



# ENCUENTRO ESTELAR

ENCUENTRO ESTELAR: DESCUBRIENDO EL  
MUNDO DE LA CIENCIA Y LA TECNOLOGÍA

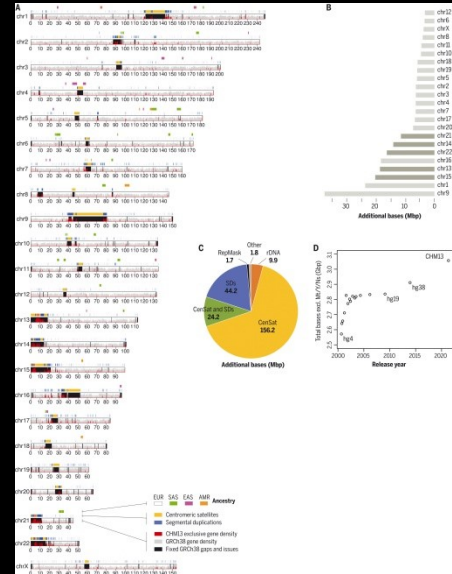
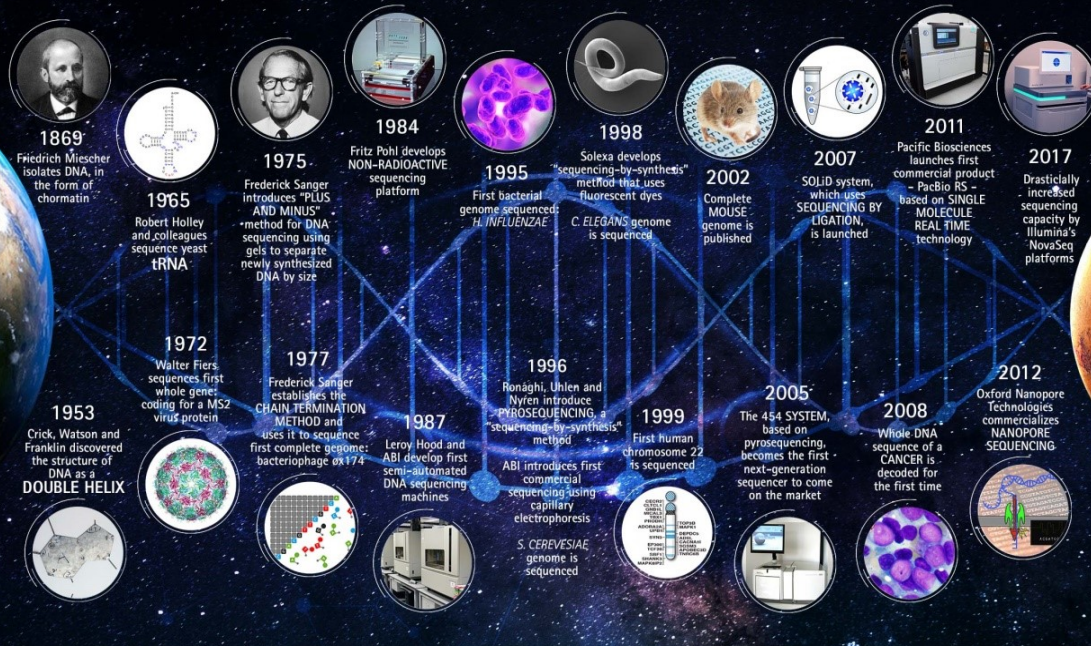
Belén de la Morena Barrio

# Guión de la sesión

- ❖ **Introducción.** Revolución tecnológica en genética humana
- ❖ **Secuenciación por nanoporos.** Grupo de investigación
- ❖ Estudio de **retrotransposones** mediante nanoporos
- ❖ **Simulación** de proceso de diagnóstico genético de un retrotransposon en una enfermedad rara.

# Introducción: Revolución genética

Researchers generate the first complete, gapless sequence of a human genome

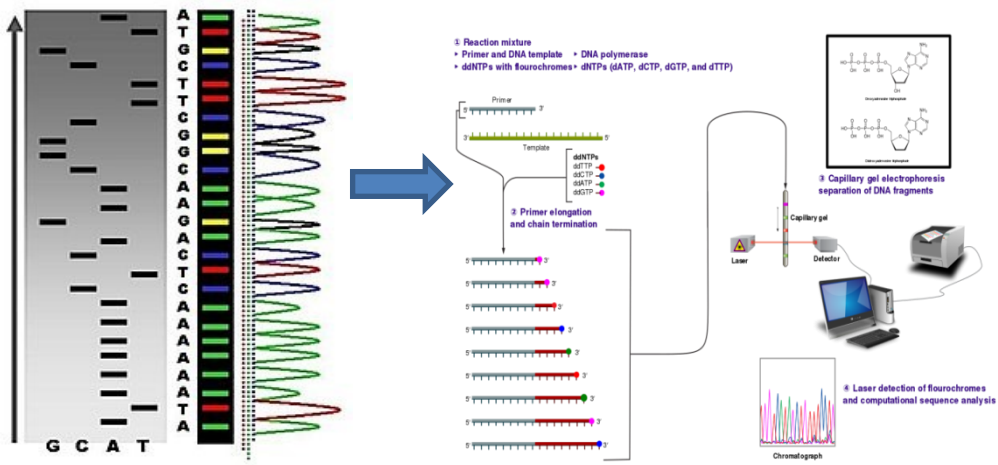


## Historia de la Técnicas de Análisis Genómico

- Desde 1980 Secuenciación Sanger
  - De elección
  - Ahora: 1 día 400 pb
  - 6 cnt/pb

### Punto de clave: Proyecto Genoma Humano

- Empezó en 1990 y acabó en 2003
- 20 universidades y centros de investigación de United States, United Kingdom, France, Germany, Japan and China: **International Human Genome Sequencing Consortium.**
- 3 billones de dolares
- Resultado: 92% del genoma secuenciado ~400 gaps



**WANTED**  
20 Volunteers  
to participate in the  
**Human Genome Project**  
a very large international scientific research effort.

The goal is to decode the human hereditary information (human blueprint) that determines all individual traits inherited from parents. The outcome of the project will have tremendous impact on future progress of medical science and lead to improved diagnosis and treatment of hereditary diseases.

Volunteers will receive information about the project from the Clinical Genetics Service at Roswell Park, and sign a consent form before participating.  
No personal information will be maintained or transferred.

Volunteers will provide a one-time donation of a small blood specimen. A small monetary reimbursement will be provided to the participants for their time and effort.

Individuals must be at least 18 years of age.  
Persons who have undergone chemotherapy are not eligible.

**ROSWELL PARK**  
CLINICAL GENETICS SERVICE

For more information please contact the  
Clinical Genetics Service  
843-5770 (9:00 am - 3:00 pm)  
March 24 - 26, 1997



# Curiosidad

The first printout of the human genome to be presented as a series of books, displayed at the Wellcome Collection, London



## REVOLUCIÓN TECNOLÓGICA

Sanger Un Gen

Masiva, cadenas cortas

Masiva, cadenas largas

año 1978

2020



Sanger Sequencing  
Maxam and Gilbert  
Sanger Chain-termination

- Infer nucleotide identity using dNTPs then visualize with electrophoresis
- 500-1000 bp fragments



454, Solexa,  
Ion Torrent  
Illumina

- High throughput from the parallelization of sequencing reactions
- ~50-500 bp fragments



PacBio  
Oxford Nanopore

- Sequence native DNA in real time with single-molecule resolution
- Tens of kb fragments, on average



Short-read sequencing



Long-read sequencing

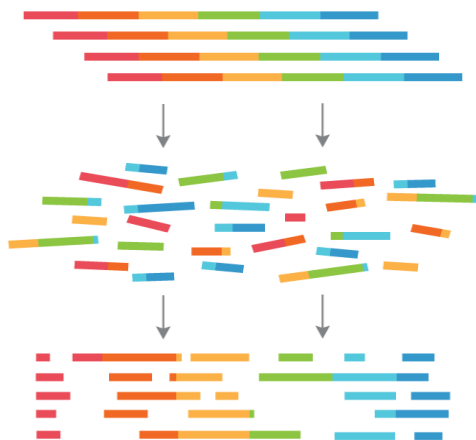
# REVOLUCIÓN TECNOLÓGICA

- **TECNOLOGÍA DE SEGUNDA GENERACIÓN**

- Tecnología Illumina
- Tecnología Ion Torrent



Miseq Illumina



ATGTTCCGATTAGGAACCTATCTGTAACGTGTTTCATTCAGTAAAGGAGGAAA

## Proceso



Fragmentación del ADN  
Amplificación

**Búsqueda de SNV**  
✓ “Fácil” detección  
✓ Necesidad de alta **profundidad**

<https://www.youtube.com/watch?v=CZeN-lgjYCo>

## Limitaciones de la NGS

- Gran equipamiento y coste
- Algunas mutaciones sin detectar (variantes más grandes, estructurales)

### ENFERMEDADES RARAS

#### Rare diseases: facts and figures

The UK defines a 'rare disease' as one that affects **1 in 2,000** or less of the population...



In total, that's about **3 million** people currently in the UK who will be affected by a rare disease



... so, collectively, rare disease will affect **1 in 17** of the population at some point in their life



**50%** of newly diagnosed cases of rare diseases are in children

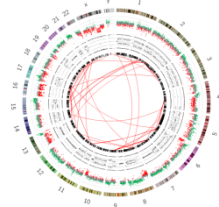
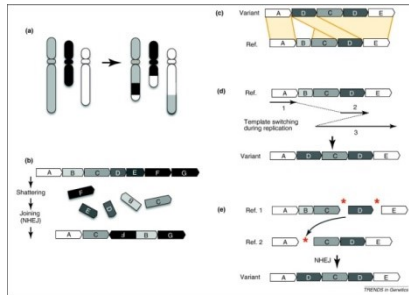


There are between **5,000** and **8,000** different rare diseases...

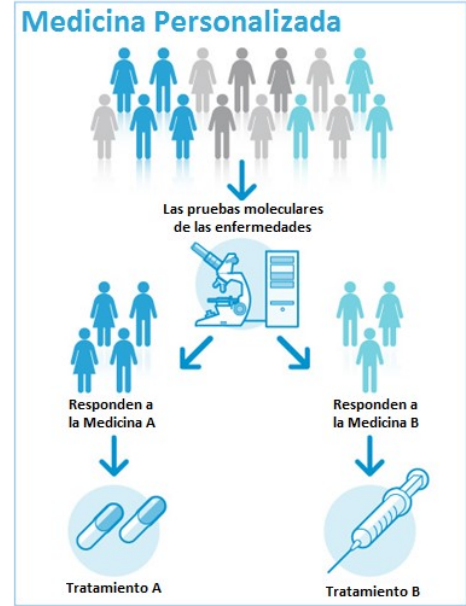
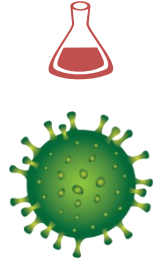
... and **80%** of them have a known **genetic origin**



### MECANISMOS GENÉTICOS NUEVOS



### PROBLEMAS BIOLÓGICOS MAS COMPLEJOS



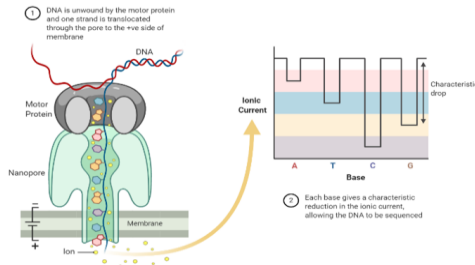


# Parecía invencible...



Llegan las nuevas generaciones

## Secuenciación de 4º Generación LECTURAS LARGAS EN TIEMPO REAL



- ADN/ARN sin manipular
- Secuenciación a través de nanoporo
- Diferencia de voltaje = basecalling

### Preparación de muestra

- ✓ 2ug de ADN de calidad
- 1. Reparación
- 2. Ligación de adaptadores
- 3. Carga en la flowcell

2 horas

Todo tipo de material genético  
(DNA, RNA, LR-PCR, PCR)

**Menor profundidad de lectura**  
**Tasa de error. Ahora 99,1% de precisión**  
**Nuevos reactivos y "flowcells"**

# Secuenciación por nanoporos

## Diferentes dispositivos



**10–20Gb en 48 h  
(5x Genoma)  
Coste genoma: 1000€  
Accesibilidad!!!  
Solo necesita un ordenador**

**5 minION  
a la vez**

**Equipo: 250.000€  
100Gb por flowcell en 72 h  
(48 flowcells)  
(30x Genoma)  
Coste genoma: 2000€**

**Promethion P2  
Equipo: 72.000€  
100Gb por flowcell en 72 h  
(2 flowcells)  
(30x Genoma)  
Coste genoma: 2000€**

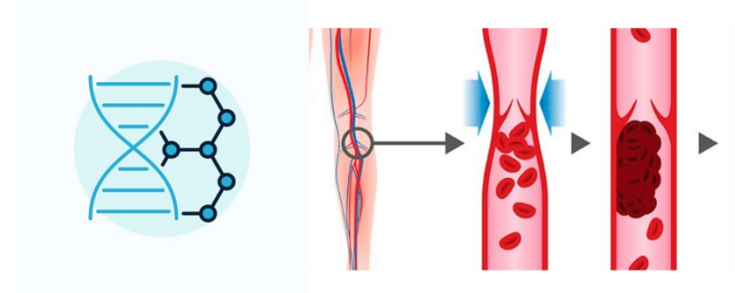
# Secuenciación por nanoporos



## DIAGNÓSTICO GENÉTICO ENFERMEDAD RARA DEFICIENCIA DE ANTITROMBINA

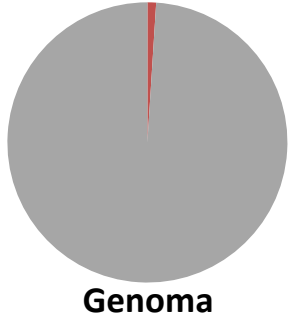


## TESIS DOCTORAL



# Retrotransposones

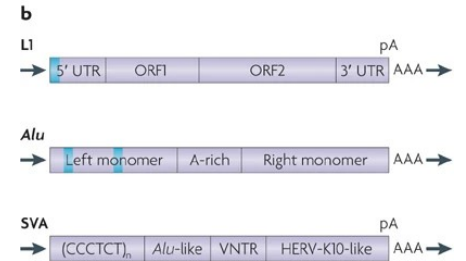
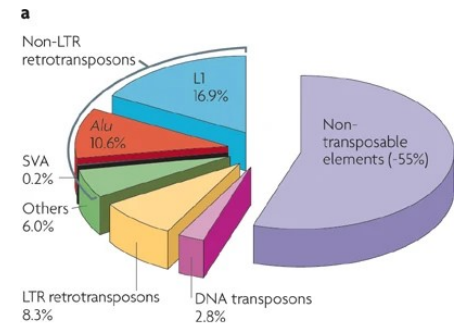
1% coding DNA



“jumping genes”

Secuencias repetitivas del genoma

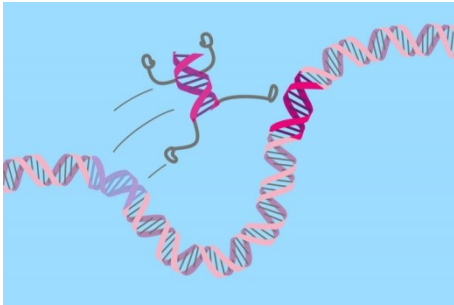
- Transposones no son activos (2,8%)
- Retrotransposones **activos (45%)**
  - mecanismo de “copy-and-paste”



Nature Reviews | Genetics

>500,000 L1 copies  
>1 million *Alu* copies  
~3,000 copies SVA

## ¿Basura?



# Papel de los retrotransposones

1) Evolución

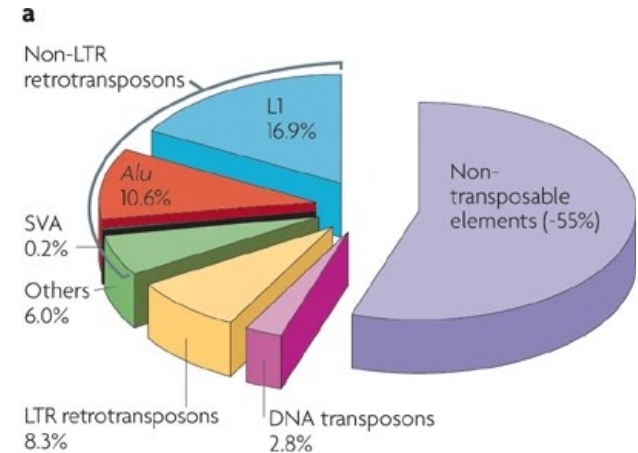
2) Enfermedad

## **L1, *Alu* y SVA non-LTR retrotransposons**

Activos en el genoma humano

60 casos de inserciones denovo implicadas en enfermedades

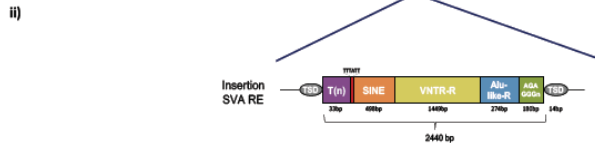
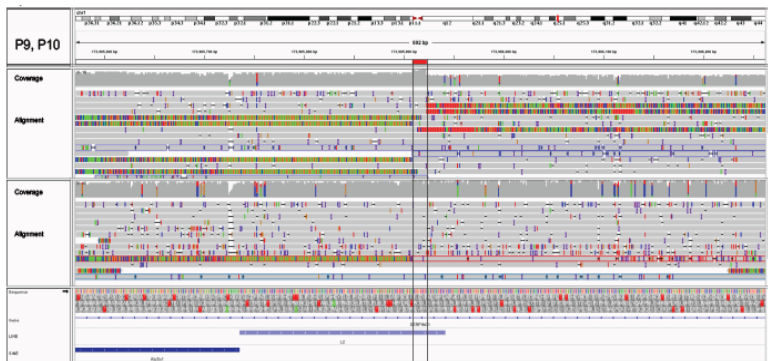
- Hemofilia A
- Neurofibromatosis
- Cancer
- Síndrome de Lynch



# Retrotransposones



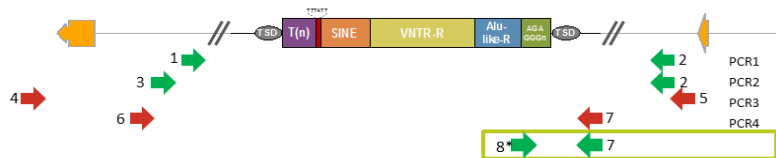
13 casos con deficiencia de AT pero sin resultados positivos



Identificación de un nuevo mecanismo molecular implicado en deficiencia de AT

**Tres pacientes**  
Inserción 2,440bp Intrón 6

**Secuencia *denovo***  
Nuevo retrotransposon SINE-VNTR-Alu (SVA)  
Mismo target site duplication (TSD) de 14bp  
Validado por sanger (diseño de primer interno en SVA)  
\*Efecto fundador

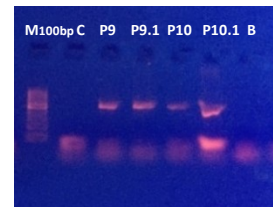


**SERPINC1**

- ✗ Sanger negativo
- ✗ NGS PGM negativo
- ✗ MLPA negativo
- ✗ aCGH negativo
- ✗ LR PCR negativa



PromethION (WGS)



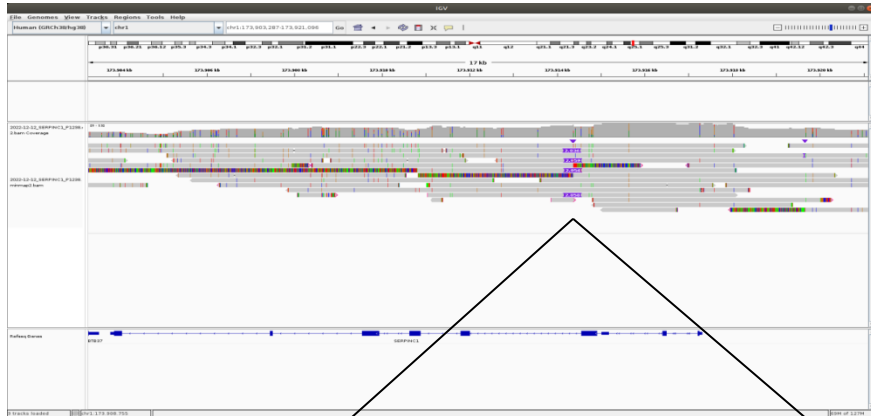


# Retrotransposones



MinION  
Enriquecimiento  
de 3MB  
Incluyendo  
el gen *SERPINC1*

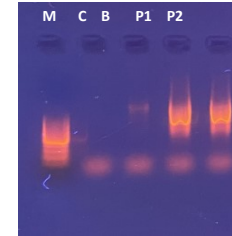
Paciente con deficiencia de AT sin mutación



**INSERCIÓN NUEVA**  
2,940 bp Intron 3

**(De novo assembly) SVA F1**  
Specific in Humans

- Characterization
- Validated by PCR
- Origin?



**Alta incidencia de INS  
de retrotransposones  
en DAT  
(¿subestimada?)  
(4/398 cases 1%)**

# Retrotransposones

## Búsqueda de base molecular desconocida



Grupo de Belén P  
Grupo de Guillermo Antiñolo



**CASO 1)** Enfermedad de almacenamiento de glucógeno.

Variante patogénica en un alelo c.1436C>A (*GYS2*)

**CASO 2)** Enfermedad peroxisomal.

Variante patogénica en un alelo c.2097dup (*PEX2*)

**CASO 3)** Distrofia hereditaria de retina

**Alta incidencia de INS de retrotransposones EN DISTINTAS PATOLOGÍAS**

**TOTAL: 7 PACIENTES  
4 ENFERMEDADES RARAS DISTINTAS**



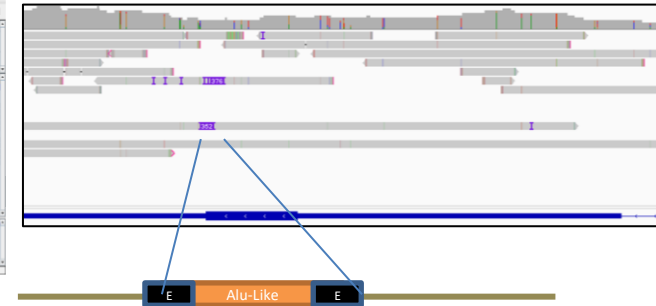
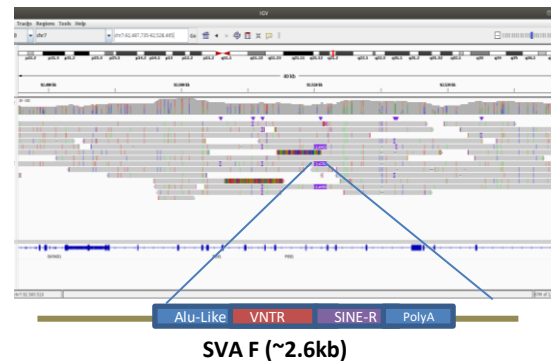
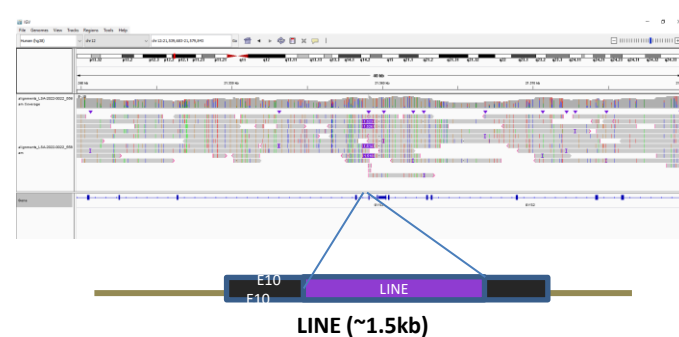
MinION  
Enriquecimiento  
de 3MB  
Incluyendo los  
genes de interés



1.5 Kb elemento **LINE** insertado en el exon 10 del gen *GYS2* en trans

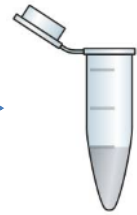
2.6 Kb elemento **SVA** cercano a SVA\_F, insertado en el intron 8 de *PEX2* en trans

~ 350 pb elemento **Alu** insertado en el exon del gen implicado

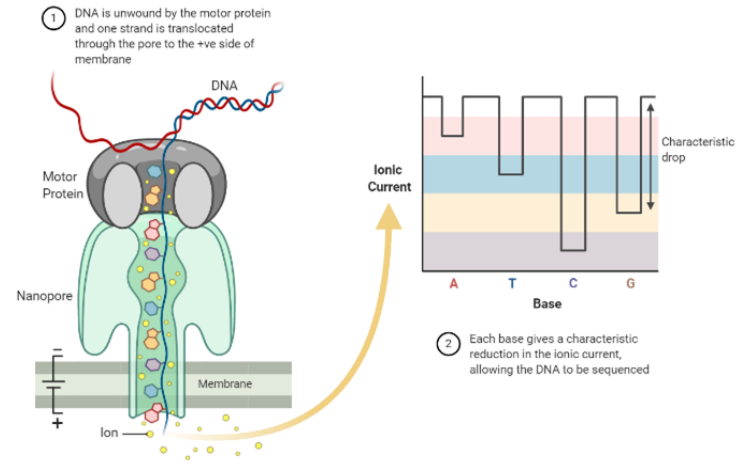


**SIMULACIÓN**

# ADN - EXTRACCIÓN



# SECUENCIACIÓN



# SECUENCIACIÓN

(VIDEO)

# ANÁLISIS DE DATOS

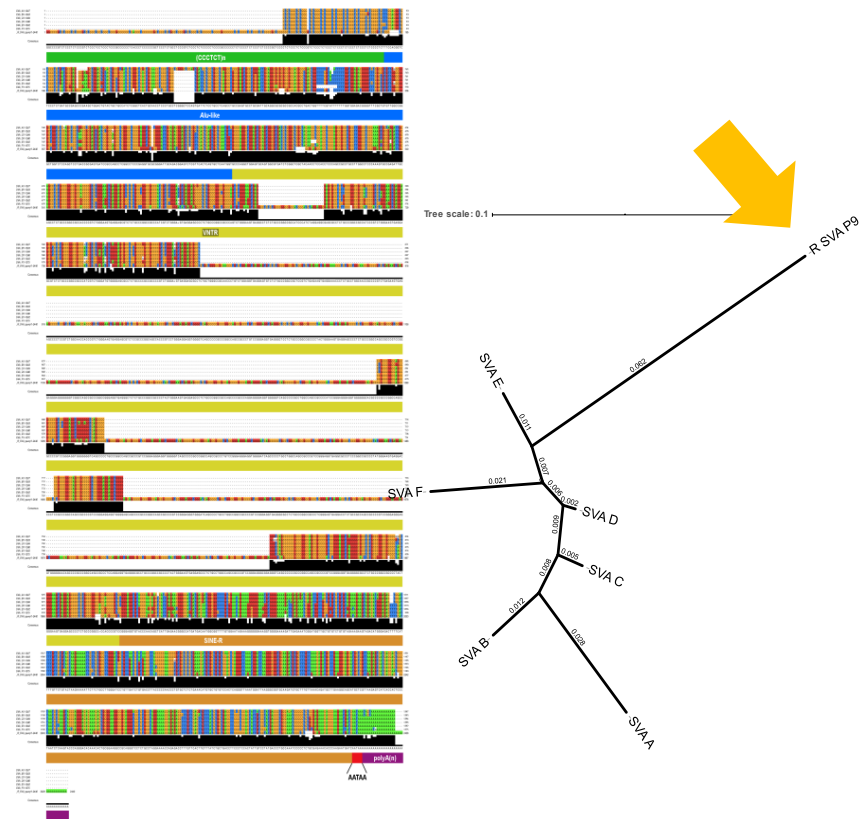
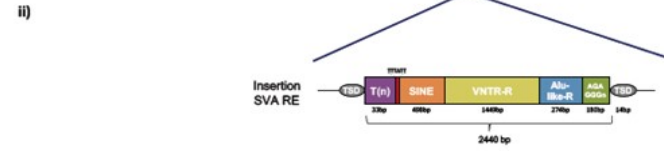
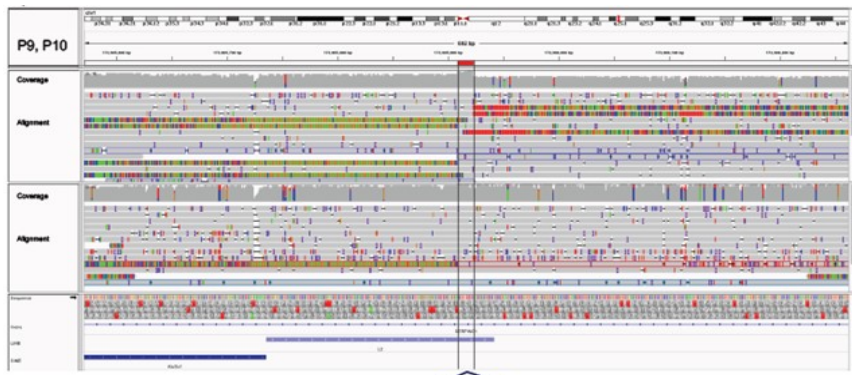
(IGV) - LLEVARLO

# ANÁLISIS DE DATOS

Estudio por **ensamblaje *de novo*** de la secuencia

Comparación con las secuencias de SVA (A-E)

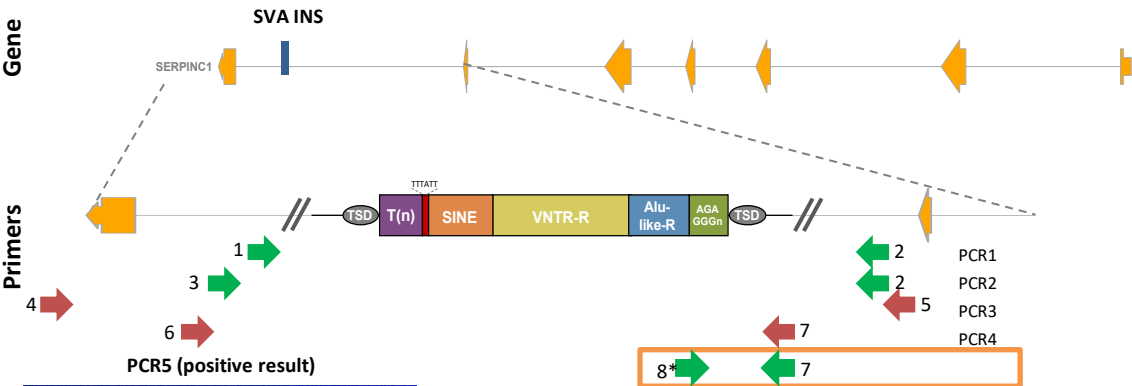
Estudio de arbol filogenético (nuevo)





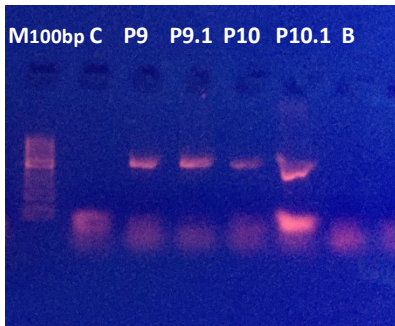
# VALIDAR POR OTRA TECNICA

## Estudio de validación/ Dificultad diagnóstica



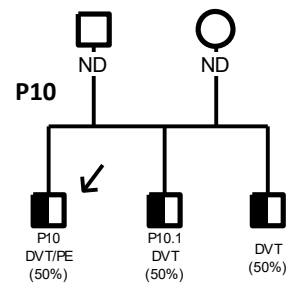
PCR design and Agarose Gel

| PCR | PRIMERS | WT allele | MUT allele | SVA amplification |
|-----|---------|-----------|------------|-------------------|
| 1   | 1+2     | 1.6kb     | 3kb        | ✗                 |
| 2   | 3+2     | 2.6kb     | 4kb        | ✗                 |
| 3   | 4+5     | 4kb       | 6.4kb      | ✗                 |
| 4   | 6+7     | 800bp     | 3.2kb      | ✗                 |
| 5   | 8*+7    | -         | 550bp      | ✓                 |



Solo resultado positivo con primer interno. PCR específica  
Validado en familiares ✓

P9



# CREACIÓN DE LA EMPRESA



- 1) **MUCHAS APLICACIONES.**
- 2) **Primera línea en nuestro algoritmo diagnóstico**
- 3) **Pocos investigadores/médicos conocen esta técnica**
- 4) **Útil para**
  - 1) **Muchas enfermedades**
  - 2) **Agricultura**
  - 3) **Otros organismos**



¿PREGUNTAS?