

Новосибирский государственный университет  
Институт химической биологии и фундаментальной медицины

# Определение мутаций и их функциональной значимости в генах *BRCA1* и *BRCA2* у больных раком молочной железы и раком яичников

---

*представление диссертационной работы по окончании аспирантуры  
специальность: генетика 03.02.07*

**Кечин А. А.**

Научный руководитель:  
**к.б.н. Филипенко М. Л.**

# Рак молочной железы и рак яичников

---

- Ежегодно 65 тыс. новых случаев РМЖ (~650 – мужчины) и 13 тыс – РЯ \*
- Смертность от РМЖ – 29 человек на 100 тыс населения, от РЯ – 10 \*
- 21.2% всех онкологий у женщин – РМЖ, 4.4% - РЯ \*
- Мутации в BRCA1/2 повышают риск развития РМЖ с 12,4% до 40-80%, РЯ – с 1,3% до 11-40% \*\*
- Соматические мутации в BRCA1/2 – в 4 раза реже, чем герминальные, у больных РМЖ (15% случаев) \*\*\*

\* Каприна АД, Старинского ВВ, Петровой ГВ (2016) Злокачественные новообразования в России в 2014 году (заболеваемость и смертность).

\*\* Ngeow J Eng C Warhin A Levy D Garber J et. al. (2013) Precision medicine in heritable cancer: when somatic tumour testing and germline mutations meet

\*\*\* Nik-Zainal S Davies H Staaf J Ramakrishna M Glodzik D et. al. (2016) Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences.

# Вклад генов *BRCA* в сравнении с другими генами. Функции *BRCA1/2*

---

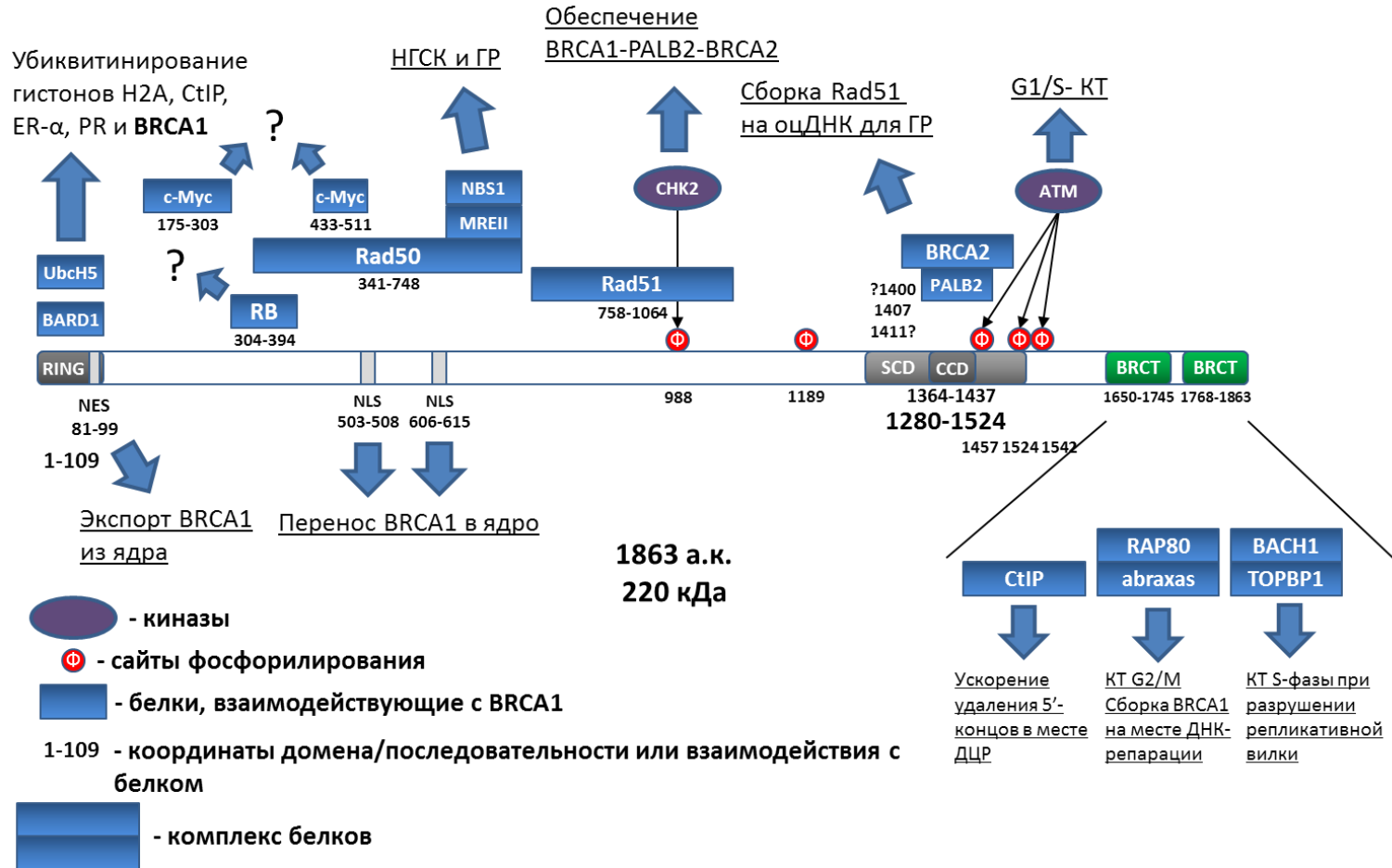
*BRCA1*,  
1863 а.о.  
220 кДа

- ДНК-репарация двуцепочечных разрывов (ДЦР) с помощью негомولوجичного соединения концов (НГСК) и гомولوجичной рекомбинации (ГР)
- Прохождение контрольных точек (КТ) G1-S, G2-M
- Регуляция транскрипции
- Перестройка хроматина

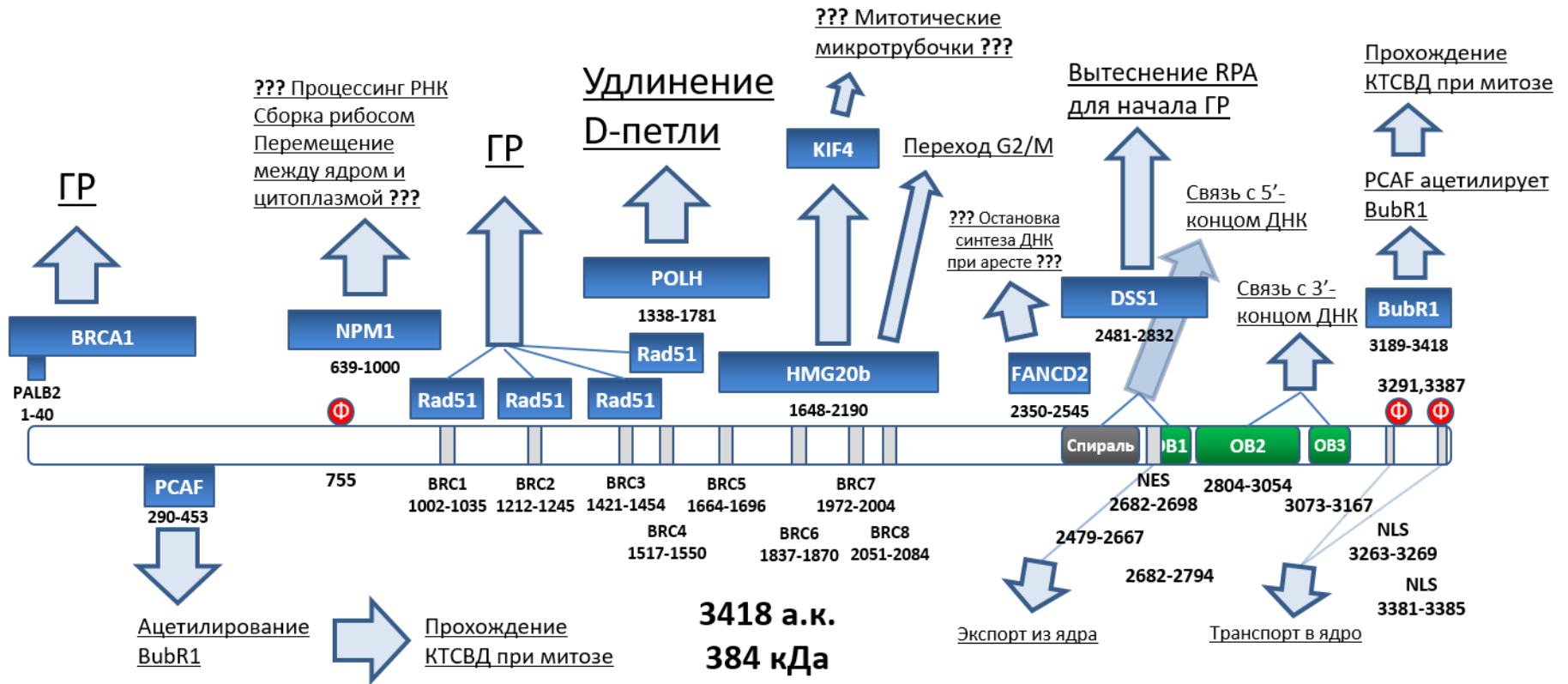
*BRCA2*,  
3418 а.о.  
384 кДа

- ДНК-репарация ДЦР с помощью ГР
- Контроль митоза

# BRCA1. Строение, функции и взаимодействия



# BRCA2. Строение, функции и взаимодействия

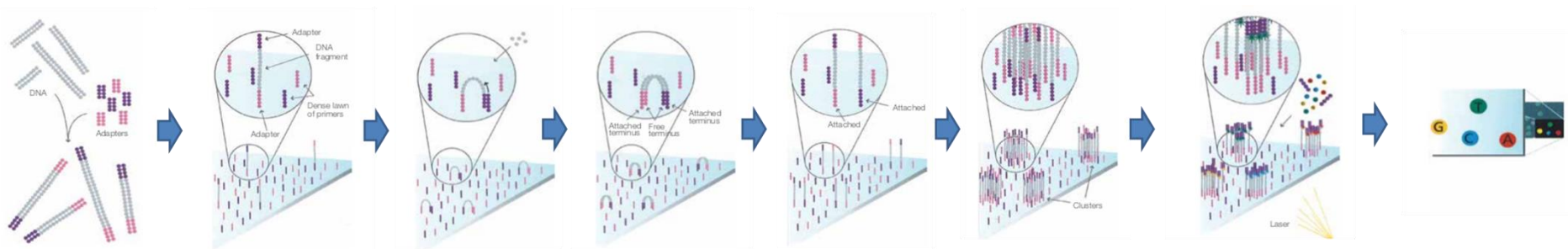


# Проблемы выявления мутаций в *BRCA1/2*. Секвенирование нового поколения (NGS)

Длина кодирующей последовательности *BRCA1* – 5592 п.о., *BRCA2* – 10257 п.о.

Число экзонов *BRCA1* – 24, *BRCA2* – 27

Слабая представленность хотспот-мутаций (не более 11-16%) \*



\* John EM, Miron A, Gong G, et al. (2007) Prevalence of pathogenic *BRCA1* mutation carriers in 5 US racial/ethnic groups.

\* Kang E, Seong M-W, Park SK, et al. (2015) The prevalence and spectrum of *BRCA1* and *BRCA2* mutations in Korean population: recent update of the Korean Hereditary Breast Cancer (KOHBRA) study.

Рисунки из Technology Spotlight Illumina®

# Статистика мутаций в базах данных. Проблема клинической значимости

---

- Известно более 9000 мутаций в генах BRCA1/2. Для половины из них клиническая значимость не определена
- Сегрегационный анализ затруднен для большинства мутаций
- Применяются методы по определению функциональной значимости
- Анализ локализации BRCA1 в ядре – один из последних и релевантных подходов \*
- Обычно линии клеток получают от пациентов
- С технологией CRISPR/Cas9 возможно получение линий клеток, несущих изучаемую мутацию

\* Loke J, Pearlman A, Upadhyay K, et al. (2015) Functional variant analyses (FVAs) predict pathogenicity in the BRCA1 DNA double-strand break repair pathway.

# Цели и задачи

**Цель:** выявление мутаций и определение их функциональной значимости в генах *BRCA1* и *BRCA2* больных раком молочной железы и раком яичников на выборке пациентов Российских онкологических центров.

## Задачи:

1. Оптимизировать метод приготовления библиотеки кодирующих последовательностей генов *BRCA1/2*, основанный на амплификации выбранных фрагментов и предназначенный для последующего секвенирования на MiSeq Illumina. Разработать программу автоматической обработки получаемых NGS-данных.
2. Выявить мутации в генах *BRCA1/2* в выборке больных раком молочной железы и раком яичников, проживающих на территории Российской Федерации с целью определения частот встречаемости мутаций, а также выбора мутаций с неопределенной клинической значимостью.
3. С помощью технологии геномного редактирования CRISPR/Cas9 создать линии человеческих клеток, несущие в генах *BRCA1/2* выбранные мутации в гомозиготном и гетерозиготном состоянии.



# Цели и задачи

**Цель:** выявление мутаций и определение их функциональной значимости в генах *BRCA1* и *BRCA2* больных раком молочной железы и раком яичников на выборке пациентов Российских онкологических центров.

## **Задачи:**

4. Оценить функциональную значимость выбранных мутаций с помощью исследования уровня локализации комплексов с BRCA1/2 в ядре.

# Образцы ДНК пациентов

---

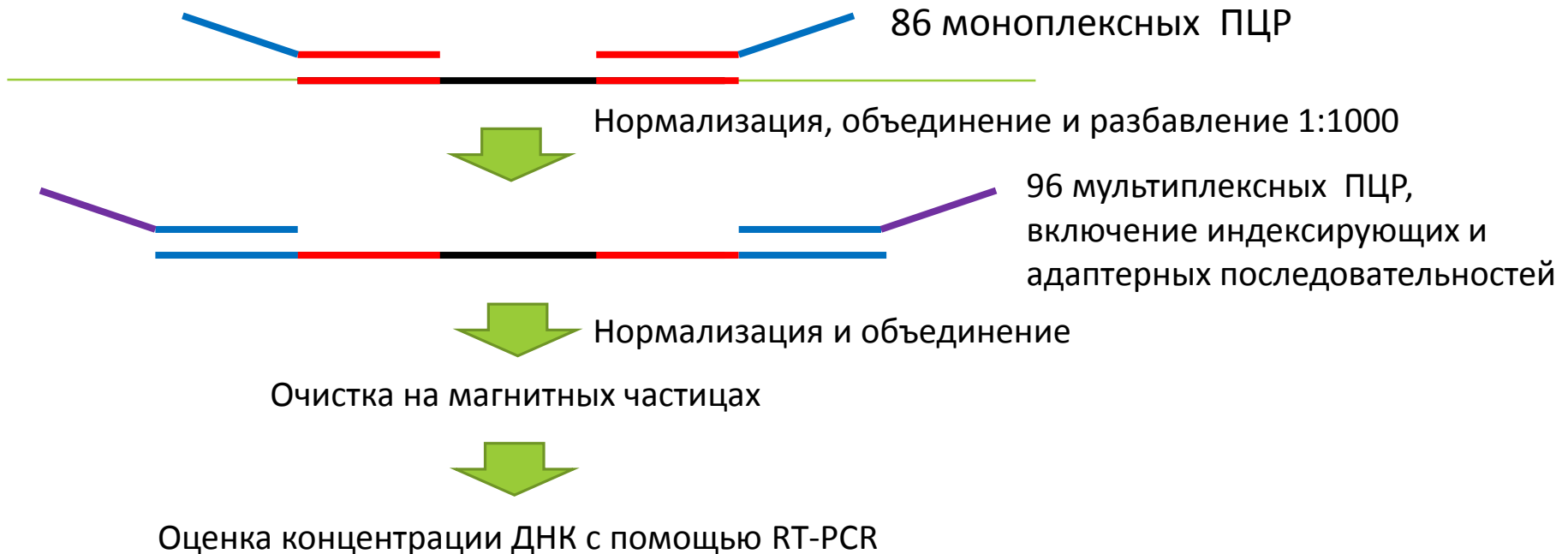
## Выборки пациентов:

- 96 больных РМЖ, пациенты Алтайского краевого онкологического диспансера (были выбраны только пациенты без хотспот-мутаций);
- 41 больной РЯ, пациенты ФГБУ «Российский онкологический научной центр им. Н.Н. Блохина»
- 31 больной РЯ, пациенты Барнаульского филиала ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина»
- 7 больных РМЖ, пациенты ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова»
- 3 контрольных образца, предоставленные AstraZeneca
- 1 больной – рак грудной железы (мужчина)
- 82 пациента – больные РЯ (программа OVATAR)

**Всего: 261 пациент**

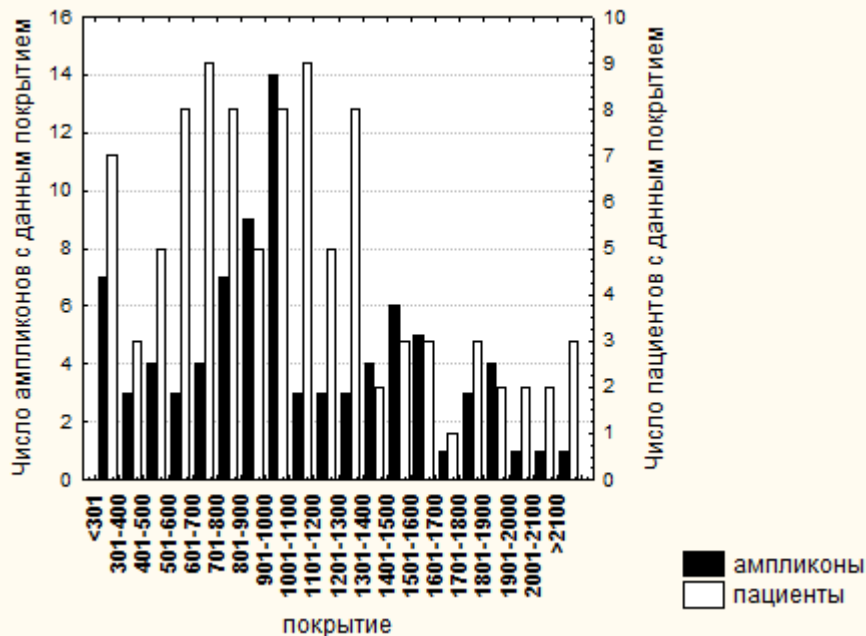
Liu X, Harada S (2013) DNA isolation from mammalian samples

# Метод приготовления библиотеки №1



Всего данным методом были приготовлены библиотеки для 96 образцов ДНК

# Метод приготовления библиотеки №1. Оценка покрытия



Среднее покрытие по ампликонам - 1012,3 (182-2270)

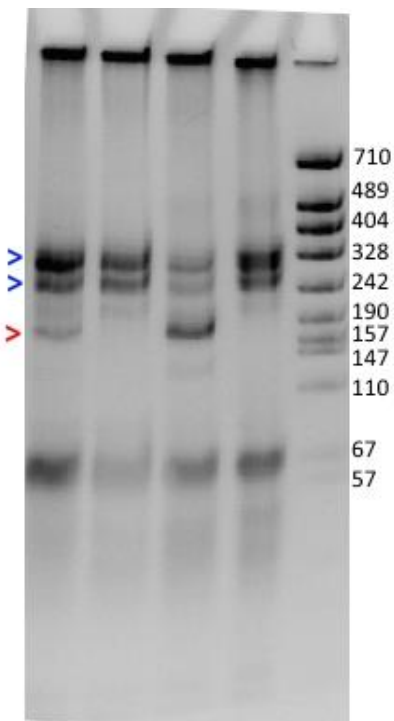
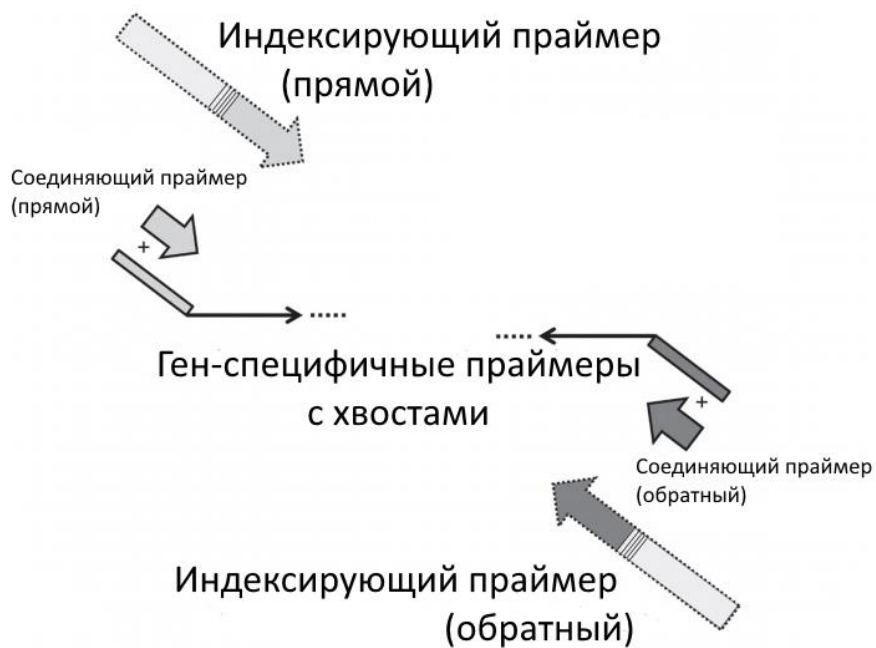
Среднее покрытие по пациентам – 1019,2 (240-4563)

Данный метод не требует больших количеств ДНК

+ Подходит для различных источников ДНК пациентов, кроме парафинизированных гистологических блоков

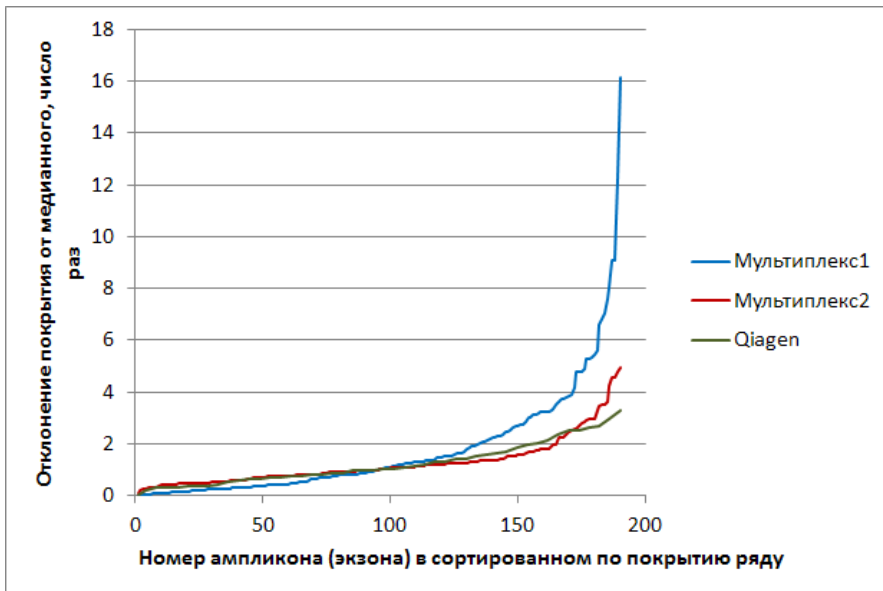
- Не подходит для гистологических блоков, все ампликоны разной длины

# Мультиплексный метод приготовления библиотеки



Всего данным методом были приготовлены библиотеки для 83 образцов ДНК

# Мультиплексный метод приготовления библиотеки. Оценка покрытия



Медианное покрытие по ампликонам  
- 85,8 (0-1387),  $\sigma=2,22$

Медианное покрытие по ампликонам  
после изменения концентраций  
праймеров – 835 прочтений (63-  
4107),  $\sigma=1,61$

Медианное покрытие по экзонам –  
801 (27-2634),  $\sigma=0,81$

Коммерческим набором были приготовлены библиотеки для 82 образцов ДНК

# Оптимизация алгоритма анализа данных NGS генов *BRCA1/2*

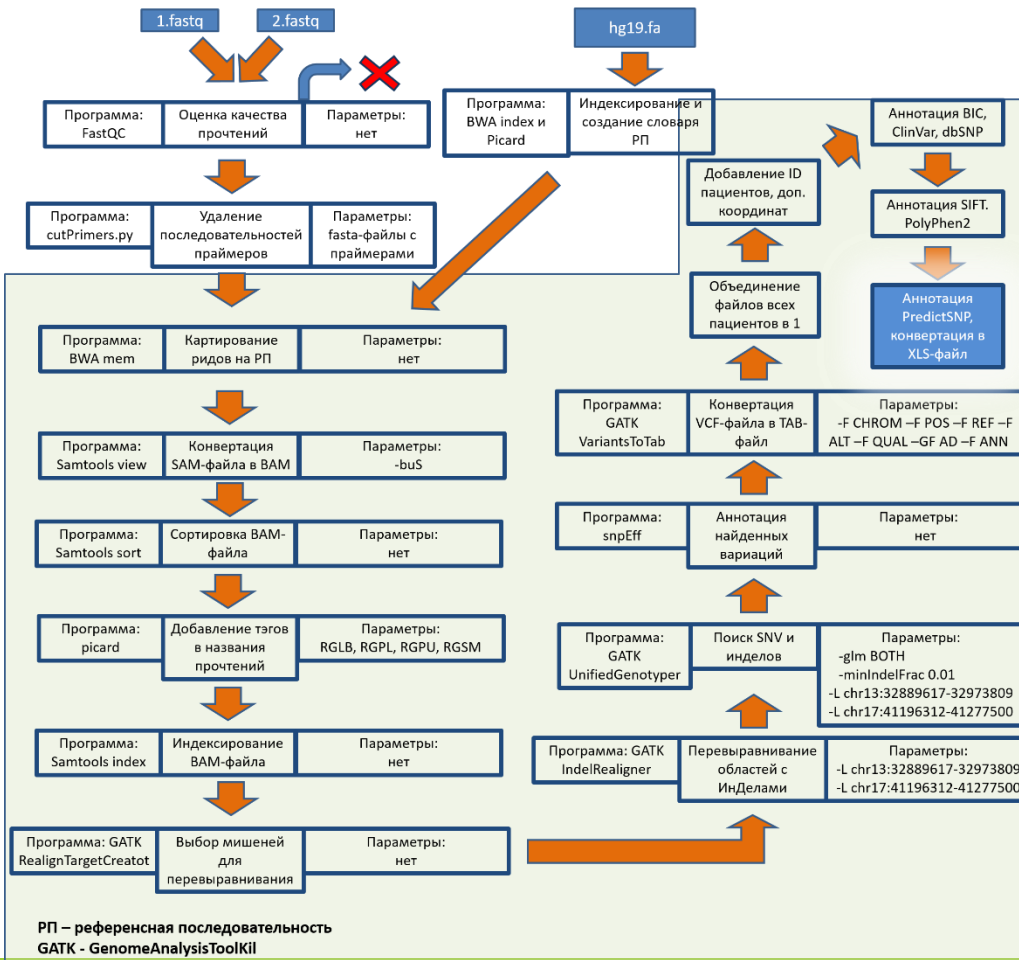
---

- BWA → GATK → Freebayes/Samtools/GATK → ANNOVAR → BIC, dbSNP, 1000Genomes
- 96 образцов
- Метод приготовления библиотеки №1
- 16 образцов – контрольные; кодирующие последовательности *BRCA1/2* были полностью секвенированы по Сэнгеру
- Сравнили Freebayes, Samtools и GATK

Программа картирования	Программа выявления мутаций	Пороговое покрытие позиции	Мин. % прочтений с альт. аллелем	ВП	ЛП	ЛО
<b>BWA, IndelRealignment</b>	FreeBayes	100	10	61	32	8
			30	57	3	12
		20	10	65	36	4
			20	63	22	6
			30	61	3	8
			40	60	3	9
	SAMtools	100	10	55	3	14
			30	55	3	14
		20	10	59	9	10
			20	59	3	10
			30	59	3	10
			40	59	3	10
	GATK*	100	10	64	6	5
			30	56	3	13
		20*	10	68	7	1
			14*	68*	4*	1*
			20	65	3	4
			30	60	3	9
			40	60	3	9



# Пакет анализа данных NGS генов *BRCA1/2*



- Введен этап удаления последовательностей праймеров из прочтений;
- Аннотация по расположению в генах и влиянию на аминокислотную последовательность кодируемого белка проводится с помощью snpEff;
- Добавлена аннотация с помощью PredictSNP
- Многопоточность анализа

# Пакет анализа данных NGS генов *BRCA1/2*. Сравнение с аналогичными пакетами

---

Программа	Число ВП	Число ЛП	Число ЛО	Чувств.	Время анализа 96 образцов
<b>BRCAanalyzer</b>	14	0	0	100%	150 мин
<b>GeneRead *</b>	12	0	2	85,7%	80 мин.

ВП – верноположительные

ЛП – ложноположительные

ЛО - ложноотрицательные

\* Qiagen GeneRead Targeted Exon Enrichment Panel Data Analysis

<http://ngsdataanalysis.sabiosciences.com/NGS2/>

# Программа по удалению последовательностей праймеров из прочтений

---

- Праймер может быть удален до 10 позиций от начала или конца прочтения
- Допускается до 5 замен, инсерций или делеций в последовательности праймера. В других программах используется относительное число ошибок
- Когда найдено 4 праймера (по 2 на каждое прочтение из пары), производится выравнивание и вычисляется число ошибок
- В конце пользователь получает статистику ошибок в праймерах

№	Программа	Время вырез. из 9311 пар проч.	Число ост. проч.
1	cutPrimers	43 сек.	8443
2	cutadapt	25 сек.	5772
3	Trimmomatic	30 сек.	150??

# Выявленные мутации. Патогенные

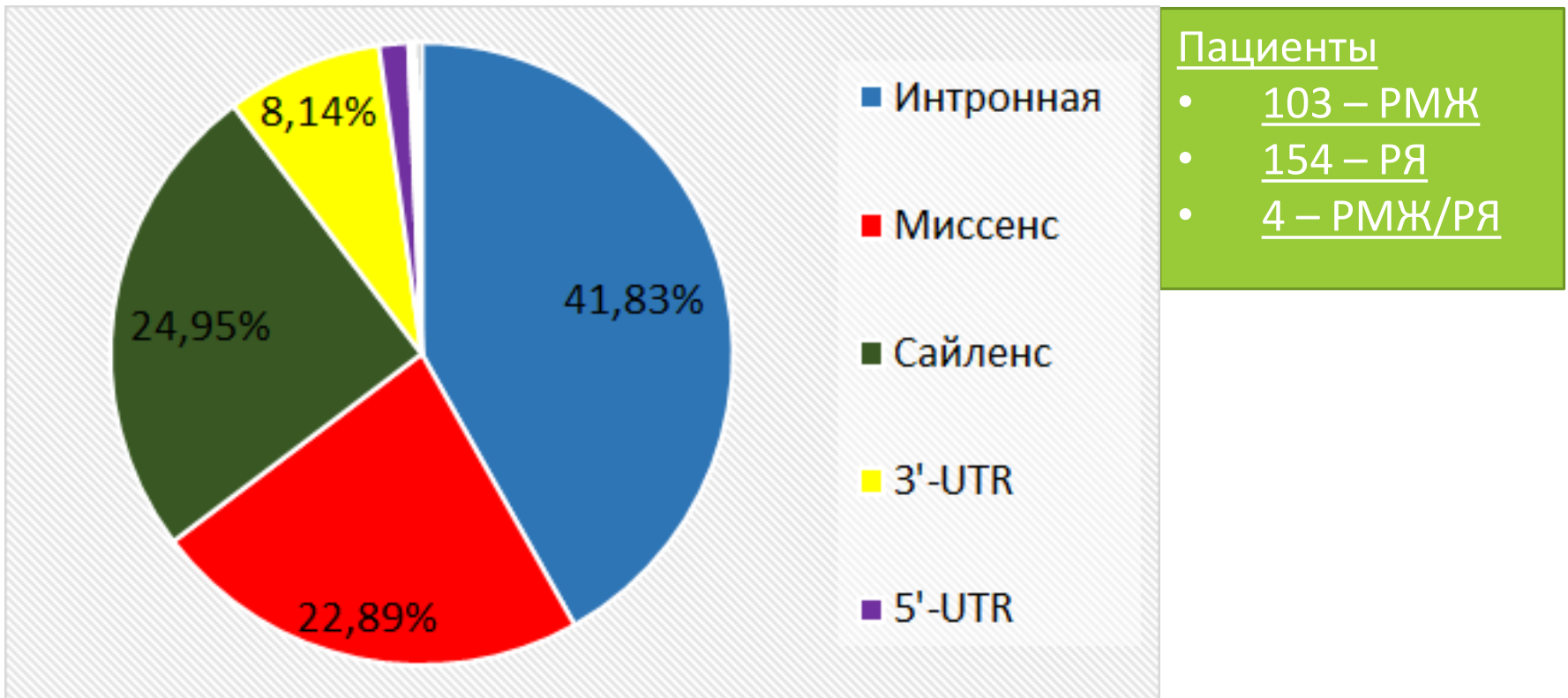
---

- Выявлено 27 патогенных мутаций: 4 – РМЖ (3,8%), 21 – РЯ (13,6%), 2 – РМЖ/РЯ
- 14 – в гене *BRCA1*, 13 – *BRCA2*
- 17 (63%) - фреймшифты, 7 (26%) – нонсенс-мутации, 2 (7,4%) – нарушают сайт сплайсинга, 1 (3,7%) – миссенс
- 11 мутаций были найдены впервые

## Пациенты

- 104 – РМЖ
- 154 – РЯ
- 3 – РМЖ/РЯ

# Выявленные мутации. Общая статистика



# Выявление мутаций. Неизвестная клиническая значимость

---

- Всего 18 мутаций с неизвестной клинической значимостью
- 16 – миссенс-мутации, 2 – рядом с сайтом сплайсинга (1-3 экзона, 3-8 интрона)
- 12 мутаций располагаются в районе взаимодействия белка BRCA1 или BRCA2 с другими белками или в одном из его доменов
- Для 6 мутаций было предсказано нарушение структуры белка с помощью PredcitSNP

# Выводы

---

1. Проведена оптимизация метода приготовления библиотеки кодирующих последовательностей генов *BRCA1/2*, основанного на амплификации выбранных фрагментов и предназначенный для последующего секвенирования на MiSeq Illumina. Показано, что метод позволяет получить высокое покрытие всех экзонов генов *BRCA1/2*.
2. Разработан пакет программ автоматической обработки получаемых NGS-данных. Входящая в состав пакета программа по удалению последовательностей праймеров из прочтений имеет более высокую точность обнаружения праймеров. Алгоритм картирования прочтений и выявления мутаций разработанного пакета показал более высокую чувствительность (100% против 86%) по сравнению с коммерчески доступным GeneRead (Qiagen).
3. Чувствительность и специфичность метода были оценены на 16 больных раком молочной железы и составили 98,6% и 94,4%, соответственно.

4. Определены мутации в генах *BRCA1/2* в выборке больных раком молочной железы и раком яичников (всего 261 пациент), проживающих на территории Российской Федерации. Выявлено 27 патогенных мутаций у 27 пациентов. Большинство мутаций (17) нарушали рамку считывания гена и представляли собой делеции и дупликации одного или нескольких нуклеотидов. Также часто выявляемыми мутациями были мутации, приводящие к образованию нового стоп-кодона (7).
5. Было выявлено 11 новых мутаций, ранее не описанных в литературе, что подтверждает необходимость использования NGS для скрининга мутаций у больных РМЖ и РЯ.
6. Выбрано 18 мутаций с неизвестной функциональной значимостью, выявленных на анализируемых выборках пациентов для дальнейшего функционального анализа. 12 из них располагаются в районе взаимодействия белка с другими белками или в одном из его доменов, возможно, нарушая его структуру или функцию. Для 6 мутаций *in silico* было предсказано нарушение структуры белка, однако требуется анализ функциональной значимости *in vitro*.



# Список публикаций

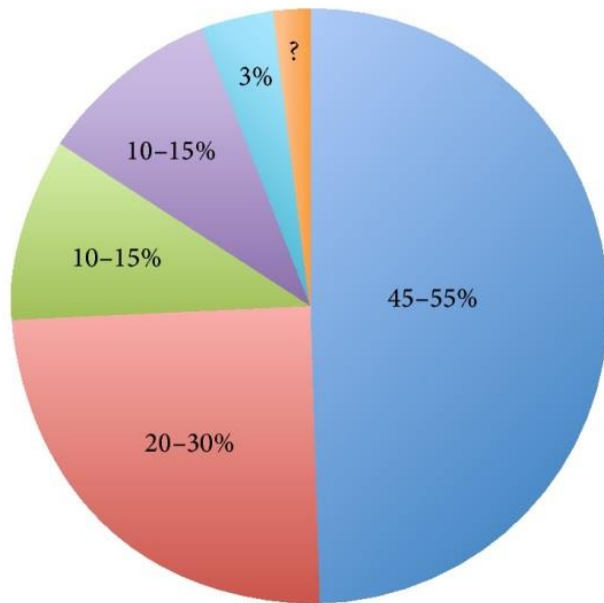
---

1. Н.А. Ермоленко<sup>#</sup>, У.А. Боярских<sup>#</sup>, А.А. Кечин<sup>#</sup>, Л.Ф. Лазарев, В.Д. Петрова, А.М. Мазитова, Н.Е. Кушлинский, М.Л. Филипенко. «Опыт клинического использования платформы MiSeq Illumina для диагностики мутаций *BRCA1* и *BRCA2*». Технологии живых систем, 2015 г., т. 12, №1.
2. N.A. Ermolenko<sup>#</sup>, U.A. Boyarskikh<sup>#</sup>, A.A. Kechin<sup>#</sup>, A.M. Mazitova, E.A. Khrapov, V.D. Petrova, A.F. Lazarev, N.E. Kuchlinskii, M.L. Filipenko. «Massive Parallel Sequencing for Diagnostic Genetic Testing of BRCA Genes – a Single Center Experience». APJCP, 2015, 16 (17), 7935-41.
3. А.А. Кечин, У.А. Боярских, Н.А. Ермоленко, Е.А. Храпов, М.Л. Филипенко. «Способ определения нуклеотидных последовательностей экзонов генов *BRCA1* и *BRCA2*». Патент на изобретение. Регистрационный номер: 2015153232.

---

# Дополнительные слайды

# Вклад генов *BRCA* в сравнении с другими генами. Функции *BRCA1/2*



- BRCA1*
- BRCA2*
- Genes involved in DSB repair
- MMR* genes (Lynch SDR)
- TP53* (Li-Fraumeni SDR)
- Other genes

Повышают риск развития РМЖ и РЯ не только гены *BRCA1/2*, однако их вклад наибольший

*BRCA1*, 1863 а.о.  
220 кДа

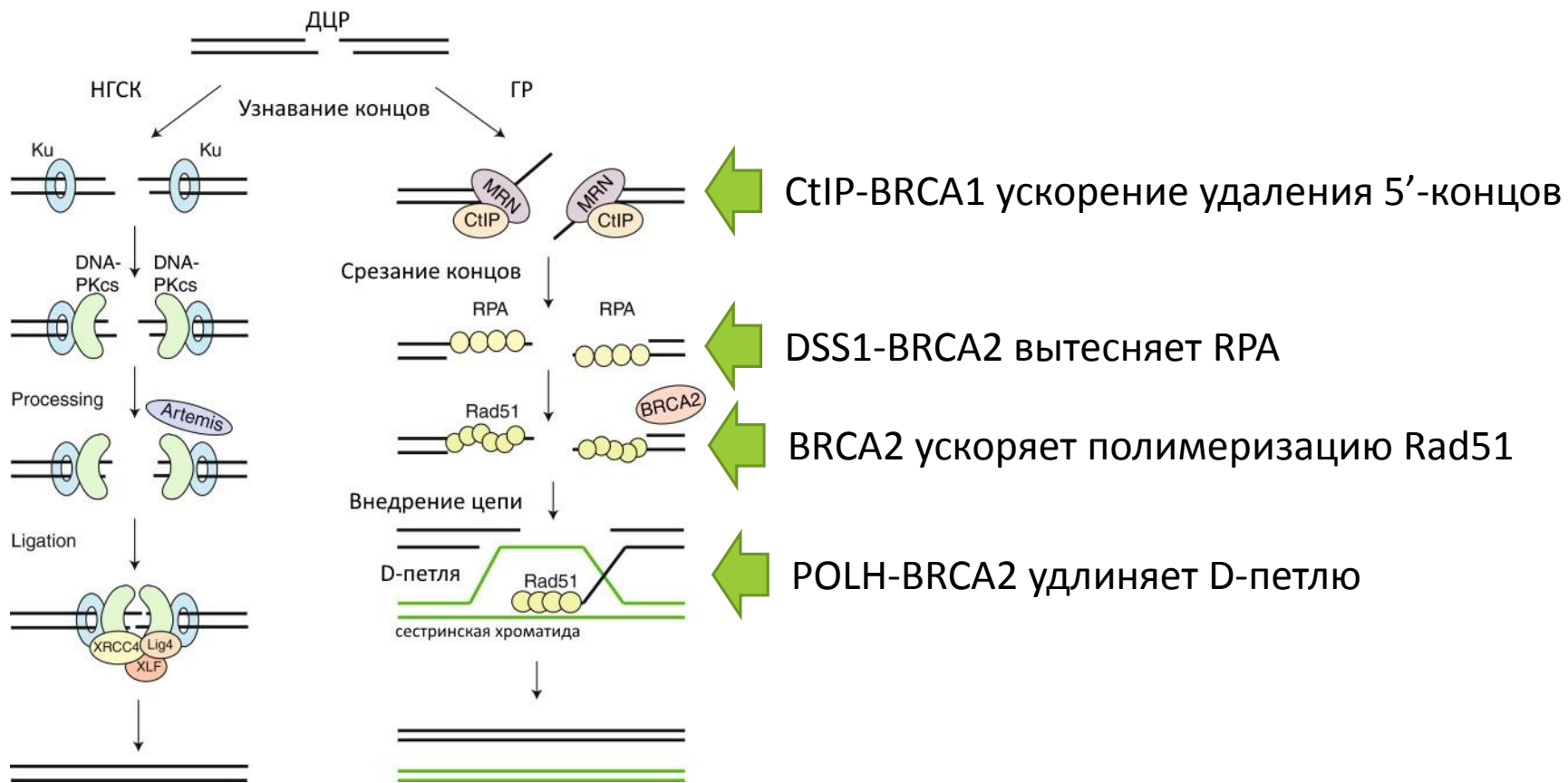
- ДНК-репарация ДЦР с помощью НГСК и ГР
- Прохождение КТ G1-S, G2-M
- Регуляция транскрипции
- Перестройка хроматина

*BRCA2*, 3418 а.о.  
384 кДа

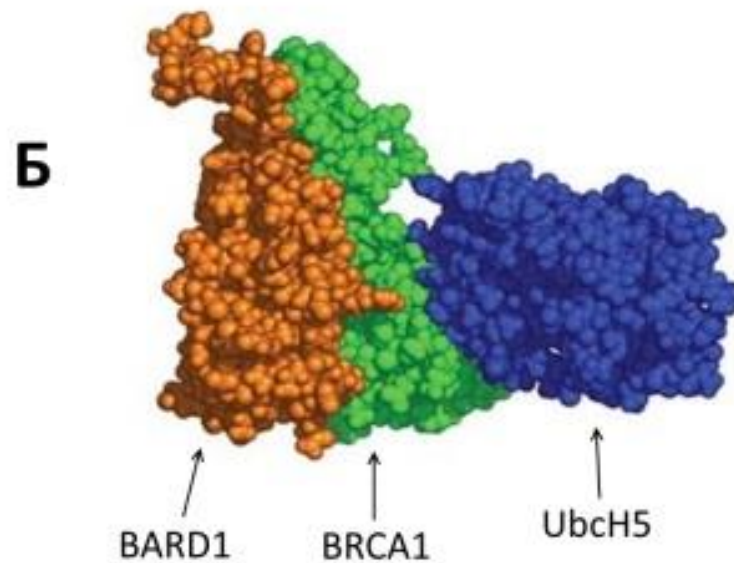
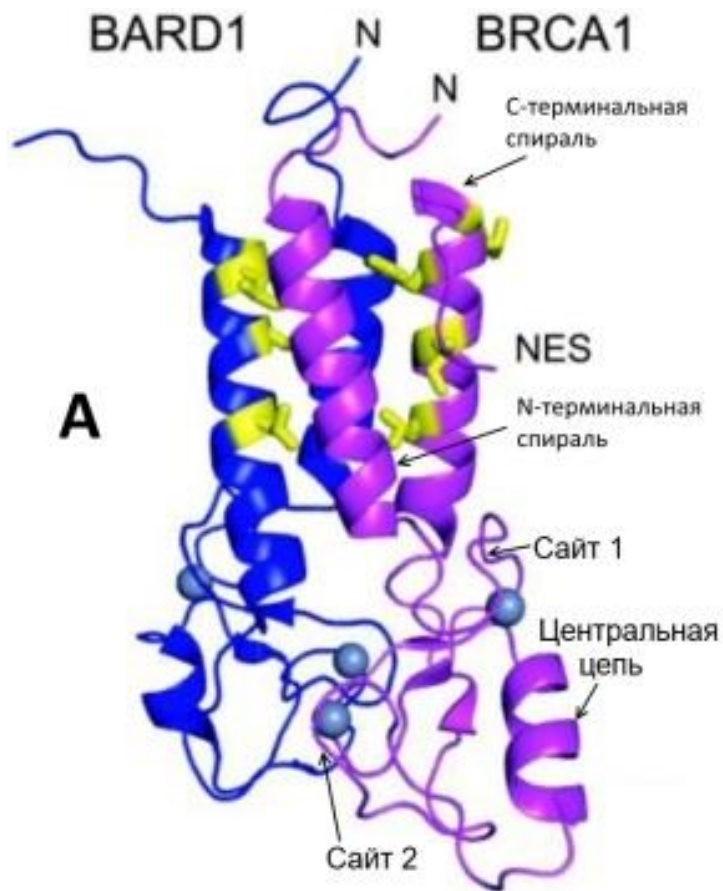
- ДНК-репарация ДЦР с помощью ГР
- Контроль митоза

Toss A Tomasello C Razzaboni E Contu G Grandi G et. al. Hereditary ovarian cancer: not only *BRCA1* and *2* genes.

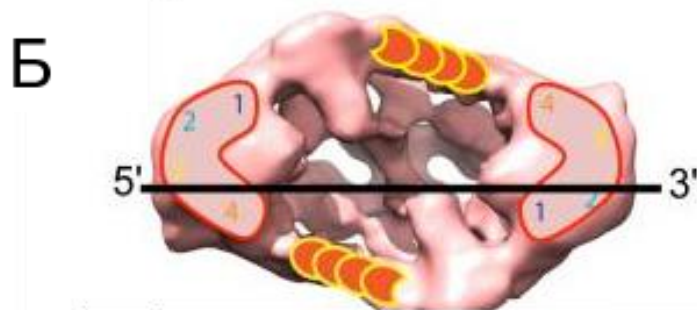
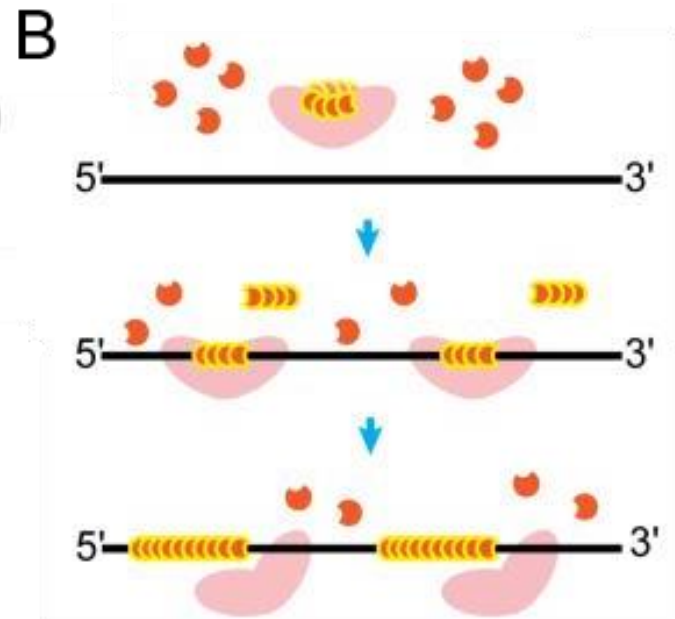
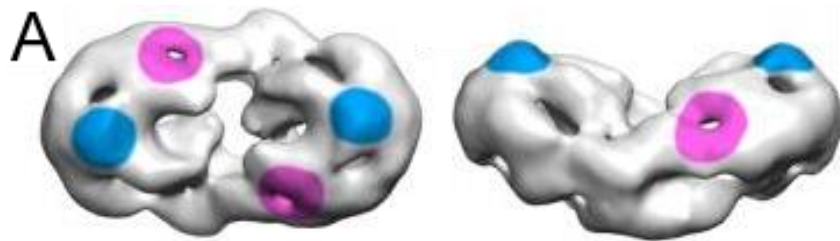
# Схема репарации ДЦР с помощью ГР и НГСК



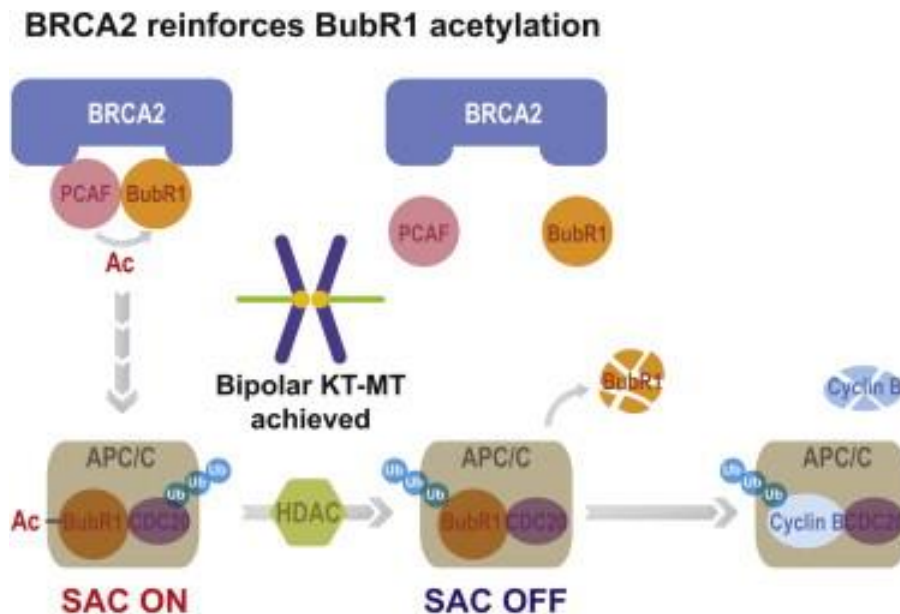
# Модель взаимодействия BRCA1, BARD1 и UbcH5



# Модель взаимодействия BRCA2 и Rad51



# Взаимодействие BRCA2, PCAF и BubR1



- BubR1 проверяет прикрепленность нитей ВД к кинетохорам
- Если есть неприкрепленные, то BubR1 ингибирует E3-Ub-лигазу APC/C → задержка протеолиза циклина-D
- Если все ОК, BubR1 после КТСВД деацетируется, убиквитинируется и протеализируется
- Если PCAF не ацетирует BubR1, то он разрушается

Choi E, Park P-G, Lee H-O, et al. (2012) BRCA2 fine-tunes the spindle assembly checkpoint through reinforcement of BubR1 acetylation

# О гомозиготных мутациях в BRCA1/2

---

**Мыши  
гомозиготные по  
одной из мутаций в  
BRCA1**



**Гибель эмбрионов \***