

Интерпретация соматических генетических вариантов, выявленных методом высокопроизводительного секвенирования опухолевой ДНК, на примере онкологических заболеваний детского возраста

Спектор М.А.¹, Ясько Л.А.¹, Друй А.Е.^{1,2}

1 — ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России

117997, г. Москва, ГСП-7, ул. Саморы Машела, д. 1

2 — ГИЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»

620026, г. Екатеринбург, ул. Карла Маркса, д. 22 а

Активное внедрение высокопроизводительного секвенирования в клиническую практику требует общего подхода к интерпретации обнаруженных генетических вариантов, в частности, вариантов с соматическим статусом. В 2017 году Ассоциация молекулярной патологии США (AMP), Американская коллегия медицинской генетики и геномики (ACMG), Американское общество клинической онкологии (ASCO) и Коллегия американских патологов (CAP) опубликовали руководство по интерпретации соматических генетических вариантов и выдаче заключений по результатам высокопроизводительного секвенирования опухолевой ДНК.

Данный обзор посвящен специфике применения руководства AMP/ACMG/ASCO/CAP для интерпретации результатов генетических исследований детских солидных опухолей. В статье приводятся критерии, на которых основана классификация соматических генетических вариантов, обсуждаются проблемы оценки клинической значимости генетических находок и приводятся примеры классификации генетических вариантов, выявленных в различных типах детских солидных опухолей.

Ключевые слова: секвенирование нового поколения (NGS), рекомендации, клиническая онкология, критерии патогенности вариантов последовательности ДНК, соматические генетические варианты.

Для цитирования: Спектор М.А., Ясько Л.А., Друй А.Е. Интерпретация соматических генетических вариантов, выявленных методом высокопроизводительного секвенирования опухолевой ДНК, на примере онкологических заболеваний детского возраста. *Медицинская генетика* 2021; 20(3): 3-25.

DOI: 10.25557/2073-7998.2021.03.3-25

Автор для корреспонденции: Друй А.Е.; e-mail: Dr-Druy@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Поступила: 20.02.2021.

The interpretation of somatic genetic variants identified with high-throughput sequencing of DNA from paediatric solid tumors

Spektor M.A.¹, Yasko L.A.¹, Druy A.E.^{1,2}

1 — Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of Russia
1 Samory Mashela str., Moscow, 117997, Russia

2 — Research Institute of Medical Cell Technologies
22a Karl Marx str., Yekaterinburg, 620026, Russia

Active clinical implementation of high-throughput DNA sequencing requires a common approach to the interpretation of detected genetic variants, including variants with somatic status. In 2017, the United States Association of Molecular Pathology (AMP), the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG), the American Society of Clinical Oncology (ASCO), and the College of American Pathologists (CAP) published the guidelines for interpreting and reporting the somatic genetic variants in cancer identified using high-throughput sequencing analysis.

This review focuses on the specific application of the AMP/ACMG/ASCO/CAP guidelines in the field of genetic research on paediatric solid tumors. In particular, the review provides the criteria for classification of somatic genetic variants, discusses the problems of evaluating the clinical significance of genetic findings in paediatric tumors, and provides examples of classification of genetic variants specific for certain types of childhood solid malignancies.

Key words: massive parallel sequencing (MPS), next-generation sequencing (NGS), guidelines, clinical oncology, DNA variants classification criteria, somatic variants.

For citation: Spektor M.A., Yasko L.A., Druy A.E. The interpretation of somatic genetic variants identified with high-throughput sequencing of DNA from paediatric solid tumors. *Meditsinskaya genetika [Medical genetics]* 2021; 20(3): 3-25. (In Russ.).

DOI: 10.25557/2073-7998.2021.03.3-25

Corresponding author: Druy A.E.; **e-mail:** Dr-Drui@yandex.ru

Funding. The study was carried out without sponsorship.

Conflict of interest. Author declare no conflicts of interest.

Accepted: 20.02.2021.

Выявление и классификация соматических вариантов в опухолях на основании их клинической значимости играет ключевую роль в развитии персонализированной медицины в области онкологии [1–3]. Если при классификации герминальных генетических вариантов достигнут консенсус, нашедший отражение в рекомендациях и руководствах по интерпретации результатов массового параллельного секвенирования (MPS), разработанных в Европе и США [4–8] и опубликованных на русском языке в журнале «Медицинская генетика» в 2017 году [9], то интерпретация соматических вариантов, выявленных при молекулярно-генетическом тестировании опухолей, выполненных в рамках различных исследований, в том числе в области детской онкологии, в значительной мере различается.

Унификация классификации соматических вариантов в детских опухолях в соответствии с руководством AMP/ACMG/ASCO/CAP [10] может способствовать обмену опытом между различными клиническими группами и, как следствие, значительно увеличить практическую значимость молекулярно-генетической диагностики.

Принципы классификации генетических вариантов в опухолях согласно руководству AMP/ACMG/ASCO/CAP

Генетические варианты, обнаруженные в результате секвенирования ДНК опухоли, могут носить герминальный или соматический характер. Герминальные варианты — это наследуемые генетические изменения, которые возникают в половых клетках (яйцеклетках или сперматозоидах) или в их предшественниках. Соматические варианты представляют собой генетические изменения, которые возникают в любой соматической клетке организма. Некоторые из них являются драйверными событиями онкогенеза и приводят к злокачественной трансформации клетки. Накопление дополнительных соматических вариантов в трансформированных клетках способствует увеличению генетической нестабильности и формированию злокачественной опухоли. В результате генетический материал опухолевых клеток содержит большее количество со-

матических мутаций по сравнению с клетками нормальной ткани [11].

Генетические варианты включают в себя:

- точковые мутации (нуклеотидные замены);
- инсерции и делеции (инделлы);
- химерные гены, возникшие в результате геномных перестроек;
- вариации числа копий генов.

Клиническая значимость соматических вариантов определяется тем, какой вклад они вносят в диагностику, определение прогноза заболевания, а также в подбор терапии. Таким образом, клинически значимые варианты представляют собой совокупность диагностических, прогностических и предиктивных молекулярно-генетических биомаркеров.

Генетический вариант является клинически значимым, если он:

- предсказывает эффект терапии (чувствительность, резистентность или токсичность);
- изменяет функциональную активность белкового продукта гена, который является мишенью для одобренных препаратов или препаратов, проходящих клинические исследования;
- является критерием включения в клинические исследования;
- позволяет оценить прогноз и вероятный клинический исход заболевания;
- влияет на дифференциальную диагностику заболевания;
- может быть использован для профилактики и/или ранней диагностики онкологического заболевания [10].

Если генетический вариант удовлетворяет перечисленным выше критериям клинической значимости, он может быть отнесен к одной из следующих категорий:

- **категория I**, варианты с высокой клинической значимостью;
- **категория II**, варианты с потенциальной клинической значимостью;
- **категория III**, варианты с неизвестной клинической значимостью.

В ином случае соматический вариант относится к **категории IV**, которая включает в себя доброкаче-

ственные или вероятно доброкачественные варианты, не влияющие на развитие опухоли и, как следствие, на прогноз течения заболевания и выбор стратегии терапии.

Варианты категорий I и II дополнительно классифицируют на подкатегории в соответствии с уровнем доказательности клинических и экспериментальных данных, подтверждающих их клиническое значение (рис. 1).

Категория I включает в себя варианты с высоким (А) и средним (В) уровнями доказательности их клинической значимости, категория II — с умеренным (С) и низким (D). Уровень достоверности клинических и экспериментальных данных зависит от источника информации, свидетельствующей о клинической значимости варианта [10]. Источниками информации могут служить профессиональные клинические руководства, базы данных генетических вариантов и научные публикации. Критерии, на которых основана данная классификация, приведены в табл. 1.

Источники информации для классификации генетических вариантов

Одними из ключевых источников информации, необходимой для интерпретации клинической значимости вариантов, являются геномные базы данных. Ге-

номные базы данных представляют собой репозитории нуклеотидных последовательностей ДНК, в которых генетические варианты систематизированы определенным образом. Информация, содержащаяся в геномных базах данных, необходима для корректного аннотирования и классификации генетических вариантов [10]. Наиболее релевантными для анализа результатов секвенирования ДНК опухолей являются популяционные базы данных, базы данных соматических и герминальных генетических вариантов (табл. 2).

Популяционные базы данных содержат информацию о частоте встречаемости минорных аллельных вариантов в различных популяциях и используются для фильтрации вариантов, которые можно считать вероятно доброкачественными (полиморфизмами). Не существует стандартного порогового значения популяционной частоты, начиная с которого вариант следует относить к категории IV. При секвенировании образца опухоли без контрольного образца неизменной ткани рекомендуется установить пороговое значение MAF 1% [10] или 0,1% [14]. Уровень в 1% установлен рабочей группой AMP, ASCO, CAP (США) [10], тогда как уровень 0,1% предложен европейскими авторами на основании рекомендаций GnomAD для выборок, насчитывающих более 2000 аллелей [14].

Однако некоторые соматические варианты, которые относятся к категориям высокой или потенциальной

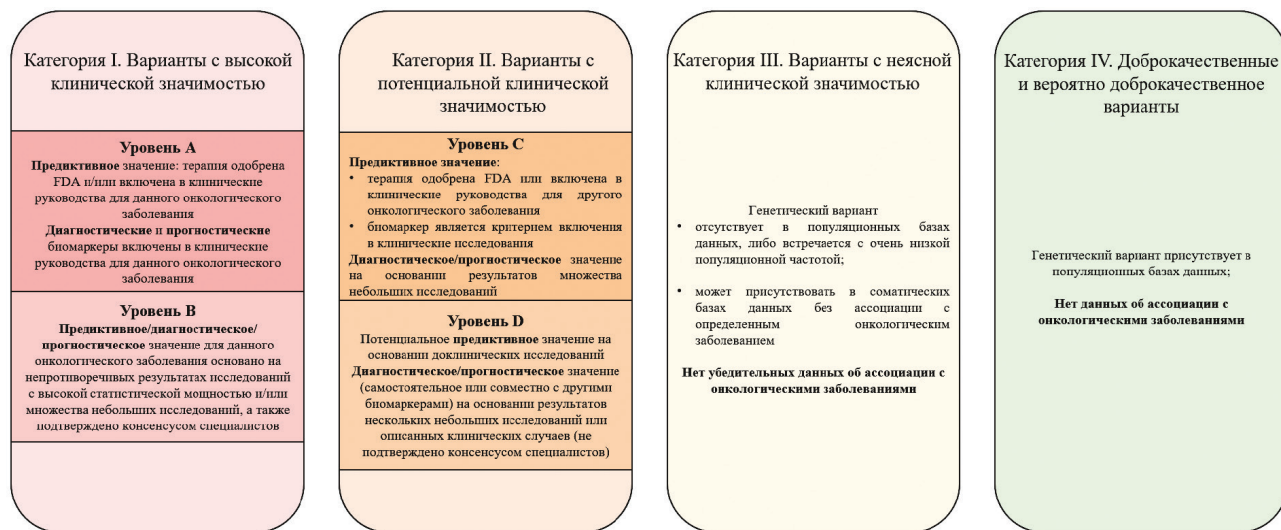


Рис. 1. Классификация соматических генетических вариантов на категории I–IV на основании их диагностической, прогностической и предиктивной клинической значимости ([10], с изменениями).

* FDA – Федеральная служба по надзору за продуктами питания и лекарственными препаратами США

Fig. 1. Classification of somatic genetic variants (tiers I-IV) based on their diagnostic, prognostic or predictive clinical significance ([10] with modifications)

* FDA – Food and Drug Administration of the USA

Критерии классификации генетических вариантов на категории I–IV на основании их клинической значимости в диагностике, прогнозировании течения заболевания и подборе терапии ([10], с изменениями)

Источник информации	Категория I	Категория II	Категория III	Категория IV
Рекомендации FDA; профессиональные клинические рекомендации; экспериментальная терапия	<u>Терапевтическая значимость</u> Терапия для данного онкологического заболевания: • одобрена FDA; • подтверждена исследованиями с высокой статистической мощностью и консенсусом специалистов. <u>Диагностическая, прогностическая значимость</u>: • биомаркер внесен в профессиональные рекомендации для данного онкологического заболевания; • значимость подтверждена исследованиями с высокой статистической мощностью и консенсусом специалистов.	<u>Терапевтическая значимость</u>: • терапия одобрена FDA или профессиональным сообществом для другого онкологического заболевания; • генетический вариант является критерием включения в клинические исследования; • эффективность терапии подтверждена доклиническими исследованиями. <u>Диагностическая, прогностическая значимость</u> (самостоятельная или совместно с другими биомаркерами): • подтверждена несколькими исследованиями с небольшой статистической мощностью; • подтверждена в нескольких описанных клинических случаях.	Нет убедительных данных о клинической/биологической значимости данного варианта.	Нет данных о клинической/биологической значимости данного варианта, либо есть данные, свидетельствующие о том, что вариант доброкачественный.
Тип генетического варианта	Активирующая мутация; мутация с потерей функции белка (в т.ч. нонсенс-мутация, миссенс-мутация, мутация в участке сплайсинга (индел); вариация числа копий гена, химерный ген	Активирующая мутация; мутация с потерей функции белка (в т.ч. нонсенс-мутация, миссенс-мутация, мутация в участке сплайсинга, индел); вариация числа копий гена; химерный ген	Обычно миссенс-мутация или индел без сдвига рамки считывания. Функциональное влияние на белковый продукт гена неизвестно.	Обычно миссенс-мутация. Функциональное влияние на белковый продукт гена неизвестно или отсутствует.
Частота соматического аллельного варианта (VAF)	Обычно <50%	Обычно <50%	Любая частота	Преимущественно герминальные варианты: ~50% или ~100%
Частота герминального аллельного варианта (VAF)	~50% или ~100%	~50% или ~100%	~50% или ~100%	
Популяционные базы данных: • ESP • dbSNP • 1000Genome • ExAC • gnomAD	Вариант отсутствует или встречается с популяционной частотой (MAF) <1%	Вариант отсутствует или встречается с популяционной частотой (MAF) <1%	Вариант отсутствует или встречается с популяционной частотой (MAF) <1%	Вариант встречается с популяционной частотой MAF ≥ 1%, либо встречается с высокой частотой в отдельных этнических популяциях
Базы данных герминальных вариантов: • HGMD • ClinVar	Может присутствовать	Может присутствовать	Обычно отсутствует	Обычно отсутствует

Окончание табл. 1 см. на стр. 7

Окончание таблицы 1

Критерии классификации генетических вариантов на категории I–IV на основании их клинической значимости в диагностике, прогнозировании течения заболевания и подборе терапии ([10], с изменениями)

Источник информации	Категория I	Категория II	Категория III	Категория IV
Базы данных соматических вариантов: • COSMIC • My Cancer Genome • TCGA	Вероятно, присутствует	Вероятно, присутствует	Потенциально соматический вариант: может присутствовать в нескольких образцах различных опухолей. Потенциально герминальный вариант: отсутствует или присутствует без ассоциации с определенным онкологическим заболеванием	Присутствует или отсутствует, не ассоциирован с определенным онкологическим заболеванием.
Утилиты для предсказания влияния генетического варианта на функцию белкового продукта гена (<i>in silico</i>): • SIFT • Provean • PolyPhen2 • MutTaster • CADD	Вероятно, вариант, влияющий на белковый продукт гена	Вероятно, вариант, влияющий на белковый продукт гена	Результаты анализа влияния генетического варианта на структуру и функцию белкового продукта гена неоднозначны	Вероятно, вариант, не влияющий на структуру белкового продукта гена
Участие белкового продукта гена в сигнальных путях	Сигнальные пути, ассоциированные с возникновением и прогрессией онкологических заболеваний	Сигнальные пути, ассоциированные с возникновением и прогрессией онкологических заболеваний	Не важно	Не важно
Примеры	Миссенс-мутация <i>ALK</i> p.F1174L при нейробластоме [12]	Мутация p.Ala536ArgfsTer53 в гене <i>TSC2</i> , приводящая к сдвигу рамки считывания, при остеосаркоме [12]	Миссенс-мутация <i>MED12</i> p.G44D при опухоли Вильмса (нефробластоме) [12]	Миссенс-мутация <i>TP53</i> p.Y107H при опухоли Вильмса (нефробластоме) [13]

Примечание: VAF – variant allele frequency, частота аллельного варианта; MAF – minor allele frequency, частота минорного аллеля; * – данный критерий не должен быть основополагающим при классификации варианта.

клинической значимости, присутствуют в популяционных базах данных. В связи с этим, несмотря на то, что популяционная частота является основным параметром фильтрации доброкачественных и вероятно доброкачественных вариантов, рекомендуется оценивать клиническую значимость варианта с ненулевой MAF по совокупности всех параметров, приведенных в **табл. 1** [10].

Базы данных соматических вариантов, ассоциированных с развитием онкологических заболеваний, включают в себя информацию о встречаемости генетических вариантов в образцах опухолей различных типов, в частности, систематизированную информацию из научных публикаций, массивов данных по результатам геномных исследований, других соматических баз данных.

Одной из наиболее обширных баз данных этого типа является COSMIC (Catalog of Somatic Mutations in Cancer, <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>). Помимо этого, существуют базы данных, содержащие информацию о генетических вариантах в определенном ключевом онкогене или онкосупрессоре. В частности, базы данных The International Agency for Research in Cancer (IARC) *TP53* database (<http://p53.iarc.fr/>) и Seshat (<http://vps338341.ovh.net/>) содержат информацию о вариантах в гене *TP53*, изменения в котором вносят значительный вклад в формирование и прогрессию множества типов опухолей. Использование этих баз данных рекомендуется при оценке клинической значимости вариантов данного гена [10, 14].

Базы данных соматических вариантов в опухолях детского возраста. За последнее десятилетие было организовано несколько крупномасштабных проектов, в которых проводились молекулярно-генетические исследования образцов опухолей и конституциональных тканей пациентов детского возраста. Целью данных проектов было выявление потенциальных мишеней персонализированной терапии детских онкологических заболеваний и синдромов предрасположенности к злокачественным опухолям. Среди них:

- проект «Геном детского рака» (The pediatric cancer genome project, PCGP) — совместный проект исследовательского госпиталя святого Иуды (St. Jude Children's Research Hospital) и Медицинской школы Уни-

верситета Джорджа Вашингтона (Washington University School of Medicine) [15];

- проект Pan-Cancer Study of Childhood Cancers (PedPanCan), организованный немецким центром исследования рака (German Cancer Research Center, DKFZ) [16];

- проект Therapeutically Applicable Research To Generate Effective Treatments (TARGET), посвященный генетическим исследованиям опухолей детского возраста, которые характеризуются неблагоприятным клиническим течением. Проводится при поддержке Национального института онкологии (National Cancer Institute, NCI) под кураторством экспертов Детской онкологической группы (Children's Oncology Group, COG) [17];

Таблица 2

Базы данных, используемые для интерпретации соматических вариантов ([10], с изменениями)

Назначение баз данных	Базы данных	Адрес сайта
Популяционные базы данных	1000 Genomes Project	https://internationalgenome.org/
	NHLBI Exome Variant Server	http://evs.gs.washington.edu/EVS
	dbSNP	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp
	dbVar	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar
	GnomAD	https://gnomad.broadinstitute.org/about
Базы данных соматических вариантов в опухолях	Catalog of Somatic Mutations in Cancer	http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic
	My Cancer Genome	http://mycancergenome.org
	Personalized cancer therapy, MD Anderson Cancer Center	http://pct.mdanderson.org
	cBioPortal, Memorial Sloan Kettering Cancer Center	http://www.cbioportal.org
	IARC (WHO) TP53 mutation database	http://p53.iarc.fr
	Seshat	http://vps338341.ovh.net/
	International Cancer Genome Consortium (ICGC)	http://dcc.icgc.org
Базы данных соматических вариантов в опухолях детского возраста	PeCan	https://pecan.stjude.cloud/
	PedcBioPortal	https://pedcbioportal.org/
	Pedican	http://pedican.bioinfo-minzhao.org/
	Xena Browser	https://xenabrowser.net/
Референсные последовательности	NCBI Genome	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome
	RefSeqGene	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/rsg
	UCSC table browser	http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTables
	Ensemble BioMart	http://useast.ensembl.org/biomart/martview
Другие базы данных генетических вариантов, полезные для интерпретации соматических вариантов	ClinVar	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar
	Human Genome Mutation Database (HGMD)	http://www.hgmd.org
	Leiden Open Variation Database	http://www.lovd.nl
	dbNSFP	http://sites.google.com/site/jpopgen/dbNSFP
	Ensemble Variant Effect Predictor	http://www.ensembl.org/info/docs/tools/vep/index.html
	ClinicalTrials.gov	http://clinicaltrials.gov
	Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)	http://omim.org

• проект Treehouse Childhood Cancer Initiative, посвященный исследованию профилей экспрессии генов в образцах опухолей, соучредителем которого является Институт геномики в Санта-Круз (UC Santa Cruz Genomics Institute) [18];

• PedBrain tumor project — проект DKFZ в рамках Международного консорциума генома рака (International Cancer Genome Consortium, ICGC), направленный на изучение опухолей ЦНС детского возраста [19].

Базы данных, созданные по результатам проектов, находятся в свободном доступе для других исследовательских групп на веб-ресурсах St Jude/Washington University Pediatric Cancer Genomic Data Portal (PeCan) (<https://pecan.stjude.cloud/>), PedcBioPortal (<https://pedcbiportal.org/>), ICGC Data Portal (<https://dcc.icgc.org/>), Xena Browser (<https://xenabrowser.net/>) (табл. 2).

Однако ни один из вышеперечисленных веб-ресурсов не содержит полную информацию о результатах всех геномных исследований, проведенных в области детской онкологии: интернет-порталы содержат как пересекающиеся, так и уникальные наборы данных. Кроме того, на вышеперечисленных веб-ресурсах реализованы разные инструменты для работы с данными [20]. В результате, использование и сопоставление содержащейся в них информации оказывается весьма трудоемким. В связи с этим, на сегодняшний день основными источниками информации для анализа клинической значимости генетических вариантов, выявленных в детских опухолях, остаются базы данных, не специализированные на детской онкологии (COSMIC и др.). С учетом того, что опухоли детского возраста характеризуются «мутационным ландшафтом» (профилем), отличным от опухолей взрослых [16,17], необходимо дальнейшее развитие инициатив по обмену клиническими и геномными данными в области детской онкологии для более корректной интерпретации результатов генетических исследований.

Базы знаний соматических вариантов содержат регулярно обновляемую информацию об их клинической значимости, основанную на данных научной литературы [21]. Перечень некоторых баз знаний персонализированной онкологии (как со свободным, так и с ограниченным доступом), приведен в табл. 3.

Базы знаний способствуют систематизации информации о генетических вариантах и являются удобным инструментом для их классификации. В частности, во многих базах знаний (например, CIViC, OncoKB, PMKB) каждому генетическому варианту присваивается определенная категория или уровень значимости, причем в основе классификации часто лежат уникальные принципы, разработанные для конкретной базы знаний. При использовании баз знаний для оценки клинической

значимости вариантов возникают значительные затруднения, обусловленные неполным соответствием содержащейся в них информации, а также несогласованностью принципов классификаций [21]. Сопоставления классификаций некоторых баз знаний с классификацией AMP/ACMG/ASCO/CAP представлены в табл. 4.

С целью систематизации геномных данных был учрежден Всемирный альянс геномики и здоровья (The Global Alliance for Genomics and Health, GA4GH), целью которого является развитие подходов к безопасному обмену геномными и клиническими данными. Одним из основных проектов GA4GH является Консорциум интерпретации опухолевых генетических вариантов (The Variant Interpretation for Cancer Consortium, VICC, <https://cancervariants.org/>), в который входят эксперты по клинической интерпретации генетических вариантов. Основной задачей VICC является коллективная разработка стандартов обмена геномными данными и курируемой экспертами информации о клинической значимости генетических вариантов между специалистами в области онкологии. С этой целью при участии экспертов VICC 6 баз знаний (CGI, CIViC, JAX CKB, MolecularMatch, OncoKB и PMKB) были интегрированы в общую базу The Variant Interpretation for Cancer Consortium Meta-Knowledgebase (https://search.cancervariants.org/#*) [22], содержащую 19551 интерпретацию генетических вариантов, 15094 из которых были отнесены к категориям I-II согласно классификации AMP/ACMG/ASCO/CAP (май, 2020).

Базы данных герминальных генетических вариантов содержат информацию о патогенных герминальных вариантах, в том числе в генах, ассоциированных с наследственными опухолевыми синдромами (табл. 2). Базы данных герминальных генетических вариантов (например, The Human Gene Mutation Database, ClinVar) рекомендуется использовать не только при интерпретации результатов секвенирования образцов неизмененной ткани, но и при аннотировании и классификации вариантов с аллельной частотой близкой к 50% или 100%. Такие генетические варианты могут носить герминальный характер и, как следствие, не могут быть корректно интерпретированы на основе данного руководства до подтверждения их соматического статуса [10].

Помимо геномных баз данных, для оценки патогенности варианта *in silico* используют различные виды программного обеспечения (ПО), разработанного на основе специализированных алгоритмов. Некоторые из них прогнозируют влияние миссенс-мутаций в гене на структуру и функцию белкового продукта (например, PolyPhen2, SIFT). Алгоритмы предсказания патогенности генетических вариантов основаны на таких критериях, как:

- консервативность аминокислоты в данной позиции;
- степень физико-химического сходства аминокислот, между которыми произошла замена;
- функциональная роль аминокислоты в белке;
- наличие патогенных и доброкачественных замен в регионе, где расположен выявленный вариант.

Помимо этого, существуют алгоритмы для определения влияния генетического варианта в экзоне или интроне гена на сплайсинг пре-мРНК, например, Human Splice Finder HSF3.1 и SpliceAI.

Перечень алгоритмов и ПО, которые могут быть использованы для аннотации генетических вариантов типа миссенс-мутации и мутации, затрагивающие сайт сплайсинга, приведены в **табл. 5**. Обычно,

данные утилиты обладают относительно низкой специфичностью (около 60-80%) [10,14], в связи с чем уровень патогенности, полученный с помощью алгоритмов и ПО, не следует использовать в качестве основополагающего критерия для классификации генетического варианта, так как он может быть завышен [10].

Герминальные варианты, выявленные в ходе секвенирования

Секвенирование генетического материала образца опухоли предпочтительно проводить параллельно с секвенированием ДНК неизмененной ткани данного пациента: в этом случае, используя алгоритмы биоин-

Таблица 3

Базы знаний по интерпретации клинической значимости генетических вариантов ([21,22], с изменениями)

База знаний	Организация, учредившая базу знаний	Открытый доступ	Оценка терапевтической значимости	Актуальные клинические исследования с открытым набором	Данные об ассоциации варианта с синдромом предрасположенности к опухолям	Оценка диагностической значимости	Оценка прогностической значимости	Веб-сайт
Cancer Genome Interpreter (CGI)	Institute for Research in Biomedicine, IRB	Да	Да	Нет	Нет	Нет	Нет	https://www.cancergenomeinterpreter.org/home
Clinical Interpretation of Variants in Cancer (CIViC)	Washington University School of Medicine	Да	Да	Нет	Да	Да	Да	http://www.civicdb.org/
JAX Clinical Knowledgebase (JAX-CKB)	The Jackson Laboratory	Да	Да	Да	Да	Да	Да	https://ckb.jax.org/
Molecular Match (MMatch)	Molecular Match	Нет	Да	Да	Нет	Нет	Да	https://app.molecular-match.com/
OncoKB	Memorial Sloan Kettering Cancer Center	Да	Да	Нет	Нет	Нет	Нет	http://oncokb.org/#/
Precision Medicine Knowledgebase (PMKB)	Weill Cornell Medical College	Да	Да	Нет	Да	Да	Да	https://pmkb.weill.cornell.edu/
My Cancer Genome (MCG)	Vanderbilt University	Да	Да	Да	Нет	Да	Да	https://www.mycancergenome.org/
Personalized Cancer Therapy Database (PCT)	MD Anderson Cancer Center	Да	Да	Да	Да	Да	Да	https://pct.mdanderson.org/#/home
Database of Evidence for Precision Oncology (DEPO)	Washington University in St Louis	Да	Да	Нет	Нет	Нет	Нет	http://depo-dinglab.ddns.net/

форматического анализа, можно достоверно отличить соматические варианты опухоли от герминальных [10].

При отсутствии контрольных образцов конституциональной ткани пациента в лаборатории должны быть разработаны критерии, позволяющие предполагать герминальный или соматический статус варианта. Наиболее убедительным критерием является аллельная частота варианта (VAF) — доля прочтений со-

ответствующего варианта от общего числа прочтений для данного локуса [10].

Для герминального варианта VAF составляет приблизительно 0,5 (если вариант гетерозиготный) или 1 (для гомозиготного варианта). Для соматического варианта VAF в большинстве случаев принимает значение меньше 0,5, т.к. в образце опухоли обычно присутствуют клетки неизменной ткани паци-

Таблица 4

Соответствие принципов классификаций генетических вариантов в базах знаний с рекомендациями AMP/ACMG/ASCO/CAP [22]

Уровень достоверности (AMP/ACMG/ASCO/CAP)	CIViC	OncoKB	JAX-CKB	CGI	MMatch	PMKB
Уровень А, категория I	Уровень А	Уровень 1/2A/R1	Одобрено профессиональными рекомендациями/агентством FDA	Клиническая практика	Уровень 1A	Категория I
Уровень В, категория I	Уровень В	Уровень 3A	Фаза III	Клинические исследования III-IV фазы	Уровень 1B	-
Уровень С, категория II	Предиктивный уровень С	Уровень 2B/3B	Клинические исследования I- II фазы	Клинические исследования I-II фазы, клинические случаи	Уровень 2C	Категория II
Уровень D, категория II	Непредиктивный уровень С/уровень D/уровень E	Уровень 4	Доклинические исследования	Доклинические исследования	Уровень 2D	-

Таблица 5

Алгоритмы и ПО для прогнозирования влияния генетического варианта в белок-кодирующем участке или в области сайта сплайсинга на структуру и функцию белка [10]

Назначение алгоритма	Алгоритм/ПО	Адрес сайта
Миссенс-мутации	PolyPhen2	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2
	SIFT	http://sift.jcvi.org
	MutationAssessor	http://mutationassessor.org
	MutationTaster	http://mutationtaster.org
	PROVEAN	http://provean.jcvi.org/index.php
	CoVEC	https://sourceforge.net/projects/covec/files
	CADD	http://cadd.gs.washington.edu
	GERP++	http://mendel.stanford.edu/sidowlab/downloads/gerp/index.html
	PhyloP and PhastCons	http://compugen.bscb.cornell.edu/phast
Сайты сплайсинга	Human Splicing Finder	http://www.umd.be/HSF3
	MaxEntScan	http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentseq_scoreseq.html
	NetGene2	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2
	NNSplice	http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html
	SpliceAI	https://github.com/Illumina/SpliceAI
	GeneSplicer	http://www.cbcb.umd.edu/software/GeneSplicer/gene_spl.shtml

ента, которые не несут данный генетический вариант, а также из-за внутриопухолевой гетерогенности [10].

Если по результатам секвенирования был выявлен вариант в гене, ассоциированном с наследственным опухолевым синдромом, описанный в базах данных герминальных вариантов и/или встречающийся в научных статьях, посвященных синдромам предрасположенности к онкологическим заболеваниям, это может свидетельствовать в пользу того, что вариант носит герминальный характер. Однако, для некоторых генов (например, *TP53*, *PTEN*) описаны варианты и герминального, и соматического характера с одними и теми же геномными координатами [10].

Особенности клинического случая (в частности, ранний возраст постановки диагноза, двусторонняя или мультифокальная локализация опухоли, онкологические заболевания в семейном анамнезе) являются дополнительным основанием для предположения герминального характера варианта.

Интерпретация герминальных вариантов должна быть проведена в соответствии с руководствами по интерпретации результатов массового параллельного секвенирования (MPS): национальными [9], *ACMG/AMP* [4], *ESHG* [7]. Если в результате секвенирования ДНК из образца опухоли был найден предположительно герминальный вариант с высокой или потенциальной клинической значимостью, для подтверждения статуса варианта следует рекомендовать дополнительную верификацию в конституциональной ткани (буккальный эпителий, волосы, ногти, лейкоциты периферической крови и др.) с применением валидированного метода выявления герминальных мутаций — секвенирования по Сэнгеру [10].

Руководство по интерпретации и описанию результатов

Результаты высокопроизводительного секвенирования должны быть проанализированы специалистом в области молекулярной диагностики. Анализ должен быть произведен в контексте клинической картины заболевания с учетом всей известной значимой информации о данном клиническом случае. По форме и содержанию заключения должны быть составлены так, чтобы лечащий врач мог однозначно интерпретировать полученные результаты. Заключение должно содержать перечень вариантов категорий I и II, варианты с неясным клиническим значением, а также отрицательные результаты (в случае, если для данного онкологического заболевания характерен определенный клинически значимый вариант, не выявленный в образце) и невалидные результаты (в случае, если неко-

торые локусы не были проанализированы из-за низкого качества или количества прочтений) [10]. Более подробные рекомендации по форме заключения приведены ниже.

Методология. Заключение по результатам секвенирования должно включать:

- описание метода;
- ограничения методики;
- оценку качества секвенирования;
- минимальную глубину покрытия, т.е. пороговое значение покрытия, начиная с которого результаты секвенирования локуса считаются достоверными;
- список исследуемых генов с указанием экзонов и/или мутационных «горячих точек» (hot spots), если исследуемые гены были секвенированы не полностью;
- версию сборки генома, на который картировали прочтения.

Номенклатура вариантов. Генетические варианты в заключении должны быть обозначены в соответствии со стандартами HUGO Gene Nomenclature Committee [23]. Для каждого варианта рекомендуется указывать следующие параметры:

- геномные координаты;
- частоту альтернативного аллеля (VAF);
- глубину покрытия;
- тип варианта (нонсенс-, миссенс-мутация; мутация в участке сплайсинга; индел со сдвигом рамки считывания; индел без сдвига рамки считывания; мутация в регуляторном участке (например, промоторе); вариация числа копий; хромосомная перестройка).

Для белок-кодирующих генов в дополнение следует приводить следующие параметры:

- версию референсного транскрипта (например, NM_004333.4);
- номер экзона или интрона;
- координаты на уровне белкового продукта гена

(согласно рекомендациям The Human Genome Variation Society (HGVS) (например, *BRAF* p.V600E).

Химерные гены должны обозначаться с перечислением обоих генов-партнеров через символ «/» (например, химерный ген *EWSR1/FLI1*). Вариации числа копий следует приводить в формате таблицы, в которой указано название гена, его координаты, а также число дополнительных или утраченных копий [10].

Классификация. Все обнаруженные генетические варианты рекомендуется классифицировать по категориям клинической значимости I-IV (рис. 1, табл. 1). При этом в заключении рекомендуется приводить только варианты категорий I-III в порядке убывания клинической значимости (с обязательным указанием категории). Генетические варианты категории IV

(доброкачественные и вероятно доброкачественные) не должны быть включены в заключение по результатам секвенирования [10].

Для вариантов с высокой и потенциальной клинической значимостью (категории I и II) рекомендуется приводить пояснительные комментарии. Комментарии могут включать следующую информацию:

- описание диагностической, прогностической или предиктивной значимости генетического варианта для конкретного типа опухоли;
- влияние варианта на изменения в сигнальных путях и метаболизме опухолевых клеток;
- частоту встречаемости варианта в опухолях данного типа.

При обнаружении терапевтически значимого варианта рекомендации по лечению должны:

- основываться на данных с высоким уровнем доказательности;
- быть значимыми для онкологического заболевания пациента;
- содержать предупреждение о том, что данные рекомендации основаны только на результатах секвенирования и должны быть интерпретированы лечащим врачом в комплексе с другими факторами, в том числе клиническими, морфологическими, молекулярно-генетическими.

Рекомендации по включению в конкретные клинические исследования не должны быть отражены в тексте заключения по результатам высокопроизводительного секвенирования [10].

Отрицательные результаты. Если при данном онкологическом заболевании существуют терапевтически значимые варианты категории IA, то их отсутствие в образце опухоли пациента также должно быть отражено в заключении по результатам генетического тестирования [10].

Невалидные результаты для определённых локусов. Если достоверность полученных результатов секвенирования ставится под сомнение (из-за низкого содержания опухолевых клеток в образце, плохого качества биоматериала или низкого качества/недостаточного количества прочтений), это должно быть указано в заключении. В частности, необходимо указать все гены и мутационные «горячие точки» (hot spots), которые не удалось проанализировать [10].

Потенциально герминальные варианты. В заключении по результатам секвенирования рекомендуется указывать критерии, на основании которых предполагается герминальный характер варианта, такие как:

- значение VAF, близкое к 0,5 или 1;
- ассоциация варианта с генетическим синдромом предрасположенности к опухоли;

- особенности клинического течения, свидетельствующие о развитии опухоли в контексте одного из синдромов предрасположенности к онкологическим заболеваниям.

Если выявленный генетический вариант соответствует данным критериям, то заключение должно содержать рекомендацию по проведению генетического исследования неопухолевого биоматериала пациента для установления герминального или соматического статуса варианта [10].

Заключение по результатам секвенирования генетического материала конституциональной ткани можно представить в виде 1) приложения к исходному заключению; 2) отдельного заключения по результатам секвенирования ДНК из неопухолевой ткани (результаты по секвенированию ДНК из ткани опухоли должны быть приведены в приложении); 3) обобщенного заключения по результатам секвенирования как конституционального, так и опухолевого материала пациента, с двумя отдельными приложениями для герминальных и соматических вариантов [10].

Примеры классификации генетических вариантов в ДНК солидных опухолей детского возраста согласно рекомендациям AMP/ACMG/ASCO/CAP

В большинстве клинических случаев детских онкологических заболеваний наибольшим клиническим значением обладают варианты в генах, белковые продукты которых являются компонентами следующих систем:

- 1) участники сигнальных путей:
 - RAS-MAPK (гены *NF1*, *BRAF*, *NRAS*, *HRAS*);
 - PI3K-AKT-mTOR (гены *PIK3CA*, *PTEN*, *TSC1*, *TSC2*);
 - WNT (гены *CTNNB1*, *APC*);
 - NOTCH (гены *NOTCH1/2*);
 - SHH (гены *PTCH1*, *SMO*, *SUFU*).
- 2) рецепторные тирозинкиназы (гены *ALK*, *FGFR1*, *NTRK1/2/3*, *PDGFRA/B*, *EGFR*, *KIT*, *MET*);
- 3) регуляторы клеточного цикла (гены *TP53*, *RB1*, *CDKN2A*, *CDKN2B*);
- 4) белки, участвующие в эпигенетической регуляции экспрессии генов (гены *H3F3A*, *ATRX*, *SMARCA4*, *SMARCB1*);
- 5) транскрипционные факторы (гены *MYC*, *ZIC1*, *EWSR1*);
- 6) белки системы репарации (гены *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*) [16,24].

Ниже приведены примеры клинически значимых вариантов и их классификация на основании критериев, приведенных в **табл. 1**.

Атипическая тератоидно-рабдоидная опухоль – инактивирующая мутация в гене SMARCB1

Белковый продукт гена-онкосупрессора *SMARCB1* является компонентом комплекса ремоделирования хроматина SWI/SNF, который регулирует экспрессию генов путем изменения локализации нуклеосом. Белок *SMARCB1* подавляет экспрессию генов, кодирующих компоненты различных сигнальных путей, в частности, p16-RB, WNT и SHH [25].

Вариант гена *SMARCB1*, приведенный в **табл. 6**, отсутствует в популяционных базах данных (gnomAD, 1000 Genomes Project, Exome Variant Server). Инактивирующие варианты (loss-of-function) в данном гене ассоциированы с онкологическими заболеваниями [27].

Мутации с потерей функции в гене *SMARCB1* (нонсенс мутации, инсерции и делеции со сдвигом рамки считывания) согласно данным COSMIC составляют 31% (281/919) от выявленных в нем генетических вариантов (май, 2020). Приведенный генетический вариант присутствует в базе данных COSMIC (COSV54093216), причем в 64% (14/22) случаев данный вариант был выявлен в образцах АТРО (май, 2020).

АТРО являются наиболее распространенными злокачественными новообразованиями ЦНС среди детей в возрасте до 6 месяцев и характеризуются биаллельной инактивацией гена *SMARCB1* (реже – *SMARCA4*), которая приводит к значительным эпигенетическим изменениям [28]. В 25-35% случаев инактивирующие варианты носят герминальный характер [29]. По этой причине оценка клинической значимости генетических вариантов *SMARCB1* (в особенности с частотой альтернативного аллеля около 50% или 100%) может проводиться согласно руководству AMP/ACMG/ASCO/CAP только после подтверждения их соматического статуса.

Приведенный генетический вариант имеет подтвержденный соматический статус [26].

Согласно классификации опухолей ЦНС Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) 2016 года, инактивирующие генетические варианты *SMARCB1* или, в редких случаях, *SMARCA4* являются основными молекулярно-генетическими маркерами АТРО, и их выявление необходимо для подтверждения диагноза [30], что позволяет отнести данный вариант к категории высокой диагностической значимости (IA).

Нейробластома – миссенс-мутация ALK R1275Q

Ген *ALK* кодирует рецепторную тирозинкиназу, которая относится к суперсемейству инсулиновых рецепторов. В результате связывания ALK с лигандом могут активироваться различные сигнальные пути: JAK-STAT, PI3K-AKT-mTOR [31].

Вариант гена рецепторной тирозинкиназы *ALK* R1275Q (**табл. 7**) отсутствует в популяционных базах данных (gnomAD, 1000 Genomes Project, Exome Variant Server). В то же время он присутствует в базе данных соматических вариантов COSMIC: 100 из 105 зарегистрированных случаев относятся к образцам нейробластомы (по данным на май 2020 года). Утилиты для прогнозирования влияния генетического варианта на функцию белкового продукта свидетельствуют о патогенности варианта: согласно предсказанию MutationTaster генетический вариант относится к группе «Disease causing» (prob value=1), SIFT относит вариант к категории «Damaging» (score=0,02).

Активирующая мутация *ALK* R1275Q встречается в половине наследственных и в одной трети спорадических случаев нейробластомы [33]. Если частота данного аллельного варианта близка к 50% или 100%, оценка клинического значения при использовании рекомендаций AMP/ACMG/ASCO/CAP не может быть проведена до тех пор, пока соматический характер варианта не будет подтвержден. Нижеприведенный анализ

Таблица 6

Оценка клинической значимости инактивирующего варианта *SMARCB1* у пациента детского возраста с диагнозом атипическая тератоидно-рабдоидная опухоль (АТРО)

Ген	Транскрипт	Вариант, координаты		Экзон/интрон	Тип варианта	Частота альтернативного аллеля	ID dbSNP	Диагноз	Клиническая значимость	Источник
		Геном (hg19)	CDS, белок							
SMARCB1	NM_003073.5	chr22:24167427 G>T	c.601C>T G271*	Ex 7	Нонсенс	~72%	-	АТРО	Высокая диагностическая (категория IA)	[26]

клинической значимости относится к варианту *ALK* R1275Q с подтвержденным соматическим статусом.

Согласно исследованию Bresler S. C. с соавт., в ходе которого было проведено генетическое тестирование 1596 образцов нейробластомы, данный вариант ассоциирован с низкой выживаемостью пациентов групп промежуточного и высокого риска [34]. Кроме того, Ackermann S. с соавт. было показано негативное влияние данного генетического варианта на прогноз пациентов с нейробластомой в сочетании с активацией механизмов поддержания длины теломерных повторов [35]. Таким образом по результатам приведенных исследований, генетический вариант *ALK* p.R1275Q является прогностически значимым (категория IIC). В том случае, если в дальнейших исследованиях будет обнаружена активация одного из механизмов поддержания длины теломер (структурная перестройка в области промотора гена *TERT*, сопровождающаяся его повышенной экспрессией, амплификация гена *MYCN* или активация альтернативного *TERT*-независимого пути удлинения теломер), данный вариант будет классифицирован как мутация с высокой прогностической значимостью (категория IB) [35].

По результатам клинических исследований агентство FDA одобрило использование *ALK*-ингибиторов кризотиниба, церитиниба, бригатиниба и алектиниба для лечения *ALK*-позитивного немелкоклеточного рака легкого [36]. На сегодняшний день наличие активирующей точечной мутации в гене *ALK* является критерием для включения во многие клинические исследования ингибиторов *ALK* как при нейробластоме, так и при других онкологических заболеваниях (NCT00939770, NCT01121588, NCT02650401, NCT02780128, NCT03126916 и др.).

В связи с этим, генетический вариант *ALK* R1275Q относится к терапевтически значимым (категория IIC).

Саркома Юинга – инактивирующая мутация в гене STAG2

Белковый продукт гена *STAG2* является частью когезинового комплекса, который удерживает сестринские хроматиды после репликации. *STAG2* также не-

обходим для стабилизации репликативной вилки [37]. Помимо этого, было показано, что *STAG2* участвует в регуляции экспрессии генов путем взаимодействия с транскрипционными факторами [38].

Данный вариант гена *STAG2* (табл. 8) отсутствует в популяционных базах данных (gnomAD, 1000 Genomes Project, Exome Variant Server).

Некоторые герминальные варианты *STAG2* ассоциированы с редким генетическим синдромом Mullegama-Klein-Martinez, OMIM # 301022 [39], который характеризуется задержкой физического и интеллектуального развития. При этом, злокачественные новообразования при данном генетическом синдроме не были описаны.

Инактивирующие варианты в гене *STAG2* (нонсенс мутации, инсерции и делеции со сдвигом рамки считывания) были выявлены в 620 образцах опухолей, согласно данным COSMIC, 54 из которых относились к образцам саркомы Юинга (по данным на май 2020 года). Известно, что драйверным молекулярно-генетическим событием в онкогенезе саркомы Юинга является перестройка гена *EWSR1*, а роль генетических вариантов в гене *STAG2* в патогенезе данной опухоли является предметом дискуссии [40–43].

Мутации и перестройки в гене *STAG2* встречаются в 17% сарком Юинга [40]. По результатам исследований, инактивация гена *STAG2* при данной опухоли ассоциирована с неблагоприятным прогнозом [41,42]. Однако, Bahrami A. с соавт. показали, что инактивация *STAG2* не имеет индивидуального прогностического значения, а может свидетельствовать о неблагоприятном прогнозе только совместно с миссенс-мутациями в гене *TP53* [43]. В связи с этим, инактивирующие варианты гена *STAG2* имеют низкую прогностическую значимость уровня IID.

В исследовании Mondal G. с соавт. было показано, что инактивация гена *STAG2* увеличивает чувствительность к ингибиторам топоизомеразы, поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP) и и протеинкиназы ataxia telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) в клеточных линиях глиобластомы и саркомы Юинга [37]. Однако,

Таблица 7

Оценка клинической значимости миссенс-мутации *ALK* R1275Q у пациента детского возраста с диагнозом нейробластома

Ген	Транскрипт	Вариант, координаты		Экзон/интрон	Тип варианта	Частота альтернативного аллеля	ID dbSNP	Диагноз	Клиническая значимость	Источник
		Геном (hg19)	CDS, белок							
<i>ALK</i>	NM_004304.5	chr2: 29432664 C>T	c.3824G>A R1275Q	Ex 25	Миссенс	~73%	rs113994087	Нейробластома	Средняя терапевтическая (категория IIC)	[32]

наличие инактивирующего варианта *STAG2* не является критерием включения в клинические исследования для пациентов с саркомой Юинга согласно данным ClinicalTrials.gov (май, 2020). Таким образом, инактивирующие варианты *STAG2* относятся к категории низкой терапевтической значимости.

Интерпретация результатов высокопроизводительного секвенирования ДНК опухолей у детей: предшествующий опыт и дальнейшие перспективы

По результатам множества клинических исследований, посвященных молекулярному профилированию детских опухолей, была продемонстрирована целесообразность внедрения методик высокопроизводительного секвенирования в клиническую практику в детской онкологии. В данных исследованиях клинически значимые варианты были выявлены в образцах 30 – 90% пациентов [24].

В табл. 9 приведена основная информация о структуре некоторых клинических исследований в этой области, проведенных за период 2015 – 2019 гг. В большинство исследований были включены пациенты, у которых был диагностирован рецидив либо наблюдалась прогрессия заболевания на фоне проводимой терапии [12,44–51]. Молекулярное профилирование опухолей проводили с использованием различных методик: высокопроизводительного секвенирования таргетных панелей генов, полноэкзомного секвенирования (WES) и полногеномного секвенирования (WGS). Помимо этого, в некоторых исследованиях проводили анализ вариации числа копий генов методом сравнительной геномной гибридизации (CGH) и детекцию химерных транскриптов методом секвенирования РНК.

Только в одном из приведенных исследований классификация соматических генетических вариантов проводилась согласно рекомендациям AMP/ACMG/

ASCO/CAP [1]. Большинство исследовательских групп руководствовалось собственными критериями оценки клинической значимости генетических вариантов, разработанными в ходе проводимых проектов. Помимо этого, результаты секвенирования были предоставлены в разном формате; по этой причине их трудно сопоставить между собой.

Так, в ряде исследований [45,49–52] все клинически значимые генетические варианты выделяли в одну группу без ранжирования: в дальнейшем каждый из них обсуждался междисциплинарной комиссией для оценки возможности корректировки терапии по результатам генетического тестирования.

В некоторых исследованиях генетические варианты были интерпретированы согласно одним и тем же критериям без определения их статуса (соматического или герминального) [53, 54].

Отдельные исследования фокусировались исключительно на генетических вариантах, имеющих терапевтическое значение. Прогностические и диагностические варианты были вынесены за рамки классификации и рассматривались отдельно [47, 48].

Таким образом, внедрение руководства AMP/ACMG/ASCO/CAP в практику интерпретации результатов молекулярного профилирования опухолей могло бы значительно упростить систематизацию результатов клинических исследований.

Однако, несмотря на наличие исчерпывающих рекомендаций, классификация некоторых вариантов согласно руководству AMP/ACMG/ASCO/CAP может быть субъективной. В особенности это касается прогностически и диагностически значимых вариантов уровней IV и IC: отнесение варианта к одному из этих уровней зависит от статистической мощности исследований, подтверждающих их клиническое значение, причем критерии оценки статистической мощности не приводятся в руководстве [10,14].

Кроме того, в руководстве не приведены рекомендации по подбору минимального порогового значения

Таблица 8

Оценка клинической значимости инактивирующего варианта *STAG2* у пациента детского возраста с диагнозом саркома Юинга

Ген	Транскрипт	Вариант, координаты		Экзон/интрон	Тип варианта	Частота альтернативного аллеля	ID dbSNP	Диагноз	Клиническая значимость	Источник
		Геном (hg19)	CDS, белок							
<i>STAG2</i>	NM_001042749.2	chrX:123196815 dupT	c.1701dupT A568Cfs*20	Ex18	Инсерция со сдвигом рамки считывания	~79%	—	Саркома Юинга	Низкая прогностическая (категория ID) Низкая предиктивная (категория IID)	[1]

Таблица 9

Молекулярно-генетические исследования опухолей детского возраста

Источник	Тип опухоли	Количество пациентов (проанализировано/зарегистрировано)	Возраст	Генетическое тестирование	Определение химерных генов	Определение вариаций числа копий	Секвенирование ДНК неизмененной ткани	Метод классификации	Клинически значимые генетические варианты	Доля пациентов с клинически значимыми генетическими вариантами
[12]	Солидные опухоли/опухоли ЦНС; рецидив или резистентность к терапии	53/55	≤21 (медиана 10,7)	Таргетная панель (экзоны 381 генов и интроны 22 генов)	Нет	Да (по глубине секвенирования)	Нет	Собственный	Варианты с любой терапевтической значимостью	36,4% (20/53)
[44]	Солидные опухоли/опухоли ЦНС; рецидив или резистентность к терапии	84/98	94% пациентов <18 (медиана 9,9)	2 таргетные панели: 1) мутационные горячие точки в 50 генах 2) экзоны 159 генов	Нет	Нет	Да (40/84)	[58]	Варианты с любой терапевтической, прогностической, диагностической значимостью	36,9% (31/84), 19% (16/84) получили клинические рекомендации или информацию о прогнозе
[1]	Солидные опухоли/опухоли ЦНС/гемобласты	367 (147 — солидные опухоли; 96 — опухоли ЦНС; 124 — гемобласты)	≤26 (среднее 8,6)	2 таргетные панели: 1) солидные опухоли и опухоли ЦНС; экзоны 237 генов 2) гемобласты: экзоны 99 генов SNP генотипирование	Да (таргетная панель)	Да (SNP генотипирование)	Нет	[10]	Варианты категорий I-II согласно классификации, рекоммендованной AMP/CAP/ASCO/ACMG (терапевтическая, прогностическая, диагностическая значимость)	78,7% (289/367) Солидные опухоли: 62,6% (92/147) Опухоли ЦНС: 90,6% (87/96) Гемобласты: 88,7% (110/124) *включая выявленные химерные гены и вариации числа копий
[45]	Солидные опухоли/опухоли ЦНС/гемобласты; рецидив или резистентность к терапии	48	≤17 (медиана 9,5)	Полноэкзомное секвенирование РНК; Сравнительная геномная гибридизация	Да (секвенирование РНК)	Да (Сравнительная геномная гибридизация)	Да	Нет (клинически значимые/незначимые варианты)	Варианты с любой терапевтической, прогностической, диагностической значимостью	68,8% (33/48)

Продолжение табл. 9 см. на стр. 18.

Молекулярно-генетические исследования опухолей детского возраста

Источник	Тип опухоли	Количество пациентов (проанализировано/зарегистрировано)	Возраст	Генетическое тестирование	Определение химерных генов	Определение вариаций числа копий	Секвенирование ДНК неинвазивной ткани	Метод классификации	Клинически значимые генетические варианты	Доля пациентов с клинически значимыми генетическими вариантами
[47]	Солидные опухоли; группа высокого риска, рецидив или резистентность к терапии	89/100	≤30 (медиана 13,4)	Масс-спектрометрическое генотипирование (мутационные горячие точки в 41 гене); Таргетная панель (экзоны 275 генов, интроны 30 генов); Сравнительная геномная гибридизация	Да	Да (Сравнительная геномная гибридизация)	Да (несколько образцов)	Собственный	Варианты с любой терапевтической значимостью	48,3% (43/89) Клинические рекомендации: 34,8% (31/89)
[53]	Опухоли ЦНС; первичные опухоли/рецидив	85/88	≤22 (медиана 10)	Таргетная панель (экзоны 262 генов и некоторые интроны)	Да (таргетная панель)	Да (по глубине секвенирования)	Нет	Собственный	Варианты с любой терапевтической, прогностической, диагностической значимостью (совместная классификация терминальных и соматических вариантов)	80,0% (68/85)
[59]	Солидные опухоли/опухоли ЦНС/гемобласты	78 (26 – солидные опухоли; 16 – опухоли ЦНС; 36 – гемобласты)	Не указан	Полногеномное секвенирование; Полноэкзомное секвенирование; Секвенирование РНК	Да (по глубине секвенирования)	Да	[4] (с изменениями)	Да (секвенирование РНК)	Патогенные/вероятно патогенные варианты (согласно рекомендациям ACMG для интерпретации герминальных вариантов; с изменениями)	Образцы всех пациентов содержали заранее известные генетические варианты, выявленные другими методами; 156 впервые выявленных патогенных/вероятно патогенных вариантов (с соматическим и герминальным статусом)

Продолжение табл. 9 см. на стр. 19.

Продолжение таблицы 9

Молекулярно-генетические исследования опухолей детского возраста

Источник	Тип опухоли	Количество пациентов (проанализировано/зарегистрировано)	Возраст	Генетическое тестирование	Определение химерных генов	Определение вариаций числа копий	Секвенирование ДНК неизмененной ткани	Метод классификации	Клинически значимые генетические варианты	Доля пациентов с клинически значимыми генетическими вариантами
[48]	Солитарные опухоли/опухоли ЦНС/гемобластозы; рецидив/прогрессия/первичная опухоль без стандартной терапии	52/57	≤40 (медиана 13)	Полногеномное секвенирование с низким покрытием; Полноэкзомное секвенирование; Секвенирование РНК	Да (секвенирование РНК)	Да (по глубине секвенирования)	Да	Собственный (Категории 1-7 терапевтической значимости)	Варианты с терапевтической значимостью (средней и выше)	50% (26/52) – категории 1-4
[46]	Солитарные опухоли/опухоли ЦНС/гемобластозы; рецидив/резистентность к терапии/первичная опухоль без стандартной терапии	62/84	≤21 (среднее 10,1)	Полноэкзомное секвенирование; Секвенирование РНК	Да (секвенирование РНК)	Да (по глубине секвенирования)	Да	Собственный	Варианты с любой терапевтической, прогностической, диагностической значимостью	87% (54/62)
[60]	Солитарные опухоли/опухоли ЦНС; до терапии	121/150	≤17 (среднее 7,4)	Полноэкзомное секвенирование	Нет	Нет	Да	Собственный	Варианты с любой терапевтической, прогностической, диагностической значимостью	27% (33/121) – соматические варианты
[61]	Солитарные опухоли/опухоли ЦНС	209/255	≤24	2 таргетные панели: 1) 78 генов 2) 91 ген Сравнительная геномная гибридизация	Нет	Да (Сравнительная геномная гибридизация)	Да	Классификация ОпсоКВ, версия 1 [62]	Варианты с любой терапевтической значимостью	51% (107/209)

Продолжение табл. 9 см. на стр. 20.

Молекулярно-генетические исследования опухолей детского возраста

Источ-ник	Тип опухоли	Количество пациентов (проанализиро-вано/зарегистриро-вано)	Возраст	Генетическое тестирование	Опреде-ление хи- мерных генов	Определе- ние вариаций числа копий	Секвени- рование ДНК не- изменен- ной ткани	Метод класси- фикации	Клинически значимые генетические варианты	Доля пациентов с клинически значимыми генетическими вариантами
[54]	Опухоли ЦНС	203 (115/203 – таргетная панель)	≤26	Таргетная панель (экзоны 300 генов); Сравнительная геномная гибридизация	Да (таргетная панель)	Да (Сравнительная геномная гибридизация)	Нет	Собствен- ный	Варианты с любой терапев- тической, прогностиче- ской, диа- гностической значимостью (совместная классификация терминальных и соматических вариантов)	56% (64/115)
[49]	Солитарные опухоли/ опу- хо- ли ЦНС; рецидив/ре- зистентность к терапии/ плохой прогноз	58/60 (52/58 – таргетная панель 1; 2/58 –таргетная панель 2)	≤22 (медиана 13)	Таргетная панель (экзоны 50 генов) Сравнительная геномная гибридизация	Нет	Да (Сравнительная геномная гибридизация)	Нет	Нет (клиниче- ски значи- мые/не- значимые варианты)	Варианты с любой тера- певтической значимостью	39,6% (23/58) – по результатам NGS и сравни- тельной геномной гибридизации
[50]	Солитарные опухоли/ опу- хо- ли ЦНС; рецидив/ре- зистентность к терапии/ плохой прогноз	69/75	≤25 (медиана 10,9)	Полноэкзомное секвенирование; таргетная панель (экзоны 75 генов); Секвенирование РНК; Сравнительная геномная гибридизация	Да (секвени- рование РНК)	Да (Сравнительная геномная гибридизация)	Да	Нет (клиниче- ски значи- мые/не- значимые варианты)	Варианты с любой тера- певтической значимостью	60,9% (42/69) 47,8% – по результатам NGS
[52]	Солитарные опухоли/ опу- хо- ли ЦНС	101	94% - <18 (медиана 8,0)	Полноэкзомное секвенирование; Секвенирование РНК; Сравнительная геномная гибридизация	Да (секвени- рование РНК)	Да (Сравнительная геномная гибридизация)	Да	Нет (клиниче- ски значи- мые/не- значимые варианты)	Варианты с любой тера- певтической значимостью	38% (38/101) – по результатам полноэкзомного секвенирования

Продолжение табл. 9 см. на стр. 21.

Молекулярно-генетические исследования опухолей детского возраста

Источник	Тип опухоли	Количество пациентов (проанализировано/зарегистрировано)	Возраст	Генетическое тестирование	Определение химерных генов	Определение вариаций числа копий	Секвенирование ДНК измененной ткани	Метод классификации	Клинически значимые генетические варианты	Доля пациентов с клинически значимыми генетическими вариантами
[51]	Солитарные опухоли ЦНС/гемобласты; рецидив/резистентность к терапии/редкое онкологическое заболевание	91/102	≤22 (медиана 11,5)	Полноэкзомное секвенирование; Секвенирование РНК	Да (секвенирование РНК)	Да (по глубине секвенирования)	Да	Нет (клинически значимые/незначимые варианты)	Варианты с любой терапевтической, прогностической, диагностической значимостью	46,1% (42/91)

аллельной частоты VAF, начиная с которого генетический вариант может считаться значимым при выборе стратегии лечения.

Помимо этого, один и тот же генетический вариант при определенном онкологическом заболевании может быть отнесен к разным категориям клинической значимости в зависимости от «генетического контекста». Примером может служить указанный выше вариант *ALK* p.R1275Q. Данная замена в сочетании с перестройками промоторной области гена *TERT*, приводящими к его гиперэкспрессии, обуславливает крайне агрессивное течение нейробластомы, а в отсутствии активации механизмов удлинения теломера не влияет на выживаемость пациентов [35].

Несмотря на некоторые недостатки, рекомендации AMP/ACMG/ASCO/CAP остаются современным стандартом классификации соматических вариантов. Снижение субъективности оценки клинической значимости может быть достигнуто путем создания перечней прогностически, диагностически и терапевтически значимых вариантов уровней А и В, в том числе, для опухолей детского возраста. Аналогичная инициатива была реализована в **биологической** классификации соматических вариантов в солидных опухолях и гемобластозах, разработанной экспертами ComPerMed (Бельгия) [14]. Существование актуальных перечней клинически значимых вариантов позволило бы унифицировать оценку значимости ключевых генетических маркеров, а также решить проблему разграничения вариантов категорий IB и IIC.

На сегодняшний день существует несколько крупномасштабных клинических исследований, в которых проводится молекулярное профилирование опухолей детского возраста, например, Individualized Therapy for Relapsed Malignancies in Childhood (INFORM, Германия), Individualized Therapies for Children with Relapsed/Refractory Malignancies using Molecular Profiling (ITHER, Нидерланды), Molecular Profiling for Pediatric and Young Adult Cancer Treatment Stratification (MAPPY-ACTS, Франция), Pediatric Molecular Analysis for Therapy Choice (Pediatric MATCH, США), Precision Oncology for Young People Program (PROFYLE, Канада), Zero Childhood Cancer (ZERO, Австралия) [24, 56]. Результаты молекулярного профилирования рассматриваются междисциплинарной комиссией экспертов (molecular tumor board). В случае выявления потенциальных терапевтических мишеней пациенты могут быть включены в клинические исследования в области персонализированной терапии опухолей детского возраста. Клинические исследования в области персонализированной медицины могут быть организованы как в формате «basket» (терапевтический агент или их комбинация на-

значается вне зависимости от типа опухоли на основании наличия определенного генетического маркера), так и в формате «umbrella» (пациенты с определенным диагнозом получают различное лечение, назначенное на основании выявленных генетических маркеров).

Примерами текущих исследований типа «umbrella» могут служить Next Generation Personalized Neuroblastoma Therapy (нейробластома, NCT02780128), Iobenguane I-131 or Crizotinib and Standard Therapy in Treating Younger Patients With Newly-Diagnosed High-Risk Neuroblastoma or Ganglioneuroblastoma (нейробластома, NCT03126916), A Clinical and Molecular Risk-Directed Therapy for Newly Diagnosed Medulloblastoma (медуллобластома, NCT01878617), Biological Medicine for Diffuse Intrinsic Pontine Glioma (DIPG) Eradication (диффузная глиома ствола головного мозга, NCT02233049) [56].

Одним из крупнейших современных исследований типа «basket» является Pediatric MATCH (Molecular Analysis for Therapeutic Choice; NCT03155620), организованный Детской онкологической группой (COG) при поддержке Национального института онкологии (NCI). В отличие от многих исследований типа «basket», Pediatric MATCH включает в себя молекулярное профилирование опухоли. В исследование могут быть включены пациенты до 21 года с рецидивом или резистентностью к стандартной терапии при солидных опухолях, неходжкинской лимфоме или гистиоцитозе [57]. Пациент может быть включен в одну из групп исследования, если в ДНК опухоли был выявлен соматический вариант, который является потенциальной мишенью одного из исследуемых таргетных препаратов [57].

Подбор молекулярных мишеней и таргетных препаратов для исследования Pediatric MATCH проводился комитетом Pediatric MATCH Target and Agent Prioritization (TAP), в который входят представители из COG, NCI и FDA. Приоритет создания групп клинического исследования («мишени-препарат») был основан на таких параметрах, как частота генетических вариантов в гене-мишени в детских опухолях; возможность обнаружения генетического варианта при молекулярно-генетическом тестировании Pediatric MATCH; уровень доказательности клинических и экспериментальных данных, свидетельствующих об эффективности таргетной терапии при наличии данного генетического варианта и др. Для каждой группы исследования заранее определялся перечень соматических вариантов в ДНК опухоли, которые являются критериями включения в группу [57].

Наиболее обширным клиническим исследованием типа «basket» в области таргетной терапии детских опухолей в Европе является The European Proof-of-Concept

Therapeutic Stratification Trial of Molecular Anomalies in Relapsed or Refractory Tumors in Children (ESMART, NCT02813135). В него могут быть включены пациенты до 18 лет с солидными опухолями или лейкозами, у которых произошел рецидив или наблюдалась резистентность к стандартной терапии. Для включения пациент должен предоставить результаты генетического тестирования ДНК опухоли (полноэкзомного или полногеномного секвенирования, опционно — секвенирования РНК), которые могут быть получены в одном из европейских исследований (например, MAPPYACTS, INFORM, IThER). В отличие от Pediatric MATCH, большинство групп исследования ESMART получают не монотерапию, а комбинацию двух или более таргетных терапевтических препаратов или таргетную терапию совместно со стандартной цитотоксической химиотерапией [24,57].

В перспективе использование рекомендаций AMP/ACMG/ASCO/CAP может способствовать созданию актуального перечня генетических вариантов, обладающих высокой клинической значимостью, унификации интерпретации результатов молекулярного профилирования и улучшению взаимодействию между исследовательскими группами.

Литература

1. Surrey L.F., MacFarland S.P., Chang F., Cao K., Rath K.S., Akgen G.T., et al. Clinical utility of custom-designed NGS panel testing in pediatric tumors. *Genome Med.* 2019 May 28;11(1):32.
2. Morganti S., Tarantino P., Ferraro E., D'Amico P., Duso B.A., Curi-gliano G. Next Generation Sequencing (NGS): A Revolutionary Technology in Pharmacogenomics and Personalized Medicine in Cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1168:9–30.
3. Morash M., Mitchell H., Beltran H., Elemento O., Pathak J. The Role of Next-Generation Sequencing in Precision Medicine: A Review of Outcomes in Oncology. *J Pers Med.* 2018 Sep 17;8(3).
4. Richards S., Aziz N., Bale S., Bick D., Das S., Gastier-Foster J., et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet.* 2015 May; 17(5):405–24.
5. Rehman H.L., Bale S.J., Bayrak-Toydemir P., Berg J.S., Brown K.K., Deignan J.L., et al. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet.* 2013 Sep;15(9):733–47.
6. Aziz N., Zhao Q., Bry L., Driscoll D.K., Funke B., Gibson J.S., et al. College of American Pathologists' laboratory standards for next-generation sequencing clinical tests. *Arch Pathol Lab Med.* 2015 Apr;139(4):481–93.
7. Matthijs G., Souche E., Alders M., Corveleyn A., Eck S., Feenstra I., et al. Guidelines for diagnostic next-generation sequencing. *Eur J Hum Genet EJHG.* 2016 Oct;24(10):1515.
8. Use of standards in FDA regulatory Oversight of Next Generation Sequencing-Based In Vitro Diagnostics used for diagnosing Germline Diseases (Draft Guidance) [Internet]. *SciPol.org.* 2016 [cited 2020 May 20]. Available from: <https://scipol.duke.edu/track/use-standards-fda-regulatory-oversight-next-generation-sequencing-based-vitro-diagnostics-used>

9. Рыжкова О., Кардымон О., Прохорчук Е., Коновалов Ф., Масленников А., Степанов В., и др. Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018, версия 2). Медицинская Генетика. 2019;18(2):3–23.
10. Li M.M., Datto M., Duncavage E.J., Kulkarni S., Lindeman N.I., Roy S., et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn JMD*. 2017 Jan;19(1):4–23.
11. Abbas T., Keaton M.A., Dutta A.. Genomic instability in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013 Mar 1;5(3):a012914.
12. Lee J.W., Kim N.K.D., Lee S.H., Cho H.W. Ma Y., Ju H.Y., et al. Discovery of actionable genetic alterations with targeted panel sequencing in children with relapsed or refractory solid tumors. *PLoS One*. 2019;14(11):e0224227.
13. Evidence Repository - Clinical Genome Resources [Internet]. [cited 2020 May 27]. Available from: <https://erepo.clinicalgenome.org/evrepo/ui/interpretation/b172bcbe-5c5f-4ba5-9ba2-482b4e1e357d>
14. Froyen G., Le Mercier M., Lierman E., Vandepoole K., Nollet F., Boone E., et al. Standardization of Somatic Variant Classifications in Solid and Haematological Tumours by a Two-Level Approach of Biological and Clinical Classes: An Initiative of the Belgian ComPerMed Expert Panel. *Cancers*. 2019 Dec 16;11(12).
15. Downing J.R., Wilson R.K., Zhang J., Mardis E.R., Pui C.-H., Ding L., et al. The Pediatric Cancer Genome Project. *Nat Genet*. 2012 May 29;44(6):619–22.
16. Gröbner S.N., Worst B.C., Weischenfeldt J., Buchhalter I., Kleinheinz K., Rudneva V.A., et al. The landscape of genomic alterations across childhood cancers. *Nature*. 2018 Mar 15;555(7696):321–7.
17. Ma X., Liu Y., Liu Y., Alexandrov L.B., Edmonson M.N., Gawad C., et al. Pan-cancer genome and transcriptome analyses of 1,699 paediatric leukaemias and solid tumours. *Nature*. 2018 Mar 15;555(7696):371–6.
18. Morozova O., Newton Y., Cline M., Zhu J., Learned K., Stuart J., et al. Abstract LB-212: Treehouse Childhood Cancer Project: a resource for sharing and multiple cohort analysis of pediatric cancer genomics data. *Cancer Res*. 2015;75(15 Supplement):LB-212.
19. Jäger N., Jones D.T., Kool M., Zichner T., Hutter B., Sultan M., et al. ICGC PedBrain - dissecting the genomic complexity underlying medulloblastoma using whole-genome sequencing. *BMC Proc*. 2012 Oct 1;6(6):P43.
20. Jeanquartier F., Jean-Quartier C., Holzinger A. Use case driven evaluation of open databases for pediatric cancer research. *BioData Min*. 2019;12:2.
21. Li X., Warner J.L. A Review of Precision Oncology Knowledgebases for Determining the Clinical Actionability of Genetic Variants. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:48.
22. Wagner A.H., Walsh B., Mayfield G., Tamborero D., Sonkin D., Krysiak K., et al. A harmonized meta-knowledgebase of clinical interpretations of somatic genomic variants in cancer. *Nat Genet*. 2020 Apr;52(4):448–57.
23. Wain H.M., Bruford E.A., Lovering R.C., Lush M.J., Wright M.W., Povey S. Guidelines for human gene nomenclature. *Genomics*. 2002 Apr;79(4):464–70.
24. Jones D.T.W., Banito A., Grünwald T.G.P., Haber M., Jäger N., Kool M., et al. Molecular characteristics and therapeutic vulnerabilities across paediatric solid tumours. *Nat Rev Cancer*. 2019 Aug;19(8):420–38.
25. Kohashi K., Oda Y. Oncogenic roles of SMARCB1/INI1 and its deficient tumors. *Cancer Sci*. 2017 Apr;108(4):547–52.
26. Eaton K.W., Tooke L.S., Wainwright L.M., Judkins A.R., Biegel J.A. Spectrum of SMARCB1/INI1 mutations in familial and sporadic rhabdoid tumors. *Pediatr Blood Cancer*. 2011 Jan;56(1):7–15.
27. Phi J.H., Sun C.-H., Lee S.-H., Lee S., Park I., Choi S.A., et al. NPM1 as a potential therapeutic target for atypical teratoid/rhabdoid tumors. *BMC Cancer*. 2019;19(1):848.
28. Erkek S., Johann P.D., Finetti M.A., Drosos Y., Chou H.-C., Zapatka M. et al. Comprehensive Analysis of Chromatin States in Atypical Teratoid/Rhabdoid Tumor Identifies Diverging Roles for SWI/SNF and Polycomb in Gene Regulation. *Cancer Cell*. 2019 14;35(1):95–110.e8.
29. Frühwald M.C., Biegel J.A., Bourdeaut F., Roberts C.W.M., Chi S.N. Atypical teratoid/rhabdoid tumors—current concepts, advances in biology, and potential future therapies. *Neuro-Oncol*. 2016 Jun;18(6):764–78.
30. Louis D.N., Perry A., Reifenberger G., von Deimling A., Figarella-Branger D., Cavenee W.K., et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2016;131(6):803–20.
31. Della Corte C.M., Viscardi G., Di Liello R., Fasano M., Martinelli E., Troiani T., et al. Role and targeting of anaplastic lymphoma kinase in cancer. *Mol Cancer*. 2018 Feb 19;17(1):30.
32. Bellini A., Bernard V., Leroy Q., Frio T.R., Pierron G., Combaret V., et al. Deep Sequencing Reveals Occurrence of Subclonal ALK Mutations in Neuroblastoma at Diagnosis. *Clin Cancer Res*. 2015 Nov 1;21(21):4913–21.
33. Trigg R.M., Turner S.D. ALK in Neuroblastoma: Biological and Therapeutic Implications. *Cancers*. 2018 Apr 10;10(4).
34. Bresler S.C., Weiser D.A., Huwe P.J., Park J.H., Krytska K., Ryles H., et al. ALK mutations confer differential oncogenic activation and sensitivity to ALK inhibition therapy in neuroblastoma. *Cancer Cell*. 2014 Nov 10;26(5):682–94.
35. Ackermann S., Cartolano M., Hero B., Welte A., Kahlert Y., Roderwieser A., et al. A mechanistic classification of clinical phenotypes in neuroblastoma. *Science*. 2018 Dec 7;362(6419):1165–70.
36. Mondal G., Stevers M., Goode B., Ashworth A., Solomon D.A. A requirement for STAG2 in replication fork progression creates a targetable synthetic lethality in cohesin-mutant cancers. *Nat Commun*. 2019;10(1):1686.
37. A requirement for STAG2 in replication fork progression creates a targetable synthetic lethality in cohesin-mutant cancers | Nature Communications [Internet]. [cited 2020 May 28]. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-019-09659-z>
38. Romero-Pérez L., Surdez D., Brunet E., Delattre O., Grünwald T.G.P. STAG Mutations in Cancer. *Trends Cancer*. 2019 Aug;5(8):506–20.
39. OMIM Clinical Synopsis - #301022 - MULLEGAMA-KLEIN-MARTINEZ SYNDROME; MKMS [Internet]. [cited 2020 May 21]. Available from: <https://omim.org/clinicalSynopsis/301022>
40. Gargallo P., Juan A., Yáñez Y., Dolz S., Segura V., Castel V., et al. Precision medicine in Ewing sarcoma: a translational point of view. *Clin Transl Oncol Off Publ Fed Span Oncol Soc Natl Cancer Inst Mex*. 2020 Feb 5;
41. Brohl A.S., Solomon D.A., Chang W., Wang J., Song Y., Sindiri S., et al. The genomic landscape of the Ewing Sarcoma family of tumors reveals recurrent STAG2 mutation. *PLoS Genet*. 2014 Jul;10(7):e1004475.
42. Crompton B.D., Stewart C., Taylor-Weiner A., Alexe G., Kurek K.C., Calicchio M.L., et al. The genomic landscape of pediatric Ewing sarcoma. *Cancer Discov*. 2014 Nov;4(11):1326–41.
43. Bahrami A., Wu J., Dyer MA, Delattre O., Pappo AS. Loss of STAG2 expression and prognosis in Ewing sarcoma family of tumors. *J Clin Oncol*. 2015 May 20;33(15 suppl):10024–10024.
44. Gargallo P., Font de Mora J., Berlanga P., Calabria I., Llavador M., Pedrola L., et al. Precision medicine in relapsed or refractory pediatric solid tumors: a collaborative Spanish initiative. *Transl Med Commun*. 2019;4(1):10.
45. Østrup O., Nysom K., Scheie D., Schmidt A.Y., Mathiasen R., Hjalgrim L.L., et al. Importance of Comprehensive Molecular Profiling for Clinical Outcome in Children With Recurrent Cancer. *Front Pediatr*. 2018;6:114.
46. Khater F., Vairy S., Langlois S., Dumoucel S., Sontag T., St-Onge P., et al. Molecular Profiling of Hard-to-Treat Childhood and Adolescent Cancers. *JAMA Netw Open*. 2019 Apr 5;2(4):e192906.
47. Harris M.H., DuBois S.G., Glade Bender J.L., Kim A., Crompton B.D., Parker E., et al. Multicenter Feasibility Study of Tumor Molecular Profiling to Inform Therapeutic Decisions in Advanced Pediatric Solid Tumors: The Individualized Cancer Therapy (iCat) Study. *JAMA Oncol*. 2016 May 1;2(5):608–15.
48. Worst B.C., van Tilburg C.M., Balasubramanian G.P., Fiesel P., Witt R., Freitag A., et al. Next-generation personalised medicine for high-

- risk paediatric cancer patients - The INFORM pilot study. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2016 Sep;65:91–101.
49. Pincez T., Clément N., Lapouble E., Pierron G., Kamal M., Bieche I., et al. Feasibility and clinical integration of molecular profiling for target identification in pediatric solid tumors. *Pediatr Blood Cancer*. 2017 Jun;64(6).
50. Harttrampf A.C., Lacroix L., Deloger M., Deschamps F., Puget S., Auger N., et al. Molecular Screening for Cancer Treatment Optimization (MOSCATO-01) in Pediatric Patients: A Single-Institutional Prospective Molecular Stratification Trial. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2017 Oct 15;23(20):6101–12.
51. Mody R.J., Wu Y.-M., Lonigro R.J., Cao X., Roychowdhury S., Vats P., et al. Integrative Clinical Sequencing in the Management of Refractory or Relapsed Cancer in Youth. *JAMA*. 2015 Sep 1;314(9):913–25.
52. Oberg J.A., Glade Bender J.L., Sulis M.L., Pendrick D., Sireci A.N., Hsiao S.J., et al. Implementation of next generation sequencing into pediatric hematology-oncology practice: moving beyond actionable alterations. *Genome Med*. 2016 Dec 23;8(1):133.
53. Cole B.L., Lockwood C.M., Stasi S., Stevens J., Lee A., Ojemann J.G., et al. Year 1 in the Molecular Era of Pediatric Brain Tumor Diagnosis: Application of Universal Clinical Targeted Sequencing in an Unselected Cohort of Children. *JCO Precis Oncol*. 2018;(2):1–13.
54. Ramkissoon S.H., Bandopadhyay P., Hwang J., Ramkissoon L.A., Greenwald N.F., Schumacher S.E., et al. Clinical targeted exome-based sequencing in combination with genome-wide copy number profiling: precision medicine analysis of 203 pediatric brain tumors. *Neuro-Oncol*. 2017 Jul 1;19(7):986–96.
55. Leichsenring J., Horak P., Kreutzfeldt S., Heining C., Christopoulos P., Volckmar A.-L., et al. Variant classification in precision oncology. *Int J Cancer*. 2019 Dec 1;145(11):2996–3010.
56. Vo K.T., Parsons D.W., Seibel N.L. Precision Medicine in Pediatric Oncology. *Surg Oncol Clin N Am*. 2020 Jan;29(1):63–72.
57. Forrest S.J., Geoerger B., Janeway K.A. Precision medicine in pediatric oncology. *Curr Opin Pediatr*. 2018 Feb;30(1):17–24.
58. Mody R.J., Prensner J.R., Everett J., Parsons D.W., Chinnaiyan A.M. Precision medicine in pediatric oncology: Lessons learned and next steps. *Pediatr Blood Cancer*. 2017 Mar;64(3).
59. Rusch M., Nakitandwe J., Shurtleff S., Newman S., Zhang Z., Edmonson M.N., et al. Clinical cancer genomic profiling by three-platform sequencing of whole genome, whole exome and transcriptome. *Nat Commun*. 2018 Sep 27;9(1):3962.
60. Parsons D.W., Roy A., Yang Y., Wang T., Scollon S., Bergstrom K., et al. Diagnostic Yield of Clinical Tumor and Germline Whole-Exome Sequencing for Children With Solid Tumors. *JAMA Oncol*. 2016 May 1;2(5):616–24.
61. George S.L., Izquierdo E., Campbell J., Koutroumanidou E., Proszek P., Jamal S., et al. A tailored molecular profiling programme for children with cancer to identify clinically actionable genetic alterations. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2019 Nov;121:224–35.
62. Chakravarty D., Gao J., Phillips S.M., Kundra R., Zhang H., Wang J., et al. OncoKB: A Precision Oncology Knowledge Base. *JCO Precis Oncol*. 2017 Jul;2017.
- Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. 2015 May;17(5):405–24.
5. Rehman H.L., Bale S.J., Bayrak-Toydemir P., Berg J.S., Brown K.K., Deignan J.L., et al. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. 2013 Sep;15(9):733–47.
6. Aziz N., Zhao Q., Bry L., Driscoll D.K., Funke B., Gibson J.S., et al. College of American Pathologists' laboratory standards for next-generation sequencing clinical tests. *Arch Pathol Lab Med*. 2015 Apr;139(4):481–93.
7. Matthijs G., Souche E., Alders M., Corveleyn A., Eck S., Feenstra I., et al. Guidelines for diagnostic next-generation sequencing. *Eur J Hum Genet EJHG*. 2016 Oct;24(10):1515.
8. Use of standards in FDA regulatory Oversight of Next Generation Sequencing-Based In Vitro Diagnostics used for diagnosing Germline Diseases (Draft Guidance) [Internet]. *SciPol.org*. 2016 [cited 2020 May 20]. Available from: <https://scipol.duke.edu/track/use-standards-fda-regulatory-oversight-next-generation-sequencing-based-vitro-diagnostics-used>
9. Ryzhkova O.P., Kardymon O.L., Prokhorchuk E.B., Kononov F.A., Maslennikov A.B., Stepanov V.A., Afanasyev A.A., Zaklyazminskaya E.V., Rebrikov D.V., Savostianov K.V., Glotov A.S., Kostareva A.A., Pavlov A.E., Golubenko M.V., Polyakov A.V., Kutsev S.I. Rukovodstvo po interpretatsii dannykh posledovatel'nosti DNK cheloveka, pochlenennykh metodami massovogo parallel'nogo sekvenirovaniya (MPS) (redaktsiya 2018, versiya 2). [Guidelines for the interpretation of massive parallel sequencing variants (update 2018, v2)]. *Meditsinskaya genetika [Medical genetics]* 2019; 18(2): 3–24. (In Russ.)
10. Li M.M., Datto M., Duncavage E.J., Kulkarni S., Lindeman N.I., Roy S., et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn JMD*. 2017 Jan;19(1):4–23.
11. Abbas T., Keaton M.A., Dutta A. Genomic instability in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013 Mar 1;5(3):a012914.
12. Lee J.W., Kim N.K.D., Lee S.H., Cho H.W., Ma Y., Ju H.Y., et al. Discovery of actionable genetic alterations with targeted panel sequencing in children with relapsed or refractory solid tumors. *PloS One*. 2019;14(11):e0224227.
13. Evidence Repository - Clinical Genome Resources [Internet]. [cited 2020 May 27]. Available from: <https://erepo.clinicalgenome.org/evrepo/ui/interpretation/b172bcbe-5cfe-4ba5-9ba2-482b4e1e357d>
14. Froyen G., Le Mercier M., Lierman E., Vandepoele K., Nollet F., Boone E., et al. Standardization of Somatic Variant Classifications in Solid and Haematological Tumours by a Two-Level Approach of Biological and Clinical Classes: An Initiative of the Belgian ComPerMed Expert Panel. *Cancers*. 2019 Dec 16;11(12).
15. Downing J.R., Wilson R.K., Zhang J., Mardis E.R., Pui C.-H., Ding L., et al. The Pediatric Cancer Genome Project. *Nat Genet*. 2012 May 29;44(6):619–22.
16. Gröbner S.N., Worst B.C., Weischenfeldt J., Buchhalter I., Kleinheinz K., Rudneva V.A., et al. The landscape of genomic alterations across childhood cancers. *Nature*. 2018 Mar 15;555(7696):321–7.
17. Ma X., Liu Y., Liu Y., Alexandrov L.B., Edmonson M.N., Gawad C., et al. Pan-cancer genome and transcriptome analyses of 1,699 paediatric leukaemias and solid tumours. *Nature*. 2018 Mar 15;555(7696):371–6.
18. Morozova O., Newton Y., Cline M., Zhu J., Learned K., Stuart J., et al. Abstract LB-212: Treehouse Childhood Cancer Project: a resource for sharing and multiple cohort analysis of pediatric cancer genomics data. *Cancer Res*. 2015;75(15 Supplement):LB-212.
19. Jäger N., Jones D.T., Kool M., Zichner T., Hutter B., Sultan M., et al. ICGC PedBrain - dissecting the genomic complexity underlying medulloblastoma using whole-genome sequencing. *BMC Proc*. 2012 Oct 1;6(6):P43.
20. Jeanquartier F., Jean-Quartier C., Holzinger A. Use case driven evaluation of open databases for pediatric cancer research. *BioData Min*. 2019;12:2.
21. Li X., Warner J.L. A Review of Precision Oncology Knowledgebases for Determining the Clinical Actionability of Genetic Variants. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:48.

References

1. Surrey L.F., MacFarland S.P., Chang F., Cao K., Rath K.S., Akumoglu G.T., et al. Clinical utility of custom-designed NGS panel testing in pediatric tumors. *Genome Med*. 2019 May 28;11(1):32.
2. Morganti S., Tarantino P., Ferraro E., D'Amico P., Duso B.A., Curigliano G. Next Generation Sequencing (NGS): A Revolutionary Technology in Pharmacogenomics and Personalized Medicine in Cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1168:9–30.
3. Morash M., Mitchell H., Beltran H., Elemento O., Pathak J. The Role of Next-Generation Sequencing in Precision Medicine: A Review of Outcomes in Oncology. *J Pers Med*. 2018 Sep 17;8(3).
4. Richards S., Aziz N., Bale S., Bick D., Das S., Gastier-Foster J., et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical

22. Wagner A.H., Walsh B., Mayfield G., Tamborero D., Sonkin D., Krysiak K., et al. A harmonized meta-knowledgebase of clinical interpretations of somatic genomic variants in cancer. *Nat Genet.* 2020 Apr;52(4):448–57.
23. Wain H.M., Bruford E.A., Lovering R.C., Lush M.J., Wright M.W., Povey S. Guidelines for human gene nomenclature. *Genomics.* 2002 Apr;79(4):464–70.
24. Jones D.T.W., Banito A., Grünwald T.G.P., Haber M., Jäger N., Kool M., et al. Molecular characteristics and therapeutic vulnerabilities across paediatric solid tumours. *Nat Rev Cancer.* 2019 Aug;19(8):420–38.
25. Kohashi K., Oda Y. Oncogenic roles of SMARCB1/INI1 and its deficient tumors. *Cancer Sci.* 2017 Apr;108(4):547–52.
26. Eaton K.W., Tooke L.S., Wainwright L.M., Judkins A.R., Biegel J.A. Spectrum of SMARCB1/INI1 mutations in familial and sporadic rhabdoid tumors. *Pediatr Blood Cancer.* 2011 Jan;56(1):7–15.
27. Phi J.H., Sun C.-H., Lee S.-H., Lee S., Park I., Choi S.A., et al. NPM1 as a potential therapeutic target for atypical teratoid/rhabdoid tumors. *BMC Cancer.* 2019;19(1):848.
28. Erkek S., Johann P.D., Finetti M.A., Drosos Y., Chou H.-C., Zapatka M., et al. Comprehensive Analysis of Chromatin States in Atypical Teratoid/Rhabdoid Tumor Identifies Diverging Roles for SWI/SNF and Polycomb in Gene Regulation. *Cancer Cell.* 2019 14;35(1):95–110.e8.
29. Frühwald M.C., Biegel J.A., Bourdeaut F., Roberts C.W.M., Chi S.N. Atypical teratoid/rhabdoid tumors—current concepts, advances in biology, and potential future therapies. *Neuro-Oncol.* 2016 Jun;18(6):764–78.
30. Louis D.N., Perry A., Reifenberger G., von Deimling A., Figarella-Branger D., Cavenee W.K., et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol (Berl).* 2016;131(6):803–20.
31. Della Corte C.M., Viscardi G., Di Liello R., Fasano M., Martinelli E., Troiani T., et al. Role and targeting of anaplastic lymphoma kinase in cancer. *Mol Cancer.* 2018 Feb 19;17(1):30.
32. Bellini A., Bernard V., Leroy Q., Frio T.R., Pierron G., Combaret V., et al. Deep Sequencing Reveals Occurrence of Subclonal ALK Mutations in Neuroblastoma at Diagnosis. *Clin Cancer Res.* 2015 Nov 1;21(21):4913–21.
33. Trigg R.M., Turner S.D. ALK in Neuroblastoma: Biological and Therapeutic Implications. *Cancers.* 2018 Apr 10;10(4).
34. Bresler S.C., Weiser D.A., Huwe P.J., Park J.H., Krytska K., Ryles H., et al. ALK mutations confer differential oncogenic activation and sensitivity to ALK inhibition therapy in neuroblastoma. *Cancer Cell.* 2014 Nov 10;26(5):682–94.
35. Ackermann S., Cartolano M., Hero B., Welte A., Kahlert Y., Roderwieser A., et al. A mechanistic classification of clinical phenotypes in neuroblastoma. *Science.* 2018 Dec 7;362(6419):1165–70.
36. Mondal G., Stevers M., Goode B., Ashworth A., Solomon D.A. A requirement for STAG2 in replication fork progression creates a targetable synthetic lethality in cohesin-mutant cancers. *Nat Commun.* 2019;10(1):1686.
37. A requirement for STAG2 in replication fork progression creates a targetable synthetic lethality in cohesin-mutant cancers | Nature Communications [Internet]. [cited 2020 May 28]. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-019-09659-z>
38. Romero-Pérez L., Surdez D., Brunet E., Delattre O., Grünwald T.G.P. STAG Mutations in Cancer. *Trends Cancer.* 2019 Aug;5(8):506–20.
39. OMIM Clinical Synopsis - #301022 - MULLEGAMA-KLEIN-MARTINEZ SYNDROME; MKMS [Internet]. [cited 2020 May 21]. Available from: <https://omim.org/clinicalSynopsis/301022>
40. Gargallo P., Juan A., Yáñez Y., Dolz S., Segura V., Castel V., et al. Precision medicine in Ewing sarcoma: a translational point of view. *Clin Transl Oncol Off Publ Fed Span Oncol Soc Natl Cancer Inst Mex.* 2020 Feb 5;
41. Brohl A.S., Solomon D.A., Chang W., Wang J., Song Y., Sindiri S., et al. The genomic landscape of the Ewing Sarcoma family of tumors reveals recurrent STAG2 mutation. *PLoS Genet.* 2014 Jul;10(7):e1004475.
42. Crompton B.D., Stewart C., Taylor-Weiner A., Alexe G., Kurek K.C., Calicchio M.L., et al. The genomic landscape of pediatric Ewing sarcoma. *Cancer Discov.* 2014 Nov;4(11):1326–41.
43. Bahrami A., Wu J., Dyer MA, Delattre O, Pappo AS. Loss of STAG2 expression and prognosis in Ewing sarcoma family of tumors. *J Clin Oncol.* 2015 May 20;33(15 suppl):10024–10024.
44. Gargallo P., Font de Mora J., Berlanga P., Calabria I., Llavador M., Pedrola L., et al. Precision medicine in relapsed or refractory pediatric solid tumors: a collaborative Spanish initiative. *Transl Med Commun.* 2019;4(1):10.
45. Østrup O., Nysom K., Scheie D., Schmidt A.Y., Mathiasen R., Hjalgrim L.L., et al. Importance of Comprehensive Molecular Profiling for Clinical Outcome in Children With Recurrent Cancer. *Front Pediatr.* 2018;6:114.
46. Khater F., Vairy S., Langlois S., Dumoucel S., Sontag T., St-Onge P., et al. Molecular Profiling of Hard-to-Treat Childhood and Adolescent Cancers. *JAMA Netw Open.* 2019 Apr 5;2(4):e192906.
47. Harris M.H., DuBois S.G., Glade Bender J.L., Kim A., Crompton B.D., Parker E., et al. Multicenter Feasibility Study of Tumor Molecular Profiling to Inform Therapeutic Decisions in Advanced Pediatric Solid Tumors: The Individualized Cancer Therapy (iCat) Study. *JAMA Oncol.* 2016 May 1;2(5):608–15.
48. Worst B.C., van Tilburg C.M., Balasubramanian G.P., Fiesel P., Witt R., Freitag A., et al. Next-generation personalised medicine for high-risk paediatric cancer patients - The INFORM pilot study. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2016 Sep;65:91–101.
49. Pincez T., Clément N., Lapouble E., Pierron G., Kamal M., Bieche I., et al. Feasibility and clinical integration of molecular profiling for target identification in pediatric solid tumors. *Pediatr Blood Cancer.* 2017 Jun;64(6).
50. Hartrampf A.C., Lacroix L., Deloger M., Deschamps F., Puget S., Auger N., et al. Molecular Screening for Cancer Treatment Optimization (MOSCATO-01) in Pediatric Patients: A Single-Institutional Prospective Molecular Stratification Trial. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2017 Oct 15;23(20):6101–12.
51. Mody R.J., Wu Y.-M., Lonigro R.J., Cao X., Roychowdhury S., Vats P., et al. Integrative Clinical Sequencing in the Management of Refractory or Relapsed Cancer in Youth. *JAMA.* 2015 Sep 1;314(9):913–25.
52. Oberg J.A., Glade Bender J.L., Sulis M.L., Pendrick D., Sireci A.N., Hsiao S.J., et al. Implementation of next generation sequencing into pediatric hematology-oncology practice: moving beyond actionable alterations. *Genome Med.* 2016 Dec 23;8(1):133.
53. Cole B.L., Lockwood C.M., Stasi S., Stevens J., Lee A., Ojemann J.G., et al. Year 1 in the Molecular Era of Pediatric Brain Tumor Diagnosis: Application of Universal Clinical Targeted Sequencing in an Unselected Cohort of Children. *JCO Precis Oncol.* 2018;(2):1–13.
54. Ramkissoon S.H., Bandopadhyay P., Hwang J., Ramkissoon L.A., Greenwald N.F., Schumacher S.E., et al. Clinical targeted exome-based sequencing in combination with genome-wide copy number profiling: precision medicine analysis of 203 pediatric brain tumors. *Neuro-Oncol.* 2017 Jul 1;19(7):986–96.
55. Leichsenring J., Horak P., Kreutzfeldt S., Heining C., Christopoulos P., Volckmar A.-L., et al. Variant classification in precision oncology. *Int J Cancer.* 2019 Dec 1;145(11):2996–3010.
56. Vo K.T., Parsons D.W., Seibel N.L. Precision Medicine in Pediatric Oncology. *Surg Oncol Clin N Am.* 2020 Jan;29(1):63–72.
57. Forrest S.J., Geoerger B., Janeway K.A. Precision medicine in pediatric oncology. *Curr Opin Pediatr.* 2018 Feb;30(1):17–24.
58. Mody R.J., Prensner J.R., Everett J., Parsons D.W., Chinnaiyan A.M. Precision medicine in pediatric oncology: Lessons learned and next steps. *Pediatr Blood Cancer.* 2017 Mar;64(3).
59. Rusch M., Nakitandwe J., Shurtleff S., Newman S., Zhang Z., Edmonson M.N., et al. Clinical cancer genomic profiling by three-platform sequencing of whole genome, whole exome and transcriptome. *Nat Commun.* 2018 Sep 27;9(1):3962.
60. Parsons D.W., Roy A., Yang Y., Wang T., Scollon S., Bergstrom K., et al. Diagnostic Yield of Clinical Tumor and Germline Whole-Exome Sequencing for Children With Solid Tumors. *JAMA Oncol.* 2016 May 1;2(5):616–24.
61. George S.L., Izquierdo E., Campbell J., Koutroumanidou E., Proszek P., Jamal S., et al. A tailored molecular profiling programme for children with cancer to identify clinically actionable genetic alterations. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2019 Nov;121:224–35.
62. Chakravarty D., Gao J., Phillips S.M., Kundra R., Zhang H., Wang J., et al. OncoKB: A Precision Oncology Knowledge Base. *JCO Precis Oncol.* 2017 Jul;2017.