



***Масштабное
генотипирование на
основе MALDI-TOF в
контексте
персонализированной
медицины***

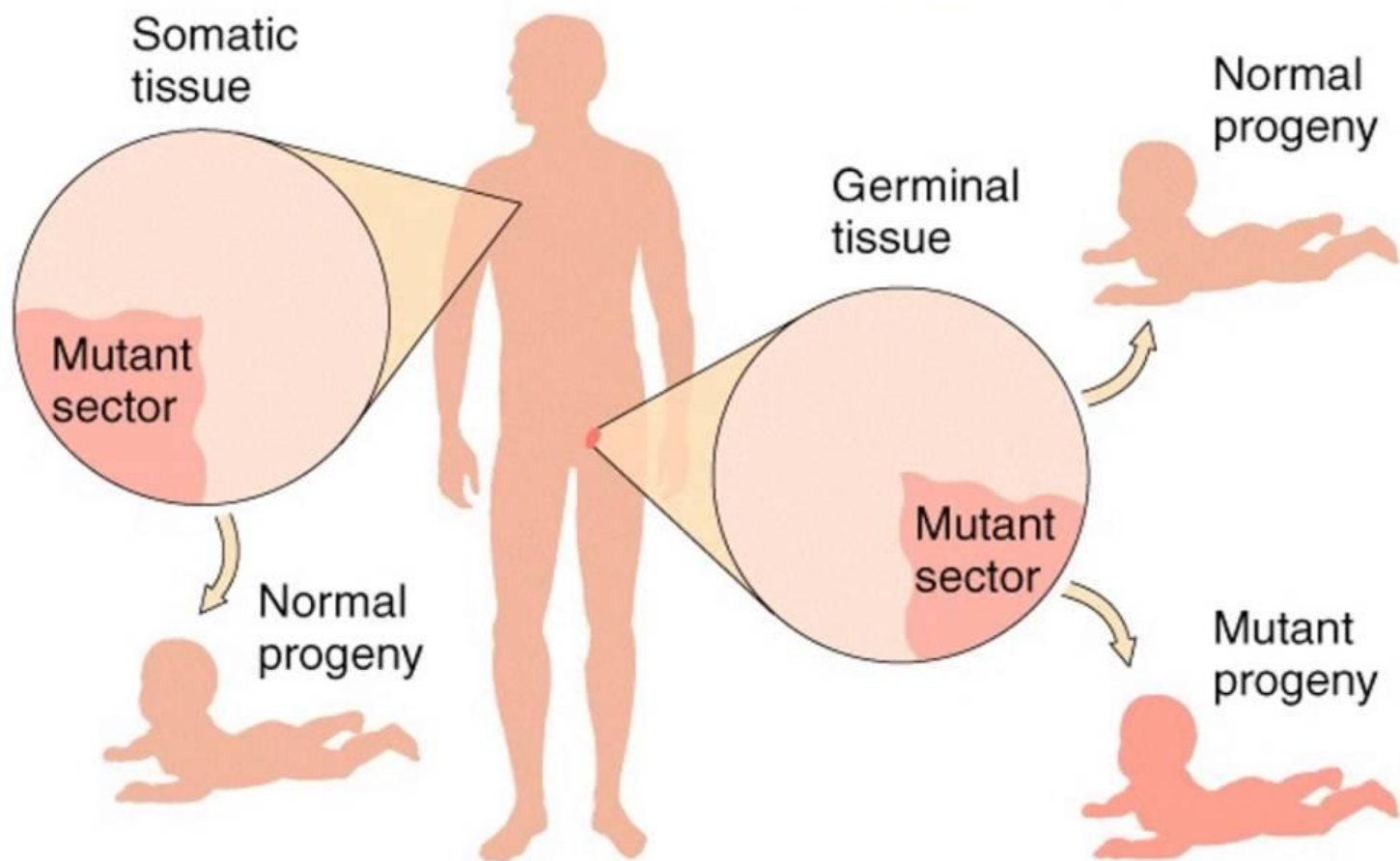
Agela
BIOSCIENCE

Клинико-лабораторная диагностика и лабораторная генетика

Соматические
мутации

Наследственные
предрасположенности

DIFFERENCE – SOMATIC / GERMLINE

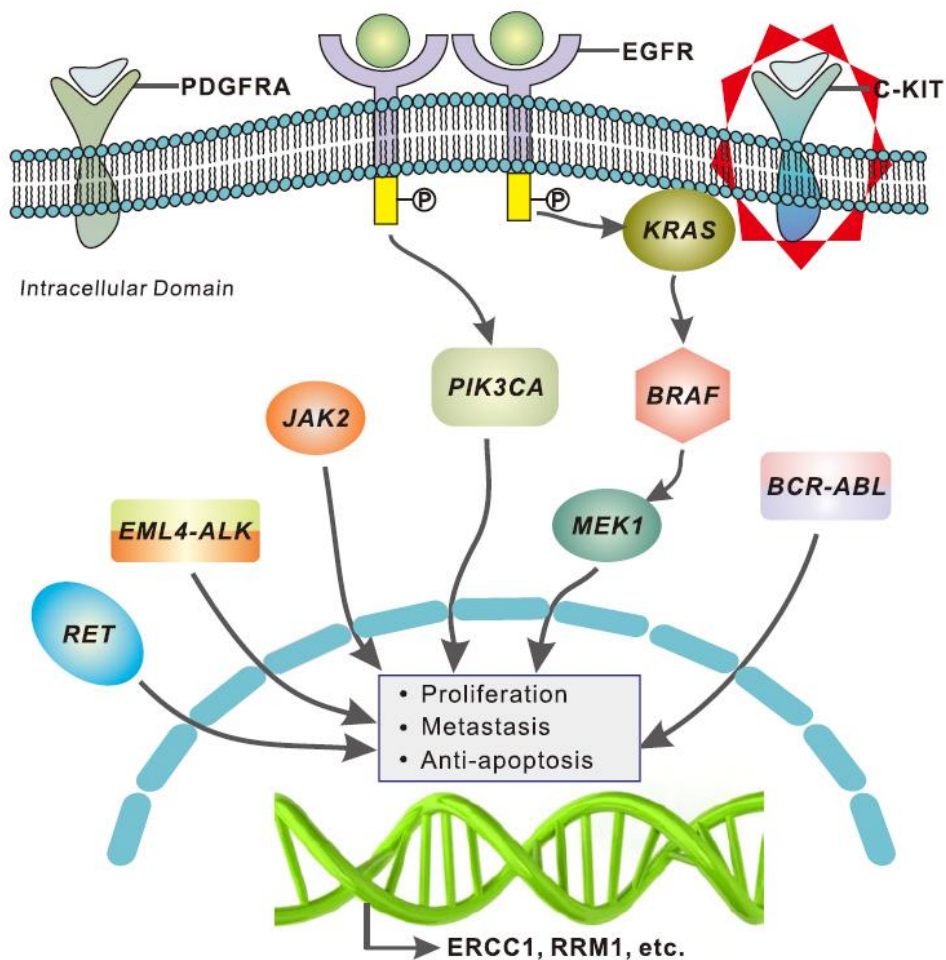


Наследственные предрасположенности к онкологическим заболеваниям. Органы и ткани

<i>Молочная железа</i>	<i>Яичники</i>	<i>Эндо метрий, матка</i>
<i>Мио метрий, матка</i>	<i>Предстательная железа</i>	<i>Желудок</i>
<i>Толстая и прямая кишки</i>	<i>Легкие и плевра</i>	<i>Тонкий кишечник</i>
<i>Пищевод</i>	<i>Мочеиспускательный канал и мочевого пузыря</i>	<i>Экзокринная поджелудочная железа</i>
<i>Эндокринные почки поджелудочной железы</i>	<i>Шейка матки</i>	<i>Кожа</i>
<i>Кость</i>	<i>Щитовидная железа</i>	<i>Печень</i>
<i>Мягкие ткани</i>	<i>Разные эндокринные железы</i>	<i>Кровь</i>
<i>Голова и шея</i>	<i>Центральная нервная система</i>	<i>Периферическая нервная система</i>

Основные гены, мутации которых определяют наследственные предрасположенности к онкологическим заболеваниям

AIP	ALK	APC	ATM	BAP1	BARD1	BLM	BMPR1A	BRCA1
BRCA2	BRIP1	BUB1B	CDC73	CDH1	CDK4	CDKN1C	CDKN2A	CEBPA
CEP57	CHEK2	CYLD	DDB2	DICER1	DIS3L2	EGFR	EPCAM	ERCC2
ERCC3	ERCC4	ERCC5	EXT1	EXT2	EZH2	FANCA	FANCB	FANCC
FANCD2	FANCE	FANCF	FANCG	FANCI	FANCL	FANCM	FH	FLCN
GATA2	GPC3	HNF1A	HOXB13	HRAS	KIT	MAX	MEN1	MET
MLH1	MSH2	MSH6	MUTYH	NBN	NF1	NF2	NSD1	PALB2
PHOX2B	PMS1	PMS2	PPM1D	PRF1	PRKAR1A	PTCH1	PTEN	RAD51C
RAD51D	RB1	RECQL4	RET	RHBDF2	RUNX1	SBDS	SDHAF2	SDHB
SDHC	SDHD	SLX4	SMAD4	SMARCA4	SMARCB1	STK11	SUFU	TMEM127
TP53	TSC1	TSC2	VHL	WT1	WRN	XPA	XPC	



**Соматические
мутации и их
значение в
патогенезе и
лечении
онкологически
х заболеваний**

Plasma and saliva miR-21 expression in colorectal cancer patients

A. A. Sazanov^{1,2} · E. V. Kiselyova³ · A. A. Zakharenko³ · M. N. Romanov⁴ ·
M. I. Zaraysky¹

Received: 25 August 2016 / Revised: 14 November 2016 / Accepted: 17 November 2016
© Institute of Plant Genetics, Polish Academy of Sciences, Poznan 2016

Abstract MicroRNA-21 (miR-21) expression was quantified by real-time qRT-PCR in peripheral blood and saliva samples obtained from patients diagnosed with colorectal cancer (CRC) of varying degrees of malignancy and healthy volunteers. All patients had adenocarcinoma located in the distal colon at different stages. Significant differences were detected between the control group and the total experimental group of CRC patients (plasma, $P = 0.0001$; saliva, $P = 5e-12$). MiR-21 expression was also significantly different in certain sub-

Keywords Blood plasma · Colorectal cancer · Epigenetics · Gene expression profiling · microRNA (miR) · miR-21 · Molecular diagnostics · Saliva · Real-time qRT-PCR

Introduction

MicroRNAs (miRs) are non-coding RNA molecules of about 20 nucleotides long that are involved in regulation of gene

Кривые накопления флуоресцентного сигнала

J Appl Genetics

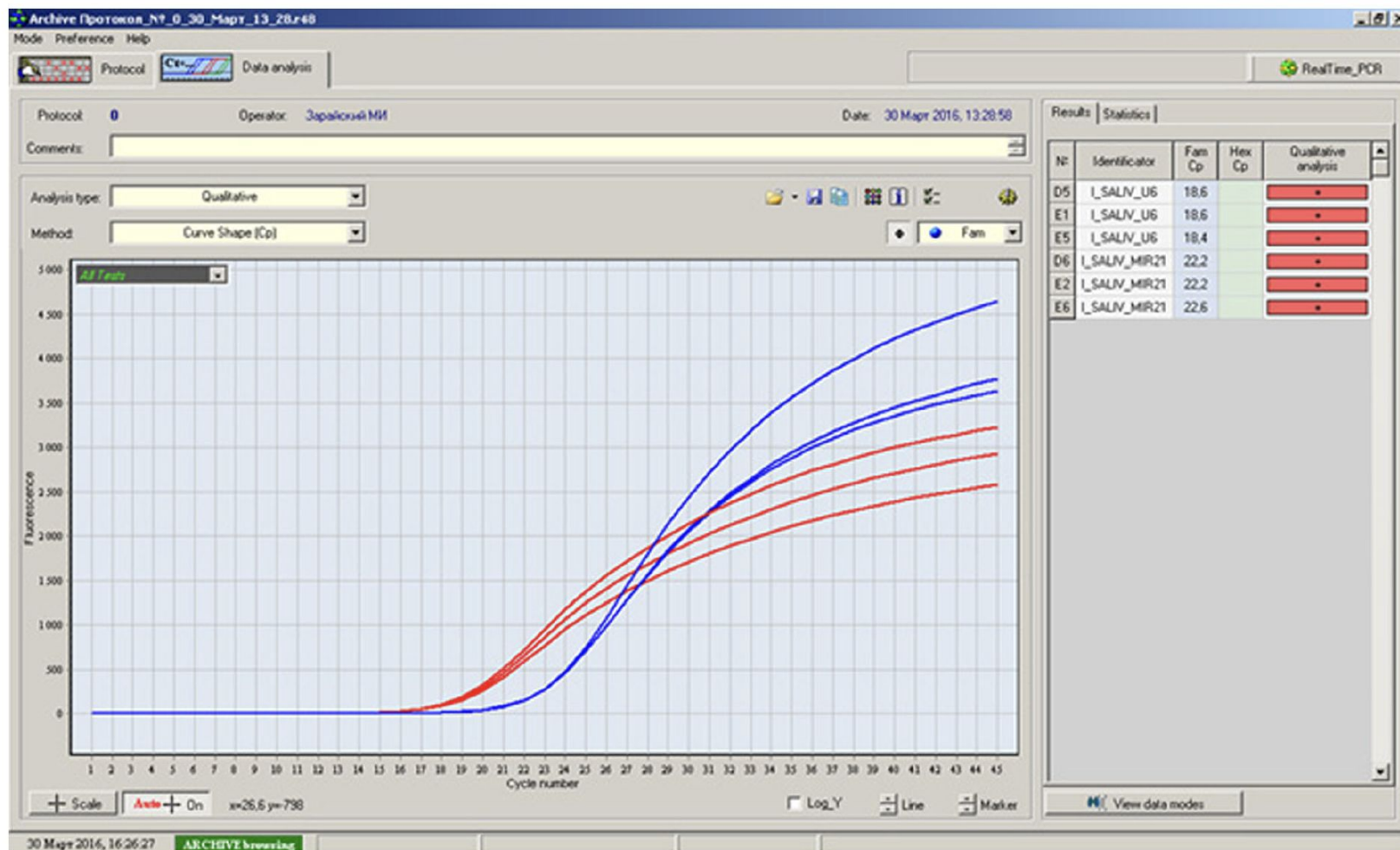
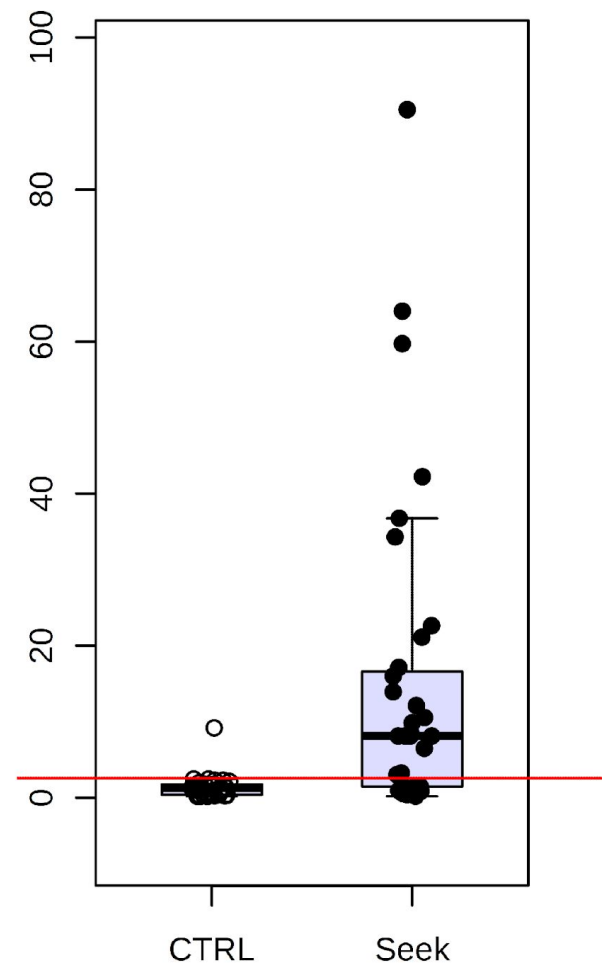
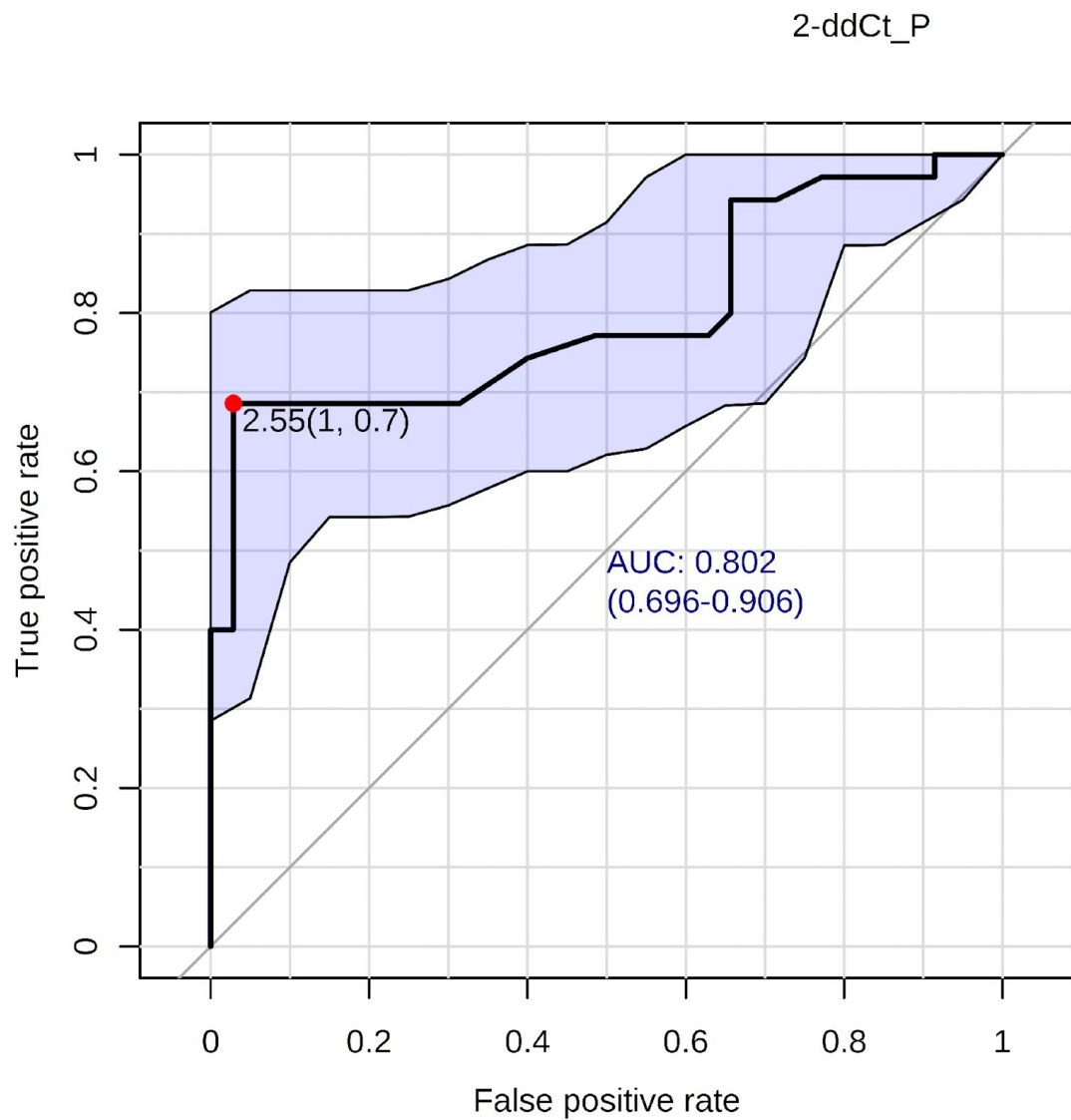
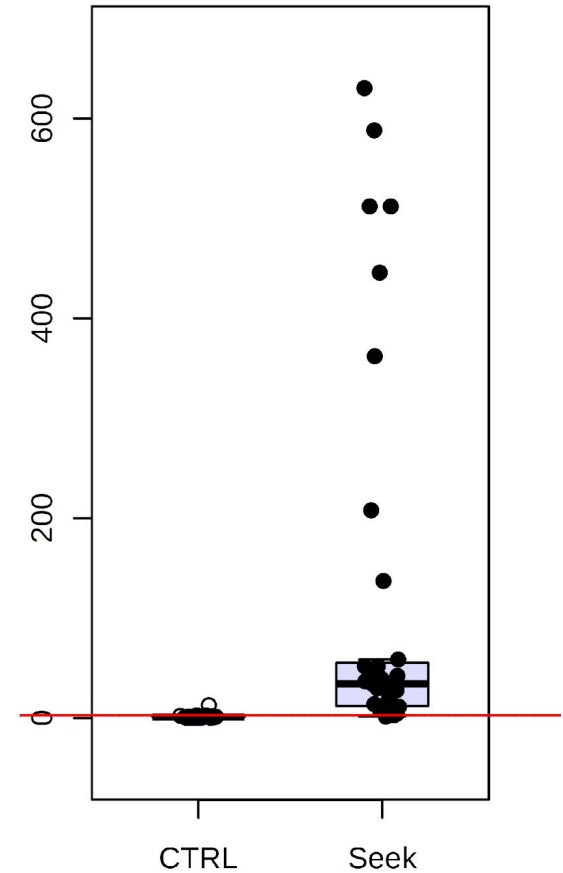
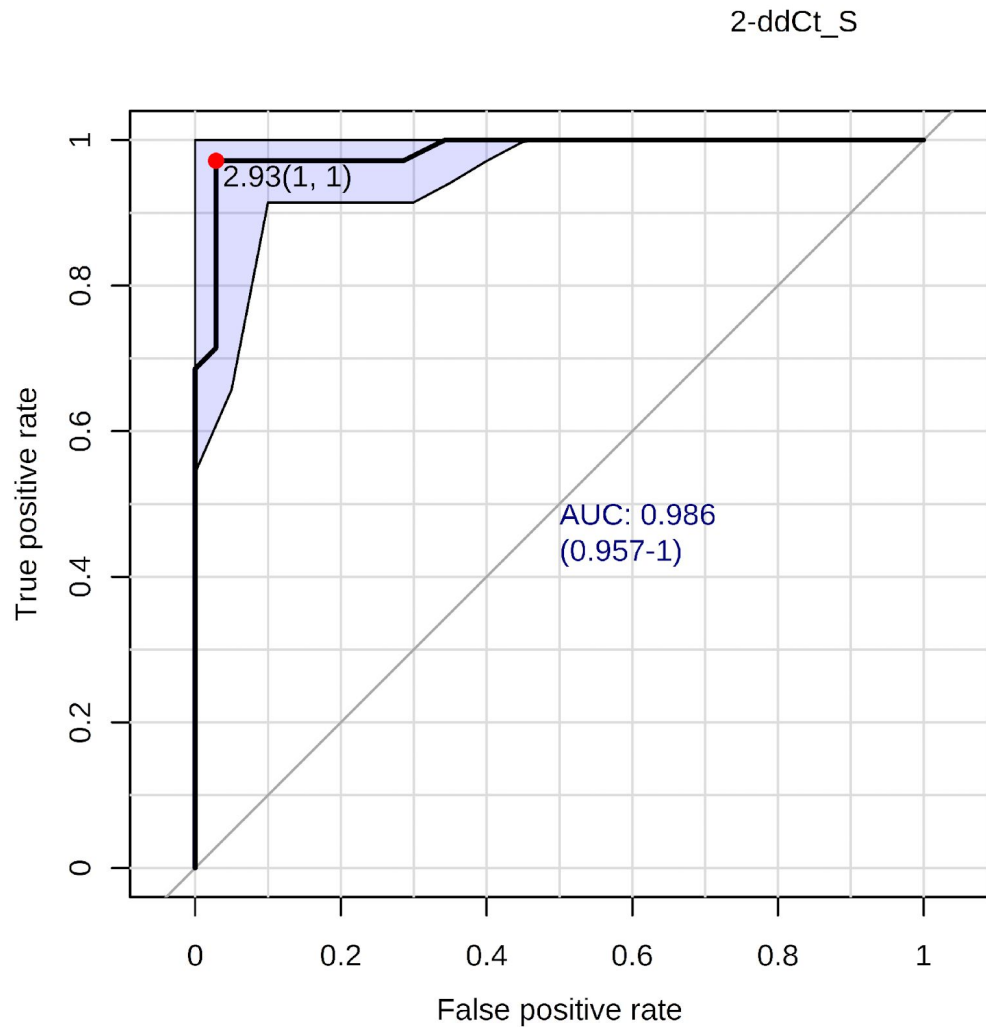


Fig. 1 An example of miR-21 and U6 snRNA accumulation curves produced in the present study

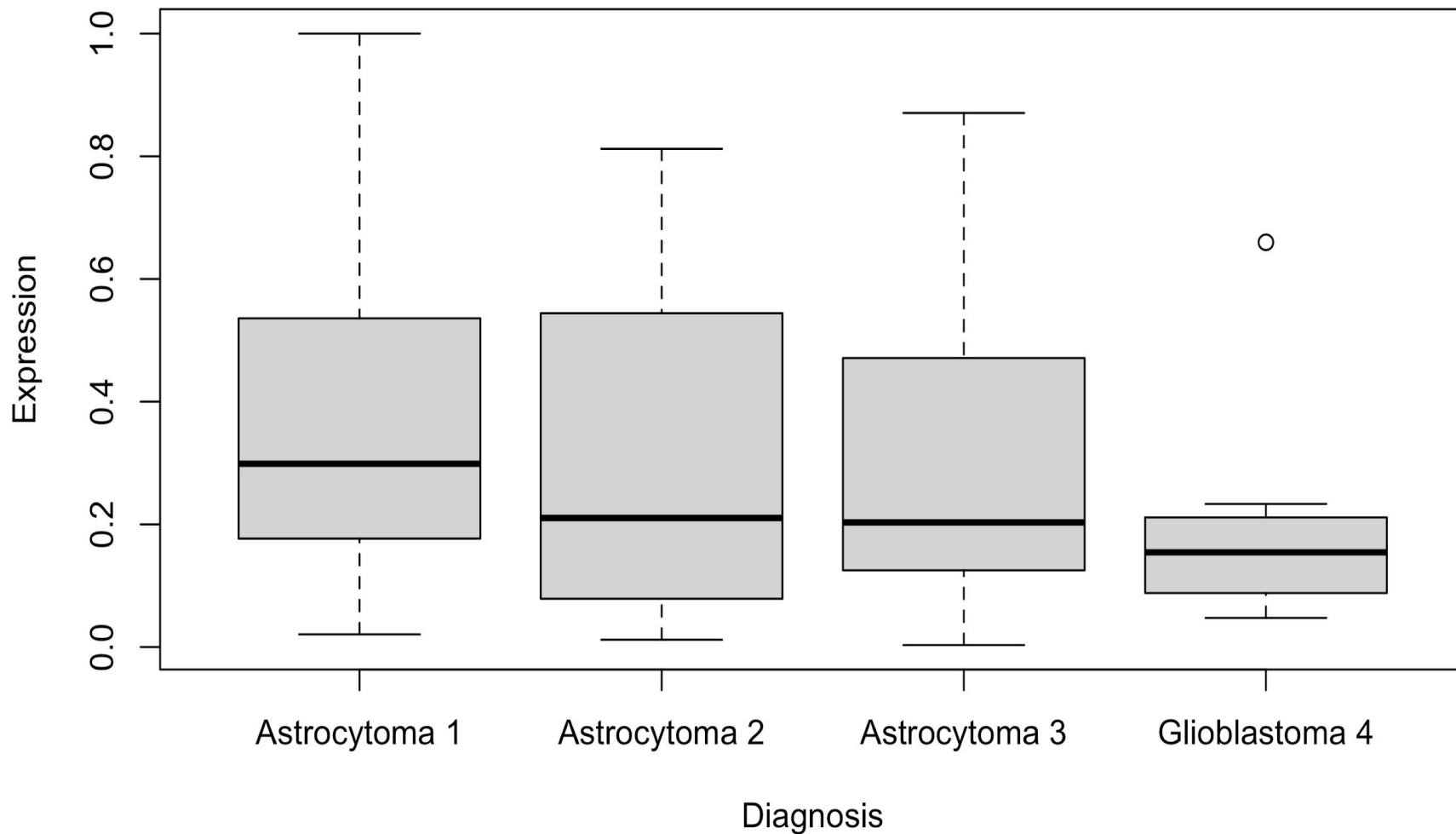
ROC-кривая экспрессии miR-21 в плазме



ROC-кривая экспрессии miR-21 в слюне

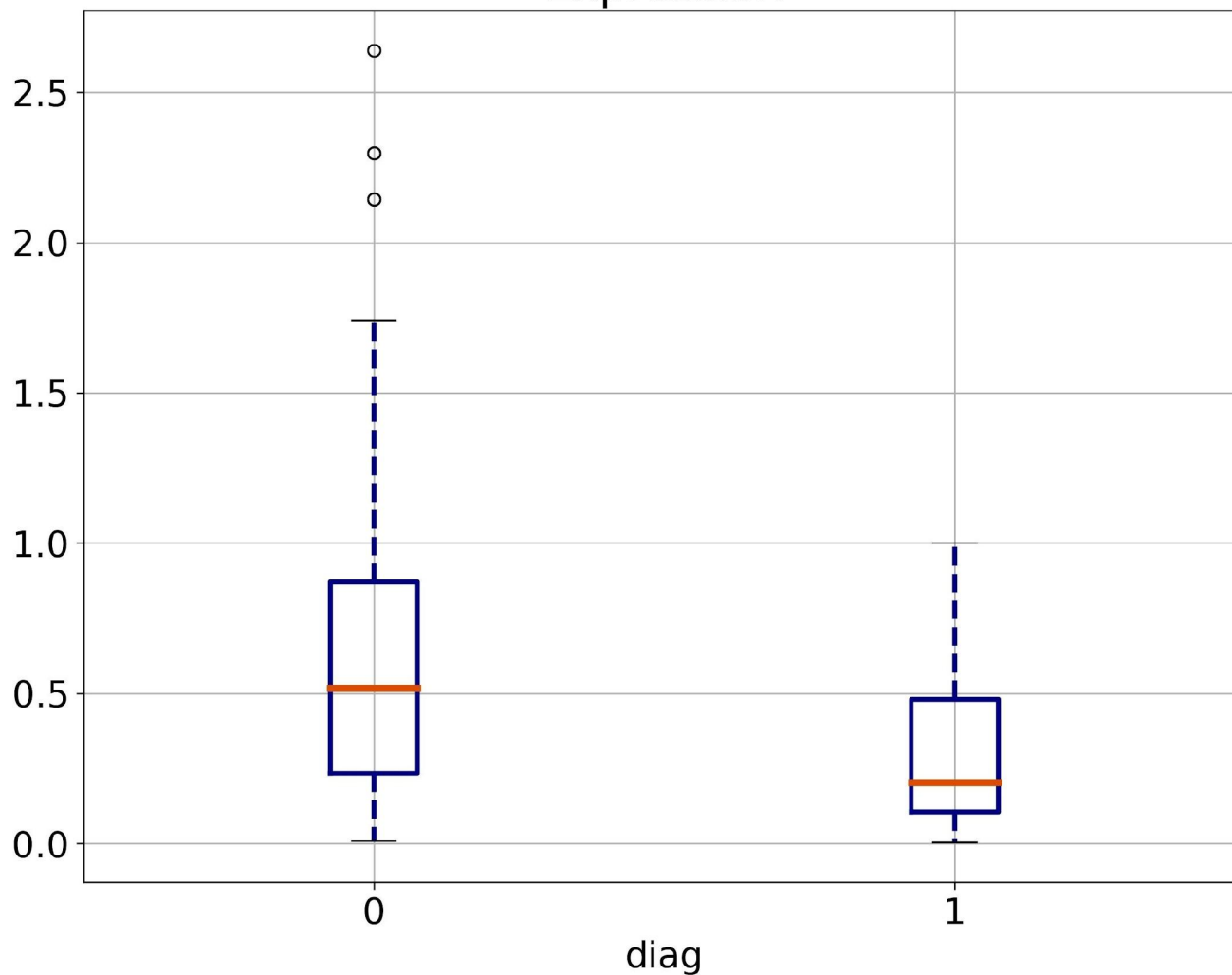


Боксплоты уровней экспрессии miR-21 в R



Боксплоты уровней экспрессии miR-21 в Python

Boxplot grouped by diag
Expression



Логистическая регрессия в Python

```
In [203]: from matplotlib.colors import ListedColormap
          from sklearn import model_selection, datasets, linear_model, metrics
          import numpy as np
```

```
In [204]: log_regressor = linear_model.LogisticRegression(random_state = 1)
```

```
In [205]: log_regressor.fit(X2, y2)
```

```
Out[205]: LogisticRegression(C=1.0, class_weight=None, dual=False, fit_intercept=True,
                             intercept_scaling=1, l1_ratio=None, max_iter=100,
                             multi_class='auto', n_jobs=None, penalty='l2',
                             random_state=1, solver='lbfgs', tol=0.0001, verbose=0,
                             warm_start=False)
```

```
In [206]: lr_predictions = log_regressor.predict(X2)
```

```
In [207]: lr_proba_predictions = log_regressor.predict_proba(X2)
```

```
In [208]: from sklearn import model_selection, datasets, linear_model, metrics
          from matplotlib.colors import ListedColormap
```

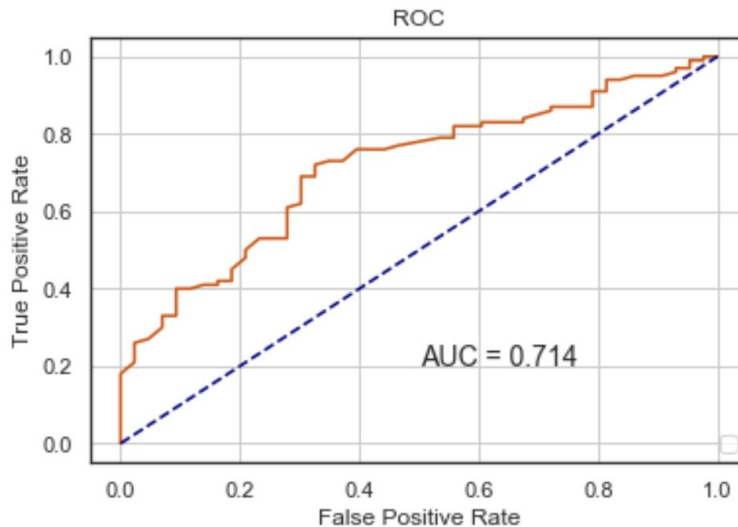
```
In [209]: fpr, tpr, _ = metrics.roc_curve(y2, lr_proba_predictions[:,1])
```

Построение ROC-кривой в Python

```
In [211]: plt.rcParams.update({'font.size' : 14})
plt.figure()

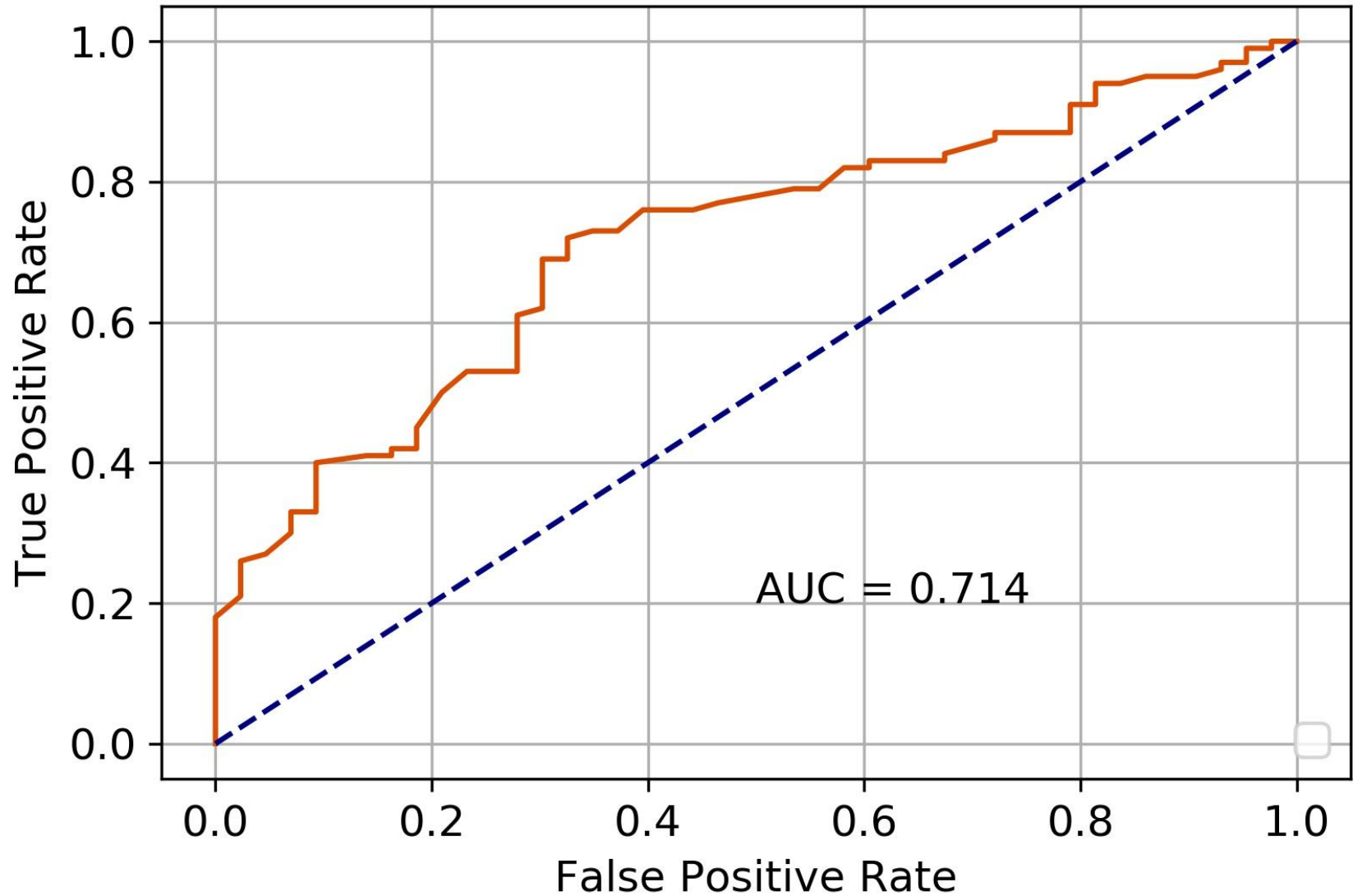
plt.plot(fpr, tpr, color='#dc4d01')
plt.plot([0, 1], [0, 1], color='navy', linestyle='--')
plt.xlim([-0.05, 1.05])
plt.ylim([-0.05, 1.05])
plt.xlabel('False Positive Rate')
plt.ylabel('True Positive Rate')
plt.title('ROC')
plt.legend(loc="lower right")
plt.text(0.5, 0.2, 'AUC = 0.714')
plt.grid(True)
plt.show()
```

No handles with labels found to put in legend.



ROC-кривая экспрессии miR-21 в Python

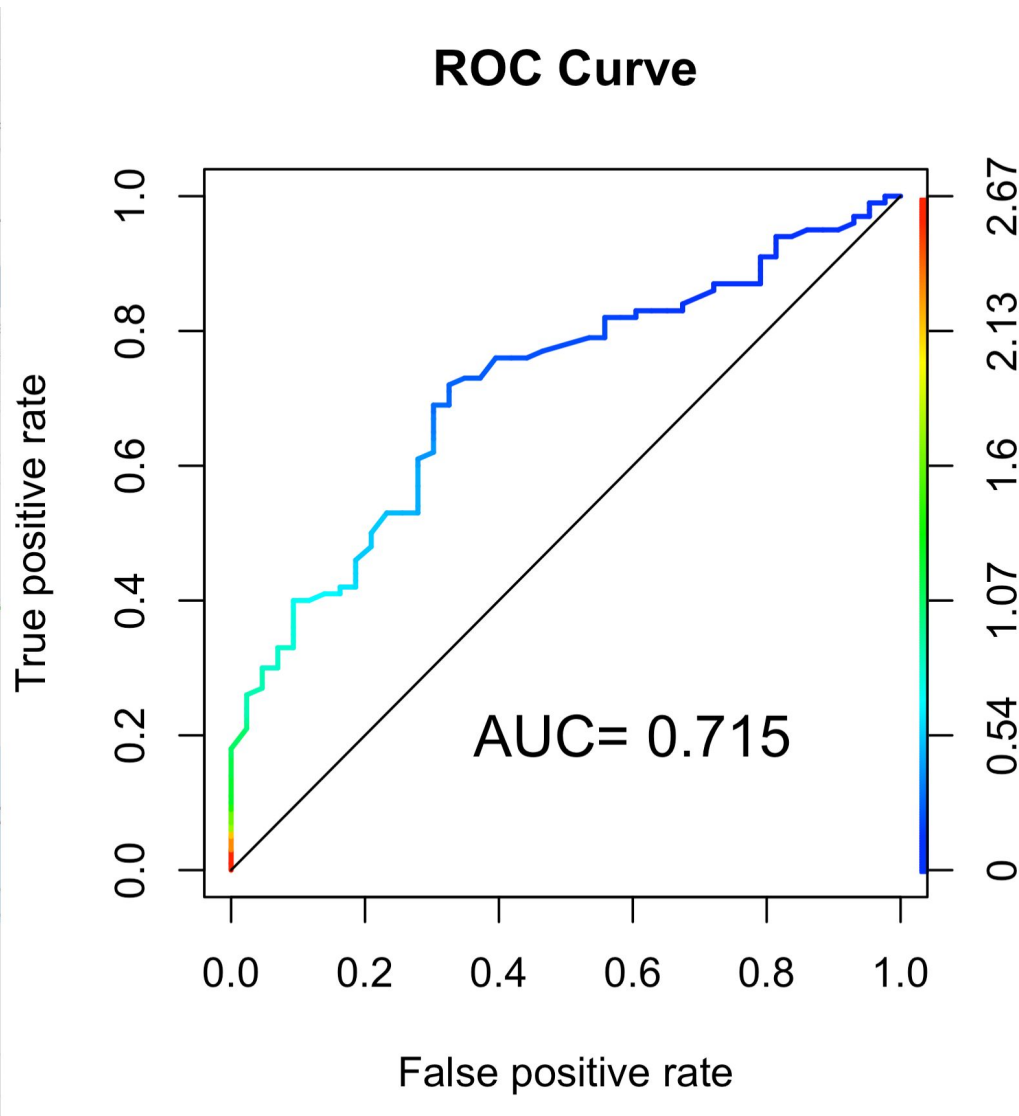
ROC



Построение ROC-кривой в R

```
27
28 # ROC-curve
29 library(ROCR)
30 pred <- prediction(Expression, diag)
31 plot(performance(pred, "tpr", "fpr"), colorize = T, lwd=2)
32 lines(c(0,1),c(0,1))
33 text(0.6,0.2,paste("AUC= ", round(auc,3), sep=""), cex=1.4)
34 title("ROC Curve")
35
36 fitroc1 <- glm(diag ~ Expression, finrocdf1, family = 'binomial')
37 log_coef <- fitroc1$coefficients
38 summary(fitroc1)
39 finrocdf1$prob <- predict(object = fitroc1, type = "response")
40
41 View(finrocdf1)
42
43
```

ROC-кривая экспрессии miR-21 в R



Определение точки отсечения (cut off) в Python

```
In [213]: # Попробуем найти отсечку
          from sklearn.metrics import precision_recall_curve
```

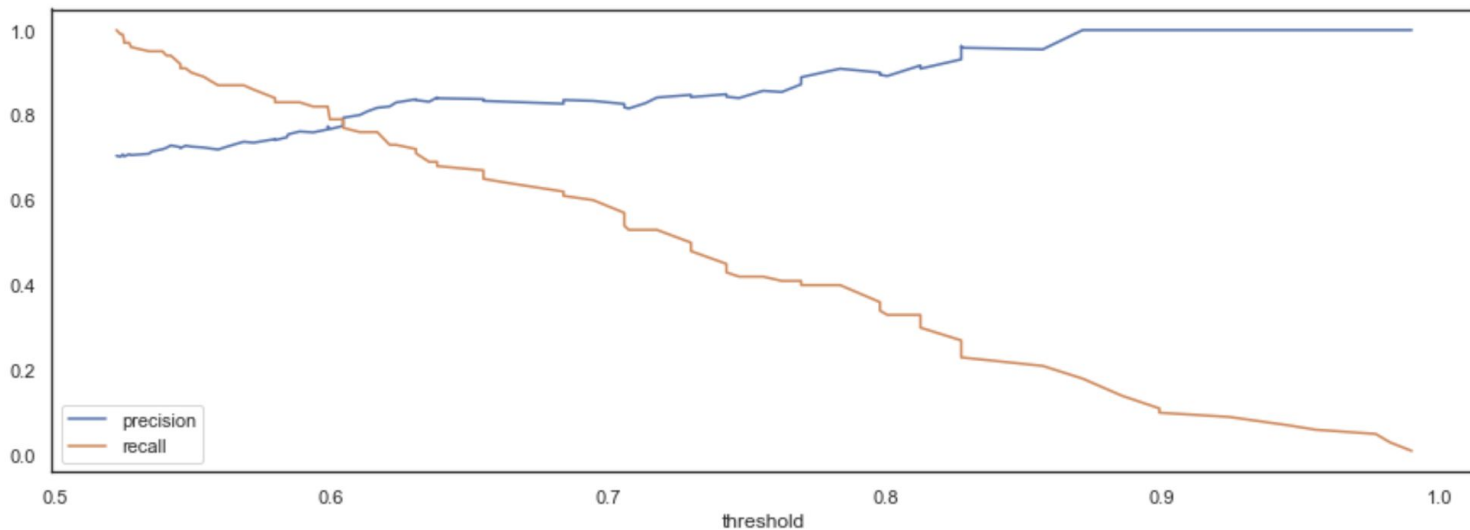
```
In [214]: prec, rec, thresh = precision_recall_curve(y2, lr_proba_predictions[:,1])
```

```
In [216]: prec, rec, thresh = precision_recall_curve(y2, lr_proba_predictions[:,1])
          plt.figure(figsize=(15, 5))

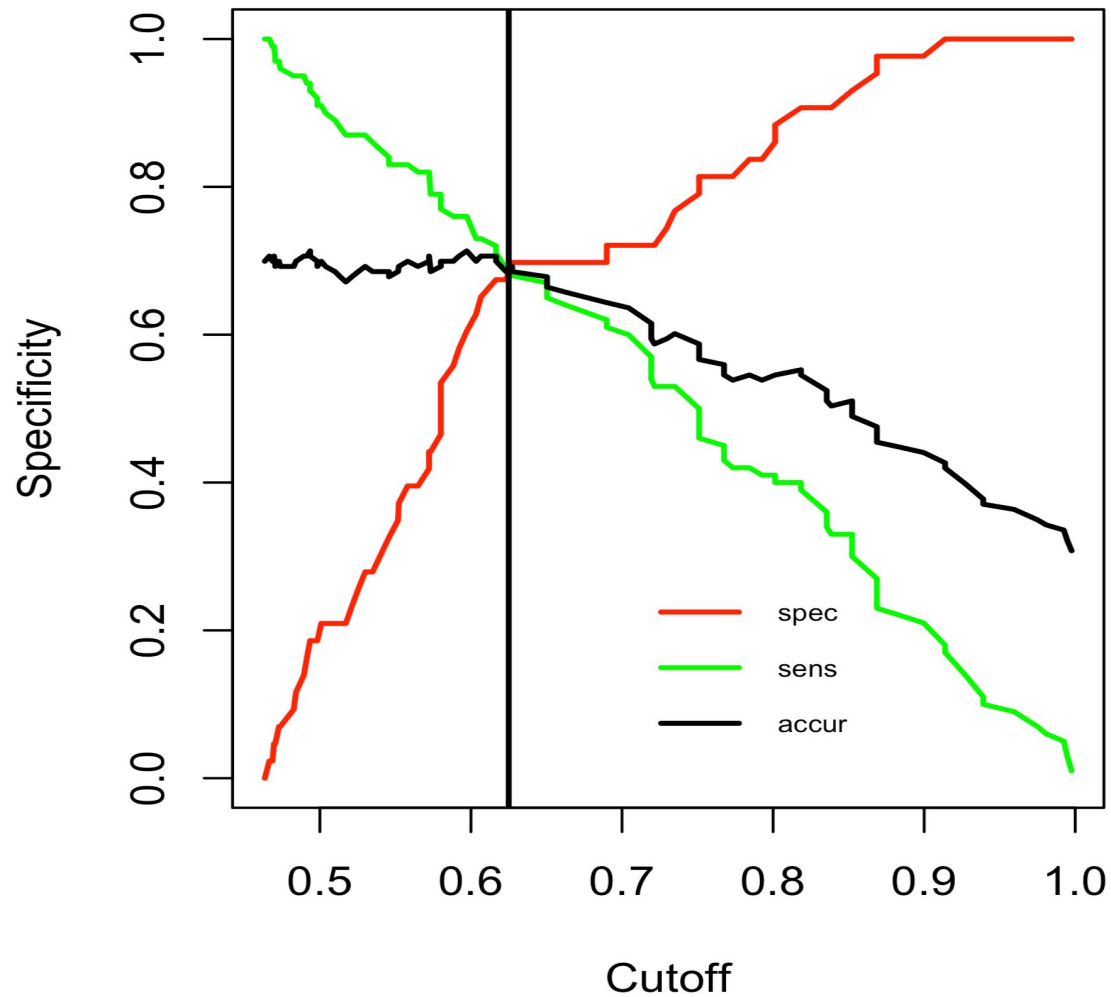
          plt.plot(thresh, prec[:-1], label="precision")
          plt.plot(thresh, rec[:-1], label="recall")
          plt.xlabel("threshold")

          plt.legend()
```

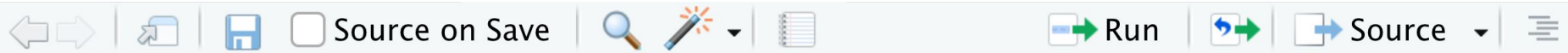
```
Out[216]: <matplotlib.legend.Legend at 0x7fa52eefc7d0>
```



Определение точки отсечения (cut off) в R



Характеристики клинической эффективности теста в R



```
130
131 install.packages('epiR')
132 library(epiR)
133 # Создадим матрицу epi.test. Принцип такой:
134 datpcr <- as.table(matrix(c(30,31,13,69), nrow = 2, byrow = TRUE))
135 # дадим названия колонкам и рядам
136 colnames(datpcr) <- c("Dis+", "Dis-")
137 rownames(datpcr) <- c("Test+", "Test-")
138 #      Dis+ Dis-
139 # Test+  30  31
140 # Test-  13  69
141 # СМОТРИМ РЕЗУЛЬТАТ
142 pcrval <- epi.tests(datpcr, conf.level = 0.95)
143 print(pcrval); summary(pcrval)
144 # Outcome +      Outcome -      Total
145 # Test +           30           31           61
```

Характеристики клинической эффективности теста в R

```
← → | 📄 | 💾 Source on Save | 🔍 ✨ | 📝 | ▶ Run | 🔁 | 📄 Source ▾ | ☰
145 # Test +           30           31           61
146 # Test -           13           69           82
147 # Total            43          100          143
148
149 # Point estimates and 95 % CIs:
150 # -----
151 # Apparent prevalence           0.43 (0.34, 0.51)
152 # True prevalence               0.30 (0.23, 0.38)
153 # Sensitivity                   0.70 (0.54, 0.83)
154 # Specificity                   0.69 (0.59, 0.78)
155 # Positive predictive value     0.49 (0.36, 0.62)
156 # Negative predictive value     0.84 (0.74, 0.91)
157 # Positive likelihood ratio     2.25 (1.58, 3.20)
158 # Negative likelihood ratio     0.44 (0.27, 0.70)
159 # -----
160
```

Принципы, методы и технологические платформы генотипирования

Метод ПЦР

1. смыв с органов

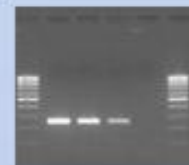


2. выделение ДНК

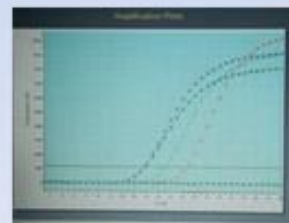


3. ПЦР

Стандартная ПЦР



ПЦР в режиме реального времени

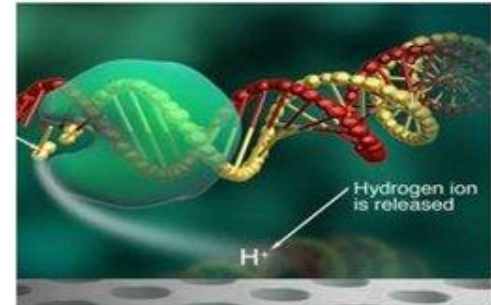


Полногеномное секвенирование NGS – Next Generation Sequencing

Методы секвенирования, лежащие в основе полногеномных секвенаторов

life
technologies™

Ion Proton
Ion Torrent (PGM)

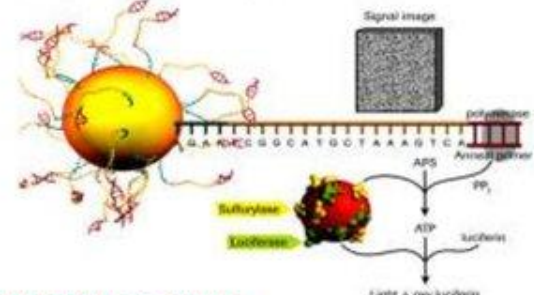


Полупроводниковое секвенирование – регистрация акта присоединения нуклеотида по образующимся ионам водорода

F.Hoffmann-La Roche Ltd



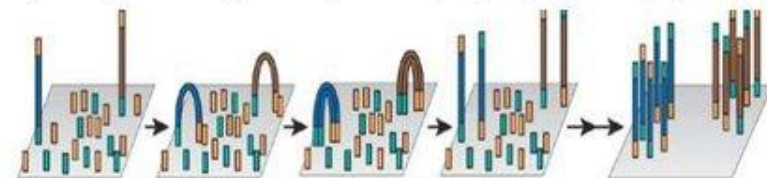
GS Junior



Пиросеквенирование – регистрация акта присоединения нуклеотида по образующемуся пирофосфату

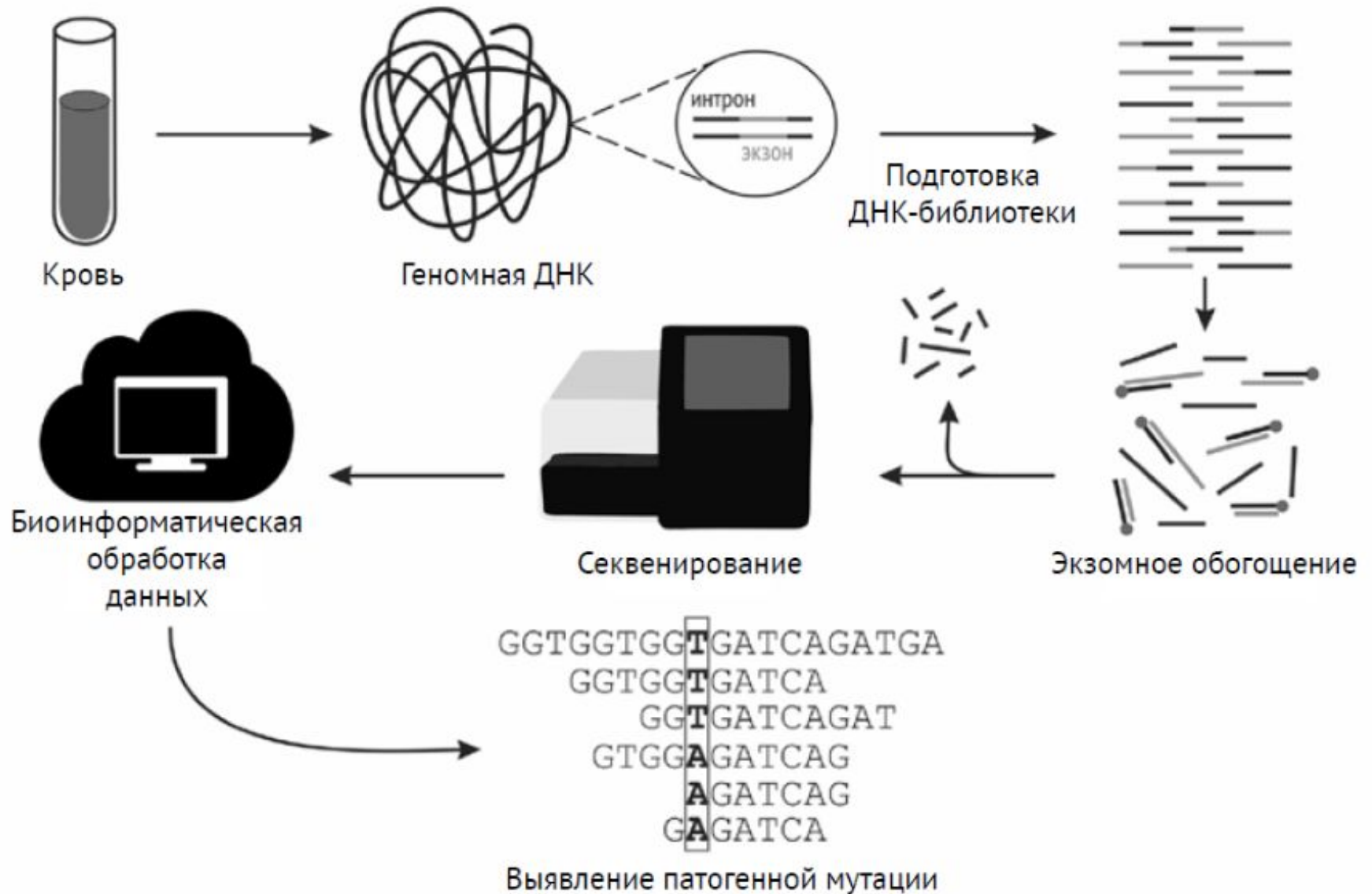
illumina®
MiSeq

Регистрационное удостоверение
РОСЗДРАВНАДЗОРа
№ РЗН 2014/1568 от 29.04.2014

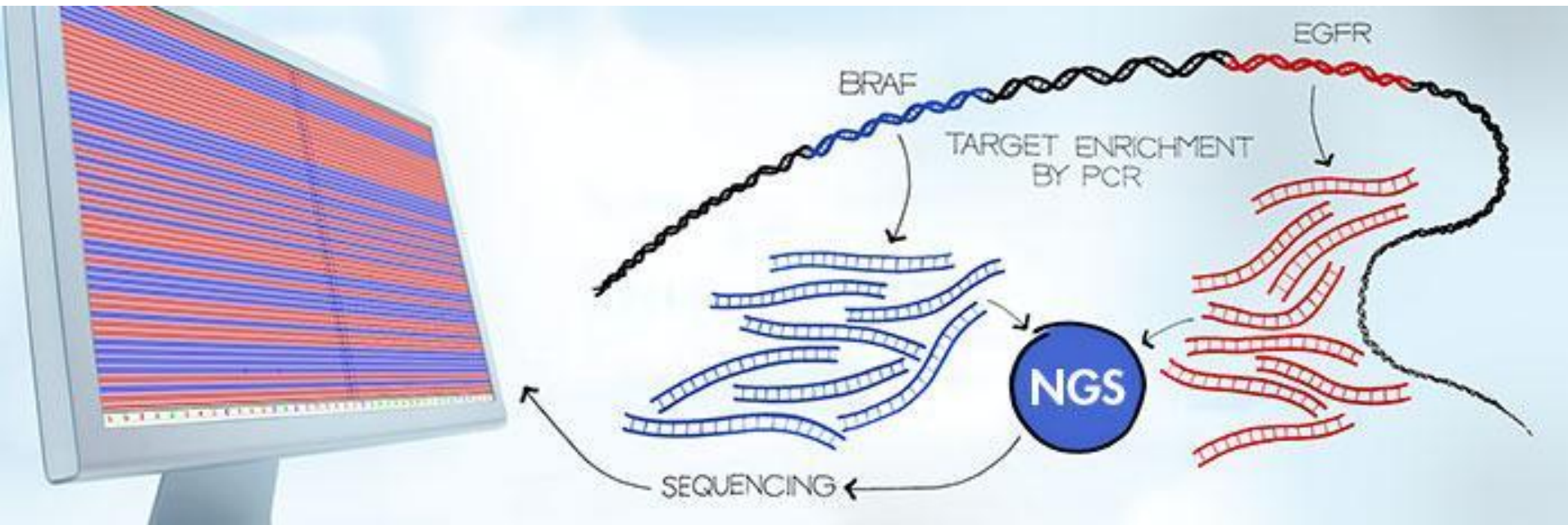


Секвенирование синтезом – обратимые терминирующие нуклеотиды – регистрация присоединенного нуклеотида по отщепляемой метке

Экзомное секвенирование



Таргетное секвенирование



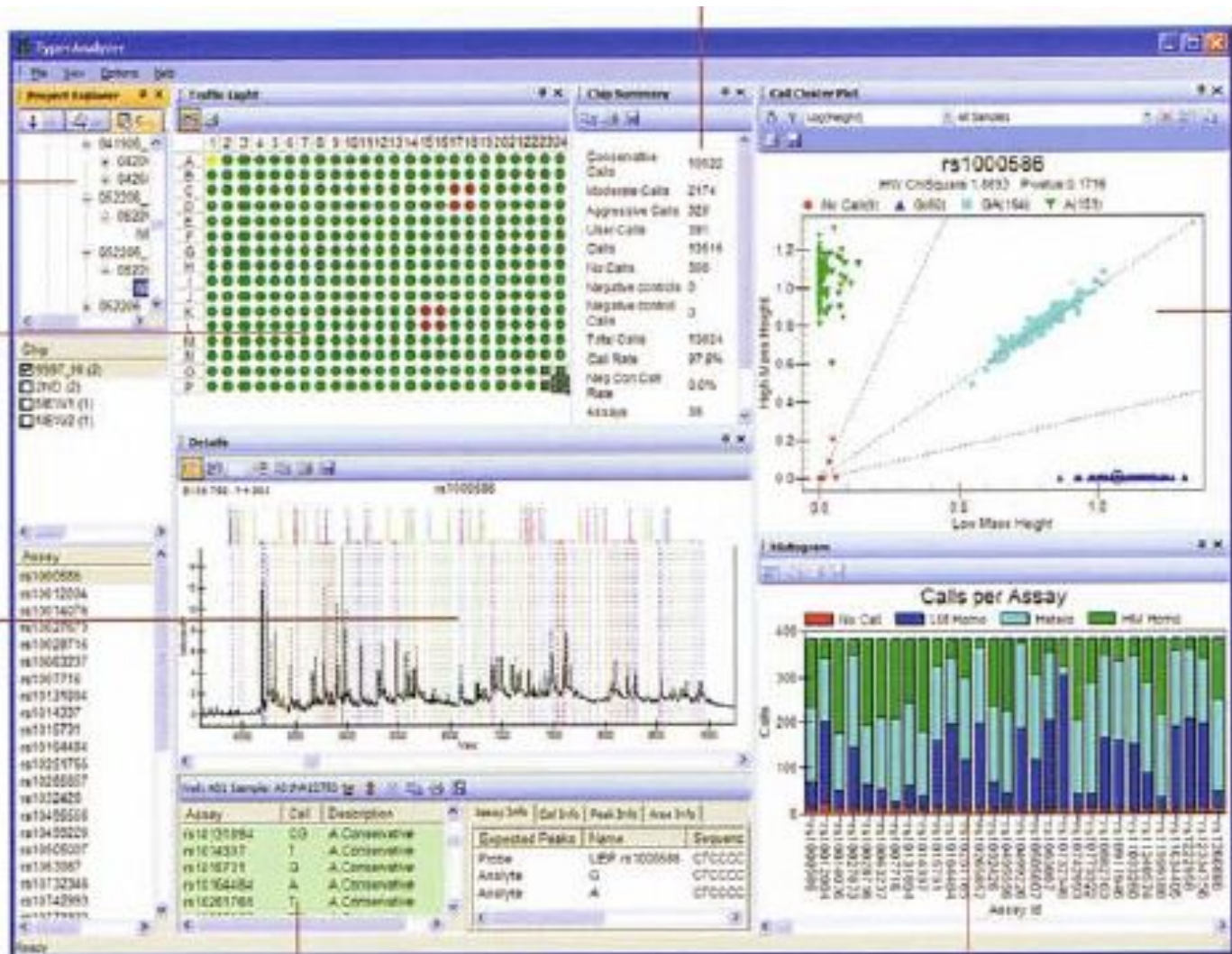
Времяпролетная масс-спектрометрия

Рабочий цикл системы MassARRAY



- **Точность – 1 нуклеотид**
- **Быстрота анализа**
- **Простота протокола**
- **Автоматическая обработка**

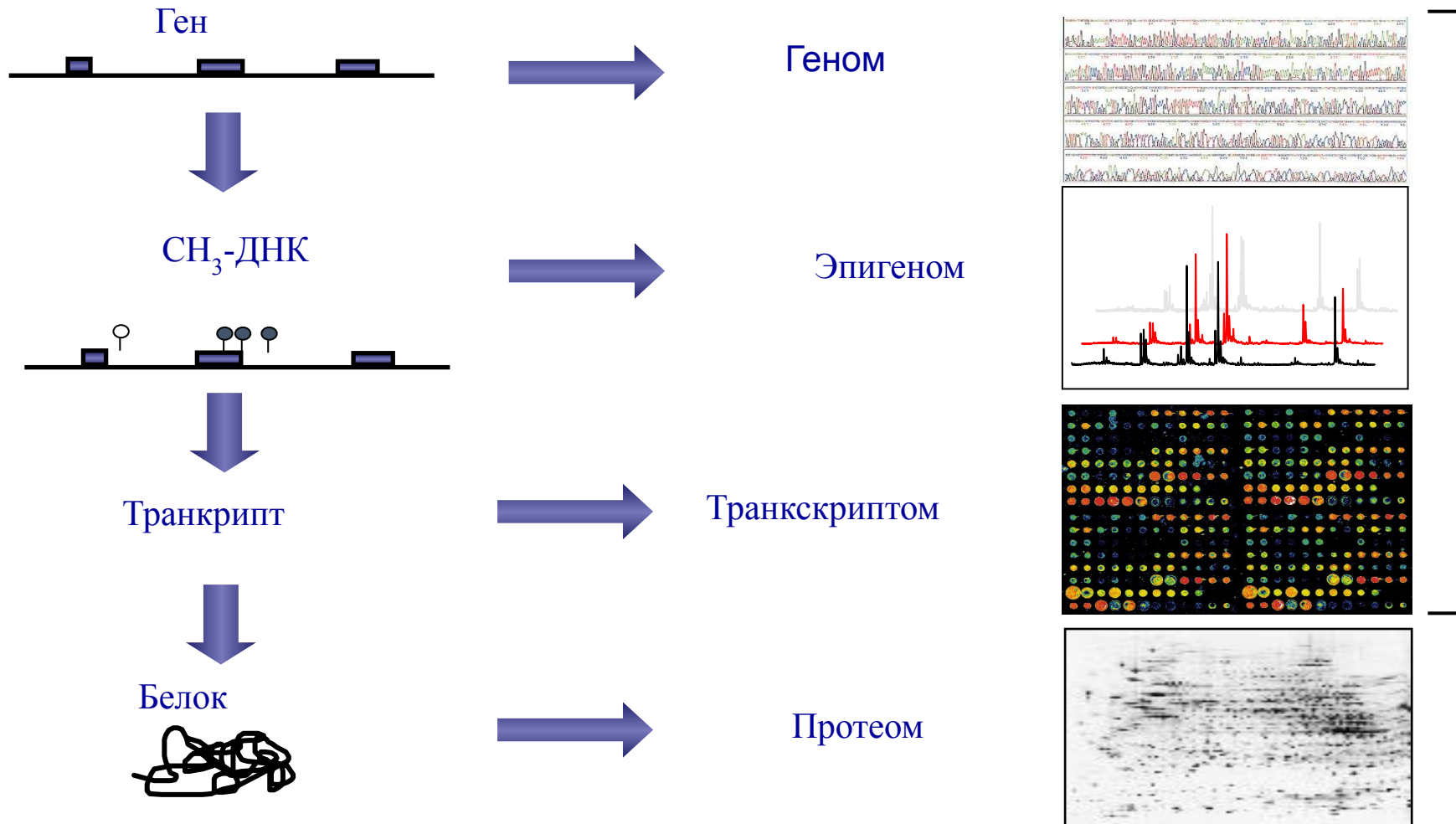
Интерфейс ПО Mass ARRAY 4



Преимущества технологии MALDI-TOF по сравнению с ПЦР и NGS

- **ПЦР** – малоприемлемая себестоимость при большом (150-300) числе SNP
- **NGS** – низкая точность определяет требование до 100 000 прочтений при частоте соматической мутации 0,1%, что существенно повышает себестоимость
- **Времяпролетная масс-спектрометрия** позволяет при относительно небольшой себестоимости исследований получать количественную оценку частоты соматических мутаций с разрешающей способностью до 0,1% встречаемости в клеточной популяции.

Широкий спектр применимости



Agema MassARRAY – универсальный прибор для геномных исследований

- Мультиплексность – до 60 реакций в лунке
- Гибкость – система доступна в вариантах 96-ти и 384-ти лунок
- Разрешающая способность в один нуклеотид
- Прямая детекция – не требует флуоресцентного мечения
- Самый дешевый анализ – 1 SNP за несколько рублей
- Простота в работе – ПЦР + детекция
- Быстрота – 160000 SNP за 45 минут
- Для крупных и средних лабораторий
- Свыше 2500 публикаций! Новые публикации еженедельно!

Благодарю за внимание!