



Η συμβολή της μοριακής εργαστηριακής διάγνωσης στην κλινική πράξη

Α ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ
ΕΔΙΠ, ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ
ΕΚΠΑ

- Δηλώνω ότι δεν έχω σύγκρουση συμφερόντων

Χαρτογράφηση του ανθρώπινου γονιδιώματος- Ημερομηνίες Σταθμοί

- **Οκτώβριος 1990**: Εναρξη του HGP
 - 1998: ολοκλήρωση της χαρτογράφησης
- **Ιούνιος 2000**: Πρώτη δημοσίευση του HGP
- **Φεβρουάριος 2001**: Δημοσίευση της αλληλουχίας του ανθρώπινου γονιδιώματος στα περιοδικά *Nature* (409:800-892) και *Science* (291:1304-1351).
- **Απρίλιος 2003**: Ολοκλήρωση του προγράμματος HGP

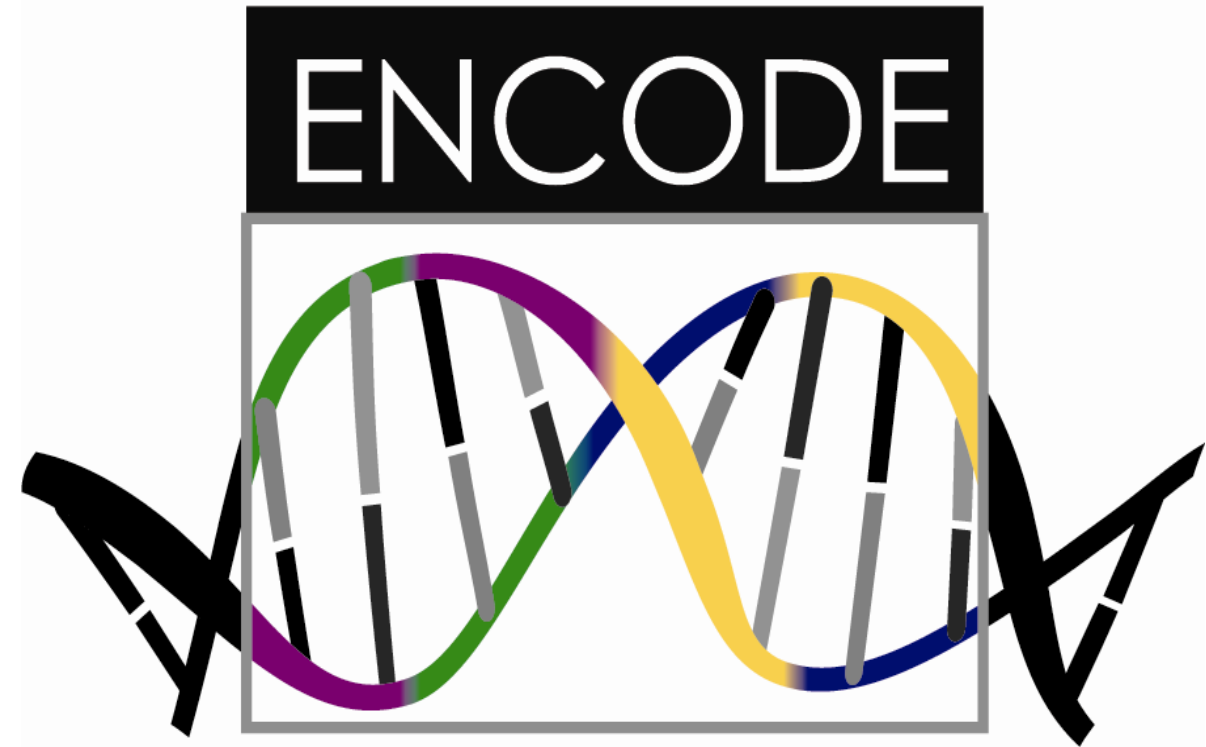


Human Genome Project σε αριθμούς

Αριθμός βάσεων (ACTG)	~ 6 δις
Μεγαλύτερο χρωμόσωμα	279Mb (1)
Μικρότερο χρωμόσωμα	45 Mb (21)
% GpC	41%
% γονιδιώματος που μεταφράζεται σε πρωτεΐνες	1.5% (18-22K genes, >22K proteins)
% γονιδιώματος που δεν μεταφράζεται σε πρωτεΐνες αλλά είναι λειτουργικό	3.5%
Αριθμός γονιδίων	~ 22.000, 100 disruptive variants in genes, 20 completely inactivated
Πυκνότητα γονιδίων	9-14γονίδια/Mb
Μεγαλύτερο γονίδιο	2.4Mb (DMD)
SNPs	3-5M (150k not in data bases, 60 not in either parent)
% γονιδιώματος που επαναλαμβάνεται (SINEs, LINEs, LTRs, DNA transposons)	44.8%

Κατανόηση των λειτουργικών περιοχών

- ~3.5% του γονιδιώματος λειτουργικό αλλά όχι κωδικοποιήσιμο
 - Ρυθμιστικές περιοχές γονιδίων
 - Λειτουργικές περιοχές χρωσωμάτων
 - Άγνωστες λειτουργικές περιοχές



Πολυμορφισμοί

Hap Map Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations the international

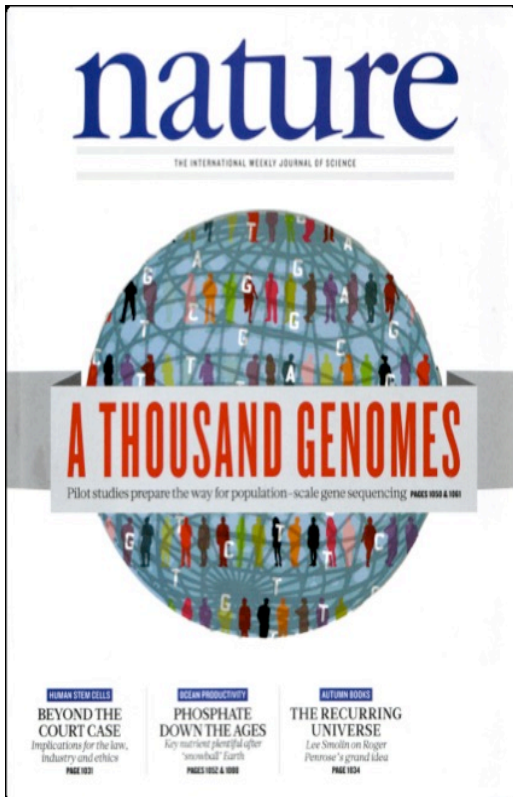
HapMap consortium, *Nature* 2010

38 M SNPs, 1,4 M μικρές ενθέσεις ή
απαλοιφές, >14,000 απαλοιφές
μεγαλύτερου μεγέθους

An integrated map of genetic variation from 1,092
human genomes

The 1000 Genomes Project Consortium, *Nature*, 2012;
491: 56-65

10ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ανδρολογίας
Κλινικό φροντιστήριο 1: Εργαστηριακή Ανδρολογία



Συμβολή της μοριακής βιολογίας στην κλινική διάγνωση

- Επιβεβαίωση κλινικής διάγνωσης
- Διάγνωση
- Προγενετικός έλεγχος - Γενετική συμβουλευτική
- Επιλογή θεραπείας/Εξατομικευμένη θεραπεία

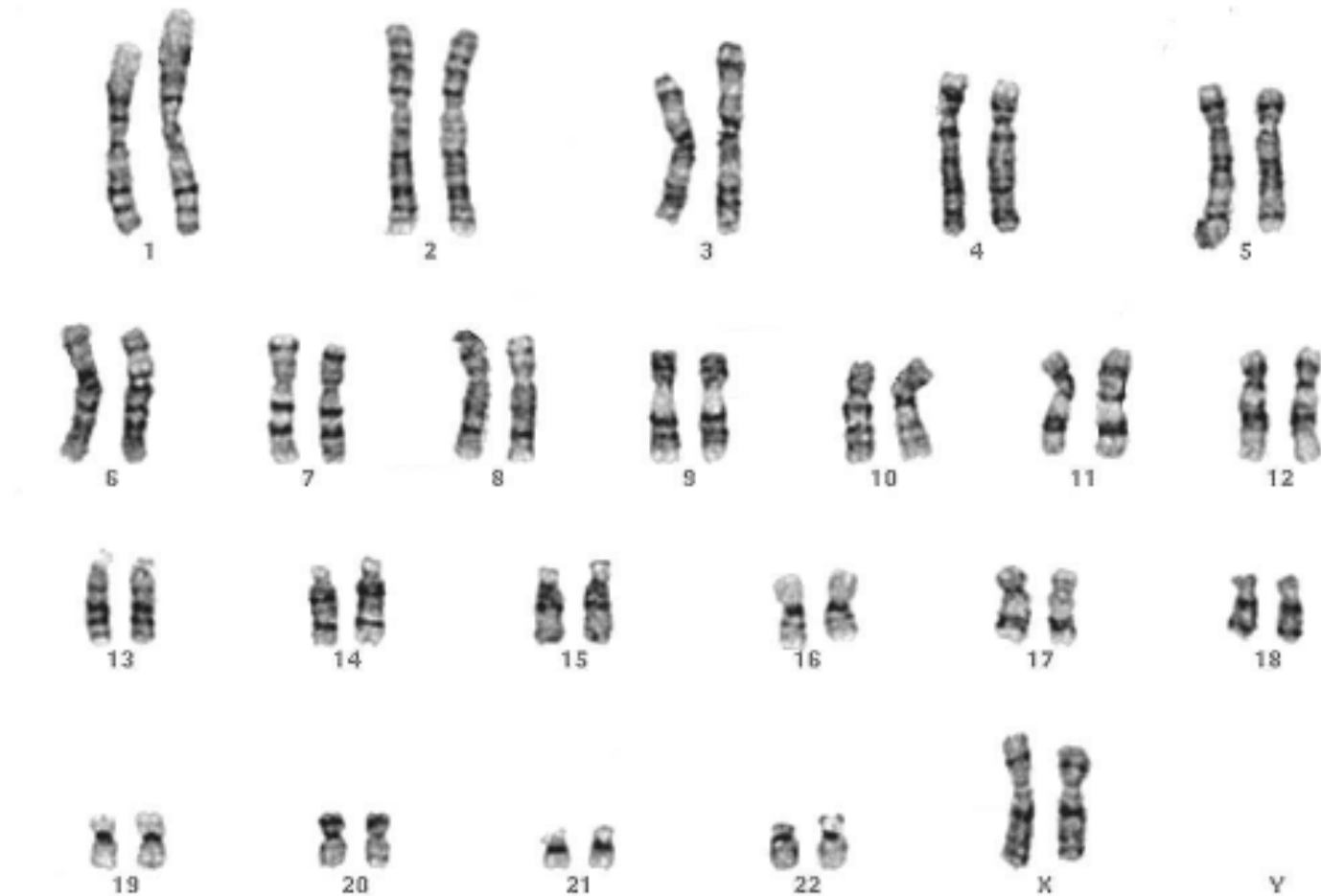
Εργαστηριακή προσέγγιση: Στόχευση ή σάρωση

- Στοχευμένες γενετικές αλλαγές:
 - Ανίχνευση συγκεκριμένων γενετικών αλλαγών στο DNA του ασθενούς
 - Ανίχνευση/ταυτοποίηση ιών, μικροβίων
- Άγνωστες γενετικές αλλαγές – σάρωση συγκεκριμένων γονιδίων ή του γονιδιώματος:
 - Χρωμοσωμικές ανωμαλίες
 - Ενθέσεις – απαλοιφές μικρότερου μεγέθους
 - Σημειακές μεταλλάξεις ή απαλοιφές – ενθέσεις μικρού μεγέθους

Κριτήριο: μέγεθος και είδος γενετικής αλλαγής

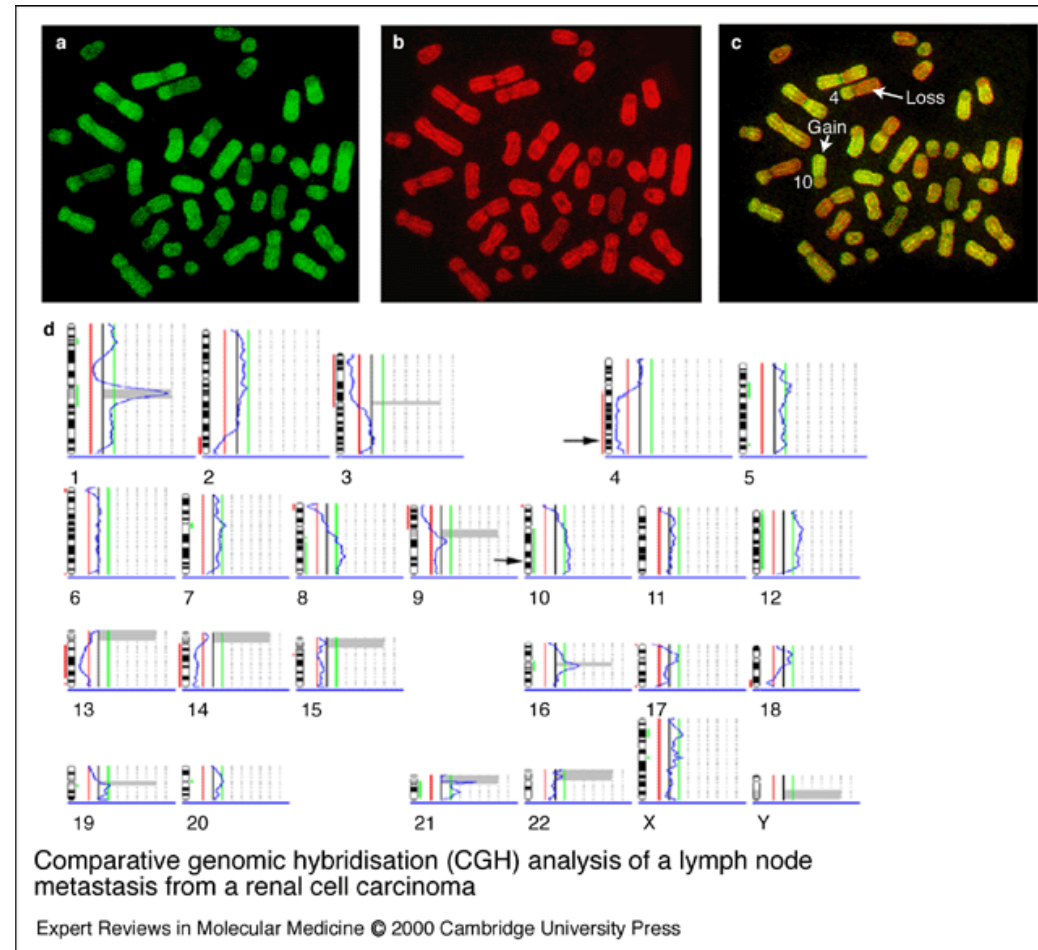
- Σημειακές αλλαγές
- Ενθέσεις/απαλοιφές
- Χρωμοσωμικές αλλαγές
- Μικροελλείψεις
- Επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες
- Μεθυλιώσεις
- Γενετικές ανακατατάξεις (fusion genes)

Χρωμοσωμικές αλλαγές: Καρυότυπος



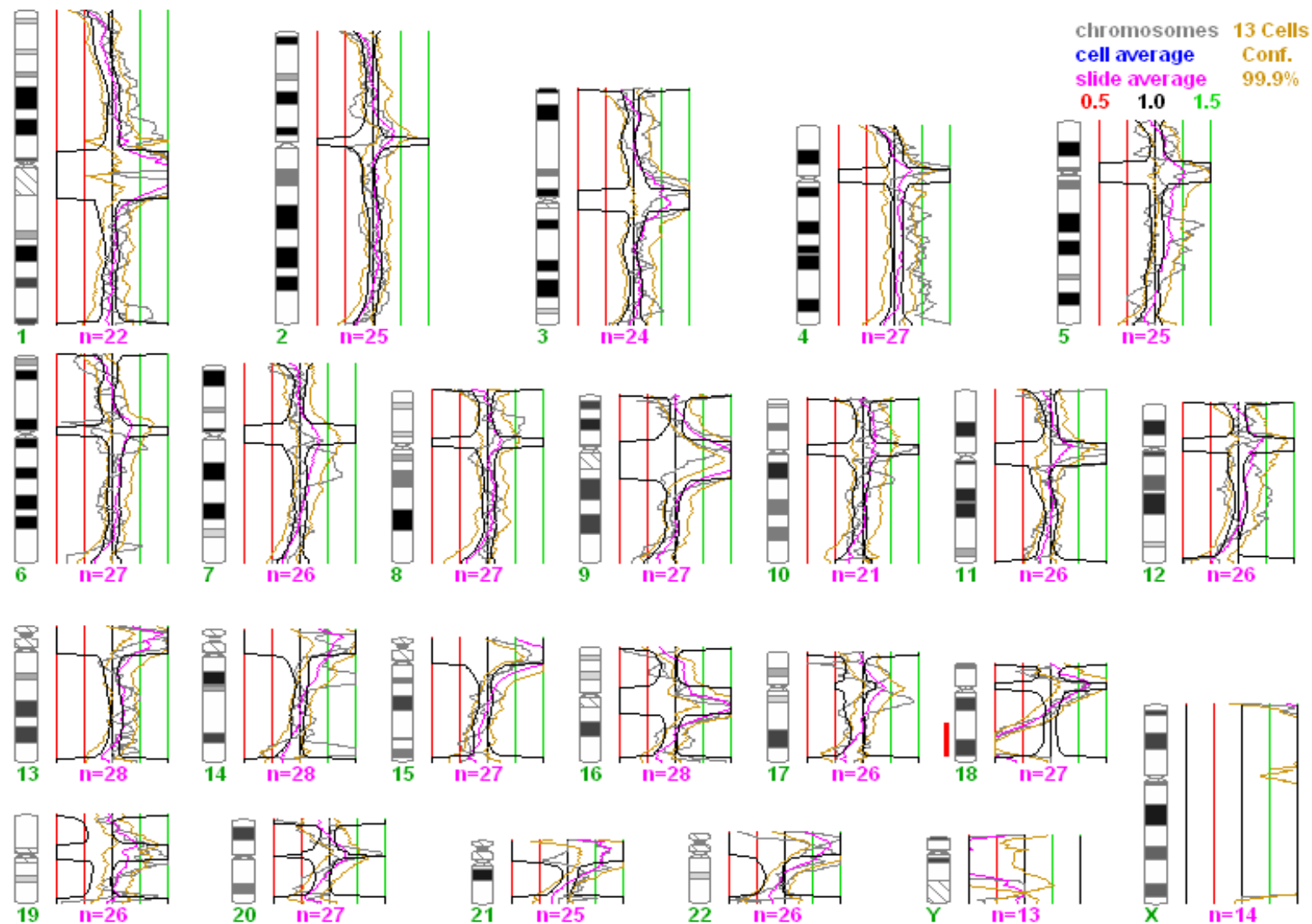
Resolution: 5-15Mb

Comparative Genomic Hybridization

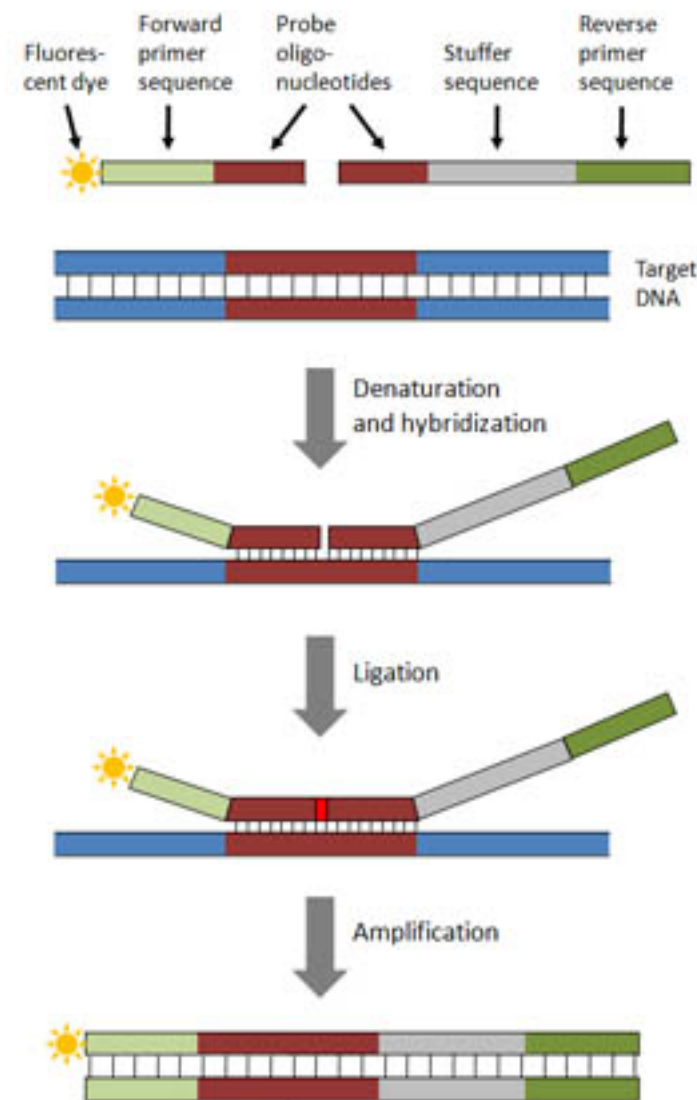
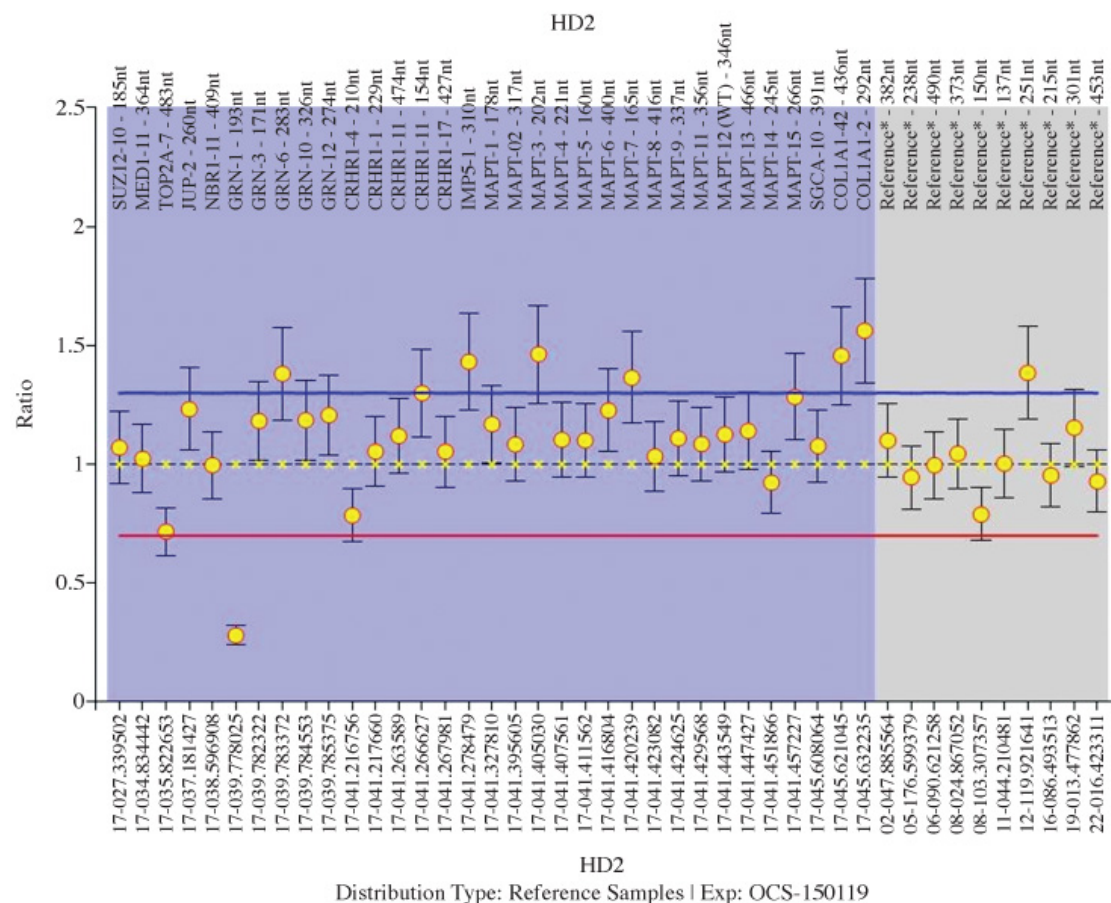


Resolution: 3-10Mb

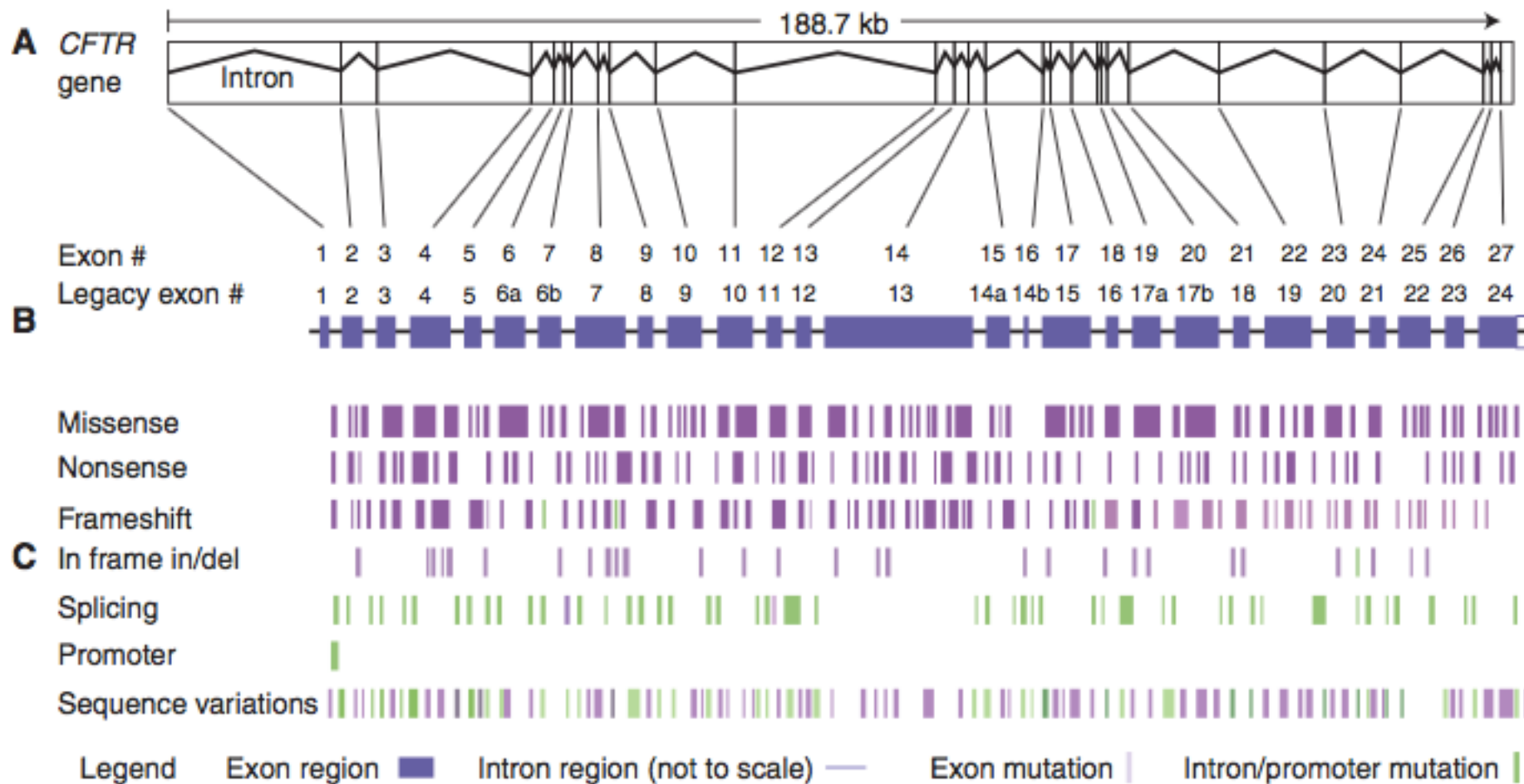
CGH σε παιδί με νοητική υστέρηση και φυσιολογικό καρυότυπο



MLPA

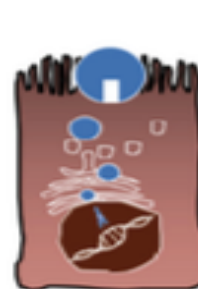
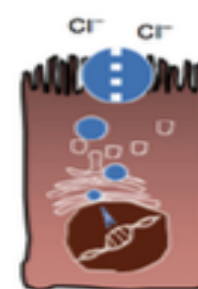
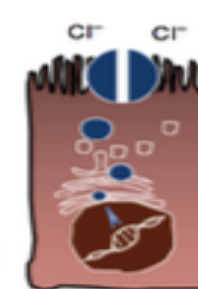
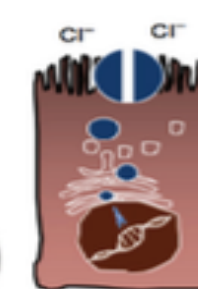


Μονογονιδιακά: παράδειγμα *CFTR* gene



Συσχέτιση γονότυπου – φαινότυπου

(1) FUNCTIONAL CLASSIFICATION

	Class of mutation						
	Normal	I	II	III	IV	V	VI
							
Molecular defect		No synthesis	Block in processing	Block in regulation	Reduced conductance	Reduced synthesis	Reduced half-life
Functional abnormality		Protein is not synthesized	Folding defect	Channel opening defect	Ion transport defect	Decreased protein synthesis	Decreased half-life of the protein
Main mutations		Gly542X Trp128X Arg553X 621+1G→T	Phe508del Asn1303Lys Ile507del Arg560Thr	Gly551Asp Gly178Arg Gly551Ser Ser549Asn	Arg117His Arg347Pro Arg117Cys Arg334Trp	3849+10kbC→T 2789+5G→A 3120+1G→A 5T	4326delTC Gln1412X 4279insA

(2) CLINICAL CLASSIFICATION

Severe (A)	Broad-spectrum (A/B)	or Mild	No clinical consequences (C)
Unknown or uncertain clinical relevance (D)			

Οι συχνότητες των μεταλλάξεων ποικίλουν ανάλογα με τους πληθυσμούς

	Europe, North	Europe, South	America, North	America, South/Central	Australasia	Asia, mainly Middle East	Africa	Relative frequency (%)
Total CF chromosomes screened	21,154	7,281	10,438	758	2,095	608	515	
G85E	30	14	16			7		0.2
R117H	62	3	61		7	0		0.3
621+1G→T	97	37	154		27			0.7
711+1G→T	15	13	21					0.1
1078delT	53	2	1		1			0.1
R334W	18	21	12		2			0.1
R347P	55	24	26		1			0.2
A455E	35	0	27					0.1
Δ1507	57	5	20	2	9	0		0.2
ΔF508	14,866	4,007	6,900	342	2,309	173	351	66.0
17171-G>A	160	65	44		12	3		0.6
G542X	439	259	234	38	56	27		2.4
S549N	18	2	5	1	3	0	1	0.1
G551D	356	37	206	1	117	0		1.6
R553X	165	44	96	5	11	0	1	0.7
R560T	40	0	24		3	0		0.1
1898+1G→A	41	10	2					0.1
2184delA	14	7	8					0.1
2789+5G→A	27	10	17					0.1
R1162X	36	68	19		2			0.3
3659delC	39	1	14					0.1
3849+10kbC→T	23	8	57			16		0.2
W1282X	120	43	245		6	120	2	1.2
N1303K	209	179	130	11	23	29	8	1.3
Fraction of mutations detected (%)	80.2	66.7	79.9	52.8	83.7	61.7	72.2	~70% world wide

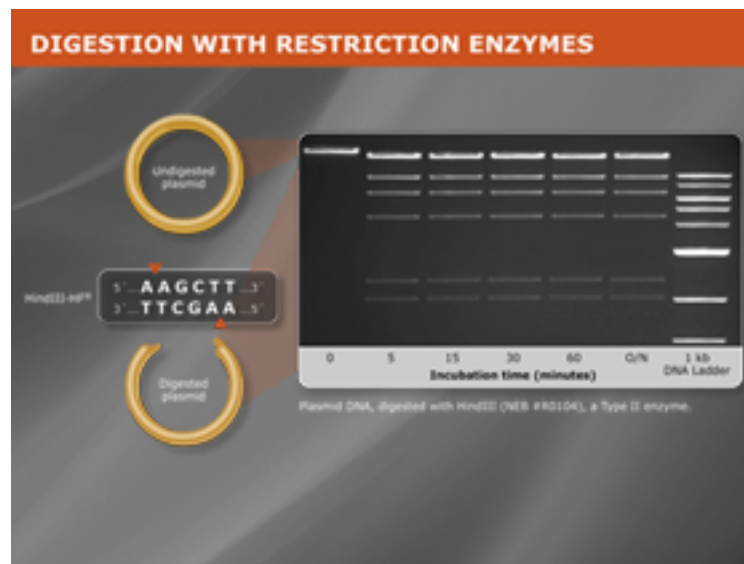
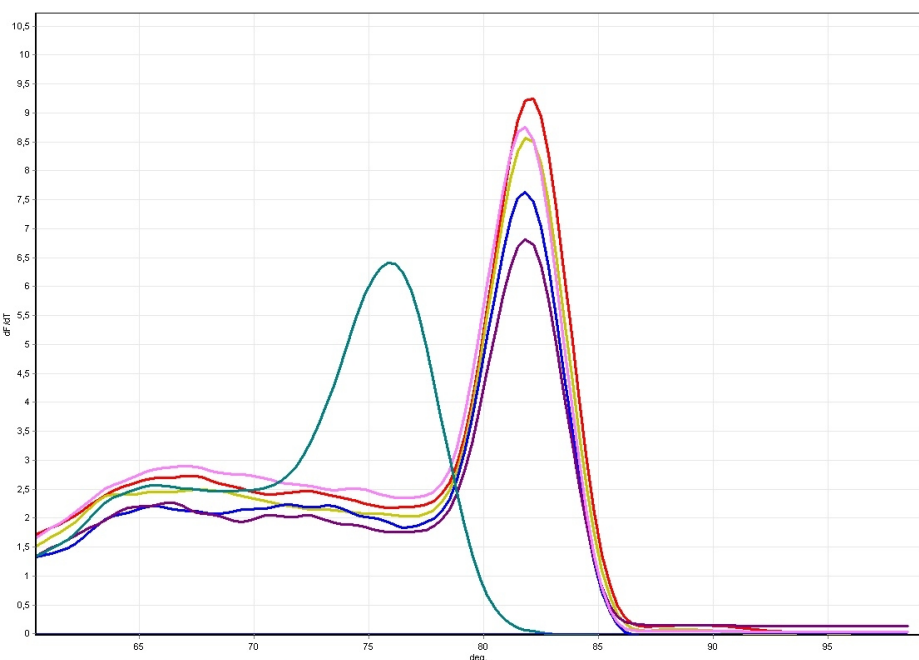
Ελλάδα: 80 διαφορετικές μεταλλάξεις. F508del: 53,4% των ανευρεθείσων μεταλλάξεων, 621+1G>T (5,72%), G542X (3,9%), N1303K (2,63%).

Ανίχνευση συγκεκριμένων (γνωστών) γενετικών αλλαγών

PCRs

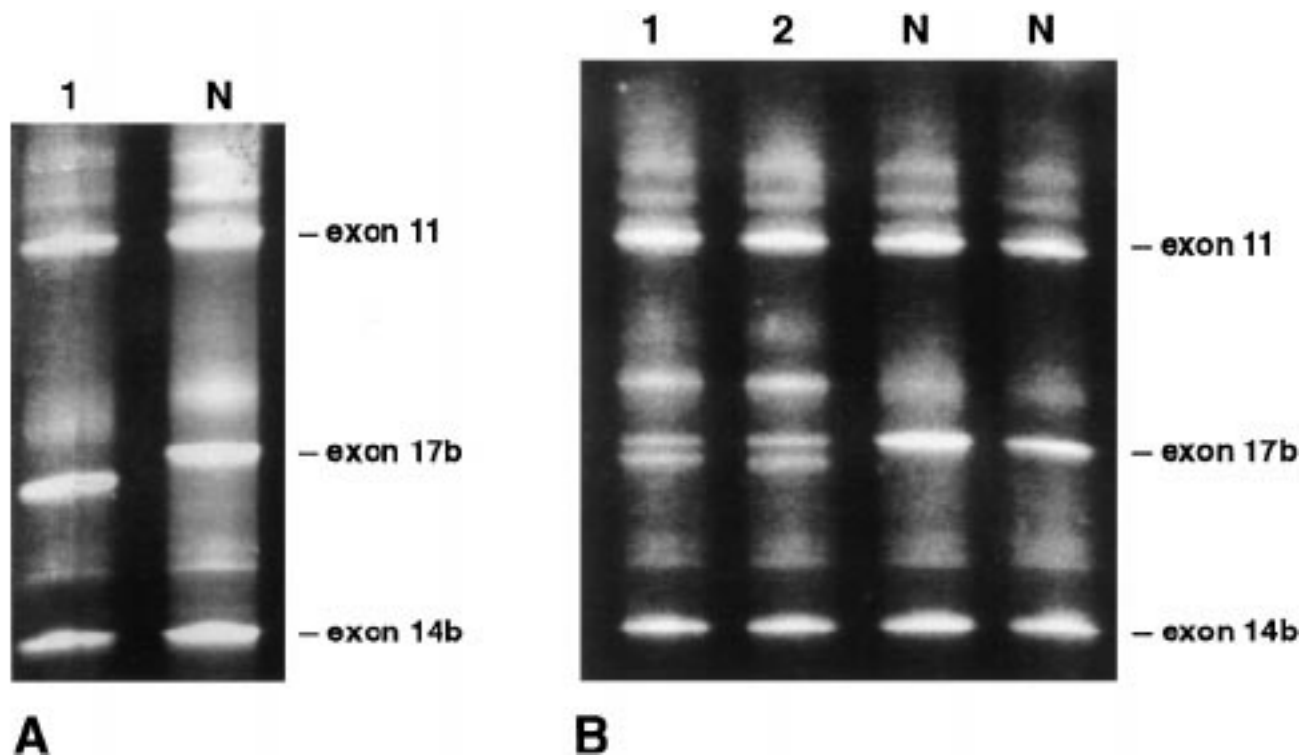
Oligonucleotide ligation assay (OLA), transcription-mediated amplification (TMA), nucleic acid sequence based amplification (NASBA), rolling cycle amplification (RCA), ligase chain reaction (LCR), and strand displacement amplification (SDA)...

Real time PCR

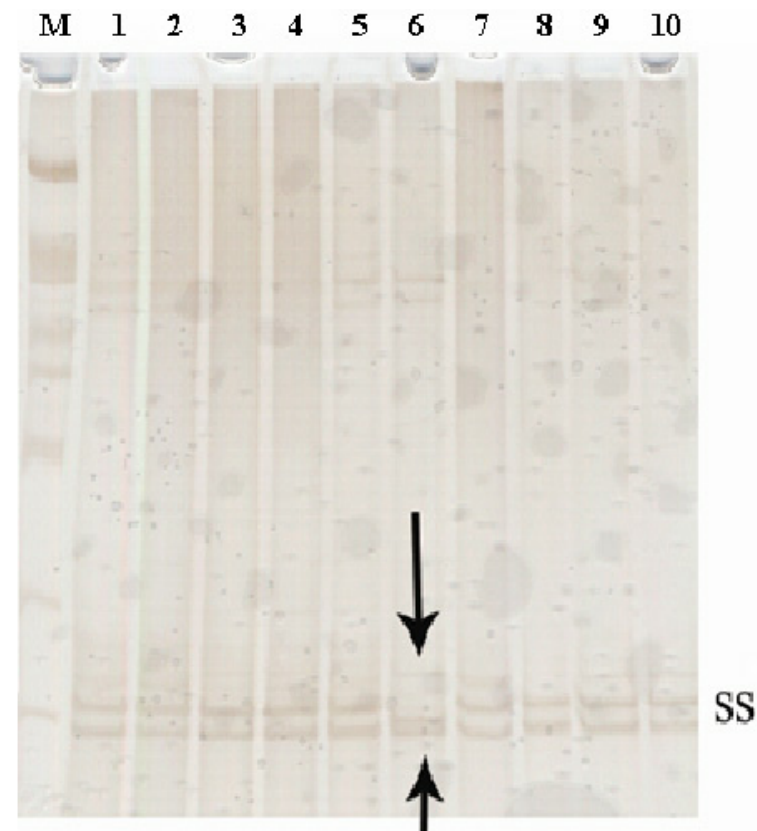


	marker line		marker line
	control		control
1	M.ΔF508	1	M.621+1G→T
2	M.G542X	2	M.R117H
3	M.G551D	3	M.R1162X
4	M.N1303K	4	M.R347P
5	M.W1282X	5	M.3849+10kbC→T
6	M.R553X	6	M.394delTT
7	M.1717-1G→A	7	M.G85E
8	M.ΔI507	8	M.A455E
9	M.R560T	9	M.1078delT
10	M.711+1G→T	10	M.2789+5G→A
11	M.3905insT	11	M.3659delC
12	M.S1251N	12	M.R334W
13	M.Q552X	13	M.2183AA→G
14	M.3120+1G→A	14	M.2184delA
15	M.I148T	15	M.E60X
16	M.1898+1G→A	16	M.2143delT
17	W.ΔF508 = W.ΔI507	17	M.711+5G→A
18	W.G542X	18	W.621+1G→T
19	W.G551D	19	W.R117H
20	W.N1303K	20	W.R1162X
21	W.W1282X	21	W.R347P
22	W.W1282X	22	W.3849+10kbC→T
23	W.R553X	23	W.394delTT
24	W.1717-1G→A	24	W.G85E
25	W.R560T	25	W.A455E
26	W.711+1G→T	26	W.1078delT
27	W.3905insT	27	W.2789+5G→A
28	W.S1251N	28	W.3659delC
29	W.Q552X	29	W.R334W
30	W.3120+1G→A	30	W.2183AA→G = W.2184delA
31	W.I148T	31	W.E60X
	W.1898+1G→A	32	W.2143delT
		33	W.711+5G→A
		34	marker line
		35	5T
		36	7T
		37	9T

Ανίχνευση άγνωστων γενετικών αλλαγών



DGGE

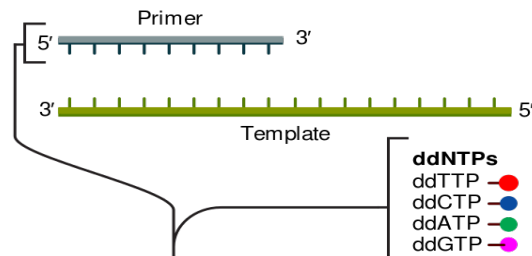


SSCP

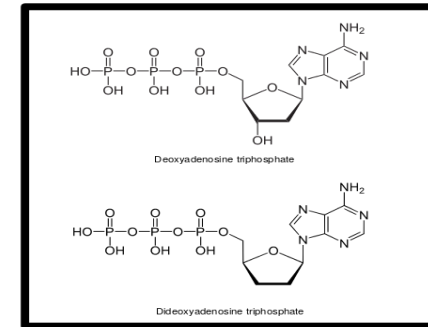
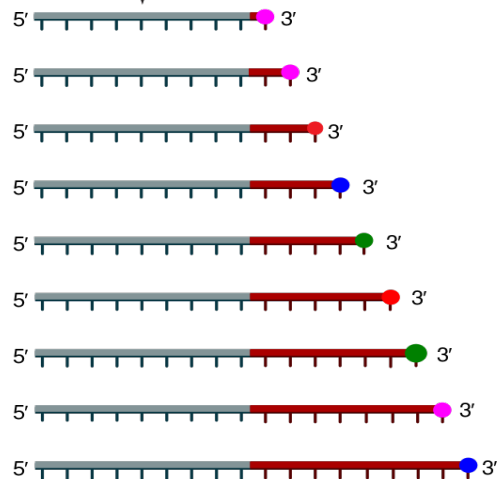
Αυτοματοποιημένο σύστημα αλληλούχησης

① Reaction mixture

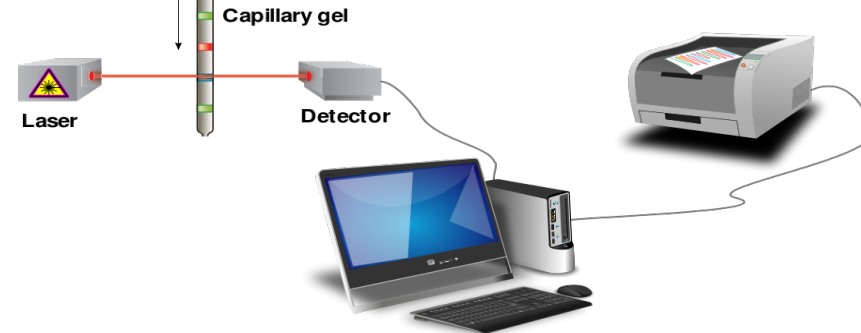
- ▶ Primer and DNA template
- ▶ DNA polymerase
- ▶ ddNTPs with flourochromes
- ▶ dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP)



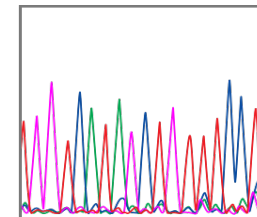
② Primer elongation and chain termination



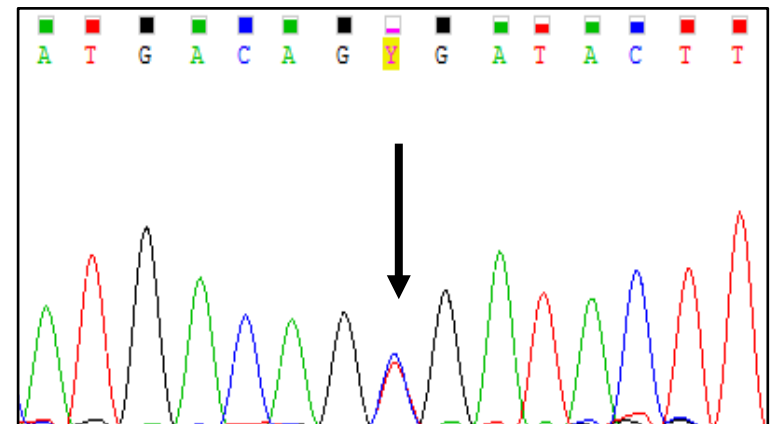
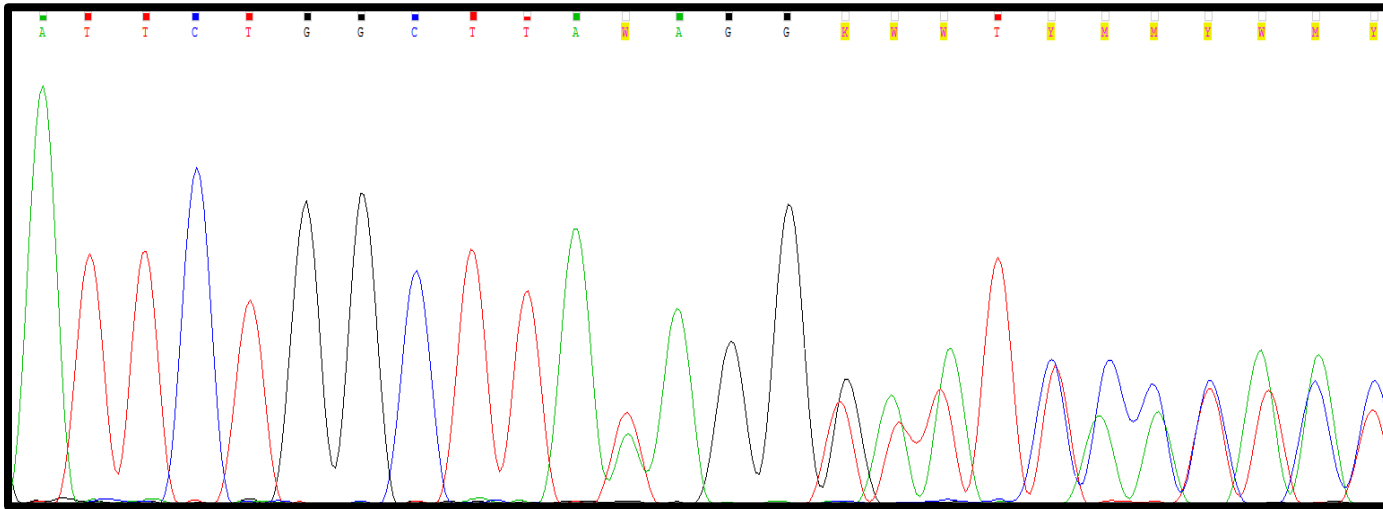
③ Capillary gel electrophoresis separation of DNA fragments



④ Laser detection of flourochromes and computational sequence analysis



Ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων και μικρού μήκους απαλοιφές & ενθέσεις



BLAST®

Basic Local Alignment Search Tool

Home

Recent Results

Saved Strategies

Help

NCBI/BLAST/blastn suite

blastnblasttblastntblast

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s)

Or, upload file

Job Title

Align two or more sequences

Choose Search Set

Database

Organism

Exclude

Limit to

Entrez Query

Program Selection

Optimize for

BLAST

Search database Nucleotide collection (nr/nt) using Megablast (Optimize for highly similar sequences)

Algorithm parameters

Standard

Transcript-based displays

Summary

Supporting evidence

Sequence

Exons

cDNA

Protein

External References

General identifiers

Oligo probes

Ontology

Genetic Variation

Variation table

Variation image

Population comparison

Comparison image

Protein Information

Protein summary

Domains & features

Variants

External data

Personal annotation

ID History

Transcript history

Protein history

Configure this page

Add your data

Export data

Share this page

Bookmark this page

Ensembl genome browser

www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Exons?db=core;g=ENSG0000012048;r=17:43044295-43125483;t=ENST00000357654

BLAST/BLATBioMartToolsDownloadsHelp & DocumentationBlogMirrors

Human (GRCh38.p3)Location: 17:43,044,295-43,125,483Gene: BRCA1Transcript: BRCA1-001

Transcript: BRCA1-001ENST00000357654

Description

Synonyms

Location

About this transcript

Gene

breast cancer 1, early onset [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1100]

BRCC1, FANCS, PPP1R53, RNF53

Chromosome 17: 43,044,295-43,125,370 reverse strand.

This transcript has 23 exons, is associated with 40 domains and features, is associated with 4214 variations and maps to 59 oligo probes

This transcript is a product of gene ENSG0000012048

Hide transcript table

Table with 10 columns: Name, Transcript ID, bp, Protein, Biotype, CCDS, UniProt, RefSeq, Flags

Copyright | Disclaimer | Privacy | Accessibility | Contact | Send feedback

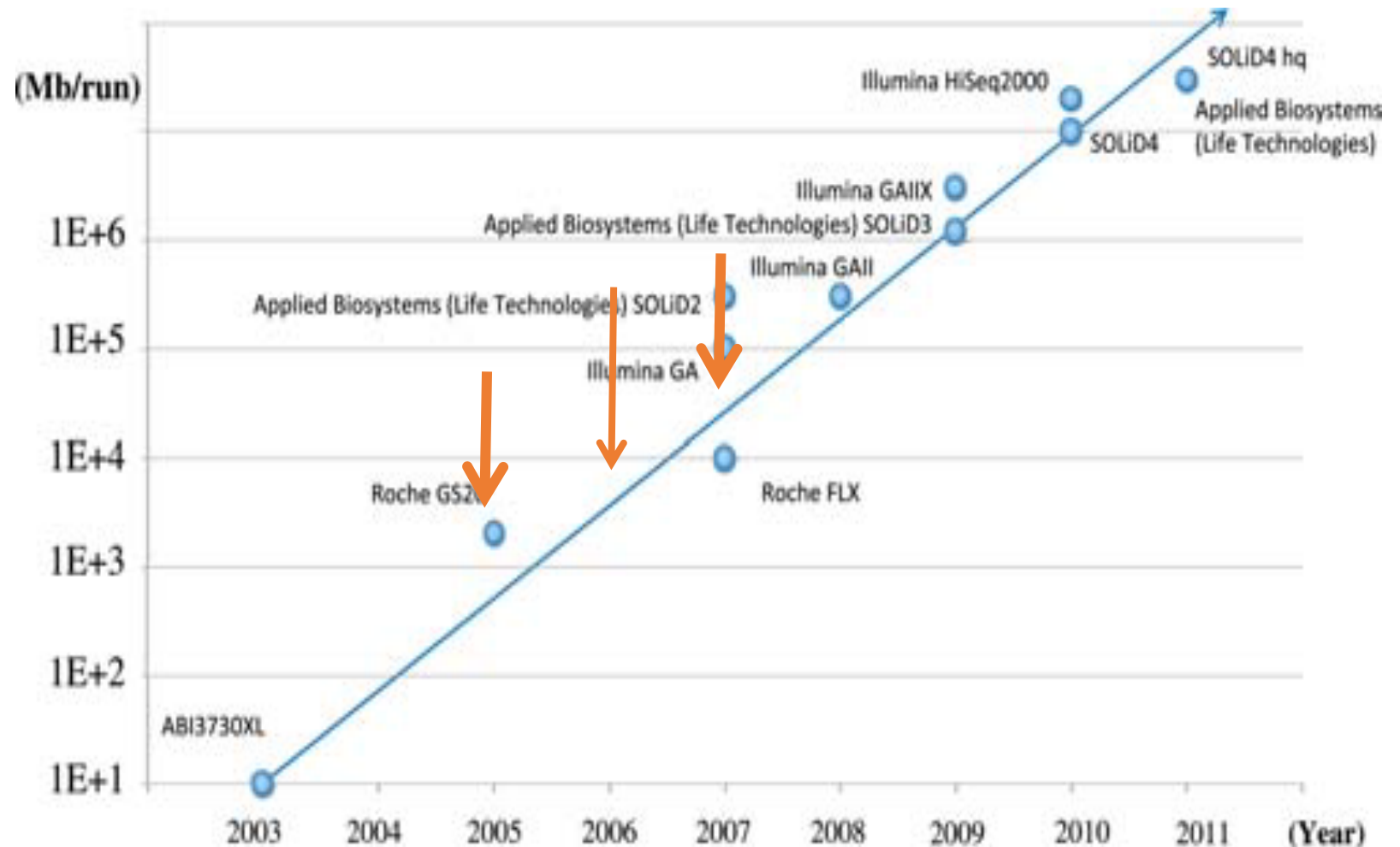
BLAST is a registered trademark of the National Library of Medicine.

Windows taskbar with icons for various applications and the system clock showing 8:41 μμ on 23/11/2015.

Next Generation Sequencing (2nd generation)

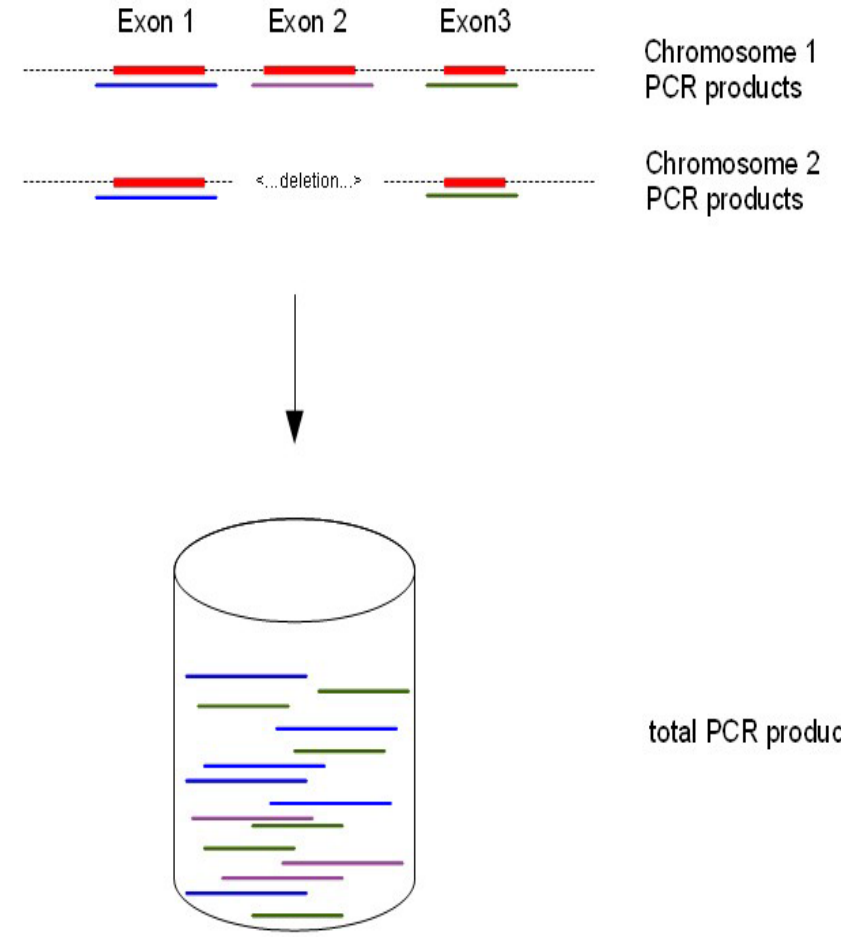
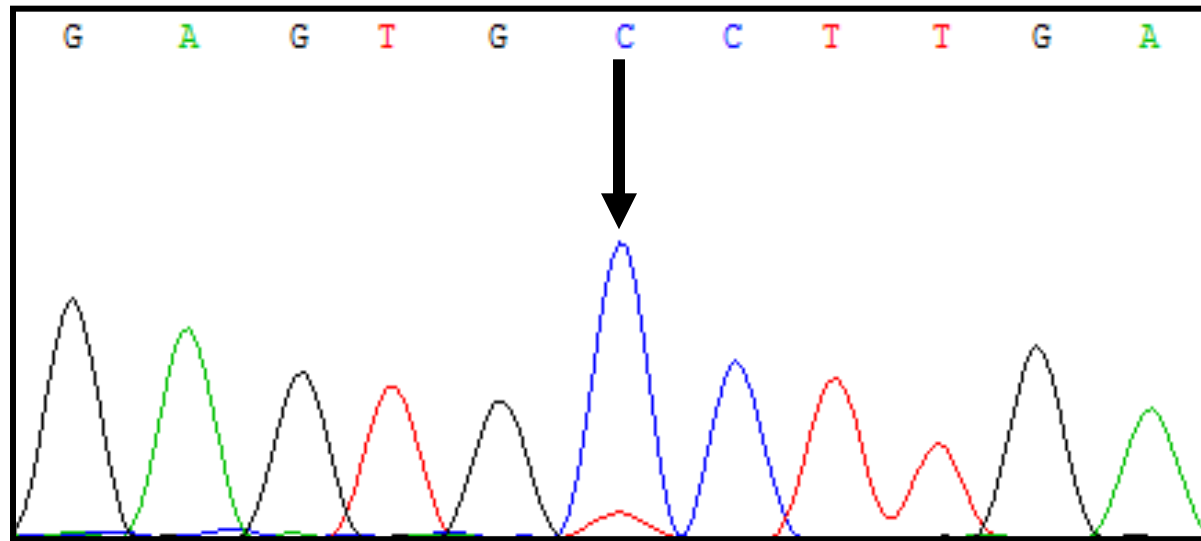
Δυνατότητα
αλληλούχισης μεγάλου
αριθμού διαφορετικών
αλληλουχιών DNA
(μαζική παράλληλη
αλληλούχιση)

Η τεχνολογία NGS
ελέγχει τη διαδοχική
προσθήκη
νουκλεοτιδίων σε
ακινητοποιημένα
υποστρώματα DNA



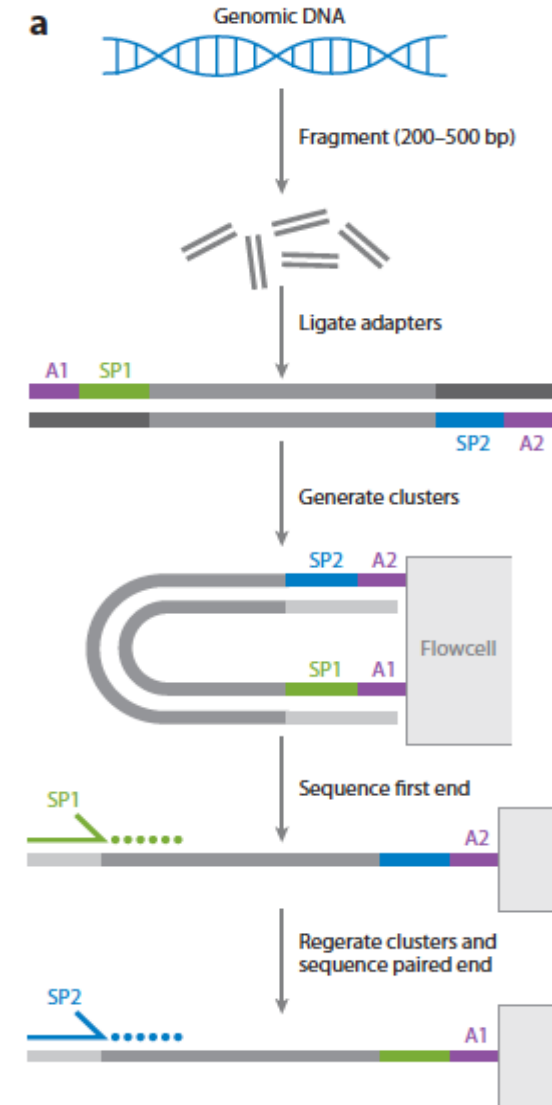
Περιορισμοί Sanger Sequencing

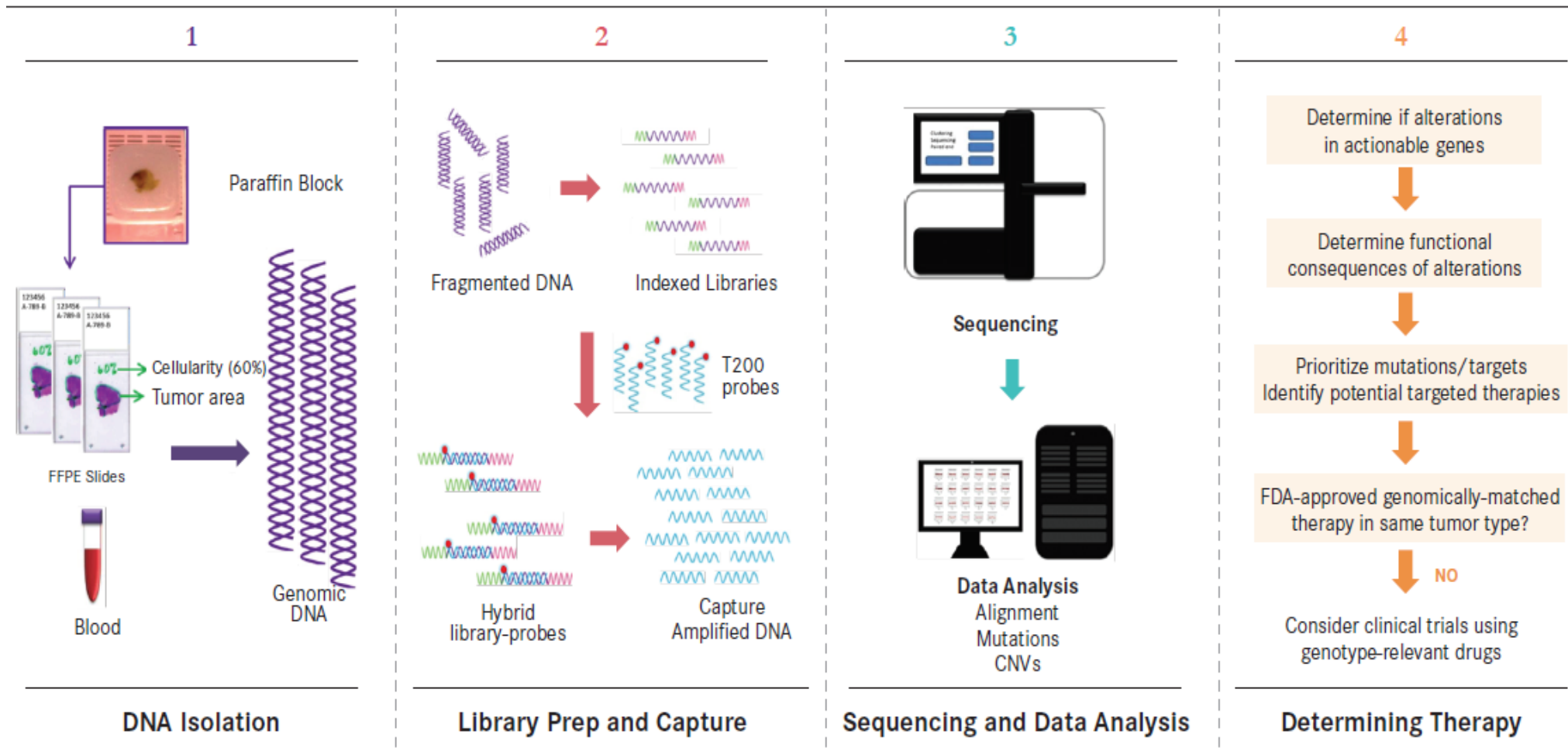
- : ~1000 βάσεις/αντίδραση
- Ετερογένεια ιστού
- CNVs

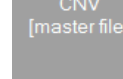
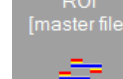
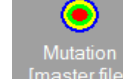
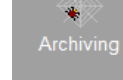
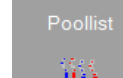
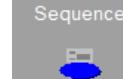
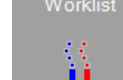
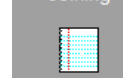
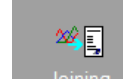


Next Generation Sequencing (2nd generation)

- Όλες οι πλατφόρμες απαιτούν τη δημιουργία βιβλιοθήκης είτε με πολλαπλασιασμό (amplification) είτε με σύνδεση (ligation) με ειδικούς συνδέτες (linkers)
- Κάθε τμήμα της βιβλιοθήκης πολλαπλασιάζεται σε μία σταθερή επιφάνεια που φέρει ειδικούς συνδέτες που υβριδίζονται με τους αντίστοιχους συνδέτες της βιβλιοθήκης
- Άμεση ανίχνευση των νουκλεοτιδίων που ενσωματώνονται σε κάθε πολλαπλασιαζόμενο τμήμα της κάθε βιβλιοθήκης
- Πολλές αντιδράσεις/πείραμα=μαζική παράλληλη αλληλούχιση
- Ένα ψηφιακό σήμα επιτρέπει την άμεση ποσοτικοποίηση
- Μικρότερου μήκους διαβάσματα σε σχέση με το Sanger







Order Protocol Family

Order No: 150280005

Patient: P-155

DNA No.: 155

Date: 01/28/2015 18:09:01

Settings:

Barcode: ACGCGTCTAGT (RL6)

/ Settings /

Single / double direction analysis /

Both dir. min abs. cov.: off

Both dir. min % cov.: off

State: compl.

Files

File	Organism	Bases
1 file : I6SVG7U...	hg19	24092

III

T.V. M.V.

ROI Groups

Name	Ba...	CNV	Var.	Con
	24...		43 / ...	

III

T.V. M.V.

Genes / Chromosomes

Gene	Ba...	Var.	Cond...
TSC1	12...	23 / 101	
TSC2	11...	20 / 77	

III

T.V. M.V.

ROIs / Locations

Name	Bases	Va
TSC1-E13-T1-2	215	0 /
TSC1-E14-T1-2	244	0 /
TSC1-E15-T1-2	701	1 /
TSC1-E16-T1-2	198	1 /
TSC1-E17-T1-2	286	1 /
TSC1-E18-T1-2	327	0 /

III

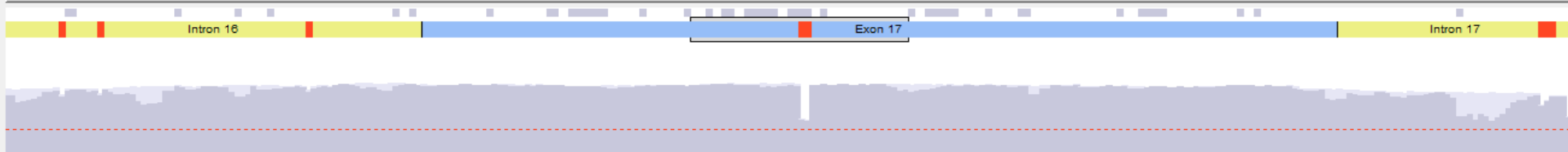
T.V. M.V.

Summary

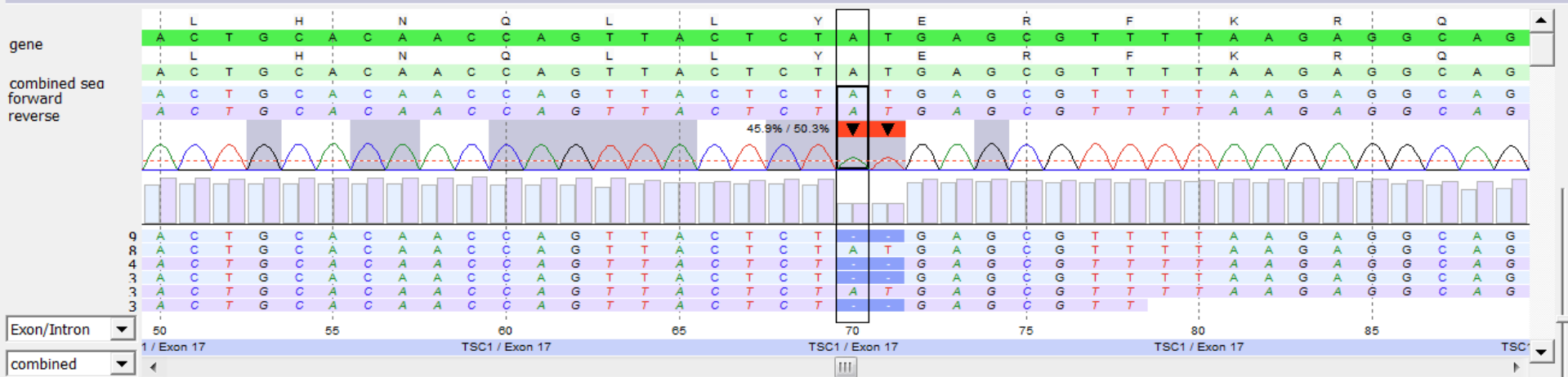
all 124 distinct 23 other 56 homopolymer 45 filter 0

all Genes selected Gene

Print	mut DB	In...	Gene	Name	Location	Pos.	Type	Nuc Change	Coverage	AA Change
☒	☐	43	TSC1	TSC1-E14-T1-2	E14	56 (1389) / 1bp [chr9:g.135782167 (hg19)]	I (Dup)	T (het)	6% (14) [9% (12) / 2% (2)]	[STOP] AA 46
☒	☐	44	TSC1	TSC1-E14-T1-2	E14	93 (1426) / 1bp [chr9:g.135782130 (hg19)]	I (Dup)	A (het)	6% (12) [9% (12) / 0% (0)]	[STOP] AA 47
☒	☒	45	TSC1	TSC1-E15-T1-2	E15	-21 / 1bp [chr9:g.135781547 (hg19)]	D	T (het)	14% (32) [11% (10) / 17% (22)]	
☒	☐	46	TSC1	TSC1-E15-T1-2	E15	364 (1802) / 1bp [chr9:g.135781163 (hg19)]	D	C (het)	5% (13) [5% (6) / 6% (7)]	[STOP] AA 62
☒	☐	47	TSC1	TSC1-E15-T1-2	E15	+47 / 1bp [chr9:g.135780921 (hg19)]	D	T (het)	8% (21) [14% (17) / 3% (4)]	
☒	☒	48	TSC1	TSC1-E16-T1-2	E16	-46 / 1bp [chr9:g.135779887 (hg19)]	D	T (het)	54% (137) [49% (64) / 60% (73)]	
☒	☐	49	TSC1	TSC1-E16-T1-2	E16	-46..-44 / 3bp [chr9:g.135779887_135779885 (hg19)]	Indel	TCT -> C (het)	10% (25) [7% (9) / 13% (16)]	
☒	☒	50	TSC1	TSC1-E16-T1-2	E16	-13 / 1bp [chr9:g.135779854 (hg19)]	D	A (het)	5% (14) [10% (13) / 1% (1)]	
☒	☐	51	TSC1	TSC1-E17-T1-2	E17	-66 / 1bp [chr9:g.135779270 (hg19)]	D	G (het)	7% (19) [2% (2) / 12% (17)]	
☒	☐	52	TSC1	TSC1-E17-T1-2	E17	-59 / 1bp [chr9:g.135779263 (hg19)]	D	G (het)	8% (20) [13% (17) / 2% (3)]	
☒	☐	53	TSC1	TSC1-E17-T1-2	E17	-21 / 1bp [chr9:g.135779225 (hg19)]	D	C (het)	5% (14) [3% (4) / 7% (10)]	



gene
combined seq
forward
reverse



Exon/Intron

combined

Comments

Show

reading

3

check

web + m

web + mut Ref.

< 1 >

edited

< 0/0 >

het. pos.

< 1/1 >

mism.

< 1/8 >

Functions

Previous

Next

T.V.

M.V.

print...

Extras ->

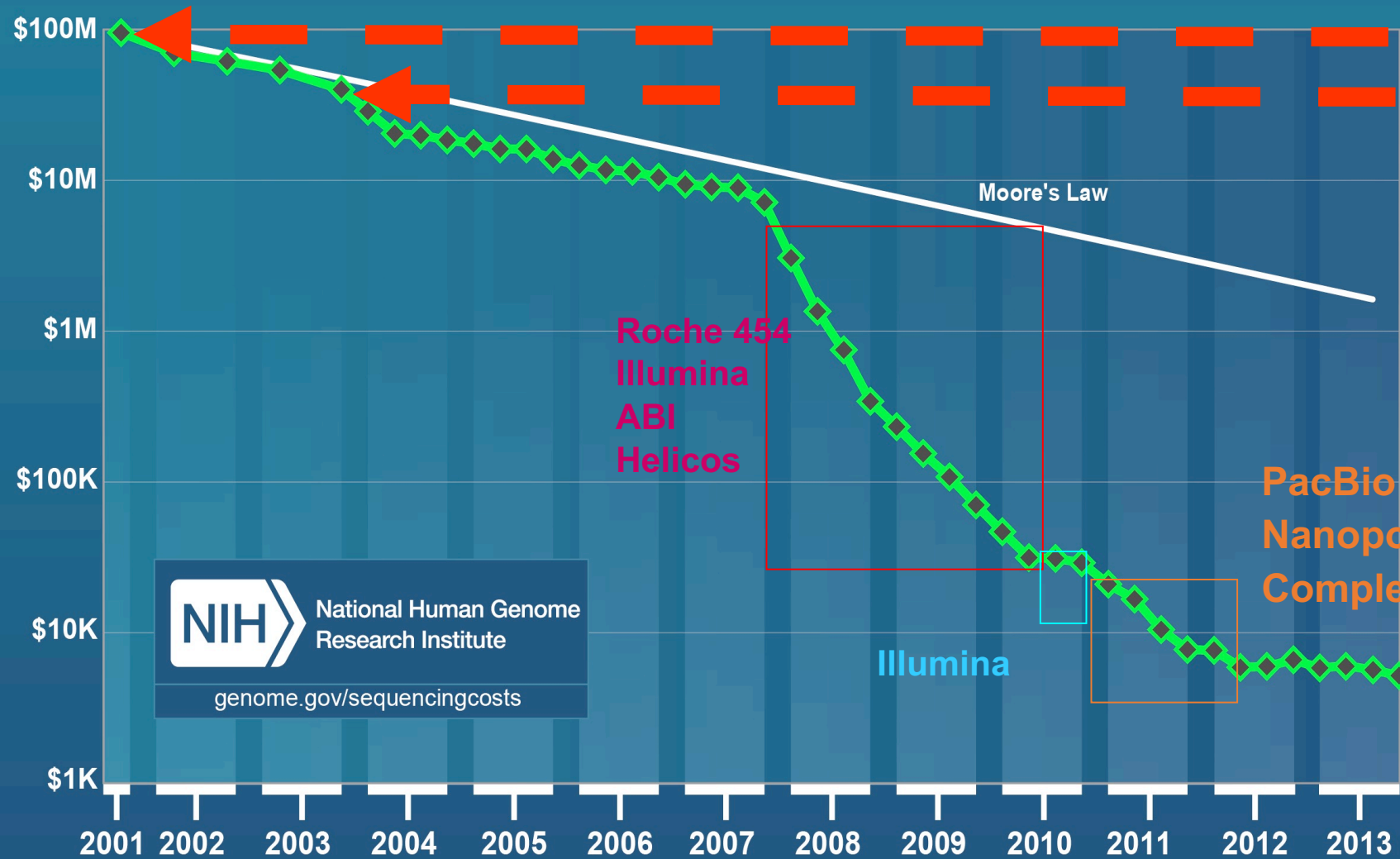
Protocol

Εφαρμογή	Amplicons, targeted gene panels	Everyday genome, WES, RNA-seq	WGS
Output range	0.3-15Gb	20-120Gb	1.6-1.8Tb
Max Read length	600	300-400	300
Run time	5-65H	15-30H	<3 days
Reads per flow cell	25 Million	130-400 Million	3 billion

Επιλογή εργαστηριακής προσέγγισης

- Whole genome sequencing (WGS)
 - Αγνωστη γενετική αιτιολογία
 - Δύσκολη η αξιολόγηση και η ερμηνεία των αποτελεσμάτων
 - Πιθανότητα ανεύρεσης μεταλλάξεων ή γενετικών αλλαγών που δεν σχετίζονται με το νόσημα
 - Μεγάλο το κόστος και ο χρόνος επεξεργασίας των δεδομένων
- Whole exome sequencing (WES)
 - Αγνωστη γενετική αιτιολογία
 - Χαμηλότερο κόστος από WGS και μεγαλύτερη απόδοση σε μικρότερο χρόνο
 - Πιο στοχευμένη αναζήτηση
 - Δύσκολη η αξιολόγηση και η ερμηνεία των αποτελεσμάτων
- Custom Capture (PANELS)
 - Συγκεκριμένο νόσημα – συγκεκριμένες αλλαγές που ανιχνεύονται
 - Χαμηλότερο κόστος
 - Λιγότερος χρόνος

Cost per Genome



\$ 100M

6-8 χρόνια

\$ 10-50M

3-4 μήνες

\$ 4-6 K

2-3 ημέρες

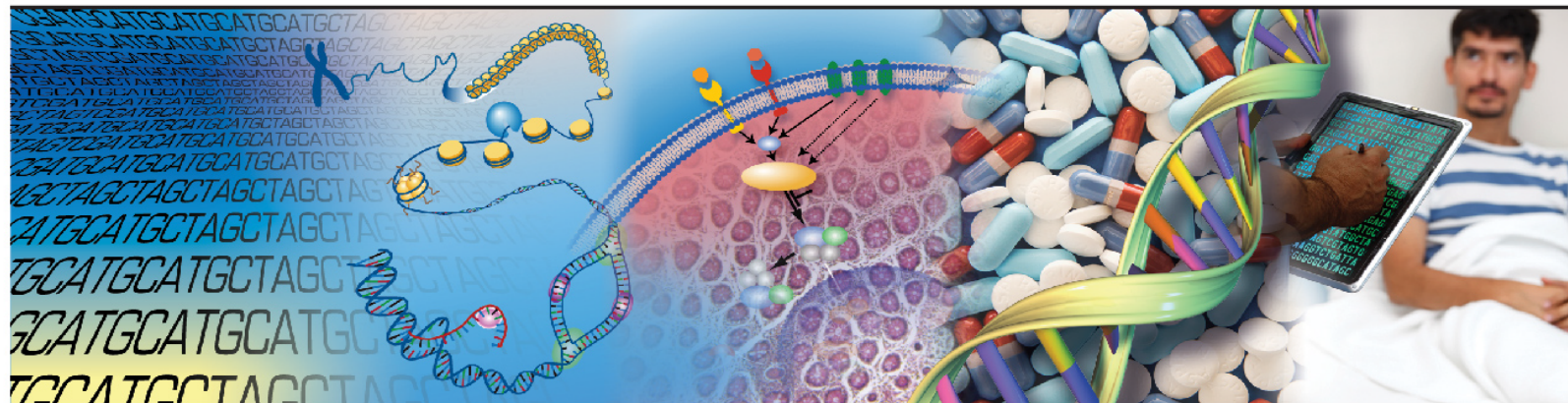
Understanding
the Structure of
Genomes

Understanding
the Biology of
Genomes

Understanding
the Biology of
Disease

Advancing
the Science of
Medicine

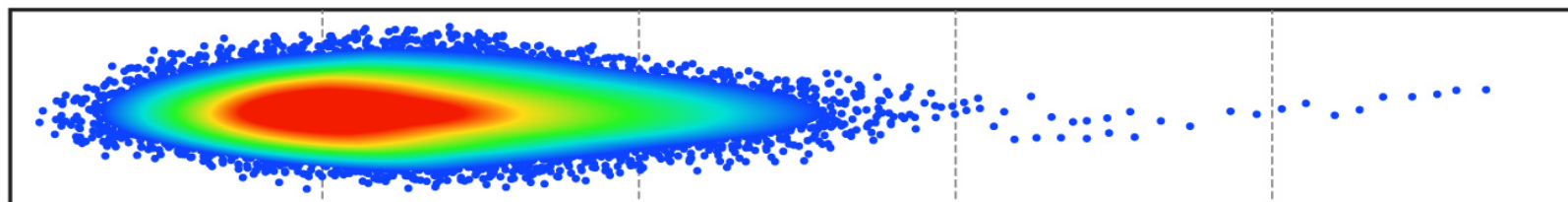
Improving the
Effectiveness of
Healthcare



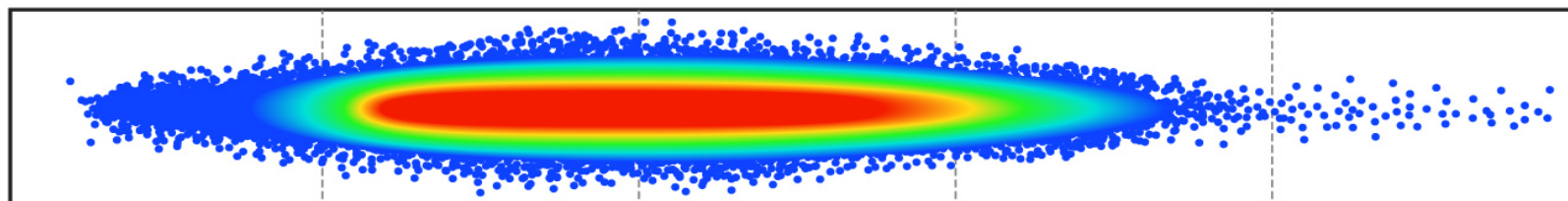
1990-2003
Human Genome Project



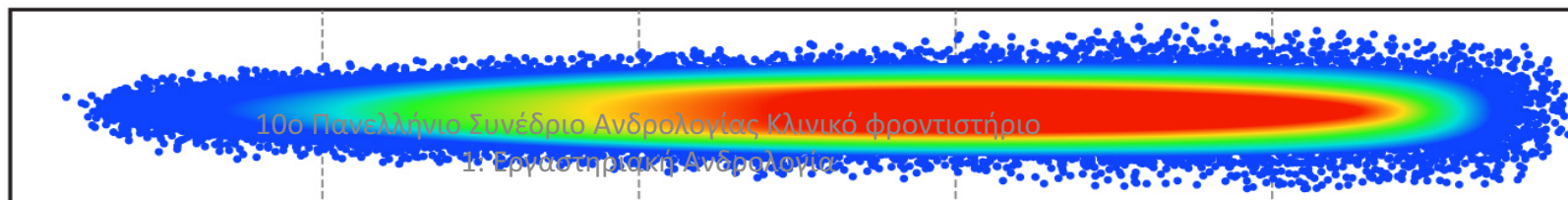
2004-2010



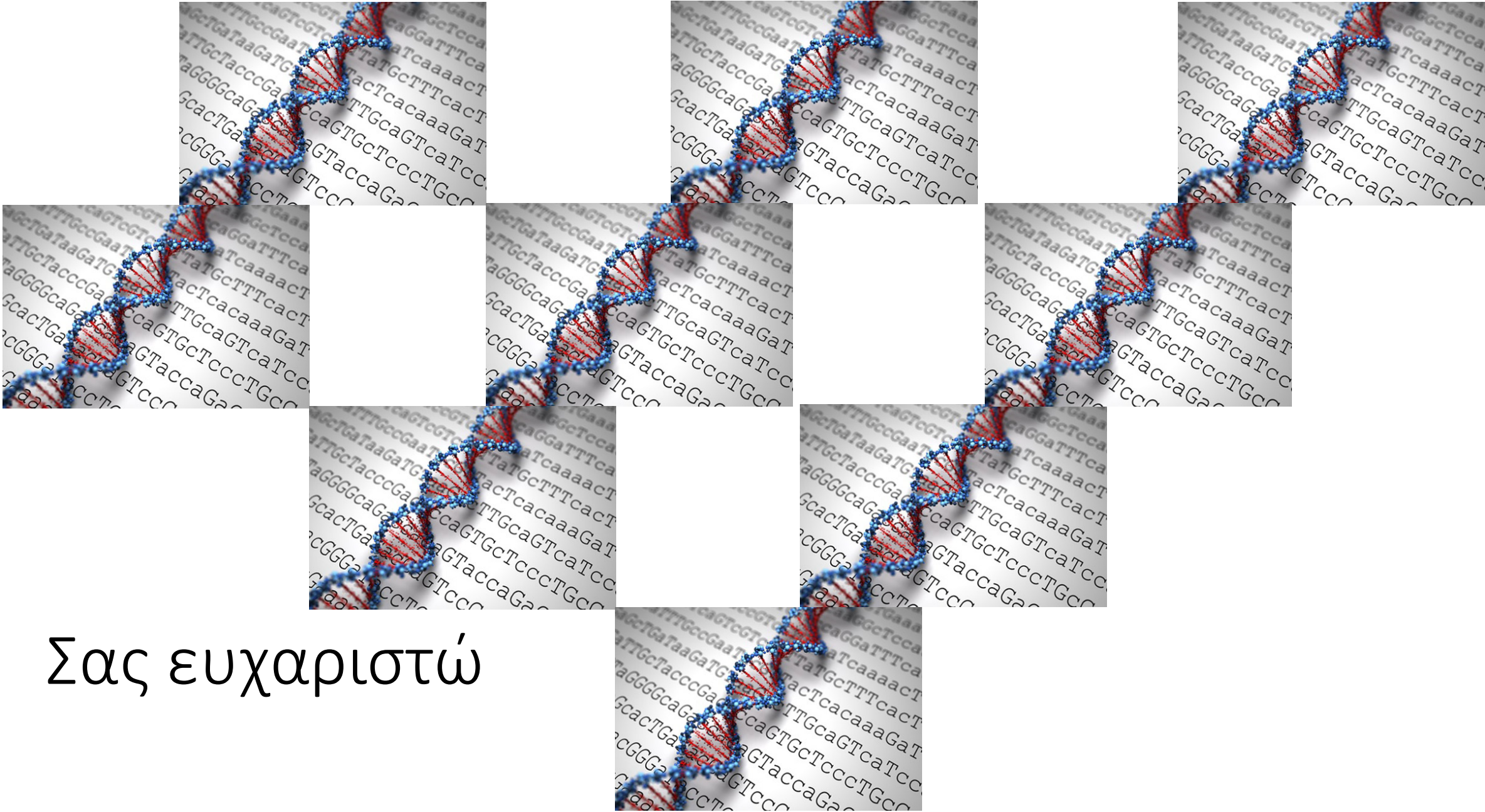
2011-2020



Beyond 2020



10ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ανδρολογίας Κλινικό φροντιστήριο
1. Εργαστήριο Κλινικής Ανδρολογίας



Σας ευχαριστώ