

ATBC - BIO-INFORMATICA - OPSGEM - GENETICA

BIO-INFORMATICA

OPSPOREN VAN GENETISCHE MUTATIES BIJ ERFELIJKE
ZIEKTES

GENOME SEQUENCING
GENOME ASSEMBLIES
GENOME VIEWERS

OVERZICHT BI2B BIOINFORMATICA

Week	Onderwerpen theorieles	Onderwerpen werkcollege
1	Introductie, biologische databases	Stamboom analyse, zoeken in OMIM
2	PCR, primer design, primer eigenschappen	Zoeken in NCBI, gen naar mRNA sequentie, primer design
3	Gelelektroforese, Sanger sequencing, genstructuur, genetische varianten	Tools voor primer design en primer analyse, blast resultaten primer analyse, bekende mutaties op het kandidaatgen
4	Introductie + toepassingen next generation sequencing & third generation sequencing, genome assemblies, genome browsers	Primer design, zoeken naar RP genen in genome browsers
5	Genetische markers, mutaties & genetische varianten	Targeted next generation sequencing data analyse, weektaak doornemen
6	Onderzoek doornemen, oefenen met de stof	Exome sequencing data analyse
7	Oefentoets, vragen	Oefentoets thematoets, weektaak afmaken, vragen

DOELEN

Na deze week:

- Kan je verschillende sequencing methoden benoemen
- Weet je hoe de sequentie van genomen bepaald wordt
- Weet je verschillende toepassingen van sequencing methoden
- Weet je wat genome assemblies, genome builds en referentie genomen zijn
- Kun je gebruik maken van genome browsers

LEERMIDDELEN

- Pevsner, *Bioinformatics and functional genomics*, third edition, Hoofdstuk 9, pagina 382-384, 387
Hoofdstuk 20, 966-968
- Campbell, *Biology*, twelfth edition, Paragraaf 19.1, Paragraaf 15.3 & paragraaf 20.1
- Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet*. 2016 May 17;17(6):333-51. doi: 10.1038/nrg.2016.49. PMID: 27184599.

AGENDA

- Herhaling week 3
- Huiswerk bespreken
- Spacerace
- Weektaak 1 t/m 4
- Genome sequencing
- Genome assemblies
- Genome browsers

HERHALING WEEK 3

- Gelelektroforese:
 - Methode om moleculen op grootte te scheiden
 - Gel waar elektrisch veld op wordt gezet
 - Negatief geladen moleculen bewegen naar positieve pool
 - DNA ladder om grootte DNA fragment te bepalen
- Sanger sequencing:
 - Maakt gebruik van ddNTPs met fluorescerend label
 - Wanneer polymerase er een ddNTP in zet stopt de reactie. Er kans geen dNTP meer aan gezet worden door polymerase chain termination
 - Volgorde van fluorescerende kleuren geeft volgorde van DNA
- Genstructuren bepalen aan de hand van annotatie

AGENDA

- Herhaling week 3
- Huiswerk bespreken
- Spacerace
- Weektaak 1 t/m 4
- Genome sequencing
- Genome assemblies
- Genome browsers

OPDRACHT

Teken de structuur van het coagulation factor IX (F9) gen.
Geef in je tekening de volgende onderdelen aan (geef ook het getal van de positie):

- Exonen
- Intronen
- Positie transcriptie start en stop
- Positie translatie start en stop
- Positie 5' en 3' UTR

Teken de structuur aan de hand van de annotatie die je kan vinden over het F9 gen in de RefSeq database:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NG_007994.1

EXTRA OEFENOPDRACHT (HUISWERK)

Teken de structuur van hemoglobine subunit gamma 2 (HBG2) mRNA. Geef in je tekening de volgende onderdelen aan (geef ook het getal van de positie):

- Coderende sequentie (CDS)
- Exonen
- Positie translatie start en stop
- Positie 5' en 3' UTR

Teken de structuur aan de hand van de annotatie die je kan vinden over het HBG2 mRNA in de RefSeq database:

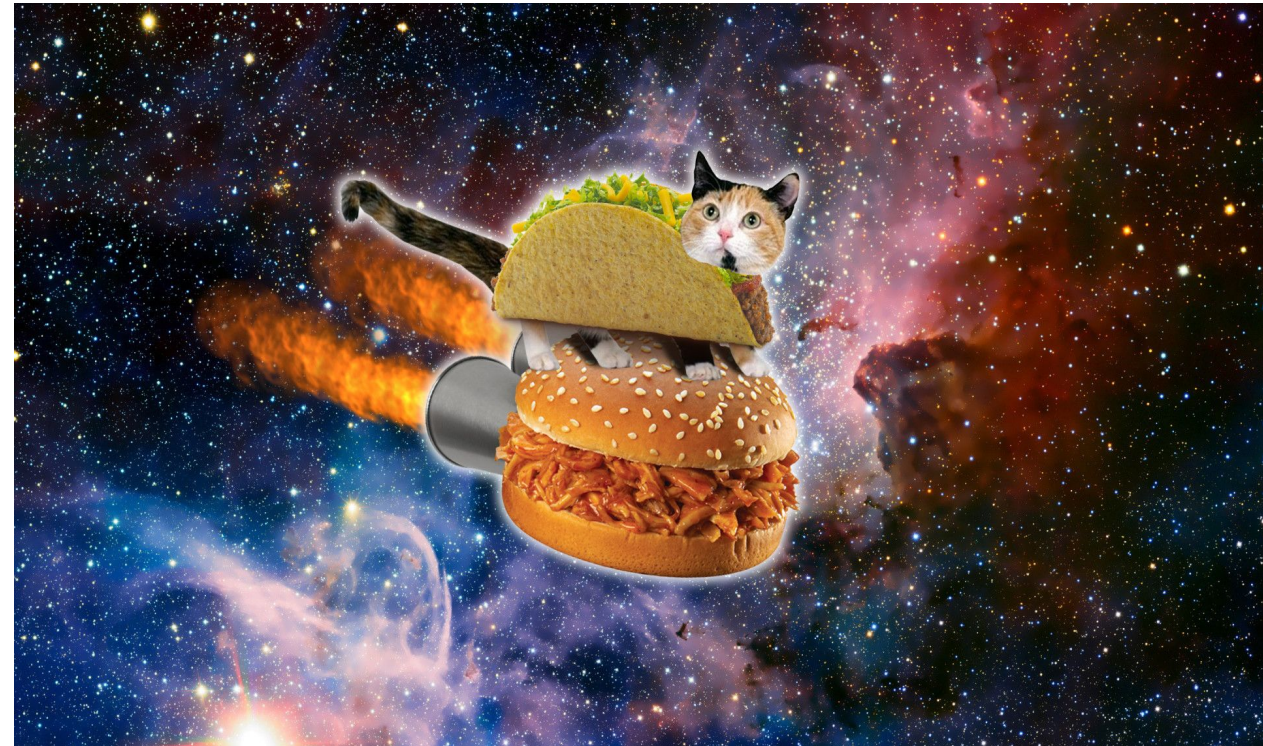
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_000184.3

AGENDA

- Herhaling week 3
- Huiswerk bespreken
- **Spacerace**
- Weektaak 1 t/m 4
- Genome sequencing
- Genome assemblies
- Genome browsers

SPACE RACE

- Maak koppels
- Ga naar:
<https://b.socrative.com/login/student/>
- Room name: BIOINF2
- Verzin een fancy teamnaam,
en roep je kleur
- Begin met de race!



<https://wallpaperaccess.com/space-cat>, 11-12-2021

* Het gaat niet op tijd. Het koppel dat de meeste vragen goed beantwoord en het verste komt wint de race!

AGENDA

- Herhaling week 3
- Huiswerk bespreken
- Spacerace
- **Weektaak 1 t/m 4**
- Genome sequencing
- Genome assemblies
- Genome browsers

PETRA DIAGNOSTICEREN: WELKE ZIEKTE, WELK GEN, WELKE MUTATIE



- Stamboom analyse
- Diagnose erfelijke ziekte Petra

- Kandidaat gen kiezen
- Primer design (handmatig) voor amplificatie van kandidaat gen

- Primer design (m.b.v. tools) voor amplificatie van kandidaat gen
- Uitzoeken van bekende mutaties in het kandidaatgen

Onderzoek naar één enkel kandidaat gen

PETRA DIAGNOSTICEREN: WELKE ZIEKTE, WELK GEN, WELKE MU



Week 4

- Structuur van genen die te maken hebben met Petra's ziekte onderzoeken
- Verdiepen in genetische variatie en de effecten van variatie

Onderzoek naar alle genen die te maken hebben met de ziekte van Petra

AGENDA

- Herhaling week 3
- Huiswerk bespreken
- Spacerace
- Weektaak 1 t/m 4
- **Genome sequencing**
- Genome assemblies
- Genome browsers

We hebben nu geleerd hoe we m.b.v. PCR en Sanger sequencing een klein stuk target DNA kunnen sequencen.

Maar hoe sequencen we nu een heel genoom of exoom?

DNA SEQUENCING METHODEN

DNA sequencing kan gedaan worden met één van de volgende sequencing methoden:

- Sanger sequencing
- Next generation sequencing
- Third generation sequencing

NEXT GENERATION SEQUENCING

- Methode om met **hoge snelheid** en **throughput parallel DNA te sequencen**
- Resulteert in **korte reads** (~35 – 150 nt)
- Een **read** is een kort stukje DNA-volgorde dat wordt verkregen tijdens sequencing

Stappen:

1. DNA wordt gefragmenteerd
2. DNA fragmenten worden geamplificeerd m.b.v. PCR
3. DNA fragmenten worden parallel gesequenced

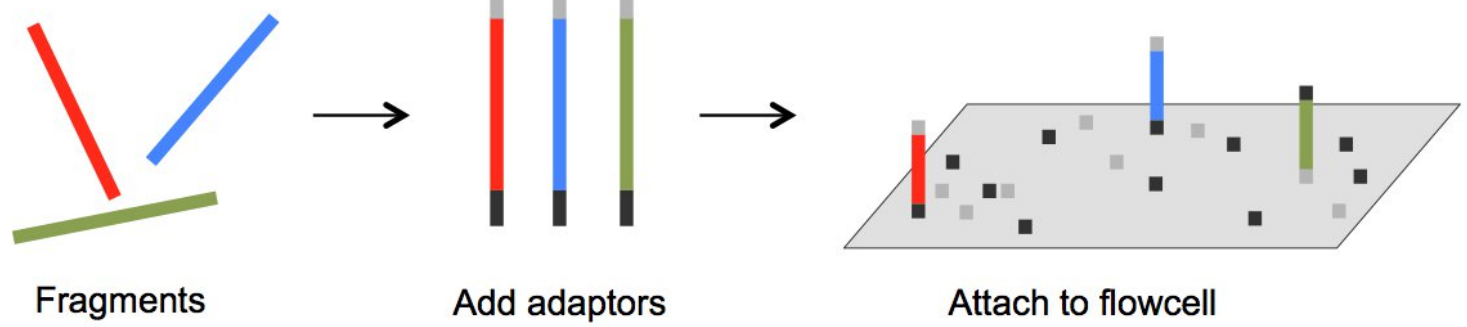
NEXT GENERATION SEQUENCING PLATFORMS*

* Sneak preview Genomics jaar 2

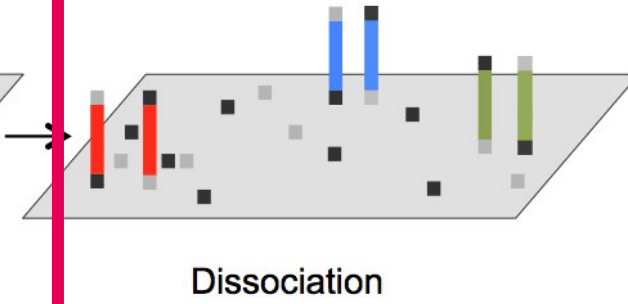
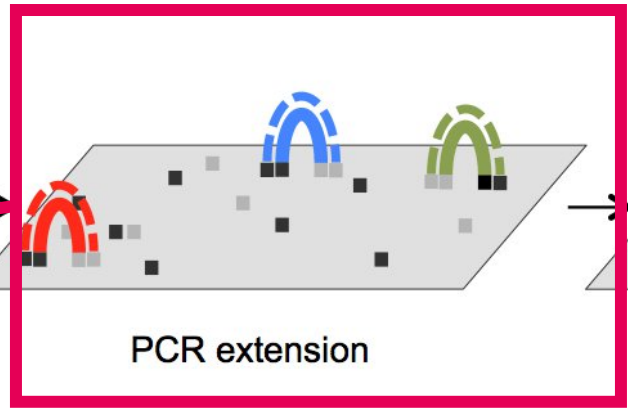
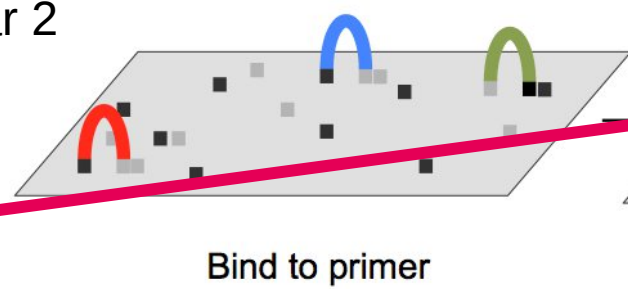
	2 nd generation sequencing	
	Ion Torrent	Illumina
DNA amplificatie methode	emulsion PCR	solid-phase bridge amplification
Sequencing methode	sequencing by synthesis using proton detection	sequencing by synthesis using reversible terminators

NEXT GENERATION SEQUENCING MET ILLUMINA*

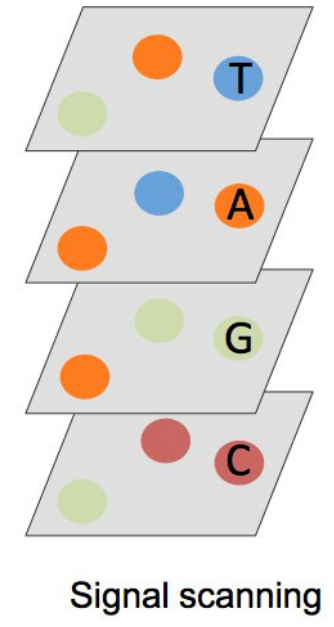
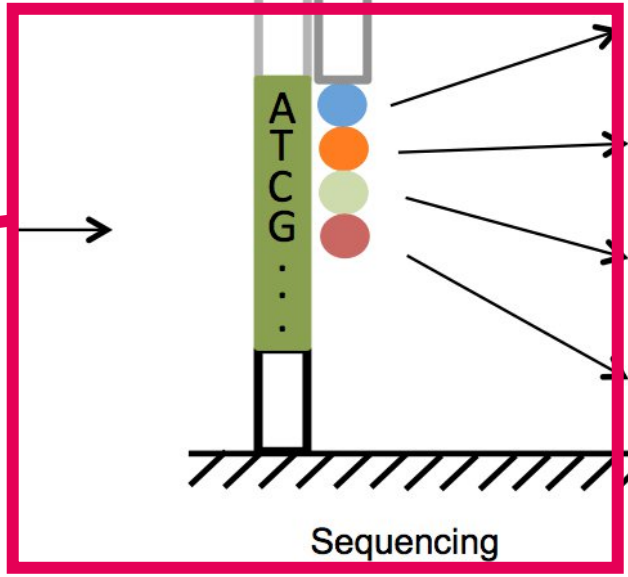
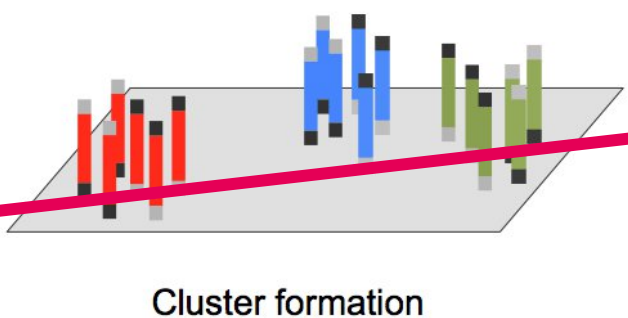
* Sneak preview Genomics jaar 2



Amplificatie van DNA met PCR



Sequencing van DNA



THIRD GENERATION SEQUENCING

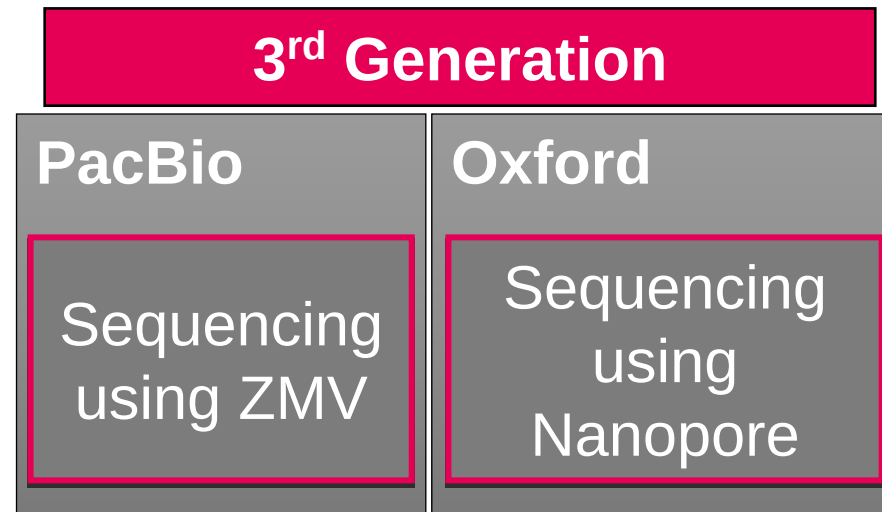
- Methode om met **hoge snelheid** en **throughput parallel DNA te sequencen**
- Resulteert in **langere reads** (~ 20.000 – 200.000 nt)
- Een **read** is een kort stukje DNA-volgorde dat wordt verkregen tijdens sequencing

Stappen:

1. DNA wordt gefragmenteerd
2. DNA fragmenten worden parallel gesequenced

THIRD GENERATION SEQUENCING PLATFORMS

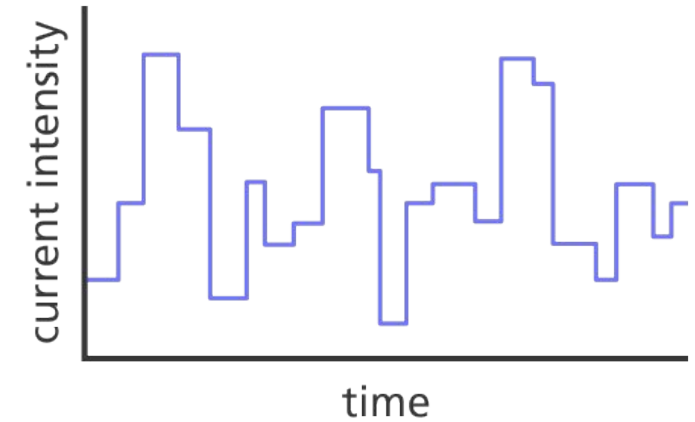
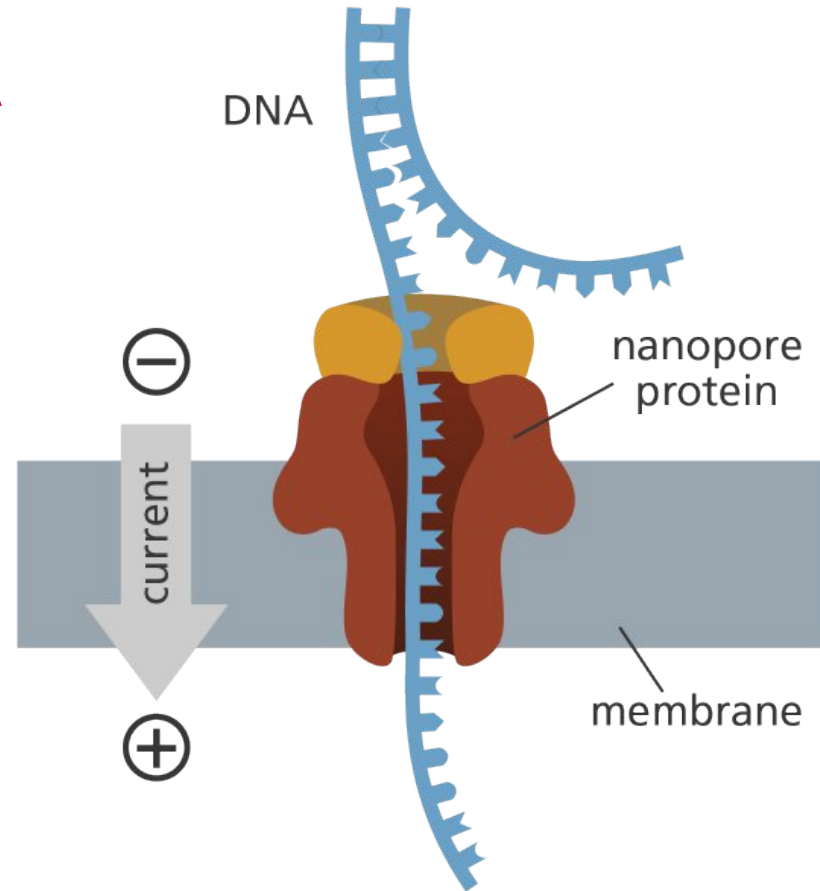
* Sneak preview Genomics jaar 2



à Geen PCR
amplificatie nodig

THIRD GENERATION SEQUENCING MET NANOPORE*

* Sneak preview Genomics jaar 2



ACTGCT ...

HAN UNIVERSITY
OF APPLIED SCIENCES

TOEPASSINGEN NGS EN THIRD GENERATION SEQUENCING

Toepassingen (o.a.):

- Whole Genome Sequencing (WGS)
- Whole Exome Sequencing (WES)
- Targeted genome sequencing
- Targeted exome sequencing
- RNA sequencing

NU HEBBEN WE READS... EN DAN?

Reads zijn de bouwstenen van het sequencingproces en moeten worden samengevoegd om een volledig overzicht van een (deel van een) genoom/exoom/transcriptoom krijgen.

Er zijn twee manieren om aan de sequentie van een genoom te komen:

- Door assembleren van reads tot een genoom: **read assembly**
- Door het mappen van je reads tegen een referentie genoom: **read mapping**

AGENDA

- Herhaling week 3
- Huiswerk bespreken
- Spacerace
- Weektaak 1 t/m 4
- Genome sequencing
- **Genome assemblies**
- Genome browsers

GENOME ASSEMBLY

De reads worden **geassembleerd** tot één **consensus sequentie**



GENOME ASSEMBLY

- Wordt bijvoorbeeld gedaan wanneer het genoom van een soort nog niet in kaart is gebracht.
- Maar wat als het genoom van een soort al wel in kaart is gebracht?

MAPPING VAN READS TEGEN EEN REFERENTIE GENOOM

De reads worden gealigned tegen het referentie genoom

Referentie genoom

ATCGCGGCACCTGTCGTGTGTAGAACCTAACTAACGACCTTTATCGTATGCATCCA

Reads

ATCGCGGGCA GTCGTGTGTAG CTACTGACCT
GCGGGCACCT CTGTAGAACCT GACGACCTTTA
CCTGTCGTGTG ATCGTATGCAT

REFERENTIE GENOOM

- Referentie genoom:
DNA-sequentie die het genoom van een soort het beste representeert
- Referentie genomen zijn verkregen d.m.v. **genome assembly**

REFERENTIE GENOOM

Er zijn meerdere versies van het humane genoom.

Humane genome builds/genome assemblies/referentie genomen:

Naam	Datum van uitgave	Gelijkwaardige UCSC versie
T2T	2022	
GRCh38	2013	hg38
GRCh37	2009	hg19
NCBI Build 36.1	2006	hg18
NCBI Build 35	2004	hg17
NCBI Build 34	2003	hg16

GENETISCHE VARIATIE

Reads mappen tegen een genoom helpt ook om **genetische variatie** in het gesequencede DNA te vinden.



AGENDA

- Herhaling week 3
- Huiswerk bespreken
- Spacerace
- Weektaak 1 t/m 4
- Genome sequencing
- Genome assemblies
- **Genome browsers**

GENOME BROWSERS

- **Genome browsers**: grafische interface voor het **visualiseren** van **genomische data** uit een biologische database.
- Visualiseren **sequentie informatie** en andere informatie zoals bijvoorbeeld **positie en structuur van genen** en **genetische variatie** (oftewel annotatie).
- UCSC Genome Browser: <https://genome-euro.ucsc.edu/>
- ENSEMBL genome browser: <http://www.ensembl.org/>
- NCBI Genome data viewer: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/>

BRONNEN

- Pevsner, *Bioinformatics and functional genomics*, Wiley-Blackwell, third edition
- Campbell, *Biology*, Pearson, twelfth edition
- Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet*. 2016 May 17;17(6):333-51. doi: 10.1038/nrg.2016.49. PMID: 27184599.

VERANTWOORDING

- In deze uitgave is géén auteursrechtelijk beschermd werk opgenomen
- Alle teksten © Emma Vos en © Ingrid Paffen / HAN tenzij expliciet externe bronnen zijn aangegeven
- Screenshots op basis van eigen werk auteur en/of vernoemde sites
- Eventuele images zijn opgenomen met vermelding van bron