

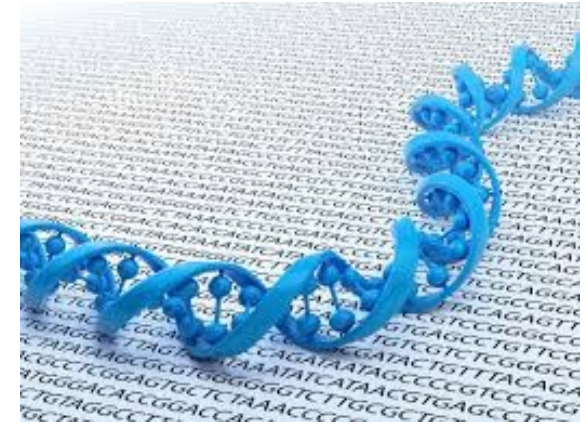
Moderní metody analýzy genomu: aplikace technologie NGS

Mgr. Martin Trbušek, Ph.D.

Interní hematologická a onkologická klinika, FN Brno

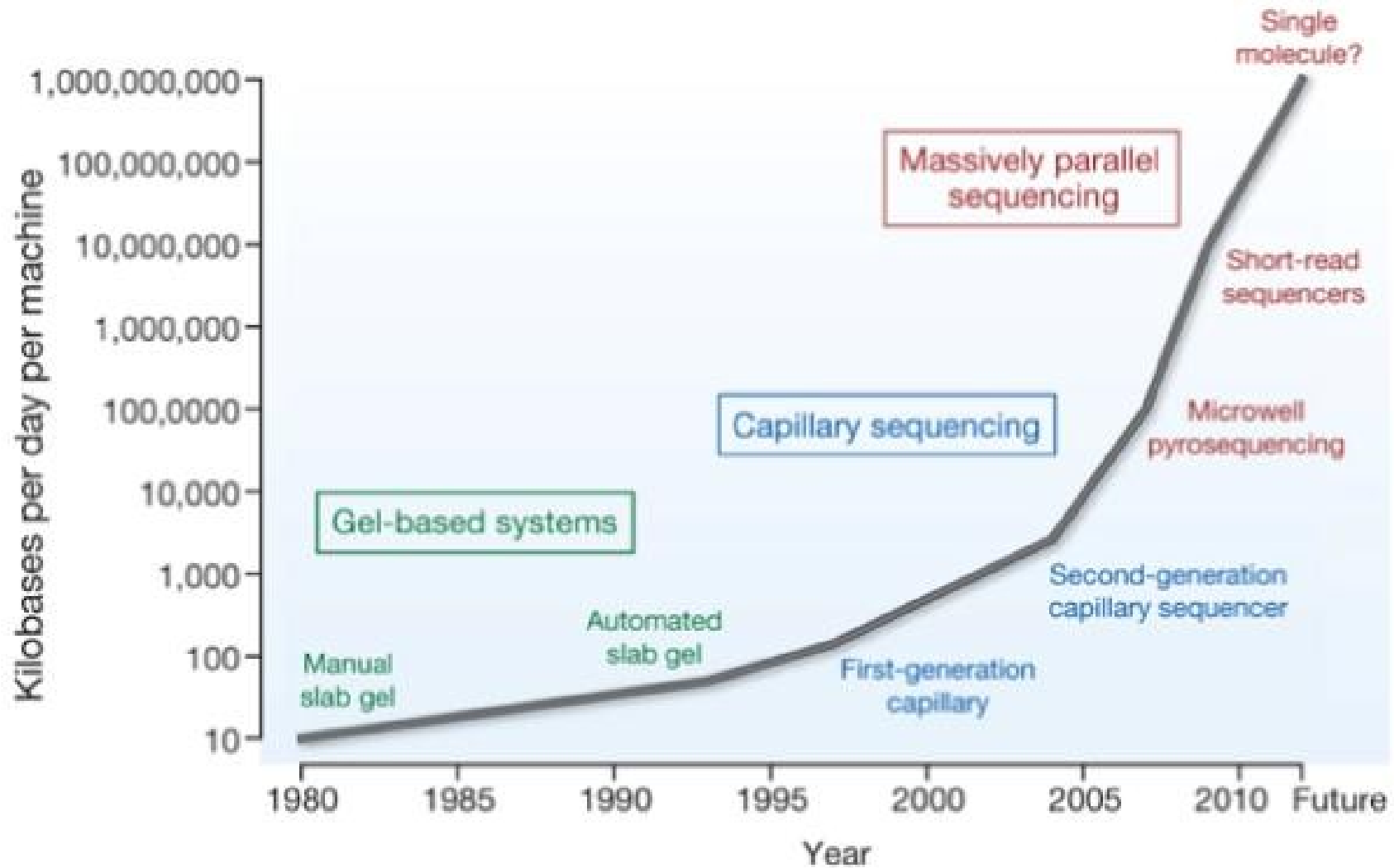
Centrum molekulární biologie a genové terapie

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

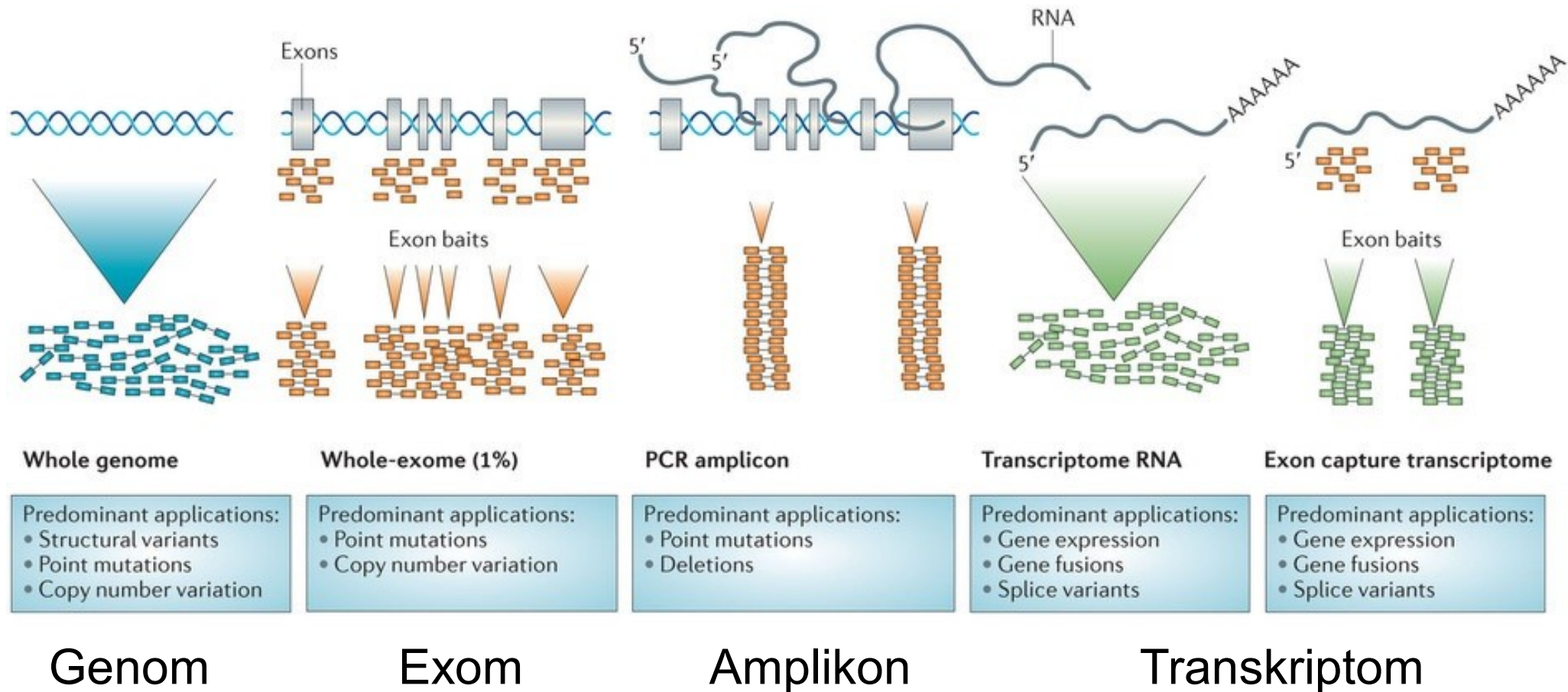


Obecné využití NGS

- 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: oblast analýz



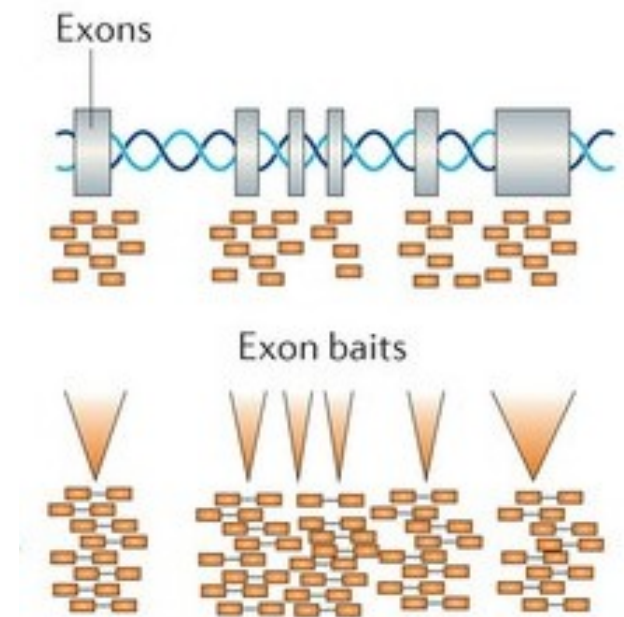
Celogenomové sekvenování (WGS)

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

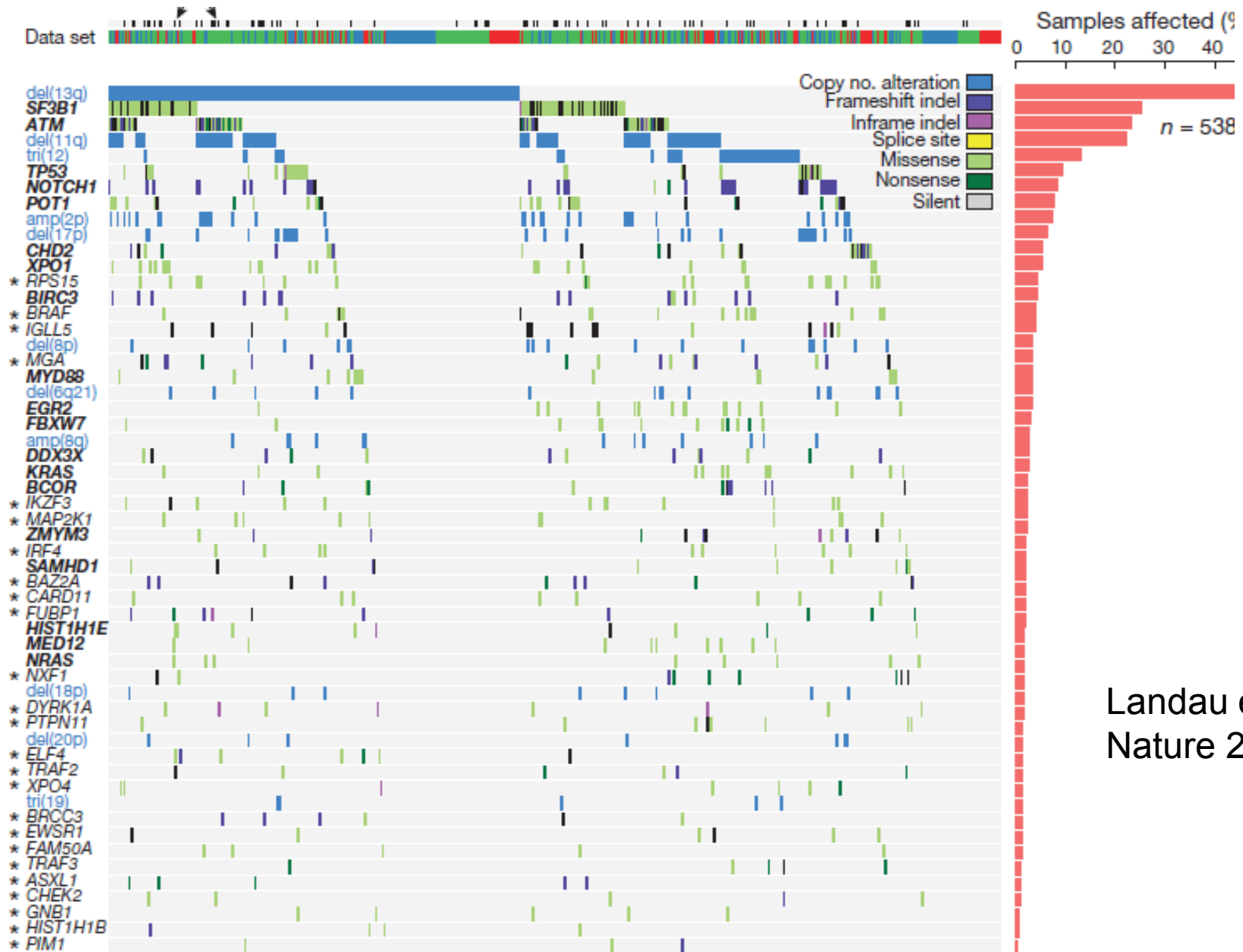
- 1. *De novo* assembly** - využívá překryvů sekvencí, předpokladem dostatečné pokrytí (>10x)
- 2. Resekvenování** - mapování na referenční sekvenci

Exomové sekvenování

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



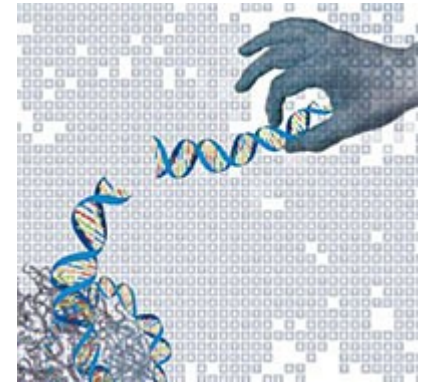
WES a rekurentní „driver“ mutace u CLL



Landau et al.,
Nature 2015

SF3B1, ATM, TP53, NOTCH1, POT1, regulace c-MYC

Cílené sekvenování



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

Mutační analýza genu ATM pomocí NGS

Count	Coverage	Frequency	Gene_function	RefGene	Exon_number	cDNA	Codon
1752	1752	100	exonic	ATM	exon40	c.5948A>G	p.N1983S
2261	2452	92,21	exonic	ATM	exon22	c.3161C>G	p.P1054R
690	2962	23,3	exonic	ATM	exon50	c.7311C>A	p.Y2437X
100	1203	8,31	exonic	ATM	exon24	c.3433_3435del	p.1145_1145del
74	1433	5,16	exonic	ATM	exon30	c.4578C>T	p.P1526P
46	1281	3,59	exonic	ATM	exon43	c.6258T>A	p.Y2086X
243	8231	2,95	splicing	ATM	exon19	c.2921+1G>A	p.P962Q
19	699	2,72	exonic	ATM	exon25	c.3705_3709del	p.P1235fs
25	1087	2,3	exonic	ATM	exon5	c.480delT	p.S160fs
24	1046	2,29	exonic	ATM	exon5	c.483G>C	p.Q161H
67	3357	2	exonic	ATM	exon26	c.3837G>A	p.W1279X
73	5626	1,3	exonic	ATM	exon26	c.3952_3960del	p.1318_1320del
64	5151	1,24	exonic	ATM	exon49	c.7181C>T	p.S2394L
11	904	1,22	exonic	ATM	exon63	c.9022C>T	p.R3008C
42	3514	1,2	exonic	ATM	exon10	c.1402_1403del	p.K468fs

Tři způsoby přípravy knihovny

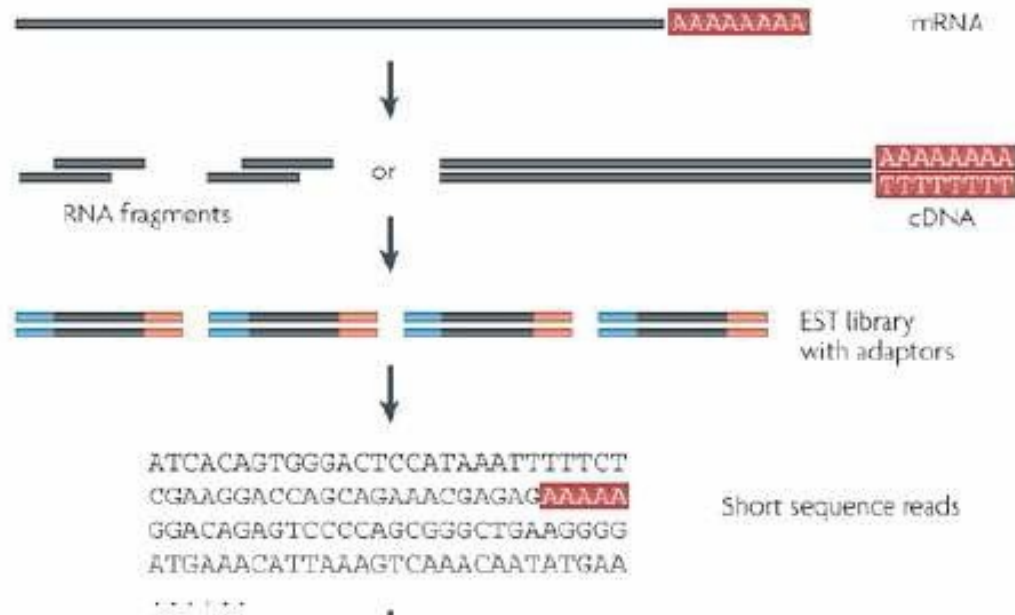
1. **multiplex PCR**: AmpliSeq (Life Tech.) až 6144 párů primerů
2. **single-plex PCR**: Microdroplet PCR (RainDance Tech.), Access Array System (Fluidigm)
3. **targeted capture** (cílený „záchyt“ sondami) s následnou multiplex PCR: TrueSeq Amplicon (Illumina), HaloPlex (Agilent Tech.), SeqCap EZ technology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

Klinické využití

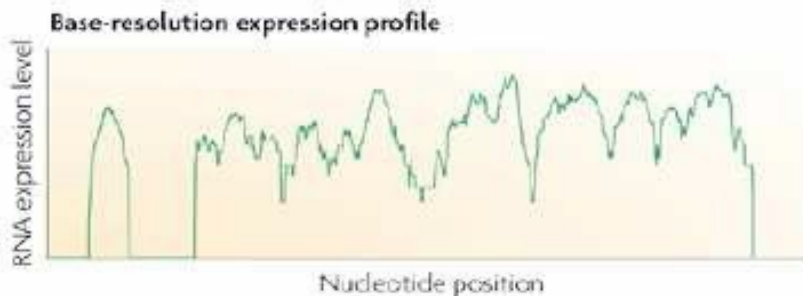
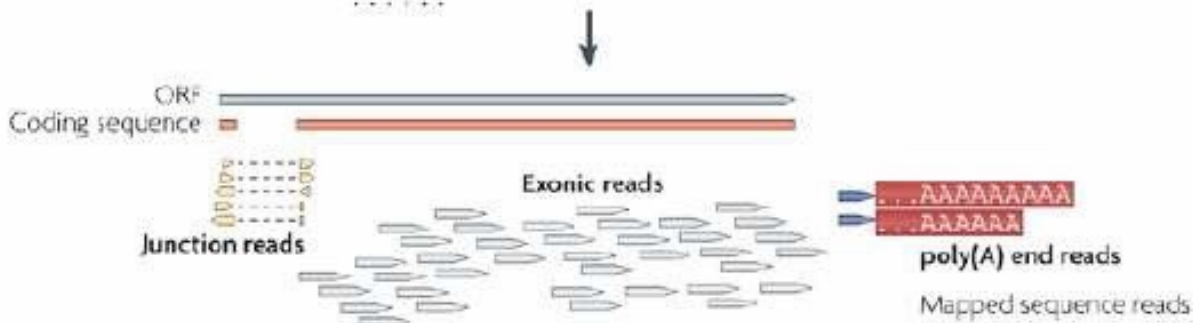
- Nejvhodnější „targeted capture“
- **Komerční kity:**
 - diagnostické kity (panely genů různých onemocnění)
 - nádorové panely (záchyt hereditárních nádorových onemocnění)
 - panely genů dle přání zákazníka



Sekvenování transkriptomu (RNA seq)

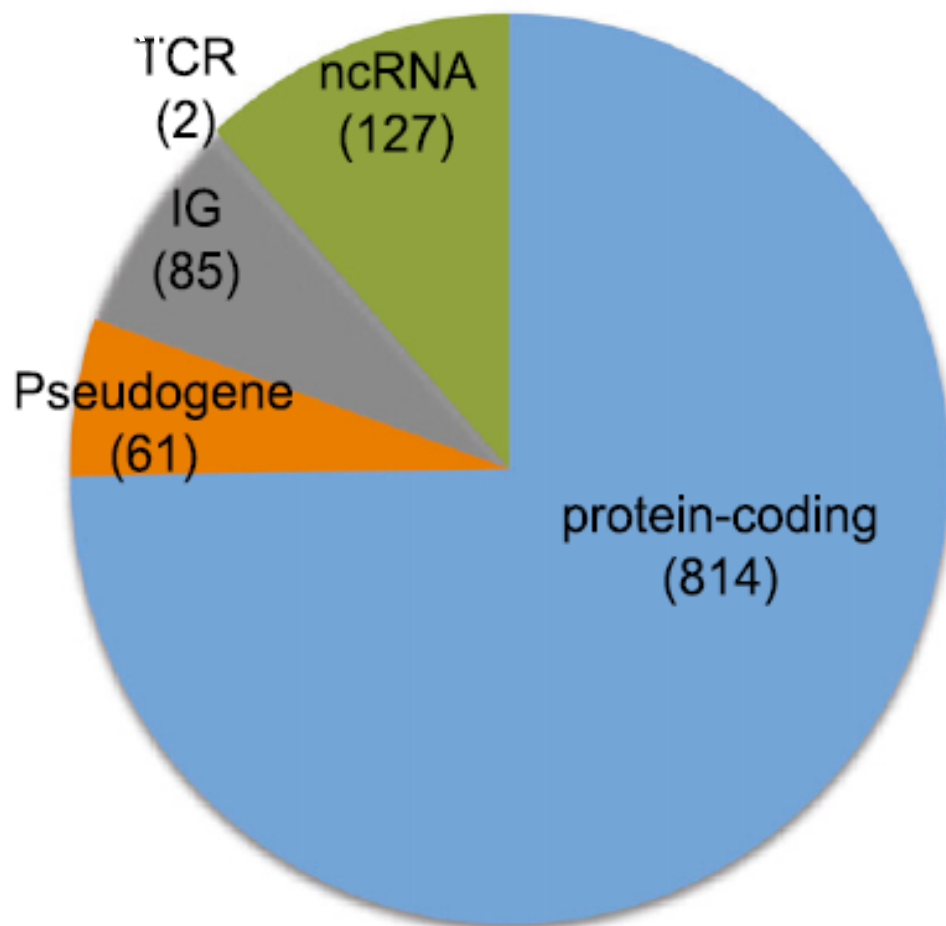


Transkriptom = soubor všech molekul RNA (mRNA, rRNA, tRNA a noncoding RNA)

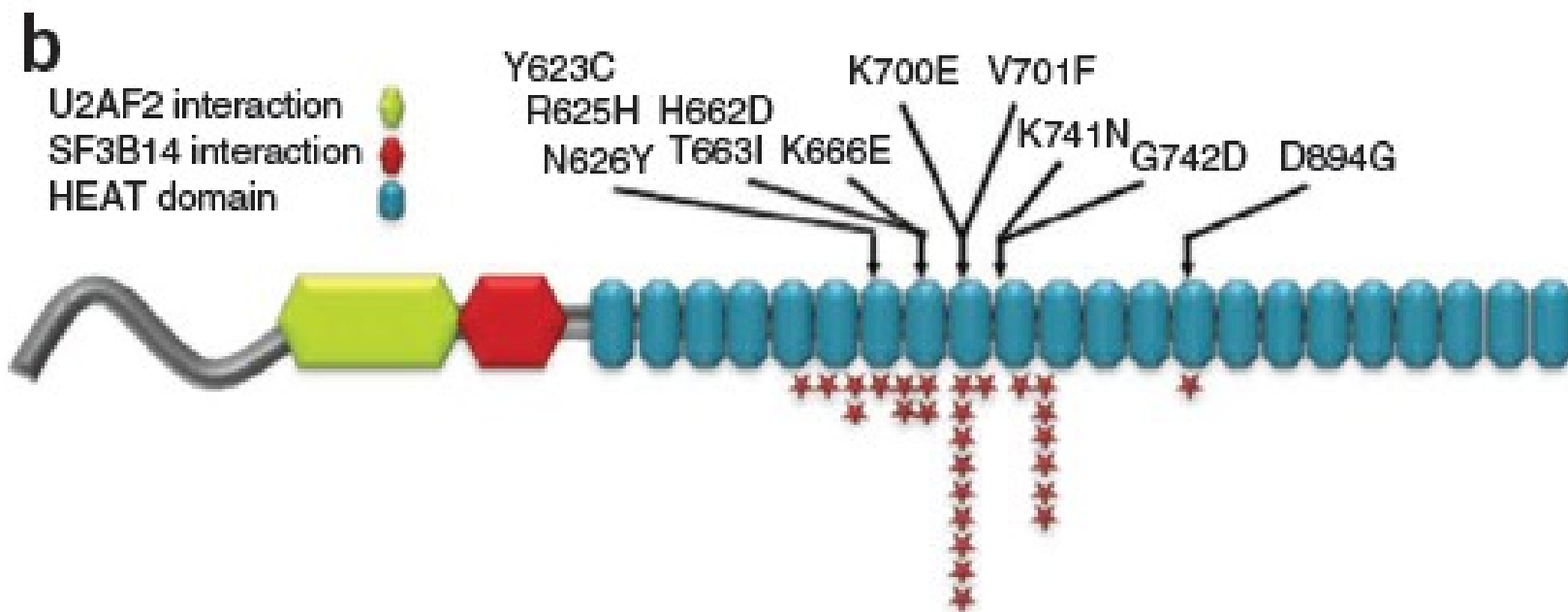


Wang 2009

Aberantní exprese u CLL lymfocytů (RNA seq)



Identifikace mutací SF3B1: synergie různých přístupů



Quesada et al., Nat Genet 2011

RNA seq - možnosti

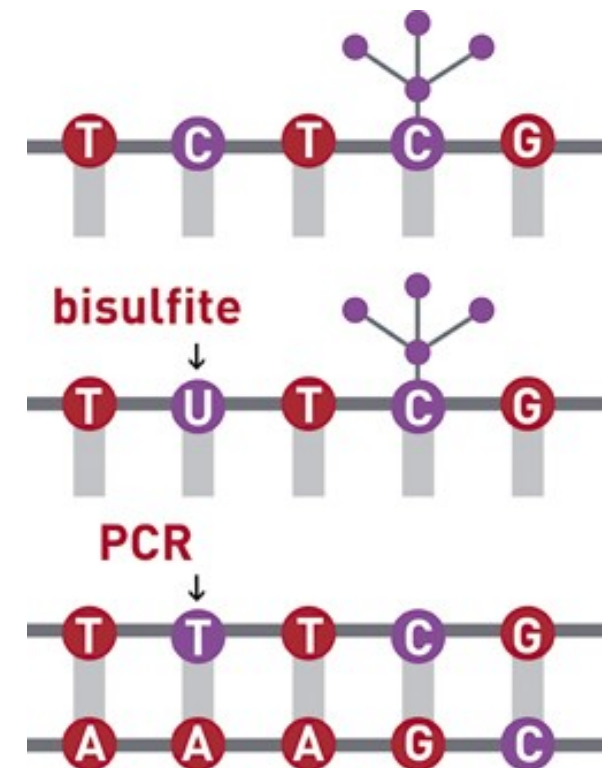
- Detekce somatických **mutací**, mezigenových **fúzí** a alternativních **sestřihových variant**
- Studium **ncRNA**: regulace proliferace, diferenciace a apoptózy, regulace genové exprese (miRNA)
- Na rozdíl od čipových technologií není limitována předchozí znalostí genomu, dynamickým rozlišením nebo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

NGS a epigenetika

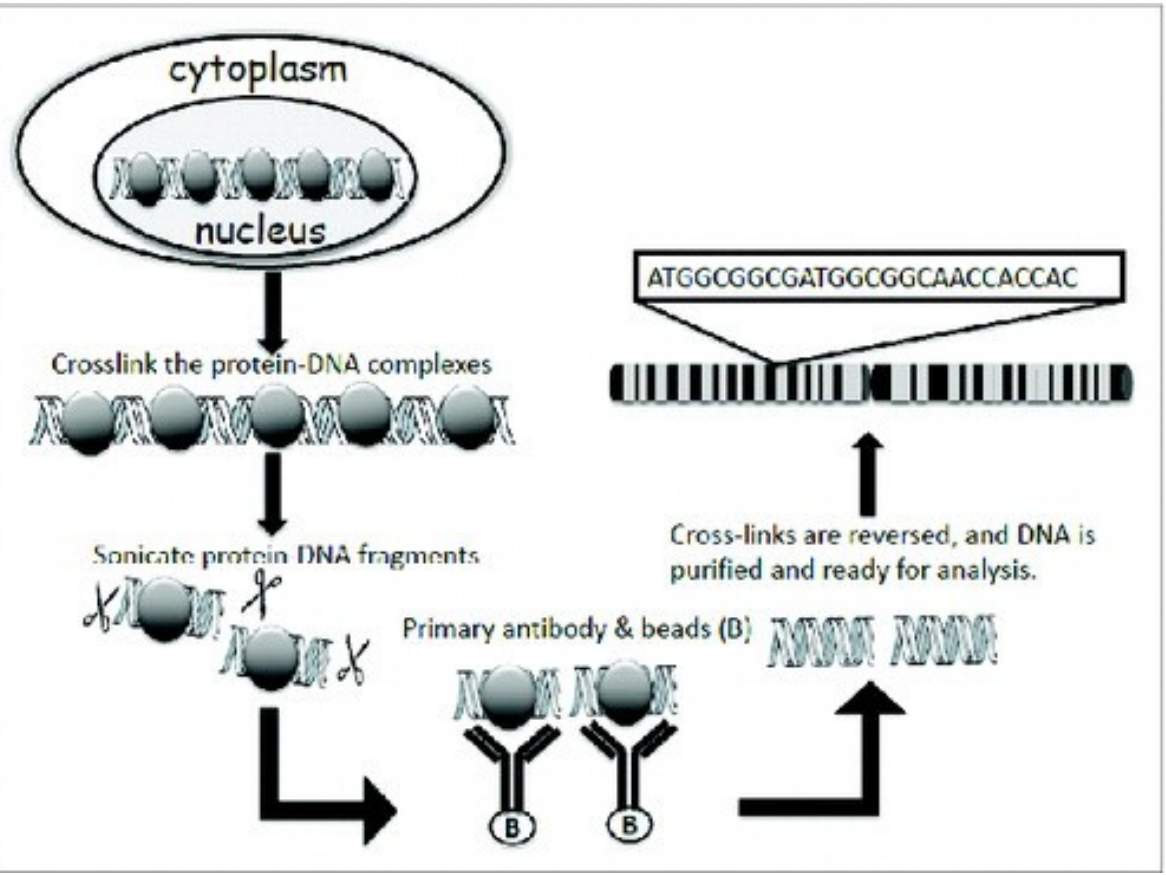
Metylace DNA: 80% C, umlčení transkripce genů

Bisulfitová konverze + NGS:

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



Chromatinová imunoprecipitace (ChIP-Seq)



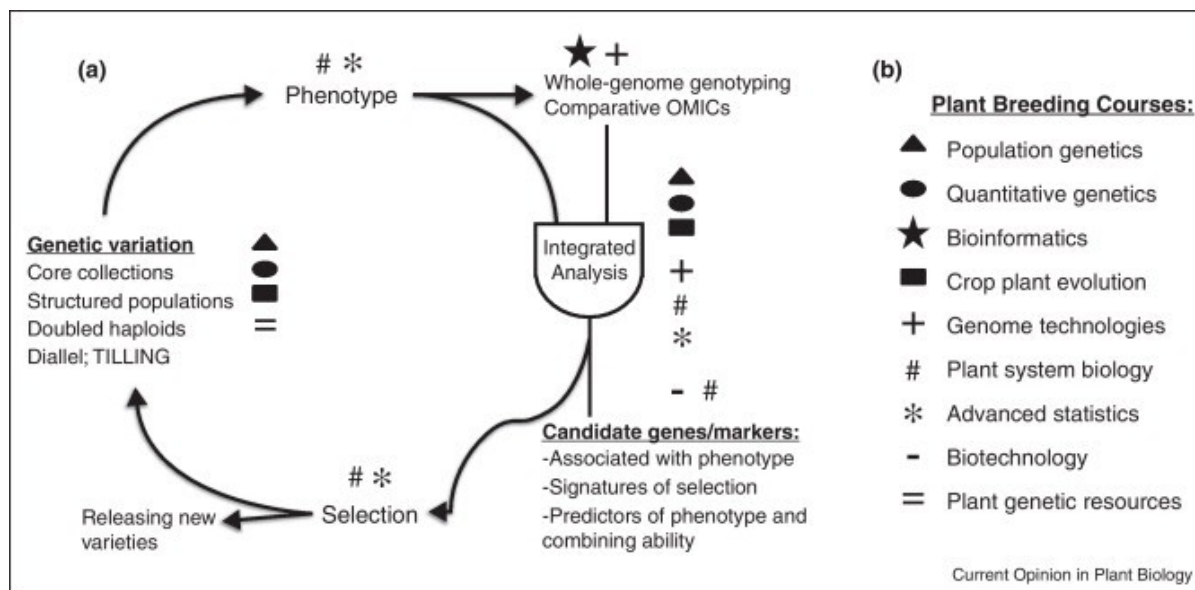
Sledování interakcí mezi proteiny, DNA a RNA → vazebná místa pro TF, histony, a další proteiny

Regulace genové exprese, epigenetické modifikace chromatinu

Mezioborové využití NGS

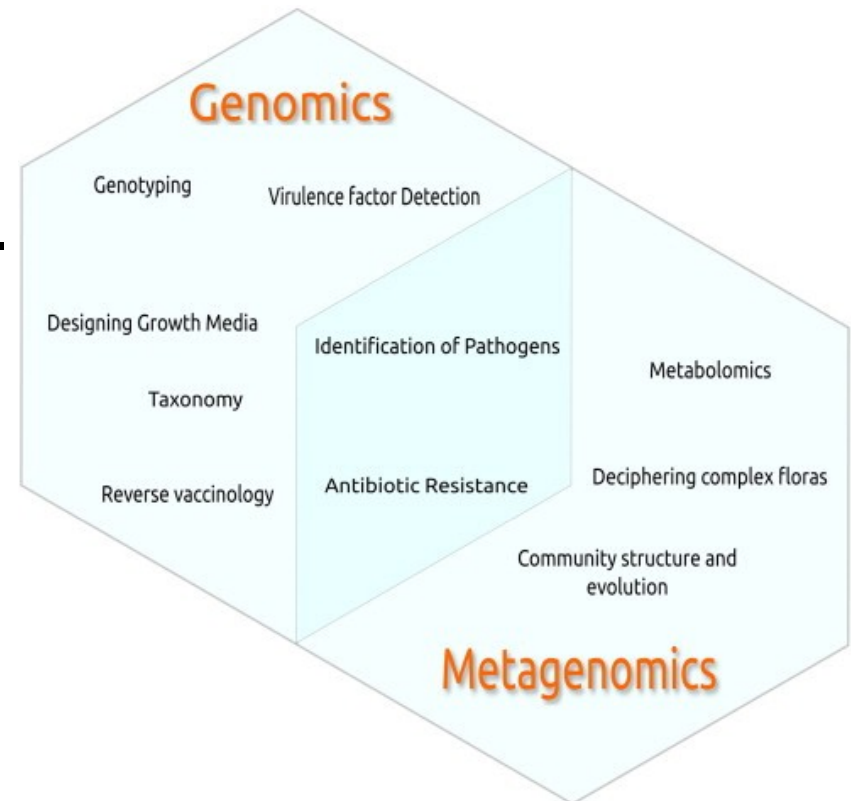
Studium **druhové diverzity** (genotypizace):

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



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

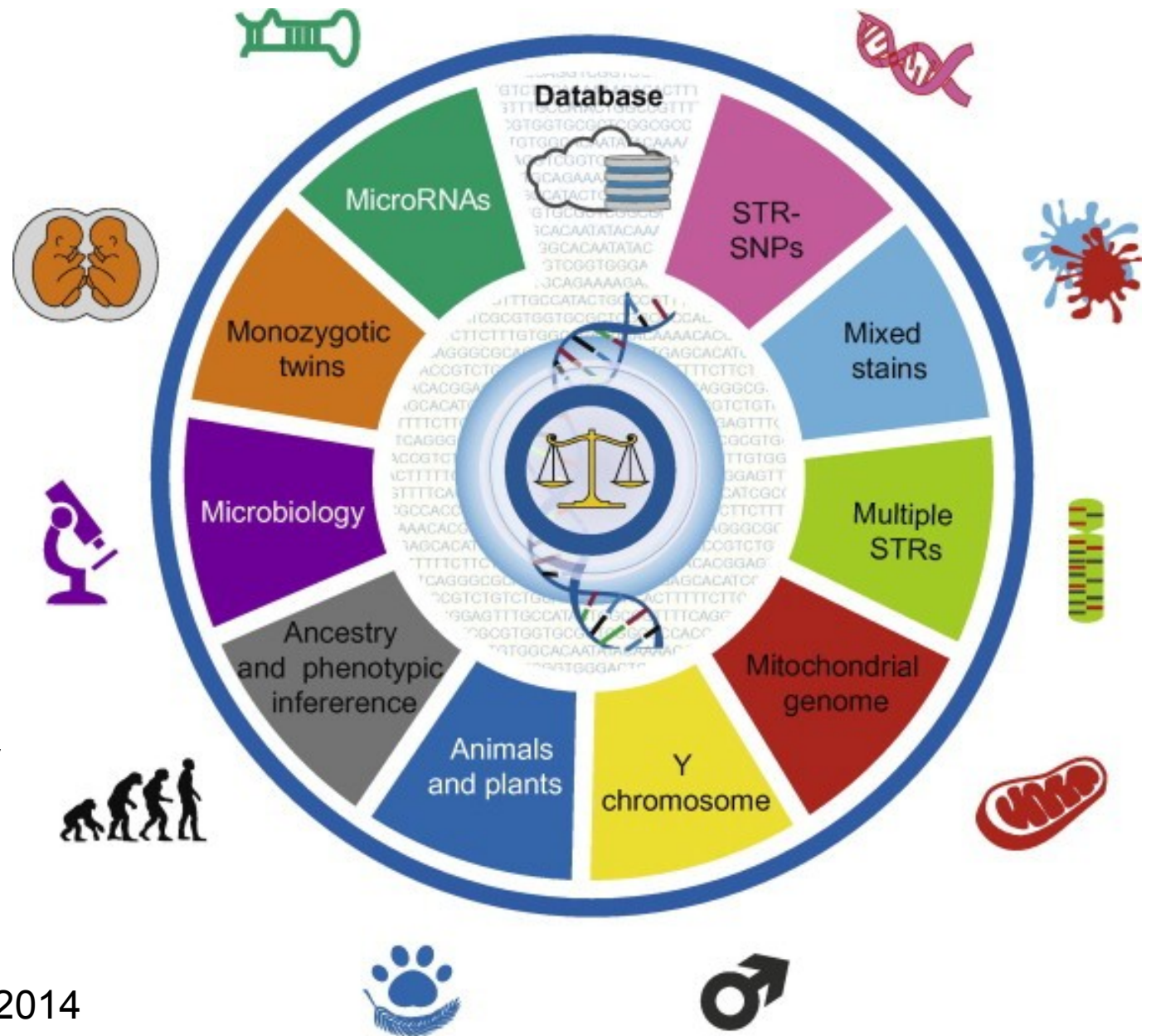
- bez potřeby kultivace
- identifikace patogenů, virulence, rezistence, atd.



Forenzní genetika:

Analýza stop z místa činu

Polymorfní místa v genomu



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; bezbřehé možnosti!

Základní aplikace v onkologii

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

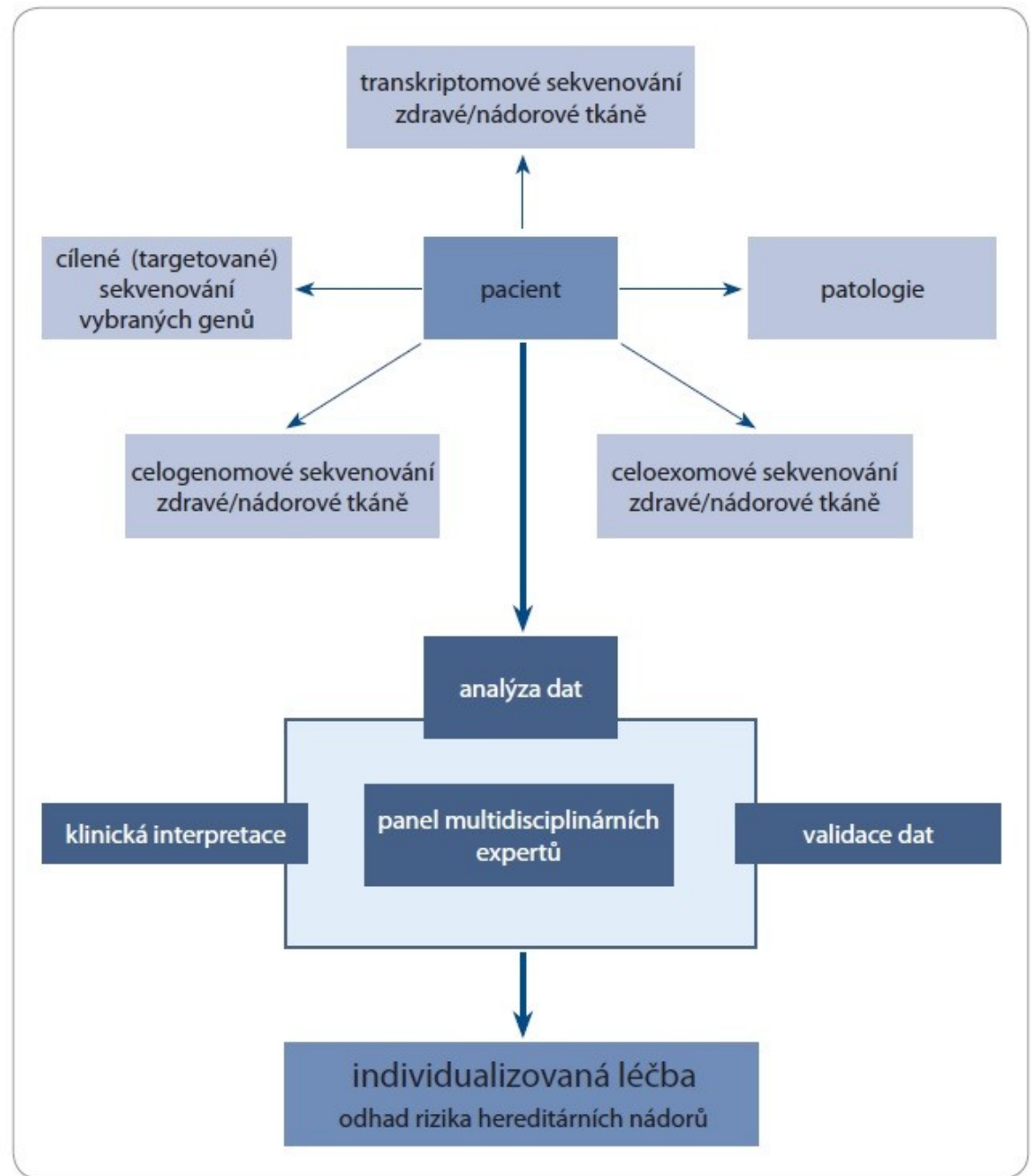
Přínos NGS v onkologii

- **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
 - Využití při sledování minimální zbytkové nemoci

(Dong and Wang, Frontiers in Medicine 2012)

- Identifikace **germinálních mutací** (WES):
 - familiární nádory pankreatu (PALB2)
 - dědičný feochromocytom (MAX)
 - familiární melanom (MITF)
- **Cílené sekvenování:**
 - detekce mutací v 21 genech včetně BRCA 1 a 2 asociovaných s hereditárními nádory mléčné žlázy a vaječníku (neodhalitelné Sangerem a MLPA) (Walsh 2010)

NGS → personalizovaná léčba



Využití NGS v onkologické praxi

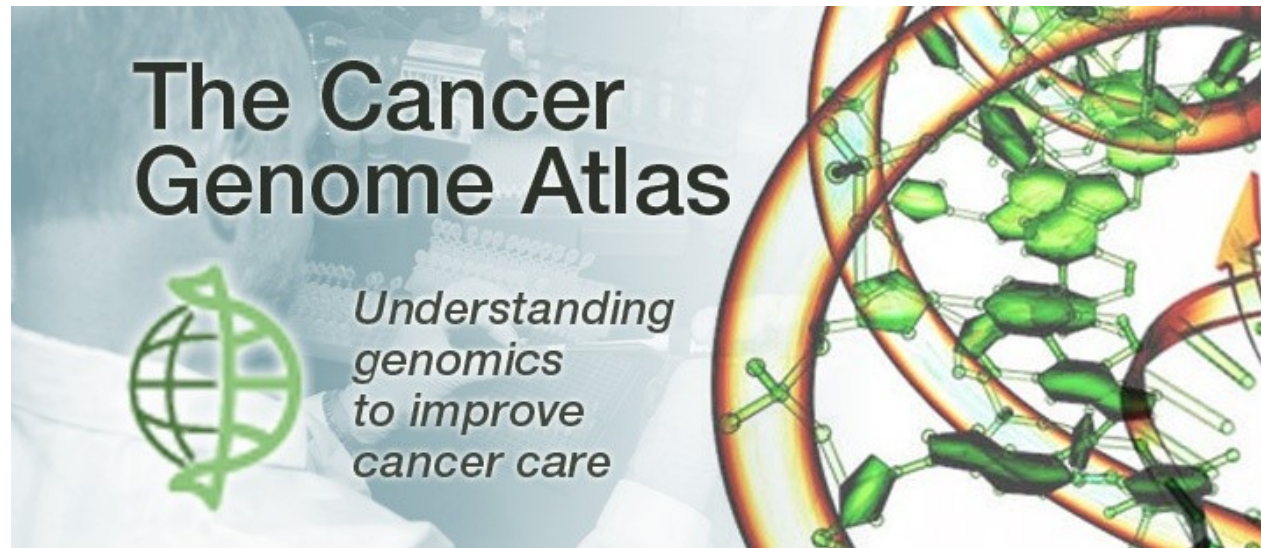
International Cancer Genome Consortium (ICGC):

Cancer GenomeProjekt – charakterizace genomických, transkriptomických a epigenomických změn u 50 nejčastějších nádorových onemocnění



International
Cancer Genome
Consortium

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

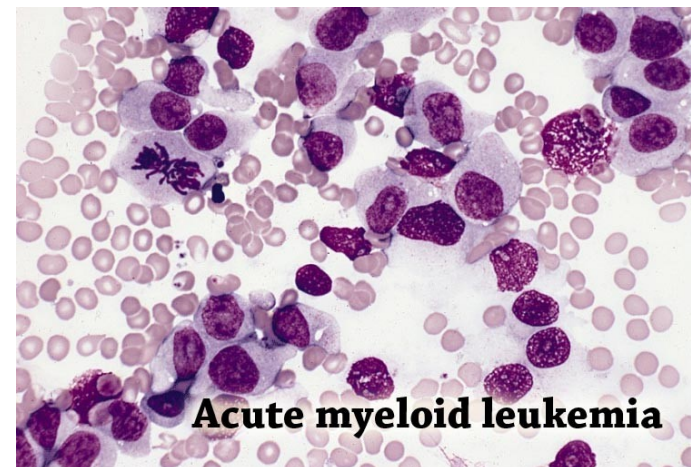


Skrínink nových léků na panelu 60 buněčných linií

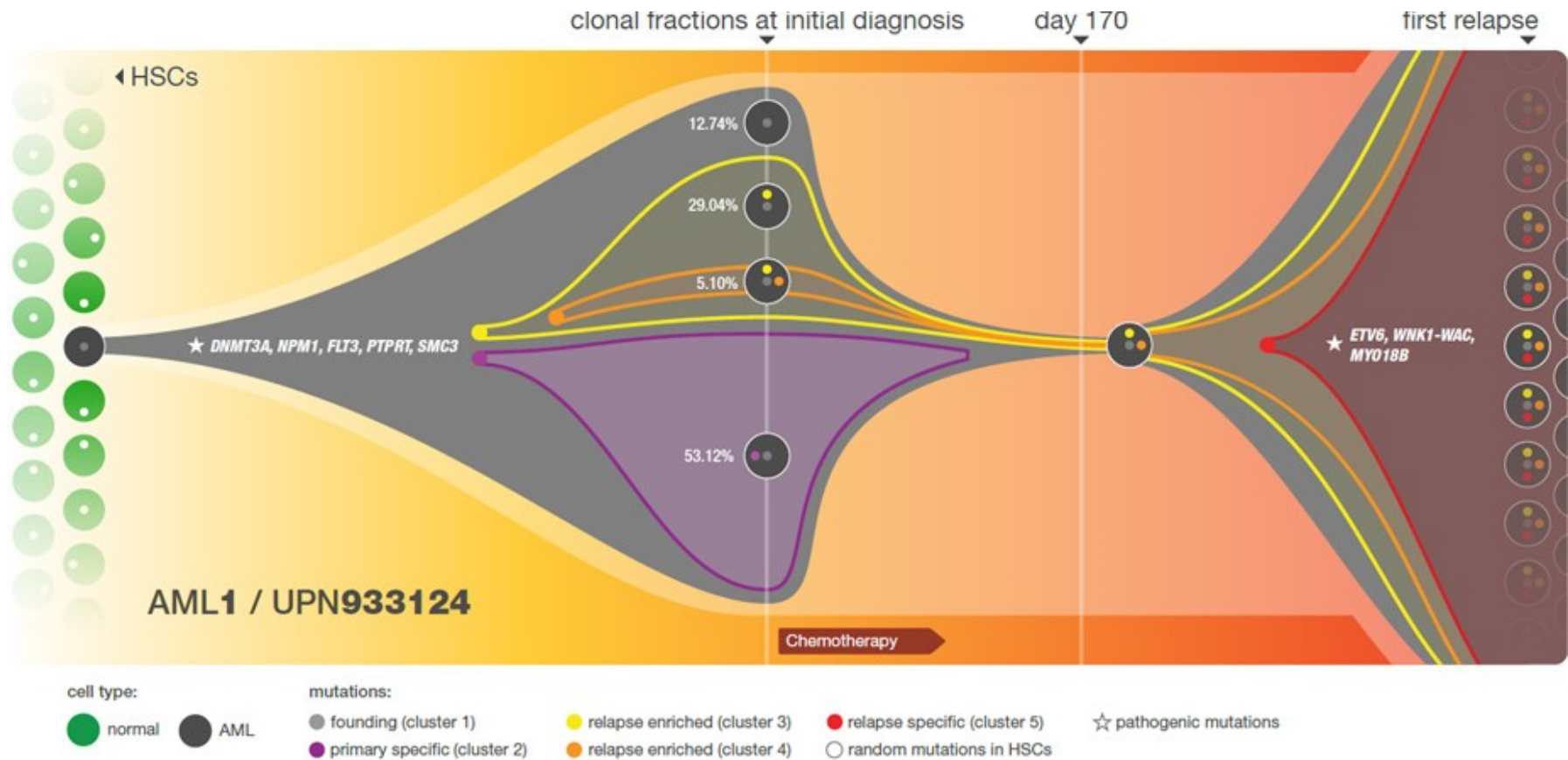
Hematoonkologie

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

(Ley et al., Nature 2008)



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



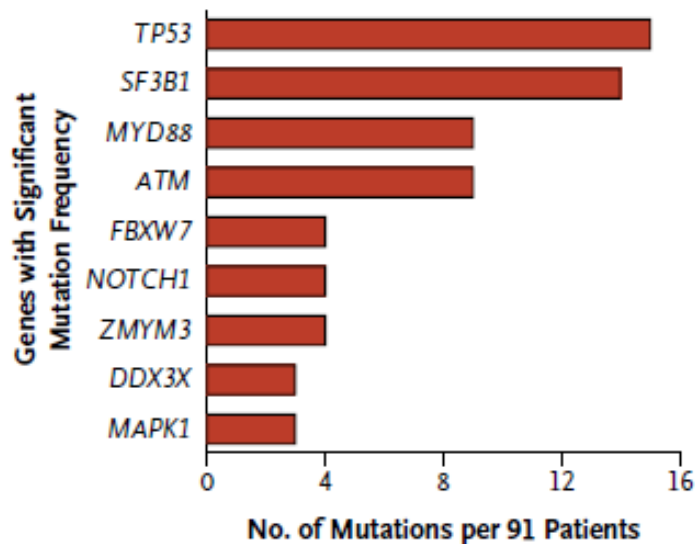
Ding et al., Nature 2012

Využití NGS při výzkumu CLL

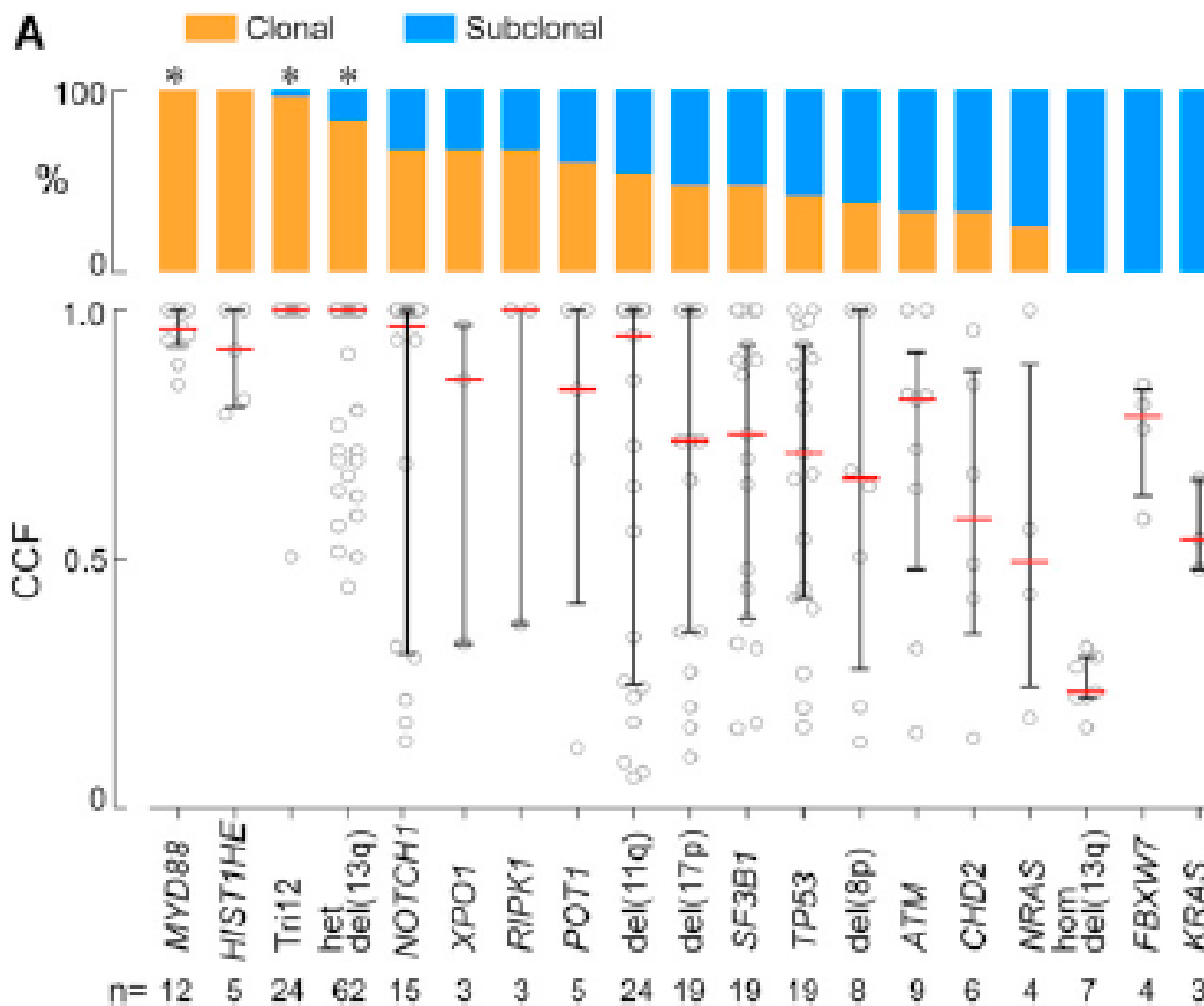
Objev nových rekurentně mutovaných genů

(WGS, WES) – SF3B1, NOTCH1, BIRC3, MYD88

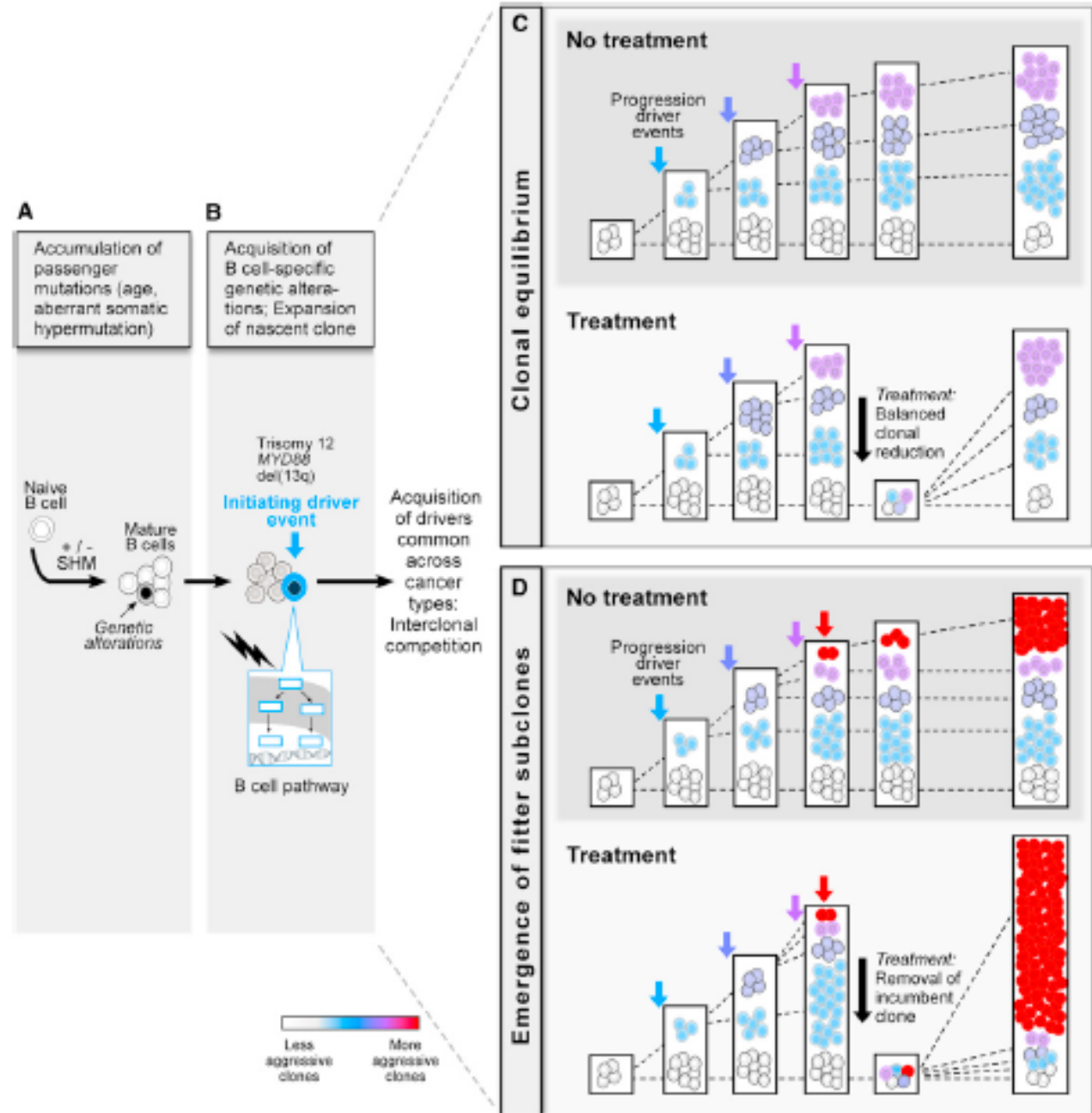
(Puente et al., Nature 2012, Quesada et al., Nature 2012)



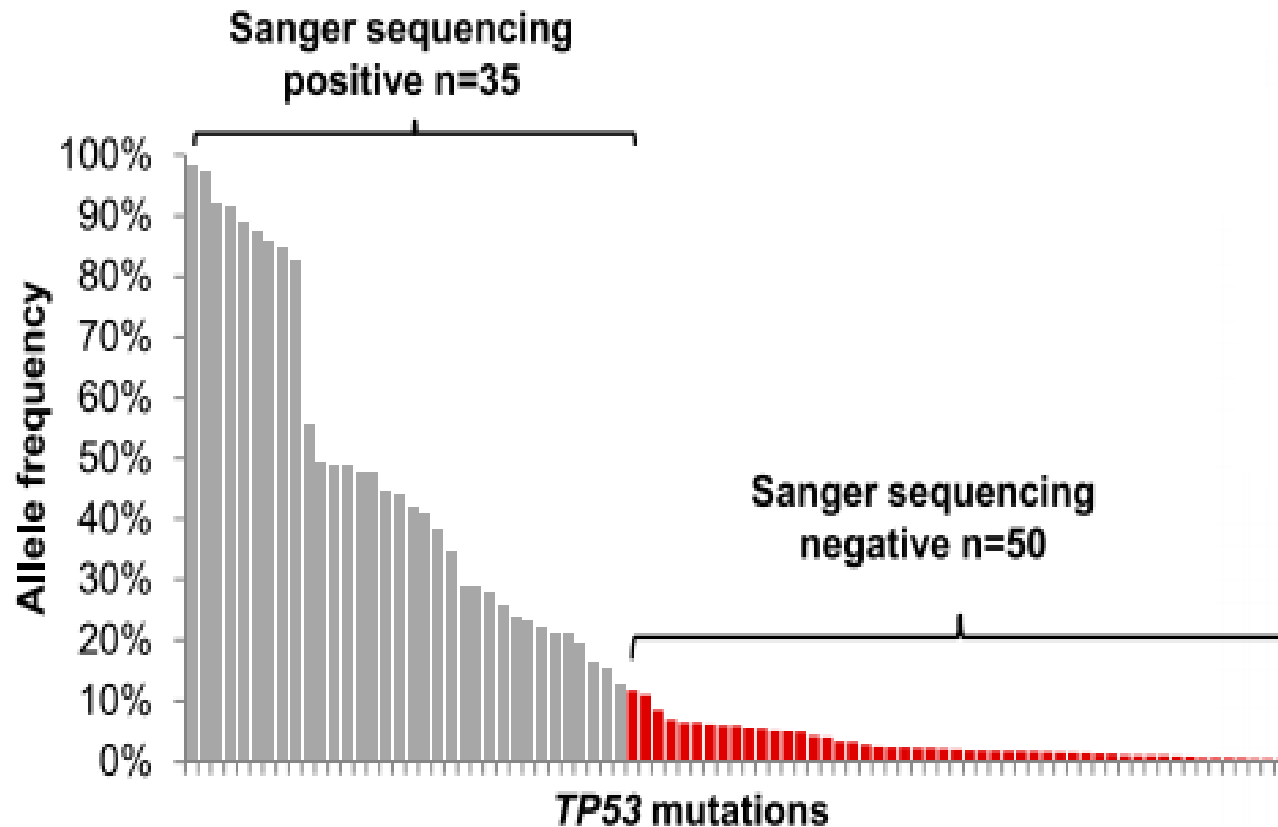
Klonální architektura CLL – časně klonální (del13q, tri12, MYD88) a pozdější subklonální aberace (TP53, SF3B1) → selekce léčbou a urychlení progresu



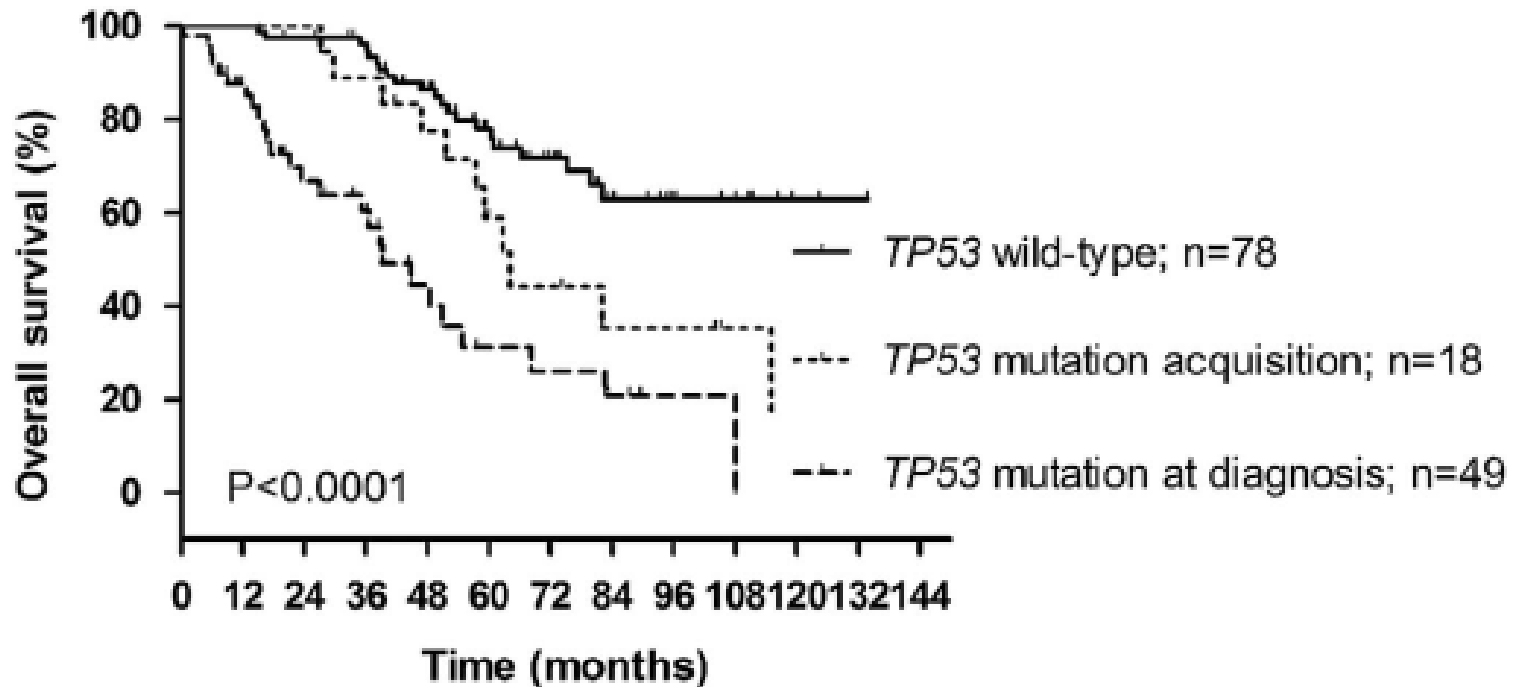
Model vývoje CLL



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



Negativní dopad selektovaných mutací na přežití



Přežití stanoveno od diagnózy

„Mutation acquisition“ = přítomnost mutace v relapsu

Naše zkušenosti (IHOK FN Brno)

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

- Ultra-deep sekv. (MiSeq) – klonální evoluce mutací v **TP53** u CLL; citlivost 0,2% (Malcikova et al., Leukemia 2015)
- Detekce **ATM** mutací u CLL a MCL (Miseq)
- Detekce mutací SF3B1, NOTCH1 a BIRC3 u CLL
- **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 uchovávání → vysoké náklady)
- absence **standardu** pro určení kvality sekv. dat, rozdílné bioinformatické strategie
- Obtížná **interpretace** dat
- **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.

- 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.

**Děkuji za
pozornost**

