

II Ежегодный Конгресс Ассоциации Онкопатологов

Безальтернативность NGS в ДНК-диагностике факоматозов



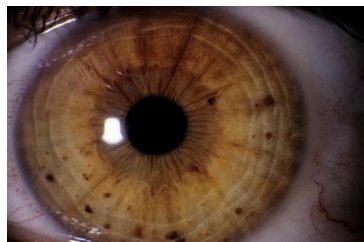
Стрельников Владимир Викторович
ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»

phacomatoses;
греч. phakos - чечевица, родимое пятно

- Группа наследственных, прогрессирующих заболеваний, характеризующихся сочетанным поражением кожи, глаз, нервной системы и внутренних органов
- Ассоциированы с доброкачественными и злокачественными опухолями
- Наиболее известные:
 - **нейрофиброматоз** – гены *NF1*, *NF2*
 - **туберозный склероз** – гены *TSC1*, *TSC2*

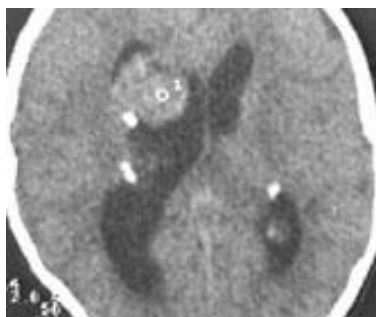
Нейрофиброматоз

- множество светло-коричневых пятен на коже (от 5 до 20 мм)
- нейрофибромы
- гиперпигментация
- глиомы зрительных нервов
- гамартома радужки (узелки Лиша)
- костные аномалии



Туберозный склероз

генетически детерминированное заболевание, причиной которого являются мутации в генах супрессоров опухолевого роста *TSC1* и *TSC2*



Факоматозы

- **нейрофиброматоз I типа** (болезнь Реклингхаузена)
- **нейрофиброматоз II типа**
- **туберозный склероз** (болезнь Бурневилля-Прингла)
- синдром Стерджа-Вебера (энцефалотригеминальный ангиоматоз)
- синдром Клиппеля-Треноне-Вебера (гипертрофическая гемангиэктазия)
- атаксия-телеангиэктазия (синдром Луи-Бар)
- **болезнь Гиппеля-Линдау** (ретиноцеребровисцеральный ангиоматоз)
- болезнь Ослера-Рандю-Вебера (наследственная геморрагическая телеангиэктазия)
- другие

Сложности ДНК-диагностики факоматозов

- Несколько генов для одной болезни, например:
нейрофиброматоз – NF1, NF2;
туберозный склероз – TSC1, TSC2.
- Гены большого размера:
NF1 + NF2 = 72 экзона,
TSC1 + TSC2 = 63 экзона.
- Отсутствие «горячих точек»
- Стоимость анализа секвенированием по Сэнгеру («золотой стандарт» поиска мутаций) может превысить 100000 рублей.
- Вывод:
требуется подход, позволяющий одновременно секвенировать гены целиком
чтобы повысить доступность и сократить время выполнения анализа.

Сложности ДНК-диагностики факоматозов

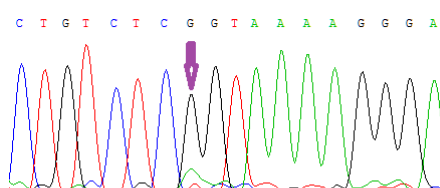
- Высокая частота случаев мозаичных мутаций:
NF1 – 10%,
NF2 – 30%,
TSC1/2 – 10%.

(Традиционное секвенирование ДНК по Сэнгеру не позволяет надежно выявлять минорные клоны, представленные в <20% материала).

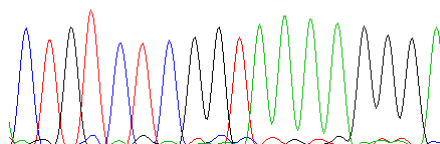
- Множество псевдогенов NF1

Пример. Мозаичная мутация при туберозном склерозе. Секвенирование по Сэнгеру.

- ДНК больного

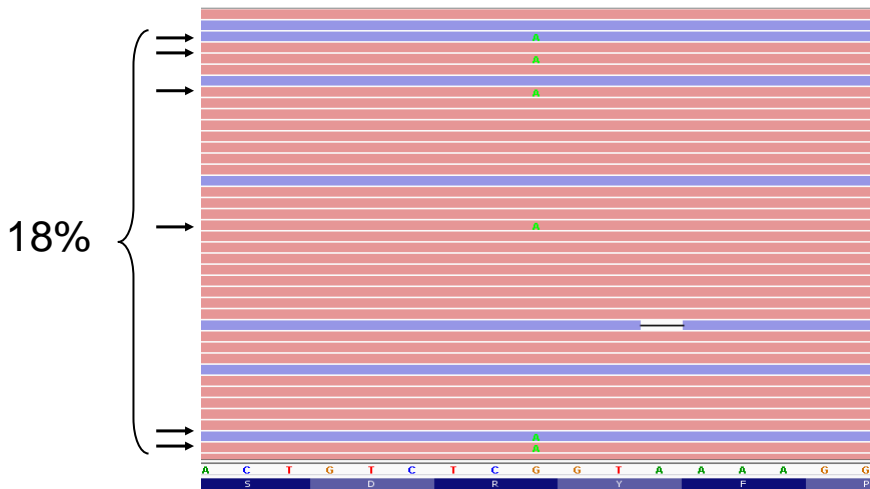


- Контрольная ДНК



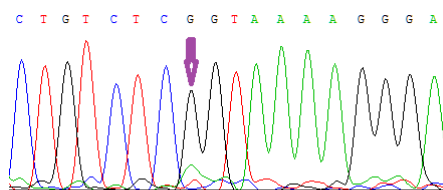
- Мутация или технический шум?

Проблема выявления мозаичных мутаций решается только индивидуальным секвенированием множества молекул ДНК образца по отдельности (высокопроизводительное параллельное секвенирование)

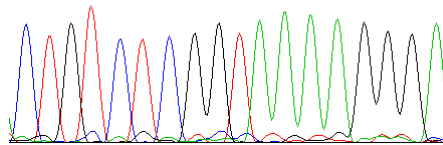


Пример. Мозаичная мутация при туберозном склерозе. Секвенирование по Сэнгеру.

• ДНК больного



• Контрольная ДНК



• Мутация или технический шум?

Высокопроизводительное параллельное секвенирование ДНК

- Одновременный поиск мутаций в значительном количестве генов
- Фильтрация последовательностей псевдогенов в процессе выравнивания прочтений



Personal Genome Machine (PGM)

- Каждая молекула ДНК анализируется индивидуально, что обеспечивает эффективное выявление минорных клонов (мозаичных мутаций)

Область применения специализированных панелей NGS в КЛД

Таргетное секвенирование (специализированные панели):

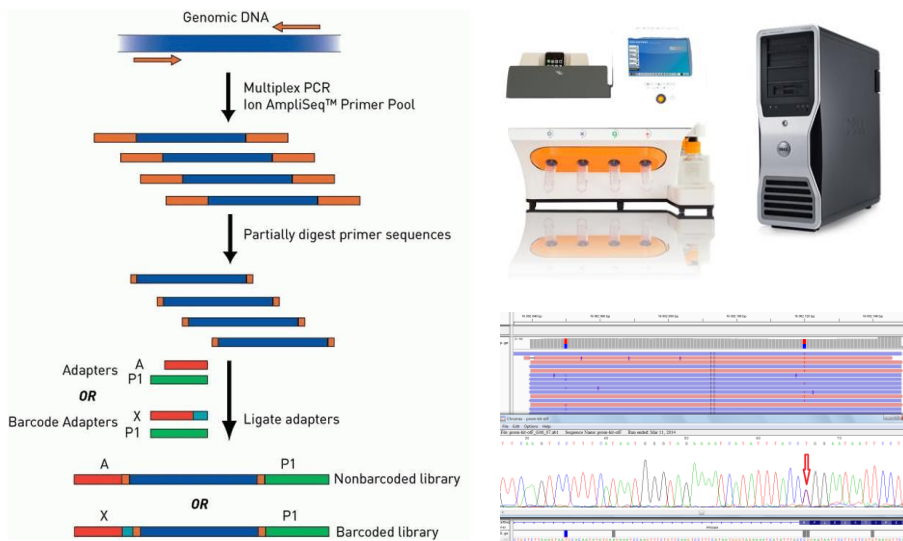
- проще
- быстрее
- дешевле
- надёжнее

Экзомное секвенирование (полный или клинический экзом):

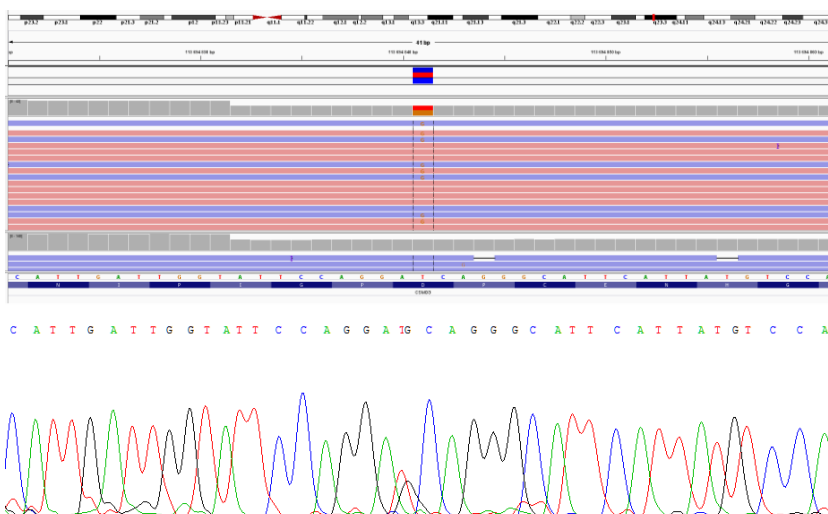
- сложнее
- дольше
- дороже
- вопросы к ширине покрытия

Специализированные панели идеальны для скрининга генных мутаций в диагностике наследственных болезней, обусловленных мутациями в 1 – 10/20 генах.

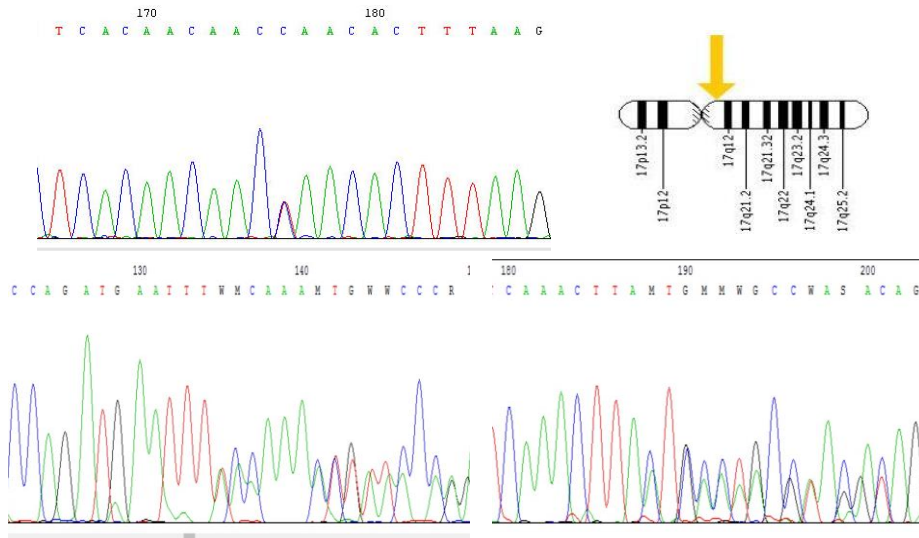
Технология Ampliseq



Поиск и валидация мутаций использование независимых пар праймеров



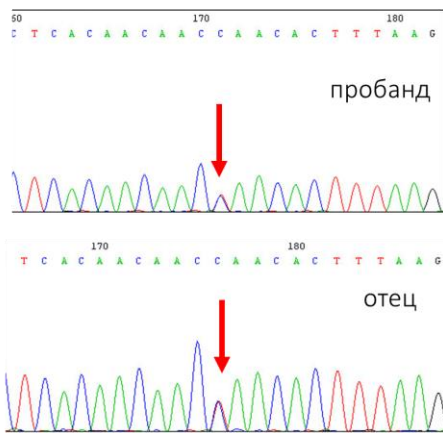
Мутации в гене *NF1*



Семейные случаи

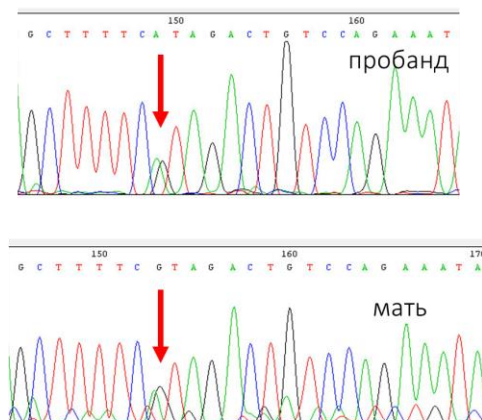
1.

c.1174C>T, p.Q392X

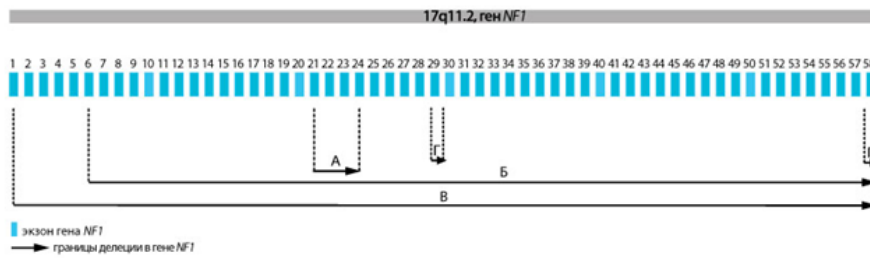


2.

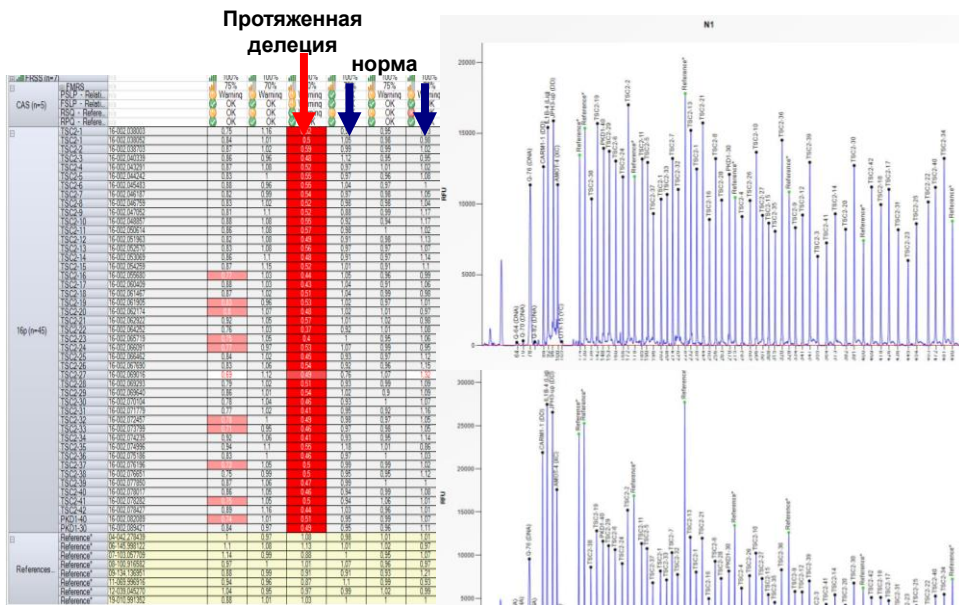
c.C910T, p.R304X



Границы делеций NF1



Исследование протяженных делеций методом MLPA



Делеции NF1

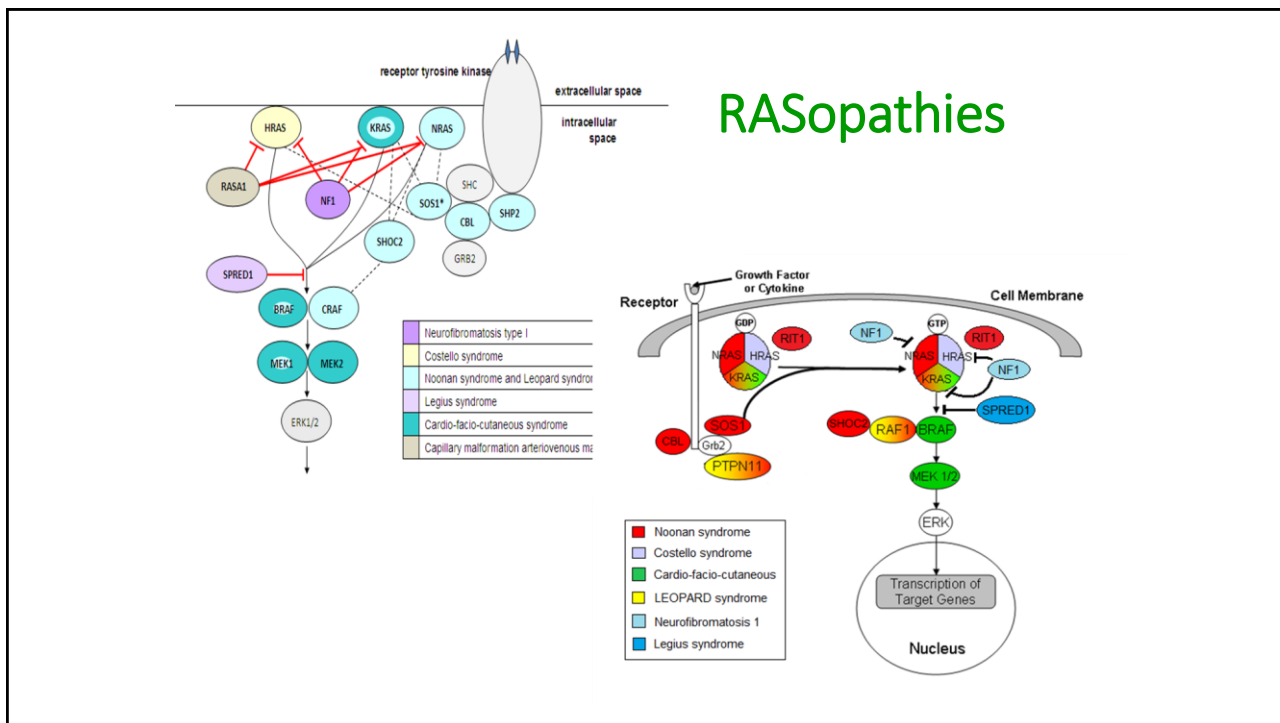
Протяженная
Делеция 3 экзонов
делеция норма

- у 14 из 97 больных определены делеции гена NF1:
- ✓ 10 протяженных делеций гена NF1
- ✓ 1 протяженная делеция 21-24 экзонов
- ✓ 1 протяженная делеция 6-58 экзонов
- ✓ 2 делеции 1 экзона (29 и 58 эксон)

ratio overview		statistics	chart statistics	Probe target info					
				Amp	Positiv	Reference	Sample		
				397	370	502	N1	N2	
FRSS (n=7)				35%	30%	100%	100%	36%	60%
CAS (n=5)				Warning	Warning	Warning	Warning	Warning	Warning
NF1-upstream				1.1	0.8	0.8		1.1	1.1
NF1-1	17:025 442712	1.21	0.52	0.8	0.8	1.2	1.2	1.06	
NF1-2	17:025 507125	0.88	0.46	0.84	0.94	1.03	1.04	1.04	
NF1-4	17:025 514364	0.74	0.49	0.91	1.06	1.06	1.04	1.04	
NF1-6	17:025 532562	1	0.8	0.85	1.19	1.05	1.01	1.01	
NF1-7	17:025 532822	0.83	0.52	1	1	1	1.01	1.01	
NF1-11	17:025 552883	0.95	0.6	0.84	1.12	1.09	1.09	1.09	
NF1-13	17:025 565542	0.84	0.46	1.22	0.96	0.96	0.96	0.96	
NF1-15	17:025 572706	0.91	0.62	0.94	1.03	1.04	1.04	1.04	
NF1-17	17:025 576310	1.06	0.64	0.94	1.03	1.04	1.04	1.04	
NF1-18	17:025 577745	0.93	0.62	0.88	1.12	1.03	1.03	1.03	
NF1-21	17:025 580477	0.47	0.52	0.97	1.03	1.01	1.01	1.01	
NF1-23	17:025 581431	0.65	0.54	0.97	1.07	0.97	0.97	0.97	
NF1-23	17:025 581674	0.55	0.56	0.93	1.05	1.01	1.01	1.01	
NF1-24	17:025 581917	0.34	0.5	1.2	0.88	0.97	0.97	0.97	
NF1-26	17:025 583936	0.91	0.58	0.95	1.07	0.95	0.95	0.95	
NF1-28	17:025 588623	0.68	0.45	0.75	1.26	1.13	1.13	1.13	
NF1-29	17:025 587096	1.13	0.64	0.88	1.12	1.04	1.04	1.04	
NF1-32	17:025 605504	1.04	0.53	0.84	1.16	1.05	1.05	1.05	
NF1-35	17:025 612984	0.88	0.41	0.95	1.05	1.01	1.01	1.01	
OMC-2	17:025 641955	1.31	0.55	1	0.93	1.09	1.09	1.09	
NF1-37	17:025 672111	1.04	0.62	0.87	1.18	0.99	0.99	0.99	
NF1-37	17:025 681489	0.96	0.62	0.81	1.22	1.06	1.06	1.06	
NF1-41	17:025 687519	1.36	0.51	0.82	1.16	1.01	1.01	1.01	
NF1-42	17:025 687877	1.12	0.63	0.79	1.16	1.15	1.15	1.15	
NF1-49	17:025 691650	0.68	0.45	1.07	1.03	0.96	0.96	0.96	
NF1-49	17:025 700263	0.83	0.52	0.9	1.09	1.02	1.02	1.02	
NF1-50	17:025 701265	1.39	0.56	0.85	1.08	1.11	1.11	1.11	
NF1-51	17:025 703448	1.41	0.46	0.88	1.1	1.04	1.04	1.04	
NF1-51	17:025 707265	1.41	0.46	0.88	1.1	1.04	1.04	1.04	
NF1-52	17:025 711683	0.95	0.62	0.88	1.09	1.05	1.05	1.05	
NF1-58	17:025 725175	1.29	0.6	0.83	1.09	1.15	1.15	1.15	
NF1-58	17:025 727217	1.1	0.49	0.8	1.1	1.07	1.07	1.07	
NF1-downstr	17:025 735670	1.35	0.45	0.82	1.13	1.12	1.12	1.12	
Reference*	01-199 327271	0.89	1.22	1.08	0.96	0.97	0.97	0.97	
Reference*	05-122 02507	0.93	0.76	0.71	0.96	1.11	1.11	1.11	
Reference*	08-071 232280	1.14	0.79	1.06	0.96	0.96	0.96	0.96	
Reference*	09-078 022269	1.04	1.15	0.89	1.08	1.03	1.03	1.03	
Reference*	10-085 742824	0.97	1.02	0.8	1.22	1.08	1.08	1.08	
Reference*	11-129 263813	1.01	0.93	1.04	0.92	1.05	1.05	1.05	
Reference*	12-032 895032	1.1	1.15	1.02	1	0.98	0.98	0.98	
Reference*	14-026 580319	0.81	0.9	0.97	1.11	1.05	1.05	1.05	
Reference*	16-003 721785	1.19	0.57	1.03	0.94	1.04	1.04	1.04	

Семейная делеция NF1

ratio overview		statistics	Probe target info											
				AllSamples					ReferenceSamp.					
				220d	276	276ote	N1	253		N2				
FRSS (n=7)				90%	75%	100%	100%	100%	100%	0%	45%	100%	95%	OK
CAS (n=5)				War.	War.	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
NF1-upstream				0.59	1.1	0.58	0.57	0.91	1.08	0.93	0.93	0.93	0.93	0.93
NF1-1	17:025 445712	0.53	0.76	0.53	0.6	0.94	1.06	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95		
NF1-2	17:025 507125	0.51	0.84	0.55	0.53	1.09	0.93	1.01	1.01	1.01	1.01	1.01		
NF1-4	17:025 514364	0.54	1.08	0.58	0.55	1.12	0.95	1.05	1.05	1.05	1.05	1.05		
NF1-6	17:025 532562	0.95	0.78	0.95	0.92	1.04	0.96	1.04	1.04	1.04	1.04	1.04		
NF1-7	17:025 532822	0.54	0.98	0.57	0.49	1.16	0.94	1.07	1.07	1.07	1.07	1.07		
NF1-11	17:025 552883	0.58	0.87	0.58	0.53	1	0.95	1.05	1.05	1.05	1.05	1.05		
NF1-13	17:025 565542	0.48	0.84	0.54	0.52	1.19	0.95	1.05	1.05	1.05	1.05	1.05		
NF1-15	17:025 572706	0.5	0.79	0.53	0.5	1.14	1.03	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97		
NF1-17	17:025 576310	0.5	1.04	0.49	0.47	1.1	0.96	1.05	1.05	1.05	1.05	1.05		
NF1-18	17:025 577745	0.54	1.23	0.5	0.5	0.99	0.93	1.08	1.08	1.08	1.08	1.08		
NF1-21	17:025 580477	0.49	1.17	0.54	0.52	1.26	0.9	1.12	1.12	1.12	1.12	1.12		
NF1-23	17:025 581431	0.52	0.97	0.53	0.49	0.99	0.93	1.02	1.02	1.02	1.02	1.02		
NF1-23	17:025 581674	0.51	1.31	0.59	0.53	1.27	0.87	1.17	1.17	1.17	1.17	1.17		
NF1-24	17:025 581917	0.6	0.92	0.58	0.51	1.4	0.86	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2		
NF1-26	17:025 583936	0.55	1.04	0.55	0.52	1.02	0.98	1.02	1.02	1.02	1.02	1.02		
NF1-28	17:025 588623	0.53	1.11	0.58	0.56	1	1.05	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95		
NF1-29	17:025 587096	0.51	1.25	0.54	0.51	0.97	1.02	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98		
NF1-32	17:025 605504	0.57	1.11	0.59	0.55	1.02	1.02	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98		
NF1-35	17:025 612984	0.58	1.3	0.63	0.56	1	0.96	1.04	1.04	1.04	1.04	1.04		
OMC-2	17:025 641955	0.52	0.88	0.5	0.48	1	1.03	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97		
NF1-39	17:025 672111	0.59	1.14	0.57	0.55	0.96	0.86	1.05	1.05	1.05	1.05	1.05		
NF1-39	17:025 681489	0.49	1.23	0.54	0.53	1.08	0.98	1.02	1.02	1.02	1.02	1.02		
NF1-41	17:025 687519	0.59	1.23	0.58	0.51	0.99	1.06	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95		
NF1-42	17:025 687877	0.47	1.23	0.53	0.49	1.07	0.95	1.05	1.05	1.05	1.05	1.05		
NF1-47	17:025 691650	0.57	1.05	0.6	0.52	1.1	1.01	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99		
NF1-49	17:025 691650	0.54	1.06	0.52	0.52	0.94	0.97	1.03	1.03	1.03	1.03	1.03		
NF1-50	17:025 701265	0.59	0.94	0.55	0.53	0.9	1	1.01	1.01	1.01	1.01	1.01		
NF1-51	17:025 703448	0.55	1.29	0.57	0.54	0.99	1.04	0.96	0.96	0.96	0.96	0.96		
NF1-52	17:025 707265	0.52	1.46	0.5	0.49	0.95	0.93	1.01	1.01	1.01	1.01	1.01		
NF1-57	17:025 711683	0.98	1.01	0.83	0.8	0.98	0.98	1.02	1.02	1.02	1.02	1.02		
NF1-58	17:025 725175	0.57	1.04	0.51	0.55	0.79	1.07	0.94	0.94	0.94	0.94	0.94		
NF1-58	17:025 727217	0.57	1.3	0.6	0.57	0.91	1.08	0.93	0.93	0.93	0.93	0.93		
NF1-downstr	17:025 735670	0.61	0.74	0.58	0.5	0.88	1.21	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95		
Reference*	01-199 327271	1	0.57	0.91	1.02	1.02	1.02	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98		
Reference*	02-189 572635	0.96	1.11	1.03	0.97	1.03	1	1	1	1	1	1		
Reference*	05-122 027607	1.04	1.25	1.03	1	1.05	0.99	1.01	1.01	1.01	1.01	1.01		
Reference*	08-071 232280	0.93	0.84	0.95	0.98	0.98	0.98	1.02	1.02	1.02	1.02	1.02		
Reference*	09-078 022269	1.07	1.17	1	0.98	0.94	0.97	1.03	1.03	1.03	1.03	1.03		
Reference*	10-053 744834	0.96	0.87	1.01	0.97	1.01	0.99	1.01	1.01	1.01	1.01	1.01		
Reference*	11-129 263813	1.02	0.88	1.07	1.03	0.97	0.98	1.02	1.02	1.02	1.02	1.02		
Reference*	12-032 895032	1.01	0.92	1.02	0.96	1.17	1.02	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98		
Reference*	14-076 840813	0.99	1.08	0.99	1.04	0.96	1.04	0.96	0.96	0.96	0.96	0.96		
Reference*	16-003 721785	1.04	0.4	0.9	0.85	0.88	1.05	0.96	0.96	0.96	0.96	0.96		
Reference*	18-045 659444	0.95	0.99	1.02	1.01	1.1	1.01	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99		



Благодарю за внимание!