

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

Čipy pro analýzu genomu

Karla Plevová

17.10.2014

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

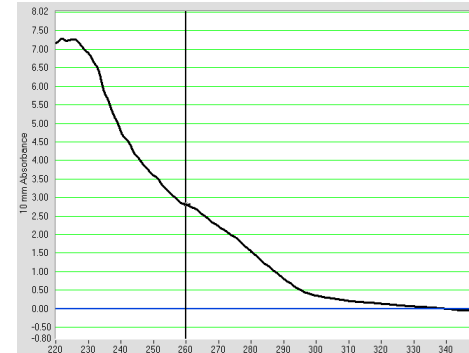
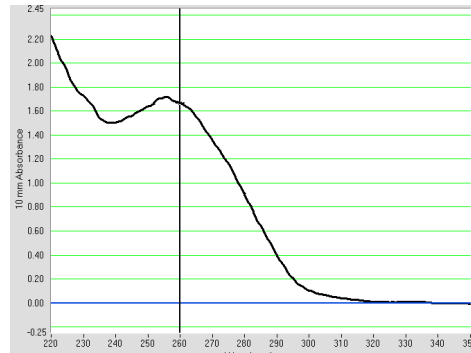
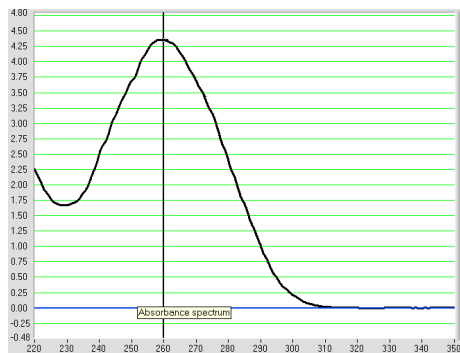
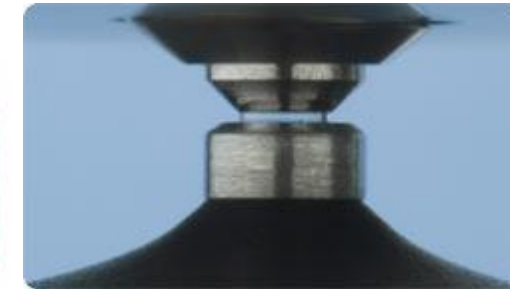
- Měření absorbance nukleotidů A_{260}
- Stanovení čistoty

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.

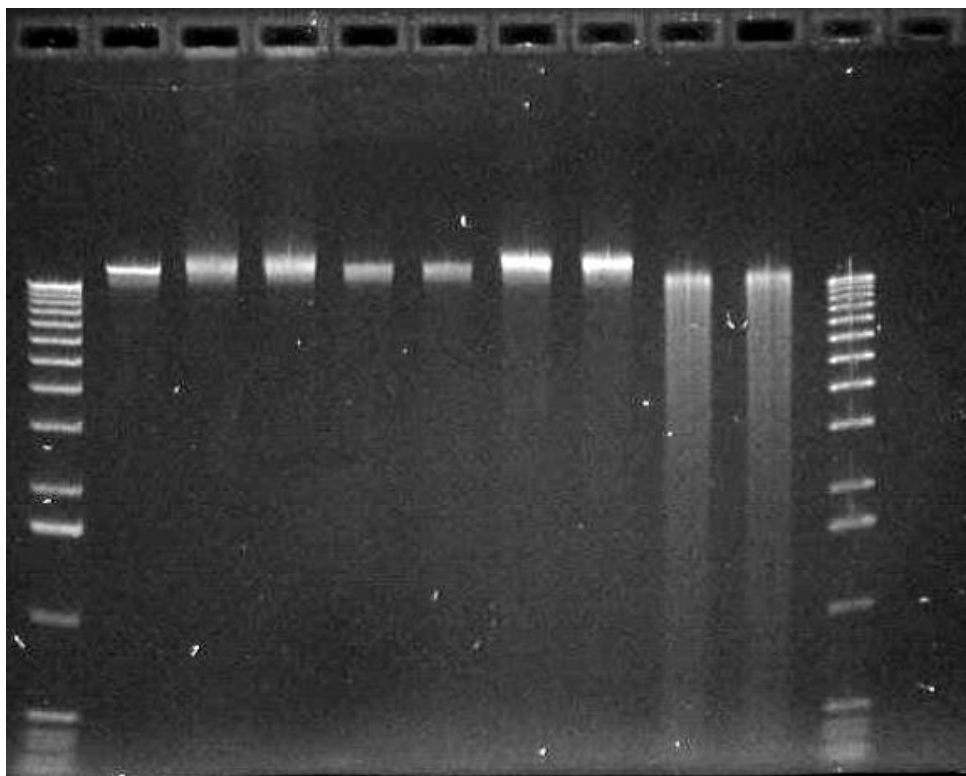
Nanodrop – Malá spotřeba materiálu (1ul)

– Plný spektrální rozsah 190–840 nm



Výchozí materiál - DNA

- Kontrola kvality DNA
 - Elektroforéza



Cytogenetika na čipu



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

CGH - komparativní genomová hybridizace

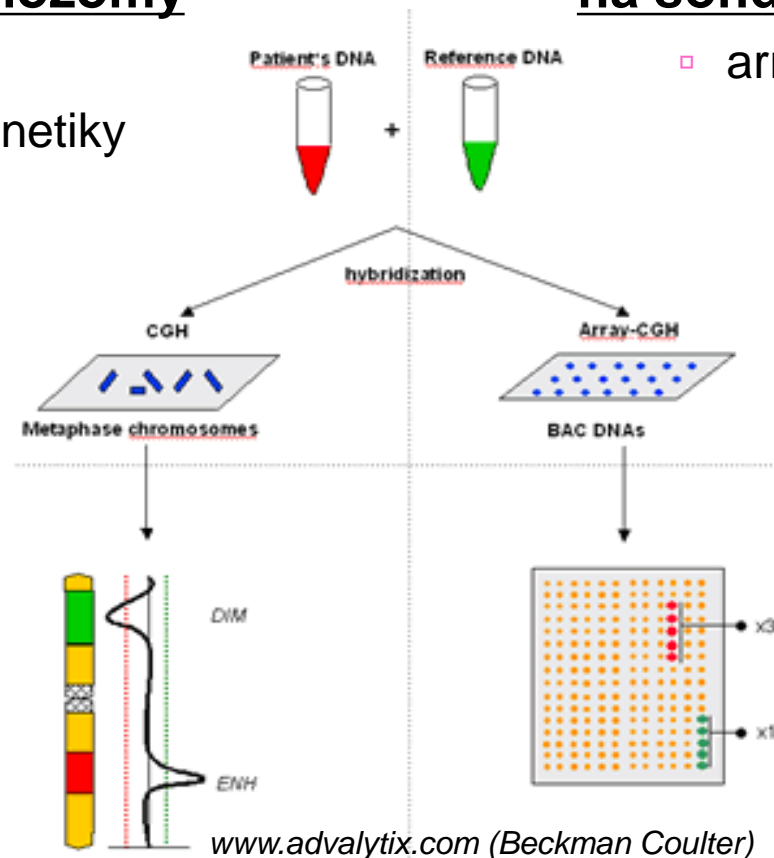
Kohybridizace značené **DNA vzorku** a **kontrolní DNA**

na normální metafázní chromozomy

- Klasická CGH, HR-CGH
- Metoda molekulární cytogenetiky

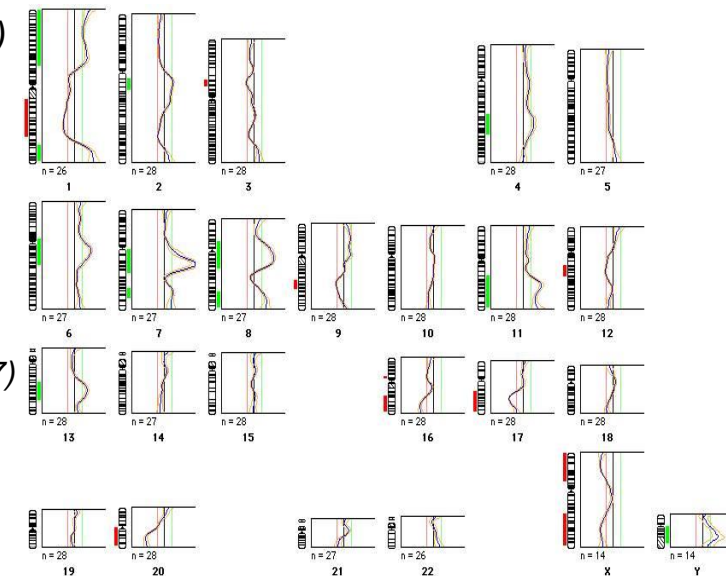
na sondy navázané na sklíčku

- 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

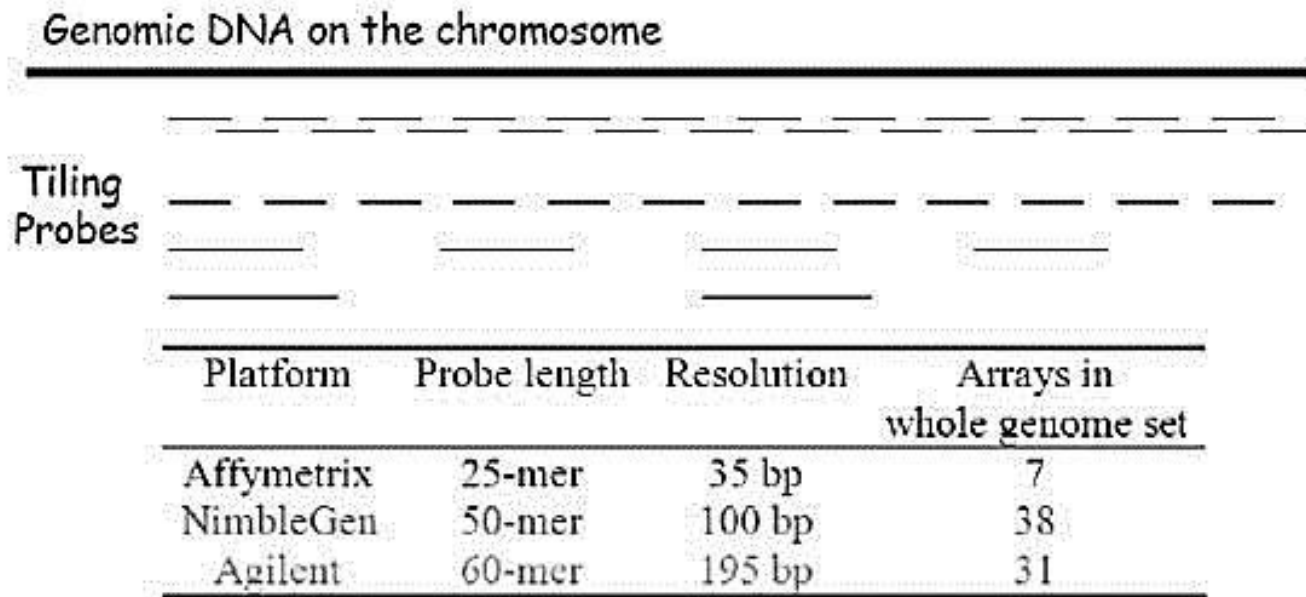
- Rozlišení čipu je dáno délkou a hustotou pokrytí DNA sond
 - BAC ~ 1Mb
 - cDNA – 1-2 kb
 - Oligonukleotidy – i pod 1 kb

Platformy aCGH

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

Tiling arrays

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

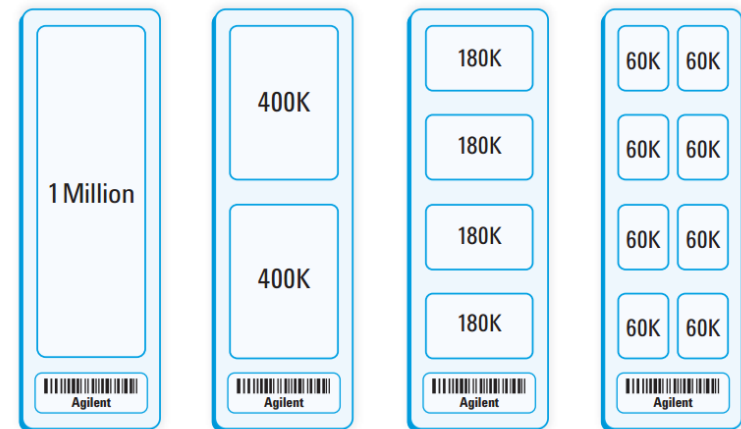
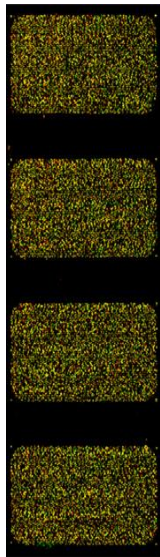


- aCGH, resekvenační, ChIP on chip, MeDIP-chip, DNase-chip

Oligonukleotidové aCGH

Agilent

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



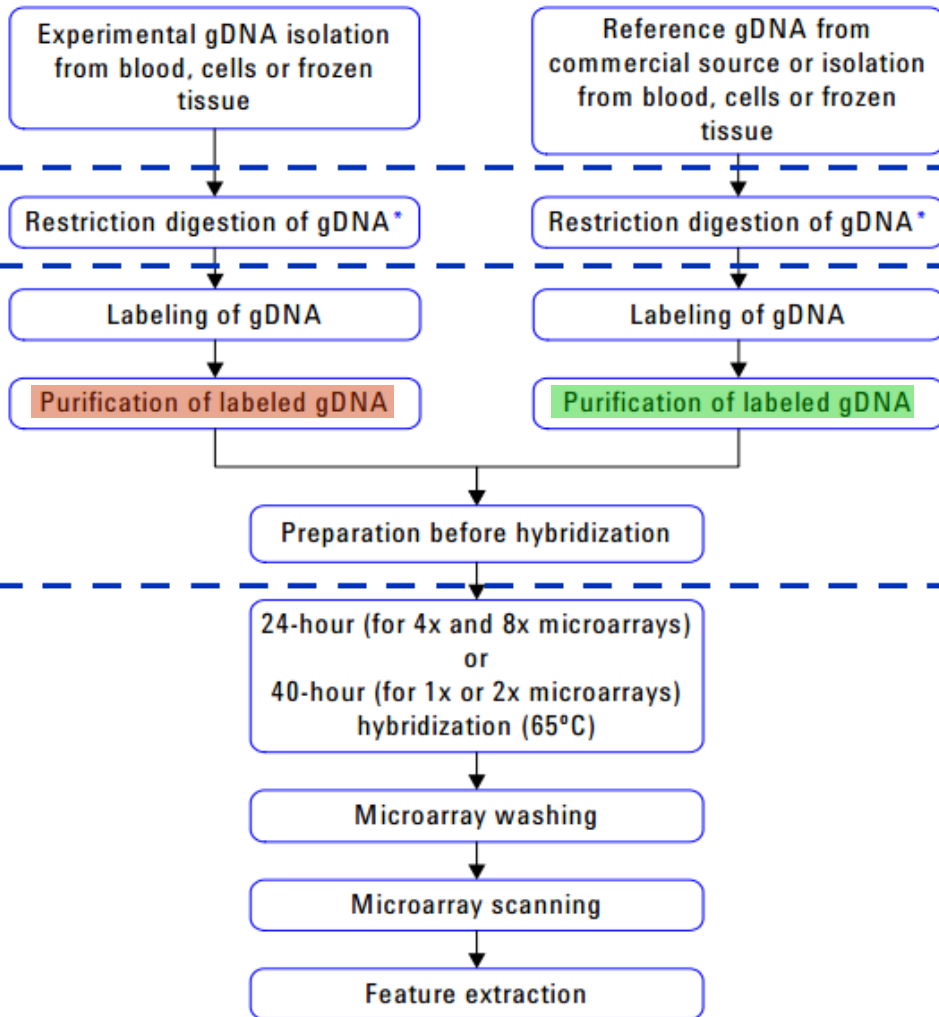
- Další organismy: myš, krysa, kráva, pes, kuře, šimpanz, makak Rhesus, rýže
- Custom arrays

Postup - Agilent

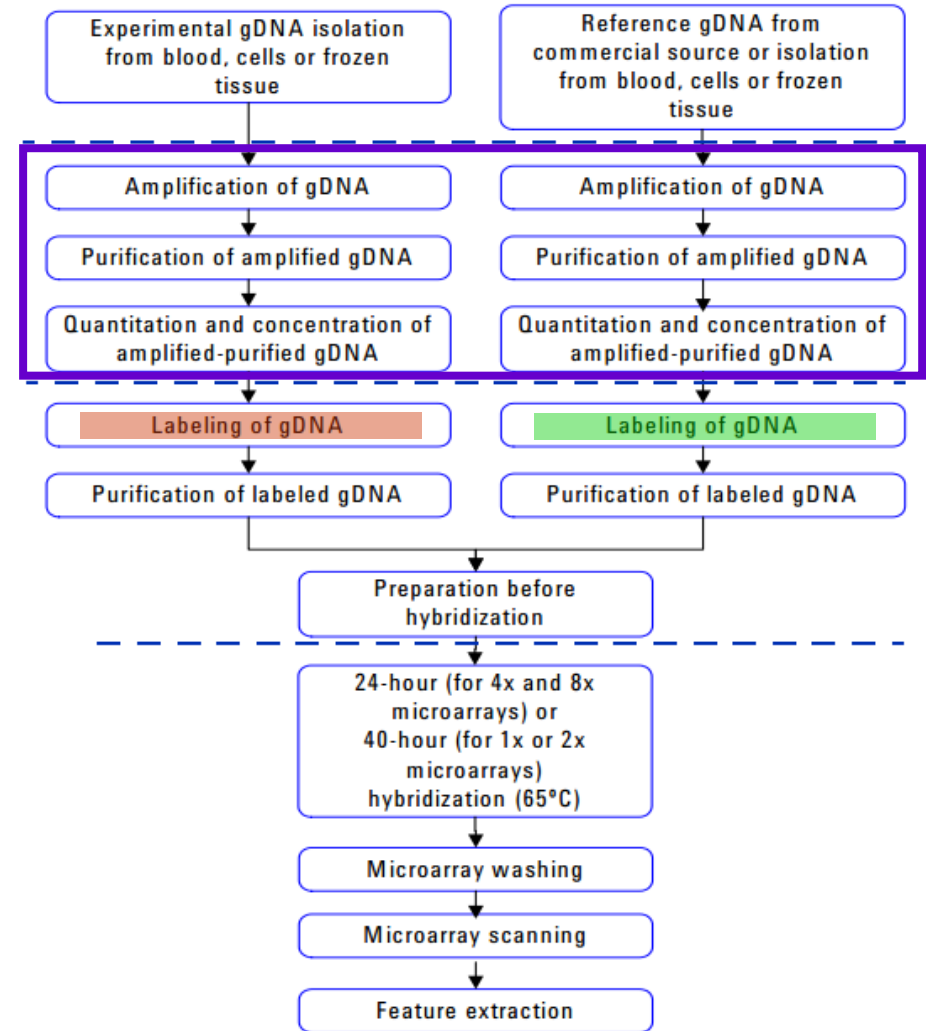
200-500 ng gDNA

50 ng gDNA

Direct Method of Oligo aCGH Workflow



Amplification Method of Oligo aCGH Workflow



Oligonukleotidové aCGH

Roche NimbleGen

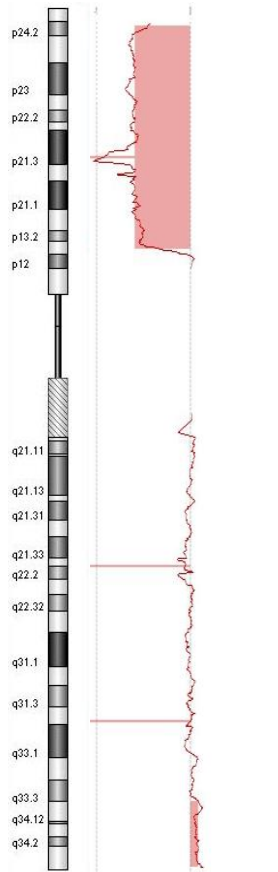
- Sondy 60 bazí
- Specifické aplikace
 - Cytogenetic Arrays - CGx
 - CNV Arrays
 - Whole Genome Tilinig Arrays
 - CGH Whole-Genome Exon-Focused Arrays
- Formáty
 - 4.2M, 2.1M, 3x1.4M, 3x720K, 6x630K, 12x270K, 12x135K, 385K, 4x72K (Chromosome Tiling)
- Další organismy: myš, krysa, kráva, pes, kuře, makak Rhesus, Caenorhabditis elegans, Drosophila, Zebrafish, Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, Plasmodium falciparum



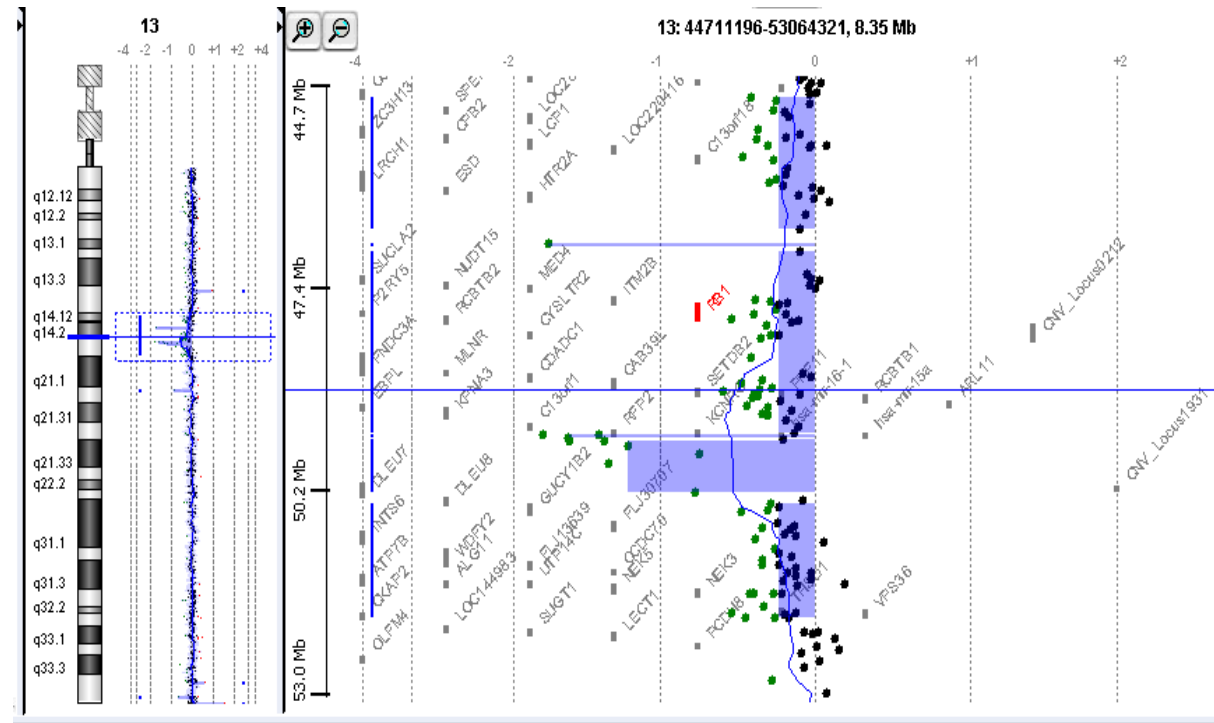
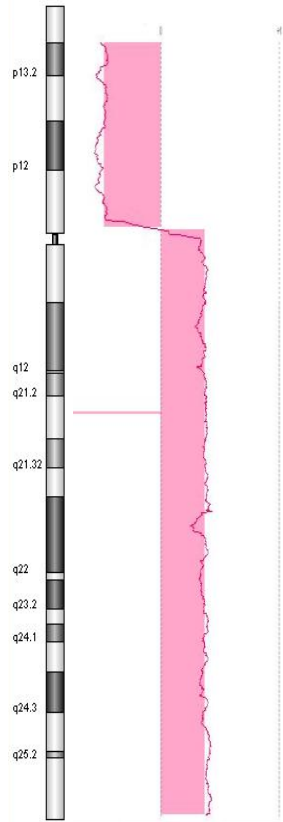
Výsledky aCGH

Monoalelická delece a krátká bialelická

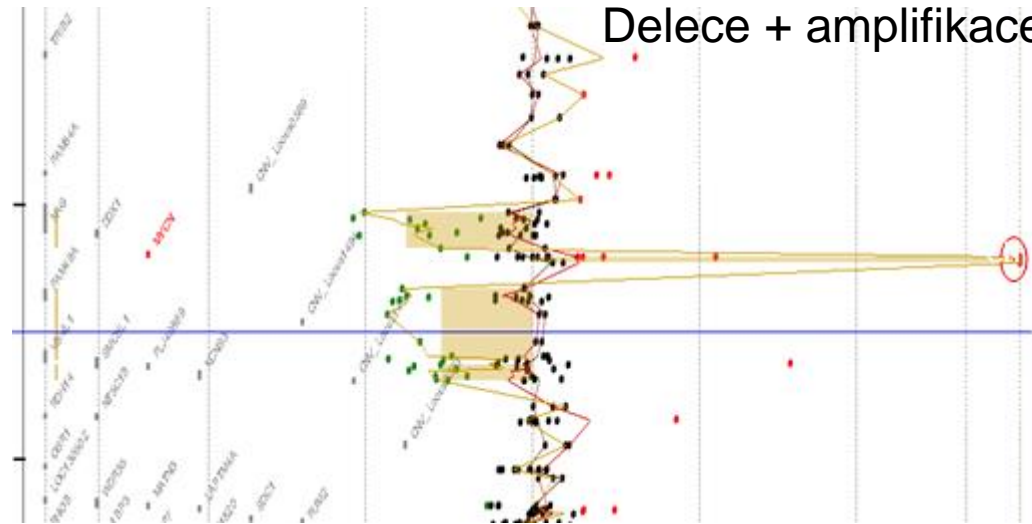
delece 9p



izochromozom 17

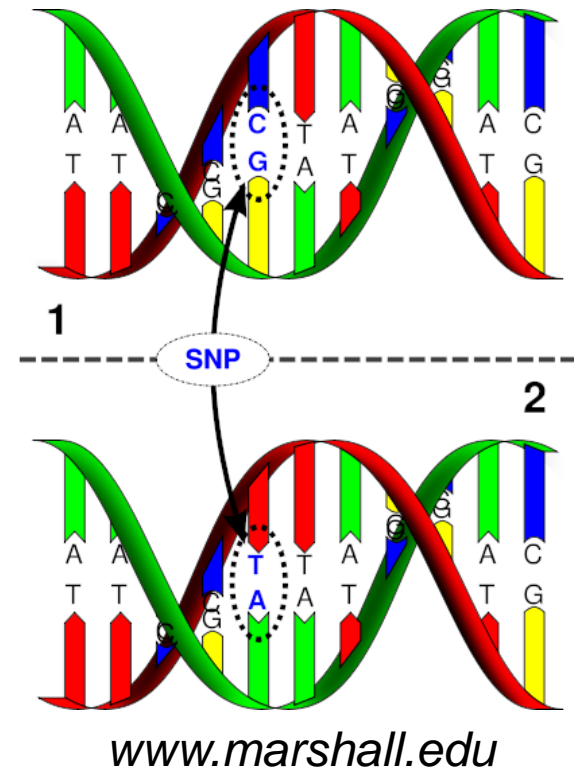


Delece + amplifikace



SNP čipy

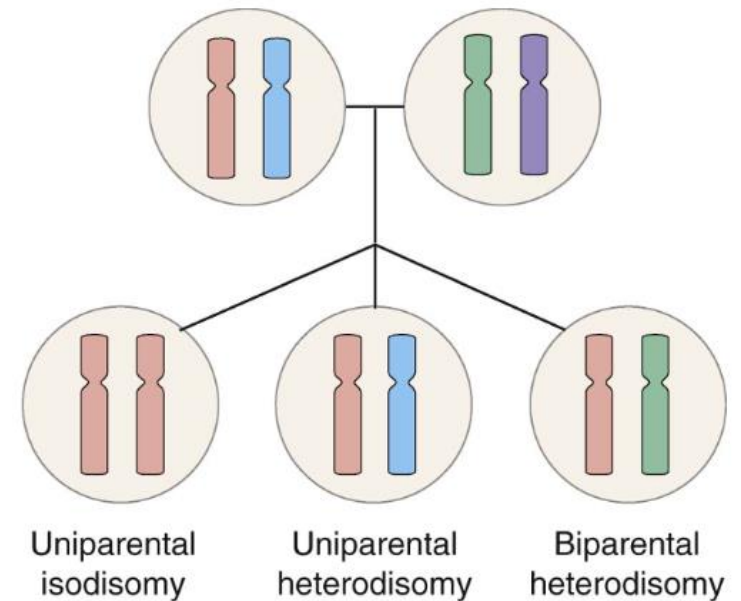
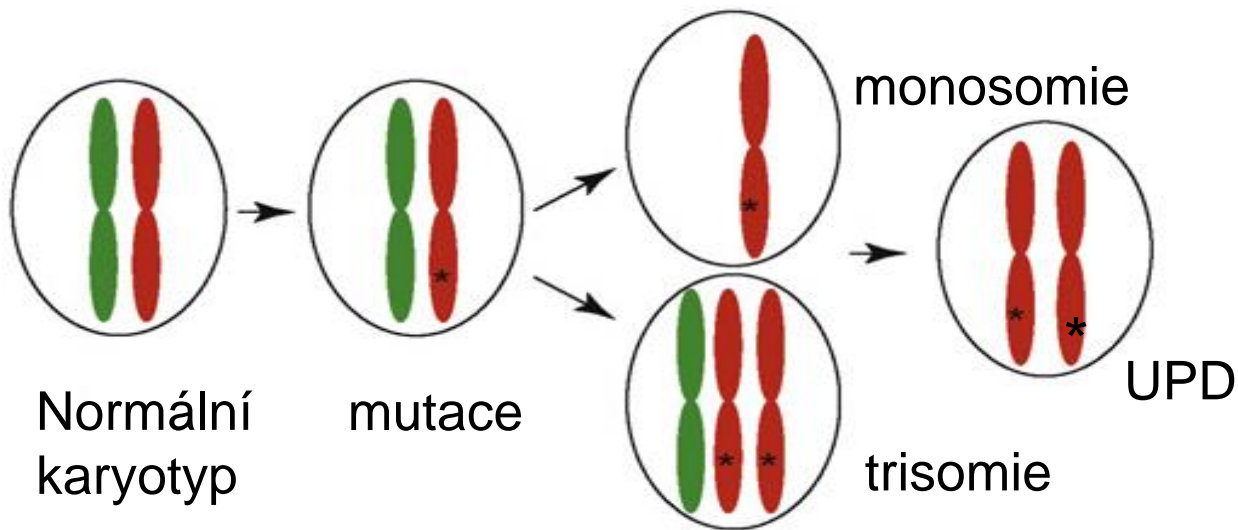
- Čipy umožňující rozlišit nejen CNV, ale i SNP
- SNP – jednonukleotidové polymorfismy
 - V lidském genomu asi 15 mil identifikovaných polymorfismů
 - Asociace s onemocněními (Polymorfismus vs mutace)
- Určení stavu alel, haplotypu
 - Genotypizace, asociační studie
- Detekce ztráty heterozygotnosti/uniparentální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



Uniparentální disomie (UPD) / ztráta heterozyzity

CNN LOH – copy number neutral loss of heterozyzity

- Vyskytuje se u řady onemocnění
- Somatická vs germinální
- Heterodisomie vs isodisomie



Princip SNP čipů

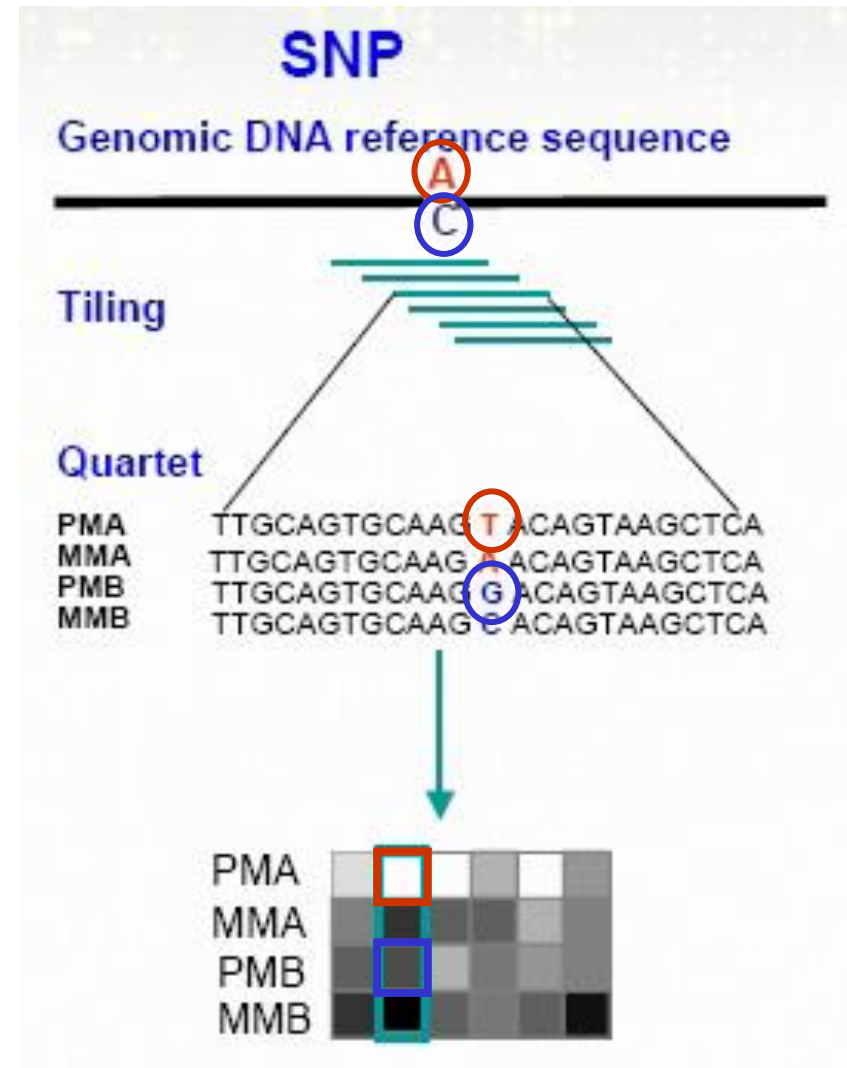
- Sondy pro detekci CNV jako u CGH čipů + sondy speciálně navržené pro detekci SNP
- Pro analýzu SNP není testovaná DNA srovnávána s kontrolní DNA
- Vyhodnocení CNV
 - srovnání s kontrolní DNA hybridizovanou na jiném/stejném čipu
 - porovnání s daty uloženými v softwaru - soubor kontrolní DNA

Princip SNP čipů - Affymetrix

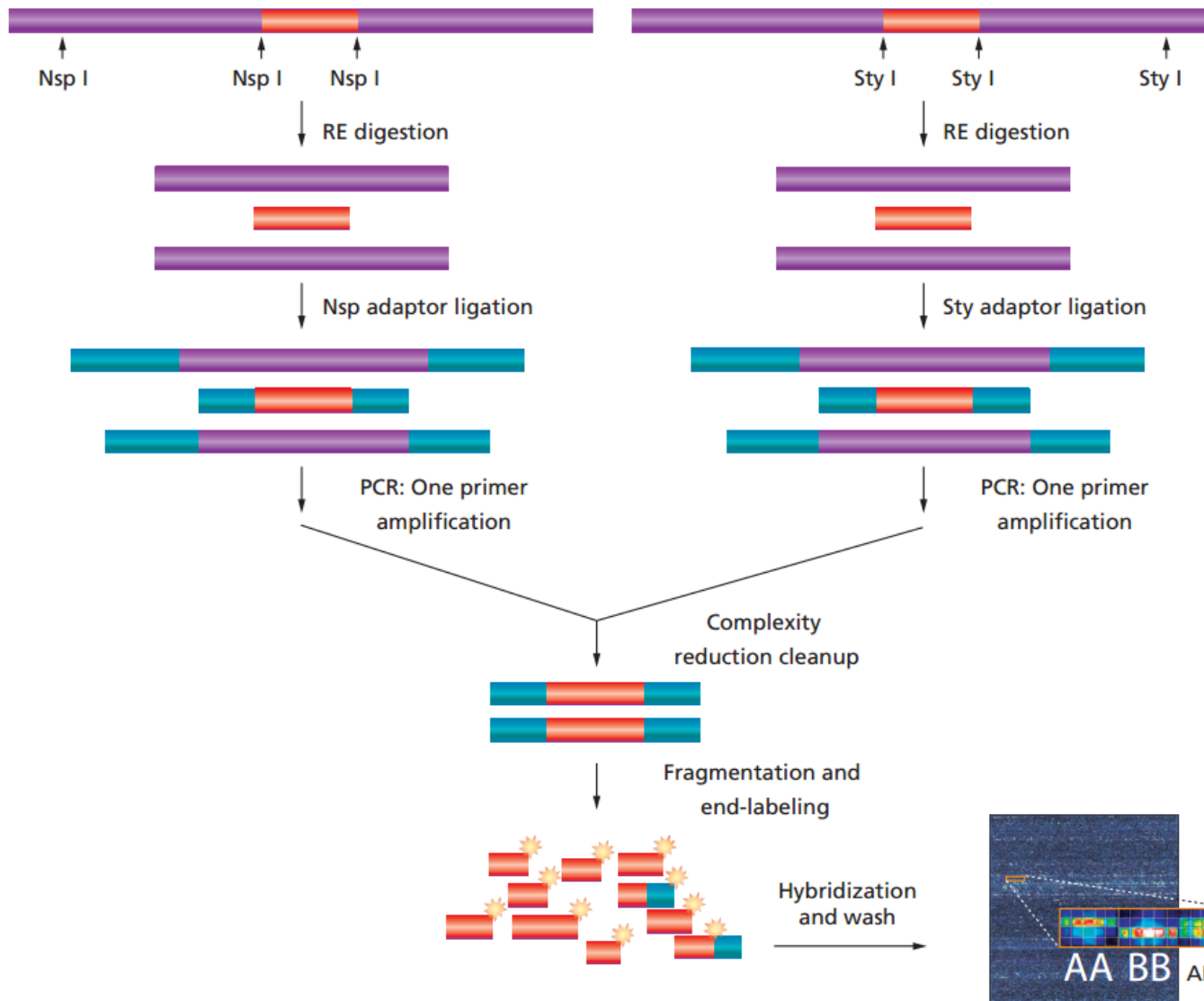
25b sondy

záměna 13. nukleotidu -

největší vliv na sílu vazby
při neshodě



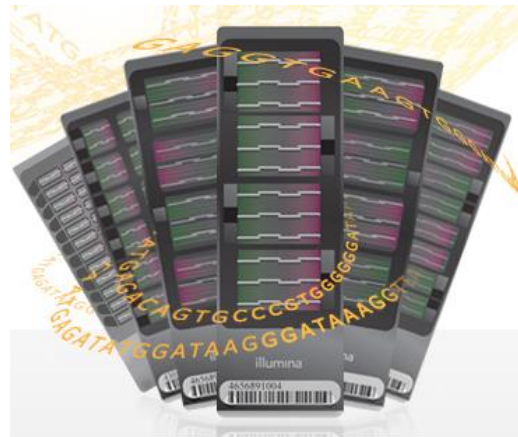
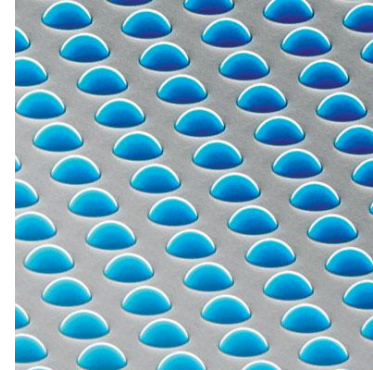
Postup - SNP6



500 ng gDNA

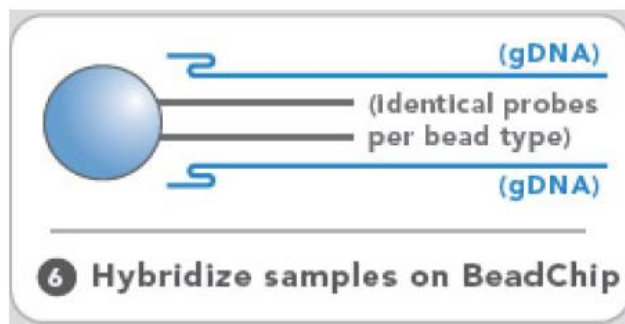
Illumina Bead array

- BeadChip
- Více formátů
 - 4, 12, 24 vzorků na čip
 - 300 tis - 2,45 mil markerů

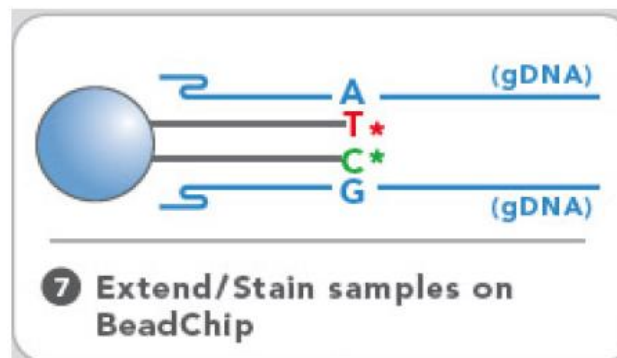


Princip SNP čipů - Illumina

Infinium II
Infinium HD

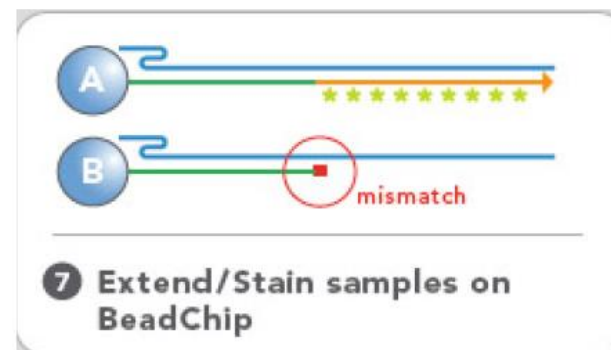
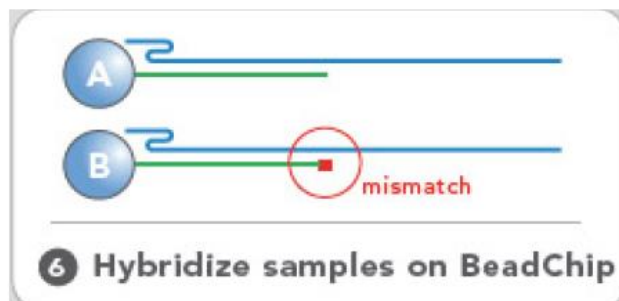


T*
A*
C*
G*



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

Infinium I

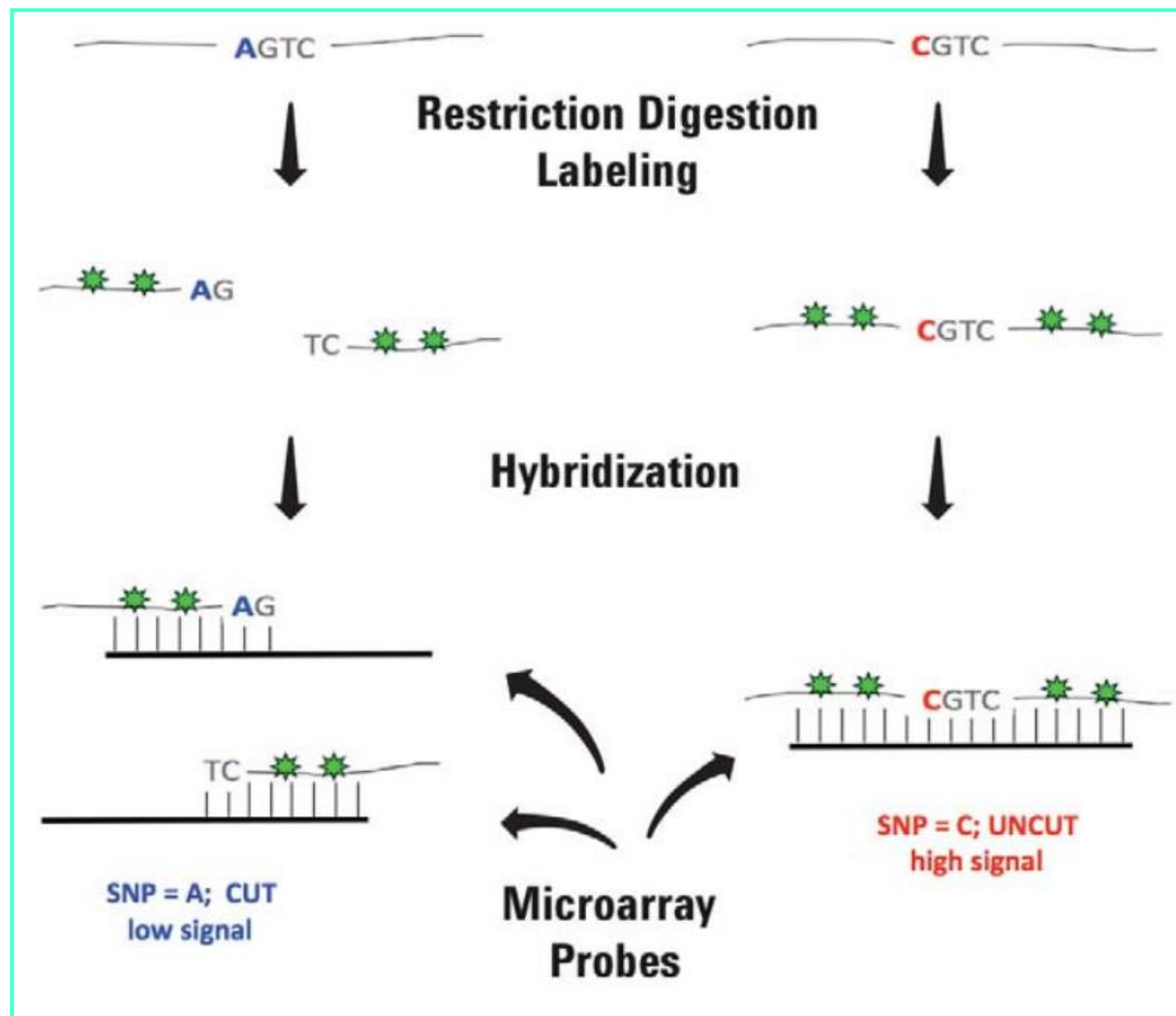


2X 50b, allele specific extension

Agilent

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

Princip SNP čipů - Agilent

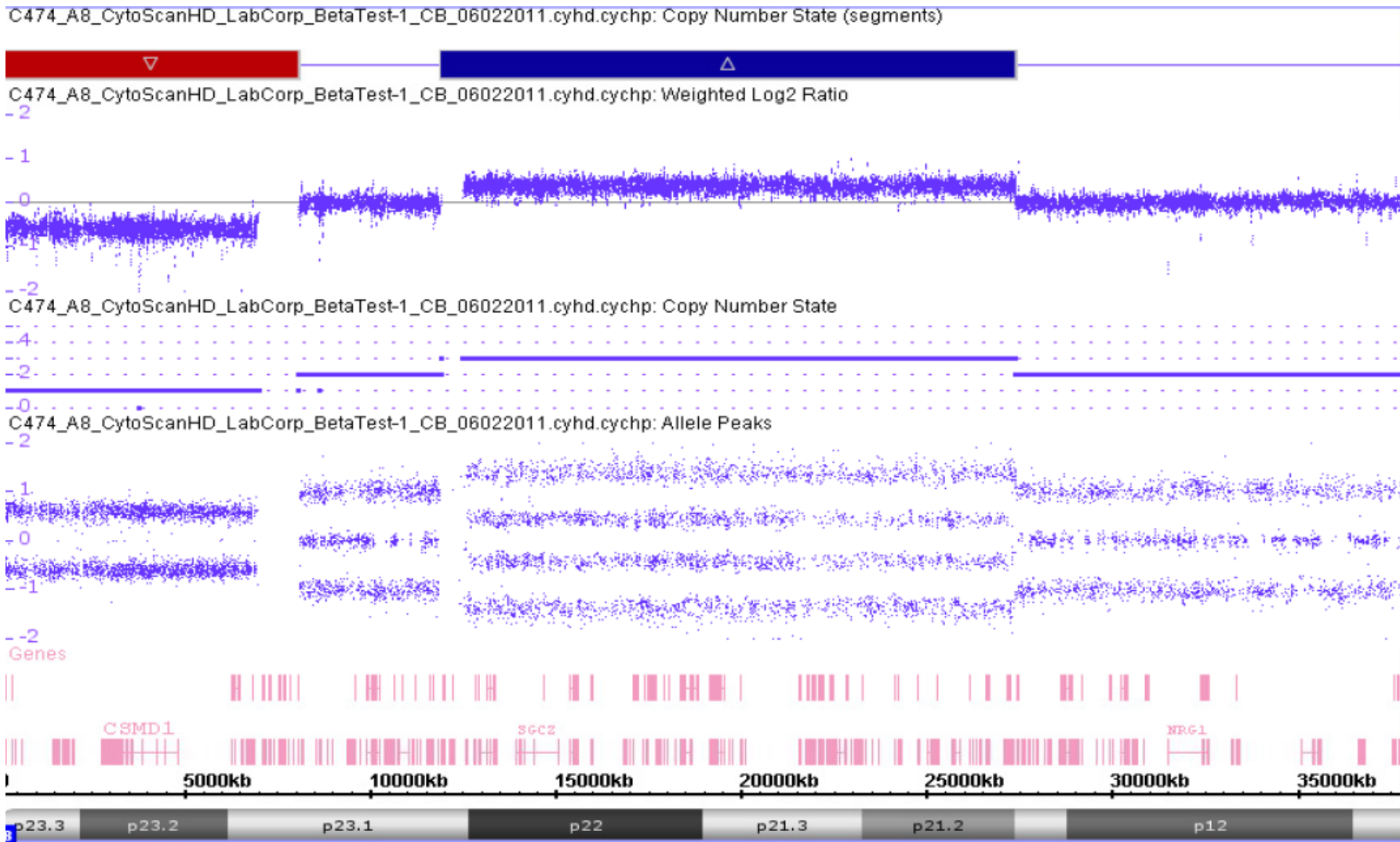


Bluegnome



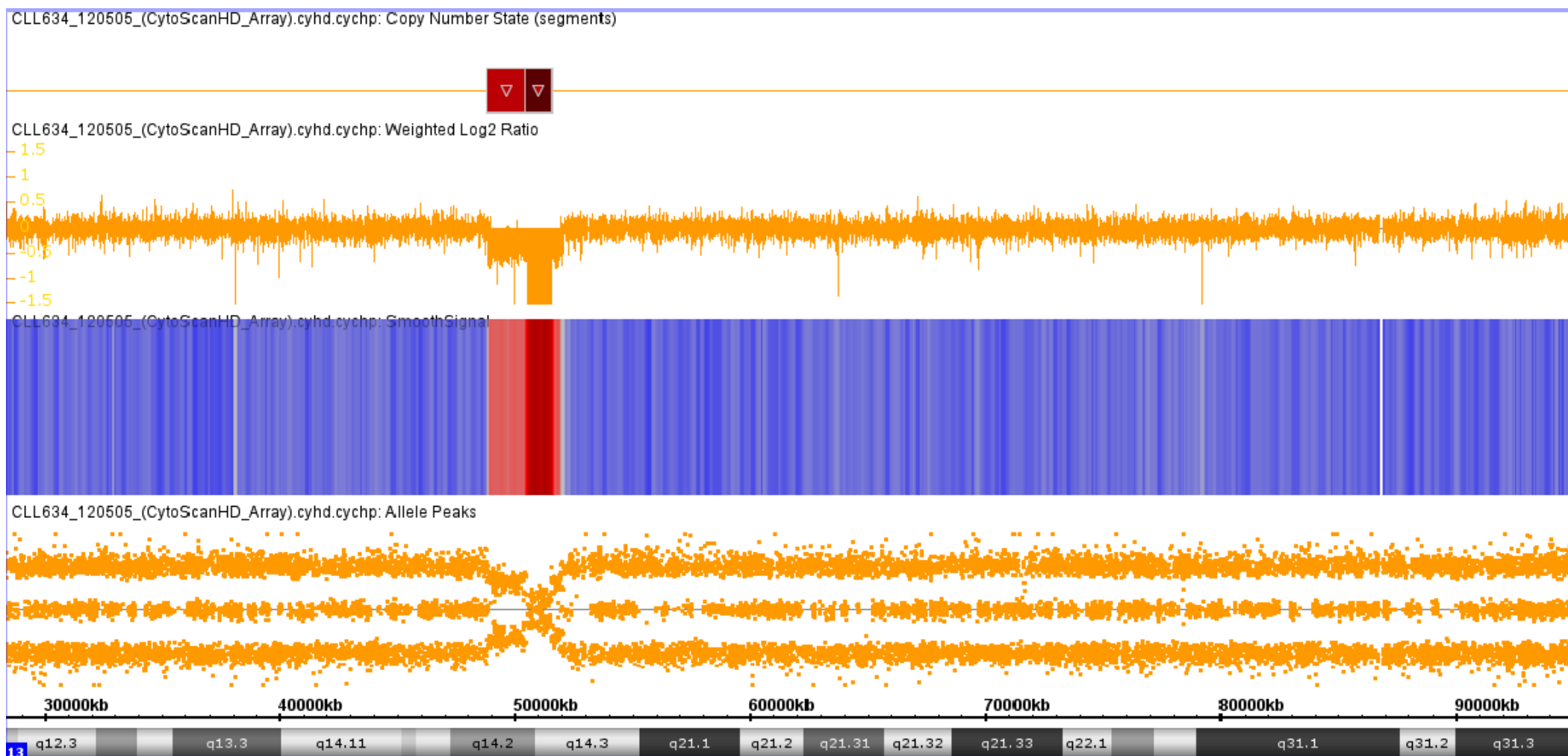
- CytoSNP - 850K
- 24sure – PGS
 - Preimplantační screening – detekce aneuploidií všech 24 chromosomů
- 24sure+ - PGD
 - Preimplantační genetická diagnostika – screening emryí nositelů reciprokých translokací
- Další specifické
 - Cytochip-focus – špatná kvalita DNA – amniocentéza, odběr choriových klků
 - CytoChip Cancer
 - CytoChip ISCA (The International Standards for Cytogenomic Arrays)

Výsledky SNP arrays – analýza CNV amplifikace + delece



Výsledky SNP arrays – analýza CNV

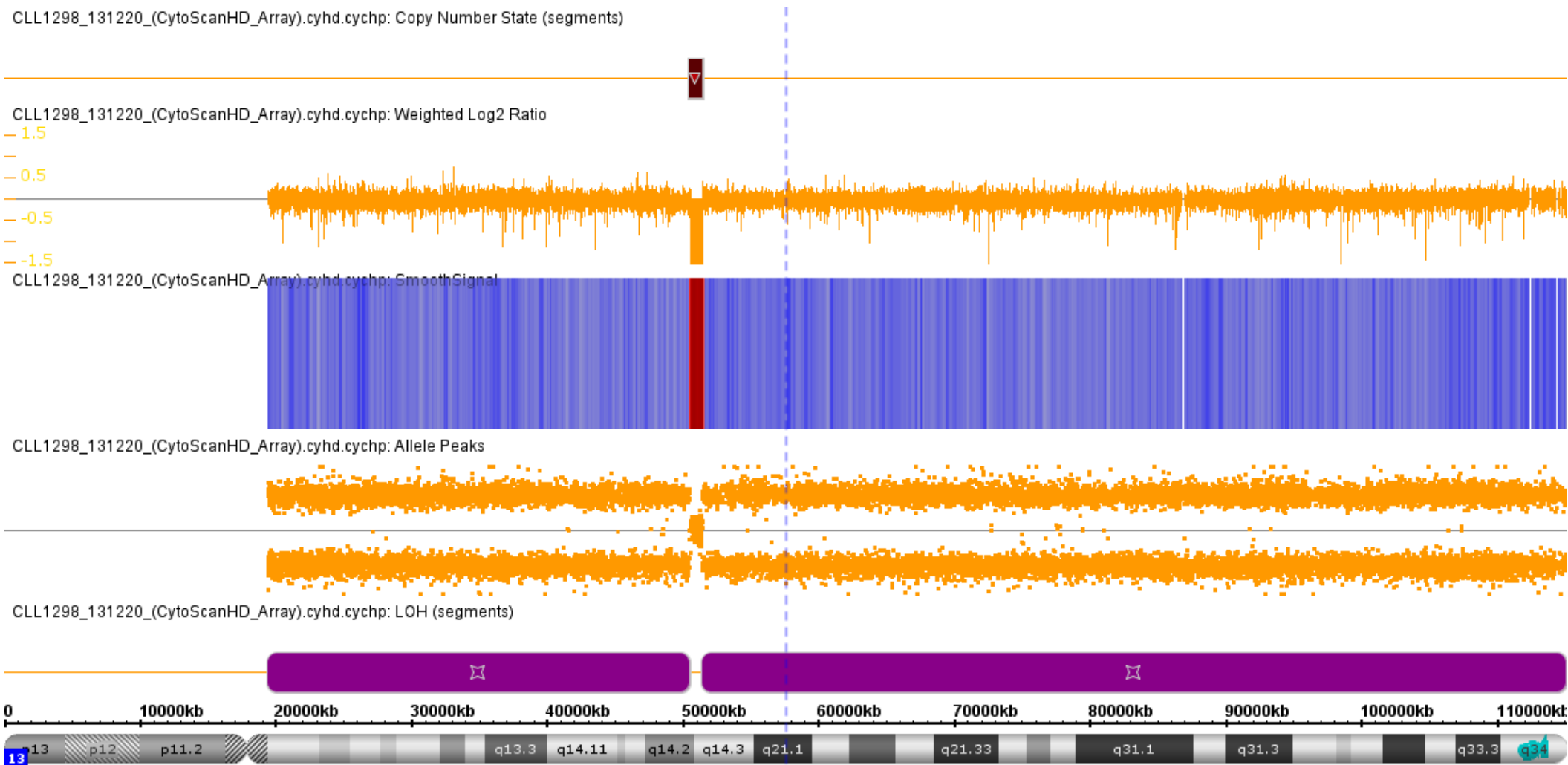
monoalelická + bialelická delece



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Výsledky SNP arrays - CNN LOH

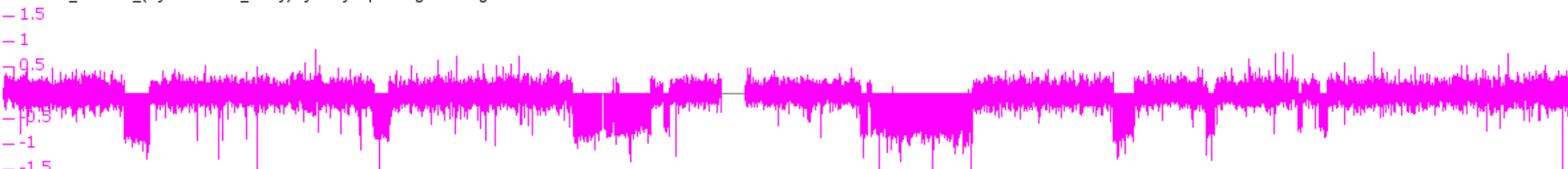


Výsledky SNP arrays - chromothripse

CLL719_141010_(CytoScanHD_Array).cyhd.cychp: Copy Number State (segments)



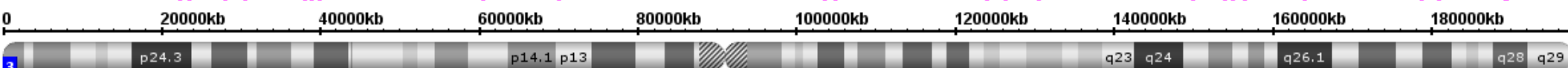
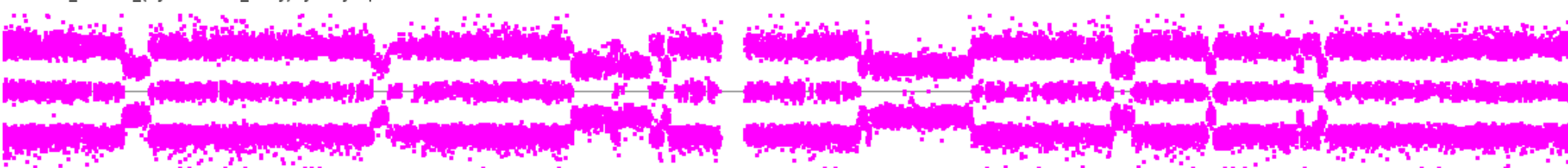
CLL719_141010_(CytoScanHD_Array).cyhd.cychp: Weighted Log2 Ratio



CLL719_141010_(CytoScanHD_Array).cyhd.cychp: Copy Number State



CLL719_141010_(CytoScanHD_Array).cyhd.cychp: Allele Peaks



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

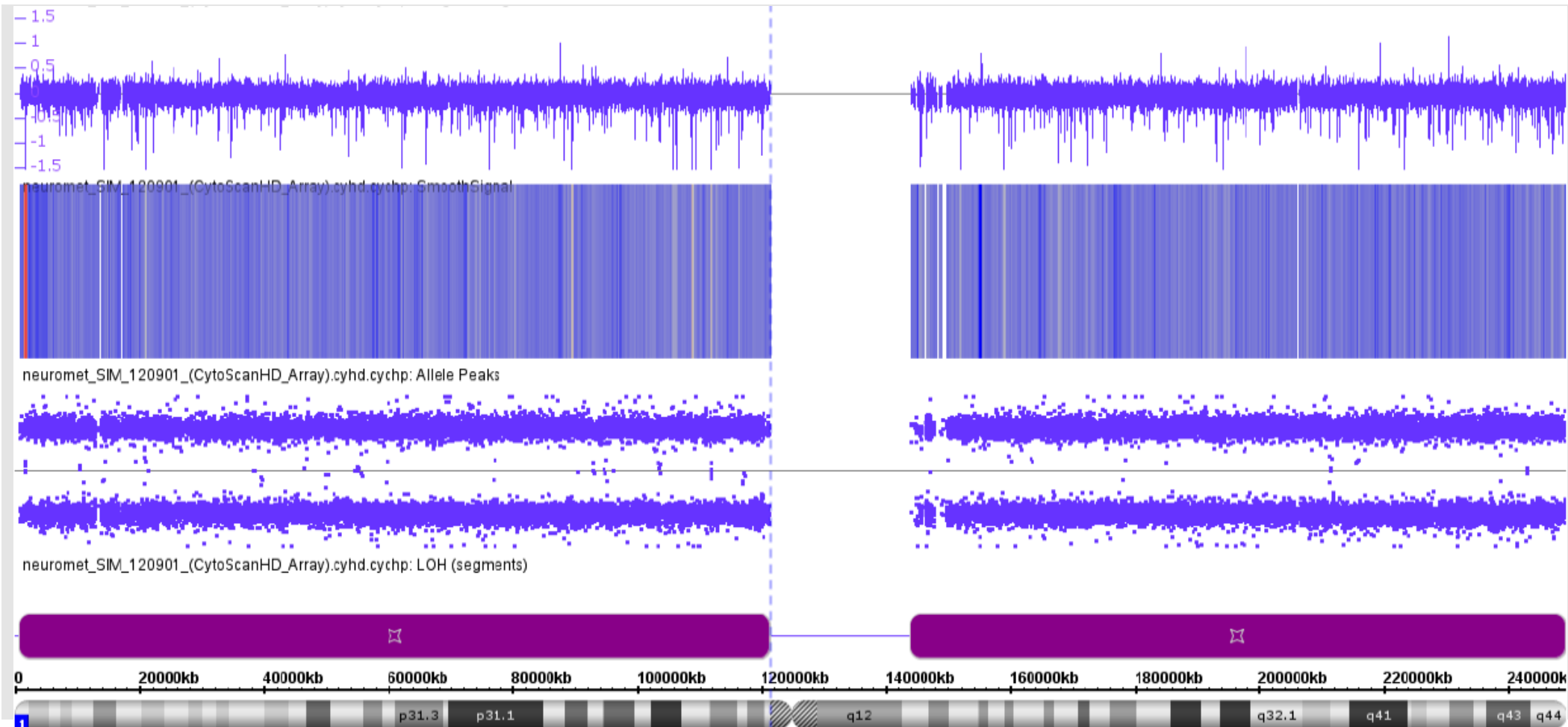
Výsledky SNP arrays

– identifikace oblastí identických původem (stanovení konsanguinity)

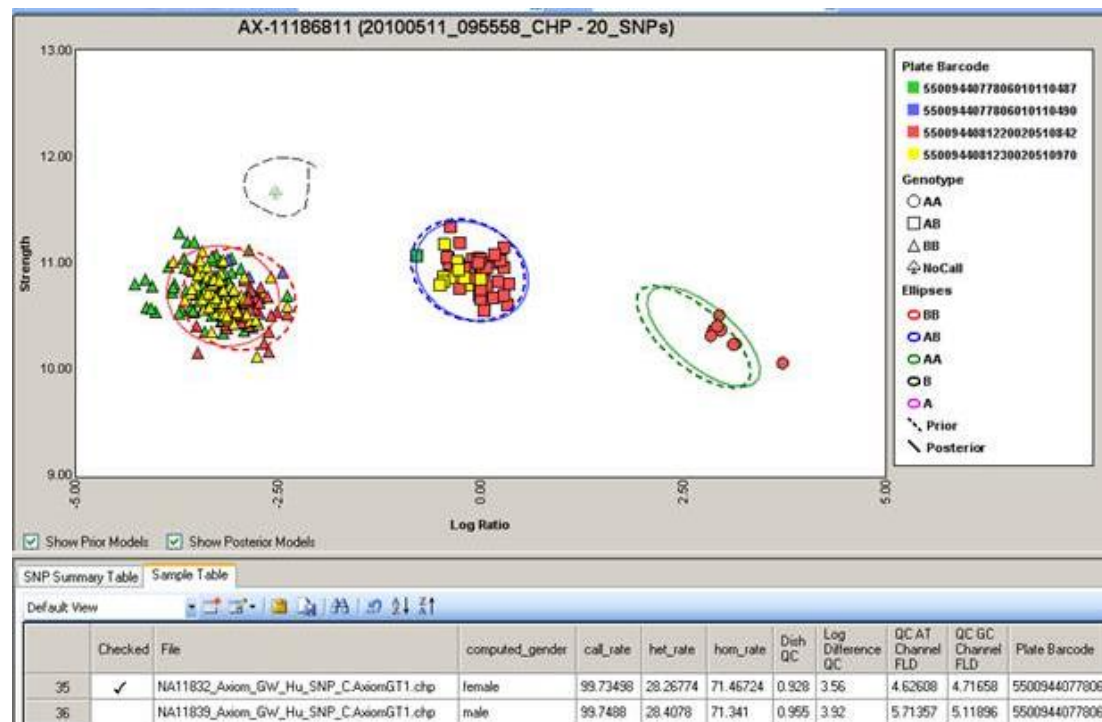
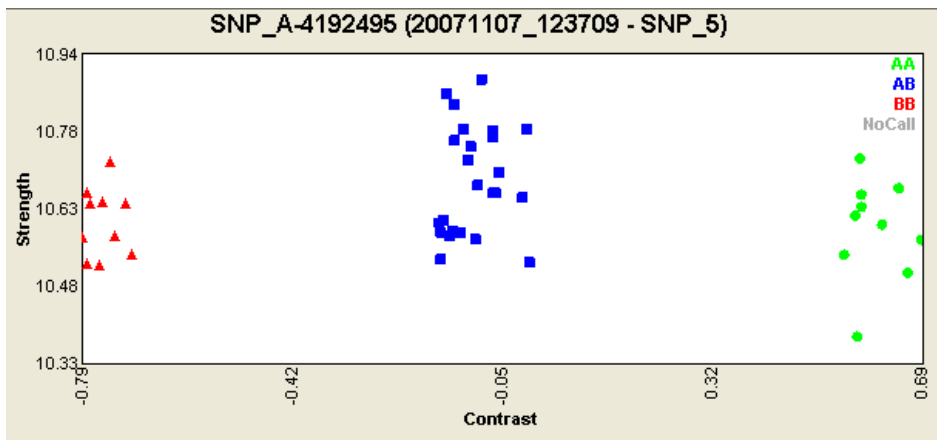


Glykogenóza, typ III

autozomálně recesivně dědičné onemocnění, mutace v genu AGL
(enzym účastnící se degradace glykogenu)



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
- **Prenatální a preimplantační diagnostika**
- **Asociační studie – asociace SNP i CNV s řadou onemocnění (revmatoidní artritida, diabetes, nádorová onemocnění)**
- **Farmakogenomika**
- **Evoluční studie**

Resekvenační čipy

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

Resekvenační čipy - Affymetrix

- Stejný princip jako detekce SNP
- Krátké oligonukleotidy – 25mery
- Typizovaná báze na 13. pozici
- SNP array – 4 sondy na jeden SNP

X resekvenování – 8 sond na jednu pozici

TCGGTAGCCATGAATGAGTTACTAC	<i>Probe 1 Forward</i>
TCGGTAGCCATGCATGAGTTACTAC	<i>Probe 2 Forward</i>
TCGGTAGCCATGGATGAGTTACTAC	<i>Probe 3 Forward</i>
TCGGTAGCCATGTATGAGTTACTAC	<i>Probe 4 Forward</i>
ATCGGTAGCCATGCATGAGTTACTACAGCT	<i>Genomic Sequence of interest</i>
TAGCCATCGGTACGTACTCAATGATGTCGA	
AGCCATCGGTAGTACTCAATGATG	<i>Probe 1 Reverse</i>
AGCCATCGGTAGCTACTCAATGATG	<i>Probe 2 Reverse</i>
AGCCATCGGTAGTACTCAATGATG	<i>Probe 3 Reverse</i>
AGCCATCGGTAGTTACTCAATGATG	<i>Probe 4 Reverse</i>

Resekvenační čipy Affymetrix - princip



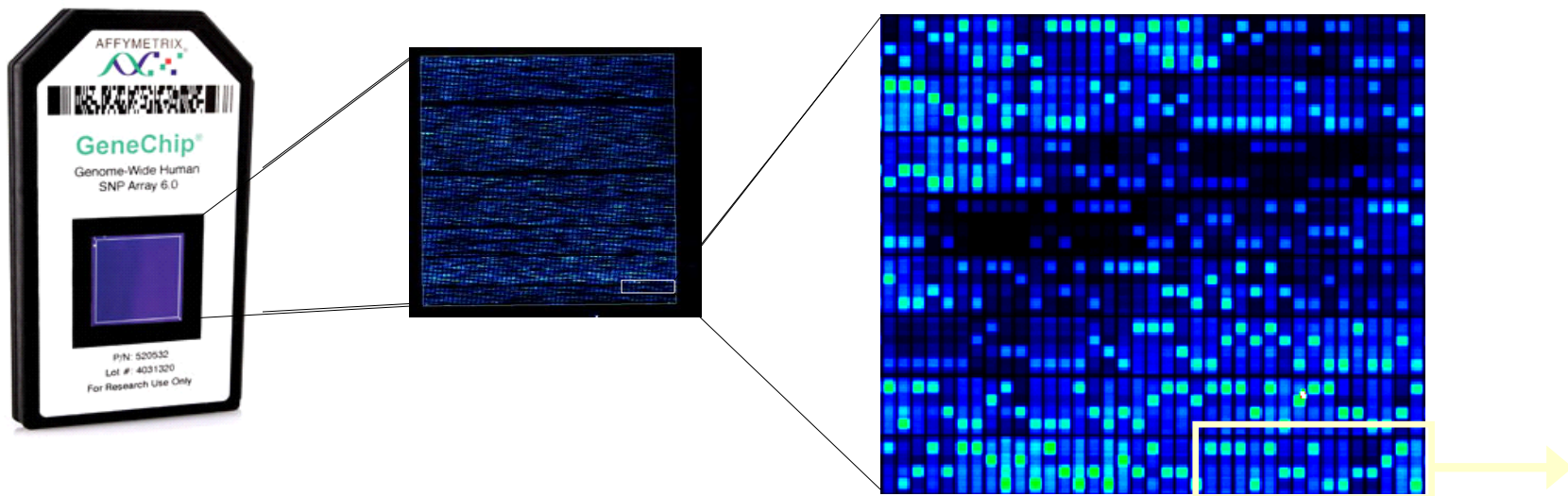
Resekvenační čipy Affymetrix - princip



Resekvenační čipy Affymetrix - princip



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
	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
Array Image (Forward)														
Sequence	A	C	T	A	T	A	G	C	A	A	C	A	G	



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

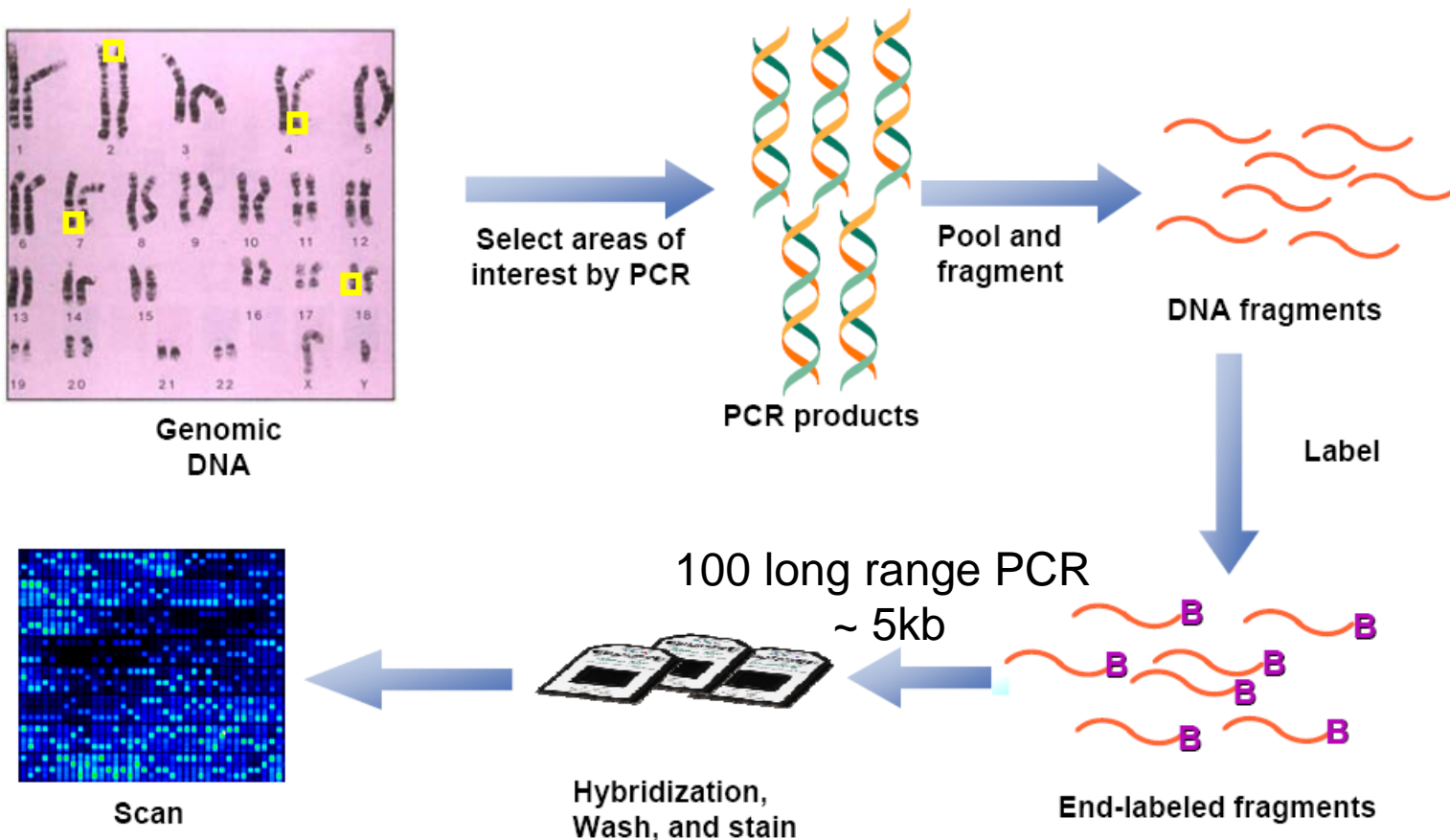
Resekvenační čipy Affymetrix

- Sekvenace mnoha kb současně

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

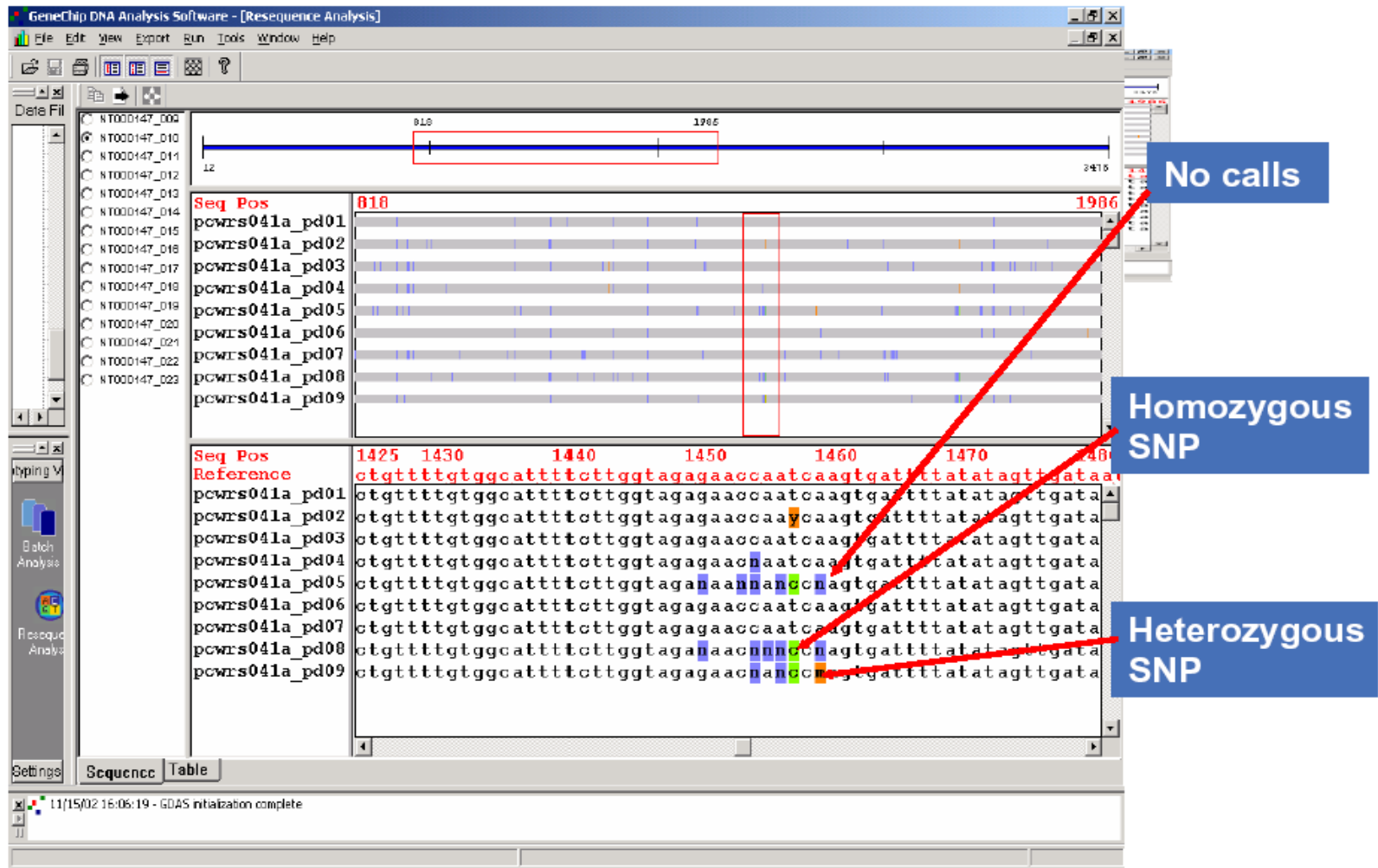
- Citlivost - 10-25% mutovaných alel ve vzorku
- Problematické oblasti – GC bohaté, repetitivní

Resekvenační čipy - postup



Protokol - 3 dny

Resekvenační čipy - výstup

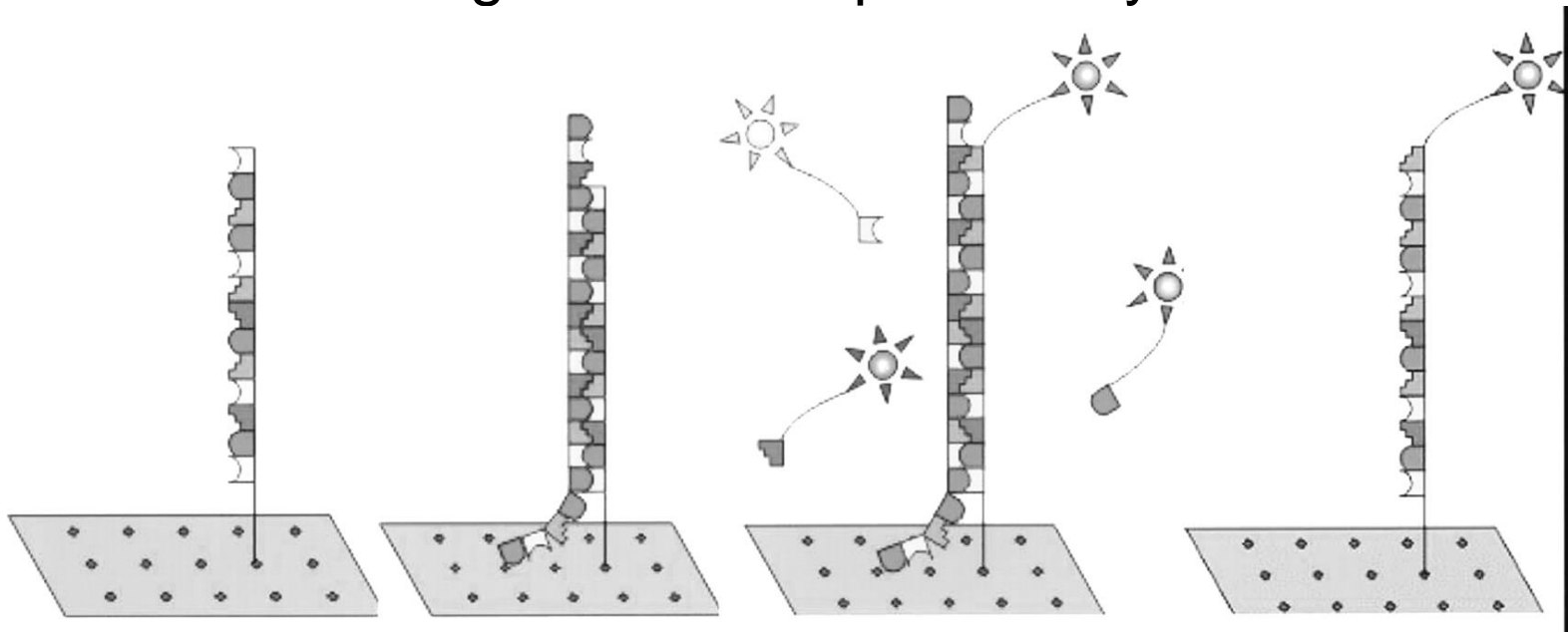


Nutné ověřit sangerovým sekvenováním

Resekvenační čipy

APEX

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



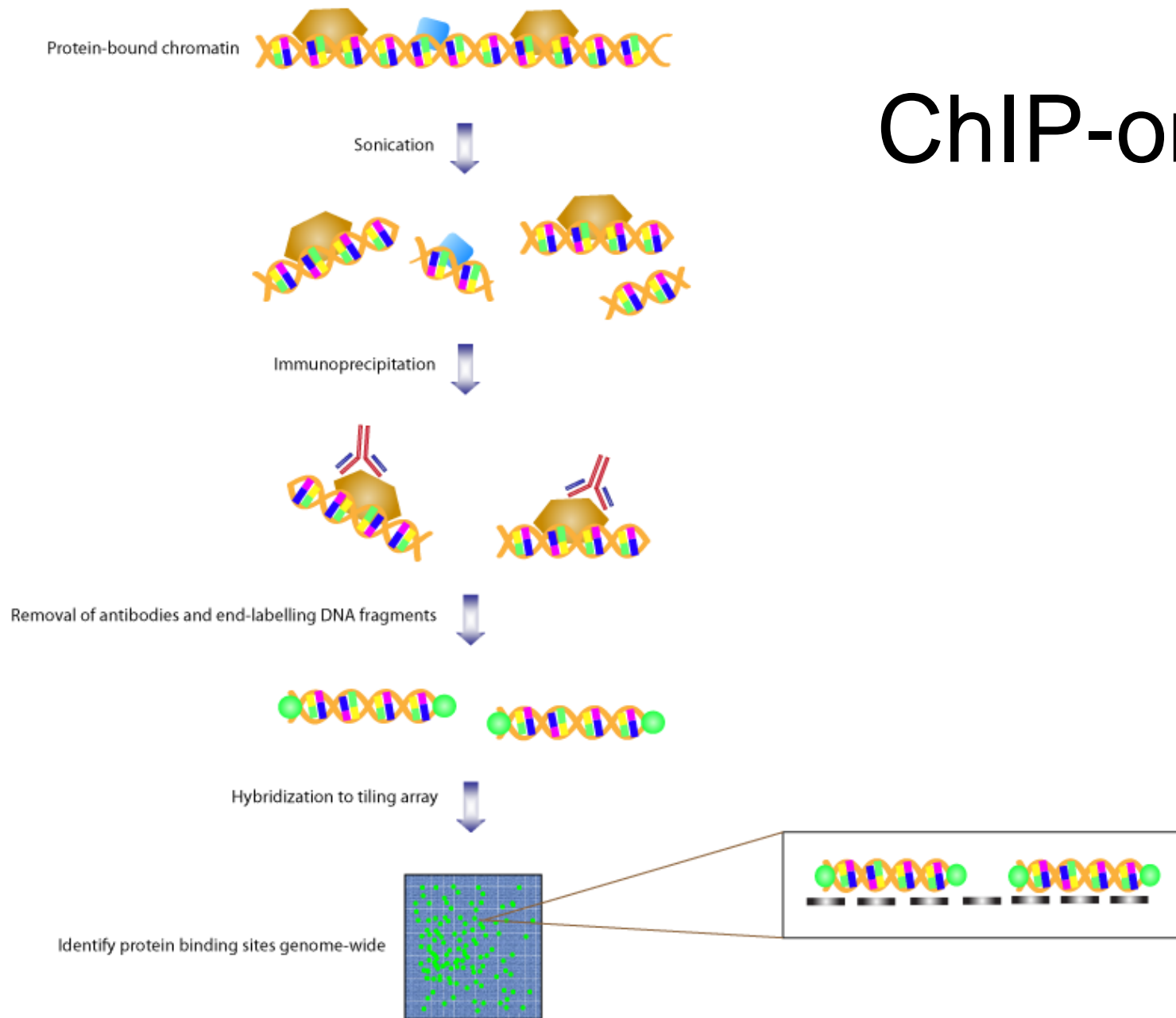
Epigenomika na čipu

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

ChIP on chip

- Chromatin immunoprecipitation on chip
- Mapování vazby proteinů na DNA
- Studium vazebných míst transkripčních faktorů,...

ChIP-on-chip

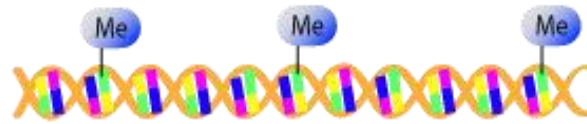


MeDIP-chip

- **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

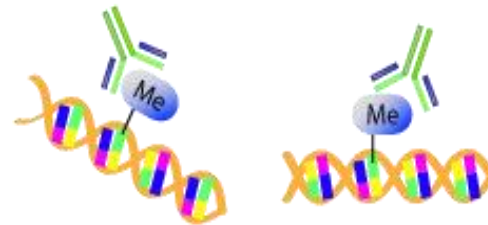
genomic DNA with
5-methyl-cytosine



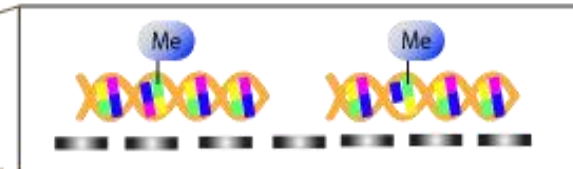
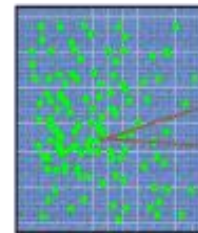
Sonication



Immunoprecipitation with
anti-5-methyl-cytosine antibody



Hybridize to tiling array



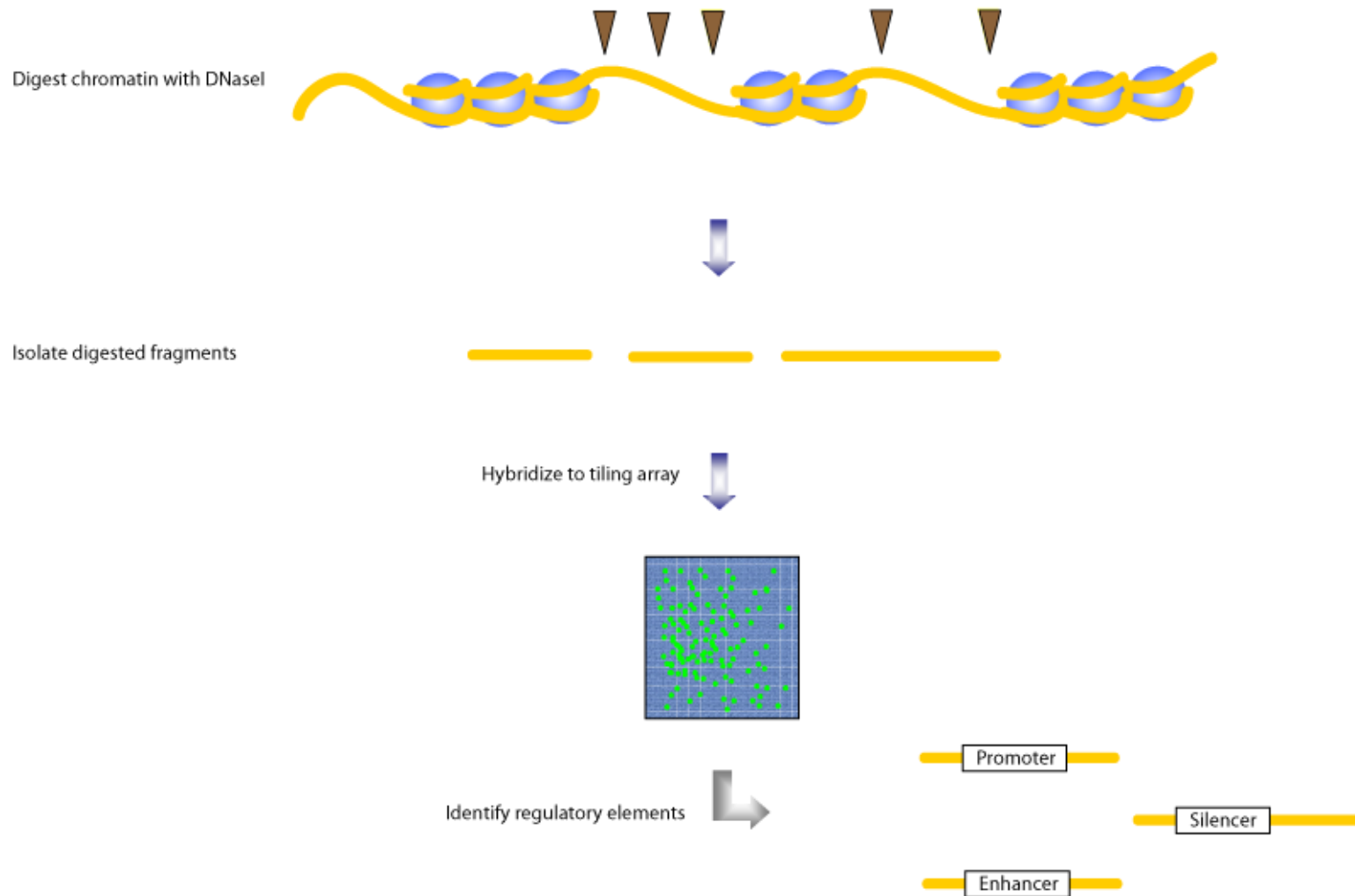
Identify methylated cytosine
across genome



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 – 31.10.2014

➤ **mikroRNA čipy** – Marek Mráz



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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