

C7188 Úvod do molekulární medicíny 3/12



**Moderní metodické přístupy
v molekulární medicíně I**



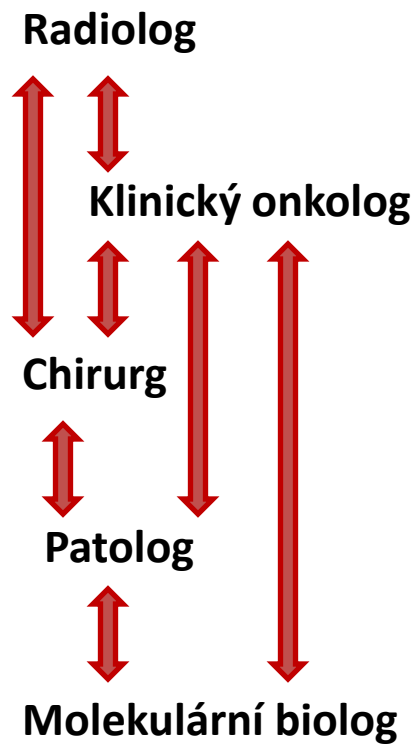
BIOLOGICKÝ MATERIÁL, GENOMIKA I



Ondřej Slabý, Ph.D.
*Masarykův onkologický ústav
Lékařská fakulta Masarykovy univerzity
CEITEC*

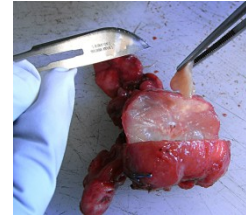


Interdisciplinární charakter biomedicínského výzkumu – příklad onkologického výzkumu



Biologický materiál užívaný pro účely molekulární medicíny

Tkáň (nativní vs. fixovaná – př. FFPE-formalin fixed paraffin-embedded tissue; chirurgický resekát, biopsie)



Plná krev (plazma + buňky)

Plazma (tekutina po odstranění krevních elementů, obsahuje faktory hemokoagulace)

Sérum (tekutina nad sraženinou, bez faktorů krevního srážení)

Moč

Kostní dřeň, bronchiální aspirát, ejakulát, bronchoalveolární laváž, kloubní tekutiny, mozkomíšní mok, sputum, stolice, výtěry...

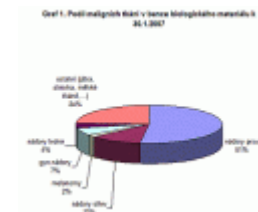


Banky biologického materiálu

archivace vzorků v parách kapalného dusíku při teplotě -160°C

K archivovanému vzorku nativní tkáň

uložen fixovaný parablok=morfologický korelát



Odběr klinického materiálu

Klíčový moment rozhodující a kvalitě celého výzkumu!!!!!!

Všechny odběry musí probíhat stejně, a celý proces musí být přísně kontrolován!



Doba transportu na patologii
Fixace vzorku



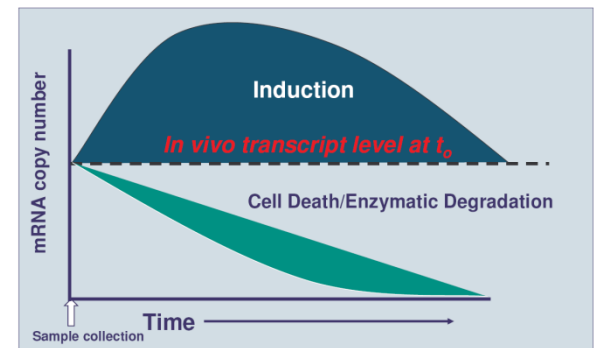
Kontrolovaná
archivace vzorku

DNA 4°C
RNA -70°C

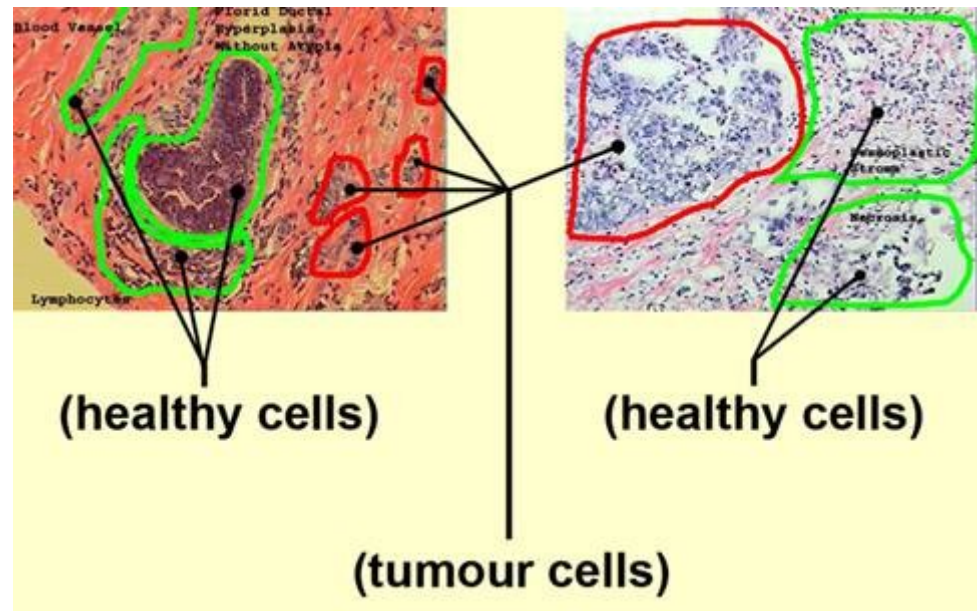
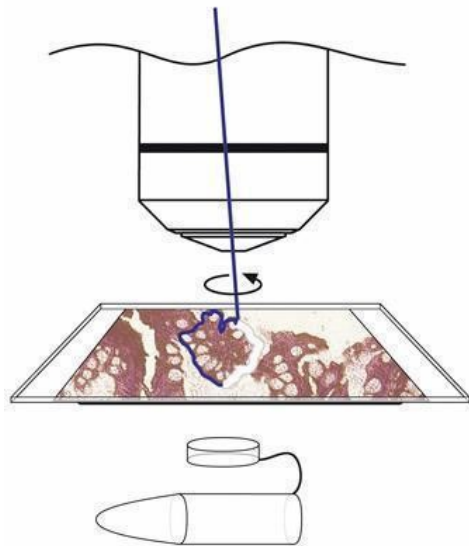


Zaznamenání času podvázání cév
Tzv. ischemické zdržení

Vysoké nároky na stabilizaci především při práci s RNA
Nejčastěji používáme stabilizační činidlo RNAlater



Laserová mikrodisekce – nástroj k získání vybraných buněčných populací *laser capture microdissection (LCM)*



Izolace nukleových kyselin

Homogenizace tkáně (ultrazvuk, mechanicka, rotor-stator)

Lyze buněk (enzymaticky-proteináza K, chemicky-SDS, EDTA, fyzikálně-zahřívání...)

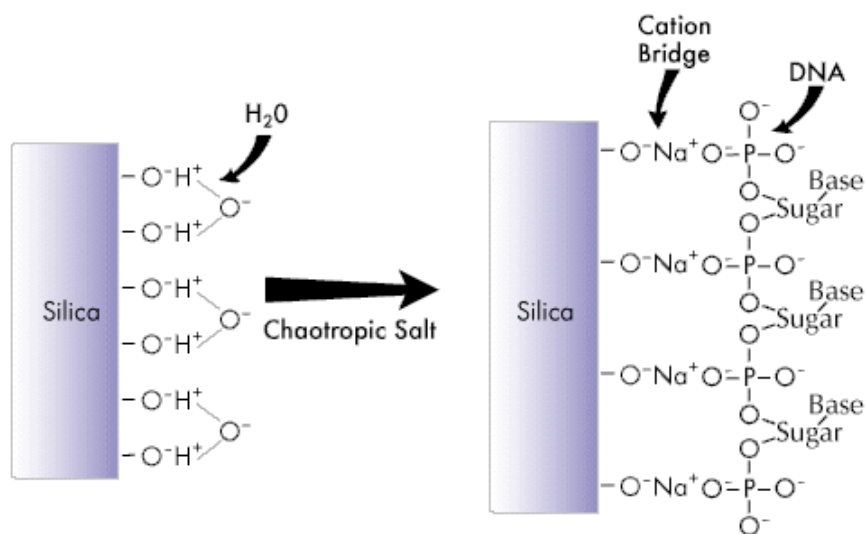
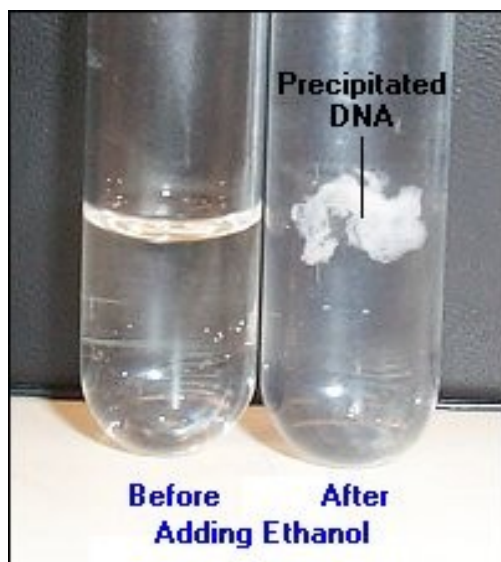
RNA méně stabilní než DNA! (homogenizace beta-ME, DTT)

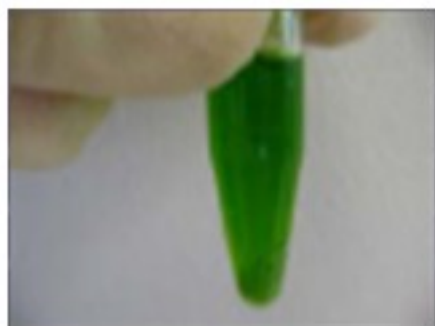
Extrakce směsí fenol-chloroform

Srážení nukleových kyselin alkoholem

Přečištění enzymy

Purifikace nukleových kyselin chromatografií (adsorpce na silikát)





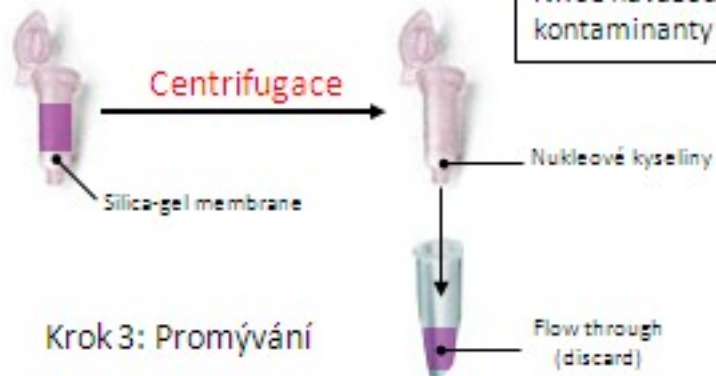
Krok 1: příprava lyzátu

Umístit na kolonku

Krok 2: navázání na silikát

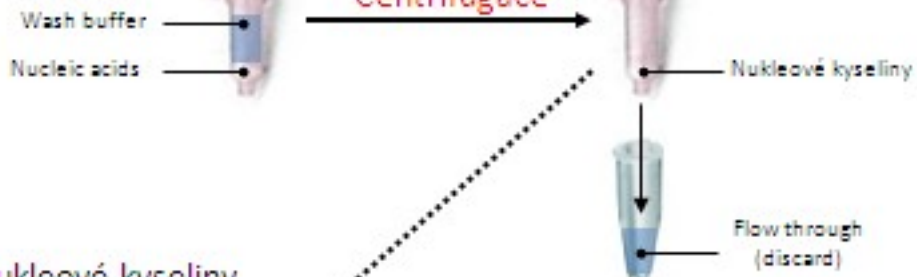
NK se návážou zatímco kontaminanty protečou

Centrifugace



Krok 3: Promývání

Centrifugace

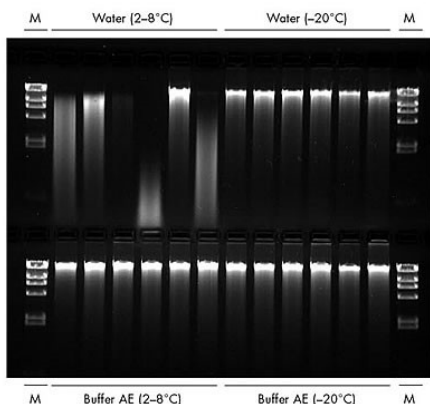


Step 4: Eluce nukleové kyseliny

Centrifugace



Eluční pufr vytváří podmínky znemožňující vazbu NK na silikát



An RNA Isolation Solution for Every Application



WEB RESOURCES:

MagMAX™ Kits
www.appliedbiosystems.com/magmax

Cells-to-Ct™ Kits
www.appliedbiosystems.com/c2ct

miRNA Solutions
mima.appliedbiosystems.com and
www.ambion.com/mirna

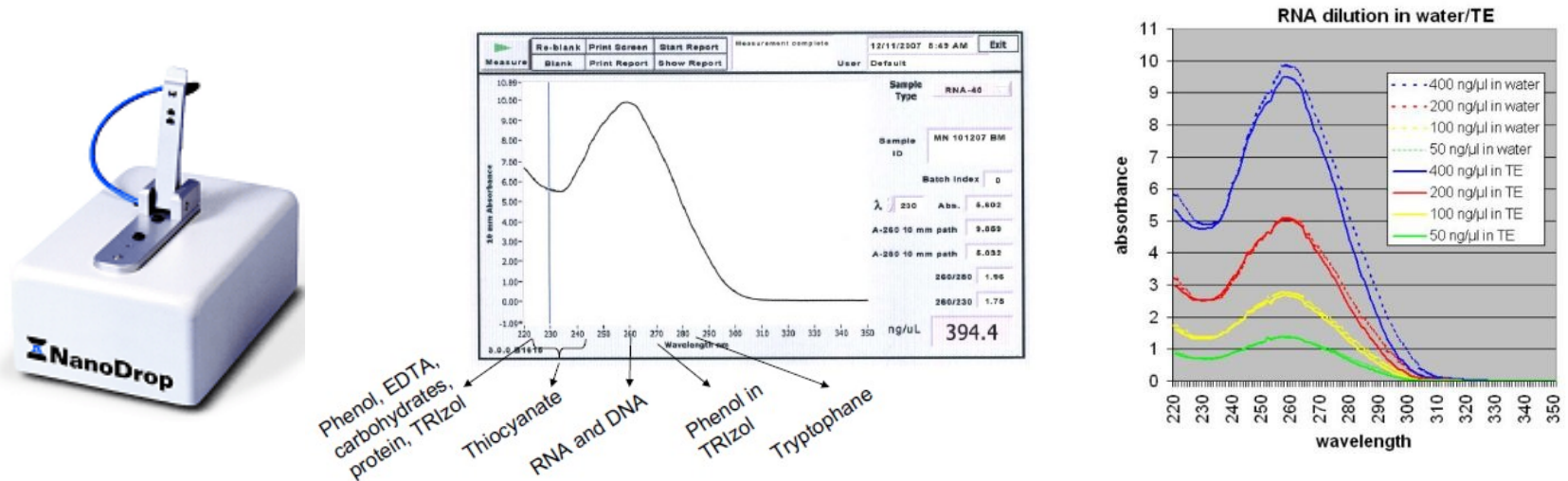
General RNA Isolation Information
www.ambion.com

Spektrofotometrická kvantifikace a čistota nukleových kyselin

Roztok dvouřetězcové DNA má při 260nm absorbanci 1 při koncentraci 50ug/ul

Roztok jednořetězcové DNA má při 260nm absorbanci 1 při koncentraci 30ug/ul

Roztok jednořetězcové RNA má při 260nm absorbanci 1 při koncentraci 40ug/ul



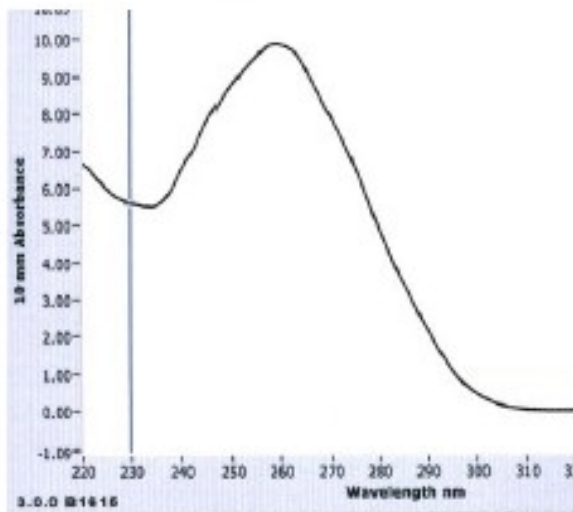
Proteiny mají díky aromatickým aminokyselinám absorpční maximum při 280 nm

Poměr A260/A280 se má u nekontaminované DNA pohybovat v rozmezí 1,8 až 2,0

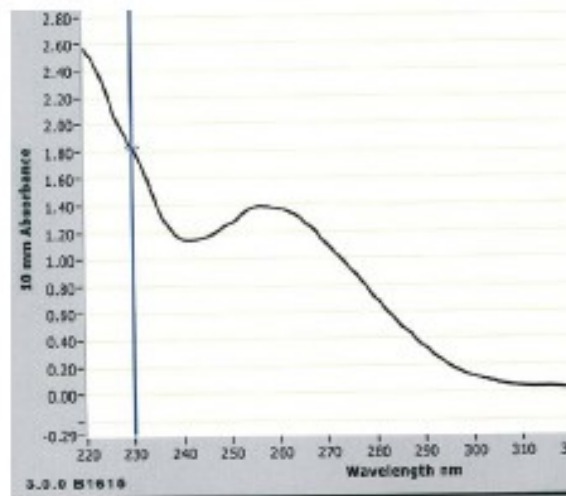
Poměr A260/A230 < 1,7 indikuje kontaminaci chaotropními solemi a fenolem

Nanodrop ND1000 – umožňuje kvantifikaci pouze v 1ul vzorku

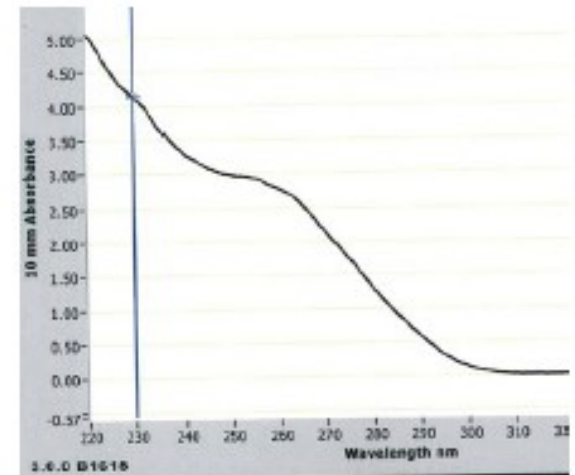
Křivky z Nanodropu



260/280: 1,96
 260/230: 1,75
 Conc: 394,4



260/280: 1,91
 260/230: 0,75
 Conc: 54,9



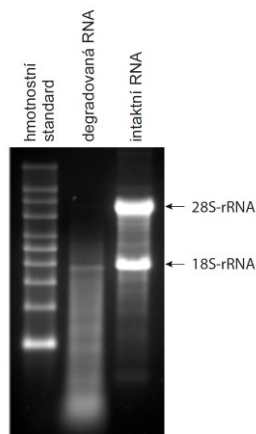
260/280: 2,09
 260/230: 0,67
 Conc: 111,4

Integrita nukleových kyselin

Agilent Bioanalyzer 2100

Lab on a chip (LOC) technology

Je miniaturizované zařízení implentující kapilární gelovou elektroforézu pro účely analýzy NK

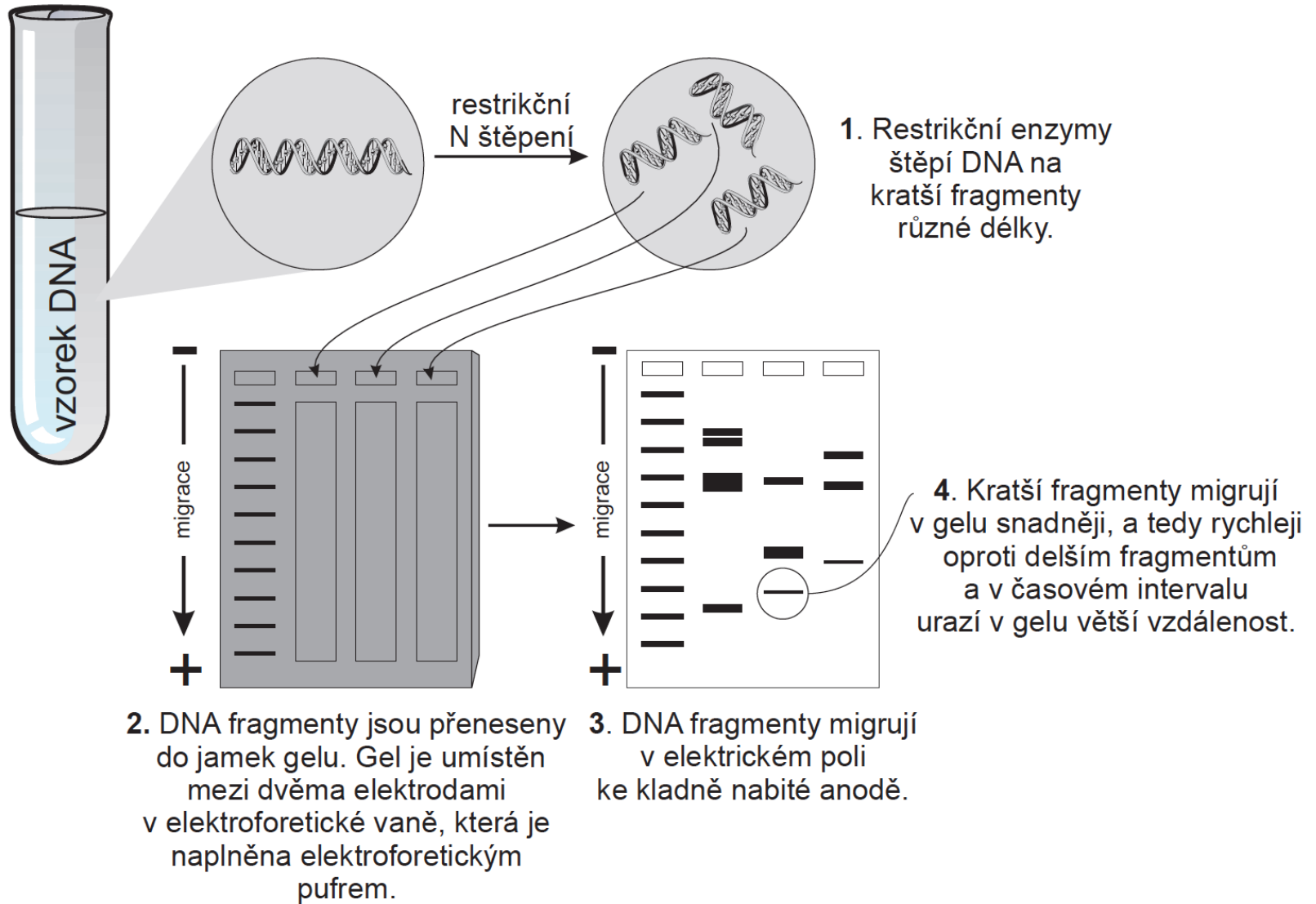


**Poměr 28S/18S ~ 2,0
pro nefragmentovanou RNA**



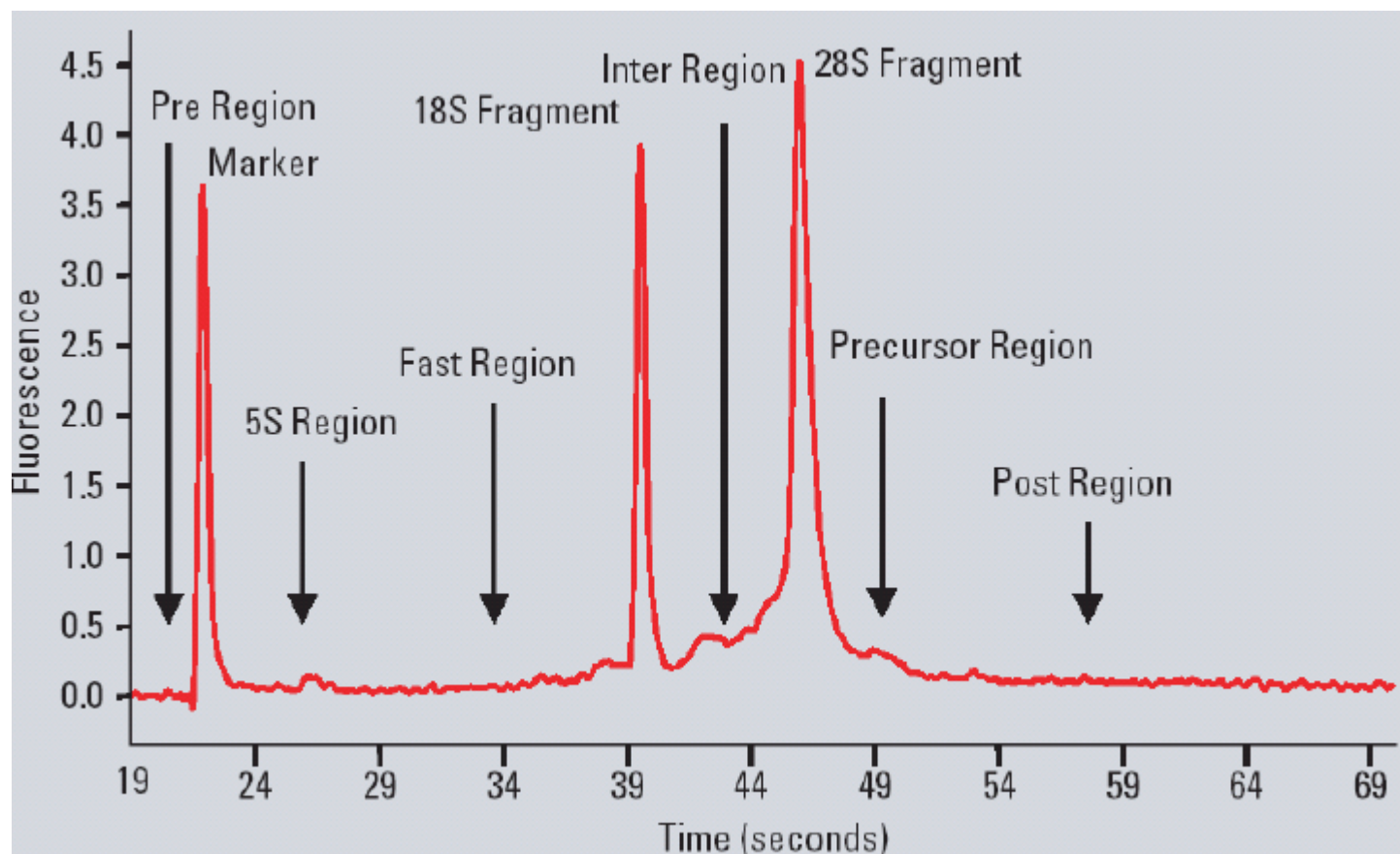
80% rRNA
10-20% tRNA
1-5% mRNA

Gelová elektroforéza nukleových kyselin

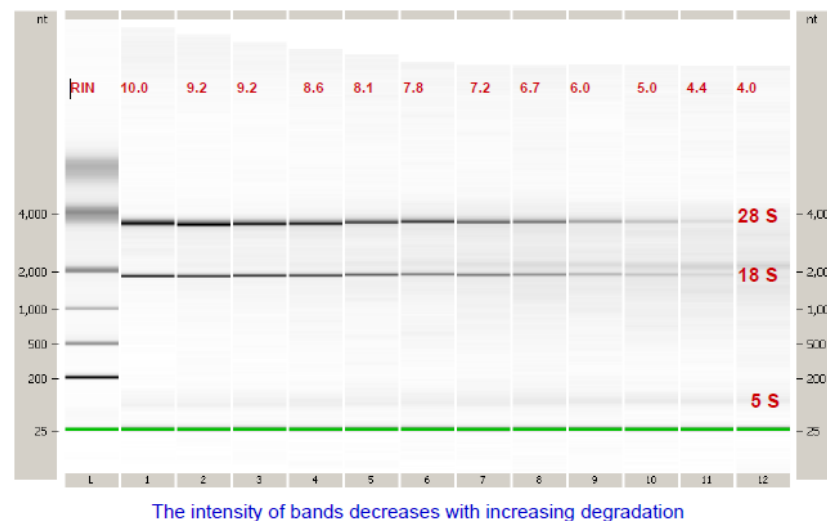
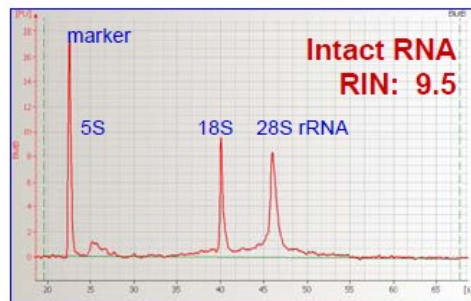
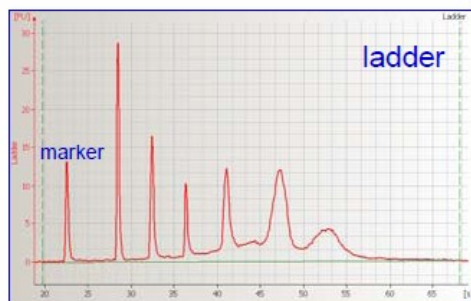


Obr. 3.6.1. Gelová elektroforéza nukleových kyselin. Ukázka elektroforézy DNA fragmentů v agarózovém gelu.

Integrita nukleových kyselin



Integrita nukleových kyselin

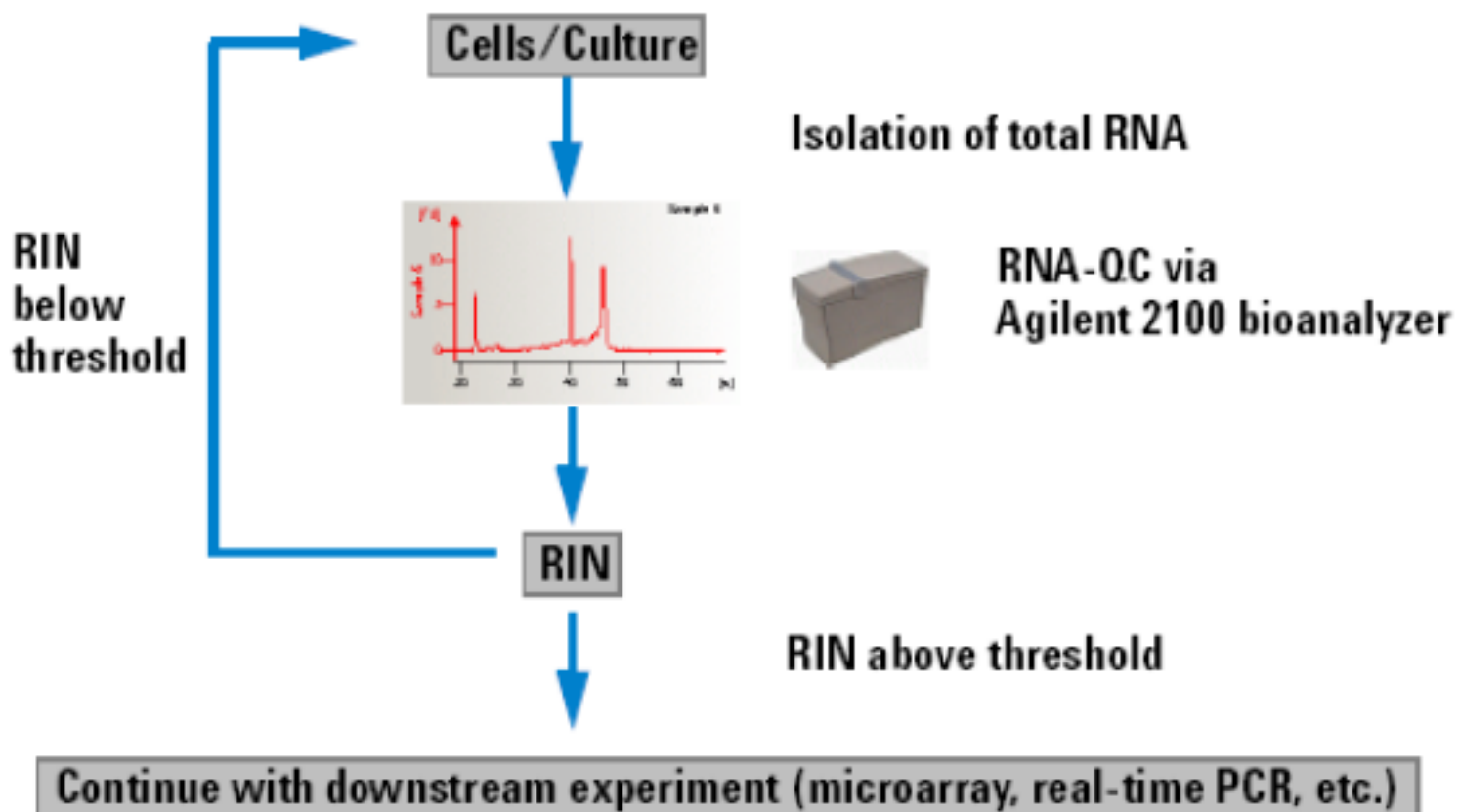


RIN = RNA Integrity Number (0 – 10)

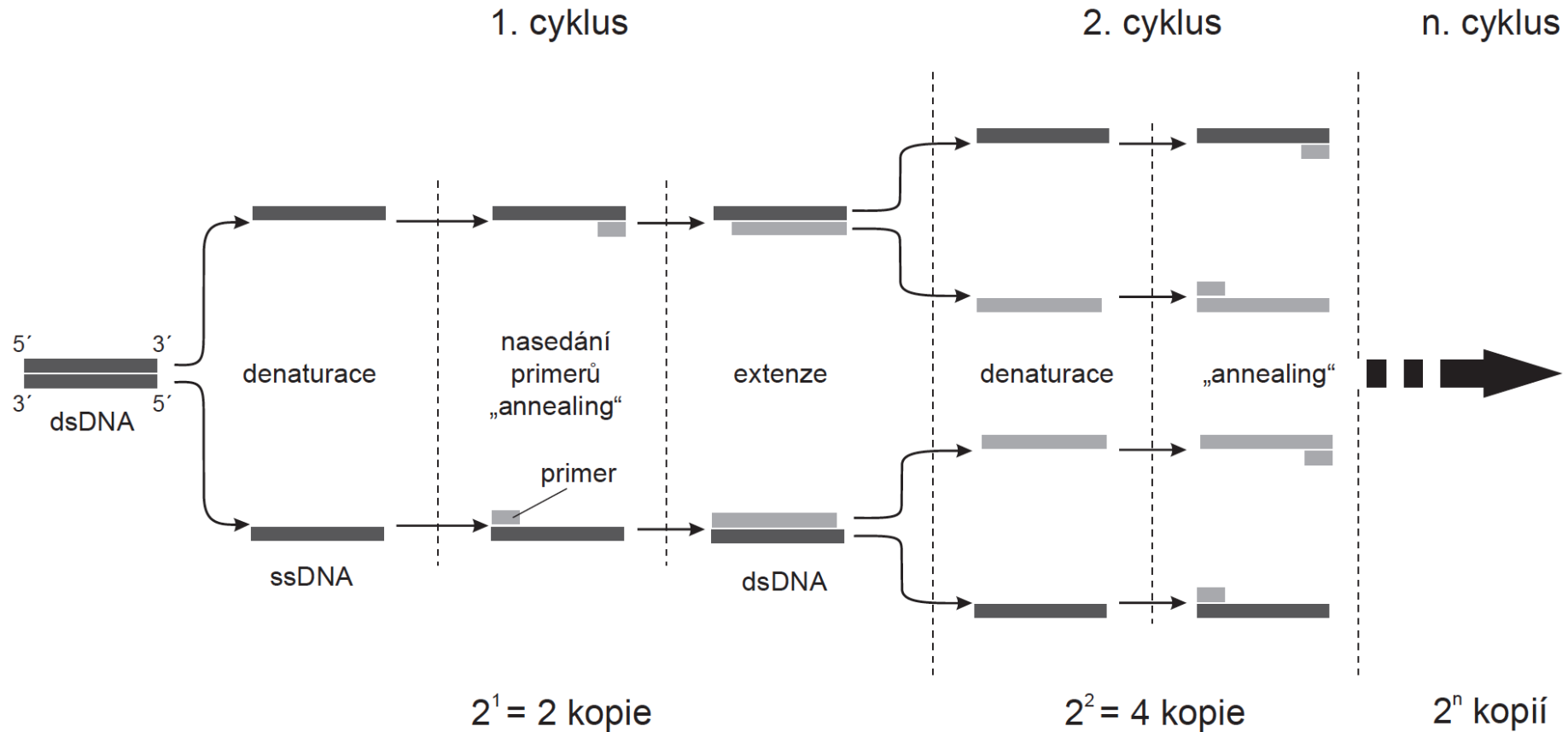
The RIN value: Schroeder *et al*, 2006

Integrita nukleových kyselin

Run standard experiment and use RIN to determine if sample integrity is sufficient:

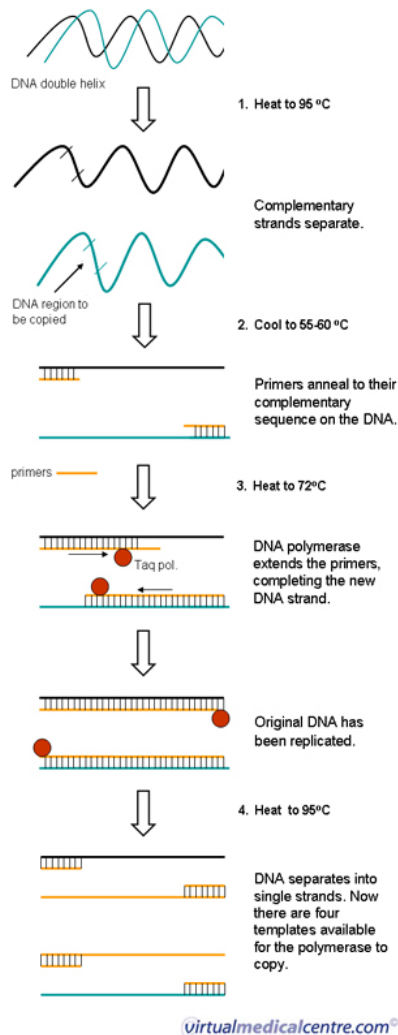


Real-Time PCR – nepoužívanější a nejstandardnější metoda studia genové exprese



Obr. 3.10.1. Princip PCR. dsDNA je v prvním kroku denaturována (denaturace), následuje vazba specifických primerů (nasedání, „annealing“) a syntéza komplementárního DNA řetězce (extenze). V dalším cyklu se všechny kroky opakují a výsledkem je 2ⁿ kopií sekvence při n cyklech PCR.

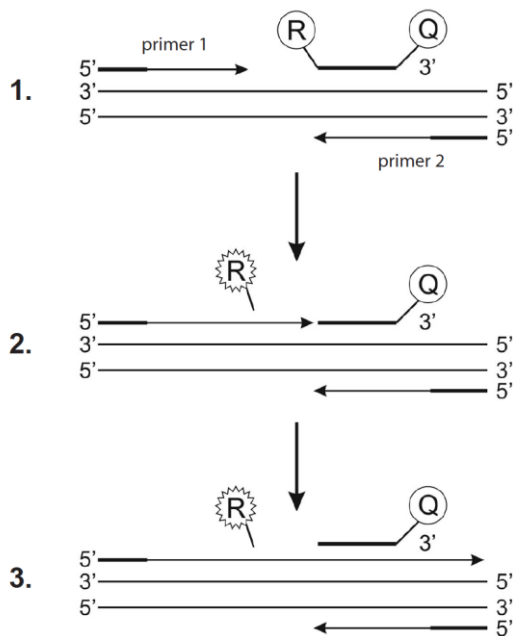
Real-Time PCR – nejpoužívanější a nejstandardnější metoda studia genové exprese



Real-time PCR je založena na sledování průběhu polymerázové řetězové reakce (PCR) přímo během reakce (tzv. „*in real time*“) pomocí fluorescenčních sond či barviv, které detekují množství PCR produktu během reakce zvýšením své fluorescenční aktivity. Její výhodou oproti konvenční PCR je možnost přesného stanovení výchozího počtu kopií cílové templátové sekvence DNA, čili schopnost kvantifikace. Real-time PCR se provádí s pomocí přístrojů zvaných **cyclery**, které umožňují jak provádění teplotního cyklování, tak detekci fluorescence v každém cyklu PCR.



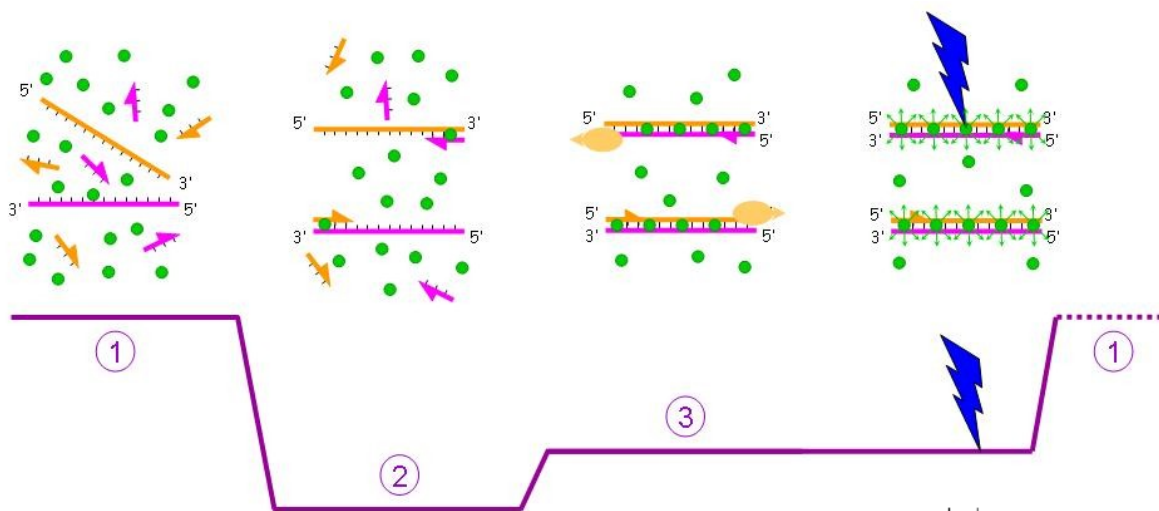
Real-Time PCR – nejpoužívanější a nejstandardnější metoda studia genové exprese



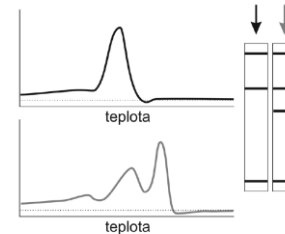
Obr. 3.10.6. Hydrolyzační sondy. 1) Sonda je na 5'-konci opatřena fluorescenční značkou a na 3'-konci tzv. zhášedčem. Dokud je sonda celistvá, nedochází k emisi fluorescence. 2) Během syntézy komplementárního vlákna DNA polymeráza odštěpí fluorofor (reportér, R). 3) Syntéza vlákna je dokončena a uvolněný reportér emituje specifickou fluorescenci.

Specifické TaqMan sondy

Nejčastější způsoby detekce amplifikačního produktu

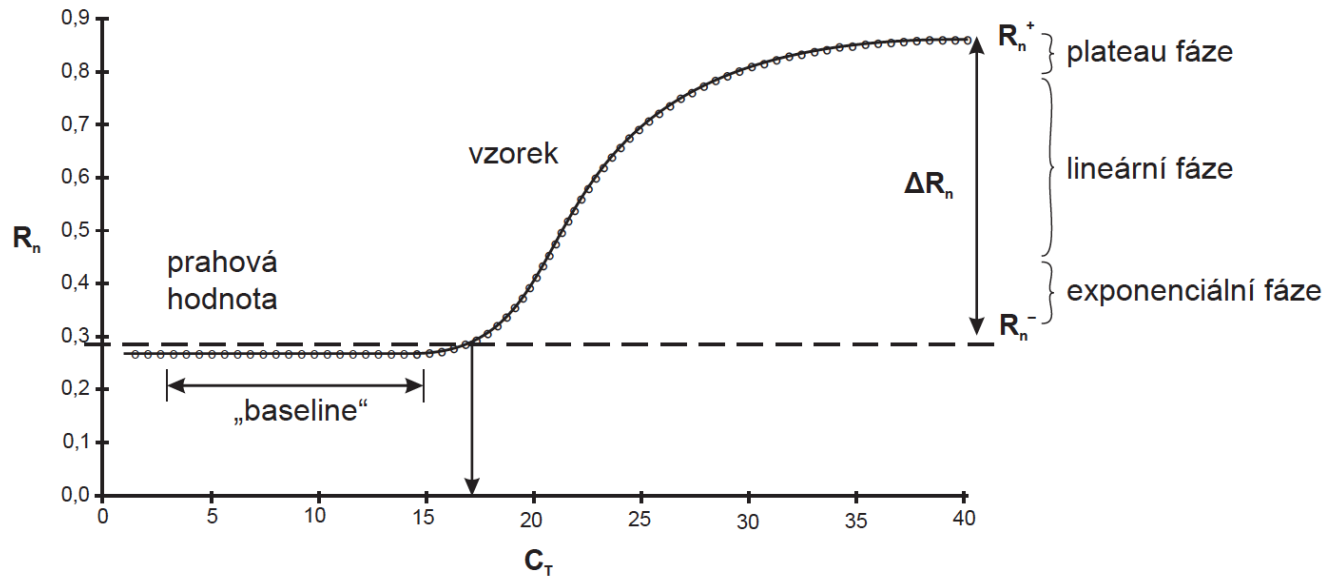


Interkalační barvivo SYBR green



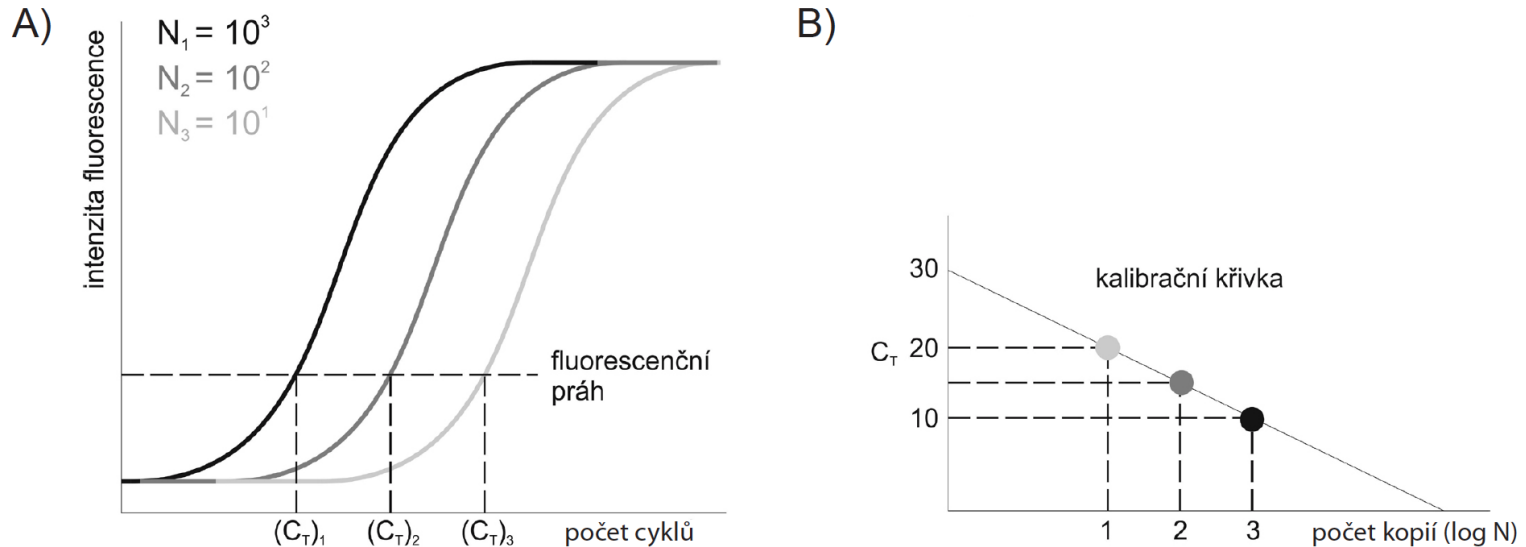
Denaturační křivka kontrola specificity reakce

Real-Time PCR – nejpoužívanější a nejstandardnější metoda studia genové exprese



- 1) **Baseline** - fluorescenční signál je pod detekovatelným limitem detektoru
- 2) **fluorescence exponenciálně narůstá** společně s produktem amplifikace. Ovšem společně s pokračující amplifikací se snižuje i poměr polymeráza : PCR produkty.
- 3) **plateau fáze** - koncentrace vytvořených amplikonů dosáhne koncentrace 10^{-8} M, zastaví se exponenciální růst, od koncentrace 10^{-7} M už R_n dále nenarůstá.

Real-Time PCR – nejpoužívanější a nejstandardnější metoda studia genové exprese



Obr. 3.10.3. Absolutní kvantifikace. **A)** Ukázka amplifikačních křivek, na základě kterých byla sestrojena kalibrační přímka. **B)** Kalibrační přímku lze definovat v tzv. směrnicovém tvaru: $y = mx + b$, kde „ m “ je směrnice přímky a „ b “ je tzv. úsek vytknutý přímkou na ose y . Při absolutní kvantifikaci se také často udává tzv. koeficient korelace R , jehož hodnota by měla být $R > 0,99$.

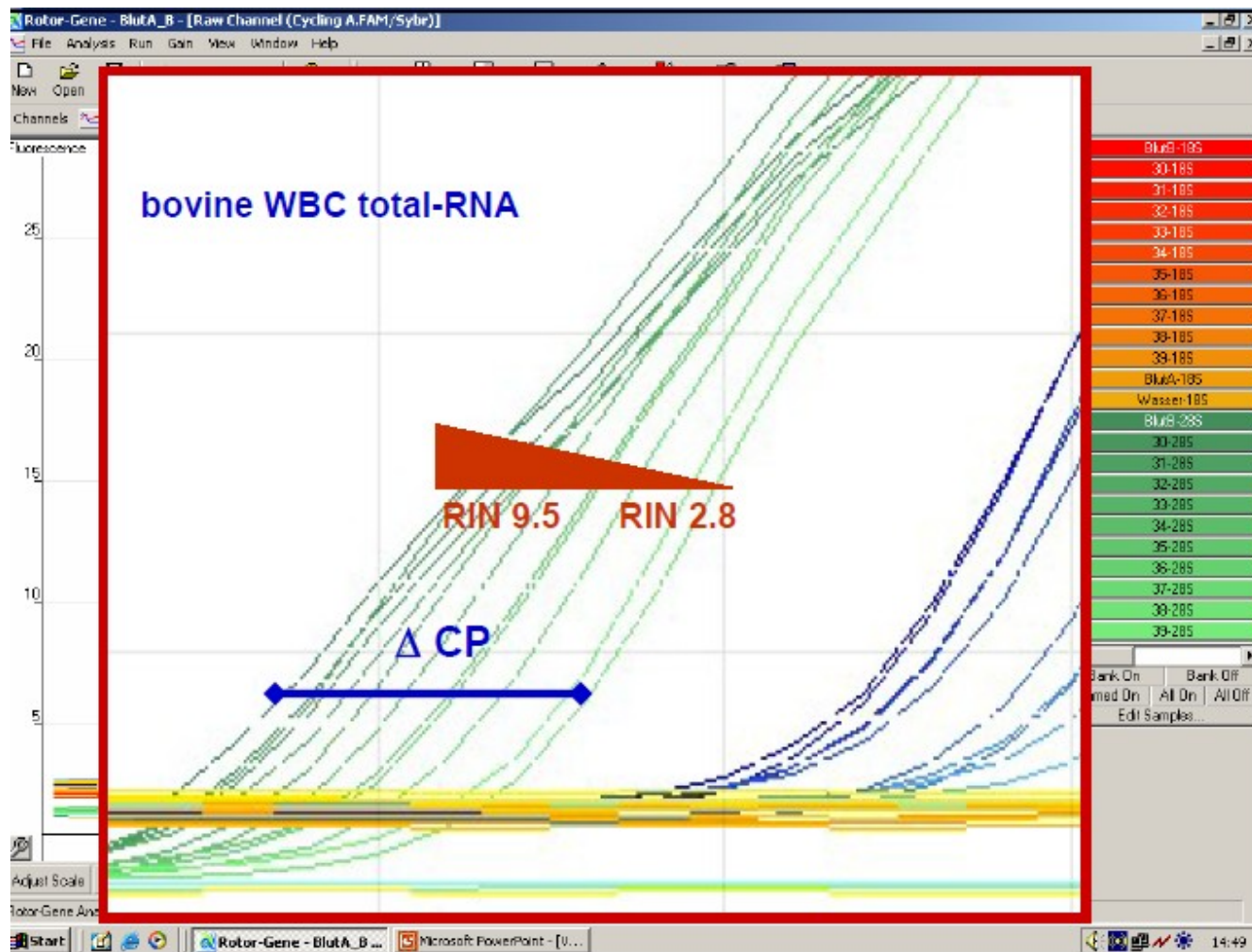
Threshold (prahový) cyklus C_T –

cyklus, při kterém R_n signály začnou odpovídat exponenciálnímu růstu množství amplifikačního produktu
Pro určení C_T vyhodnocovací software vypočítá průměrnou odchylku R_n v několika prvních cyklech a na základě této odchylky rozpozná následnou změnu vedoucí od baseline (kterou obvykle představuje asi prvních 15 cyklů) k exponenciálnímu průběhu

(threshold změna R_n je definovaná jako desetinásobek průměrné odchylky v baseline fázi PCR)

C_T je závislé na koncentraci DNA templátu, účinnosti amplifikace a funkčnosti fluoroforového systému.

Vztah integrity RNA a Ct prahového cyklu při měření stejného transkriptu v analogickém vzorku



Real-Time PCR – nejpoužívanější a nejstandardnější metoda studia genové exprese

Normalizace pomocí endogenní kontroly – relativní kvantifikace metoda $\Delta \Delta Ct$

Reference – obvykle nějaké housekeepingové geny

jsou aktivní ve všech buňkách zajišťují základní funkce buněčného metabolismu: syntéza nukleových kyselin a proteosyntéza, transport živin a jejich zpracování, biosyntéza cytoskeletu a organel (GAPDH, HPRT1, ACTB, B2M,....)

$\Delta Ct_1 = Ct(\text{gen}) - \Delta Ct(\text{reference})$ – v kalibračním vzorku (např. nenádorový střevní epitel)

$\Delta Ct_2 = Ct(\text{gen}) - \Delta Ct(\text{reference})$ – v analyzovaném vzorku (např. kolorektální karcinom)

$$\Delta \Delta Ct = \Delta Ct_2 - \Delta Ct_1$$

$$2^{-\Delta \Delta Ct} = [\text{gen ve vzorku}] / [\text{gen v kalibrátoru}]$$

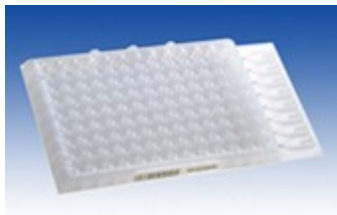
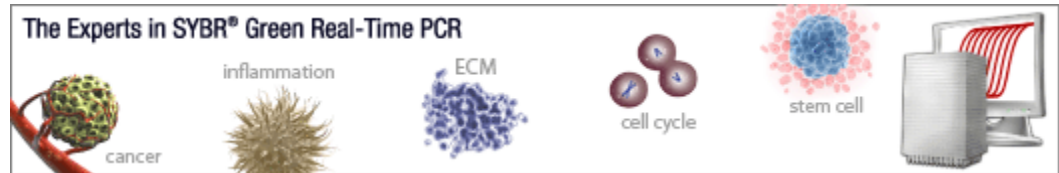
(př. 3 znamená, že normalizovaná hladina stanovovaného genu je 3x vyšší v kolorektálním karcinomu než v nenádorovém epitelu)

$$2^{-\Delta Ct_1} = [\text{gene}] / [\text{reference}]$$

Rozdíly v množství celkové RNA ve vzorcích a asi 20% chyba reverzní transkripce

Real-Time PCR arrays

obvykle cílené na geny konkrétní signální dráhy nebo biologického procesu



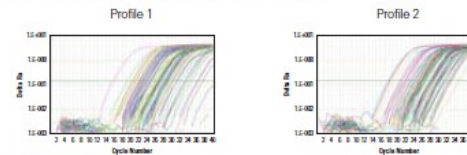
1. Convert Total RNA to cDNA.



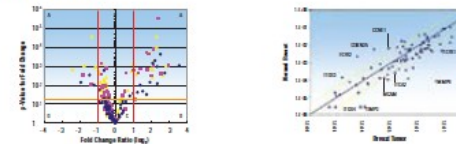
2. Add cDNA to RT² qPCR Master Mix & Aliquot Mixture Across PCR Array.



3. Run in Your Real-Time PCR Instrument.



4. Data Analysis.



www.appliedbiosystems.com

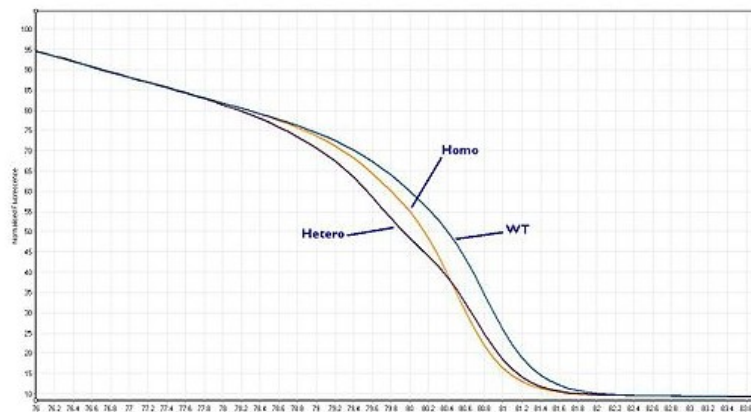
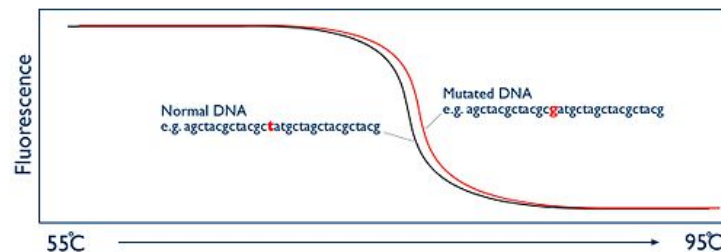
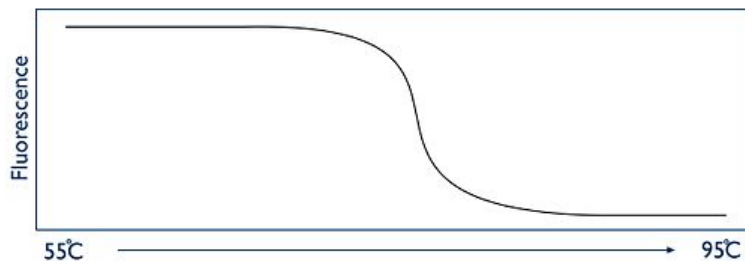
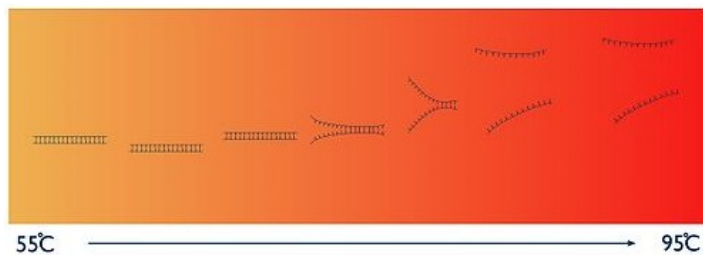
www.sabiosciences.com

High resolution melting (HRM) – analýza tání s vysokým rozlišením

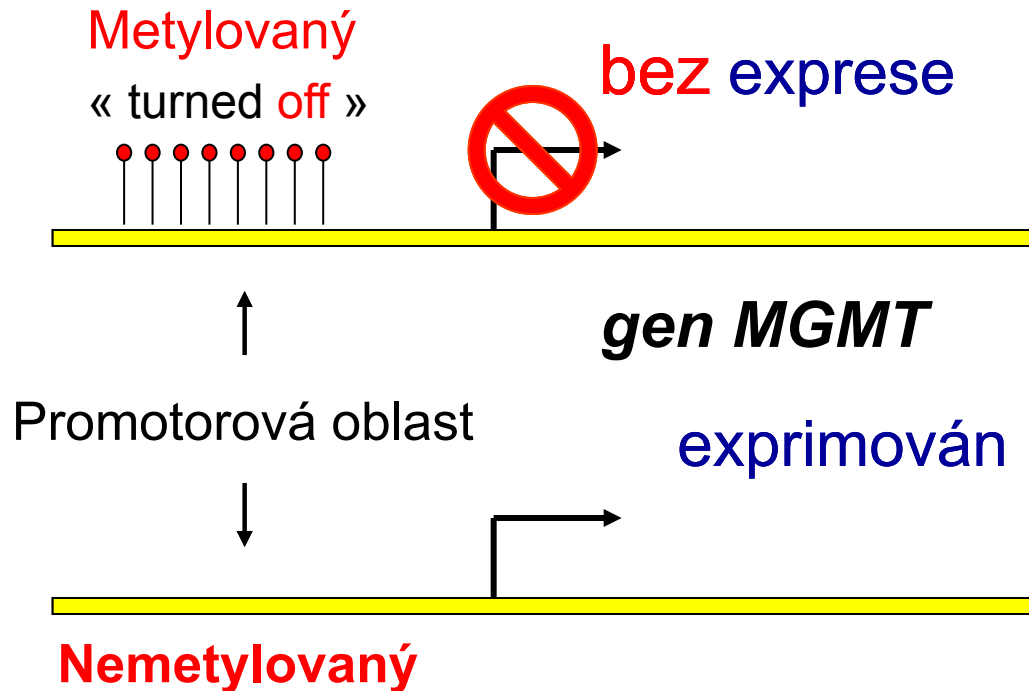
SNP Class	Base Change	Typical T_m Curve Shift	Occurrence in the Human Genome
1	C/T & G/A	Large (>0.5, avg. of 1.0°C)	64%
2	C/A & G/T	Large (>0.5, avg. of 1.0°C)	20%
3	C/G	Small (0.2–0.5°C)	9%
4	A/T	Very small (<0.2°C)	7%

Table 1. Human Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) Occurrence and T_m .

HRM *can* detect all SNP classes

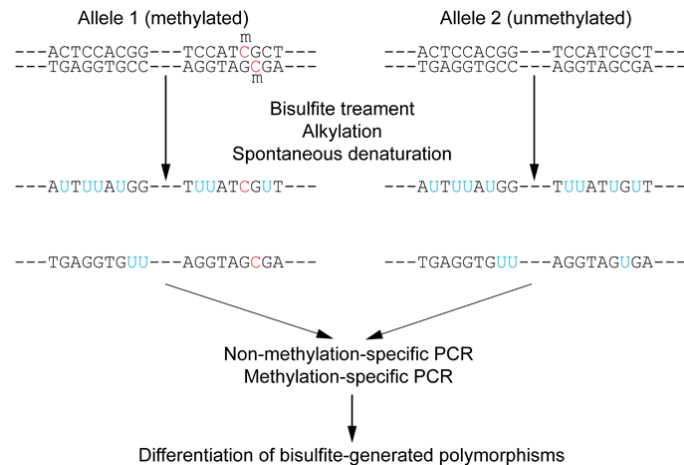


O⁶-metylguanin-DNA metyltransferáza (MGMT) v predikci odpovědi na léčbu temozolomidem (TMZ)

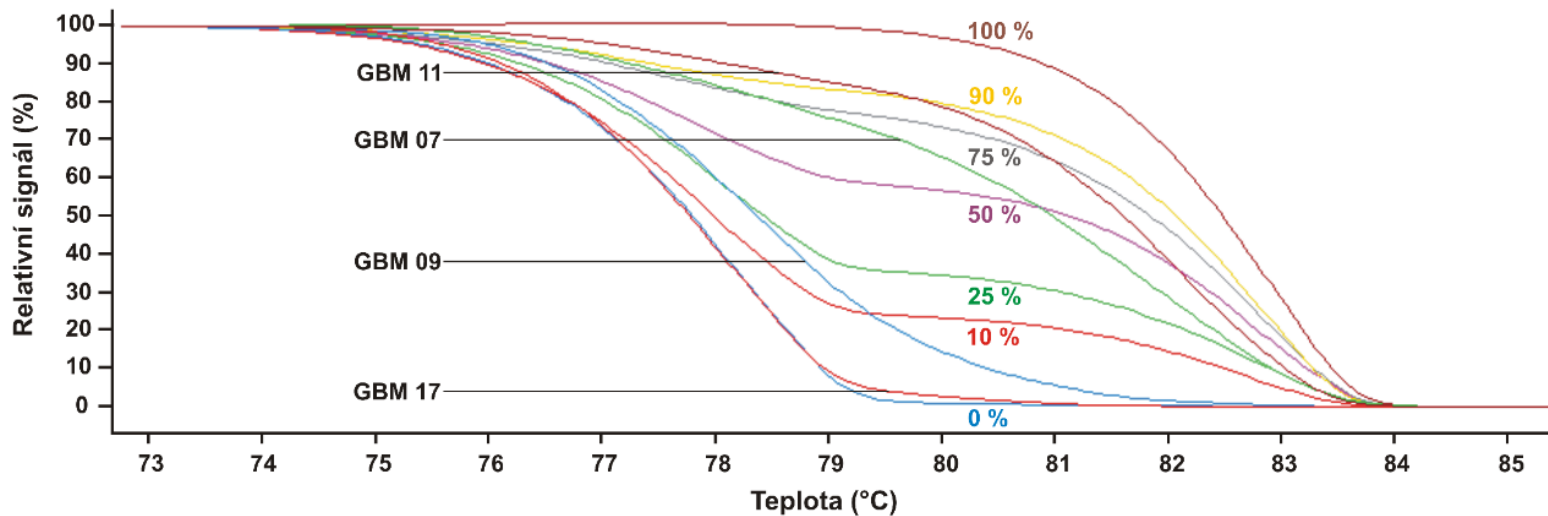


GBM s metylovaným promotorem MGMT

- **Není** reparační protein DNA - MGMT
- **Nejsou** opravována poškození DNA indukovaná účinkem temozolomidu
- Lepší odpověď na léčbu
- Lepší přežití pacientů s glioblastomem



Obr. 1: Normalizované křivky tání promotoru pro MGMT

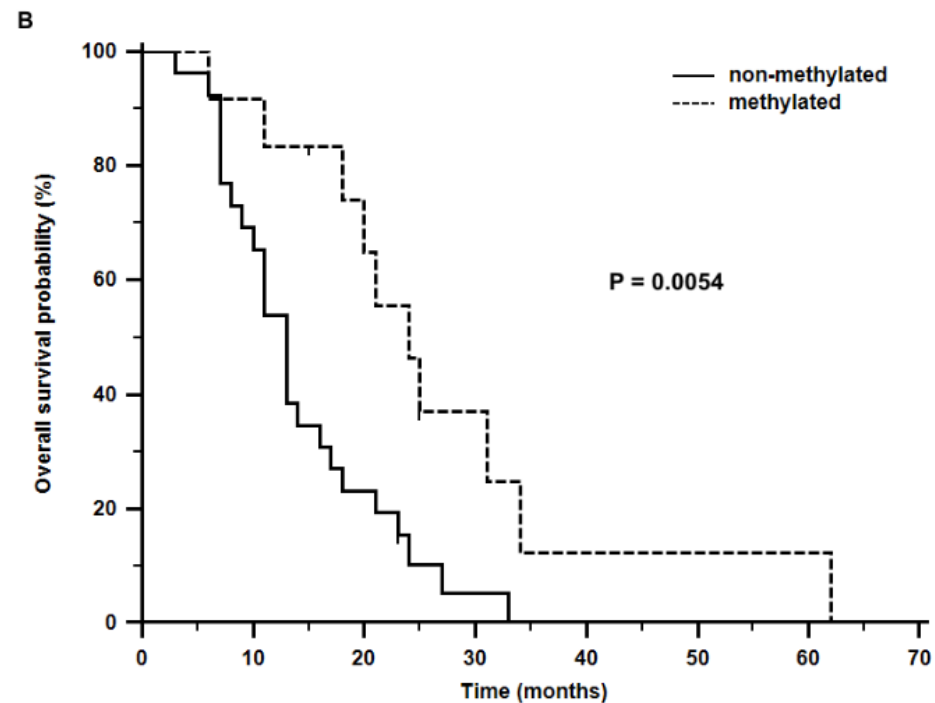
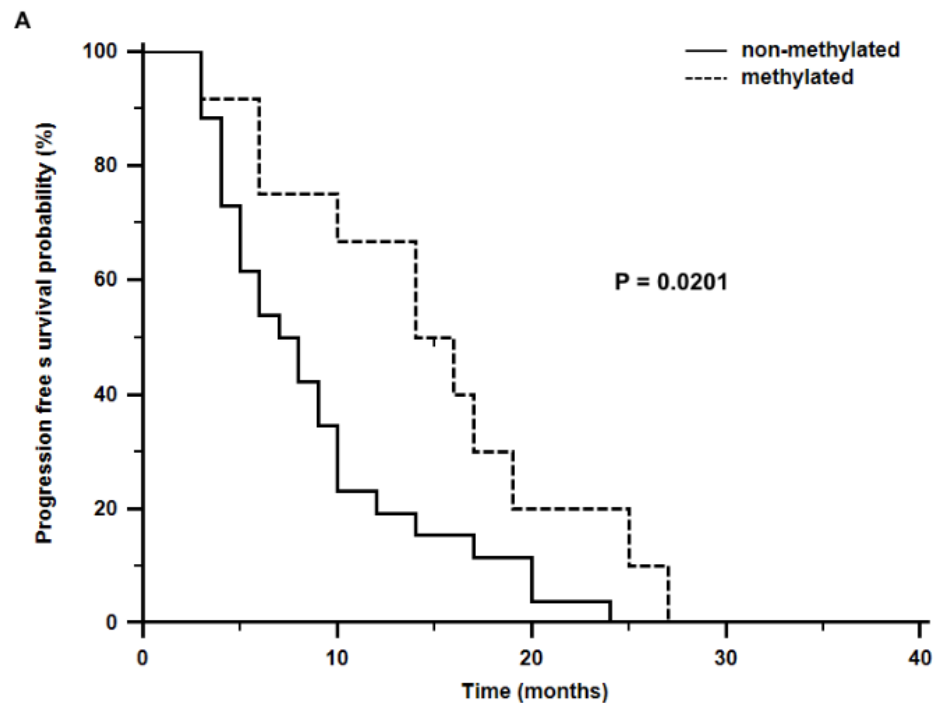


Kalibrační vzorky s 0 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 90 %, 100 % metylovanou DNA
 Glioblastomové vzorky GBM 07, GBM 09, GBM 11, GBM 17

Prediktivní význam metylace MGMT u pacientů s multifórním glioblastomem – odpověď na nové alkylační agens temozolomid

Stav metylace promotoru genu pro reparační protein MGMT stanovený metodou HRM

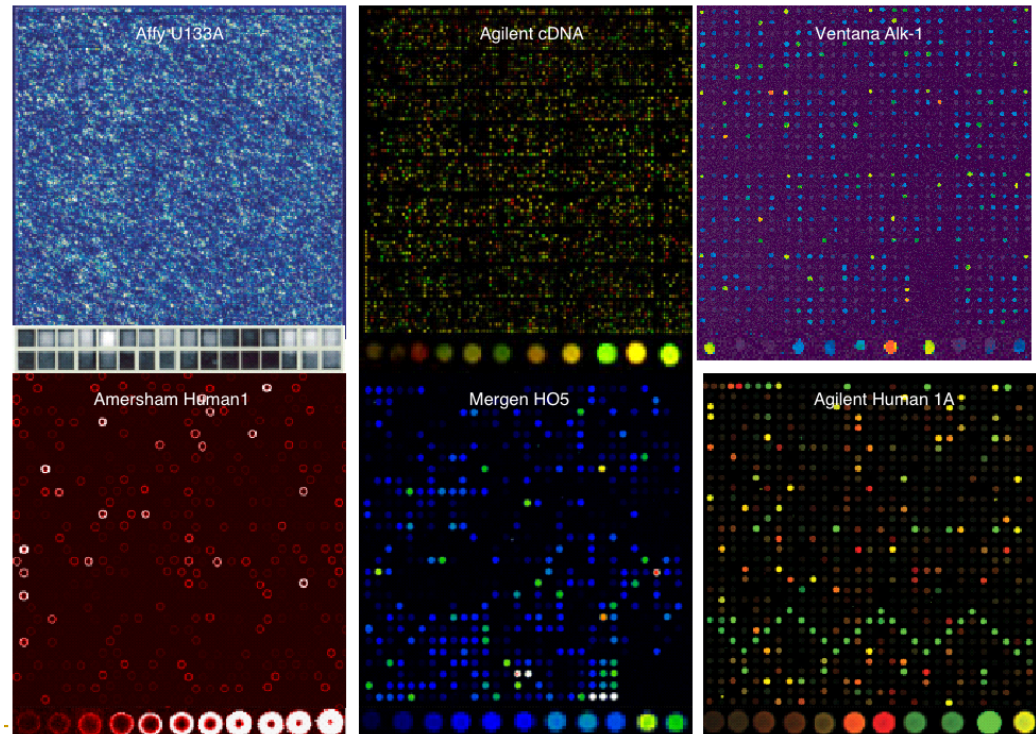
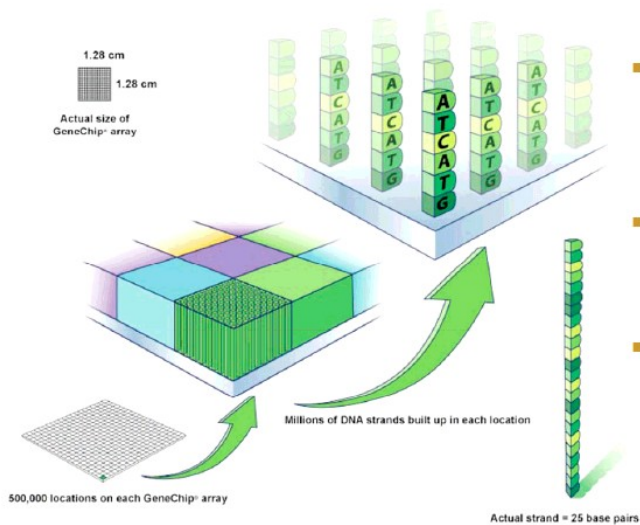
Nemetylovaný promotor, Vyšší hladiny MGMT, Vyšší DNA reparační kapacita (- prognostický faktor)
Metylovaný promotor, Nižší hladiny MGMT (+ prognostický faktor)



Slaby et al., Cancer Science, 2011

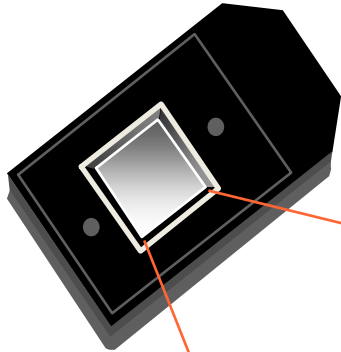
DNA microarrays (čipy) – definice a ukázky

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



DNA čip (Affymetrix GeneChip U133A)

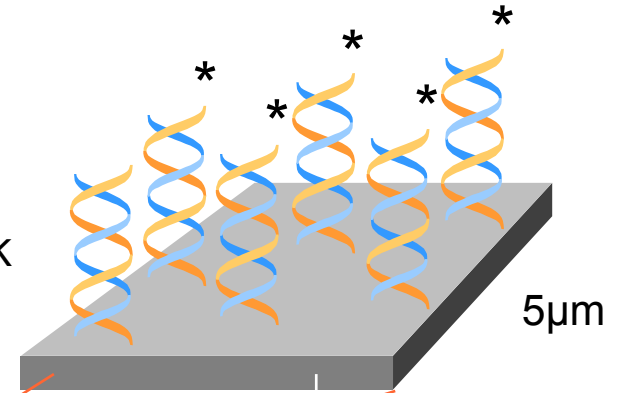
GeneChip U133A - DNA čip



1.28cm

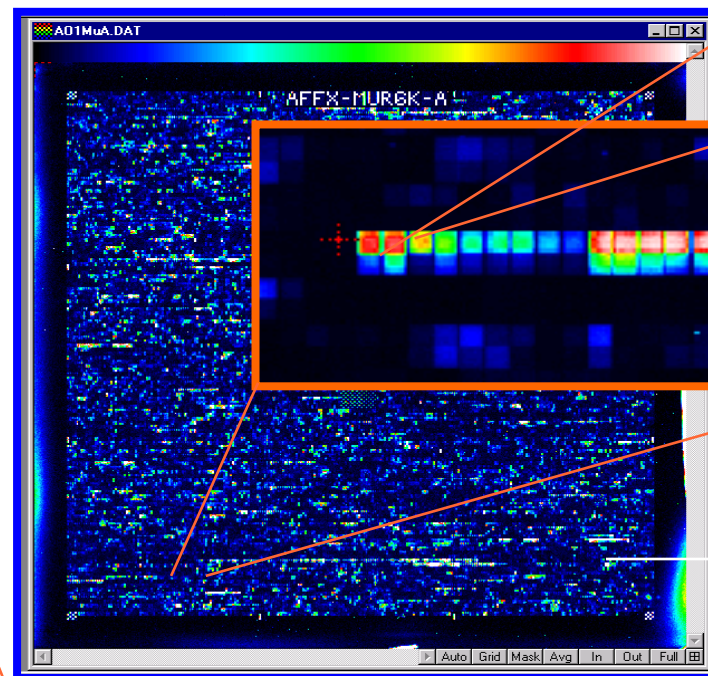


Testovaná NK
Sonda = fragment NK



Milióny kopií jedné sondy

Hybridizační jednotka



Přes 6 500 000
hybridizačních jednotek

U133 set (A+B)
-33 000 lidských
genů
-1 000 000 hybridizačních jednotek

Základní dělení DNA čipů

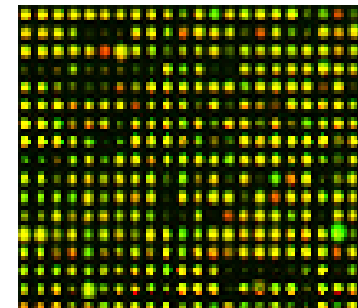
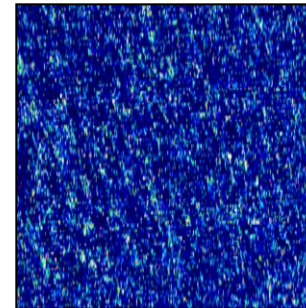
Dle charakteru detekce

- 1) pasivní – pracovní podmínky pro všechny hybridizační jednotky jsou stejné – Affymetrix, Agilent
- 1) aktivní – pracovní podmínky každé hybridizační jednotky lze ovlivňovat individuálně – Nanogen



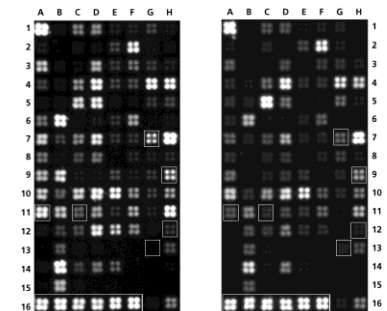
Dle typu sond

- 1) cDNA čipy – historicky Agilent
- 2) oligonukleotidové čipy – Affymetrix (25mers), Agilent (60mers)

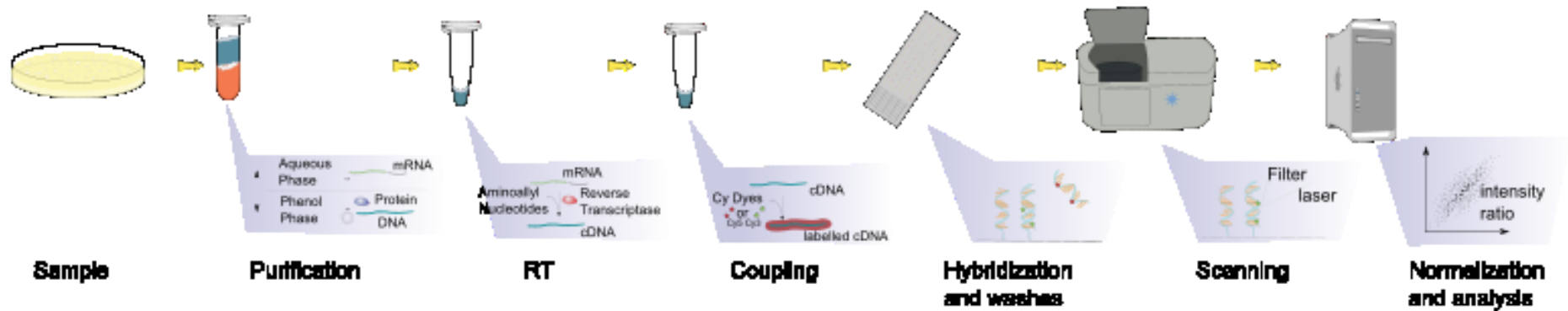


Dle počtu sond

- 1) vysokohustotní DNA čipy (celogenomové) – Affymetrix, Agilent, ...
- 2) nízkohustotní DNA čipy (stovky genů) – Eppendorf, Superarray, ...

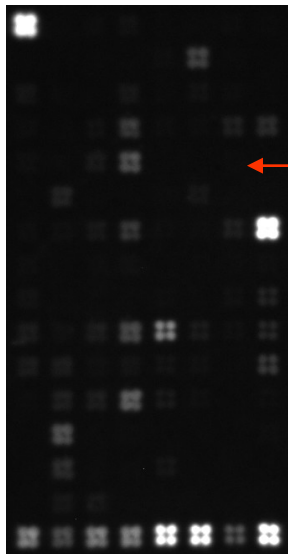


Experiment s DNA čipem

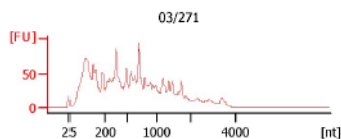
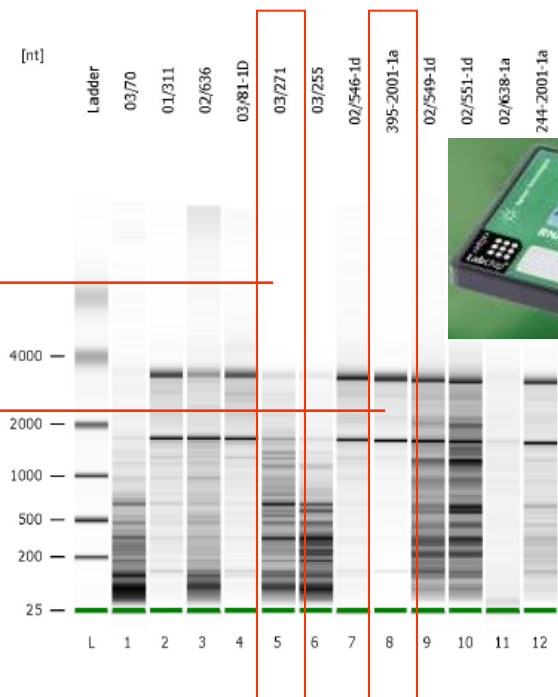
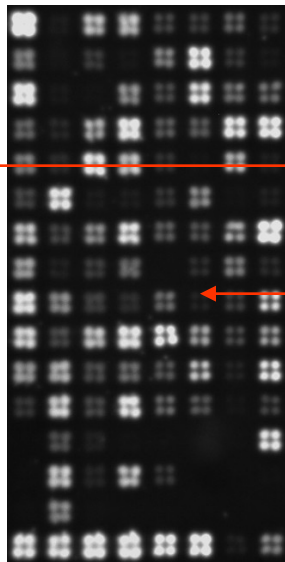


Izolace RNA a vliv její integrity na analýzu expresních profilů

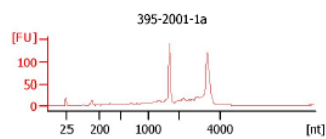
Vzorek č. 03/271
RIN = 2,8



Vzorek č. 395-2001-1a
RIN = 8,4



$c = 0,4412 \text{ ug/ul}$
 $A260/A280 = 1,93$
 $A260/A230 = 1,79$



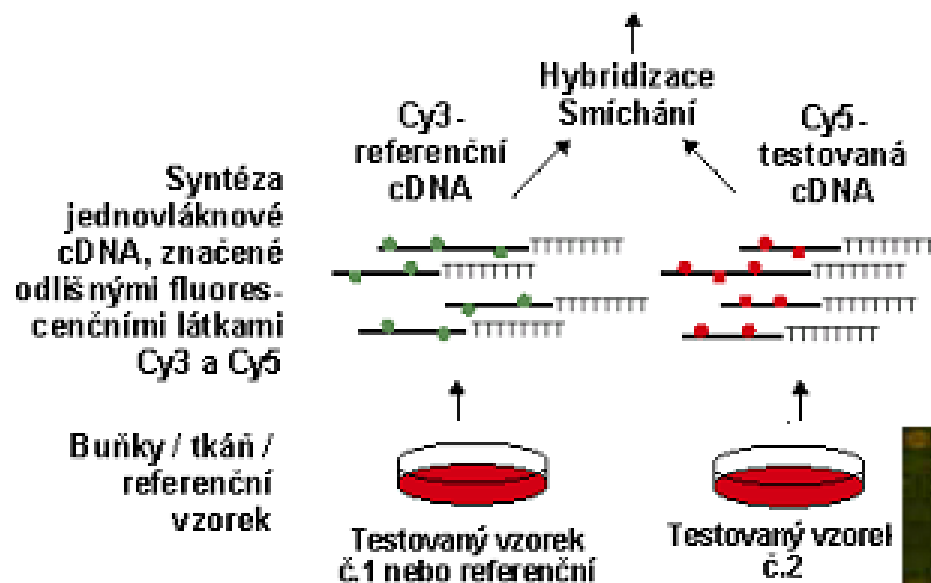
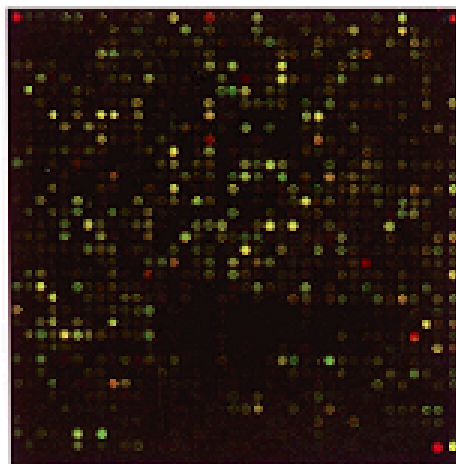
$c = 0,2412 \text{ ug/ul}$
 $A260/A280 = 2,03$
 $A260/A230 = 1,82$

**Jako minimální RIN vzorku
byla stanovena hodnota 7.**

RIN = RNA Integrity Number (0 – 10)

Dvoubarevný čipový experiment (cDNA, Agilent)

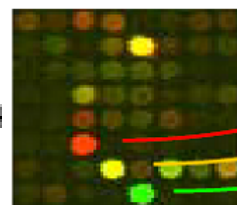
Excitace hybridizačních jednotek dvěma laserovými paprsky. Intenzita záření emitovaného odlišnými fluorochromy odpovídá obsahu testované (Cy5) a referenční (Cy3) cDNA na příslušné jednotce. Poměr Cy5/Cy3 je vyjádřen v pseudobarevném zobrazení



U cDNA čipů hybridizujeme na jednom čipu značenou ss-cDNA získanou z testovaného a referenčního vzorku.

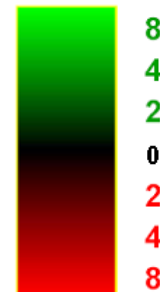
Proto je nutno každou ss-cDNA označit rozdílným fluorochromem. Standardně: referenční ss-cDNA je Cy-3 – zeleně a testovaná ss-cDNA Cy5 – červeně

Po hybridizaci následuje vymytí přebytečného materiálu a čtení (skenování) čipu pomocí fluorescenčního skeneru



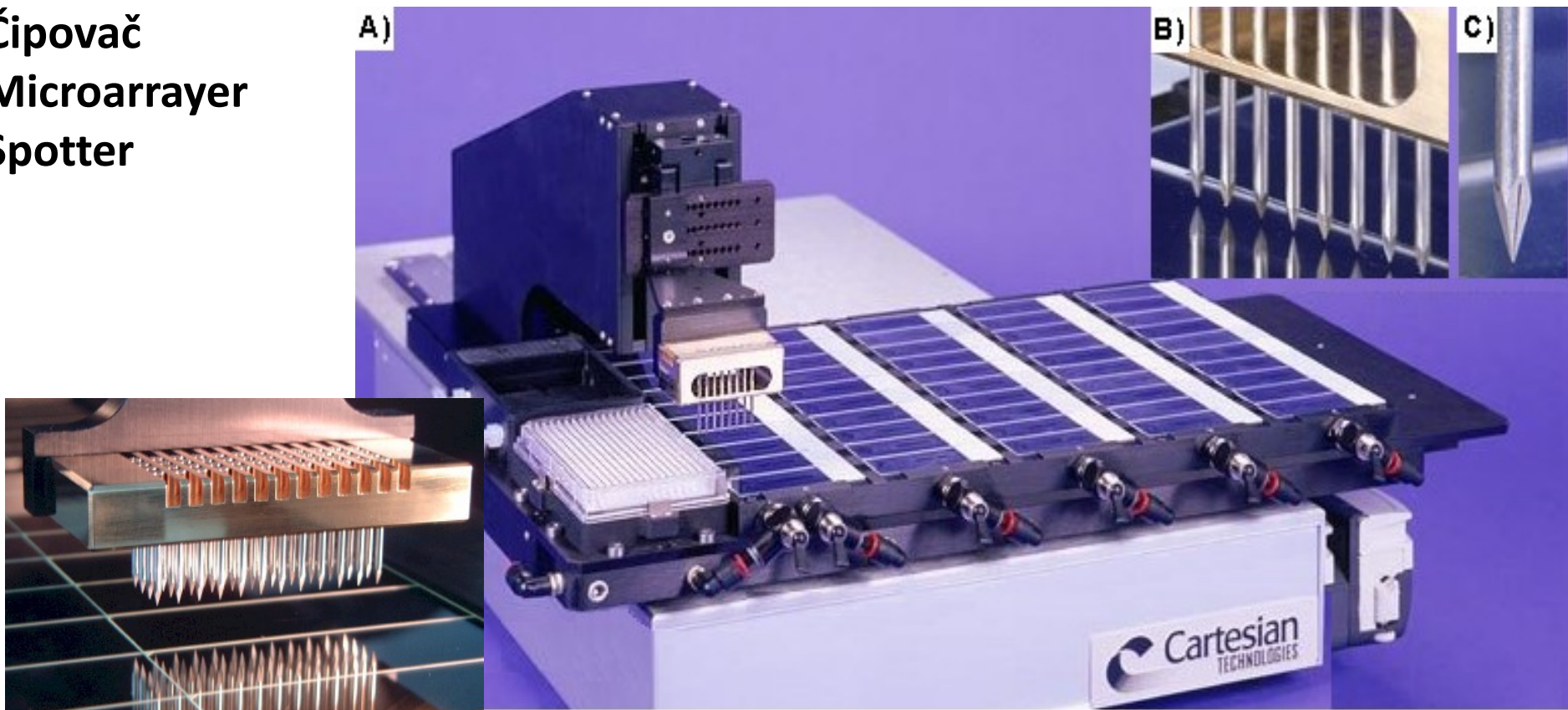
Cy3	Cy5	$\frac{Cy5}{Cy3}$	$\log_2 \left(\frac{Cy5}{Cy3} \right)$
200	10000	50.00	5.64
4800	4800	1.00	0.00
9000	300	0.03	-4.91

Cy3 Snížená exprese genu
Cy5 Zvýšená exprese genu



Výroba cDNA ČIPŮ

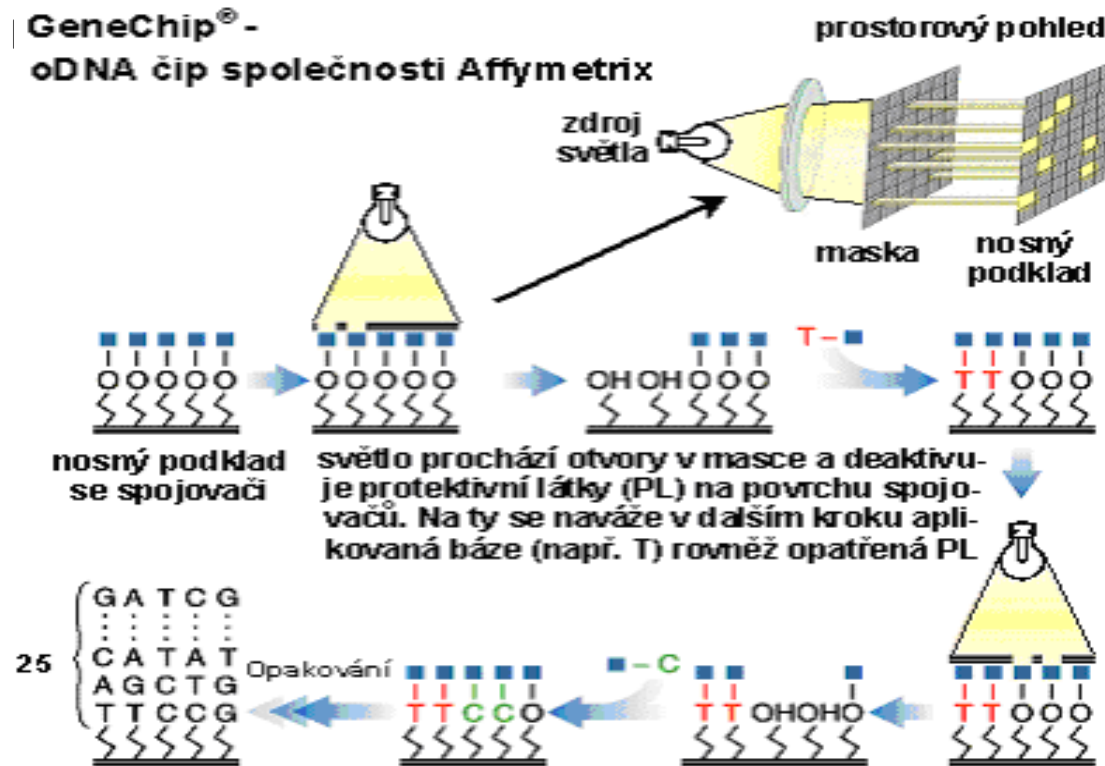
Čipovač
Microarrayer
Spotter



Obr. č. 1. A) Pohled na výkonnou část čipovacího přístroje společnosti Cartesian Technologies. Detailní snímek na: B) pracovní hlavu osazenou nanášecími tělesy (NT) a C) kontaktní NT – štěrbinovitý hrot.

Oligonukleotidové DNA čipy – Affymetrix – výroba syntézou in situ

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



Pomocí odlišných masek jsou postupně deaktivovány PL zbylých spojovaců a následně aplikovány dosud nepoužité nukleotidy. K syntéze libovolného počtu sond je zapotřebí takový počet masek a příslušných kroků, který odpovídá množství nukleotidů v jedné sondě (25) násobeném počtem bází (4).

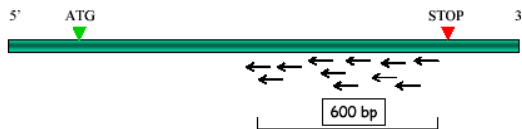
1.28 x 1.28+ cm plocha čipu
HJ ~5 x 5 μm průměr plocha
(≈ miliony sond na 6,500,000 HJ)

Affymetrix GeneChip

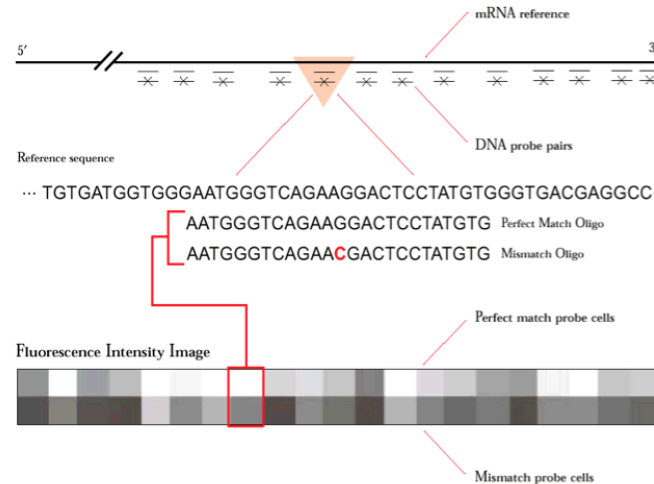
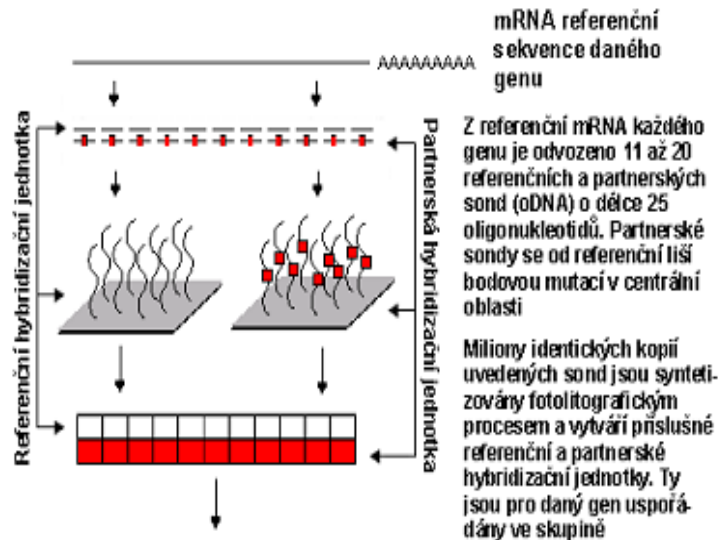
PŘÍPRAVA OLIGONUKLEOTIDOVÝCH SOND

Probe Design

Combining databases, empiric knowledge



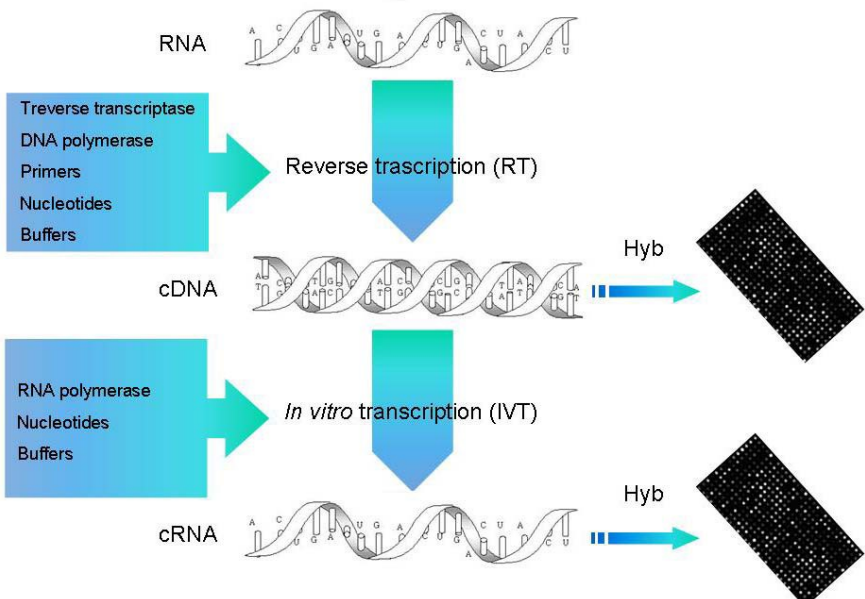
- Probe set: - at least 11 unique oligos (25-mers)
 - spread over 600 bp 3'-end
 - spread over the whole chip
 - match-mismatch oligos



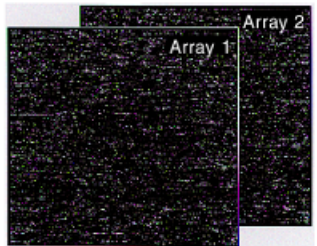
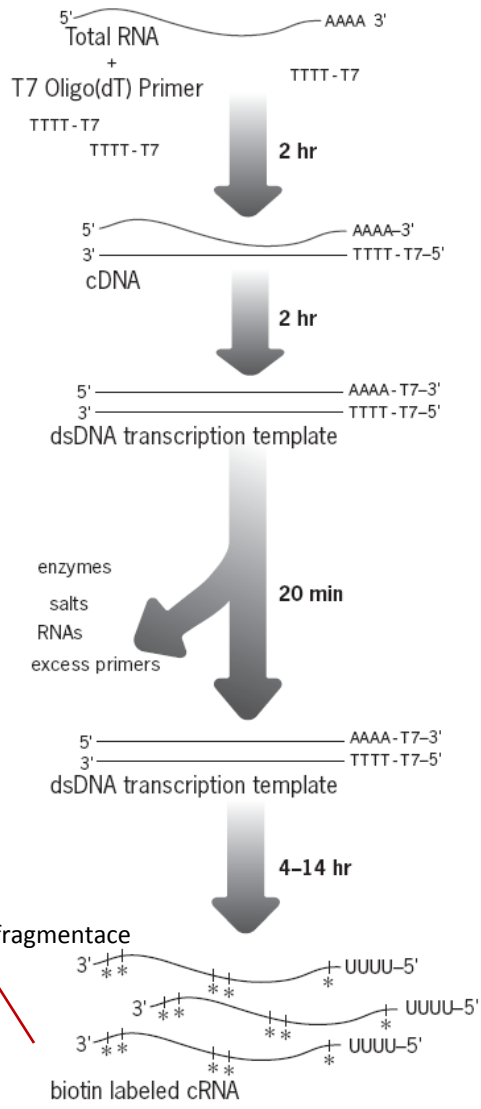
mRNA sekvence daného genu -> virtuálně vysektováno 11-20 specifických oligonukleotidových úseků reprezentujících daný gen-> reverzní transkripce do sekvence cDNA -> fotolitografická syntéza přímo na povrchu čipu

Referenční a partnerské sondy v referenčních a partnerských hybridizačních jednotkách. Liší se cílenou záměnou jednoho nukleotidu v centrální oblasti (negativní kontrola).

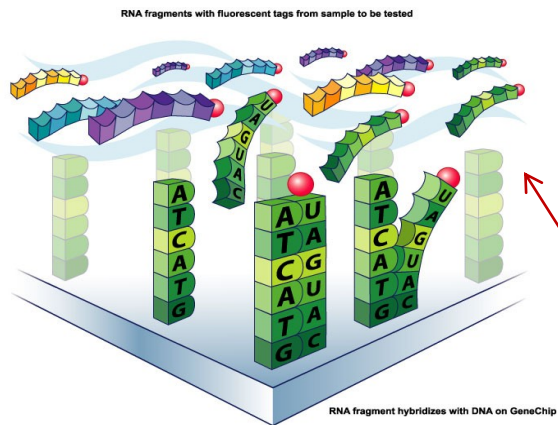
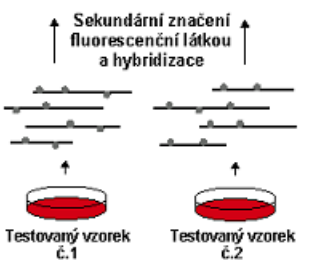
IVT, značení cRNA biotinem a posthybridizační detekce



Izolace RNA / mRNA
 -> reverzní transkripce
 -> ss-cDNA
 -> PCR syntéza ds-DNA s T7 promotory
 -> lineární amplifikace a zároveň in-vitro reverzní transkripce s inkorporací NTPs (pseudouridin nesoucí biotin - nepřímá metoda)
 -> biotinem značená cRNA
 -> hybridizace



Hybridizační jednotky jsou excitovány jedním laserovým paprskem. Obecně je gen považován za exprimovaný, pokud hodnota intenzity emitovaného záření z jeho referenčních jednotek převyšuje po odečtení fluorescenčního pozadí hodnotu z jednotek partnerských

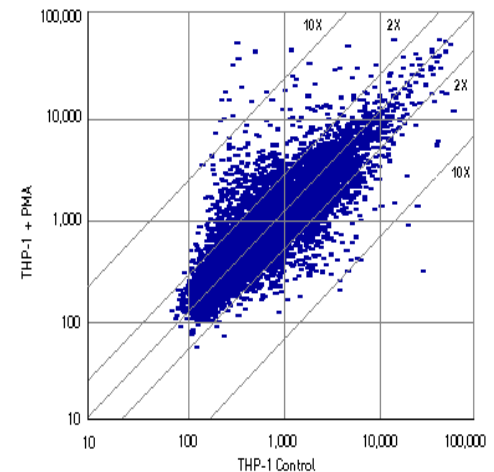
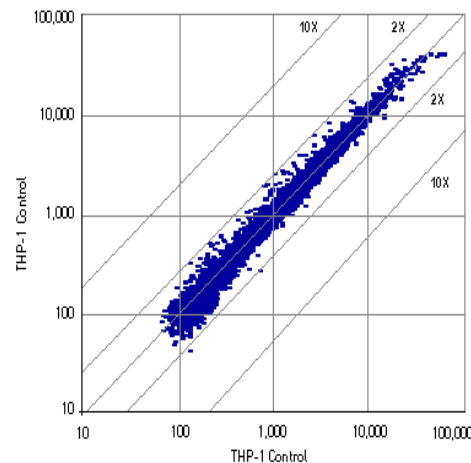


Faktory ovlivňující čipové analýzy

heterogenita souboru pacientů, kvalita vstupního materiálu, rozdílnost čipových platforem, validace výsledků

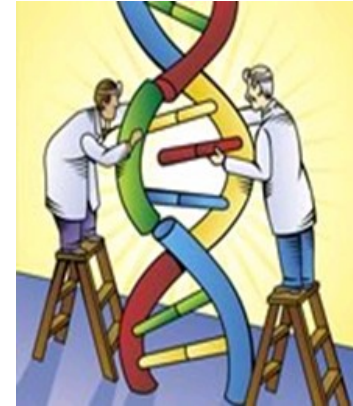
Biologická variabilita = charakteristika individua nebo systému (genetický základ a jeho variace, vývojové stádium, fyziologický stav, teplota, kultivační podmínky, sledované experimentální podmínky, atd.)

Biologickou variabilitu odlišit od **technologické variability** (zpracování a nanášení vzorku, čipy a jejich výroba, značení cDNA, hybridizace, RNA a cDNA amplifikace, skenování a skener)
 odlišit -pozadí od biologicky důležitých genů včetně těch exprimovaných na nízké úrovni
 -odlišit nespecifické změny (stresové reakce), atd.
 -kontaminace jinými buněčnými populacemi



Take home

Interdisciplinární charakter biomedicínského výzkumu
Biologický materiál užívaný pro účely molekulární medicíny
Odběr klinického materiálu (stabilita, archivace)
Laserová mikrodisekce
Izolace nukleových kyselin
Kvantifikace a stanovení kvality nukleových kyselin
Real-Time PCR (definice, způsoby detekce, absolutní a relativní kvantifikace)
Real-Time PCR arrays
DNA čipy (definice a základní členění)
cDNA čipy
oligonukleotidové čipy
Faktory ovlivňující čipové analýzy



Náplň příští přednášky

Moderní metodické přístupy v molekulární medicíně II – faktory ovlivňující čipové analýzy, základní statistické přístupy k analýze čipových dat, další čipové technologie SNP čipy, CGH čipy, mikroRNA čipy, ChiP–on-chip, využití genomiky pro molekulární klasifikaci nádorových onemocnění, jak navrhovat studie a jak číst publikace – výhody a limity genomických metod

Dotazy?

