

# Sekvenciranje nove generacije (NGS) u dijagnostici i liječenju malignih bolesti

**Prof.dr.sc. Irena Drmić Hofman**

KBC Split, Laboratorij za molekularnu dijagnostiku  
Medicinski fakultet Split, Katedra za medicinsku kemiju i biokemiju

*„Molekularna genetika- novosti u dijagnostici i terapiji”, HAZU, 16. listopada 2017.*

## Pregled

- Pristupi molekularnom testiranju
- NGS
- Primjena NGS-a u dijagnostici tumora
- Primjer primjene NGS-a u kliničkom testiranju tumora
- Perspektive NGS-a

# Klasični pristupi molekularnom testiranju tumora

- **Molekularna dijagnostika**

- ekstrakcija DNA
- jedan gen = jedan test
- dio patohistološkog nalaza
- Sekvenciranje po Sangeru
- 1. generacija sekvenciranja



## Sekvenciranje gena po Sangeru



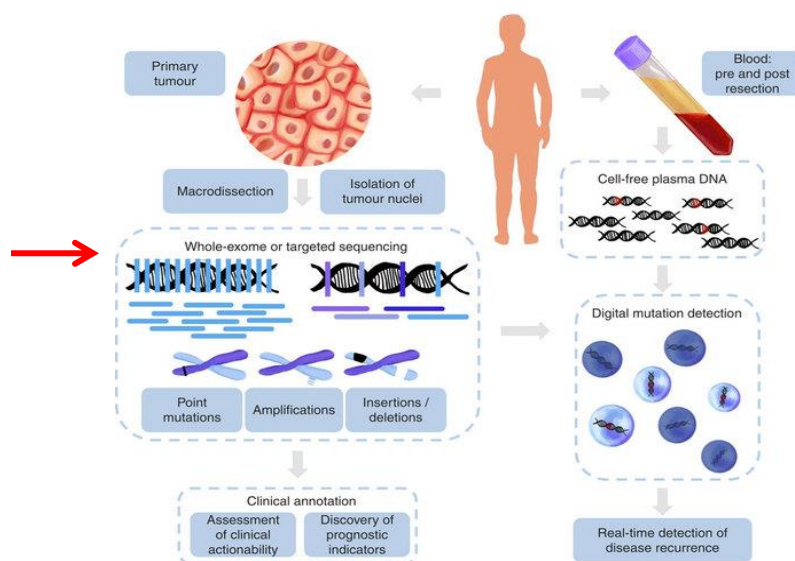
Kratke sekvence (do 900 bp), pogodno za mali broj uzoraka i skupo

# Promjena paradigme molekularnog testiranja

- **Molekularna dijagnostika tumora**

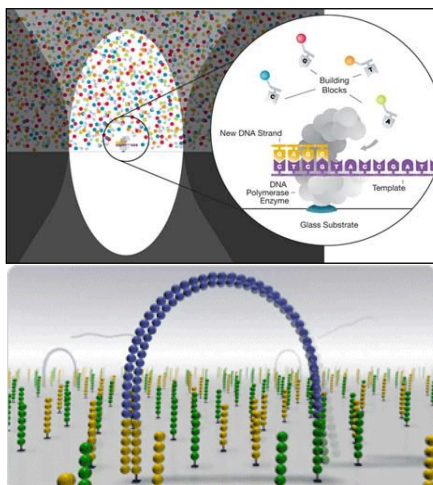
- Potreba za istovremenom analizom mnoštva gena
- Raznolike genetičke promjene (točkaste mutacije, translokacije i sl.), potrebno ih je analizirati istovremeno
- Limit: ograničena količina uzorka potrebnog za analizu

## Shema molekularnog testiranja u patologiji

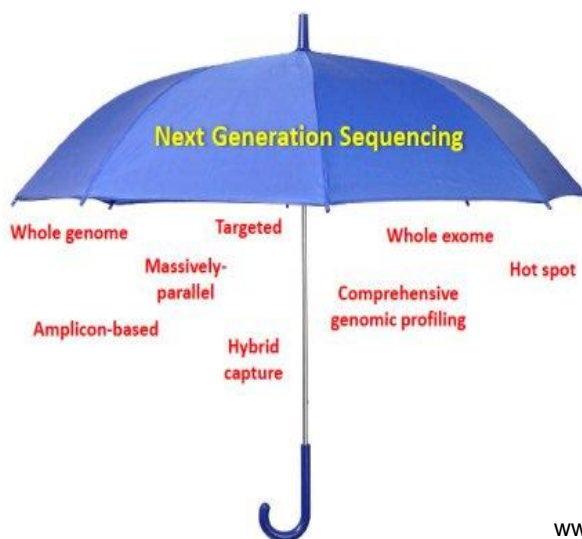


# Tehnologija sekvenciranja nove generacije (NGS)

- Standardno testiranje zamijenjeno masivnim paralelnim sekvenciranjem
- Mnoštvo fragmenata DNA/RNA za analizu
- Pomak od analize jednog gena prema analizi multiplih gena



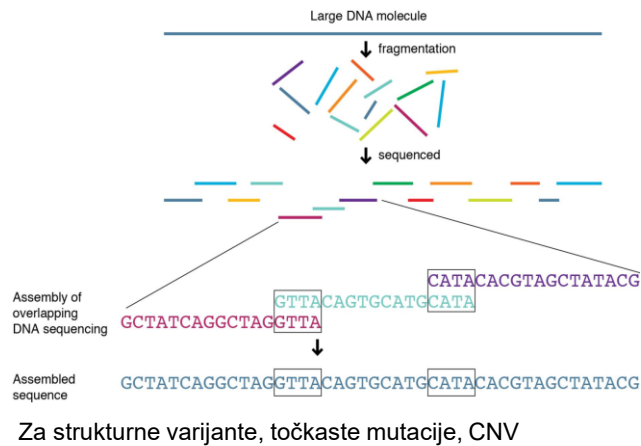
## Sekvenciranje nove generacije



[www.healio.com](http://www.healio.com)

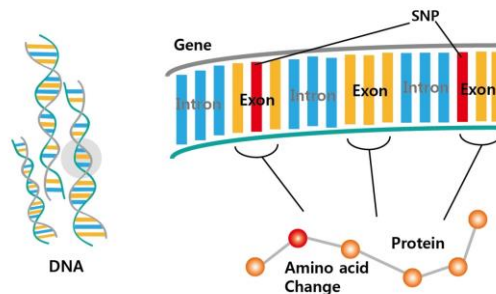
## Cjelogenomsko sekvenciranje

- (a) engl. *whole genome sequencing (WGS)*



## Cjeloegzomsko sekvenciranje

- (b) engl. *whole exome sequencing (WES)*  
(1% genoma, no 85% mutacija) 20,000-30,000 varijanti



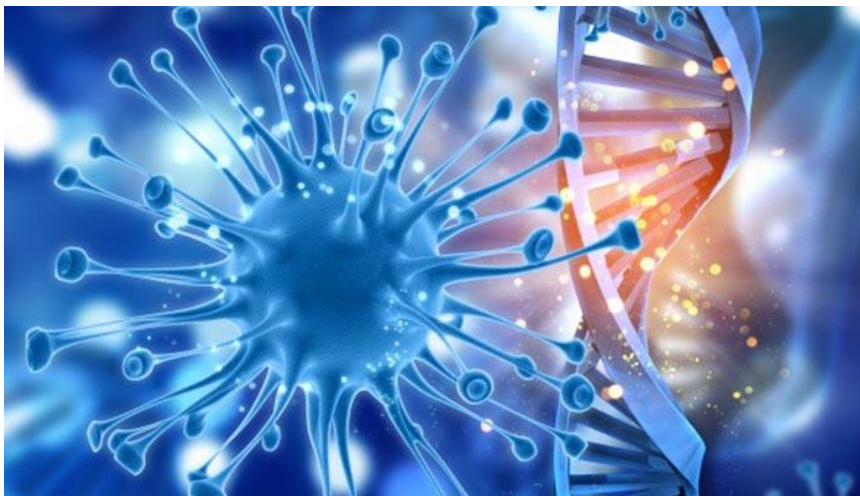
Predominantno za točkaste mutacije, CNV

## Ciljano sekvenciranje

- brže, jednostavnije i jeftinije
- **Paneli** imaju obično 20-50 gena, no mogu imati čak ~100 gena
- Dijagnostičko i prognostičko značenje
- Za sekvenciranje DNA i RNA

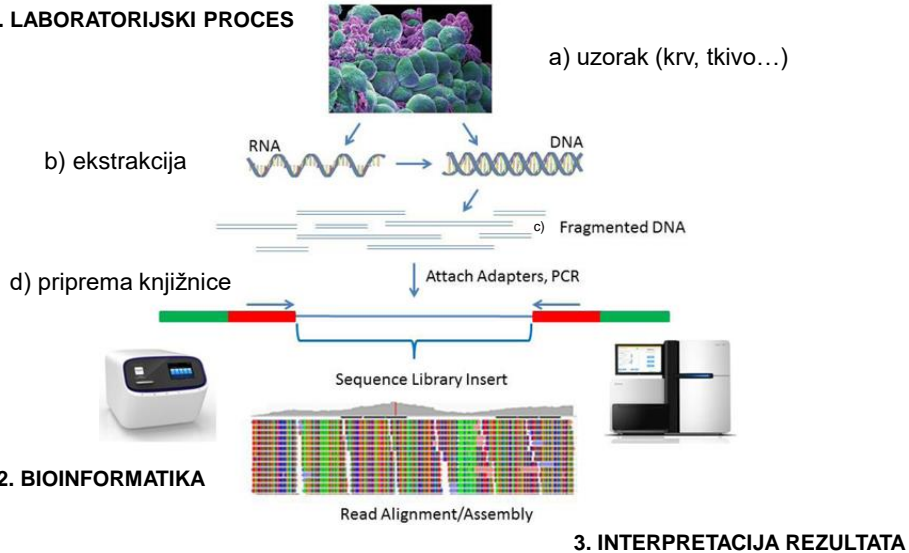


## Tehnologija sekvenciranja novije generacije (NGS)



# NGS

## 1. LABORATORIJSKI PROCES



## 2. BIOINFORMATIKA

## 3. INTERPRETACIJA REZULTATA

## 2. Bioinformatička analiza

- Uključuje analizu okrivnosti i dubine (broj očitavanja)
- mapiranje očitanih sekvenci, usporedba s referentnim bazama
- utvrđivanje i obilježavanje varijanti (anotacija)





# Bioinformatički izazovi NGS-a

Golema količina podataka dobivena sekvenciranjem (stotine Gb ili Tb)



## 3. Interpretacija rezultata NGS-a

- samo dio genetičkih varijanti dovodi do pojave bolesti; razdvajanje „driver” od passenger mutacija
- Heterogenost tumora i česte strukturne preuredbe gena
- **Potvrda: sekvenciranje po Sangeru zlatni standard!**



# Primjena NGS u dijagnostici tumora

- (a) Identifikacija novih mutacija u tumorima
- (b) NGS u nasljednim tumorskim sindromima
- (c) NGS za personalizirano liječenje
- (d) Detekcija tumorske cirkulirajuće DNA (ctDNA)

## Kliničke analize tumora tehnikom NGS u Hrvatskoj

- NGS instrumenti - KBC Split i Medicinski fakulteti Rijeka i Zagreb
- Ciljano sekvenciranje
- Primjer:

Sekvenciranje BRCA1,2 za moguću primjenu PARP inhibitora u terapiji HG seroznih karcinoma jajnika



Indikacije za testiranje <b>BRCA mutacija</b>	Indikacija za terapiju <b>PARP inhibitorima</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Serozni epitelni karcinom jajnika visokog stupnja nediferenciranosti (gradusa)</li> <li>• Karcinom jajovoda</li> <li>• Primarni peritonealni karcinom</li> </ul>	<ol style="list-style-type: none"> <li><b>1. Definitivno patogene mutacije (tip 5) &gt; 99 *</b></li> <li><b>2. Vrlo vjerojatno patogene (tip 4) 0,95 - 0,99</b></li> <li><b>3. Mutacije neodređenog značaja (tip 3) 0,05 – 0,949</b></li> <li><b>4. Nema kliničkog značaja (tip 2) 0,001 – 0,049</b> Vrlo vjerojatno benigne</li> <li><b>5. Benigni polimorfizmi (SNP) &lt; 0,001</b></li> </ol>

\* Vjerojatnost patogenosti

Sharon E. Plon et al., Human Mutation 29:1282-1291, 2008

## Rezultati testiranja BRCA1,2

KBC Split	Medicinski fakultet Rijeka
Ukupno uzoraka krvi N=67	Ukupno uzoraka N=101 Krv N=42 Tkivo N=54 RNA later N=5
Ukupno mutacija 13/67 (19,6%)	30/101 (29,5%)
10 u BRCA1 i 3 u BRCA2	27 u BRCA1 i 3 u BRCA2



## **Perspektive NGS-a u dijagnostici tumora**

- Integriranja podataka iz svih izvora
- Sekvenciranje RNA- relativna ekspresija gena
- Imunoterapija analiza odgovora
- Kombinacije metoda (sekvenciranje egzoma masenom spektrometrijom?)

Standardizacija i konsenzus o primjeni  
novih genomskih metoda u  
molekularnoj dijagnostici u Hrvatskoj?

