NUEVAS TECNOLOGÍAS EN LOS LABORATORIOS DE GENÉTICA CLÍNICA

Sebastián Blesa Luján
Laboratorio de Estudios Genéticos,
Fundación para la Investigación del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

TÉCNICAS UTILIZADAS HASTA EL MOMENTO

BASADAS PRINCIPALMENTE EN LA BÚSQUEDA DE MUTACIONES O ESTUDIOS DE SEGREGACIÓN

- **SISTEMAS INDIRECTOS DE DETECCIÓN:**
  - SSCP
  - DGGE
  - heteroduplex
  - RLFPs
  - análisis de fragmentos
  - Southern Blot

- **SISTEMAS DIRECTOS:**
  - Secuenciación
  - PCR largo
  - ASO-PCR

TÉCNICAS CONVENCIONALES

PENSADAS PARA LA BÚSQUEDA DE MUTACIONES, ESTUDIOS DE SEGREGACIÓN Y OTROS MARCADORES (NIVEL DE ARNm, METILACIÓN, ETC.).

- Secuenciadores
  - a) Secuenciación.
  - b) Análisis de fragmentos (tamaño y/o semicuantitativo)
    - I/D (pequeñas), STRs y VNTRs
    - I/D (grandes alteraciones)

- Termocicladores cuantitativos a tiempo real
  - a) Cuantificación de ácidos nucleicos
  - b) Cuantificación del número de copias (I/D)
  - c) Identificación de mutaciones

- Otros sistemas de análisis de ADN.
  - a) Masas
  - b) Pirosecuenciación

NUEVOS SISTEMAS

- MICROCHIPS

  a) detección de mutaciones
  b) expresión
  c) metilación

- SISTEMAS DE SECUENCIACIÓN MASIVA

- SISTEMAS INFORMÁTICOS
  a) Bases de datos.
  b) Programas informáticos de análisis.

SISTEMAS CONVENCIONALES:

- Secuenciadores
  a) Secuenciación.
  b) Análisis de fragmentos (tamaño o semicuantitativo)
    - I/D (pequeñas), STRs y VNTRs
    - I/D (grandes alteraciones)
    - SNPs y mutaciones puntuales

- Termocicladores cuantitativos a tiempo real
  a) Cuantificación de la expresión
  b) Cuantificación del número de copias (I/D)
  c) Identificación de mutaciones

- Otros sistemas de análisis de ADN.
  a) Masas
  b) Pirosecuenciación

SECUENCIACIÓN: SISTEMAS AUTOMÁTICOS CONVENCIONALES

Principales características:

Basados en la incorporación enzimática de ddNTPs en la síntesis de copias del ADN molde y posterior electroforesis capilar (1-96 capilares)

Analizan hasta 1000 bp en cada reacción y unas 1000-2000 reacciones al día (1-2 Mbp).

Fidelidad 99,5 %.

Aplicaciones:

Conocimiento de la secuencia de un fragmento de ADN o ARN.

Secuenciación completa de genomas (clonacion o gene walking)

Caracterización de patógenos.

Identificación de mutaciones y polimorfismos.

Limitaciones:

Necesidad de conocer la secuencia (productos de PCR), excepto clonacion.

Tamaño de las secuencias.

SISTEMAS BASADOS EN EL USO DE SECUENCIADORES

ANALISIS DE POLIMORFISMOS / MUTACIONES

ANÁLISIS DE FRAGMENTOS

ANÁLISIS DE TAMAÑOS

- Detección de pequeñas alteraciones de inserción/deleción.

- Estudio STRs.

ANÁLISIS SEMICUANTITATIVO

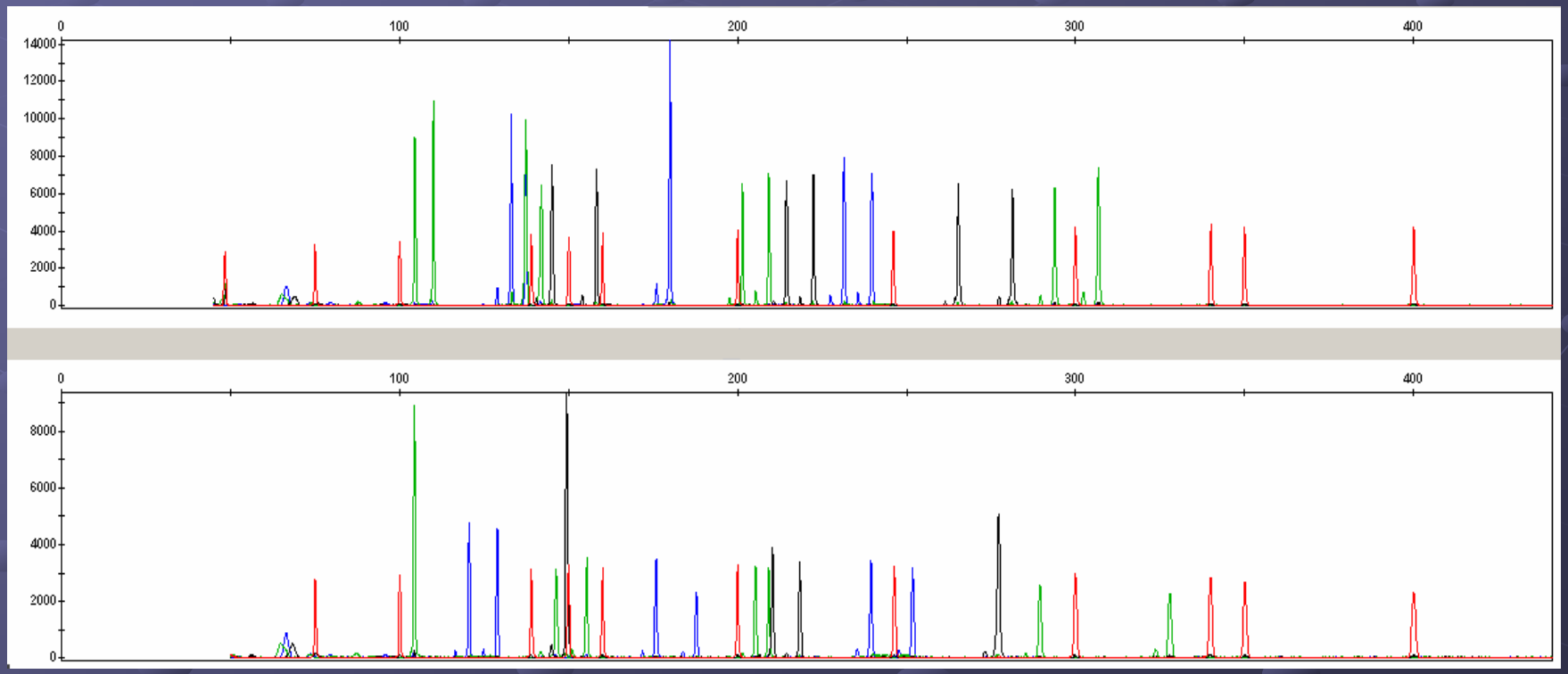
- Detección de grandes reordenamientos.

- Determinación de polimorfismos de I/D de grandes secuencias y CNVs.

ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS

ANÁLISIS DE TAMAÑOS

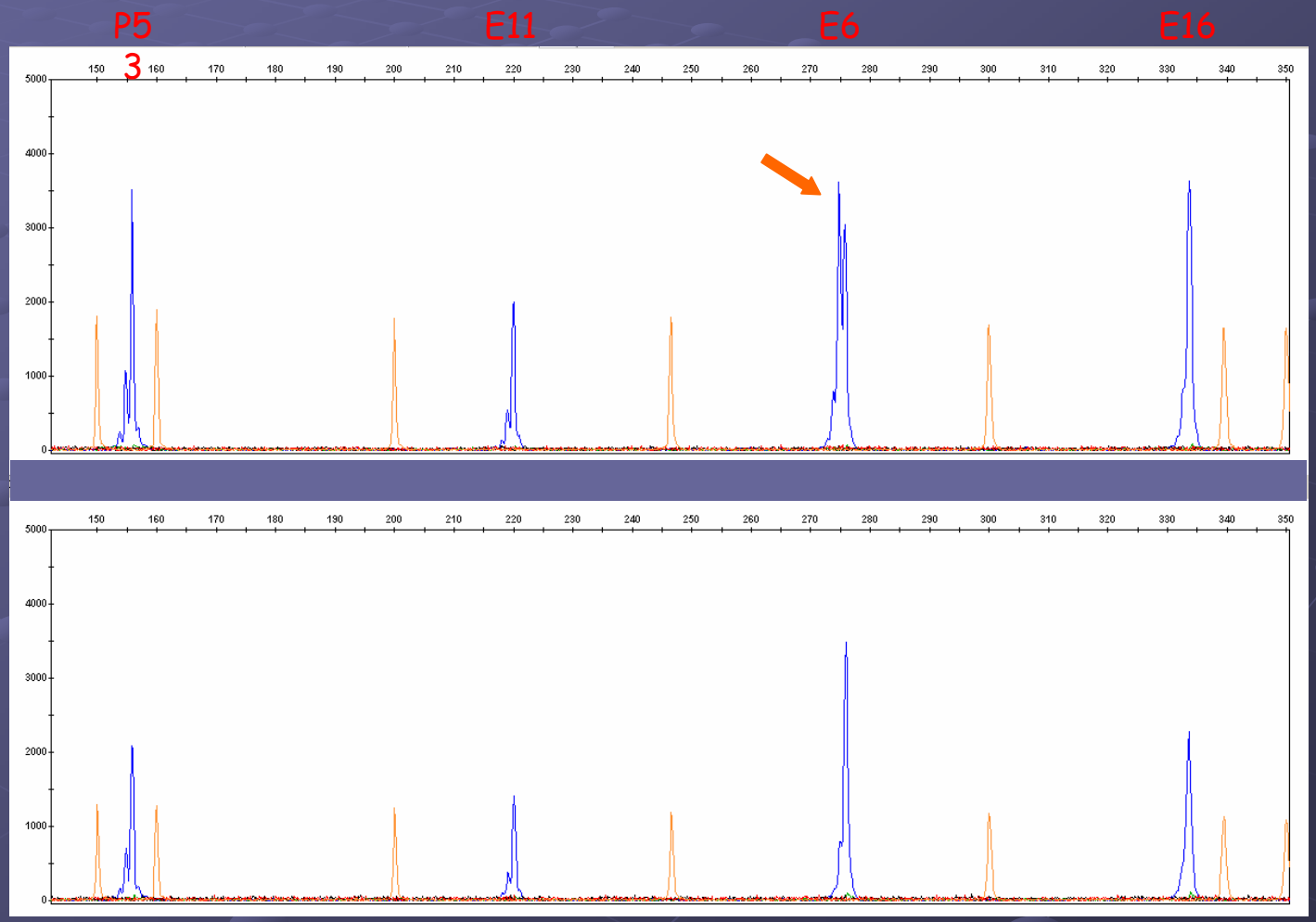
Detección de pequeñas alteraciones de inserción/deleción.
Estudio STRs.



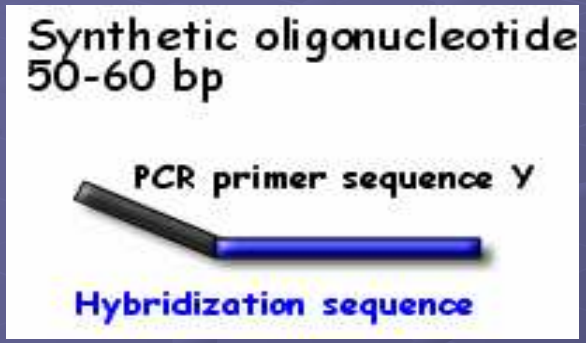
PEQUEÑAS INSERCIONES O DELECIONES

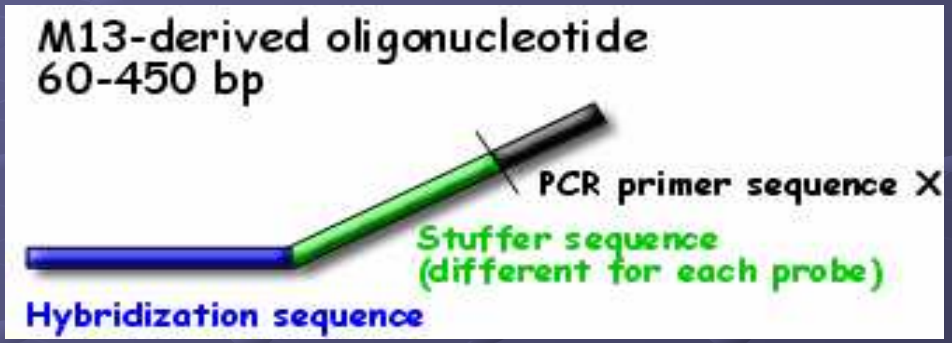
FH501
(884delT)

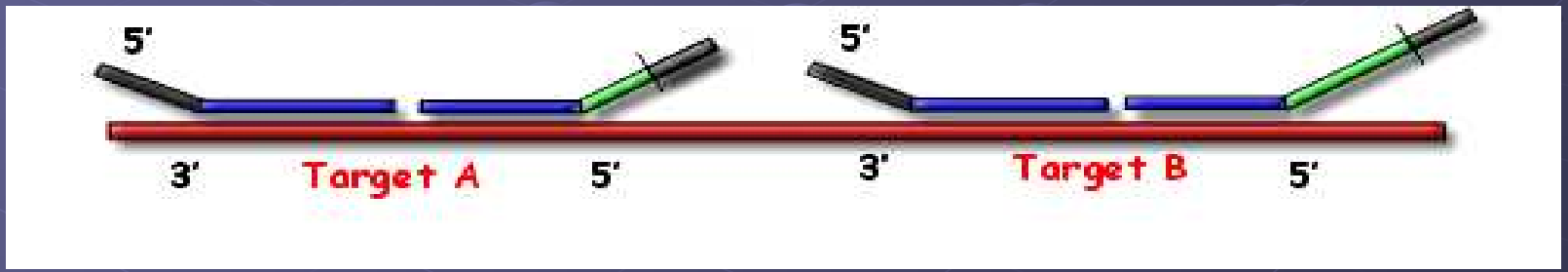
Control

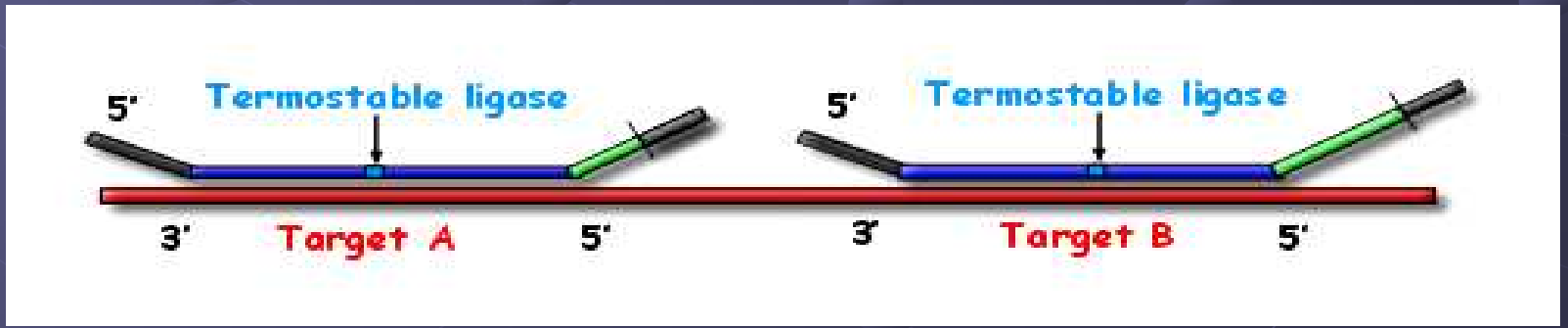


DETECCIÓN DE GRANDES REORDENAMIENTOS : MLPA
(Multiplex Ligation Probe Amplification)



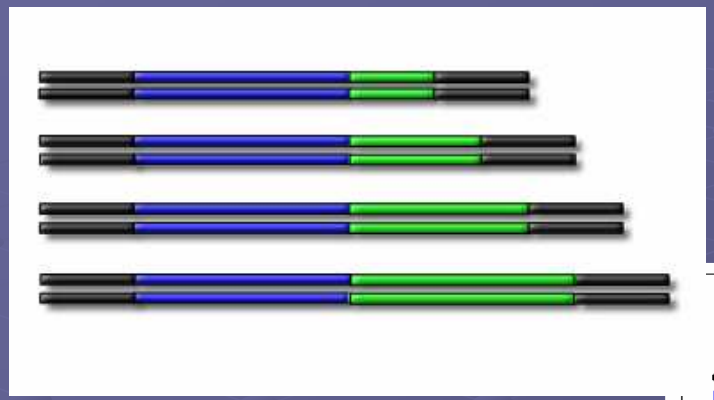


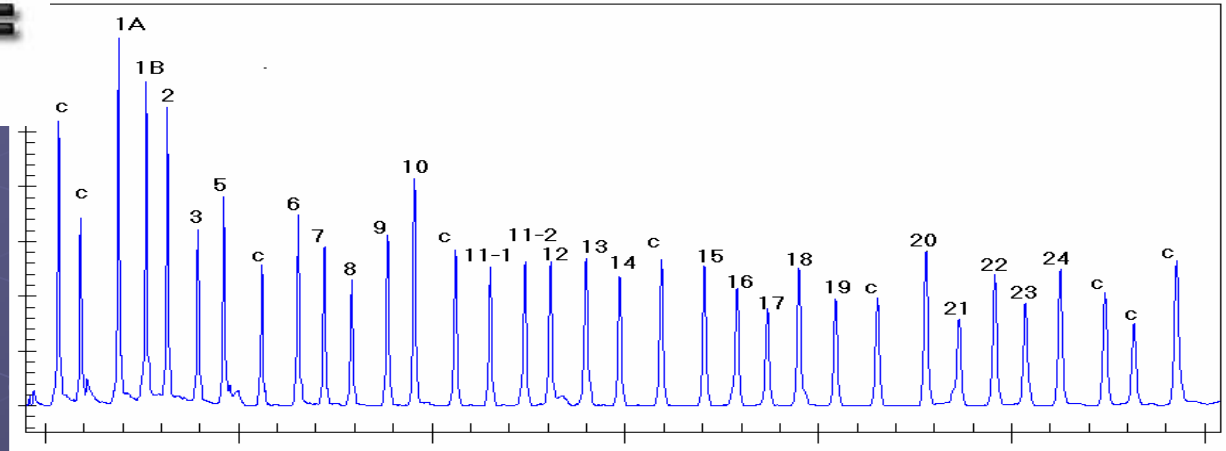


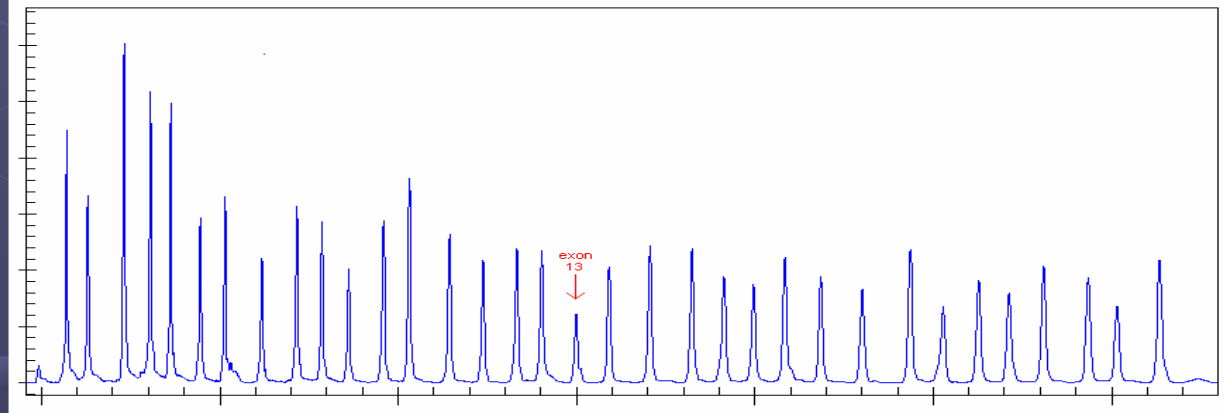


DETECCIÓN DE GRANDES REORDENAMIENTOS : MLPA

(Multiplex Ligation Probe Amplification)



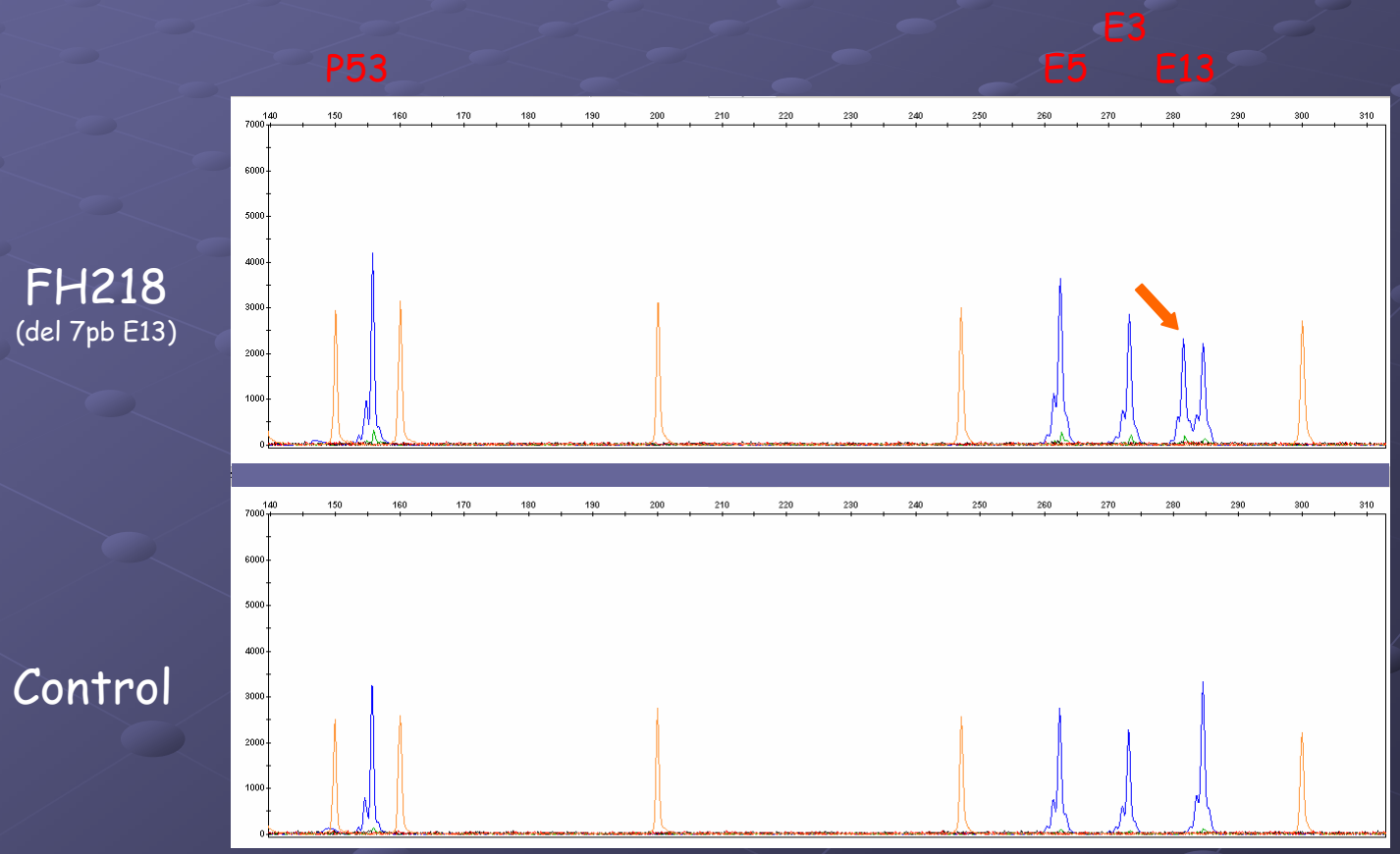




TÉCNICAS DE ALTO RENDIMIENTO PARA EL ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS

ANÁLISIS SEMICUANTITATIVO

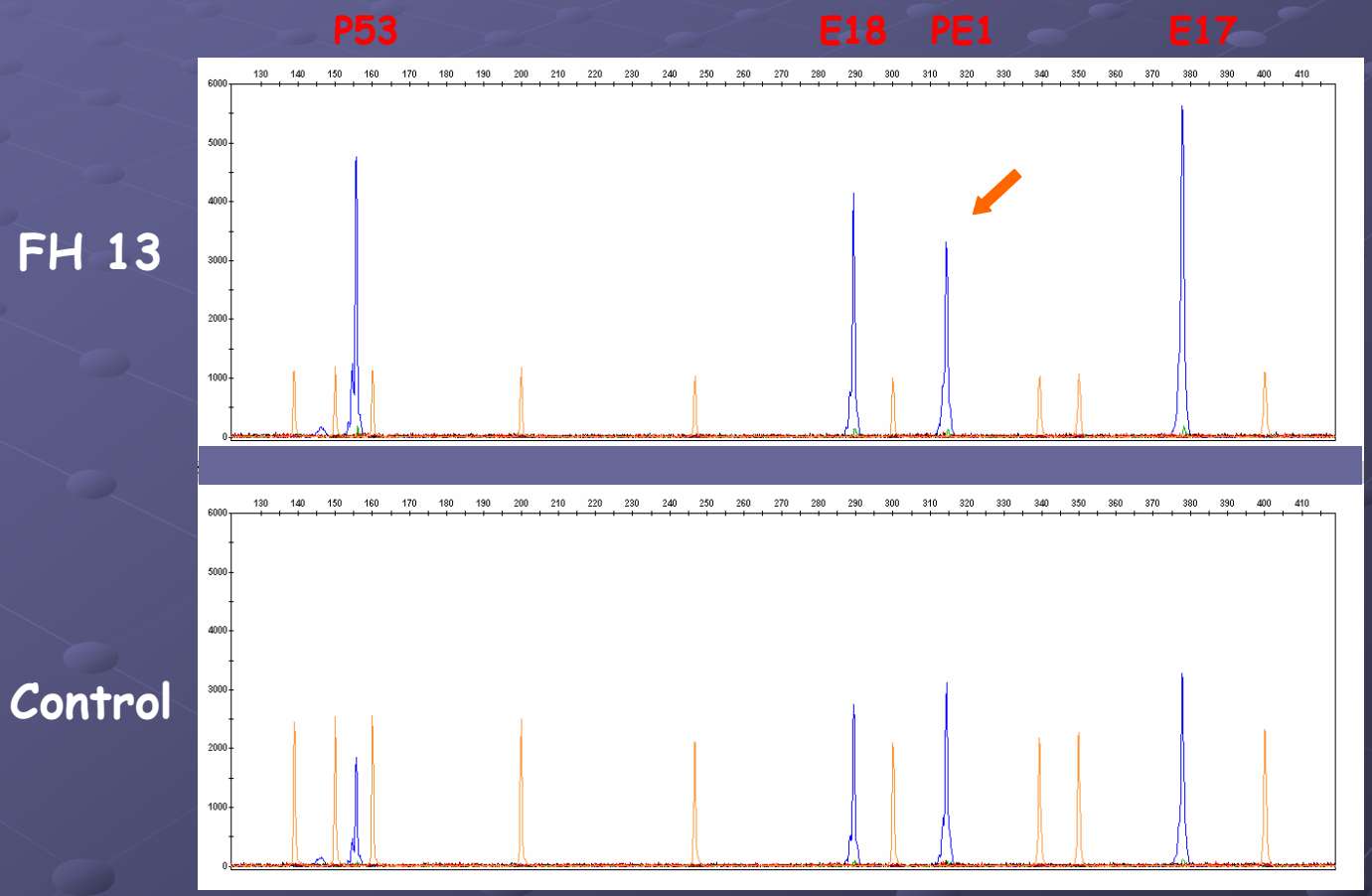
Estudio de polimorfismos y mutaciones de I/D pequeñas



García-García, et al. Human Mutation 2006

ANÁLISIS SEMICUANTITATIVO

Estudio de polimorfismos y mutaciones de I/D de grandes fragmentos



García-García, et al. Human Mutation 2006

SISTEMAS CONVENCIONALES: ALTO RENDIMIENTO

Automatización:

Incorporación de sistemas robóticos e informaticos que preparan las muestras, reacciones y las purifican.

Sistema de extracción de purificación de ADN **"Chemagic MSM "** de Chemagen. Extracciones de 0,2 a 10 ml.

-Dos sistemas robóticos “StartLet” de Hamilton para la preparación de reacciones y su purificación. Diseñados para el trabajo en pre y post PCR.
- Secuenciador automático de ácidos nucleicos “3730 DNA Analyzer” de Applied Biosystems (sistema automático de electroforesis de ADN de 48 capilates).

CAPACIDAD DEL LABORATORIO DE ESTUDIOS GENÉTICOS

- **EXTRACCIÓN DE ADN:**

> 50 muestras a partir de 10 ml de sangre total al día.
> 500 muestras a partir de 0,05 a 0,50 ml de sangre al día.

- **PREPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DE REACCIONES:**

> 5000 reacciones al día.

-**ANÁLISIS DE SECUENCIAS:**

> 900 secuencias al día de unas 700 bp (límite del secuenciador).

TÉCNICAS DE ALTO RENDIMIENTO PARA EL ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS/MUTACIONES PUNTUALES

Análisis de SNPs:

- Minisecuenciación
- SNPlex (I/D de hasta 6 bp)

Aplicaciones:

- Deteccion de mutaciones
- Análisis polimorfismos y haplotipos:

Farmacogenómica

COMBINACION DE ESTRATEGIAS DE DISCRIMINACION,FORMATO Y DETECCION EN EL GENOTIPADO DE SNPs

PRINCIPIO DE LA REACCION	FORMATO	DETECCION/MARCAJE
-Hibridacion con sondas ASO -Primer extension -Minisecuenciacion -Ligacion -Rotura invasiva (invasive cleavage) -Rotura por enzimas restriccion	-Solucion homogénea -Solución semihomogénea -Placa de fase sólida -Microarray (fase solida) -Microparticulas (fase sólida) -Gel	-Radioactividad -Flourescencia -FRET (Fluorescence resonance energy transfer) -”Quenching” por contacto -Espectrometria de Masas -Luminiscencia

METODOS BIOQUIMICOS PARA LA DISCRIMINACION DE LOS DOS ALELOS DE UN SNP / MUTACION

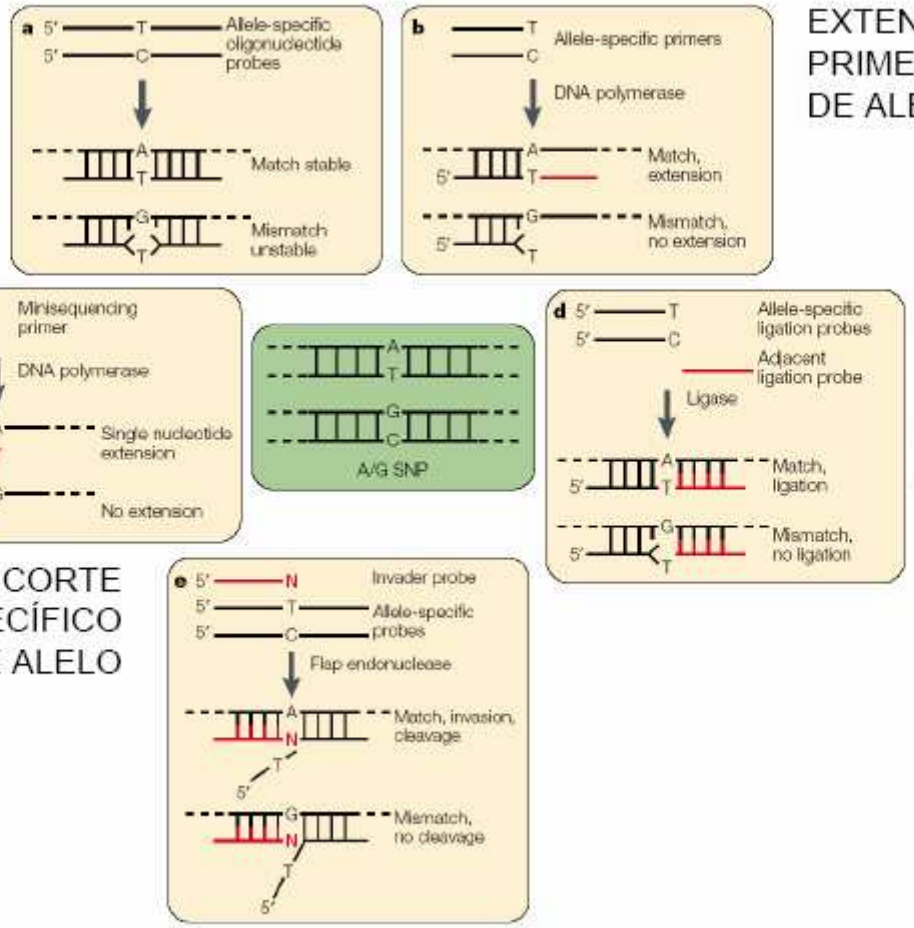
HIBRIDACIÓN ESPECÍFICA DE ALELO (ASO)

EXTENSIÓN DEL PRIMER ESPECÍFICA DE ALELO (ASE)

EXTENSIÓN DEL PRIMER CON UN NUCLEÓTIDO (SBE O MINI SECUENCIACIÓN)

LIGACIÓN DE OLIGOS ESPECÍFICA DE ALELO (OLA)

CORTE ESPECÍFICO DE ALELO



ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS Y MUTACIONES: TECNICAS DE ALTO RENDIMIENTO

ANÁLISIS DE SNPs:

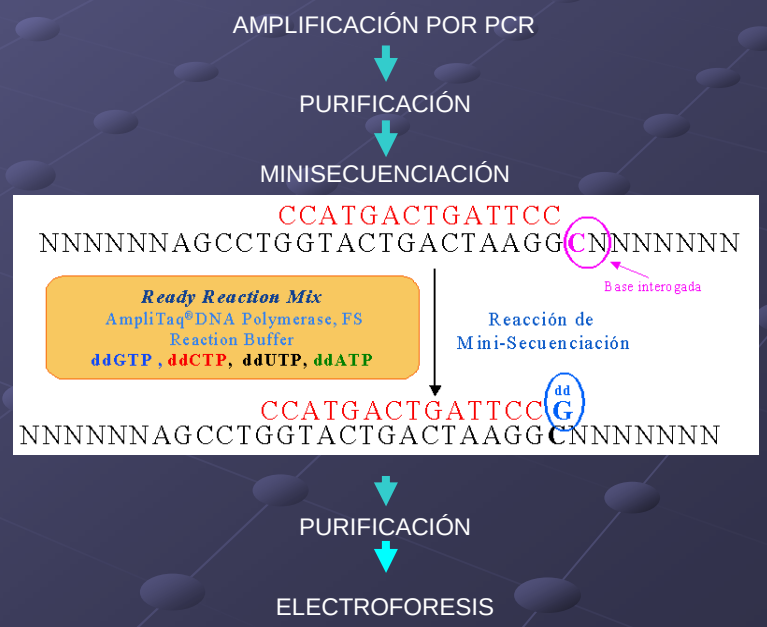
- **Minisecuenciación**
- **SNPlex (I/D de hasta 6 bp)**
- **Microchips (Illumina, Affimetrix).**

MINISECUENCIACIÓN:

Se basa en incorporación de ddNTPs en extremo 3 de un oligonucleótido que termina justo antes del polimorfismos o estudiar.

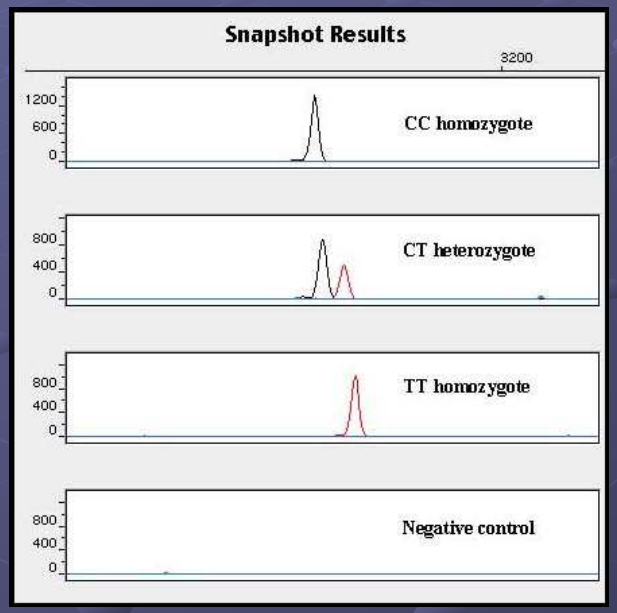
Permite analizar grupos de hasta 30 o más polimorfismos.

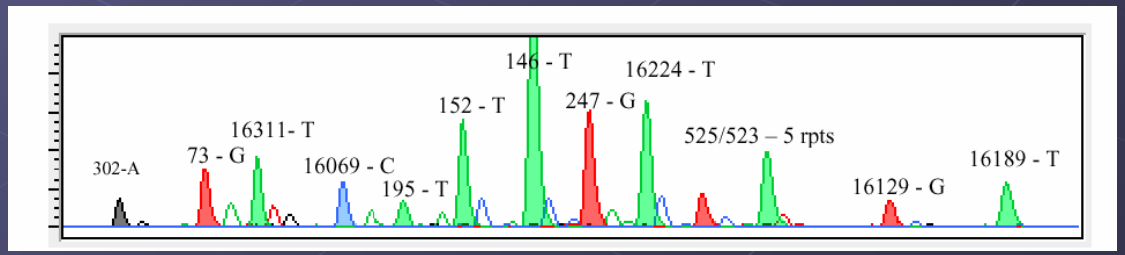
Obtención de hasta 15-20.000 datos de polimorfismos/día.



TÉCNICAS DE ALTO RENDIMIENTO PARA EL ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS

Minisecuenciación





TÉCNICAS DE ALTO RENDIMIENTO PARA EL ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS

ANÁLISIS DE SNPs:

- Minisecuenciación
- SNPlex

SNPlex.

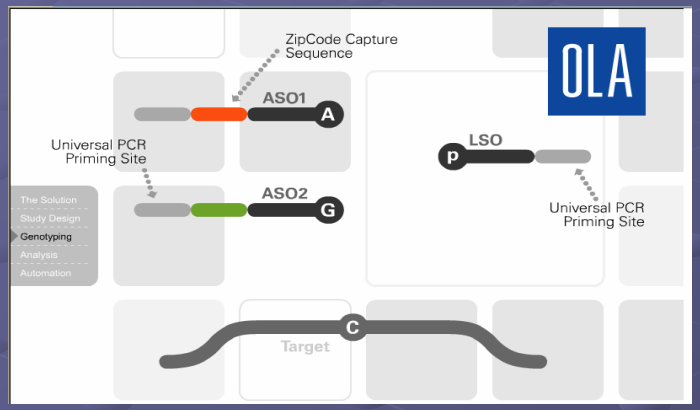
Se basan en la ligación de dos sondas en función del alelo presente en un polimorfismo.

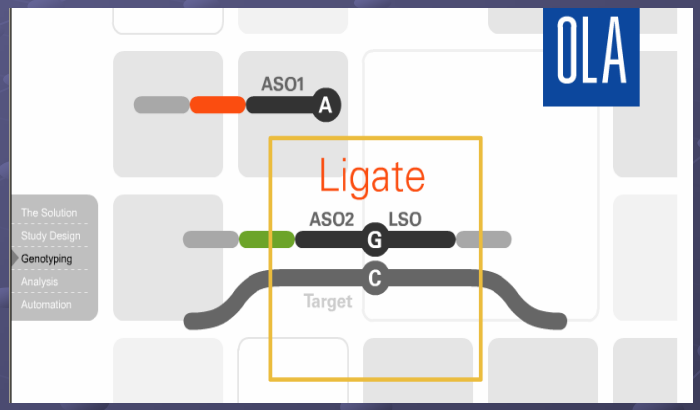
Análisis de hasta 48 polimorfismos (SNPs e I/D pequeñas) simultáneamente en 1 muestra.

Posibilidad de obtener hasta 150.000-250.000 datos de polimorfismos/día.

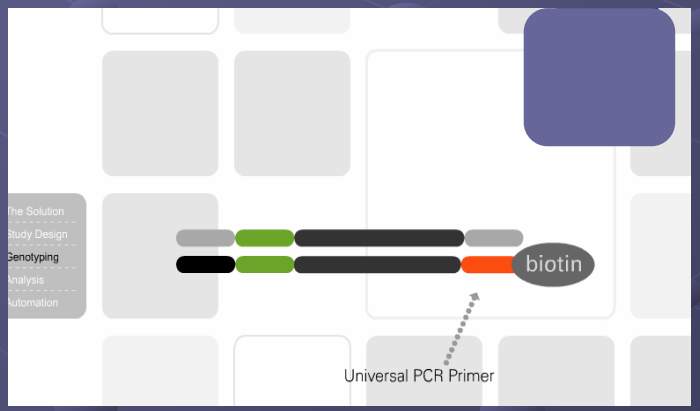
TÉCNICAS DE ALTO RENDIMIENTO PARA EL ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS

SNPLEX

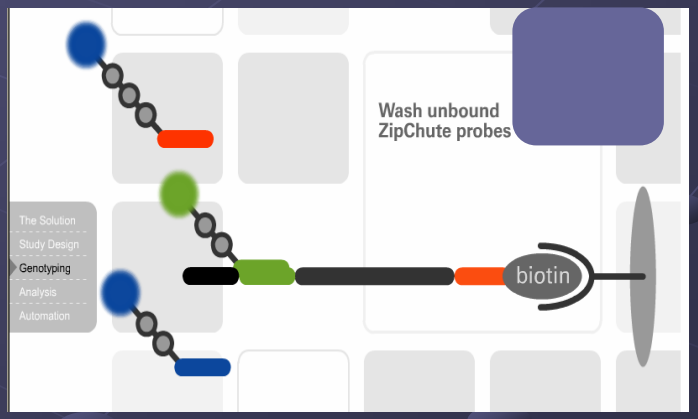




AMPLIFICACIÓN



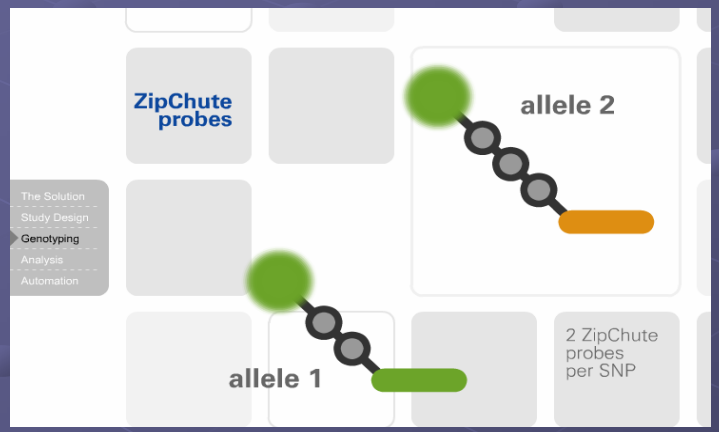
HIBRIDACIÓN



TÉCNICAS DE ALTO RENDIMIENTO PARA EL ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS

SNPLEX

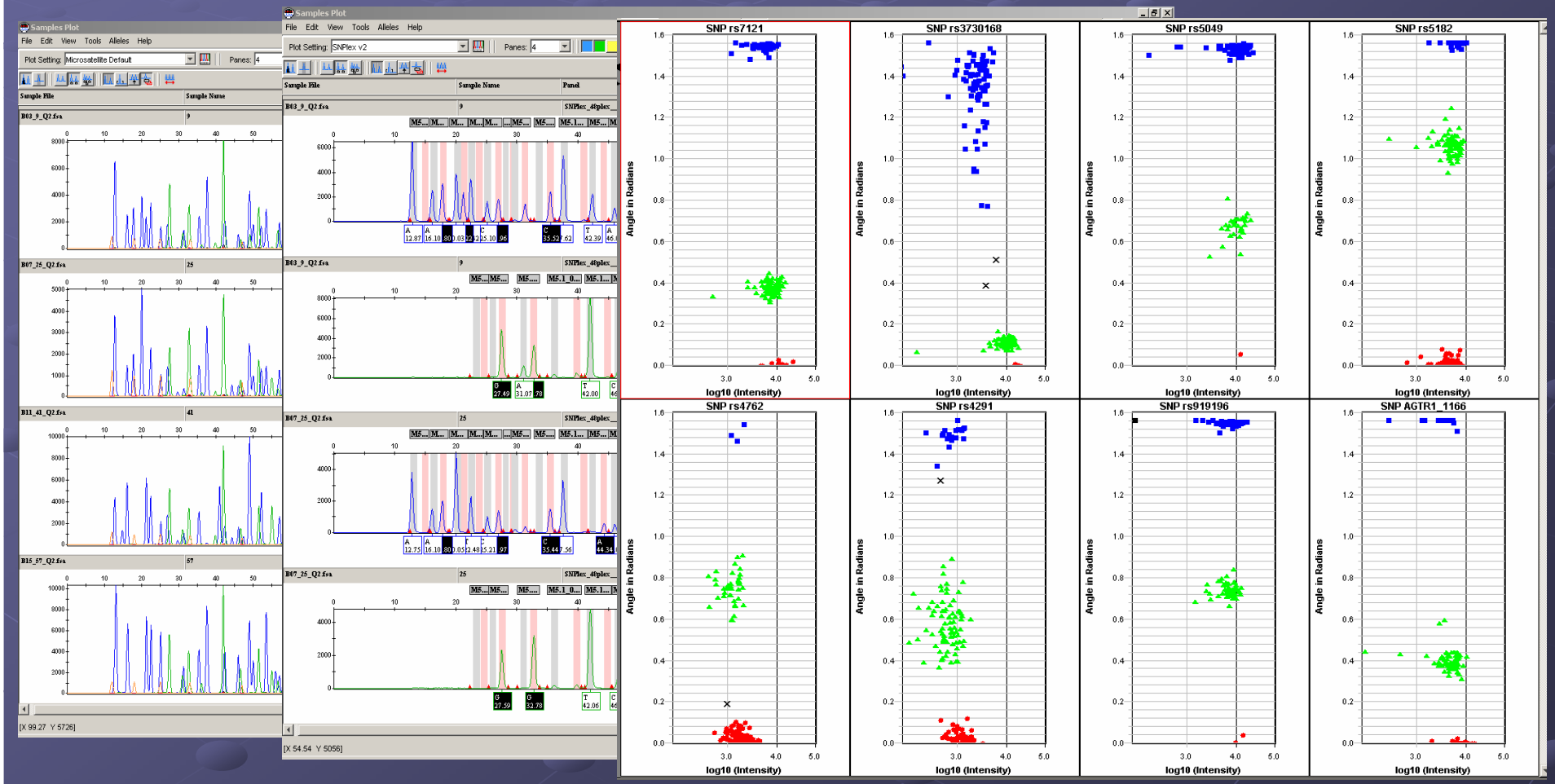
PURIFICACIÓN



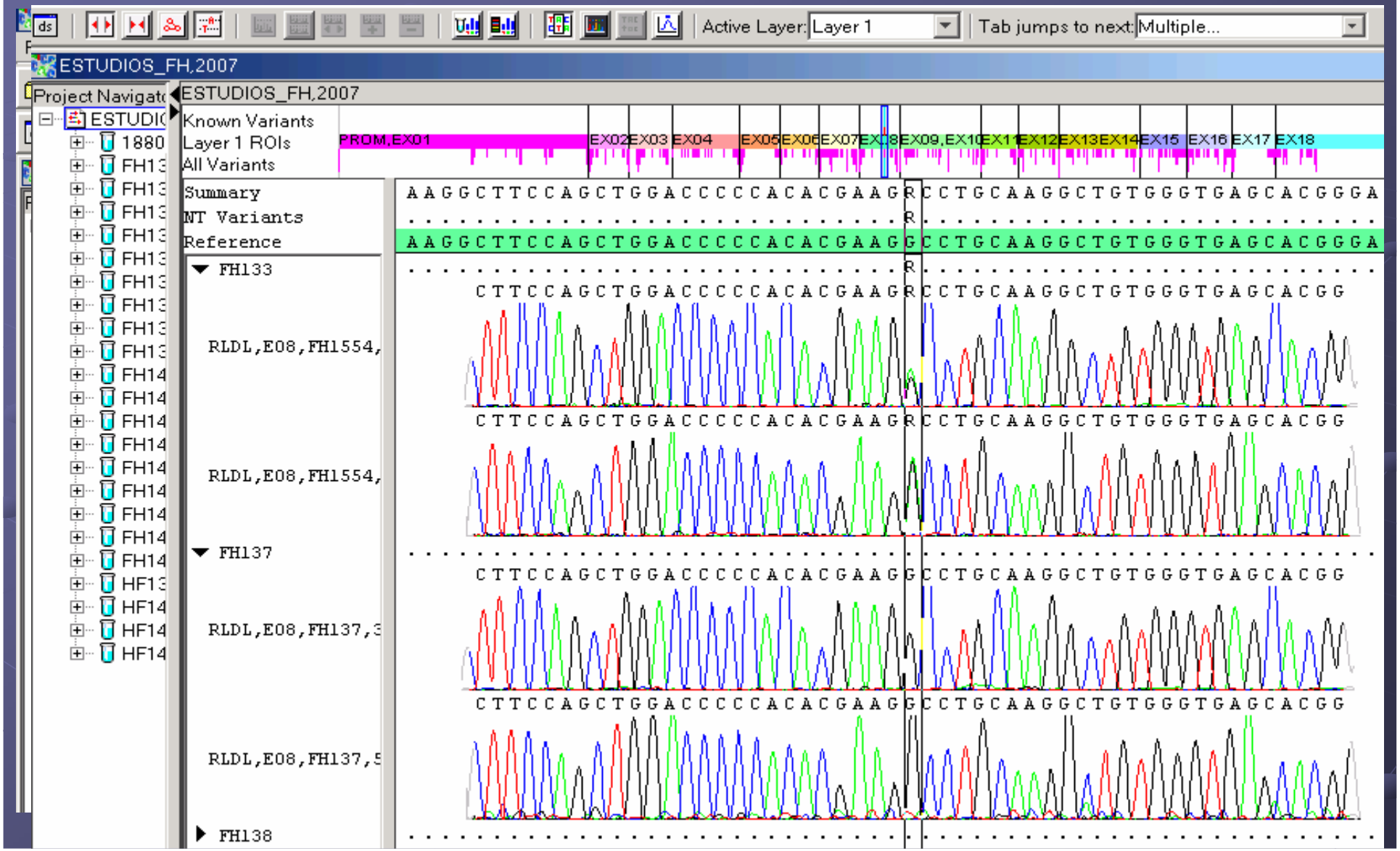
ELECTROFORESIS

TÉCNICAS DE ALTO RENDIMIENTO PARA EL ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS

SNPLEX



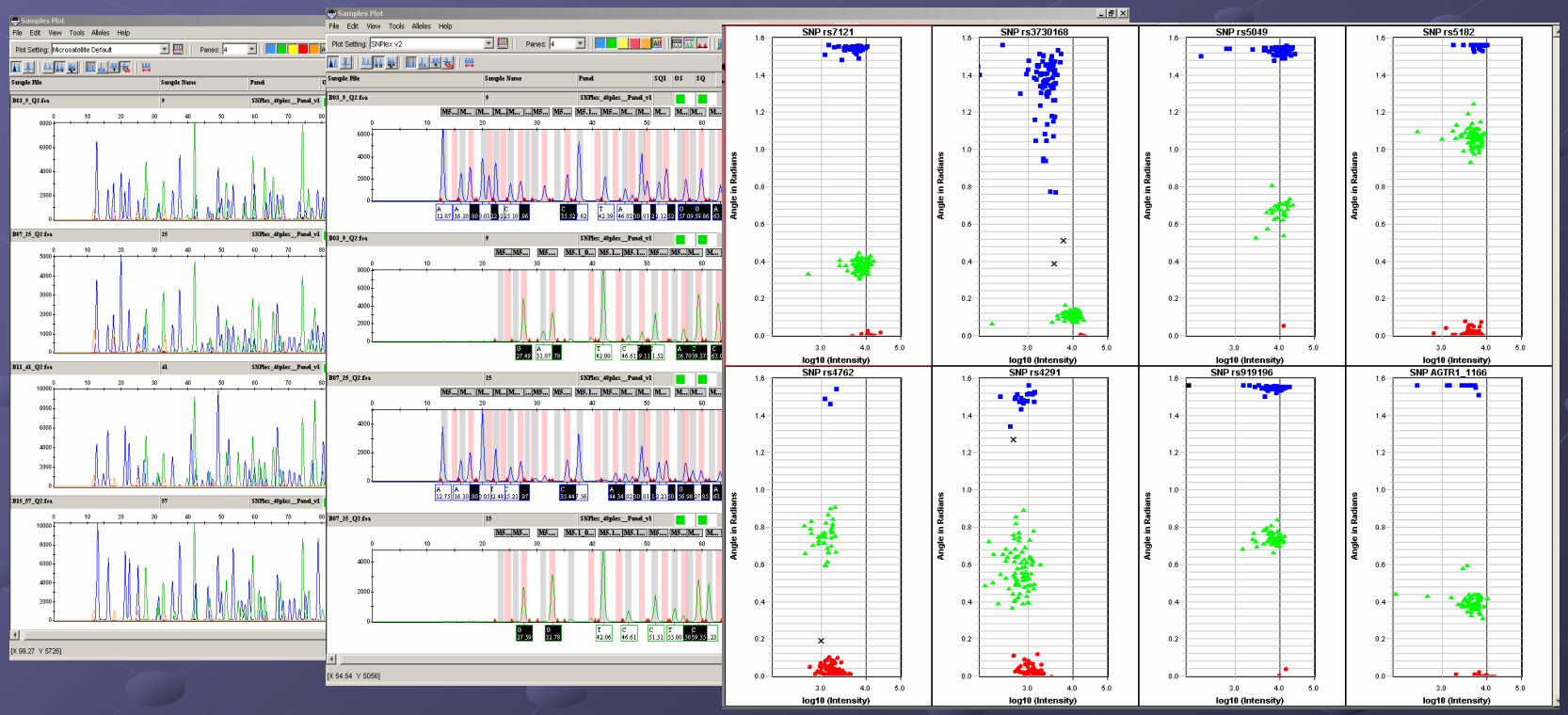
CAPACIDAD DEL LABORATORIO DE ESTUDIOS GENÉTICOS



CAPACIDAD DEL LABORATORIO DE ESTUDIOS GENÉTICOS

DETECCIÓN DE POLIMORFISMOS Y MUTACIONES PUNTUALES

100-150.000 datos/día.



TÉCNICAS CONVENCIONALES

- Secuenciadores
  - a) Secuenciación.
  - b) Análisis de fragmentos (tamaño o semicuantitativo)
    - I/D (pequeñas), STRs y VNTRs
    - I/D (grandes alteraciones)

- Termocicladores cuantitativos a tiempo real
  - a) Cuantificación de la expresión
  - b) Cuantificación del número de copias (I/D)
  - c) Identificación de mutaciones

-

TÉCNICAS BASADAS EN TERMOCICLADORES CUANTITATIVOS A TIEMPO REAL

Principales características:

Basados en la detección de fluorescencia en cada ciclo de amplificación.
Analizan hasta 384 muestras simultáneamente.

Aplicaciones:

Cuantificación de ADN:

- **Identificación de la presencia de mutaciones de I/D.**
- **Presencia de ADN de patógenos.**

Cuantificación de ARN:

- **Determinación de la presencia de patógenos (virus de ARN o expresión** de genes) y su cuantificación.
- Niveles de ARNm: variaciones de la expresión génica en función de una variación.

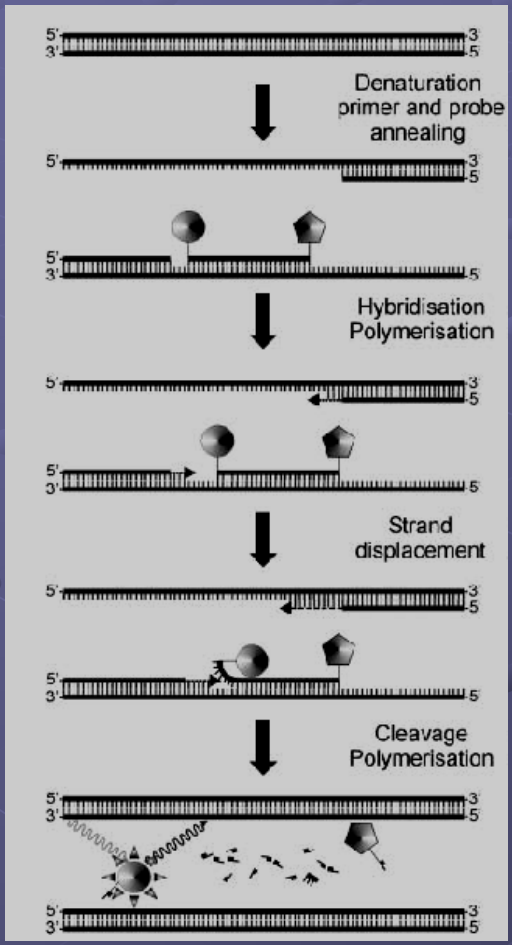
Detección de mutaciones o polimorfismos

Limitaciones:

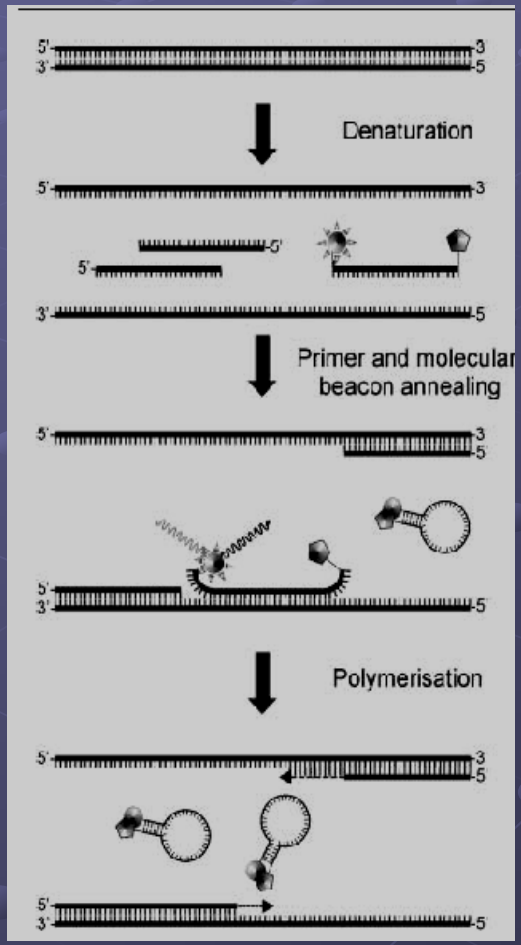
Necesidad de conocer la secuencia.
Solo permiten detectar una o unas pocas mutaciones por reacción.
Análisis de enfermedades causadas por una o unas pocas mutaciones.
Normalización (cuantifiación de expresión o ARNm).

ESTUDIOS MEDIANTE EL USO DE SONDAS CON SISTEMAS DE PCR CUANTITATIVA

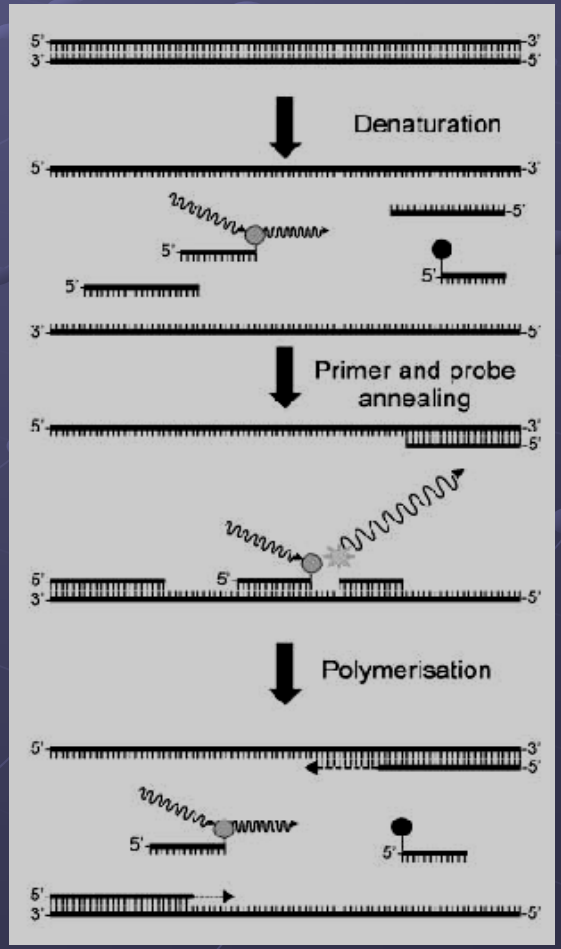
SONDAS TAQMAN



MOLECULAR BEACONS

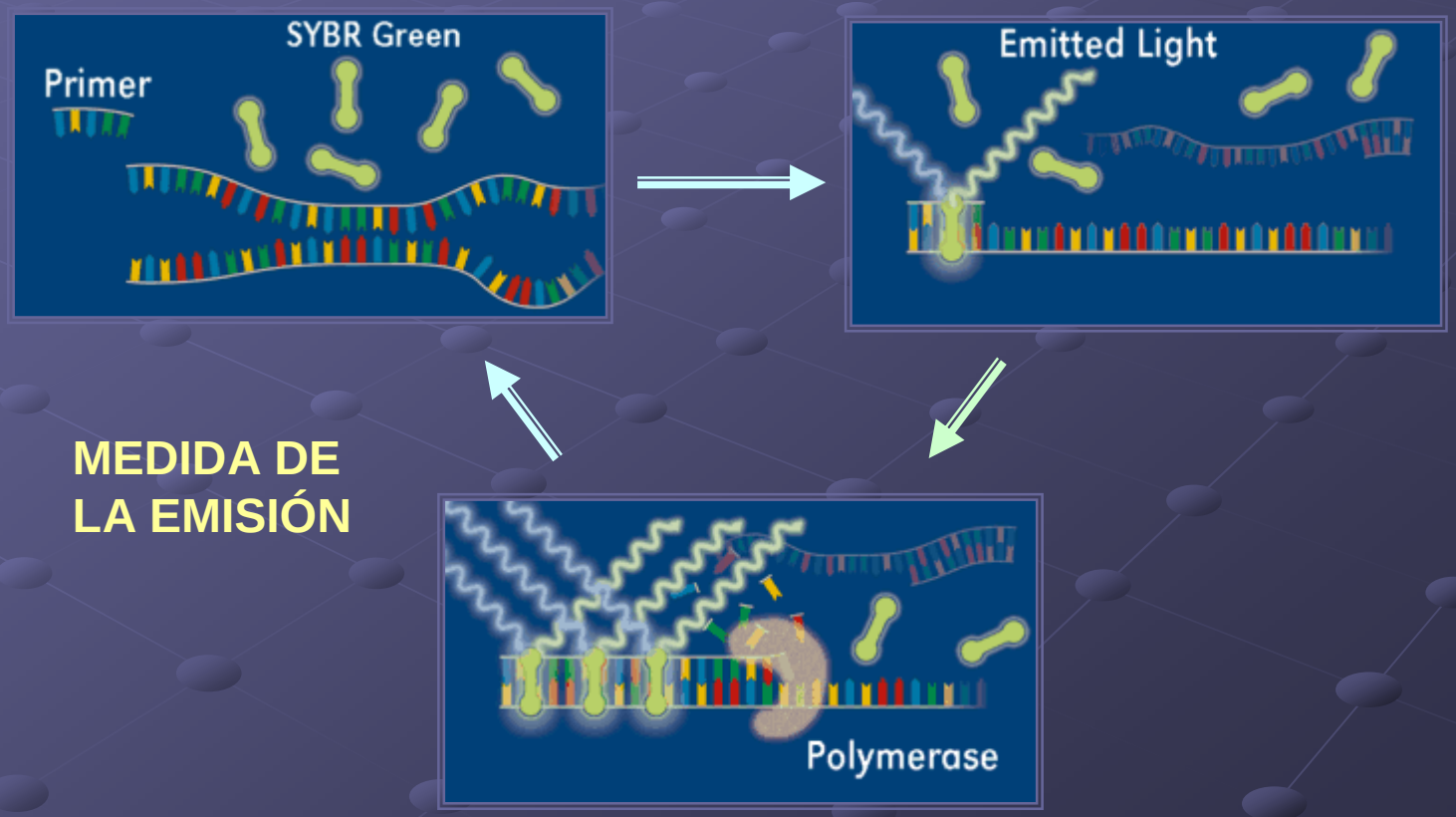


NESTED PROBES



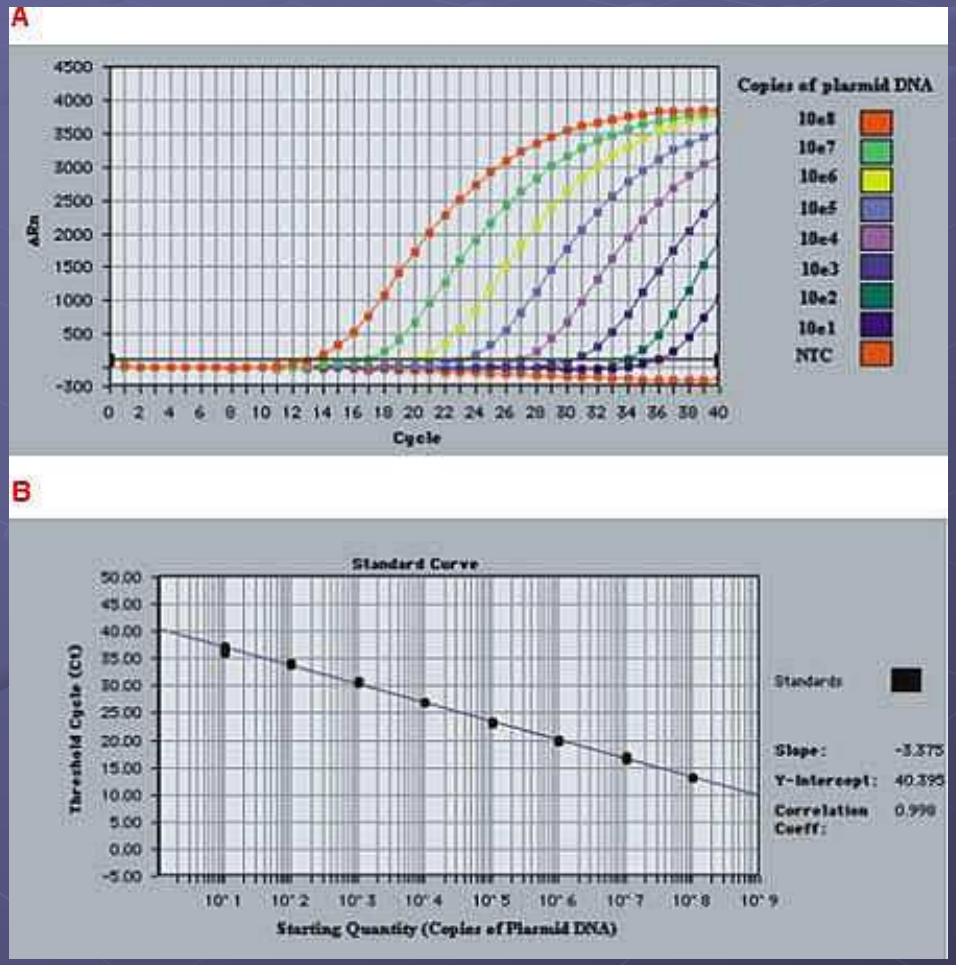
SISTEMAS DE DETECCIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN: SYBR-Green

- SyBRGreen: medida del DNA de doble cadena al final de cada ciclo.
- Curvas de disociación al final de la reacción (son necesarias para ver la amplificación específica del fragmento de interés).

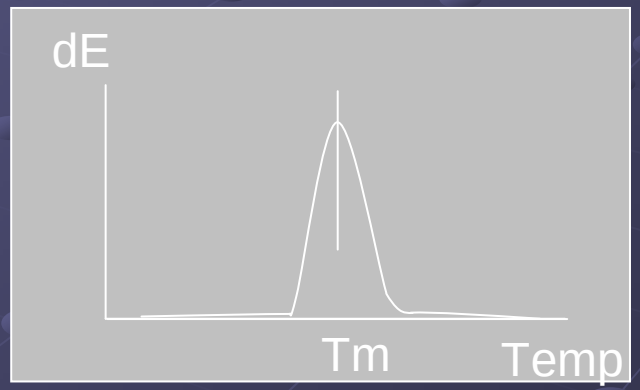


MEDIDA DE LA EMISIÓN

RESULTADOS



Curva de disociación



CAPACIDAD DEL LABORATORIO DE ESTUDIOS GENÉTICOS

GeneAmp® PCR System **9700**

Estudio de mutaciones:

5.000 datos/día de SNPs / mutaciones puntuales

- **Estudio de los niveles de ARNm o ADN.**

-2500 análisis día.

NUEVOS SISTEMAS

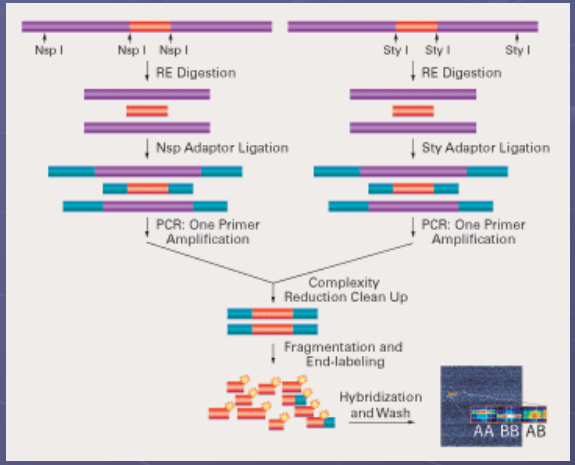
- MICROCHIPS: Amplio uso en investigación; pendiente en diagnóstico

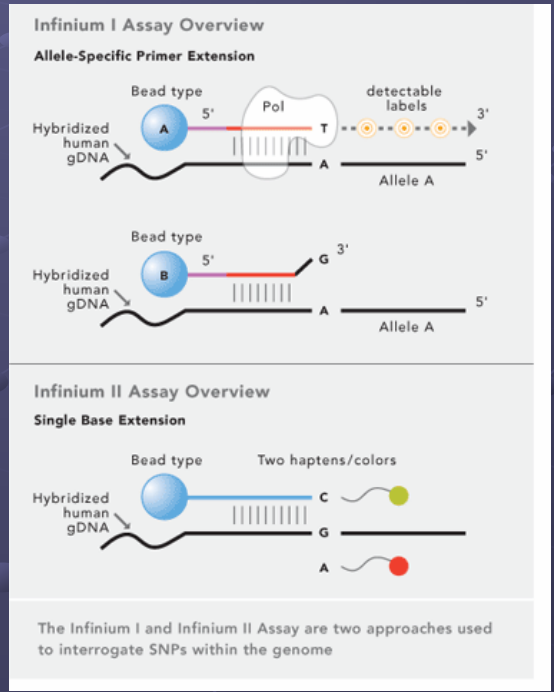
  a) detección de mutaciones
  b) expresión
  c) metilación

- SISTEMAS DE SECUENCIACIÓN MASIVA

MICROCHIPS
DETECCIÓN DE MUTACIONES

Existen varios sistemas según su producción, aplicación y tecnología que utilizan. Básicamente para detectar las mutaciones se usan dos técnicas, la hibridación de sondas y la minisecuenciación.

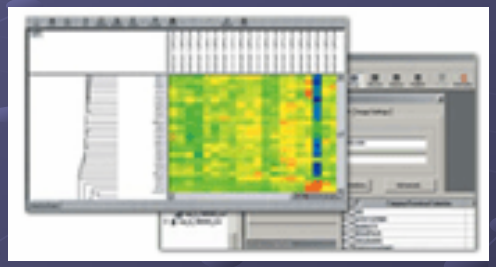


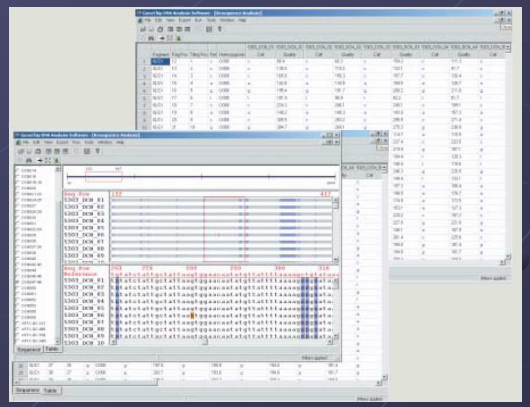


Posibilidad de trabajar con unos cientos a millones de sondas.

TÉCNICAS DE ALTO RENDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE MUTACIONES

CHIPS DE RESECUENCIACIÓN





Principales características:

Basado en hibridación de sondas o minisecuenciación.
Analizan unas 300.000 bp en cada chip (2-5 Mb/día).
Fidelidad del 99.9 %.

Aplicaciones:

Identificación de mutaciones en genes conocidos.
Identificación de microorganismos en mezclas y clasificación en subtipos.

Limitaciones:

Aplicación a secuencias conocidas.
Diseño previo de las secuencias que se quieren analizar.
Identificación de alteraciones de más de una base.

MICROCHIPS
DETECCIÓN DE MUTACIONES

Diseñados específicamente para el estudio de una enfermedad:

- Detección específica de mutaciones o polimorfismos conocidos (diagnostico, pronostico, respuesta al tratamiento, etc.).

- Resecuenciación: detectan todas las posibles mutaciones presentes en una secuencia (hasta 300 Kb).

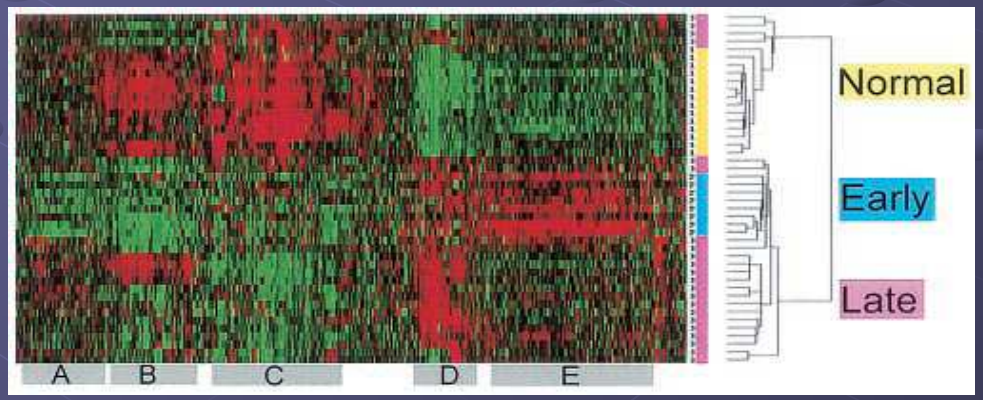
Su limitación puede estar en el precio, principalmente cuando se utilizan para detectar mutaciones conocidas:

Ej: Diagnóstico FH mediante Biochip (>600 €), mediante secuenciación y detección de grandes reordenamintos (270-300 €).

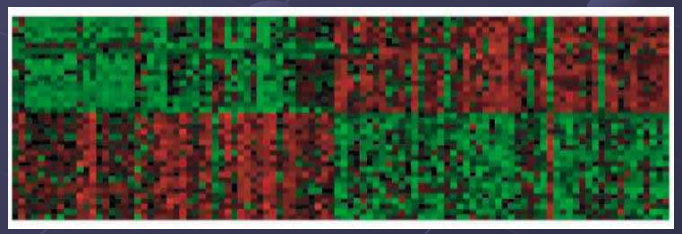
MICROCHIPS
CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE ARN

Permiten analizar los niveles de ARNm de todos los genes conocidos.

- **Diagnóstico de Cáncer:**
  - **Identificación de la presencia de ARN anómalo en sangre.**
  - **Diagnostico y clasificación de tumores (patrón de expresión de genes)**
  - **Respuesta al tratamiento y pronostico (patrón de expresión de genes)**

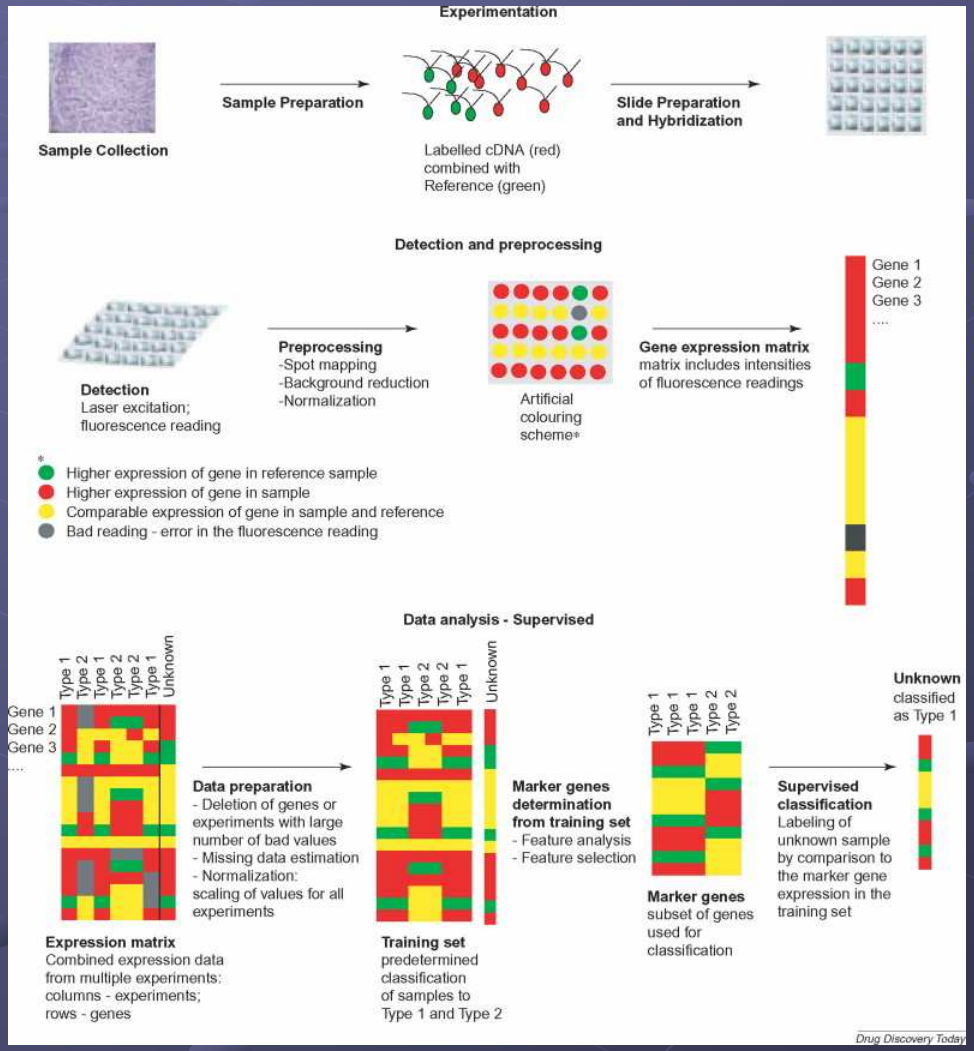


McGregor et al., 2002.



Cuperlovic-Culf et al., 2005.

MICROCHIPS
CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE ARN



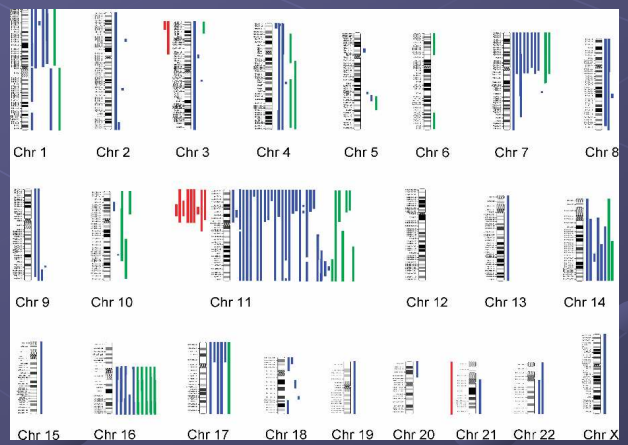
Cuperlovic-Culf et al., 2005.

MICROCHIPS
ESTUDIO DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS

Permiten analizar todo el genoma para determinar aqullas regiones que se han perdido o duplicado.

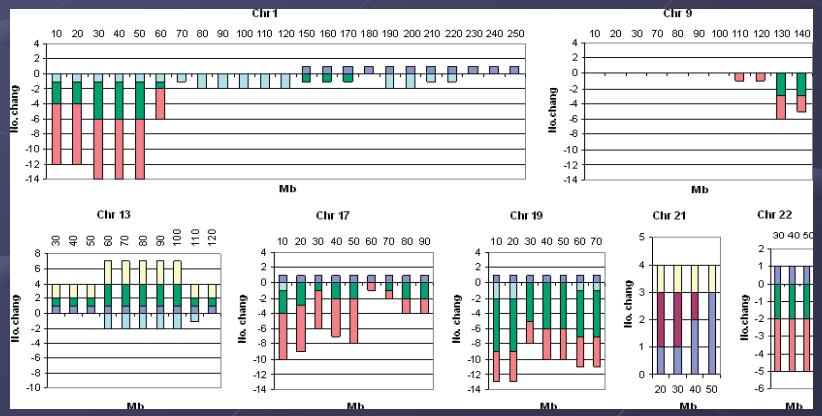
- **Diagnóstico de Cáncer:**
  - **Identificación de la presencia de ARN anómalo en sangre.**
  - **Diagnostico y clasificación de tumores (patrón de expresión de genes)**
  - **Respuesta al tratamiento y pronostico (patrón de expresión de genes)**

LOH en tumores de Wilms



Yuan et al, 2005

AC en adenomas



Blue = gains in FAP adenomas, purple = gains in MAP adenomas, and yellow = gains in sporadic adenomas. Turquoise = deletions in FAP adenomas, green = deletions in MAP adenomas, red = deletions in sporadic adenomas

Jones et al, 2007

MICROCHIPS

DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS REGIONES METILADAS DEL ADN.

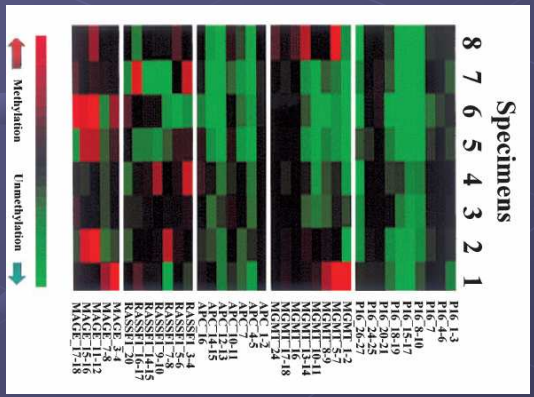
- Permiten analizar todos los promotores conocidos.

- Diagnóstico de Cáncer:

- Identificación de la presencia de ADN metilado en genes relacionados con el desarrollo del cáncer.

- Diagnostico y clasificación de tumores (patrón metilación)

- Respuesta al tratamiento y pronostico (patrón de metilación)



Kim et al, 2006

NUEVOS SISTEMAS

- MICROCHIPS

  a) detección de mutaciones
  b) expresión
  c) metilación

- SISTEMAS DE SECUENCIACIÓN MASIVA

SISTEMAS DE SECUENCIACIÓN MASIVA

Principales características:

Basados en secuenciación por clusters: pirosecuenciación o ligación.

Analizan unas 100 y 3.000 Mbp en cada reacción.

Fidelidad del 99.99 %.

Aplicaciones:

Secuenciación completa de genomas.

Secuenciación de novo

Resecuenciación (identificación de mutaciones, determinación de polimorfismos, reordenamientos, mutaciones somáticas en baja frecuencia, etc.) en numerosas muestras de forma simultanea.

Análisis del trascriptoma y mezclas de ADN o ARN (identificación de especies, análisis de ARNm, STS, regiones 5', etc.).

Epigenética (metilación del ADN y modificación de nucleosomas).

Regulación de la trascripción (pequeños ARNs y unión de factores de trascripción).

Secuenciación en paralelo de numerosas muestras.

Identificación de mutaciones presentes en baja proporción (<1%)

Limitaciones:

Precios equipamiento y reacción.

SISTEMAS DE SECUENCIACIÓN MASIVA

Unique combination of read length & reads per run ensure the broadest applications portfolio

***De Novo* Sequencing**
- Microorganisms (genome plasticity)
- Plants, Animals
- BACs, YACs, Fosmids, Viruses etc.

Resequencing
- Whole Genomes
- Disease associated regions
- Somatic mutations (cancer research via amplicon sequencing)
- Structural variations of the human genome

Transcriptome Analysis
- Expression profiling (e.g. SAGE-like, CAGE-like, GIS-PET)
- EST-sequencing
- Full length cDNA sequencing

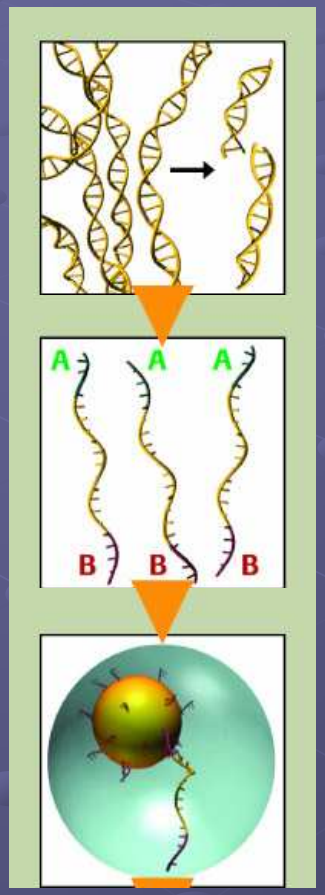
Gene Regulation Studies
- Identification of transcription factor binding sites (ChIP-Sequencing)
- Identification and quantification of sncRNAs sequences

Epigenetic Changes
- DNA-Methylation patterns

Metagenomes & Microbial Diversity
- Shotgun sequencing of the metagenome
- 16S amplicon sequencing

Ancient DNA
- Neanderthals, Mammoths and many more

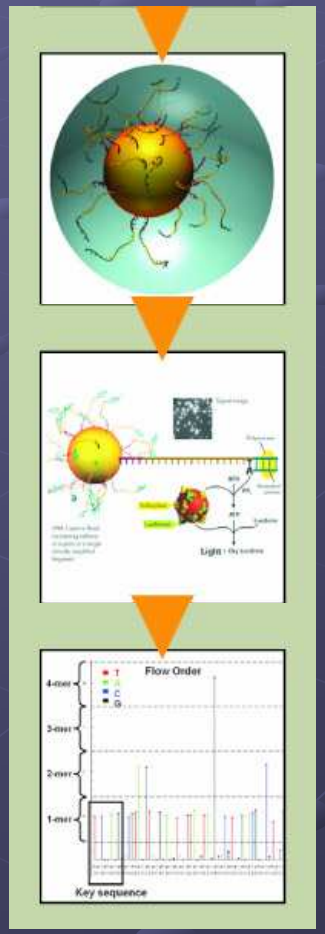
SISTEMAS DE SECUENCIACIÓN MASIVA
Sistema GFX (Roche)



Fragmentación de la muestra/muestras

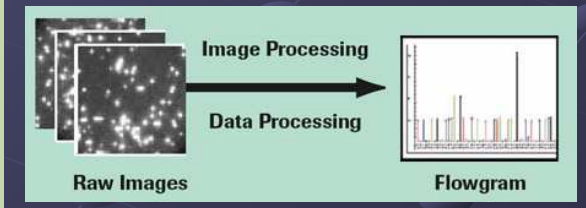
Preparación de la librería

Unión de 1 cadena de ADN/esfera



Amplificación

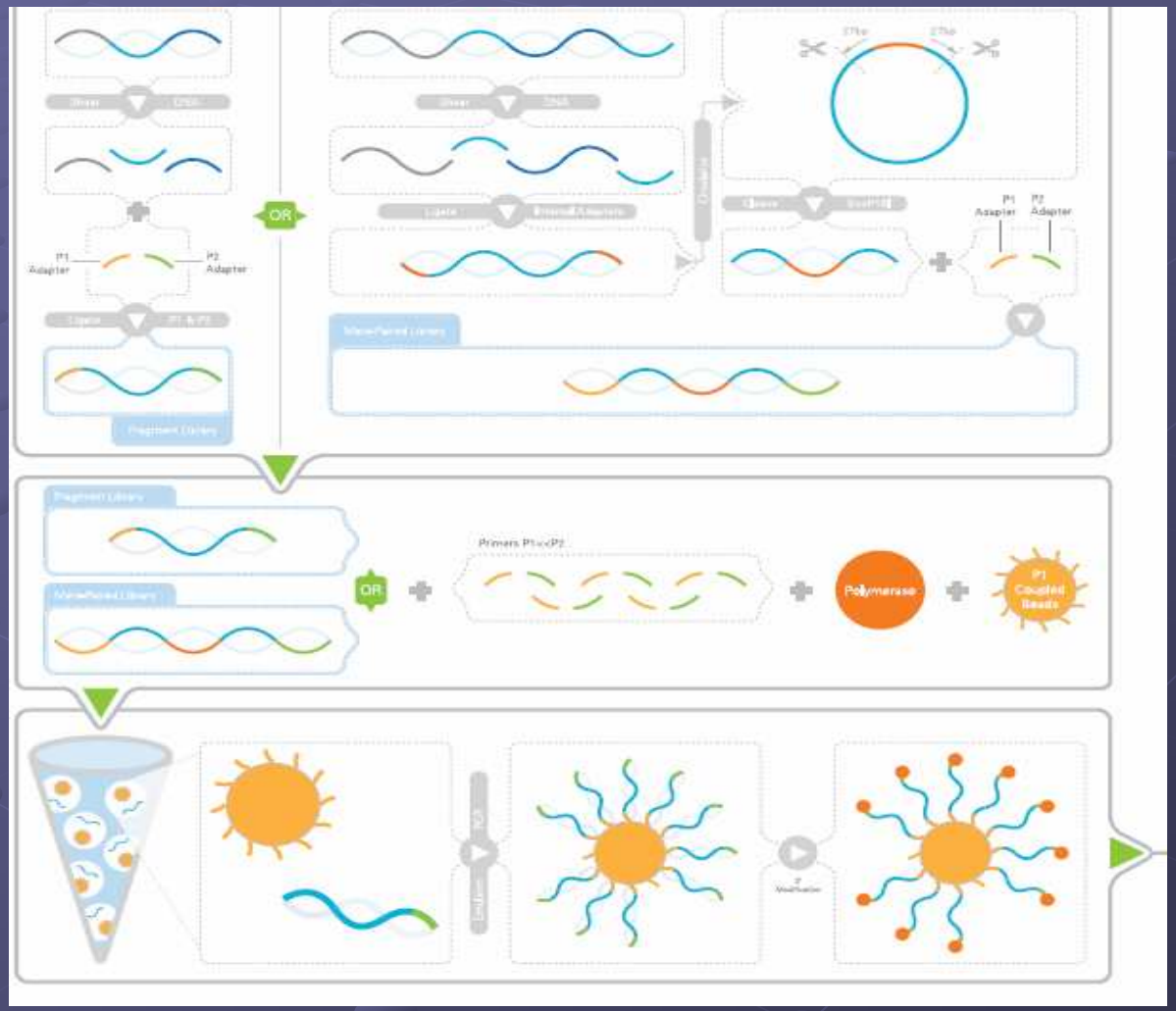
Secuenciación



Análisis de datos

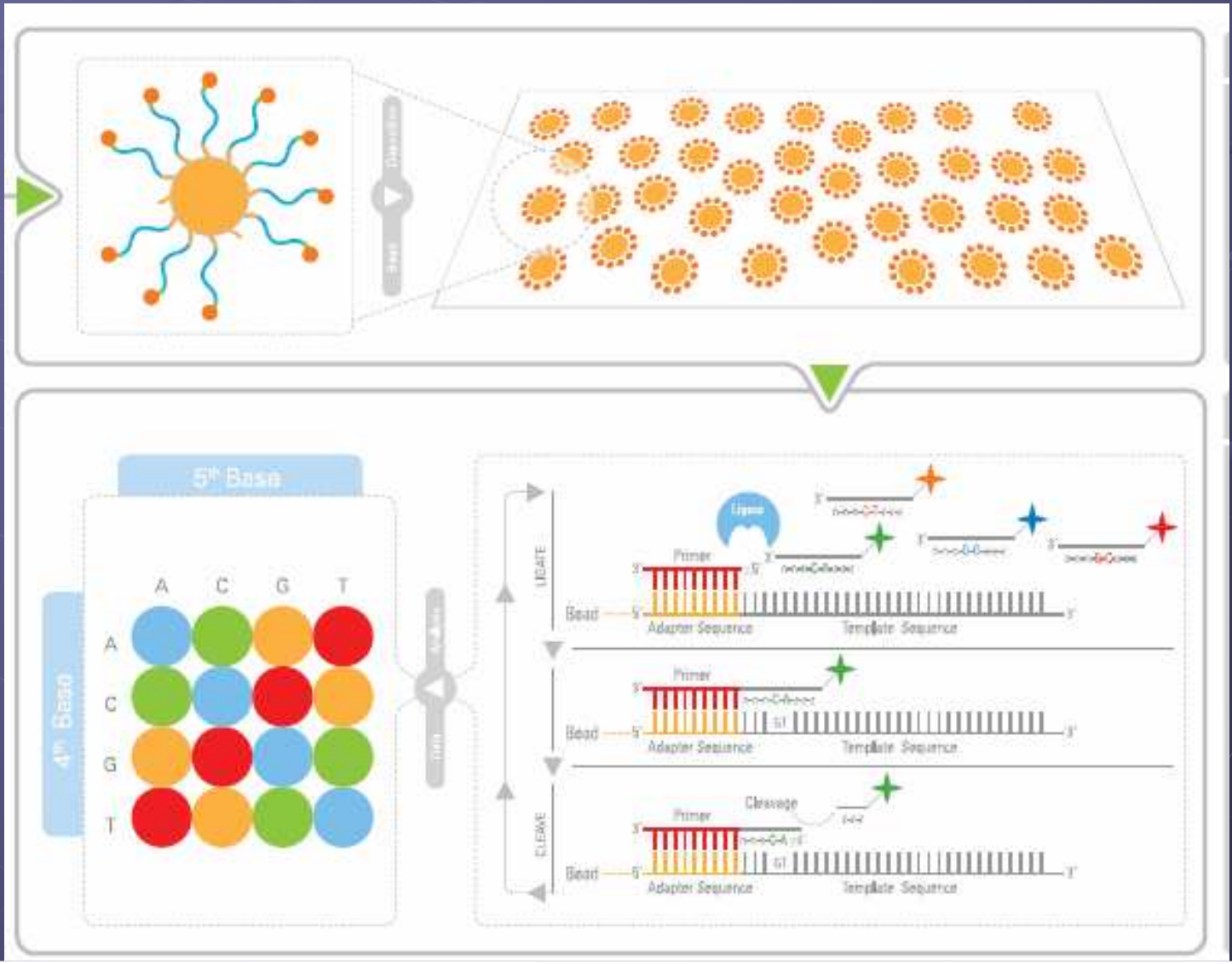
SISTEMAS DE SECUENCIACIÓN MASIVA

Solid (Applied Biosystems)



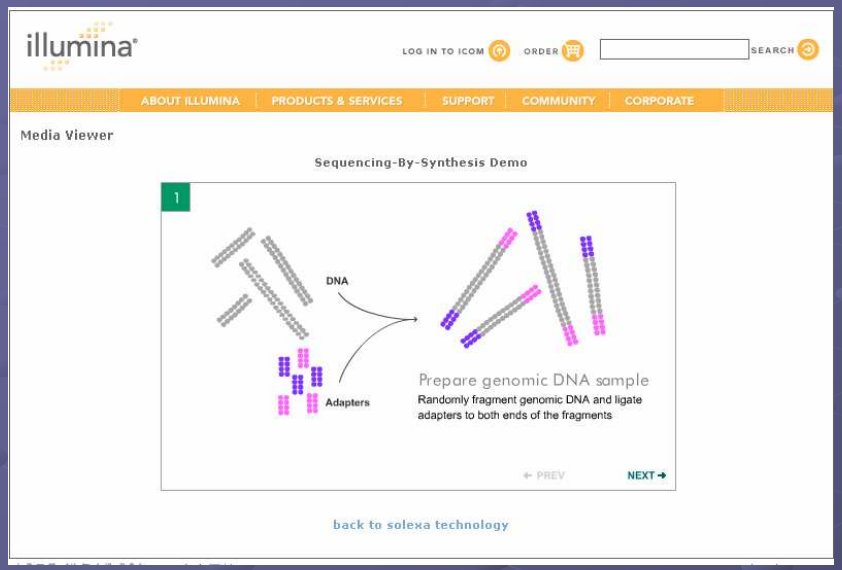
SISTEMAS DE SECUENCIACIÓN MASIVA

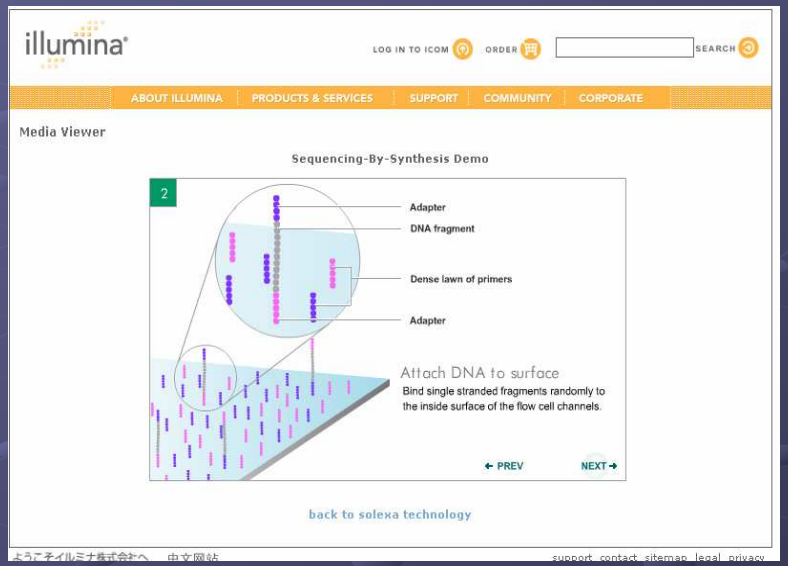
Solid (Applied Biosystems)

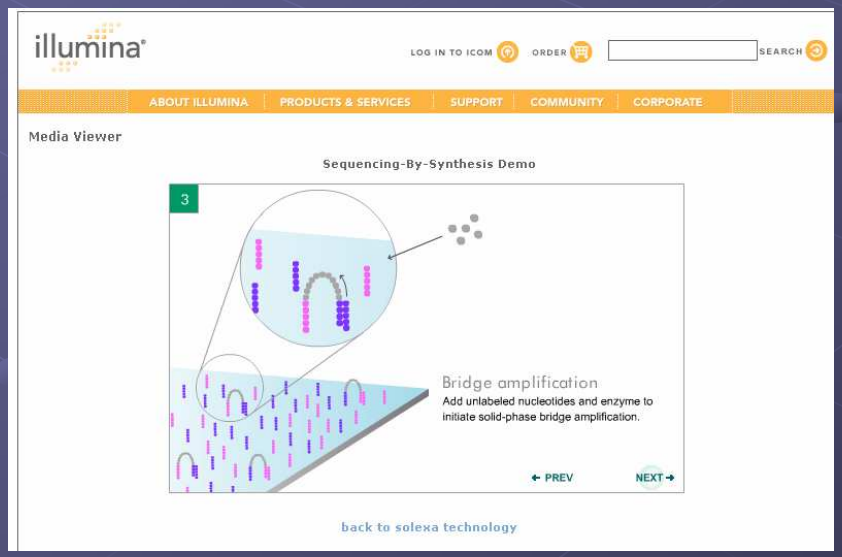


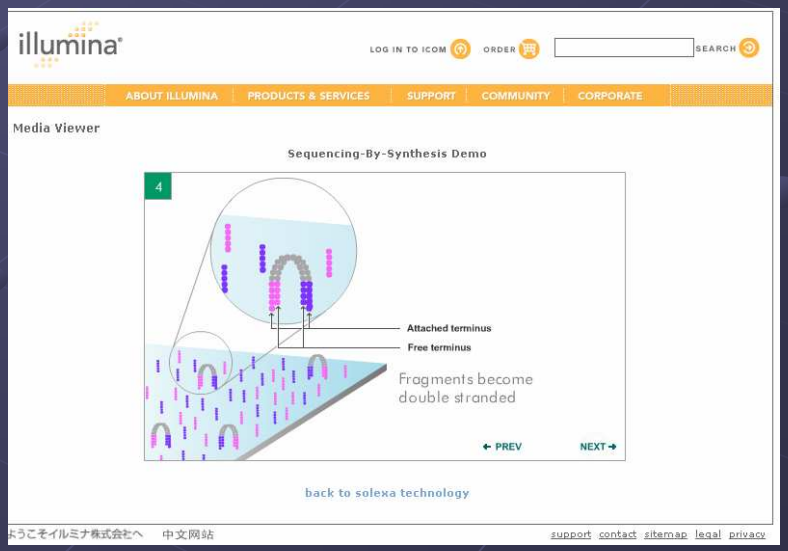
SISTEMAS DE SECUENCIACIÓN MASIVA

Solexa (Illumina)



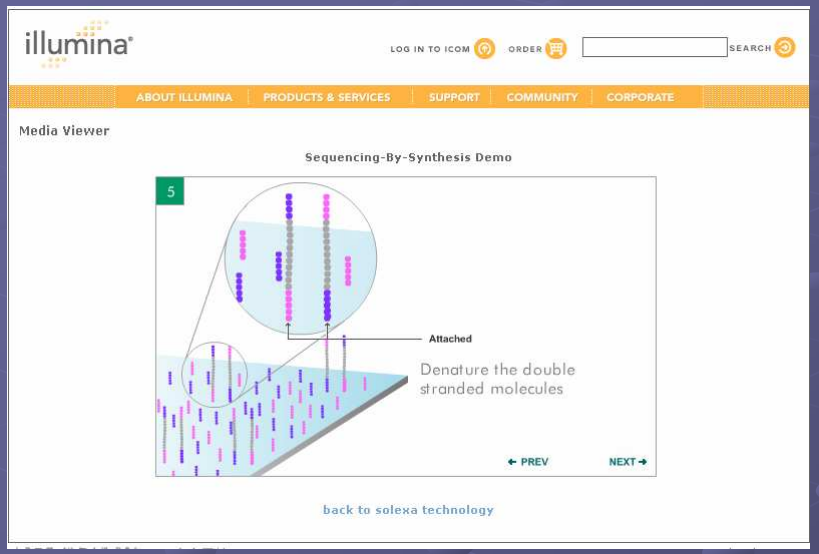


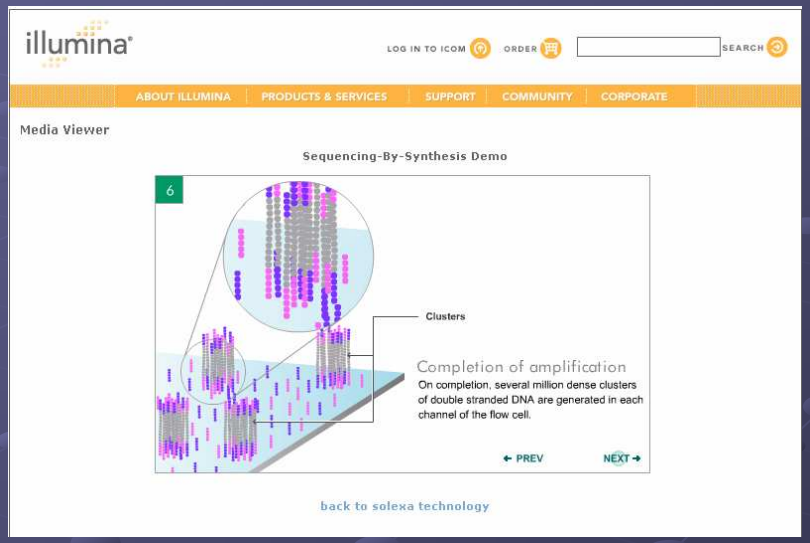


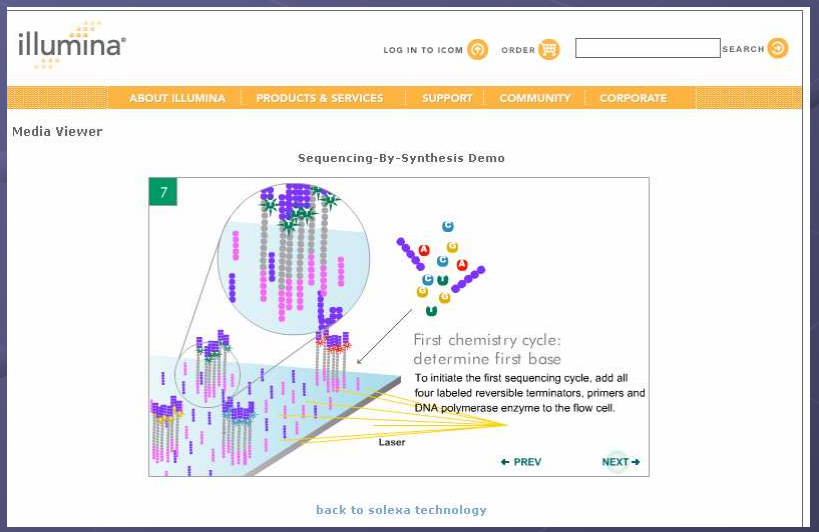


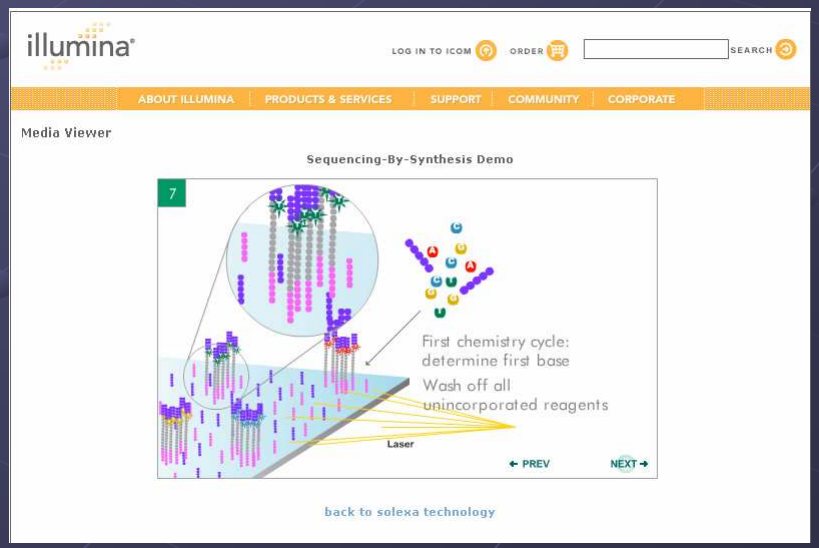
SISTEMAS DE SECUENCIACIÓN MASIVA

Solexa (Illumina)



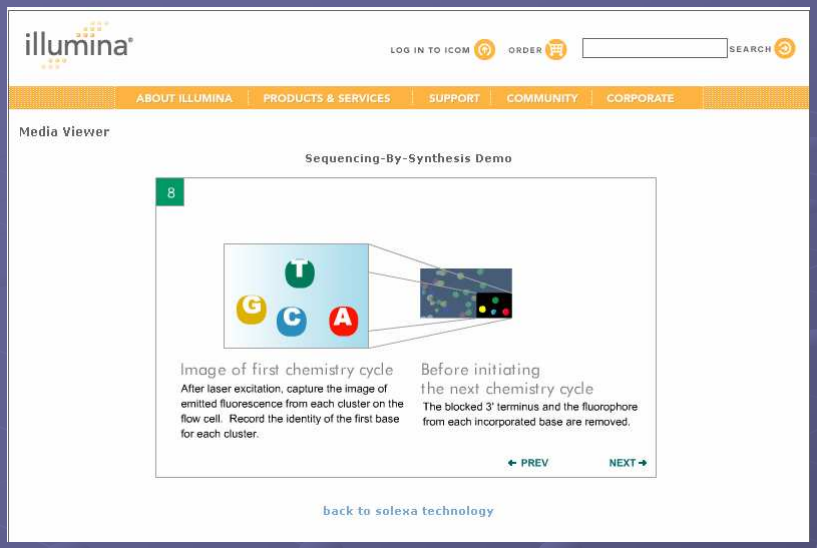


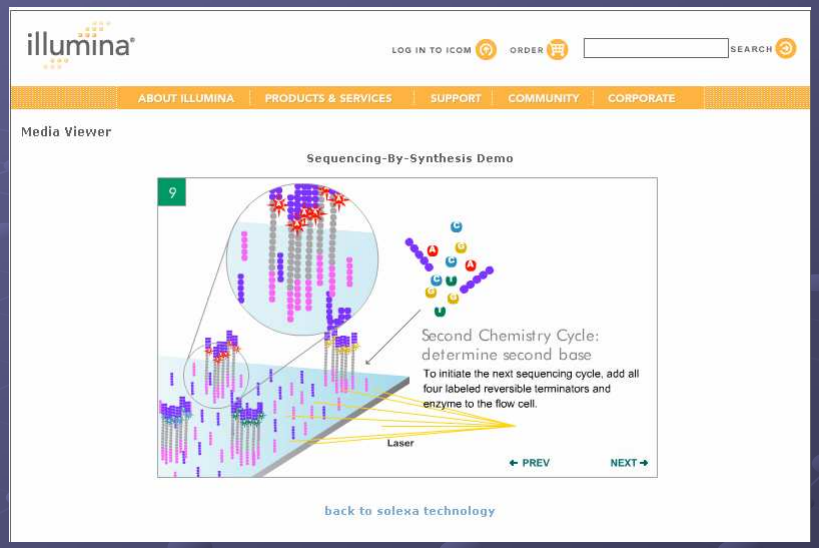


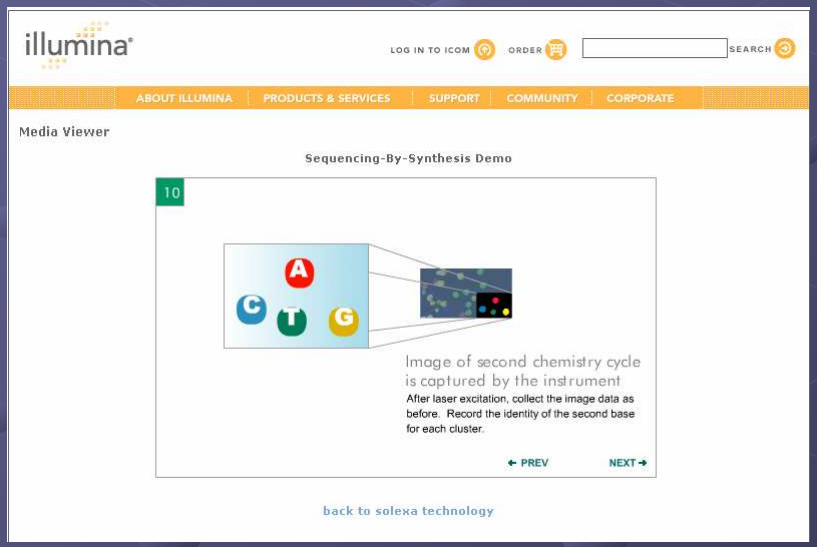


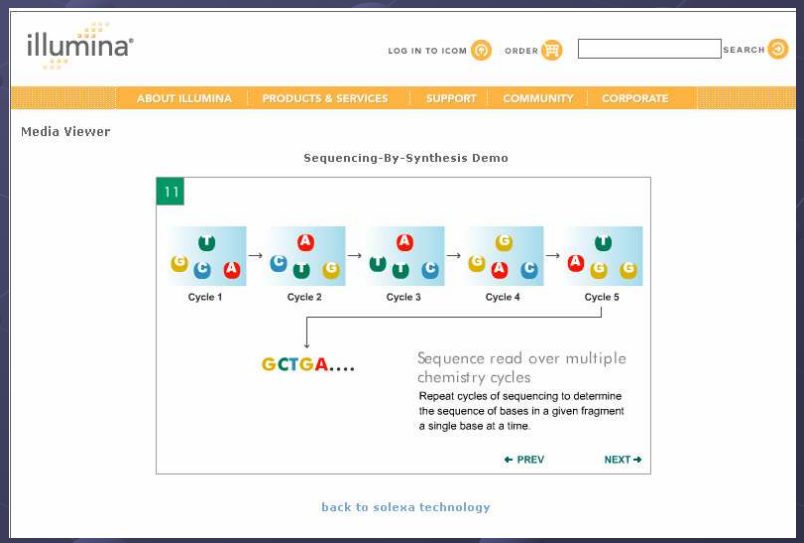
SISTEMAS DE SECUENCIACIÓN MASIVA

Solexa (Illumina)









CONCLUSIONES

- El genotipado de SNPs a gran escala es un área emergente: tecnología que responde/responderá a gran número de “preguntas”
- Numerosas tecnologías con ventajas y desventajas. El uso simultáneo de varias de ellas en un mismo laboratorio confieren a éste de una gran flexibilidad en el abordaje de estudios a media/gran escala.
- La tecnología del futuro:

  Evita un paso previo de PCR

  Podría basarse en el análisis de moléculas únicas (molecular haplotyping)

  La reducción en el coste y el aumento del *throughput* tendrá consecuencias importantes en investigación y diagnostico (medicina personalizada)

Laboratorio de Estudios Genéticos, Fundación para la Investigación del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

FJ CHAVES MARTINEZ

MARIA LUISA MANSEGO TALAVERA

CARMEN IVORRA IVORRA

MARIA JOSE FUENTES PARDILLA

VERONICA GONZALEZ ALBERT

REBECA HILARIO

SERGIO MARTINEZ HERVAS

ANA BARBARA GARCIA GARCIA

ROSARIO ABELLAN

SEBASTIAN BLESA LUJAN