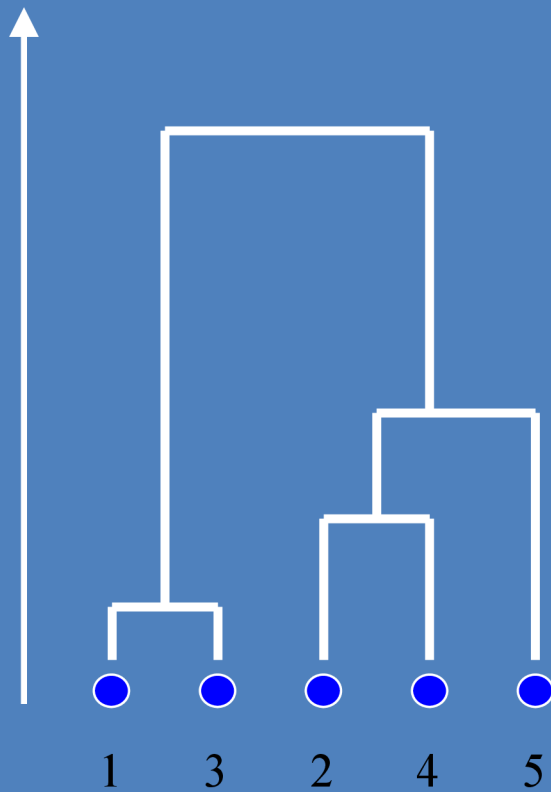
Ukolem shlukovacích metod je tedy najít v datech skupiny prvků (shluky) tak, že prvky jednotlivých skupin budou v jistém smyslu více podobné než prvky z jiných skupin, tzn. nalezené skupiny prvků budou co nejvíce homogenní

Snažíme se nalézt mezi zkoumanými geny (resp. biologickými vzorky) skupinky genů (resp. biologických vzorků), které vykazují v průběhu experimentu, tedy za působení specifických podmínek, podobné chování.



Hierarchické klastrování

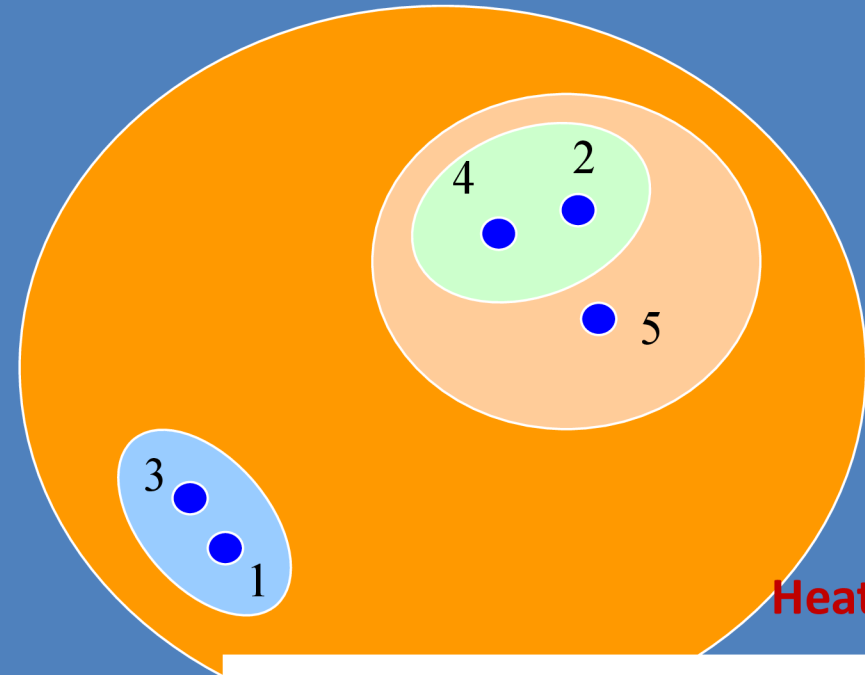
Vzdálenost mezi jednotlivými klastry



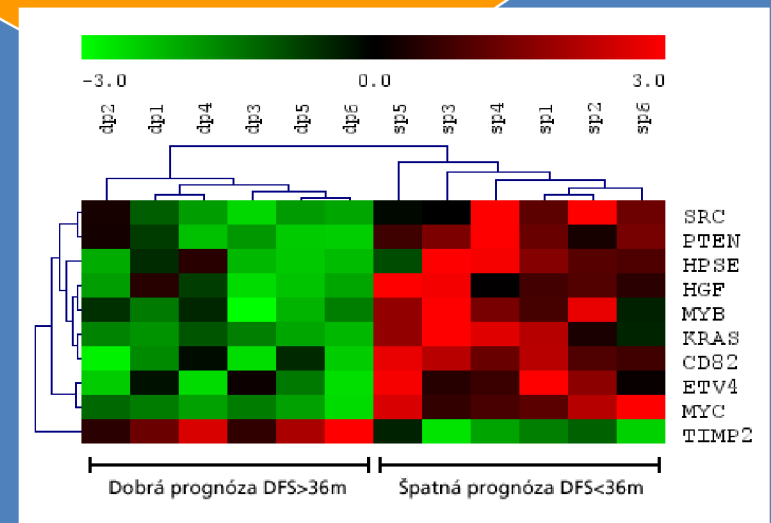
Dendrogram

Podobnost je vyjádřena hierarchickým stromem – dendrogram.

- 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



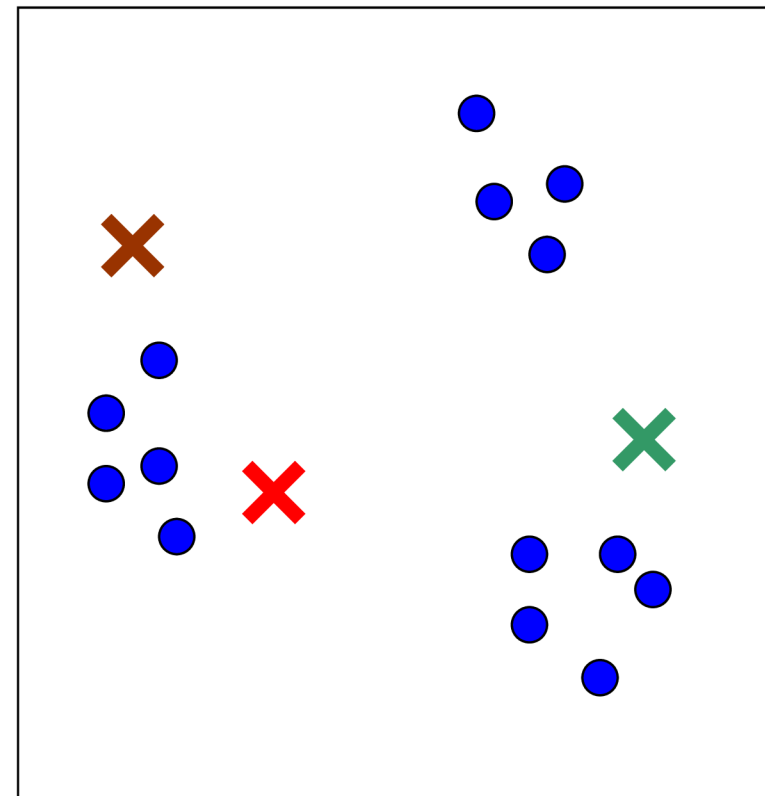
Heat map



Centroidové metody - K-means

minimalizovaná vnitroshluková variabilita a zároveň maximalizovaná mezishluková variabilita

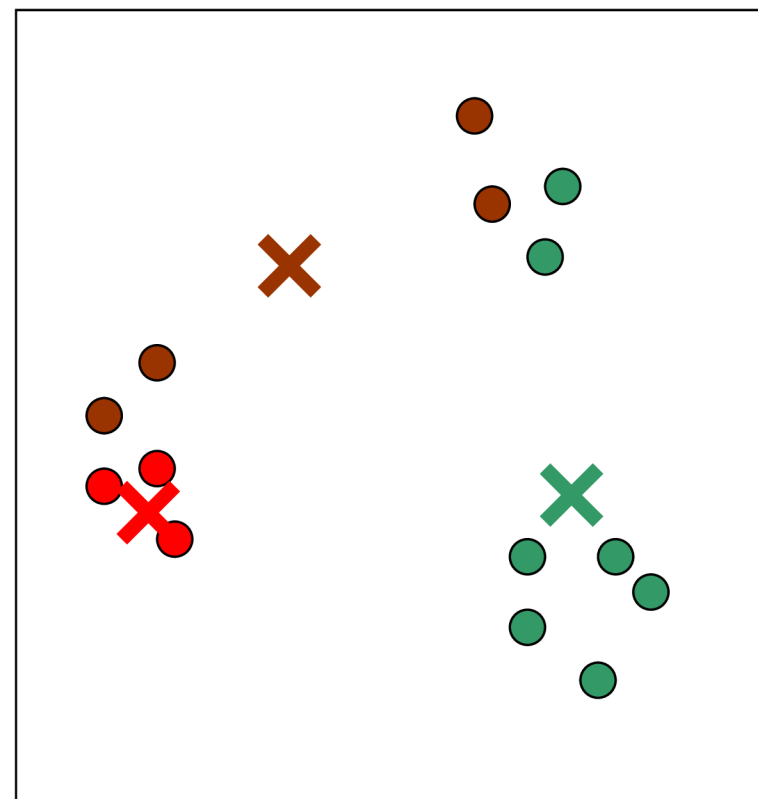
- start s náhodnou pozicí předem definovaného počtu K-centroidů
- opakovaný pohyb centroidů, dokud nedosáhnou stability a nezahrnou veškeré prvky systému



opakování = 0

Centroidové metody - K-means

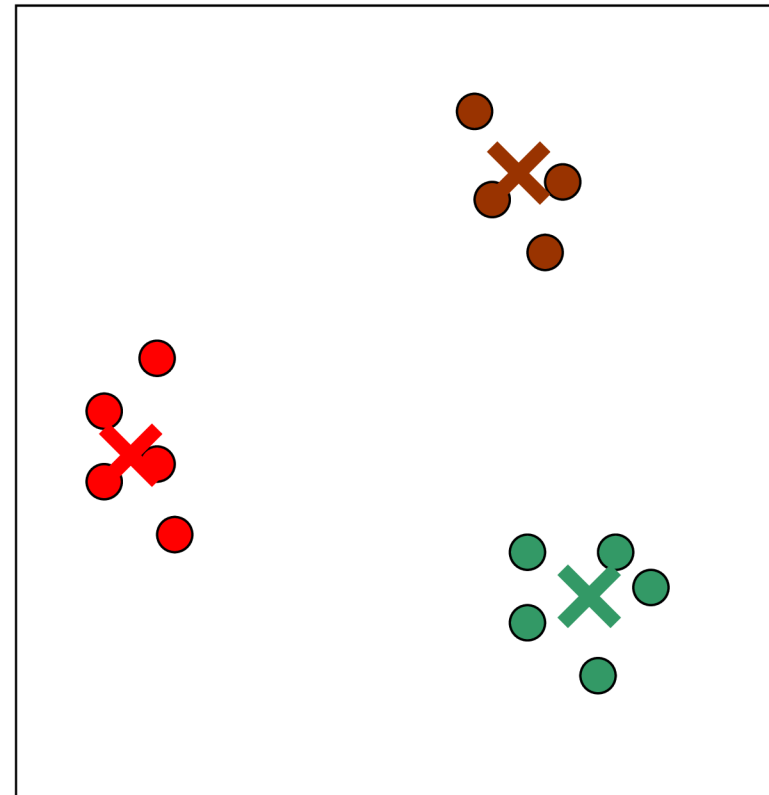
- start s náhodnou pozicí předem definovaného počtu K-centroidů
- opakovaný pohyb centroidů, dokud nedosáhnou stability a nezahrnou veškeré prvky systému



opakování = 1

Centroidové metody - K-means

- start s náhodnou pozicí předem definovaného počtu K-centroidů
- opakovaný pohyb centroidů, dokud nedosáhnou stability a nezahrnou veškeré prvky systému



opakování = 3

3) Klasifikační metody

Principem klasifikačních metod v analýze dat z DNA čipů je vytvoření rozhodovacího pravidla, které by na základě naměřených hodnot genové exprese umožňovalo přiřazení pacienta do jedné 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 stávajících diagnostických metod a výrazně tak přispět ke zpřesnění diagnostiky závažných onemocnění (klasifikační stromy, Support Vector Machines (SVM), metoda k-nejbližších sousedů,..)

MOLEKULÁRNÍ KLASIFIKACE NÁDORŮ:

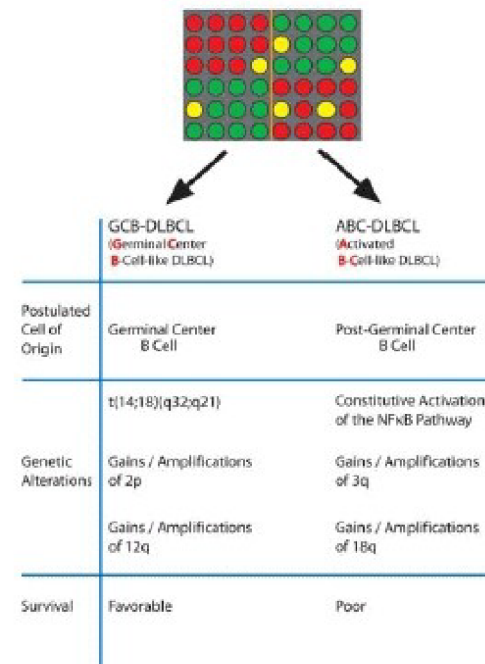
precizní klasifikace je základem léčebného úspěchu, současné metody jsou založeny na morfologii, imunohistochemii, genetice a klinické odpovědi

řada diagnostických nejasností (heterogenita)

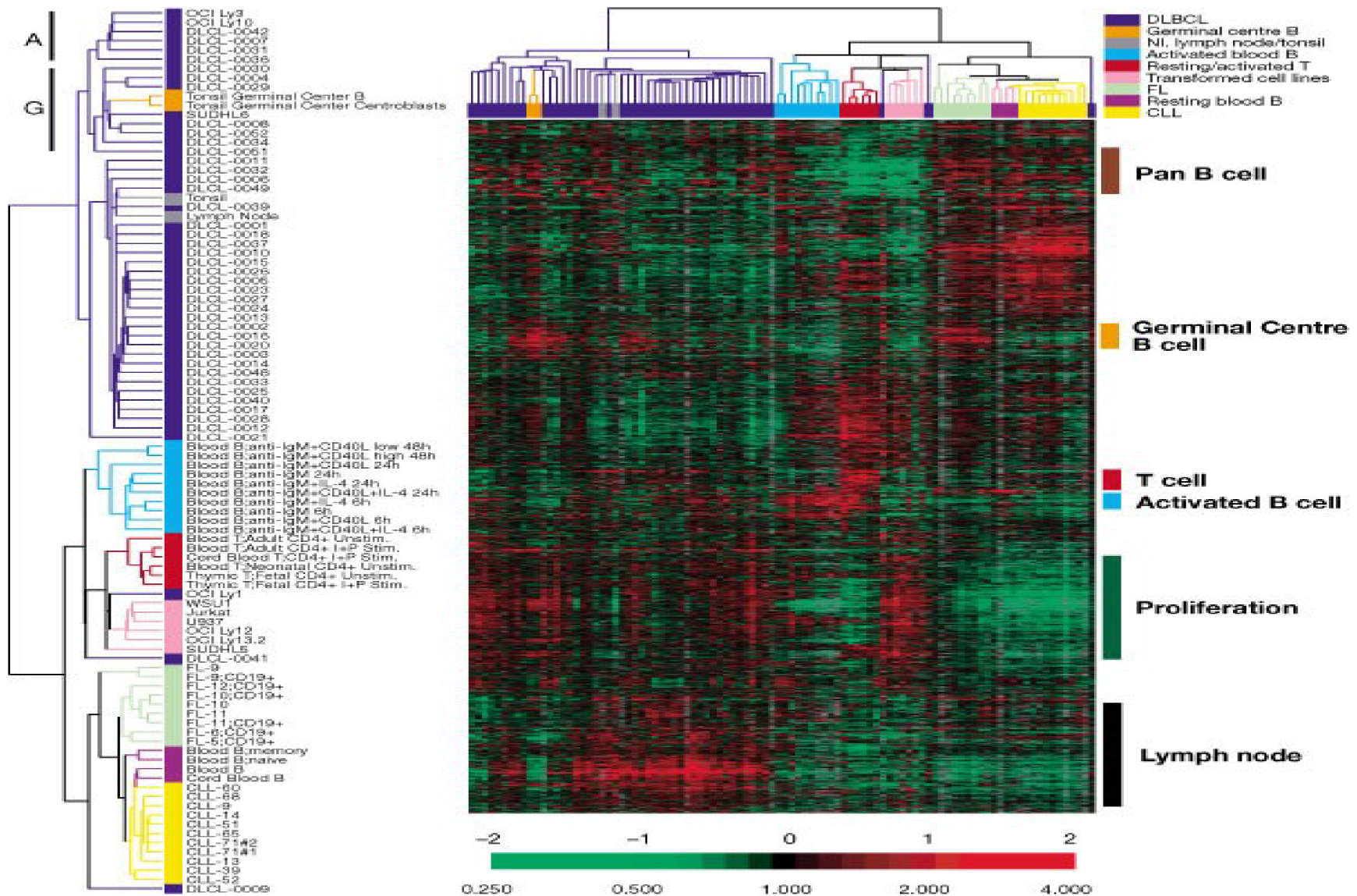
ČIPY:

- identifikace nových jednotek na podkladě profilu genové exprese
- reklasifikace stávajících jednotek
- identifikace skupin či jednotlivých genů „markerů“ specifických pro dané jednotky

Identification of Molecular Subgroups of Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL)

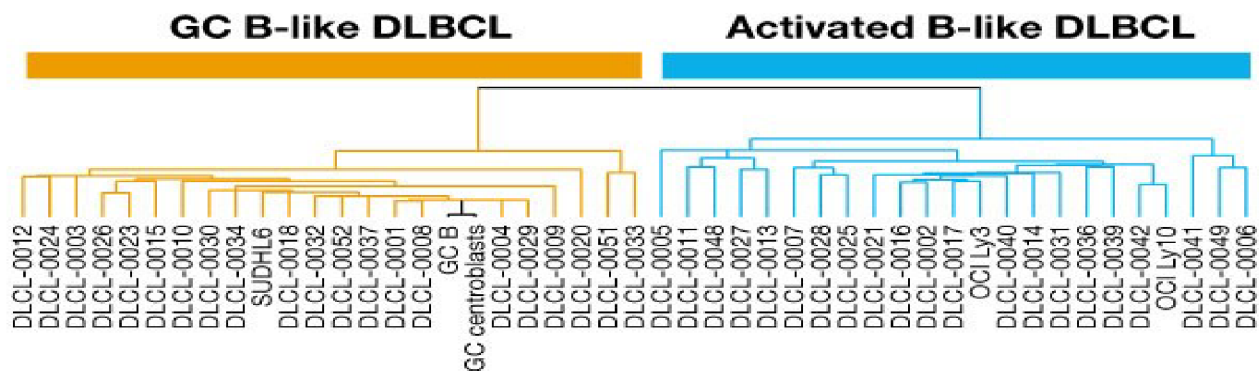
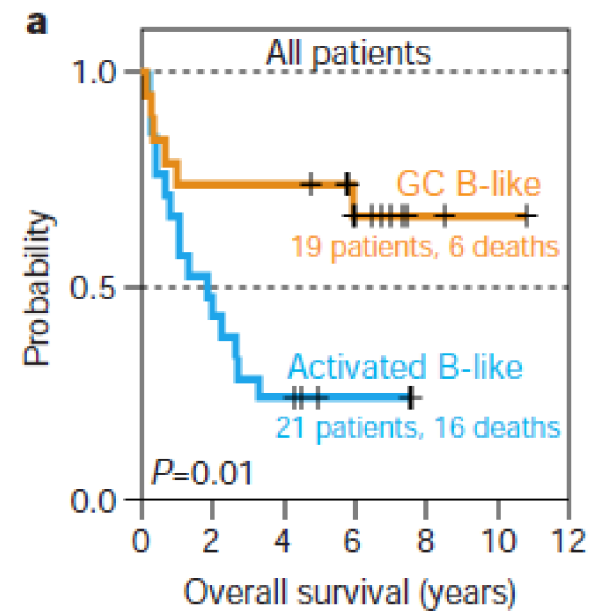
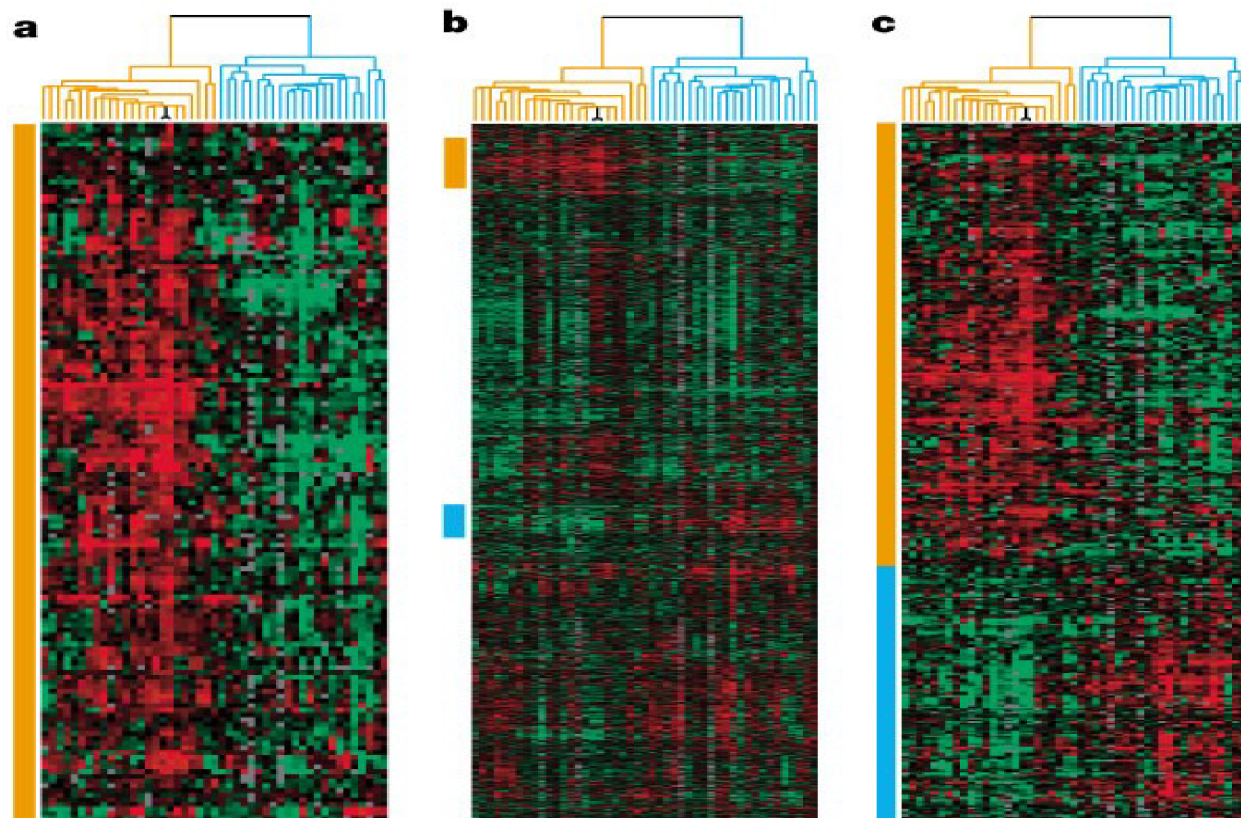


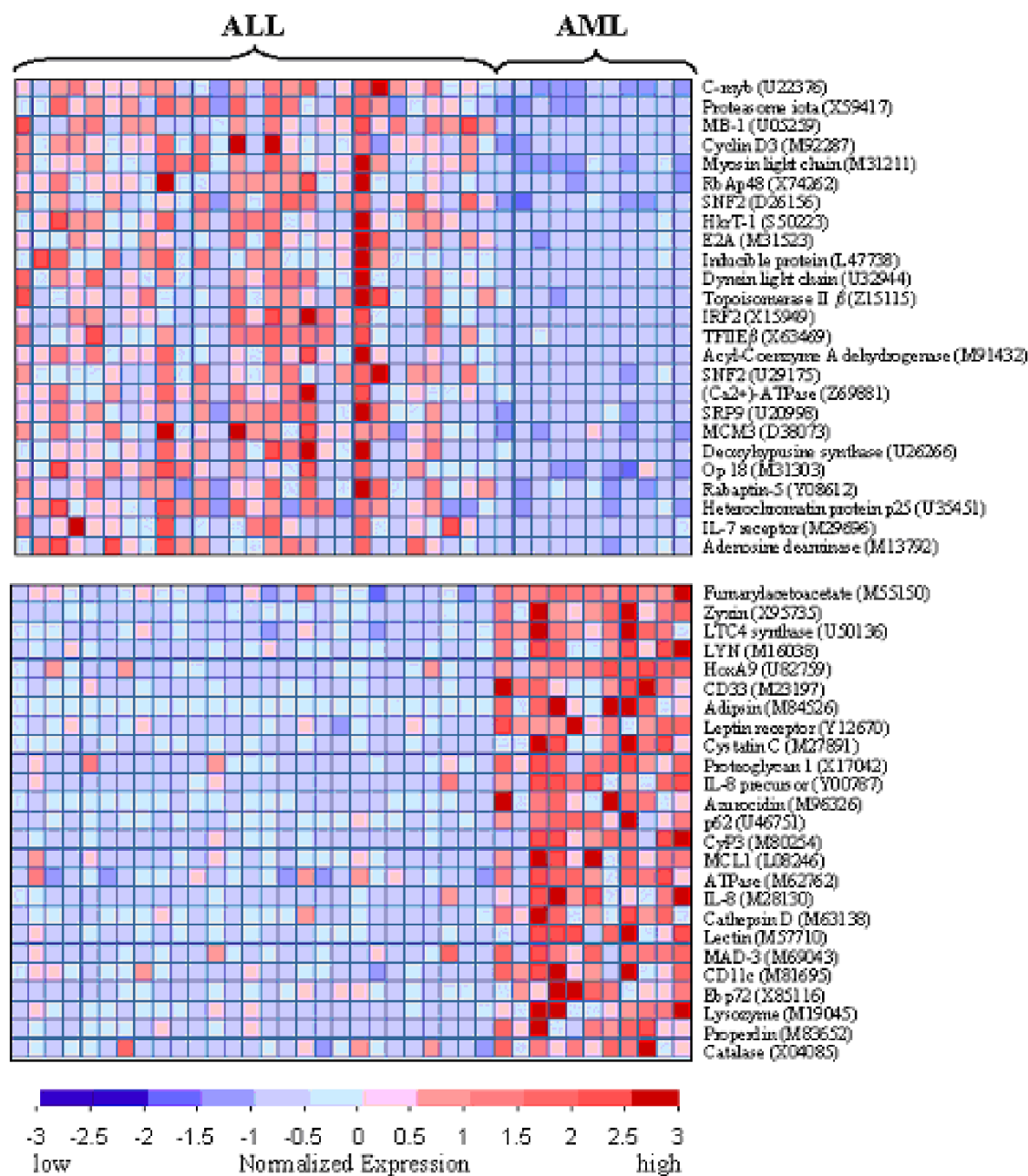
Molekulární klasifikace velkobuněčného B-lymfomu



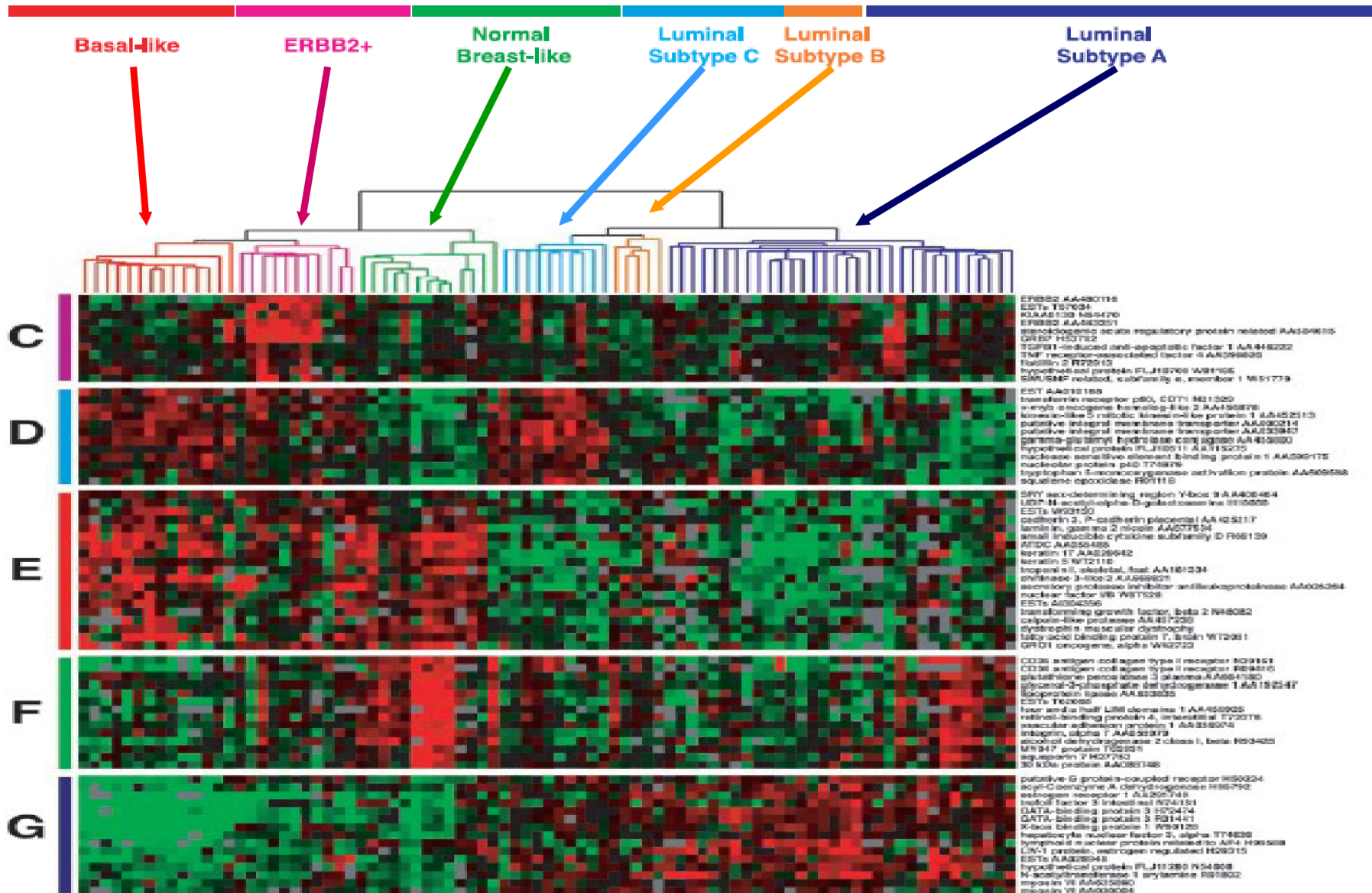
Vzato z: Nature February, 2000

Paper by Allzadeh. A et al *Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by Gene expression profiling,*





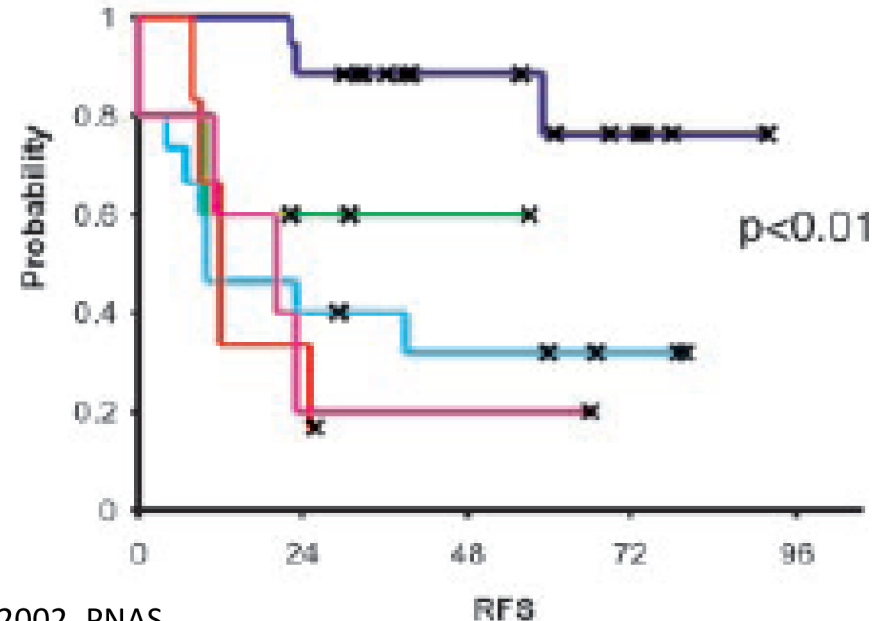
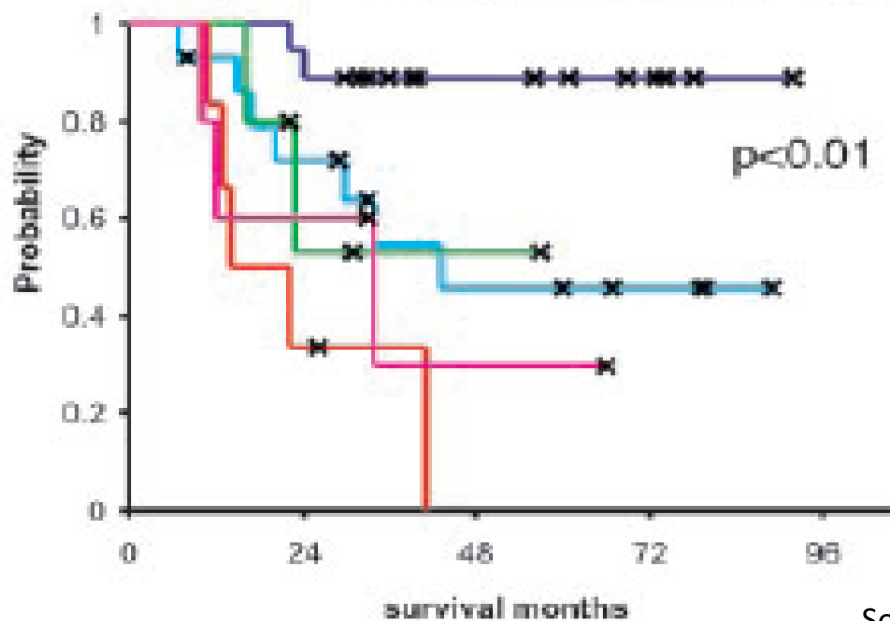
Molekulární klasifikace karcinoma prsu



Sorlie et al, 2002, PNAS

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, Normal B-like, Basal, ERBB2+

Predikce metastatického potenciálu u pacientek s časnými stádii mamárního karcinomu

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

96 sporadických mamárních karcinomů

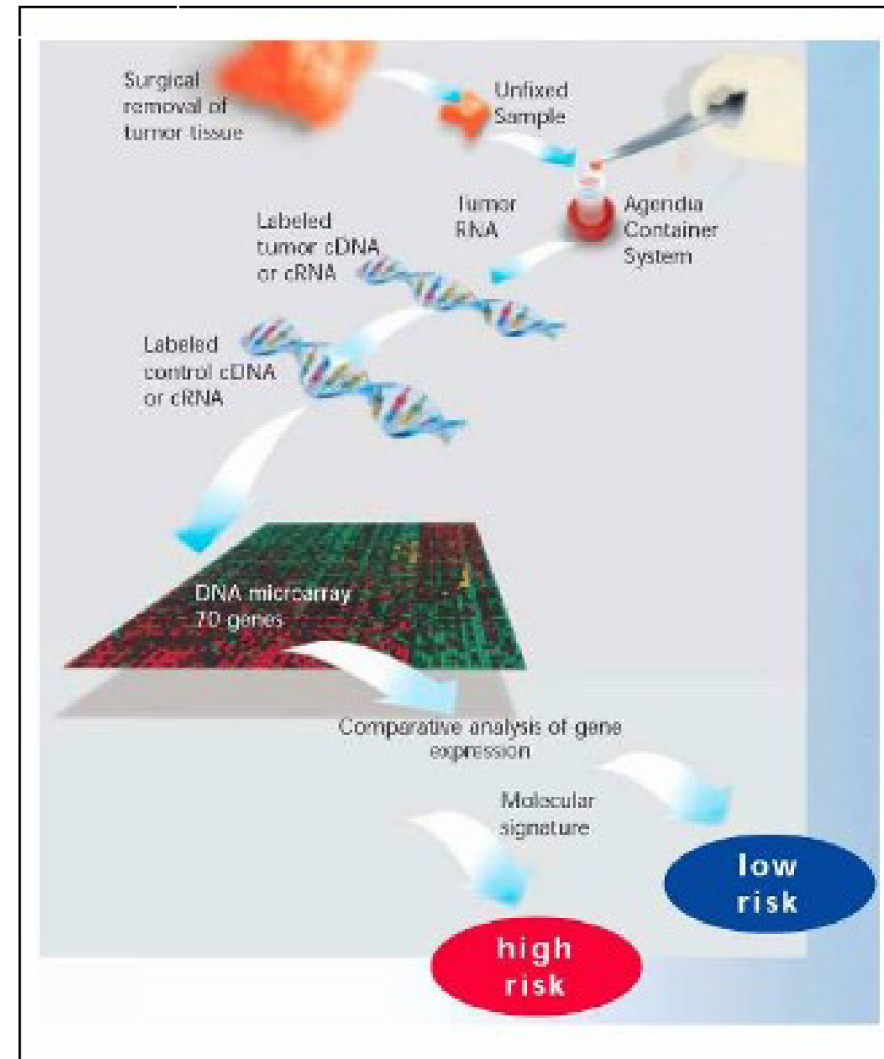
46 pacientek se špatnou prognózou (do 5 let se nevyvinuly vzdálené metastáze)

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

PROTOKOL KLINICKÉ STUDIE „MINDACT“

(Microarray In Node negative Disease may Avoid Chemotherapy)

Pacientky s karcinomem prsu: T1-3N0M0
Registrace do studie, rebiopsie tumoru a odesláním vzorku nativní tkáně do centra studie

Stanovení prognózy pacientek (riziko relapsu choroby):
1. "randomizace" pacienta
1. klinicko-patologický prognostický systém (Adjuvant OnLine)
2. 70-genový prognostický profil genové exprese tumoru

Oba prognostické systémy vyhodnotily nízké riziko časného relapsu choroby

Výsledky obou prognostických systémů jsou ve vzájemném rozporu

Oba prognostické systémy vyhodnotily vysoké riziko časného relapsu choroby

2. randomizace pacienta
Chemoterapie:
NE ANO

3. randomizace pacienta
Chemoterapie:
A) s antracyklinem
B) s kapecitabinem/docetaxelem

Hormonoterapie
NE: ER- ANO: ER+

Rozpočet ~ 20 mil. EUR

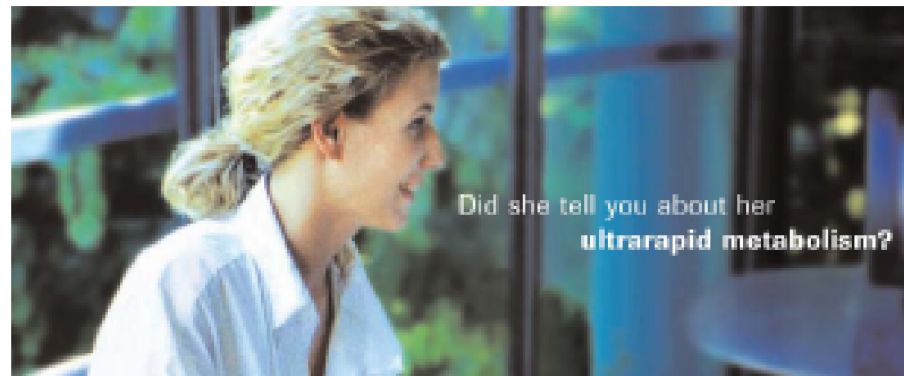
Pořádá síť
TRANSBIG

40 institucí 21 zemí

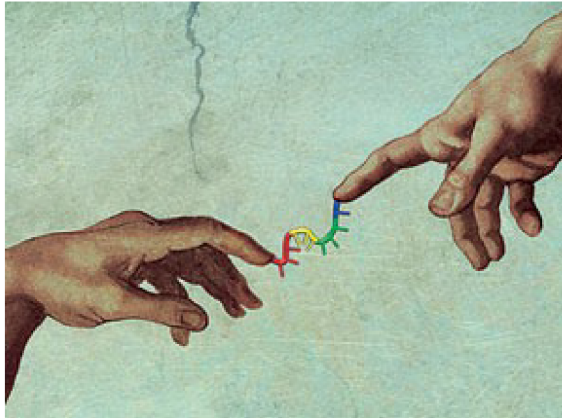
Zařazení 5000 pacientek
v prvních 3 letech

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

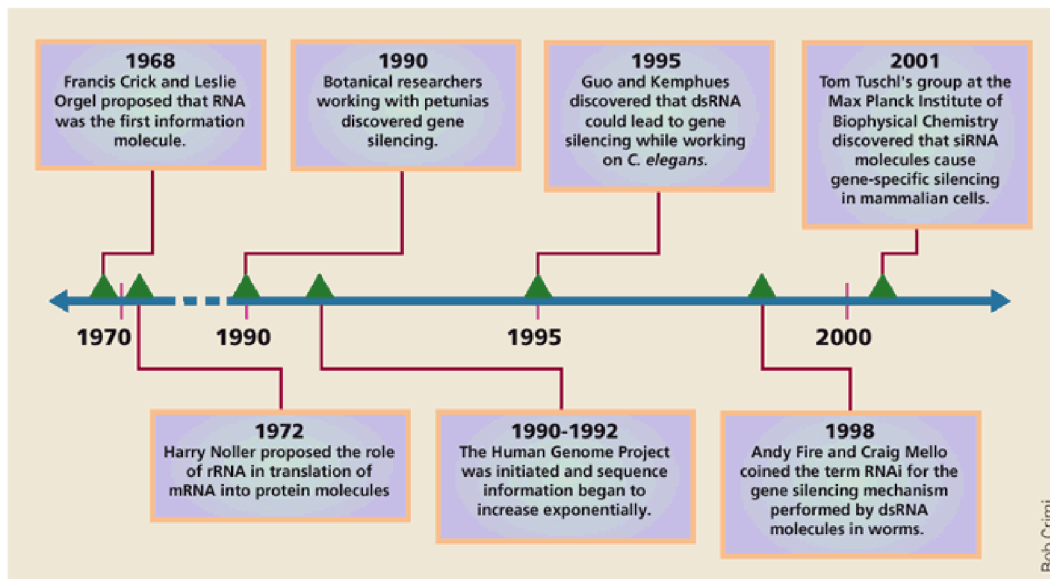


www.roche.com
www.amplichip.us

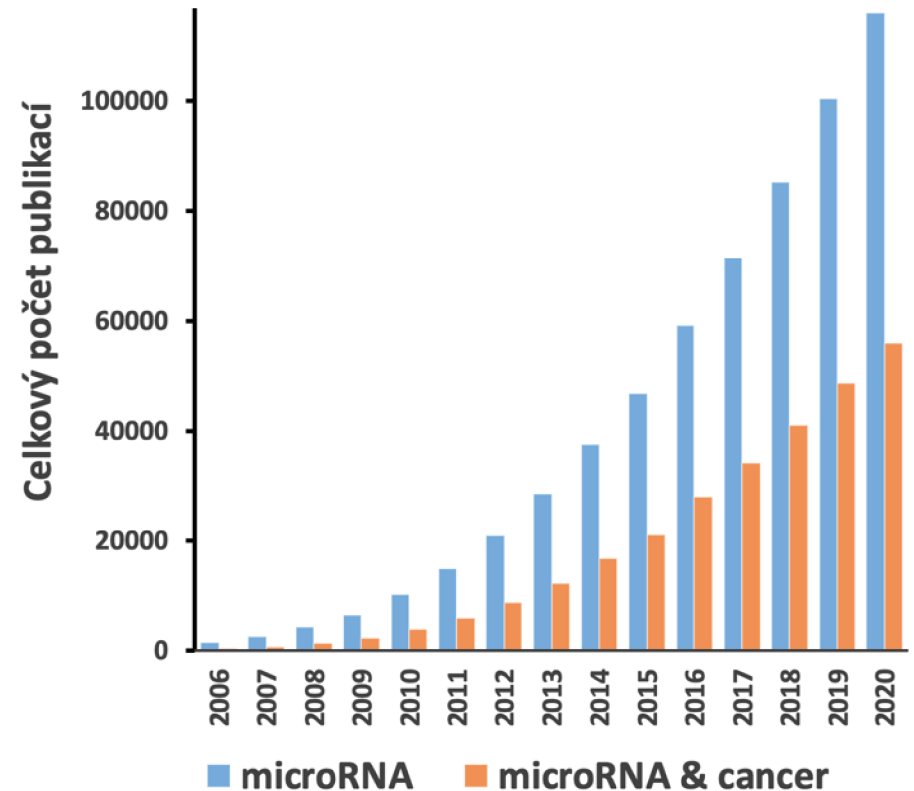


mikroRNA: nová úroveň regulace genové exprese mikroRNA čipy

Proč se zabývat výzkumem mikroRNA?



Nature Biotechnology 21, 1441 - 1446 (2003)



3.10.2020 PubMed - „MicroRNA AND Cancer“ – 20 995 odkazů
„MicroRNA“ – 60 724 odkazů

Proč se zabývat výzkumem mikroRNA?

The colorectal microRNAome

Jordan M. Cummins[†], Yiping He[†], Rebecca J. Leary[†], Ray Pagliarini[†], Luis A. Diaz, Jr.[†], Tobias Sjoblom[†], Omer Barad[†], Zvi Bentwich[†], Anna E. Szafranska[‡], Emmanuel Labourier[§], Christopher K. Raymond[¶], Brian S. Roberts[¶], Hartmut Juhl[¶], Kenneth W. Kinzler[†], Bert Vogelstein^{†,††}, and Victor E. Velculescu^{†,††}

PNAS | March 7, 2006 | vol. 103 | no. 10 | 3687–3692

A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets

Stefano Volinia^{**}, George A. Calin^{**}, Chang-Gong Liu^{*}, Stefan Ambros[§], Amelia Cimmino^{*}, Fabio Petrocca^{*}, Rosa Visone^{*}, Marilena Iorio^{*}, Claudia Roldo^{*}, Manuela Ferracin[§], Robyn L. Pruett[§], Nozomu Yanaihara[§], Giovanni Lanza[§], Aldo Scarpa[¶], Andrea Vecchione^{**}, Massimo Negrini[¶], Curtis C. Harris[§], and Carlo M. Croce^{**††}

PNAS | February 14, 2006 | vol. 103 | no. 7 | 2257–2261

MicroRNA Gene Expression Deregulation in Human Breast Cancer

Marilena V. Iorio¹, Manuela Ferracin², Chang-Gong Liu¹, Angelo Veronese², Riccardo Spizzo², Silvia Sabbioni⁴, Eros Magri², Massimo Pedriali², Muller Fabbri¹, Manuela Campiglio⁴, Sylvie Ménard², Juan P. Palazzo¹, Anne Rosenberg², Piero Musiani⁶, Stefano Volinia¹, Italo Nenci², George A. Calin¹, Patrizia Querzoli², Massimo Negrini², and Carlo M. Croce¹

Cancer Res 2005; 65: 1161. August 15, 2005

MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma

AE Szafranska¹, TS Davison¹, J John¹, T Connor¹, B Sipos², A Maghnooui¹, E Labourier^{1,4} and SA Hahn^{3,4}

Oncogene (2007), 1–11

A MicroRNA Signature Associated with Prognosis and Progression in Chronic Lymphocytic Leukemia

George Adrian Calin, M.D., Ph.D., Manuela Ferracin, Ph.D., Amelia Cimmino, M.D., Ph.D., Gianpiero Di Leva, Ph.D., Masayoshi Shimizu, B.S., Sylwia E. Wojcik, M.Sc., Marilena V. Iorio, Ph.D., Rosa Visone, Ph.D., Nurettin Ilfer Sever, Ph.D., Muller Fabbri, M.D., Rodolfo Iuliano, Ph.D., Tiziana Palumbo, Ph.D., Flavia Pichiorri, Ph.D., Claudia Roldo, M.D., Ramiro Garzon, M.D., Cinzia Sevignani, Ph.D., Laura Rassenti, Ph.D., Hansjuerg Alder, Ph.D., Stefano Volinia, Ph.D., Chang-gong Liu, Ph.D., Thomas J. Kipps, M.D., Ph.D., Massimo Negrini, Ph.D., and Carlo M. Croce, M.D.

N ENGL J MED 353:17 WWW.NEJM.ORG OCTOBER 27, 2005

MicroRNA expression profiles classify human cancers

Jun Lu^{1,4,†}, Gad Getz^{1,†}, Eric A. Miska^{2,†}, Ezequiel Alvarez-Saavedra², Justin Lamb¹, David Peck¹, Alejandro Sweet-Cordero^{3,4}, Benjamin L. Ebert^{1,4}, Raymond H. Mak^{1,4}, Adolfo A. Ferrando⁴, James R. Downing², Tyler Jacks^{2,5}, H. Robert Horvitz² & Todd R. Golub^{1,4,6}

nature

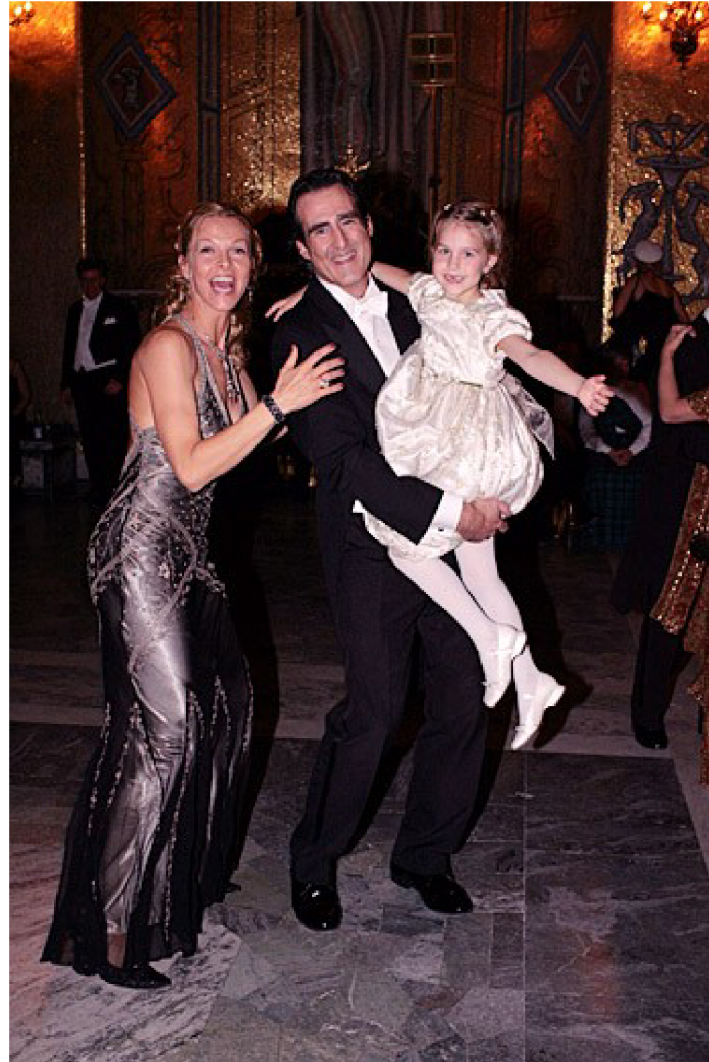
Vol 435|9 June 2005|doi:10.1038/nature03702

Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis

Nozomu Yanaihara¹, Natasha Caplen², Elise Bowman¹, Masahiro Seike¹, Kensuke Kumamoto¹, Ming Yi³, Robert M. Stephens³, Aikou Okamoto⁴, Jun Yokota⁵, Tadao Tanaka⁴, George Adrian Calin⁶, Chang-Gong Liu⁶, Carlo M. Croce⁶ and Curtis C. Harris^{1,*}

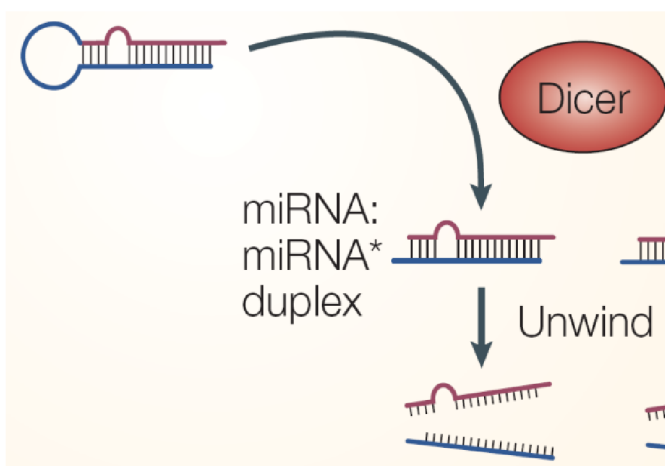
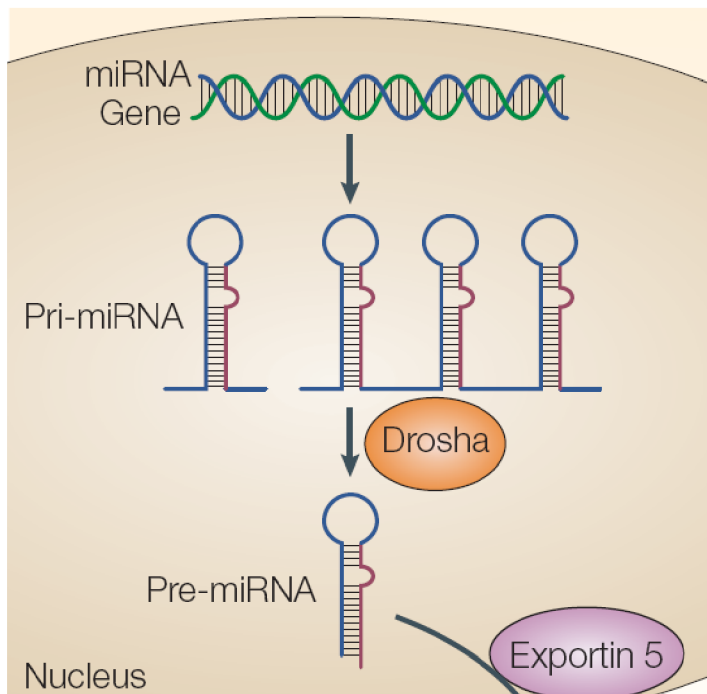
CANCER CELL 9, 189–198, MARCH 2006 ©2006 ELSEVIER INC. DOI 10.1016/j.ccr.2006.01.025

Proč se zabývat výzkumem mikroRNA?



Craig Mello na slavnostním banketu po udílení Nobelových cen za rok 2006.

Biogeneze a funkce mikroRNA

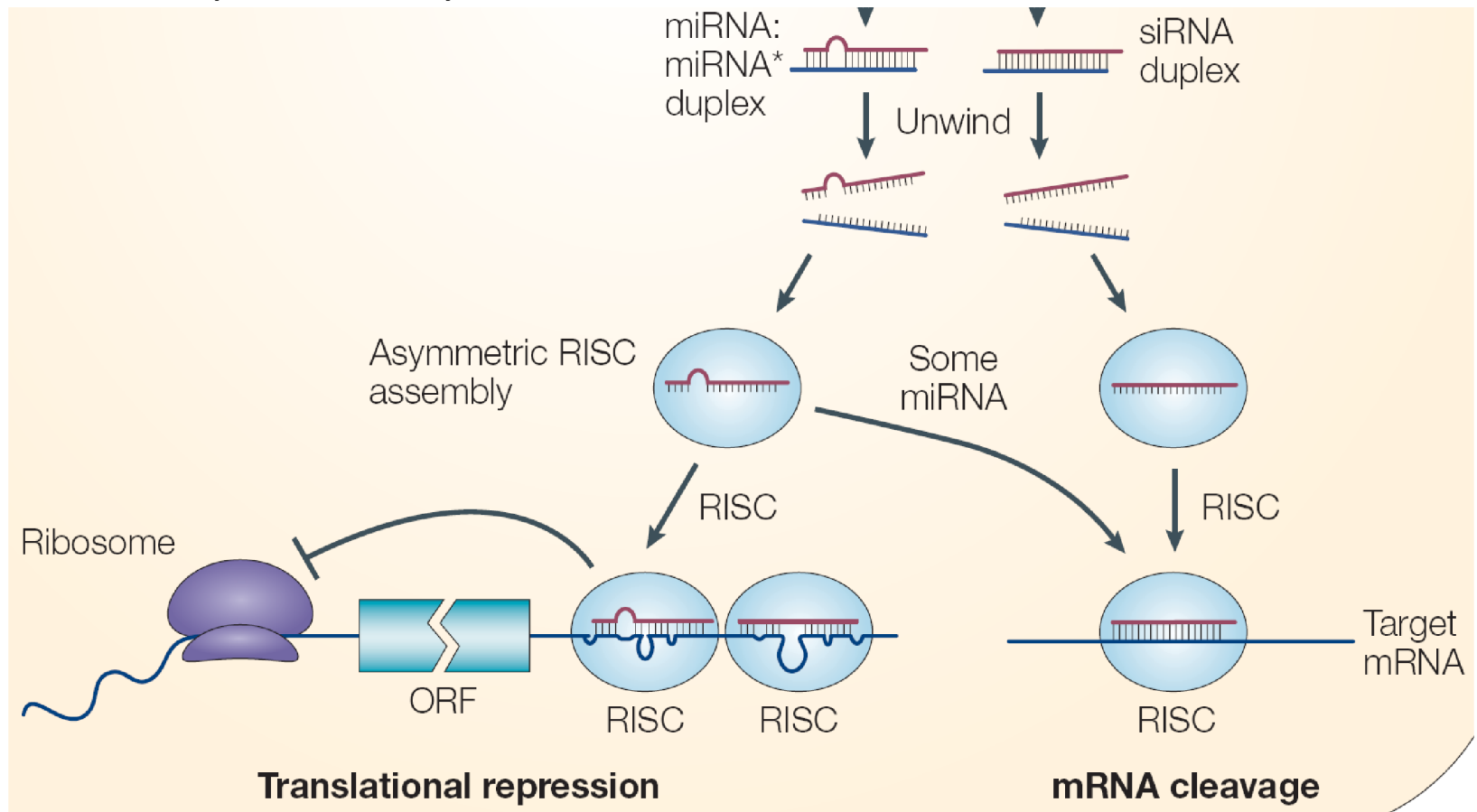


1. Transkripce miRNA genu
2. pri-miRNA jsou zpracovány pomocí RNáz Drosha a Pasha
3. pre-miRNA exportovány pomocí Exportinu 5 do cytoplazmy
4. Zpracování pomocí RNázy Dicer

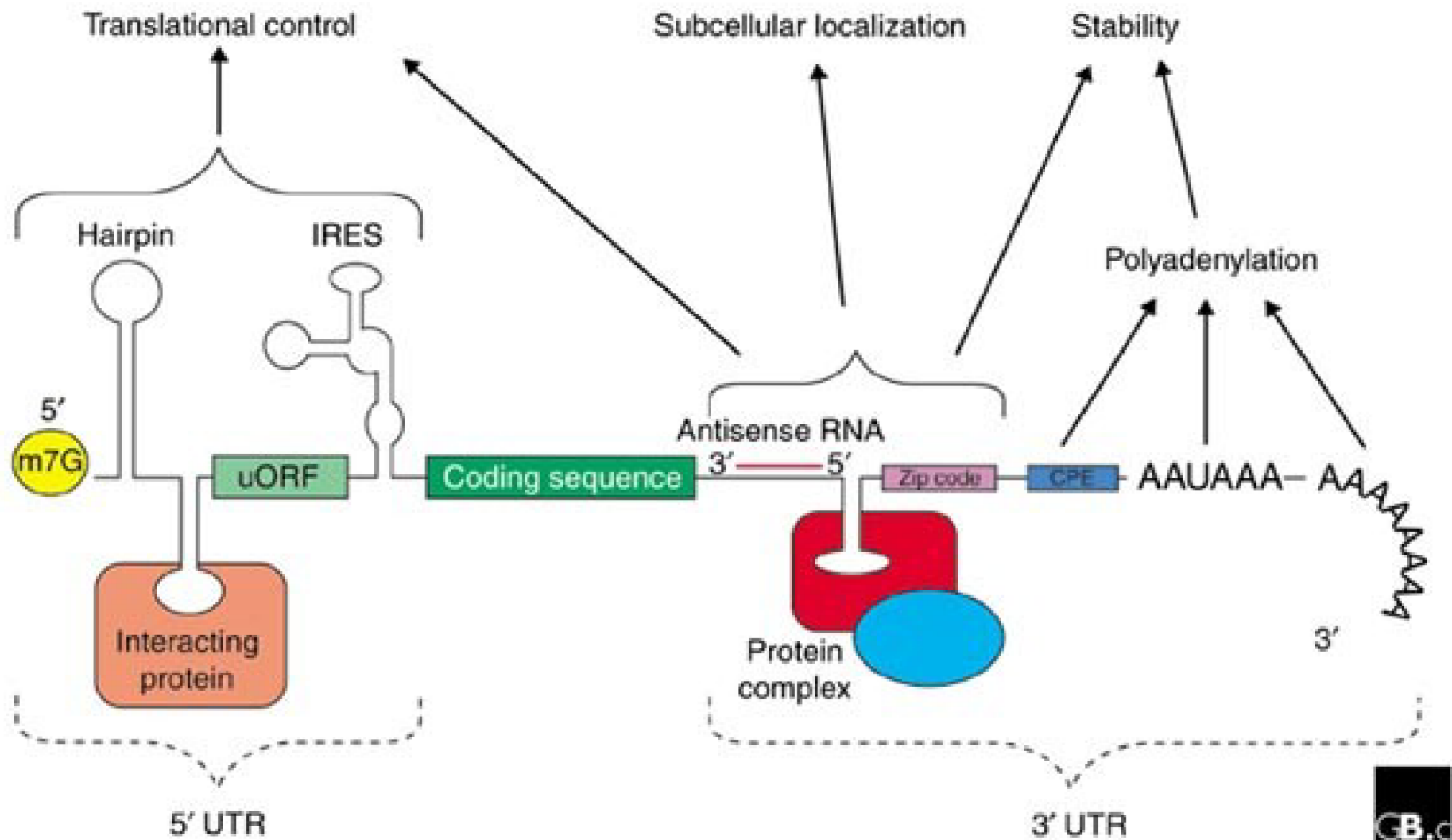
microRNA: licensed to kill messenger

5. Aktivní vlákno je inkorporováno do komplexu RISC
6. Represe translace nebo degradace mRNA v závislosti na míře komplementarity

Biogeneze a funkce mikroRNA

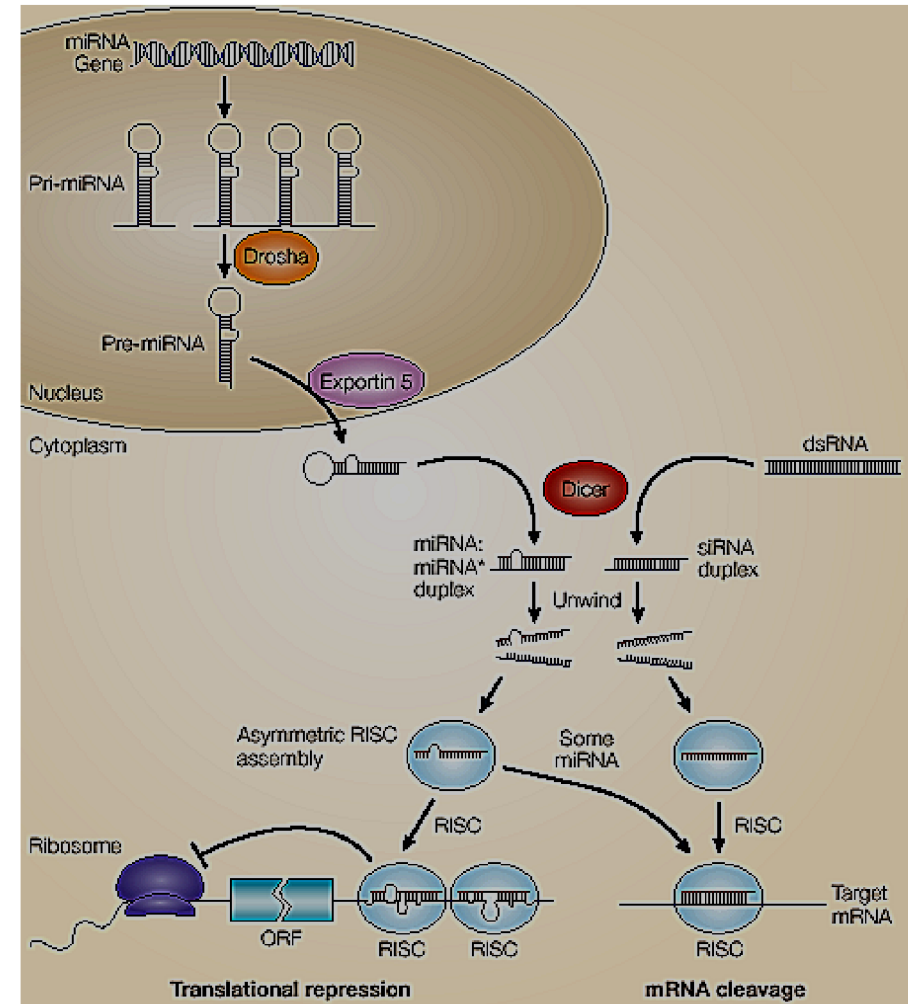


Struktura mRNA - interakce regulačních oblastí



Jaký je rozdíl mezi miRNA a siRNA?

- Funkce obou je regulace exprese
- siRNA je původem dsRNA
- siRNA souvisí s cizorodou RNA (obvykle virovou) a je 100% komplementární
- miRNA je původně ssRNA, která formuje vlásenkové dsRNA struktury
- miRNA reguluje post-transkripční genovou expresi



He and Hannon, *Nature Reviews Genetics*, 2004

Základní fakta o mikroRNA

miRNA poprvé popsal Ambros a kol. (1993) u *C. elegans* (*lin-4*)

Přibližně 3% predikovaných lidských genů jsou geny pro miRNA (> 1000 miRNA)

miRNA mají potenciál regulovat asi 1/3 kódujících genů

Některé miRNA jsou kódovány více než jedním genem

Geny kódující miRNA jsou často klastrovány (klastr *miR-17*)

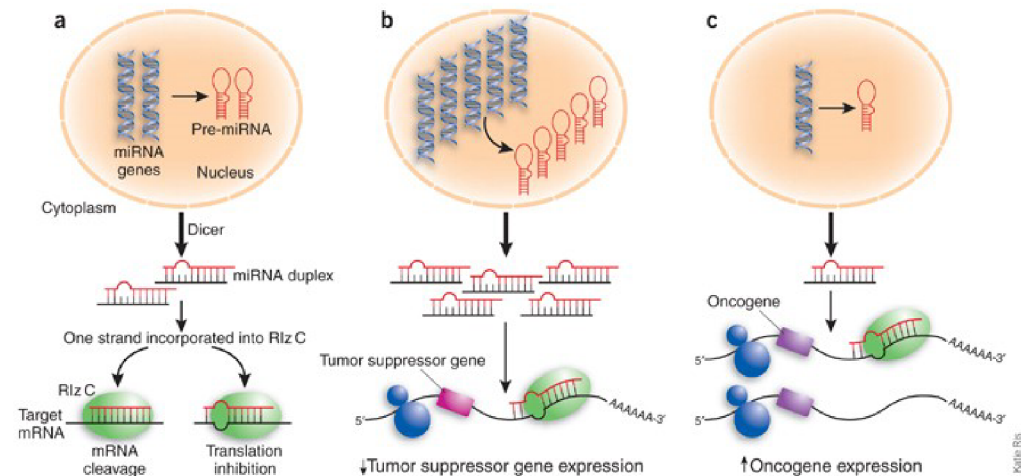
Geny miRNA jsou lokalizovány v mezigenových oblastech

v intronových oblastech nebo antisense řetězcích známých genů

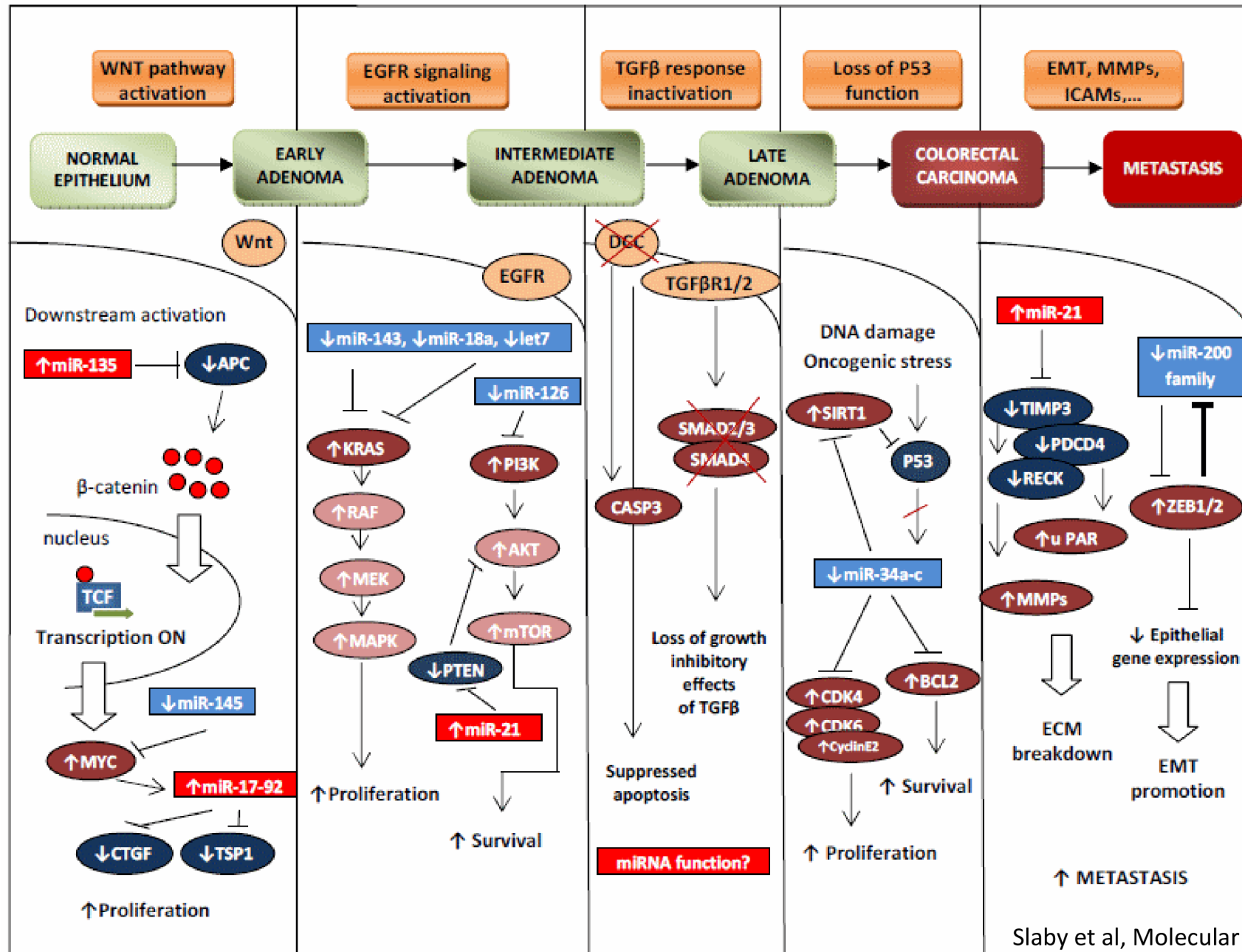
miRNA family members can be very similar eg *let-7* family:

```

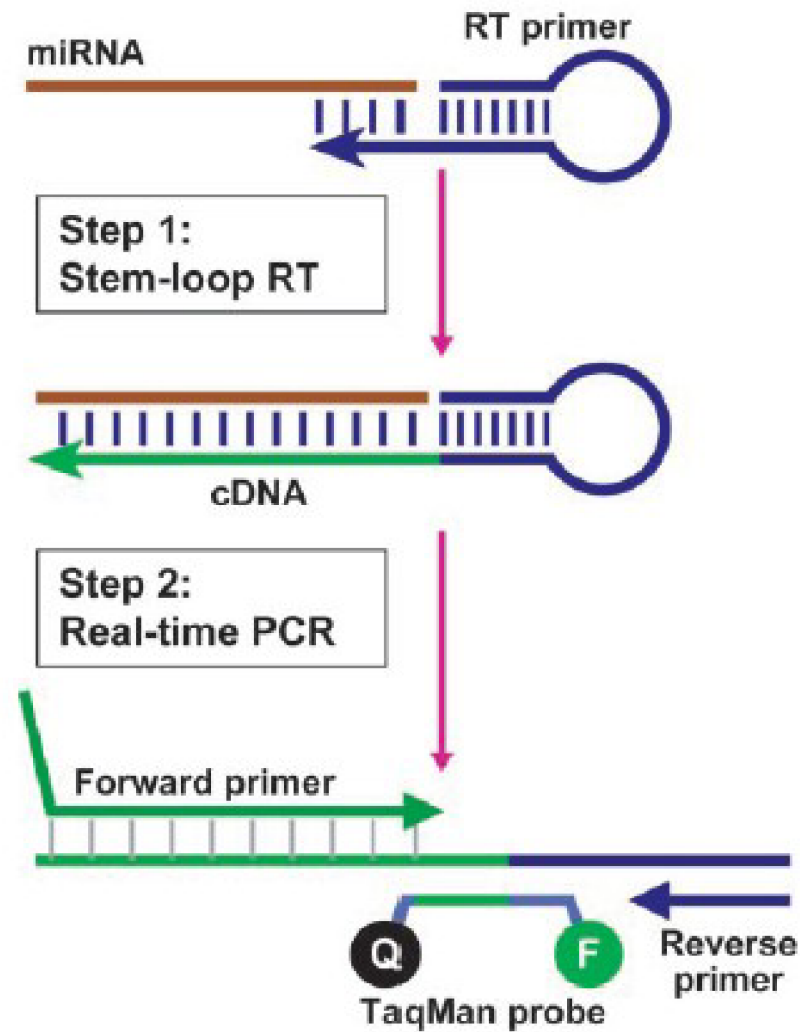
mmu-let-7a:  UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU
mmu-let-7b:  UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
mmu-let-7c:  UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU
mmu-let-7d:  AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU
mmu-let-7e:  UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUU
mmu-let-7f:  UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU
mmu-let-7g:  UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU
mmu-let-7i:  UGAGGUAGUAGUUUGUGCUGUU
  
```



Zapojení mikroRNA do Vogelsteinova modelu kolorektálního karcinomu



Real-Time PCR – modifikovaná TaqMan technologie ke kvantifikaci miRNA



mikroRNA čipy

Hybridizační čipy – analogická technologie jako u DNA čipů

Ambion, Exiqon, Agilent, Affymetrix, Invitrogen NCode

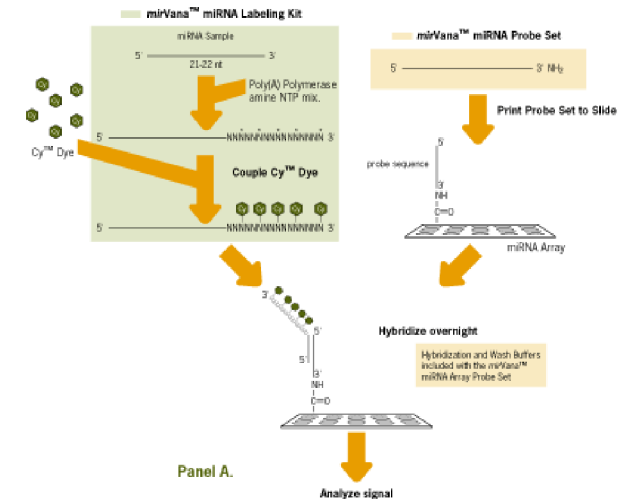
Real-Time PCR čipy

Applied Biosystems

Low density arrays (LDA)

microRNA array verze 2.0 (panel A+B)

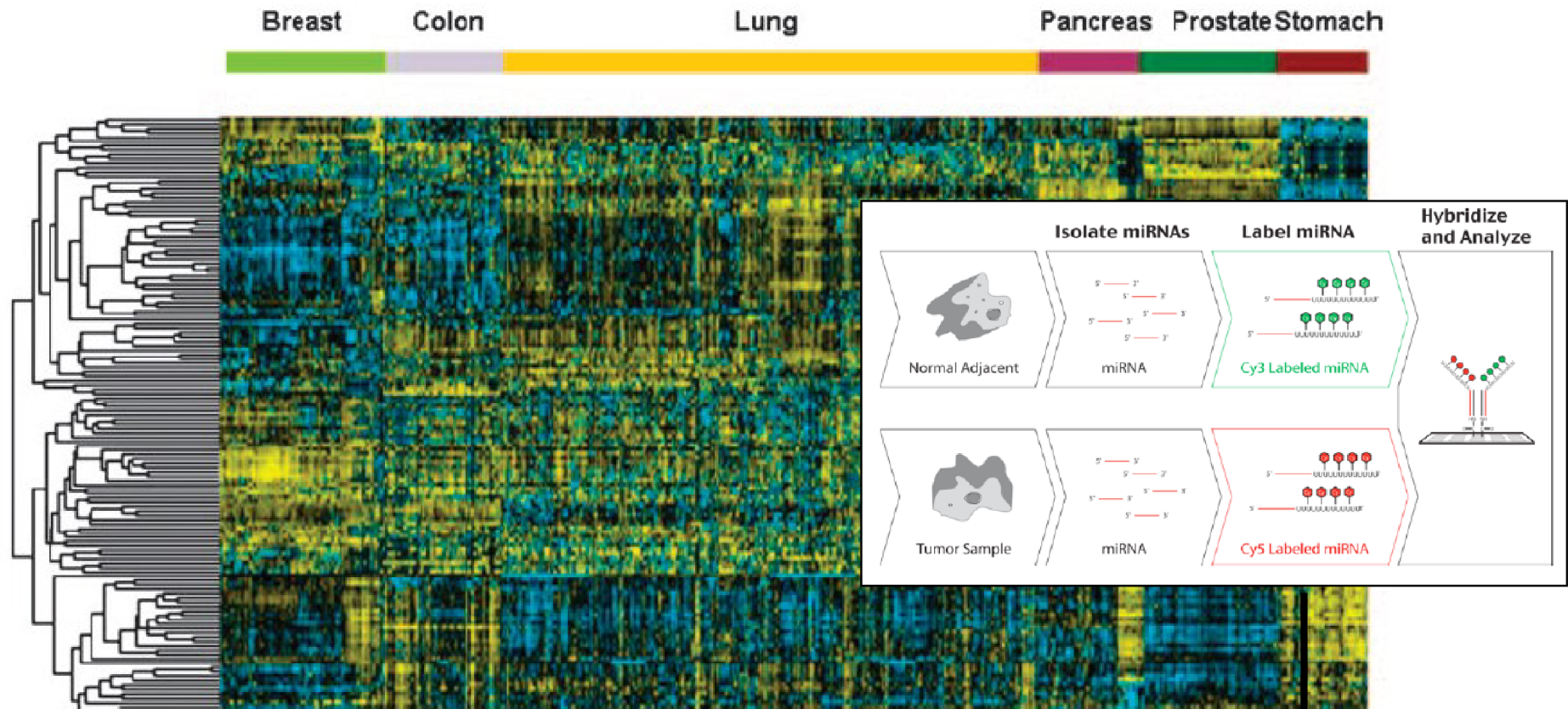
QuantiMir, SABiosciences, miRANDA



LDA mikrofluidní destička (384 miRNA)

Význam mikroRNA v nádorové biologii

Rozdílné expresní profily mezi nádorovou a nenádorovou tkání



Volinia et al., PNAS, 2006

Shluková analýza 540 vzorků šesti druhů solidních nádorů a příslušných nenádorových tkání.

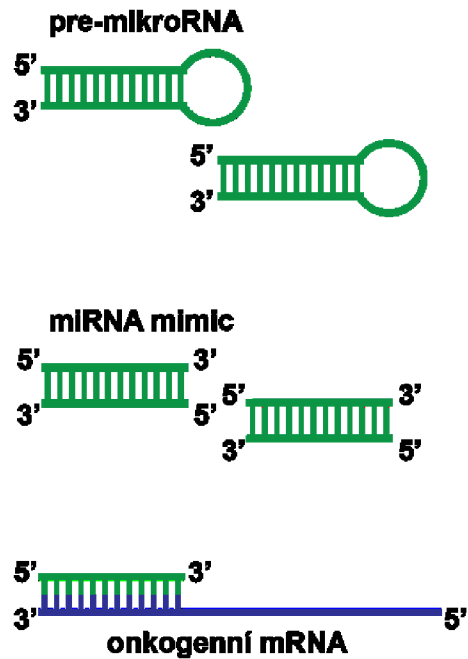
Žlutá znamená zvýšenou expresi oproti kontrolnímu (nenádorovému) vzorku

Biotechnologické společnosti zaměřené na miRNA diagnostiku

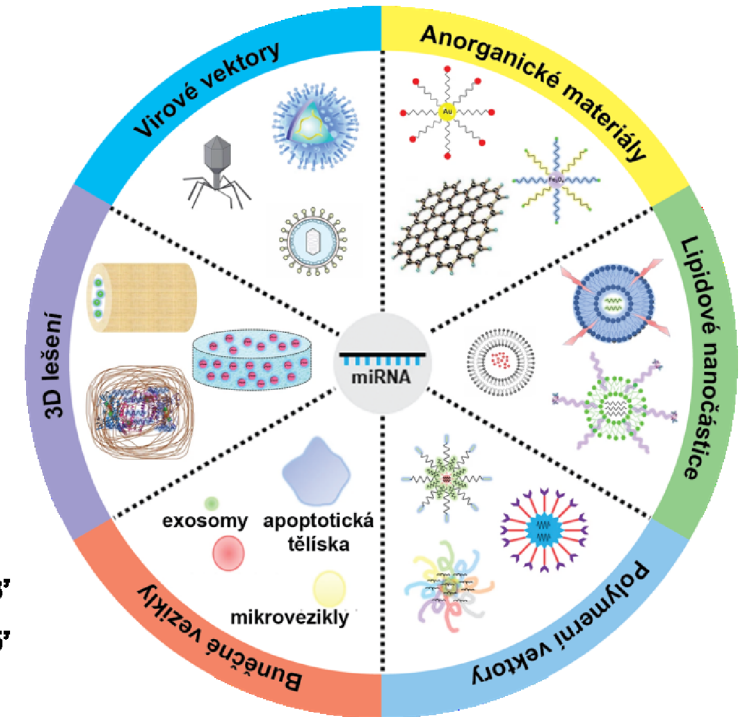
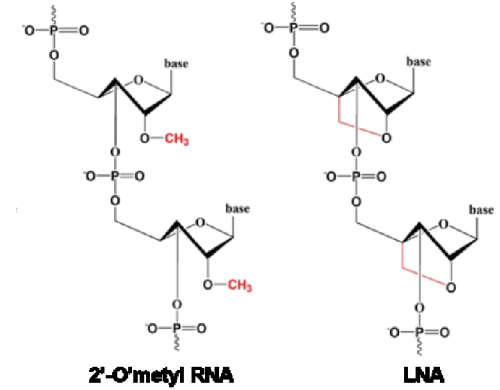
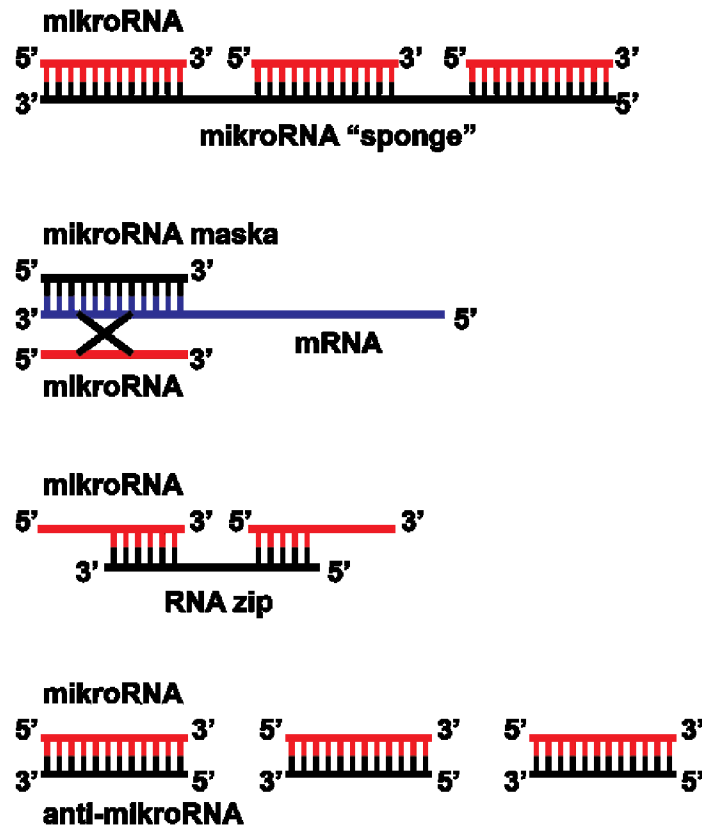
Společnost	Produkt	miRNA	Typ onemocnění	Fáze vývoje
MiRXES	GASTROClear	Panel s 12 miRNA	Nádor žaludku	Dostupné
Interpace Diagnostics/Asuragen	ThyraMIR/ThyGENX	miR-29b-1-5p miR-31-5p miR-138-1-3p miR-139-5p miR-146b-5p miR-155 miR-204-5p miR-222-3p miR-375 miR-551b-3p	Nádory slinivky a štítné žlázy	Dostupné
Rosetta Genomics/Precision Therapeutics	miRview mets	Panel (neznámé)	Identifikuje původ nádoru	Dostupné
Genoptix	Reveal	Panel (neznámé)	Nádor štítné žlázy	Dostupné
TA miRNA	OsteomiR	Panel s 19 miRNA	Osteoporóza	Dostupné
	ThrombomiR	Panel s 11 miRNA	Kardiovaskulární onemocnění	Dostupné
Hummingbird Diagnostics	-	Panely (neznámé)	Nádory, srdce, mozek	Fáze I
DiamiR	CogniMIR	Panel (neznámé)	Alzheimer	Fáze I
	-	Panel (neznámé)	Onemocnění mozku	Fáze I
Mirnext	-	Panel s miR 423-5p	Srdeční selhání	Preklinická fáze
Quanterix/DestiNA Genomics	Simoa	miR-122	Jaterní toxicita	Preklinická fáze

Strategie v terapii pomocí mikroRNA

Suplementace nádorově-supresorových mikroRNA



Inhibice onkogenních mikroRNA



mikroRNA jako terapeutické cíle

Výrobce	Název léčiva	Účinná látka	Cílové onemocnění	Klinická fáze	Status
Santaris Pharma/Roche	Miravirsen	AntimiR-122	Hepatitida C	Fáze II	dokončeno
Regulus Therapeutics	RG-101	AntimiR-122	Chronická hepatitida C	Fáze II	dokončeno
	RG-125	AntimiR-103/107	Nealkoholická steatohepatitida	Fáze I	probíhá
	RG-012 Lademirsen	AntimiR-21	Dědičná nefritida	Fáze II	probíhá
	RGLS4326	AntimiR-17	Autozomálně dominantní polycystické onemocnění ledvin	Fáze I	probíhá
miRagen Therapeutics	MRG-106	AntimiR-155	Kožní T-buněčný lymfom, mykóza fungoides	Fáze II	probíhá
	MRG-110	AntimiR-92	Poranění	Fáze I	dokončeno
	MRG-201	miR-29 mimic	Keloidní jizvy / Scleroderma	Fáze II	probíhá
EnGeneIC	TargomiRs	miR-16 mimic	Maligní mezoteliom pleury; nemalobuněčný karcinom plic	Fáze I	dokončeno
Mirna Therapeutics Inc.	MRX-34	miR-34 mimic	Různé solidní nádory	Fáze I	ukončeno

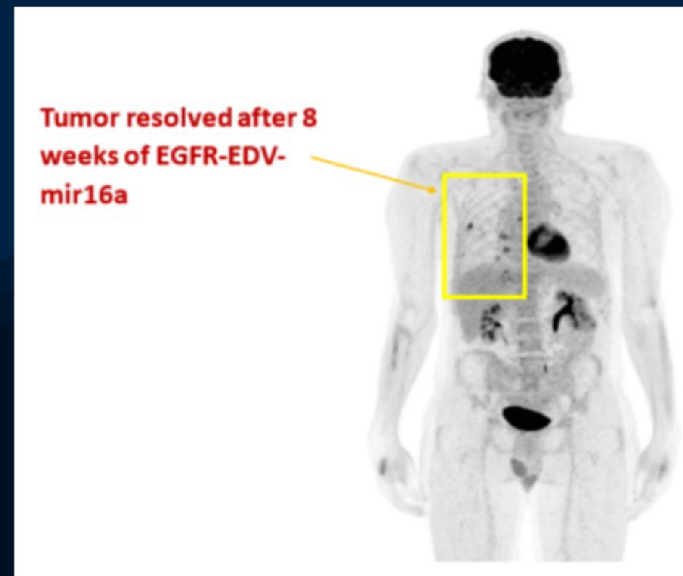
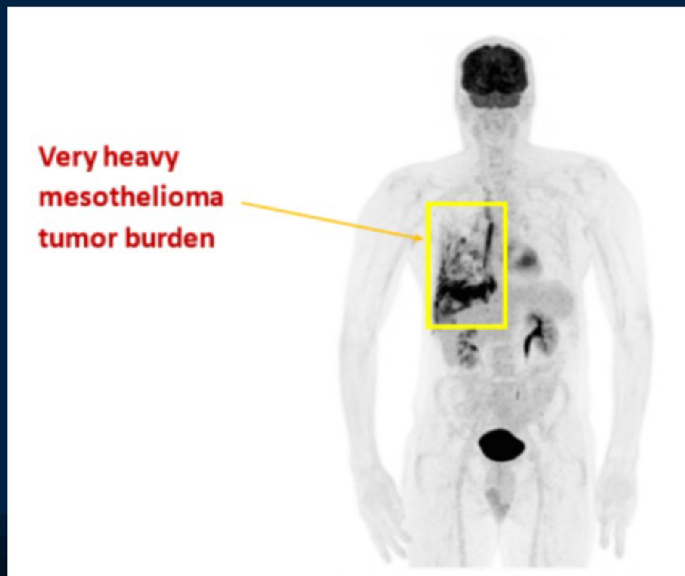
ENGEN

TargomiR

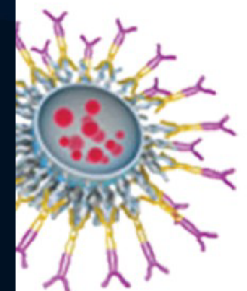
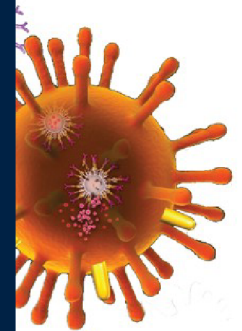
- EGFR
- u MPM
- miR-1

Not just a chemotherapeutic payload but delivering functional nucleic acids too

- A Phase I trial in patients with end-stage mesothelioma and who had failed standard therapies was conducted with EGFR-EDVs loaded with a microRNA 16a. The mir15/16 family is associated with unsuppressed cell growth when it is lost in malignant mesothelioma
- Despite this trial being a safety trial, those patients who completed at least one cycle of EGFR-EDV-mir16a (16 out of 22 patients) showed a clinical response and median survival was much longer than expected in this group of patients at 41 weeks post commencement of EDV treatment (*Kao et al., American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 191(12): 1467-1469 (2015); *Van Zandwijk et al, Lancet Oncology* (2017))



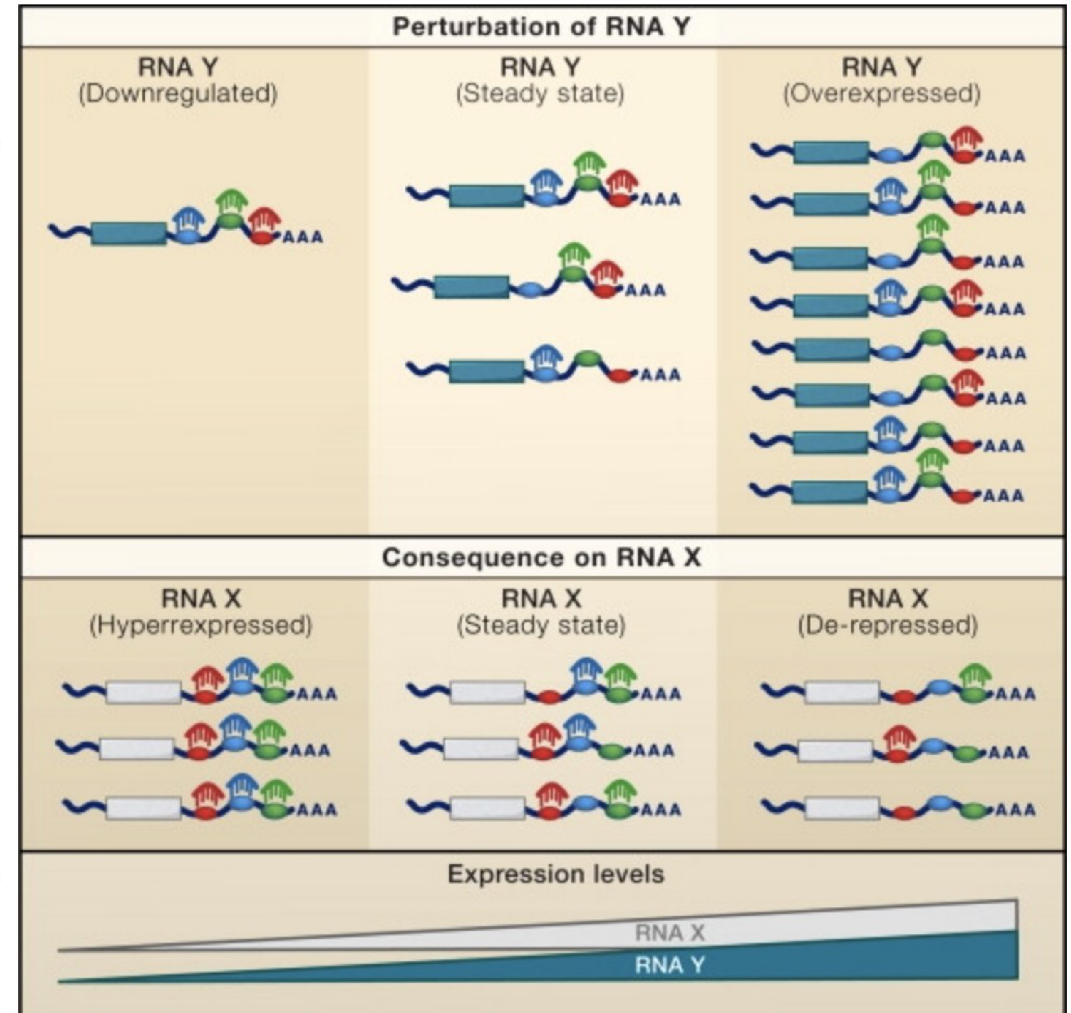
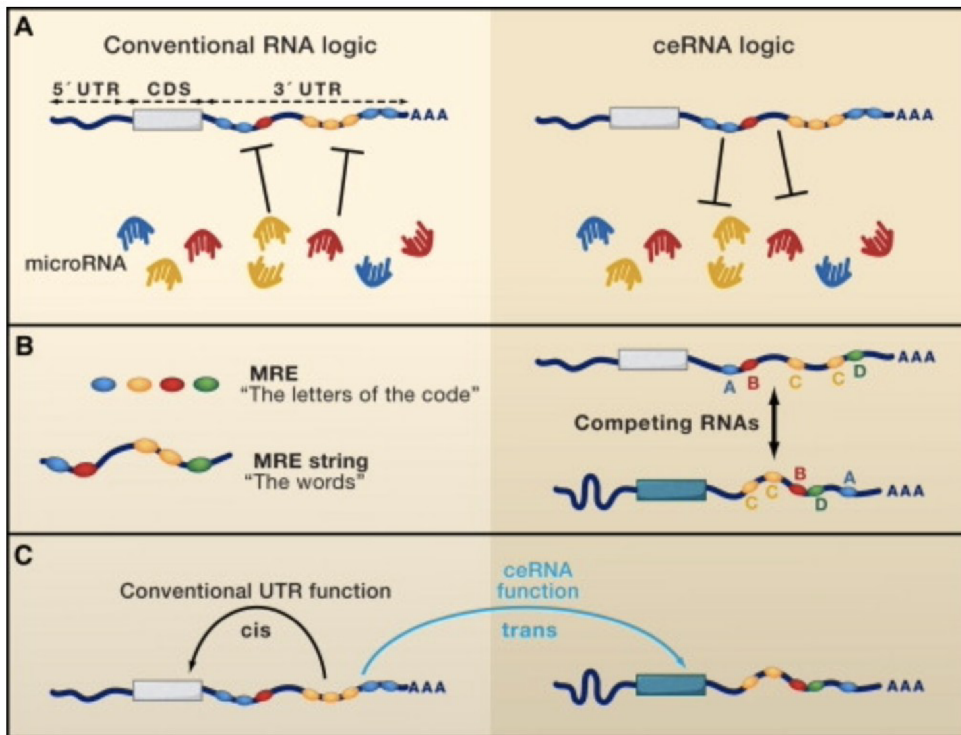
zaná na EGFR
ádorové buňky



navázanými
ými protilátkami



Hypotéza kompetujících endogenních RNA



SNP čipy

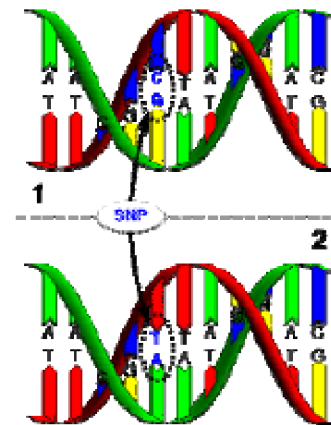
Za geneticky polymorfní je považován znak s nejméně dvěma geneticky podmíněnými variantami v jedné populaci, které se nachází v takových frekvencích, že i zřídka má frekvenci alespoň 1%.

SNP = single nucleotide polymorphism, jsou jednonukleotidové polymorfní znaky
Celogenomové mapy SNPs jsou dostupné ve webových databázích (~6 milionů)

Mezi lidmi je přibližně 99,9% shoda v sekvenci DNA
Zbývajících 0,1% nás činí jedinečnými (jak vypadáme, nemoci, kterými budeme trpět, ...)

Přibližně 1 SNP per 1.000 bp

90% genů obsahuje alespoň 1 SNP

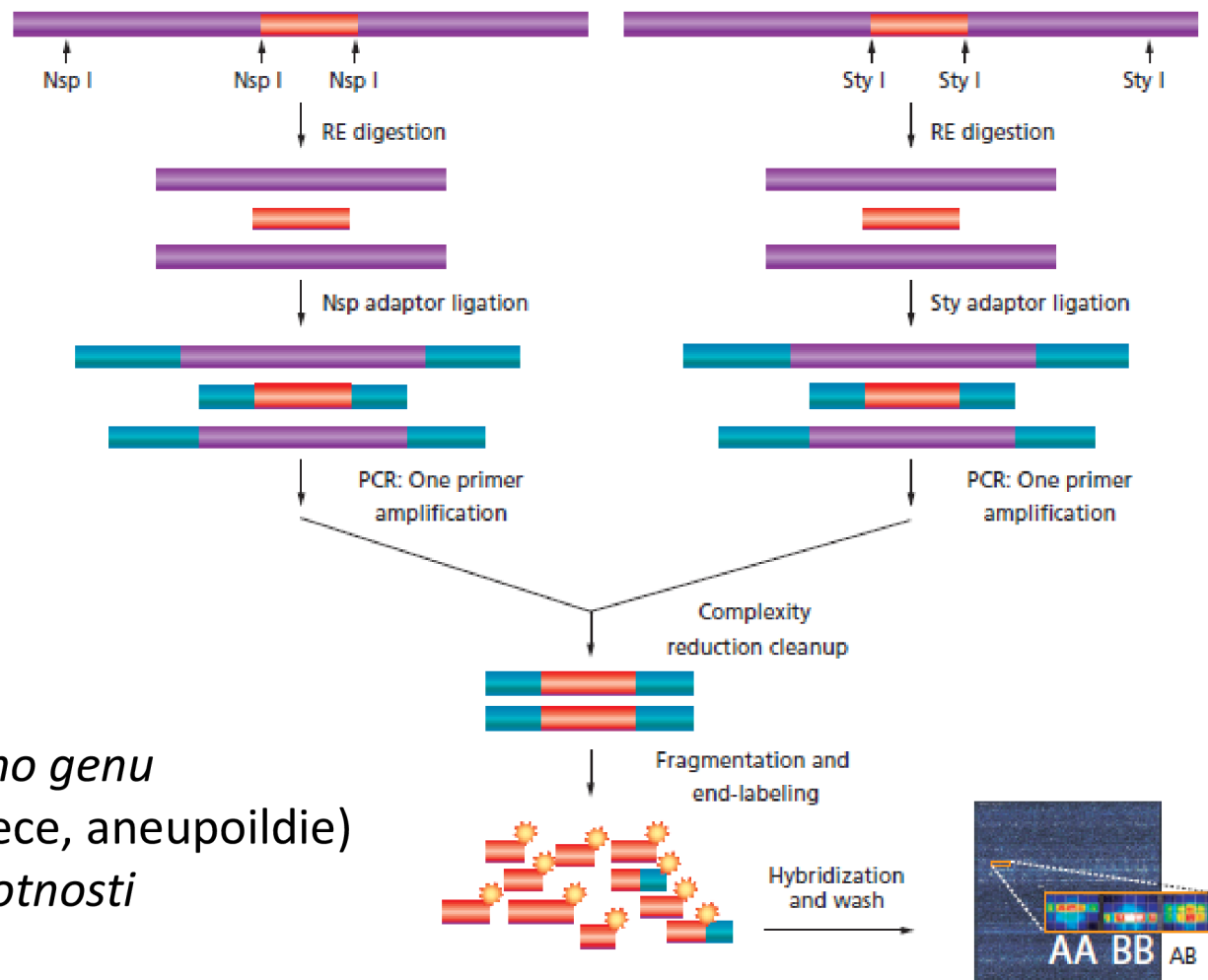


A	T	A	T	G	A	T	G	T	G	G	T	A	T	A	T	A	C	-	T	C	A	A	T	G	A	T	A	A	T	T	C	-	T	A
A	T	A	T	G	A	T	G	T	G	G	T	A	T	A	T	A	C	-	T	C	A	A	T	G	A	T	A	A	T	T	C	-	T	A
A	T	A	T	G	A	T	G	T	G	G	T	A	T	A	T	A	C	-	T	C	A	A	T	G	A	T	A	A	T	T	C	-	T	A
A	T	A	T	G	A	T	G	T	G	T	A	T	A	T	A	C	-	T	C	A	A	T	G	A	T	A	A	T	T	C	-	T	A	
A	T	A	T	G	A	T	G	T	G	T	A	T	A	T	A	C	-	T	C	A	A	T	G	A	T	A	A	T	T	C	-	T	A	
A	T	A	T	G	A	T	G	T	G	T	A	T	A	T	A	C	-	T	C	A	A	T	G	A	T	A	A	T	T	C	-	T	A	
A	T	A	T	G	A	T	G	T	G	T	A	T	A	T	A	C	-	T	C	A	A	T	G	A	T	A	A	T	T	C	-	T	A	
A	T	A	T	G	A	T	G	T	G	T	A	T	A	T	A	C	-	T	C	A	A	T	G	A	T	A	A	T	T	C	-	T	A	
A	T	A	T	G	A	T	G	T	G	T	A	T	A	T	A	C	-	T	C	A	A	T	G	A	T	A	A	T	T	C	-	T	A	
A	T	A	T	G	A	T	G	T	G	T	A	T	A	T	A	C	-	T	C	A	A	T	G	A	T	A	A	T	T	C	-	T	A	
A	T	A	T	G	A	T	G	T	G	T	A	T	A	T	A	C	-	T	C	A	A	T	G	A	T	A	A	T	T	C	-	T	A	

Affymterix SNP čipy

Mapping 10K array => Mapping 100K array => Genome-wide Human SNP array 5.0 (500K) => Genome-wide Human SNP array 6.0 (1.8 million)

Figure 1: Overview of the Genome-Wide Human SNP Assay 5.0/6.0.



Umožňuje:

Detekci SNP

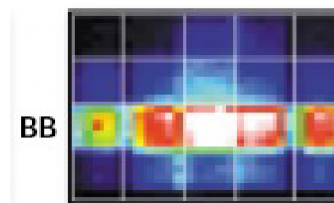
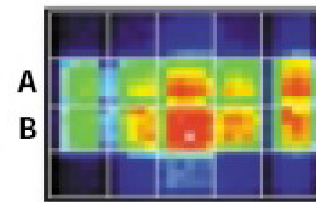
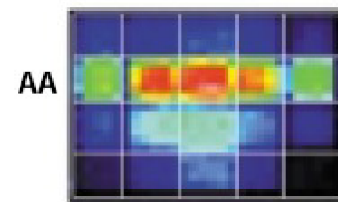
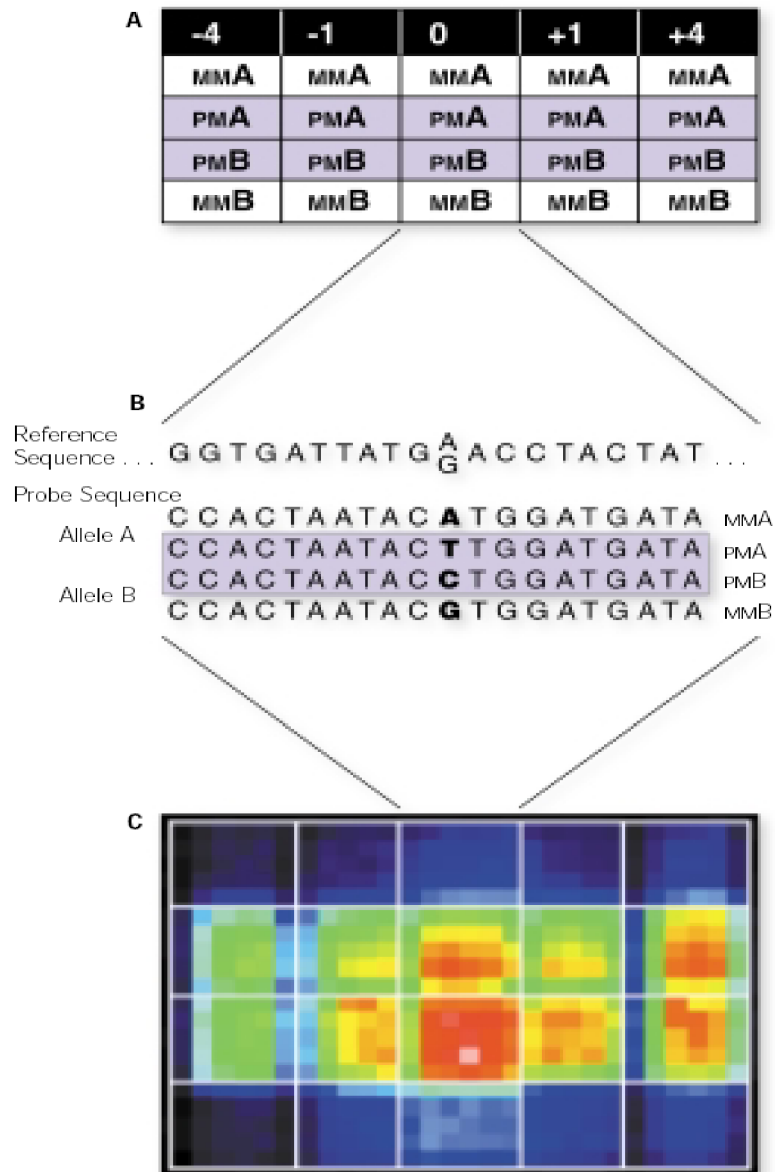
Počet kopií daného genu

(amplifikace, delece, aneuploidie)

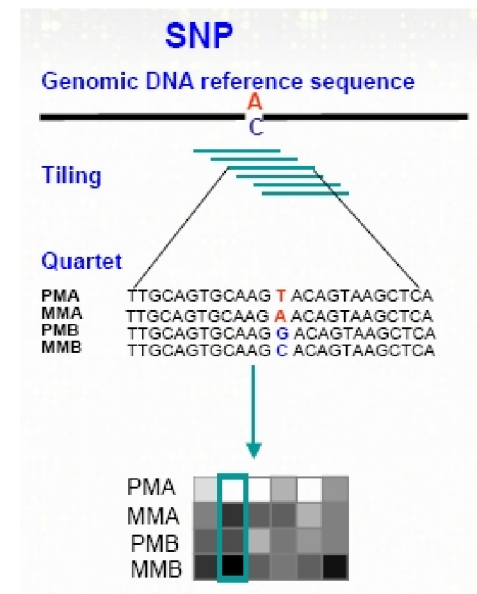
Ztráta heterozygotnosti

Affymterix SNP čipy

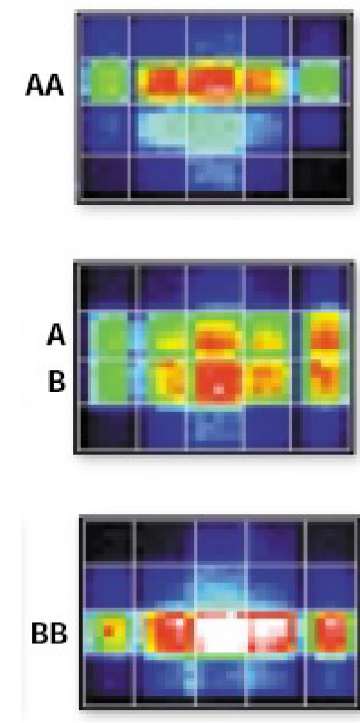
How the GeneChip® HuSNP™ Array Calls Genotypes



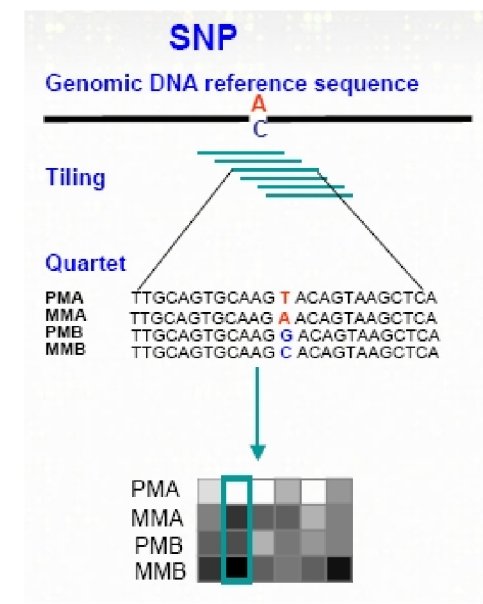
- Alely: AA, AB, BB
- Intenzita signálu: počet kopií



Affymterix SNP čipy



- Alely: AA, AB, BB
- Intenzita signálu: počet kopií



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

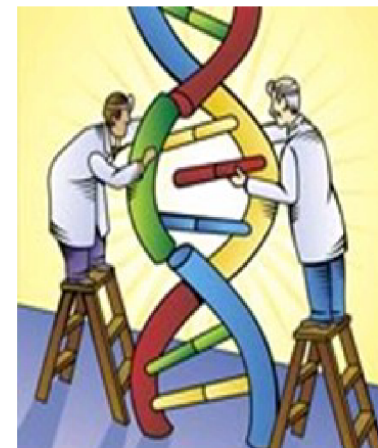
Molekulární klasifikace nádorových onemocnění – ukázky

Aplikace čipových technologií do klinické praxe – studie MINDACT, Agendia, Roche AmpliChip CYP450

mikroRNA: nová úroveň regulace genové exprese

mikroRNA čipy

SNP čipy



Náplň 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?

