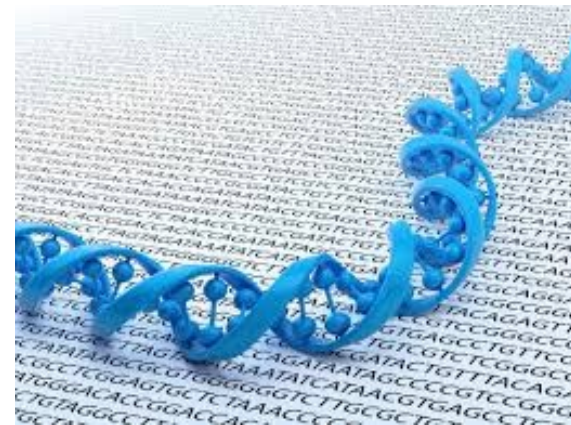


Středoevropský technologický institut (MU)
a
Interní hematologická a onkologická klinika (FN Brno)

Moderní metody analýzy genomu NGS aplikace

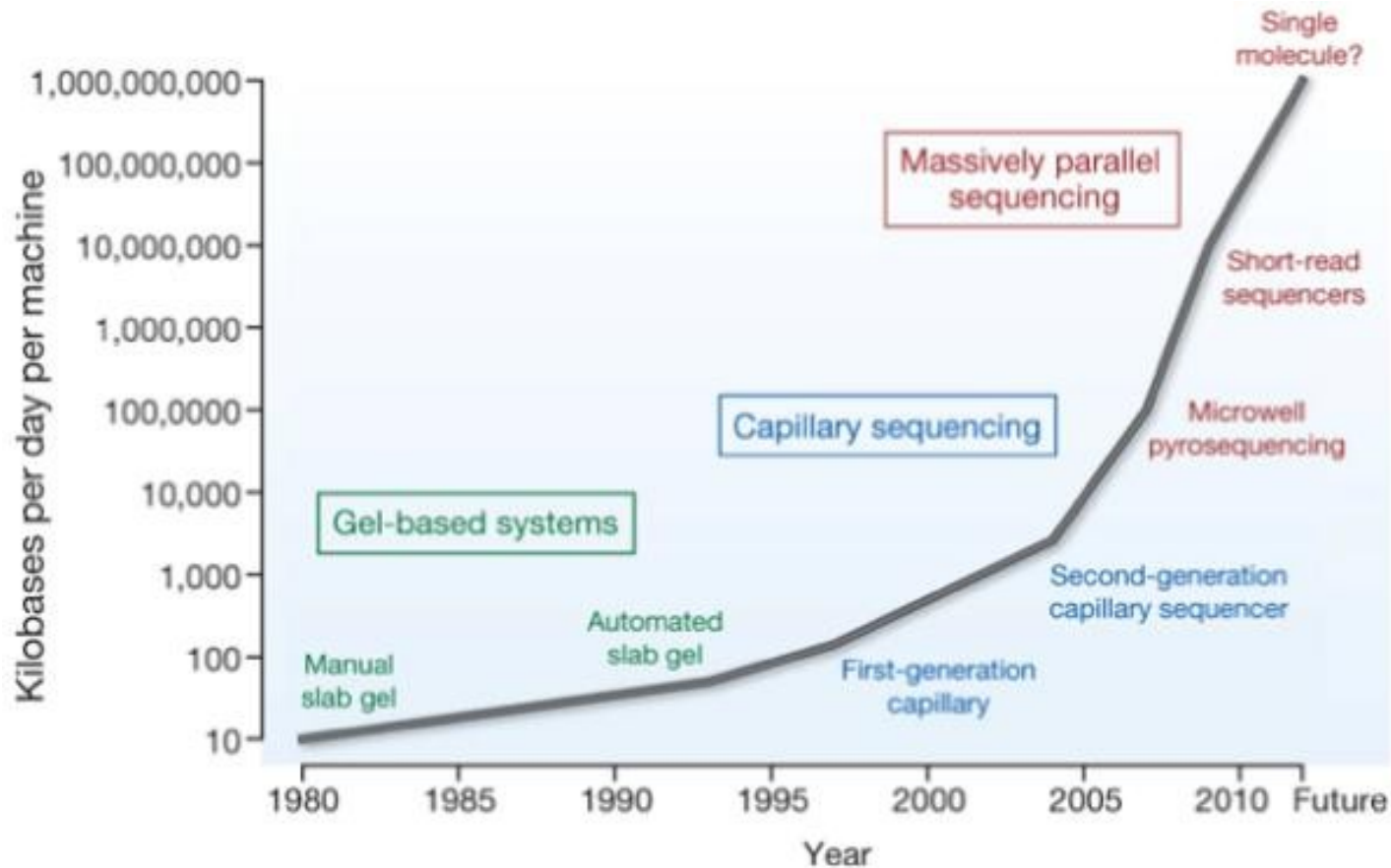
Veronika Navrkalová

Obsah



- Obecné využití NGS
- Aplikace v různých biologických oborech
- Využití v biomedicíně a onkologii
- Hematoonkologie
- Aplikace při studiu CLL a využití na našem pracovišti

Vývoj sekvenování



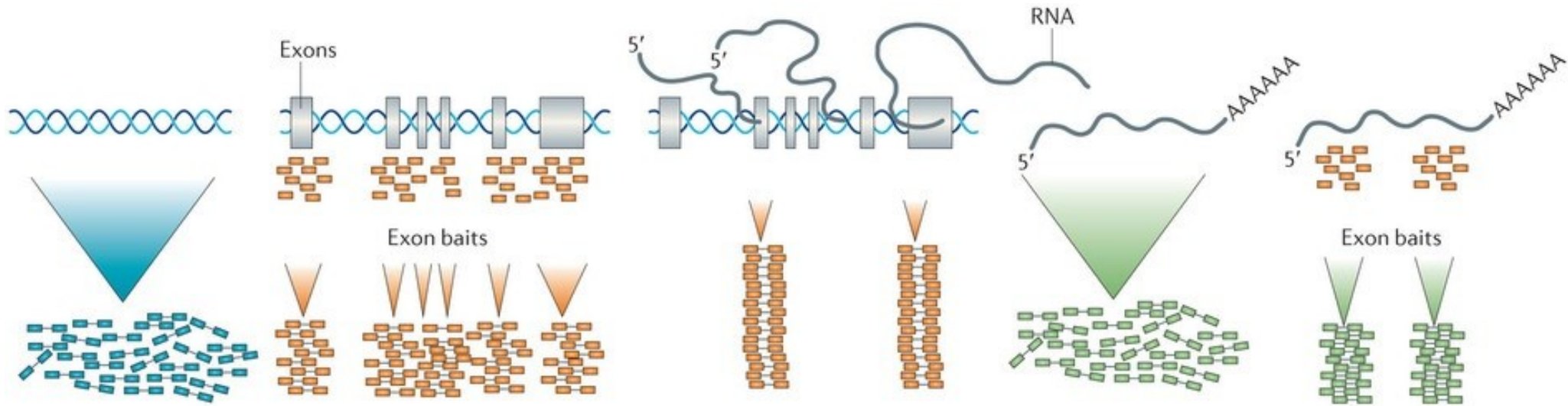
Stratton 2009

Obecné využití NGS

- SNV = single nucleotide variants (mutace/SNP)
- CNV = copy number variation (inzerce/delece)
- strukturní aberace (translokace/inverze)
- genová exprese (mRNA)
- epigenetika (metylované oblasti)
- interakce DNA-protein



Přístupy NGS



Whole genome

Whole-exome (1%)

PCR amplicon

Transcriptome RNA

Exon capture transcriptome

- Predominant applications:
- Structural variants
 - Point mutations
 - Copy number variation

- Predominant applications:
- Point mutations
 - Copy number variation

- Predominant applications:
- Point mutations
 - Deletions

- Predominant applications:
- Gene expression
 - Gene fusions
 - Splice variants

- Predominant applications:
- Gene expression
 - Gene fusions
 - Splice variants

Genom

Exom

Amplikon

Transkriptom

Simon 2013



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

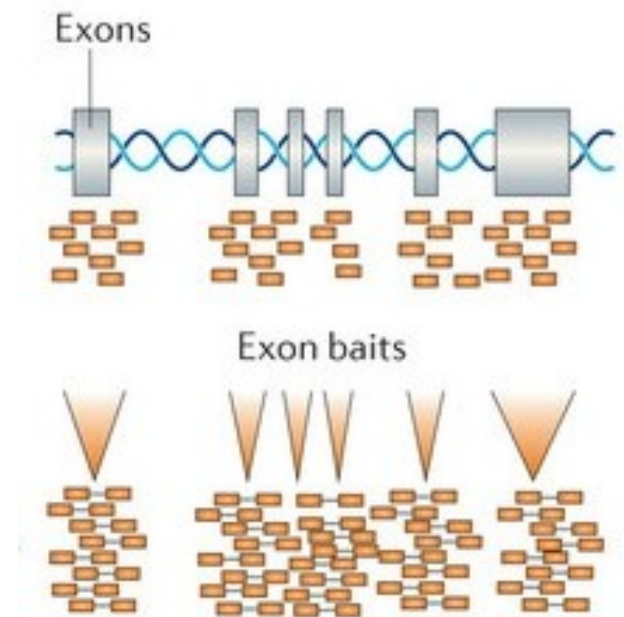
Celogenomové sekv. = WGS

Sekvenace celé chromozomální DNA → úplná informace o genomu (pokryty i promotorové a regulační sekvence)

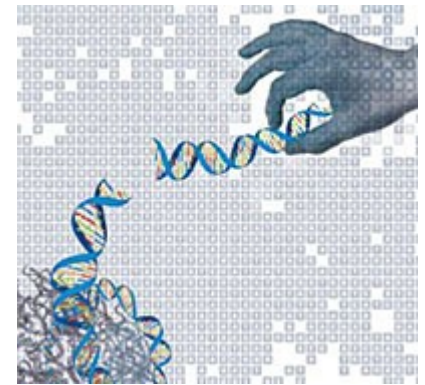
- 1. *De novo* assembly** - využívá překryvů sekvencí, předpokladem dostatečné pokrytí (>10x)
- 2. Resekvenování** - mapování na referenční sekvenci

Exomové sekv.

- WES = whole exome sequencing
- Sekvenování jen kódujících oblastí = **exom** (asi 1 % genomu)
- **Efektivnější:** rychlost, cena, vyšší pokrytí



Cílené sekv.



- Targeted sequencing
- Identifikace vzácnějších variant pod detekčním limitem Sangerova (až 1% při vysokém pokrytí)
- **Výhody:** rychlost, cena, méně prostoru pro skladování dat
- Pro sekvenování velkého počtu vzorků (screening) nebo validaci genetických variant v populaci

Tři způsoby přípravy knihovny

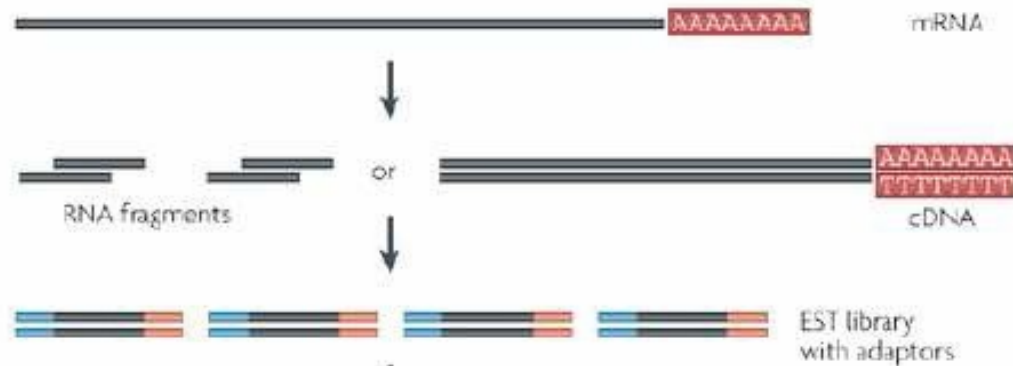
1. **multiplex PCR**: AmpliSeq (Life Tech.) až 6144 párů primerů
2. **single-plex PCR**: Microdroplet PCR (RainDance Tech.), Access Array System (Fluidigm)
3. **targeted capture** (cílený „záchyt“ sondami) s následnou multiplex PCR: TrueSeq Amplicon (Illumina), HaloPlex (Agilent Tech.), SeqCap EZ technology (Roche NimbleGen)

Klinické využití

- Nejvhodnější „targeted capture“
- **Komerční kity:**
 - diagnostické kity (panely genů různých onemocnění)
 - nádorové panely (záchyt hereditárních nádorových onemocnění)
 - panely genů dle přání zákazníka

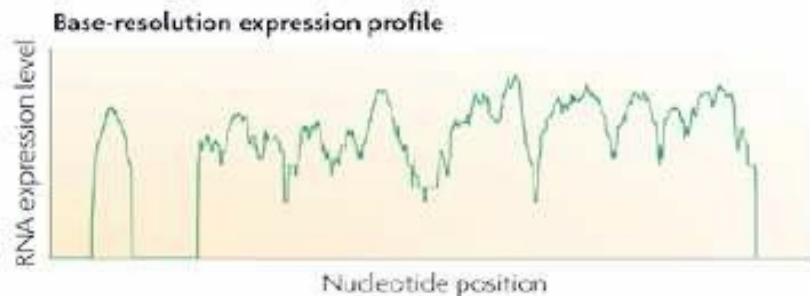
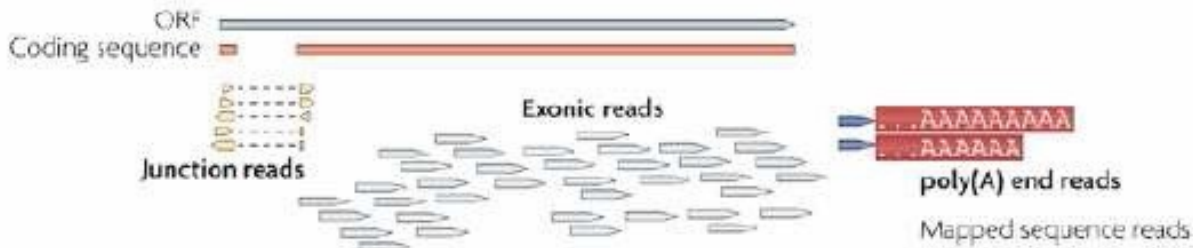


Sekv. transkriptomu = RNA seq



Short sequence reads

```
ATCACAGTGGGACTCCATAAATTTTCT
CGAAGGACCAGCAGAAACGAGAGAAAA
GGACAGAGTCCCCAGCGGGCTGAAGGGG
ATGAAACATTAAAGTCAAACAATATGAA
...
```



Transkriptom =
soubor všech
molekul RNA
(mRNA, rRNA,
tRNA a noncoding
RNA)

Wang 2009

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

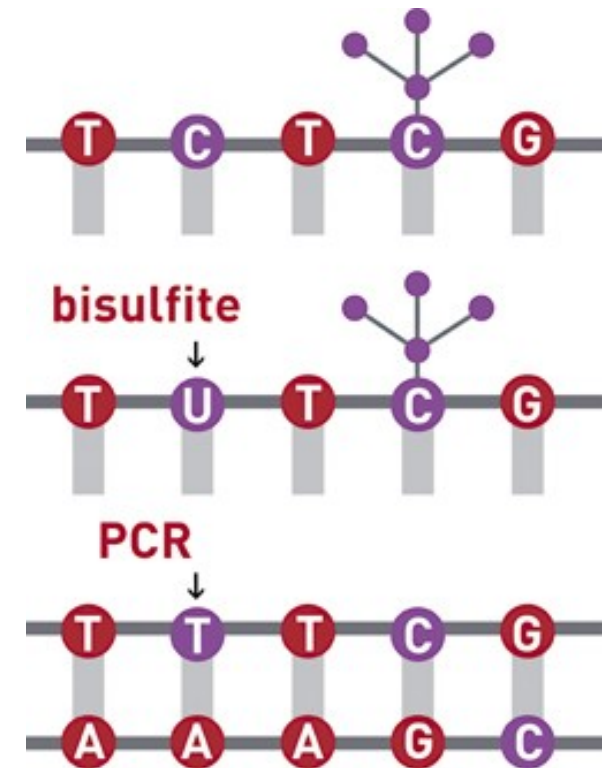
- Detekce somatických **mutací**, mezigenových **fúzí** a alternativních **sestřihových variant**
- Studium **ncRNA**: regulace proliferace, diferenciace a apoptózy, regulace genové exprese (miRNA)
- Na rozdíl od čipových technologií není limitována předchozí znalostí genomu, dynamickým rozlišením nebo zkříženou (cross) hybridizací

NGS a epigenetika

Metylace DNA: 80% C, umlčení transkripce genů

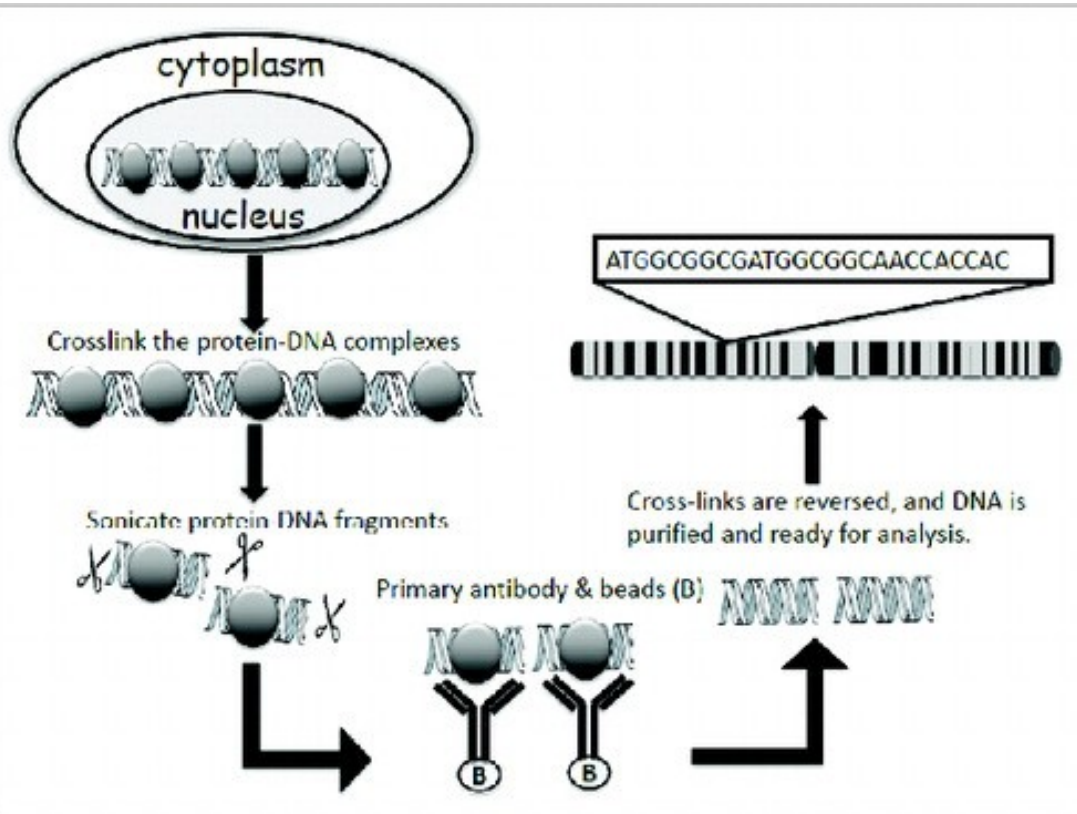
Bisulfitová konverze + NGS:

- konverze C → U, Met-C se nemění
- přesná identifikace jednotlivých metylovaných bazí



ChIP- Seq

- Sledování interakcí mezi proteiny, DNA a RNA → vazebná místa pro TF, histony, a další proteiny
- Regulace genové exprese, epigenetické modifikace chromatinu

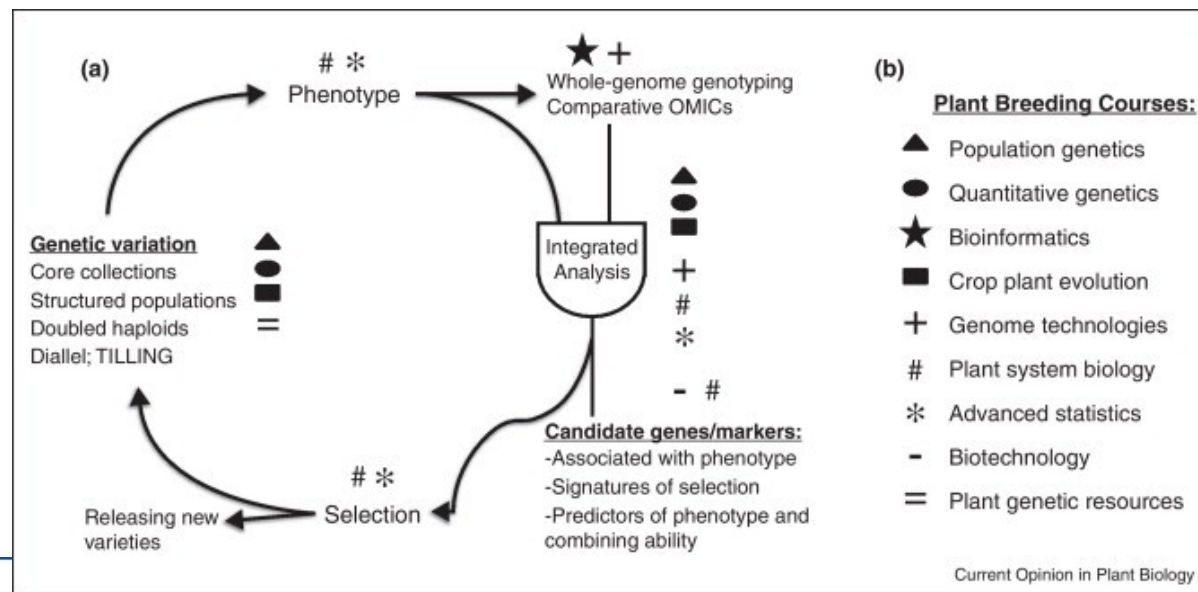


Mundade 2014

Mezioborové využití NGS

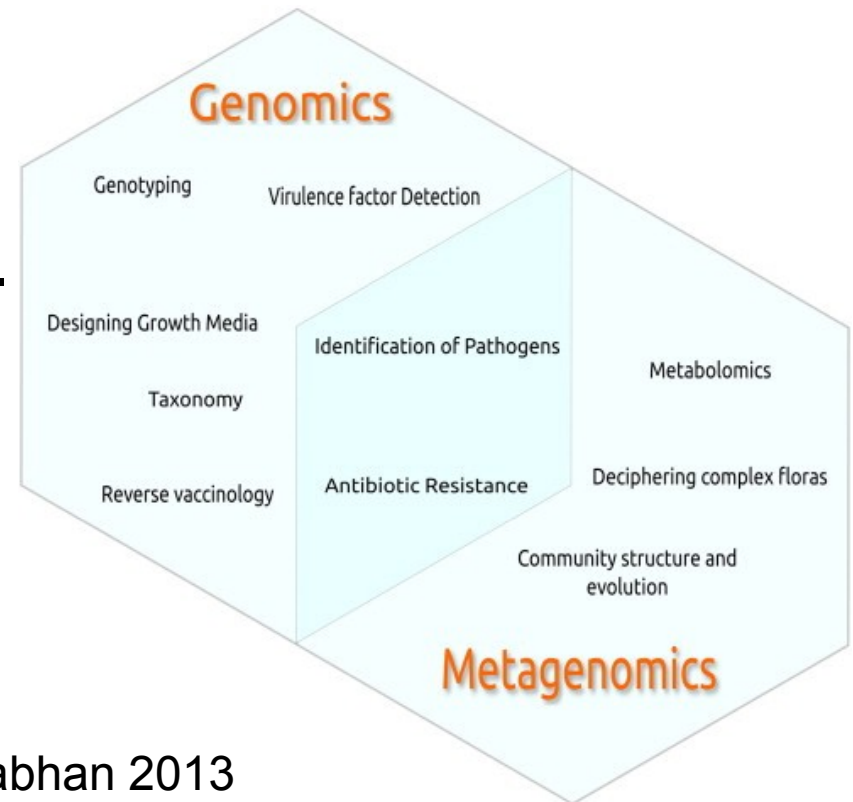
Studium **druhové diverzity** (genotypizace):

- fylogeneze živočišných druhů (Ellegren 2012)
- identifikace nových virových variant (Kapgate 2015)
- šlechtění plodin v zemědělství (Fridman 2012)



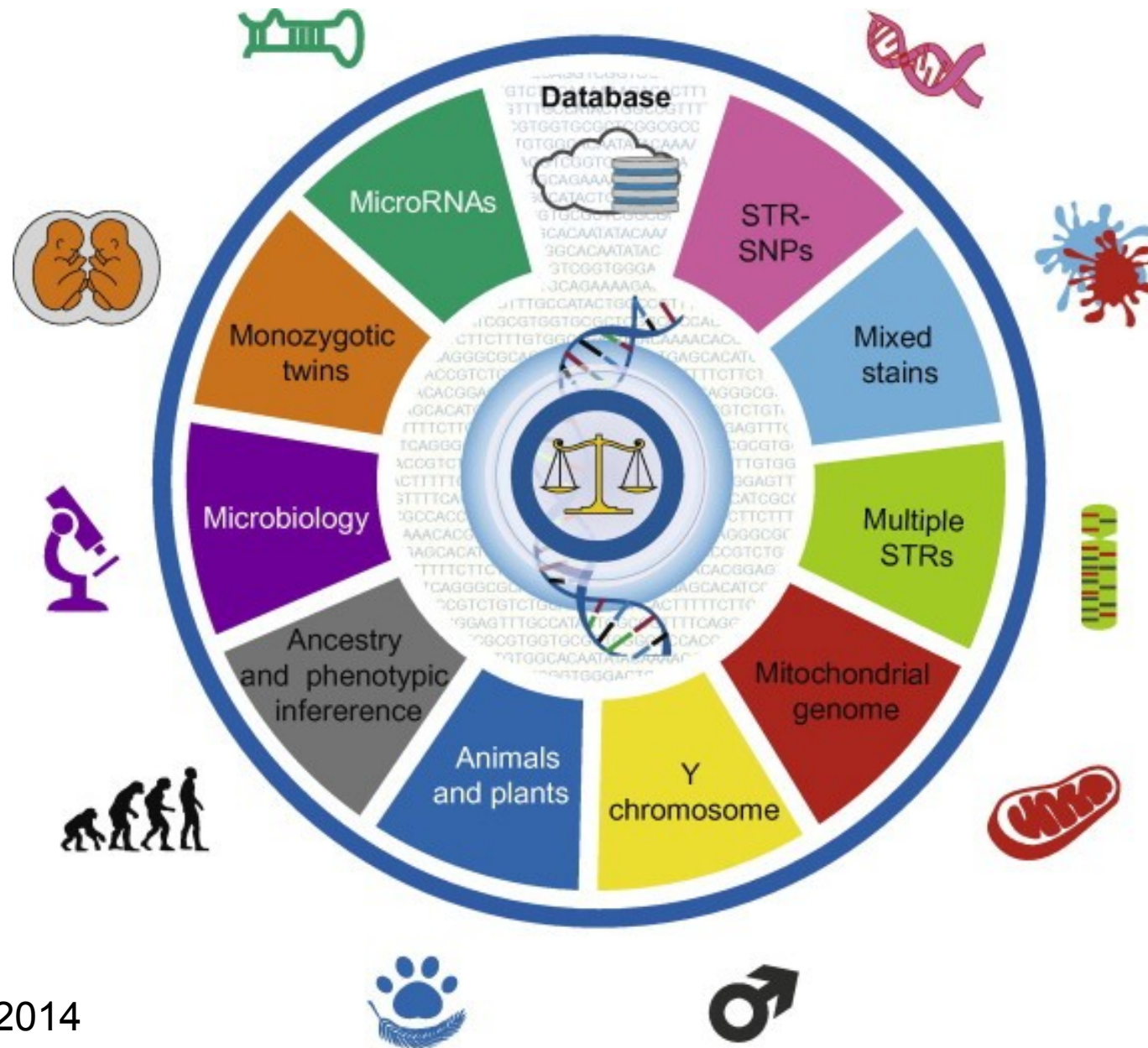
Metagenomika: studium mikrobiálního složení v různých typech prostředí (střevní mikroflóra, zubní plak, půda, korálové útesy, mořské dno)

- bez potřeby kultivace
- identifikace patogenů, virulence, rezistence, atd.



Padmanabhan 2013

Forenzní genetiká:



Yang 2014

Využití v medicíně



- molekulární diagnostika dědičných chorob a infekčních onemocnění
- prenatální diagnostika (neinvazivní, z fetální DNA v mateřské plazmě)
- farmakogenomika (identifikace nových terapeutických cílů, studium rezistence)
- onkologie!

Onkologie

- molekulární diagnostika nádorů
- analýza prognostických markerů
- objasnění mechanismů kancerogeneze (mutační profily nádorů)
- hledání nových rekurentně mutovaných genů (nezachytitelných standardními metodami)

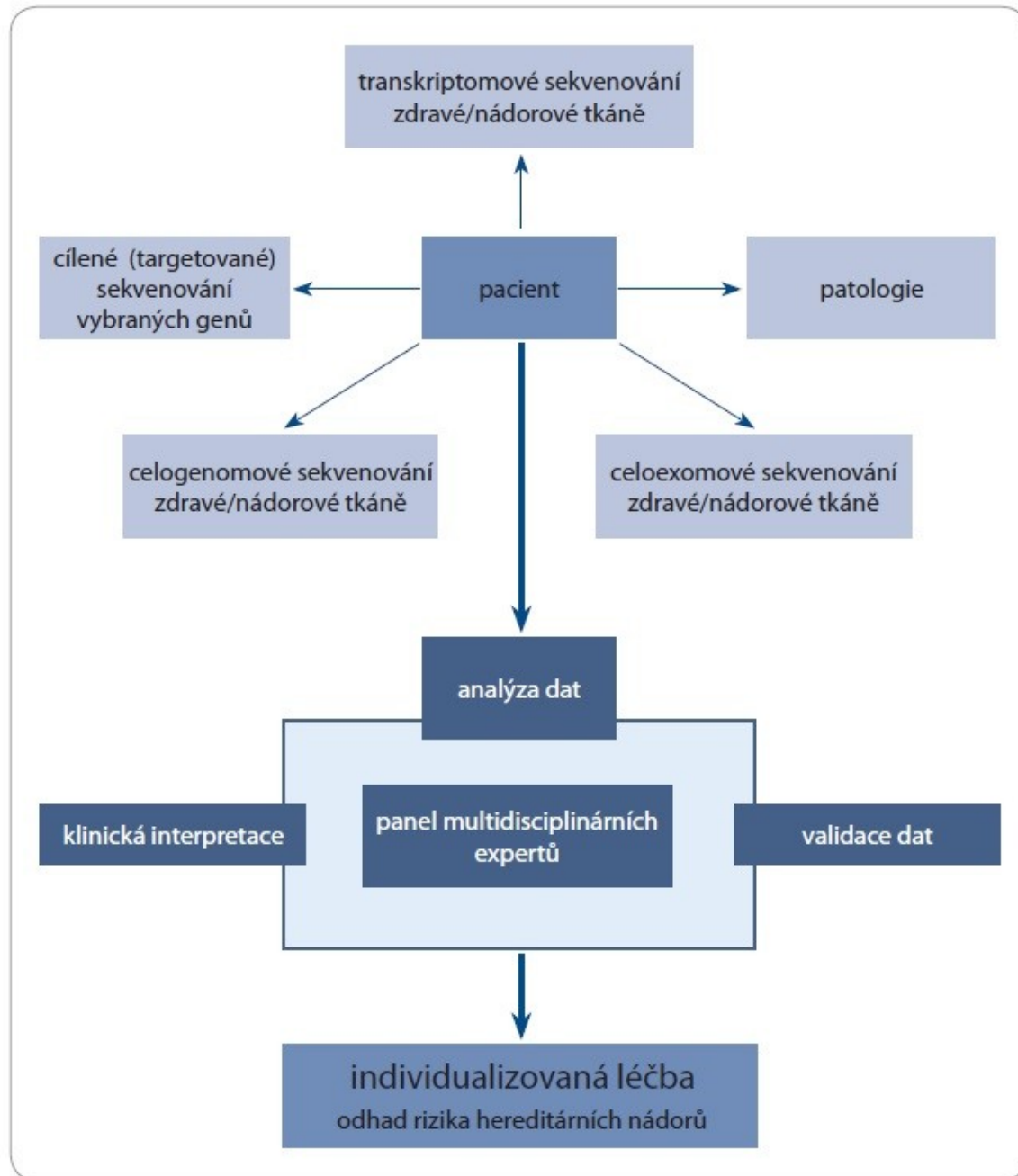
Přínos NGS v onkologii

- **RNA seq**: objev nových **fúzí genů** → mohou být využity jako dg markery a potenciální terapeutické cíle (tkáňově specifické nebo univerzální)
 - translokace *EML4- ALK* u nemalobuněčného karcinomu plic
 - translokace *TMPRSS2- ERG* u karcinomu prostaty

(Dong 2012)

- Identifikace **germinálních mutací** (WES):
 - familiární nádory pankreatu (PALB2)
 - dědičný feochromocytom (MAX)
 - familiární melanom (MITF)
- **Cílené sekvenování:**
 - detekce 21 nových mutací BRCA asociovaných s hereditárními nádory mléčné žlázy a vaječníku (neodhalitelné Sangerem a MLPA) (Walsh 2010)

NGS → personalizovaná léčba



Koubkova 2014;
Guan 2012

Využití NGS v onkologické praxi

International Cancer Genome Consortium (ICGC):
Cancer GenomeProjekt – charakterizace
genomických, transkriptomických a
epigenomických změn u 50 nejdůležitějších
nádorů



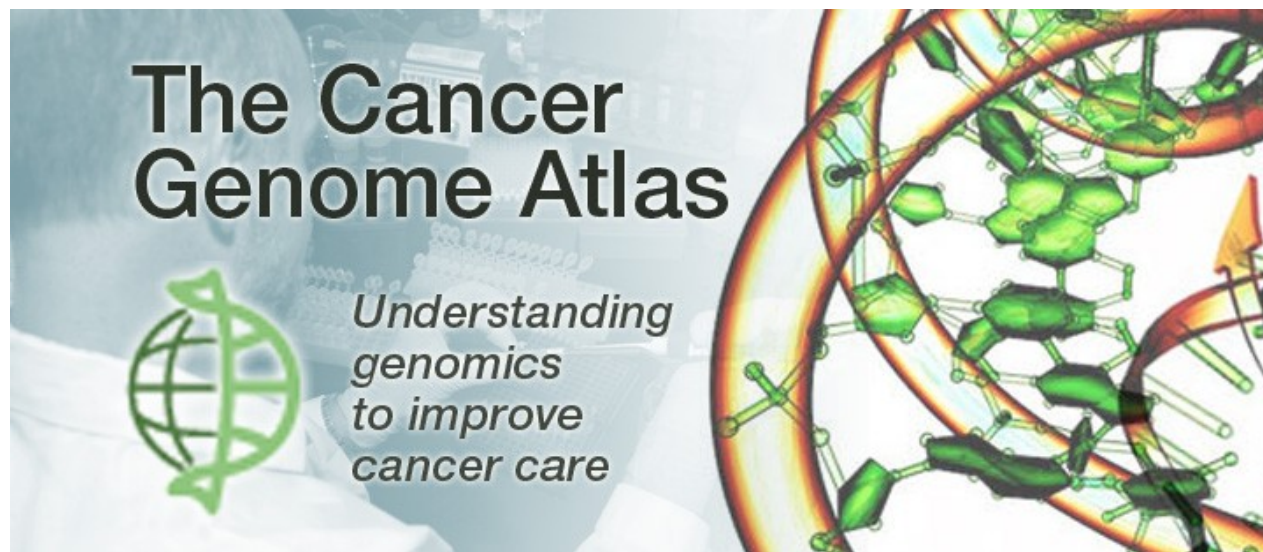
International
Cancer Genome
Consortium



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

National Cancer Institute (NCI): projekt vytvoření atlasu nádorových genů – **The Cancer Genome Atlas (TCGA)** za účelem zlepšit nádorovou prevenci, včasnou detekci a léčbu

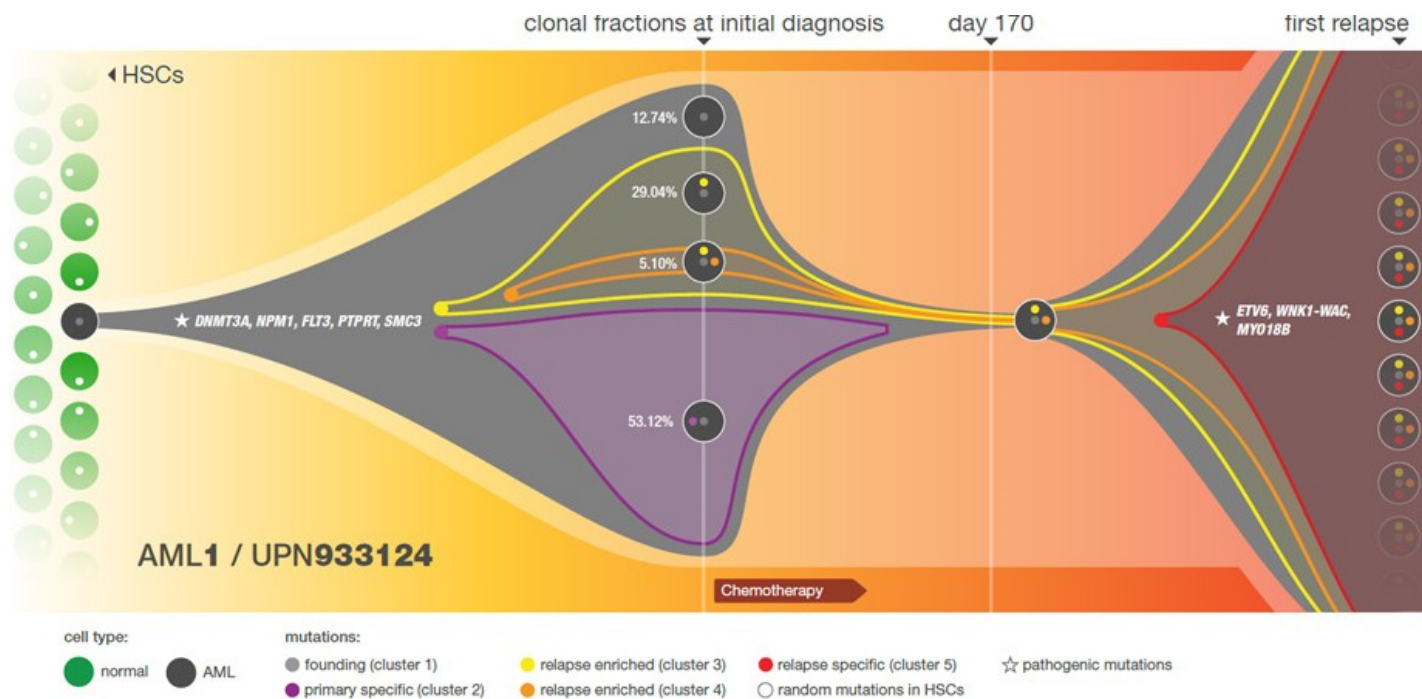


Hematoonkologie

První **celogenomový** sekvenační projekt 2008:
porovnání nádorového a normálního vzorku
téhož pacienta s **AML** → identifikace osmi
nových somatických mutací (Ley 2008)



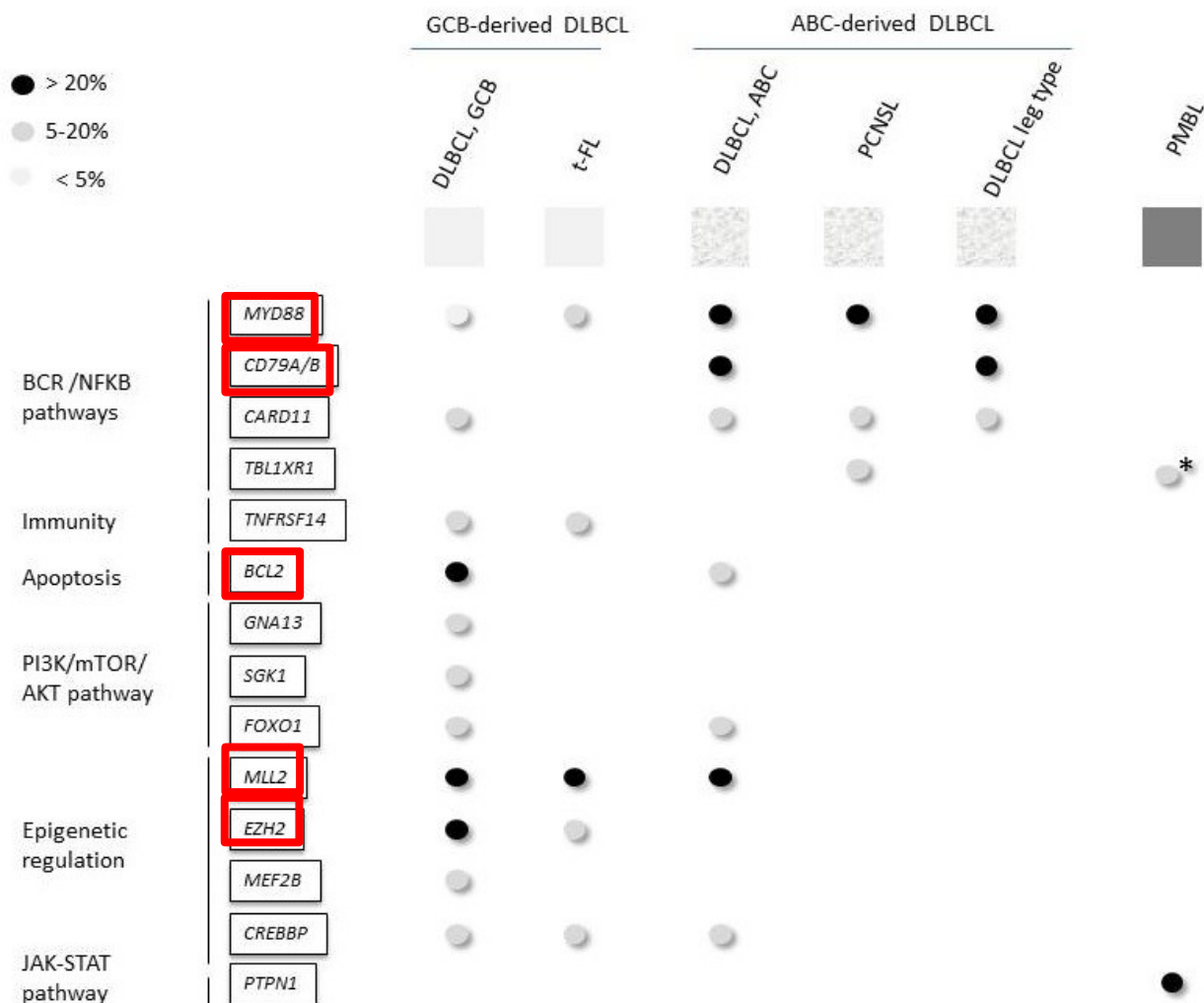
Studium klonální evoluce AML pomocí WGS: identifikace somatických mutací objevujících se při relapsu (pravděpodobně díky cytotoxické terapii)



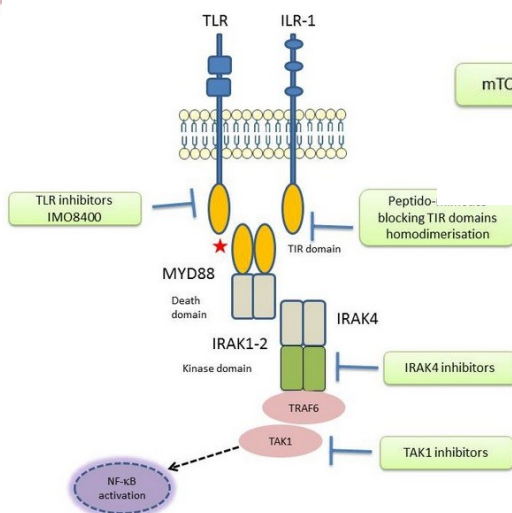
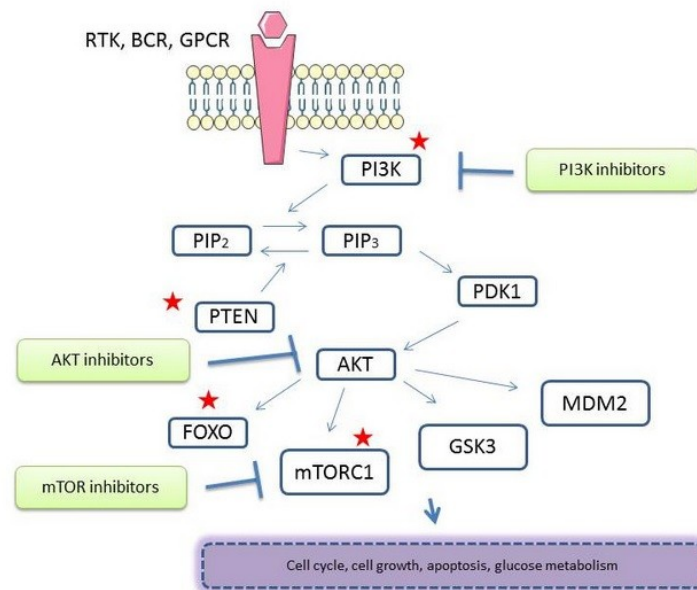
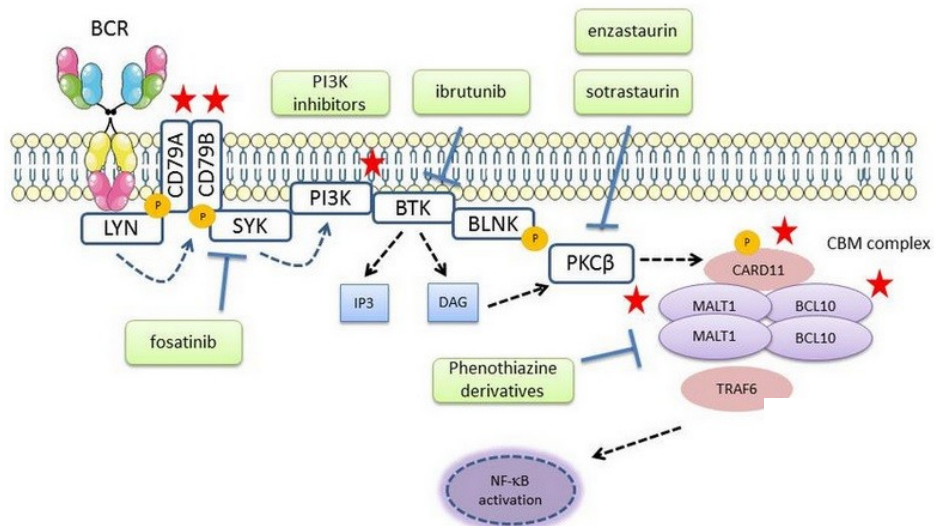
Ding 2012

DLBCL

Identifikace nových genů zahrnutých v patogenezi
 → předefinování typů DLBCL a ...



.... nalezení nových potenciálních terapeutických cílů

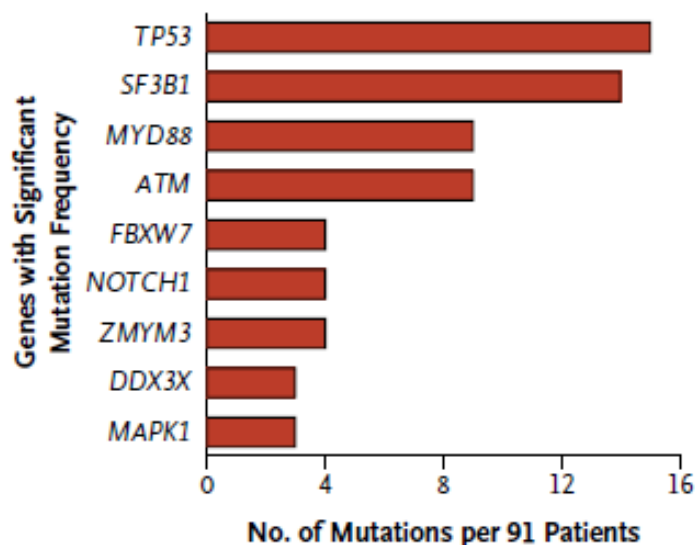


Jardin 2014

CLL

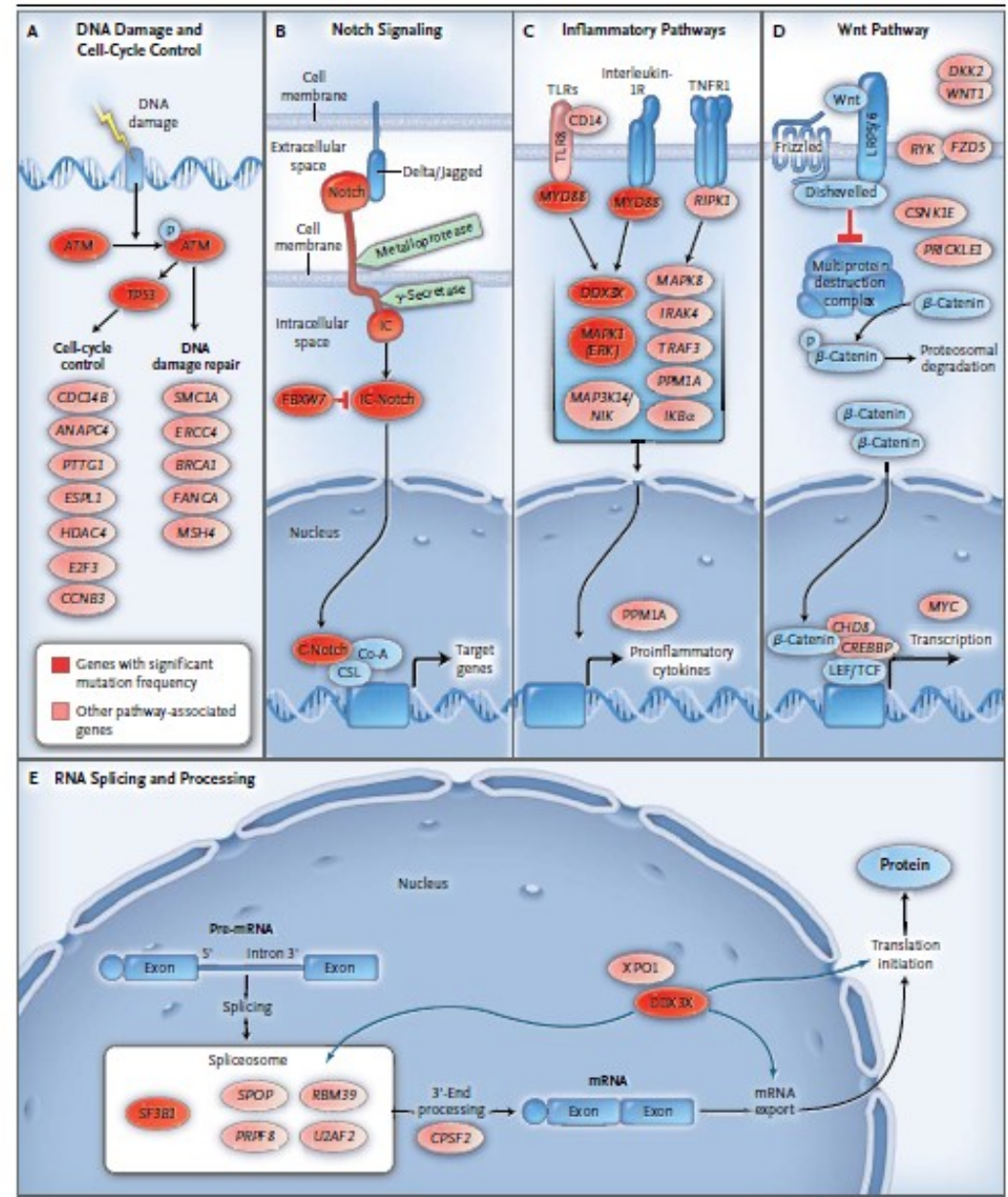
Objev nových rekurentně mutovaných genů (WGS, WES) – SF3B1, NOTCH1, BIRC3, MYD88 →

(Wang 2011, Puente 2012, Quesada 2012)



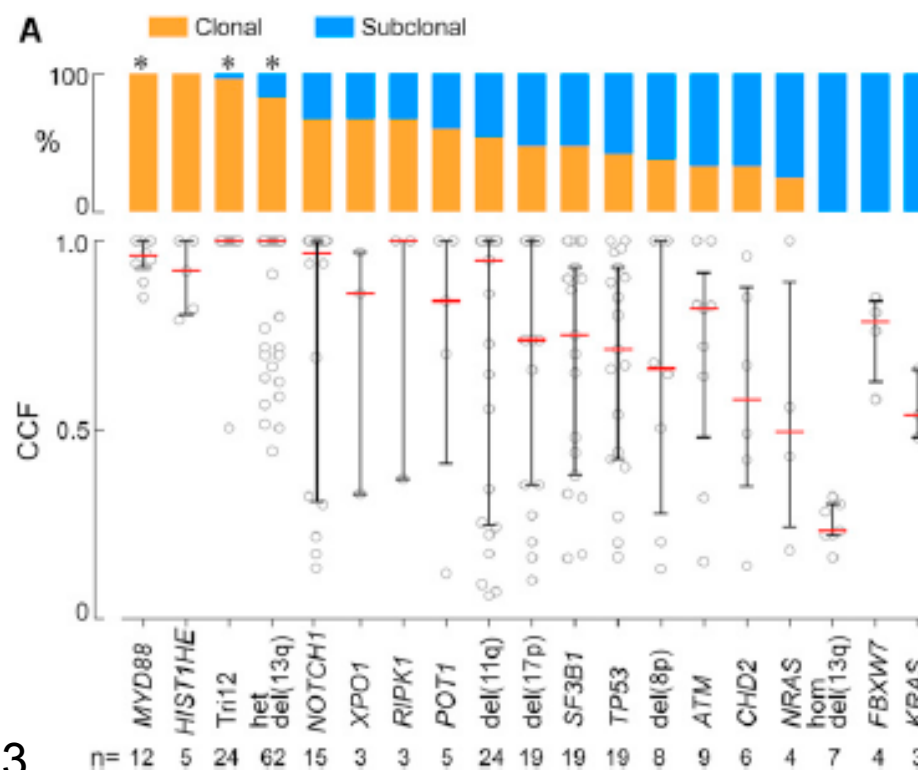
Wang 2011

→ defekty zahrnuté v několika signálních drahách



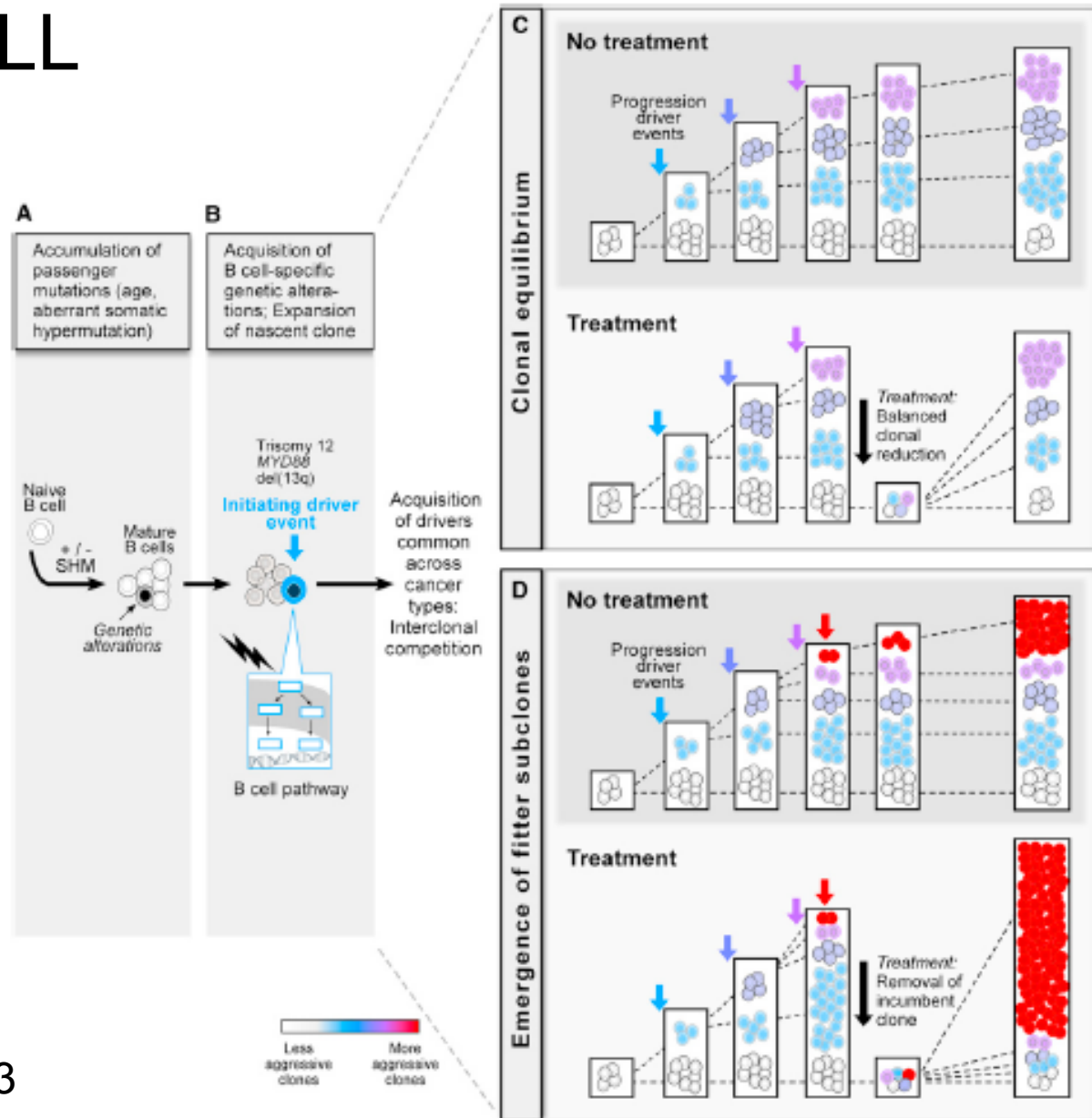
Wang 2011

Klonální architektura CLL – časné klonální (del13q, tri12, MYD88) a pozdější subklonální aberrace (TP53, SF3B1) → selekce léčbou a rychlejší progresi



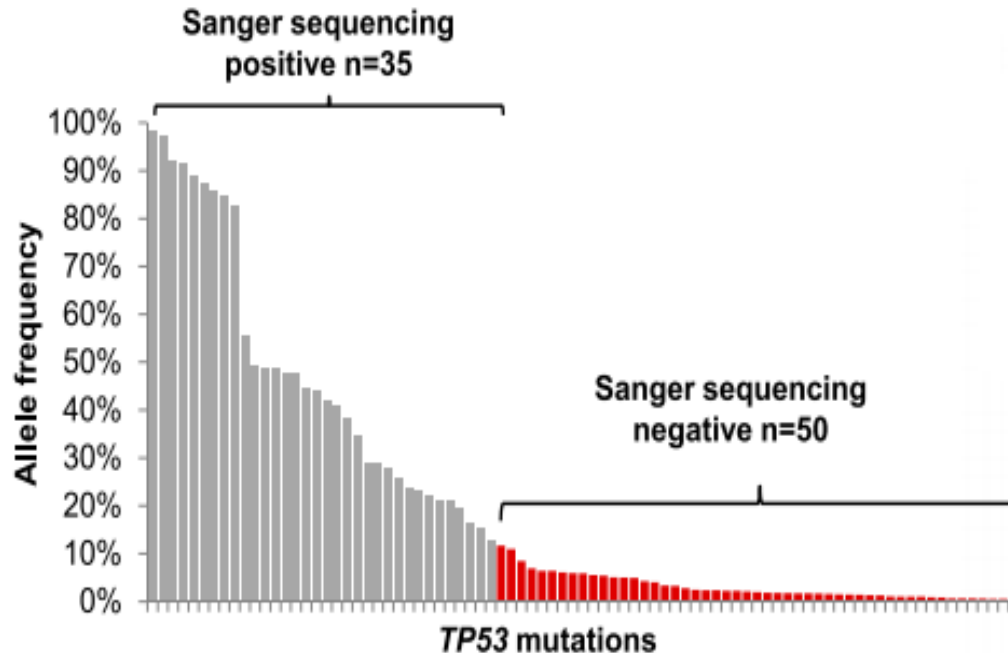
Landau 2013

Model vývoje CLL



Landau 2013

Klinický dopad **TP53 subklonů** – ultra-deep sequencing (median alel. frekvence 2%) → špatné přežití, evoluce klonu při relapsu a účast na vzniku chemorezistence



Rossi 2014

Naše zkušenosti (IHOK FN Brno a CEITEC)

Přechod od čipových technologií k NGS – flexibilita, citlivost, rychlost, cena, přesnost

- Ultra-deep sekv. (MiSeq) – klonální evoluce mutací v **TP53** u CLL (Malcikova 2014)
- Detekce **ATM** mutací u CLL a MCL (Miseq)
- **Exomové** sekv. (NextSeq) – germinální mutace u hematologických malignit
- **Celogenomové** sekv. (EMBL, Heidelberg)

Nevýhody NGS

Limity zavedení do klinické praxe:

- **cena** celogenomového sekvenování (cíl 1 000 \$ /běh/pokrytí 30x, Illumina)
- obrovské množství generovaných **dat** (otázka uchování → vysoké náklady)
- absence **standardu** pro určení kvality sekv. dat, rozdílné bioinformatické strategie
- **etická** otázka nakládání s NGS daty

Literatura

- Stratton 2009: The cancer genome.
- Simon 2013: Implementing personalized cancer genomics in clinical trials.
- Wang 2009: RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics
- Meaburn 2012: Next generation sequencing in epigenetics: insights and challenges.
- Mundade 2014: Role of ChIP-seq in the discovery of transcription factor binding sites, differential gene regulation mechanism, epigenetic marks and beyond.
- Padmanabhan 2013: Genomics and metagenomics in medical microbiology.
- Ellengren 2012: The genomic landscape of species divergence in Ficedula flycatchers.
- Kapgate 2015: Next generation sequencing technologies: Tool to study avian virus diversity.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

- Fridman 2012: Next-generation education in crop genetics.
- Yang 2014: Application of next-generation sequencing technology in forensic science.
- Dong 2012: Exploring the cancer genome in the era of next-generation sequencing.
- Walsh 2010: Detection of inherited mutations for breast and ovarian cancer using genomic capture and massively parallel sequencing.
- Koubkova 2014: Sekvenování nové generace a možnosti jeho využití v onkologické praxi
- Guan 2012: Application of next-generation sequencing in clinical oncology to advance personalized treatment of cancer.
- Ley 2008: DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome.

- Ding 2012: Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing.
- Jardin 2014: Next generation sequencing and the management of diffuse large B-cell lymphoma: from whole exome analysis to targeted therapy.
- Wang 2011: *SF3B1* and Other Novel Cancer Genes in Chronic Lymphocytic Leukemia
- Landau 2013: Evolution and Impact of Subclonal Mutations in Chronic Lymphocytic Leukemia
- Rossi 2014: Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Děkuji za pozornost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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