

**Interní hematologická klinika LF MU a FN Brno
Centrum molekulární biologie a genové terapie
CEITEC MU**

Čipy pro analýzu genomu

**Jitka Malčíková
16.10.2012**

Analýza genomových změn

- Detekce nebalancovaných genomových změn
 - amplifikace, delece – CNV – copy number variations
 - CGH čipy
- Detekce uniparentální dizomie, genotypizace
 - SNP čipy
- Detekce mutací, polymorfismů
 - Resekvenační čipy
- Analýza epigenetických změn
 - ChIP on chip, čipy pro stanovení metylace, DNase-chip

Výchozí materiál - DNA

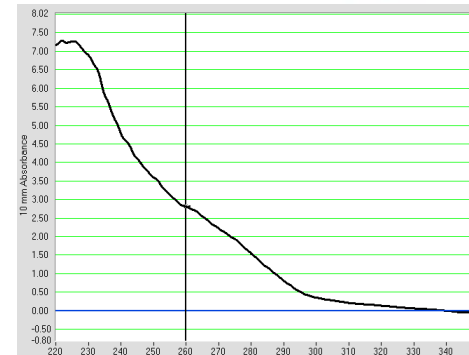
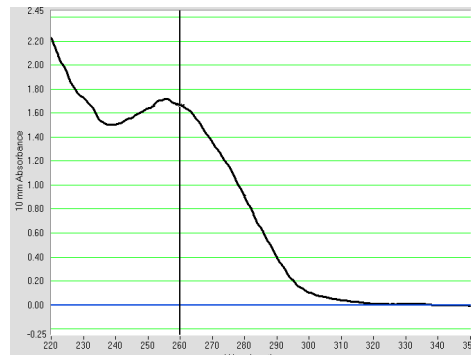
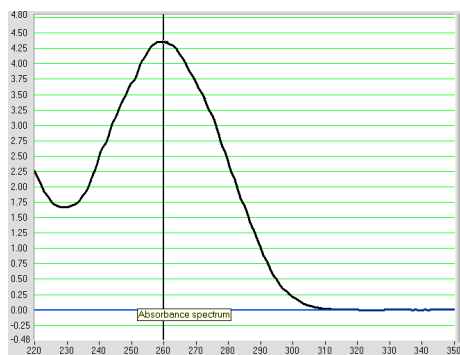
■ Kvantifikace DNA

- Měření absorbance nukleotidů A_{260}
- Stanovení čistoty

A_{260}/A_{280} – 1.8-2.0 (<1,8 kontaminace proteiny)

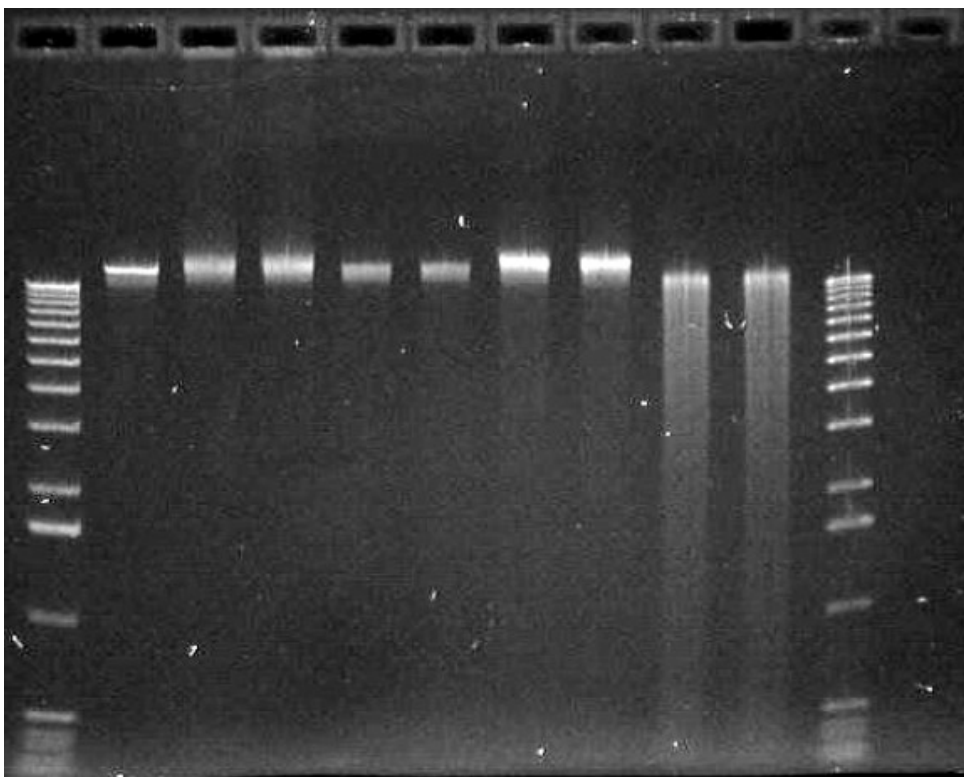
A_{260}/A_{230} >2.0 (<2 kontaminace organickými látkami
– guanidinium isothiokyanát, alkohol, fenol nebo jinými
buněčnými komponentami – karbohydráty.

Nanodrop – Malá spotřeba materiálu (1ul)
– Plný spektrální rozsah 190–840 nm



Výchozí materiál - DNA

- Kontrola kvality DNA
 - Elektroforéza



CGH - komparativní genomová hybridizace

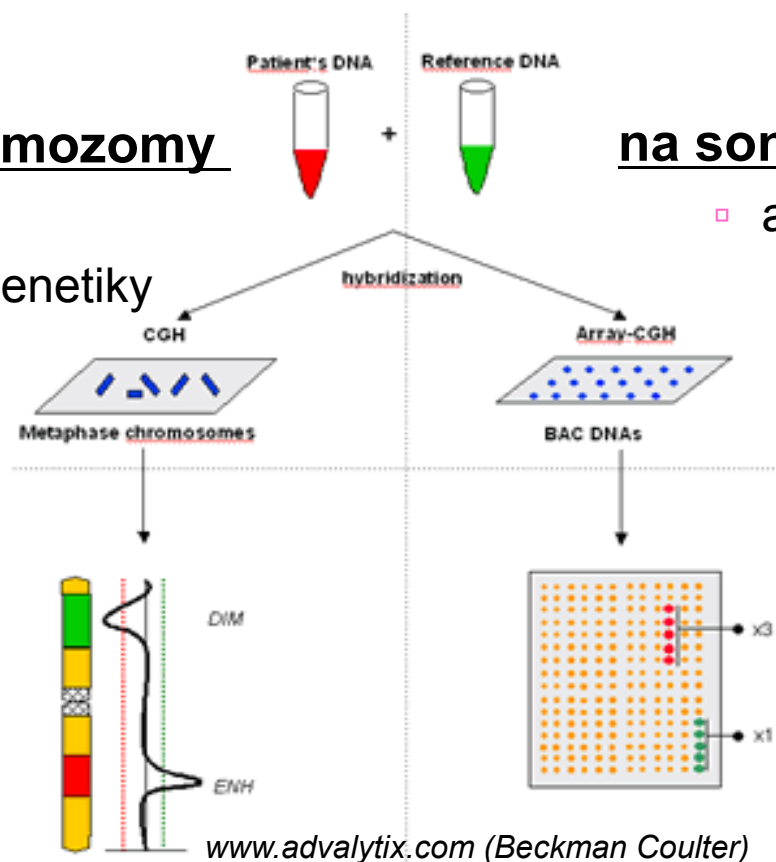
Kohybridizace značené **DNA vzorku** a **kontrolní DNA**

na normální metafázní chromozomy

- Klasická CGH, HR-CGH
- Metoda molekulární cytogenetiky

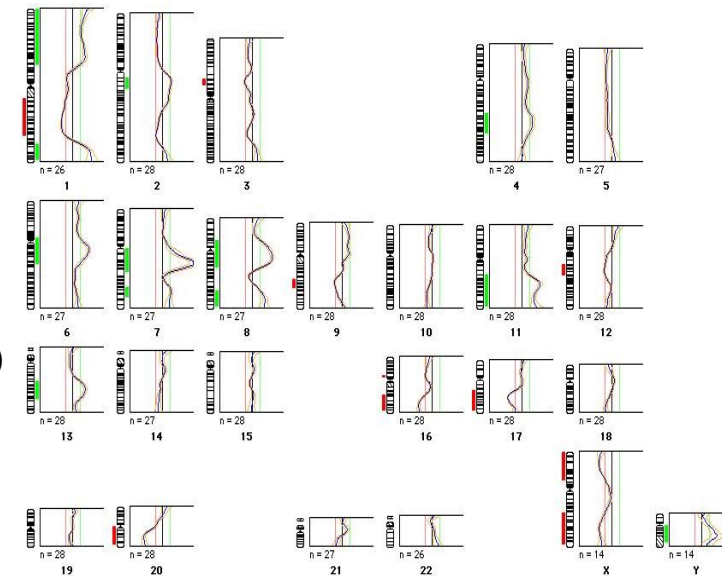
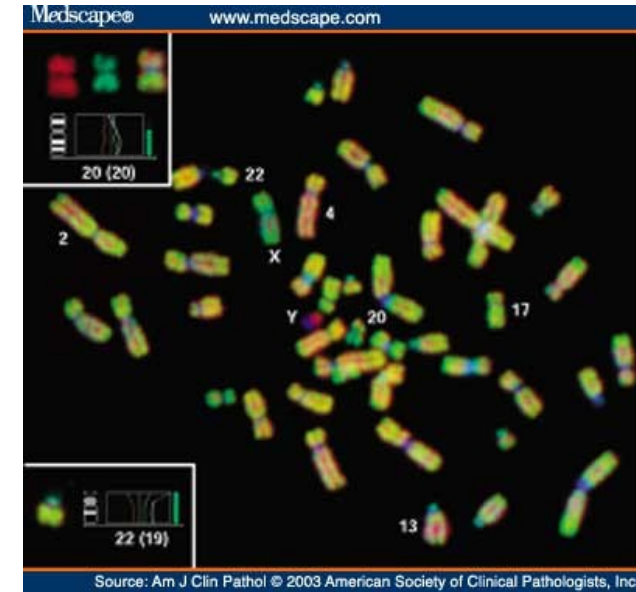
na sondy navázané na sklíčku

- array CGH



Typy CGH

- Klasická CGH (*Kallioniemi et al 1992*)
 - Rozlišení 5 -10 MB
 - Citlivost – 50% aberantních buněk
- HR-CGH – High resolution CGH (*Kirchhoff et al. 1998*)
 - Pokročilý algoritmus analýzy obrazu
 - Vyšší rozlišení (~3 MB), vyšší citlivost
- ArrayCGH (aCGH, matrix CGH) (*Solinas-Toldo et al. 1997*)
 - Vysoké rozlišení – závisí na typu čipu (1kb – 1MB)
 - Citlivost – 30-40% aberantních buněk



<http://web.ncifcrf.gov> (NCI-Frederick)

Rozdělení aCGH podle typu sond

- Úseky genomové DNA vložené do vektorů
 - YAC (Yeast Artificial chromosome) - 200 -1000 kb
 - BAC (Bacterial Artificial chromosome) - 50–200 kb
 - PAC (Phage Artificial chromosome) - 75-200 kb
 - Kosmidy – 30-40 kb
- cDNA - 1-2 kb
 - Pouze genové oblasti
 - Horší schopnost detekce jednokopiových změn
- Oligonukleotidy - 25-85 bazí

Rozlišení aCGH

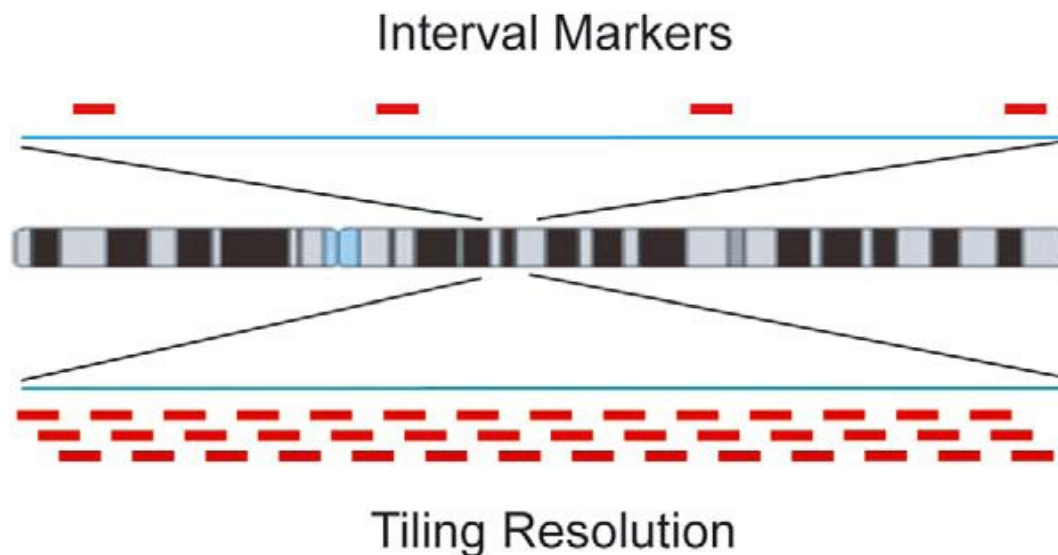
- Rozlišení čipu je dáno délkou a hustotou pokrytí DNA sond
 - BAC ~ 1Mb
 - cDNA – 1-2 kb
 - Oligonukleotidy – i pod 1 kb

Platformy aCGH

- Cílené
 - Analýza vybraných „hot spot“ oblastí spojených s konkrétním onemocněním
- Chromozómové
- Celogenomové
 - Sondy rozmístěné
 - rovnoměrně po genomu
 - v určitých intervalech
 - tilling arrays – přesné mapování delecí, translokací

Tiling arrays

- Tiling = „obklad“
 - Přesné mapování s vysokým rozlišením



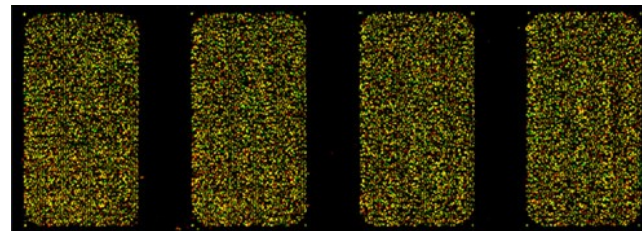
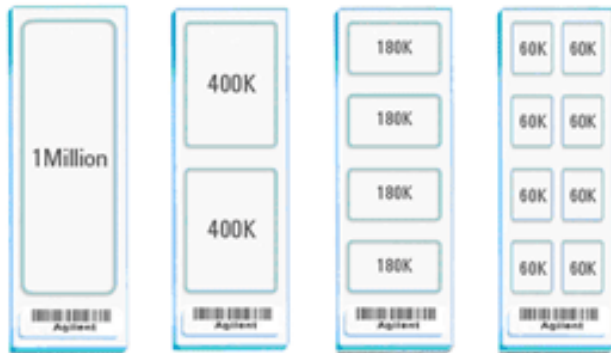
- aCGH, resekvenační, CHIP on chip, MeDIP-chip, DNase-chip

Oligonukleotidové aCGH

Agilent

- Sondy 60 bazí, SurePrint technology – *in situ* synthesis printing
- Různé formáty – vzdálenost sond určuje rozlišení
 - Lidský genom – 1x1M - vzdálenost sond 2,1 kb/1,8 kb v RefSeq genech
 - 2x400K - vzdálenost sond 5,3 kb/4,6 kb v RefSeq genech
 - 4x180K - vzdálenost sond 13 kb/11 kb v RefSeq genech
 - 8x60K - vzdálenost sond 41 kb/33 kb v RefSeq genech

SurePrint G3



- Další organismy: myš, krysa, kráva, pes, kuře, šimpanz, makak Rhesus, rýže
- Custom arrays

Oligonukleotidové aCGH

Roche NimbleGen

- Sondy 60 bazí
- Specifické aplikace
 - Cytogenetic Arrays
 - CNV Arrays
 - Whole Genome Tiling Arrays
 - CGH Whole-Genome Exon-Focused Arrays
- Formáty
 - 1x2,1M, 3x720K, 12x135K, 385K (Chromosome Tiling)
- Další organismy: myš, krysa, kráva, pes, kuře, makak Rhesus, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila*, Zebrafish, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Plasmodium falciparum*

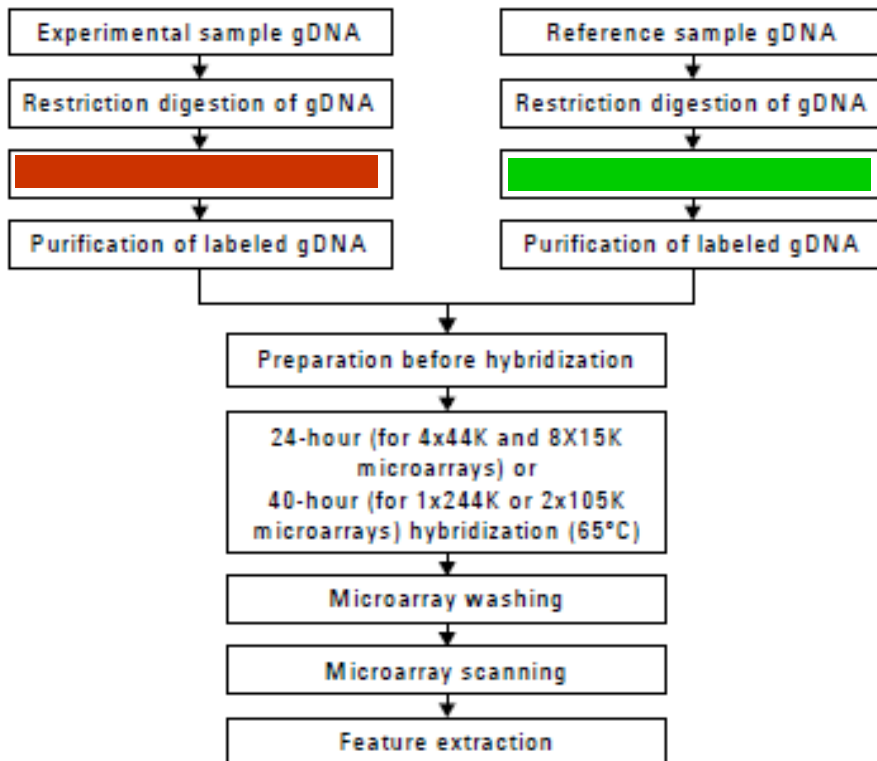


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

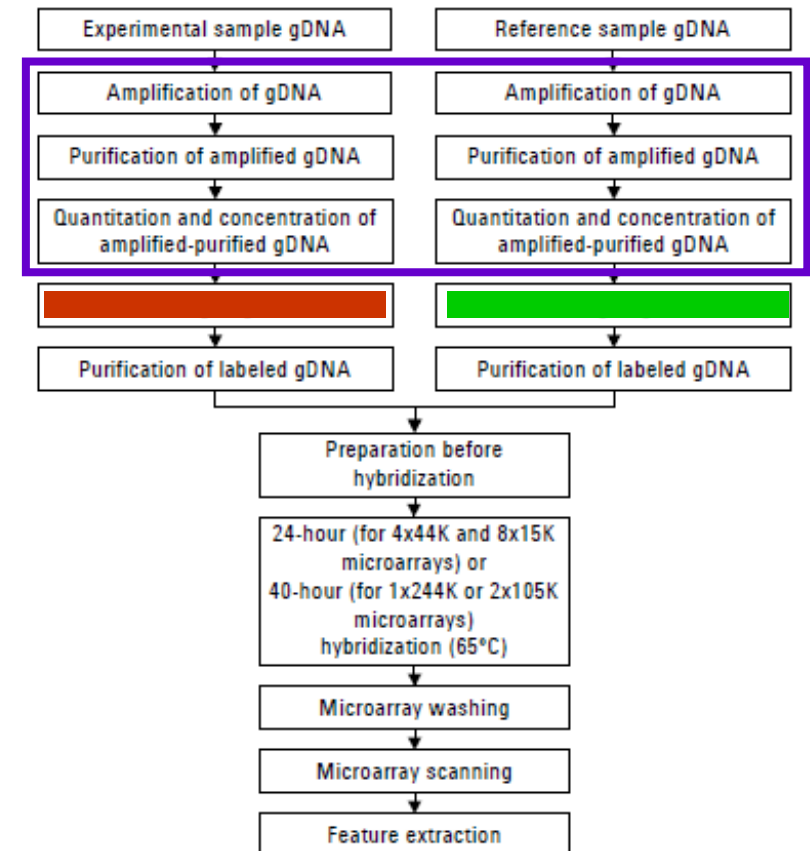
Postup - Agilent

Direct Method of Oligo aCGH Workflow



200-500 ng gDNA

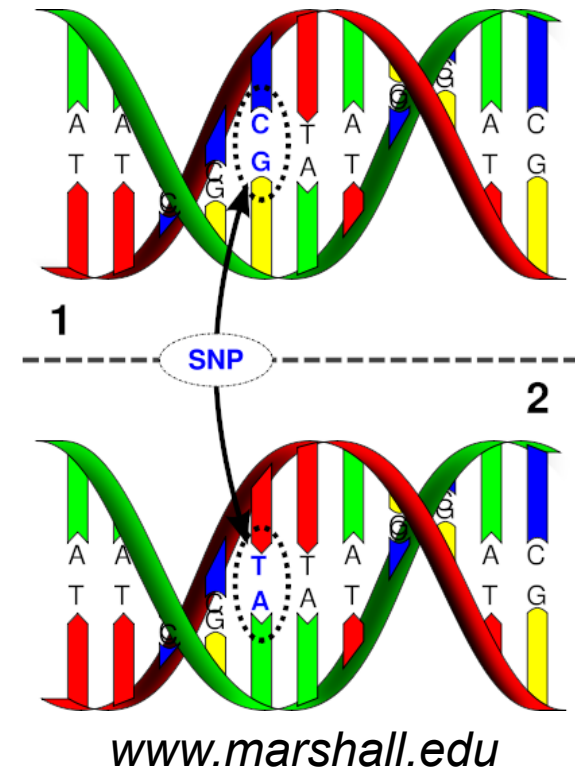
Amplification Method of Oligo aCGH Workflow



50 ng gDNA

SNP čipy

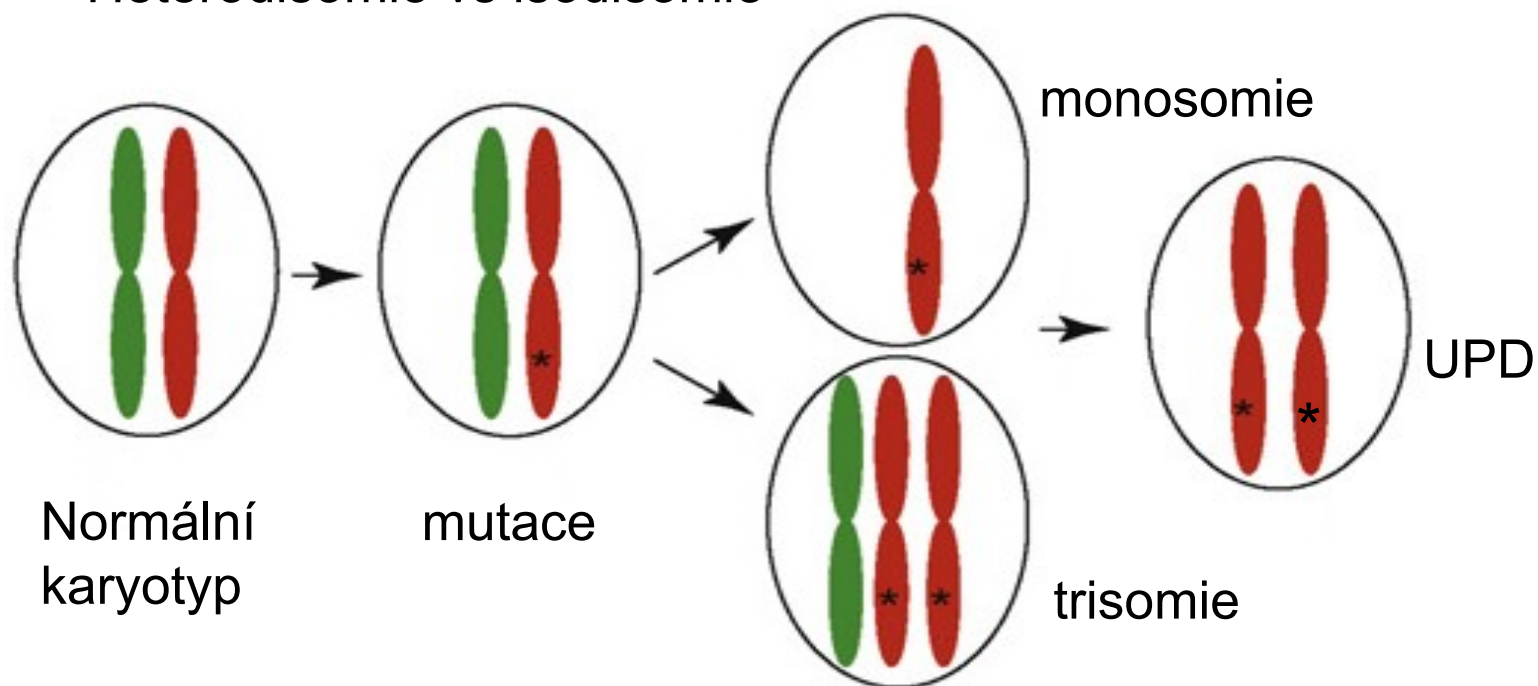
- Čipy umožňující rozlišit nejen CNV, ale i SNP
- SNP – jednonukleotidové polymorfismy
 - V lidském genomu asi 15 mil identifikovaných polymorfismů
 - Asociace s onemocněními (Polymorfismus vs mutace)
- Určení alelového statusu, haplotypu
 - Genotypizace, asociační studie
- Detekce uniparentální dizomie



Uniparentální disomie (UPD)

CNN LOH – copy number neutral loss of heterozygosity

- Vyskytuje se u řady onemocnění
- Germinální vs somatická
- Heterodisomie vs isodisomie



Princip SNP čipů

- Sondy pro detekci CNV jako u CGH čipů + sondy speciálně navržené pro detekci SNP
- Jednobarevná detekce – na čip se hybridizuje pouze označená testovaná DNA
- Vyhodnocení
 - srovnání s kontrolní DNA hybridizovanou na druhém čipu
 - porovnání s daty uloženými v softwaru - soubor kontrolní DNA

Platformy I

Affymetrix

- Vždy 1 vzorek na 1 čip
- SNP6
 - Délka sond 25 bází
 - 946 000 CNV sond, 906 600 SNP sond
 - Nerovnoměrné rozložení sond – více v genech
 - Vyšší rozlišení pro UPD, vhodné pro genotypizaci
- CytoScanHD
 - Délka sond 49 bází
 - 2.6 milionu CNV sond z toho 750,000 "genotype-able" SNPs a 1.9 milionů nepolymorfni
 - vzdálenost sond v genových oblastech 0,4-0,8kb
 - Detekce oblastí identických původem
 - Stanovení mozaicismu

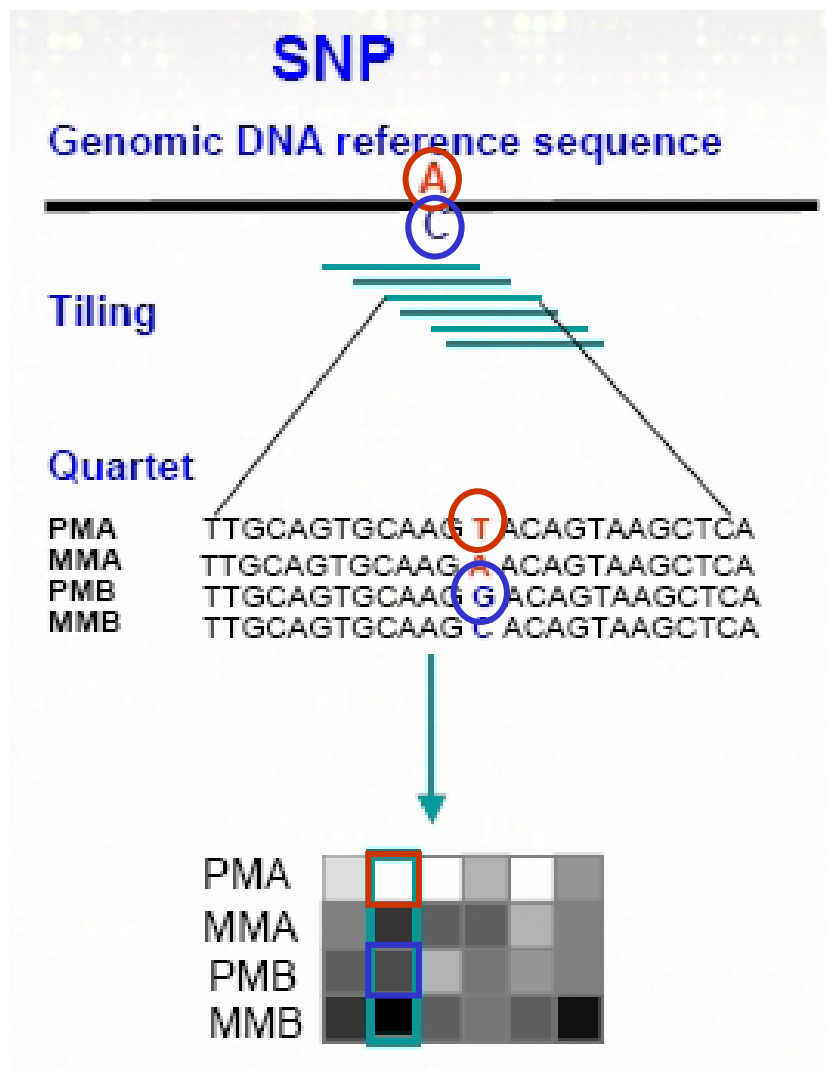


Princip SNP čipů - Affymetrix

25b sondy

záměna 13. nukleotidu -

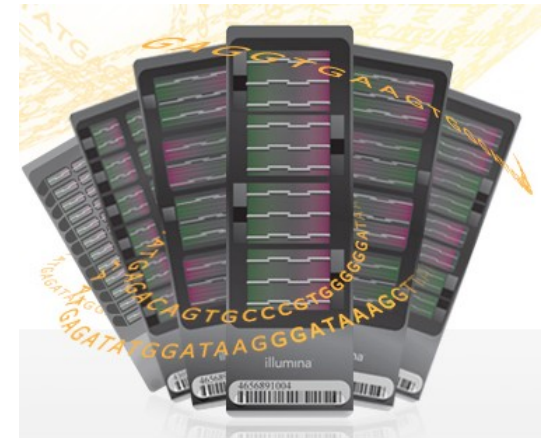
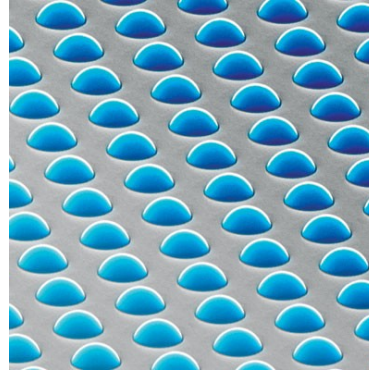
největší vliv na sílu vazby při neshodě



Platformy II

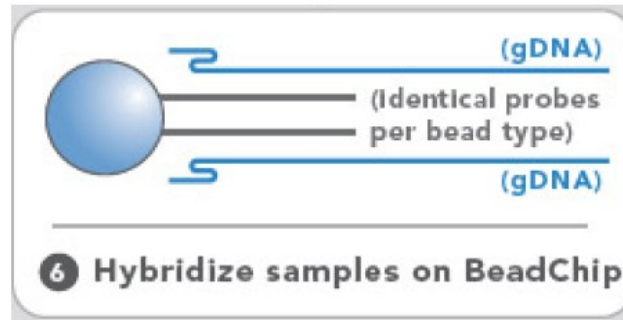
Illumina Bead array

- BeadChip
- Více formátů
 - 4 – 12 vzorků na čip
 - 700 tis - 2,45 mil markerů

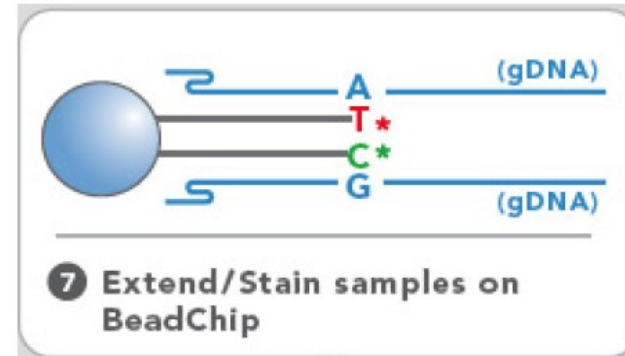


Princip SNP čipů - Illumina

Infinium II

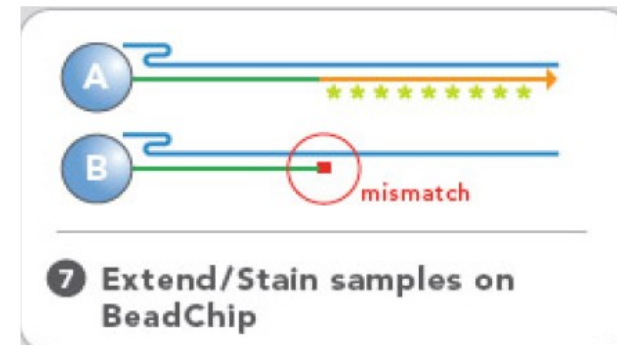
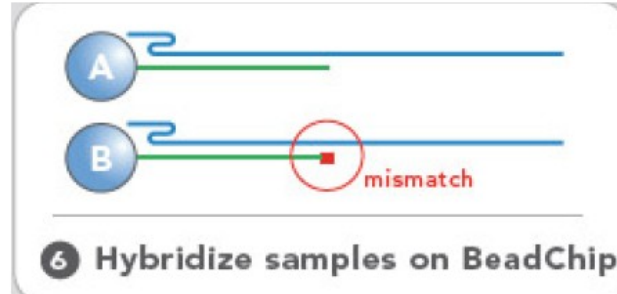


T*
A*
C*
G*



1x 50b, single base extension; pouze A/G, A/C, T/C, T/G
(dvoubarevná metoda)

Infinium I



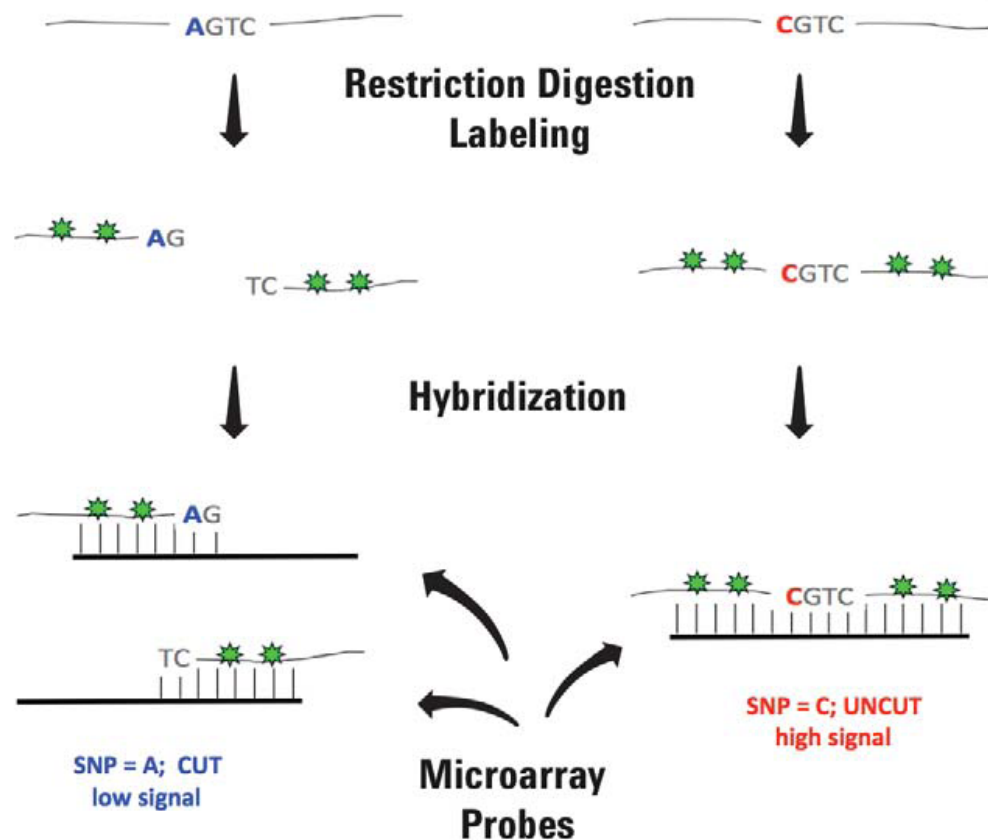
2X 50b, allele specific extension

Platformy III

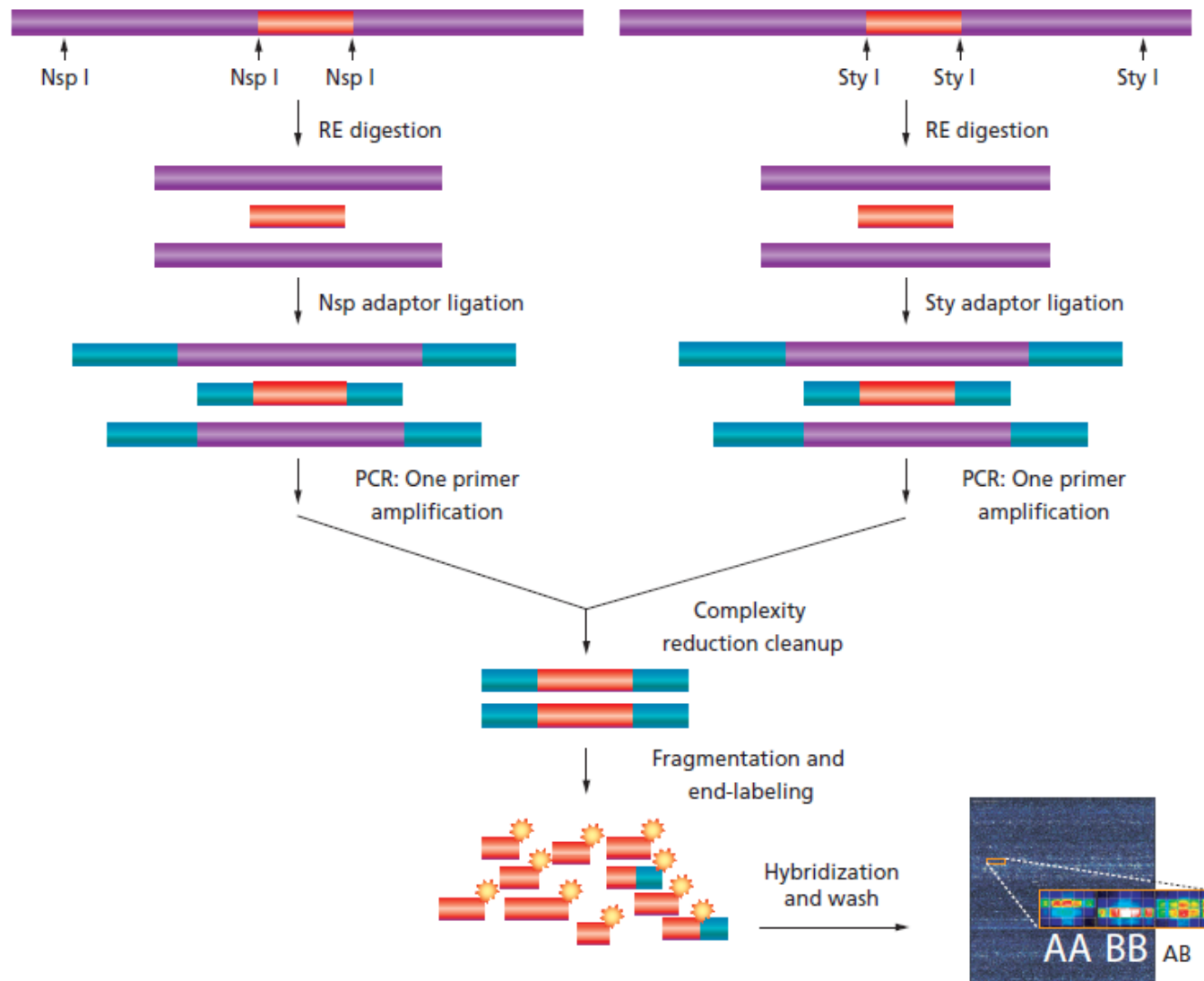
Agilent

- Human Genome CGH+SNP Microarrays
- 2x400K, 4x180K
- 60b, SNPs pouze v místech rozpoznávaných restričními endonukleázami

Princip SNP čipů - Agilent



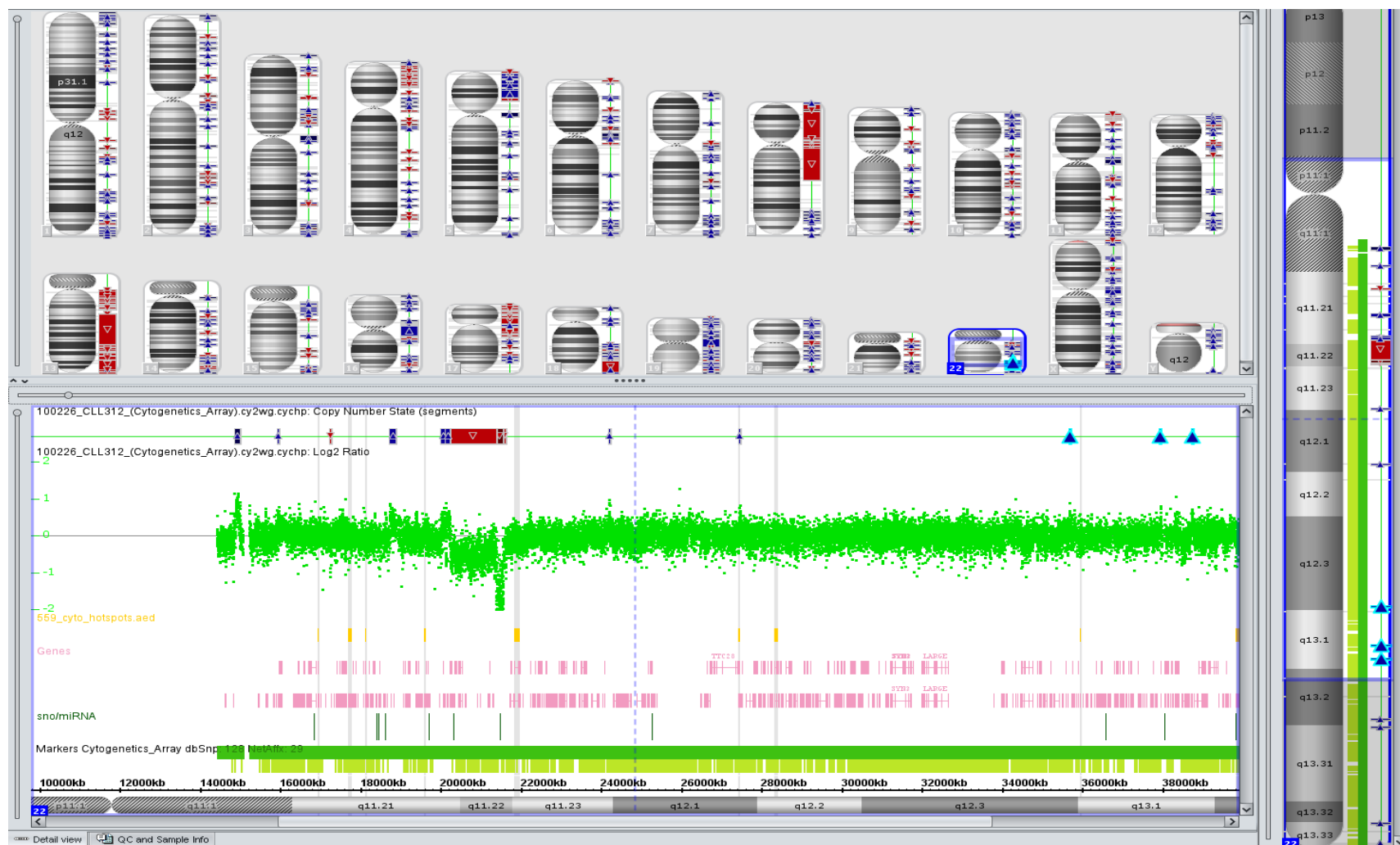
Postup -SNP6



250 ng gDNA

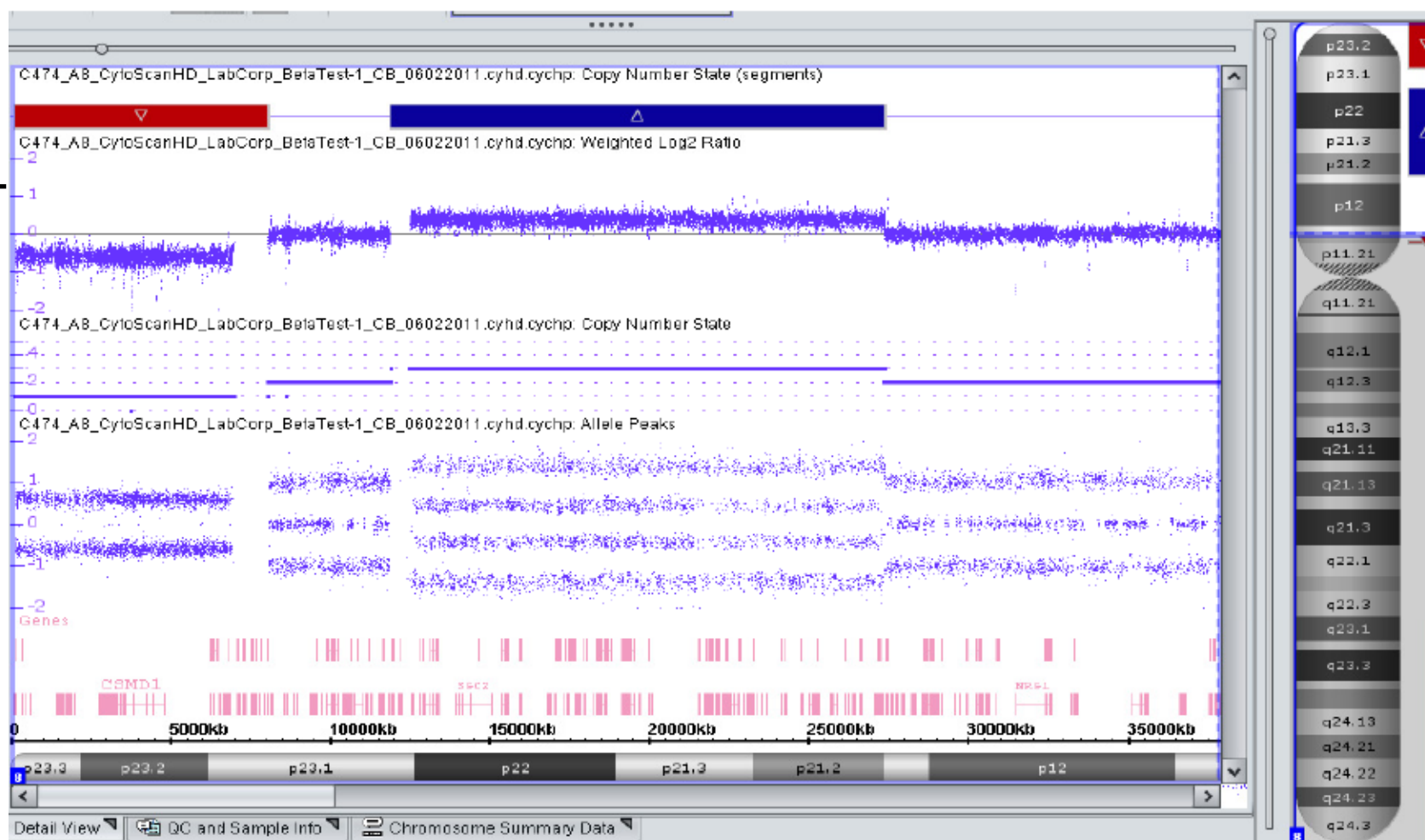
Výsledky SNP arrays – analýza CNV

amplifikace +
delece +
bialelická
delece

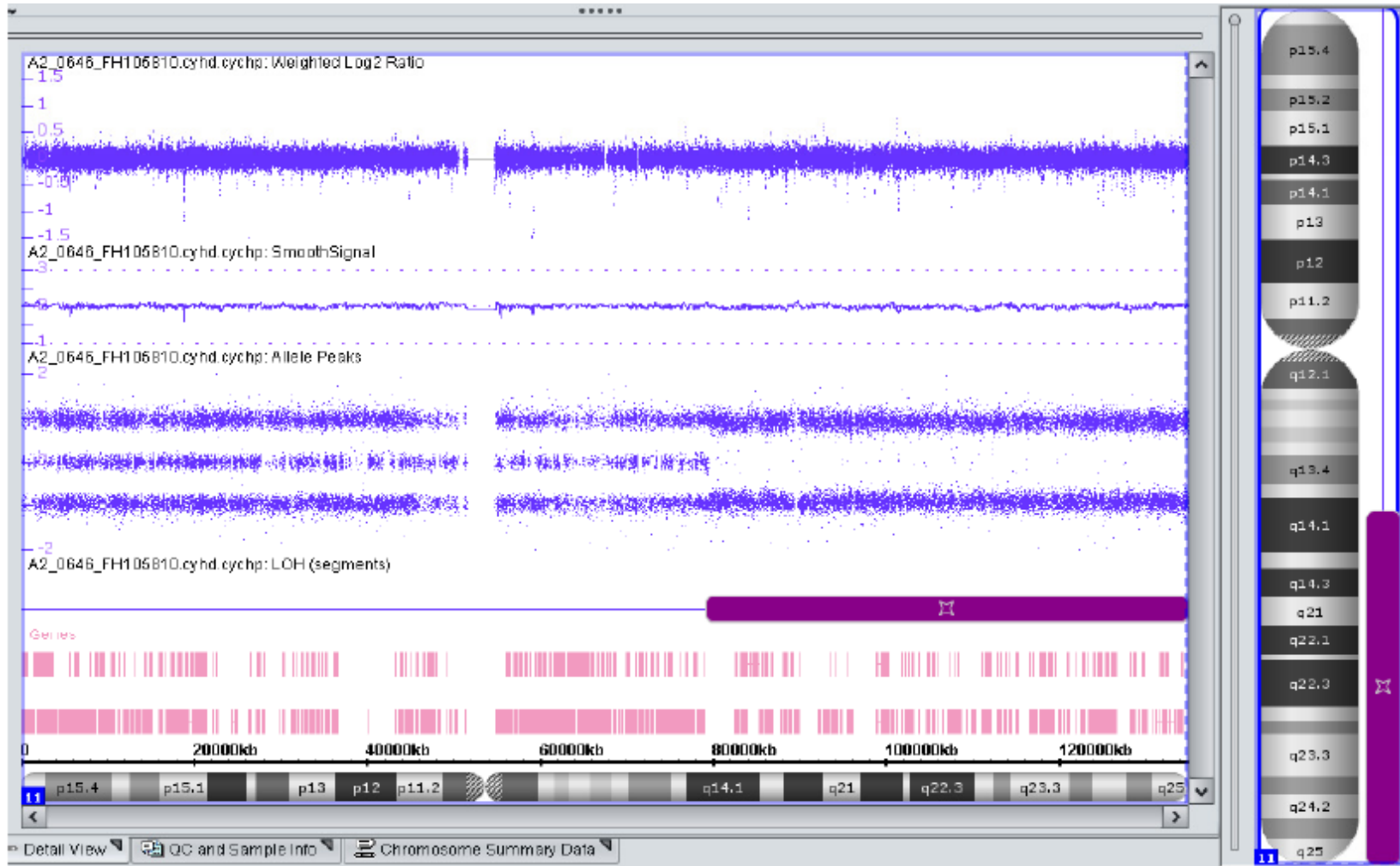


Výsledky SNP arrays – analýza CNV

amplifikace +
delece



Výsledky SNP arrays - uniparentální disomie

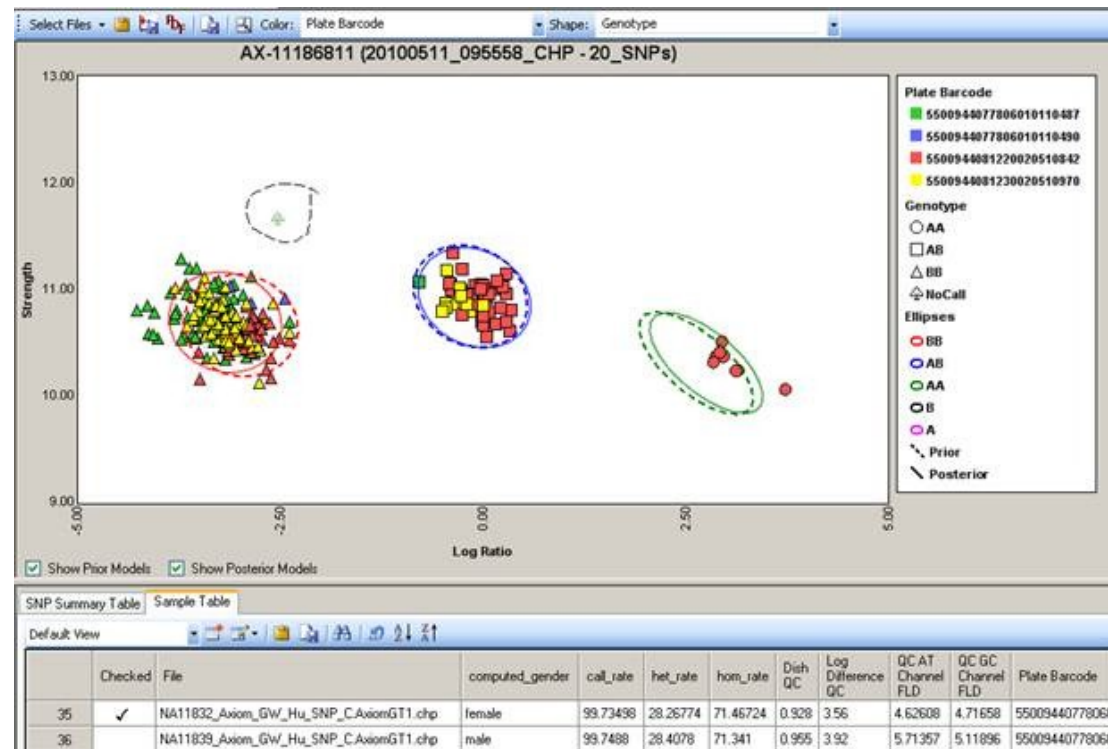
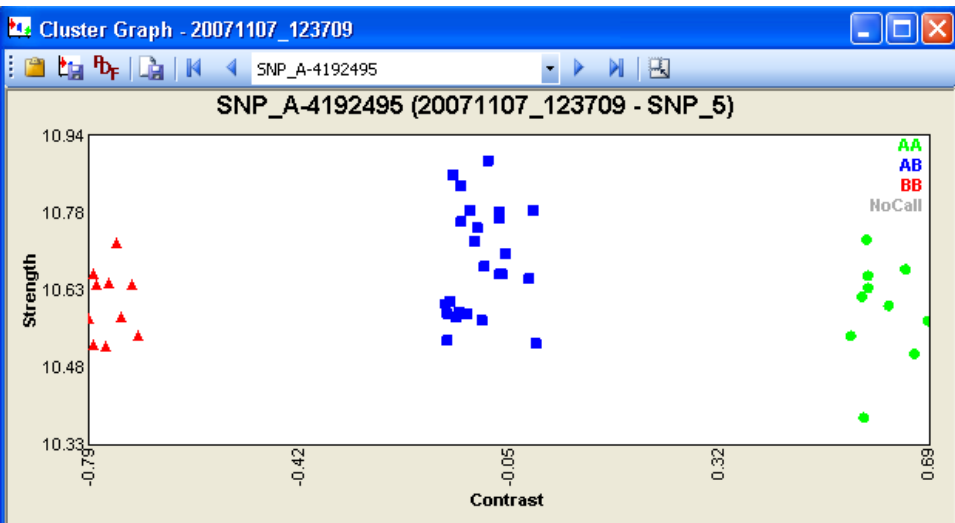


Výsledky SNP arrays

– identifikace oblastí identických původem (stanovení konsanguinity)



Výsledky SNP arrays - genotypizace



Využití CGH, SNP čipů

- **Nádorová genomika**
 - V nádorových buňkách často změny genomu – primární i sekundární
- **Klinická genetika**
 - Přesnější charakterizace mikrodelečních syndromů
 - Identifikace genomových změn u pacientů s mentální retardací i jinými vrozenými postiženími
- **Farmakogenomika**
- **Prenatální a preimplantační diagnostika**
- **Asociační studie – asociace SNP i CNV s řadou onemocnění (revmatoidní artritida, diabetes, nádorová onemocnění)**
- **Evoluční studie**

Story Oliver

- Matka 41 let, UK
- 13 - neúspěšných pokusů IVF
- 14. pokus
 - 8 oplodněných vajíček – polární tělíška testována pomocí array CGH
 - Jen 2 byla v pořádku
 - Implantace jednoho z embryí – zdravé dítě Oliver září 2009 – 1. dítě narozené s využitím technologie array CGH

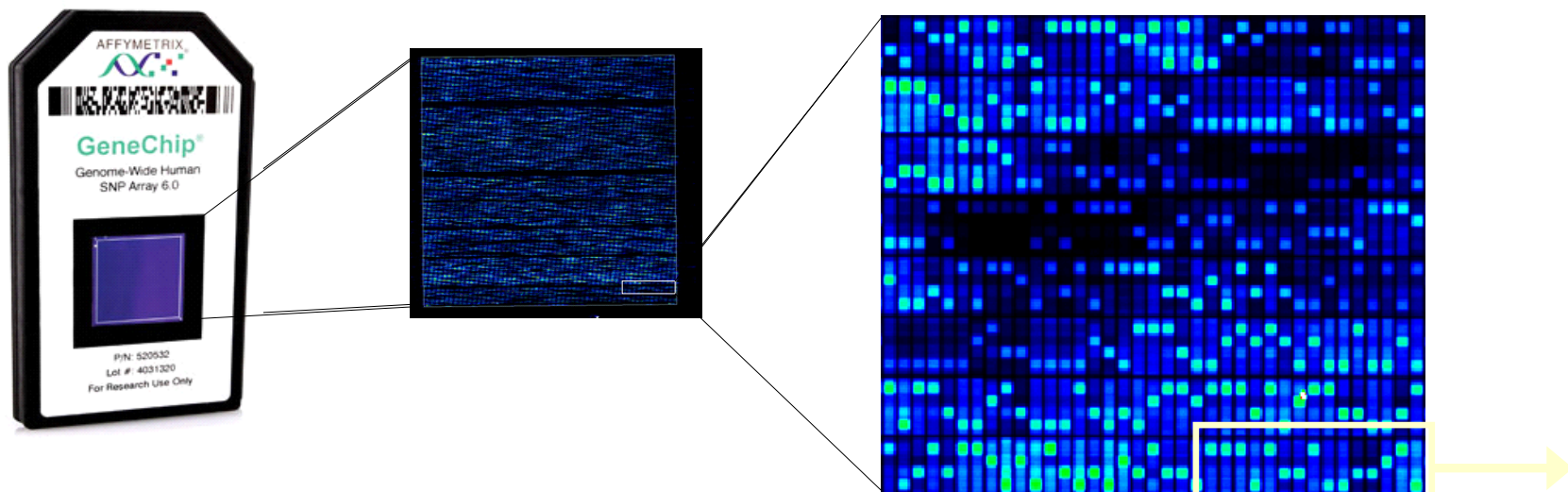
Resekvenační čipy

Affymetrix

- Stejný princip jako detekce SNP
- Krátké oligonukleotidy – 25mery
- Typizovaná báze na 13. pozici
- SNP = testovány 2 varianty X resekvenování = testovány 4 varianty

TCGGTAGCCATG A ATGAGTTACTAC	<i>Probe 1 Forward</i>
TCGGTAGCCATG C ATGAGTTACTAC	<i>Probe 2 Forward</i>
TCGGTAGCCATG G ATGAGTTACTAC	<i>Probe 3 Forward</i>
TCGGTAGCCATG T ATGAGTTACTAC	<i>Probe 4 Forward</i>
ATCGGTAGCCATG C ATGAGTTACTACAGCT	<i>Genomic Sequence of interest</i>
TAGCCATCGGT A CGTACTCAATGATGTCGA	
AGCCATCGGTAG A TACTCAATGATG	<i>Probe 1 Reverse</i>
AGCCATCGGTAG C TACTCAATGATG	<i>Probe 2 Reverse</i>
AGCCATCGGTAG G TACTCAATGATG	<i>Probe 3 Reverse</i>
AGCCATCGGTAG T TACTCAATGATG	<i>Probe 4 Reverse</i>

Resekvenační čipy Affymetrix - princip



Base Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
Probe Tiling (Forward)	A	G	A	G	A	G	A	G	A	G	A	G	A	G
Array Image (Forward)														
Sequence	A	C	T	A	T	A	G	C	A	A	C	A	G	

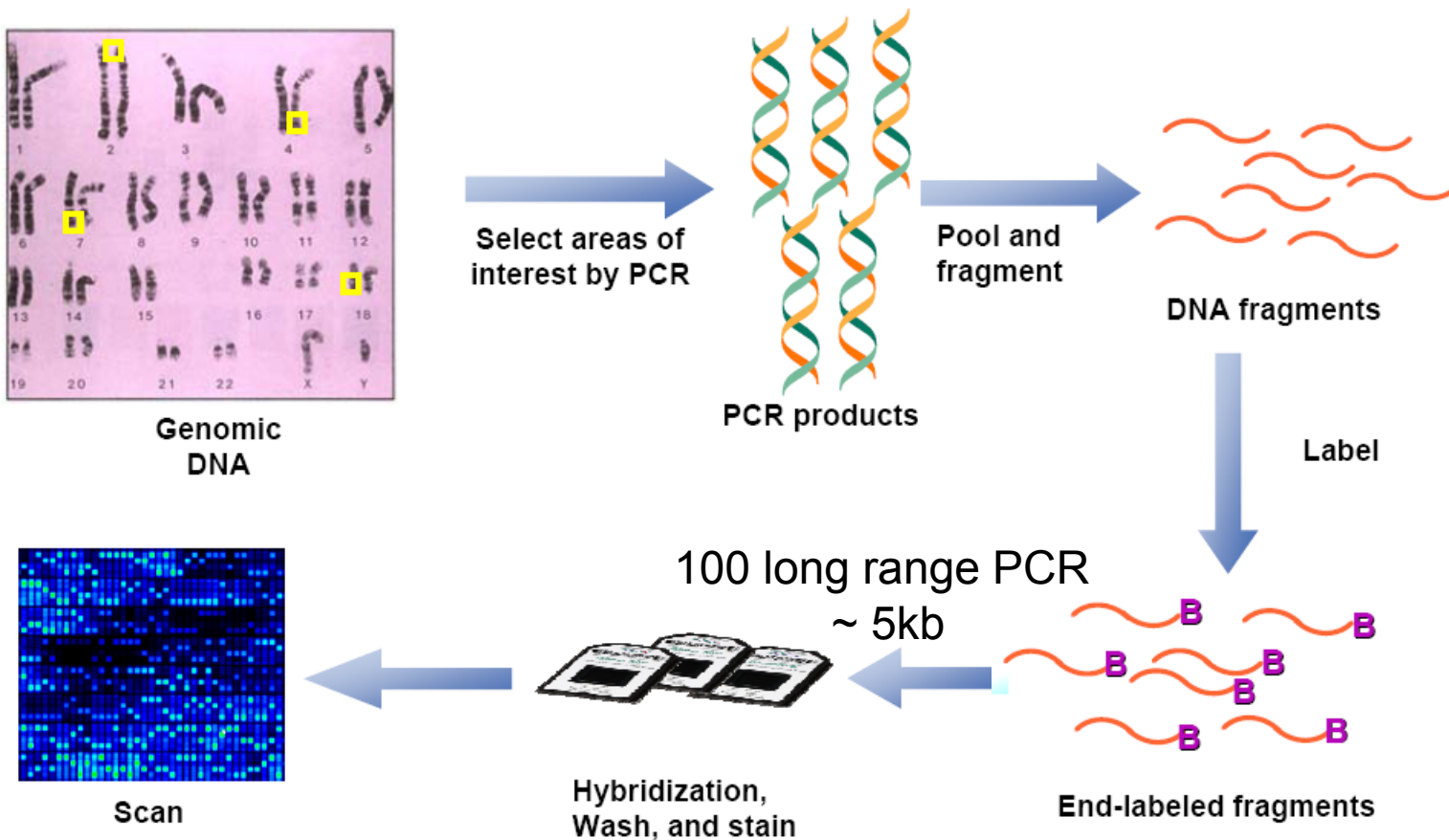
Resekvenační čipy Affymetrix

- Sekvenace mnoha kb současně

Format	49	100	169
Sequence Capacity	300 kb	100 kb	50 kb

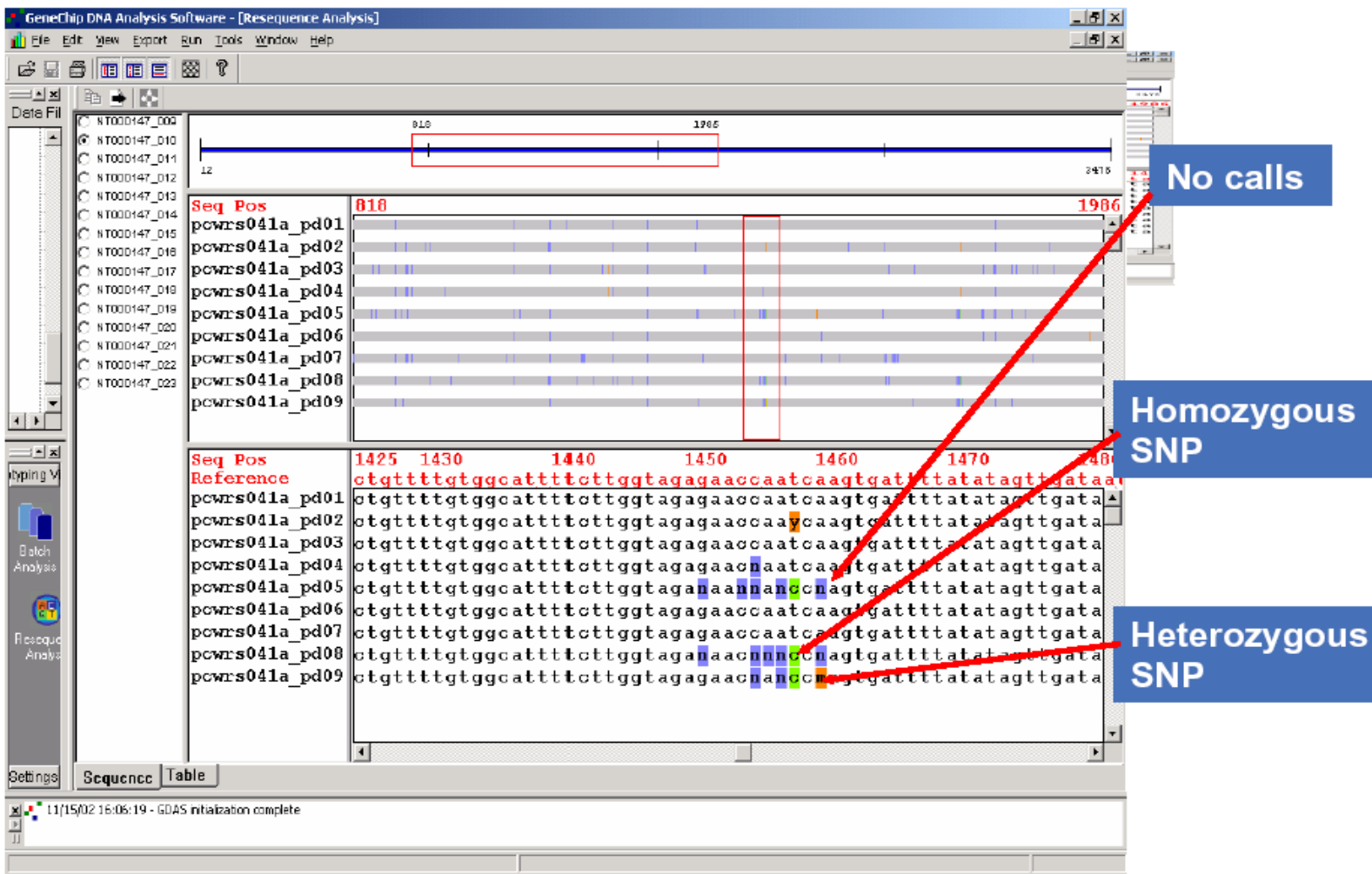
- Citlivost - 10-25% mutovaných alel ve vzorku
- Problematické oblasti – GC bohaté, repetitivní
- Vlastní design - CLL specifický čip
 - 50kb
 - 8 genů (m.j. ATM – 62 exonů), 110 miRNA

Resekvenační čipy - postup



Protokol - 3 dny

Resekvenační čipy - výstup

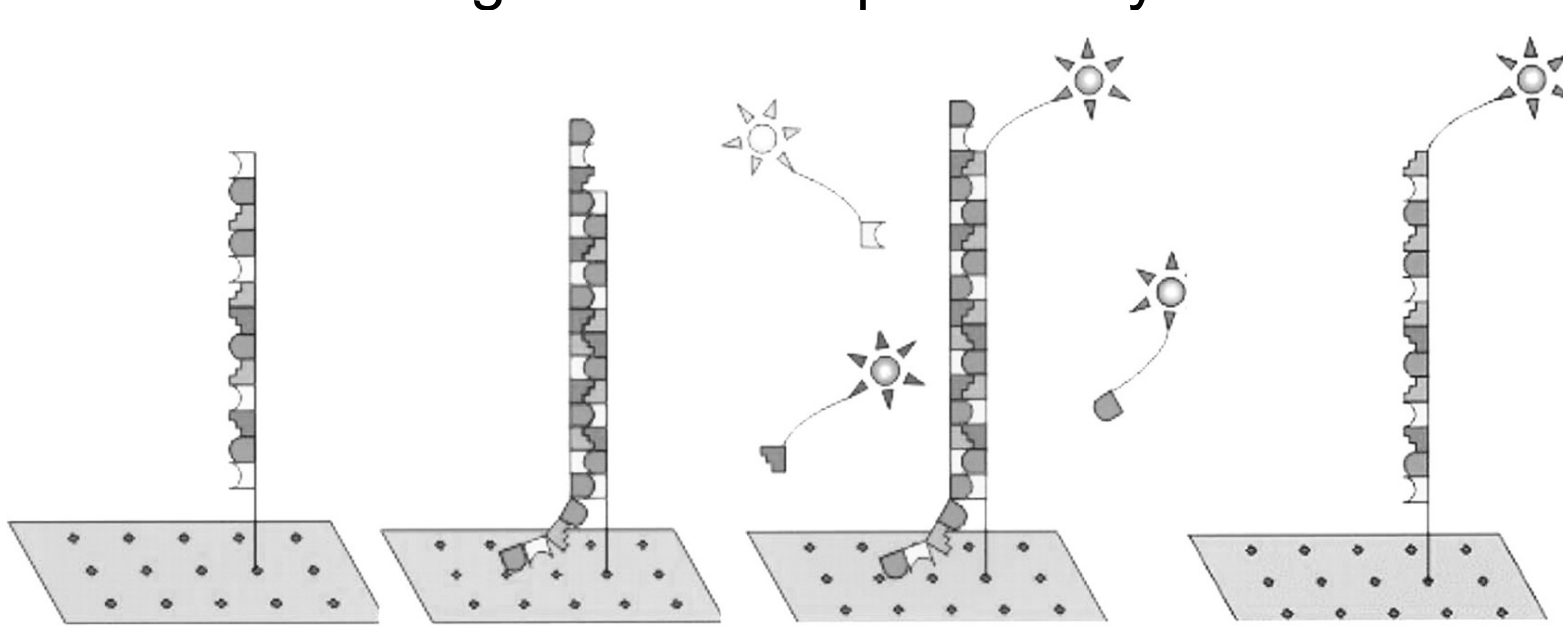


Nutné ověřit sangerovým sekvenováním

Resekvenační čipy

APEX

- Arrayed Primer EXTension
- Prodloužení sondy o jeden nukleotid komplementární ke vzorku
- 4-barevná technologie – nutné speciální vybavení



Resekvenační čipy - závěr

- Paralelní sekvenace více oblastí
- Detekce mutací, na které je čip navržen
- Screeningová metodika
- Komerčně dostupné „diagnostické“ čipy
 - Roche – platforma Affymetrix
 - Cytochrom P450 – FDA approval, CE-IVD
 - P53 v testování
 - Není nutné ověřovat výsledek
 - Jen 1 gen , ale velmi rychlé, „user friendly“ (protokol max 2 dny)
 - APEX
 - Dostupné čipy pro konkrétní geny + možný vlastní design
 - Nutné ověřit Sangerovým sekvenováním
 - Research use only

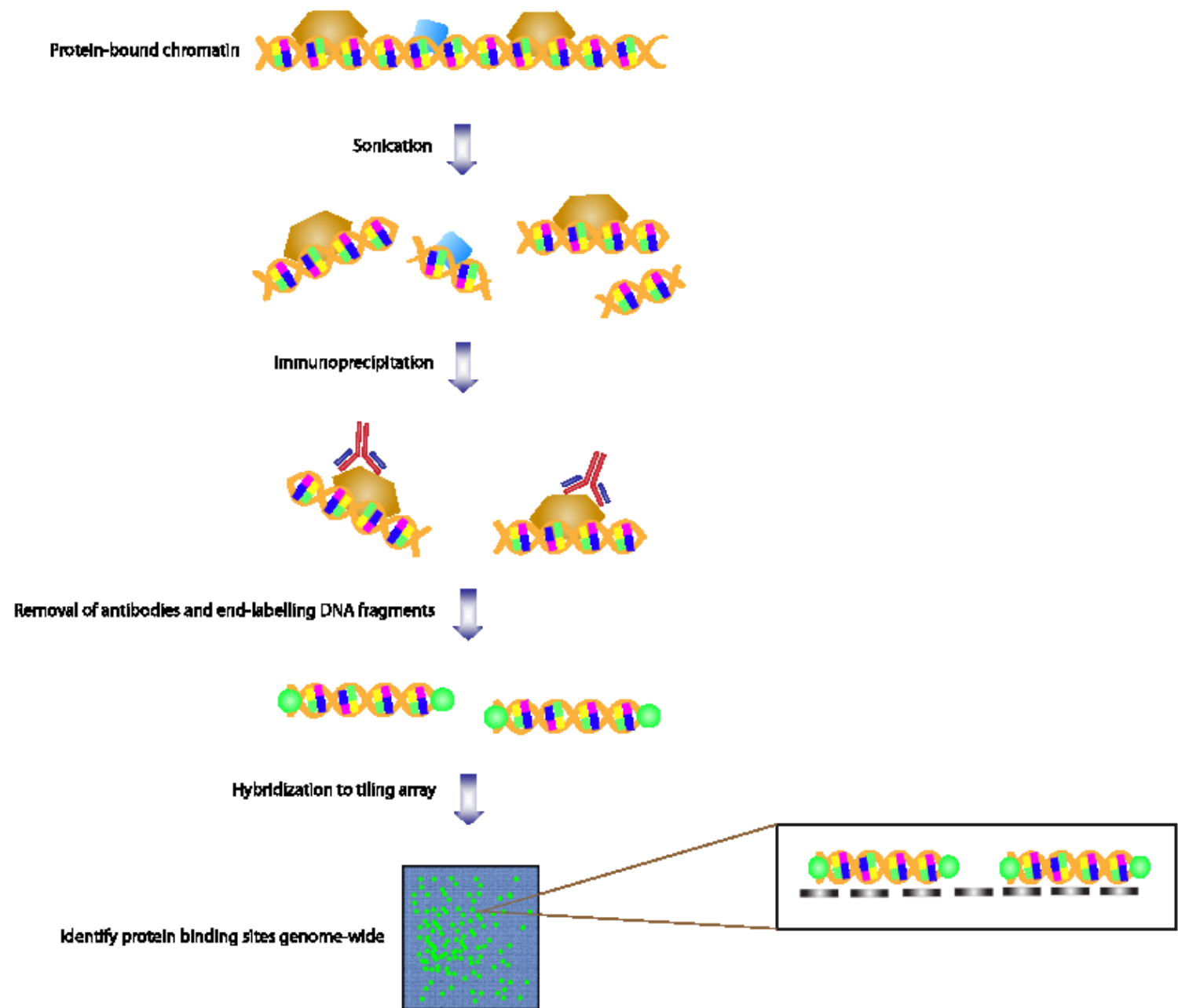
Epigenomika na čipu

- ChIP on chip
- MeDIP-chip
- DNase-chip
- Studium regulačních oblastí genomu
 - Na čipu sondy pro sekvence promotorů, enhancerů, silencerů, responzivních elementů
 - Tiling arrays

ChIP on chip

- **Ch**romatin **i**mmunop**p**recipitation on chip
- Mapování vazby proteinů na DNA
- Studium vazebných míst transkripčních faktorů,...

ChIP-on-

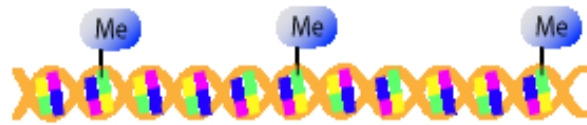


MeDIP-chip

- **Methyl-DNA immunoprecipitation**
- Detailní mapování metylace celého genomu
- DNA metylována na cytosinu v CG dinukleotidech – regulace genové exprese
 - Immunoprecipitace s protilátkou proti 5-metyl-cytosinu

MeDIP-chip

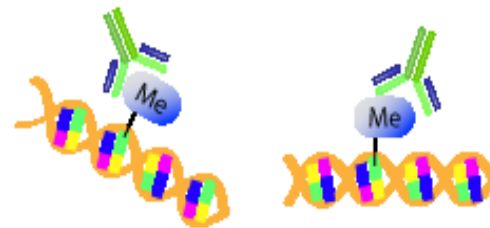
genomic DNA with
5-methyl-cytosine



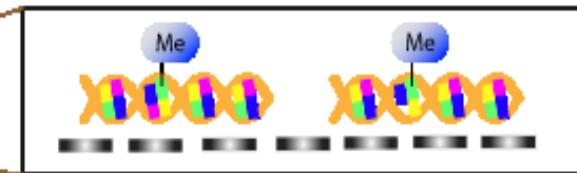
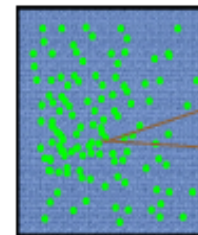
Sonication



Immunoprecipitation with
anti-5-methyl-cytosine antibody



Hybridize to tiling array



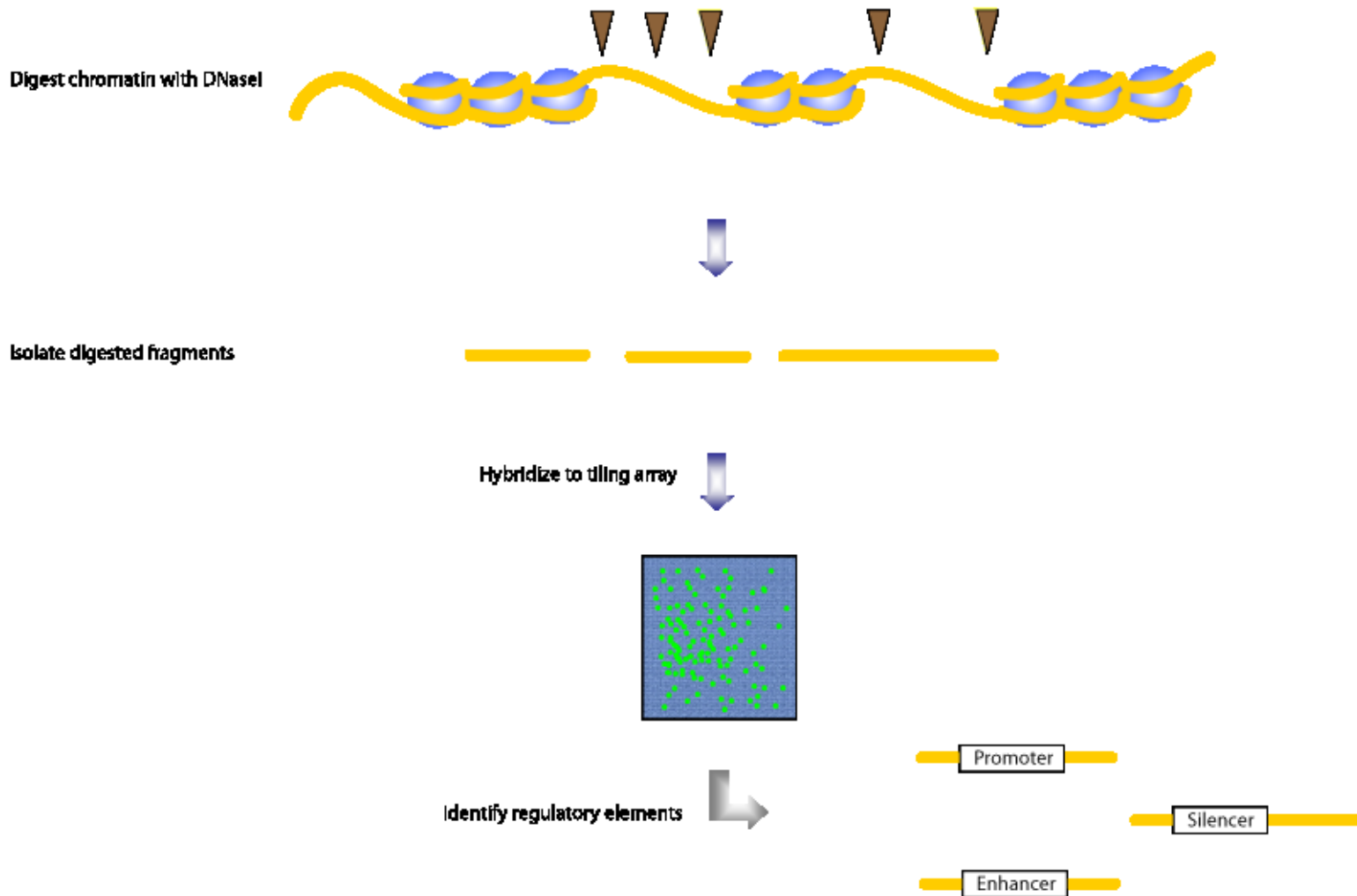
Identify methylated cytosine
across genome



DNAse-chip

- Mapování míst bez nukleosomů – otevřený chromatin, transkripčně aktivní
- Hypersensitivní ke štěpení DNAsou I
- Po štěpení fragmenty ~1,2kb
 - Predikce regulačních elementů

DNAse-chip



...pokračování příště – 30.10.2012

- Statistické metody u čipových technologií
 - Boris Tichý
- Využití čipových technologií v onkologii, mimo onkologii
 - Martin Trbušek