

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-276

**ТАРГЕТНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ AMPLISEQ FOCUS PANEL ПРИ АДЕНОКАРЦИНОМЕ
И ПЛОСКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ЛЕГКОГО**

**TARGETED RNA-SEQ (AMPLISEQ FOCUS PANEL) IN PATIENTS WITH ADENOCARCINOMA
AND SQUAMOUS CELL CARCINOMA IN LUNG CANCER**

Ю. С. Станкевич, А. Н. Щаюк, Е. П. Михаленко, А. В. Горбач, А. В. Кильчевский

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск

Y. S. Stankevich, A. N. Shchayuk, A. P. Michalenko, A. V. Gorbach, A. V. Kilchevsky

Institute of Genetics and Cytology NAS of Belarus, Minsk

✉ j.bulanovich@igc.by

Аннотация

Исследован уровень экспрессии генов, представленных в панели AmpliSeq Focus Panel для пациентов с аденокарциномой и плоскоклеточным раком легкого. Проведена оценка дифференциальной экспрессии, на основании которой можно судить о достоверных различиях между группами по генам *ROS1*, *TBP* и *ITGB7*. В части образцов выявлены химерные гены *EML4:ALK* и *MET*.

Abstract

AmpliSeq Focus Panel workflow has been conducted in samples of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma patients. Differential expression analysis on DESeq2 showed significant difference between these two groups by *ROS1*, *TBP* and *ITGB7* genes, overall expression rates were higher in *ROS1*, *TBP* and *MYC*. *EML4:ALK* and *MET* fusions were found in several samples from patients with adenocarcinoma.

Важнейшую роль в возникновении и развитии рака легкого (РЛ) играют гены, которые являются частью сигнальных путей, контролируют пролиферацию, рост и дифференциацию клеток. Некоторые онкогены способны образовывать химеры с другими участками генома, что может приводить к измененной клеточной сигнализации, неконтролируемому делению и повышенной выживаемости клеток. Существует две основные группы химерных генов. К первой относятся рецепторы тирозин-киназ (*ALK*, *RET*, *ROS1*, *NTRK1/2/3*, *FGFR1/2/3*, *EGFR*, *ERBB2*, *ERBB4*, *LTK*), ко второй — гены MAPK-пути (*RASGRF1*, *BRAF*) [1]. Мы проанализировали опухолевую ткань пациентов с двумя гистологическими типами РЛ, чтобы оценить общий уровень экспрессии, определить наличие химерных генов и сравнить группы пациентов.

Для изучения дифференциальной экспрессии было взято 28 образцов ДНК пациентов с плоскоклеточным раком легкого (ПЛ) и 21 образец — с аденокарциномой (АК). Подготовка к секвенированию осуществлялась с помощью набора AmpliSeq Illumina Focus Panel.

Результующие fastq-файлы после секвенирования загружались на платформу BaseSpace (Illumina) и использовались для запуска приложения RNA Amplicon v.2.1.0, которое производило выравнивание последовательности на референсный геном с помощью алгоритма BWA и осуществляло подсчет дифференциальной экспрессии посредством программы DESeq2.

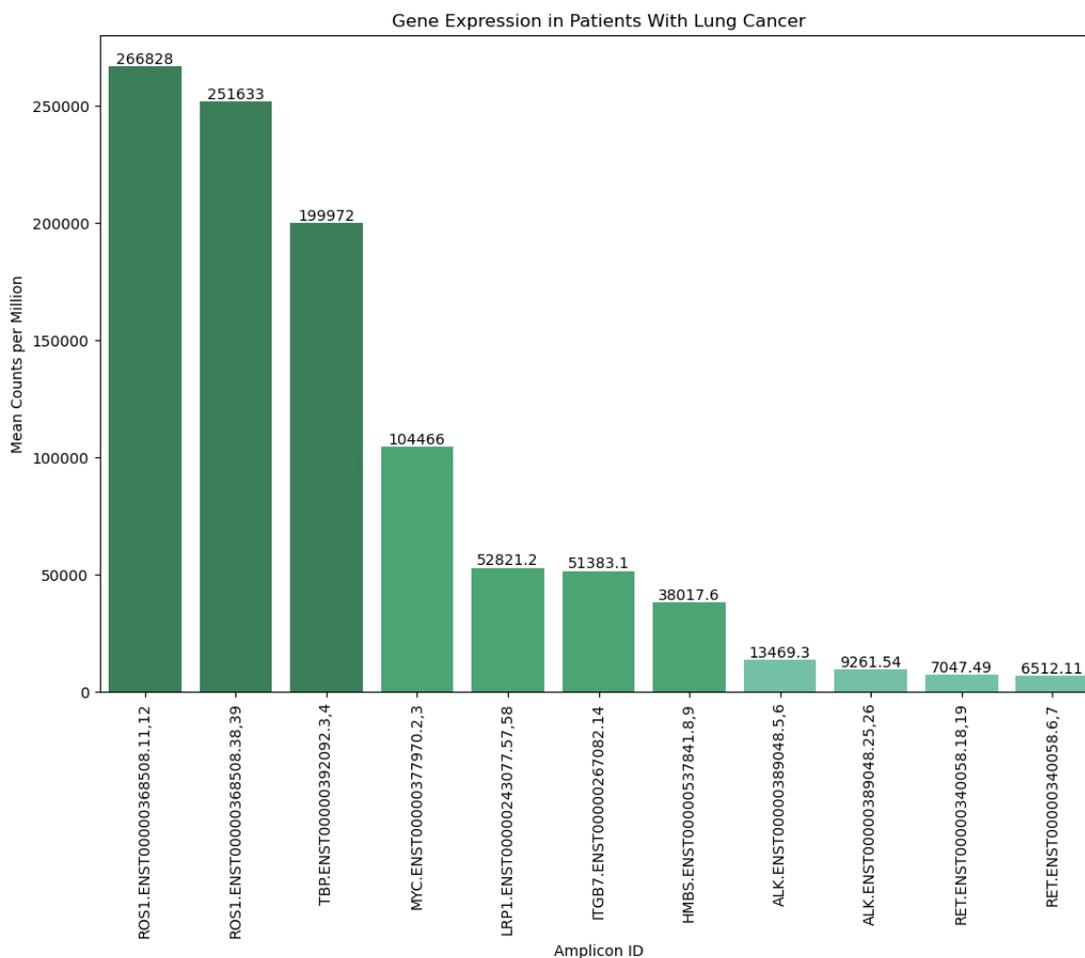
После биоинформатической обработки производился анализ полученных данных с помощью языка программирования Python: работа с таблицей, полученной от DESeq2, производилась инструментами пакета Pandas (очистка данных, удаление ампликонов с нулевыми каунтами и off target ампликонов, удаление данных с $p\text{-value} > 0,05$). В таблице представлено достоверное различие экспрессии между группами АК и ПЛ.

Дифференциальная экспрессия между группами АК и ПЛ

| Amplicon ID | Adenocarcinoma | Squamous Cell Carcinoma | log2Fold Change | p-value |
|-------------------------------|----------------|-------------------------|-----------------|---------|
| ROS1 ENST00000368508.38,39 | 22728,274 | 9841,329 | -1,2075 | 0,00652 |
| ROS1 ENST00000368508.11,12 | 24854,318 | 9870,742 | -1,3322 | 0,00097 |

| Amplicon ID | Adenocarcinoma | Squamous Cell Carcinoma | log2Fold Change | p-value |
|-----------------------------|----------------|-------------------------|-----------------|---------|
| TBP ENST00000392092.3,4 | 10010,329 | 13860,781 | 0,4695 | 0,00579 |
| ITGB7 ENST00000267082.14 | 2469,688 | 3638,091 | 0,5588 | 0,01783 |

Сравнительный анализ экспрессии среди всей выборки проводился на данных, нормализованных относительно общего количества прочтений на образец. Для выявления наиболее экспрессируемых генов также использовались инструменты Python (Pandas, NumPy), которые позволили отобрать ампликоны с ненулевой встречаемостью и вывести среднее значение каунтов для каждого из них. Графическое отображение полученных данных осуществлялось с помощью библиотек Matplotlib и Seaborn (см. рисунок).



Экспрессия генов в образцах РЛ

Также в трех образцах аденокарциномы алгоритм программы RNA Amplicon обнаружил химерный ген EML4:ALK (E13:A20), в одном — EML4:ALK (E5,6:A20). Эти перестройки более характерны для молодых (< 60 лет) некурящих женщин с АК [2] и встречаются в 3–5 % случаев. Ген ALK активно экспрессируется на ранних этапах развития организма и в норме не активен во взрослом возрасте, однако при появлении в нем изменений он будет играть ключевую роль в опухолевом процессе, так как участвует в регуляции PI3K-AKT, JAK-STAT и MAPK сигнальных путей, которые, в свою очередь, ответственны за важнейшие клеточные процессы: рост, пролиферация, клеточный цикл и апоптоз [1, 3, 4]. В одном из образцов АК также детектировалась химера MET (MET 13: MET 15). MET является протоонкогеном, который, так же как и ALK, регулирует деятельность различных сигнальных путей (RAS/ERK/MAPK, PI3K/AKT, Wnt/ β -catenin, STAT), которые, помимо вышеописанных функций, также отвечают за миграцию инвазию и ангиогенез [3].

В нашем исследовании мы оценили общую экспрессию генов у пациентов с раком легкого, выявили гены, экспрессия которых значительно различается в образцах аденокарциномы и плоскоклеточного РЛ, а также опре-

делили наличие химерных генов в некоторых образцах. Эти данные важны как для понимания процессов канцерогенеза в целом, так и для лечения пациентов с использованием таргетной терапии, которая на данный момент применяется для ROS1-, ALK- и MET-положительных РЛ. Полученные промежуточные результаты будут использованы в нашей дальнейшей работе для возможного определения генов-предикторов чувствительности к терапии пациентов РЛ.

Литература

1. Harada G. et al. Rare molecular subtypes of lung cancer // *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2023. Vol. 20 (4). P. 229–249.
2. Zhou J. X. et al. Oncogenic driver mutations in patients with non-small cell lung cancer at various clinical stages // *Annals of Oncology*. 2013. Vol. 24 (5). P. 1319–1325.
3. Chevallier M. et al. Oncogenic driver mutations in non-small cell lung cancer: Past, present and future // *WJCO*. 2021. Vol. 12 (4). P. 217–237.
4. Stanzione B. et al. Therapeutical options in ROS1-rearranged advanced non-small cell lung cancer // *Intern. J. Mol. Sci*. 2023. Vol. 24 (14).