

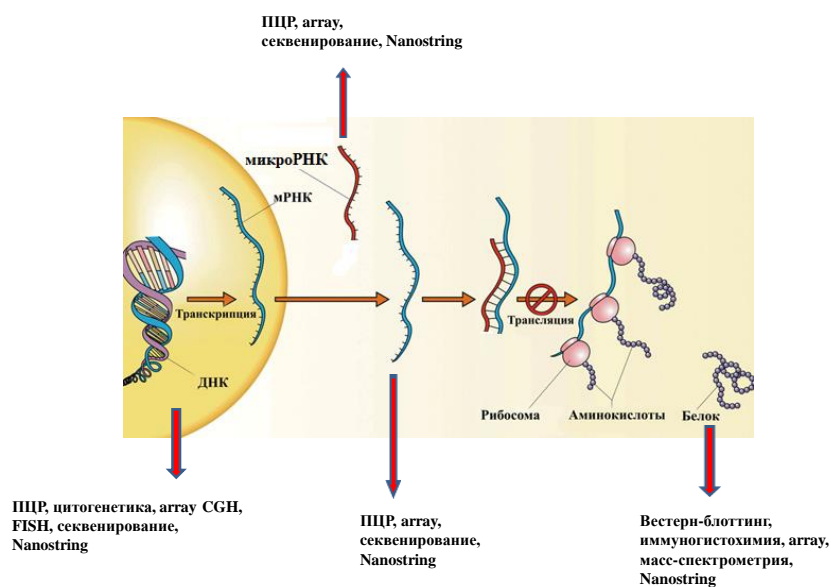


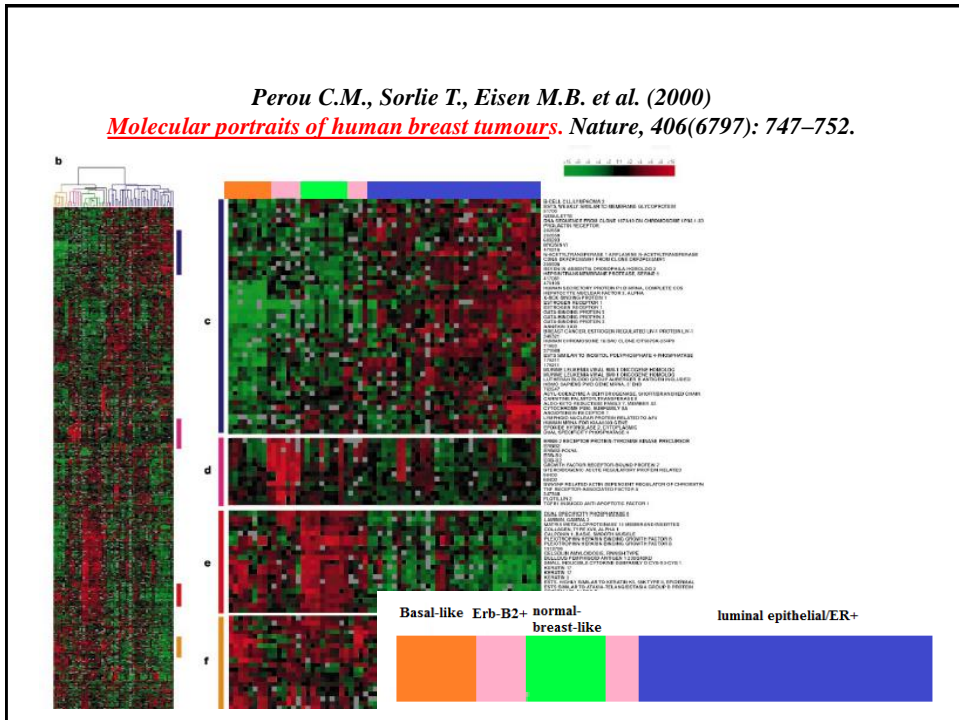
*Кометова В.В., Тагирова М.К., Родионов В.В., Лунькова А.А., Сухих Г.Т.*

## "Молекулярный портрет рака молочной железы с использованием технологии Наностринг"

Конференция «Рак молочной железы - 2017»

### Молекулярное типирование ткани





**Perou C.M., Sorlie T., Eisen M.B. et al. (2000)**  
***Molecular portraits of human breast tumours. Nature, 406(6797): 747–752.***

**Цель исследования:** анализ экспрессии 8102 генов

**Образцы:** 65 образцов ткани опухоли молочной железы от 42 пациентов (20 образцов опухоли до лечения доксорубицином и после)

**Метод:** DNA array

**Результаты:** опухоли могут быть классифицированы на основе профиля экспрессии генов, отражающий биологическое различие каждой опухоли (физиологическая вариация)





**nanoString TECHNOLOGIES**

### Архитектура двойного зонда – ключевая особенность технологии

Захватывающий зонд      Репортерный зонд

3' повторы      олигонуклеотиды, специфичные к мишени      основа - одноцепочечная ДНК      5' повторы

Исследуемая РНК

Флуоресцентно-меченные фрагменты РНК

Специфичный к мишени захватывающий зонд      Специфичный к мишени репортерный зонд

**\*50 флуорохромов (пятен) генерируют яркий сигнал достаточно сильный для цифровой детекции**

**\*4 цвета, без использования идущих пятен одного цвета = 972 возможных кодов**

Один закодированный репортер = 1 нуклеиновая Кислота (кодирование молекулы)

### Процедура анализа в три шага

5 минут «вручную»      День 1      5 минут «вручную»      День 2 АВТОМАТИЗИРОВАННО      5 минут «вручную»      День 2 АВТОМАТИЗИРОВАННО

*nCounter Prep Station (станция пробоподготовки)*

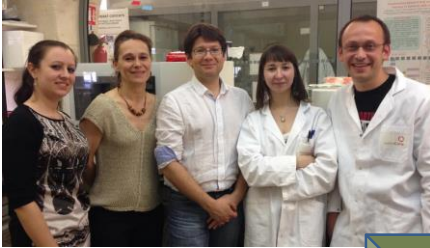
*nCounter Digital Analyzer (цифровой анализатор)*

- 1 Гибридизация
  - Гибкие требования к образцу
  - Всего 4 шага пипетирования
  - Без амплификации
  - 800 гибридизаций в одной пробирке
- 2 Очистка
- 3 Подсчёт
  - Чувствительный
  - Точный
  - Количественный
  - Простой

**nanoString TECHNOLOGIES**

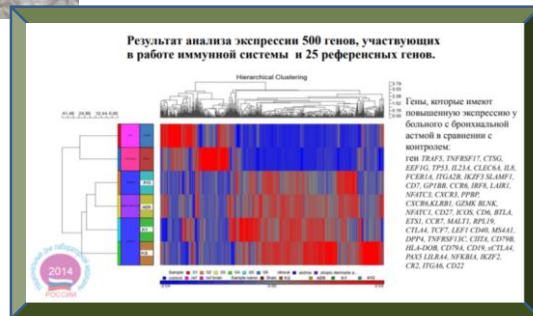
9 NanoString Confidential

*Первые результаты в России,  
полученные с помощью технологии NanoString*

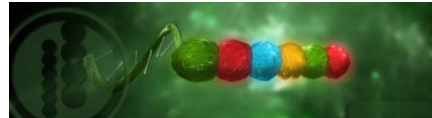


апрель 2014 в Институте Кюри

*М.К. Тагирова, Варламов Е.Е.,  
Памтура А.Н., Сухоруков В.С.*



**Центр компетенции  
NanoString**



**nCounter® Dx Analysis System with FLEX**



**Единственная система  
в России для диагностики**

**Возможности системы**

Диагностика



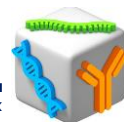
**Генетическая сигнатура PAM50 для исследования ткани опухоли при раке груди**  
Позволяет оценить риск развития рецидива в течении 10 лет у пациента и провести молекулярное типирование опухоли ( 4 подтипа: Luminal A, Luminal B, Basal-Like и HER2 Enriched)

Научные исследования



**Молекулярный скрининг и создание собственных сигнатур для диагностики**

Оценка экспрессии, копияности генов, микроРНК, хромосомных перестроек, 3D биология



## Анализ копийности генов при раке молочной железы

### Дизайн исследования:

**Образцы:** замороженная ткань опухоли молочной железы,  
ткань молочной железы (норма)

#### 1. Оценка копийности генов с использованием панели



nCounter®  
v2 Cancer CN Assay

nCounter® Cancer CN Assay Gene List

AKT2	BCL2L2	CCNE1	CSMD1	ERBB2	GRB2	KIT	MDM2	MYCL1	PARK2	PTPRD	TERT	YAP1
AKT3	BIRC2	CDK4	DCC	FADD	HMG2A	KRAS	MDM4	MYCN	PAX9	RB1	TP53	YWHAZ
APC	BRCA1	CDK6	DCUN1D1	FGFR1	IGF1R	MAGI3	MELK	NCOA3	PDE4D	REG4	TP73	ZNF217
AR	BRCA2	CDKN1A	DYRK2	FHIT	IRS2	MAP2K4	MET	NF1	PDGFRA	REL	TRAF2	
AURKA	C8orf4	CDKN2A	E2F3	FOXO1	ITGB4	MAP3K5	MITF	NKX2-1	PIK3CA	RPS6KB1	VEGFA	
BBC3	CCND1	CDKN2C	EEF1A2	GAB2	JUN	MAPK7	MYB	NKX2-B	PRKCI	SHH	WHSC1L1	
BCL2L1	CCND2	CRKL	EGFR	GPC5	KDR	MCL1	MYC	ORAOV1	PTEN	SKP2	WT1	

#### 2. Подтверждение копийности (ПЦР, FISH метод)

#### 3. Биоинформатика

- Коллаборация с Университетом Лейстер (Великобритания)  
Руководитель проекта с.н.с., к.м.н. Кометова В.В.

## **Вариация числа копий (copy number variation)**



## **Методы оценки вариации числа копий:**

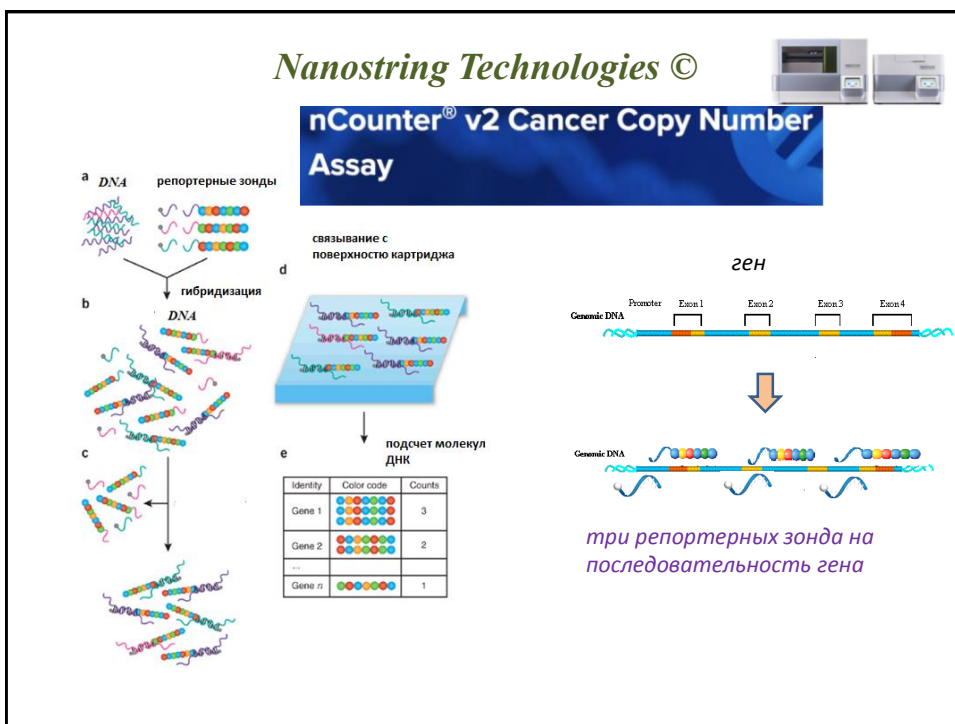
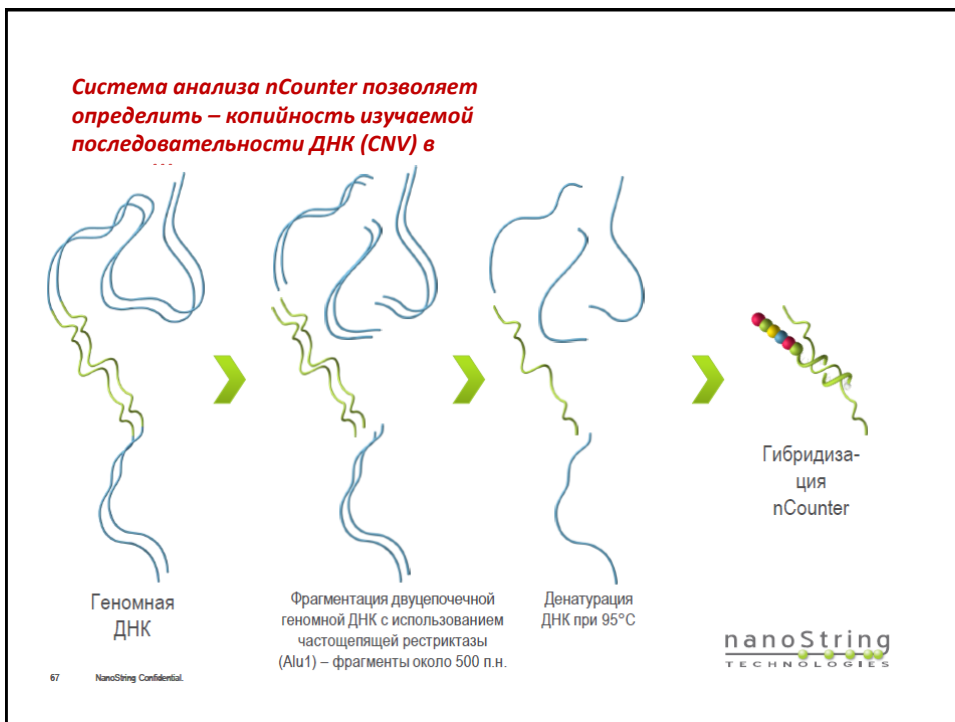
ПЦР в реальном времени (*до 6 копий*)

FISH метод (*более 3 копий, только визуальная оценка, возможность оценки ploidy*)

MLPA (*мультиплексная амплификация лигазно-связанных проб*)

Сравнительная –геномная гибридизация (array CGH) (*до 3 копий*)

Технология Наностринг (*более 6 копий*)





## Почему же меняется копийность генов?

*Увеличение  
копийности генов в  
геноме клеток ткани  
опухоли дает ей  
способность к  
метастазированию*



*Увеличение  
копийности генов в  
этом же геноме  
клеток ткани  
опухоли дает  
возможность  
подавить  
метастазирование*

*Молекулярная война*

Journal of  
Breast  
Cancer

J Breast Cancer 2017 September; 20(3): 246-253

<https://doi.org/10.4048/jbc-2017.20.3.246>

ORIGINAL ARTICLE

*MammaPrint  
(70 генов)*

Copy Number Profiling of MammaPrint™ Genes Reveals Association with the Prognosis of Breast Cancer Patients

Areej Fatima\*, Fomaz Tariq\*, Muhammad Faraz Arshad Malik, Muhammad Qasim<sup>1</sup>, Farhan Haq

Cancer Genetics and Epigenetics Lab, Department of Biosciences, COMSATS Institute of Information Technology, Islamabad, Pakistan; <sup>1</sup>Department of Pharmacology & Immune Network Pioneer Research Center, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

**Цель исследования:** прогностическая информация для пациентов с опухолью молочной железы на основе наличия в их геноме вариации числа копий.

**Образцы:** 59 клеточных линий (опухоль молочной железы), 650 пациентов с раком молочной железы из базы данных The Cancer Genome Atlas.

**Метод:** Affymetrix SNP array

**Результаты анализа:**

Гены *RFC4*, *HRASLS*, *NMU*, *GPR126*, *SCUBE2*, *C20orf46*, *EBF4* –

уменьшение выживаемости пациентов

Гены *ERBB2*, *EGFR* - рост опухоли

Гены *AKT2*, *MAP3K1*, *MAP3K13*, *NCOR1*, *SMARCD1* - карциногенез

## Анализ экспрессии генов при раке молочной железы

nCounter® PanCancer Immune  
Profiling Panel

### nCounter® PanCancer Immune Profiling Panel

ADAPTIVE IMMUNE RESPONSE		
CELL TYPE	DESCRIPTION	PANEL GENES
<b>B Cells</b>	Perform several roles, including generating and presenting antibodies, cytokine production, and lymphoid tissue organization.	BLK, CD19 (CD19), CR2 (CD21), HLA-DOB, MS4A1 (CD20), TNFRSF17 (CD269)
<b>T Cells</b>	Play a central role in immunity and distinguished from other lymphocytes (e.g., B cells) by the presence of a T cell receptor (TCR) on the cell surface.	CD2, CD3E, CD3G, CD6
<b>Helper T Cells</b>	A subset of CD3+CD4+ effector T cells that secrete cytokines with different activities.	ANP32B (APRIL), BATF, NUP107, CD28 (CD28), ICOS (CD278)
<b>T<sub>H</sub>1</b>	Produce IL-2 and IFN $\gamma$ and promote cellular immunity by acting on CD8+ cytotoxic T cells, NK cells and macrophages.	CD38, CSF2 (GM-CSF), IFNG, IL12RB2, LTA, CTLA4 (CD152), TXB21, STAT4
<b>T<sub>H</sub>2</b>	Produce IL-4, IL-5 and IL-13 and promote humoral immunity by acting on B cells.	CXCR6 (CD186), GATA3, IL26, LAIR2 (CD306), PMCH, SMAD2, STAT6
<b>T<sub>H</sub>17</b>	Produce IL-17A, IL-17F, IL-21 and IL-22 and promote anti-microbial inflammation.	IL17A, IL17RA (CD217), RORC
<b>T<sub>H</sub></b>	Trigger the formation and maintenance of germinal centers through the expression of CD40L and the secretion of IL-21 and IL-4, thereby playing a critical role in mediating the selection and survival of B cells.	CXCL13, MAF, PDCD1 (CD279), BCL6
<b>Regulatory T Cells (T<sub>reg</sub>)</b>	CD3+CD4+ T cells that inhibit effector B and T cells and play a central role in suppression of autoimmune responses.	FOXP3
<b>Memory T Cells</b>		
<b>T<sub>em</sub> (central memory)</b>	Educated T cells that rapidly respond to antigen. Central memory T cells express L-selectin and CCR7; they secrete IL-2, but not IFN $\gamma$ or IL-4.	ATM, DOCK9, NEFL, REPS1, USP9Y
<b>T<sub>em</sub> (effector memory)</b>	Educated T cells that rapidly respond to antigen. Effector memory T cells do not express L-selectin or CCR7; they secrete effector cytokines like IFN $\gamma$ and IL-4.	AKT3, CCR2 (CD192), EWSR1 (EWS), LTK, NFATC4

# nCounter® PanCancer Immune Profiling Panel

INNATE IMMUNE RESPONSE			
CELL TYPE	DESCRIPTION	PANEL GENES	
Cytotoxic (CD8) T Cells	Effector T cells with cytotoxic granules that interact with target cells expressing cognate antigen and promote apoptosis of target cells.	CD8A (CD8), CD8B (CD8B), FLT3LG, GZMM (MET1), PRF1	
Gamma Delta T Cells (Tγδ)	Express surface antigen recognition complex type 2 and represent a small percentage of the peripheral T cell population. Functions span innate and adaptive immune responses, including direct cytotoxicity and establishment of memory phenotypes.	CD160, FEZ1, TARP (TCRG)	
Cytotoxic Cells	Natural Killer (NK) Cells	Provide a rapid cytotoxic response to virally infected cells and tumors. These cells also play a role in the adaptive immune response by readily adjusting to the immediate environment and formulating antigen-specific immunological memory.	BCL2, FUT5, NCR1 (CD335), ZNF205
	CD56 <sub>high</sub>	Constitute the majority of NK cells in secondary lymphoid tissues. Abundant cytokine producers and weakly cytotoxic before activation.	FOXP1, MPPED1, PLA2G6, RRAD
	CD56 <sub>dim</sub>	Constitute the majority of NK cells in the periphery and are more cytotoxic than CD56 <sub>high</sub> cells.	GTF3C1, GZMB, IL21R (CD360)
Dendritic Cells	Conventional (Myeloid) Dendritic Cells (DC)	Cells that process antigen material and present it on the cell surface to T cells, thereby acting as messengers between the innate and adaptive immune systems.	CCL13, CCL17, CCL22 (MDC), CD209 (CD209), HSD11B1
	IDC (immature)	Play a critical role in initiating tumor immunity. Tumor cells can exploit the functional roles of IDCs for tumor progression via release of soluble factors such as VEGF.	CD1A, CD1B, CD1E, F13A1, SYT17
	aDC (activated)	Promote the induction of the adaptive immune response by presenting captured antigen to naive T cells.	CCL1, EB13, IDO1 (INDO), LAMP3 (CD208), OAS3
	Plasmacytoid Dendritic Cells (pDC)	Similar in appearance to plasma cells and share many characteristics with myeloid dendritic cells. These cells can produce high levels of IFNα.	IL3RA (CD123)

## Процедура подсчет нуклеиновых кислот системой анализа nCounter

1) Гибридизация РНК с набором CodeSet с РНК

Специфические зонды; контроли системы (набор CodeSet)



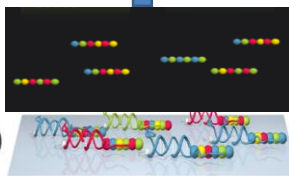
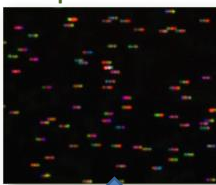
Исследуемый образец мРНК



картридж



5) Фотографирование поверхности



2) Удаление несвязанных репортеров  
3) Закрепление репортеров  
4) Иммунизация и выравнивание репортеров

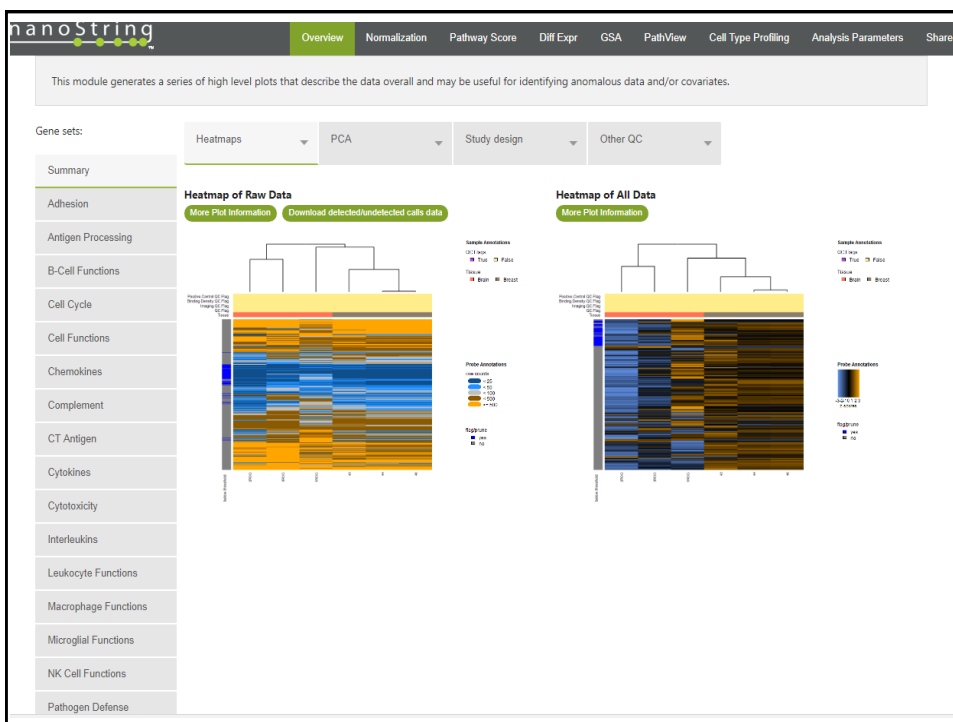
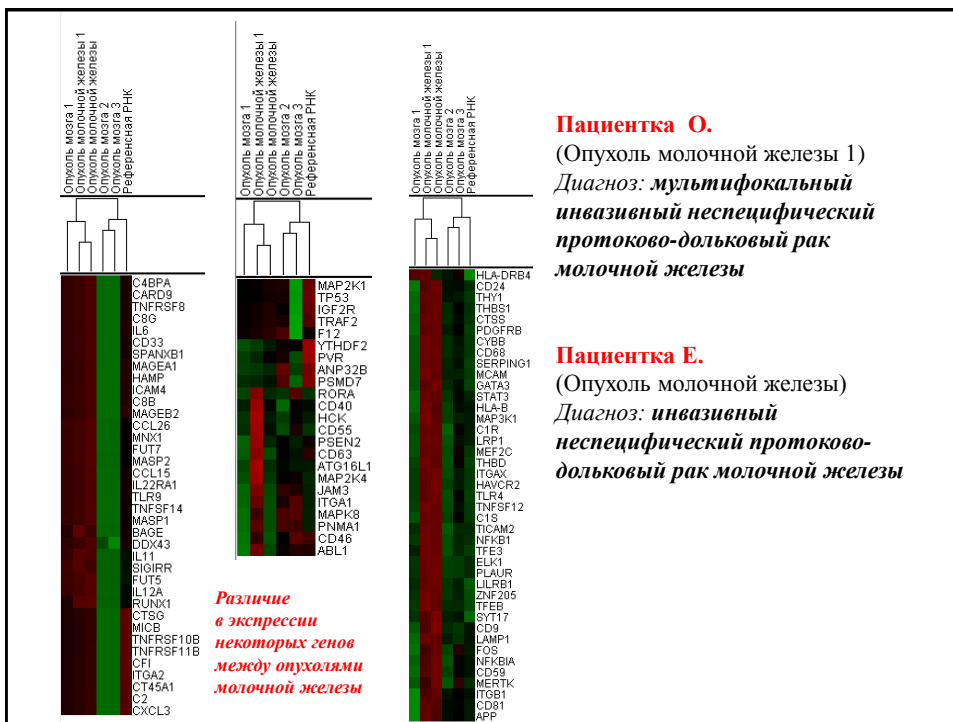
6) Подсчет штрих-кодов

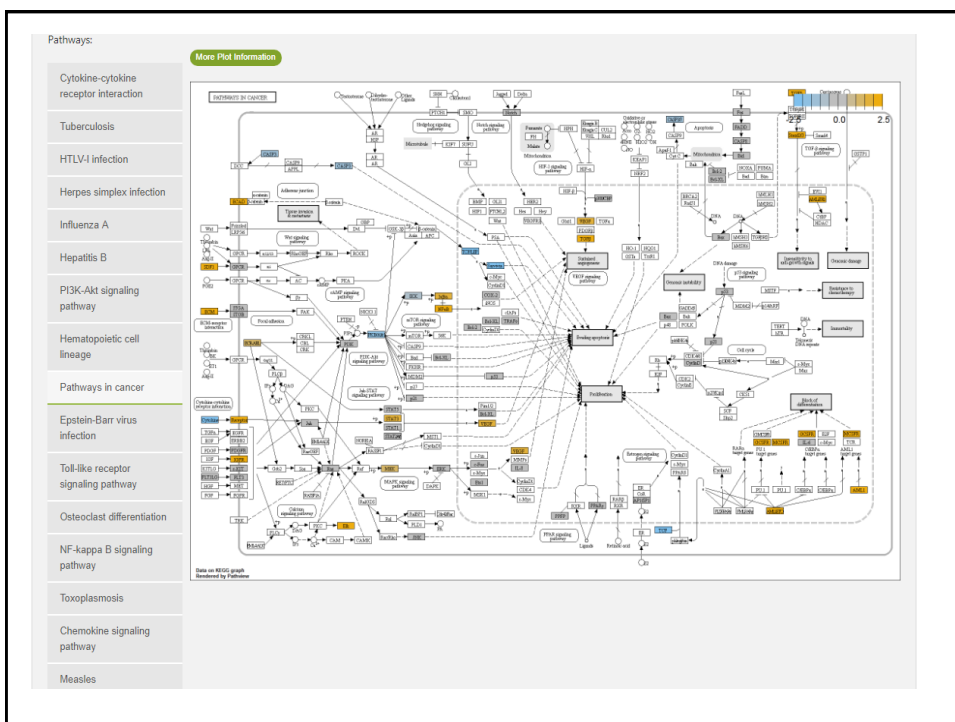
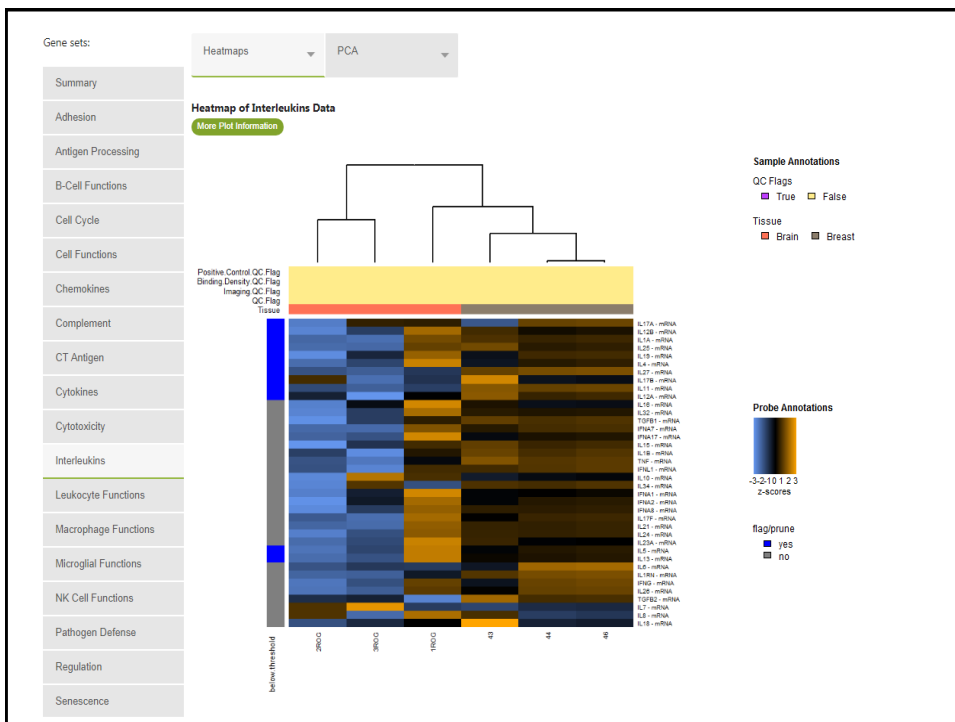
Код	Ген	Count
	x	3
	y	1
	z	2

Штрих-коды подсчитываются и данные переводятся в табличный формат

Номер анализа	1	2	3	4	5	6
Идентификация	GS1	GS2	GS3	GS4	GS5	GS6
Нуклеотидные пары						
POS_A(128)	28588	25747	25484	26387	25443	24768
POS_B(32)	6089	5381	5963	5736	5995	5564
POS_C(8)	3408	1274	1322	1302	1344	1241
POS_D(2)	480	438	460	482	426	406
POS_E(0.5)	77	86	81	59	64	71
POS_F(0.125)	38	37	31	38	29	34
NEG_A(0)	1	0	4	2	3	0
NEG_B(0)	2	0	1	1	2	1
NEG_C(0)	7	0	1	2	0	1
NEG_D(0)	5	2	5	3	2	4
NEG_E(0)	11	4	7	1	1	6
NEG_F(0)	3	2	1	2	0	2
NEG_G(0)	5	1	2	3	1	2
NEG_H(0)	4	4	1	3	6	7
ACTB	170785	72874	111725	84979	191749	81607
GUSB	962	426	180	300	124	315
RPLP0	17944	4384	5193	10499	13053	6466
PUM1	1092	294	424	272	710	381

Готовый результат!!!





## Центр компетенции NanoString

**Наш поход к созданию  
молекулярной сигнатуры**

**1. Анализ экспрессии большого количества генов (до 800 генов) при раке шейки матки**



**2. Анализ экспрессии выбранных генов на большой выборке больных с раком шейки матки**



**3. Создание молекулярной сигнатуры для использования в клинике с использованием технологии Наностринг**



**4. Создание тест-систем для ПЦР (удешевление анализа)**

**5. Поиск мишеней и создание противоопухолевых препаратов, воздействующих на конкретные пути патогенеза**

Данные экспрессии генов на «тепловой карте»



*Благодарю за внимание!*



Контакты:

Тагирова Миля

[tagirova81@gmail.com](mailto:tagirova81@gmail.com)

8-926-186-58-50

*Анализ мРНК, микроРНК, ДНК с использованием технологии Наностринг*

*Будем рады сотрудничеству!*