

Úvod do molekulární medicíny C7188



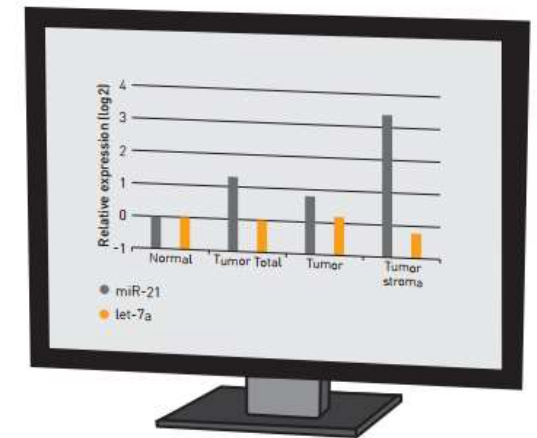
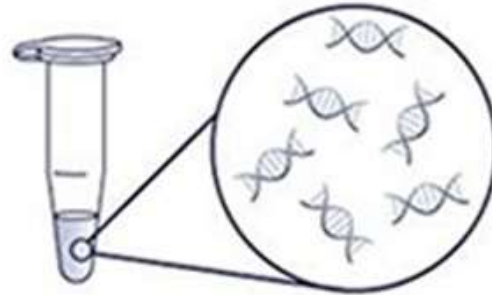
4. Metodické přístupy v molekulární medicíně – čipové technologie

Mgr. Júlia Bohošová, Ph.D.

podzim 2024

(Vysokokapacitní) metodické přístupy v genomice

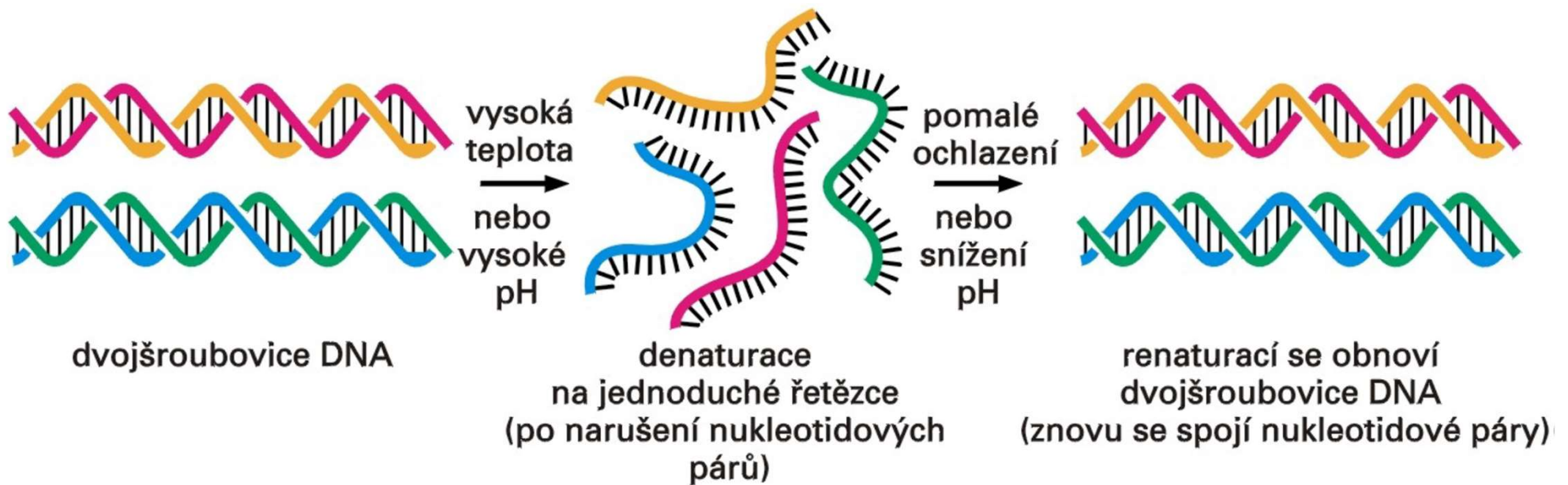
- kvantitativní PCR/PCR arraye
- microarrays (hybridizační čipy)
- sekvenování nové generace (NGS)



Typ technologie	Hlavní princip	Doplňující metody	Příklad aplikace
amplifikační	kvantitativní PCR	reverzní transkripce	qPCR array, qPCR
hybridizační	hybridizace NK	reverzní transkripce, PCR, fragmentace ...	DNA microarray – exprese, SNP/CNV, arrayCGH apod.
sekvenační	sekvenování	fragmentace, reverzní transkripce, PCR, hybridizace...	sekvenování genomu, transkriptomu, vysokokapacitní screening mutací, analýza komplexních mikrobiálních vzorků apod.

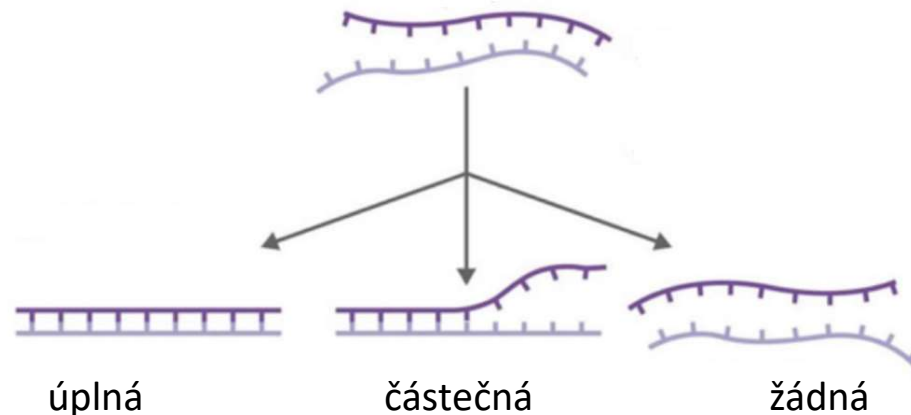
Hybridizace nukleových kyselin

- tvorba dvouřetězcových hybridů z dvou jednořetězcových a komplementárních molekul
- založena na schopnosti denaturace a renaturace NK (annealing)
- dáno komplementaritou bází, tzn. formací vodíkových vazeb mezi A a T (případně U) a mezi G a C



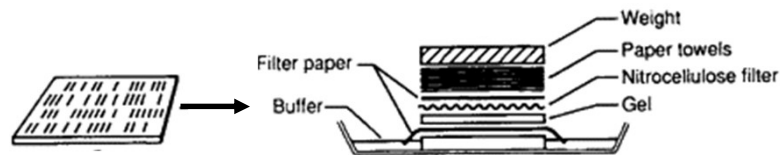
Hybridizace nukleových kyselin

- při renaturaci se mohou tvořit hybridní molekuly DNA/DNA, RNA/RNA i **DNA/RNA!**
- rozsah renaturace odpovídá rozsahu komplementarity sekvencí (homoduplex, heteroduplex)






- hybridizace v roztoku, na membráně, **in situ**

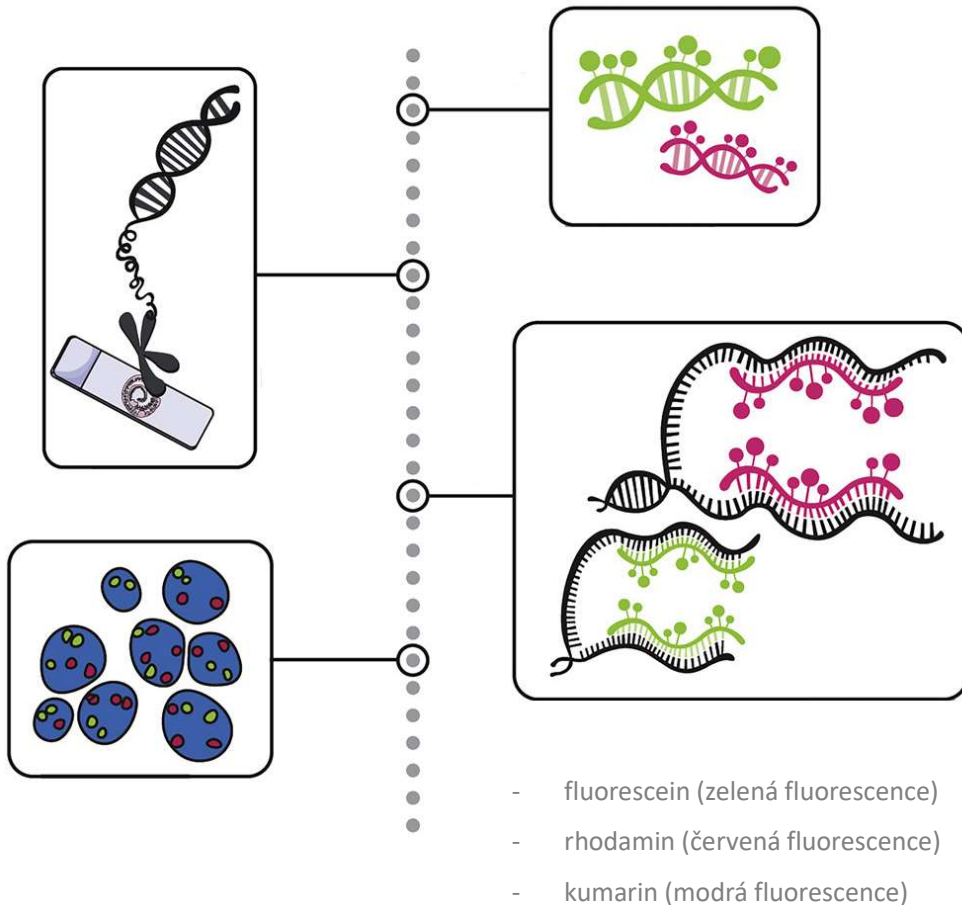
Southernův přenos - DNA
northernový přenos - RNA



Hybridizační sonda

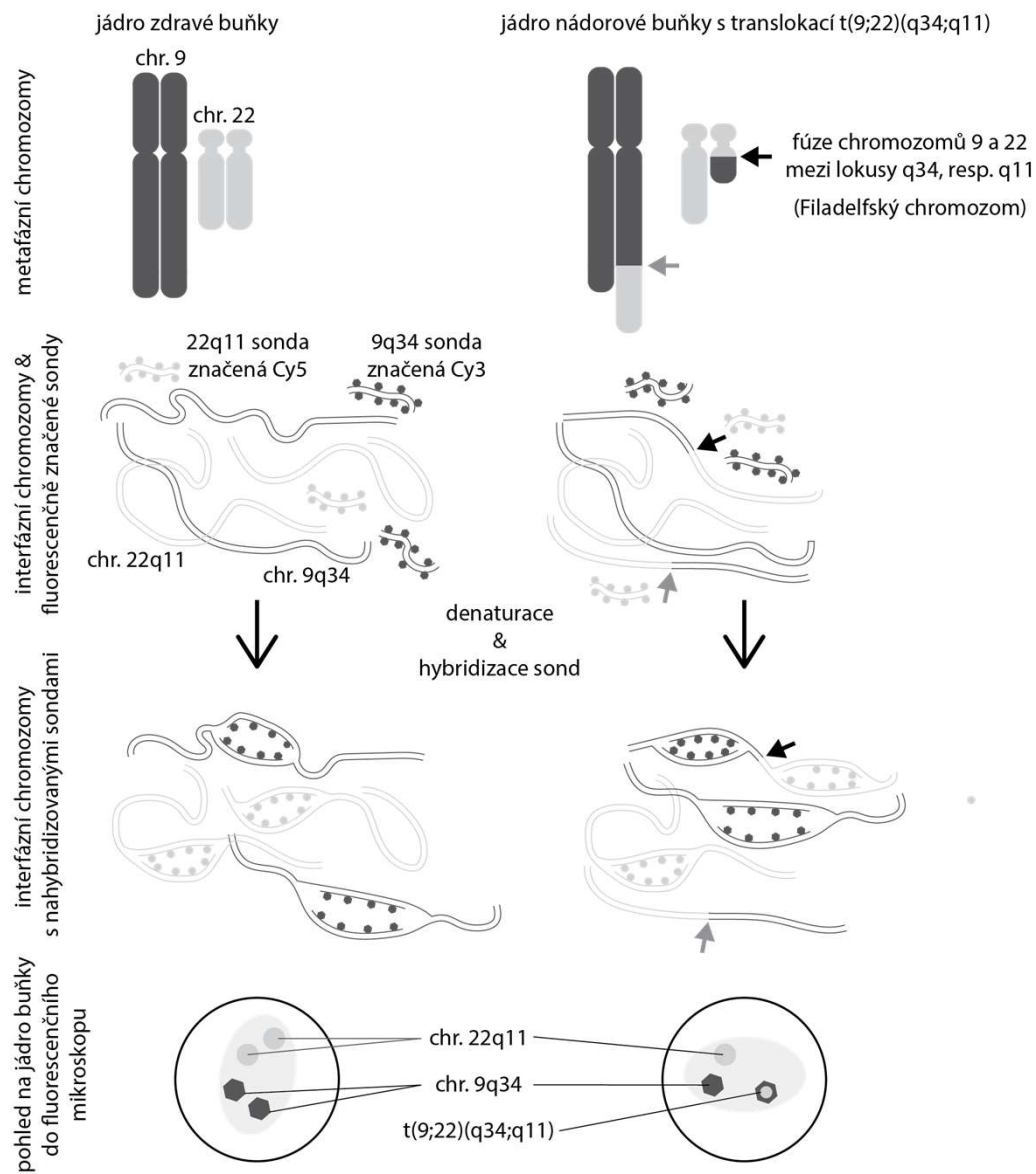
- komplementární k sekvenci testované molekuly
- značená   
- dvouřetězcové molekuly DNA
- jednořetězcové molekuly DNA
- molekuly RNA
- syntetické oligonukleotidy

FISH: Fluorescenční In Situ Hybridizace



- mikroskopická molekulárně-cytogenetická metoda (80. léta 20. století)
- cílené vyšetření předem určených chromosomových oblastí/ genů/ telomery/ centromery atd. pacienta
- použití fluorescenčních sond s vysokým stupněm komplementarity
- detekce fluorescenčním mikroskopem
- hodnotí se počet a poloha signálu
- početní i strukturní změny v genech

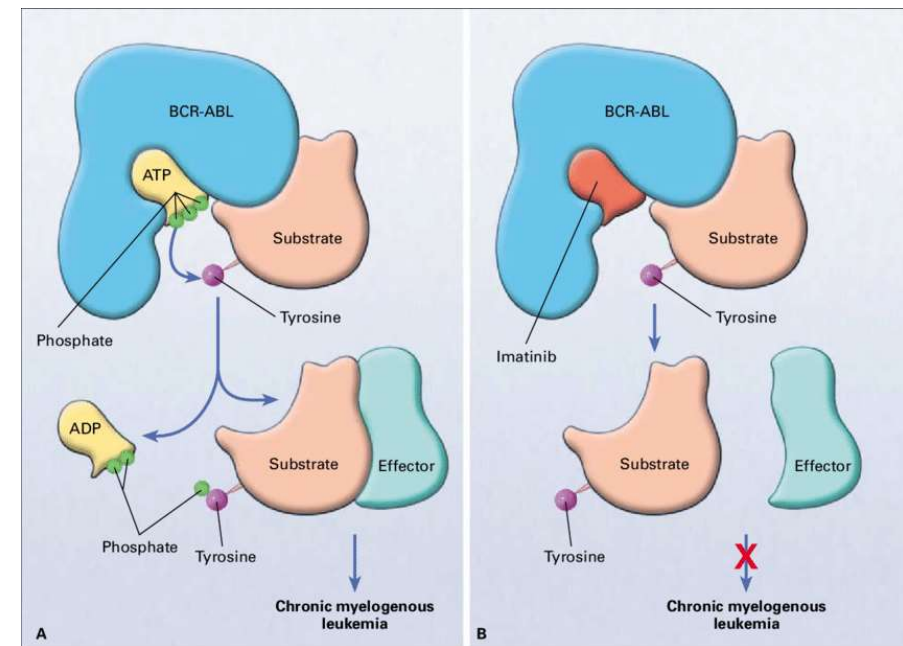
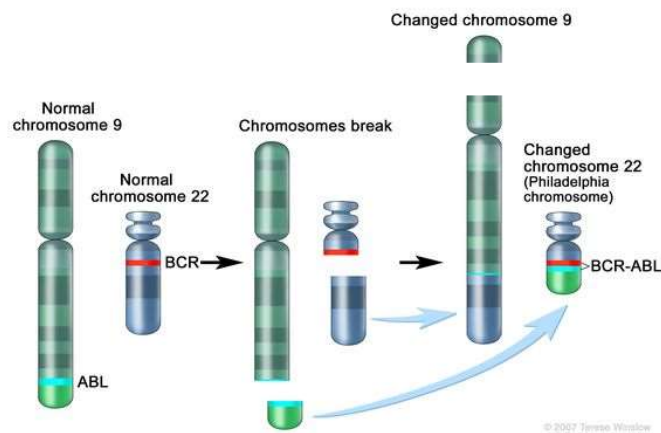
FISH



Strukturní chromozomové aberace

Filadelfský chromozom & fúzní protein BCR-ABL & inhibitory tyrosinkináz

- 1960 – Filadelfský chromozom
- 1973 – fúzní protein BCR-ABL
 - Tyrozinázová aktivita ABL je konstitutivně aktivována přiblížením genu BCR v genomu => zvýšené přežívání a proliferace leukemických buněk
 - Imatinib se váže do blízkosti vazebného místa ATP BCR-ABL, a inhibuje tak aktivitu enzymu



Variace v počtu genů

Copy number variation (CNV)

Amplifikace nebo delece jednoho genu nebo části chromozomu



- > amplifikace onkogenu
- > delece nádorového supresoru

Klinicky relevantní příklady:

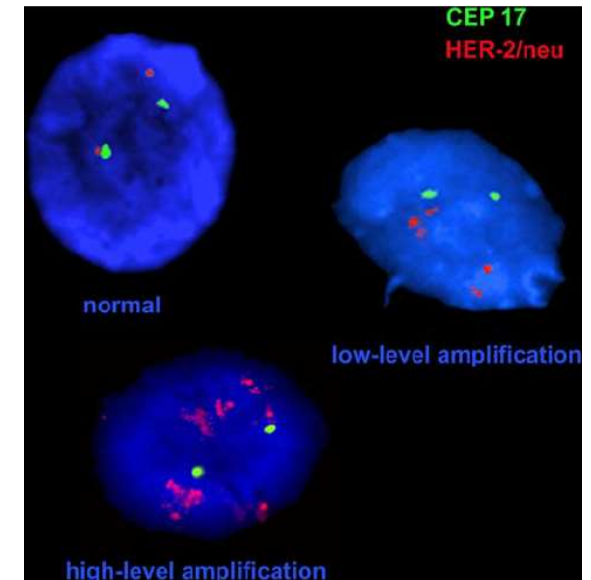
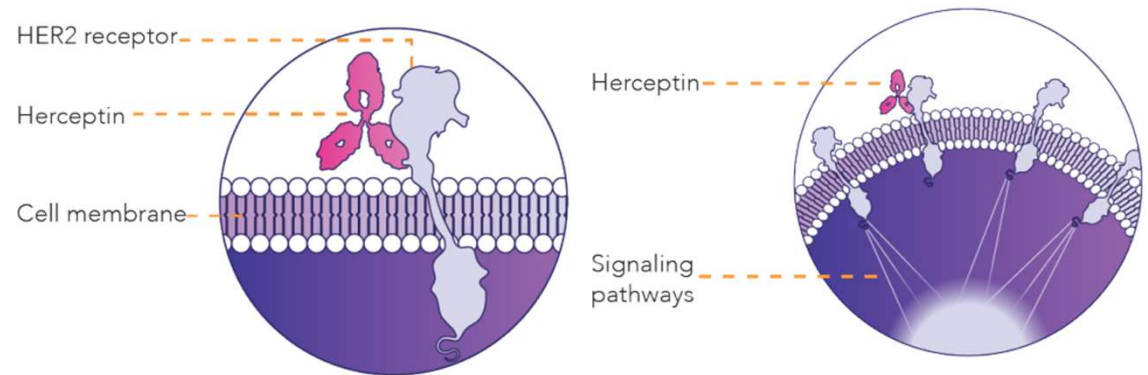
amplifikace HER2:

delece CDKN2A:

amplifikace EGFR:

citlivost k Herceptinu (trastuzumab) u karcinomu prsu společně s inaktivací Rb je spojena s citlivostí k inhibitorům CDK4/CKD6

citlivost k cetuximabu u karcinomů prsu a žaludku



FISH – diagnostické využití

Diagnostika melanocytárních lézí - benigní vs. maligní (melanom)

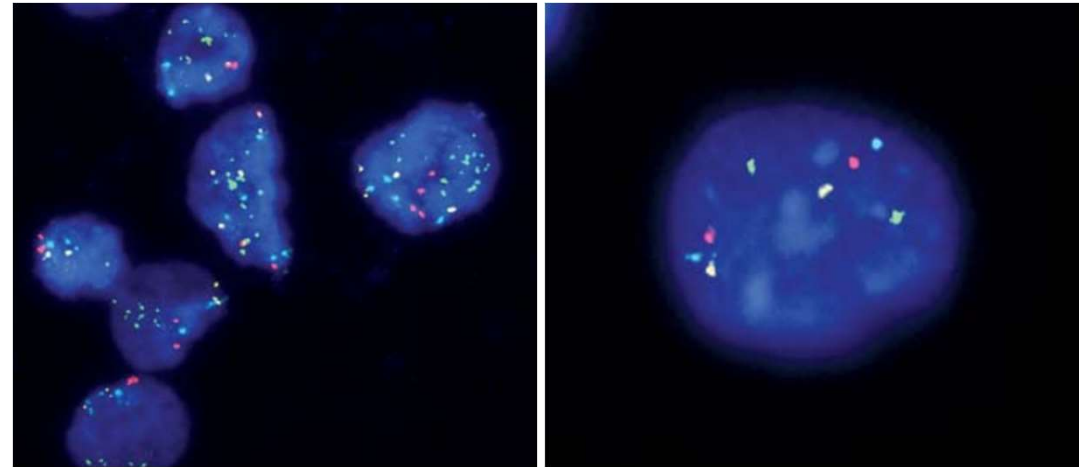
- CNV analýza **CCND1** (cyklin dependentní kinázy) a transkripčních faktorů **RREB1**, **MYB** a počtu **chromozomů 6** – čtyřbarevná FISH

Karcinom prsu

- zvýšený počet kopií genu HER2 předpovídá citlivost na trastuzumab (Mab)

Karcinom plic

- translokace genů ALK (fúze EML4-ALK) a ROS1 předpovídají citlivost k inhibitorům tyrosinkináz



malign

benign

FISH – diagnostické využití

Další aplikace

- karcinom prsu - zvýšení počtu kopií genu HER2 je podmínkou pro nasazení MAb (trastuzumab)
- karcinom plic - přítomnost translokací genů ALK, ROS1 predikuje účinnost léčby
- preimplantační genetický screening (PGS) vybraných chromosomů (chromozomy 13, 15, 16, 18, 21, 22, X a Y)

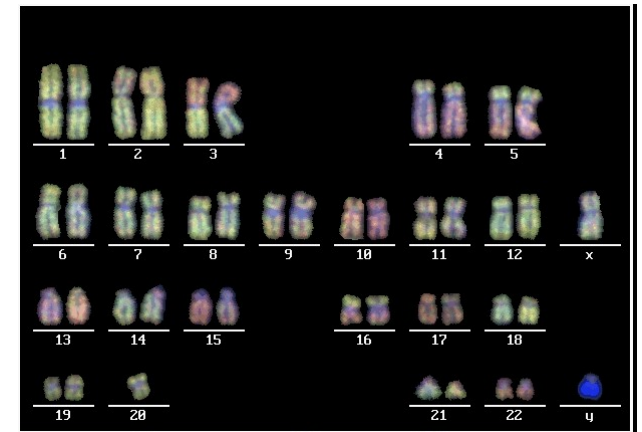
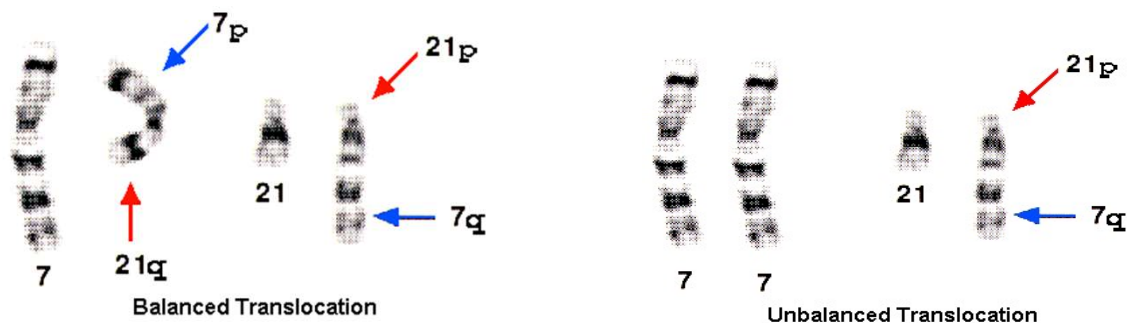
Limitace

- časově náročné, nutná optimalizace
- limitovaný počet abnormalit – počet barev
- není vhodná pro screening
- málo citlivý na detekci ztráty chromosomů nebo delece oblastí/genů

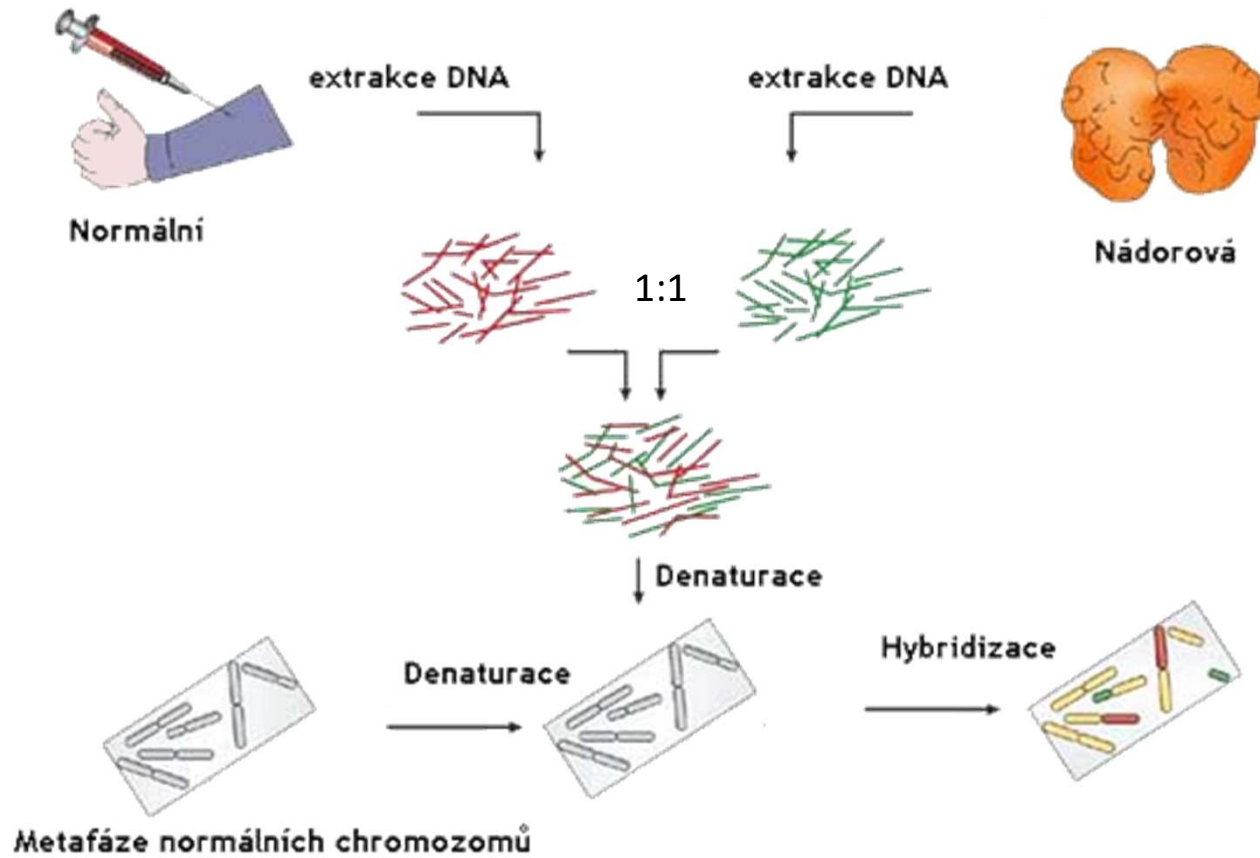
Komparativní genomová hybridizace (CGH)

- stanovení relativního počtu kopií mezi dvěma genomy
- nelze detekovat balancované translokace a inverze, obecně kvantitativní změny
- současná hybridizace dvou vzorků DNA značených odlišnými fluorochromy na normální metafázni chromozomy fixované na podložním skle
- DNA pacienta (nádorová) značena **zeleně** (FITC)
- kontrolní DNA (DNA zdravého jedince) značena **červeně** (TRITC)

sonda

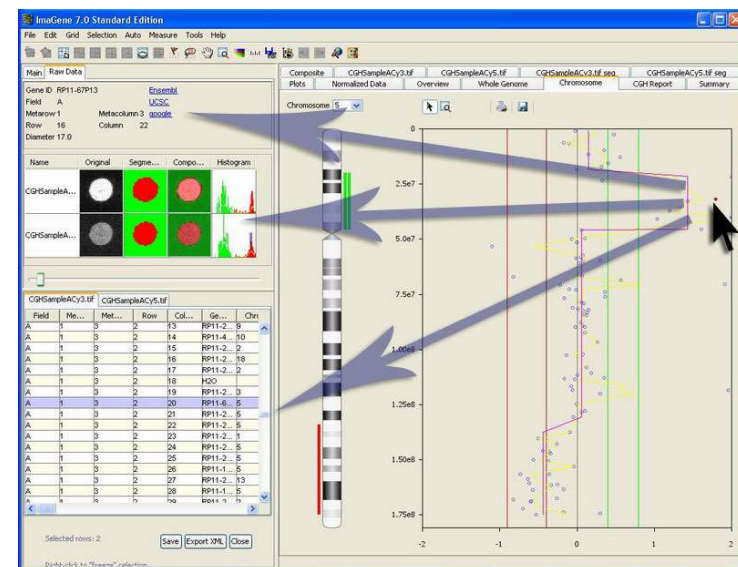
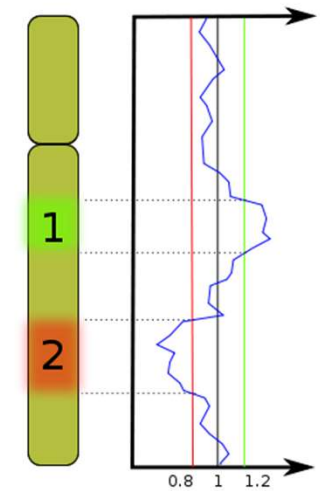


Princip chromozomové CGH

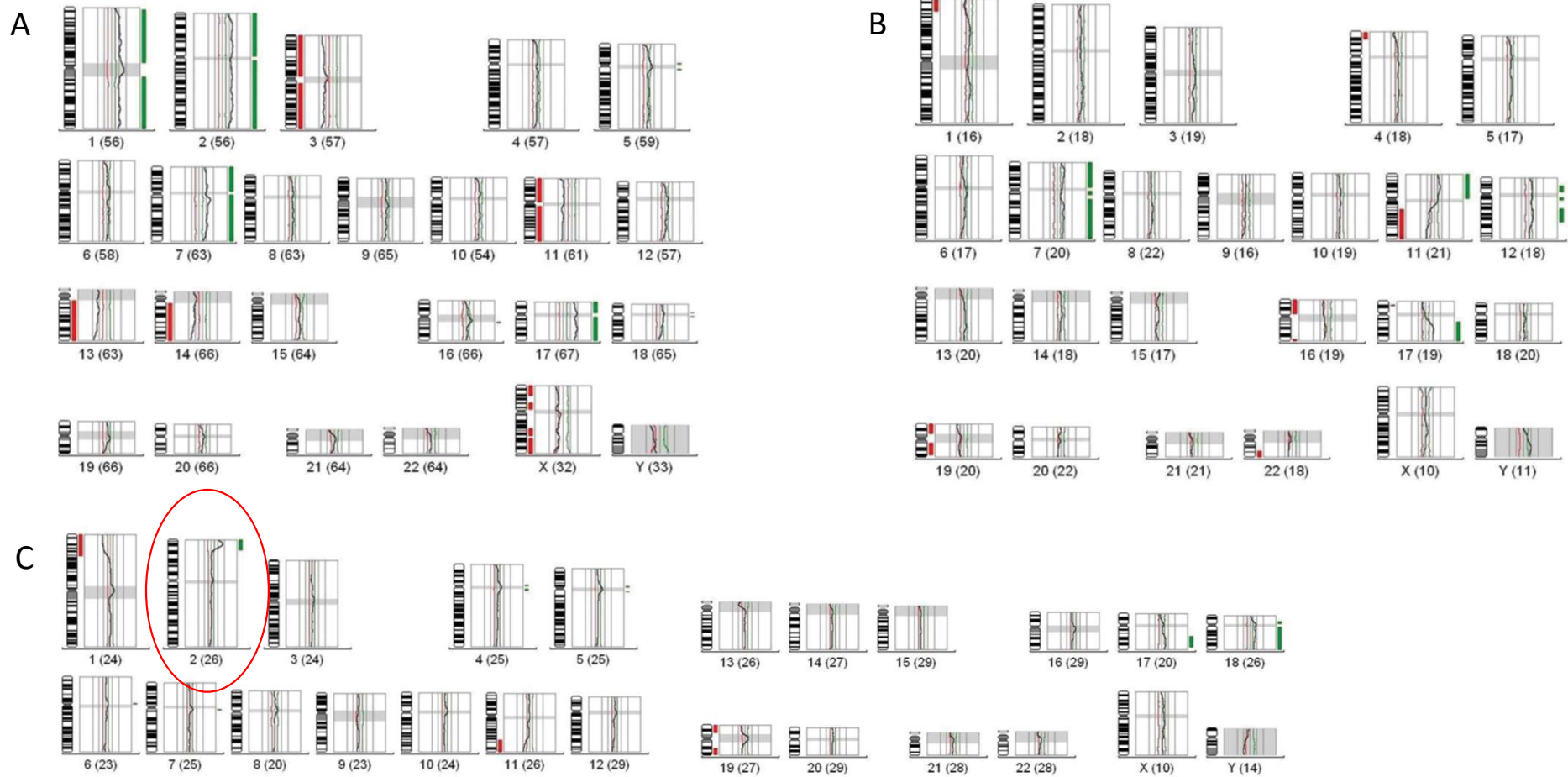


Výsledek chromozomové CGH

- vizualizován pomocí fluorescenčního mikroskopu
- pro každý fluorochrom je obraz snímán kamerou do počítače
- speciální software měří intenzitu obou fluorochromů podél každého chromozomu
- výsledkem analýzy: CGH profil - poměr intenzit signálů obou fluorochromů
- **poměr 1 = nedošlo k žádné kvantitativní změně**
- **poměr $< 0,75$ = delece**
- **poměr $> 1,25$ = duplikace, amplifikace**



Výsledek chromozomové CGH - NBL



- Nutnost kvalitního materiálu (chromozomy, DNA)
- Nahrazení chromozomu fragmenty DNA
- metoda CGH probíhající na čipu, tzv. array-CGH

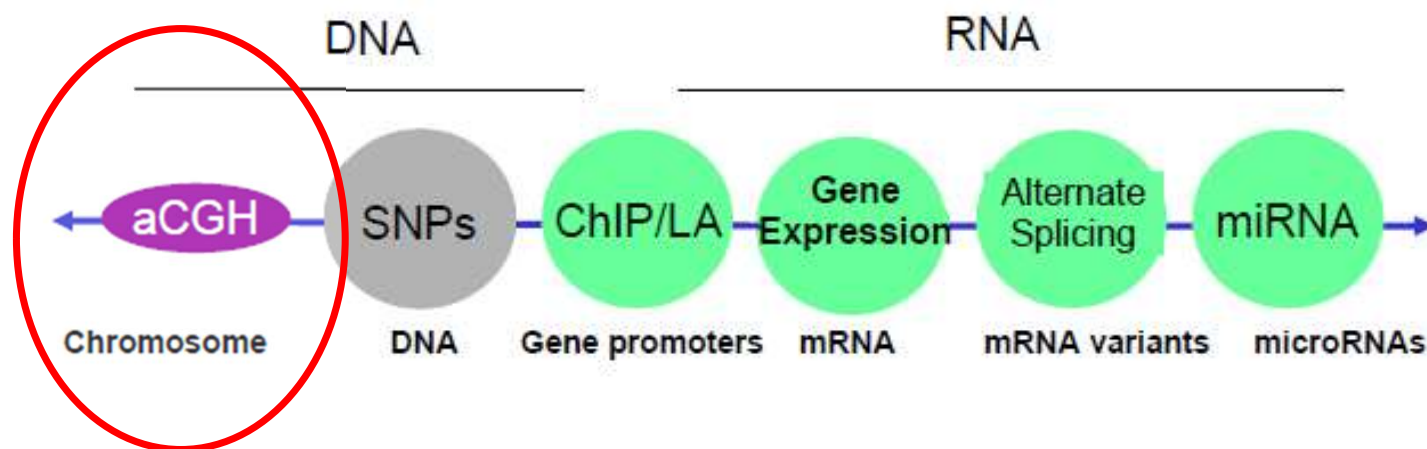
array

=
dvoudimenzionální
uspořádání
mnoha sond

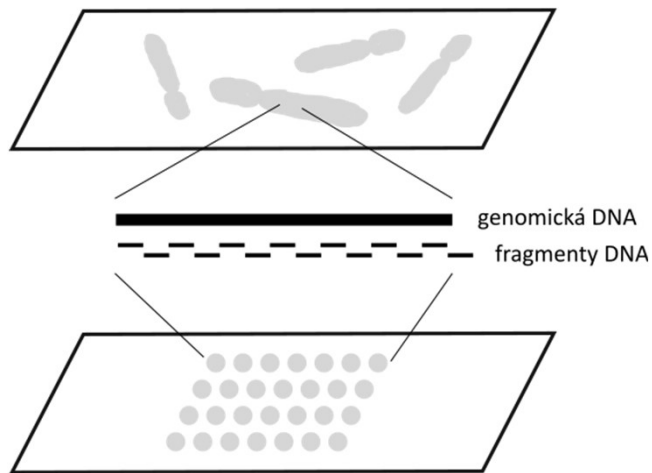
DNA

(mikro, nano, ...)čip

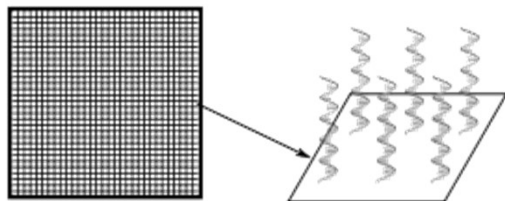
Čipové technologie/microarrays



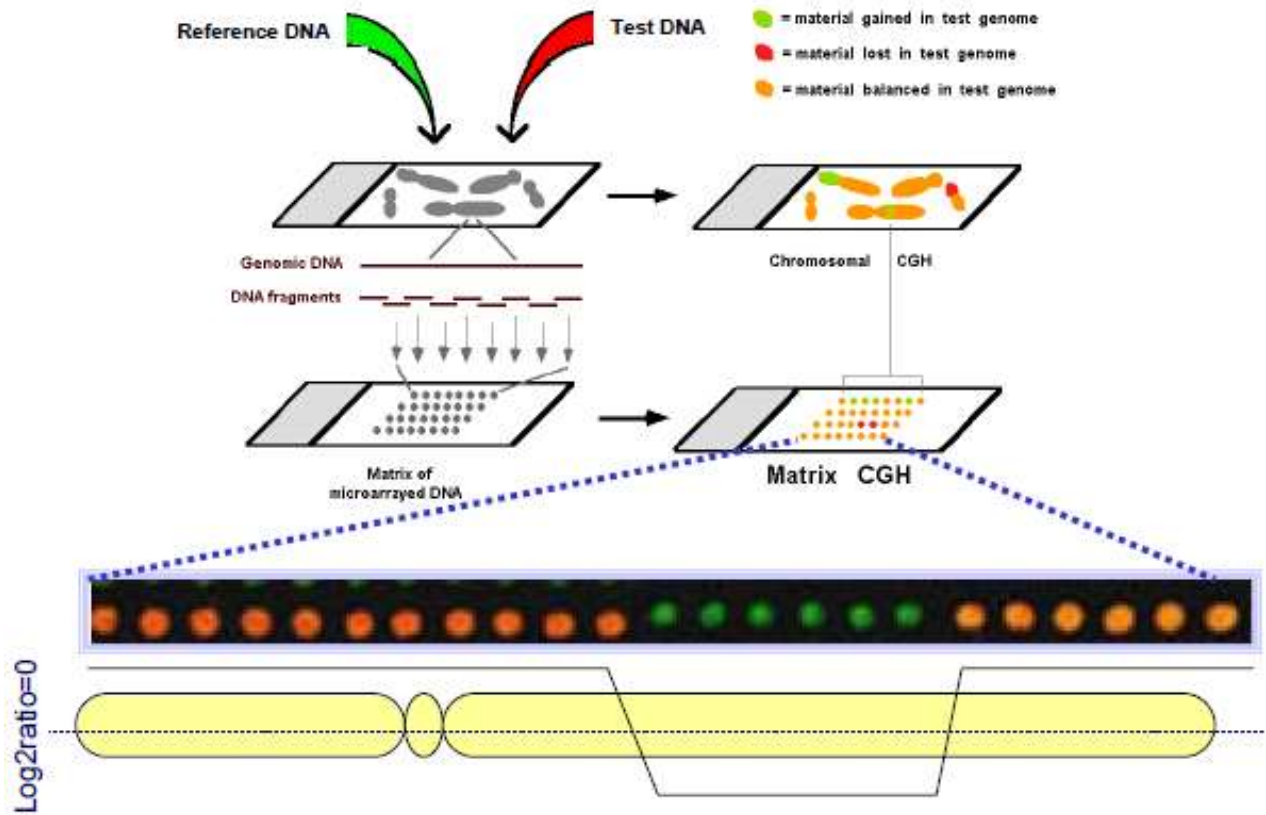
Genomová array CGH (aCGH)



- druhá pol. 90. let
- stejný princip jako CGH
- fragmenty DNA uchyceny na skle/čipu
- fragmenty na přesně dané pozici
- opačné značení kontrolní a sledované DNA než u CGH
- opět početní i strukturní změny v genech

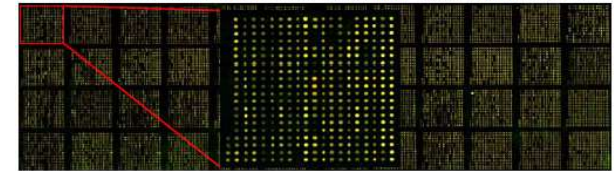


Genomová array CGH (aCGH)

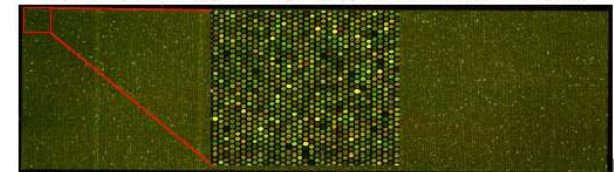


Array-CGH analysis

1 Mb array-CGH (NMC BAC-array with 18.000 DNA spots)



6 Kb array-CGH (Agilent oligo-array with 244.000 DNA spots)



Platformy aCGH

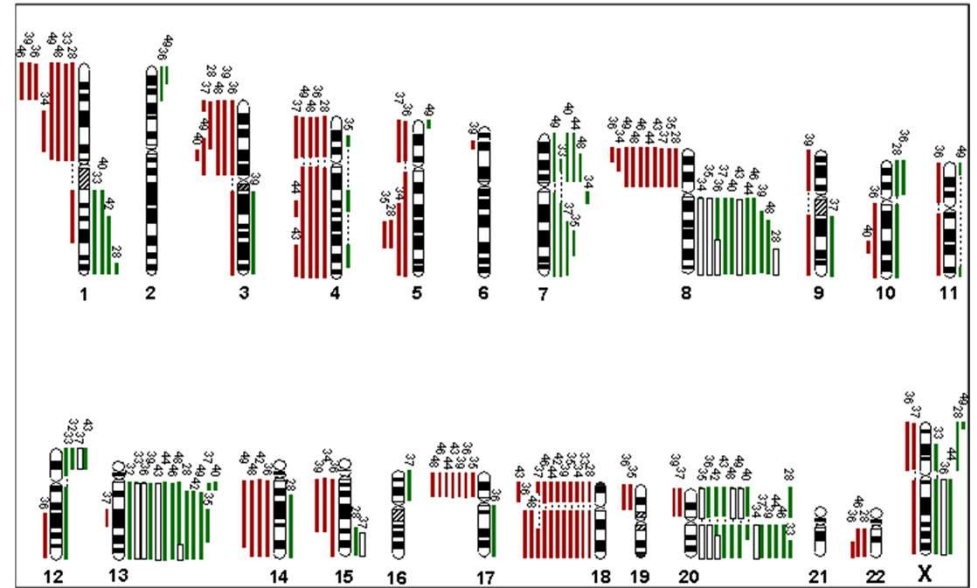
Cílené (hot spot)

Chromozomové

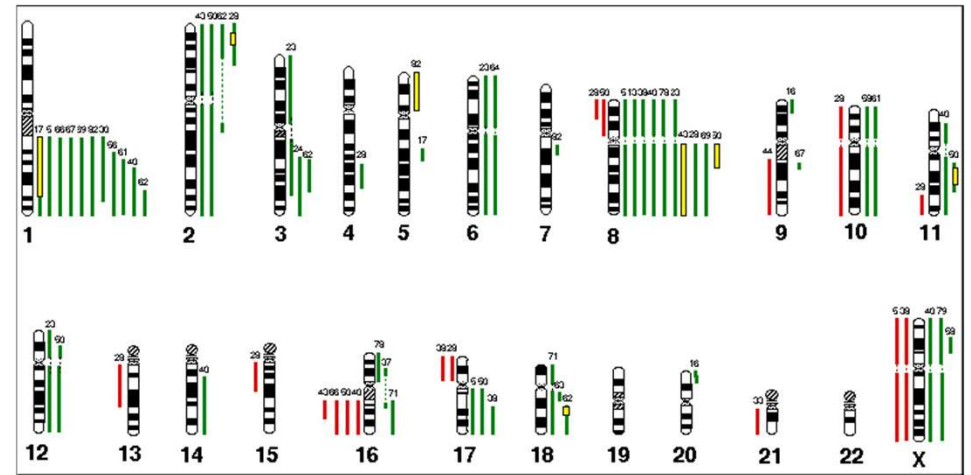
Celogenomové

aCGH v onkologii

kolorektální karcinom



karcinom děložního hrdla



Genomová array CGH (aCGH)

		Resolution	Coverage
a Cytogenetics	Karyotyping	> 10 Mb	Complete
	SKY	> 2 Mb	Complete
	Traditional CGH	> 2 Mb (cytoband)	Complete
	FISH (interphase)	≥ 20 Kb	Probe Specific
	FISH (metaphase)	≥ 100 Kb	Probe Specific
b aCGH	BAC	100 Kb (Spectral Genomics - 2 Mb)	Complete
	cDNA	2 Kb	Genes Only
	Oligo (60-mer)	0.06 Kb	Complete

Rozlišovací schopnost aCGH závisí na typu použitého vektoru – tzn. na **délce a množství** nanášených fragmentů a na jejich skutečném **zastoupení** v rámci genomu.

V každém případě je však řádově vyšší než u chromozomové CGH!!!

Typy čipů podle fragmentů

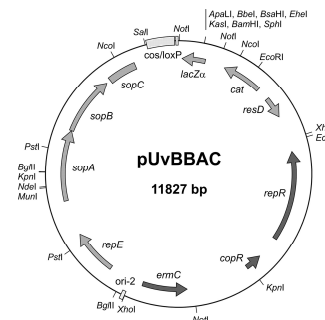
YAC [Yeast **Artificial Chromosomes**] (0,2-2 Mb)

BAC [Bacterial **Artificial Chromosomes**] (300 kb)

PAC [P1-derived **Artificial chromosomes**] (130-150 kb)

cDNA (2 kb)

oaCGH – oligonukleotidy (0,06 kb)

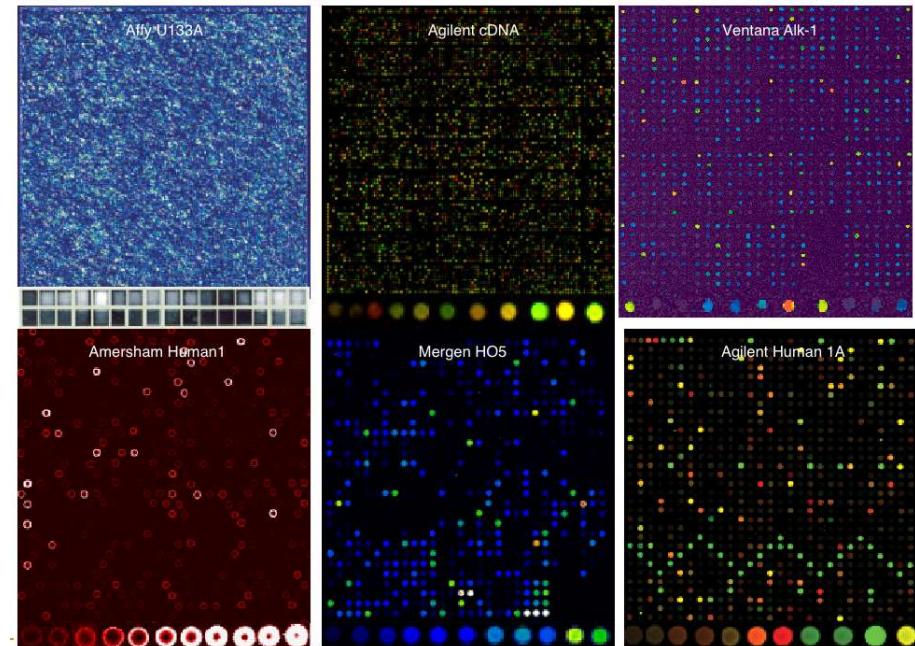
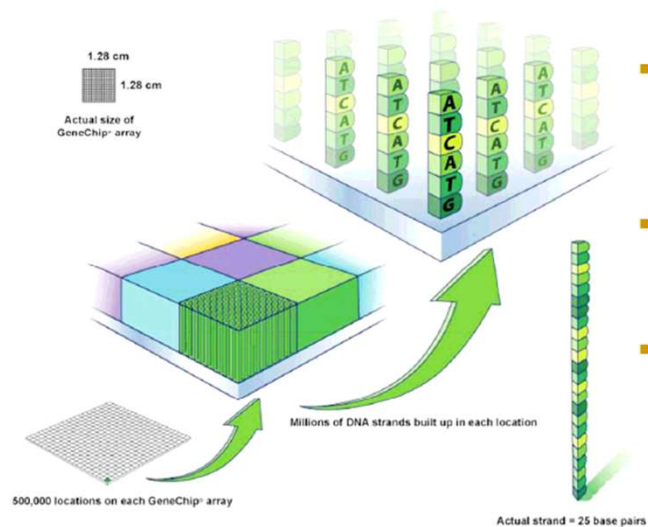


tiling assays

menší fragmenty souvisle pokrývající genom/sledovanou oblast = vyšší rozlišovací schopnost

DNA microarrays (čipy)

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.



Základní dělení DNA čipů

Dle charakteru detekce

pasivní – pracovní podmínky pro všechny hybridizační jednotky jsou stejné – Affymetrix, Agilent

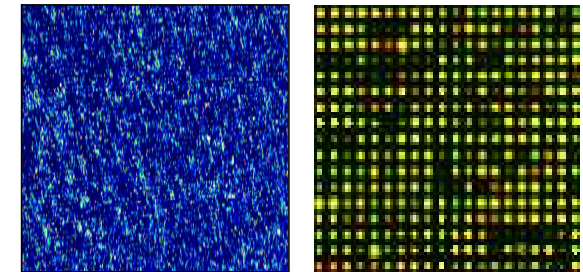
aktivní – pracovní podmínky každé hybridizační jednotky lze ovlivňovat individuálně – Nanogen



Dle typu sond

cDNA čipy – Agilent

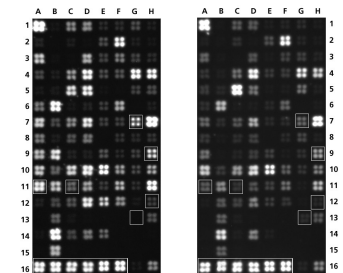
oligonukleotidové čipy - Affymetrix



Dle počtu sond

vysokohustotní DNA čipy (celogenomové) – Affymetrix, Agilent, ...

nízkohustotní DNA čipy (stovky genů) – Eppendorf, Superarray, ...

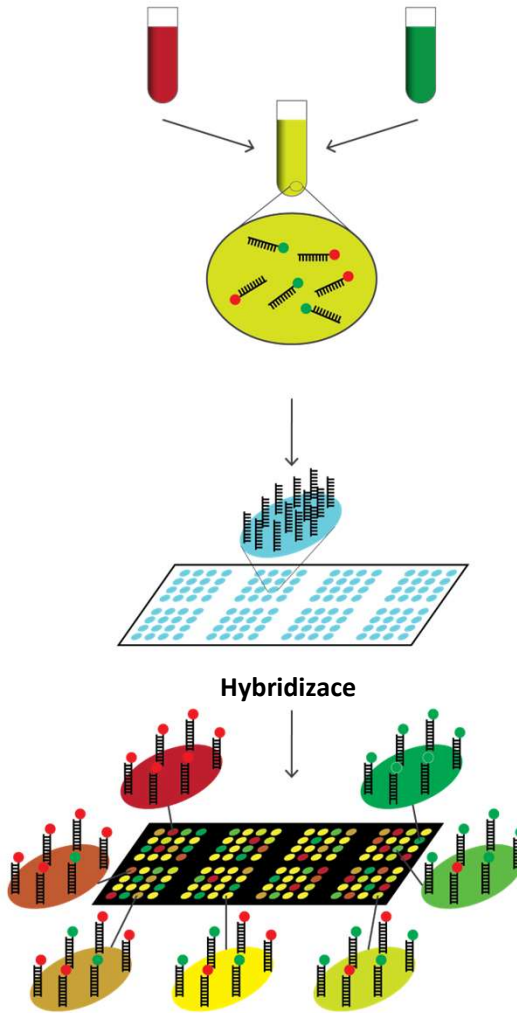


Agilent vs. Affymetrix



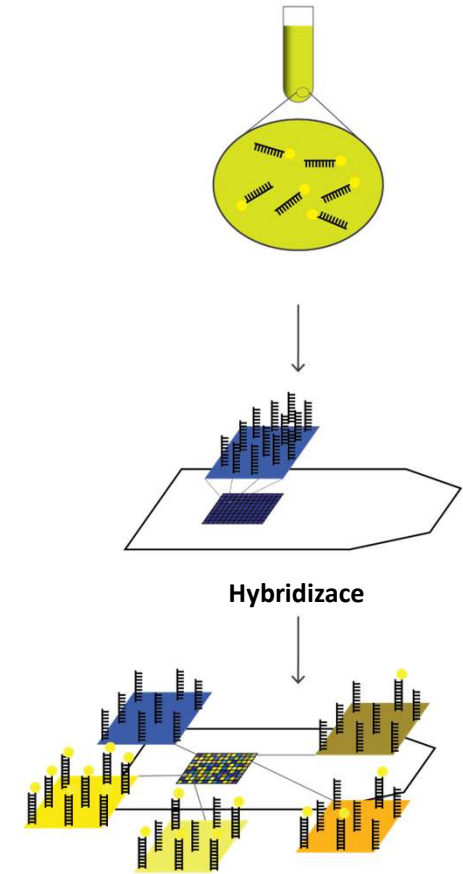
Agilent Glass slide microarray

Testovací RNA (cDNA) značená Cy5 Referenční RNA (cDNA) značená Cy3



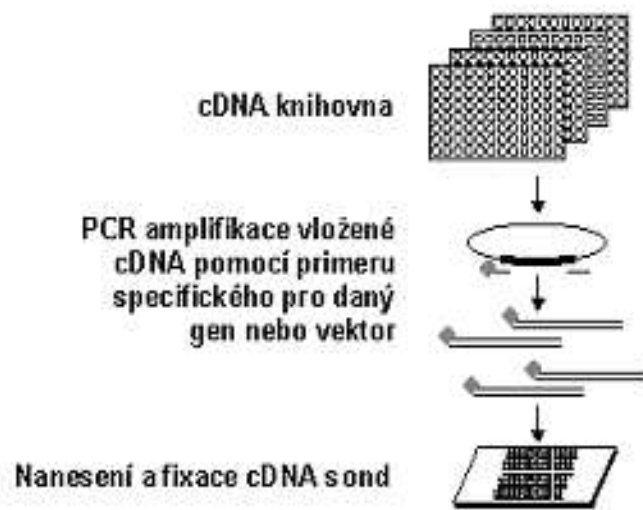
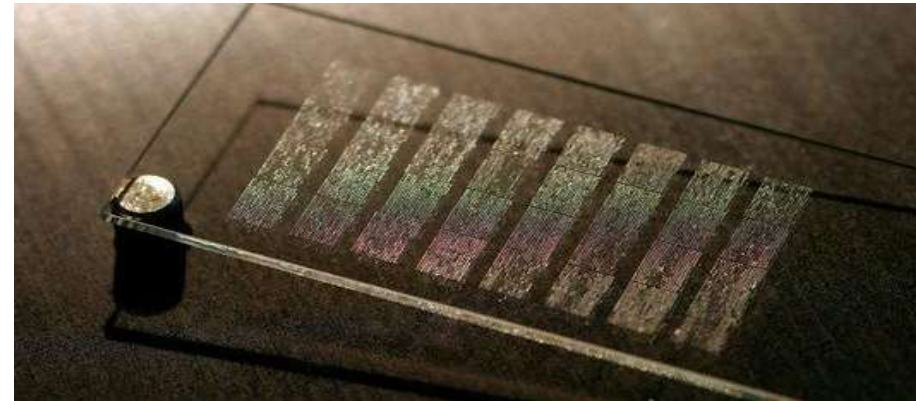
Affymetrix Gene Chip

Testovací RNA (cDNA) značená biotinem



cDNA čipy (Agilent)

- jako sondy cDNA (komplementární DNA)
- transkriptom
- poslední dobou vytlačovány oDNA čipy
- využití cDNA knihoven (mRNA → cDNA)

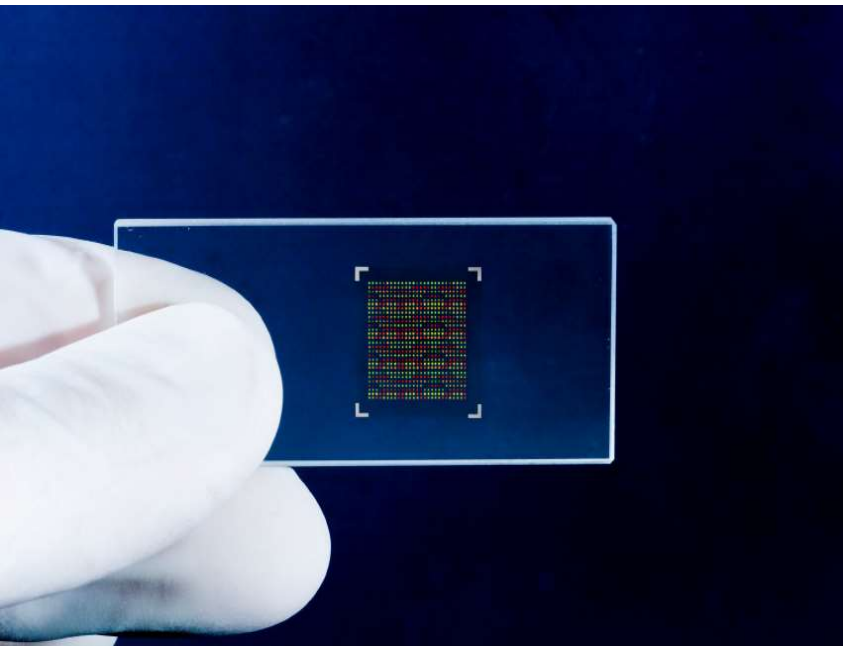


cDNA EXPRESNÍ KNIHOVNA

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

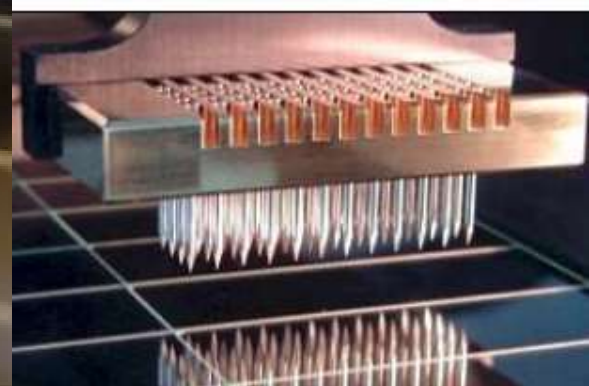
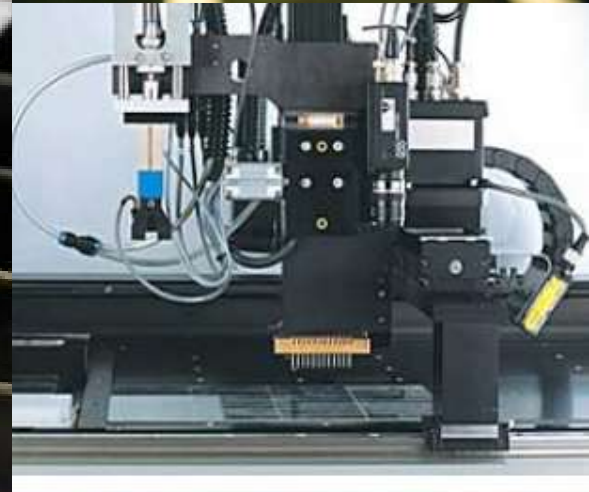
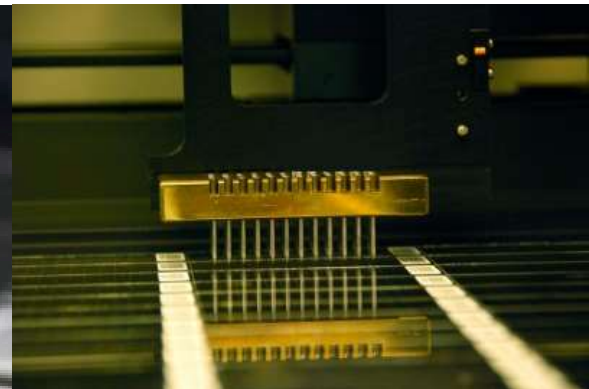
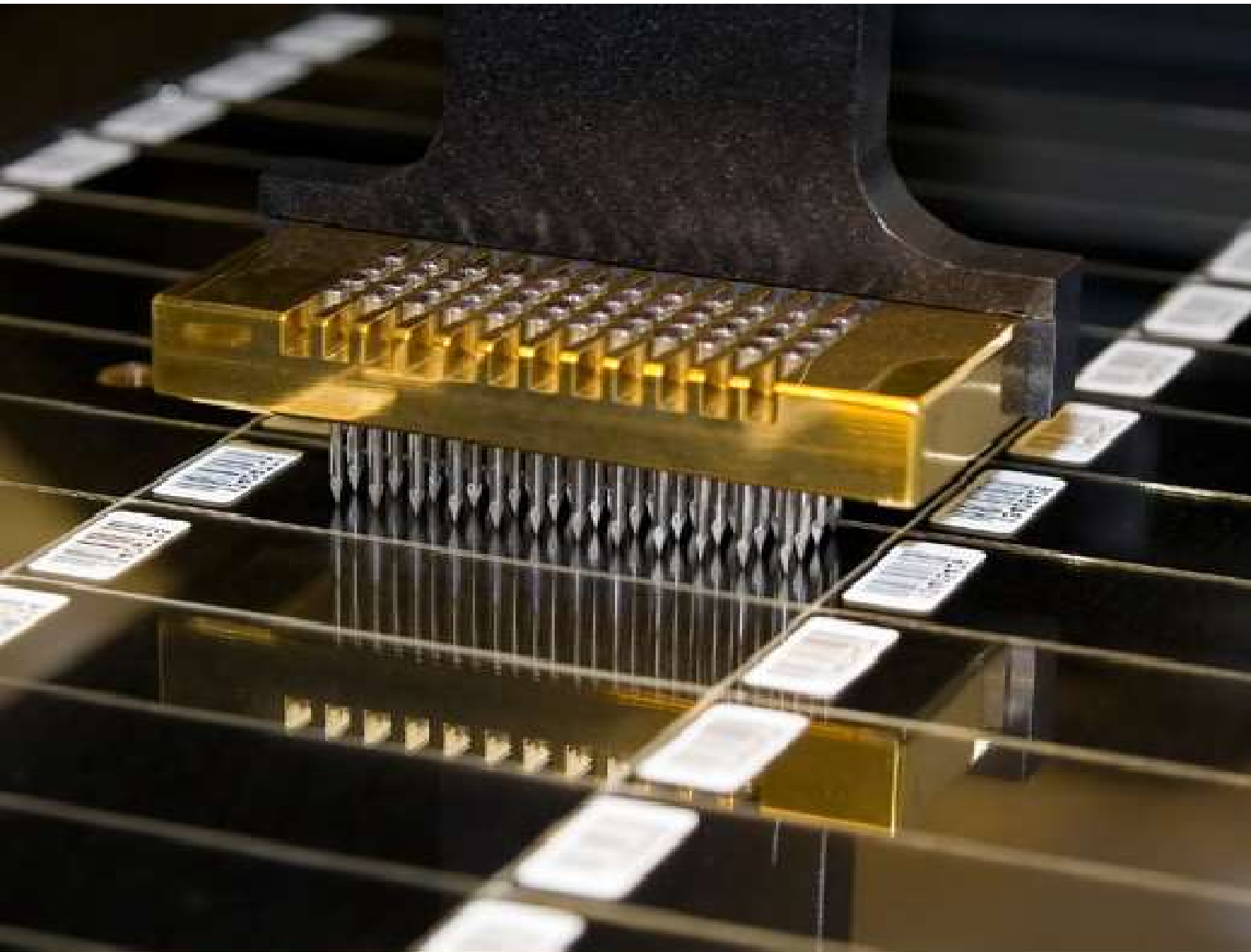
- materiály pro snadnou imobilizaci DNA sond (sklo) – povrch se musí upravit
- **silany** na povrchu (aldehyd) + amin na 5' konci sondy → kovalentní vazba (Shiffova base)
- na povrchu **poly-L-lysin** → sonda se váže elektrostatickými silami



další slide

Nanášení cDNA

- Čipovač
- Microarrayer
- Spotter



Výroba cDNA čipů

I) Kontaktní systémy

a) bez zásobníku

- plné hroty (solid pins)

b) se zásobníkem (250-1000nl)

- přepraví 0,25 – 5nl,
hybridizační jednotka 75-350 um
- štěrbinovité hroty (split pins)
- pinzetovité hroty (tweezers)

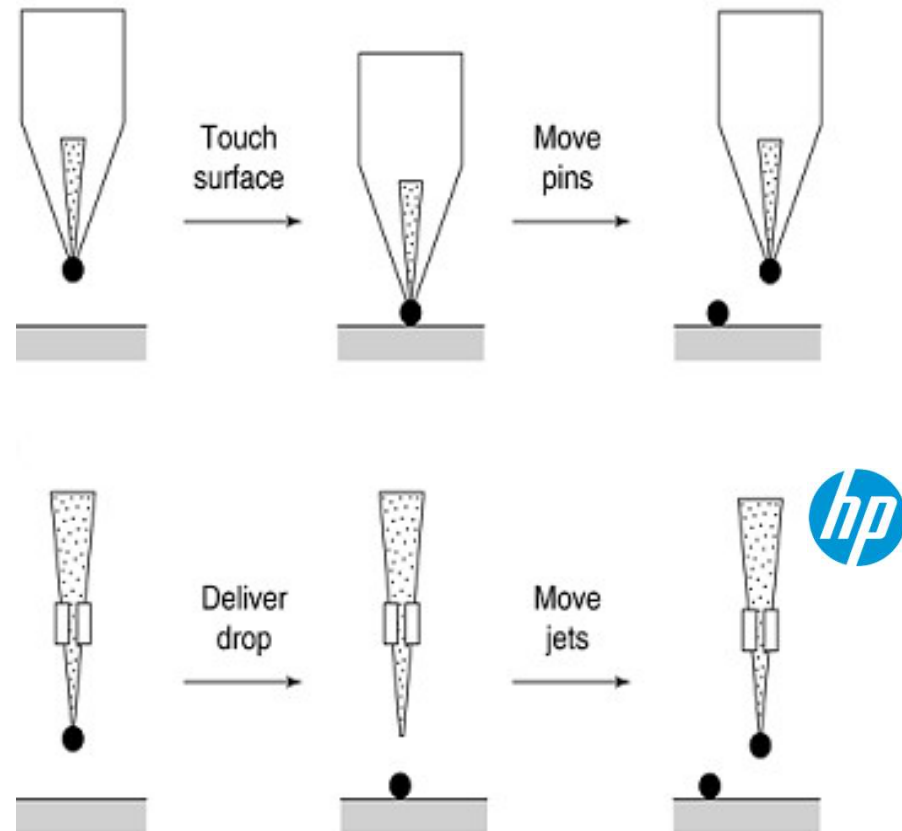
II) Bezkontaktní systémy

a) „ink-jet“ (kapacita až 10000nl)

- piezoelektrický (4-100nl)
- elektromagnetický (0,05-10nl)

b) „bubble-jet“

Nanášecí tělesa



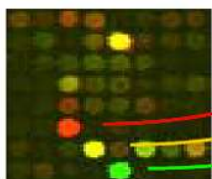
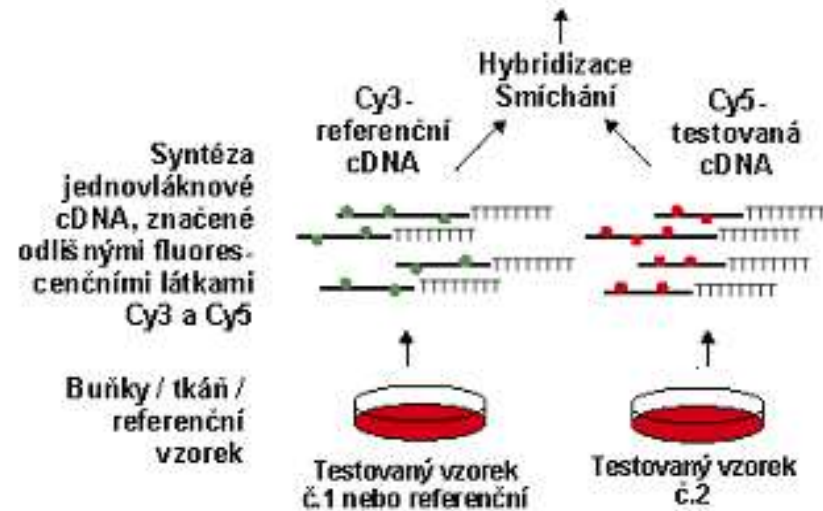
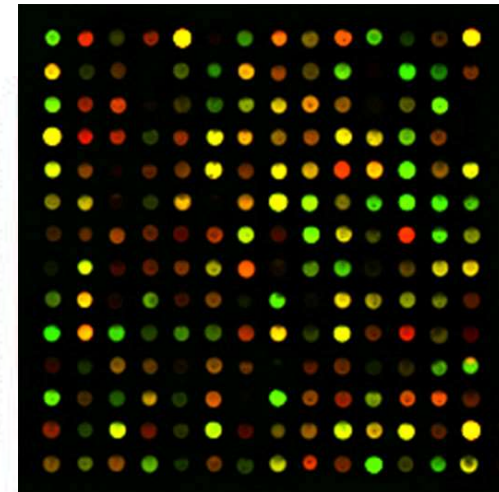
cDNA čipový experiment

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 Cy3 – 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	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



Cy3 Snížená exprese genu
Cy5 Zvýšená exprese genu

oDNA čipy (Affymetrix)

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

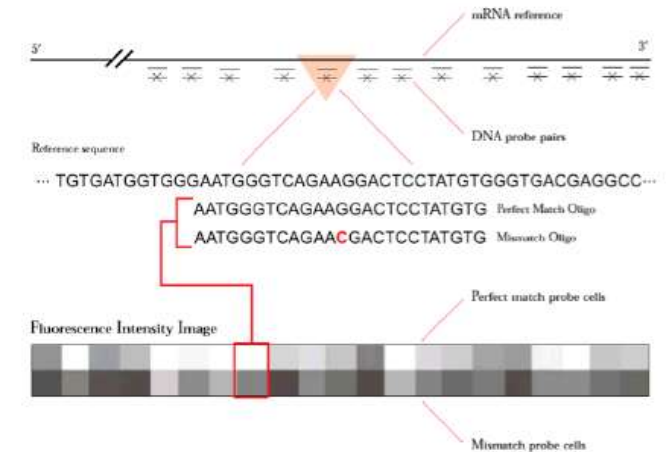
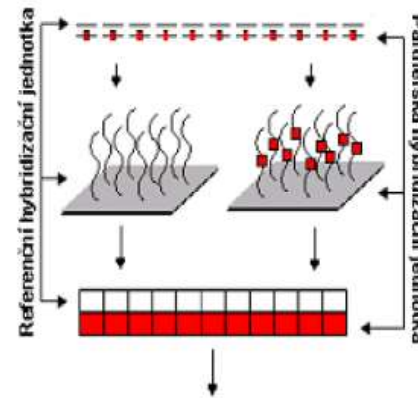
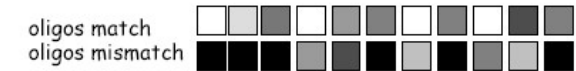
PŘÍPRAVA OLIGONUKLEOTIDOVÝCH SOND

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

Combining databases, empiric knowledge

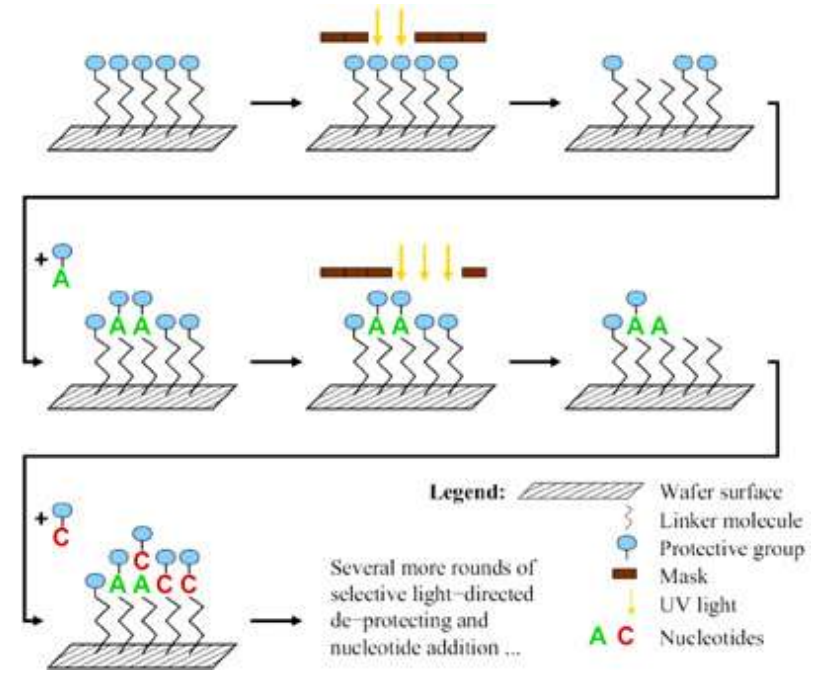
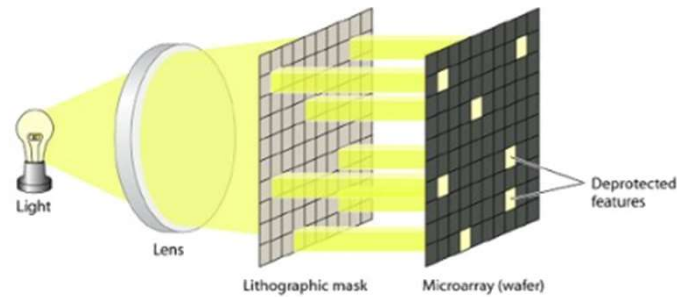


- Probe set: - at least 11 unique oligos (25-mers)
 - spread over 600 bp 3'-end
 - spread over the whole chip
 - match-mismatch oligos



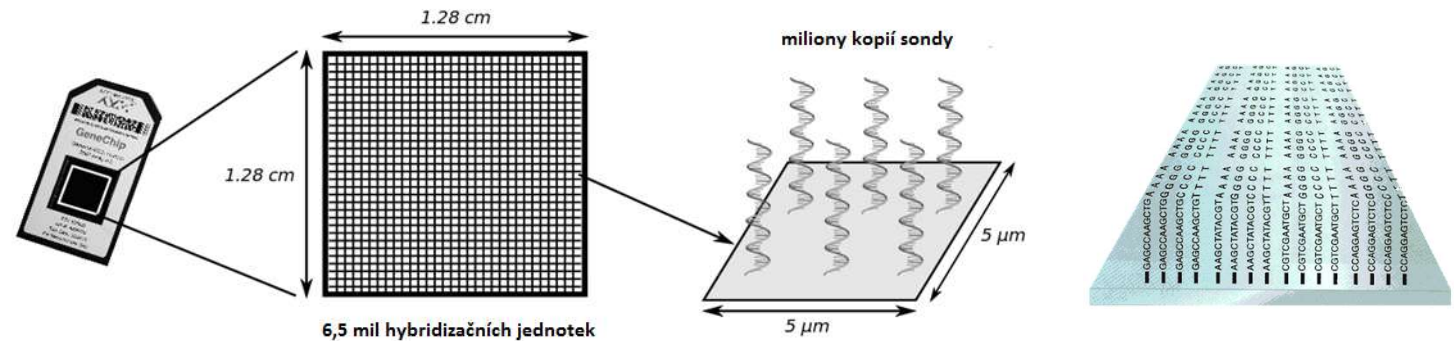
Výroba oDNA čipů

- série masek
- nukleotidy s protektivní skupinou
- ozáření UV světlem
- začlenění do řetězce



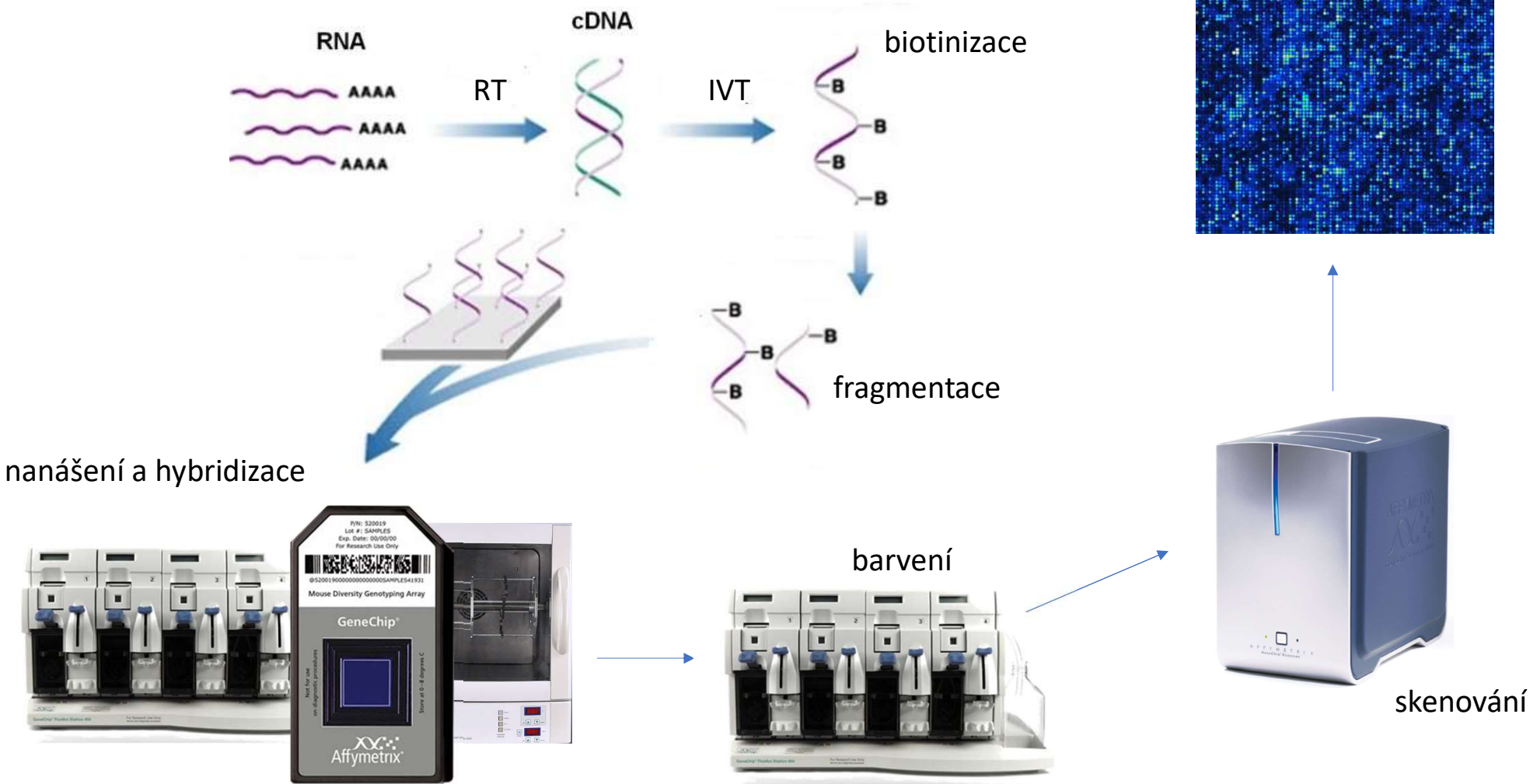
Klady a zápory

- Mnoho masek
- Nákladná výroba
- +/- Komerční výroba
- + Vysoká hustota sond



oDNA čipový experiment

bioinformatická analýza



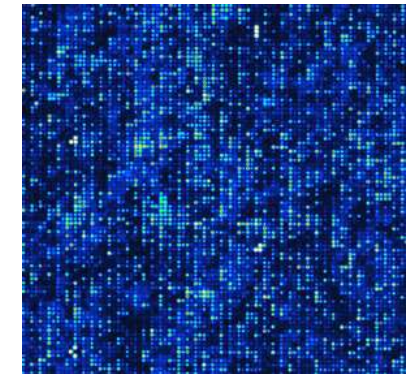
nanášení a hybridizace

biotinizace

fragmentace

barvení

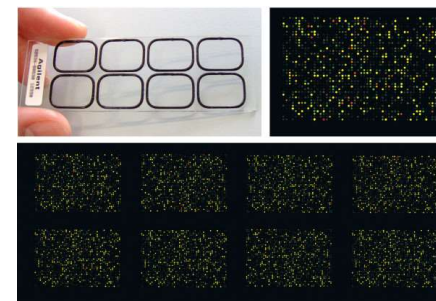
skenování



Mikročipy – diagnostické využití

- Agilent Oligo Microarray kit, Agilent Technologies - 60-ti nukleotidové próby
- analýza exprese 70 nejdůležitějších genů spojených s recidivou karcinomu prsu

- analýza exprese 80 genů, které klasifikují podtypy karcinomu prsu a odpověď na systémovou léčbu



Provide Physician Guidance

High Risk

Low Risk

Ultra Low Risk

Přínos chemoterapie

Žádný přínos chemoterapie

Žádný přínos chemoterapie

Přínos endokrinní léčby

Přínos endokrinní léčby

Bezpečná redukce endokrinní léčby



Results and Treatment Insights

Luminal

HER2

Basal

Roste pomaleji
Pravděpodobná odpověď na endokrinní léčbu

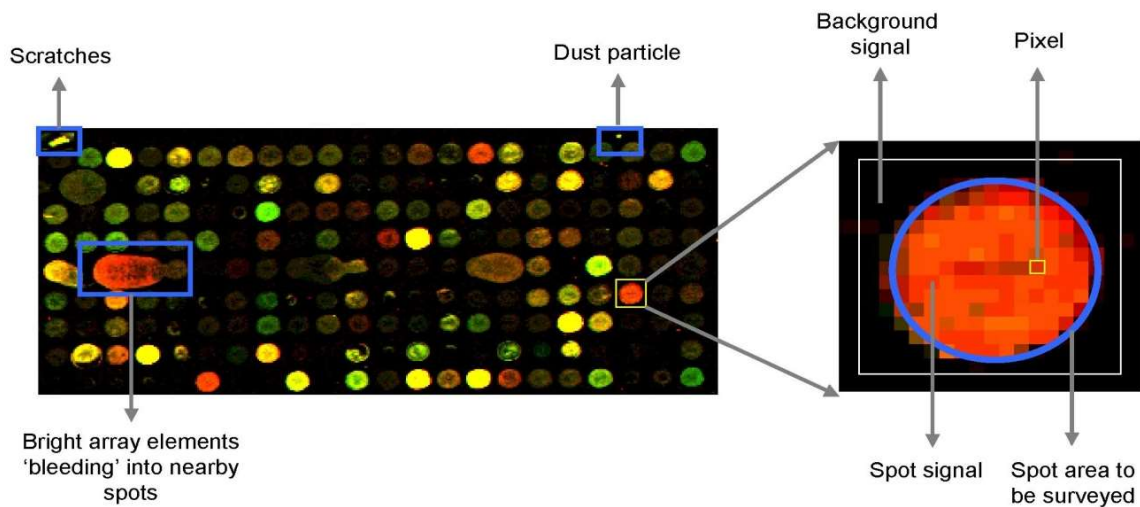
Roste rychleji
Lze často úspěšně léčit cílenou anti-HER2 terapií

Roste rychleji
Obvykle nereagují na endokrinní nebo anti-HER2 léčbu

Nedávný převod MammaPrint z testu založeného na mikročipech na NGS!

Základní zpracování dat

- převod obrazové informace (digitalizovaný obraz) na numerická data
- software identifikuje jednotlivé spoty
- rozdělení pixelů na popředí (intenzita spotu) a pozadí
- kvantitativní data/ kvalitativní (signal-to-noise ratio)



- Kvalita čipu
- Identifikace spotů
- Kvantifikace signálu
- Měření pozadí

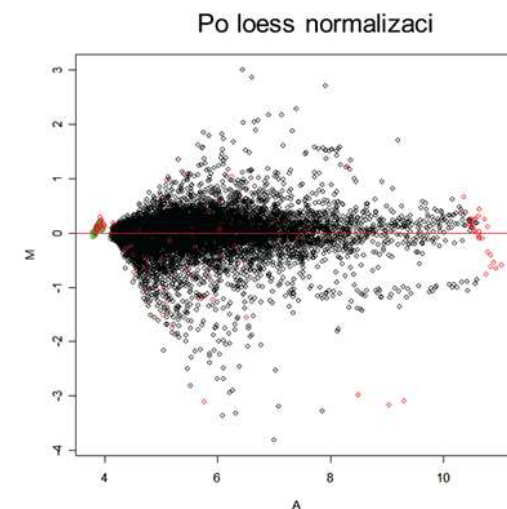
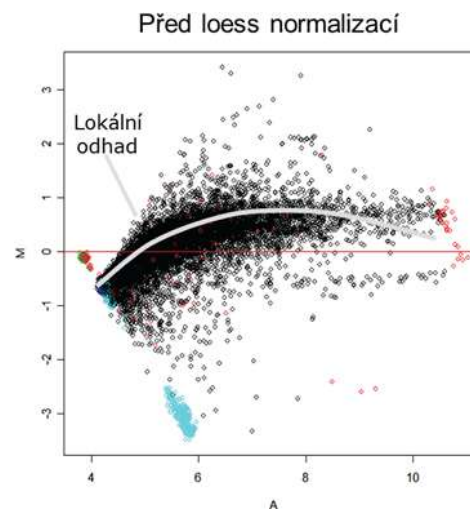
- Odstranění hodnot (mimo rozmezí)
- Odečtení pozadí

Základní zpracování dat

- před statistickou analýzou chceme minimalizovat nebiologickou variabilitu (technologická)
- nutná normalizace dat
- porovnání např. exprese genů mezi různými hybridizačními běhy
- vychází z předpokladu, že **počet genů se změnou expresí je méně než genů s nezměnou**
- úprava střední hodnoty exprese (přizpůsobení distribuce všech poměrů intenzit k hodnotě celkového mediánu k hodnotě 1)

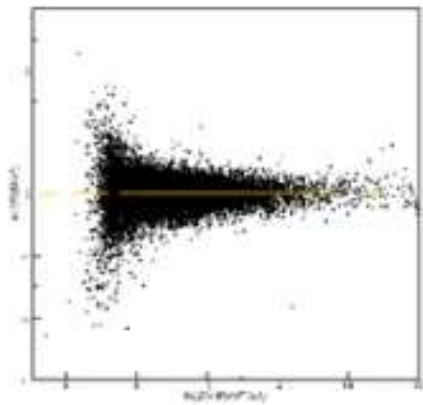
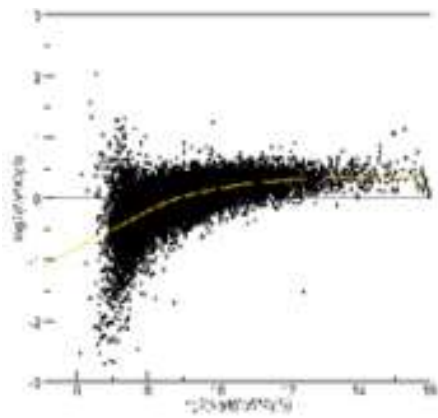
Neparametrická lokální vážená regrese LOWESS

- tzv. vyhlazování
- závislé na intenzitě signálu
- odhadnutí lokálních trendů/regrese
- odečtení od původních hodnot



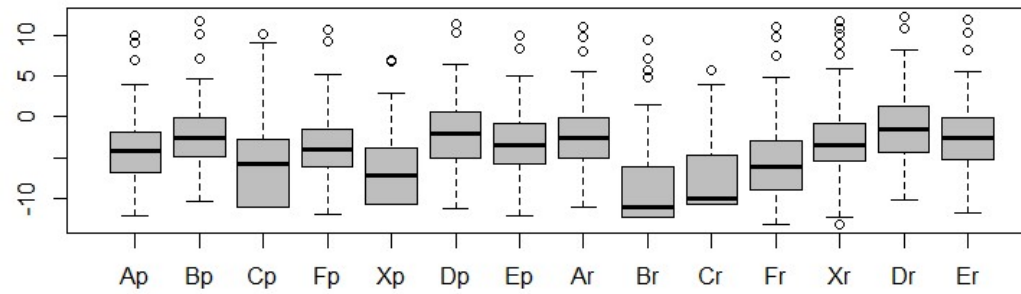
Základní zpracování dat

Vzorek

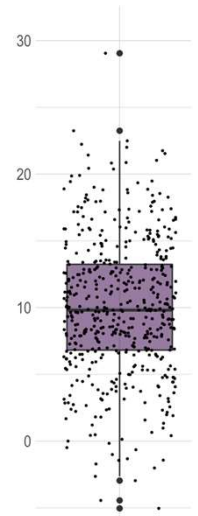
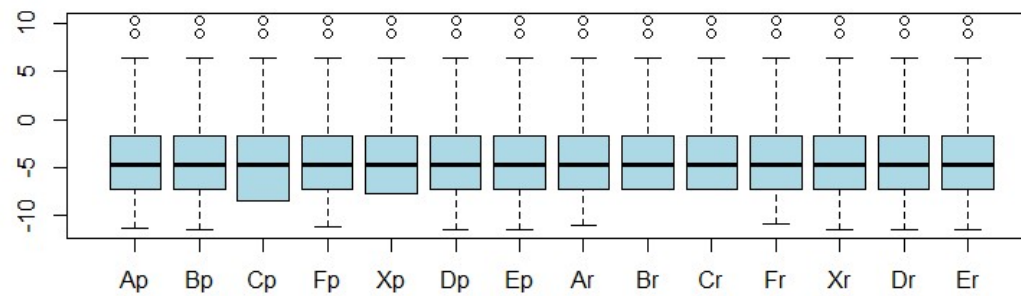


Sada vzorků

Original data



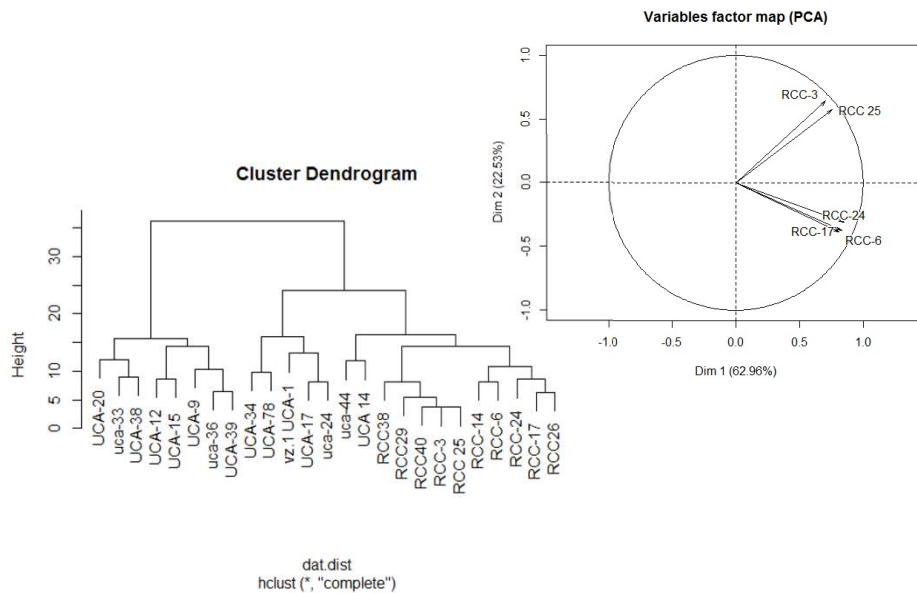
Normalised data



Základní statistická analýza dat

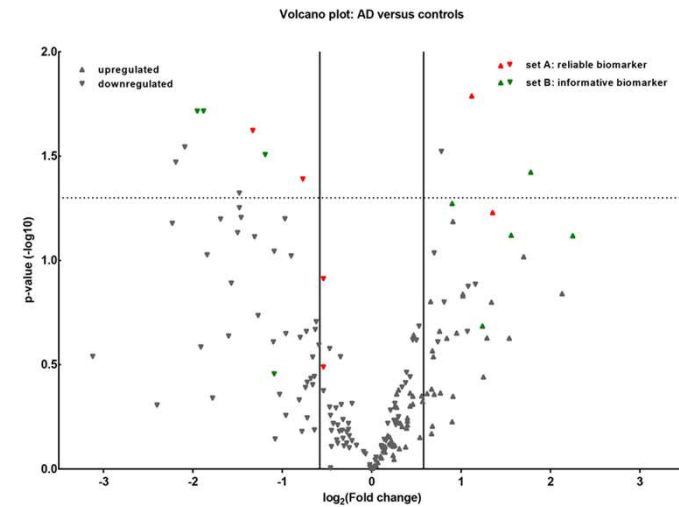
Neřízené(unsupervised) metody

- vstup pouze naměřené hodnoty
- **shlukovací analýza** – dendrogram
- analýza hlavních komponent (PCA)



„Supervised“ metody – testování rozdílů

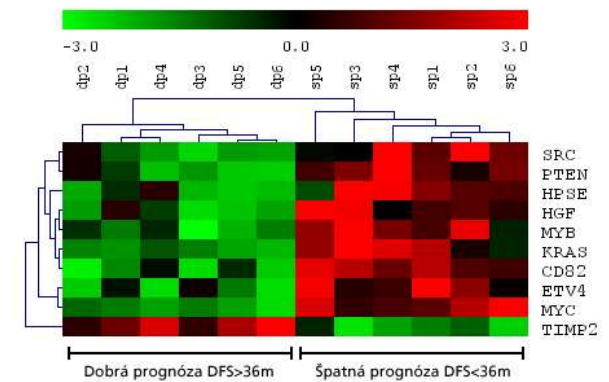
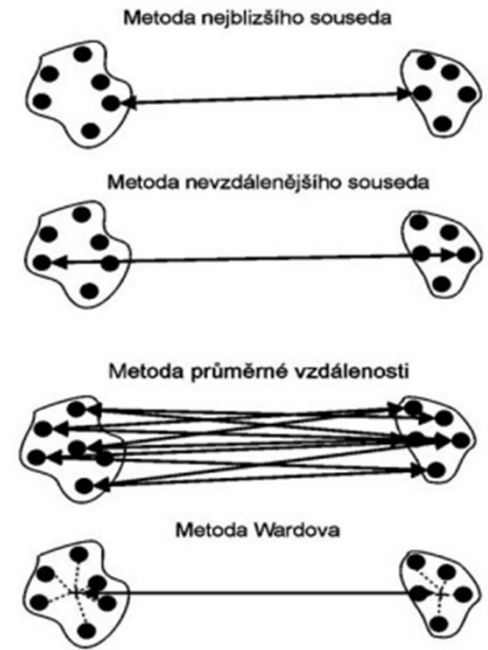
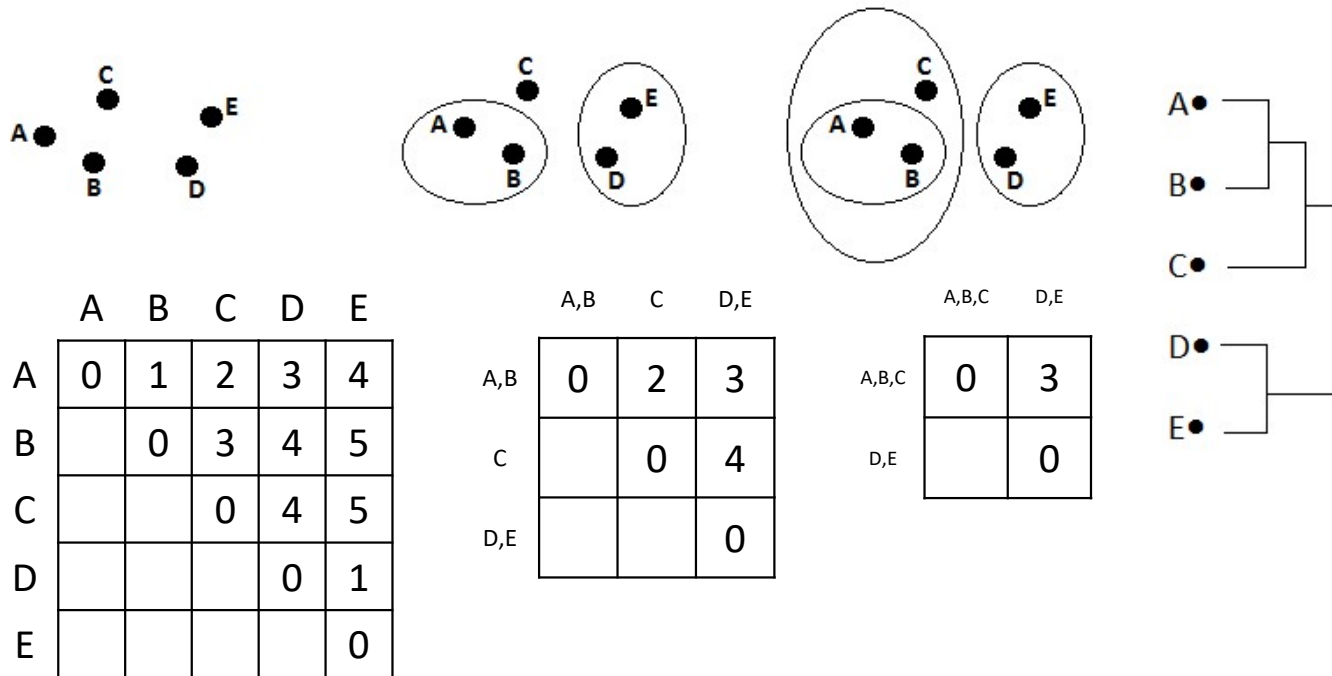
- hodnoty i další informace
- Fold change
- **statistická významnost změny**



Shlukovací analýzy

Hierarchické shlukování – hledáme geny/vzorky s podobným chováním

- iterativní porovnávání expresních profilů
- podobnost vyjádřena hierarchickým stromem - dendrogramem

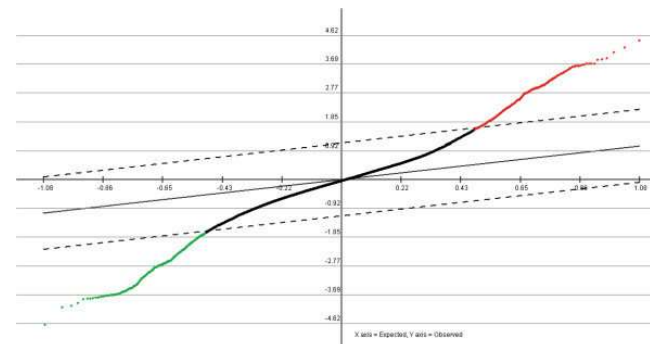
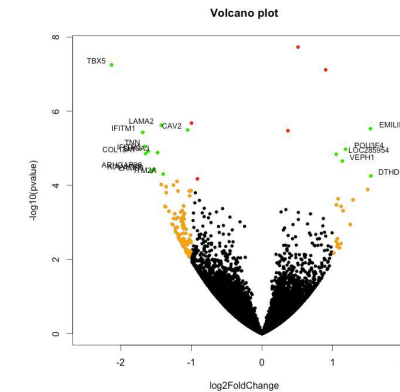
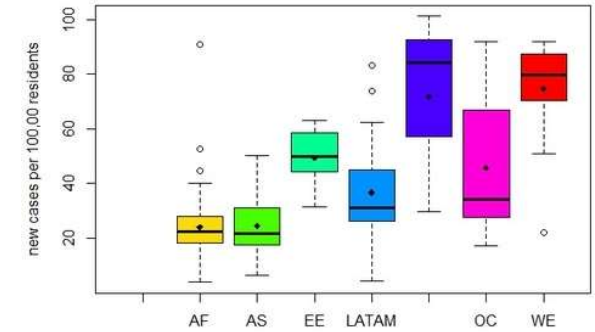


Supervised metody

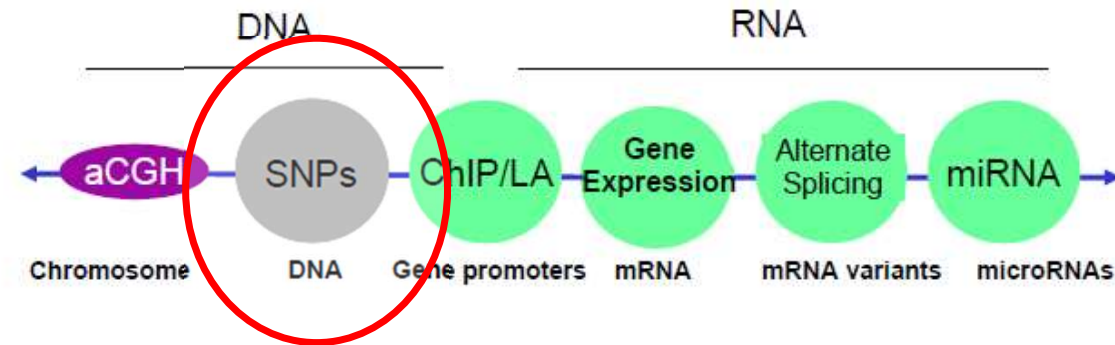
- geny s reprodukovatelnou signifikantně rozdílnou expresí mezi jednotlivými podmínkami experimentu (zdravý vs. nemocný)
- testování rozdílů
- fold change a statistická významnost této změny
- t-test, ANOVA, lineární modely nebo neparametrické testy (Wilcoxonův, Kruskal-Wallisův)
- SAM (significance analysis of microarray) – multiplicita testování

Příklad:

- Kritická hodnota pravděpodobnosti $\alpha=1\%/5\%$
- Tzn. 1% testů vyjde významně náhodou
- Microarray – 20 000 genů = 200 genů falešně pozitivní
- SAM – permutace a odhad FDR (false discovery rate)
- QQ graf



SNP čipy (SNP arrays)



Mezi lidmi je přibližně 99,9% shoda v sekvenci DNA

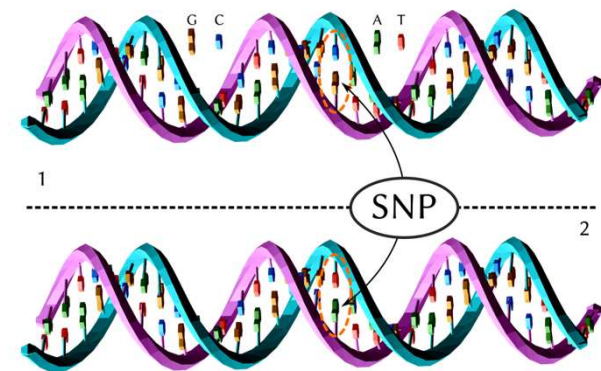
Zbývajících 0,1 % nás činí jedinečnými (jak vypadáme, **nemoci, kterými budeme trpět, ...**)

SNP = single nucleotide polymorphism, jsou jednonukleotidové polymorfní znaky

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%.

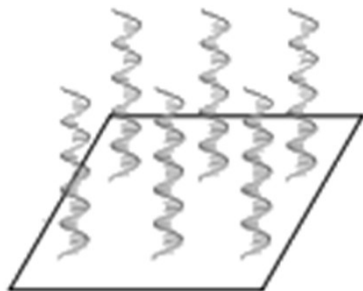
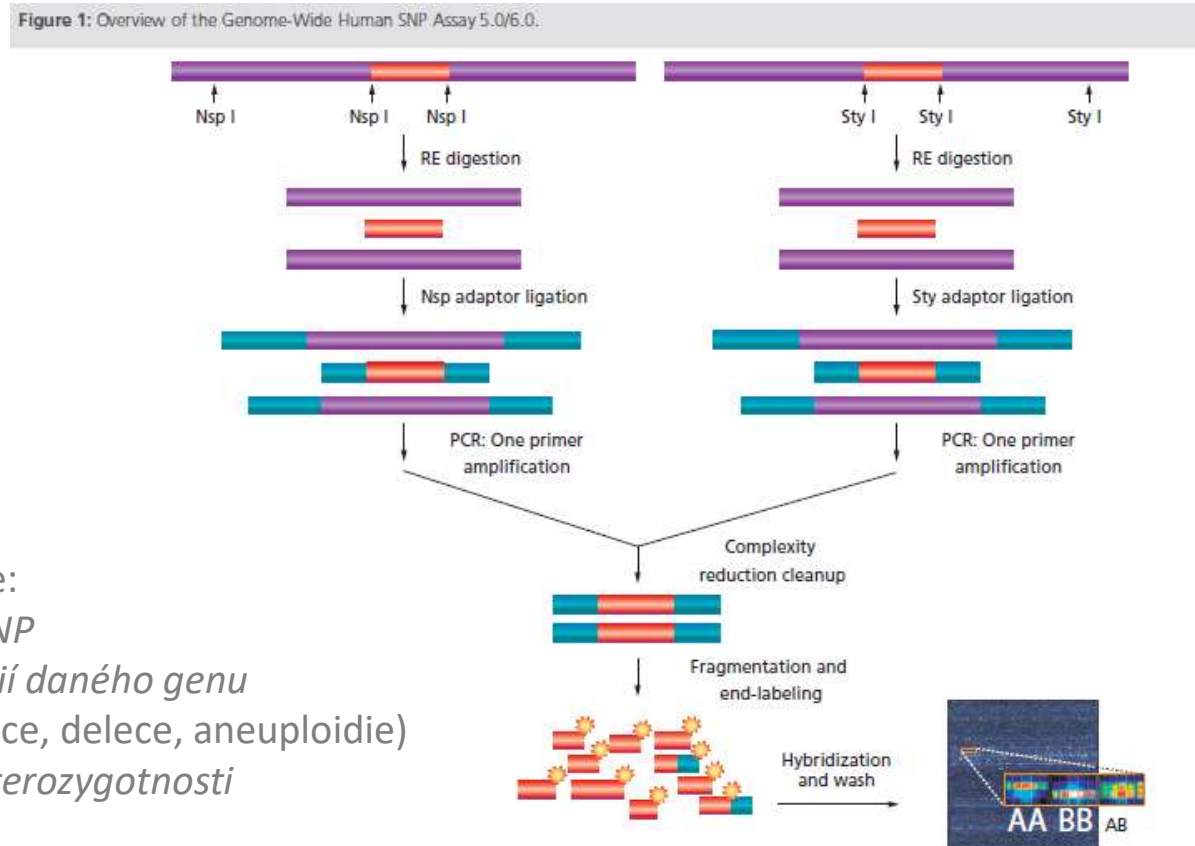
Celogenomové mapy SNPs jsou dostupné ve webových databázích

- přibližně 1 SNP na 1.000 bp
- 90 % genů obsahuje alespoň 1 SNP
- 15 milionů SNP



Affymetrix 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)

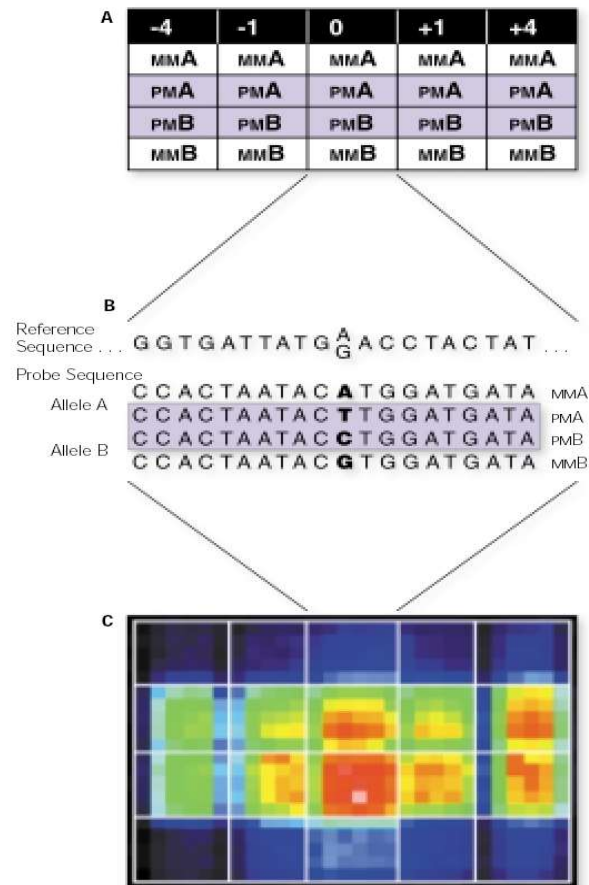


Sondy navržené pro detekci SNP

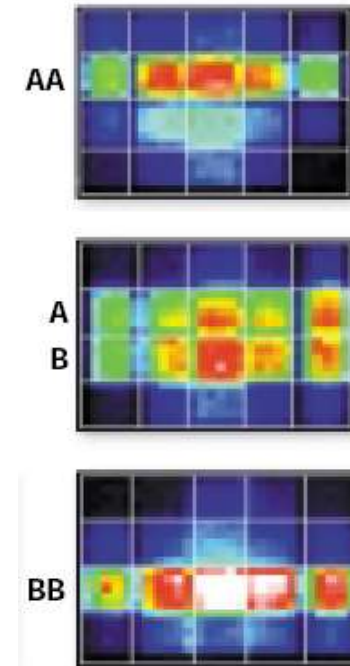
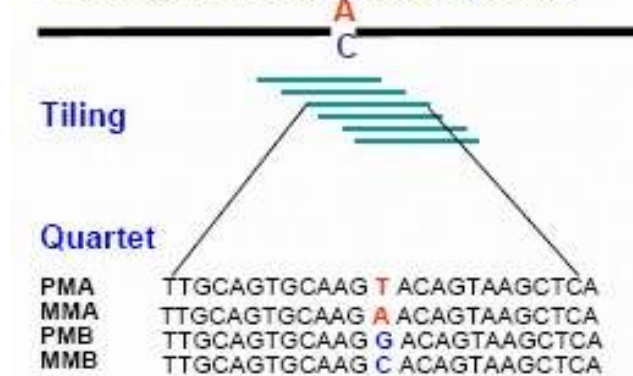
Umožňuje:
Detekci SNP
Počít kopí daného genu
(amplifikace, delecce, aneuploidie)
Ztráta heterozygotnosti

Affymetrix SNP čipy

How the GeneChip® HuSNP™ Array Calls Genotypes



Genomic DNA reference sequence



Pro každou alelu 5 sond
+
5 párových sond s nukleotidovou
záměnou (šum pozadí)

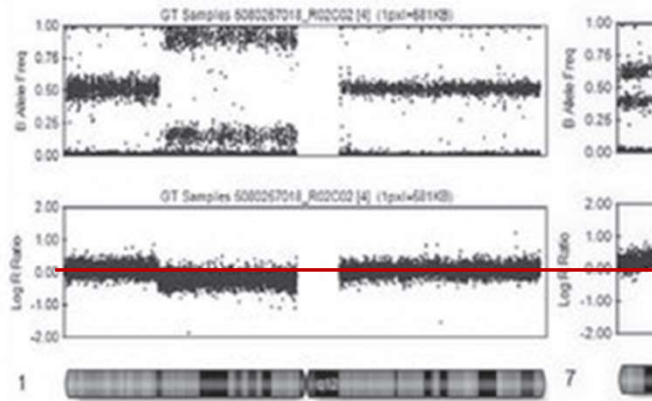
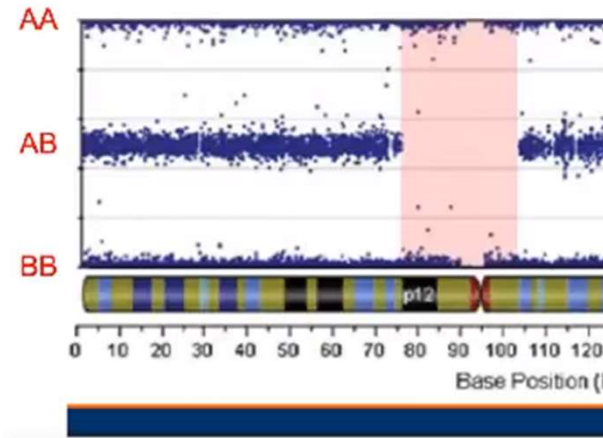
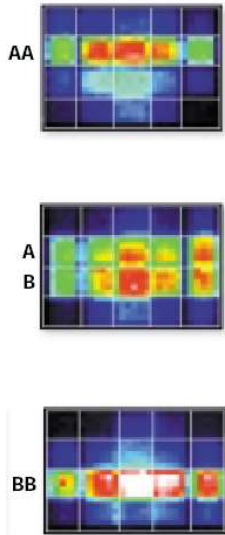
Přítomnost SNP
Hledané alely: AA, AB, BB
Intenzita signálu: počet kopií

Affymetrix SNP čipy

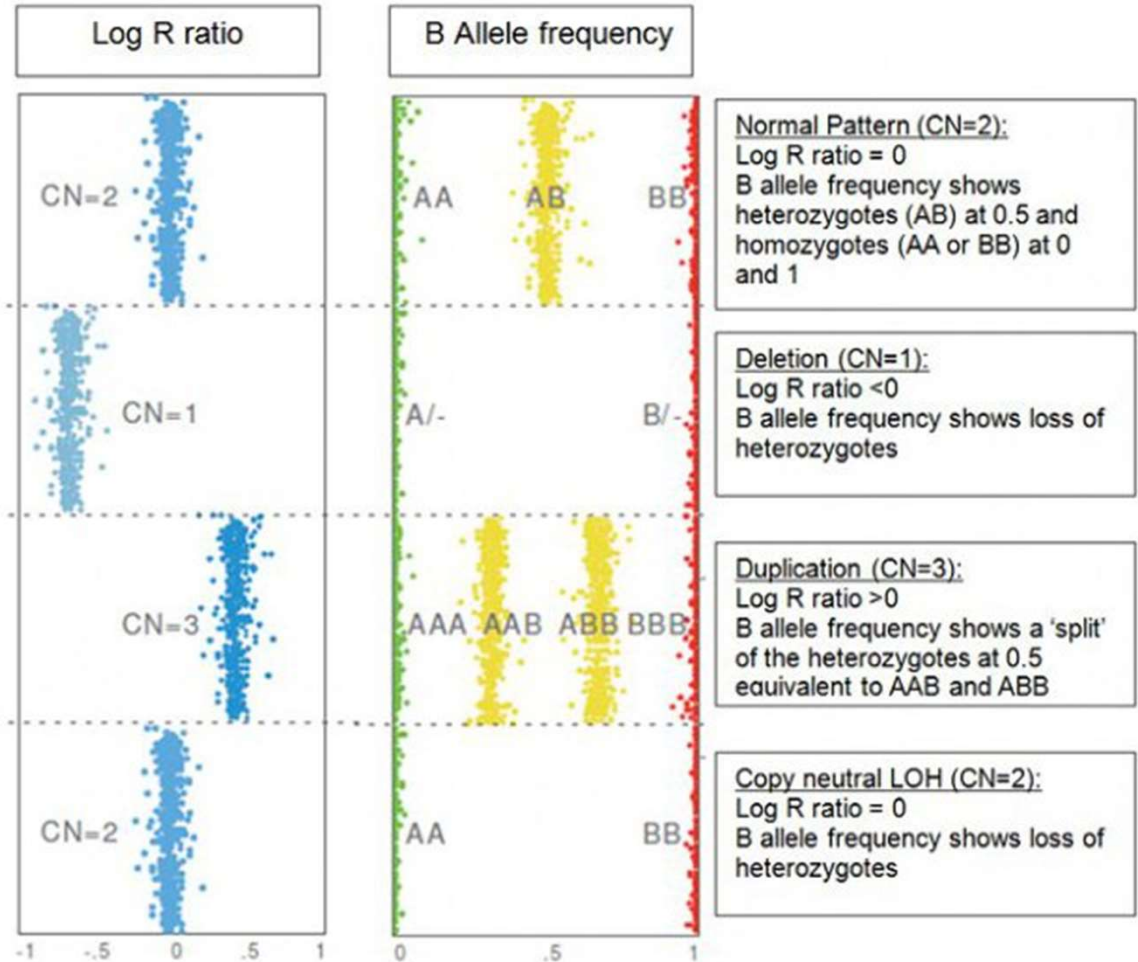
Detekce SNP

Počít kopíí daného genu (amplifikace, delece,...)

Ztráta heterozygotnosti

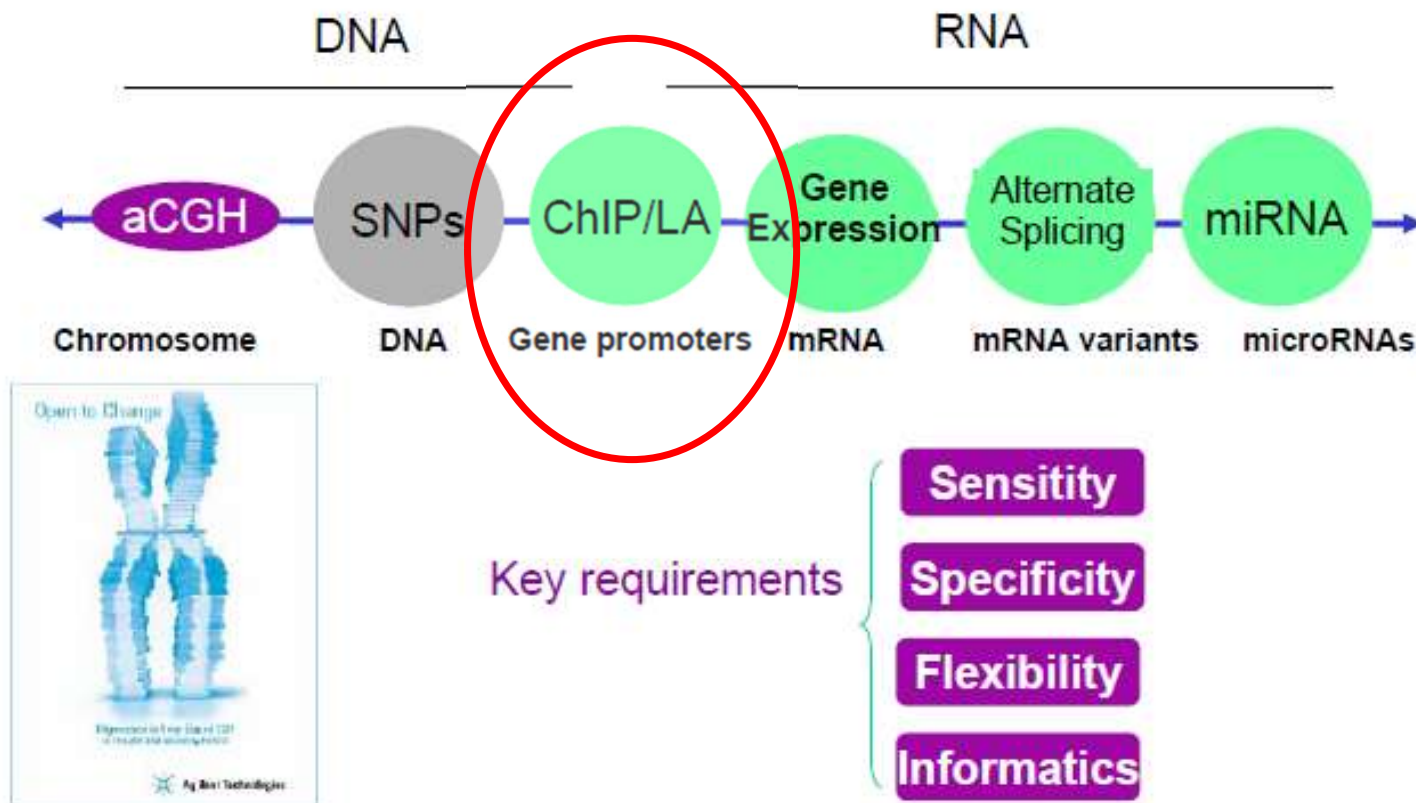


delece



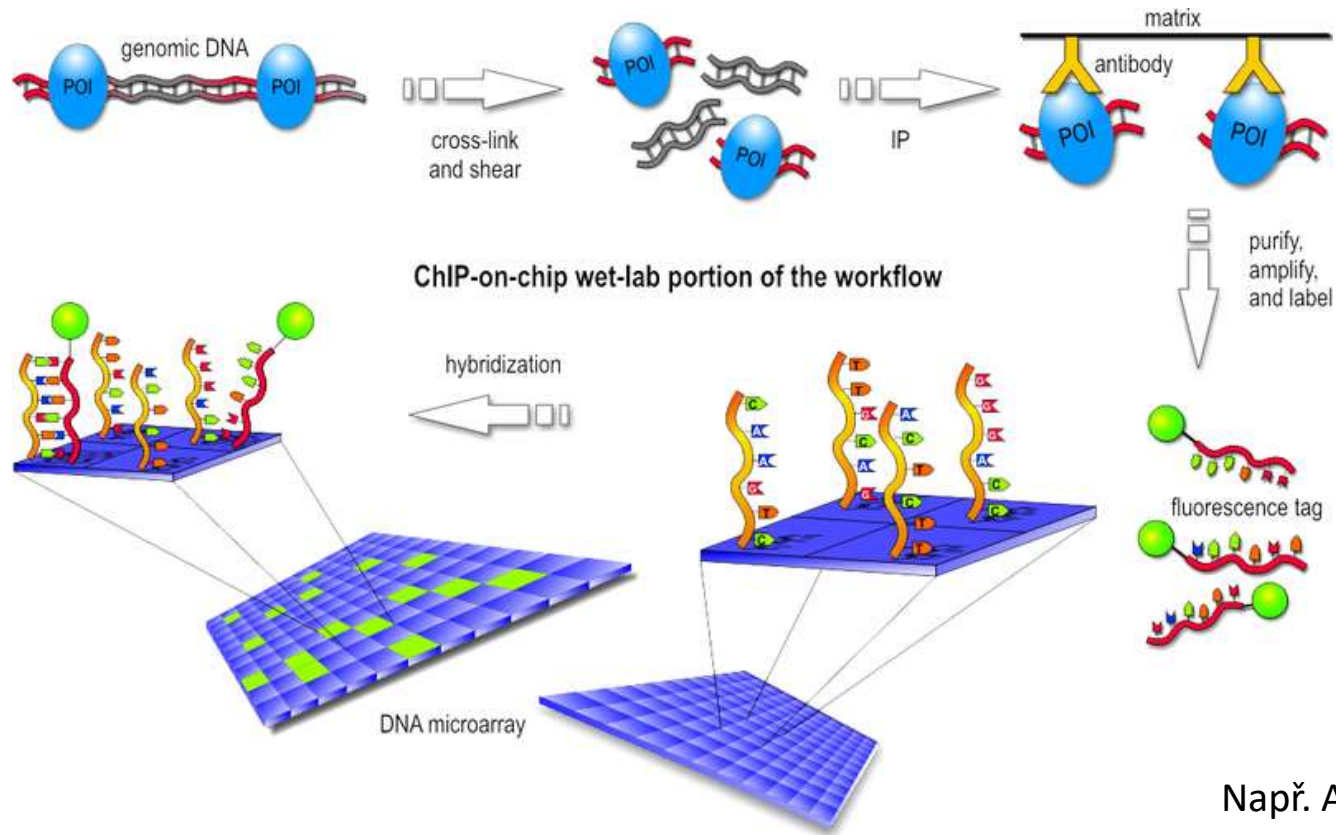
mu

Trend: More Microarray Applications



ChIP-on-chip technologie

- kombinace chromatinové imunoprecipitace a čipové technologie
- které geny jsou regulovány známými transkripčními faktory/DNA vazebnými proteiny?



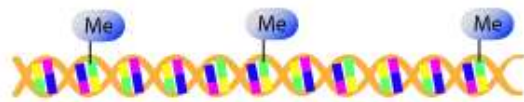
Protein/DNA interakce

Např. Agilent Technologies...

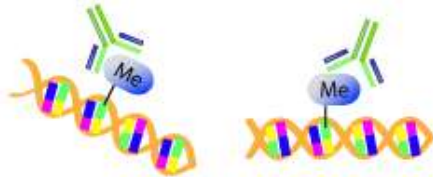
Technologie čipů k detekci methylace CpG oblastí

- V současnosti nejpoužívanější **EPIGENETIKA**

genomic DNA with 5-methyl-cytosine

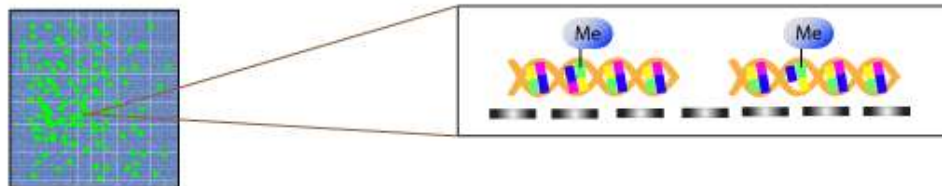


Sonication

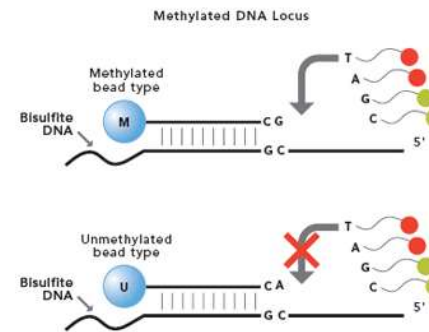


Immunoprecipitation with anti-5-methyl-cytosine antibody

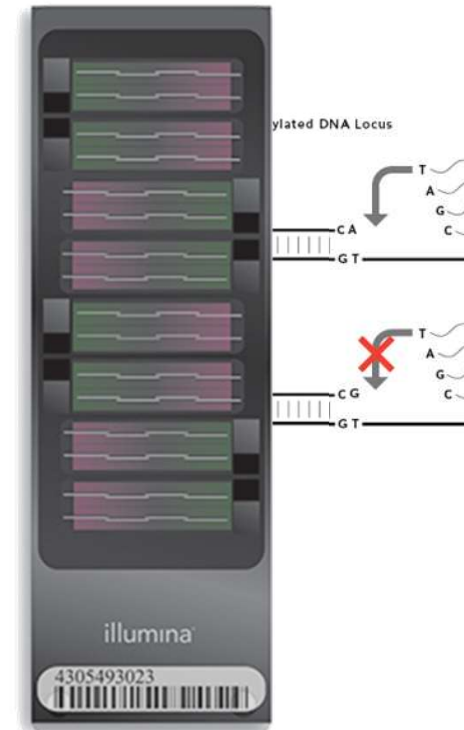
Hybridize to tiling array



Identify methylated cytosine across genome

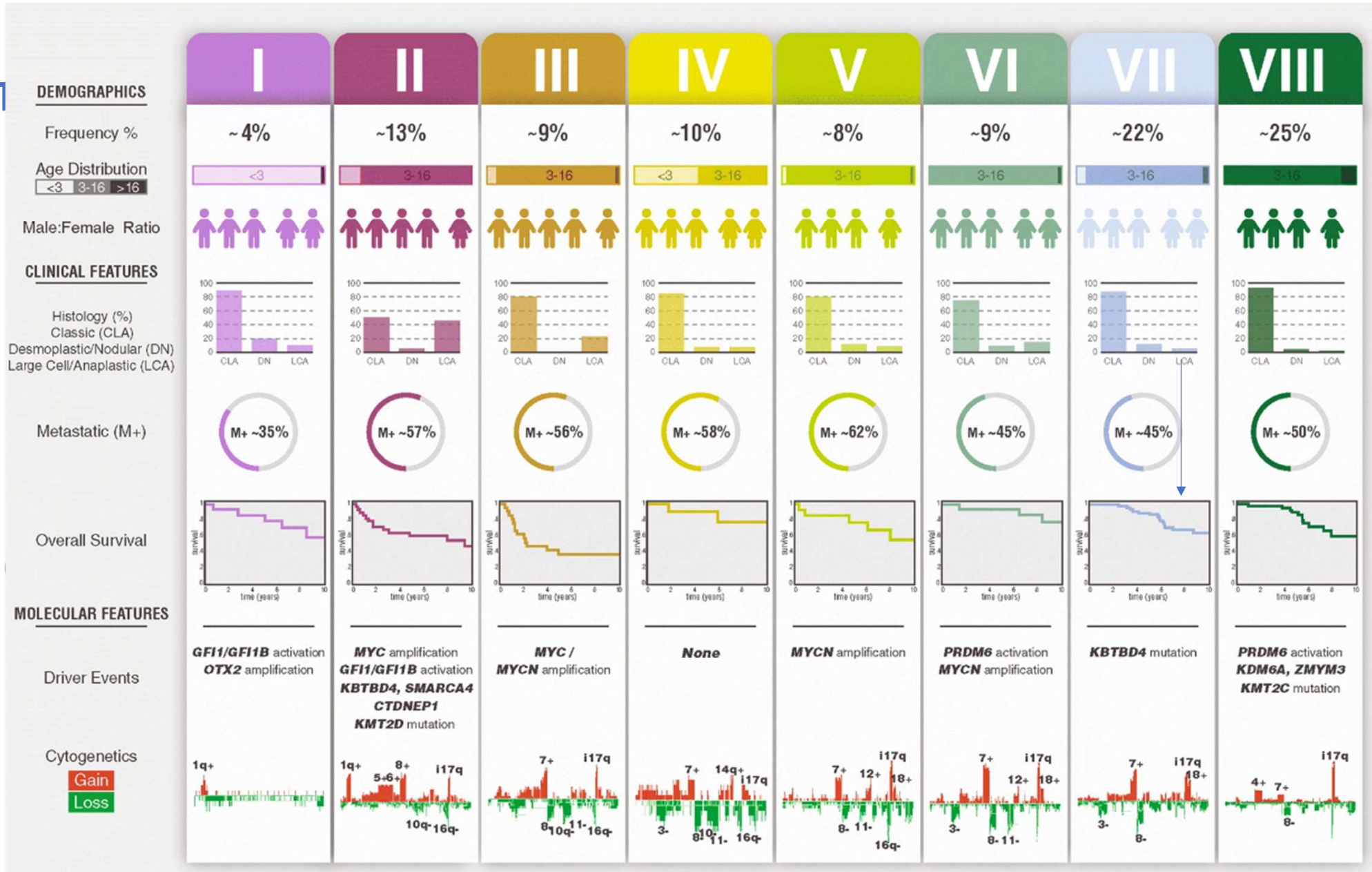


Bez Mab
Bisulfitová konverze
Methylace = C
Nemethylace = C -> U -> T

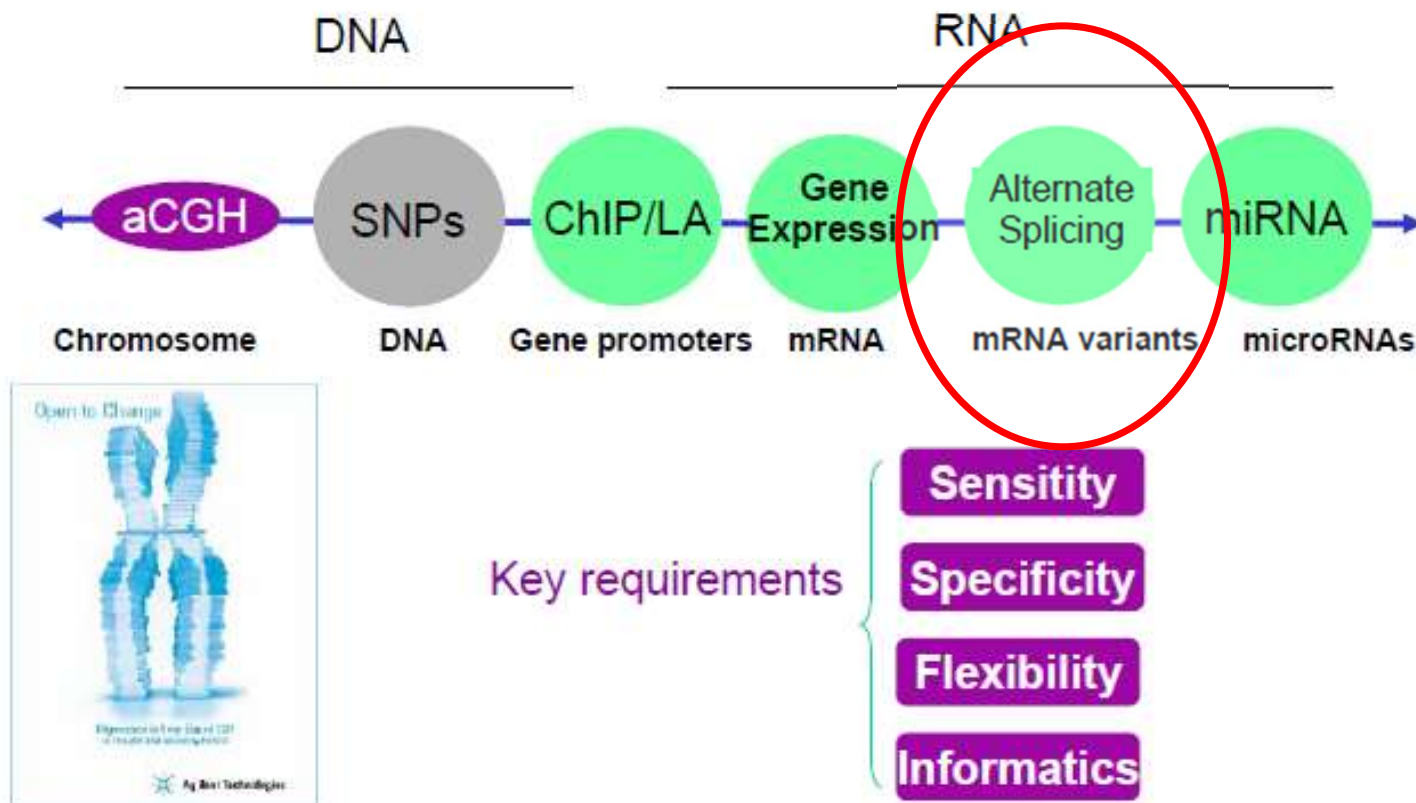


Např. Illumina, Agilent Technologies...

7

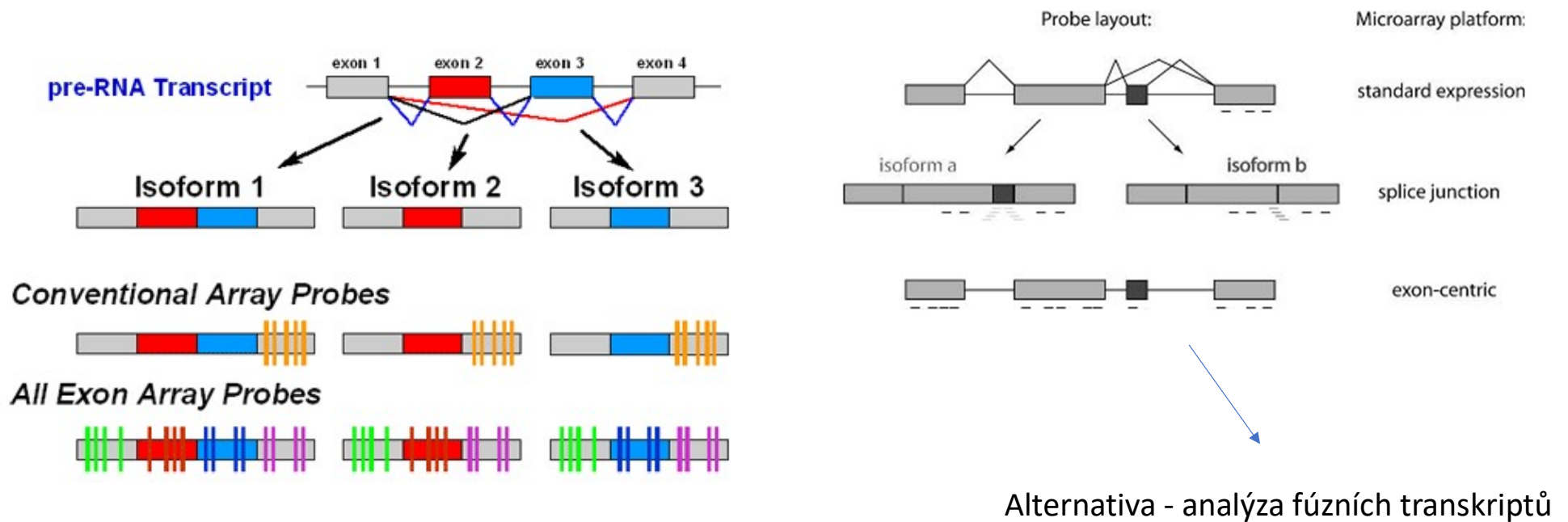


Trend: More Microarray Applications

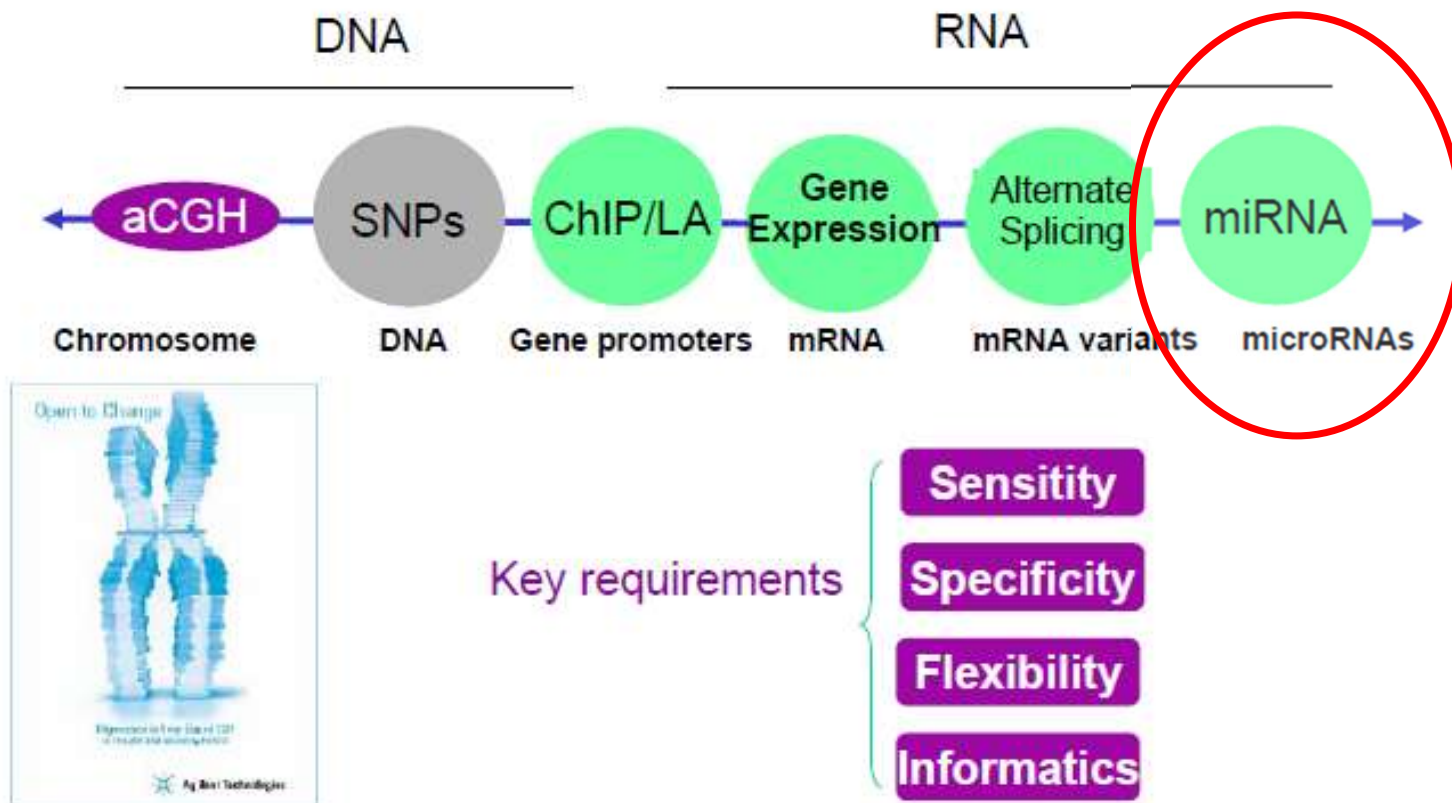


Technologie exonových čipů

- umožňuje detekci sestřihových variant známých genů
- sondy pro každý exon známých i predikovaných genů -> sestřihové mapy
- exon junction – sondy proti sestřihovým místům



Trend: More Microarray Applications



mikroRNA microarray

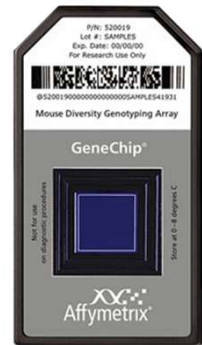
- analogická technologie jako u DNA čipů

XX GeneChip miRNA Arrays (Affymetrix)

130 ng celkové RNA

verze 4.0 **2578** lidských miRNA

+ 2025 pre-miRNA, 1996 snoRNA



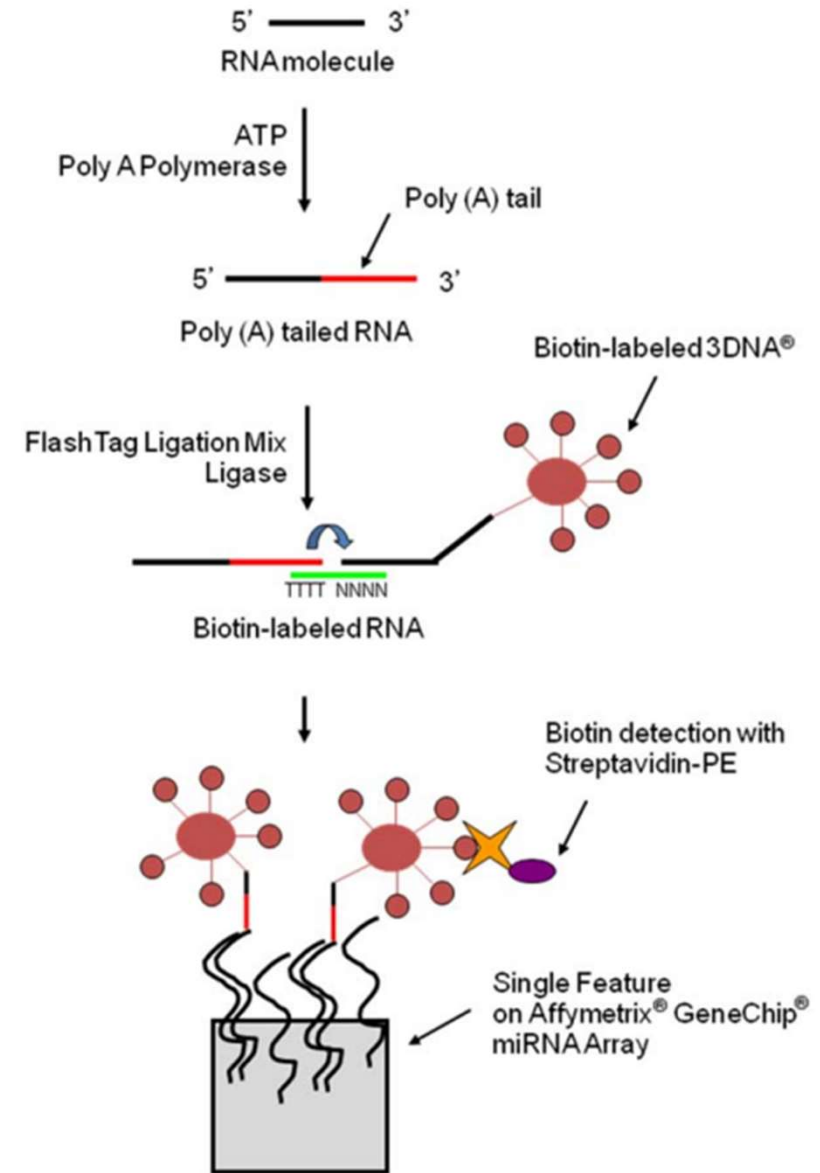
XX SurePrint Human miRNA Microarrays (Agilent Technologies)

(Agilent Technologies)

100 ng celkové RNA

verze 21.0 formát 8x60K

2549 lidských miRNA



Závěr

- v současnosti nahrazovány NGS
- limitace počtem fragmentů od již známých genů, miRNA, atd.
- cena (nemůže soupeřit s NGS)
- není explorativní experiment ve správném slova smyslu

- použití spíše v klinické diagnostice (aCGH, SNP, DNA, methylace)