

Úvod do molekulární medicíny C7188



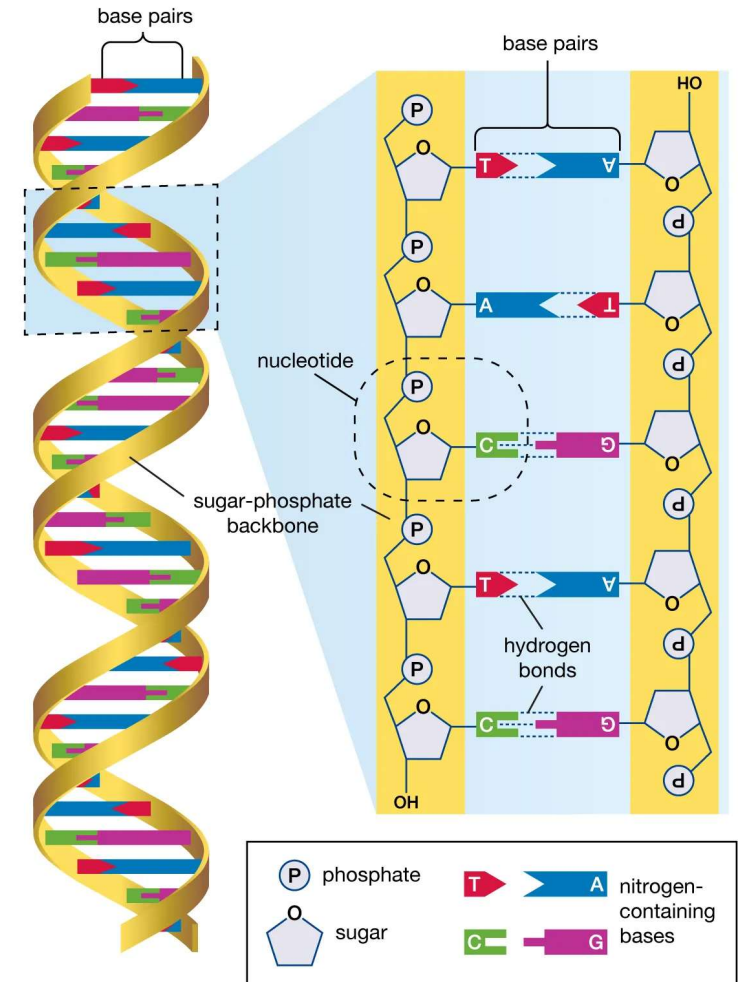
5. Masivně paralelní sekvenování

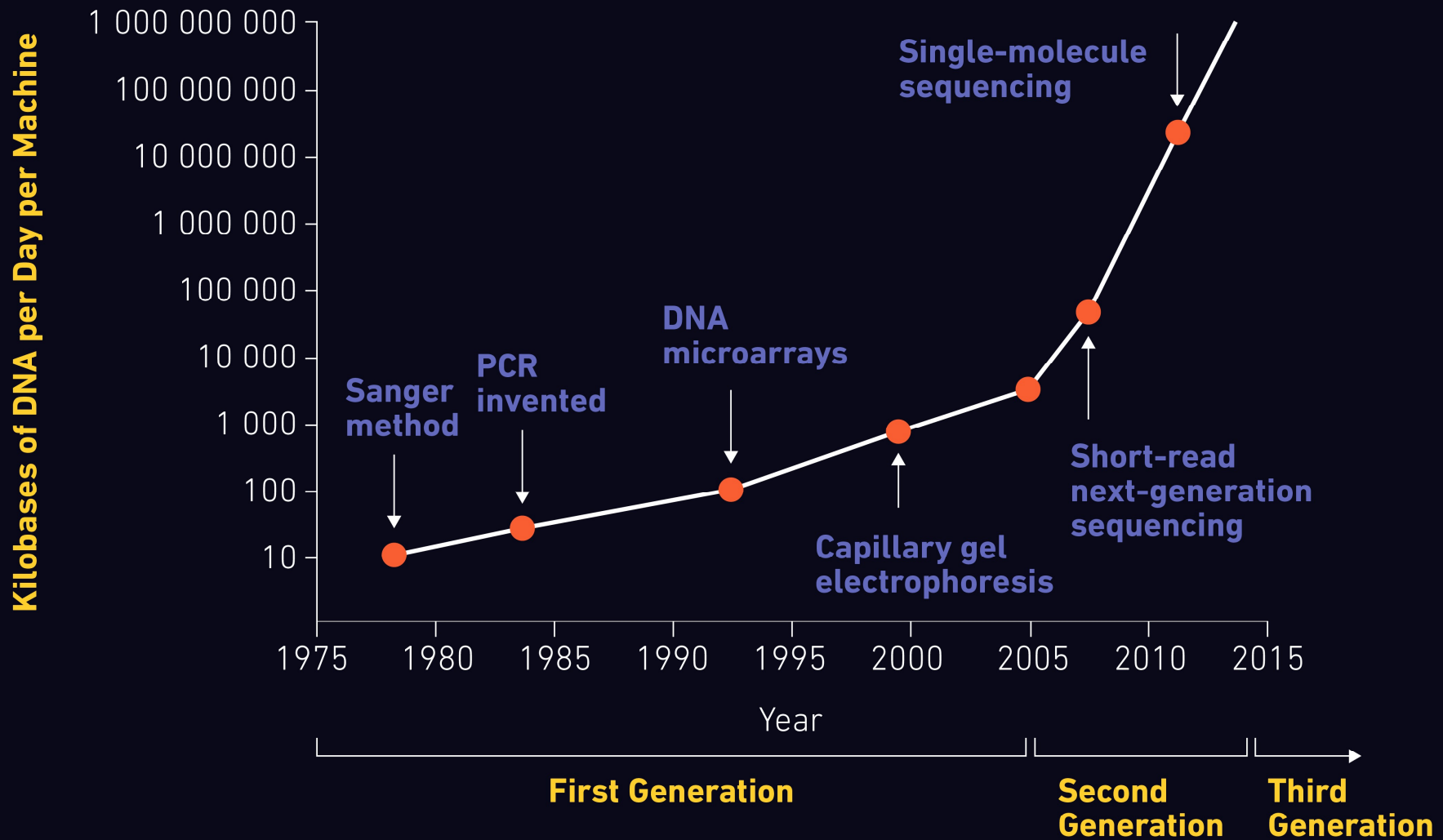
Mgr. Júlia Bohošová, Ph.D.

podzim 2024

Sekvenování

- Metody identifikující pořadí nukleotidů v genomu či specifickém úseku DNA či RNA
- RNA přepsána do cDNA -> analýza
- Existují již i metody, které dokáží analyzovat nativní RNA (Oxford Nanopore)
- Revoluce v molekulární biologii a medicíně
- Screening (biomarkery), diagnostika (mutace), hlubší porozumění patogenezi různých onemocnění
- Masivně paralelní sekvenování - neustále se rozvíjející se obor od 70. let 20. století





Maxam-Gilbert sekvenování

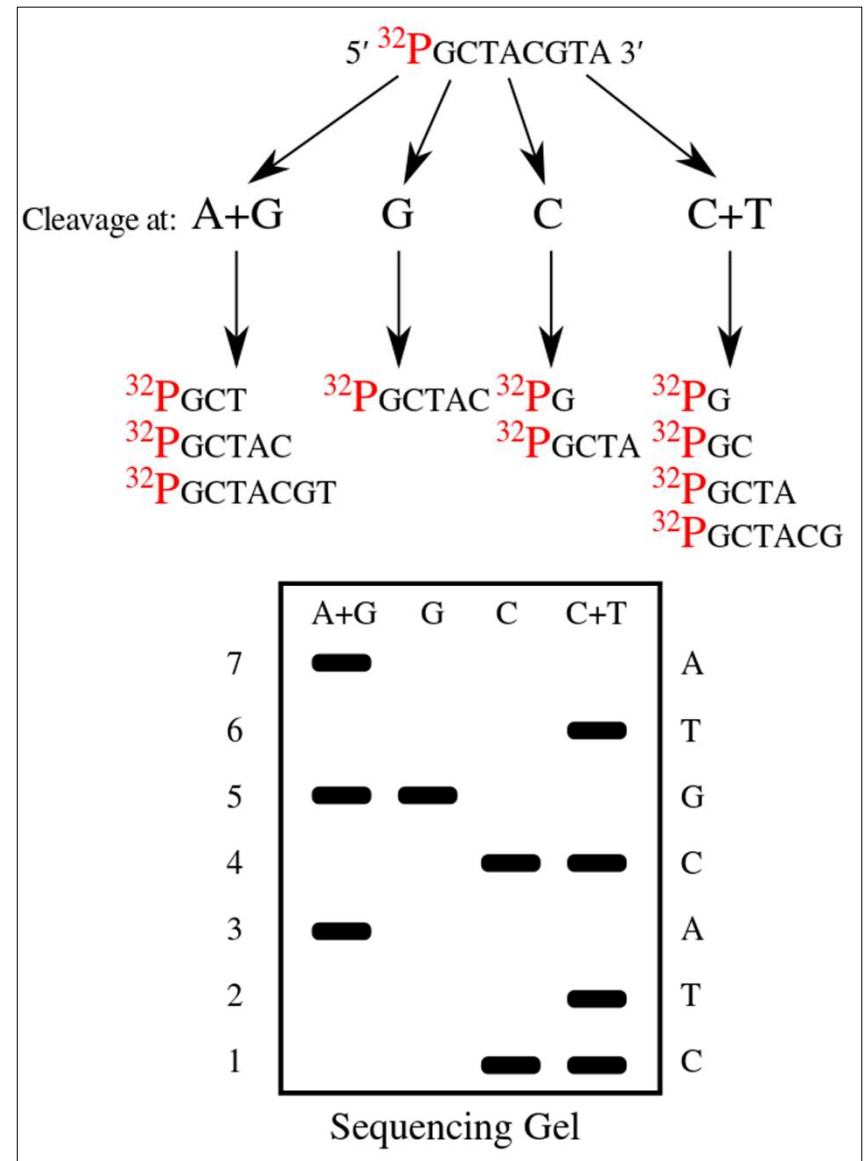
- 1976 Allan Maxam a Walter Gilbert
- První vysoce využívaná metoda DNA sekvenování
- Pracuje s vysoce toxickými chemikáliemi
- Technologická náročnost zamezila využití metody pro masivně paralelní sekvenování

A) Radioaktivní značení (^{32}P) 5' konce DNA

B) Chemická reakce s činidly štěpícími DNA (A+G ,G, C, C+T)

C) Gelová elektroforéza

D) Vizualizace autoradiograficky



Masivně paralelní sekvenování

1 Sanger Sequencing

Slow but good base and accurate structure

Reads each single base one at a time



2 Amplified Molecule Sequencing

Fast reads but only good base accuracy

Reads 300 base long fragments

Processes millions of these fragments at same time



3 Single Molecule Sequencing

Fast reads but only good structural accuracy

Reads 5,000 base long fragments

Processes hundreds of fragments at same time



4 New Technologies

Fast reads with good base and structural accuracy

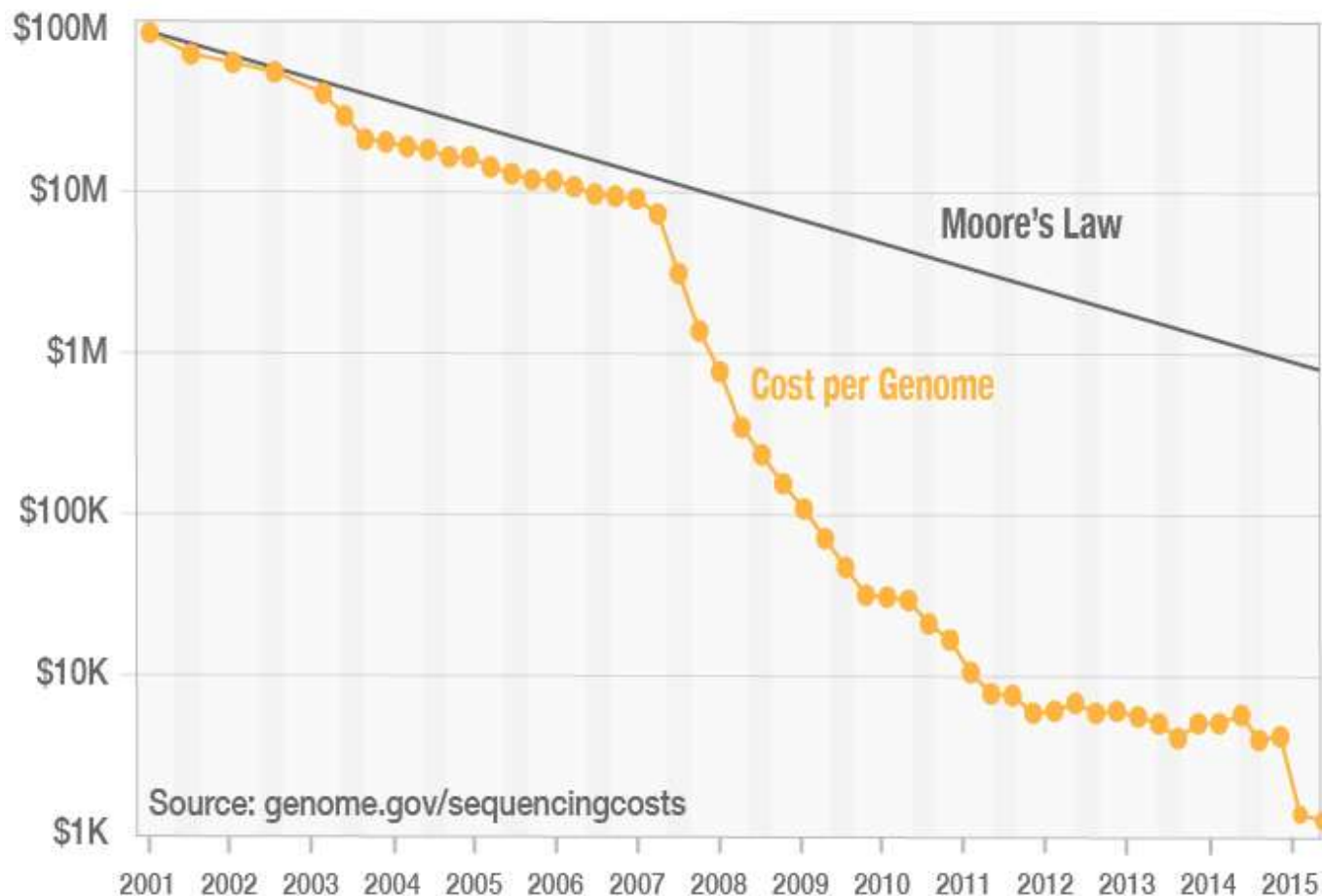
Reads 100,000 base long fragments

New Technologies in Development

Masivně paralelní sekvenování vývoj ceny

Kurz amerického dolaru vůči koruně 24.10.2023
22,98 CZK/1USD

- Momentálně lze osekvenovat lidský genom až za jenom 399USD => **9 169 CZK** v cenové AKCI bez DPH 😊
- Výrazný pokles ceny NGS umožnil postupnou implementaci metod NGS do zdravotnictví



Moorův zákon - empirické pravidlo o exponenciálním růstu výpočetního výkonu obvodů v elektronice, které roku 1965 vyslovil chemik a spoluzakladatel firmy Intel Gordon Moore.

“Počet tranzistorů, které mohou být umístěny na integrovaný obvod, se při zachování stejné ceny zhruba každých 18 měsíců zdvojnásobí.”

Sekvenování první generace

- 1977 Frederick Sanger
 - Analýza pouze jednoho úseku DNA
 - Selektivní začleňování dideoxyribonukleotidů
 - Nejpoužívanější metoda DNA sekvenování po následující čtyři dekády
 - Stále vysoce využívána pro specifické aplikace – dlouhé úseky DNA (> 500 nt), mutační status pacientů, diagnostické kritéria, STR profilování, ověření NGS výsledků
 - Applied Biosystems komercializace
- + Nízká cena, lze identifikovat sekvence až 96 genů zároveň
- Lze sekvenovat pouze jednotlivé úseky DNA, nízká kvalita identifikace prvních 15-40 bazí, kvalita čtení klesá po 700-900 bazích

1

Sanger Sequencing

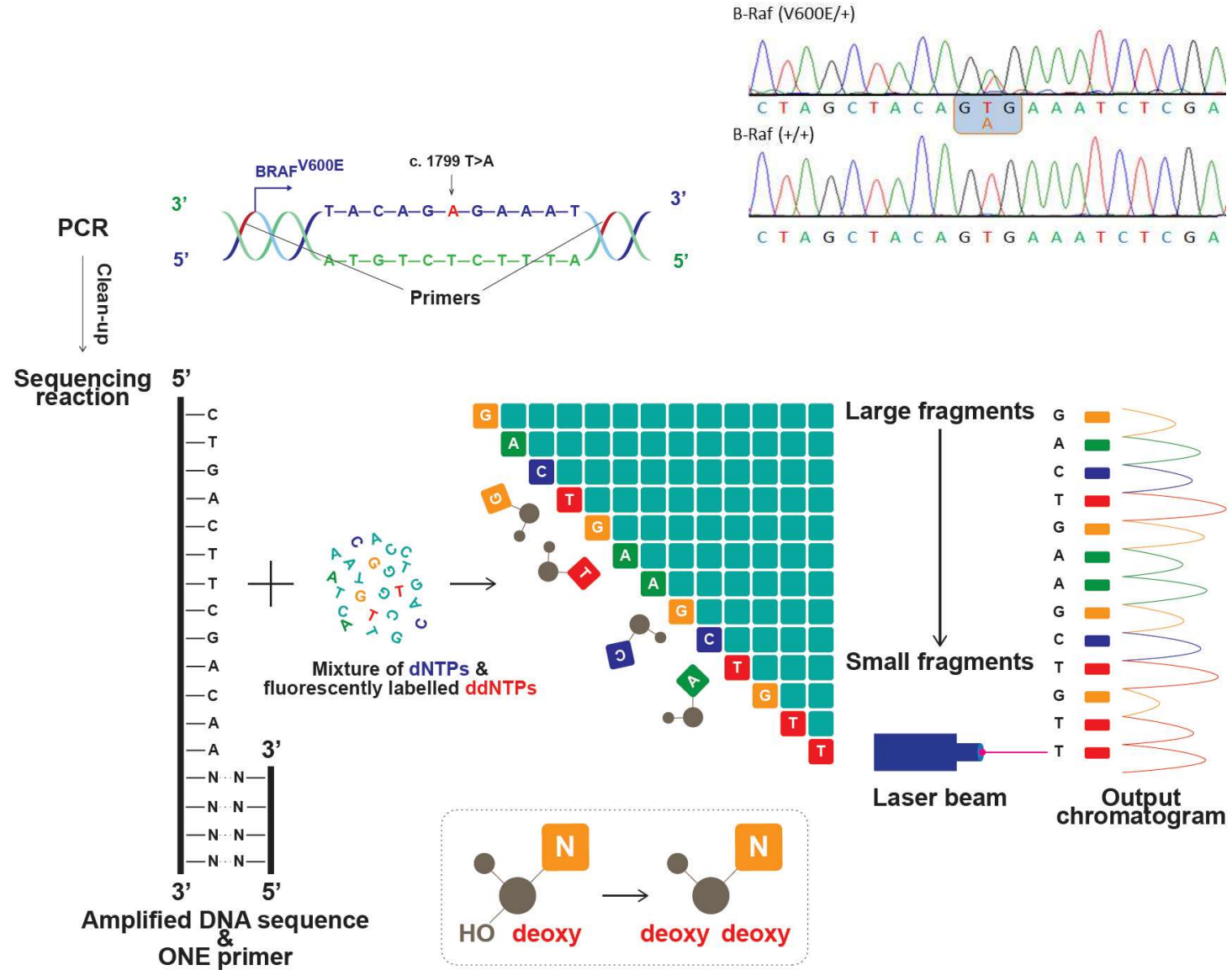
Slow but good base and accurate structure

Reads each single base one at a time



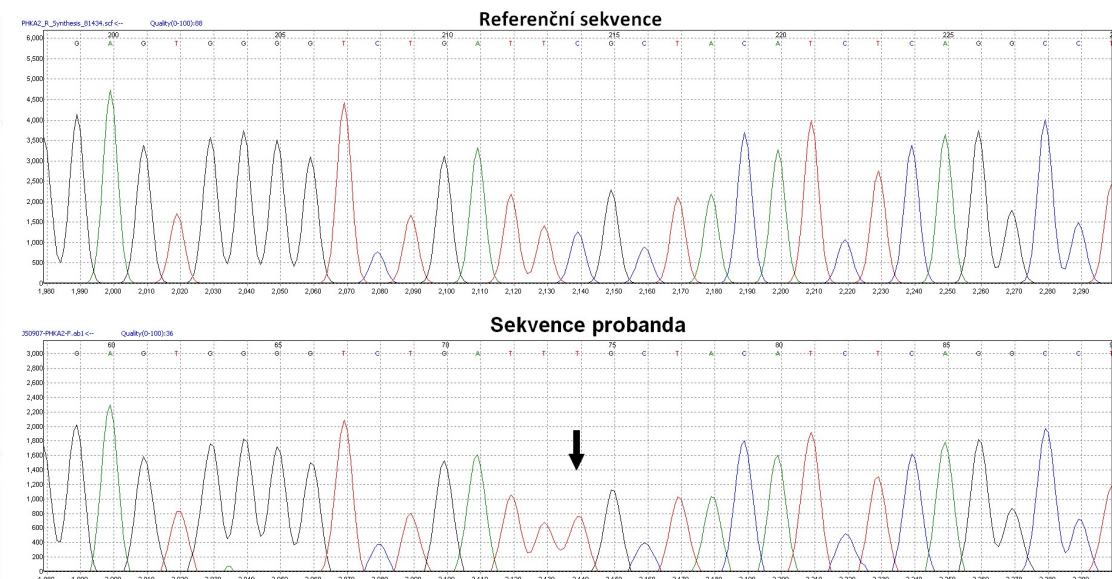
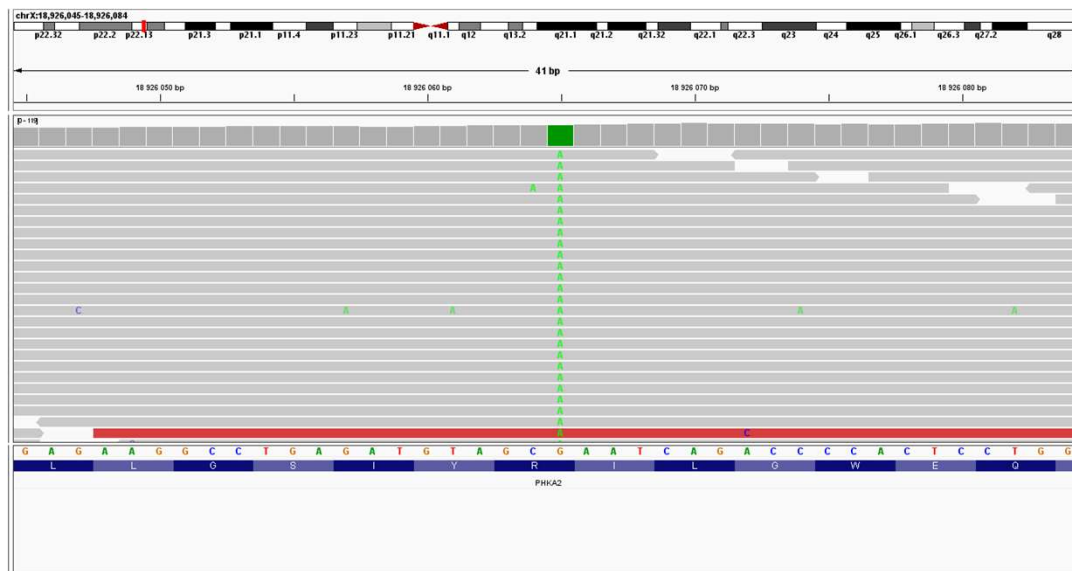
Sangerovo sekvenování

- 1) Denaturace dsDNA
- 2) Amplifikace analyzovaného segmentu DNA
- 3) Annealing sekvenačního primeru
- 4) Přidání 4 roztoků – každý má jiný terminační nukleotid (ddNTP)
- 5) Syntéza komplementárních řetězců až po zařazení ddNTP
- 6) Denaturace dsDNA
- 7) Separace fragmentů pomocí GE a analýza



Sangerovo sekvenování – příklad využití I

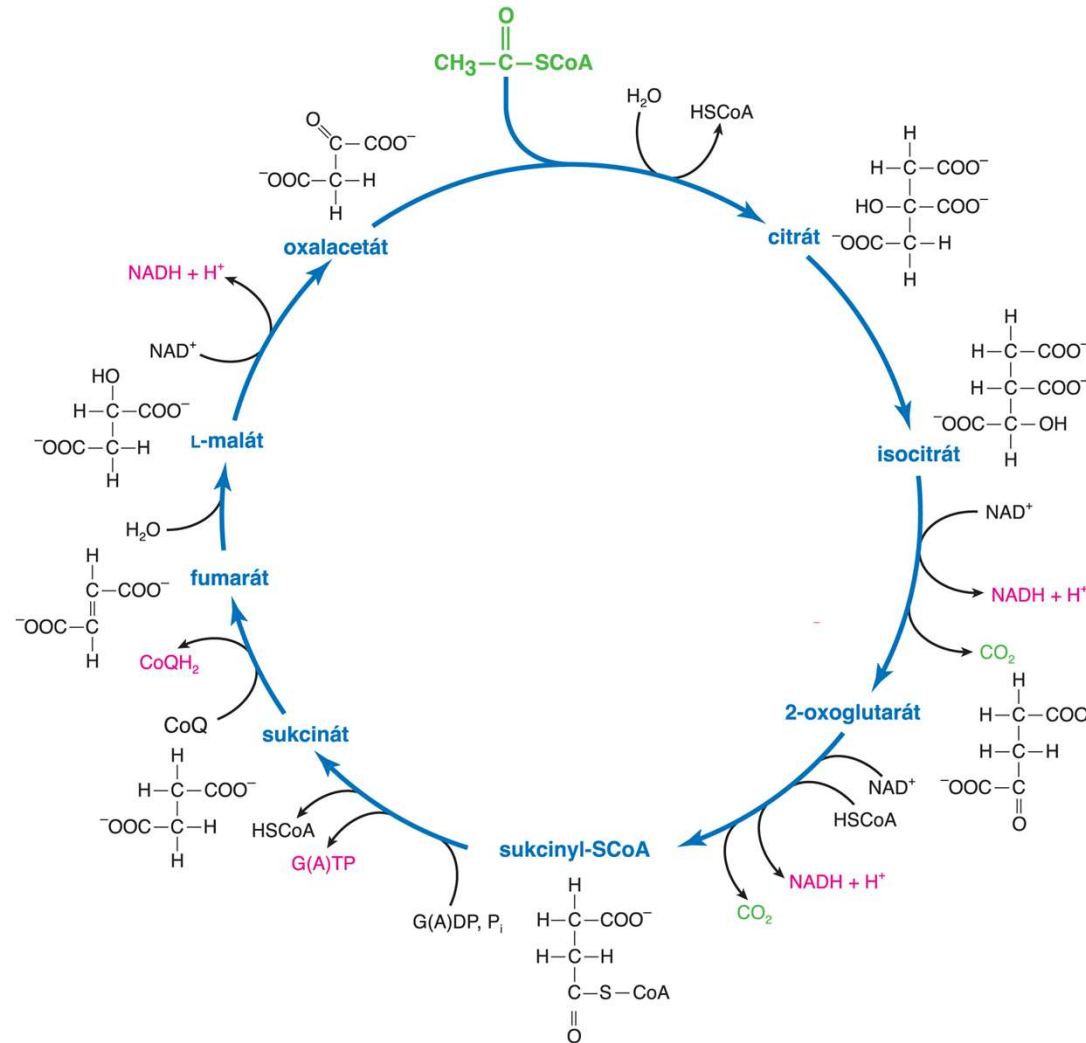
- pacient s hepatopatií v batolecím věku a opakovanými hypoglykémiami, vysloveno podezření na glykogenózu („glycogen storage disease“)
- Celoexomové sekvenování -> nalezena varianta PHKA2 c.2470C>T/p.R824C v hemizygotním stavu (X-vázaná recesivní choroba)
- varianta byla verifikována metodou Sangerova sekvenování



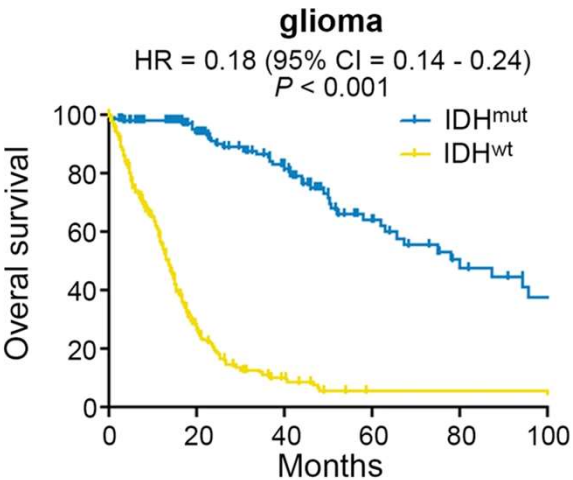
Sangerovo sekvenování – příklad využití II

Mutovaný gen IDH1 je **diagnostickým markerem** gliomů WHO 2/3.

Mutovaný gen IDH je **pozitivním prognostickým faktorem** u pacientů s gliomy a je spojen s lepším celkovým přežitím.



IDH katalyzuje oxidaci isocitrátu na 2-oxoglutarát



Unruh, D. et al, 2019

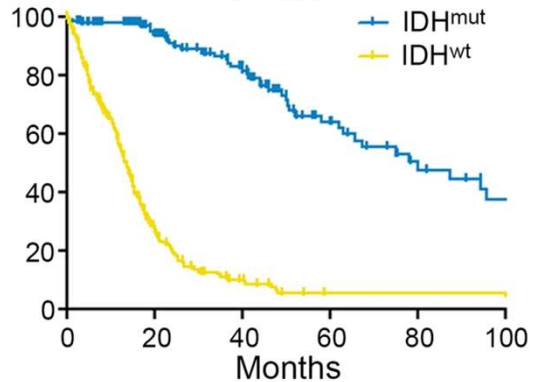
Sangerovo sekvenování – příklad využití II

Mutovaný gen IDH1 je **diagnostickým markerem** gliomů WHO 2/3.

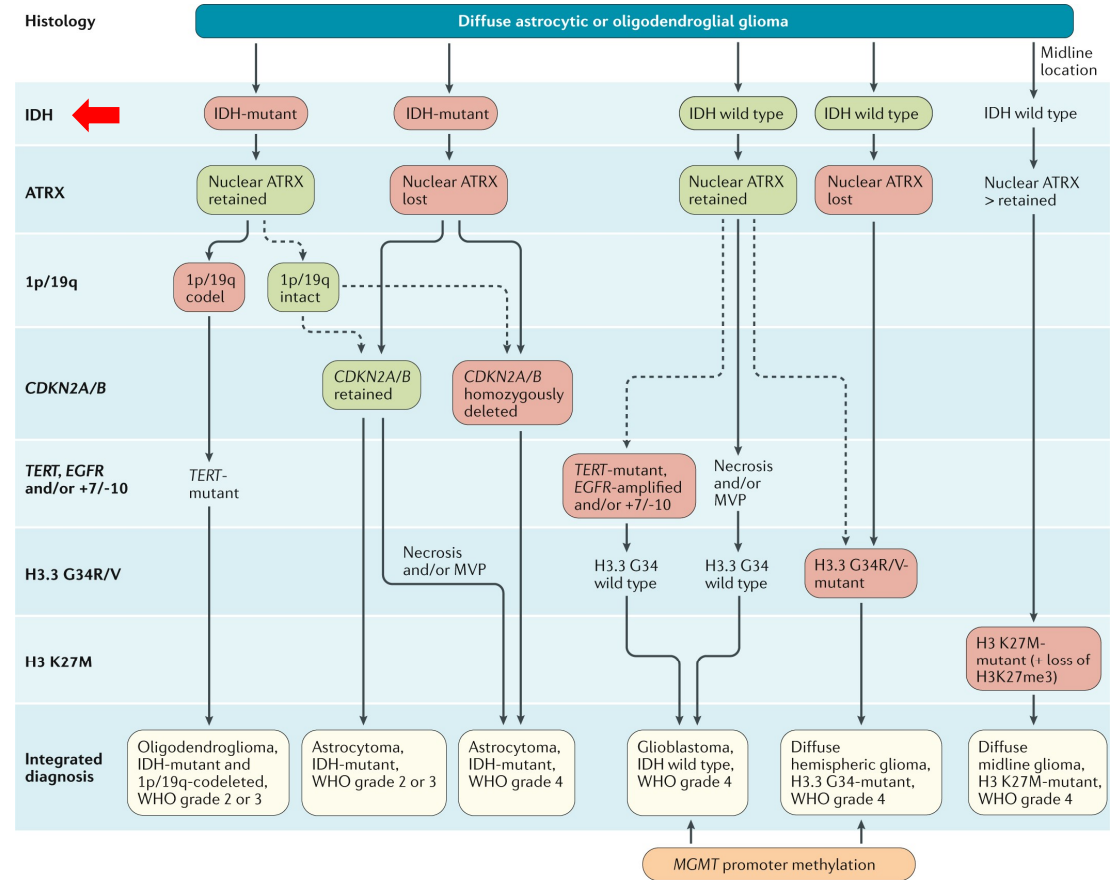
Mutovaný gen IDH je pozitivním **prognostickým faktorem** u pacientů s gliomy a je spojen s lepším celkovým přežitím.

glioma

HR = 0.18 (95% CI = 0.14 - 0.24)
P < 0.001



Unruh, D. et al, 2019



Weller, M., et al. **EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood.** *Nat Rev Clin Oncol* 18, 170–186 (2021).

Sangerovo sekvenování – příklad využití II

Mutovaný gen IDH1 je diagnostickým markerem gliomů WHO 2/3.

Mutovaný gen IDH je pozitivním prognostickým faktorem u pacientů s gliomy a je spojen s lepším celkovým přežitím.

Kód pacienta: XXXXXXXXXX
 Číslo protokolu: XXXXXXXXXX
 Číslo FFPE bloku: XXXXXXXXXX
 Obsah nád. buněk: 80 %
 Vzorek přijat: 21/12/2020
 Výsledek vydán: 08/01/2021
 Vyšetření: Mutační analýza kodonu 132 genu IDH1 a kodonu 172 genu IDH2 u zasláního FFPE vzorku

Výsledek:

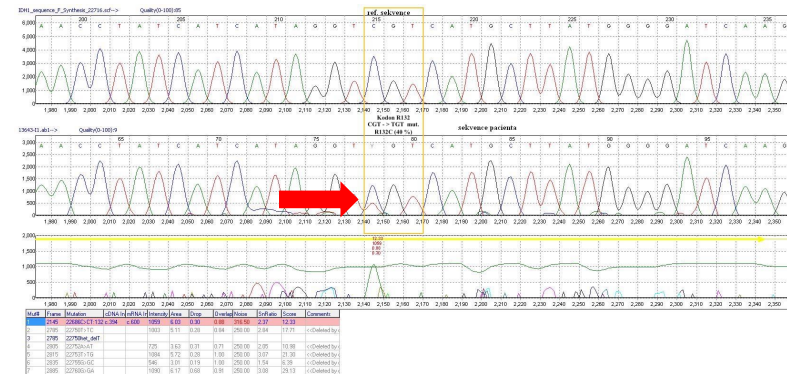
U pacienta byla zjištěna mutace v kodonu R132 genu IDH1 - mutace R132C (c.394C>T), ale nebyla zjištěna mutace v kodonu R172 genu IDH2.

Metodika vyšetření:

Ze zasláního FFPE vzorku byla izolována DNA a následně byla provedena analýza kodonu 132 genu IDH1 a kodonu 172 genu IDH2 – amplifikace a sekvenční analýza exonu 4 genu IDH1 a IDH2.

Přílohy

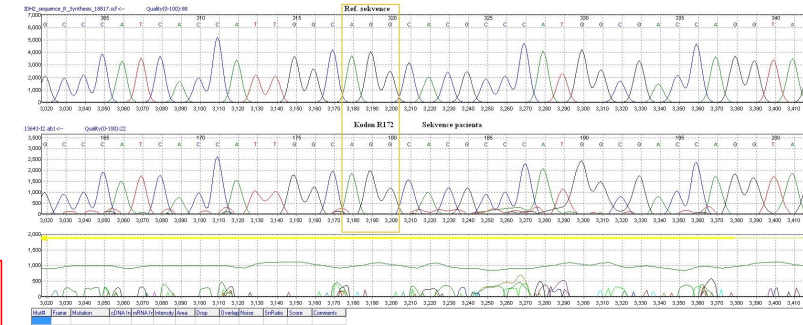
Sekvence genu IDH1 hodnocená v programu Mutation Surveyor



Sekvence genu IDH1 vydaná sekvenátorem ABI 3500xl

TWAGTMTGGAYTTCAGAGAGCCATATCTGCAAAAATATCCCCGGCTTGTGAGTGGATGGGTAACATCATCATA
 GGTGTGTCATGCTTATGGGGATCAAGTAAGTCATGTTGGCAATAATGTGATTTTGCATGTTTTTTTTTCWKGGCCCAAAA
 ATTTCCAACCTGWATGKGTTTTATCTTATCTTTTGGWATCTACMCCCWTTAAGCAAGGWTRAAA

Sekvence genu IDH2 hodnocená v programu Mutation Surveyor



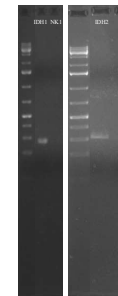
Sekvence genu IDH2 vydaná sekvenátorem ABI 3500xl

CGTCTGCAGTGCTCAGTCGRRGGWGCCAGGTGAGWGGATCCCTCTCCACCCWGGCTACCCWGGTCCGCAWGG
 GGCGTGCTGCCAATGTGTATGGGCTTGGTCCAGCCAGGACTAGGCGTGGGATGTTTTTCAGATGATGGGCTCCCG
 GAAGACAGTCCCCCAGGATGTTCCGATAGTTCATTGGGACTTTCCACATCTTCTCAGCTTGAACCTGTGAGGA
 CAGAGATAATAGTGGTCCCACTGCAGCA

Výstup z měření koncentrace a čistoty DNA na spektrofotometru:

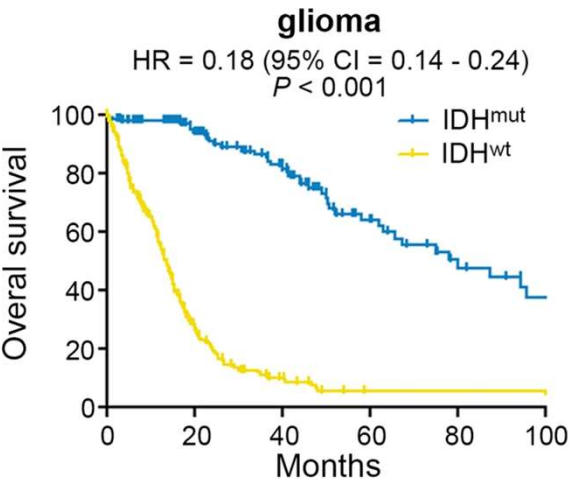
	Koncentrace [ng/μl]	A260/A280	A260/A230
1. eluce	810,6	2,00	2,22
2. eluce	167,3	1,94	2,34

Elektroforetické rozdělení PCR produktů na agarózovém gelu.



Vyžádala:
 Zhotovila:
 Zkontroloval a vydal:

MUDr. Katarína Múčková
 Mgr. Dagmar Al Tukmachi, Ing. Mgr. Michaela Ručková
 Mgr. Jiří Šána, Ph.D., Mgr. Marek Večeřa



Unruh, D. et al, 2019

Sekvenování nové (druhé) generace (NGS)


- Počátek vývoje next generation sequencing (NGS) metod v 90. letech 20. století
- Analýza mnoha molekul naráz – genom, exom, transkriptom, etc..
- Miniaturizace a paralelizace sekvenačních technologií
- Klonální amplifikace buď emulzní PCR nebo bridge PCR
- Sekvenování syntézou či ligací
- Fragmentace dlouhých molekul na kratší úseky
- 50 až 500 bazí
- SOLiD, Roche 454, Ion Torrent, [Illumina](#)

2 Amplified Molecule Sequencing

Fast reads but only good base accuracy

Reads 300 base long fragments

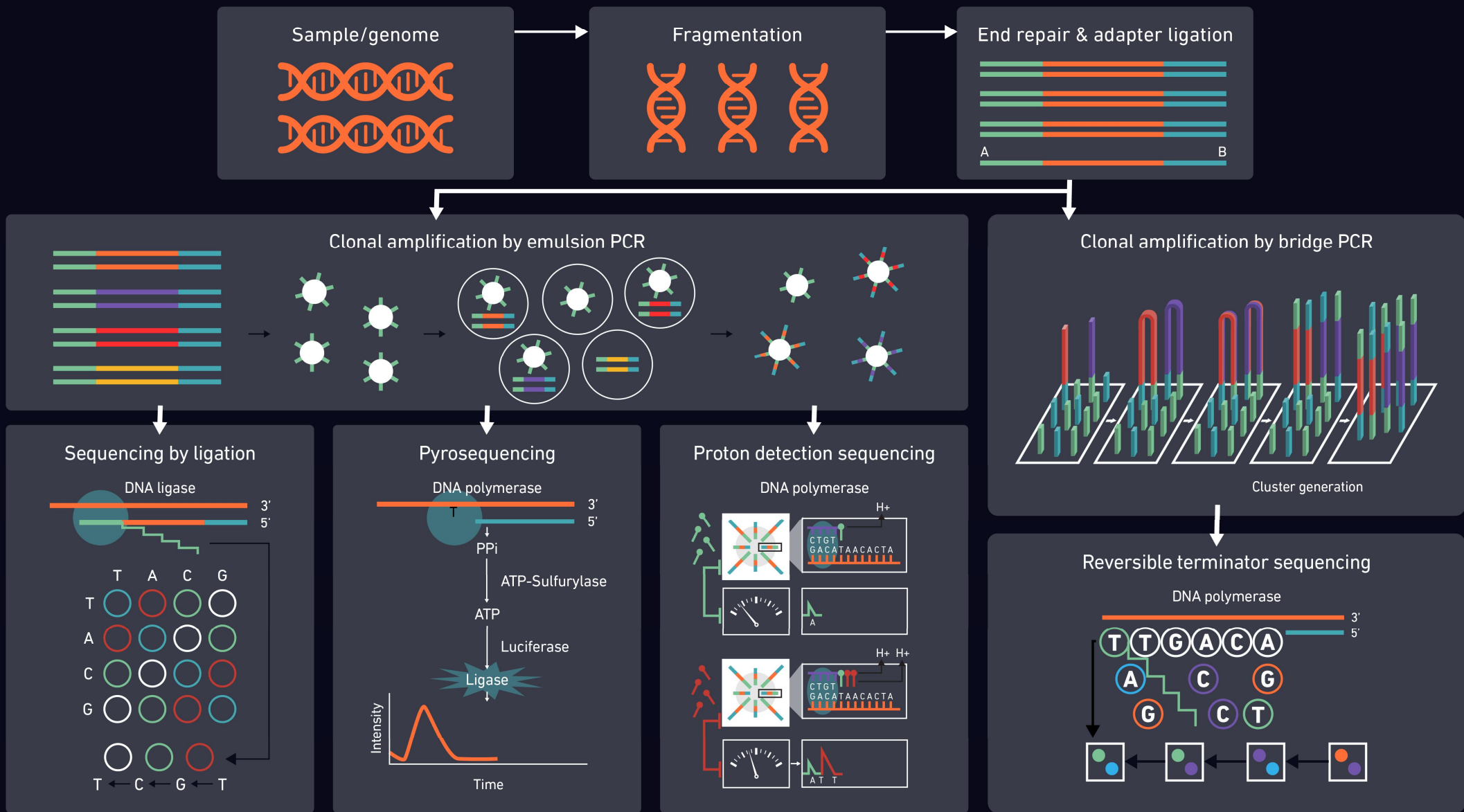
Processes millions of these fragments at same time

illumina


ThermoFisher SCIENTIFIC
The world leader in solving science
life technologies



Roche

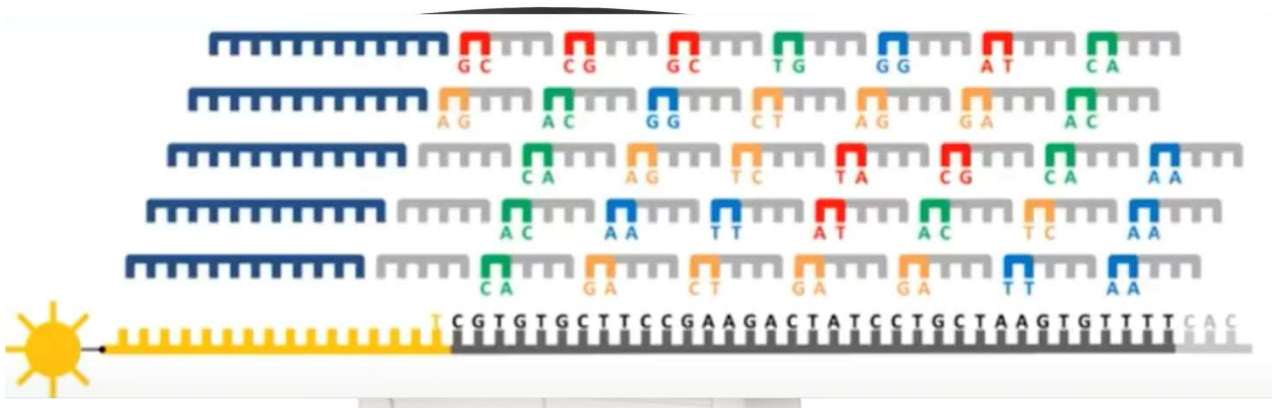
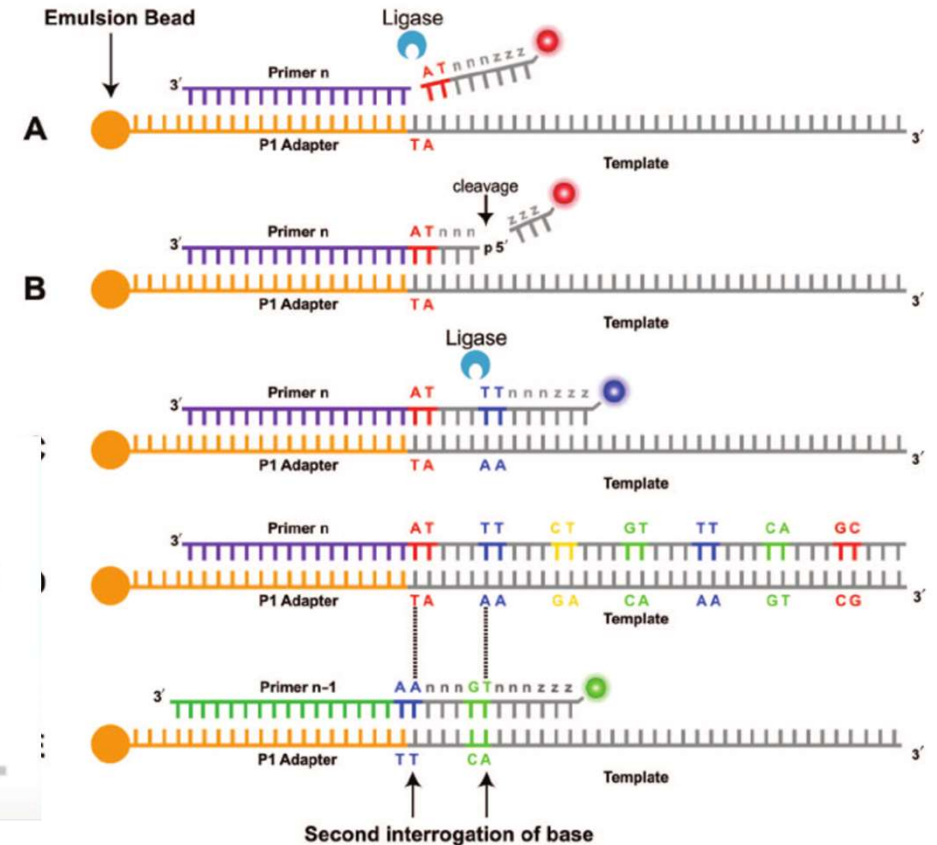
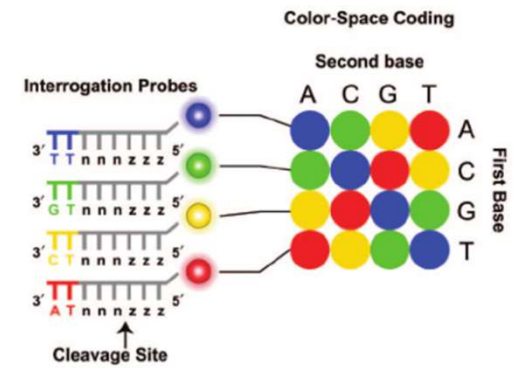


Applied Biosystems SOLiD

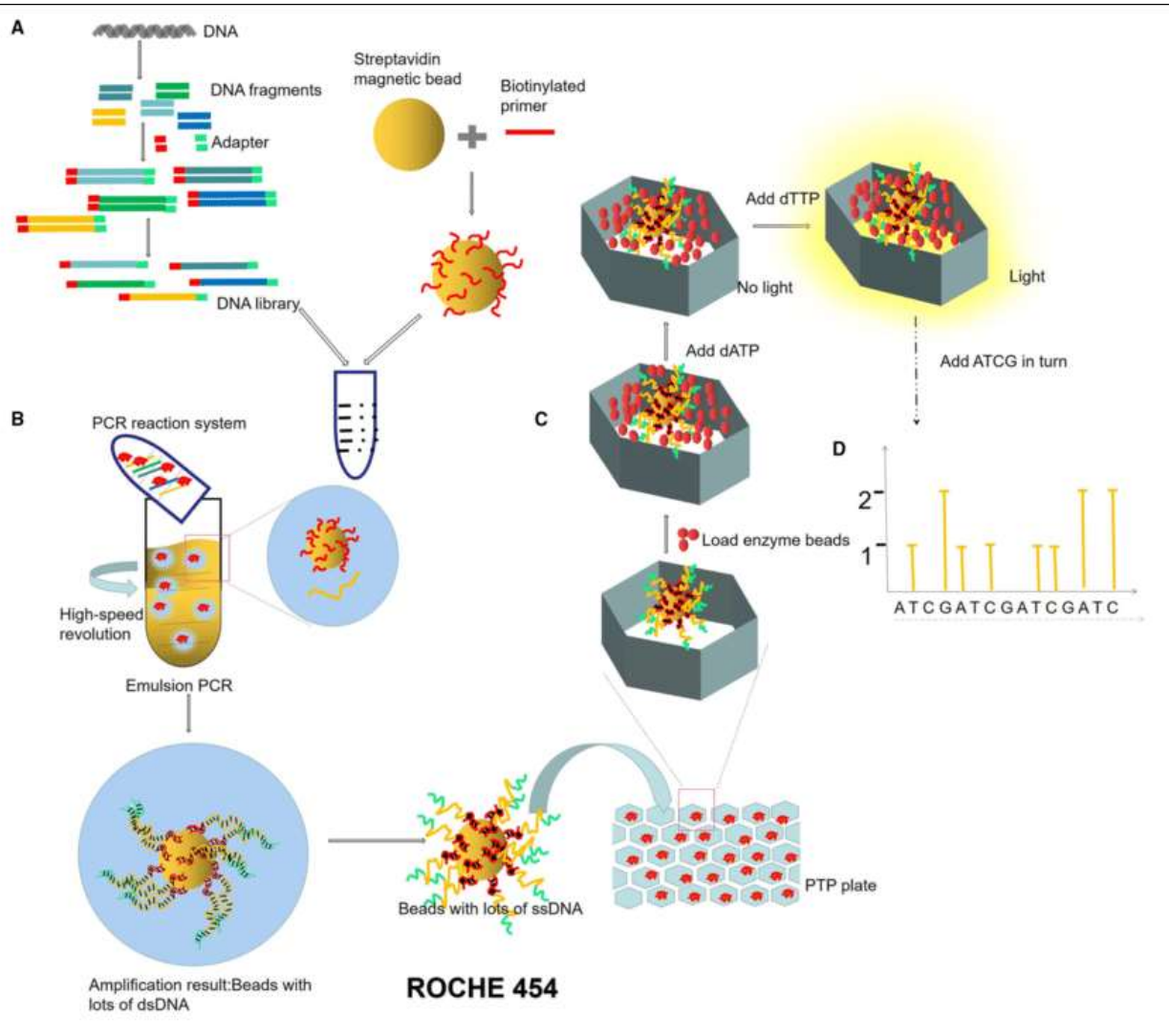
- Princip: Seq by Oligo Ligation/Detection
- Klonální amplifikace: emulzní PCR
- Ligázy jsou více selektivní než polymerázy
- Dvojité čtení bazí

+ Vysoká přesnost 99,94% - vhodné pro detekci variant a vzácných jednonukleotidových záměn (SNP), nízká cena

- Nižší výtěžnost dat než např. Illumina, dlouhá doba sekvenování 6-7 dní



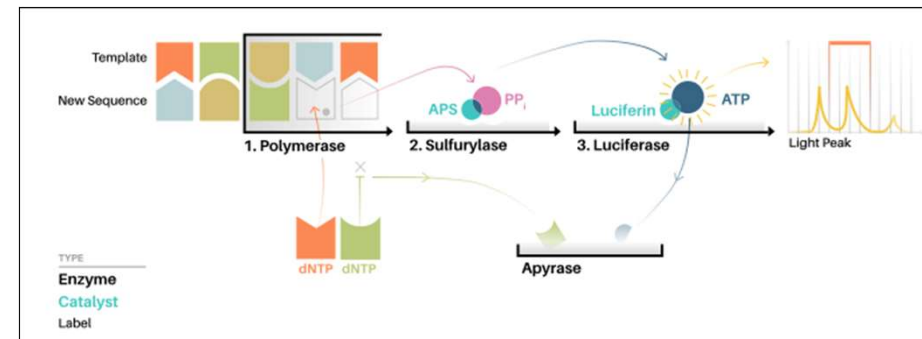
Roche 454



- Původně 454 Life Sciences, odkoupeno Roche
- Princip: vysokokapacitní pyrosekvenování
- Klonální amplifikace: emulzní PCR
- **Prodej ukončen v roce 2017**



Figure 20 The Roche 454 GS FLX+ (left) and GS Junior Benchtop Systems

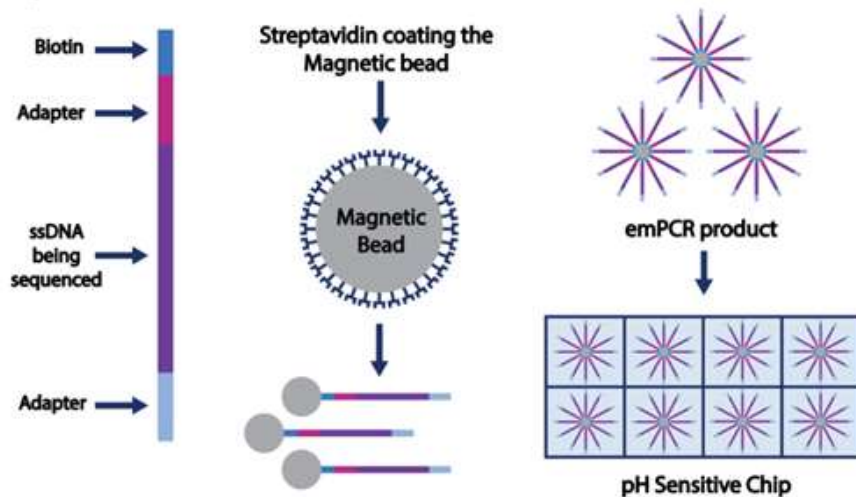


Thermo Fisher Scientific Ion Torrent

- Princip: detekce protonu uvolněného po začlenění báze do rostoucího řetězce DNA
- Klonální amplifikace: emulzní PCR
- Různá délka čtení, pouze v módu single read
- Vhodné pro de novo sekvenování velkých genomů, doplnění ostatních NGS metod
- + Nízká cena, rychlost, malý přístroj
- Krátká délka čtení ~100-200 bází, vyšší chybovost



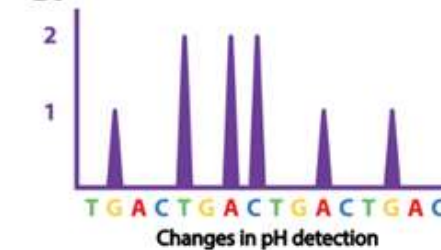
A.



B.



C.



Illumina

- Dříve Solexa
- Momentálně nejrozšířenější technologie masivně paralelního sekvenování
- Princip: sekvenování syntézou za pomoci reverzibilních terminátorů
- Klonální amplifikace: bridge amplification
- Stejná délka čtení
- Single nebo Pair-end read mód
- 99% přesnost

Sequencing Systems for Research



iSeq 100



MiniSeq



MiSeq



NextSeq 550



NextSeq 1000 & 2000



NovaSeq 6000



NovaSeq X & X Plus

Illumina

+ vysoká přesnost

nejnižší cena za jednu osekvenovanou bázi

množství publikací využívající Illumina technologii

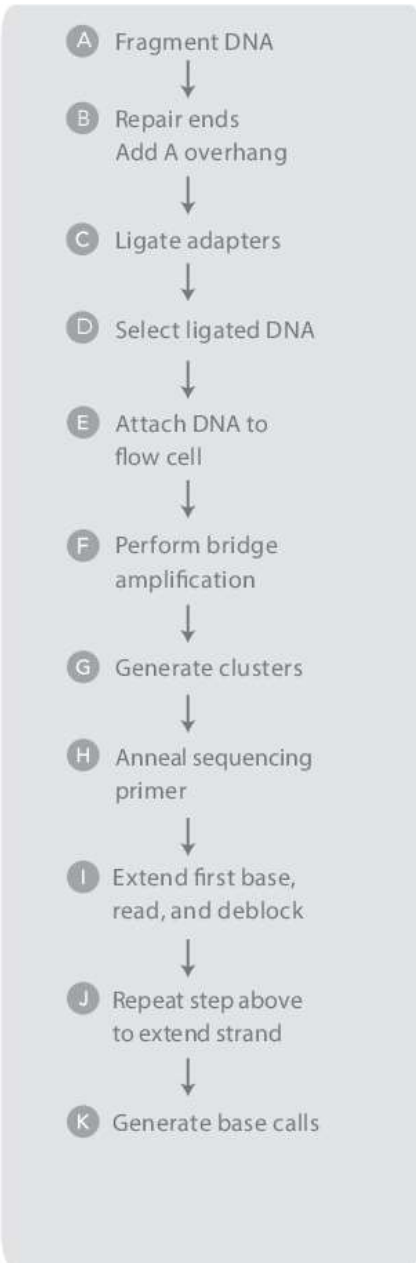
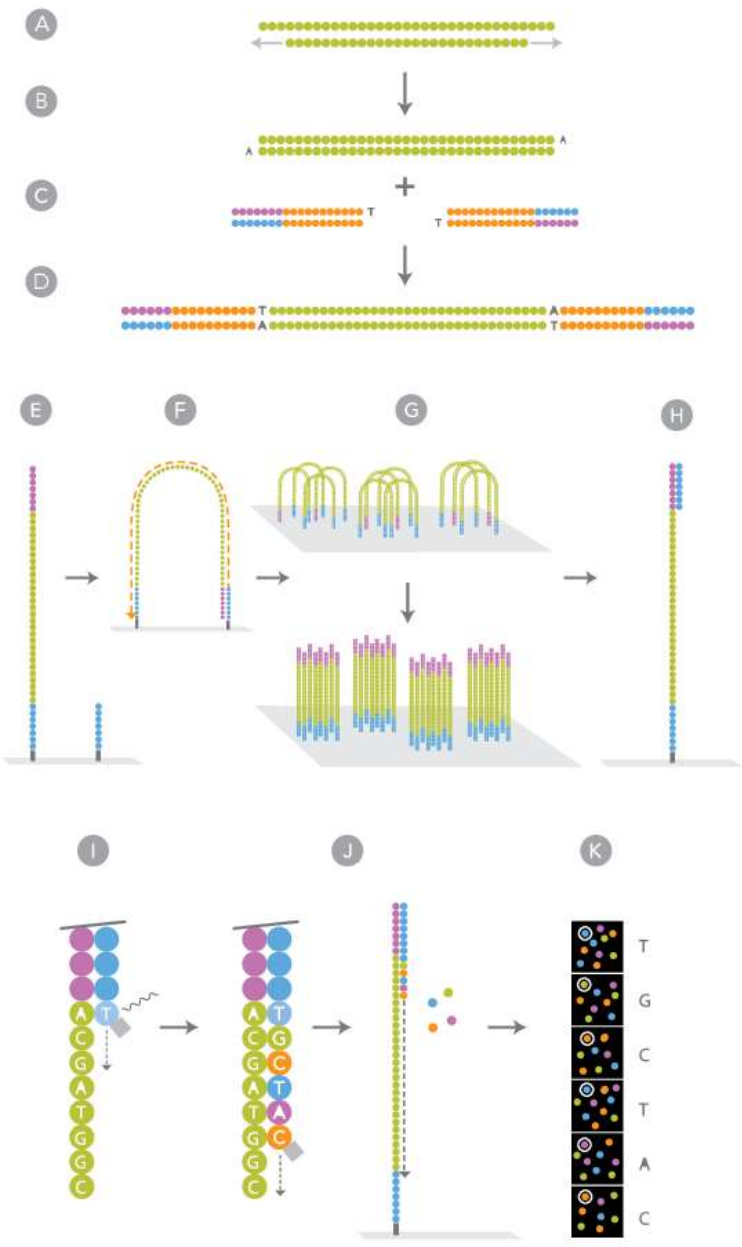
množství komerčně dostupných kitů pro různé aplikace

- vysoké pořizovací náklady

krátká délka čtení – max 300 bází – pouze některé přístroje

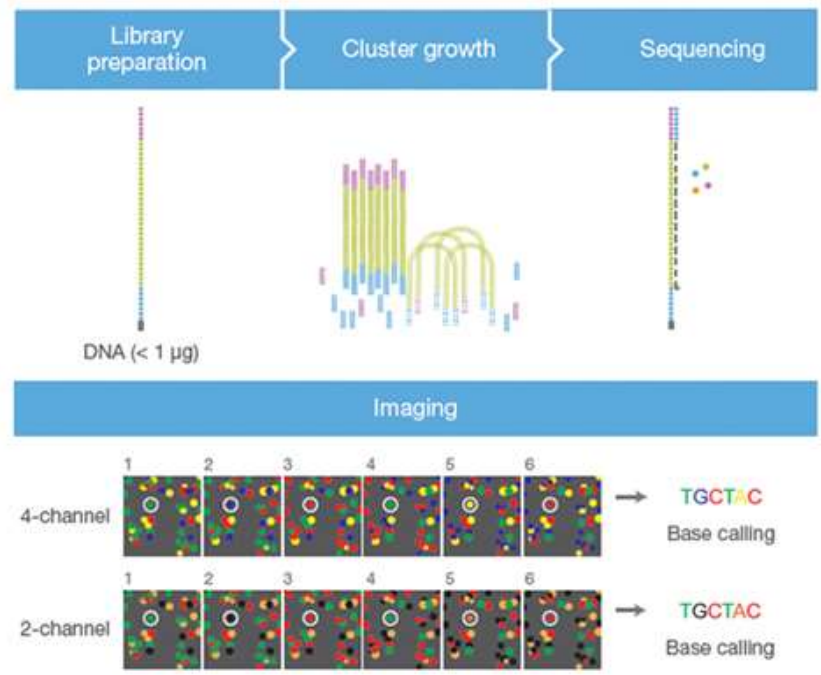
komplikovaná de novo assembly z Illumina NGS dat

dlouhá doba sekvenování 12h až 4 dny

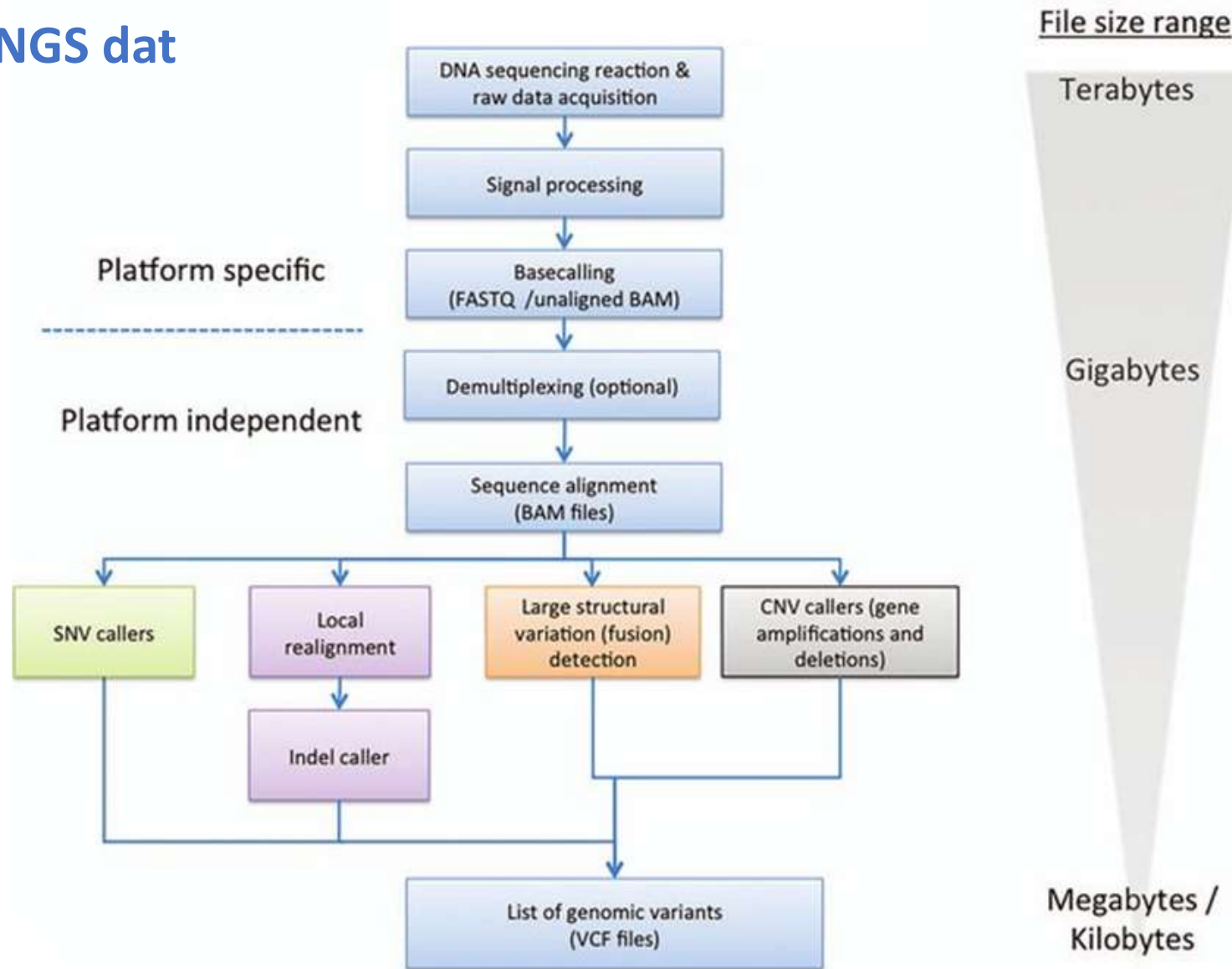


Illumina – příprava knihovny a sekvenování

- Můstková PCR umožňuje pair-end čtení
- Záznam signálu 4 nebo 2 kanálový

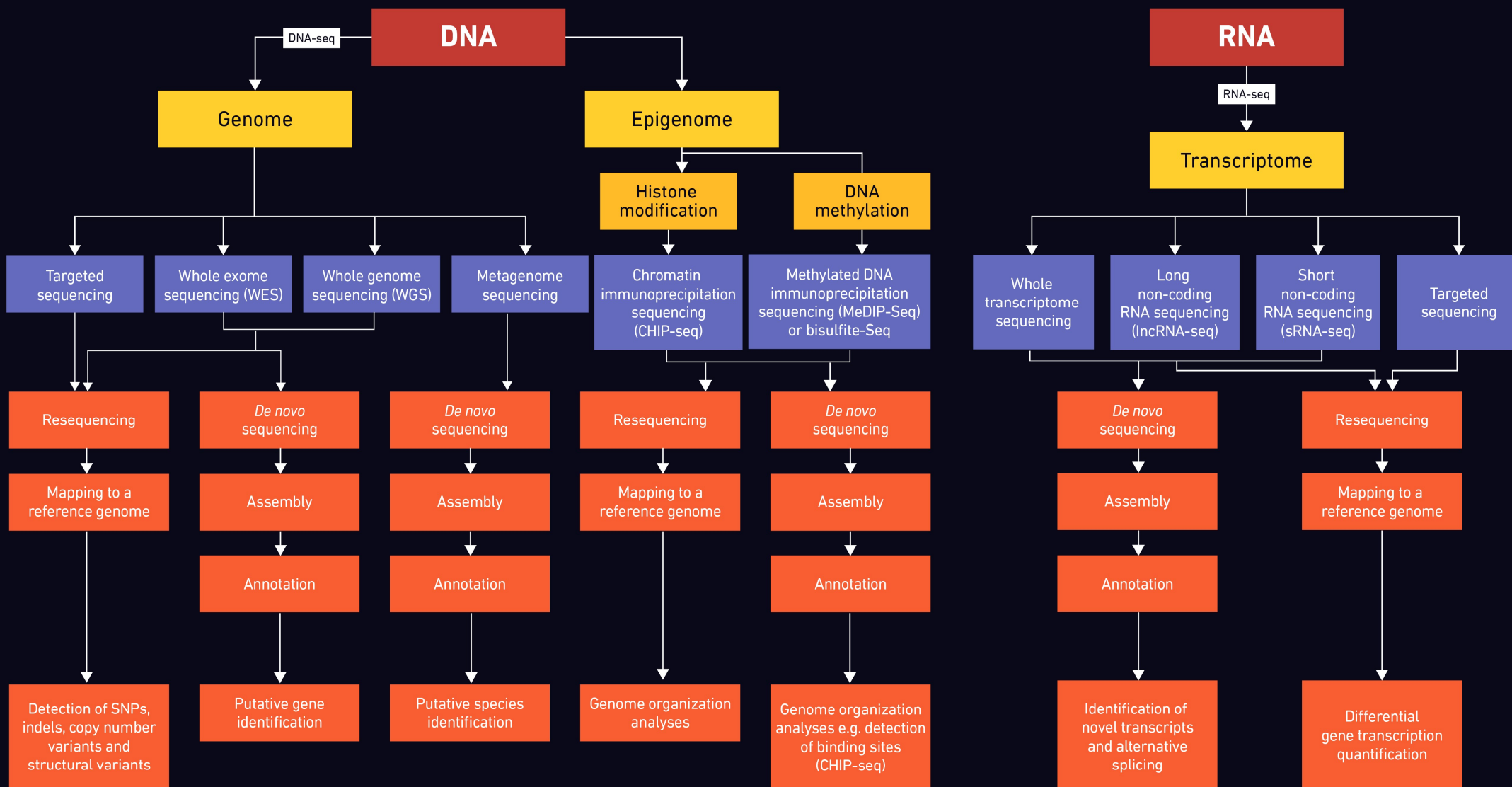


Analýza NGS dat



2022

NGS modifikace



Precizní medicína

Zaměřeno na orgány



Chemoterapie

Nádor je léčen primárně podle **lokalizace** v těle

Stratifikace podle biomarkerů



Cílená léčiva

Nádorová terapie je vybírána na základě obojího, **orgánové lokalizace** i **biomarkerů**

Precizní medicína

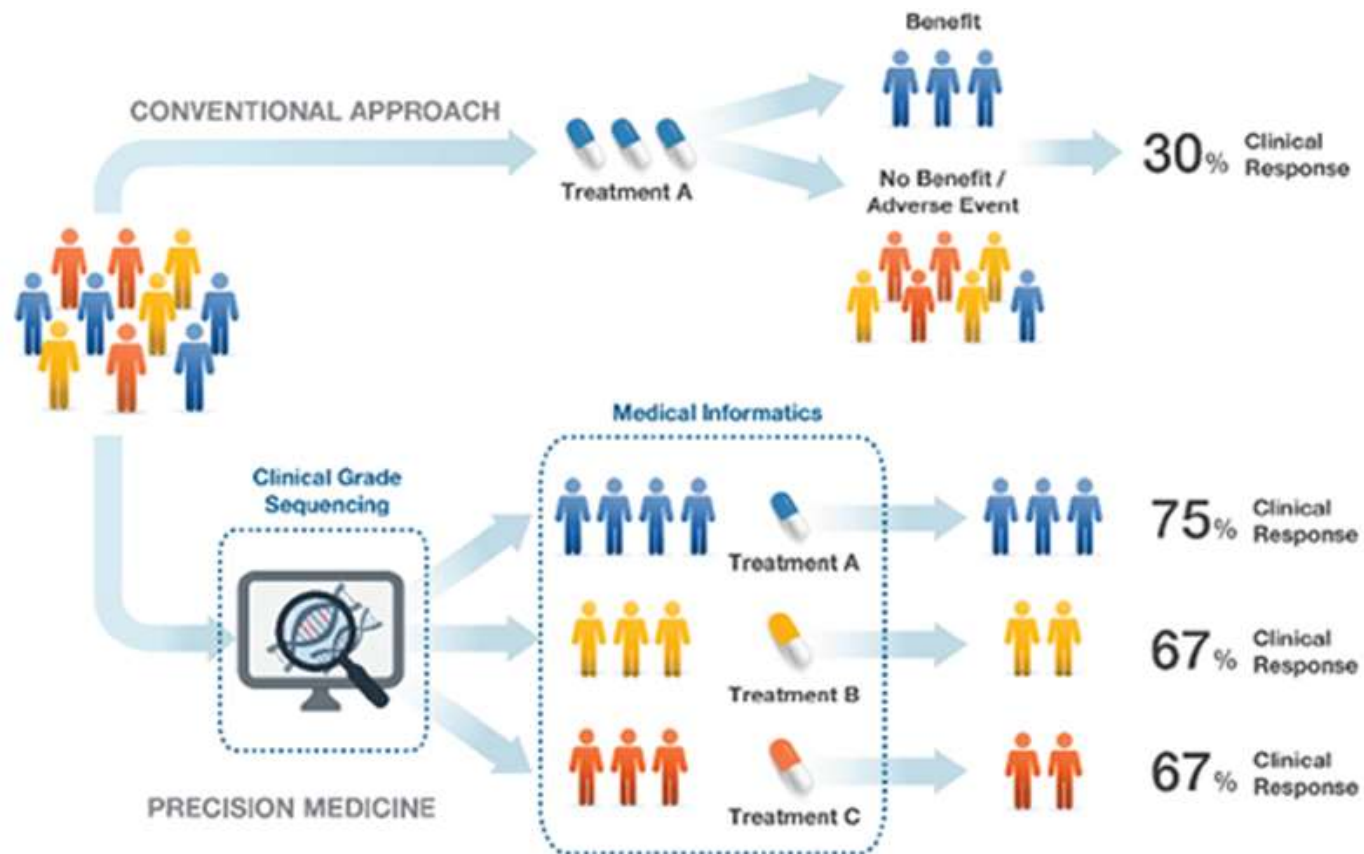


Personalizovaná zdravotní péče

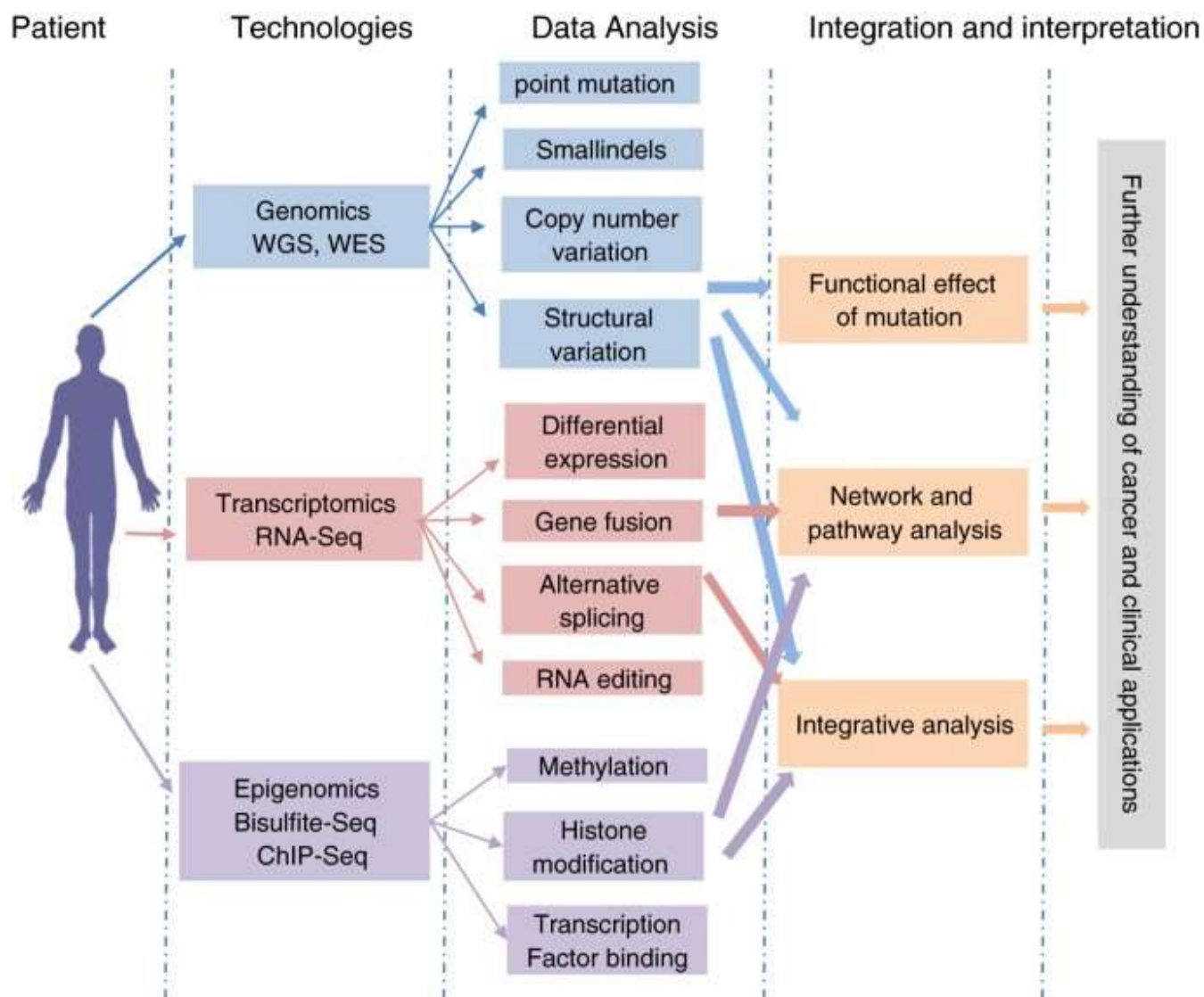
Molekulární poznatky umožňují léčbu šitou na míru **jedinečného genomového profilu** pacientova nádoru

Precizní medicína a NGS

- Nádorová onemocnění se vyznačují vysokou genetickou heterogenitou – nízká účinnost léčby
- Precizní onkologie by s využitím NGS mohla v budoucnosti výrazně zvýšit šance podání vhodné léčby vhodnému pacientovi

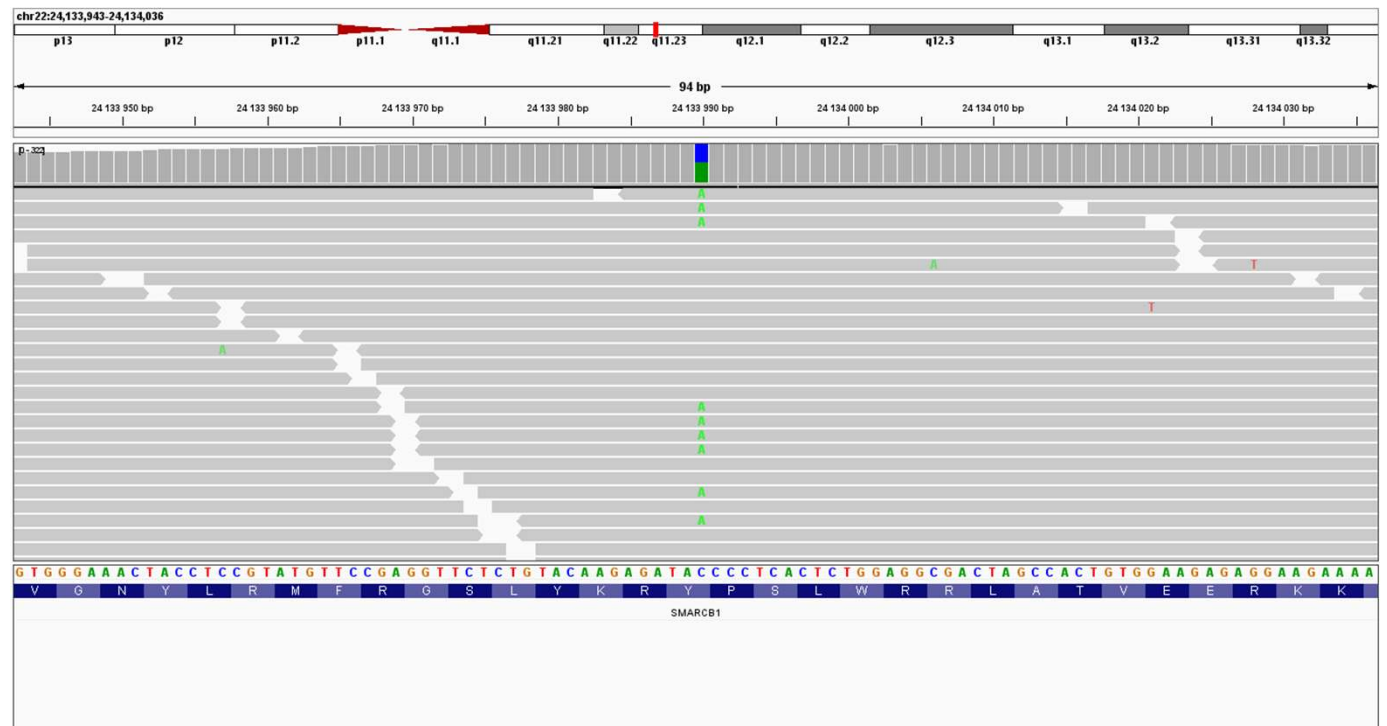
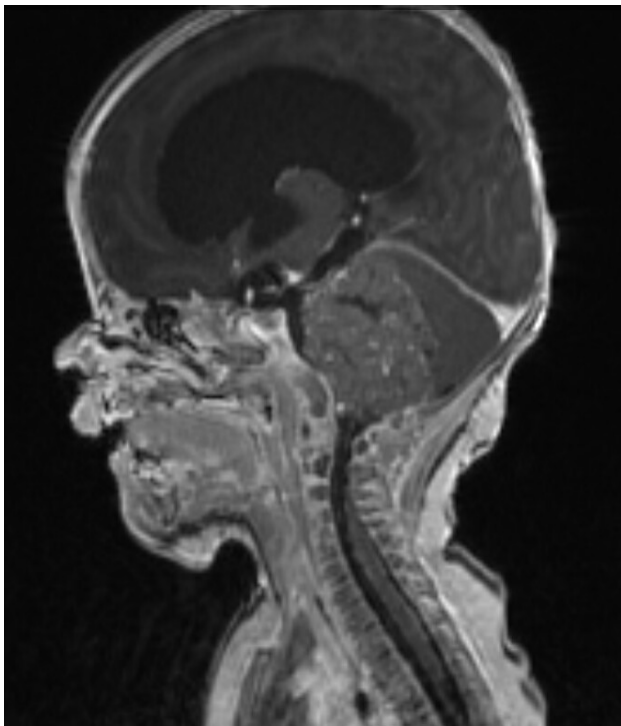


Využití NGS v onkologii



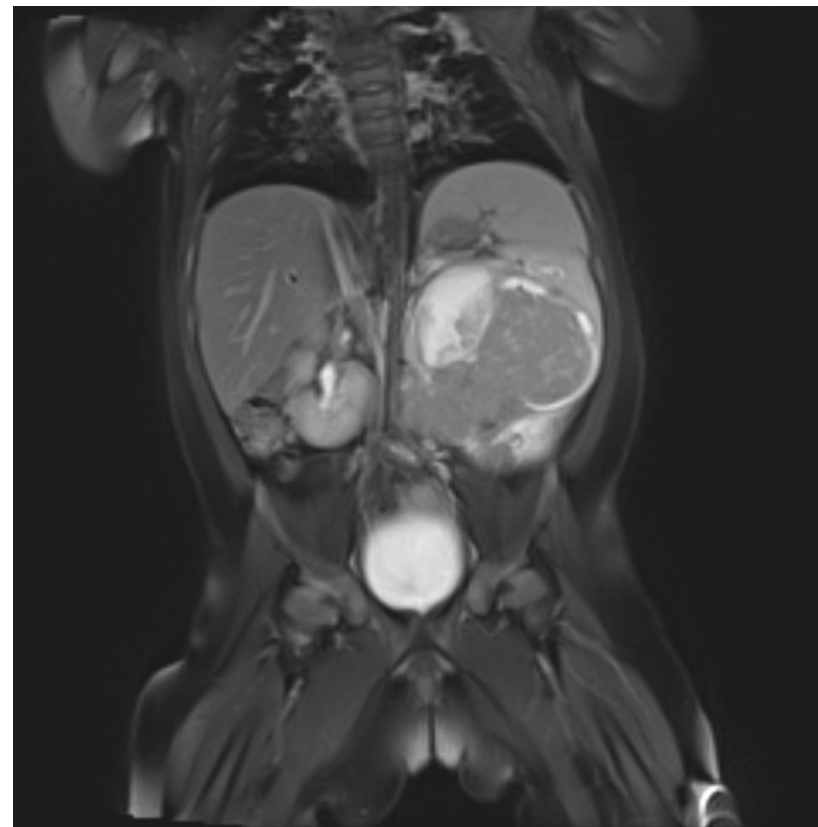
NGS Germinální Exom – příklad využití

- U 3měsíční holčičky byl diagnostikován nádor CNS, konkrétně atypický teratoidní rhabdoidní tumor
- Vzhledem k tak nízkému věku bylo provedeno vyšetření nádorových predispozic metodou celoexomového sekvenování s nálezem patogenní varianty SMARCB1 c.141C>A/p.Y47*
- Holčička bohužel zemřela cca do měsíce od diagnózy, nicméně měla sestru, dvojče - prezentováno jako dvojvaječné



NGS Germinální Exom – příklad využití

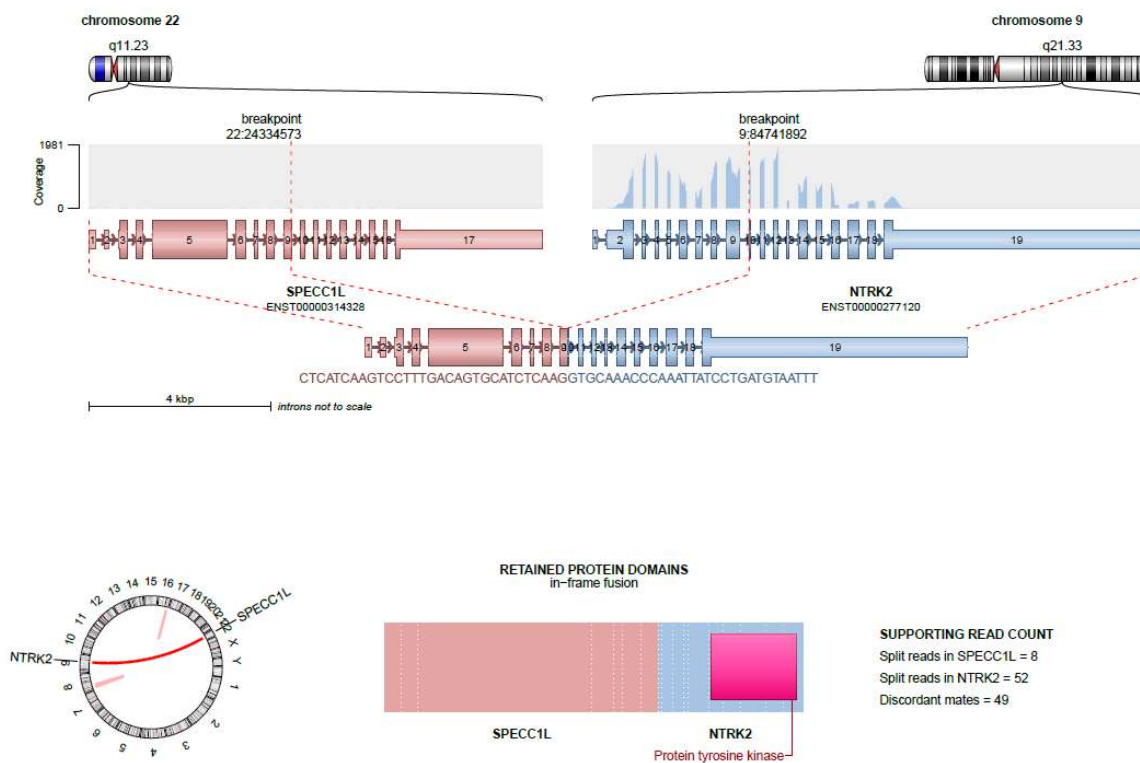
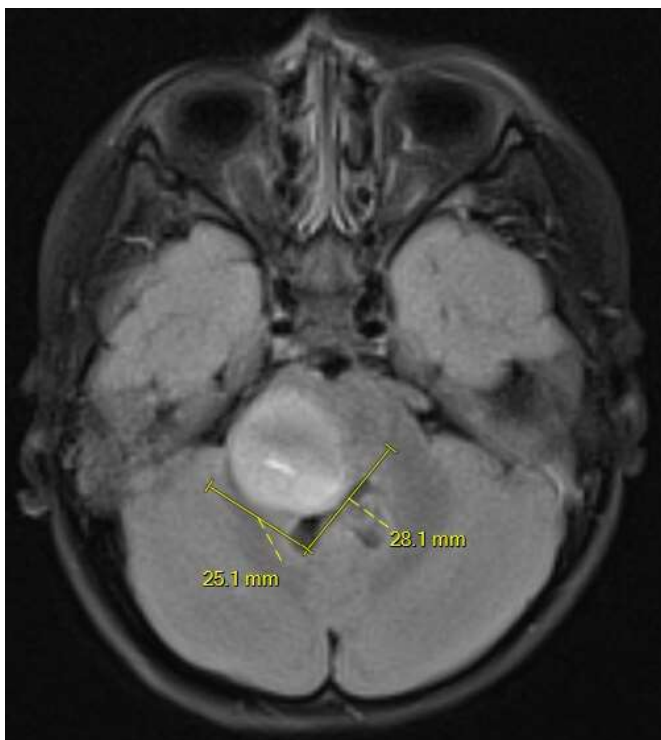
- Testování dvojčete, tentokrát již cíleně Sangerovou metodou (díky již předchozí znalosti z vysokokapacitní metody jako je WES) poukázalo na stejnou variantu genetička indikovala dovyšetření zygotity a potvrdilo se, že se jedná o jednovaječná, ne dvojevaječná dvojčata
- U dvojčete se okamžitě zahájilo sledování pomocí MRI a při jedné z kontrol byl objeven rhabdoidní tumor ledviny, ještě než se stačil klinicky manifestovat
- Holčička podstoupila resekci tumoru a je dále onkologicky léčena, mimo jiné inhibítorem EZH2, lék byl nasazen na podkladě mutace SMARCB1 zjištěné NGS.
- V tomto případě tedy analýza nejen přispěla k časnému sledování, které přineslo včasnou detekci onemocnění a zahájení léčby, ale zároveň se přinesla terapeutický cíl



NGS Genové fúze– příklad využití

- tříletá holčička s diagnostikovaným nádorem CNS, uzavřen jako difúzní středočárový gliom
- Komplexní molekulární analýza zahrnující mimo jiné vyšetření fúzních genů metodou cíleného RNA sekvenování odhalila přítomnost fúze SPECC1L-NTRK

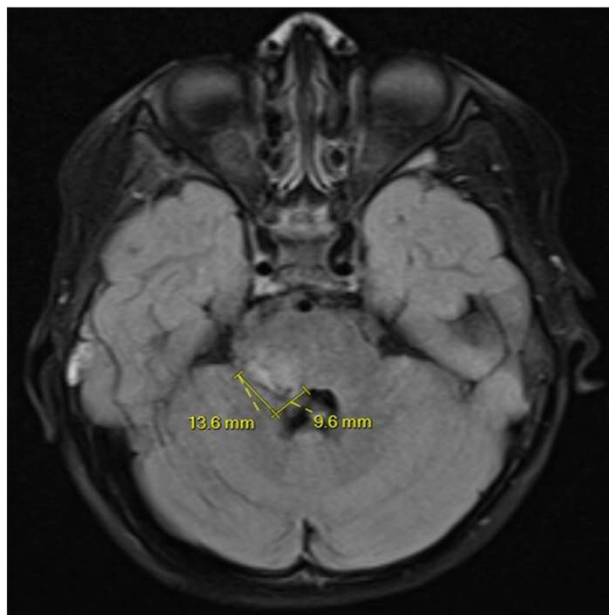
Before treatment initiation



NGS Genové fúze– příklad využití

- Pro pacienty se solidními nádory a NTRK fúzemi jsou schváleny léčiva ze skupiny tzv. NTRK inhibitorů, které mají velmi signifikantní léčebný efekt
- Holčička je více než rok léčena kombinací NTRK inhibitoru spolu s dalšími léčivy a momentálně je v radiologické remisi (MRI snímek je z doby roku od zahájení).
- Výsledek je velmi příznivý zejména vzhledem ke skutečnosti, že pacienti s difúzními středočárovými gliomy mají 2leté přežití 5-10 %, tato pacientka je po cca roce a třičtvrtě v podstatě v remisi

After radiotherapy



After 1 year of NTRKi + anti-PD-1



Sekvenování třetí generace generace

- Velice dlouhá délka čtení
- Přímé sekvenování jednotlivých molekul DNA bez předchozí fragmentace
- Lze přímo detekovat modifikace bazí – metylace promoterů
- Pacific Biosciences (PacBio), Oxford Nanopore Sequencing

3 Single Molecule Sequencing

Fast reads but only good structural accuracy

Reads 5,000 base long fragments

Processes hundreds of fragments at same time

10x GENOMICS

PACBIO

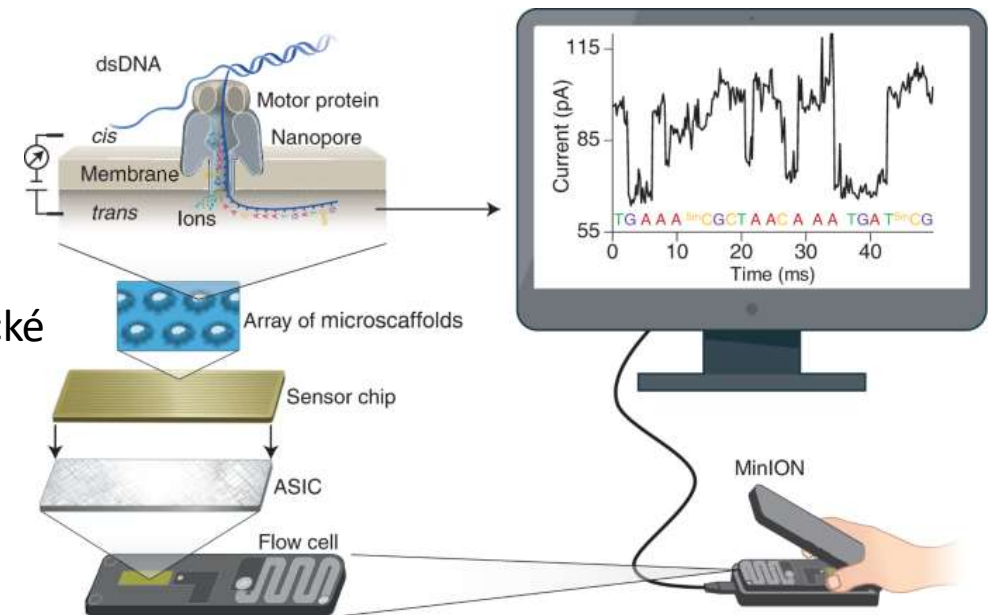


Oxford NANOPORE technologies



Oxford Nanopore

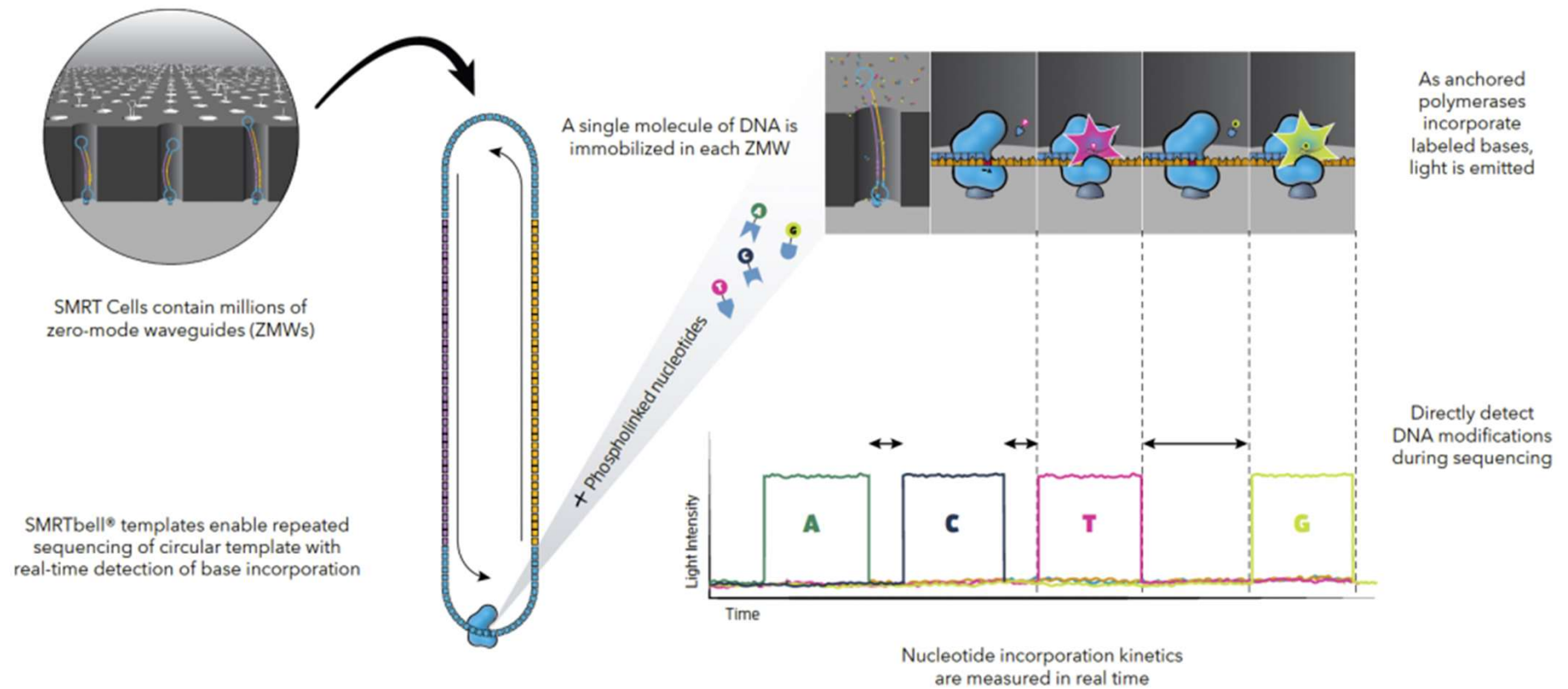
- Princip: změna proudu na membráně při průchodu nukleotidů
- Analýza nativní DNA a RNA
- Real-time analýza
- Ultra-dlouhé ready 10-300 kb
- 92-97% přesnost
- Využití především pro metagenomiku, genotypizaci
- V medicíně analýza fúzních genů – BCR-ABL u chronické myeloidní leukémie



Wang, Y., Zhao, Y., Bollas, A. et al. Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. Nat Biotechnol 39, 1348–1365 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01108-x>

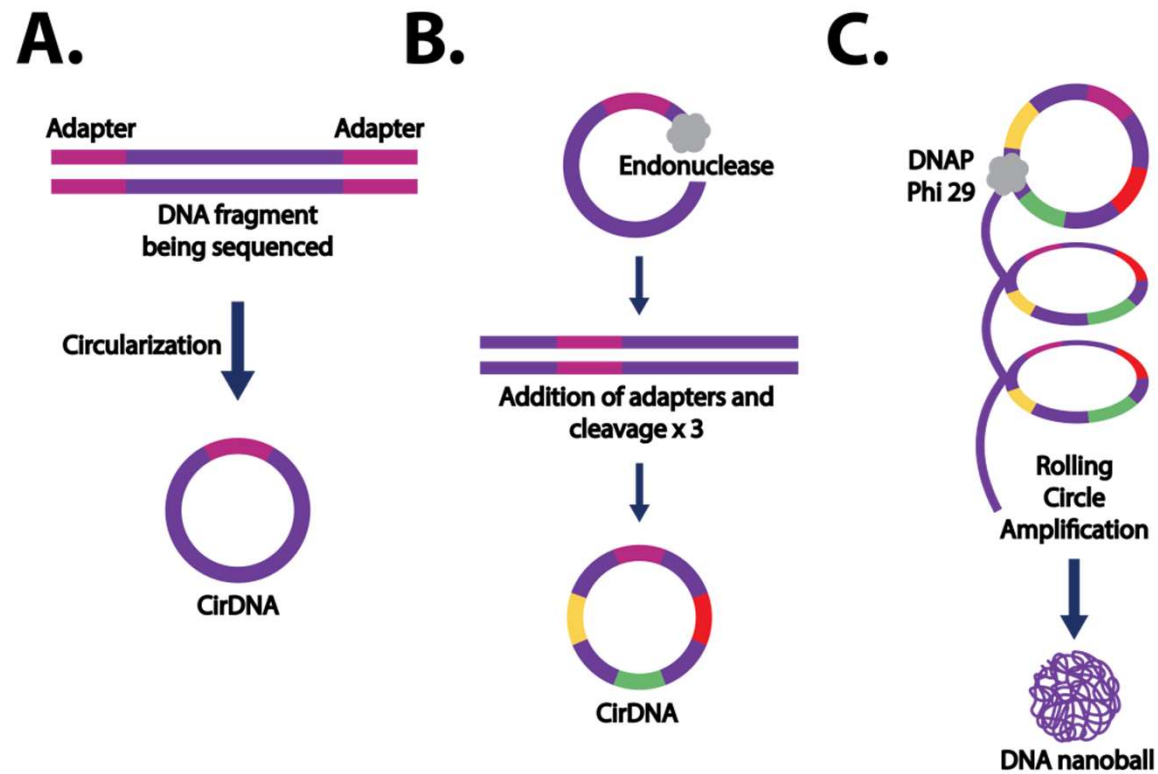
Pacific Biosciences

- Princip: Single Molecule Real-Time (SMRT)
- Zero Mode Waveguide (ZMW) – umožňuje sledování aktivity jedné DNA polymerázy



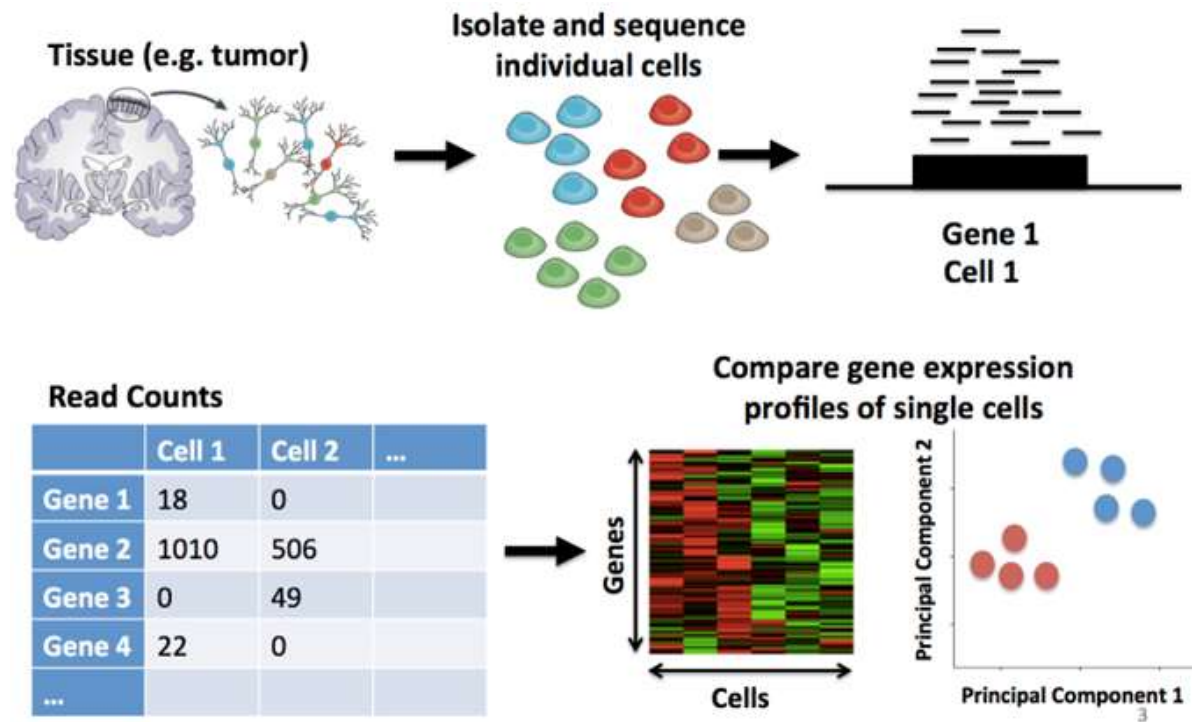
Nové technologie sekvenování - Nanoball sekvenování

- Princip: rolling circle replication
- Replikace DNA po malých fragmentech
- Určení celé genomické sekvence organismu



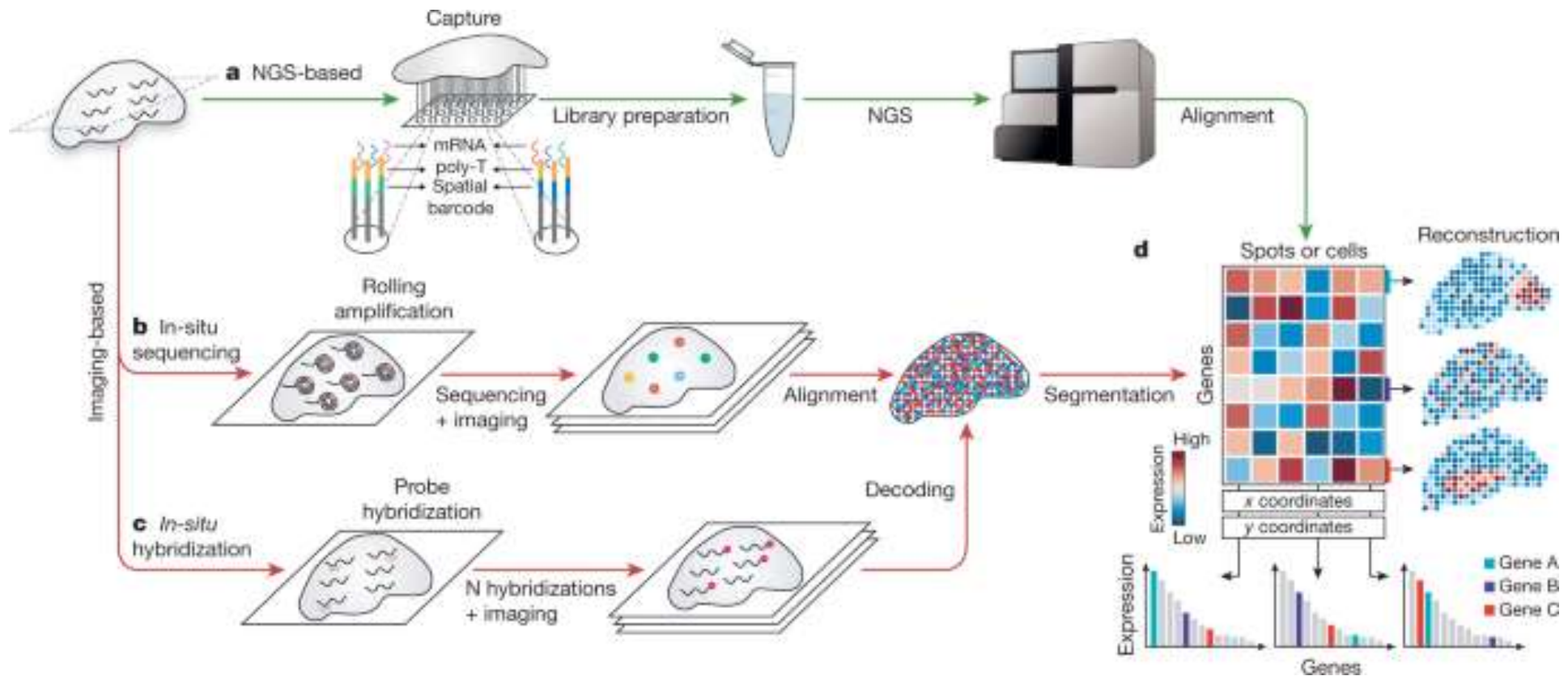
Nové technologie sekvenování - Single cell sekvenování

- Sekvence transkriptomu jednotlivých buněk
- Lepší porozumění mikroprostředí
- Lepší porozumění funkci jednotlivých buněčných populací v tkáni



Nové technologie sekvenování - Spatial transcriptomics

- Identifikace genové exprese v prostorovém kontextu
- Fixace řezu tkáně a sekvenace transkriptomu jednotlivých spotů buněk
- Lepší porozumění architektuře tkání, patogenezi různých onemocnění



Sekvenační metody - shrnutí

Platform	Sequencing rules	Advantages	Disadvantages	Signal received
Shotgun sequencing	Dideoxy chain termination method, capillary electrophoresis	Accuracy 99.999%, Reads 1,000 bp, High accuracy of processing repeated base, <i>De novo</i>	Low-throughput, high cost	Fluorescence
Roche 454	Pyrophosphate sequencing, SBS, Emulsion PCR	Accuracy 99%, Reads 400–600 bp, Parallel sequencing	Base insertion and deletion errors	Light
Illumina	SBS, Bridge PCR, Reversible terminator	Accuracy 99%, Reads 75–300 bp, Parallel sequencing	Base substitution error	Fluorescence
ABI solid	SBL, Emulsion PCR, Solid phase template shift, Two base encoding	Accuracy 99.94%, Reads 40 bp, Parallel sequencing, each base for sequencing twice	Prone to continuous base interpretation errors	Fluorescence
ABI/Ion torrent	Semiconductor sequencing, SBS, Emulsion PCR	Accuracy 99%, reads 200 bp, Parallel sequencing No light/fluorescence detection system	Difficult to identify homopolymers >8 bases, Base insertion and deletion errors	Electrical signal
Pacific bioscience	SMRT, SBS	Sequencing without PCR Detecting methylated bases average reads 10–15 kb	Random errors (5–15%) for a base, repeated sequencing can correct random errors	Fluorescence
Oxford nanopore	Nanopore sequencing Single-molecule sequencing, Direct detection of bases	Sequencing without PCR, No light/fluorescence detection system, Detecting methylated bases average reads 10–15 kb, longest to 40 kb	Random errors (5–15%) for a base, Repeated sequencing can correct random errors	Electrical signal

SBS, sequencing by synthesis; SLB, sequence by ligation; ssDNA, single-stranded DNA; SMRT, single molecular real time sequencing. Solid (sequencing by oligonucleotide Ligation and Detection).

DĚKUJI ZA POZORNOST