

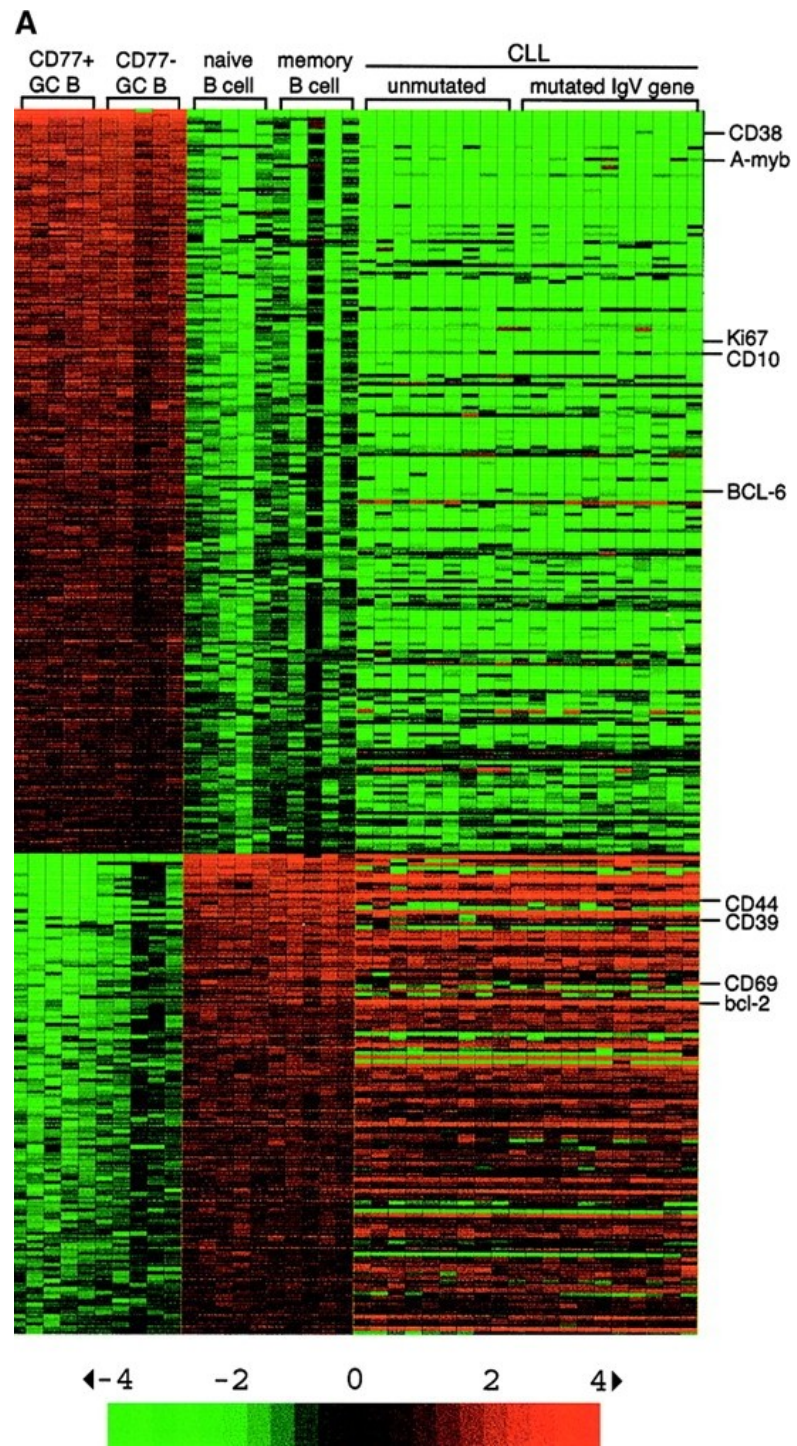
# Výzkumné strategie pro využití čipových technologií

Dr. Martin Trbušek

Fakultní nemocnice Brno

## Základní typy „microarrays“

- **Expresní čipy (mRNA, microRNA) GEP**
- **Genomické čipy (CGH, SNP)**
- **Resekvenační čipy**



# Přinést zásadní nový poznatek pomocí „čipů“ není jen tak

Na co vždy pamatovat:

- *Microarrays* jsou technicky velmi náročné
- Časově velmi náročné a pěkně drahé
- Vyžadují doprovodné metodiky pro ověření výsledků – např. u expresních čipů real-time PCR, Western blot atd.

(čipem nic nekončí!)

- Musí stavět na silném intelektuálním zázemí výzkumné skupiny

(velký problém – málokdy splněno!)

## A dále....

- **Měly by stavět na originálním uspořádání experimentu**  
také málokdy splněno, zkoumá se vyzkoumané;  
naš největší kamarád je PubMed! ([www.pubmed.com](http://www.pubmed.com))
- **Vyžadují vědeckou upřímnost**  
nepřikrášlovat si výsledky, „ani když už jsem do toho tolik investoval...“, např. vynechání *nepohodlných* vzorků.  
Fujtajksl.

# Moderní technologie velmi rychle stárnou.....

- **Microarrays – vrchol zhruba 2000-2005**

Mezitím vývoj různých platforem....Agilent vs. Affymetrix; aCGH vs. SNP čipy

- **A pak přišlo sekvenování nové generace (NGS)**

A můžeme začínat znovu.....

# Čipy se nejčastěji používají v onkologii

## Základní společné rysy nádorových buňky

Deregulace buněčného cyklu (**narušení kontrolního bodu G1/S**)

Únik před apoptózou (programovanou buněčnou smrtí)

Udržování „životaschopné“ délky telomér

Zajištění „kvalitní“ opravy DNA (**zejména v G2 / M-fázi buněčného cyklu**)

**Invazivita v primární tkáni**

**Angiogeneze**

**Metastázování**

**Selekce nových rezistentních klonů léčbou**

# Nádorová buňka a buněčný cyklus

**G1 → S → G2 → M**

Kontrolní body

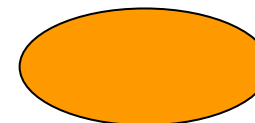
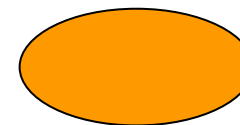
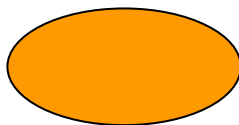
G1/S

S

G2/M

Univerzální  
inaktivace  
v nádorových buňkách

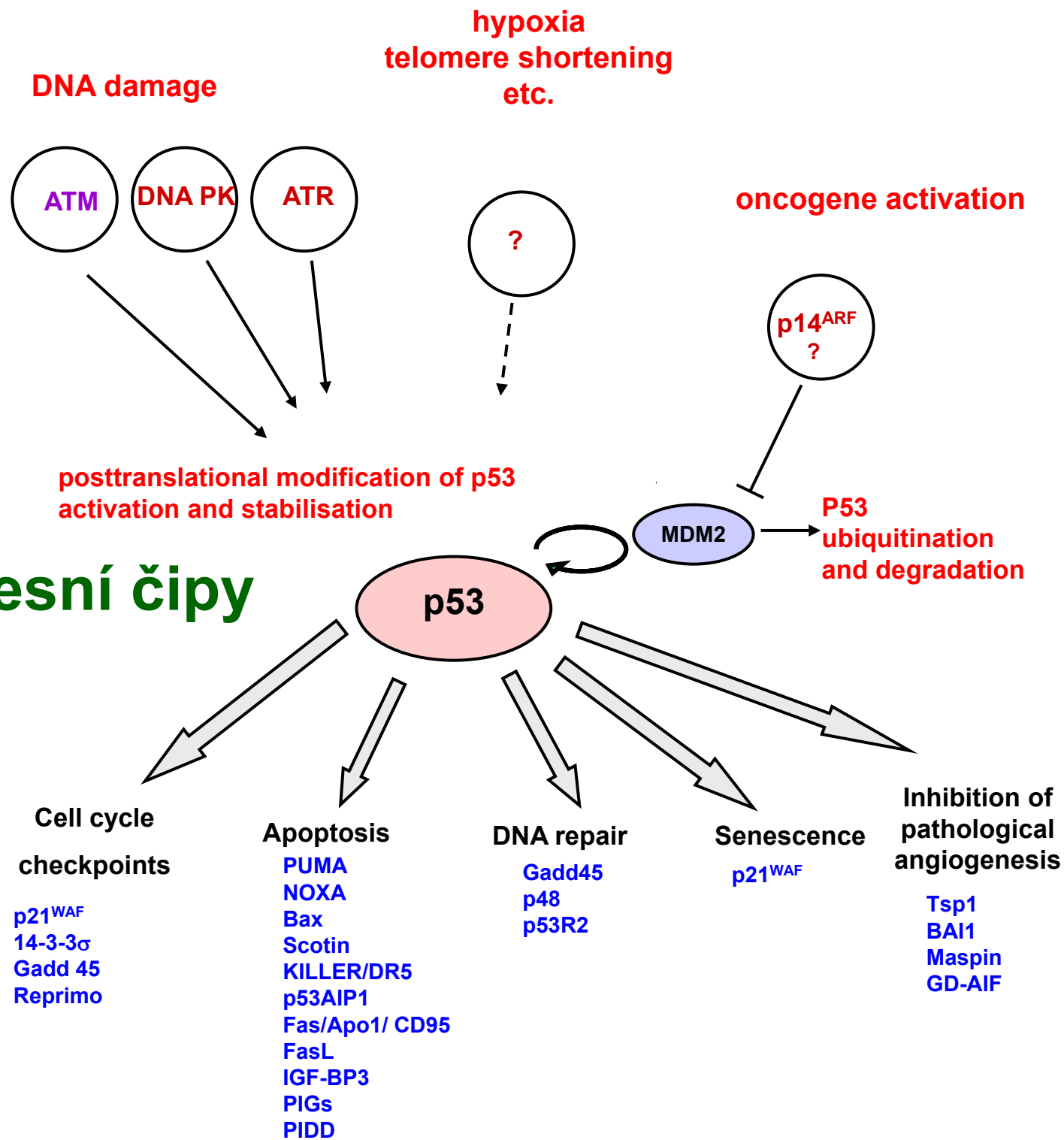
Mutace p53, Rb,  
Atm,  
p16 a jiné





# Modelová situace I

## p53 a expresní čipy

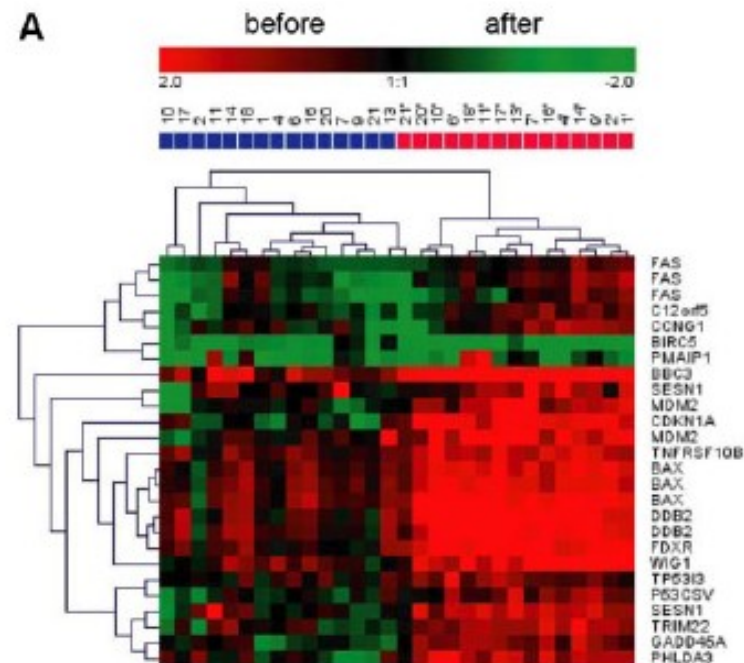


# Nádory reagují dobře na „low-dose RT“ (ovšem jen ty s wt-p53)

In vivo p53 response and immune reaction underlie highly effective low-dose radiotherapy in follicular lymphoma

Laurent Knoops,<sup>1,2</sup> Rick Haas,<sup>3</sup> Sanne de Kemp,<sup>4</sup> Donné Majoor,<sup>1</sup> Annegien Broeks,<sup>4</sup> Eric Eldering,<sup>5</sup> Jan Paul de Boer,<sup>6</sup> Marcel Verheij,<sup>3</sup> Conny van Ostrom,<sup>6</sup> Annemieke de Vries,<sup>6</sup> Laura van't Veer,<sup>1,4</sup> and Daphne de Jong<sup>1</sup>

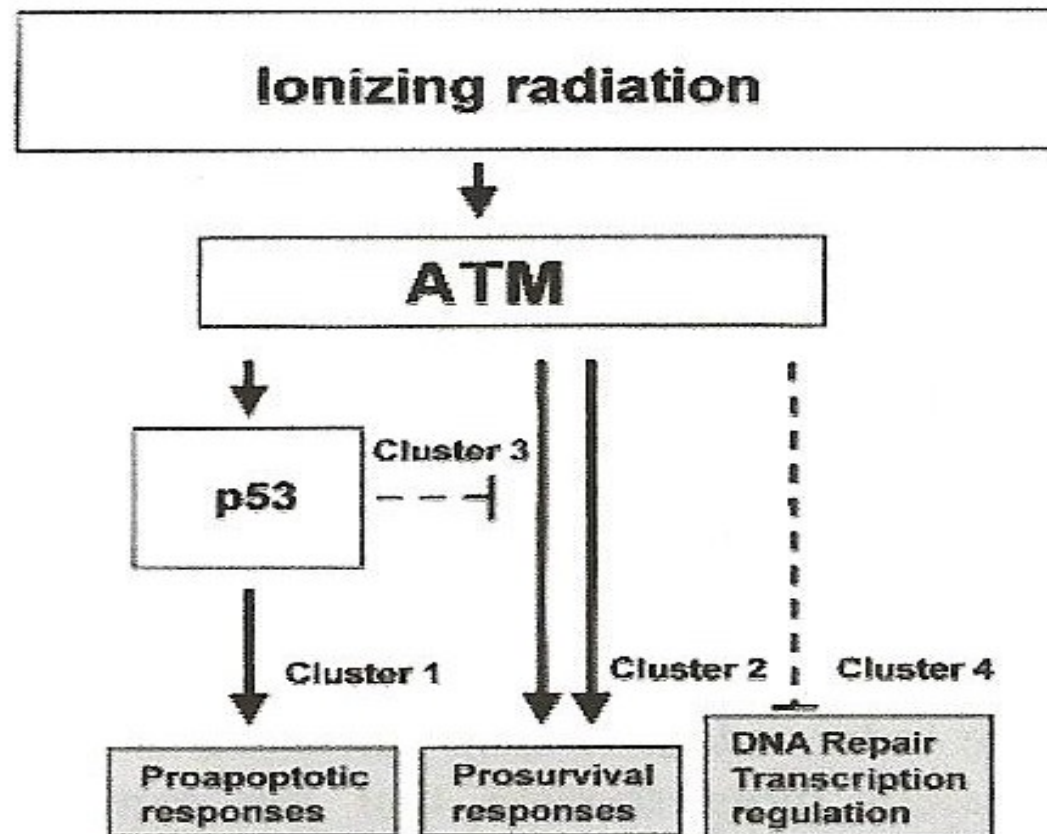
<sup>1</sup>Department of Pathology, The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, the Netherlands; <sup>2</sup>Experimental Medicine and Hematology Units, Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgium; Departments of <sup>3</sup>Radiotherapy, <sup>4</sup>Experimental Therapy and Diagnostic Oncology, and <sup>6</sup>Hematology, The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, the Netherlands; <sup>5</sup>Department of Experimental Immunology, Academic Medical Centre, Amsterdam, the Netherlands; <sup>6</sup>Laboratory of Toxicology, Pathology and Genetics, National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, the Netherlands



**Analýza expresních čipů profituje zejména z dokonalé znalosti funkce studovaných genů**

**(to umožňuje přejít od genů k procesům)**

## A pak to stojí za to



IR indukuje > 1 000 genů

Přibližně 1/3 v dráze p53

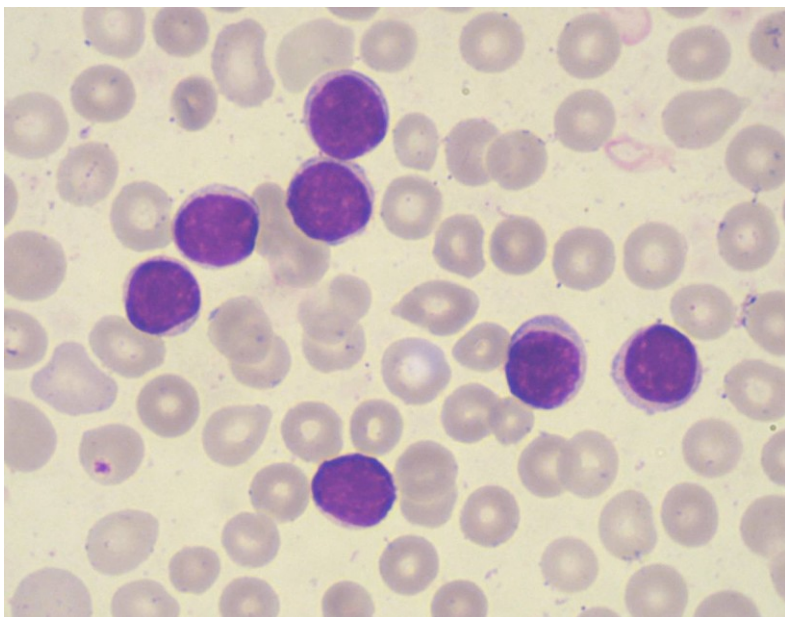
Stankovic et al., Microarray analysis reveals that TP53- and ATM-mutant B-CLLs share a defect in activating proapoptotic responses after DNA damage but are distinguished by major differences in activating prosurvival responses. *Blood* 2004

# Procesy jsou fajn, ale .... kam nás zavedou?

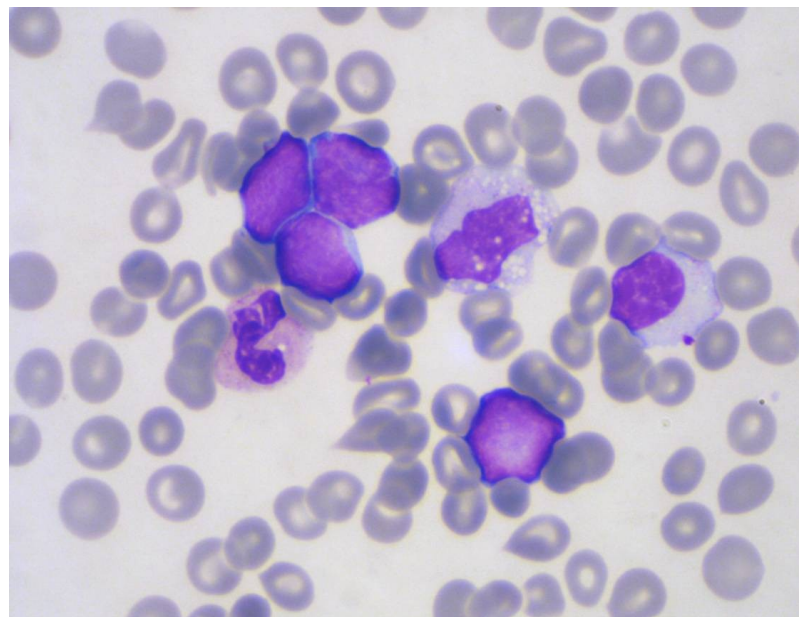
- Výsledkem GEP může opravdu být objevení zajímavých genů, ale co dál?
- Máme na to a chceme vůbec zkoumat jevy vzdálené od našeho hlavního tématu?

Výrazná změna genomu se dá očekávat  
pouze při zásadních jevech

**CLL**

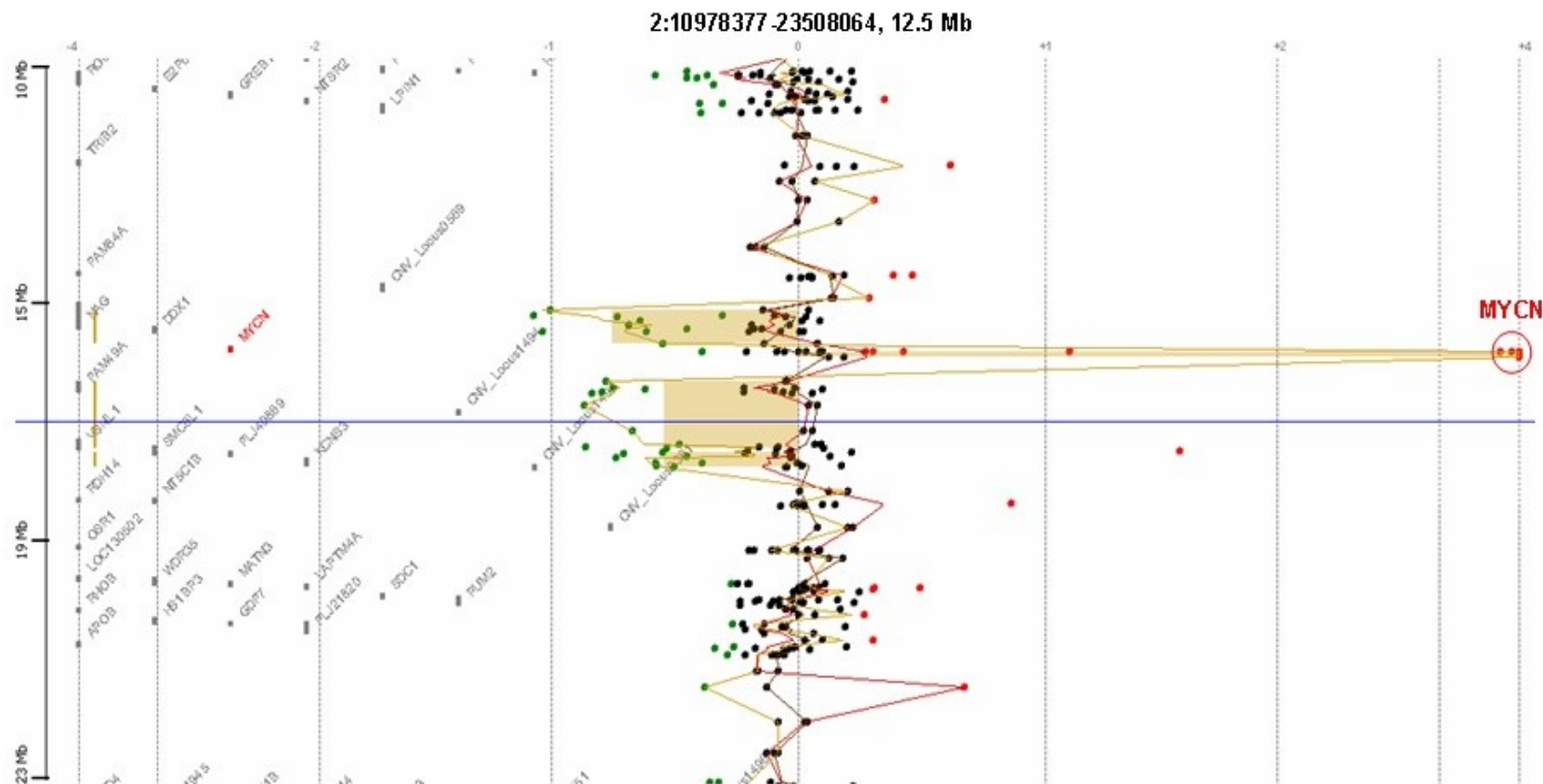


**Lymfoblastický relaps**

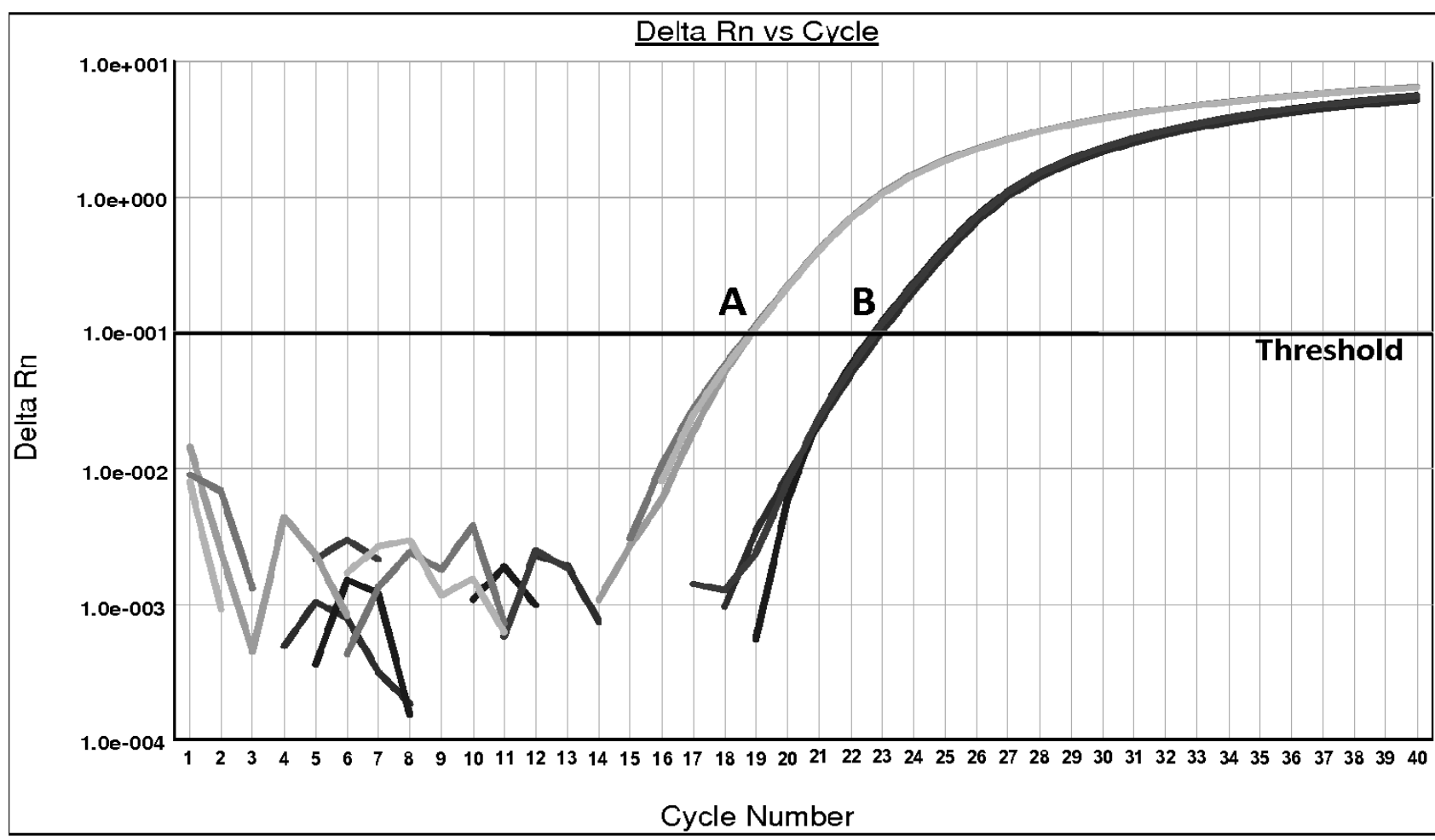


# Prominentní amplifikace onkogenu *MYC-N* v buňkách z relapsu

## Array CGH



# Potvrzená pomocí *real-time* PCR.....

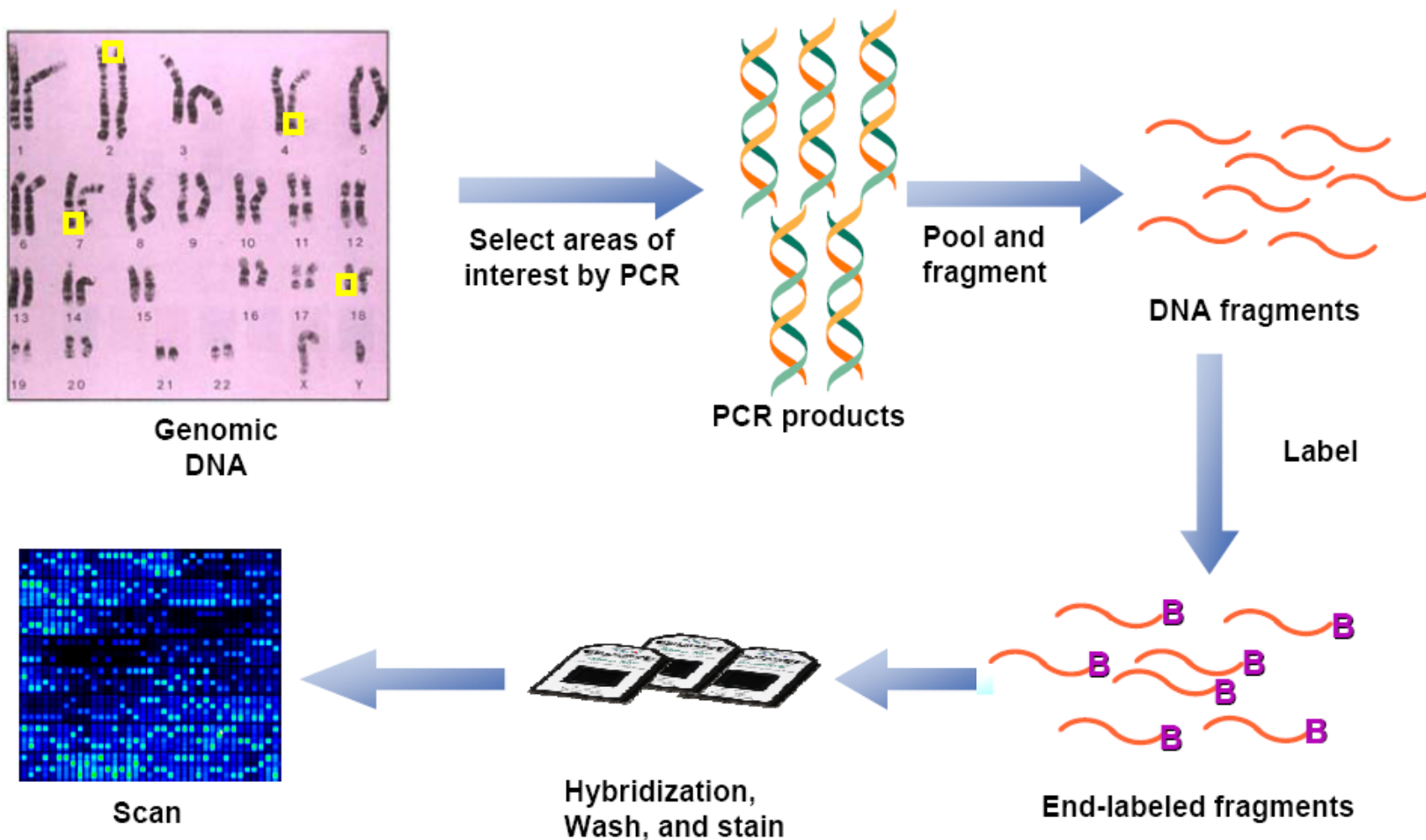




# Resekvenace na čipech



genomic DNA → long-range PCR → quantification (PicoGreen) → pooling  
→ purification → fragmentation (20-200 bp) → labelling → hybridization  
(16 h) → staining and washing → scan → data analysis



# Resekvenace - výstup

GeneChip DNA Analysis Software - [Resequencing Analysis]

File Edit View Export Run Tools Window Help

Date File

- NT000147\_000
- NT000147\_010
- NT000147\_011
- NT000147\_012
- NT000147\_013
- NT000147\_014
- NT000147\_015
- NT000147\_016
- NT000147\_017
- NT000147\_018
- NT000147\_019
- NT000147\_020
- NT000147\_021
- NT000147\_022
- NT000147\_023

Seq Pos 810 1986

pcwrs041a\_pd01

pcwrs041a\_pd02

pcwrs041a\_pd03

pcwrs041a\_pd04

pcwrs041a\_pd05

pcwrs041a\_pd06

pcwrs041a\_pd07

pcwrs041a\_pd08

pcwrs041a\_pd09

Seq Pos 1425 1430 1440 1450 1460 1470 1480

Reference ctgttttgtggcattttctttggttagagaaccaatcaagtgattttatatagttgataa

pcwrs041a\_pd01 ctgttttgtggcattttctttggttagagaaccaatcaagtgattttatatagttgata

pcwrs041a\_pd02 ctgttttgtggcattttctttggttagagaaccaatcaagtgattttatatagttgata

pcwrs041a\_pd03 ctgttttgtggcattttctttggttagagaaccaatcaagtgattttatatagttgata

pcwrs041a\_pd04 ctgttttgtggcattttctttggttagagaaccaatcaagtgattttatatagttgata

pcwrs041a\_pd05 ctgttttgtggcattttctttggttagagaaccaatcaagtgattttatatagttgata

pcwrs041a\_pd06 ctgttttgtggcattttctttggttagagaaccaatcaagtgattttatatagttgata

pcwrs041a\_pd07 ctgttttgtggcattttctttggttagagaaccaatcaagtgattttatatagttgata

pcwrs041a\_pd08 ctgttttgtggcattttctttggttagagaaccaatcaagtgattttatatagttgata

pcwrs041a\_pd09 ctgttttgtggcattttctttggttagagaaccaatcaagtgattttatatagttgata

Settings Sequenc Table

11/15/02 16:06:19 - GDAS initialization complete

No calls

Homozygous SNP

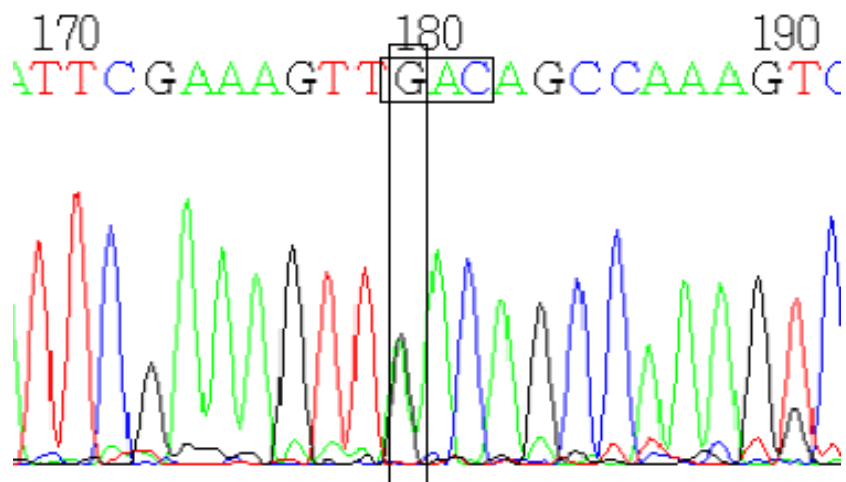
Heterozygous SNP

# Doprovodná data: jsou esenciální

exon 9 - 735 C>Y (245 Val>Val)

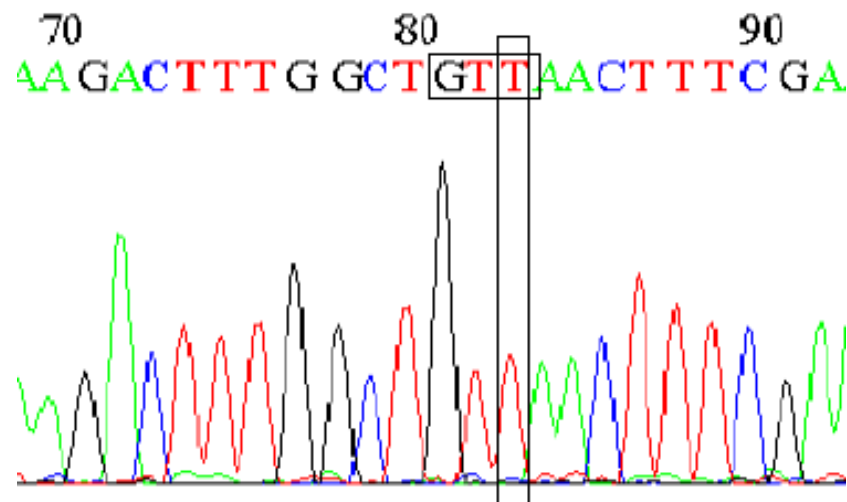
association with **skipping of exon 9** (Gronbeg *et al.*, 2002)

Sample 1 (reverse)



heterozygous mutation, both alleles of ATM gene are preserved

Sample 2 (forward)

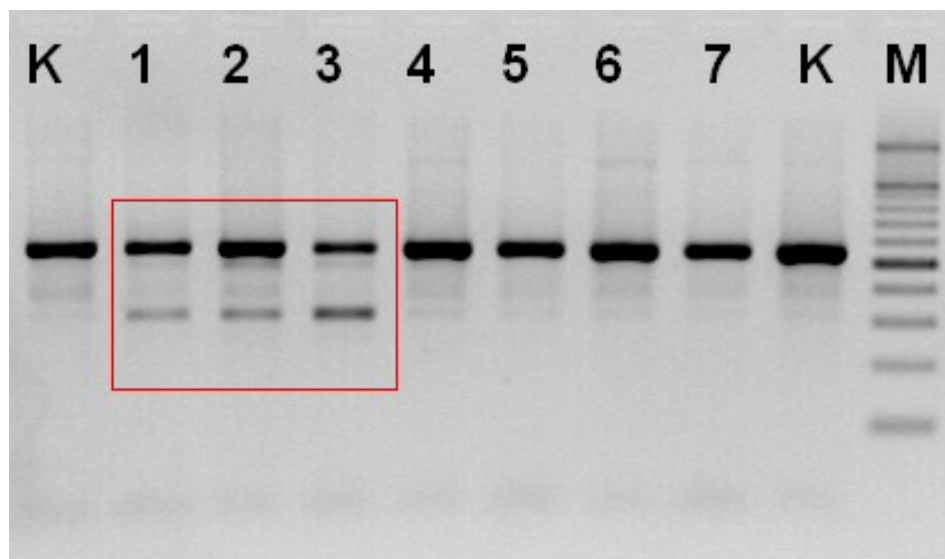


homozygous mutation, one allele of ATM gene is deleted (98% of cells)

## ...pro správnou interpretaci...

RT- PCR → PCR with cDNA primers →  
electrophoresis:

samples 1-3 with mutation, samples 4-7 without  
mutation

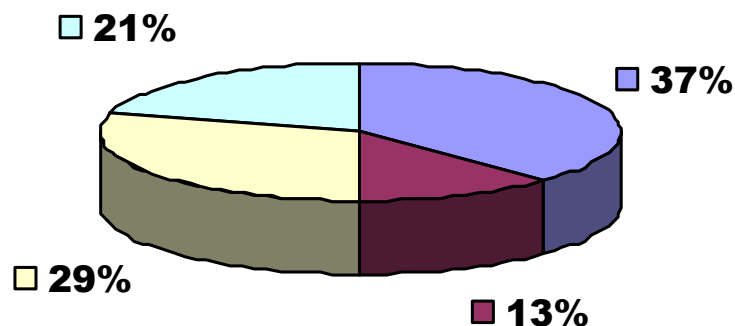


excision of bands → direct sequencing: **the skipping of exon 9 is confirmed!!**

# A po čipech: žádná nuda v Brně

**110 CLL pacientů; sekvenace genu ATM; 62 exonů, 3056 aa, 9168 nt**

**Graf č. 1: Nalezené aberace genu ATM pomocí resekvenačních čipů**



- Známé mutace v genu ATM**
- Polymorfismy asociované s predispozicí k rakovině**
- Běžné polymorfismy**
- Neznámé aberace**

# Cesta k úspěchu s microarrays - 1. část

- 1) K těmto metodikám přistoupit až po několika letech práce v laboratoři (min. 2-3 roky); to se týká zejména GEP
- 2) Být si jistý, že opravdu chci dělat *microarrays*
- 3) Důkladně projít PubMed pro studované téma a anticipovat nejbližší možné výsledky!!!
- 4) Nenápadně zjistit, zda je náš vedoucí „v obraze“ – jeho pomoc budeme potřebovat!
- 5) Mít k dispozici doprovodné metodiky, které určitě budeme potřebovat (real-time PCR, Western blot)
- 6) Mít k dispozici funkční tým, kde každý něco opravdu UMÍ

## Cesta k úspěchu s microarrays – 2. část

7) Mít velmi dobře charakterizované vzorky

(mutace není delece apod.)

8) Před započítím experimentování se spojit s velmi dobrým statistikem (konzultovat mj. velikost souboru)

9) Neukvapovat se po prvních *pozitivních* výsledcích

10) Pokud se dostaneme až k psaní manuskriptu, dát jej přečíst co nejvíce (relevantním) lidem

11) Připomínky *reviewers* brát vážně

# Takže děkuji za pozornost

**....a uvidíme se (asi) v prosinci**