

Single Cell Genomics

María Méndez Lago

5.05.2015

Seminario tecnológico

Facultad de Farmacia, UB

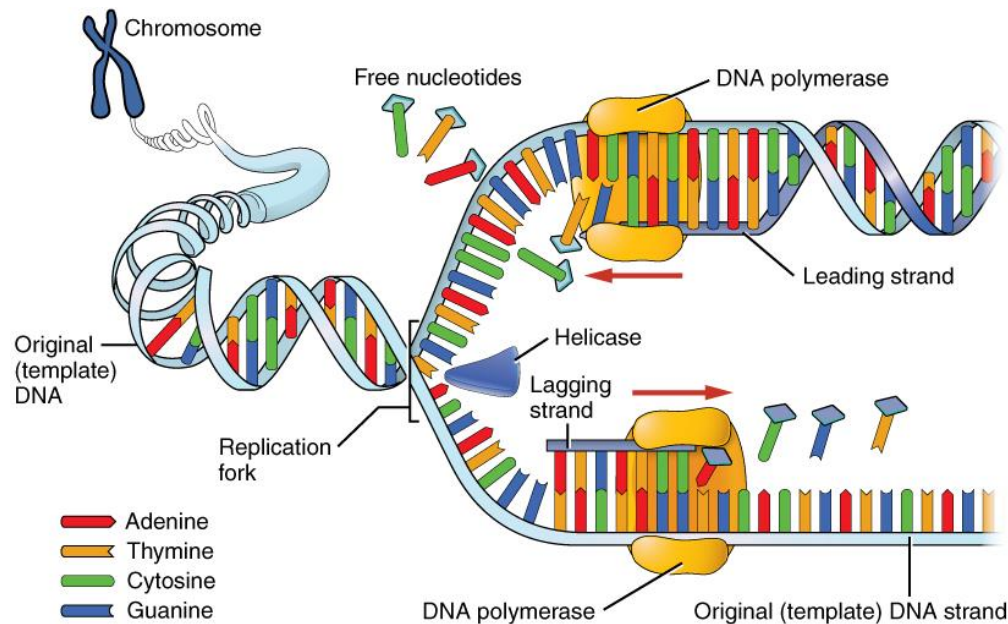


Contenido

1. Introducción a la secuenciación de “nueva generación” (NGS) y a la genómica de células individuales
2. Metodología y tecnología para secuenciación de células individuales
3. Ejemplos de aplicaciones de secuenciación de células individuales

1. Introducción

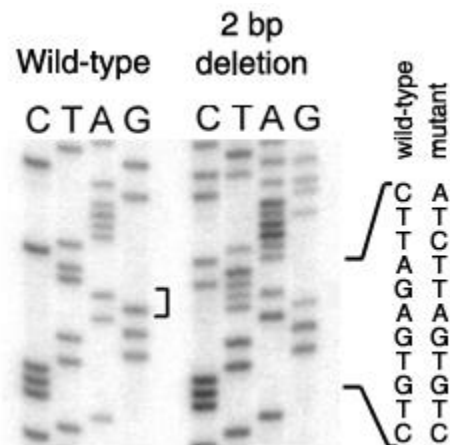
- **Secuenciación** es determinar el orden de los nucleótidos de los ácidos nucleicos.
- Se basa en el sistema que usan las células para replicar su propio DNA



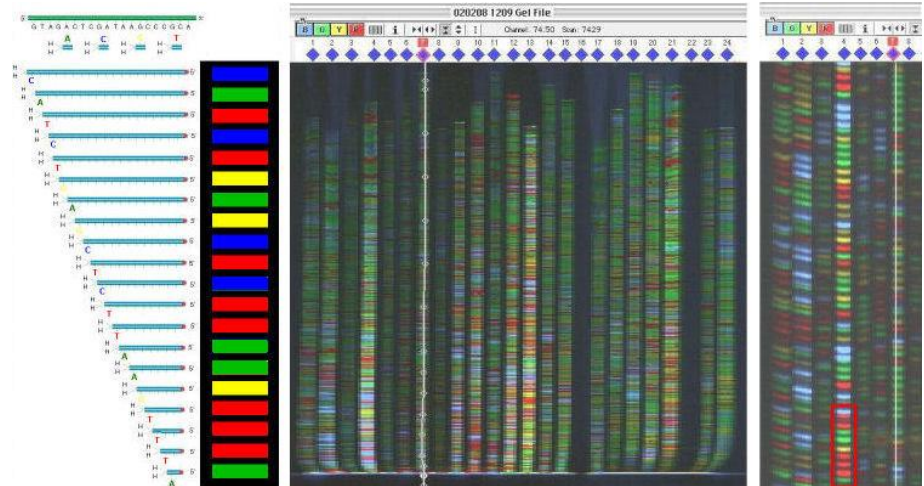
Secuenciación por el método tradicional (método de Sanger)

Secuenciación mediante geles

Nucleótidos terminadores marcados radioactivamente
(1977)

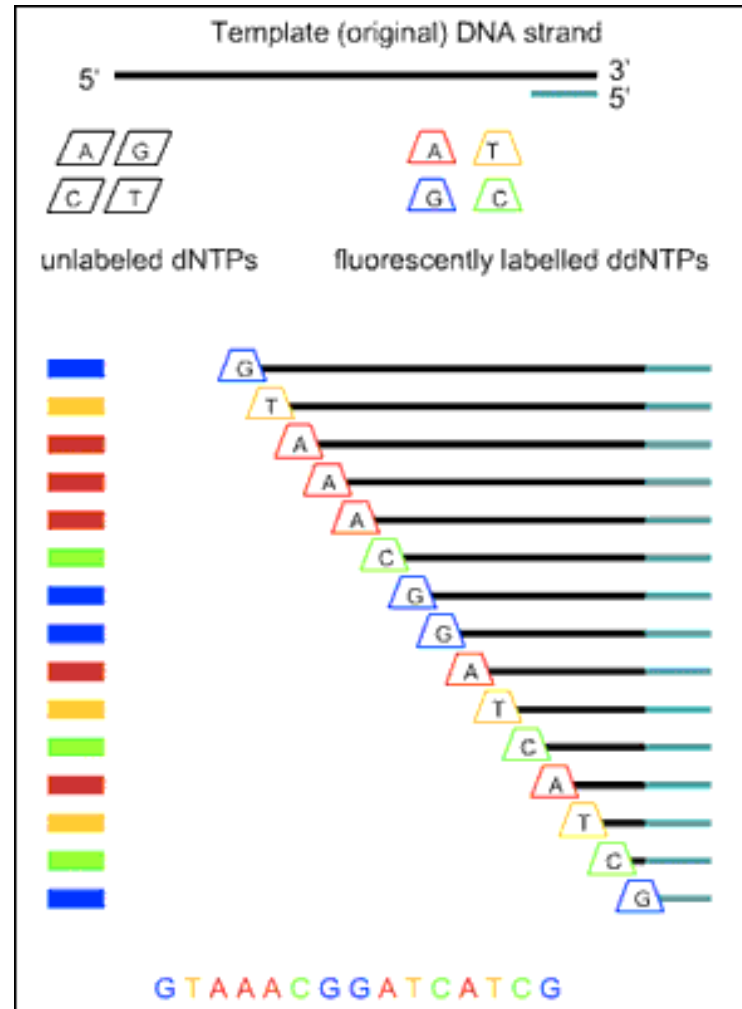
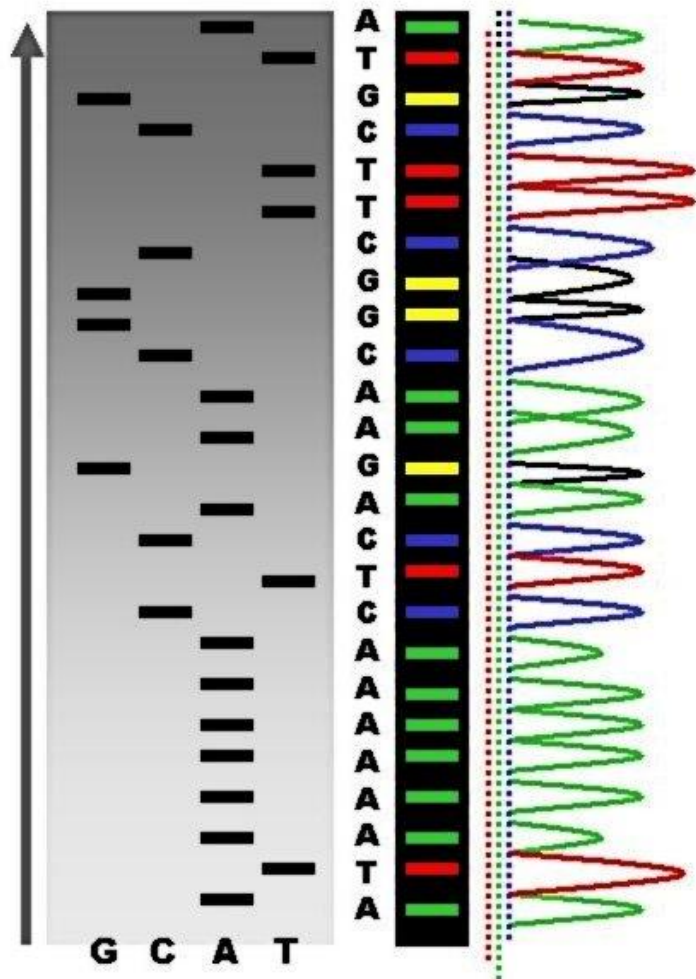


Nucleótidos terminadores marcados con fluorocromos
(Automatizado en 1987)



NOTA: Anterior al método de Sanger, Maxam Gilbert (1975) desarrolló un método de secuenciación química, que también empleaba radioactividad

Secuenciación por el método tradicional (método de Sanger)



Secuenciación por el método tradicional (método de Sanger)

Secuenciación por capilares

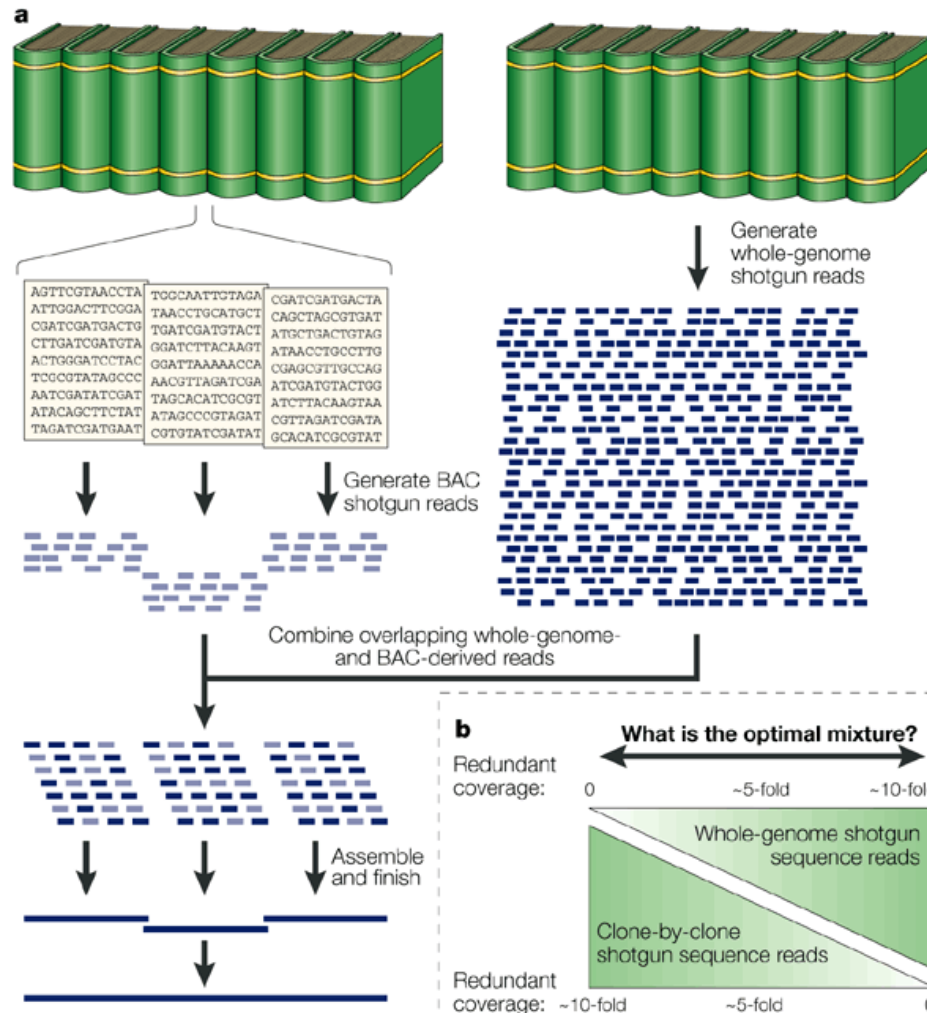
Nucleótidos
terminadores
marcados con
fluorocromos



Secuenciación del genoma humano

- Genoma humano:
 - 23 pares de cromosomas: 22 autosomas, X, Y
 - 3.000.000.000bp
 - 3.200 genes
- Consorcio Internacional: 20 centros de investigación de EE.UU, Reino Unido, Francia, Alemania, Japón y China
- Coste: \$ 2.700.000.000 ($2,7 \times 10^9$)
- Duración: 1.990-2.000 (1^{er} borrador)- 2.003 (fin)

Secuenciación del genoma humano



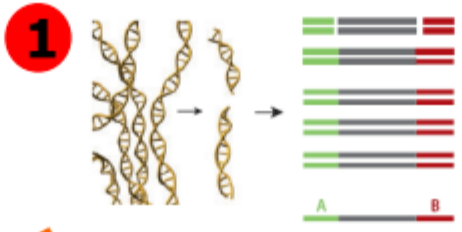
Secuenciación de nueva generación (NGS)

- Desde 2005 aparecen nuevas tecnologías de secuenciación (NGS)



Tecnologías de NGS

- 1** Library preparation
- 2** Clonal amplification
- 3** Cyclic array sequencing



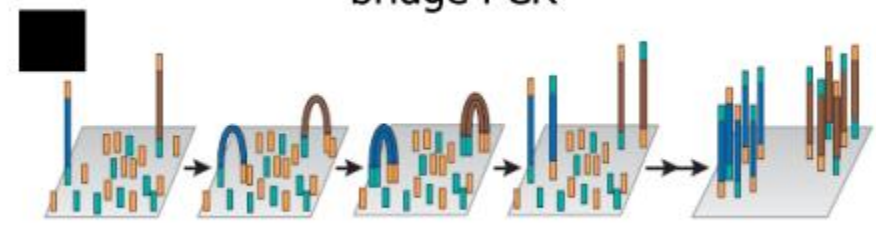
DNA fragmentation and in vitro adaptor ligation

2

emulsion PCR

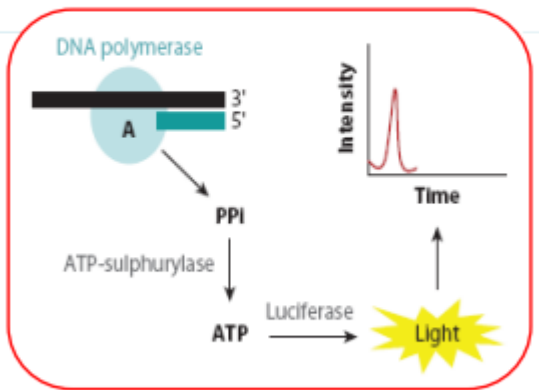


bridge PCR



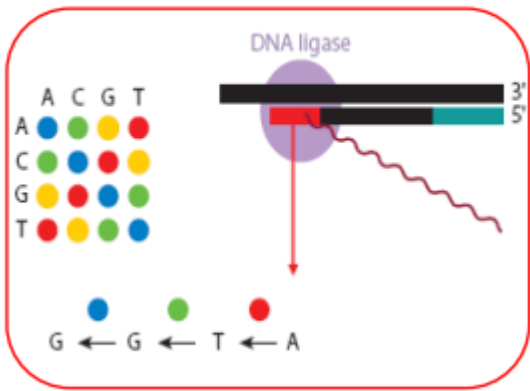
3

Pyrosequencing



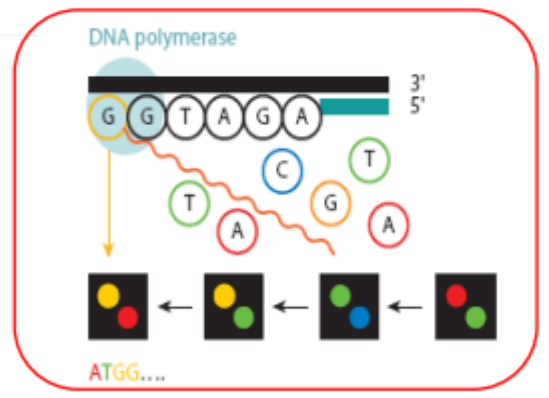
454 sequencing

Sequencing-by-ligation



SOLiD platform

Sequencing-by-synthesis



Illumina technology

Proceso de secuenciación de DNA

Biobanco
QC

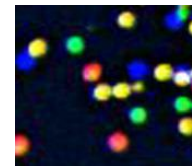
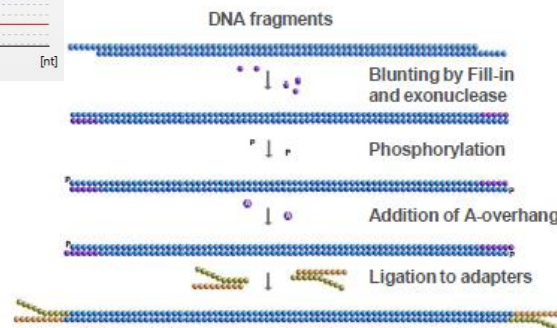
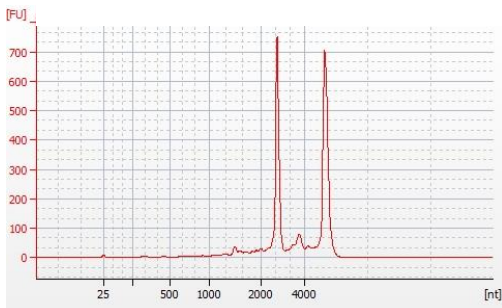
Preparación
de librería

- DNA (WGS)
- RNA
- Exoma...

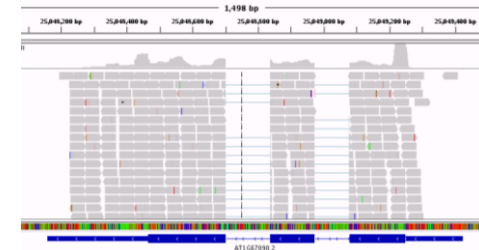
Secuenciación

Análisis
de datos

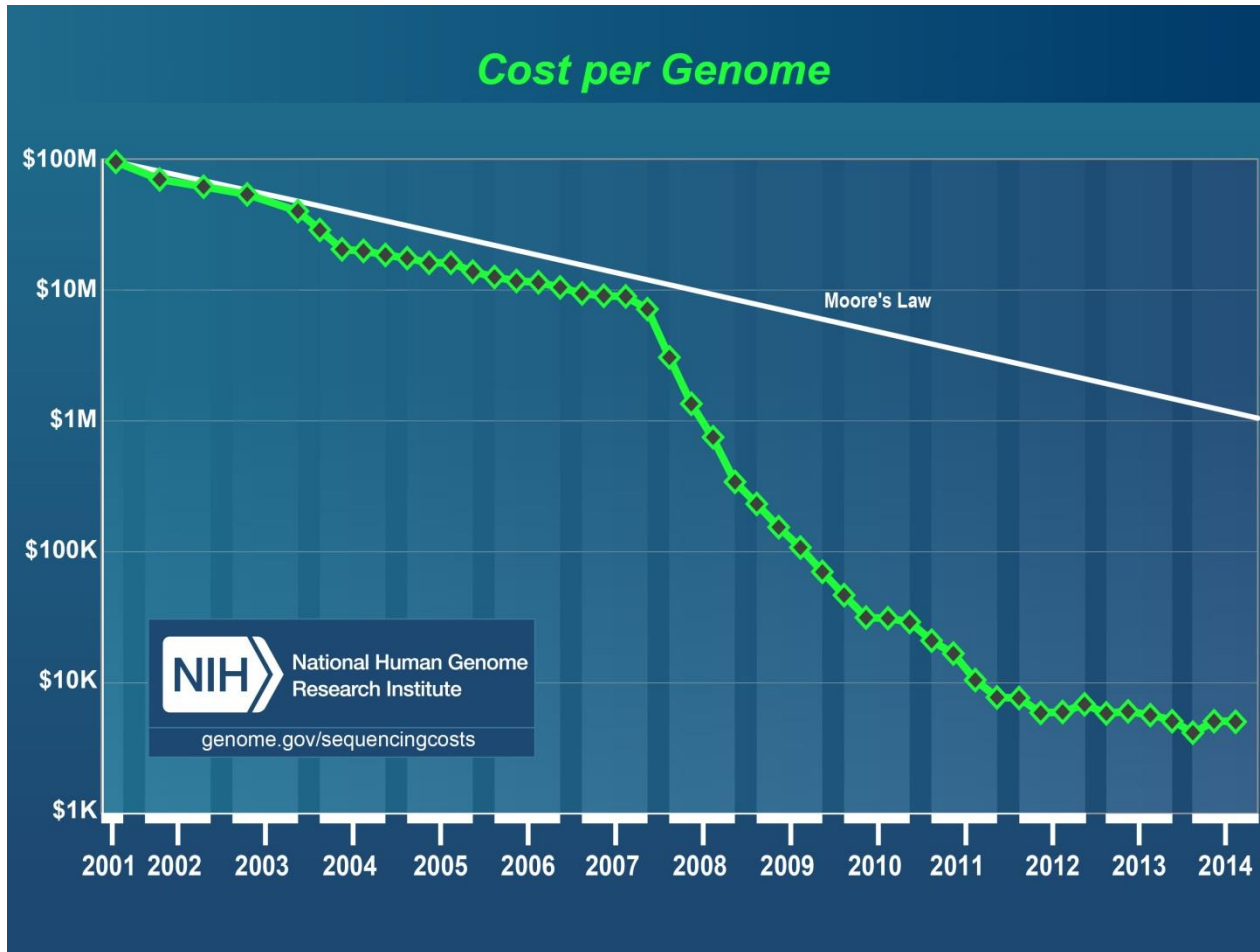
- Alineamiento
- Detección SNVs
- Cuantificación...



```
ATCAGGTACTTAGCTGAACTCGCATGCAGTGC
ATCAGGTACTTAG
CAGGTACTTAGCG
TACTTAGCGGAAC
AGCGGAACTCGCA
GGAACTCGCATGC
TCGCATGCAGTGC
```



Costes de secuenciación



Centro Nacional de Análisis Genómico (CNAG)



Equipos

- 9 Illumina HiSeq2000
- 2 Illumina HiSeq2500
- 1 Illumina MiSeq
- 4 Illumina cBots
- 1250 core cluster super computer
- 2.7 petabyte disc space
- Barcelona SuperComputing Center:
- 10 x 10 Gb/s



Copyright 2005, Barcelona Supercomputing Center - BSC



Centro Nacional de Análisis Genómico (CNAG)



Equipos



Capacidad de secuenciación

>1000 Gbases/día = 10

genomas humanos al día a 30x

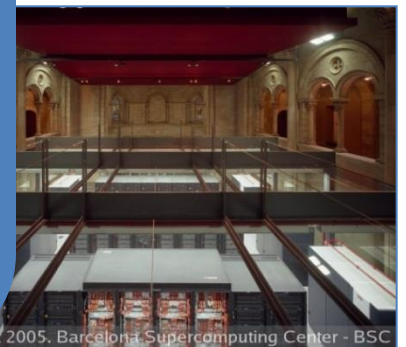


Image 2005, Barcelona Supercomputing Center - BSC

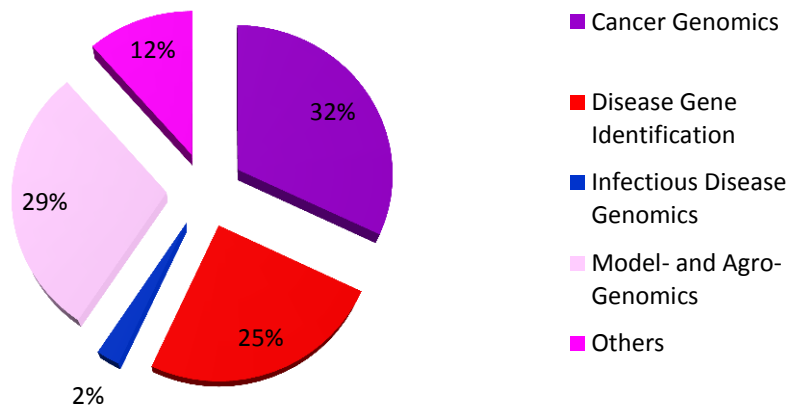


¿Por qué secuenciar genomas?

CNAG: proyectos de secuenciación



Research Areas 2014



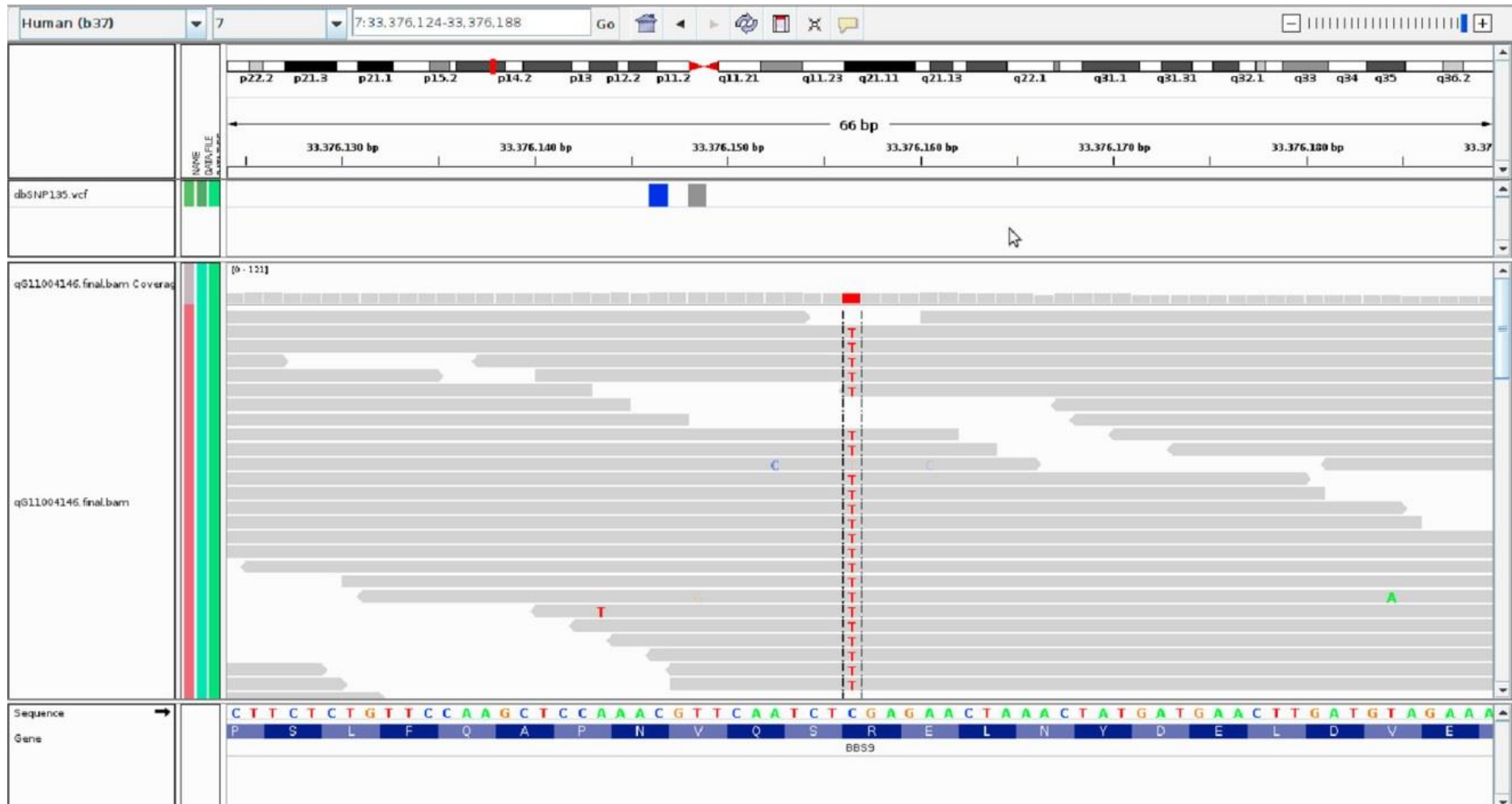
Detección de SNPs/ mutaciones

THURSDAY

T-UESDAY

- Inserción / deleción de un nucleótido
- Sustitución de un nucleótido

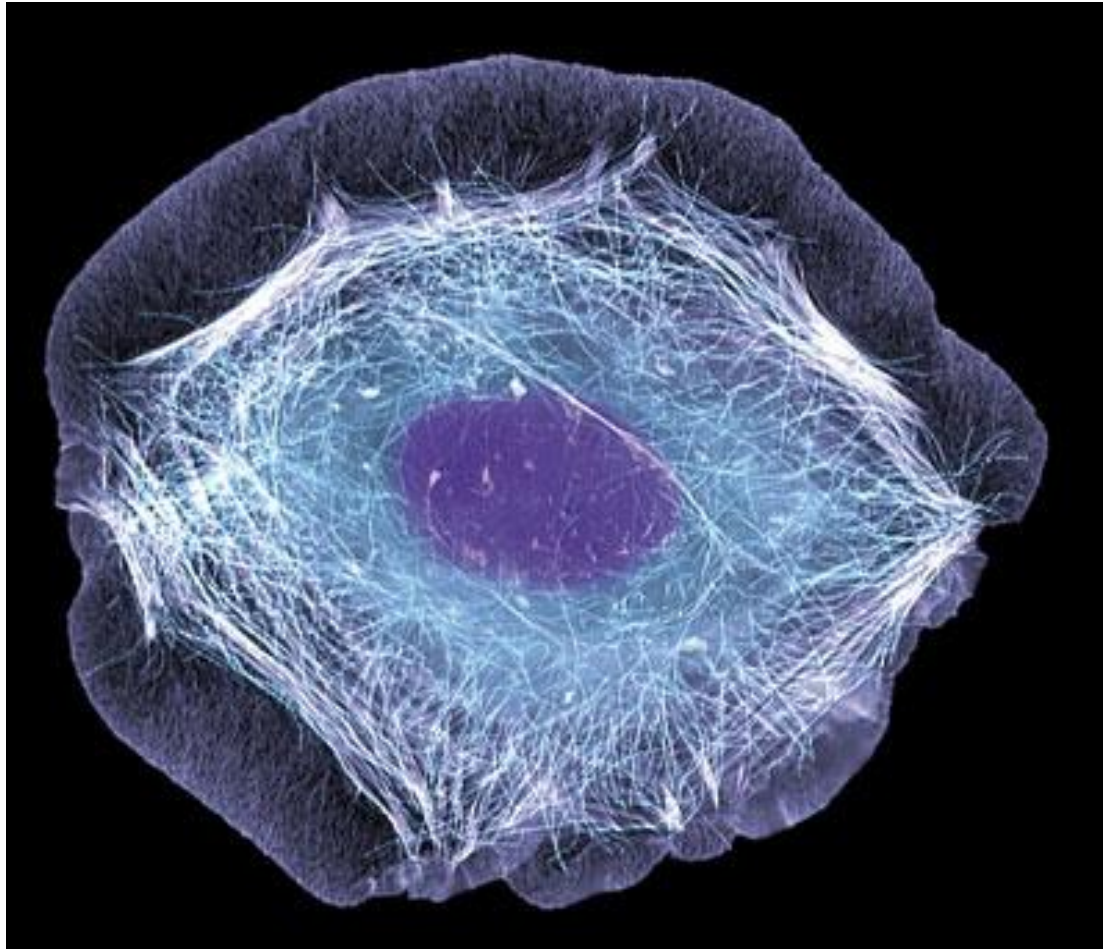
Detección de SNPs/ mutaciones



Ejemplo de aplicación de secuenciación: **medicina personalizada**

- EGFR es un oncogén frecuentemente mutado en cáncer de colon.
- También en otros cánceres: cáncer de mama, glioblastoma, etc.
- Inhibidores de EGFR son terapias habitualmente usadas para tratar cáncer de colon, podrían administrarse a otros pacientes de cáncer.

Genómica de células individuales



¿Por qué estudiar células individualmente?

- Para re-definir tipos celulares
- Para identificar nuevos subtipos celulares.
- Para comprender mejor el funcionamiento de cada célula individual dentro de un mismo tipo de células
- En muestras heterogéneas (Cáncer)
- Células tumorales en circulación (CTCs)
- Bacterias (sin necesidad de cultivo)
- Diagnóstico genético pre-implantacional en fertilización *in vitro*

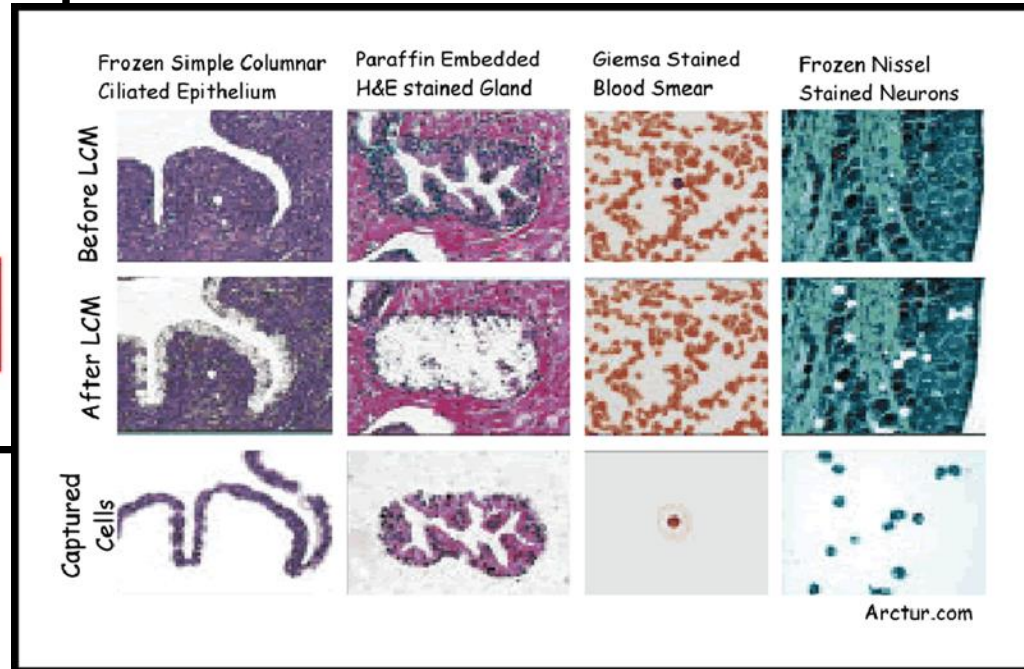
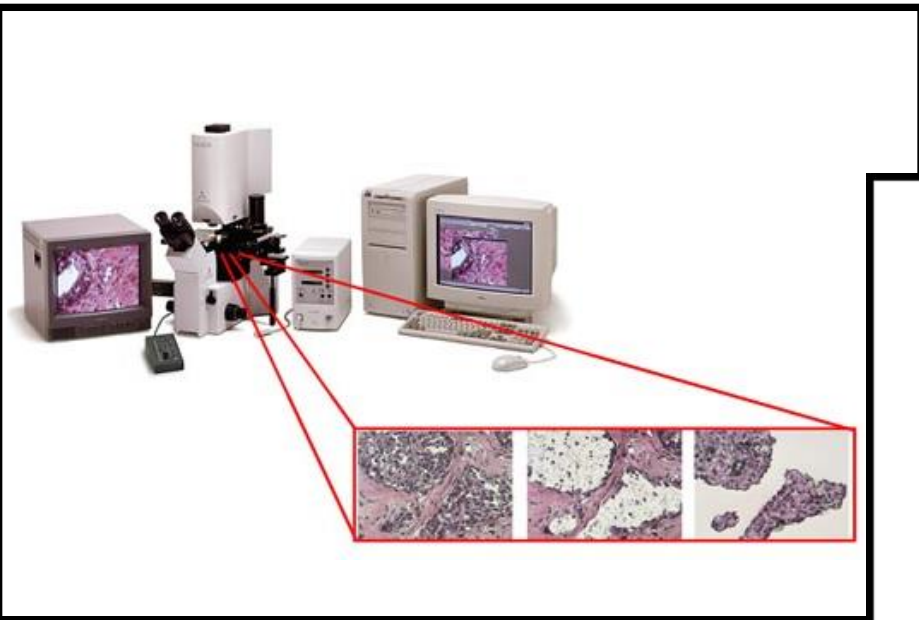
2. Metodología de secuenciación de células individuales



Aislamiento de células individuales

- Captura por microdissección con láser (LCM)
- Micropipeta manual (como en IVF)
- Fluorescent-activated cell sorting (FACS)
- Métodos microfluídicos:
 - De flujo continuo
 - De goteo
- En contexto (*in situ*)

Captura por microdissección con láser (LCM)



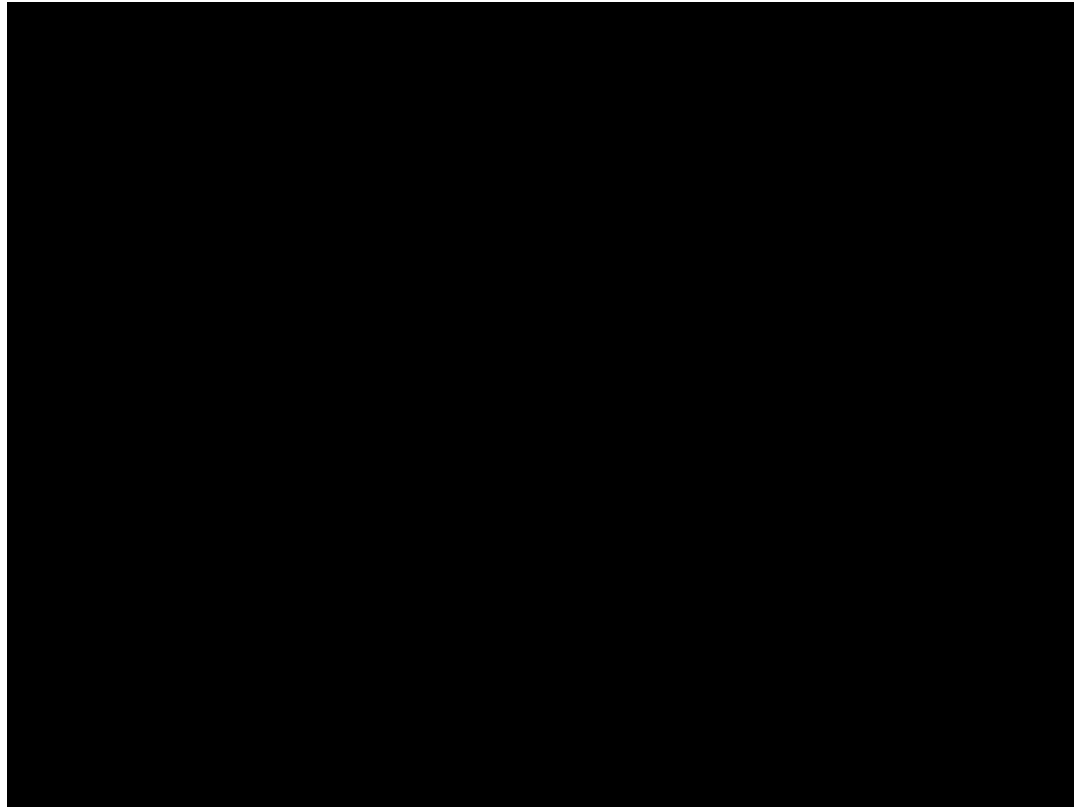
Fuente:

<http://browncancercenter.org/research/shared-research-facilities/laser-capture-microdissection/>

Fuente:

<http://www.scripps.edu/california/research/microscopy/laser-capture.html>

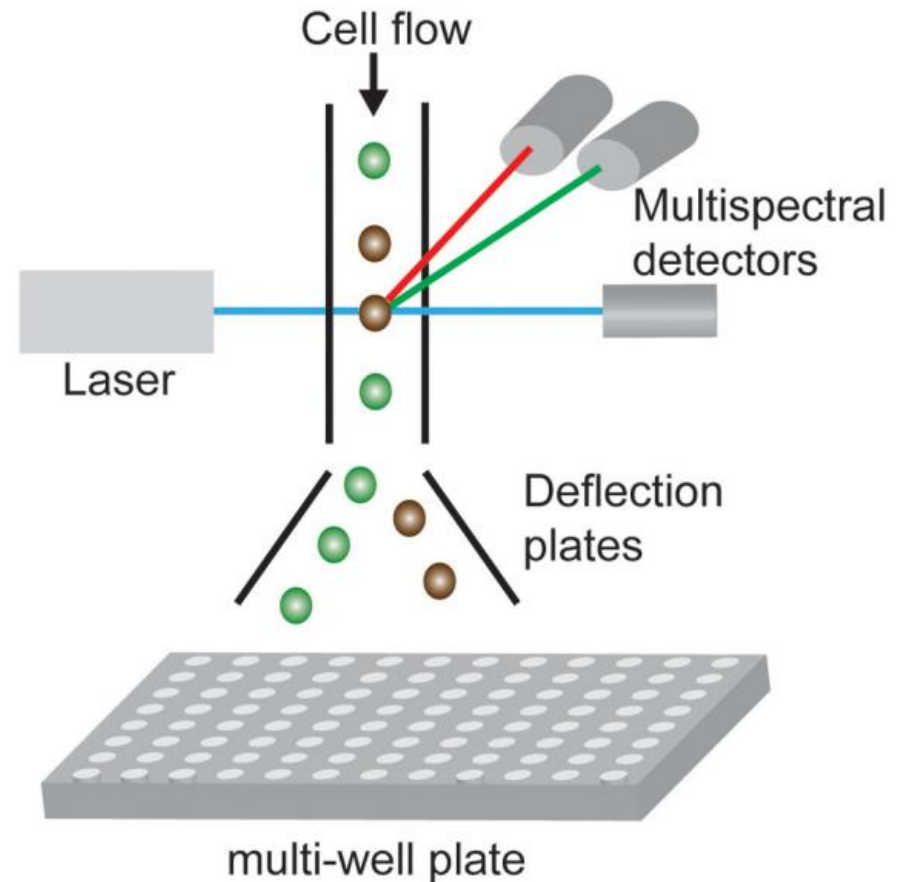
Micropipeta manual (como en IVF)



YouTube video

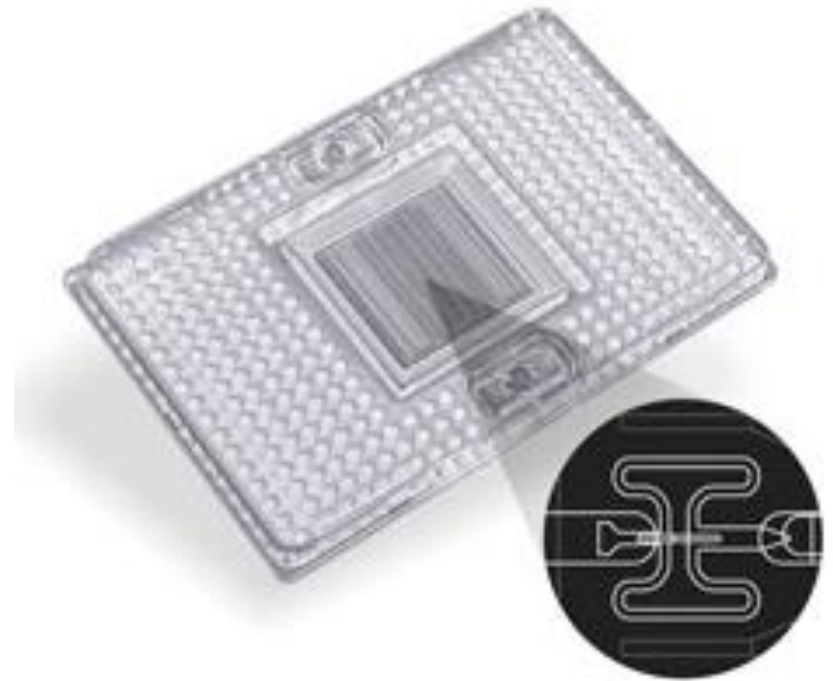
www.fertilitymagazine.net

Fluorescent-activated cell sorting (FACS)



Métodos microfluídicos: flujo continuo

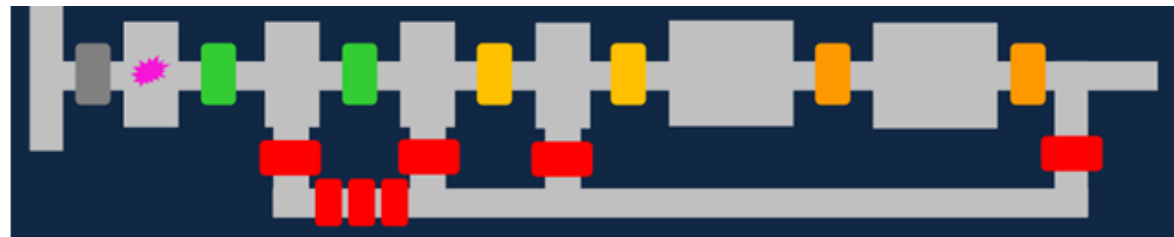
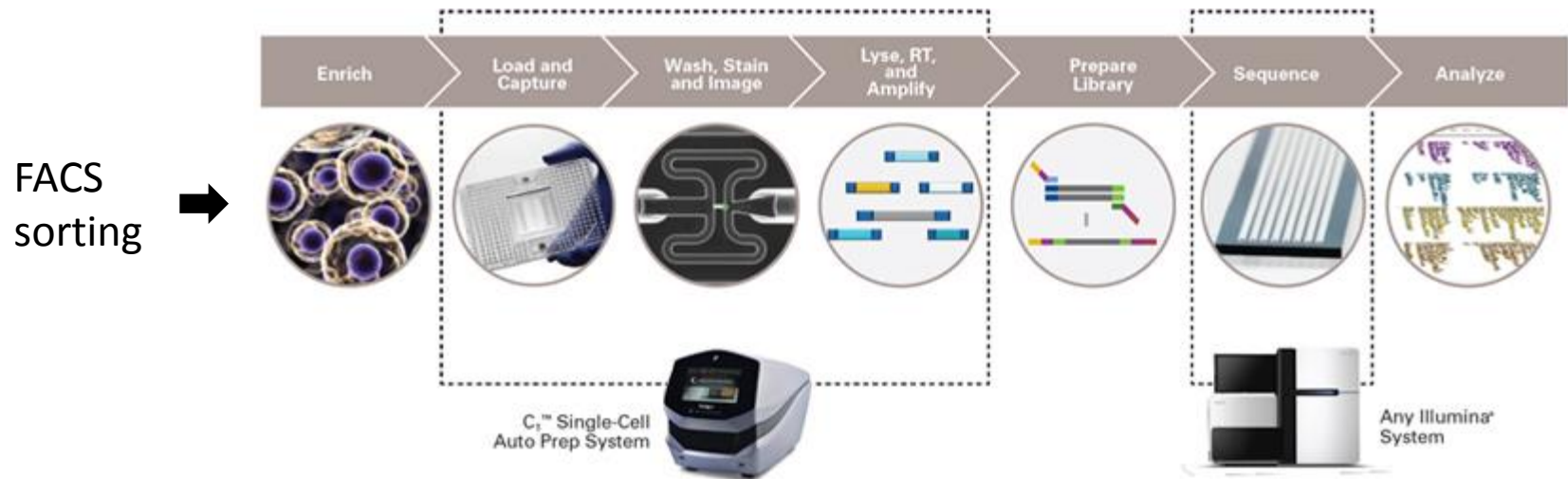
- C1 Single-cell AutoPrep System (Fluidigm)



Small cells: 5-10 μ m
Medium cells: 10-17 μ m
Large cells: 17-25 μ m

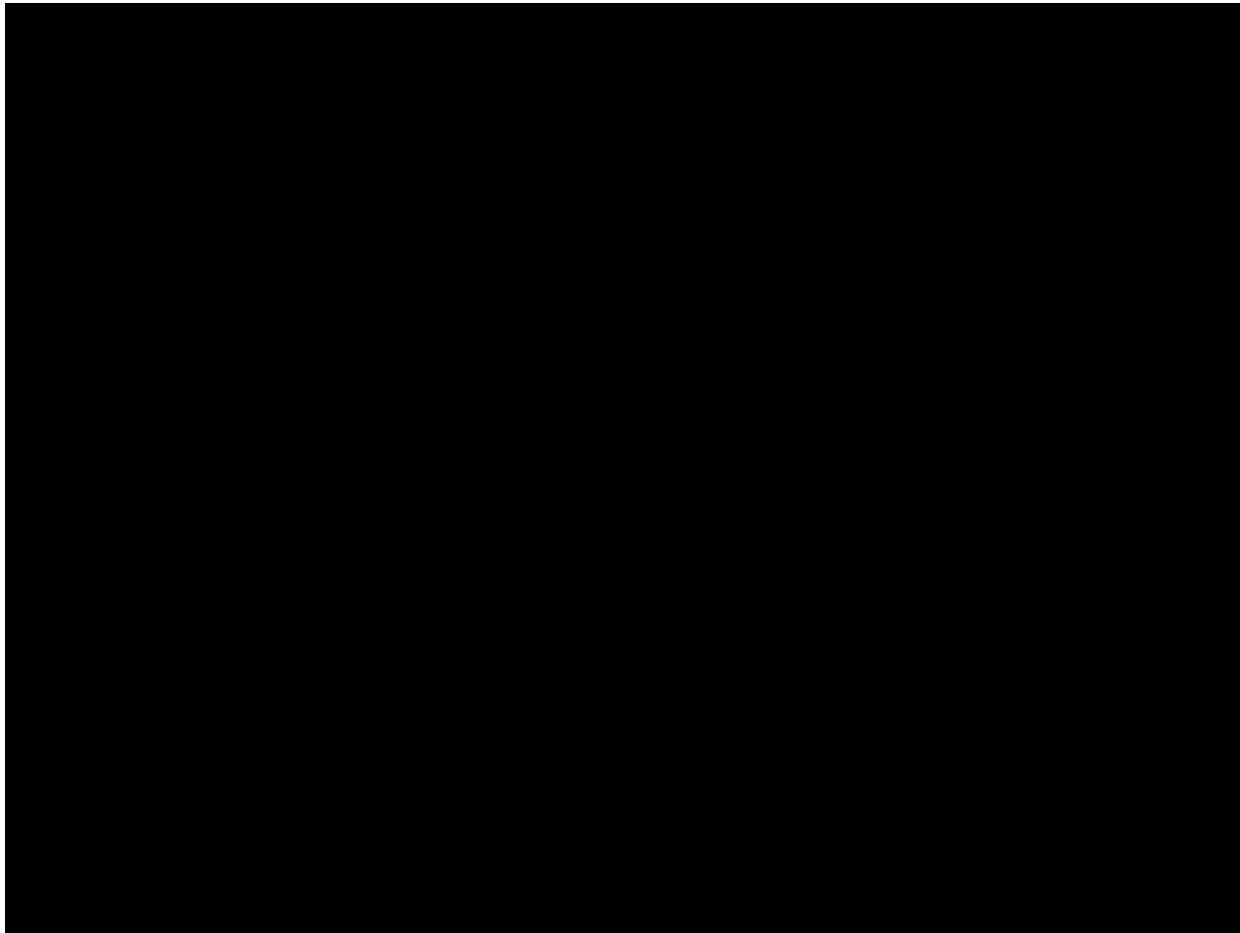
Métodos microfluídicos: flujo continuo

- C1 Single-cell AutoPrep System (Fluidigm)

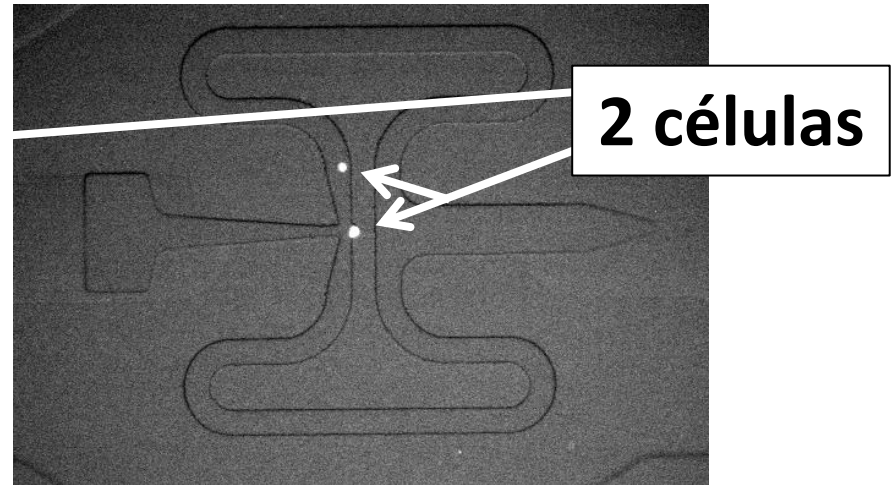
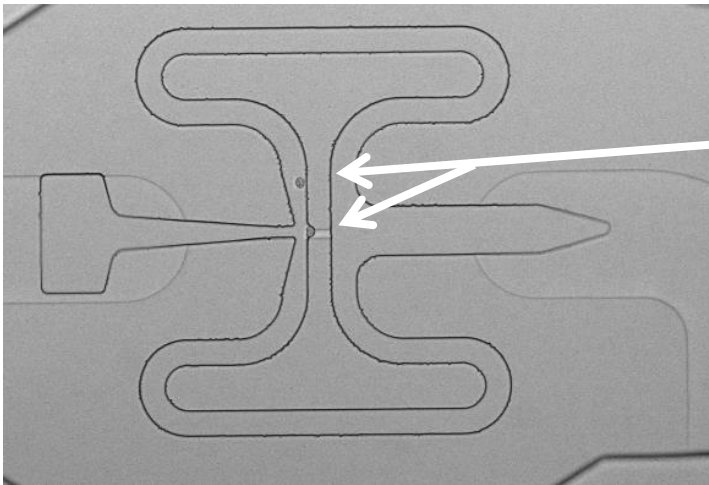
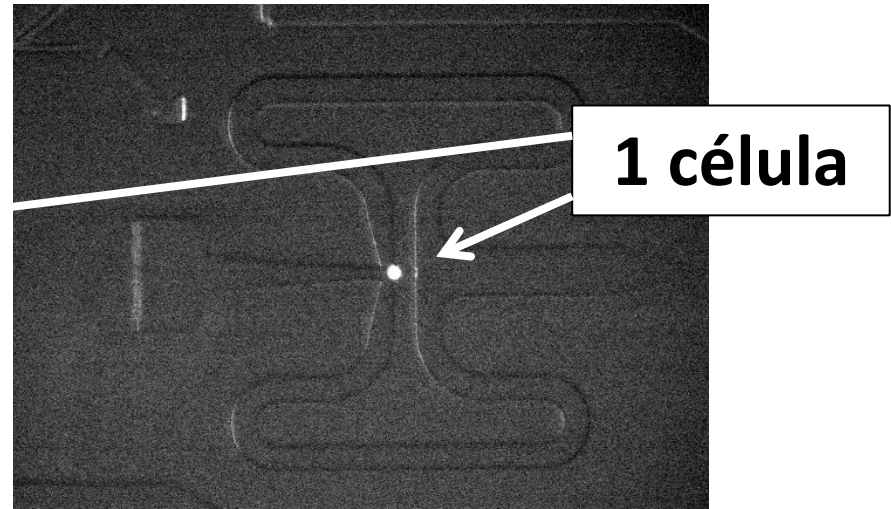
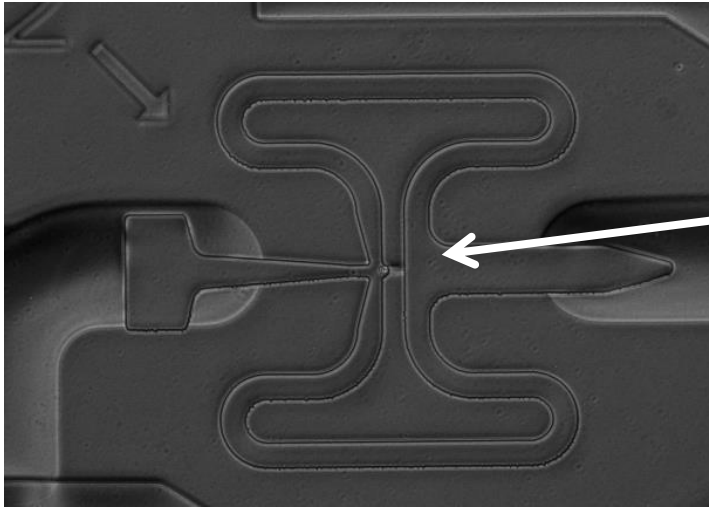


Métodos microfluídicos: flujo continuo

- C1 Single-cell AutoPrep System (Fluidigm)

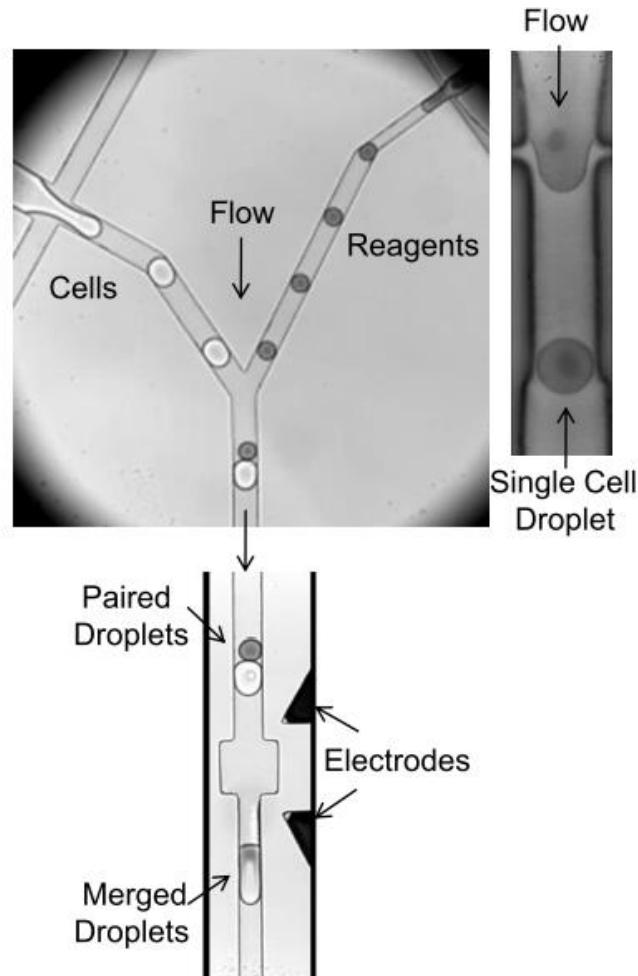


Métodos microfluídicos: flujo continuo

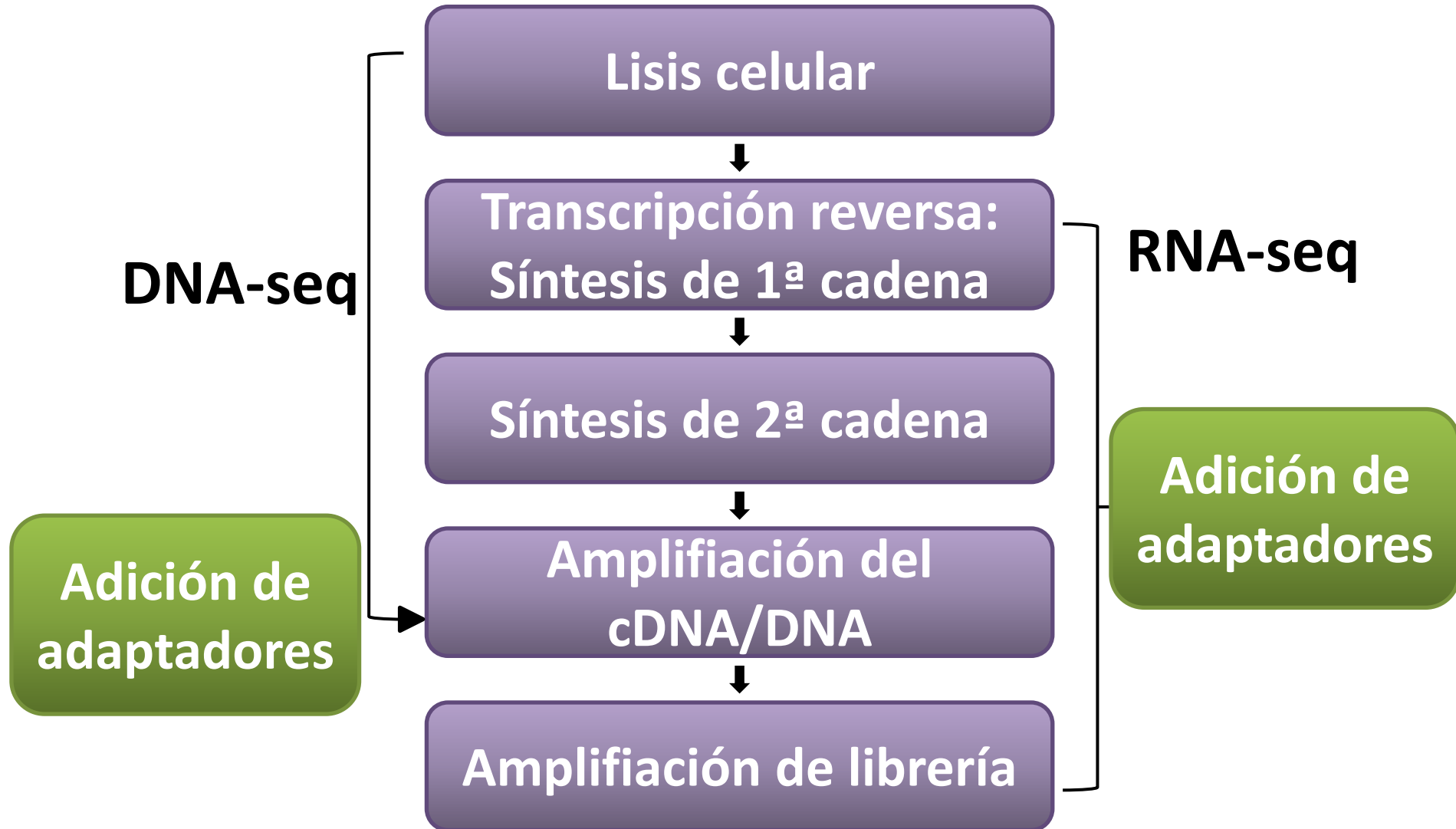


Métodos microfluídicos: de goteo

Merging Single Cell Droplets

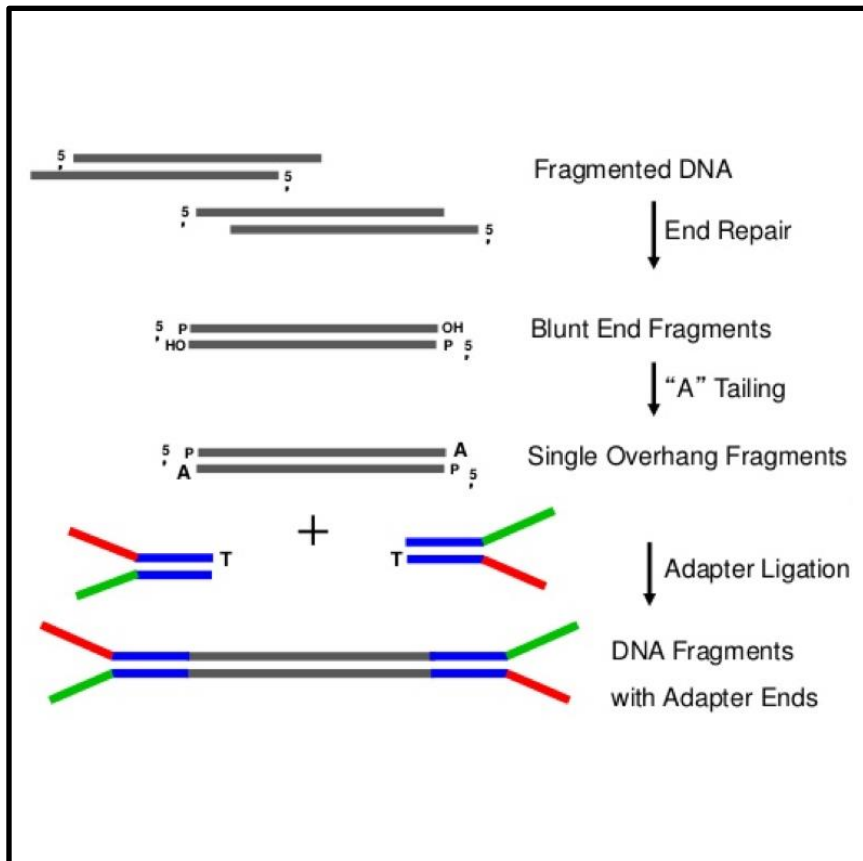


Preparación de librerías de células individuales

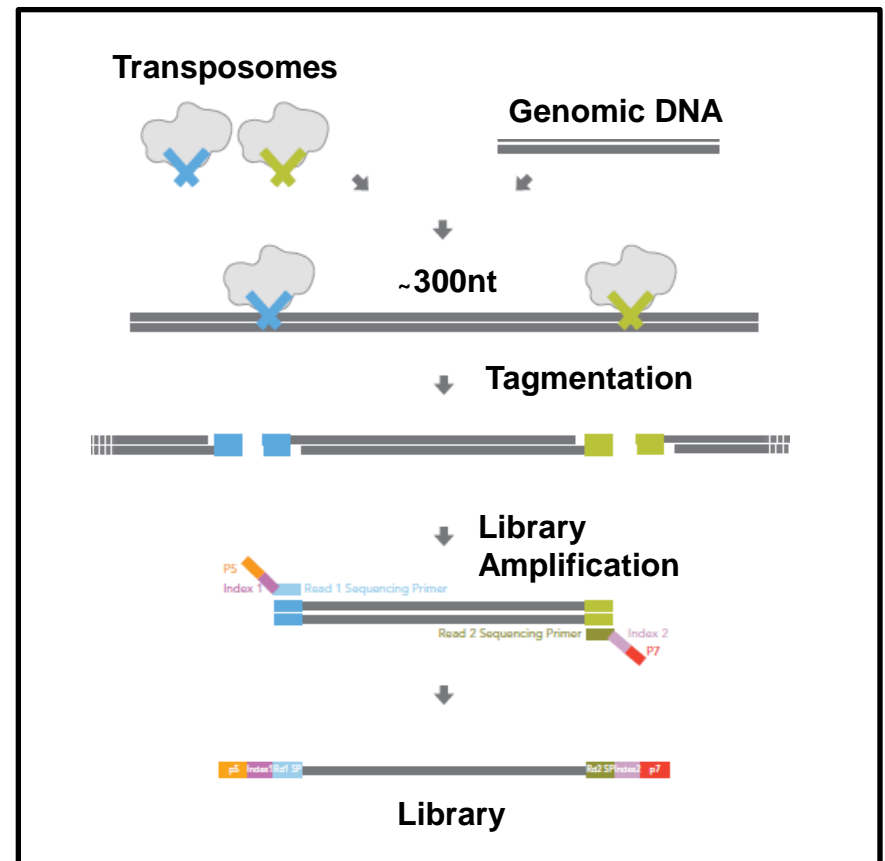


Preparación de librerías

Ligación de adaptadores

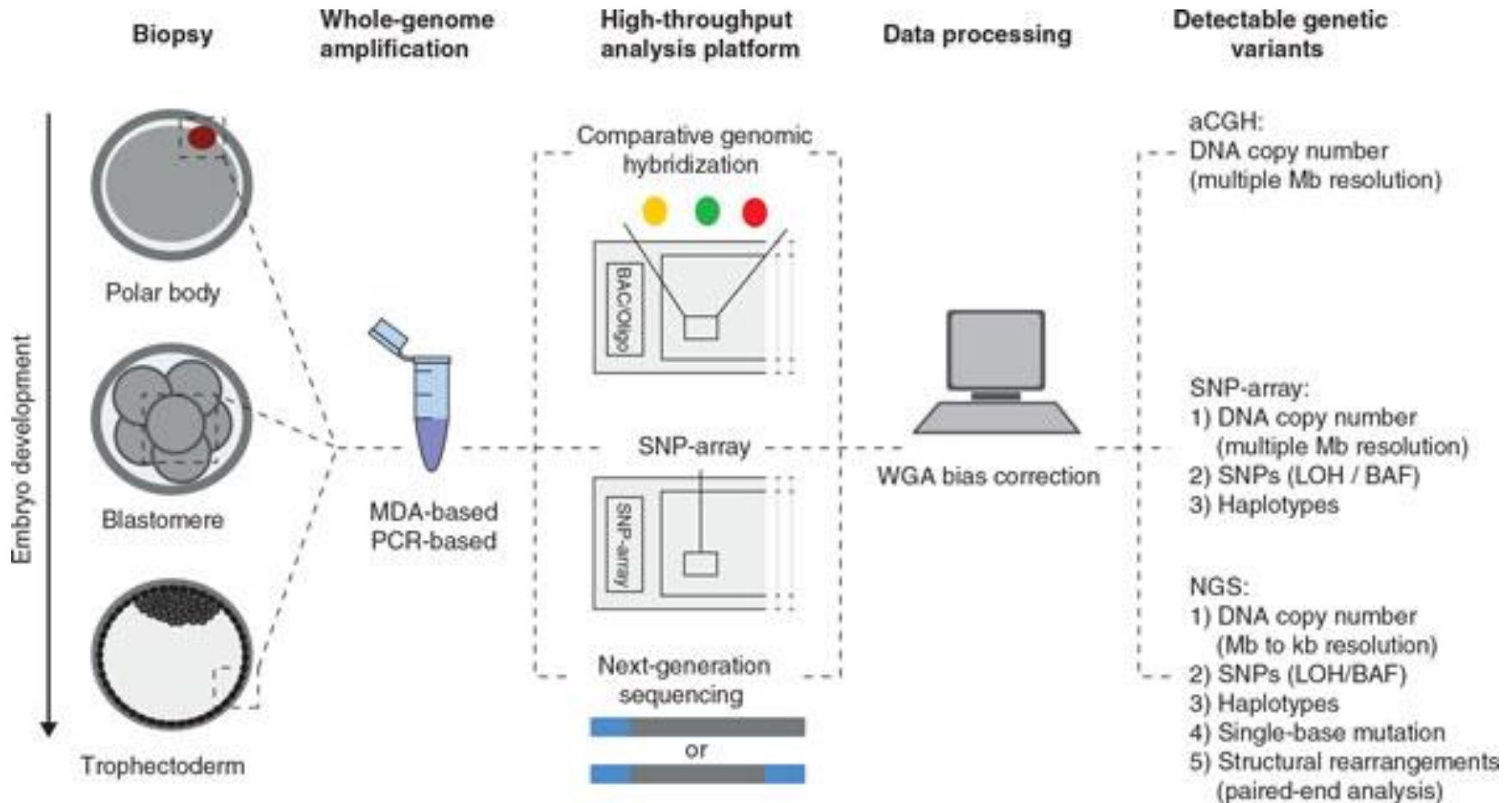


Tagmentación

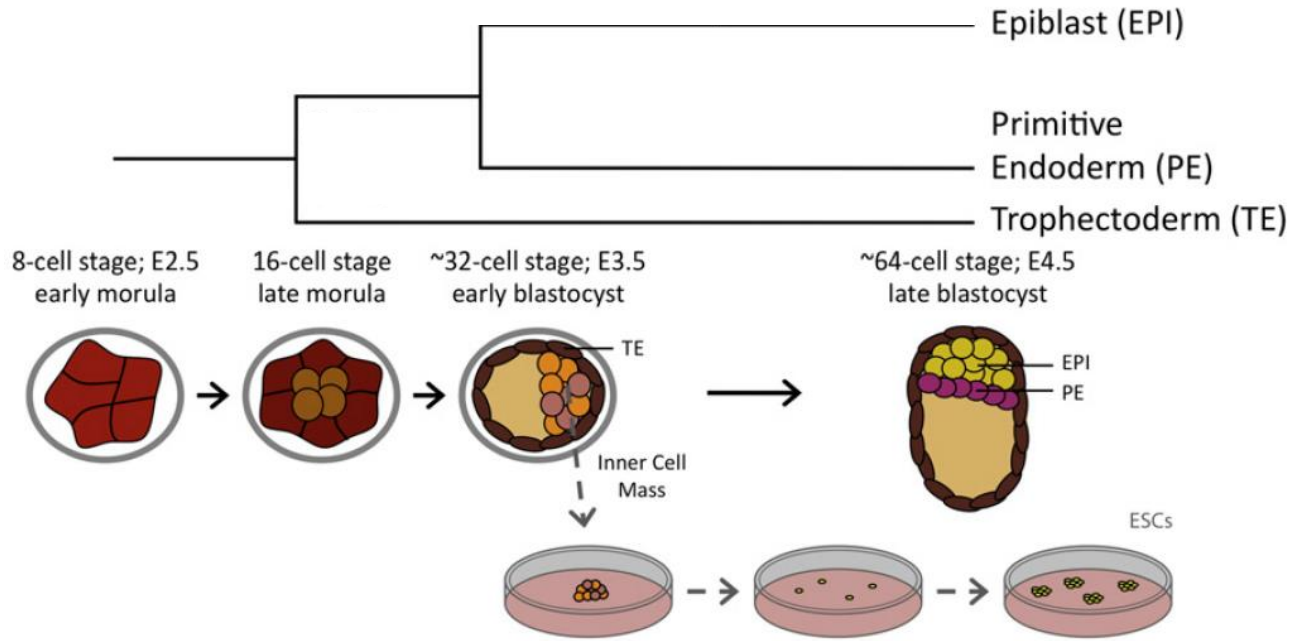


3. Ejemplos de aplicaciones de secuenciación del DNA o RNA de células individuales

Diagnóstico genético preimplantacional para fecundación in vitro



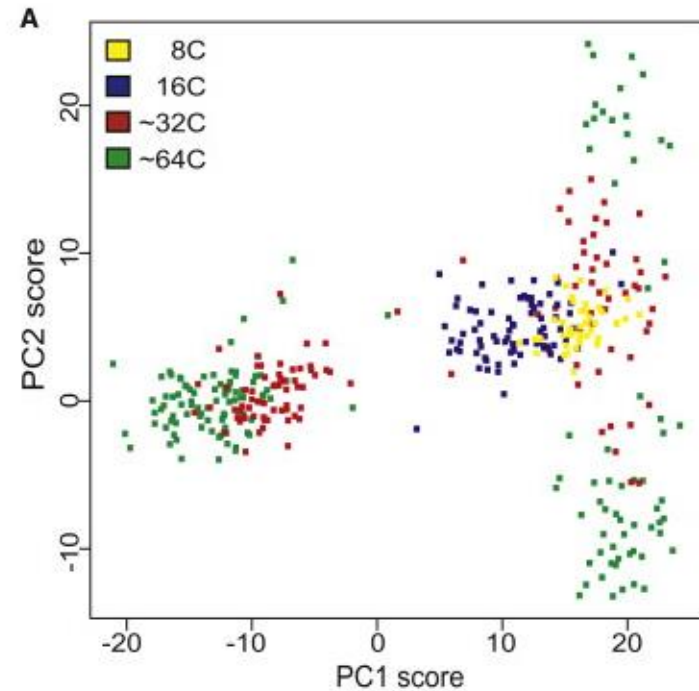
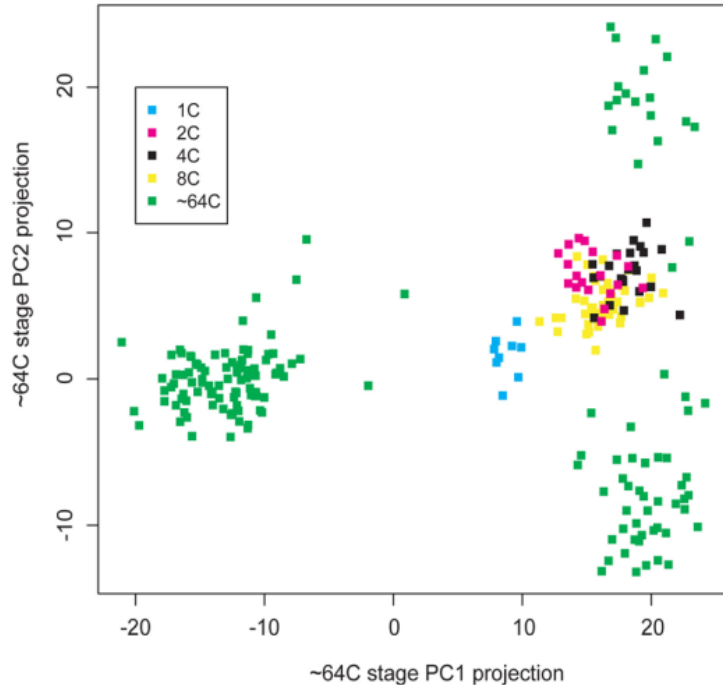
Estudios de desarrollo embrionario



Desarrollo del embrión de ratón a tres blastocistos distintos :

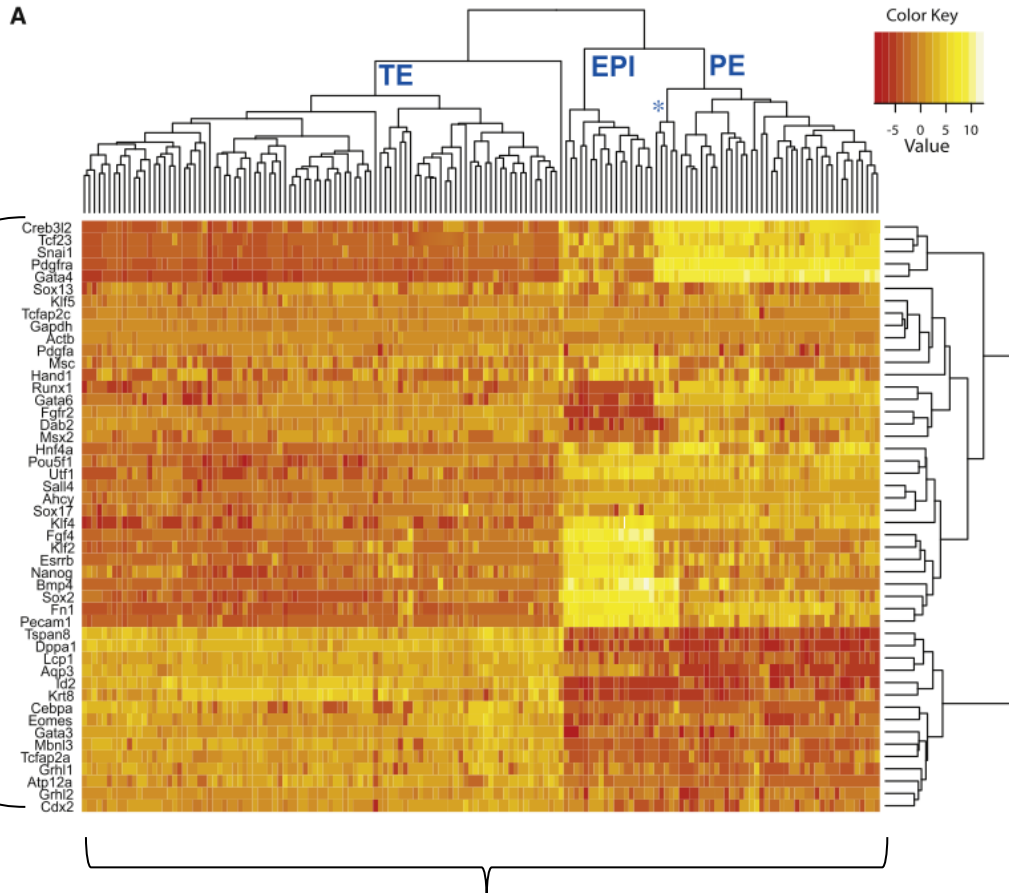
- Trofoectodermo (TE)
- Epiblasto (EPI)
- Endodermo primitivo (PE)

Estudios de desarrollo embrionario



Análisis de single-cell RNA-seq, basado en la expresión génica de 48 genes de los estadios embrionarios de 1-, 2-, 4-, 8-, 16-, 32-, y 64-células.

Estudios de desarrollo embrionario



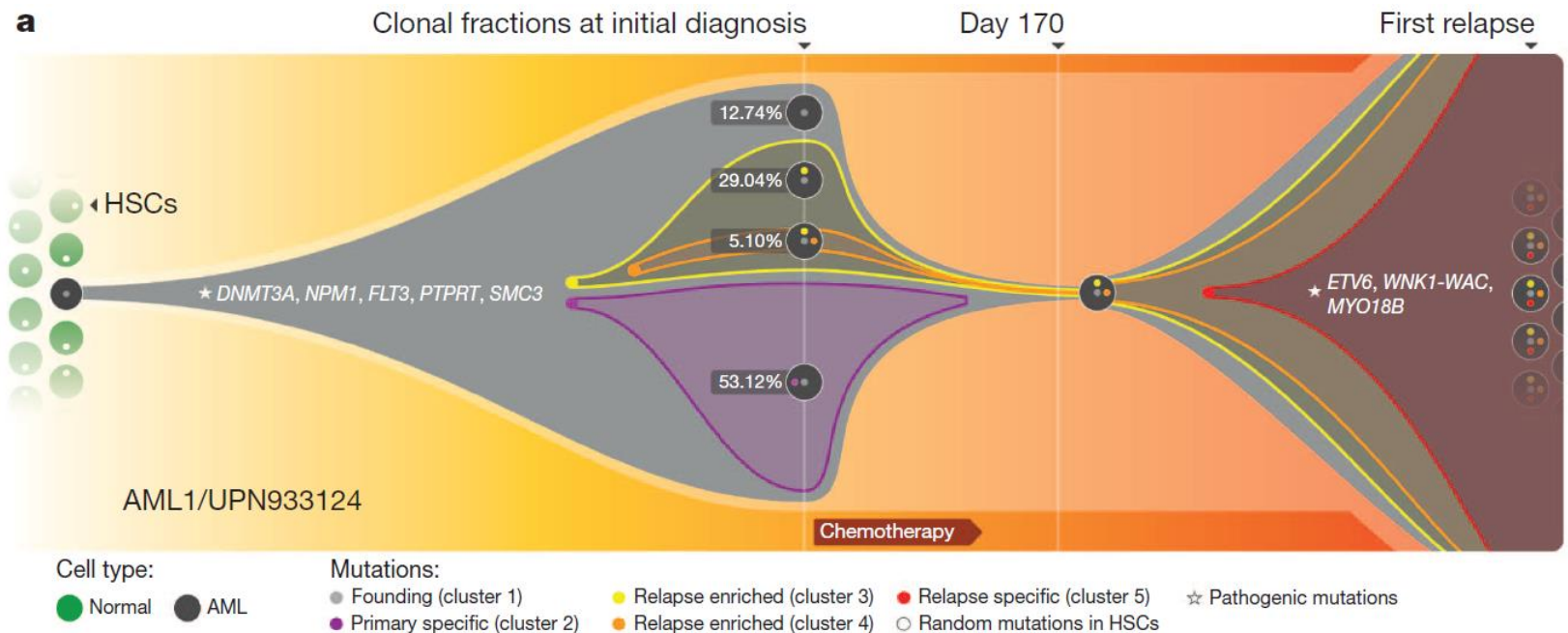
3 tipos de blastocistos distintos:

- Trofoectodermo (TE)
- Epiblasto (EPI)
- Endodermo primitivo (PE)

159 células individuales del estadio embrionario de 64-células

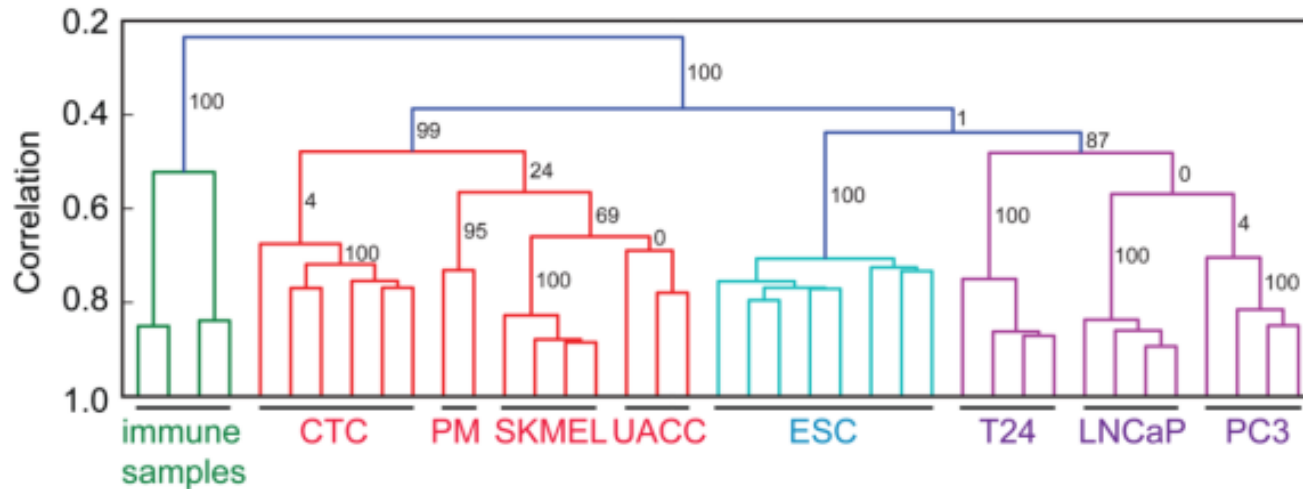
Estudio del genoma del cáncer

- Los tumores son heterogéneos: hay varios subtipos de células cancerígenas en cada tumor
- Cada subtipo tiene distintas mutaciones, o distintas alteraciones en niveles de expresión



Cáncer y CTCs

Agrupamiento jerárquico no supervisado de single-cell RNA-seq



Immune samples: Líneas celulares de linfoma de Burkitt's y leucocitos

CTC: Células circulantes de tumor de un posible melanoma

PM: Melanocitos

SKMEL: Línea celular de melanoma SKMEL5

UACC: Línea celular de melanoma UACC257

ESC: Célula madre embrionaria humana

T24: Línea celular de cáncer de vejiga

LNCaP, PC3: Líneas celulares de cáncer de próstata

¡Muchas gracias por vuestra atención!

¿Preguntas?



Maria Méndez-Lago

Team Leader Single Cell Genomics

**Centro Nacional de Análisis
Genómico (CNAG)**

mmendezlago@pcb.ub.es