

---

## Τεχνολογίες Γονιδιωματικής

---

Δέσποινα Σανούδου  
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια  
Δ' Παθολογική Κλινική

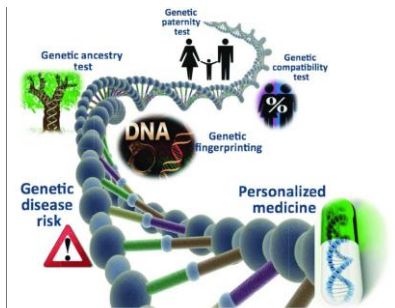
---

### Η Εποχή της -ομικής

- Γονιδιωματική
- Επιγονιδιωματική
- Μεταγραφωμική
- Πρωτεομική
- Μεταβολωμική
- Λιπιδωμική

---

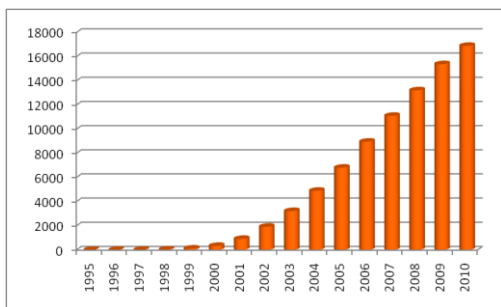
### Εφαρμογές στην Ιατρική



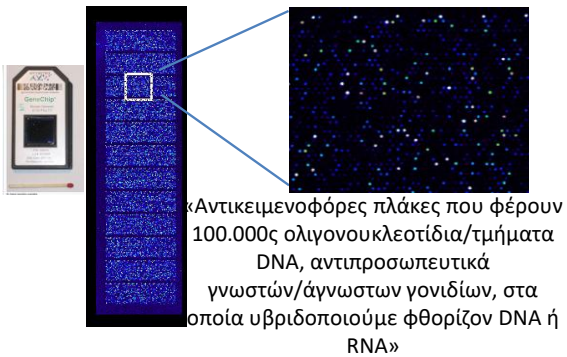
## Κύριες μεθοδολογίες Γονιδιωματικής

Η τεχνολογία προάγει τις επιστημονικές εξελίξεις

Μικροσυστοιχείς=> Εποχή Γονιδιωματικής

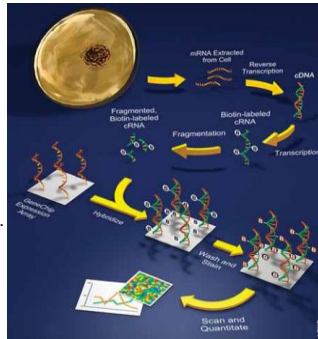


Τι είναι οι μικροσυστοιχείς;



### Πειραματικά στάδια μικροσυτοιχιών

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




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Σύστημα μικροσυτοιχιών




---

---

---

---

---

---

---

---

---

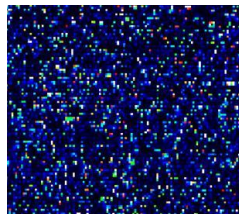
---

### Ηλεκτρονική αναπαράσταση εικόνας

Spotted  
Measuring DNA  
CGH arrays



Photolithography  
Measuring mRNA  
Expression arrays




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Κύρια διαθέσιμα είδη μικροσυστοιχιών

DNA { • Ανάλυση SNP  
• Ανάλυση αριθμού αντιγράφων περιοχών DNA

RNA { • Έκφραση γονιδίων  
• Έκφραση εξωνίων  
• Επίπεδα microRNA

Μικροβίωμα

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Ανεπεξέργαστα αποτελέσματα

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	.....
1		T21101311	T21101312	T21101313	T21101314	T21101315	T21101316	T21101317	T21101318	T21101319	T21101320
2	SOAT1	5.367326	5.520233	5.887962	5.624287	5.489871	5.584613	5.322377	5.487342	5.565398	5.1
3	ISS	9.727252	9.780137	8.105067	8.06727	9.829498	9.852128	10.0045	9.739076	9.883177	9.1
4	SQLE	7.735346	8.05712	6.99877	8.89871	8.131684	8.533728	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	6.560603	6.860352	6.698506	6.580879	6.1
9	DHCR24	4.700653	5.060557	4.894423	4.979813	5.020885	4.874913	4.722111	4.924049	5.062947	4
10	HSD17B7	7.630522	7.834301	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	7.788603	6.967683	5.481133	7.060781	6.1
12	DFP1	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	IPA	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	9.664595	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	7.780697	7.47234	8.054307	7.783364	7.734636	7.433304	8.046810	7.815304	7.706716	7.1

---

---

---

---

---

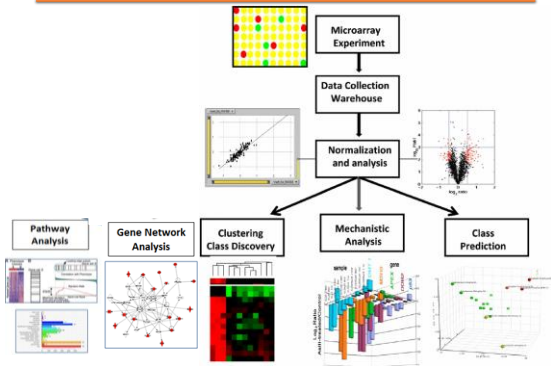
---

---

---

---

## Στάδια βιοπληροφορικής ανάλυσης δεδομένων



---

---

---

---

---

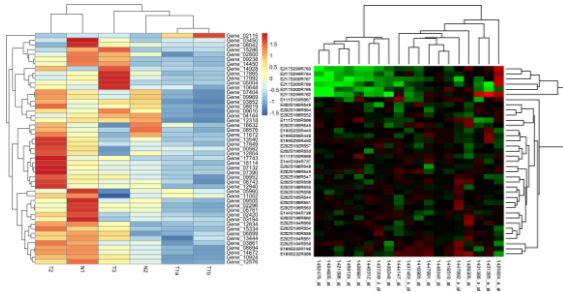
---

---

---

---

Ανάλυση: Δενδρόγραμμα & heatmap



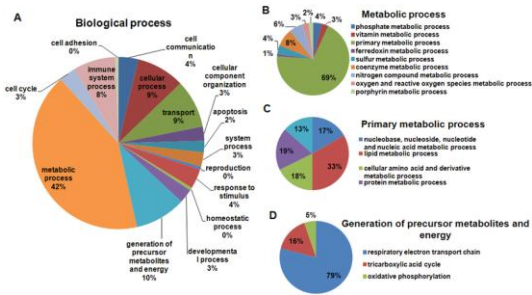
Ανάλυση: Λίστα στατιστικά σημαντικών γονιδίων

202212_at	5.02	ρεακθίλιο λιποβίος 1	PE51
211913_at	4.26	cDNA clone IMAGE:521701	HTK2B
206438_at	4.36	5-υδροξυγυρταμίνη (ισοσταμίνη) ρεцепtor 2B	SP0H1
219991_at	4.30	spredin 1, ενδοκυτταρικό μυστηριό ρεceptor	DNK1P
219876_at	4.25	αφροακτινικό ρεceptor D11 interacting protein	DO2E
203699_s_at	3.83	αφροακτινικό ιαδοδιστροφικό, τύπου 8	ELOH1
218228_at	3.49	(FEN1/EN2, SUR4/Elo), yeast-like 1	TBR1C4
220789_s_at	3.06	translating growth factor beta regulator 4	NOF2
220918_s_at	2.67	nuclear RNA export factor 2	FLJ21816
219530_at	2.66	hypothetical protein FLZ016	ITGAS
201393_at	2.54	νεοταμίν, αλφά 5	RTN4
219648_s_at	2.16	reticulán 4	ARC2
211163_s_at	1.98	actinin, αλφά 1	SLC34A1
209283_at	1.95	mannose receptor, C type 2	ADFP
209122_at	1.90	soluble carrier family 3b	FLM4
214751_s_at	1.74	adipose differentiation-related protein	KCTD13
214750_s_at	1.74	Ribonin A, alpha (protein binding protein 280)	DMRT3B
221899_at	1.74	potassium channel tetramerization domain	CCO1
220648_s_at	1.73	DNA (cytosine 5'-methyltransferase 3 beta	HSD17B7
202078_at	1.66	chemokine (C-C motif) receptor 1	R2P
220061_s_at	1.62	hydroxyphenyl (17 beta) dehydrogenase 7	CDP5
220295_s_at	1.62	benzodiazepine receptor (periplasmic)	IG27G
200621_at	1.59	cytosine and glycine-rich protein 1	SLC16A3
203865_at	1.57	benzodiazepine translocator factor 3	HCAR1
202876_s_at	1.55	soluble carrier family 1b	DNF7d491J0118
212843_at	1.54	neural cell adhesion molecule 1	STAB1
212390_at	1.54	Taxilin	APPC2
204821_at	1.53	stabilin 1	ACT8
207968_s_at	1.52	actin related protein 2/3 complex, subunit 2, 34 kDa	ADAMTS13
212862_s_at	1.46	actin, beta	RPT1
220278_at	1.45	A disintegrin-like and metalloprotease	DOCK6
206211_at	1.42	ubiquitin regulatory factor 3	HBM7L1
221754_at	1.42	deficator of cytolysis 6	PTSP1
221544_at	1.34	HNF1I histH1P methyltransferase like 1	SFA3
211213_s_at	1.34	peroxisomal tract binding protein 1	ST5
203818_s_at	1.34	springing factor 2a, subunit 2, 60 kDa	SF09
200443_s_at	1.33	suppression of tumorigenicity 5	PK6
200044_at	1.33	springing factor, arginine/serine-rich 9	SPI10
17871_at	1.29	yeast homolog (mouse)	SPI94
208512_s_at	1.23	SPI10 nuclear body protein	PLSCR3
203462_at	1.20	signal recognition particle 34 kDa	
56197_at	1.16	phosphotripeptide scramblase 3	

Βάσεις δεδομένων για βιοπληροφορική ανάλυση



## Κατηγοριοποίηση γονιδίων




---

---

---

---

---

---

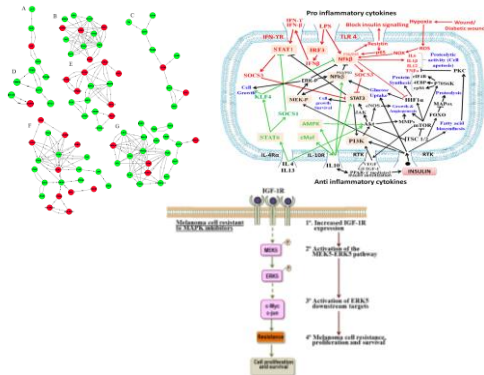
---

---

---

---

## Ανακάλυψη Μοριακών Μηχανισμών




---

---

---

---

---

---

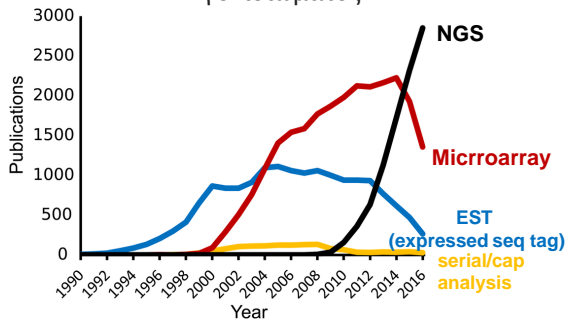
---

---

---

---

## Χρήση μεθόδων για την ανάλυση γονιδιώματος




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Αλληλούχηση Sanger

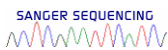


P. Berg

W. Gilbert

F. Sanger

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



---

---

---

---

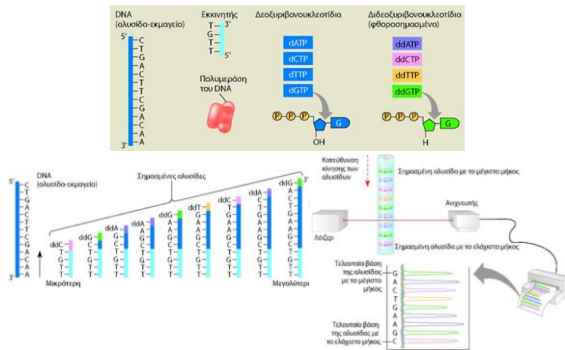
---

---

---

---

## Αλληλούχηση DNA με φθορισμό



---

---

---

---

---

---

---

---

## Αλληλούχηση DNA

Αυτοματοποιημένος αλληλουχητής



---

---

---

---

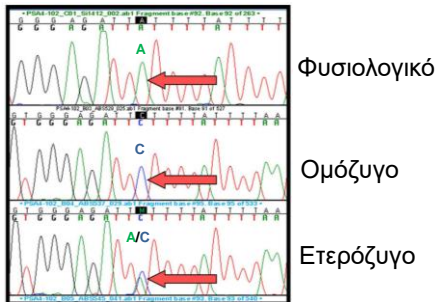
---

---

---

---

### 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

---

---

---

---

---

---

---

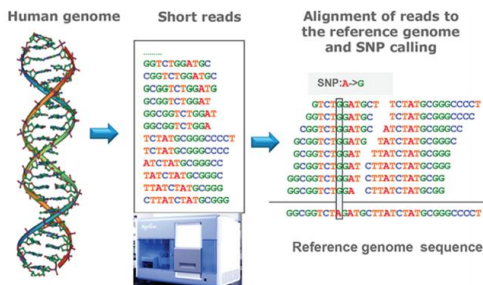
---

---

---



## Αλληλούχιση Νέας Γενιάς

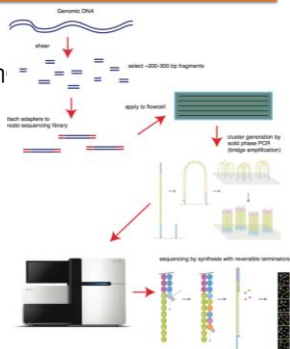


## Πλατφόρμες NGS

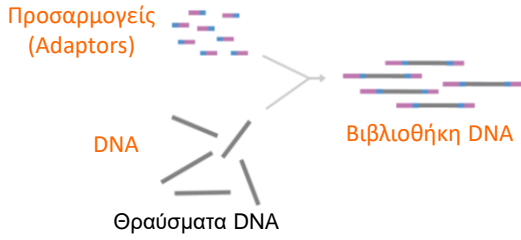
	454 FLX +	HiSeq 2000	PacBio RS	Ion Torrent 316
Company	Roche (USA)	Illumina (USA)	Pacific Biosciences (USA)	Life Technologies (USA)
Sequencing method	Synthesis (pyrosequencing)	Synthesis (cyclic reversible terminator)	Realtime sequencing	Synthesis (H <sup>+</sup> detection) on the chip
Amplification	emPCR	BridgPCR	None	emPCR
Run time	23h	11 days (bulk flow cell)	0.5 - 2h	2h
Reads: Mbp/run	1,000	540,000-600,000	5 - 10	>100
Reagent cost/run	\$6,200	~\$20,000	\$110 - 900	\$750
Reagent cost/Mb	\$7	>\$0.04	\$11 - 180	<\$7.5
Read length	500-1,000 (mode 700)	2*100 (paired-end reads)	860 - 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



---

---

---

---

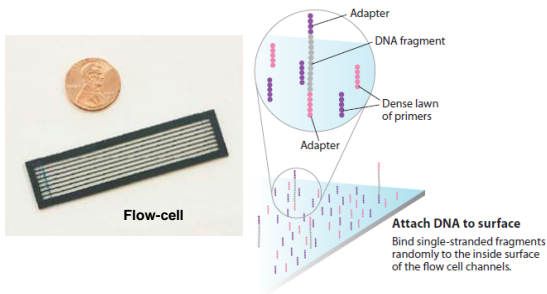
---

---

---

---

### 2. NGS- Δημιουργία συστάδων (Cluster)



---

---

---

---

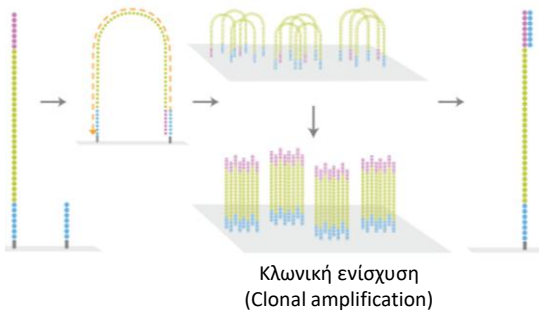
---

---

---

---

### 2. NGS- Δημιουργία συστάδων (Cluster)



---

---

---

---

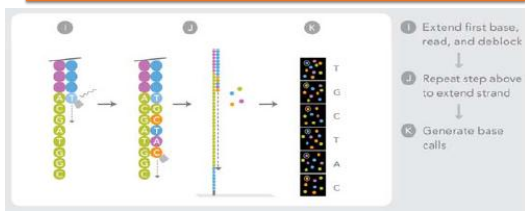
---

---

---

---

3. NGS- Αλληλούχηση



- Horizontal lines for notes corresponding to the NGS sequencing diagram.

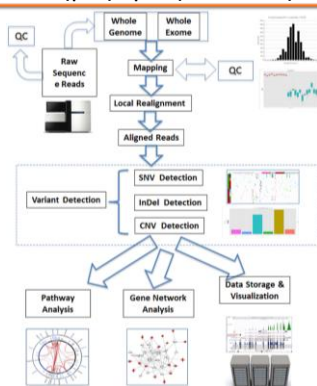
4. NGS- στοίχιση και ανάλυση δεδομένων

FASTQ format sequence alignment example showing a reference sequence and multiple sequencing reads with their corresponding quality scores.

- Horizontal lines for notes corresponding to the NGS alignment and analysis section.

Μαζικά παράλληλη αλληλούχηση

4. NGS- βιοπληροφορική ανάλυση δεδομένων



- Horizontal lines for notes corresponding to the NGS bioinformatics analysis pipeline.

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

10 Γονιδιώματα, 5 Εξωτερικοί δίσκοι



Συστοιχία υπολογιστών



---

---

---

---

---

---

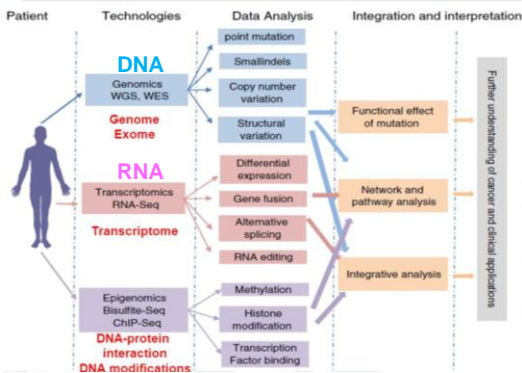
---

---

---

---

### NGS τεχνολογίες-εφαρμογές



---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Διαθέσιμες εξετάσεις με βάση το NGS

Για >200 διαφορετικά νοσήματα  
Σε επίπεδο:

- Προγεννητικό
- Προσυμπτωματικό
- Διαγνωστικό
- Προγνωστικό
- Πρόβλεψης ανταπόκρισης



---

---

---

---

---

---

---

---

---

---



---

---

---

---

---

---

---

---