

МЕТОДЫ ОЦЕНКИ МОЛЕКУЛЯРНОГО ПРОФИЛЯ ОПУХОЛИ

Абильдинова Г.Ж.

д.м.н, профессор

Руководитель лаборатории персонализированной геномной диагностики

БМЦ УДП РК

Астана, 21-22 сентября 2023 г

СПЕКТР МЕТОДОВ ДЛЯ ПОИСКА ГЕНЕТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ

ПРОСТЫЕ ТЕХНОЛОГИИ, НАПРАВЛЕННЫХ
НА ДЕТЕКЦИЮ ЕДИНИЧНЫХ ТИПОВ
МУТАЦИЙ

МЕТОДЫ, ПОЗВОЛЯЮЩИЕ
ОХАРАКТЕРИЗОВАТЬ ВЕСЬ
ОПУХОЛЕВОЙ ГЕНОМ

Наиболее часто для медико-генетического тестирования
используются методы, основанные на:

- ПЦР;
- различных типах секвенирования;
- флуоресцентной гибридизации.

КЛИНИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ТЕСТОВ В ОНКОЛОГИИ (основные направления)

Область применения	Содержание
Диагностика наследственных опухолевых синдромов	Определение риска развития онкологического заболеваний
Дифференциальная диагностика	Выявление органного происхождения опухолей, в том числе с не выявленным первичным очагом
Прогнозирование заболевания	Прогнозирование течения заболевания
Прогнозирование ответа на терапию	Предсказание чувствительности/резистентности опухоли к конкретному виду терапии
Определение параметров фармакокинетики	Определение дозировки препарата в зависимости от генетических особенностей пациента и его метаболизма (определение фармакогенетического профиля)
Мониторинг ответа на терапию	Определение эффективности терапии
Мониторинг рецидива заболевания	Контроль рецидива заболевания у пациентов, находящихся в ремиссии

ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ (IN SITU)

Гибридизация флуоресцентно-меченных ДНК-проб на цитологическом или гистологическом препарате. Технология применяется для детекции изменения копийности отдельных генов и поиска структурных аномалий (транслокаций)

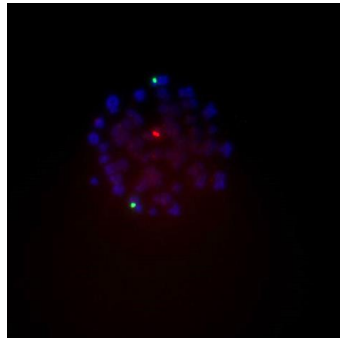
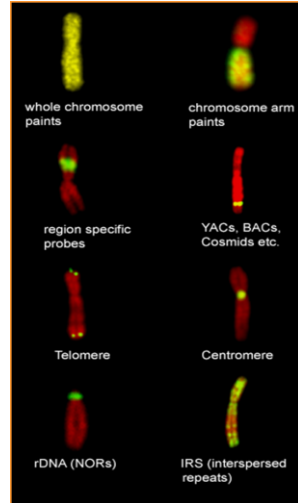
Проведение анализа требует синтеза пробы (зонда), комплементарной интересующему исследователя участку хромосомы.

ДНК – проба (зонд метится флуоресцентным красителем. Меченая проба и ДНК-матрица подвергаются денатурации, после этого проба по принципу комплементарности присоединяется к соответствующему участку ДНК

Хромосомо-специфичные зонды

Район-специфичные зонды:

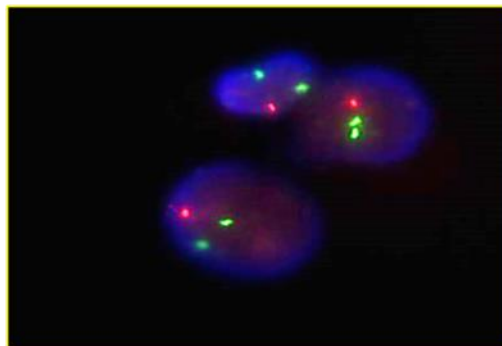
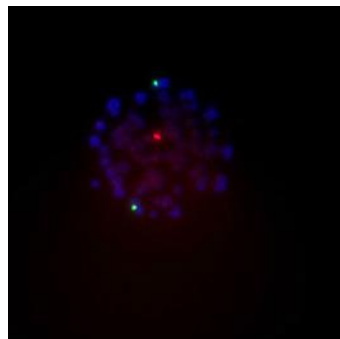
- Центромерные
- Теломерные
- Определенные хромосомные локусы



ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ (IN SITU)

ПРЕИМУЩЕСТВА

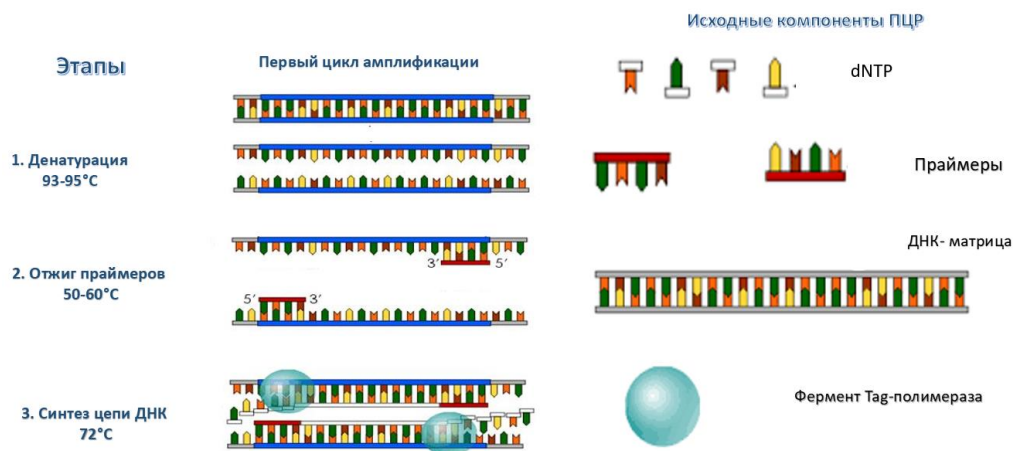
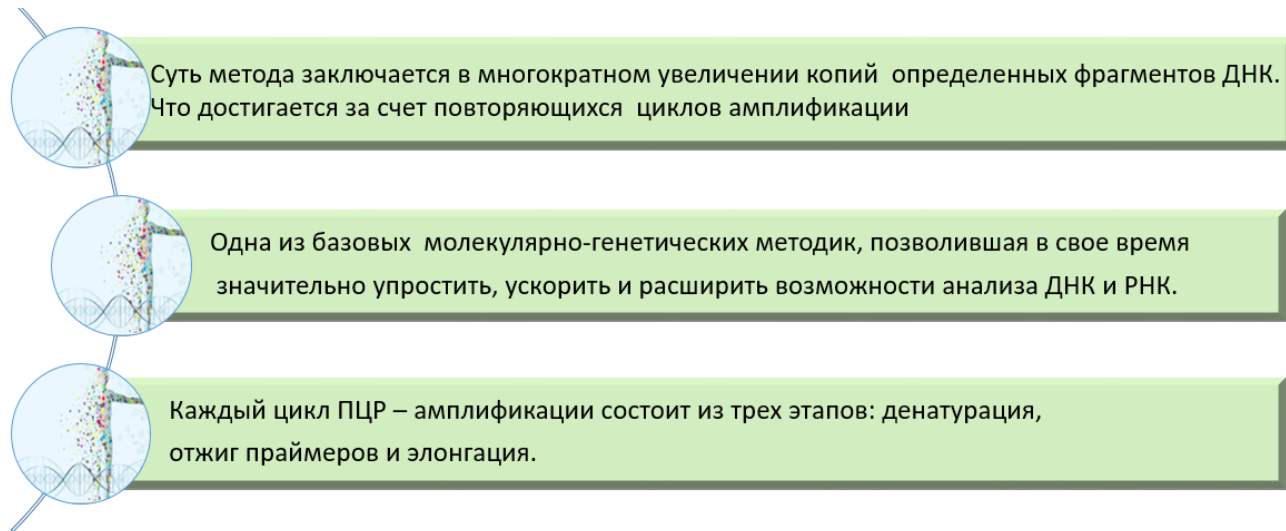
- Визуализация генетических изменений в тканевом окружении
- Заключение в парафин архивные образцы
- Применение к метафазным и интерфазным ядрам



НЕДОСТАТКИ

- Риск возникновения ошибок, связанных с субъективной оценкой результата исследования
- Зонды специфичны только к определенному участку (за одно исследование можно определить наличие мутации или числа копий только этого участка)

Молекулярно-генетические тесты, основанные на ПЦР



Преимущества ПЦР

Простота выполнения и интерпретации данных;
Высокая чувствительность и специфичность

Возможность автоматизации и стандартизации всех этапов исследования;
Низкие требования к исходному количеству биоматериала

Недостатки ПЦР

ПЦР тесты рассчитаны на определение ограниченного числа известных мутаций

Высокий риск контаминации;
Возможность получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов

ТЕХНОЛОГИИ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ МУТАЦИЙ

Секвенирование по Сэнгеру – определение нуклеиновой последовательности ДНК



Основан на использовании химически модифицированных аналогов нуклеотидов – дидезоксинуклеотидтрифосфатов, препятствующих при их встраивании удлинению вновь синтезируемой цепи ДНК

ПРЕИМУЩЕСТВА

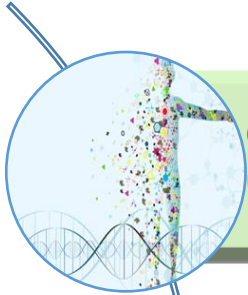
высокая точность и простота

НЕДОСТАТКИ

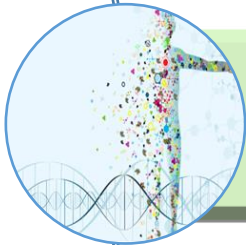
невысокая производительность
(ограниченный объем и скорость секвенирования)

Хромограмма – графическое изображение нуклеотидной последовательности, где каждый нуклеотид представлен в виде пика соответствующего цвета

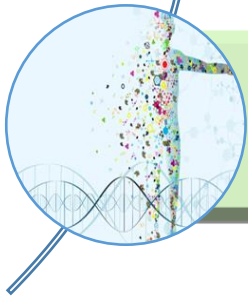
Методы МГТ, основанные на ПЦР



Суть метода заключается в многократном увеличении копий определенных фрагментов ДНК. Что достигается за счет повторяющихся циклов амплификации



Одна из базовых молекулярно-генетических методик, позволившая в свое время значительно упростить, ускорить и расширить возможности анализа ДНК и РНК.

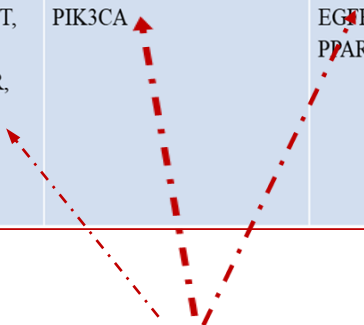


Каждый цикл ПЦР – амплификации состоит из трех этапов: денатурация, отжиг праймеров и элонгация.

Рак легкого

ДИАГНОСТИКА METex14

Гены, анализируемые для выявления вариантов последовательности ДНК	Гены вариаций количества копий	Сливные гены (fusion)
AKT1, ALK, AR, BRAF, CDK4, CTNNB1, DDR2, EGFR, ERBB2, ERBB3, ERBB4, ESR1, FGFR2, FGFR3, GNA11, GNAQ, HRAS, IDH1, IDH2, JAK1, JAK2, JAK3, KIT, KRAS, MAP2K1, MAP2K2, MET, MTOR, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, RAF1, RET, ROS1, SMO	ALK, AR, BRAF, CCND1, CDK4, CDK6, EGFR, ERBB2, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, KIT, KRAS, MET, MYC, MYCN, PDGFRA, PIK3CA	ALK, RET, ROS1, NTRK1, NTRK2, NTRK3, FGFR1, FGFR2, FGFR3, MET, BRAF, RAF1, ERG, ETV1, ETV4, ETV5, ABL1, AKT3, AXL, EGFR, ERBB2, PDGFRA, PARG



По оценкам, MET ex14 встречается примерно у 3–4% пациентов с НМРЛ

Если мутации MET ex14 обнаруживаются в лаборатории с меньшей частотой, может потребоваться оценка методологии тестирования на предмет способности обнаруживать MET ex14 и на предмет того, оптимизирована ли она для обнаружения MET ex14

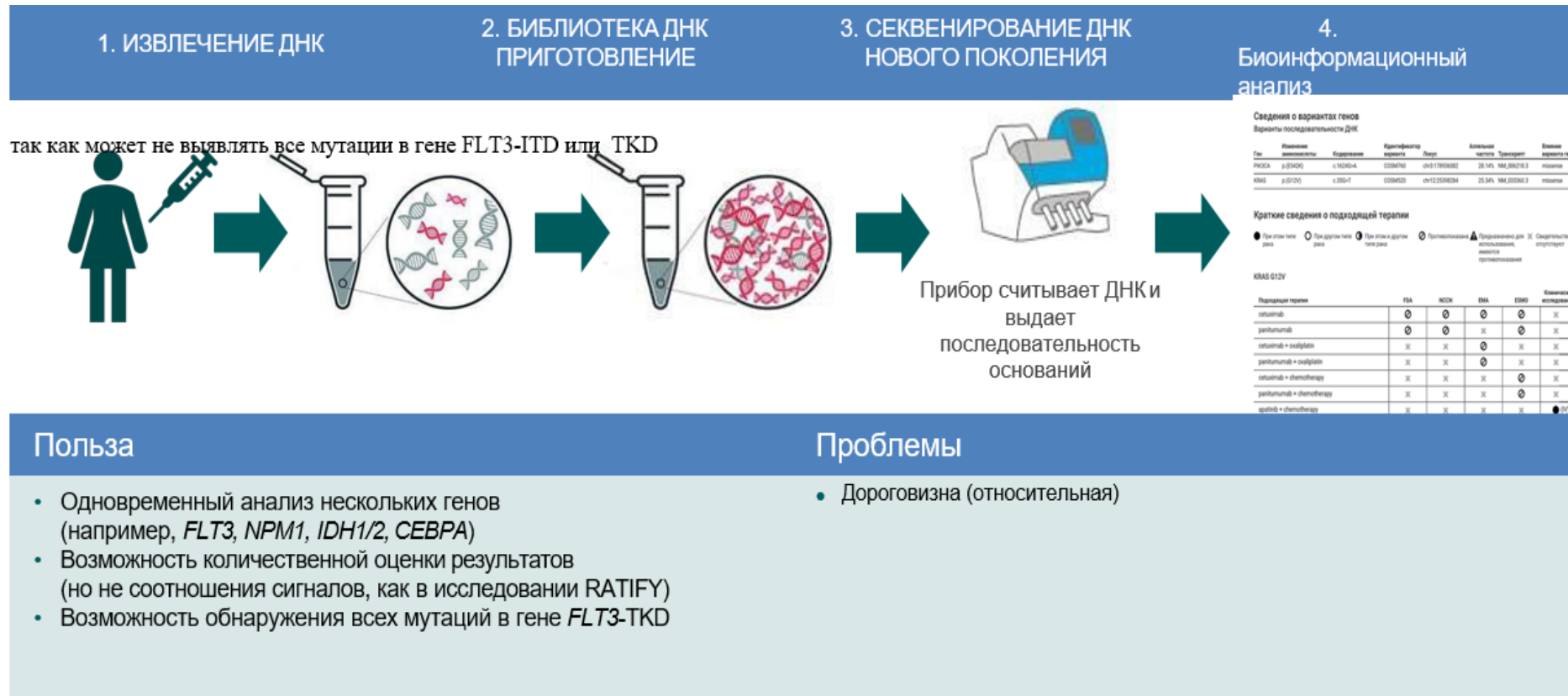
Из-за сложности MET ex14 некоторые типы изменений у пациентов с НМРЛ могут ускользать от обнаружения на различных платформах NGS

Для чего используется исследование?

- ☐ для определения показаний к применению таргетной терапии ингибиторами MET;
- ☐ для определения причины приобретенной резистентности к ингибиторам EGFR при немелкоклеточном раке легкого;
- ☐ для персонализации терапии в рамках клинического исследования.

ТЕХНОЛОГИИ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ МУТАЦИЙ

NGS



Тесты на основе NGS-секвенирования уже стали золотым стандартом в молекулярной диагностике



ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
ПРЕЗИДЕНТ ІС БАСҚАРМАСЫ

Медициналық Орталығының Аурұханасы РМБ

Больница Медицинского Центра Управления Делами
Президента РК
Мангилик Ел проспект, 80
+7 (7172) 70#80#90

Optional Label 1: placeholder value

Optional Label 2: placeholder value

Дата: 23.05.2019

1 из 31

Sample Information

Optional Sample Info 1:
Optional Sample Info 2:

Тип рака в образце: Рак прямой кишки

Содержание	Основные данные отчета
Сведения о вариантах генов	2 Клинически значимые биомаркеры
Краткие сведения о подходящей терапии	0 Доступные методы лечения
Сведения о подходящей терапии	51 Клинические исследования
Клинические исследования	

Проанализированные гены

Genes Assayed for the Detection of DNA Sequence Variants

AKT1, ALK, AR, BRAF, CDK4, CTNNB1, DDR2, EGFR, ERBB2, ERBB3, ERBB4, ESR1, FGFR2, FGFR3, GNA11, GNAQ, HRAS, IDH1, IDH2, JAK1, JAK2, JAK3, KIT, KRAS, MAP2K1, MAP2K2, MET, MTOR, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, RAF1, RET, ROS1, SMO

Genes Assayed for the Detection of Copy Number Variations

ALK, AR, BRAF, CCND1, CDK4, CDK6, EGFR, ERBB2, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, KIT, KRAS, MET, MYC, MYCN, PDGFRA, PIK3CA

Genes Assayed for the Detection of Fusions

ALK, RET, ROS1, NTRK1, NTRK2, NTRK3, FGFR1, FGFR2, FGFR3, MET, BRAF, RAF1, ERG, ETV1, ETV4, ETV5, ABL1, AKT3, AXL, EGFR, ERBB2, PDGFRA, PPARG

Клинически значимые биомаркеры

Изменения генома	Подходящая терапия (При этом типе рака)	Подходящая терапия (При другом типе рака)	Клинические исследования
KRAS G12V KRAS proto-oncogene, GTPase	cetuximab ^{1,2} panitumumab ¹ cetuximab + chemotherapy ² panitumumab + chemotherapy ²	cetuximab panitumumab	43
PIK3CA E542K phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha	Нет	Нет	11

Источники сведений о подходящей терапии: FDA¹, NCCN, EMA², ESMO

Optional left-aligned text block, one line or multiple lines. Lines will span full width of page width and then wrap to new line within footer area.

Отказ от ответственности: Приведенные здесь данные являются результатом курирования опубликованных источников, однако не являются исчерпывающими.
Версия данных: 2019.03(009).

Сведения о вариантах генов

Варианты последовательности ДНК

Ген	Изменение аминокислоты	Кодирование	Идентификатор варианта	Локус	Аллельная частота	Транскрипт	Влияние варианта гена
PIK3CA	p.(E542K)	c.1624G>A	COSM760	chr3:178936082	28.14%	NM_006218.3	missense
KRAS	p.(G12V)	c.35G>T	COSM520	chr12:25398284	25.34%	NM_033360.3	missense

Краткие сведения о подходящей терапии

● При этом типе рака ○ При другом типе рака ◐ При этом и другом типе рака ◑ Противопоказана ⚠ Предназначено для использования, имеются противопоказания ✕ Свидетельства отсутствуют

KRAS G12V

Подходящая терапия	FDA	NCCN	EMA	ESMO	Клинические исследования*
cetuximab	○	○	○	○	✕
panitumumab	○	○	✕	○	✕
cetuximab + oxaliplatin	✕	✕	○	✕	✕
panitumumab + oxaliplatin	✕	✕	○	✕	✕
cetuximab + chemotherapy	✕	✕	✕	○	✕
panitumumab + chemotherapy	✕	✕	✕	○	✕
apatinib + chemotherapy	✕	✕	✕	✕	● (IV)

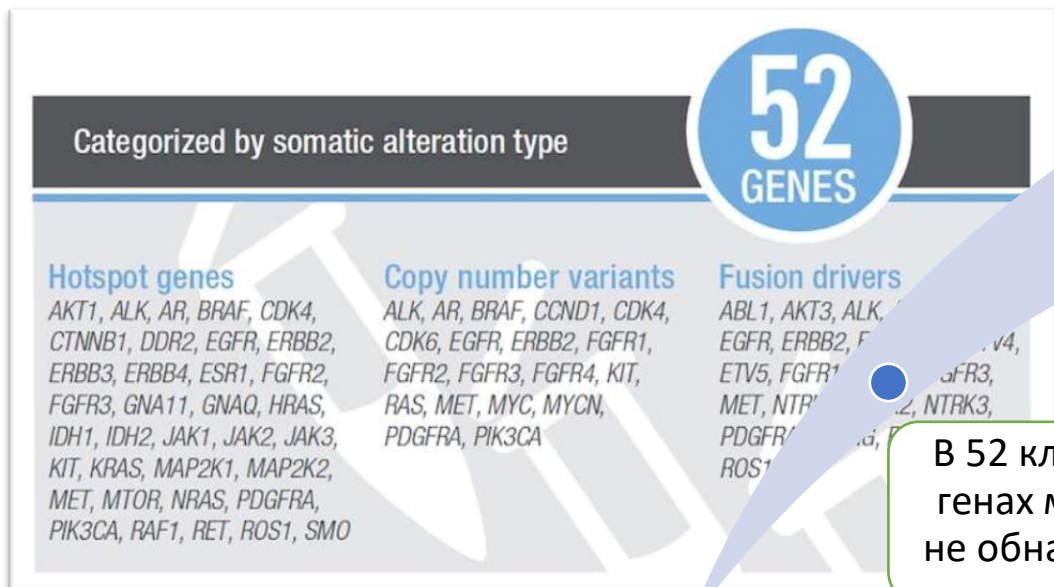
FDA - Food and Drug Administration (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов) **NCCN** - National Comprehensive Cancer Network (Национальная комплексная онкологическая сеть) **EMA** - European Medicines Agency (Европейское агентство лекарственных средств) **ESMO** - European Society for Medical Oncology (Европейское общество медицинской онкологии)

Преимущества мультигенной диагностики

Пациенту с раком легких были назначены молекулярно-генетические исследование на поиск мутаций в генах BRAF, ALK, но была выполнена панель на 161 ген, где были обнаружены мутации в генах: POLE, TP53, CREBBP

Hotspot genes				Full-length genes			Copy number genes		Gene fusions (inter- and intragenic)		
AKT1	ESR1	KIT	PDGFRB	ARID1A	FBXW7	PTEN	AKT1	FGFR4	AKT2	FGFR2	NUTM1
AKT2	EZH2	KNSTRN	PIK3CB	ATM	MLH1	RAD50	AKT2	FLT3	ALK	FGFR3	PDGFRA
AKT3	FGFR1	KRAS	PIK3CA	ATR	MRE11	RAD51	AKT3	IGF1R	AR	FGR	PDGFRB
ALK	FGFR2	MAGOH	PPP2R1A	ATRX	MSH6	RAD51B	ALK	KIT	AXL	FLT3	PIK3CA
AR	FGFR3	MAP2K1	PTPN11	BAP1	MSH2	RAD51C	AXL	KRAS	BRCA1	JAK2	PRKACA
ARAF	FGFR4	MAP2K2	RAC1	BRCA1	NBN	RAD51D	AR	MDM2	BRCA2	KRAS	PRKACB
AXL	FLT3	MAP2K4	RAF1	BRCA2	NF1	RNF43	BRAF	MDM4	BRAF	MDM4	PTEN
BRAF	FOXO2	MAPK1	RET	CDK12	NF2	RB1	CCND1	MET	CDKN2A	MET	PPARG
BTK	GATA2	MAX	RHEB	CDKN1B	NOTCH1	SETD2	CCND2	MYC	EGFR	MYB	RAD51B
CBL	GNA11	MDM4	RHOA	CDKN2A	NOTCH2	SLX4	CCND3	MYCL	ERBB2	MYBL1	RAF1
CCND1	GNAQ	MED12	ROS1	CDKN2B	NOTCH3	SMARCA4	CCNE1	MYCN	ERBB4	NF1	RB1
CDK4	GNAS	MET	SF3B1	CHEK1	PALB2	SMARCB1	CDK2	NTRK1	ERG	NOTCH1	RELA
CDK6	H3F3A	MTOR	SMAD4	CREBBP	PIK3R1	STK11	CDK4	NTRK2	ESR1	NOTCH4	RET
CHEK2	HIST1H3B	MYC	SMO	FANCA	PMS2	TP53	CDK6	NTRK3	ETV1	NOTCH1	ROS1
CSF1R	HNF1A	MYCN	SPOP	FANCD2	POLE	TSC1	EGFR	PDGFRA	ETV4	NOTCH1	RSP02
CTNNB1	HRAS	MYD88	SRC	FANCI	PTCH1	TSC2	ERBB2	PDGFRB	ETV5	NOTCH1	RSP03
DDR2	IDH1	NFE2L2	STAT3				ESR1	PIK3CB	FGFR1	NOTCH1	TERT
EGFR	IDH2	NRAS	TERT				FGF19	PIK3CA			
ERBB2	JAK1	NTRK1	TOP1				FGF3	PPARG			
ERBB3	JAK2	NTRK2	U2AF1				FGFR1	RICTOR			
ERBB4	JAK3	NTRK3	XPO1				FGFR2				
ERCC2	KDR	PDGFRA					FGFR3				

Пациент с раком кишечника



В 52 ключевых генах мутации не обнаружены

Назначено исследование на 161 гене

Обнаружены мутации в генах ARID1A, FBXW7

ДИАГНОСТИКА МУТАЦИЙ ПРИ ОПУХОЛЯХ ГОЛОВЫ И ШЕИ

Neuro-Oncology

23(8), 1231–1251, 2021 | doi:10.1093/neuonc/noab106 | Advance Access date 29 June 2021

The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary

1231

Table 2 Key Diagnostic Genes, Molecules, Pathways, and/or Combinations in Major Primary CNS Tumors

Tumor Type	Genes/Molecular Profiles Characteristically Altered*
Astrocytoma, IDH-mutant	IDH1, IDH2, ATRX, TP53, CDKN2A/B
Oligodendroglioma, IDH-mutant, and 1p/19q-codeleted	IDH1, IDH2, 1p/19q, TERT promoter, CIC, FUBP1, NOTCH1
Glioblastoma, IDH-wildtype	IDH-wildtype, TERT promoter, chromosomes 7/10, EGFR
Diffuse astrocytoma, MYB- or MYBL1-altered	MYB, MYBL1
Angiocentric glioma	MYB
Polymorphous low-grade neuroepithelial tumor of the young	BRAF, FGFR family
Diffuse low-grade glioma, MAPK pathway-altered	FGFR1, BRAF
Diffuse midline glioma, H3 K27-altered	H3 K27, TP53, ACVR1, PDGFRA, EGFR, EZHIP
Diffuse hemispheric glioma, H3 G34-mutant	H3 G34, TP53, ATRX
Diffuse pediatric-type high-grade glioma, H3-wildtype, and IDH-wildtype	IDH-wildtype, H3-wildtype, PDGFRA, MYCN, EGFR (methylome)
Infant-type hemispheric glioma	NTRK family, ALK, ROS, MET
Pilocytic astrocytoma	KIAA1549-BRAF, BRAF, NF1
High-grade astrocytoma with piloid features	BRAF, NF1, ATRX, CDKN2A/B (methylome)
Pleomorphic xanthoastrocytoma	BRAF, CDKN2A/B
Subependymal giant cell astrocytoma	TSC1, TSC2
Chordoid glioma	PRKCA
Astroblastoma, MN1-altered	MN1
Ganglion cell tumors	BRAF
Dysembryoplastic neuroepithelial tumor	FGFR1
Diffuse glioneuronal tumor with oligodendroglioma-like features and nuclear clusters	Chromosome 14, (methylome)
Papillary glioneuronal tumor	PRKCA
Rosette-forming glioneuronal tumor	FGFR1, PIK3CA, NF1
Myxoid glioneuronal tumor	PDGFRA
Diffuse leptomeningeal glioneuronal tumor	KIAA1549-BRAF fusion, 1p (methylome)
Multinodular and vacuolating neuronal tumor	MAPK pathway
Dysplastic cerebellar gangliocytoma (Lhermitte-Duclos disease)	PTEN
Extraventricular neurocytoma	FGFR (FGFR1-TACC1 fusion), IDH-wildtype
Supratentorial ependymomas	ZFTA, RELA, YAP1, MAML2
Posterior fossa ependymomas	H3 K27me3, EZHIP (methylome)
Spinal ependymomas	NF2, MYCN
Medulloblastoma, WNT-activated	CTNNB1, APC
Medulloblastoma, SHH-activated	TP53, PTCH1, SUFU, SMO, MYCN, GLI2 (methylome)
Medulloblastoma, non-WNT/non-SHH	MYC, MYCN, PRDM6, KDM6A (methylome)
Atypical teratoid/rhabdoid tumor	SMARCB1, SMARCA4
Embryonal tumor with multilayered rosettes	C19MC, DICER1

Download

ГЛИОМЫ

Астроцитомы

Олигодендроглиомы

Олигоастроцитомы

Возможность определения
 прогностически важных,
 но не назначенных генов:
 MYB, MDM2

Кол-во исследований (n=452)	
IDH1/IDH2	230
Co-del 1p/19q	120
BRAF V600E	90
KIAA1549BRAF	40
MGMT	80
H3K27	45
CDKN2A/B	200

Диагностика мутаций при опухолях головы и шеи

Панель Глиома

Одиночные мутации

Определение аберрантного метилирования (MGMT)

Определение мутации в гене IDH1-IDH2

Определение мутации WNT, SHH- активации

Определение мутации в гене CDKN2A/2B

Определение мутации в гене EGFR*

Определение мутации в гене ATRX

Определение мутации в гене TP53

Определение ко-экспрессии 1p-19q

Определение мутации H3K27

Определение мутации в гене MYCN

Определение мутации RELA fusion

Ген C19MC, miRNA профилирование

Определение мутации в гене VEGF

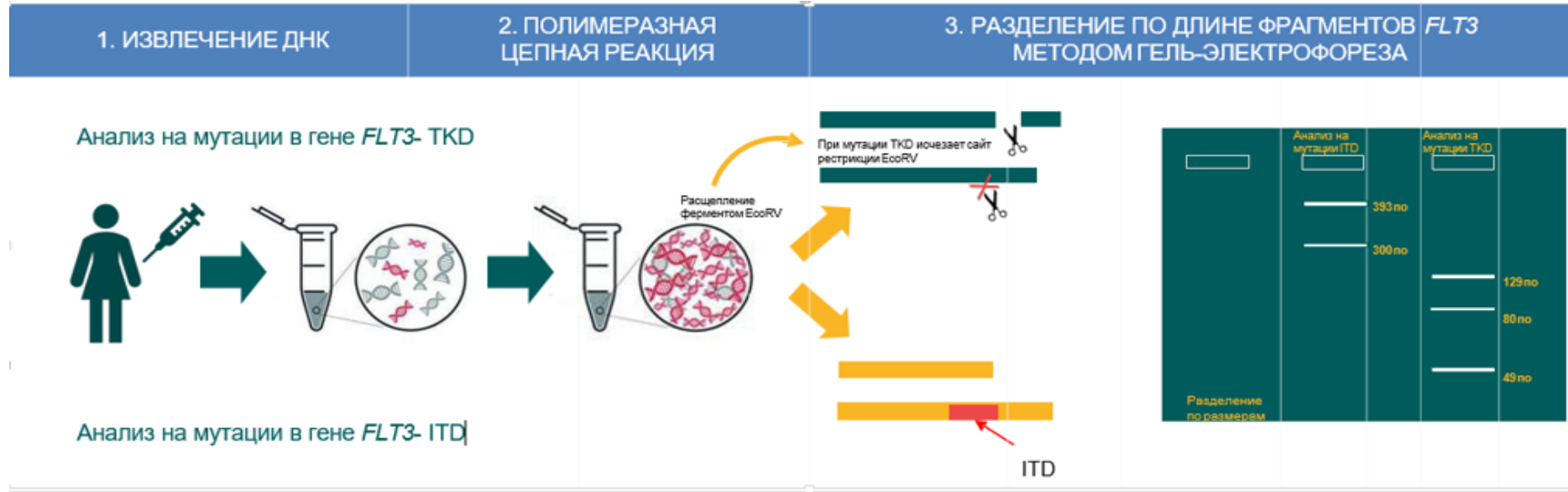


Большое спасибо за внимание

Раб. Тел 70-81-34

ТЕХНОЛОГИИ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ МУТАЦИЙ

ПЦР и электрофорез в агарозном геле



ПРЕИМУЩЕСТВА

1. Простота выполнения и интерпретация данных
2. Высокая чувствительность и специфичность;
3. Возможность автоматизации и стандартизации всех этапов исследования;
4. Низкие требования к исходному количеству биоматериала

НЕДОСТАТКИ

1. Высокий риск загрязнения (контаминации) реакционной смеси специфическими и неспецифическими молекулами нуклеиновых кислот. Риск ложноположительных и ложноотрицательных сигналов
2. ПЦР тесты рассчитаны на определение ограниченного числа известных мутаций
3. Невозможно количественное определение
4. Нельзя использовать для расчета соотношения сигналов

Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, et al. N Engl J Med. 2017;377(5):454-464.

Thiede C, Steudel C, Mohr B, et al. Blood. 2002;99(12):4326-4335

Döhner H, Estey E, Grimwade D, et al. Blood. 2017;129(4):424-447.

Au et al. Diagnostic Pathology (2016) 11:11

Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, et al. N Engl J Med. 2017;377(5):454-464

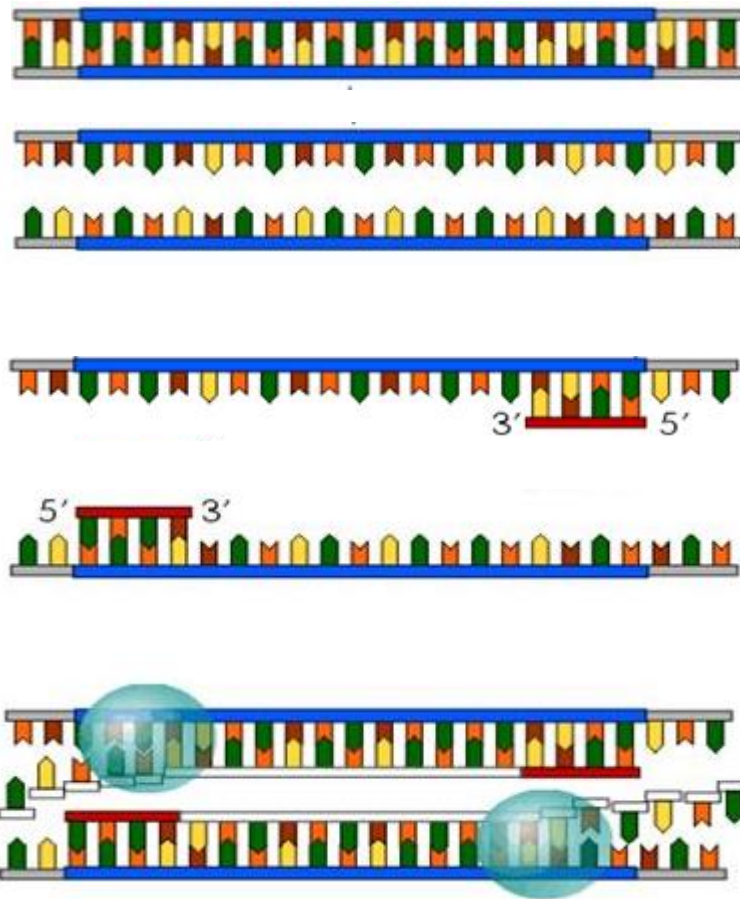
Этапы

1. Денатурация
93-95°C

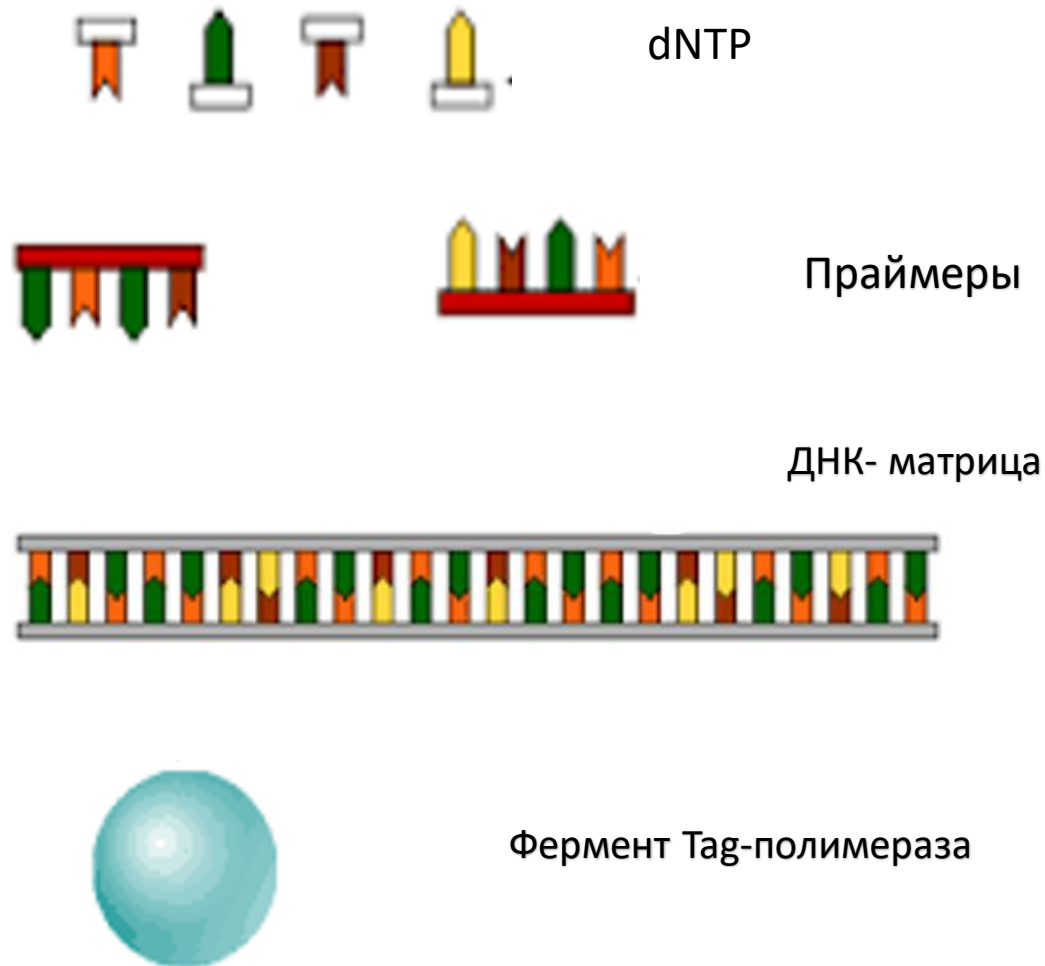
2. Отжиг праймеров
50-60°C

3. Синтез цепи ДНК
72°C

Первый цикл амплификации



Исходные компоненты ПЦР



Преимущества ПЦР

Простота выполнения и
интерпретации данных;
Высокая чувствительность и
специфичность

Возможность автоматизации
и стандартизации всех этапов
исследования;
Низкие требования к
исходному количеству
биоматериала

Недостатки ПЦР

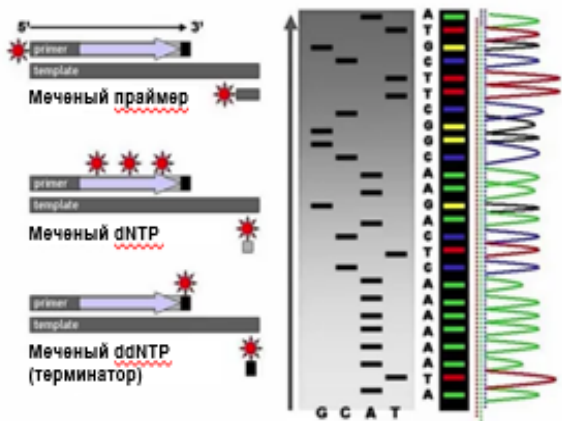
ПЦР тесты рассчитаны на
определение ограниченного
числа известных мутаций

Высокий риск контаминации;
Возможность получения
ложноположительных и
ложноотрицательных
результатов

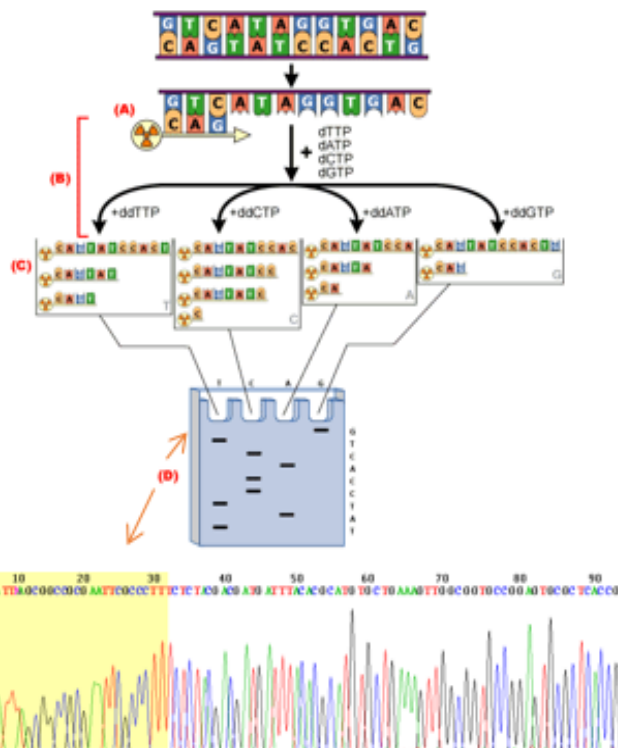
Секвенирование по Сэнгеру

Принцип метода

Используется для определения последовательности оснований ДНК



- Матрица ДНК
- Праймеры (затравка для полимеразы)
- ДНК-полимераза (синтез растущей цепи ДНК)
- dNTPs («материал» растущей цепи)
- ddNTP (обрыв реакции при включении терминирующего аналога)



ПЦР реакция с мечеными ddNTP
(ddTTP, ddCTP, ddATP, ddGTP)

Построение комплементарных цепей
разной длины
(конец каждой цепи соответствует
своему ddNTP)

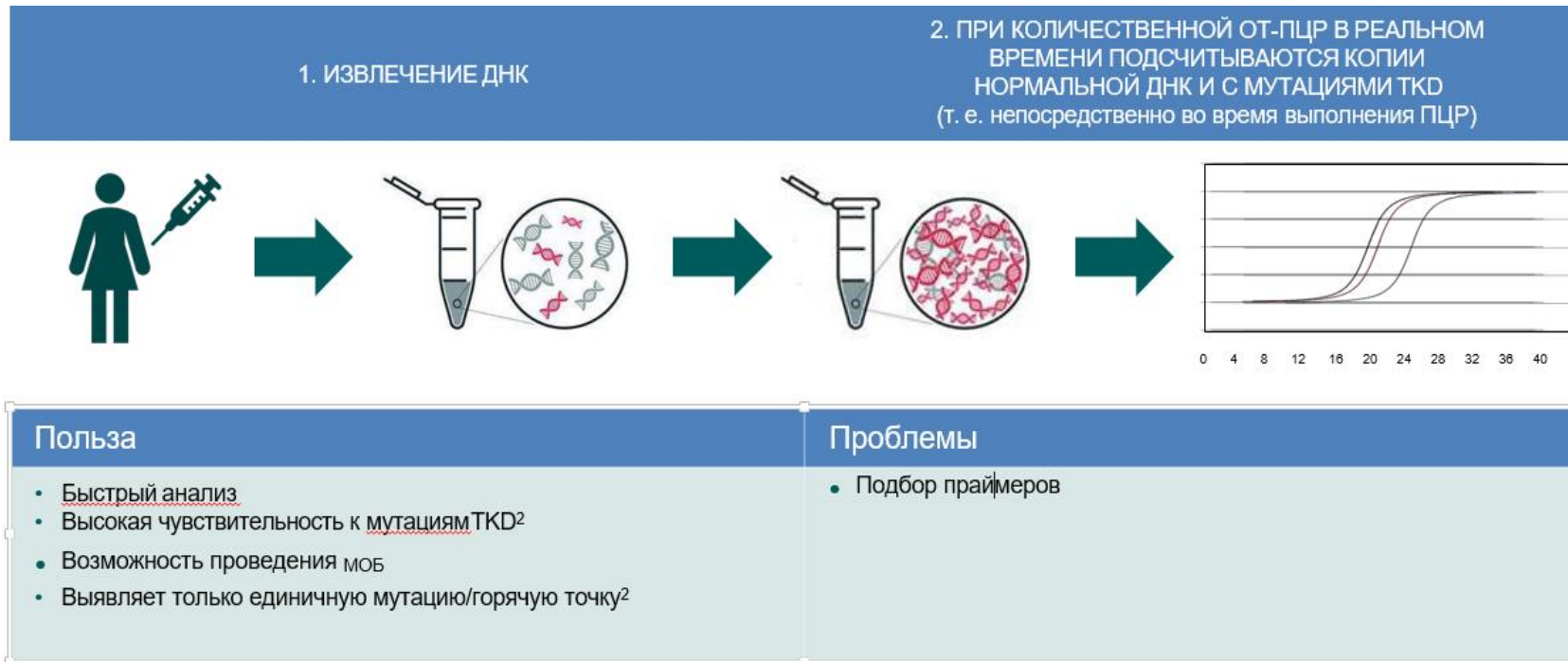
Чтение последовательности ДНК
(капиллярный электрофорез)
и анализ

ТЕХНОЛОГИИ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ МУТАЦИЙ

NGS

ТЕХНОЛОГИИ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ МУТАЦИЙ

ПЦР-РТ (технология Tag Man)



Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, et al. N Engl J Med. 2017;377(5):454-464.

Thiede C, Steudel C, Mohr B, et al. Blood. 2002;99(12):4326-4335

Döhner H, Estey E, Grimwade D, et al. Blood. 2017;129(4):424-447.

Au et al. Diagnostic Pathology (2016) 11:11

Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, et al. N Engl J Med. 2017;377(5):454-464