

NTRK как онкогенный драйвер. Обзор методик тестирования

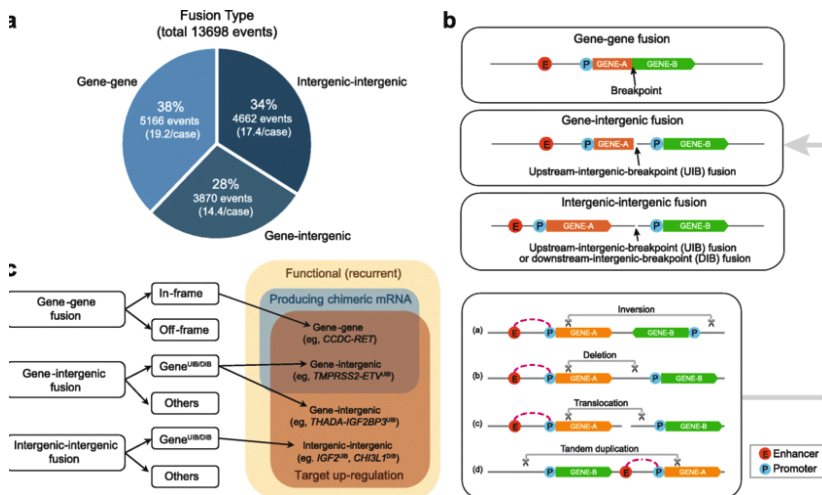
Демидова И.А.

Лаборатория молекулярной биологии «ГБУЗ МГОБ №62 ДЗМ»

M-RU-00002986 Апрель 2021

Данная презентация подготовлена при финансовой поддержке АО "Рош-Москва", официального дистрибьютора "Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд." (Швейцария). Информация, размещенная в настоящем материале, содержит сведения о незарегистрированных в РФ лекарственных средствах/показаниях, носит исключительно научный характер и не является рекламой.

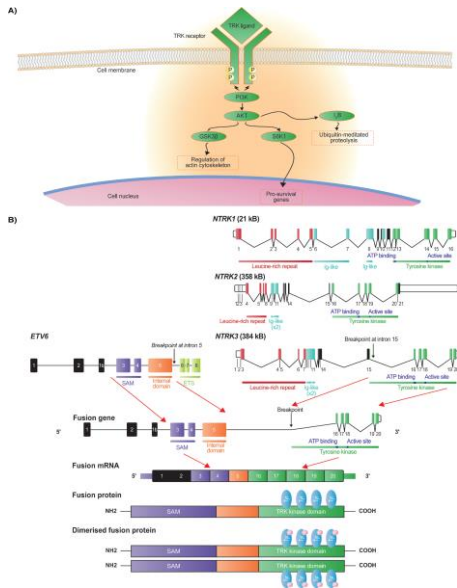
Различные типы перестроек и их роль в онкогенезе



- Три типа перестроек с разными функциональными возможностями
- Могут сопровождаться как повышением экспрессии активной части химерного транскрипта, так и снижением экспрессии, вплоть до полного отсутствия («молчащие» транслокации)
- Появление химерных транскриптов без явного брейкпойнта – цис- и транс-сплайсинг

Yun et al. Genome Biology (2020) 21:166

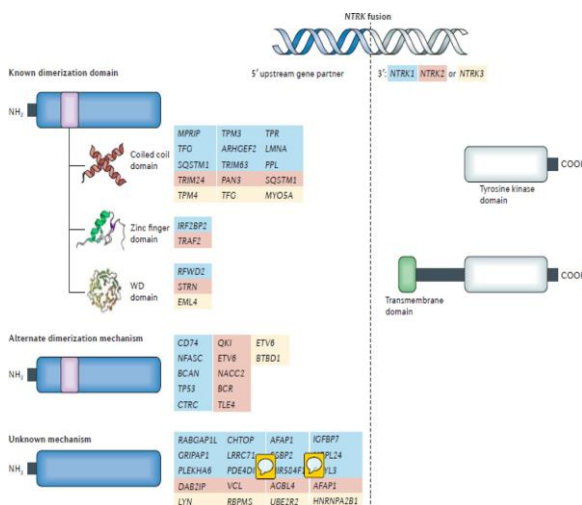
Особенности семейства NTRK



- Три гена (*NTRK1,2,3*) кодируют 3 протеина-рецептора (TRKA,B,C) в норме в основном экспрессирующихся в нервной ткани
- Стандартный механизм активации – соединение с лигандом и димеризация, сигнал передается через пути RAS/ MAPK / ERK, PI3K,PKC
- Нарушения, часто обнаруживаемые в злокачественных опухолях – мутации (KPP, НМРЛ, меланома, ОМЛ); гиперэкспрессия (РМЖ, НМРЛ, нейробластома); сплайсинговый вариант TRKIII и усеченный Δ TRK (нейробластома, ОМЛ)
- Транслокации с участием генов семейства могут обнаруживаться при самых различных злокачественных опухолях

Cocco et al *Nat Rev Clin Oncol*. 2018; Penault-Llorca F, et al. *J Clin Pathol* 2019

Транслокации с участием генов NTRK1,2,3

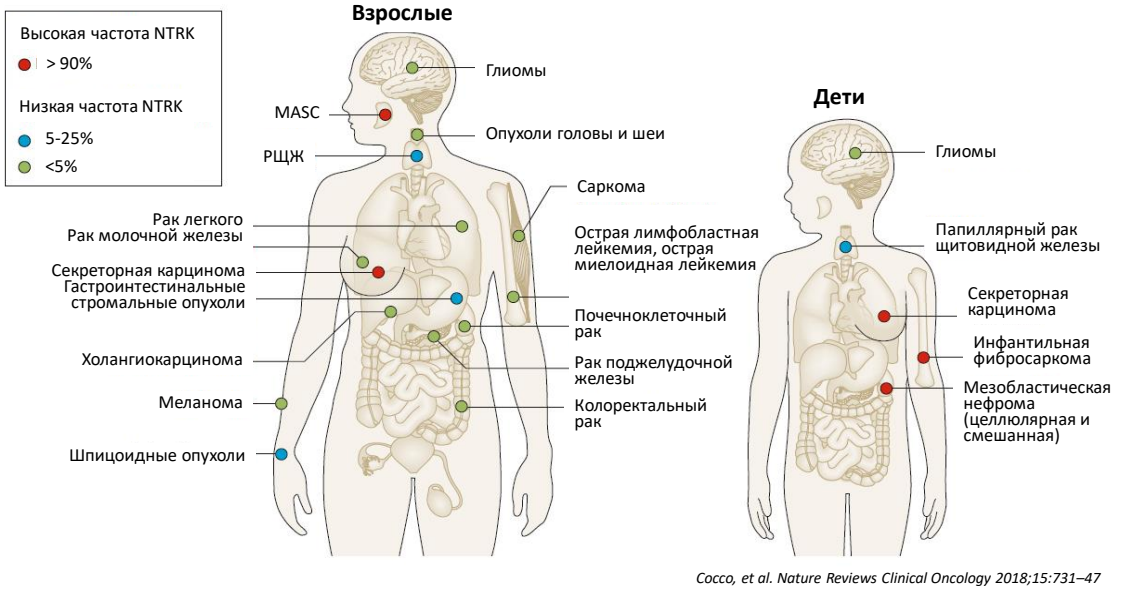


- Отличаются чрезвычайным разнообразием, возможны как межхромосомные, так и внутривхромосомные перестройки, нередко сочетанные aberrации с участием нескольких генов (самые частые партнеры – ETV6; TPM3)
- Гены-партнеры, как правило несут домены, отвечающие за димеризацию, однако, возможны другие варианты
- Структурные особенности генов –партнеров влияют также на локализацию химерных протеинов
- Однако во всех случаях образуется химерный протеин с возможностью лиганд-независимой активации
- Могут сочетаться с другими генетическими нарушениями – мутациями *TP53*, *PIK3CA*, *PTEN*, *METamp*

Cocco et al *Nat Rev Clin Oncol*. 2018; Penault-Llorca F, et al. *J Clin Pathol* 2019



Частота встречаемости перестроек NTRK



NTRK перестройки при разных типах опухолей

Ген	Опухоль	Частота перестроек	Метод детекции	
NTRK1	Невус Шниц	23/140	16%	Targeted NGS (FMI), FISH, IHC
	Папиллярный рак щитовидной железы	28/228	12%	PCR
	Аденокарцинома легкого	1/28	4%	Targeted NGS (FMI)
	Глиобластома	3/91	3%	Targeted NGS (FMI), FISH
		2/185	1%	NGS
		4/162	2.50%	NGS/PCR
		1/157		
	Колоректальный рак	3 reports	1.50%	cDNA library, FISH, PCR
		24108		PCR, ICH
	Саркома	1/103	1.00%	RNA-Seq
	Астроцитомы	35125	3.10%	NGS
	Глиома низкой степени злокачественности	2/461	0.40%	RNA-Seq
Аденокарцинома легкого	1/513	0.002	RNA-Seq	
NTRK2	Плоскоклеточный рак головы и шеи	1/411	0.20%	RNA-Seq

Ген	Опухоль	Частота		Метод детекции
NTRK3	Секреторная карцинома слюнных желез (аналог секреторной карциномы молочной железы)	15/15	100%	FISH
	Врожденная фибросаркома	10/11	91%	PCR
	Секреторная карцинома молочной железы	5/5	100%	PCR and FISH
	Врожденная нефрома (врожденная опухоль Вильмса)	12/13	92%	FISH, PCR
	Папиллярный рак щитовидной железы	5/6	83%	PCR and FISH
		9/62 ^d	14.50%	RNA-Seq
		7/243 ^e	2.90%	
	Рак щитовидной железы	7/498	1.50%	RNA-Seq
	Острый лимфобластный лейкоз	1/154	0.70%	NGS
	Колоректальный рак	2/286	0.70%	RNA-Seq
	Меланома	1/374	0.30%	RNA-Seq
	Плоскоклеточный рак головы и шеи	1/411	0.20%	RNA-Seq
Острый миелоидный лейкоз	2 case reports	n.a	PCR, FISH	
NTRK1/2/3	Детские глиомы	8/112	-7.10%	NGS

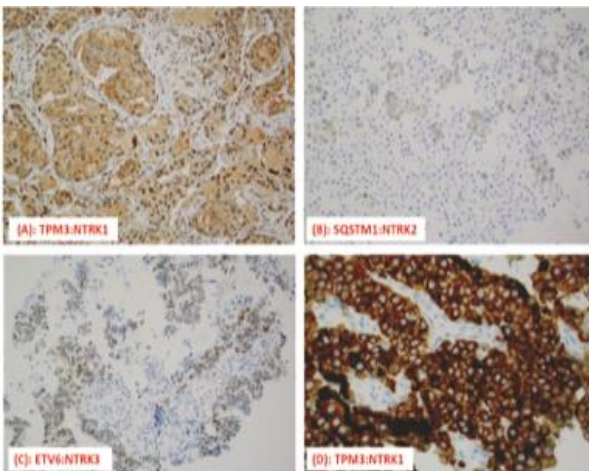
FMI: Foundation Medicine Incorporated; NTRK: neurotrophic tropomyosin receptor kinase; Vaishnavi A. et al. (2015) Cancer Discov 5:25-34.

Возможные методы детекции *NTRKfus*

Метод	Преимущества	Недостатки
ИГХ	Низкая цена, доступность Определяет сразу TRKA,B,C Исполнение – 2-3 дня	Возможны как ложнопозитивные так и ложнонегативные результаты
FISH	Определяются все перестройки, вне зависимости от партнера Доступна в большинстве лабораторий	Для проведения полного исследования необходимы 3 теста Возможны ложнопозитивные результаты (молчащие транслокации) Возможны ложнонегативные результаты (небольшие внутрихромосомные события)
RT-PCR	Высокочувствительный и специфичный метод Относительно низкая цена	Определяет перестройки только с известными партнерами Зависим от качества РНК
NGS DNA	Метод, позволяющий одновременно определить большое количество генетических нарушений, возможно использовать цодНК	Не может выявить все виды транслокаций Возможны ложнопозитивные результаты
NGS RNA	Возможно определение ранее неизвестных партнеров Одновременное исследование большого количества aberrаций	Зависим от качества РНК

Penault-Llorca F, et al. *J Clin Pathol* 2019

Детекция методом ИГХ



- Чувствительность и специфичность существенно зависят от *NTRK*, участвующего в перестройке – самая высокая для *NTRK1/2* (до 98%), самая низкая – для *NTRK3* (до 75%)
- Возможны неудачи в результате дефектов преаналитической обработки
- Удобный скрининговый метод при недоступности высокопроизводительного секвенирования в группе опухолей с низкой частотой встречаемости перестроек

Gatalica et al *Modern Pathology* (2019) 32:147–153

Чем нам симпатичен RT-PCR?

- Позволяет быстро проводить исследование, не нужно ждать набора пациентов
- Простой метод, выявляющий нарушение в считанные часы

НО

- ПЦР с заранее заданными параметрами – выявляет не все возможные нарушения
- ПЦР, определяющий дисбаланс экзонной экспрессии – маловоспроизводим за пределами создавшей его лаборатории, поэтому не может быть рекомендован к широкому распространению
- Как узкоспециализированный метод, не может помочь нам полностью решить проблемы резистентности
- Как все методы, основанные на исследовании РНК, крайне чувствителен к качеству материала

Достоинства и недостатки NGS на основе ДНК

Достоинства:

- Исследование может успешно выполняться одновременно с определением SNV, CNV, indels.
- Существенно меньшие требования к материалу

Недостатки:

- Включение детекции перестроек катастрофически перегружает панель и требует существенного удорожания секвенирования
- При всем желании, невозможно охватить полностью весь спектр перестроек: классический пример – выявление перестроек NTRK FMI Dx и MSK-ИМПАКТ – в панель были включены интроны 3 и 7-12 *NTRK1*, 15 – *NTRK2* и ни одного - *NTRK3*, только интроны его самого частого партнера – *ETV6*. Чувствительность оказалась около 80% для всех перестроек.

Партнеры генов семейства *NTRK* при опухолях с частотой встречаемости менее 5%

Fusion partner

Tumour	<i>NTRK1</i>	<i>NTRK2</i>	<i>NTRK3</i>
Glioma/glioblastoma	<i>ARHGEF2</i> ¹⁹ , <i>BCAN</i> ^{20,21} , <i>CHTOP</i> ¹⁹ , <i>NFASC</i> ²⁰	<i>BCR</i> ¹⁸ , <i>AFAP1</i> ⁹ , <i>SQSTM1</i> ⁹	<i>AFAP1</i> ¹⁸ , <i>ZNF710</i> ¹⁸ , <i>EML4</i> ¹⁸
Astrocytoma		<i>QK1</i> ⁷ , <i>NACC2</i> ⁷	
Gastrointestinal stromal tumour			<i>ETV6</i> ¹⁵
Head and neck cancer		<i>PAN3</i> ⁹	<i>LYN</i> ⁹
Lung cancer	<i>CD74</i> ⁷ , <i>GRPAP1</i> ²³ , <i>IRF2BP2</i> ¹⁸ , <i>MPRIIP</i> ⁷ , <i>P2RY8</i> ¹⁸ , <i>SQSTM1</i> ²⁴ , <i>TPM3</i> ¹⁸	<i>TRIM24</i> ⁹	
Sarcoma	<i>TPM3</i> ⁹ , <i>LMNA</i> ¹⁸		<i>TPM4</i> ¹⁰
Breast cancer	<i>CGN</i> ²⁵ , <i>GATAD2B</i> ²⁵ , <i>LMNA</i> ²⁵ , <i>MDM4</i> ²⁵ , <i>PEAR1</i> ²⁵ , <i>TPM3</i> ^{10,25}		<i>ETV6</i> ²⁵
Acute lymphoblastic leukaemia, acute myeloid leukaemia, histiocytosis, multiple myeloma, dendritic cell neoplasms			<i>ETV6</i> ²⁶
Uterine sarcoma	<i>LMNA</i> ²⁷ , <i>TPM3</i> ²⁷ , <i>TPR</i> ²⁷		<i>RBPM5</i> ²⁷
Cholangiocarcinoma	<i>LMNA</i> ¹⁰ , <i>RABGAP1L</i> ²⁸		
Pancreatic cancer	<i>CTRC</i> ¹⁰		
Melanoma	<i>DDR2</i> ²⁹ , <i>GON4L</i> ²⁹ , <i>TRIM63</i> ²⁹	<i>TRAF2</i> ²⁹	<i>ETV6</i> ⁹
Colorectal cancer	<i>LMNA</i> ¹⁰ , <i>TPM3</i> ¹⁰ , <i>SCYL3</i> ³⁰		<i>ETV6</i> ¹⁸

Penault-Llorca F, et al. J Clin Pathol 2019

Достоинства и недостатки NGS на основе РНК

Достоинства:

- Выявляются практически все виды перестроек, независимо от того, знаем ли мы второго партнера

Недостатки:

- Высокие требования к качеству образца: до 40% материала не может быть исследовано
- Выявление транс-сплайсинговых и цис-сплайсинговых событий – РНК-овых феноменов, не ведущих к трансляции протеина и не ассоциирующихся с ответом на терапию

Kenzie Taniue and Nobuyoshi Akimitsu *N on-coding RNA* 2021, 7, 10. <https://doi.org/10.3390/ncrna7010010>

NTRK: рекомендации ESMO

Высокая частота NTRK: подтверждение FISH, RT-PCR или NGS

Низкая частота NTRK: скрининг NGS или IHC с подтверждением NGS/FISH

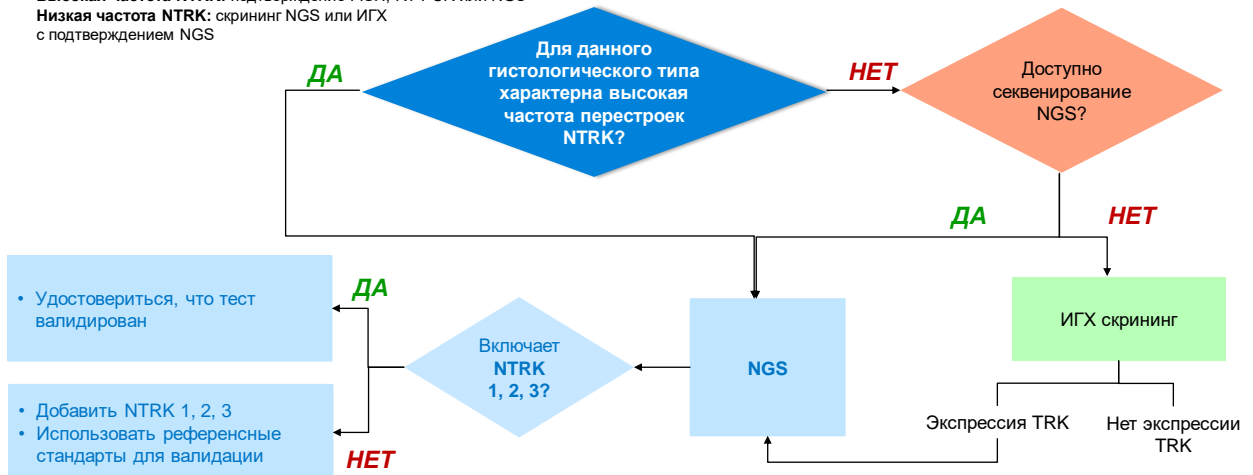


Marchio et al. Annals of Oncology 0: 1–11, 2019

NTRK тестирование с использованием ИГХ скрининга и NGS

Высокая частота NTRK: подтверждение FISH, RT-PCR или NGS

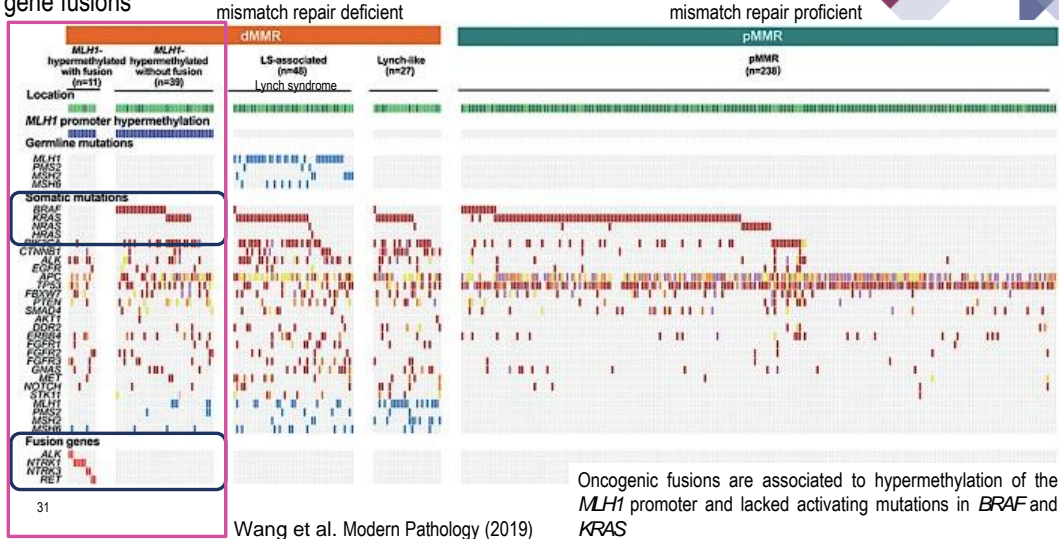
Низкая частота NTRK: скрининг NGS или ИГХ с подтверждением NGS



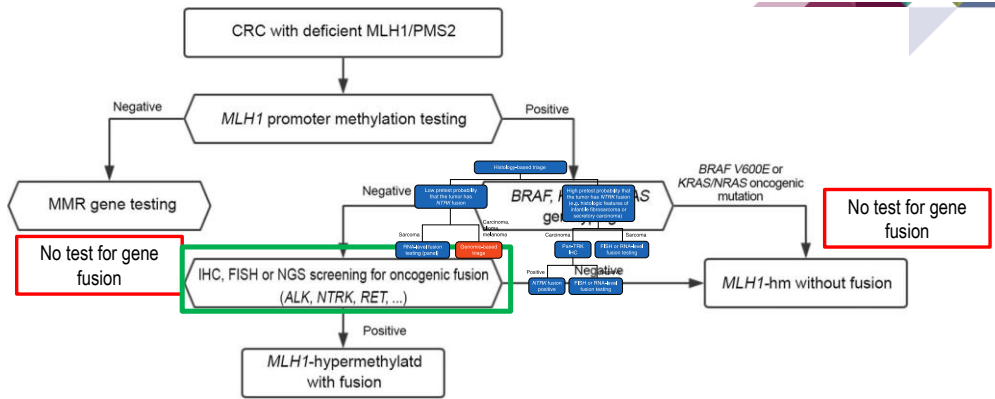
Source: 1) Reis-Filho J.S. Detecting MSI and TRK fusion using NGS: ESMO recommendations (2018) presented at ESMO Congress 2018
2) Penault-Llorca et al, 2019; Testing algorithm for identification of patients with TRK fusion cancers

Перестройки NTRK при колоректальном раке

Relation between *MLH1* hypermethylation status and the presence of gene fusions

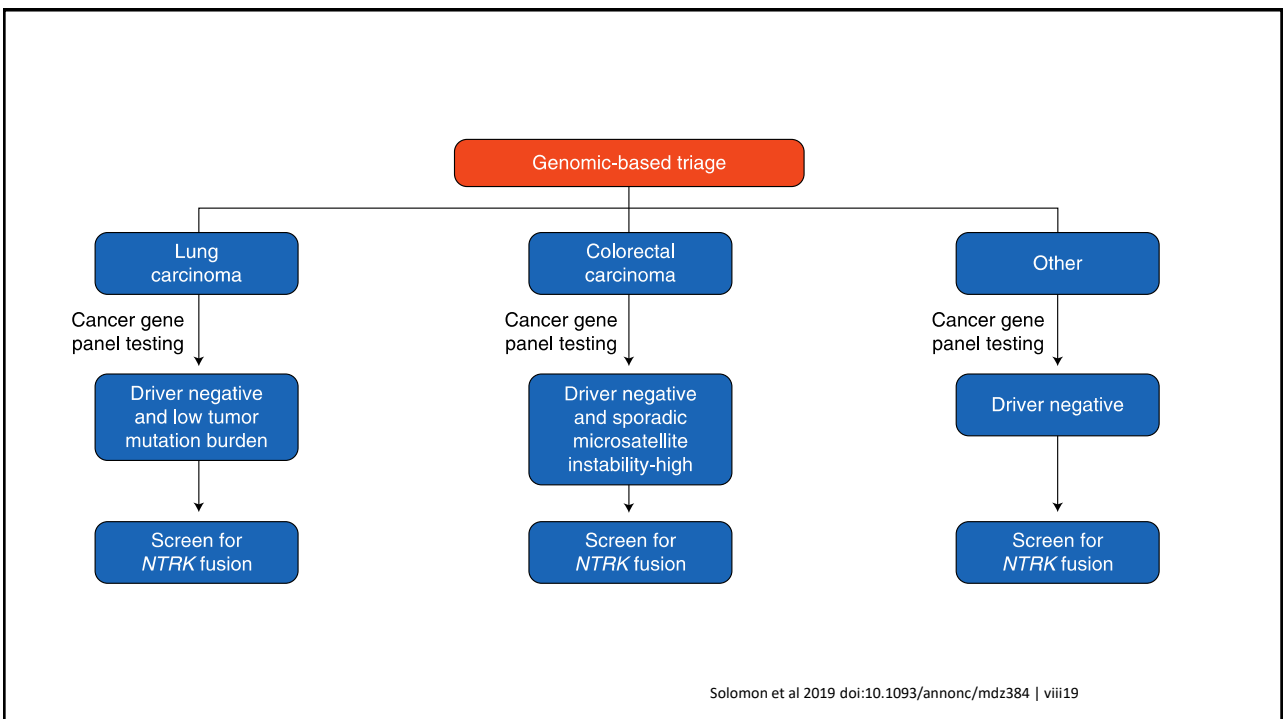
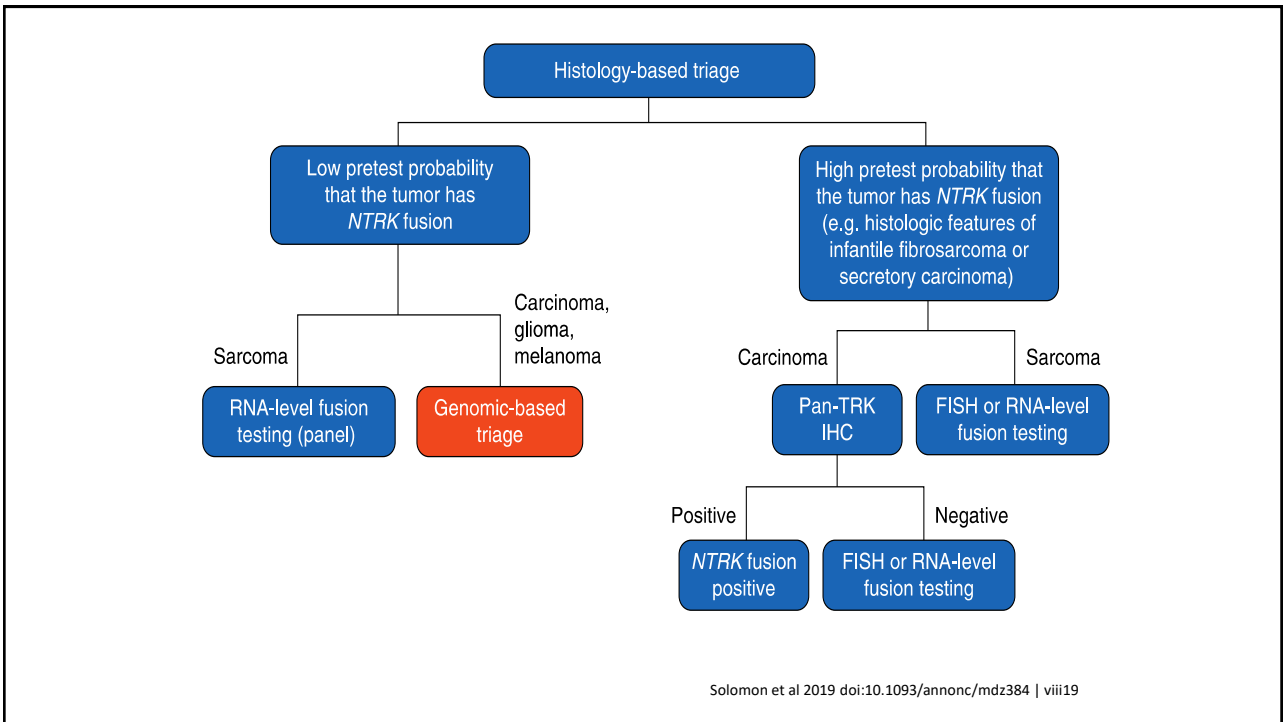


Предложения ESMO по тестированию колоректального рака – как вариант селекции пациентов с редкой встречаемостью перестроек NTRK



Proposed strategy for screening oncogenic fusions such as ALK, NTRK, and RET rearrangements in CRCs.

Cocco et al. Cancer Research 2019/ Wang et al. Modern Pathology (2019)



Спасибо за внимание!