

**MUNI
MED**



Role molekulární genetiky v cílené léčbě nádorů

doc. Mgr. Jiří Šána, Ph.D.

email: jiri.sana@med.muni.cz

XXIII. ročník kurzu genetiky a molekulární biologie pro učitele středních škol, Brno 13.9.2023

Definice nádorového onemocnění

Geneticky podmíněný abnormální přírůstek buněčné tkáňové hmoty klonálního charakteru, jehož růst není v koordinaci s růstem okolních tkání a rovnovážným stavem organismu.

prof. Rejthar

Genetické onemocnění způsobené změnami v genech, které řídí růst a množení buněk.

National Cancer Institute

Nádory představují **genetickou** nemoc: vznikají v důsledku patologických změn v informaci, kterou nese DNA. Od jiných genetických nemocí se liší hlavně tím, že s vývojem nádoru souvisí především somatické mutace, tedy mutace, které se objevují v jednotlivých tělních buňkách, na rozdíl od vrozených mutací, které jsou v buňkách zárodečné linie dávajících vznik celému mnohobuněčnému organismu.

prof. Šmardová

Jsou nádorová onemocnění dědičná?

Samotné nádorové onemocnění se nemůže přenášet z rodičů na děti. Ani genetické změny v nádorových buňkách nelze předávat. Avšak genetická změna, která zvyšuje riziko vzniku rakoviny, může být předána (zdeděna), pokud je přítomna ve vajíčkách nebo spermích rodičů.

Sporadická, familiární a hereditární nádorová onemocnění

Sporadická nádorová onemocnění

Nádorová onemocnění, která se vyskytují u lidí, kteří nemají v rodině výskyt těchto onemocnění nebo dědičnou změnu DNA, která by zvyšovala riziko jejich vzniku.

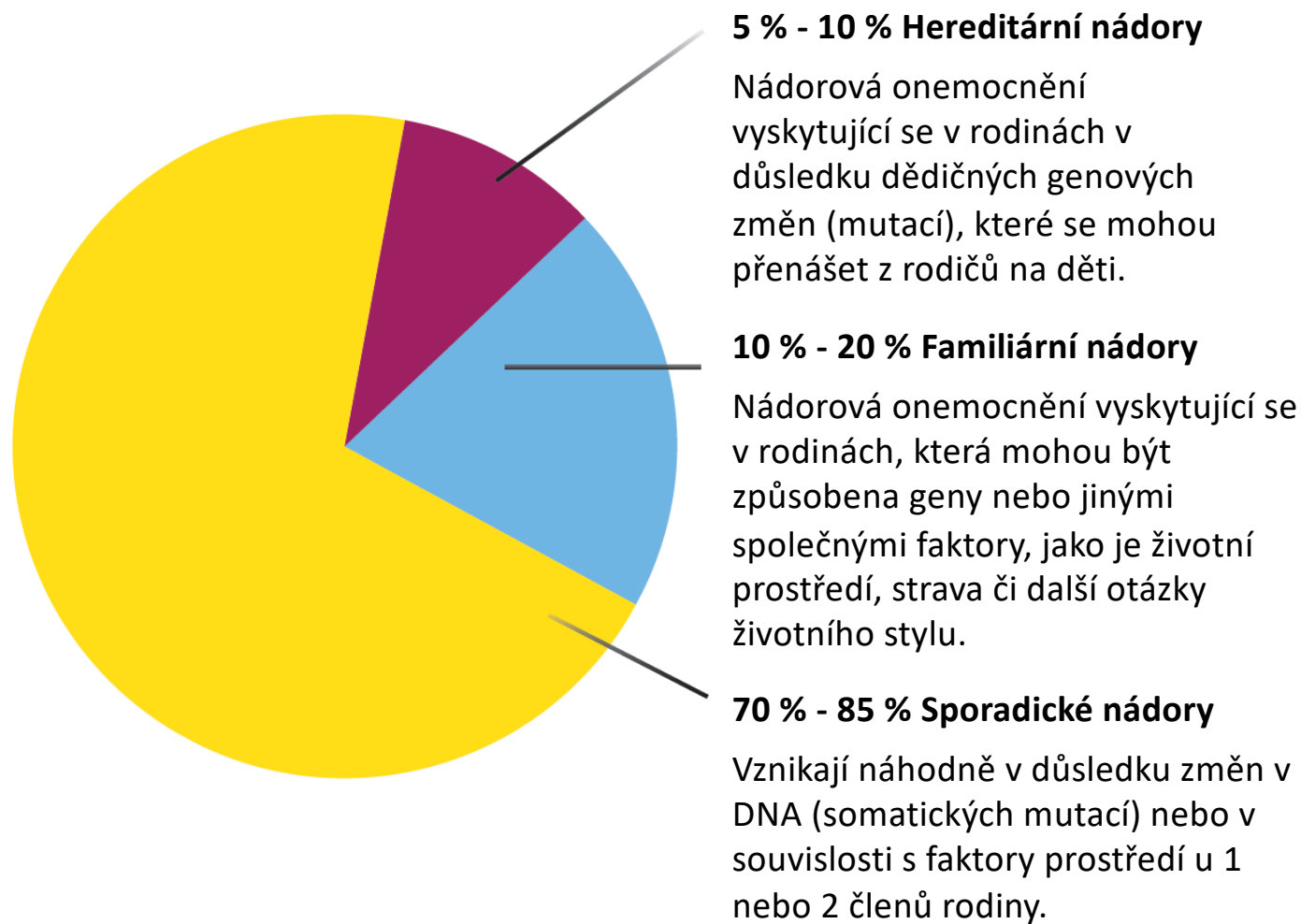
Familiární nádorová onemocnění

Nádorová onemocnění, které se v rodinách vyskytují častěji, než by se dalo očekávat. Tyto nádory se často objevují v raném věku a mohou být také známkou společných faktorů životního prostředí nebo životního stylu. Jednotná genetická příčina nebo vysvětlení však nejsou známy.

Hereditární nádorová onemocnění

Nádorová onemocnění, která jsou způsobena známými mutacemi v určitých genech přenášených z rodičů na děti. U dědičných nádorových syndromů se v rodinách zpravidla vyskytují určité vzorce výskytu nádorů. Mezi tyto vzorce patří výskyt stejného typu nádoru u několika blízkých členů rodiny (např. matka, dcera a sestra), výskyt nádorů v raném věku nebo výskyt dvou či více typů nádorů u stejné osoby.

Sporadická, familiární a hereditární nádorová onemocnění



Milníky ve výzkumu DNA

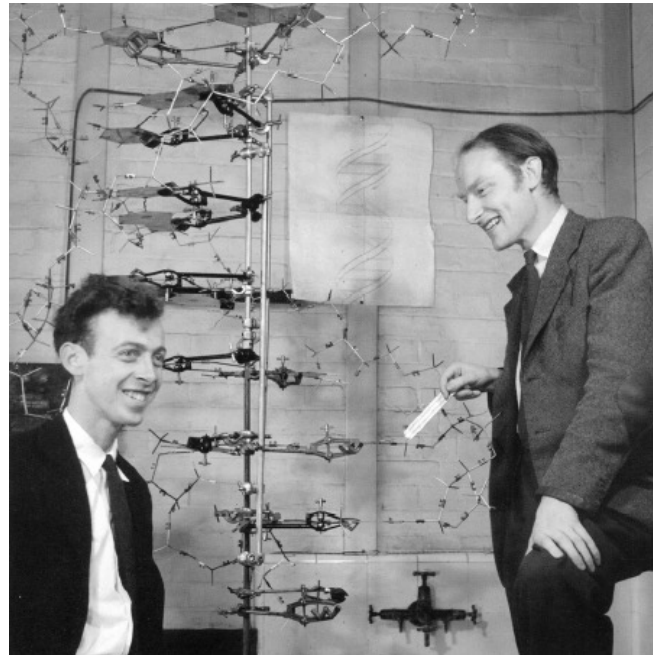
Johannes Friedrich Miesche
(1844 – 1895)



1869 – izolace nukleové kyseliny -
nuklein - z jader bílých krvinek

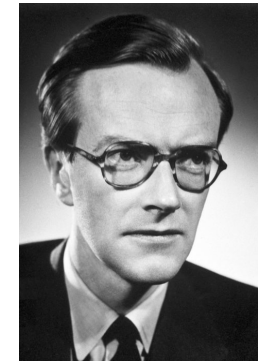
James Dewey Watson (1928) *James D. Wat*

Francis Harry Compton Crick (1916 – 2004) *Francis Crick*



1962 – Nobelova cena
za fyziologii a lékařství

Maurice Hugh
Frederick Wilkins
(1916 – 2004)



Milníky ve výzkumu DNA – projekt HUGO (1988 – 2001)

1985-1990: diskuse o sekvenování lidského genomu
– “nebezpečné” - “nesmyslné” - “nemožné”

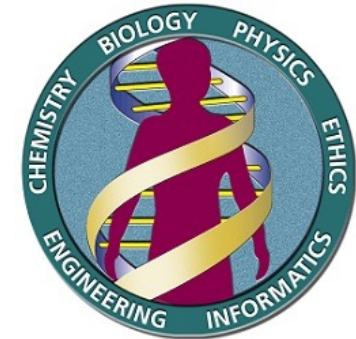
1988-1990: Založen HUMAN GENOME PROJECT (HGP)

20 laboratoří z USA, Velké Británie, Japonska, Francie, Německa a Číny
Asi 2800 lidí, vedoucí: Francis Collins, NIH

Mezinárodní spolupráce: HUGO (Human Genome Organisation)

Cíle:

- genetická mapa lidského genomu
- fyzická mapa: marker každých 100 kbp
- sekvenování modelových organismů (E. coli, S. cerevisiae, C. elegans, Drosophila, myš)
- objevit všechny lidské geny (předpokl. 60-80 tisíc)
- sekvenování celého lidského genomu (3000 Mbp) do r. 2005 s rozpočtem 3 bil. USD



Milníky ve výzkumu DNA – projekt HUGO (1988 – 2001)

Květen 1998

- Craig Venter zakládá soukromou biotechnologickou společnost CELERA GENOMICS, Inc. a vyhlašuje záměr sekvenovat celý lidský genom za 3 roky a 300 mil. USD metodou *whole-genome shotgun*, *několik desítek zaměstnanců (sponzorováno Applied Biosystems)*
- V té době výsledek práce HGP: sekvenováno cca 4 % lidského genomu.

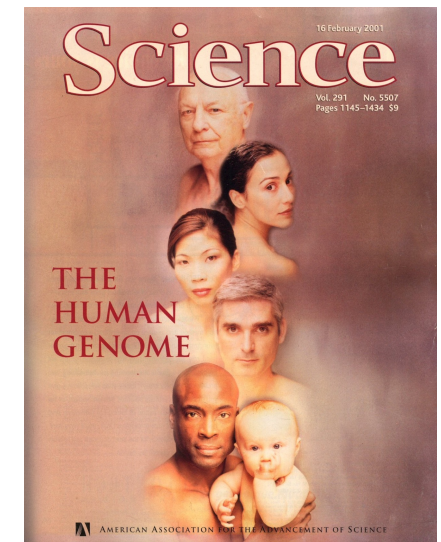
Celera Genomics & akad. spolupracovníci publikují draft genomu *Drosophila melanogaster* (cca 2/3 z 180 Mbp)

- ... *whole-genome shotgun* lze použít i pro velké genomy
- ... Lidský genom: závod mezi Human Genome Project a Celera Genomics

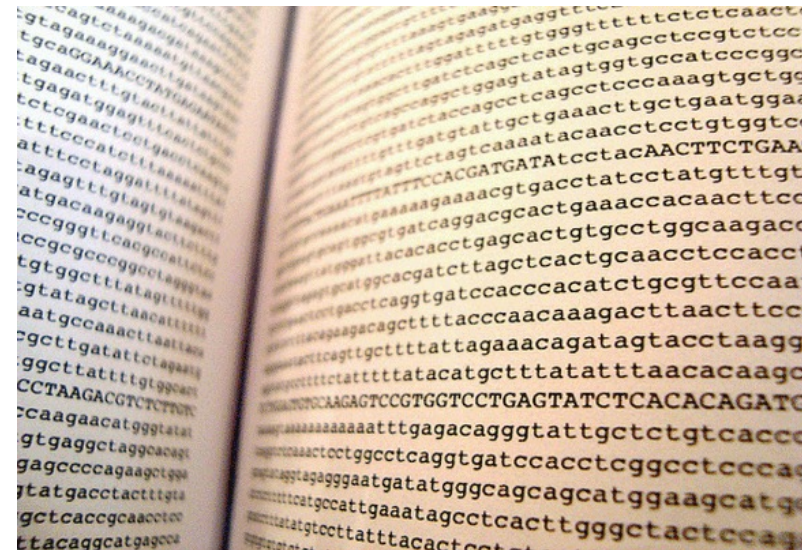
Únor 2001 - Remíza

HGP publikuje draft lidského genomu v časopisu Nature 15.2.2001.

Celera Genomics publikuje svou sekvenci lidského genomu v Science 16.2.2001.



Informační obsah lidského genomu



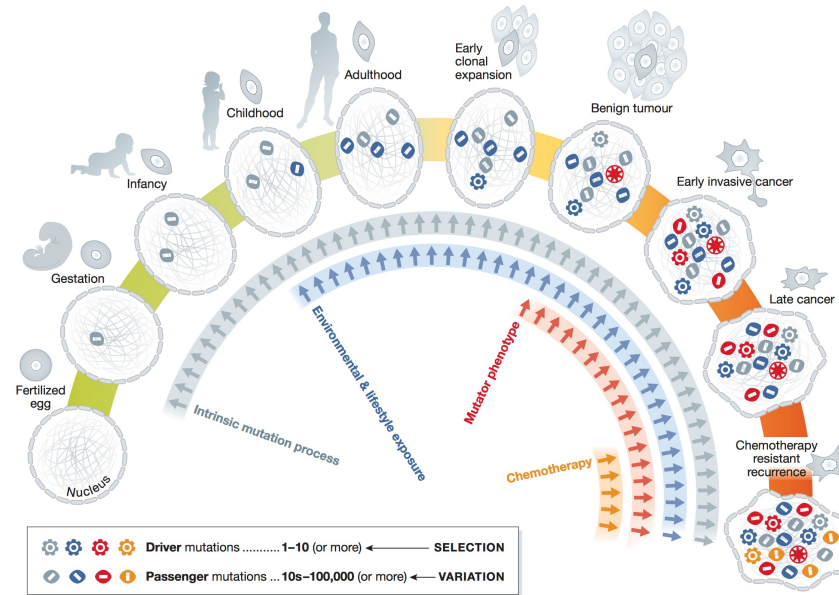
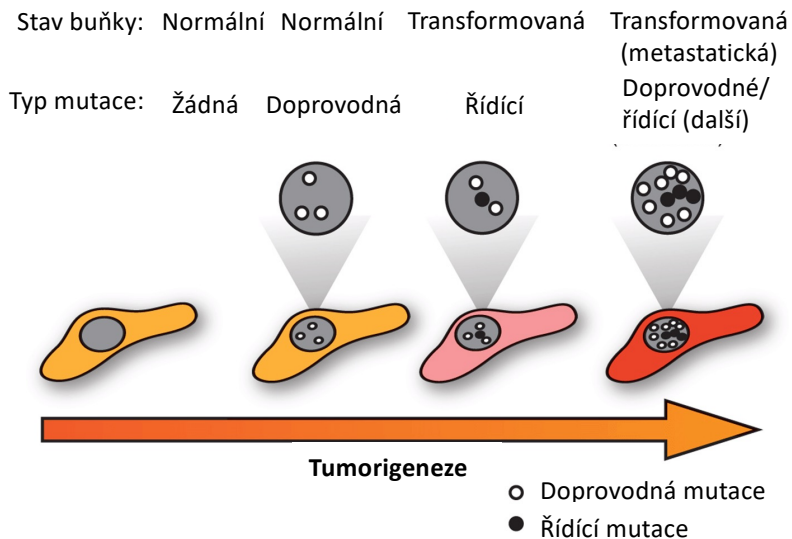
3,2 miliard jednotek DNA kódu:

- 127 knih
- 1000 stran na knihu
- cca 25000 znaků na stranu

Informační obsah lidského genomu



Doprovodné & Řídící mutace



Všechna nádorová onemocnění vznikají v důsledku **změn v DNA nádorových buněk**, i když ne všechny tyto změny přítomné v nádoru se podílejí na jeho vzniku. Jedná se o tzv. **"doprovodné (passenger) mutace."** Naproti tomu **"řídící (driver) mutace"** se **na vzniku nádoru podílí příčinně**; tzn. propůjčují nádorové buňce **výhodu při růstu** a jako takové se podílejí na onkogenezi.

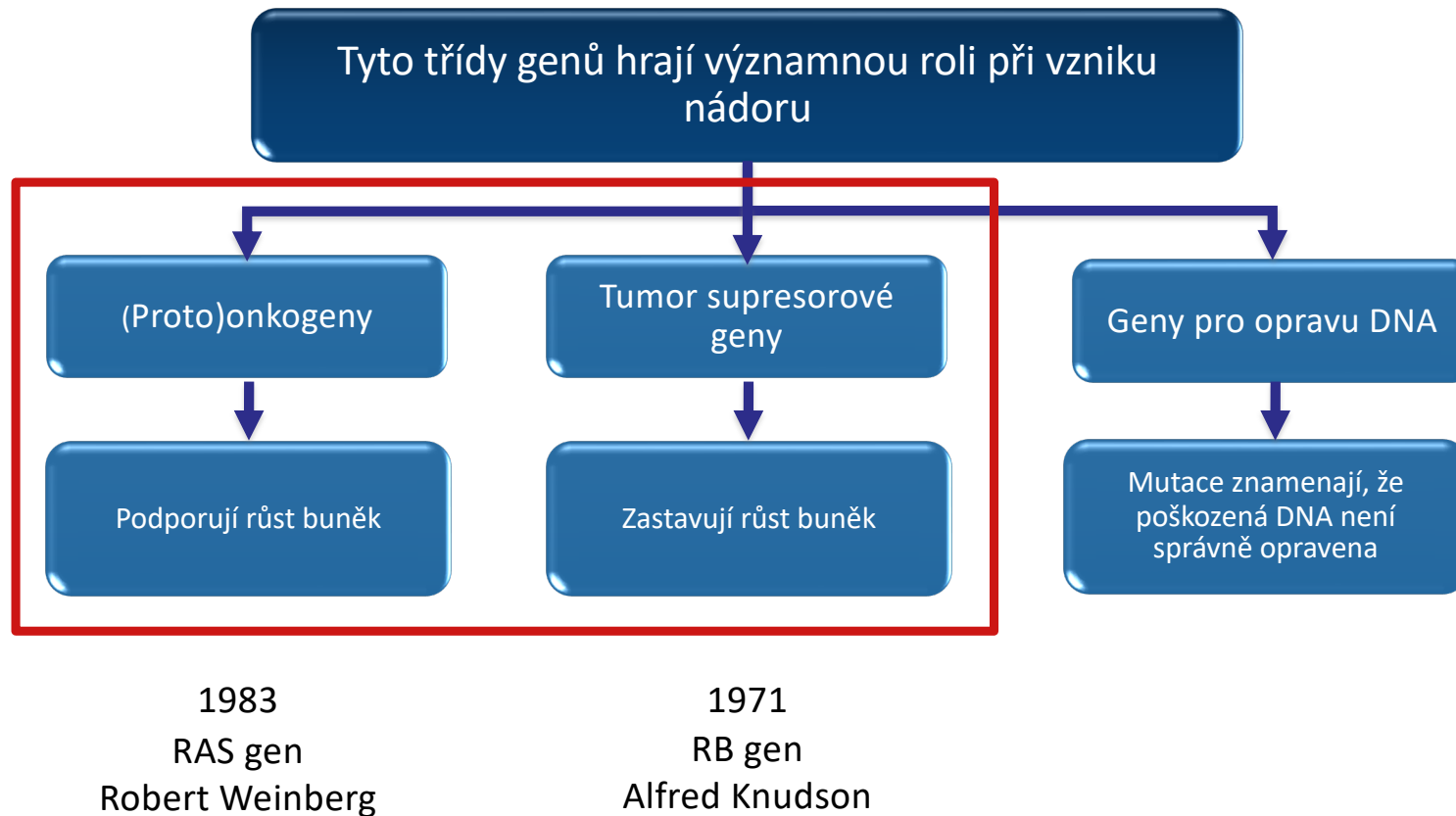
Nádorový genom typicky obsahuje:

10 000 doprovodných mutací

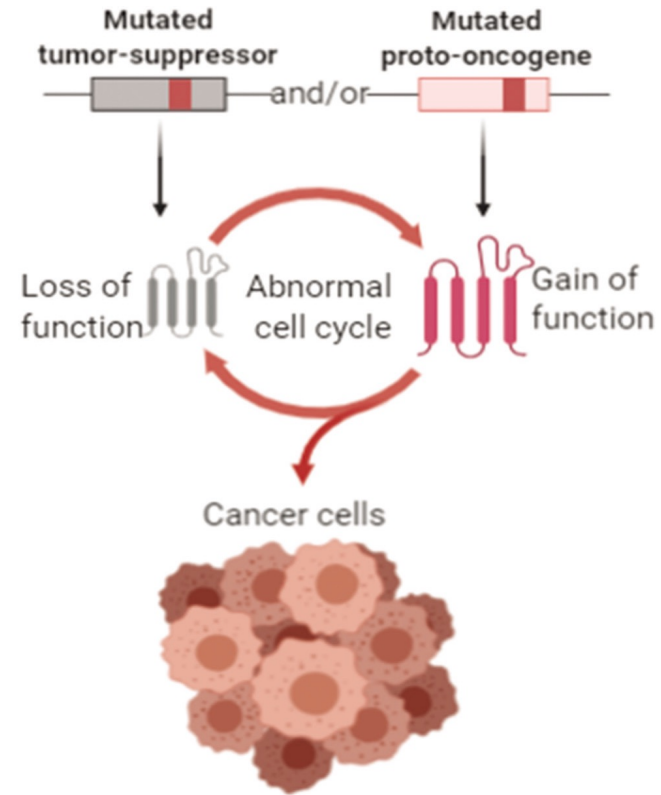
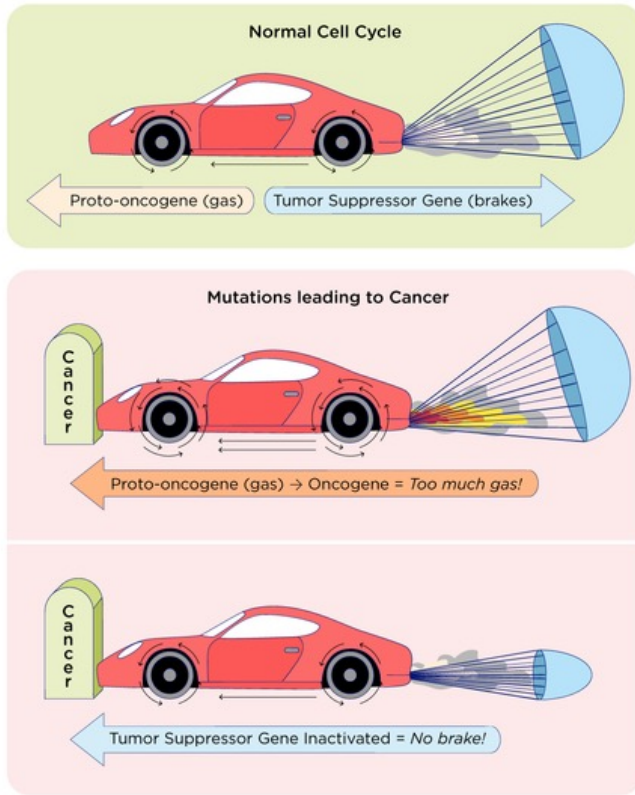
5-10 řídících (biologicky relevantních) mutací

1-2 klinicky relevantních (použitelné „actionable“) mutace => personalizovaná / cílená terapie

Geny důležité pro vývoj nádoru



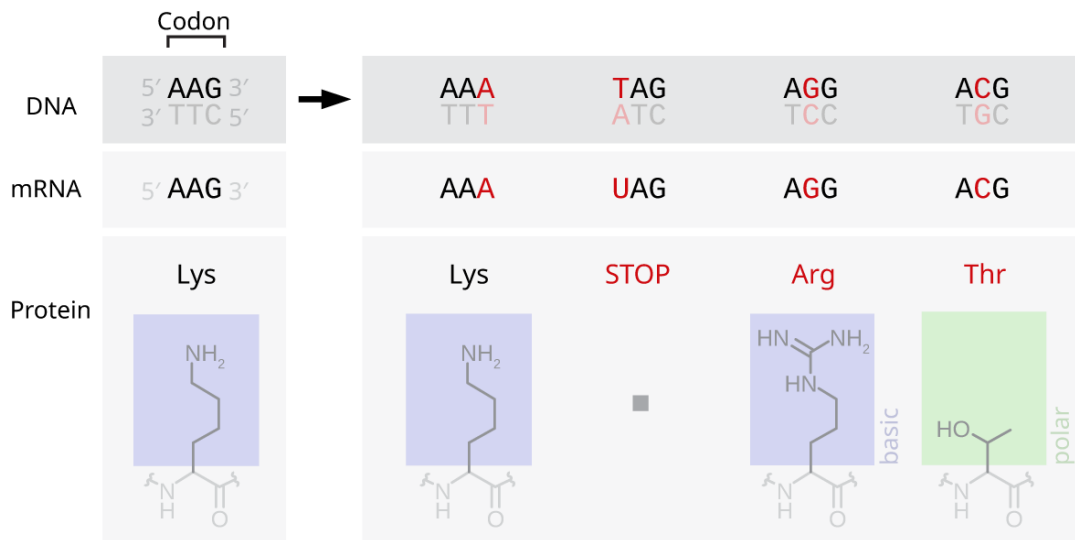
Onkogeny & Nádorové supresory



Typy genetických změn v nádorovém genomu

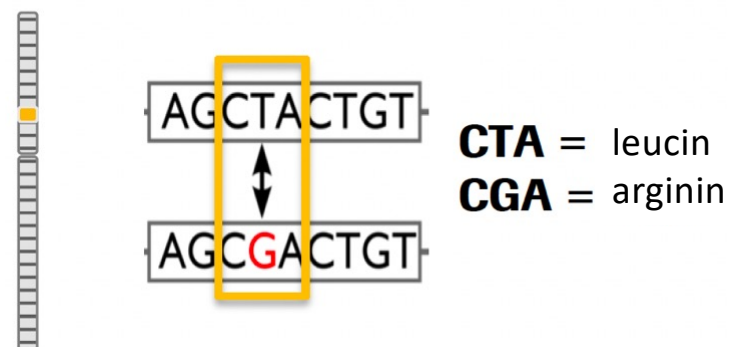
Skupina mutací	Typ mutace	Popis
Bodové mutace	Substituce	Během replikace je nesprávně přidána jedna báze, která nahradí pár v odpovídající pozici na komplementárním vlákně
	Inzerce	Do replikující se DNA je vložen jeden nebo více nukleotidů navíc, což často vede k posunu čtecího rámce
	Delece	Při replikaci je jeden nebo více nukleotidů "přeskočeno" nebo jinak vystřiženo, což často vede k posunu čtecího rámce
Strukturní chromozomové aberace	Inverze	Jedna oblast chromozomu je převrácena a znovu vložena
	Delece	Ztráta části chromozomu, která má za následek absenci všech genů v této oblasti
	Duplikace	Část chromozomu se opakuje, což vede ke zvýšení dávky genů v této oblasti
	Translokace	Část jednoho chromozomu je aberantně připojena k jinému chromozomu
Variace v počtu genů	Amplifikace genů	Počet tandemových kopií lokusu s konkrétním genem se zvyšuje
	Expanze mikrosatelitů	Obvyklý počet opakujících se mikrosatelitních sekvencí se zvyšuje

Bodové mutace



Synonymous / Silent	Non-synonymous	
	Nonsense	Missense
		Conservative Non-conservative

Záměna jedné báze v DNA



Klinicky relevantní příklady:

- EGFR T790M:** rezistence k inhibitorům EGFR*
- EGFR L858R nebo L861Q:** citlivost k inhibitorům EGFR*
- BRAF V600E:** citlivost k inhibitorům EGFR#

* gefitinib, erlotinib (2. generace); # vemurafenib

Analogie mutací

*** acg tcg gat tca tgc ccc tag ===

*** acg tcg gat **g**ca tgc ccc tag ===

*** acg t**a** gat tca tgc ccc tag ===

*** acg tcg gat ~~t~~a tgc ccc tag ===

*** acg t**█** gat tca tgc ccc tag ===

*** you saw the cat and the dog ===

*** you saw the **rat** and the dog ===

*** you sa- --- --- --- --- --- ===

*** you saw the --- and the dog ===

*** you sat **hec ata ndt hed ogy** ===

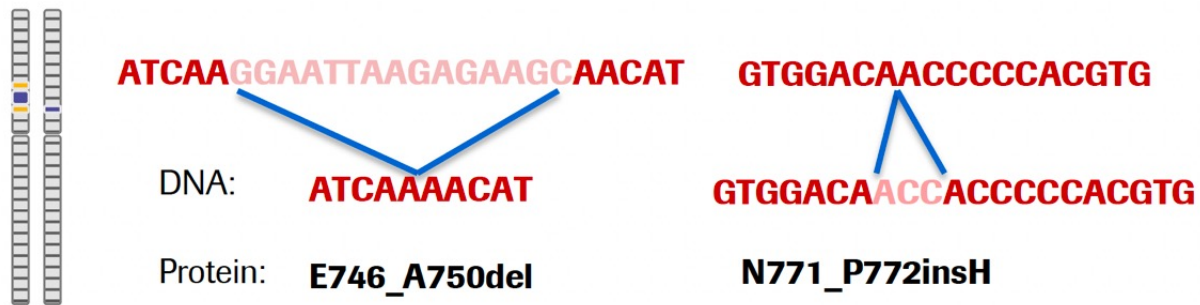
Analogie mutací

Structure of a Width - Based Bar Code



Rozsáhlejší genové mutace – inserce/delece

Inzerce nebo delece v jednom genu (1-40 bp)



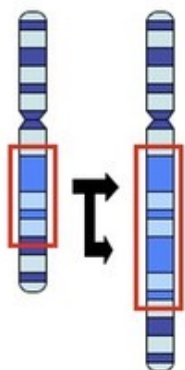
Klinicky relevantní příklad:

delece exonu 19 v genu EGFR:

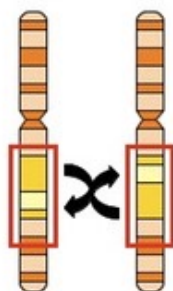
citlivost k inhibitorům EGFR

Strukturní chromozomové aberace

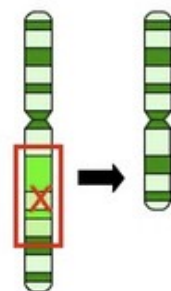
Duplikace



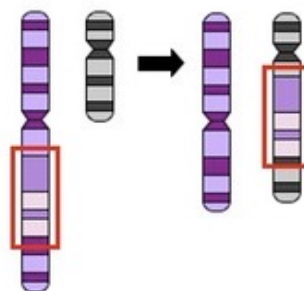
Inverze



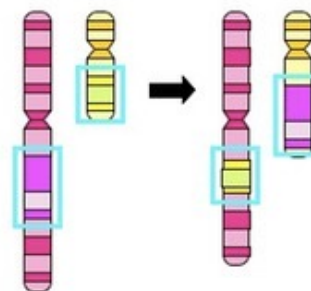
Delece



Inzerce

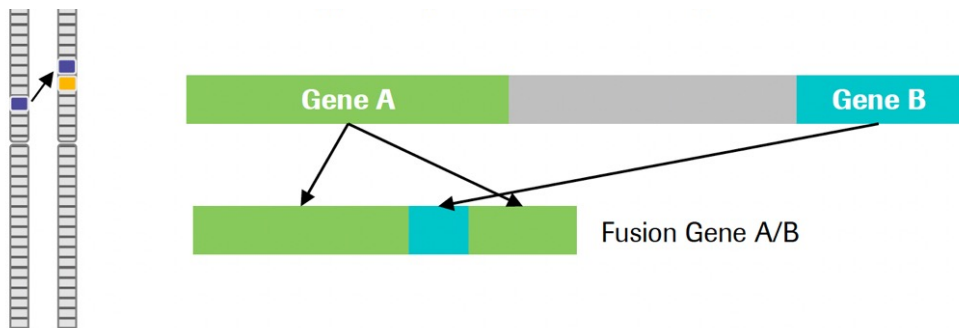


Translokace



Fúze genů

Zlom na chromozomu vede k vzájemnému přiblížení dvou genů, které se za normálních okolností vedle sebe v genomu nevyskytují



Klinicky relevantní příklady:

- ALK-EML4:** citlivost k inhibitorům ALK u karcinomu plic
- TMPRSS2-ERG:** citlivost k inhibitorům ERG u karcinomu prostaty
- RET fusions:** citlivost k inhibitorům RET u karcinomů plic a štítné žlázy
- BCR-ABL:** citlivost k imatinibu u leukémií

Analogie fúzního genu



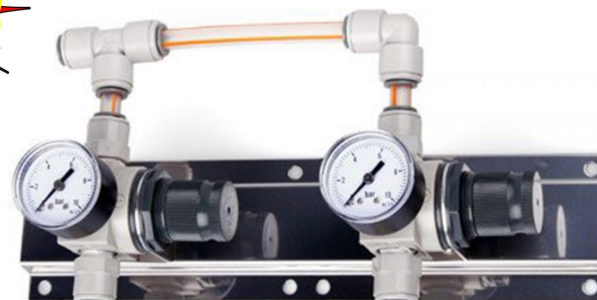
vodík



kyslík



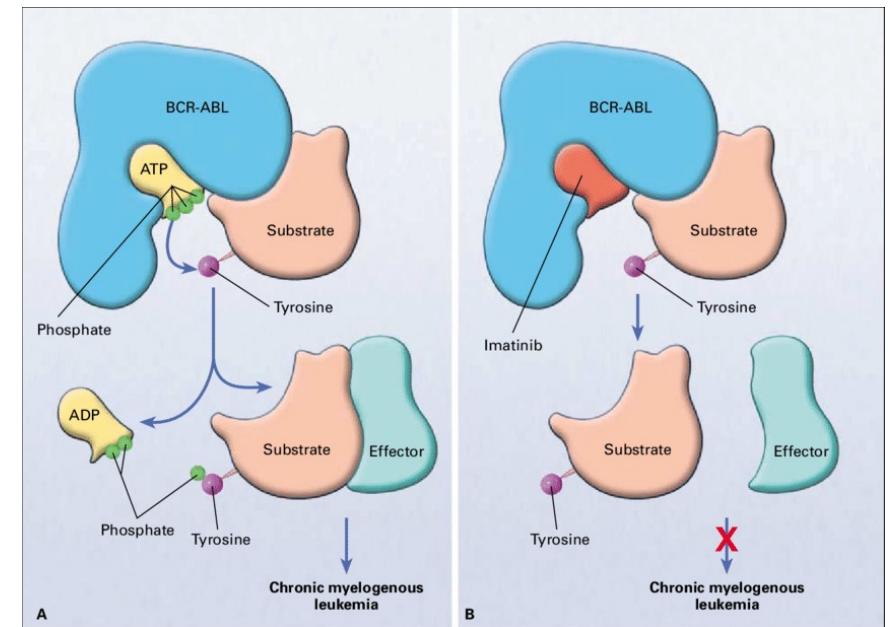
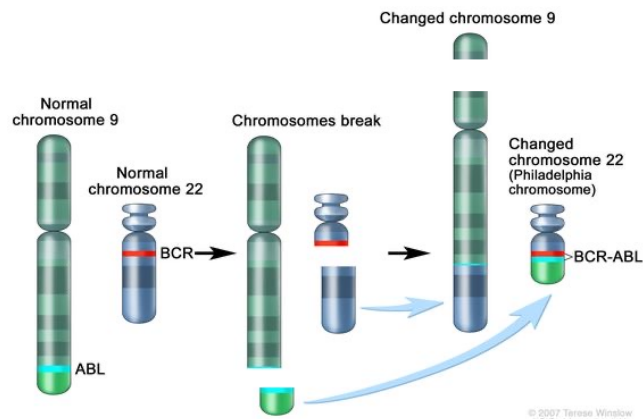
fúze



Strukturní chromozomové aberace

Filadelfský chromozom & fúzní protein BCR-ABL & inhibitory tyrosinkináz

- 1960 – Filadelfský chromozom
- 1973 – fúzní protein BCR-ABL
 - Tyrozinkinázová 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:

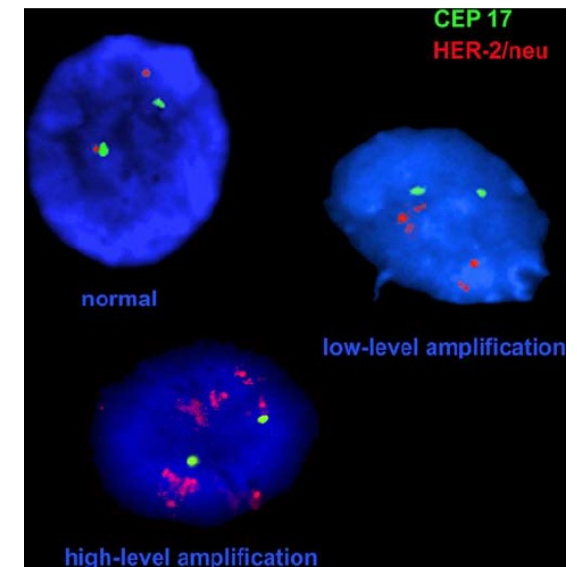
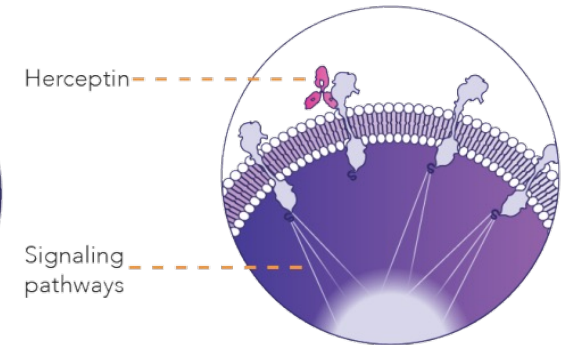
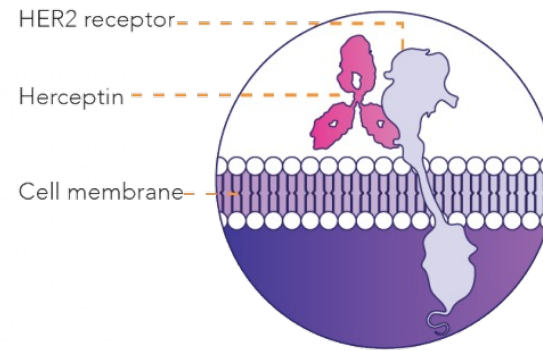
amplifikace HER2:

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

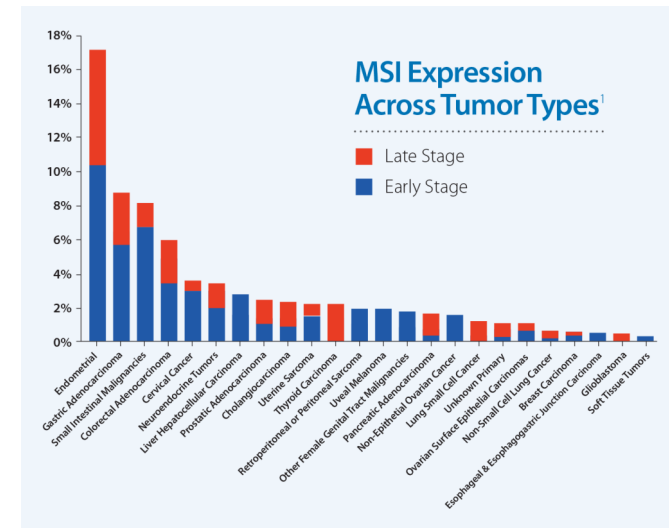
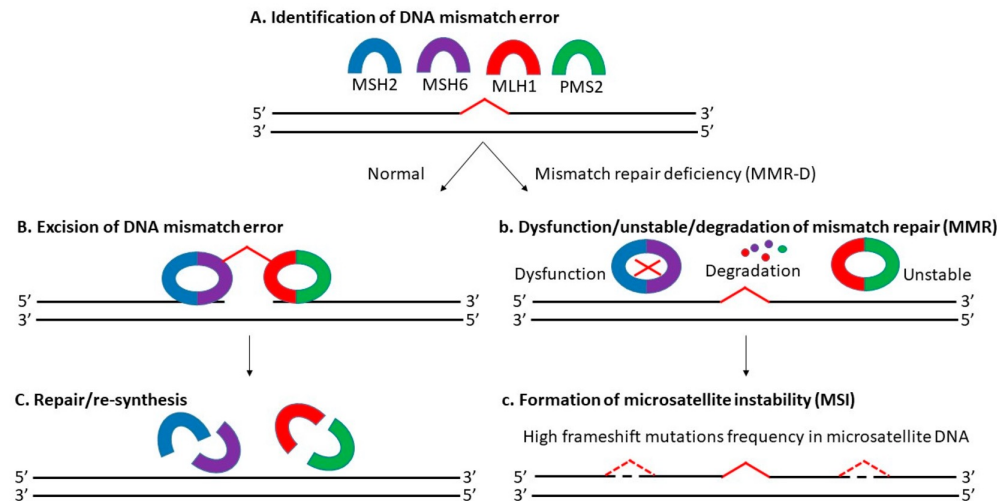


Variace v počtu genů

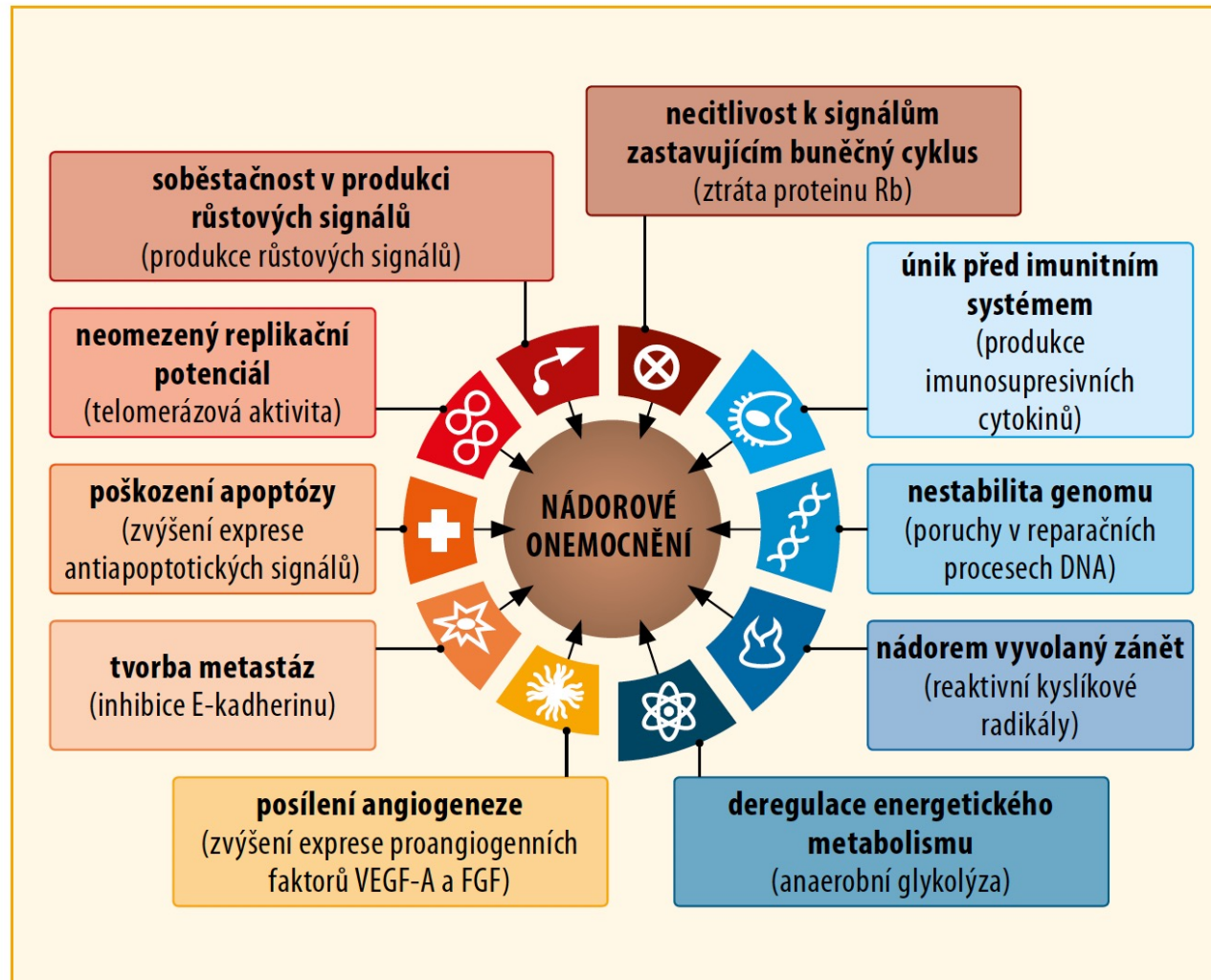
Copy number variation (CNV)

Expance mikrosatelitů – nestabilita mikrosatelitů (microsatellite instability; MSI)

- MSI je způsobena selháním systému opravy chybného párování v DNA (mismatch repair ; MMR)
- Vysoká míra MSI koreluje se zvýšenou zátěží neoantigenů, které mohou zvyšovat citlivost nádoru k imunoterapii (např. anti-PD-L1, pembrolizumab)
- Lynchův syndrom - způsobený především mutacemi v genech MMR (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, EPCAM)



Hlavní znaky maligního nádoru



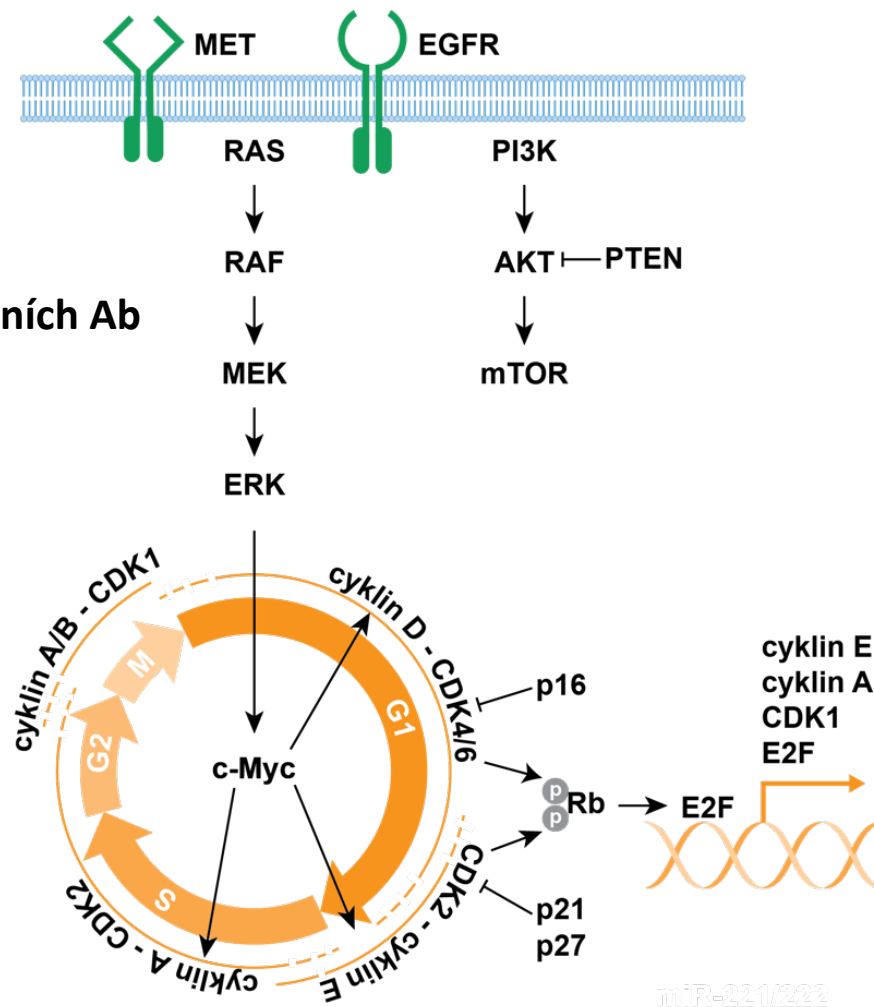
Zapojení mikroRNA do získaných vlastností maligního nádoru

Soběstačnost v produkci růstových signálů

- Aktivační mutace protoonkogenů
- MAPK signální dráha
- Cílená terapie pomocí inhibitorů tyrozinkináz a monoklonálních Ab

Necitlivost k signálům zastavujícím buněčný cyklus

- Inaktivační mutace nádorově supresorových genů
- Dědičné formy nádorových onemocnění
- Retinoblastomový gen



Léčebné přístupy u nádorových onemocnění

- **Chirurgie**
- **Radioterapie (ozařování)**
- **Chemoterapie**
- **Hormonální terapie**
- **Cílená terapie**
- **Imunoterapie**

Chemoterapie

Chemoterapie je název pro léčbu zhoubného onemocnění pomocí léků s cytotoxickým účinkem.

Tyto léky však **nejsou specifické jen pro nádorové buňky, poškozují i některé zdravé buňky**. Proto je chemoterapie doprovázena značnými nežádoucími účinky.

Mechanismus účinku (MOA)

- Inhibice syntézy nukleových kyselin
- Poškození struktury nukleových kyselin
- Alterace mikrotubulárního proteinu
- Inhibice proteosyntézy
- Poškození buněčné membrány
- Kombinované účinky

Newsweek

03.28.2014

SOLVING CANCER

**YOU CAN'T CURE WHAT YOU
DON'T UNDERSTAND**

$(X + Y = -C)$ $(X + Y = -C)$ $(X + Y = -C)$ $(X + Y = -C)$



*Every person is unique.
So is every cancer.*



Hormonální léčba

- Nádory, které vycházejí z orgánů **závislých na hormonálních podnětech** (mléčná žláza, prostata, děložní sliznice), si tuto závislost mohou zachovat.
- Závislost na hormonech je **dána přítomností hormonálních receptorů** uvnitř nádorové buňky, které stimulují buňku k růstu a dělení.
- Hormonální léčba má **méně nežádoucích účinků než chemoterapie** a je proto lépe snášena.
- Hormonální léčbu by bylo možno v principu označit i za biologickou cílenou léčbu, z historických důvodů je však uváděna samostatně.

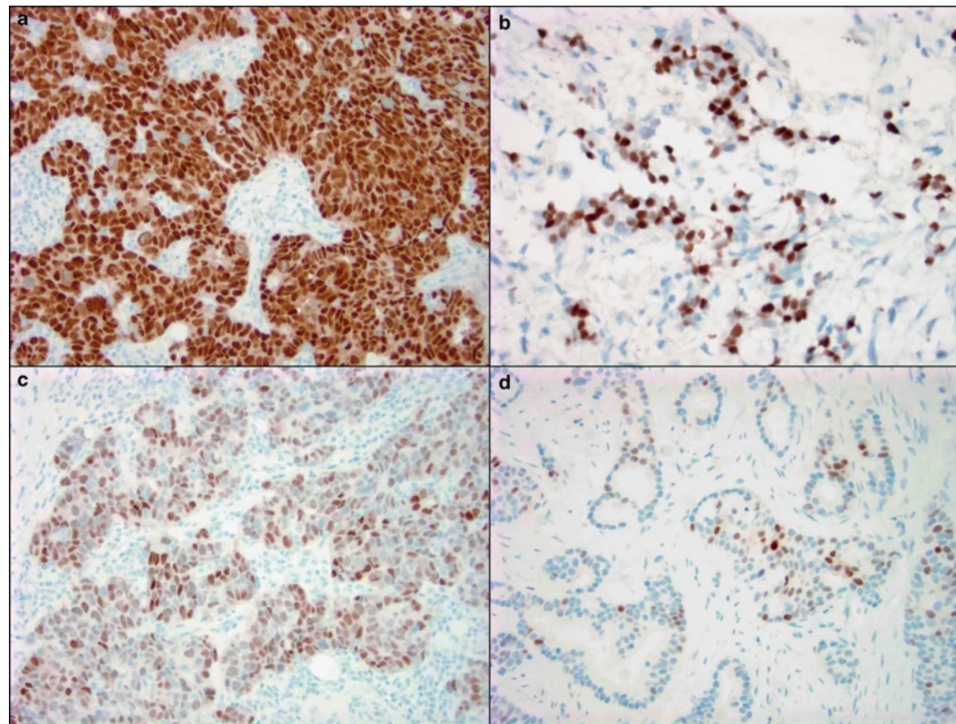
Steroidní receptory:

estrogenní receptory – ER

progesteronové receptory – PR/PgR

androgenní receptory – AR

Imunistochemická analýza ER a PgR



Kraus et al., 2012

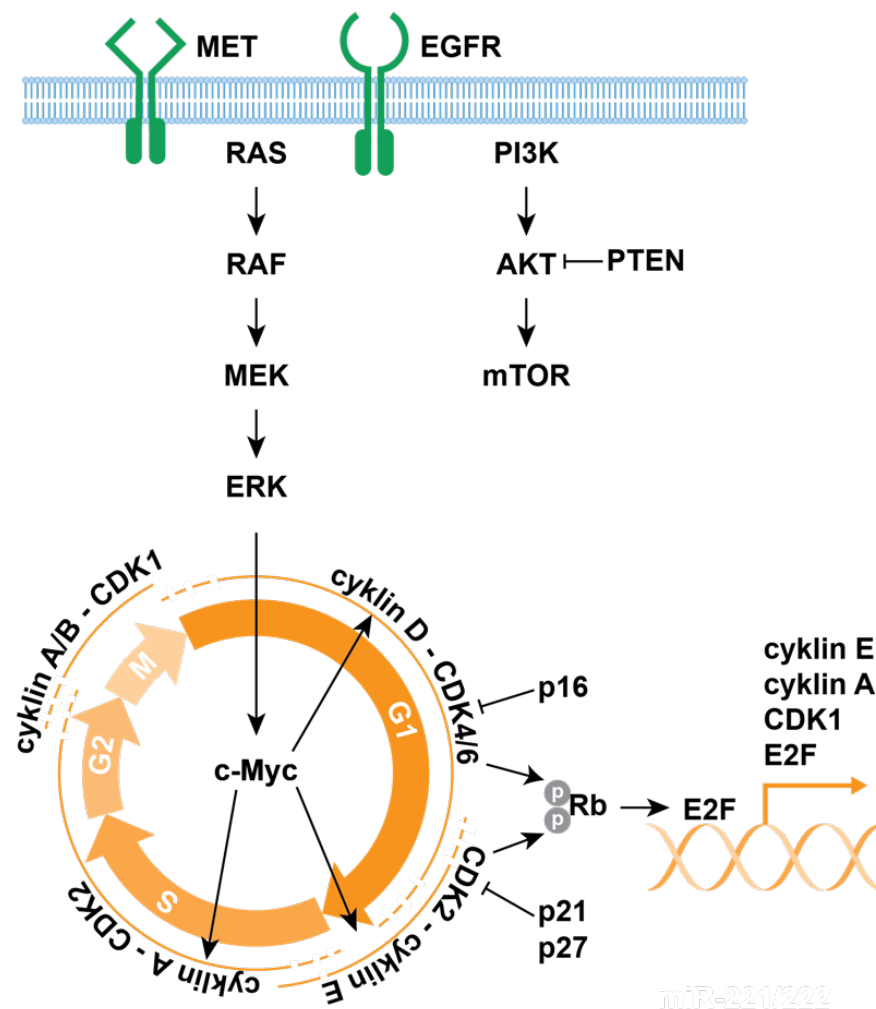
A - ER silně pozitivní B - PgR heterogenní, středně pozitivní
C - ER středně pozitivní D - PgR velmi slabě pozitivní

Cílená léčba nádorů



Cílená léčba je druh léčby nádorů, který se **zaměřuje na proteiny, jež řídí růst, dělení a šíření nádorových buněk**. Je základem precizní medicíny. S tím, jak se vědci dozvídají více o změnách DNA a proteinech, které jsou hnacím motorem nádoru, jsou schopni lépe navrhovat léčbu zaměřenou na tyto proteiny.

- **Cílené léky působí jako "vypínače" nebo "přepínače"** pochodů aktivních především **v buňkách nádorových**.
- Transmembránové receptory - přijímají signály z okolí buňky a přes membránu je předávají dalším molekulám signální kaskády až do jádra buňky, kde je aktivován nebo blokován příslušný gen.
- Součástí těchto signálních molekul jsou (proteinové) kinázy, které odpovídají za předání signálu dalším molekulám.

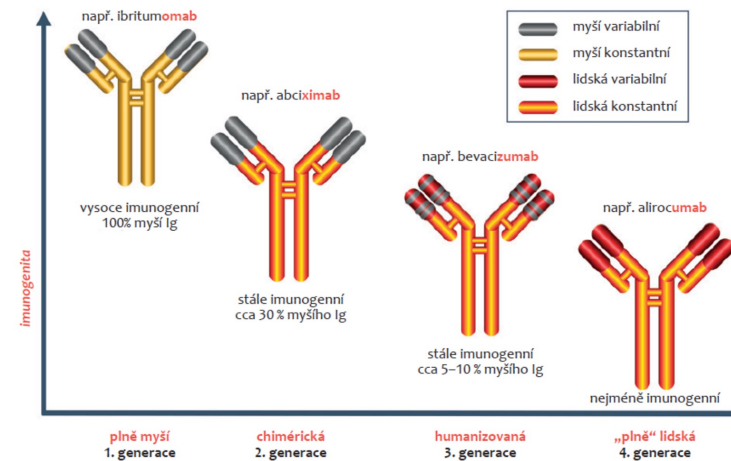
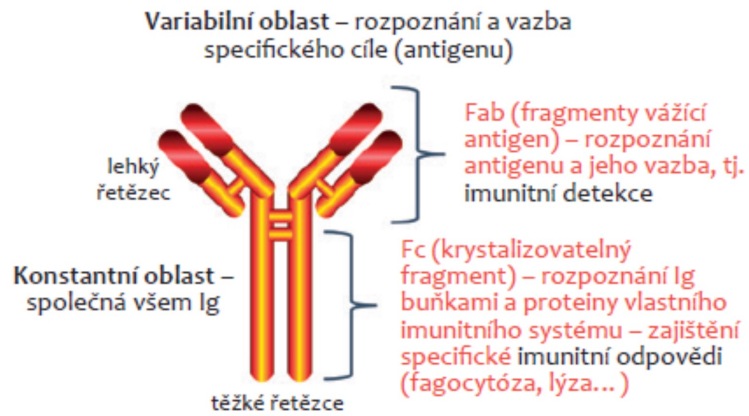
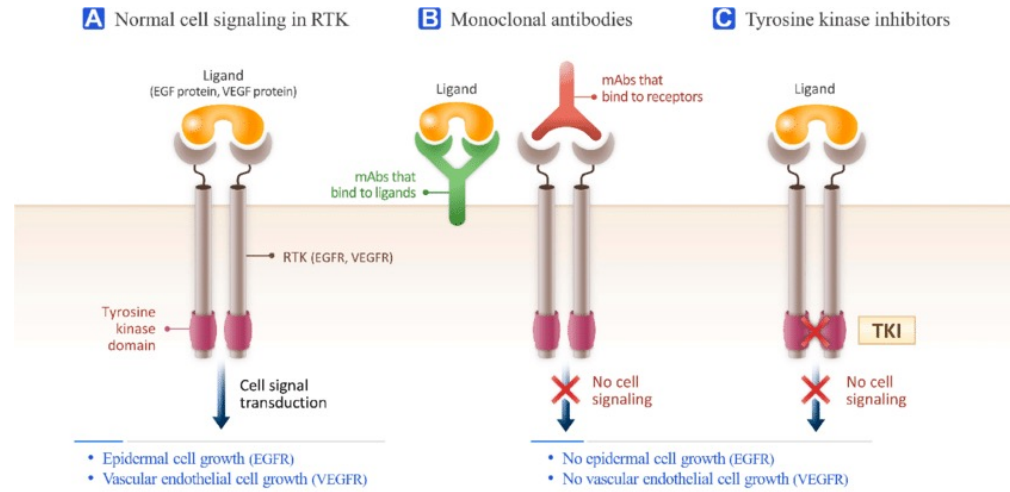


Cílená léčba nádorů

Cílená léčba	Cytotoxické léky
<ul style="list-style-type: none">• Zaměřené na specifický molekulární „přepínač“ v mutované dráze v nádorových buňkách• Mohou pouze zabránit dělení nádorových buněk (blokovat růst a šíření), ale nemusí nádor zmenšit	<ul style="list-style-type: none">• Rozlišují nádorové a normální buňky odlišným způsobem• Zabíjí aktivně se dělící buňky v určité fázi buněčného dělení• Mohou zmenšit nádor, ale ovlivňují také zdravé buňky

- Většina cílených terapií jsou buď **nízkomolekulární léky** nebo **monoklonální protilátky**.
- **Nízkomolekulární léčiva** jsou dostatečně malá, aby se snadno dostala do buněk, takže se používají pro **cíle, které jsou uvnitř buněk**.
- **Monoklonální protilátky**, známé také jako terapeutické protilátky, jsou bílkoviny vyrobené v laboratoři. Tyto bílkoviny jsou navrženy tak, aby se **navázaly na specifické cíle, které se nacházejí na nádorových buňkách**.

Monoklonální protilátky & Nízkomolekulární inhibitory



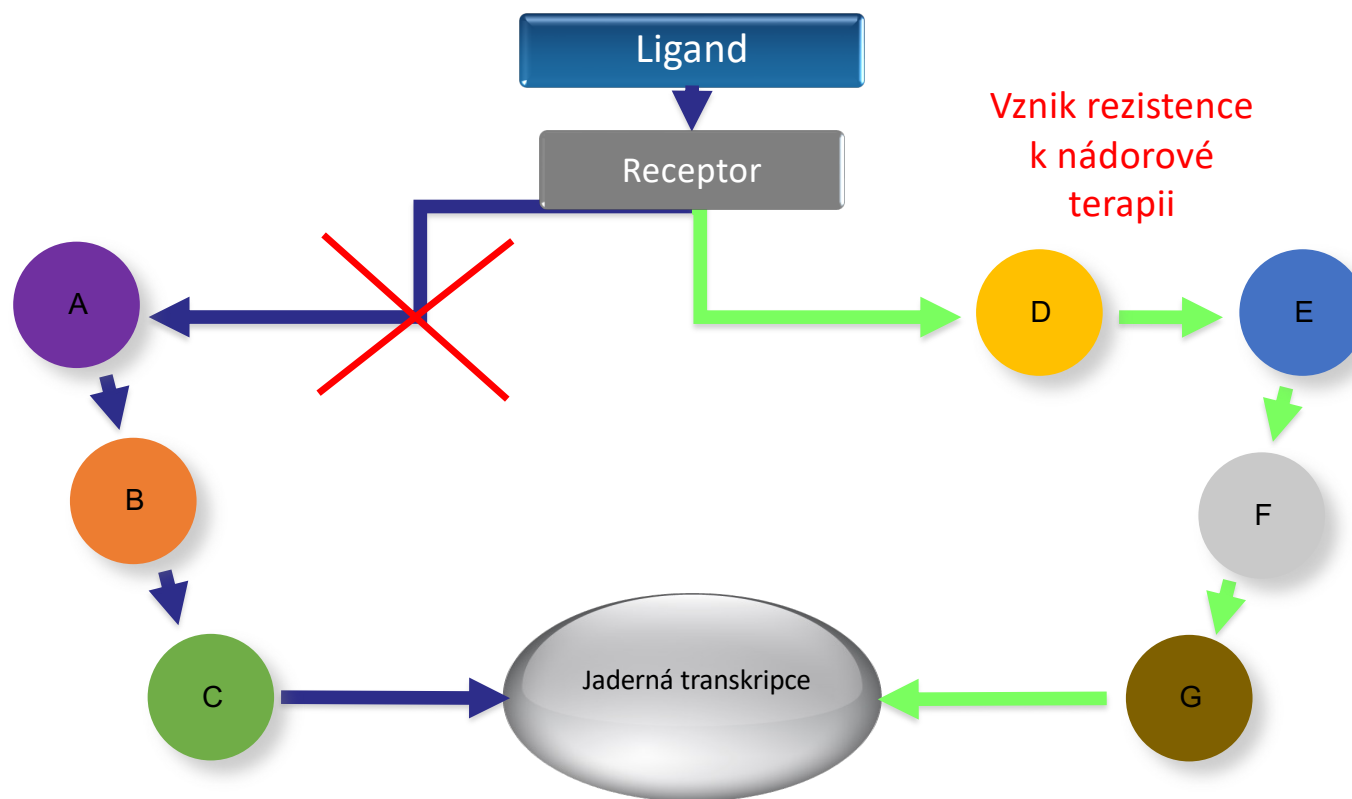
Význam molekulární biologie a genetiky v cílené léčbě nádorů

Pochopení funkce drah pro přenos signálu nám umožnilo zacílit na specifické dráhy, které jsou důležité pro nádorové bujení

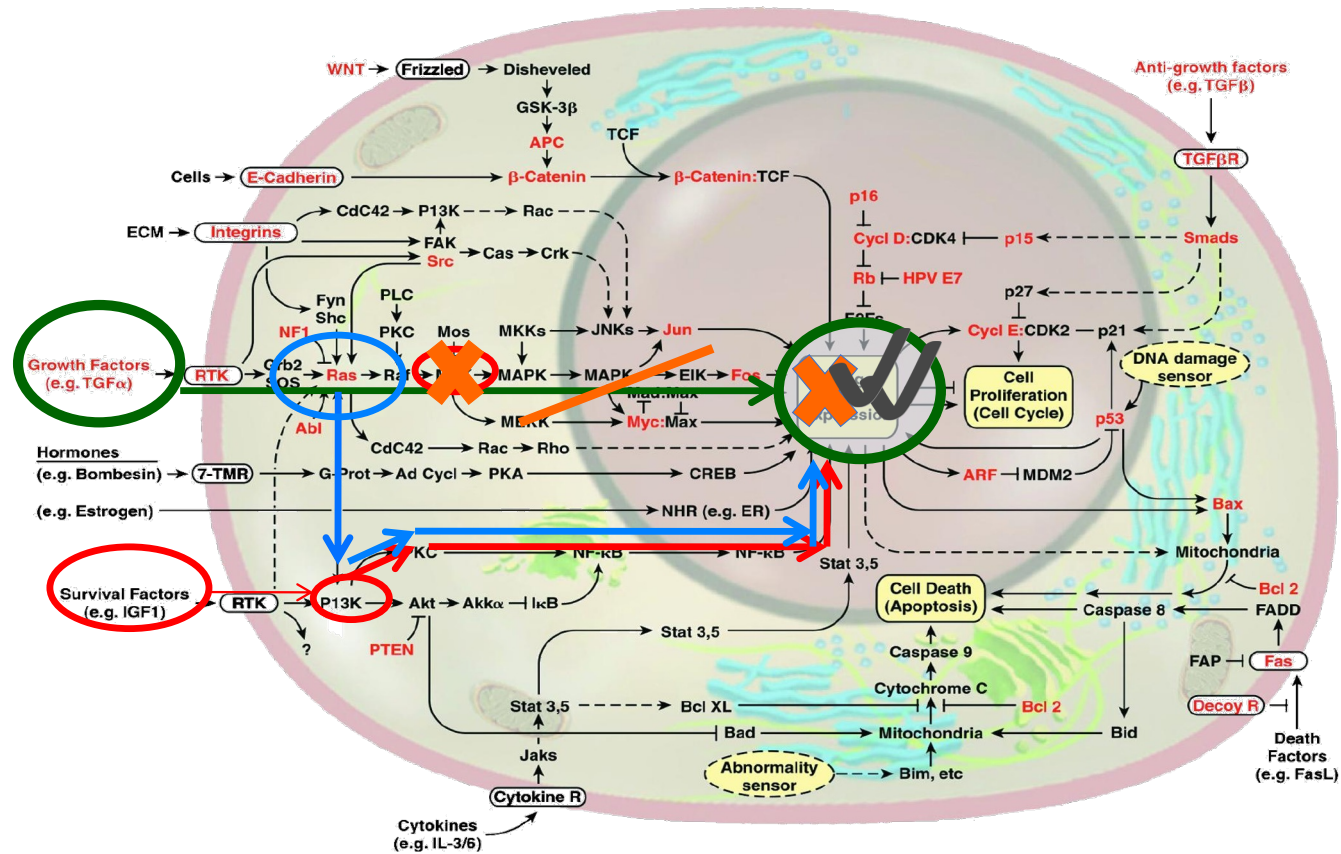


Nádory využívají často více drah, které se podílejí na jejich vzniku. Mohou být použity inhibitory, které působí na více než jeden faktor (inhibitory multikináz), a/nebo kombinovaná léčba.

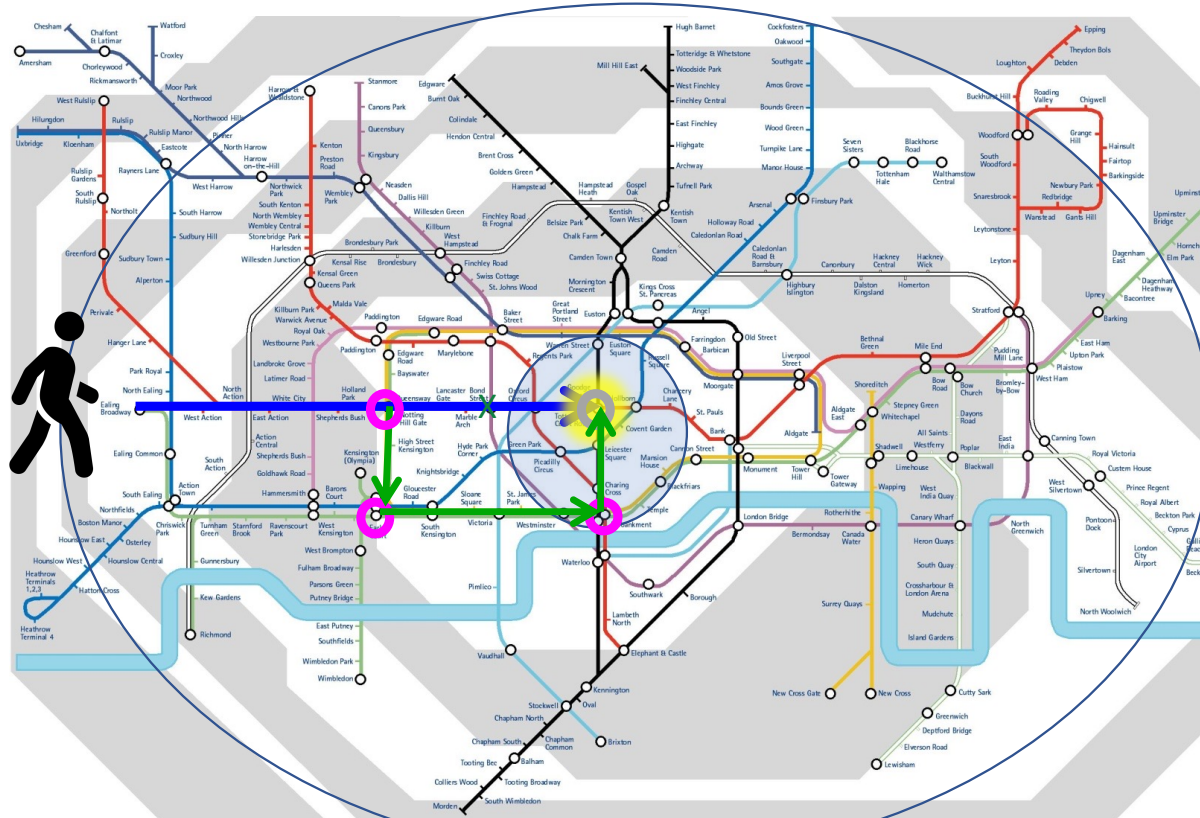
Signál z transmembránového receptoru může být do jádra veden více drahami



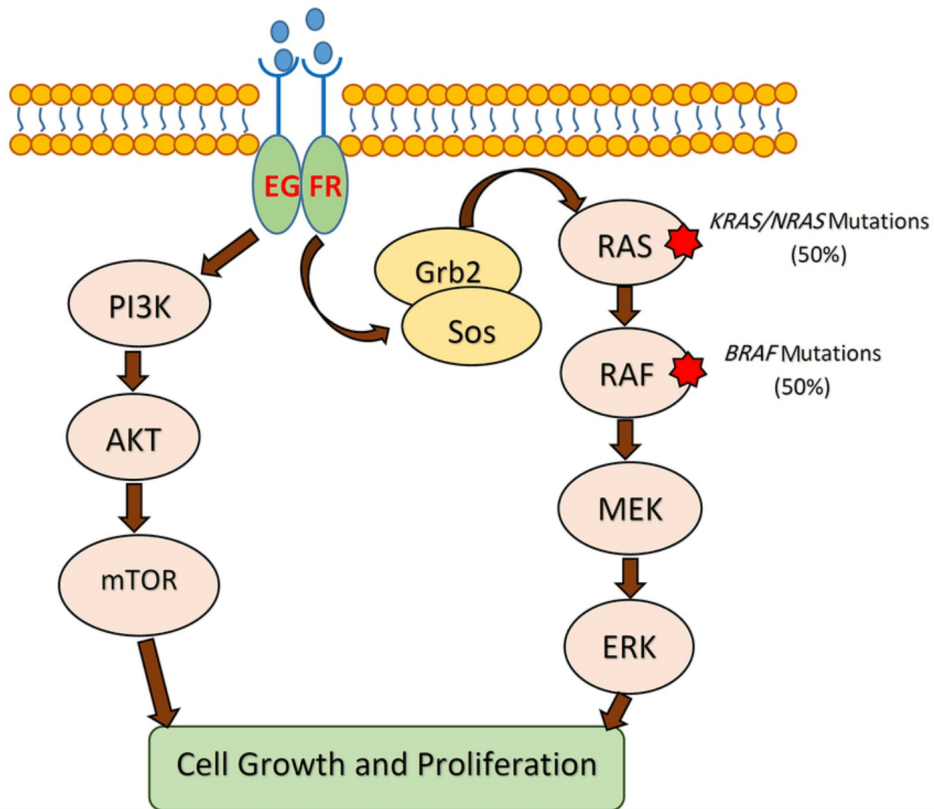
Signál z transmembránového receptoru může být do jádra veden více drahami



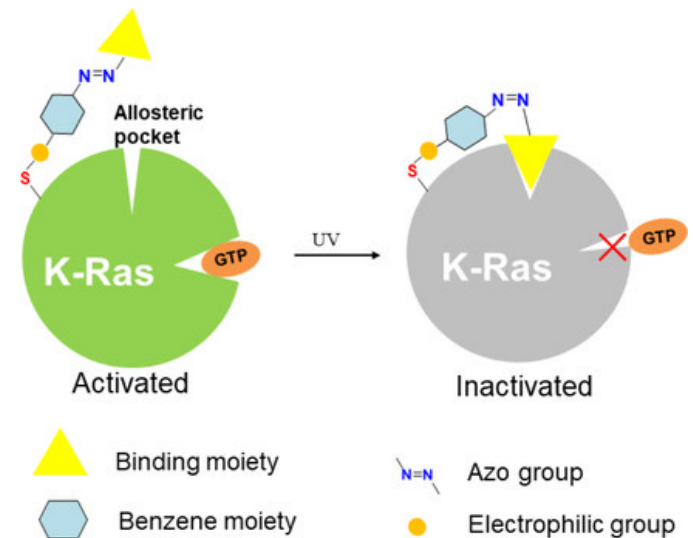
Londýnské metro – analogie signálních drah

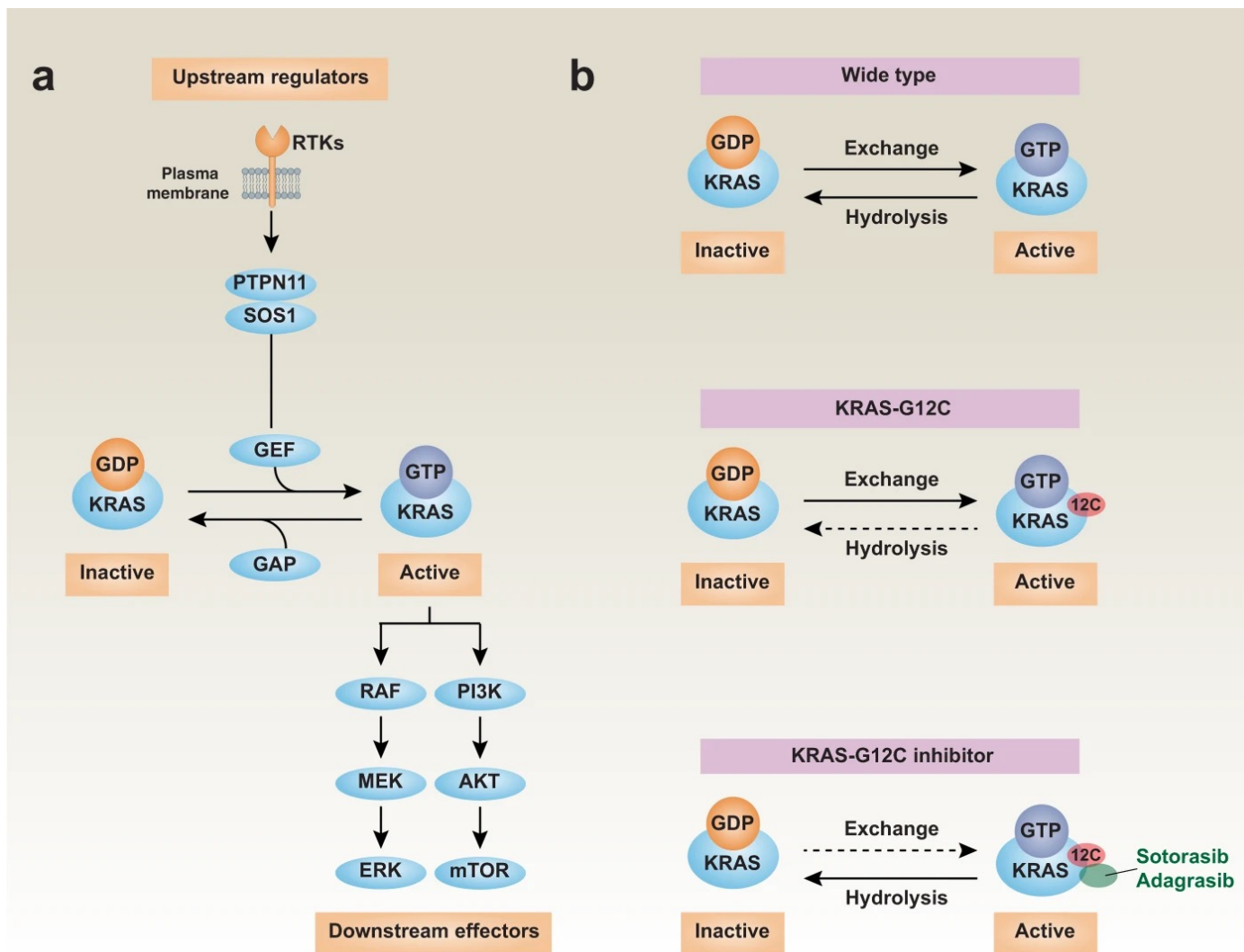


Nešťastný RAS



- KRAS je nejčastěji mutovaným onkogenem u lidských nádorů:
 - 90 % karcinomů slinivky břišní
 - 30-40 % karcinomů tlustého střeva
 - 15-20 % karcinomů plic
- RAS dlouho nebylo možné cílit
 - biochemický i biologický důvod
- Alosterické kovalentní inhibitory (G12C) – Game Changer v cílené terapii nádorů

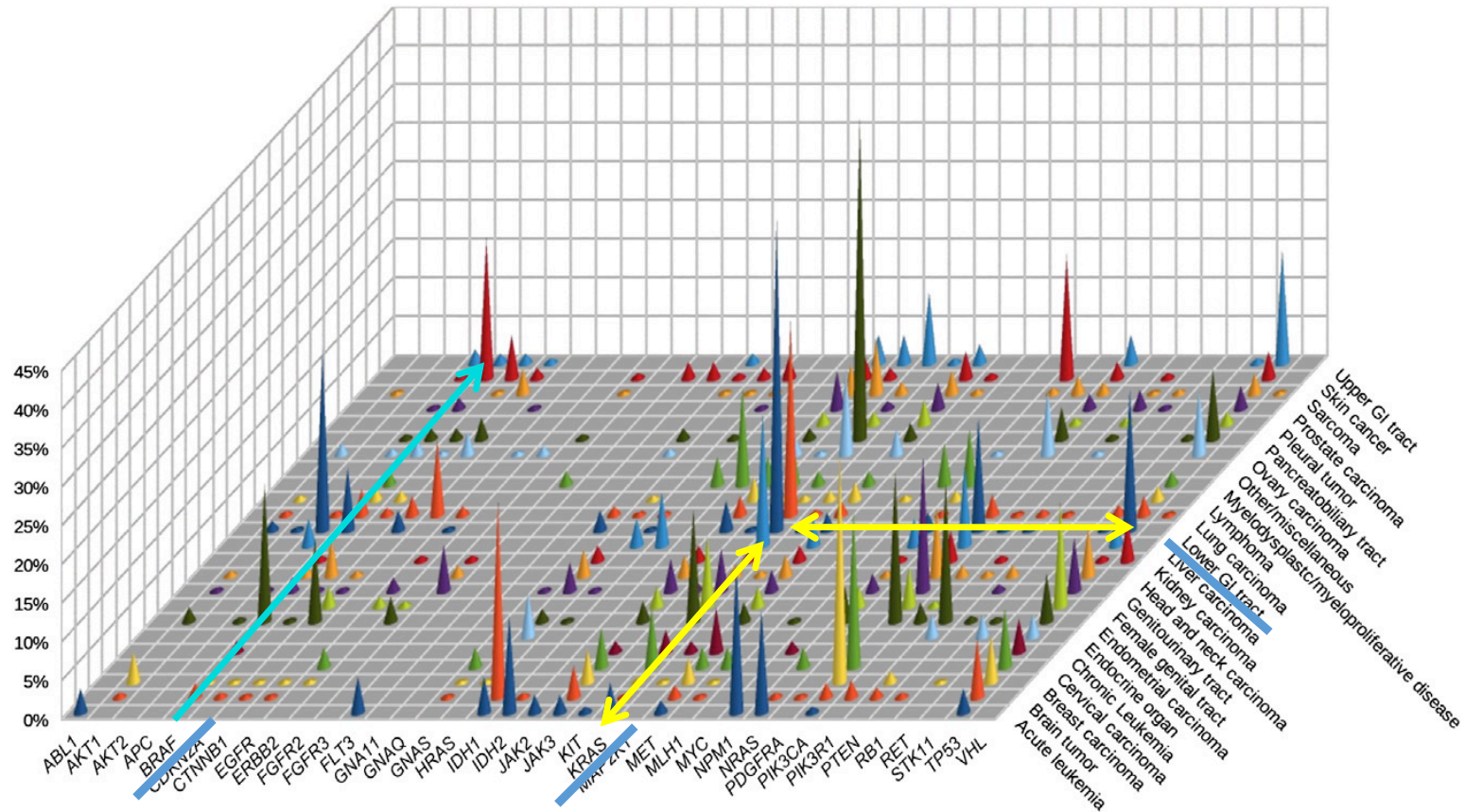




Plenární přednáška AACR 2023
**“Beating KRAS: A 30-year
 Overnight Sensation”**

Souhlas FDA
 Sotorasib – květen 2021
 Adagrasib – prosinec 2022

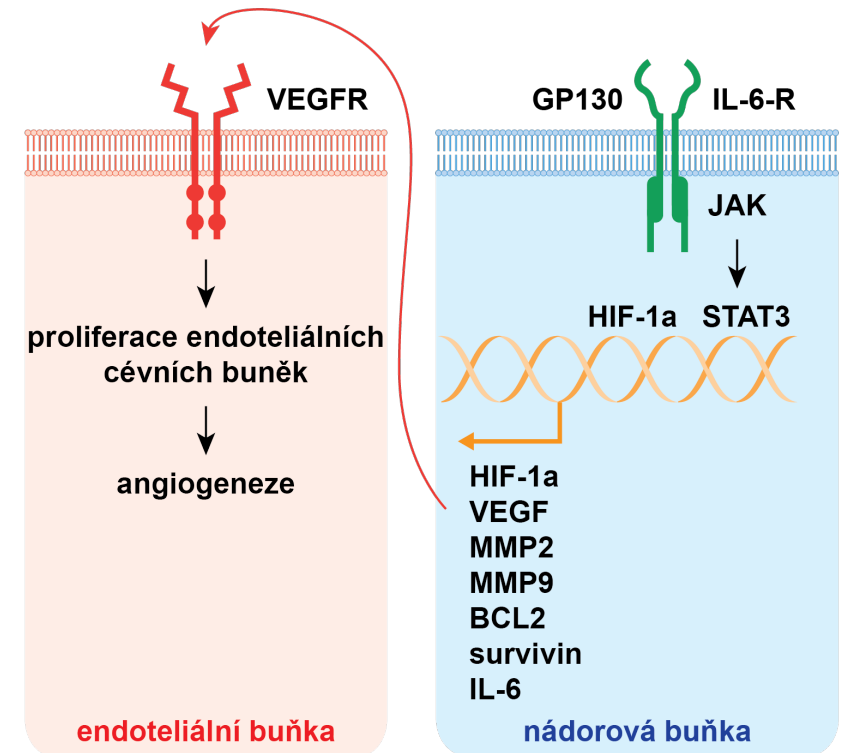
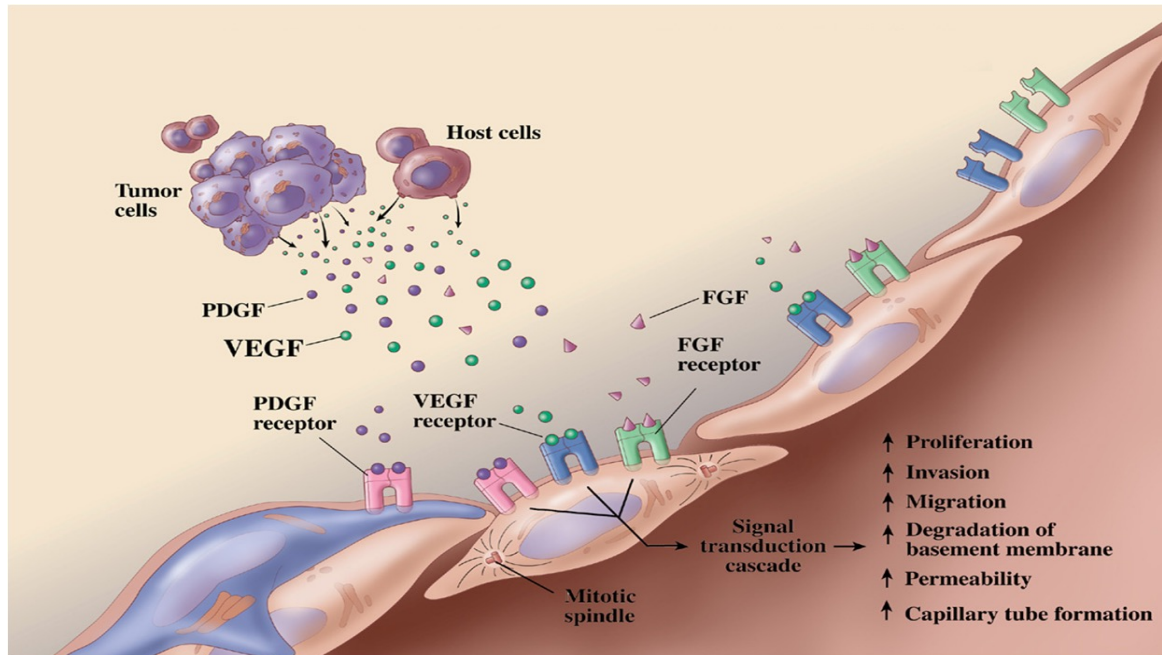
Opakující se genomové aberace v nádorech



MacConaill L 2014

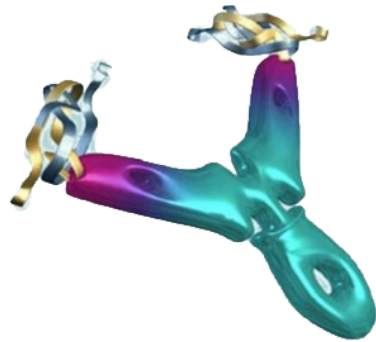
Cílená terapie – antiangiogenní léčba

- Neovlivňuje přímo nádorové buňky
- Ovlivňuje krevní cévy zásobující nádor

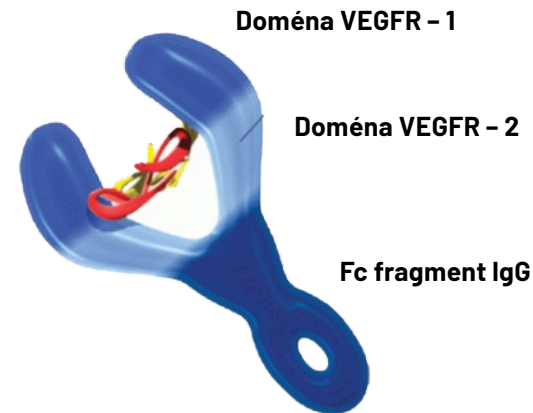


Cílená terapie – antiangiogenní léčba

BEVACIZUMAB/ AFLIBERCEPT



- **Bevacizumab**
 - Rekombinantní humanizovaná monoklonální protilátka proti VEGF (93 % lidská, 7 % myší)
 - Váže se na všechny hlavní lidské izoformy u terapií pomocí VEGF (známé také jako VEGF-A)



- **Aflibercept**
 - Rekombinantní fúzní protein (VEGFR 1 + 2 vazebné části extracelulárních domén fúzované s FC oblastí lidského IgG)
 - Váže lidské izoformy VEGF v extracelulárním prostředí (známé také jako VEGF-A)

Vazba bevacizumabu nebo afliberceptu zabraňuje vazbě VEGF na VEGFR, čímž zabraňuje signalizaci zprostředkované VEGF a inhibuje angiogenezi.

Imunoterapie

Buněčná imunita

- T – lymfocyty
- netvoří se protilátky
- antigeny se naváží na receptory T – lymfocytů
 - přímý kontakt obou buněk -> zničení cizí buňky
- **mohou omezovat nádorové bujení**
- způsobují nepřijetí transplantovaných orgánů (imunosupresivní látky)
- regulují činnost B - lymfocytů

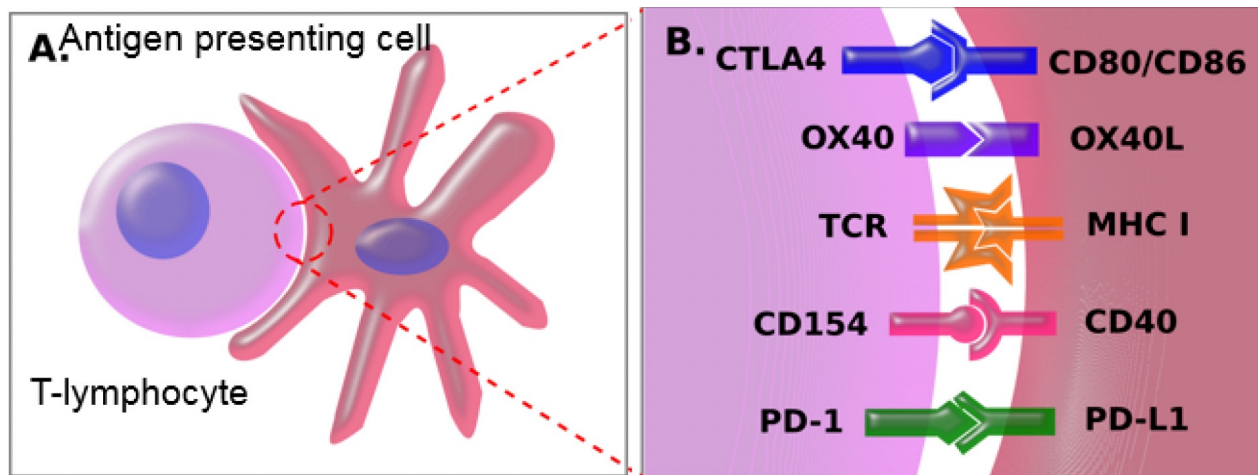
Imunoterapie

Imunitní systém vs. nádor

- Imunitní systém je poslední přirozený nástroj organismu jak eliminovat vlastní buňky, které se vymkly kontrole
- Do boje proti nádorovým buňkám je zapojena většina jeho likvidačních mechanismů
- Genetická podstata vzniku nádorové buňky způsobuje odlišnosti v secernovaných, membránových a nitrobuňčných molekulách
 - nepřítomnost některých molekul
 - nádorové antigeny
- **Nádorově specifické antigeny**
 - nevyskytují se na normálních buňkách
 - produkty mutovaných genů, antigeny onkogenních virů
 - odlišná glykosylace proteinů
- **S nádorem asociované antigeny**
 - odlišná kvantita exprese či změna v časové nebo místní expresi

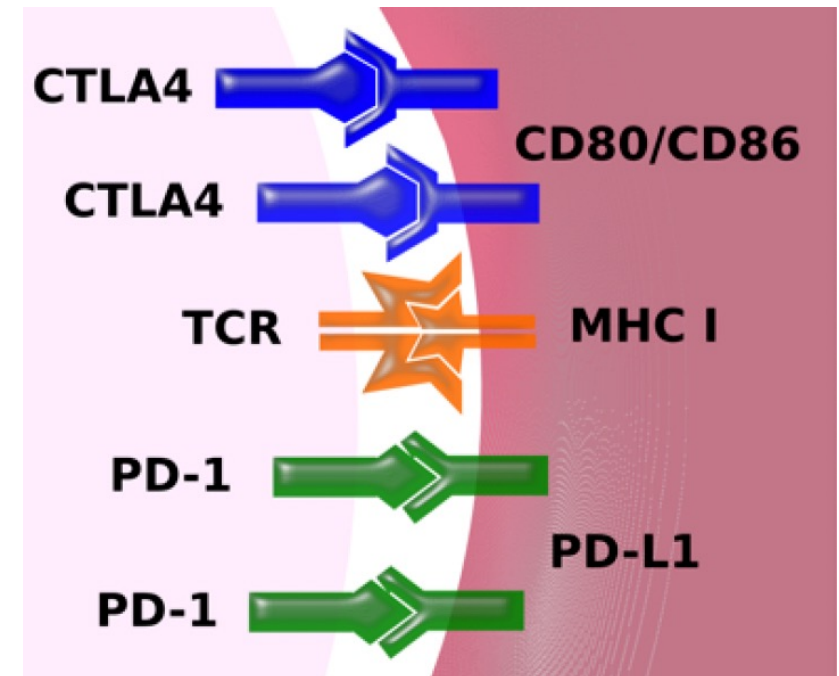
Imunitní systém vs. nádor

- Adaptivní imunitní buňky rozpoznávají jiné buňky prostřednictvím prezentace antigenů.
 - **Malý peptidový fragment** nativního, virového nebo **nádorového proteinu** je "prezentován" na povrchovém komplexu buněk tvořeném bílkovinami, které se nazývají antigeny hlavního histokompatibilního komplexu (MHC).
 - Tyto epitopy jsou pak rozpoznávány proteiny (např. T-buněčným receptorem, TCR) na povrchu jednotlivých T- nebo B-buněčných lymfocytů.
 - Repertoár lidských T-lymfocytů a B-lymfocytů dokáže rozpoznat až 10⁹ jednotlivých vzorů.
 - Výsledek prezentace a rozpoznání antigenu je určen rovnováhou interakcí mezi dvojicemi kostimulačních molekul imunitních kontrolních bodů (např. CTLA4-CD80, OX40-OX40L, CD154-CD40, PD1-PDL1).



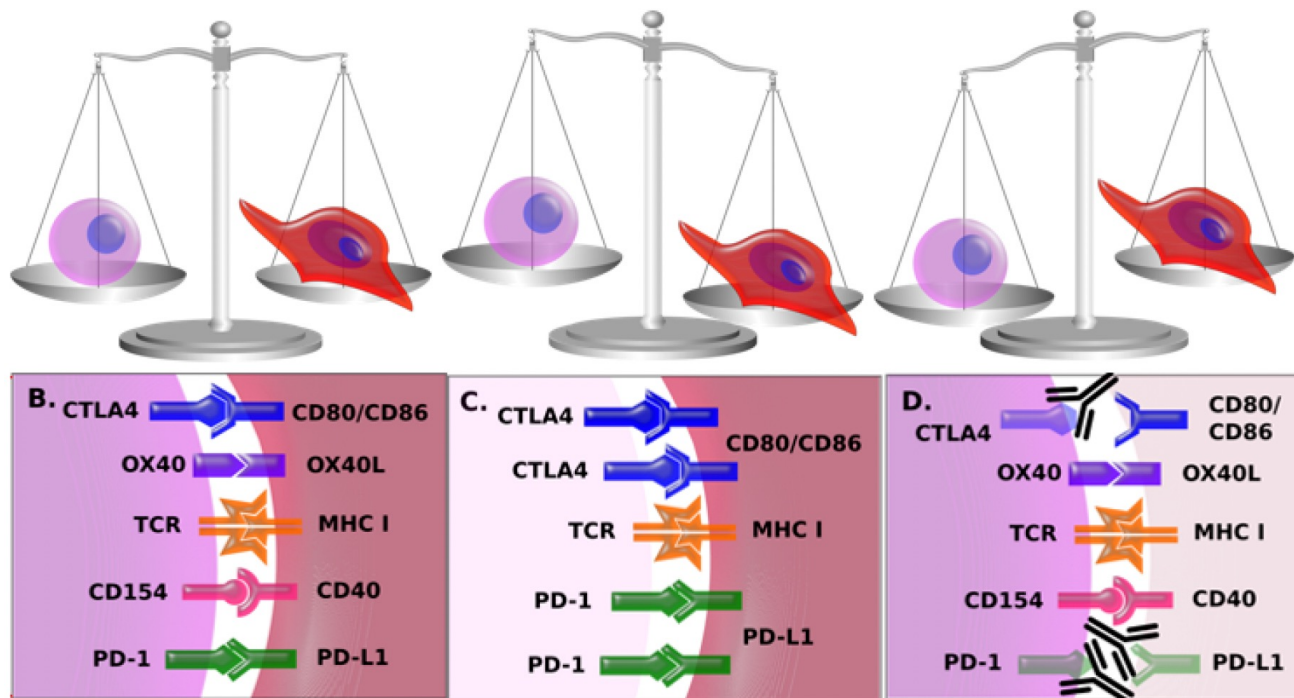
Imunitní systém vs. nádor

- Aktivita imunitního systému je modulována a pečlivě kontrolována kostimulačními molekulami nazývanými **imunitní kontrolní body**.
- Při rozpoznávání antigenu dochází na povrchu imunitní buňky a cílové buňky k interakci dalších molekul, které určují rovnováhu interakce.
 - Pokud jsou signály převážně pozitivní, imunitní buňka se aktivuje a je připravena zaútočit na antigen prezentovaný cílovou buňkou.
 - Pokud je však rovnováha signálů negativní, může dojít k inaktivaci imunitní buňky, někdy i trvalé, a antigen je přijat jako normální/samostatný antigen.
 - Kontrolní body imunitního systému, které mají význam pro nádorová onemocnění, jsou **CTLA4, PD1 a PDL1**.
- **Klíčovým mechanismem, kterým se nádorové buňky vyhýbají imunitnímu systému, je negativní signalizace kontrolních bodů imunitního systému.**



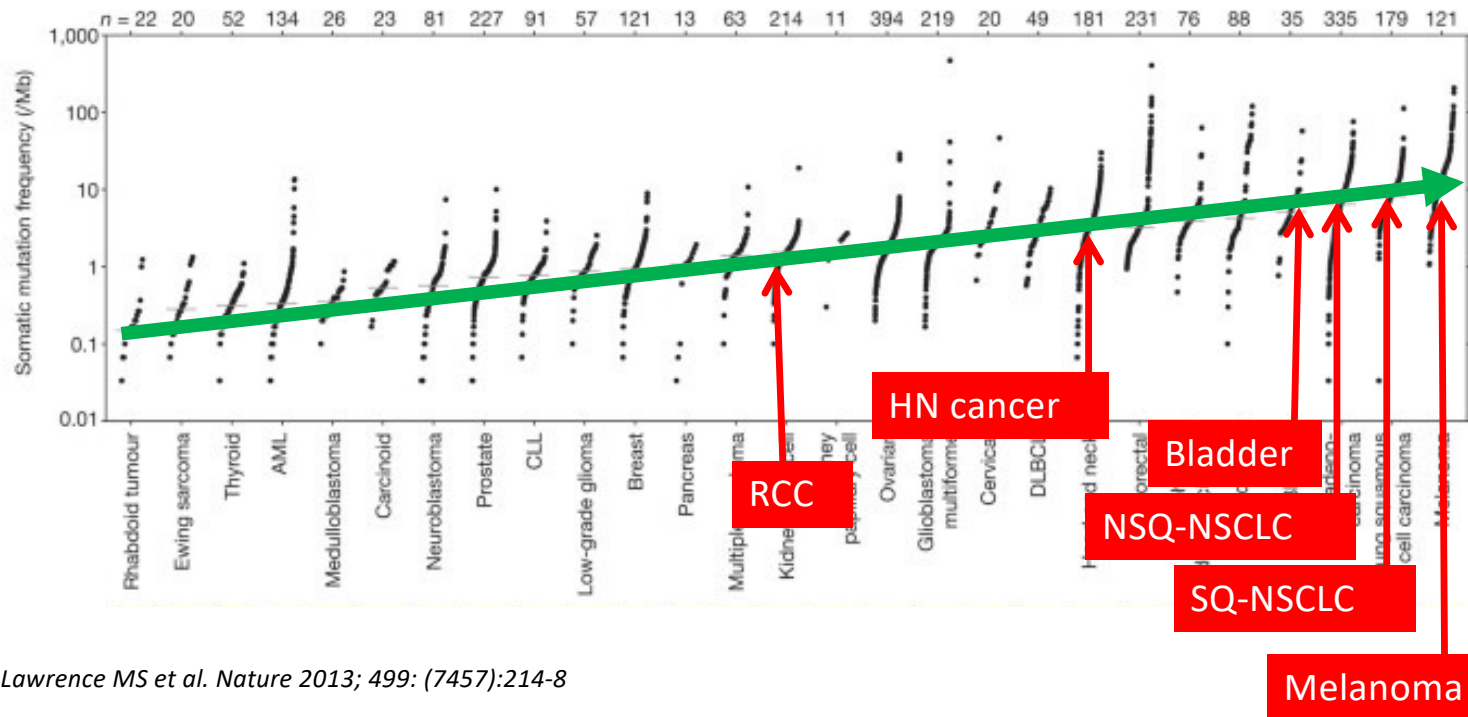
Imunoterapie pomocí inhibitorů imunitních kontrolních bodů

- Molekulární mechanismus účinku inhibitorů kontrolních bodů je poměrně přímočarý; tyto protilátky blokují interakci kontrolního bodu a jeho vazebný partner je fyzicky přerušen pevně navázanou protilátkou.
- Když jsou kontrolní body vhodně aktivovány, pak je imunitní systém v rovnováze.
- Pokud nádorová buňka zvýší signalizaci kontrolních bodů (např. více CTLA4 nebo PDL1), pak je imunitní systém inhibován.
- Blokování protilátek, které blokují signalizaci CTLA4 nebo PD1/PDL1, může tuto rovnováhu obnovit a umožnit imunitnímu systému obnovit kontrolu nad nádorovými buňkami.



Sekvenování exomu – Mutační nálož

Whole Exome Sequencing (WES) – Tumor Mutation Burden (TMB)

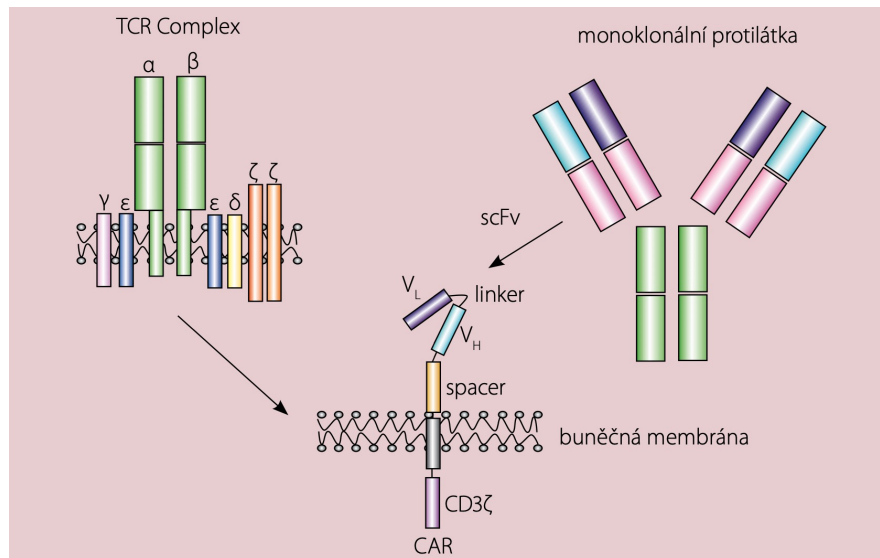


Lawrence MS et al. Nature 2013; 499: (7457):214-8

- Mutační nálož (TMB) je celkový počet somatických mutací na jeden megapár bází nádorového genomu
- Vysoká TMB je definována jako ≥ 10 mutací na jeden megapár bází [mut/Mb]
- Vysoká TMB predikuje citlivost nádoru k inhibitorům imunitních kontrolních bodů (např. atezolizumab, nivolumab – anti PD-1, ipilimumab – anti CTLA-4)

Imunoterapie pomocí CAR T-lymfocytů

- CAR-T léčba využívá vlastní T-lymfocyty pacienta, které jsou v laboratoři geneticky upraveny – je do nich vložena genetická informace pro receptor (CAR = chimérický antigenní receptor), který jednak specificky rozpoznává antigen na povrchu nádorových buněk pacienta, jednak účinněji aktivuje T-lymfocyt.



2. Transfer CAR genu do T-lymfocytů pomocí virového vektoru

3. Expres CAR na povrchu T-lymfocytů a jejich expanze

1. Aferéza a separace T-lymfocytů z periferní krve

4. Infuze CAR-T lymfocytů pacientovi

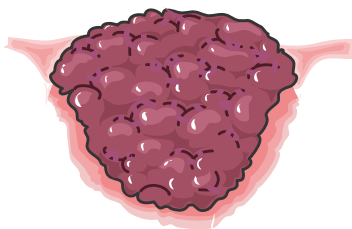
Základní struktura chimérického antigenního receptoru (CAR); nejčastější struktura CAR kombinuje extracelulární část tvořenou vazebným místem pro antigen z monoklonální protilátky a intracelulární doménu T- buněčného receptorového komplexu (TCR), jako například CD3 ζ řetězec

Imunoterapie nebo genová terapie???

INTEGRACE NÁDOROVÉ GENOMIKY DO ONKOLOGICKÉ PÉČE

Makroskopické změny

Morfologické změny

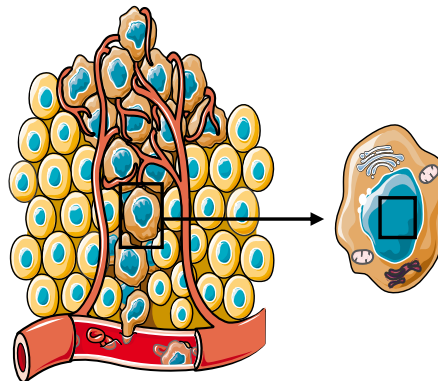


Nádor



Histologie

Histologický biomarker



Nádorové
buňky

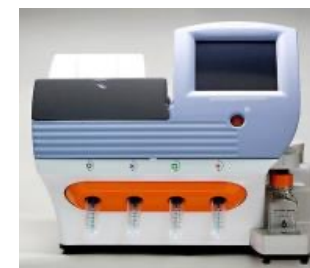


Molekulární analýza

Molekulární biomarker



DNA/RNA

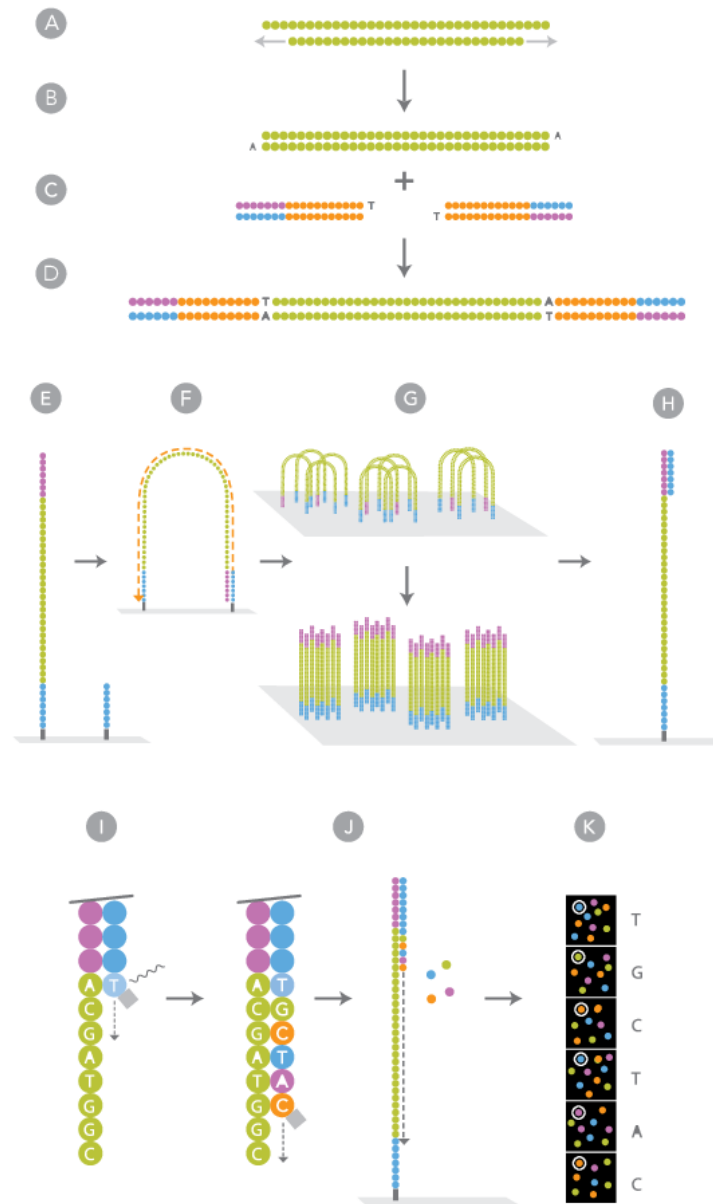


Sekvenování nové generace

Next-generation sequencing (NGS)

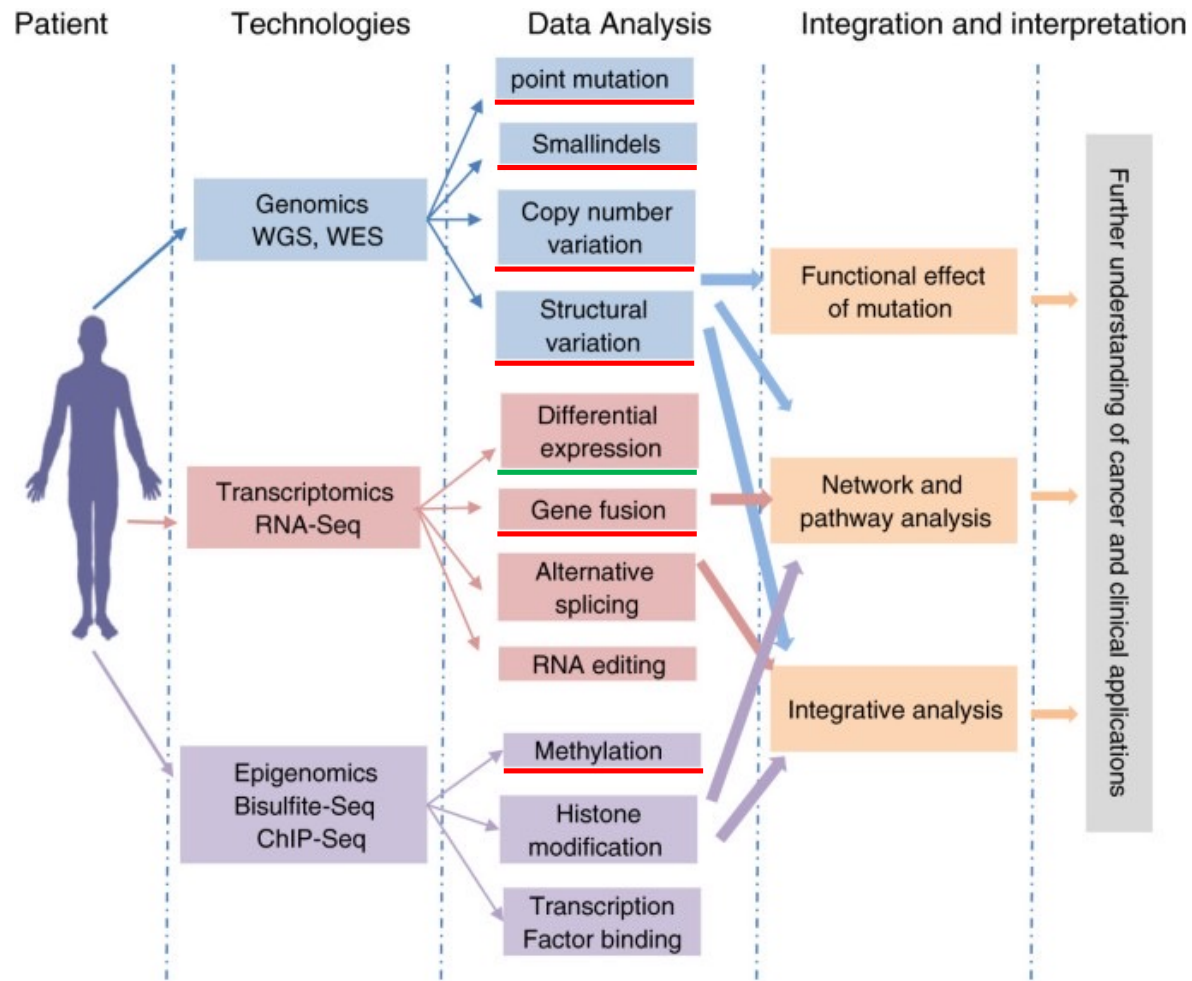
Illumina technology

- Nejrozšířenější technologie masivně paralelního sekvenování
- Sekvenování syntézou s použitím reverzibilních terminátorů
- Klonální amplifikace - můstková amplifikace
- Režim jednoduchého nebo párového čtení konců (*Single or Pair-end read mode*)
- 99% přesnost



- Fragment DNA
- Repair ends
Add A overhang
- Ligate adapters
- Select ligated DNA
- Attach DNA to
flow cell
- Perform bridge
amplification
- Generate clusters
- Anneal sequencing
primer
- Extend first base,
read, and deblock
- Repeat step above
to extend strand
- Generate base calls

Sekvenování nové generace – diagnostické využití



Děkuji za pozornost

