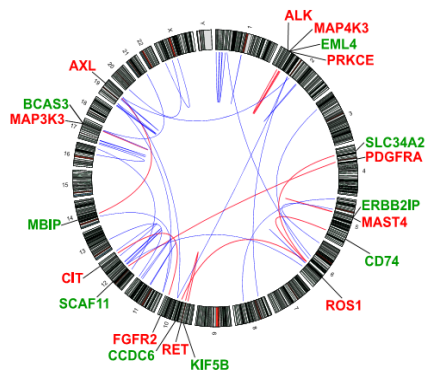


Возможности персонализированного подхода: что нас ждет завтра? (редкие мутации *NTRK*, *RET* и другие)

Строганова Анна Михайловна

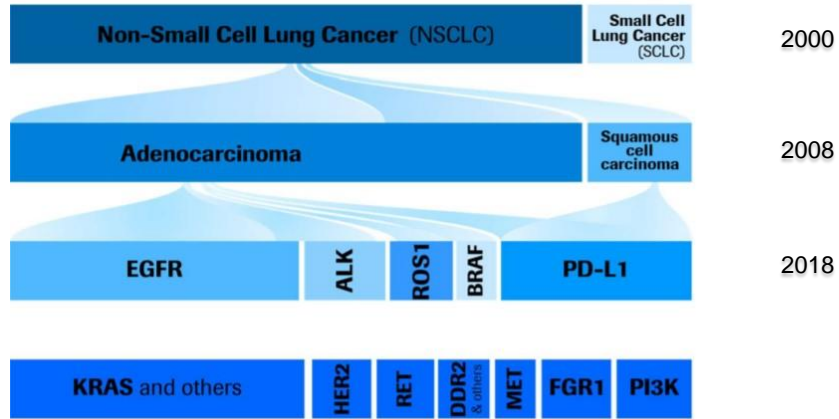
г. Москва

Рearранжировки генов при солидных опухолях



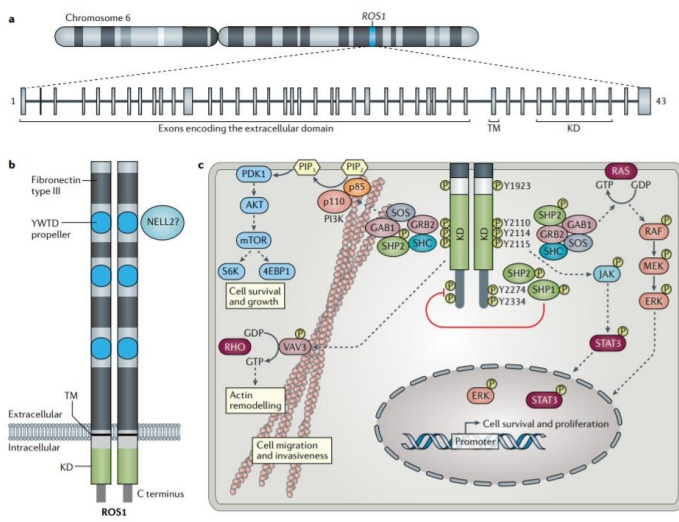
- Известно более 280 генов, участвующих в реарранжировках при злокачественных опухолях
- Из 90 известных тирозинкиназ как минимум 14 участвуют в транслокациях при злокачественных новообразованиях
- Активация тирозинкиназы происходит за счет регуляторных последовательностей гена-партнера
- Как правило, относятся к «двигателям» онкогенеза
- Являются привлекательной целью для таргетной терапии

Эволюция лечения рака легкого



3

Ген ROS1



Перестройка ROS1 впервые идентифицирована в 1987 году в клеточной линии мультиформной глиобластомы

20 лет спустя выявлена перестройка ROS1 в клеточной линии и клиническом образце аденокарциномы легкого

Транслокации гена ROS1 – 1-3% НМРЛ

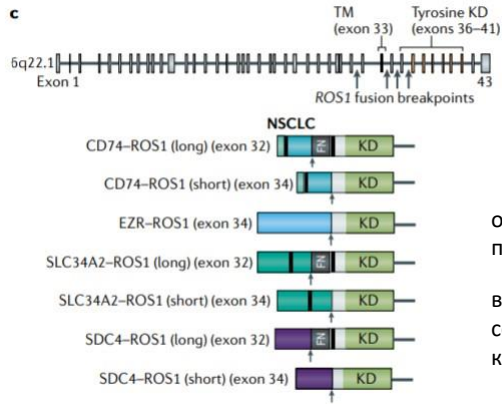
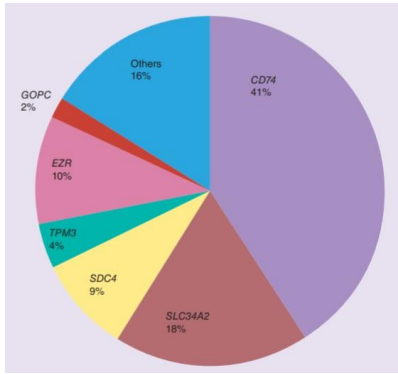
Распространенность перестройки выше среди пациентов в Азии (Китай, Япония, Южная Корея), чем в западных странах (Европа и США); 2,85% против 2,37%

0,23% при плоскоклеточном раке

Dillon et al. Clin Oncol, 2020

4

Разнообразие партнеров при транслокациях гена *ROS1*



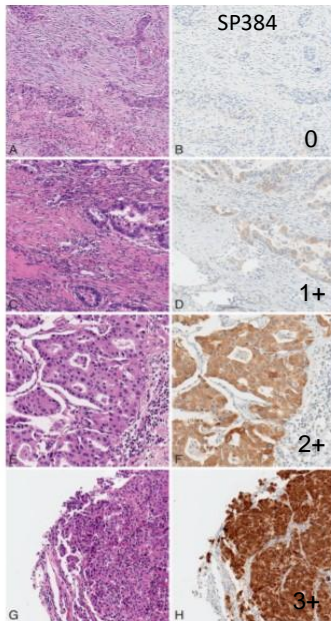
около 26 генов-партнеров

все белки сохраняют киназный домен

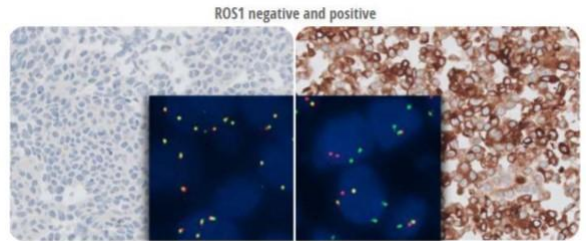
Uguen Future Oncol. (2016)

5

Стратегия поиска перестроек гена *ROS1*



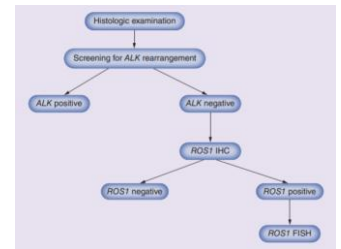
➔ FISH



➔ ОТ-ПЦР

➔ NGS на основе ДНК

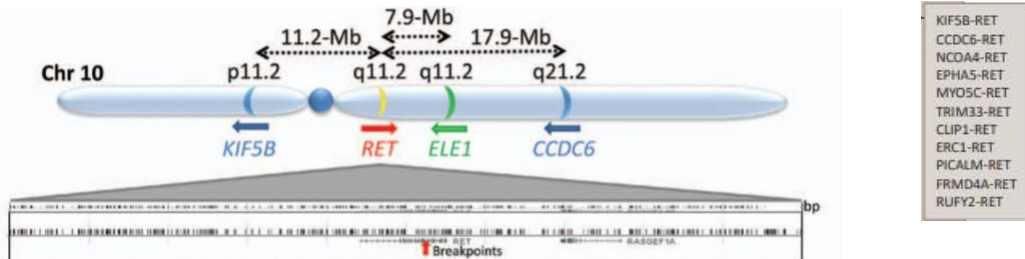
➔ NGS на основе РНК



Uguen Future Oncol. (2016)
Huang et al. Arch Pathol Lab Med, 2019

6

Разнообразие партнеров при транслокациях гена *RET*



аберрантная экспрессия RET в клетках

лиганд-независимая димеризация с активацией RET

1-2% случаев с распространенным НМРЛ

Mizukami et al *J of Thor Oncol*, 2014
C. Belli et al. *Ann of Oncol*, 2021

7

Сравнение методов поиска перестроек гена *RET*

Table 1. Summary of main features, strengths and weaknesses of all available techniques to detect *RET* rearrangements

Method	Sensitivity	Specificity	Detection of partner	Detection of expression	Screening
IHC	Moderate ^a	Moderate ^b	No	Yes	No
FISH	High	High	No/Yes ^c	No	Rare circumstances
RT-PCR	Moderate/high ^d	High	Yes/No ^e	Yes	Rare circumstances
DNA-seq NGS	Moderate ^f	High/moderate ^g	Yes	No	Yes
RNA-seq NGS	High	High	Yes	Yes ^h	Yes

DNA-seq NGS, DNA sequencing by next-generation sequencing; FISH, fluorescent in situ hybridization; IHC, immunohistochemistry; RNA-seq NGS, RNA sequencing by next-generation sequencing; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction.

^a False positive up to 40%.

^b False negative up to 40%.

^c In case of the use of specific fusion partner probe.

^d In settings with many possible fusion partners, risk of lower sensitivity.

^e Does not allow the detection of novel partners.

^f False positive: detected rearrangements by DNA-based assays may not result in fusions, so correlation with RNA-based confirmation of predicted fusion transcript is needed.

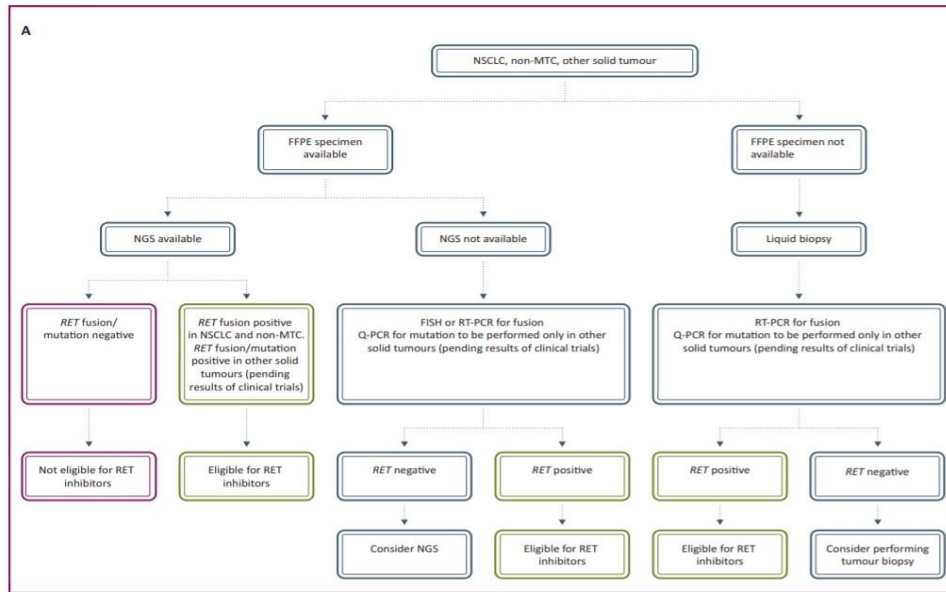
^g False negative: some introns involved in rearrangements may be inadequately covered for technical reasons.

^h Indication on the in-frame nature of the fusion (functionality).

C. Belli et al. *Ann of Oncol*, 2021

8

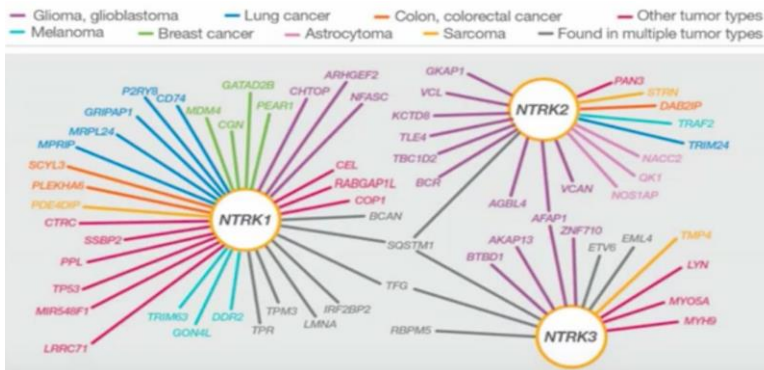
Рекомендуемый алгоритм тестирования перестроек гена *RET* (ESMO recommendations)



C. Belli et al. Ann of Oncol, 2021

9

Разнообразие партнеров при транслокациях генов *NTRK1*, *NTRK2* и *NTRK3*



Гены *NTRK1*, *NTRK2* и *NTRK3* кодируют киназу рецептора тропомиозина TRKA, TRKB и TRKC соответственно. Эти рецепторы в норме участвуют в развитии центральной и периферической нервной системы.

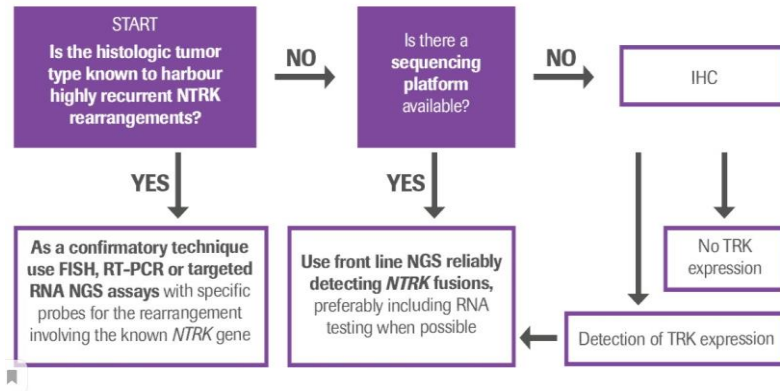
перестройки активируют сигнальный каскад, участвующий в пролиферации клеток, выживании и ангиогенезе

идентифицировано около 25 различных генов-партнеров *NTRK*

0,1–3% при НМРЛ

10

Рекомендуемый алгоритм тестирования перестроек генов *NTRK* (ESMO recommendation)



11



ИГХ скрининг

Достоинства

удобен в использовании, небольшое время тестирования, экономичен

но

ИГХ ROS1 – чувствительность приближается к 100%, но переменная специфичность (от 73 до 100%)

ИГХ для скрининга перестроек гена RET в настоящее время не рекомендуется при патологии легких (низкая чувствительность (от 55% до 65%) и высокая вариабельность специфичности (от 40% до 85%))

ИГХ обнаруживает химерные белки всех 3 генов TRK, позволяет выявить пациентов, которым потенциально может быть полезна NGS

- Ложнопозитивные случаи ИГХ – неверно установленная гистологическая форма – рак с признаками нейроэндокринной дифференцировки (в случаях ALK/ NTRK окрашивания)
- Ложнонегативные случаи ИГХ – редкий ген-партнер, сложная конфигурация химерного протеина

<https://sequencing.roche.com>

Флуоресцентная in situ гибридизация (FISH)

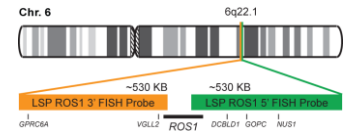
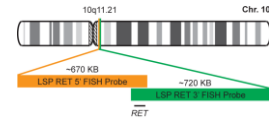
Достоинства

использование зондов break apart может обнаружить почти все известные и неизвестные перестройки

- «золотой стандарт» для обнаружения перестроек *ROS1*
- обнаружение перестроек *RET* с хорошей чувствительностью и специфичностью

но

- трудоемкий, дорогостоящий
- не содержит информации о конкретных генах-партнерах
- трудности в интерпретации результатов FISH включают перичентрические слияния, близость нескольких возможных генов-партнеров к гену *RET* (например, некоторые слияния KIF5B-*RET*) и возможное наличие делеций
- FISH не является оптимальным в контексте обширного и мультиплексного скрининга или когда выявление гена-партнера оказывает влияние на клиническое ведение пациента
- Ложнонегативные случаи FISH – сложные перестройки, иногда с участием нескольких генов; внутриврохромосомные микроделеции
- Ложнопозитивные случаи FISH – нарушения транскрипции/трансляции, «молчание» транслокации (описаны для NTRK)



13

ОТ-ПЦР

- быстрое время выполнения, не нужно ждать набора пациентов
- простой метод, высокая чувствительность и специфичность

но

- ПЦР с заранее заданными параметрами – выявляет не все возможные нарушения (не позволяет идентифицировать перестройки с участием неизвестных генов-партнеров)
- крайне чувствителен к качеству материала

Высокопроизводительное секвенирование - NGS

- Преимущества

Возможностью выявления aberrаций практически в неограниченном количестве генов (с определенными допущениями)

- Недостатки

Требовательностью к качеству и количеству материала, сложностями биоинформатики и высокой стоимостью/длительным набором образцов

<https://sequencing.roche.com>

Достоинства и недостатки NGS на основе ДНК

Достоинства:

- исследование может успешно выполняться одновременно с определением SNV, CNV, indels (экономия материала)
- существенно меньшие требования к материалу
- высокая чувствительность обнаружения мутаций (идентификация соматических мутаций с низкой частотой аллельных вариантов)

Недостатки:

- Включение детекции перестроек катастрофически перегружает панель и требует существенного удорожания секвенирования
- Невозможно охватить полностью весь спектр перестроек (ограничены размером интронных последовательностей): классический пример – выявление перестроек *NTRK* FMI Dx – в панель были включены интроны 3 и 7-12 *NTRK1*, 15 – *NTRK2* и ни одного - *NTRK3*, только интроны его самого частого партнера – *ETV6*. Ген *RET* - необычная точку разрыва или имеет ген-партнер, который никогда раньше не был охарактеризован или даже идентифицирован. Чувствительность оказалась около 80% для всех перестроек.

[Solomon et al Ann Oncol](#). 2019 Nov; 30(Suppl 8): viii16–viii22. Published online 2019 Nov 18. doi: [10.1093/annonc/mdz384](https://doi.org/10.1093/annonc/mdz384)

Достоинства и недостатки NGS на основе РНК

Достоинства:

- выявляет практически все виды перестроек, независимо от того, знаем ли мы второго партнера
- позволяет обнаруживать слияния генов в случаях с более сложными перестройками, при которых могли потеряться специфические сайты связывания праймеров
- определяет наличие сдвига рамки считывания

Недостатки:

- высокие требования к качеству образца: до 40% материала не может быть исследовано (преаналитические условия, включая время ишемии, тип и продолжительность фиксации, заливку в парафин)
- выявление транс-сплайсинговых и цис-сплайсинговых событий – РНК-овых феноменов, не ведущих к трансляции протеина и не ассоциирующихся с ответом на терапию

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

- Необходимо ли подключать новые методы диагностики (или переходить на них с самого начала)?
- Помогут ли нам новые методы исключить дискордантность, предсказать чувствительность к терапии и прогноз?

Спасибо за внимание!