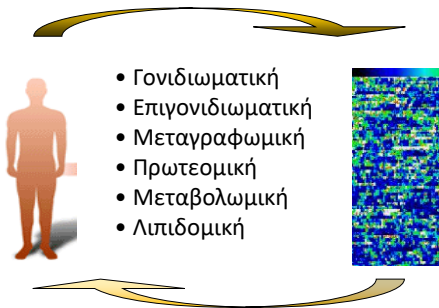


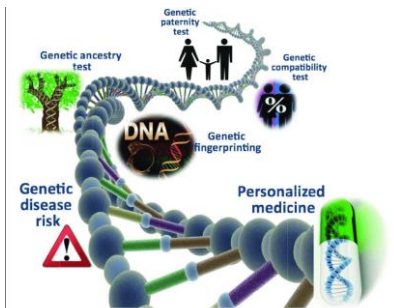
## Τεχνολογίες Γονιδιωματικής

Δέσποινα Σανούδου  
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια  
Δ' Παθολογική Κλινική

### Η Εποχή της -ομικής



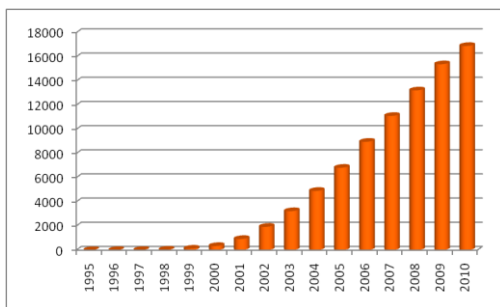
### Εφαρμογές στην Ιατρική



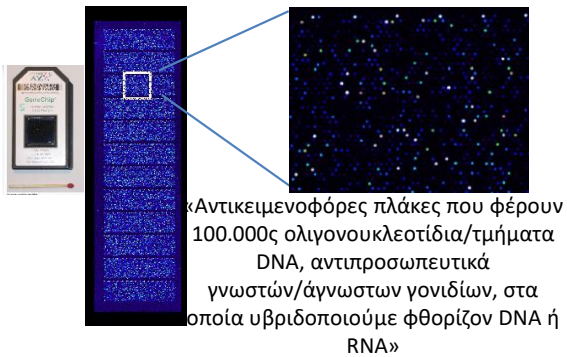
## Κύριες μεθοδολογίες Γονιδιωματικής

Η τεχνολογία προάγει τις επιστημονικές εξελίξεις

Μικροσυστοιχείς=> Εποχή Γονιδιωματικής

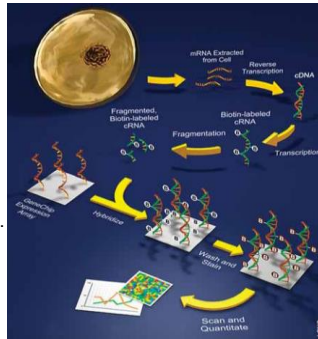


Τι είναι οι μικροσυστοιχείς;



### Πειραματικά στάδια μικροσυστοιχιών

1. Απομόνωση mRNA
2. Δημιουργία συμπληρωματικού DNA (cDNA)
3. Σήμανση cDNA με φθορίζουσα χρωστική
4. Υβριδοποίηση cDNA στη μικροσυστοιχία
5. Μέτρηση του φθορισμού.




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Σύστημα μικροσυστοιχιών




---

---

---

---

---

---

---

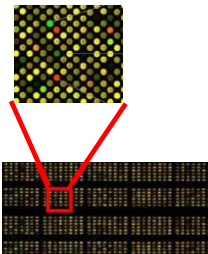
---

---

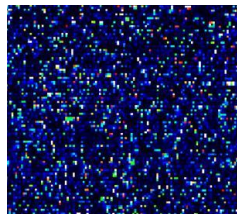
---

### Ηλεκτρονική αναπαράσταση εικόνας

Spotted  
Measuring DNA  
CGH arrays



Photolithography  
Measuring mRNA  
Expression arrays




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Κύρια διαθέσιμα είδη μικροσυτοιχιών

DNA { • Ανάλυση SNP  
• Ανάλυση αριθμού αντιγράφων περιοχών DNA

RNA { • Έκφραση γονιδίων  
• Έκφραση εξωνίων  
• Επίπεδα microRNA

Μικροβίωμα

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Ανεπεξέργαστα αποτελέσματα

id	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	.....
1											
2	SOAT1	5.367326	5.520233	5.887962	5.624287	5.489871	5.584613	5.322377	5.487342	5.565398	5.1
3	LS5	9.727252	9.780137	8.109067	8.46727	9.83498	9.852128	10.0045	9.739076	9.883177	9.1
4	SQLE	7.735346	8.05712	6.99877	8.589671	8.131684	8.553738	6.991604	7.471945	7.973404	7.4
5	EBP	4.683021	5.118117	5.78426	5.638914	5.725045	5.130736	5.863561	5.157558	5.395714	5.4
6	CYP51A1	8.269938	8.20528	8.199251	8.067303	9.381888	9.397497	8.081391	6.669024	7.911481	7.4
7	DHCR7	8.324285	8.326344	8.394122	8.639337	8.145494	8.712485	9.253899	7.371023	8.059263	8.4
8	CYP27B1	6.775091	6.469703	6.571085	6.468788	6.426431	6.56063	6.860352	6.698306	6.580879	6.1
9	DHCR24	4.700653	5.060057	4.894823	4.579013	5.038863	4.876913	4.722111	4.924049	5.062947	4
10	HSO17B7	7.630522	7.634301	8.152597	8.133018	7.696132	7.748463	7.875136	7.503293	8.164965	8.1
11	MSMO1	7.59752	7.333556	7.6071	5.559931	6.301034	7.768603	6.967683	5.481133	7.060781	6.1
12	DFOT1	10.48093	10.59119	10.22231	10.42314	9.988841	9.784424	10.65633	10.54698	10.27892	9.5
13	SCSDL	9.528375	9.350177	9.823833	9.702557	9.503177	9.335774	9.302106	9.280652	10.05913	9.4
14	LIPA	8.174425	6.751661	7.358589	7.169116	6.824679	7.824024	6.881841	7.561808	6.948957	8.1
15	CEL	10.54184	9.85274	10.03474	9.802644	10.42017	9.664995	10.21456	9.494757	9.512268	9.5
16	TM7SF2	9.828398	10.47254	9.832193	10.0013	10.31168	9.462928	9.757942	10.51902	9.601789	10
17	NSDHL	6.881942	7.472447	7.754443	6.162545	5.938341	6.740438	6.324345	6.5229	8.127225	8.1
18	GLAT3	7.780097	7.47782	8.054987	7.783764	7.734676	7.533904	8.044818	7.815304	7.706716	7.1

---

---

---

---

---

---

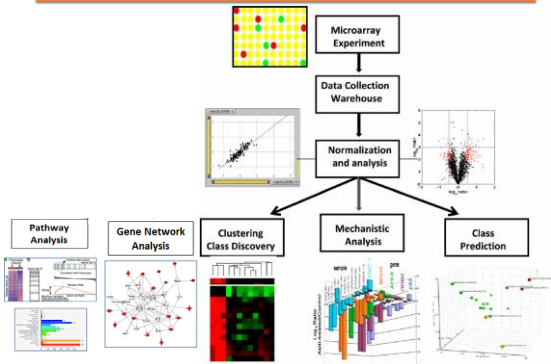
---

---

---

---

### Στάδια βιοπληροφορικής ανάλυσης δεδομένων



---

---

---

---

---

---

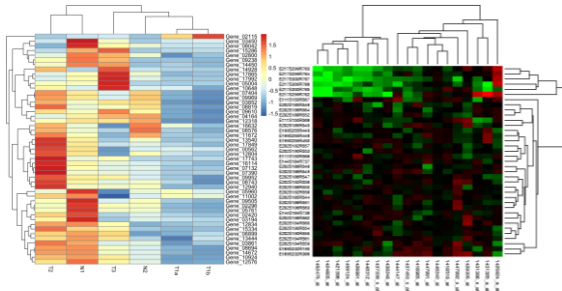
---

---

---

---

### Ανάλυση: Δενδρόγραμμα & heatmap



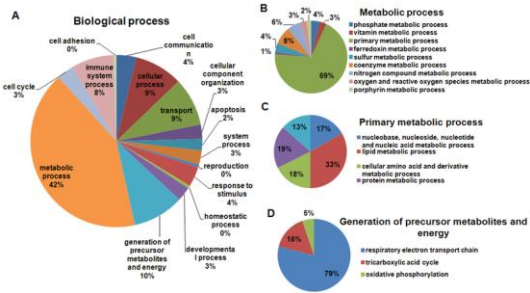
### Ανάλυση: Λίστα στατιστικά σημαντικών γονιδίων

202212_at	5.82	ρεκαθβίν λιποδόξ 1	PE51
211917_at	4.26	CD84 κίονα (MAD2, S17101)	HTK2B
206638_at	4.36	5-υδροξυγλυταμίνη (ακεταλδοξ) ρεσπτορ 2B	SPK01
219991_at	4.32	σπρενδίν 1, εκποικιλιζόμενος ρεσπτορ	DNK0P
219894_at	4.30	αφρακτικό ρεσπτορ D11 interacting protein	DO22
203699_s_at	3.63	αποκλειστικό ιαδοτροπικό, τύπος 8	ELC4L1
218223_at	3.49	(FEN1)/EN2, SDR4 (En3), γονόσ-λίκε 1	TBR5C4
220789_s_at	3.26	επιπολιόζοντις growth factor beta regulator 4	HPF2
220913_s_at	2.67	νυκτερινός DNA ρεσπτορ factor 2	FLJ11814
219930_at	2.66	υπερθηλατικό ρεσπτορ FLZ1616	ITGAS
201393_at	2.54	ρεσπτορ, αλφά 5	RTN4
210948_s_at	2.16	ρετιουλίαν 4	ACTN1
211163_s_at	1.98	ακτινίνη, αλφά 1	MR22
209280_at	1.95	μυοκίνη ρεσπτορ, C τύπος 2	SLC34A3
211193_at	1.90	ιολιμίν κέντρο family 3b	ADFP
209122_at	1.90	αδριασκό αβθεσπεντασκό-ρεσπτορ	FL3AA
214752_s_at	1.74	βλαστίαν α, αλφά (ακτινίνη δεσφίαν ρεσπτορ 2B)	KCTD13
221889_at	1.74	ροδοκίαν σκελετικό τετραμεταλλικό ομοειδίο	DMRT3B
220648_s_at	1.66	σχεμακίαν (C, C-ρρεσπ) ρεσπτορ 1	CCR1
202078_at	1.62	υπερπορτοσπείν (17) βετα δεθυλογλυταμίνη 3	HSD17B7
220061_s_at	1.62	λενοδοκίαν ρεσπτορ (αποκλειστικό)	R2DP
202093_s_at	1.57	κυτταρικό και γλυκώσ-ρίκο ρεσπτορ 1	CBP1
200621_at	1.57	λενοδοκίαν ρεσπτορ (αποκλειστικό)	IG2P3
203883_at	1.55	ιολιμίν κέντρο family 1b	SLC16A3
212816_s_at	1.54	νευρικό κελί-αδριασκό μυοκίαν 1	NCAM1
212330_at	1.54	Tauβίν	DNF7d91.01118
204821_at	1.53	σταθίαν 1	STAB1
207968_s_at	1.52	ακτινίνη-ρεσπτορ 2/3 complex, subunit 2, 34 kDa	APPC2
212863_s_at	1.46	ακτινίνη, βετα	ACTB
220228_at	1.45	A discaprin-λίκε και μεταλλοπρωτεσπείν	ADAMTS13
205621_at	1.43	ιολιμίν ρεσπτορ factor 2	RPT1
221794_at	1.42	αδριασκό of cytochrome b	DOCK6
221554_at	1.34	HMT1 histH1P methyltransferase-λίκε 1	HMT1L1
211213_s_at	1.34	ρεσπτορ/ρεσπτορ τρεσπ-λίκε ρεσπτορ 1	PTSP1
203918_s_at	1.34	σπρίντιν factor 2a, subunit 3, 40 kDa	SF3A3
202443_s_at	1.33	λενοδοκίαν of immunoglobulin 5	ST5
200014_at	1.33	σπρίντιν factor, arginine-γονόσ-ρίκο 9	SF509
178721_at	1.29	γονόσ-λίκε homolog (mouse)	JNK
208514_s_at	1.23	SPI10 nuclear body protein	SPI10
203663_at	1.20	σπρίντιν ρεσπτορ 34 kDa	SPT5A
56197_s_at	1.16	φωσφορπείν seramylase 3	PLSCR3

### Βάσεις δεδομένων για βιοπληροφορική ανάλυση



### Κατηγοριοποίηση γονιδίων




---

---

---

---

---

---

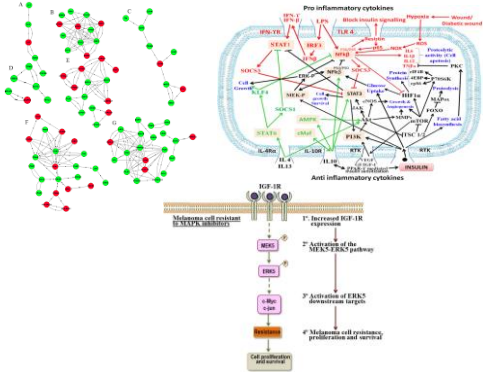
---

---

---

---

### Ανακάλυψη Μοριακών Μηχανισμών




---

---

---

---

---

---

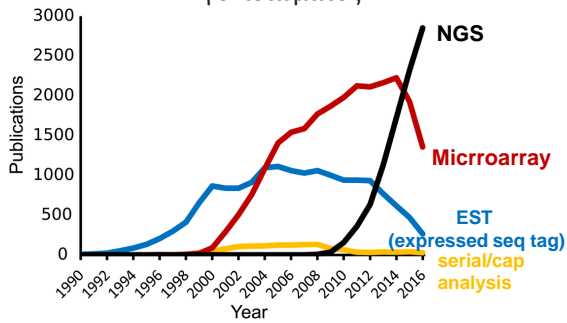
---

---

---

---

### Χρήση μεθόδων για την ανάλυση γονιδιώματος




---

---

---

---

---

---

---

---

---

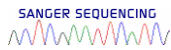
---

## Αλληλούχιση Sanger

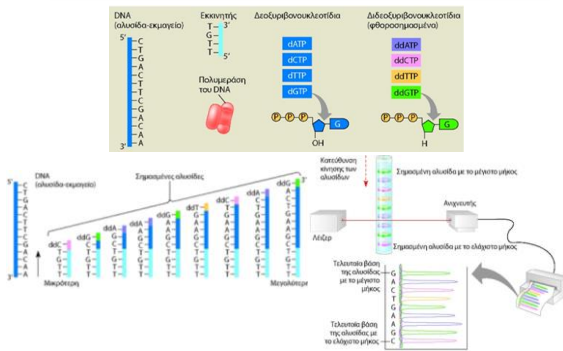


P. Berg W. Gilbert F. Sanger

**Βραβείο Νόμπελ Χημείας 1980:**  
Για τη συνεισφορά τους στον προσδιορισμό των αλληλουχιών των βάσεων στα νουκλεϊκά οξέα



## Αλληλούχιση DNA με φθορισμό

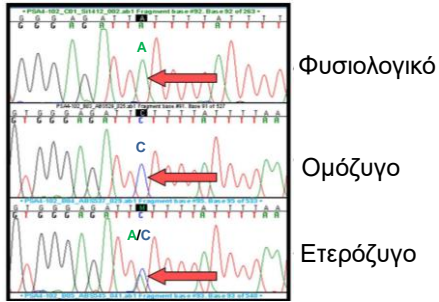


## Αλληλούχιση DNA

Αυτοματοποιημένος αλληλουχητής



### Αλληλούχιση DNA




---

---

---

---

---

---

---

---

### Αλληλούχιση του ανθρώπινου γονιδιώματος



13 χρόνια, 3 \$δισ

---

---

---

---

---

---

---

---

### Αλληλούχιση Νέας Γενιάς

#### Next Generation Sequencing (NGS)

Παράλληλη αλληλούχιση εκατομμυρίων μικρών τμημάτων (35bp-100bp) σε μια αντίδραση



13 χρόνια  
\$3billion

=> 1-2 μέρες  
=> \$1K

---

---

---

---

---

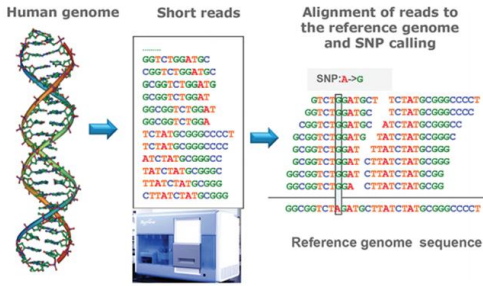
---

---

---



## Αλληλούχιση Νέας Γενιάς

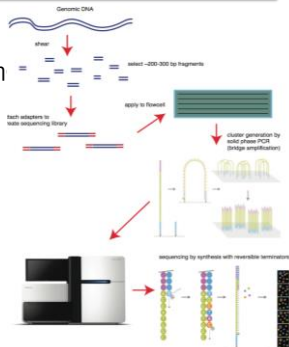


## Πλατφόρμες NGS

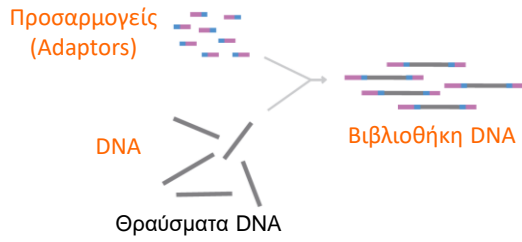
	454 FLX +	HiSeq 2000	PacBio RS	Ion Torrent 316
Company	Roche (USA)	Illumina (USA)	Pacific Biosciences (USA)	Life Technologies (USA)
Sequencing method	Synthesis (pyrosequencing)	Synthesis (cyclic reversible terminator)	Realtime sequencing	Synthesis (H <sup>+</sup> detection) on the chip
Amplification	emPCR	BridgPCR	None	emPCR
Run time	23h	11 days (dual flow cell)	0.5 - 2h	2h
Reads: Mb/run	1,000	\$40,000-600,000	5 - 10	>100
Reagent cost/run	\$6,200	~\$20,000	\$110 - 900	\$750
Reagent cost/Mb	\$7	>\$104	\$11 - 180	<\$7.5
Read length	500-1,000 (mode 700)	2*100 (paired-end reads)	850 - 1,100	>200
Primary errors	Indel	Substitution	CG deletion	Indel
Pros	Long read length	Highest throughput and lowest cost per Mb	Longest read length, no amplification error	Low cost per sample
Cons	High capital cost and high cost per Mb	High capital cost and high computation needs	Error rates, comparatively small outputs, high cost per Mb	High cost per Mb

## Στάδια NGS αλληλούχισης με την πλατφόρμα της Illumina

1. Προετοιμασία βιβλιοθήκη
2. Δημιουργία συστάδων
3. Αλληλούχιση
4. Ανάλυση δεδομένων



## 1. Προετοιμασία “βιβλιοθήκης” DNA




---

---

---

---

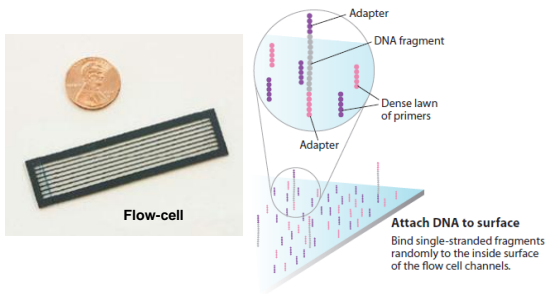
---

---

---

---

## 2. NGS- Δημιουργία συστάδων (Cluster)




---

---

---

---

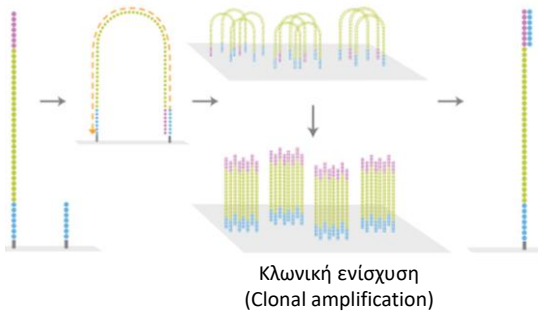
---

---

---

---

## 2. NGS- Δημιουργία συστάδων (Cluster)




---

---

---

---

---

---

---

---



#### 4. NGS- ανάγκες «υπολογιστικής δύναμης»

10 Γονιδιώματα, 5 Εξωτερικοί δίσκοι



Συστοιχία υπολογιστών




---

---

---

---

---

---

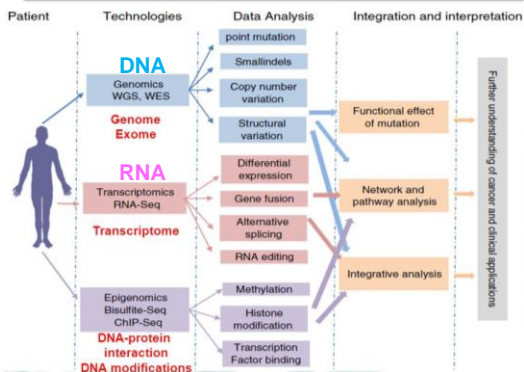
---

---

---

---

#### NGS τεχνολογίες-εφαρμογές




---

---

---

---

---

---

---

---

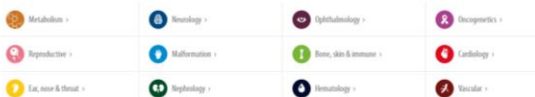
---

---

#### Διαθέσιμες εξετάσεις με βάση το NGS

Για >200 διαφορετικά νοσήματα  
Σε επίπεδο:

- Προγεννητικό
- Προσυμπτωματικό
- Διαγνωστικό
- Προγνωστικό
- Πρόβλεψης ανταπόκρισης




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---



---

---

---

---

---

---

---

---