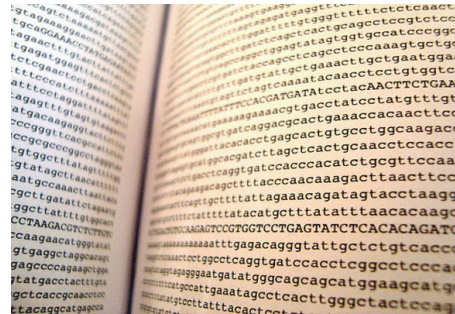


Методы секвенирования следующего поколения (NGS) в изучении структуры злокачественных опухолей

Кекеева Т.В.

Лечебно-реабилитационный центр Минздрава России
Медико-генетический центр

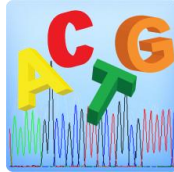
Геном человека



3.4 млрд букв ДНК:

- 127 томов
- 1000 страниц в каждом томе

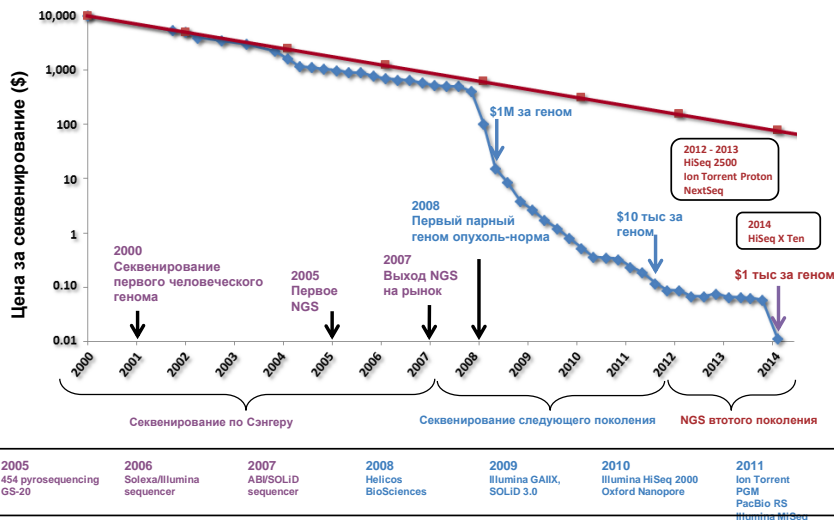
Секвенирование – это определение нуклеотидной последовательности



-- до 2005 года в течение 30 лет единственным методом секвенирования было секвенирование по Сэнгеру

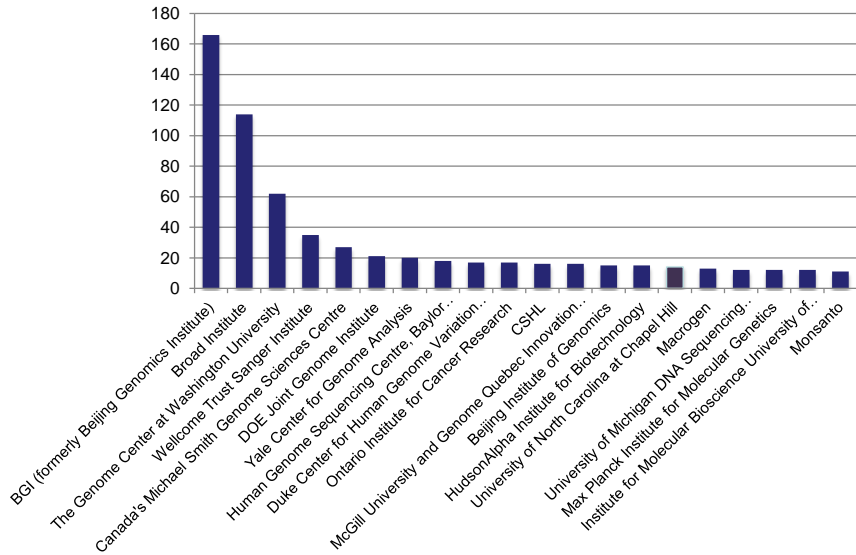
-- остается золотым стандартом

Снижение цены NGS (next generation sequencing) исследований продолжается.







MacConaill LE. Existing and emerging technologies for tumor genomic profiling. *Journal of Clinical Oncology*, 31(15), 1815-1824 (2013).

Крупнейшие мировые центры NGS



<http://topsequence500.org/>

Три основных платформы секвенирования следующего поколения

ROCHE	 GS FLX+ 454	 GS Junior 454		
Illumina	 NextSeq500	 HiSeq 2500	 HiSeq X-Ten (exp.2014)	 MiSeq
Life Technologies	 SOLID5500xl	 IonProton	 IonPGM	

Этапы NGS



Оценка опухолевого материала

Подготовка библиотеки

Секвенирование

Анализ данных

Для успешного проведения NGS необходима команда

Патологи

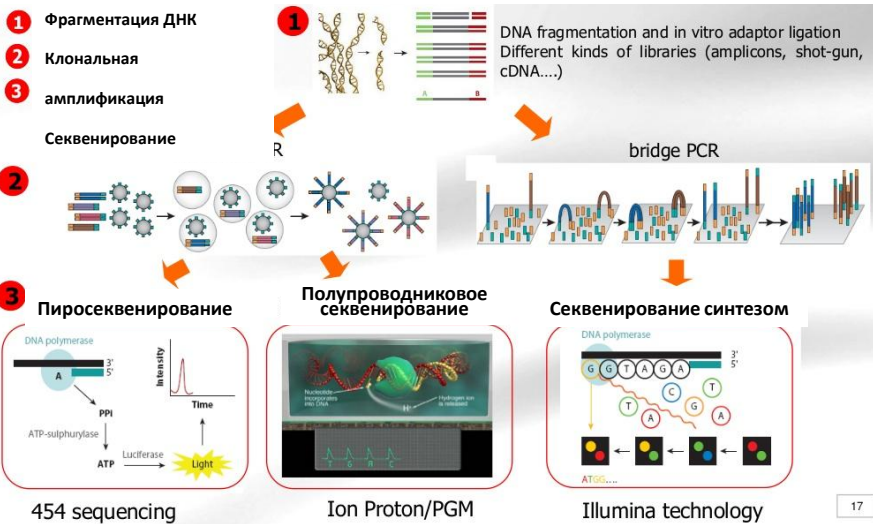


Молекулярные генетики

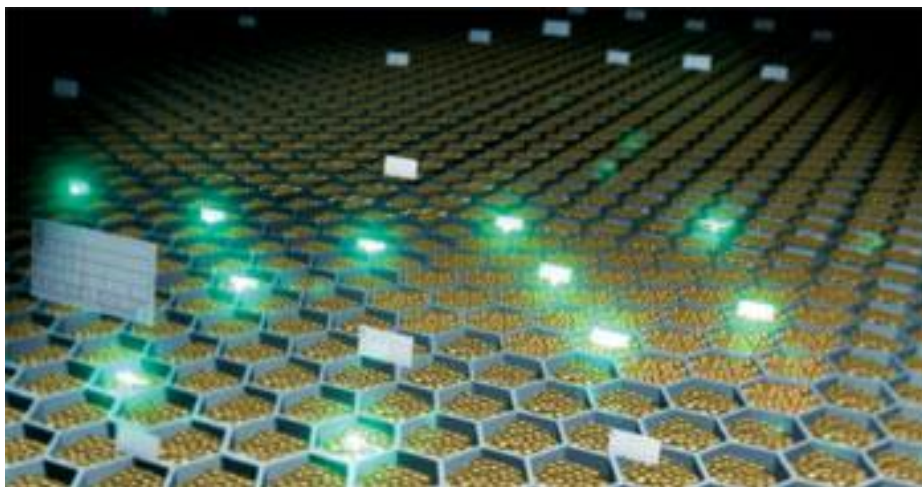


Биоинформатики

Основные подходы к секвенированию



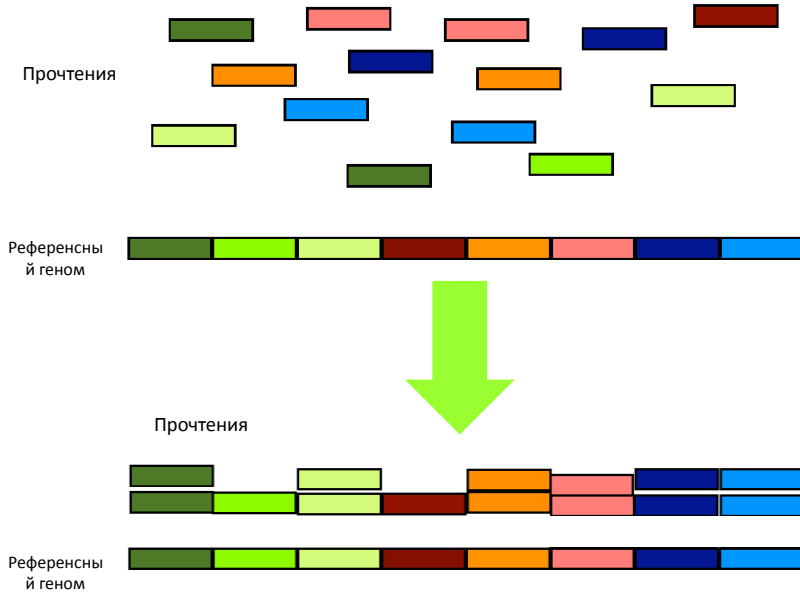
Миллионы прочтений, миллиарды пар оснований



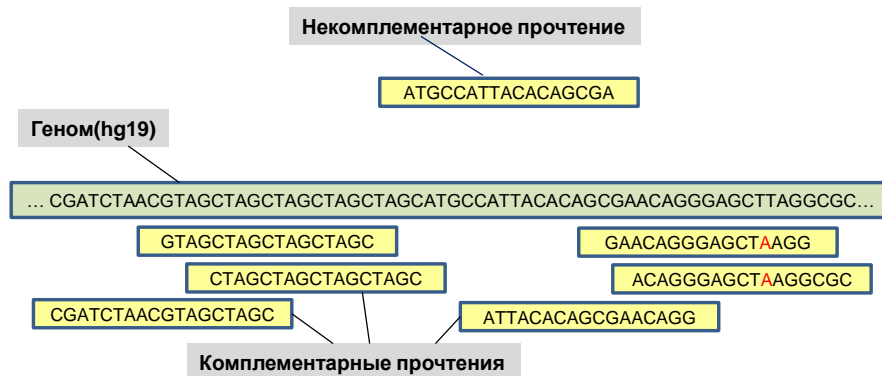
Биоинформатический анализ данных

- Анализ качества прочтений
- Картирование
- Поиск изменений (вариаций)
- Аннотирование выявленных вариаций
- Определение клинической значимости мутаций

Картирование на геном

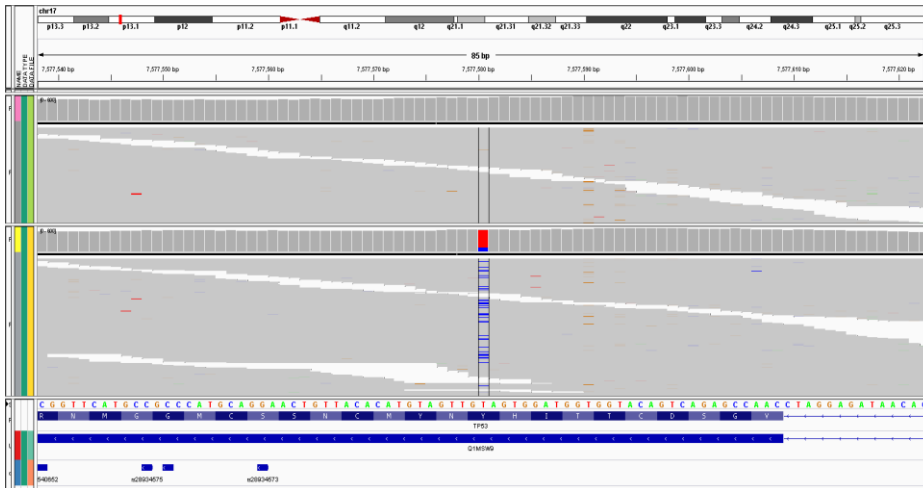


Пример картирования



- Существуют программы картирования со скоростью определения местоположения примерно 25 млн прочтений по 35 букв в час.

Поиск вариаций и аннотирование мутаций



Определение клинической значимости мутаций

Большое количество вариантов с неизвестной клинической значимостью

Какие варианты значимы?

Разработка новых подходов к оценке для более точного расчета риска

Вероятность переоценки с неоправданными медицинскими вмешательствами

Тщательная селекция пациентов для проведения NGS

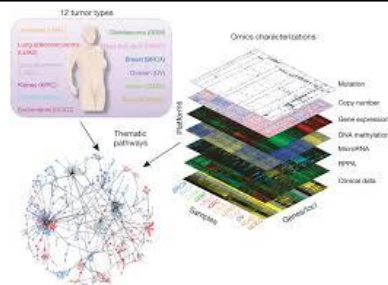
Задачи в онкологии, решаемые с помощью NGS-технологий

- Определение молекулярного профиля опухолей
- Определение потенциальных мишеней для таргетной терапии
- Дифференциальная диагностика опухолей без первично выявленного очага
- Поиск наследственных мутаций, обуславливающих онкологический синдром

Виды NGS

- Экзом – кодирующая часть генома, 3% от генома человека.
- Транскриптом – все РНК транскрипты, находящиеся в клетке. Он отличается от экзома, потому что включает только те транскрипты, которые экспрессируются в конкретной ткани или органе.
- Геном – полная совокупность наследственной информации индивидуума.
- Таргетное секвенирование панелей генов, ассоциированных с различными заболеваниями
- Сверхглубокое секвенирование таргетных участков для выявления минорных мутаций (с низким содержанием)

Проект TCGA (The Cancer Genome Atlas)



- комплексная геномная характеристика 33 самых распространенных типов опухолей
- включает 11000 пациентов
- охарактеризованы частоты и типы молекулярных нарушений опухолей
- открыты новые драйверные мутации
- описаны ключевые сигнальные пути
- разработаны эффективные алгоритмы анализа данных
- предложены молекулярные классификации для рака желудка, яичников, предстательной железы

Каждая опухоль содержит два типа мутаций: наследственные и опухоль-специфические (соматические) мутации

- Наследственные вариации определяют предрасположенность к заболеванию, скорость метаболизма препаратов, сопротивляемость организма, иммунитет
- Соматические мутации определяют развитие опухоли и являются мишенями для таргетной терапии

Анализ соматических мутаций клинического экзома рака желудка.

- Панель Trusight One sequencing panel (Illumina), включающая 4813 генов, ассоциированных с известными клиническими заболеваниями на платформе Nextseq500. Анализ данных проводили с использованием стандартных программ BaseSpace.

№	Все вариации	Стадия	Все соматические вариации	Патогенные соматические мутации
1	7704	II	12	2
4	6263	IV	43	13
7	7788	IIIc	20	9
12	8168	IV	12	4
15	7595	IIa	8	0
25	7396	IIIc	8	4

Данные лаборатории молекулярной генетики Лечебно-реабилитационного центра



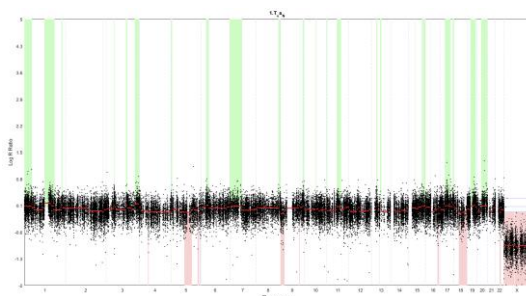
Новые мутации с повреждающим действием в генах, участвующих в канцерогенезе рака желудка

Всего обнаружено 103 соматических мутации, из них 32 были предсказательно повреждающими. 10 мутаций находились в генах, имеющих значение для рака желудка.

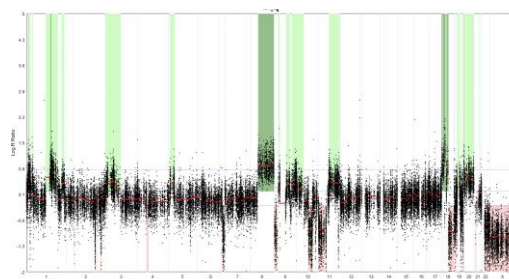
Мутация	Экзонная функция	Ген
c.C4096T:p.Q1366X	Стоп-кодон	<i>ARID1A</i>
c.C1159T:p.H387Y	Несинонимичная замена	<i>LDB3</i>
c.C1219T:p.R407C	Несинонимичная замена	<i>PTPRF</i>
c.T907G:p.Y303D	Несинонимичная замена	<i>ANTXR2</i>
c.T296G:p.V99G	Несинонимичная замена	<i>CD81</i>
c.A757C:p.T253P	Несинонимичная замена	<i>ECM1</i>
c.T1285A:p.Y429N	Несинонимичная замена	<i>CD55</i>
c.A899C:p.D300A	Несинонимичная замена	<i>MPO</i>
c.G20821T:p.E6941X	Стоп-кодон	<i>SYNE1</i>
c.C1660T:p.R554W	Несинонимичная замена	<i>CASK</i>



Соматические изменения количества повторов



Выявлена одна клинически значимая мутация – амплификация Her2/neu



Зеленым цветом показаны вставки, красным - делеции

illumina®

Анализ опухолей без первично-выявленного очага

- Дифференциальная диагностика с помощью NGS для определения тканеспецифичности



Выбор схемы лечения для выявленной нозологии



Поиск мутаций для выявления мишеней таргетной терапии методом NGS

Massively-parallel sequencing assists the diagnosis and guided treatment of cancers of unknown primary



Richard W Tothill^{1,5,7}, Jason Li¹, Linda Mileskin^{1,4}, Ken Doig¹, Terence Sganakis¹,
Prue Cowin¹, Andrew Fellowes¹, Timothy Semple¹, Stephen Fox¹, Keith Byrorn², Adam
Kowalczyk³, David Thomas¹, Penelope Schofield¹, David D Bowtell^{1, 4, 5, 6, 7}

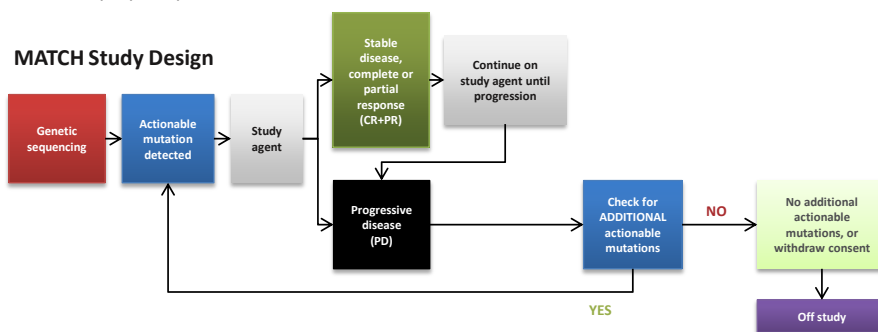
- Диагноз уточнен в 11/16 случаев

- Потенциальные мишени для препаратов найдены в 12/16 случаев

Молекулярно-информационное клиническое испытание

NCI's **MATCH** (Molecular Analysis for Therapy Choice)

- Идентификация генетических нарушений в опухолевом образце пациента с любой солидной опухолью и резистентностью к стандартным схемам лечения
- выбор препарата



National Cancer Institute
at the National Institutes of Health

Adapted from http://deainfo.nci.nih.gov/advisory/ncab/164_1213/Conley.pdf

illumina®

Ограничения применения NGS в клинической практике

- В России нет регистрационных удостоверений для большинства приборов и реактивов.
- В мире не существуют общепринятых критериев и инструкций по применению.
- Сложность интерпретации результатов вследствие большого количества вариантов с недоказанной клинической значимостью.



Спасибо за внимание!

