

Анализ клинического экзостама рака желудка

Кекеева Т.В.^{1,2,3}, Хашимов Л.Х.³, Лядов В.К.^{1,3}, Каныгина А.В.⁴, Андреева Ю.Ю.³,
Завалишина Л.Э.³, Поддубная И.В.³, Стрельников В.В.², Залетаев Д.В.^{2,5}, Франк Г.А.³

¹ — ФГАУ Лечебно-реабилитационный центр Минздрава России,
125367, Москва, Ивановское шоссе, д.3., Россия

² — ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», 115478, Москва, ул. Москворечье, д.1, Россия

³ — ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования» Минздрава России,
125993, Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1, Россия

⁴ — ФГОУ ВПО «Московский физико-технический институт (государственный университет)»,
141700, Московская область, г.Долгопрудный, Институтский переулок, д.9, Россия

⁵ — ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России,
119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2, Россия
e-mail: kekeeva@mail.ru

Идентификация соматических генетических изменений в опухолях несет потенциальную диагностическую и прогностическую информацию о драйверных мутациях и сведения, позволяющие более обоснованно выбрать схему химиотерапевтического лечения для пациентов. Секвенирование клинического экзостама уже зарекомендовало себя как высокоэффективный метод поиска мутаций. Проведен анализ соматических опухолевых изменений в клиническом экзостоме, включающем 4813 генов, у шести пациентов с раком желудка (РЖ). Двухконцовое секвенирование парных образцов опухоли и нормальной ткани выполнено на приборе Nextseq500 набором «TruSight One Sequencing Panel» (Illumina). Обнаружены 102 различные соматические мутации, все они являлись однонуклеотидными заменами, их них 30 — синонимичными заменами, 66 — несинонимичными и 6 — нонсенс-мутациями. Проанализировано 82 новых мутации, из них 10 мутаций локализованы в генах, участвующих в патогенезе РЖ. Соматическая мутация известной клинической значимости обнаружена у одного пациента, и предположительно драйверные мутации найдены у трех пациентов. Дальнейшие функциональные исследования с последующим длительным наблюдением за пациентами позволят установить значимость найденных мутаций.

Ключевые слова: клинический экзостом, рак желудка, соматические мутации

Введение

РЖ относится к наиболее распространенным опухолевым заболеваниям человека и занимает второе место в структуре онкозаболеваемости после рака легкого. Геномные технологии позволили достичь значительного понимания в патогенезе РЖ и описать большое количество молекулярных изменений, происходящих на всех стадиях заболевания.

Результаты недавних исследований, таких, как TCGA (The Cancer Genome Atlas), свидетельствуют о разнообразии молекулярных подтипов РЖ и позволяют предполагать различные механизмы патогенеза [2, 4]. Однако использование подобных исследований в клинической практике применительно к лечению пациента все еще остается ограниченным и в большинстве случаев информация о генетическом профиле опухоли не несет практической ценности.

Секвенирование опухоли и смежной условно-нормальной ткани может предоставить данные о специфических опухолевых изменениях и увеличить информативность новых технологий в клинике и возможность их использования для пациента [9, 23]. Идентификация соматических генетических изменений несет потенциальную диагностическую и прогностическую информацию о драйверных мутациях и сведения, позволяющие более обоснованно выбрать схему химиотерапевтического лечения.

Экзомное секвенирование уже зарекомендовало себя как высокоэффективный метод поиска мутаций, тем не менее, неравномерное покрытие таргетной последовательности является осложняющим фактором при анализе [13, 15, 17]. Панель с меньшим количеством генов, но с лучшим покрытием, является альтернативой секвенированию экзостама, и включает в себя только те гены, которые участвуют в патогенезе известных на сегодняшний день заболеваний человека (клинический экзостом) [16]. Настоящее исследование посвящено поиску соматических опухолевых изменений при анализе клинического экзостама, включающего 4813 генов, у пациентов с РЖ.

Материалы и методы

Клинический материал. 6 образцов опухолевой ткани и 6 образцов смежной условно-нормальной ткани желудка были получены от пациентов с РЖ, прооперированных в ФГБНУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина». Материал сразу после операции замораживали и хранили при температуре -70°C , а также фиксировали в 96%-ном этаноле. Часть операционного материала использовалась для срочного гистологического исследования, а другая часть для выделения ДНК. Гистологический анализ был выполнен на кафедре патологической анатомии ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования» Минздрава России. Количество неопластических клеток

в опухолевом образце составляло не менее 70% от общего количества клеток.

Выделение геномной ДНК из свежемороженого операционного материала проводили с использованием набора QIAamp DNA Tissue Mini Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с инструкцией производителя.

Секвенирование следующего поколения. Библиотеки для парноконцевого секвенирования получали с использованием коммерческого набора «TruSight One Sequencing Panel» (Illumina, США), который включает 4813 генов, ассоциированных с известными заболеваниями, согласно протоколам производителя. Коротко, 50 нг геномной ДНК образца фрагментировали, лигировали каждый фрагмент с олигонуклеотидами с помощью набора Nextera DNA Library preparation Kit (Illumina, США) и амплифицировали. Далее смесь ДНК гибридизовали с биотинилированными пробами к таргетным регионам. После добавления стрептавидиновых магнитных частиц получали обогащенную таргетную последовательность ДНК. После повторной гибридизации и последующей очистки стрептавидиновыми магнитными частицами проводили финальную амплификацию. Определение концентрации и валидацию геномной библиотеки проводили на флуориметре Qubit® 2.0 (Life technologies) и биоанализаторе 2100 (Agilent Technologies). Библиотеку, разведенную согласно рекомендациям производителя, секвенировали на платформе Nextseq500 (Illumina).

Анализ данных. Подготовку ридов и оценку качества прочтений проводили с использованием программ FastQ Generation, FastQC, FastQ Toolkit. Выравнивание и поиск замен осуществляли с помощью программы BWA Enrichment (версия 2.1.0). Аннотацию вариаций проводили с помощью wANNOVAR. Поиск соматических мутаций осуществляли двумя способами:

1) с использованием программы MuTest (версия 1.1.4) [18] путем вычитания герминальных мутаций при сравнении vcf файлов опухолевых и смежных нормальных образцов;

2) с применением собственных фильтров (общее покрытие в опухоли >7; покрытие варианта в норме <4; соотношение вариант/дикий тип в норме < 5% соотношения вариант/дикий тип в опухоли).

Результаты и обсуждение

Для шести пациентов с диагнозом РЖ были получены библиотеки клинического экзоста и проведено секвенирование парных образцов опухоли и нормальной ткани. Клиническая характеристика пациентов представлена в табл. 1.

Среднее количество прочтений по двенадцати образцам составило 23 млн, что обеспечило среднее 99-кратное покрытие с качеством Q>30 и 20-кратное покрытие оснований для 95% таргетной последовательности.

Количество найденных изменений как в опухолевых образцах, так и в нормальных, варьировало от 6012 до 7926, и в среднем составило 7613. По данным литературы, секвенирование парных образцов опухолевой и нормальной ткани позволяет снизить вероятность ложноположительных результатов на 65% и более точно провести детекцию и разделение герминальных и соматических изменений [9]. Поиск соматических вариаций проводили исключением общих вариаций опухолевого и нормального образцов двумя способами: при использовании программы Mutect количество соматических вариаций на образец варьировало от 1 до 32 и при использовании пользовательского фильтра от 8 до 43 (табл. 2). Все предложенные соматические вариации были визуально проверены с помощью программы IGV Browser.

В общей сложности было обнаружено 102 различных соматических вариации, все они были однонуклеотидными заменами, их них 30 являлись синонимичными заменами, 66 — несинонимичными и 6 — нонсенс-мутациями. Лишь одна мутация являлась патогенной по базе данных ClinVar. 13 вариаций описаны в базе данных dbSNP и еще 7 вариаций — в базе данных COSMIC без

Таблица 1

Клиническая характеристика пациентов

№ пациента	Пол	Возраст	Гистологический тип	TNM	Стадия
1	М	66	Умереннодифференцированная аденокарцинома	T3N0M0	Ia
4	Ж	61	Умереннодифференцированная аденокарцинома	T4aN3aM1	IV
7	Ж	73	Аденокарцинома различной степени дифференцировки, с участками муцинозной аденокарциномы	T4aN3aM0	IIIC
12	М	32	Низкодифференцированная аденокарцинома	T4aN1M1	IV
15	Ж	63	Низкодифференцированная аденокарцинома с элементами перстневидноклеточного рака	T3N0M0	IIA
25	М	64	Умереннодифференцированная аденокарцинома	T4bN3bM0	IIIC

указания клинической значимости. Остальные 82 вариации ранее не были обнаружены, в том числе и в исследовании TCGA при поиске соматических мутаций в РЖ (<https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/dataAccessMatrix.htm>).

Из 102 вариаций лишь для одной была известна клиническая значимость, и для того, чтобы присвоить обнаруженным вариациям степень патогенности, мы проанализировали их предполагаемый повреждающий эффект с использованием программ Polyphen HDIV, Polyphen HVAR и Sift. Эти три программы были выбраны на основании исследования Li с соавторами, в котором было проведено сравнение 12 программ-предикторов функциональных эффектов несинонимичных мутаций на белок и показано, что Polyphen HDIV, Polyphen HVAR и Sift имеют минимальные ложноотрицательные и ложноположительные показатели [12]. В нашем исследовании патогенными или повреждающими мутациями считали несинонимичные замены или мутации, приводящие к возникновению стоп-кодона, для которых все три программы предсказывали повреждающий эффект на белок. 33 мутации с предсказанным повреждающим эффектом перечислены в табл. 3.

По данным литературы, известно участие в патогенезе РЖ 10 генов, в которых были обнаружены повреждающие мутации: *TP53*, *ARID1A*, *LDB3*, *PTPRF*, *CD81*, *ECM1*, *CD55*, *MPO*, *SYNE1*, *CASK*. Для оценки значимости остальных 23 повреждающих мутаций недостаточно информации и необходимы дополнительные исследования их эпидемиологической и функциональной природы. Нонсенс-мутации мы считали инактивирующими, и, опираясь на сведения о роли генов в канцерогенезе РЖ, предположили, к каким функциональным изменениям на белковом уровне: инактивирующим либо активирующим, могут привести найденные новые несинонимичные замены.

Мутации в гене *TP53* являются самыми частыми при РЖ и встречаются с частотой до 55% [6]. Как правило, мутации в этом гене ассоциированы с высоким уровнем изменения количества повторов (Copy number alterations). В нашем исследовании в гене *TP53* была обнаружена нонсенс-мутация p.R342X, для которой подтверждена клиническая значимость и соматическая

природа во многих типах опухолей [10, 11], также данная мутация описана как герминальная, при синдроме Ли-Фраумени [5].

Ген *ARID1A* — супрессор опухолевого роста, мутации в котором характерны для широкого спектра опухолей, включая рак желудка, яичников, пищевода, печени, мочевого пузыря и др. [20]. *ARID1A* является компонентом SWI/SNF хроматинового ремодулирующего комплекса [23]. Чаще всего мутации в гене *ARID1A* являются инактивирующими (нонсенс-мутации или сдвиг рамки считывания), что согласуется с тем, что *ARID1A* является геном-супрессором опухолевого роста. Функциональный анализ предполагает, что *ARID1A* принимает участие в клеточной пролиферации посредством контроля регуляторов клеточного цикла CCNE1 и E2F1 [20]. Интересно, что мутации в этом гене при РЖ ассоциированы с микросателлитной нестабильностью, вирусом Эпштейн—Бар и не встречаются одновременно с мутациями в гене *TP53* [17]. В нашем исследовании обнаружена инактивирующая нонсенс-мутация p.Q1366X, ранее не описанная.

Ген *PTPRF* кодирует протеин-тирозин фосфатазу — рецептор, относящийся к РТР-семейству сигнальных молекул, участвующих в клеточной пролиферации и дифференцировке. Его экспрессия снижена в 42% образцов при гепатоцеллюлярной карциноме, в 100% — при колоректальном раке и в 67% — при РЖ. Соматические инактивирующие мутации и делеции этого гена также описаны для рака печени и колоректального рака. Предполагают, что *PTPRF* является супрессором опухолевого роста, отрицательно регулирующим ERK-зависимый сигнальный путь [1]. В нашей работе найдена несинонимичная замена p.R407C, предположительно инактивирующая, основываясь на данных литературы.

CD81 — трансмембранный белок семейства тетраспанинов, взаимодействующий с интегринами. *CD81* участвует в регуляции клеточной адгезии и инвазии. Предположительно, является геном-супрессором, поскольку локализован в часто делетируемом при злокачественных новообразованиях регионе 11p15. В работе Уоо с соавторами показано, что уровень mRNA понижен в 40% первичных опухолей желудка вследствие ги-

Таблица 2

Количество соматических вариаций в опухолевой ткани

№	Все вариации	Стадия	Соматические вариации, обнаруженные программой Mutect	Соматические вариации, обнаруженные пользовательским фильтром	Патогенные соматические вариации
1	7704	II	8	12	2
4	6263	IV	32	43	13
7	7788	IIIC	1	20	9
12	8168	IV	1	12	4
15	7595	IIa	2	8	0
25	7396	IIIC	3	8	4

перметилирования промотора и данное событие ассоциировано с опухолевой прогрессией [21]. Мы выявили мутацию p.V99G, также предположительно инактивирующую.

Ген *LDB3* кодирует PDZ-связывающий фактор, взаимодействующий с белками цитоскелета и миозином. Мутации в этом гене обнаружены при различных миопатиях. Уровень экспрессии *LDB3* достоверно снижен в диффузном подтипе РЖ по сравнению с интестинальным подтипом, что позволяет предположить инак-

тивацию этого белка в канцерогенезе диффузного РЖ [8]. Мы обнаружили несинонимичную замену p.H387Y, значение которой для белка *LDB3* — инактивирующее или активирующее, неизвестно.

ECM1 — белок экстрацеллюлярного матрикса, вовлеченный в процессы формации и ангиогенеза, он взаимодействует с белками цитоскелета, участвуя в поддержании кожной целостности и гомеостаза, а также играет важную роль в лимфогенезе. Экспрессия ECM1 достоверно повышена в 70,1% образцов РЖ и коррелирует

Таблица 3

Мутации с предсказанным повреждающим эффектом

Мутация	Вид мутации	Ген	Данные об участии белка в патогенезе РЖ	Пациент
c.C4096T:p.Q1366X	Стоп-кодон	<i>ARID1A</i>	Да	1
c.A926T:p.Q309L	Несинонимичная	<i>SLC28A3</i>	Нет	1
c.C1024T:p.R342X	Стоп-кодон	<i>TP53</i>	Да	4
c.C1159T:p.H387Y	Несинонимичная	<i>LDB3</i>	Да	4
c.C935T:p.P312L	Несинонимичная	<i>FBLIM1</i>	Нет	4
c.C1219T:p.R407C	Несинонимичная	<i>PTPRF</i>	Да	4
c.G932T:p.C311F	Несинонимичная	<i>LRP8</i>	Нет	4
c.G6941A:p.R2314H	Несинонимичная	<i>SRCAP</i>	Нет	4
c.C433T:p.R145W	Несинонимичная	<i>JPH3</i>	Нет	4
c.A1979G:p.Y660C	Несинонимичная	<i>SLC44A2</i>	Нет	4
c.A12593T:p.E4198V	Несинонимичная	<i>RYR1</i>	Нет	4
c.T359A:p.L120Q	Несинонимичная	<i>ATP1A3</i>	Нет	4
c.T3820A:p.F1274I	Несинонимичная	<i>CELSR1</i>	Нет	4
c.G2569A:p.A857T	Несинонимичная	<i>SLC8A1</i>	Нет	4
c.T907G:p.Y303D	Несинонимичная	<i>ANTXR2</i>	Нет	4
c.T856C:p.F286L	Несинонимичная	<i>KIAA2022</i>	Нет	4
c.T296G:p.V99G	Несинонимичная	<i>CD81</i>	Да	7
c.A757C:p.T253P	Несинонимичная	<i>ECM1</i>	Да	7
c.T176G:p.V59G	Несинонимичная	<i>NPR1</i>	Нет	7
c.T1285A:p.Y429N	Несинонимичная	<i>CD55</i>	Да	7
c.A6658C:p.T2220P	Несинонимичная	<i>CACNA1H</i>	Нет	7
c.A493T:p.K165X	Стоп-кодон	<i>SLC4A3</i>	Нет	7
c.T26G:p.V9G	Несинонимичная	<i>SRP72</i>	Нет	7
c.A1151T:p.Y384F	Несинонимичная	<i>NEFM</i>	Нет	7
c.G1408T:p.E470X	Стоп-кодон	<i>RPGR</i>	Нет	7
c.G12478C:p.E4160Q	Несинонимичная	<i>HYDIN</i>	Нет	12
c.A899C:p.D300A	Несинонимичная	<i>MPO</i>	Да	12
c.T799A:p.Y267N	Несинонимичная	<i>TBX4</i>	Нет	12
c.G1741T:p.D581Y	Несинонимичная	<i>PEX1</i>	Нет	12
c.G664T:p.A222S	Несинонимичная	<i>HMGCS2</i>	Нет	25
c.G1054T:p.D352Y	Несинонимичная	<i>MTMR2</i>	Нет	25
c.G20821T:p.E6941X	Стоп-кодон	<i>SYNE1</i>	Да	25
c.C1660T:p.R554W	Несинонимичная	<i>CASK</i>	Да	25

с глубиной опухолевой инвазии, стадией TNM и метастатическим потенциалом [19]. Нами обнаружена несинонимичная замена p.T253P в гене *ECM1*, предположительно активирующая.

CD55 является лигандом для белка CD97, члена семейства EGF-TM7. Показано, что CD97 играет важную роль в опухолевой дедифференцировке, миграции, инвазивности и метастазировании посредством связывания с CD55. CD97 и CD55 вовлечены в формирование адгезивных контактов опухолевых клеток в инвазивном процессе и их экспрессия высоко коррелирует между собой [14]. В нашем исследовании найдена мутация p.Y429N в гене *CD55* с неизвестной функциональной активностью.

Миелопероксидаза (МПО) — это гемовый белок, синтезируемый во время миелоидной дифференцировки. Интересно, что полиморфизм G463A в гене *МПО* ассоциирован с предрасположенностью к РЖ. Показано, что у носителей аллеля А снижен риск развития РЖ [7].

SYNE1 — ген, который кодирует белок, экспрессирующийся в скелетной и гладкой мускулатуре и локализованный на ядерной мембране. Это комплексный белок, который формирует связывающую сеть между органеллами и актиновым цитоскелетом для поддержания пространственной внутриклеточной организации. В гене *SYNE1* описаны миссенс-мутации, нонсенс-мутации и делеции со сдвигом рамки считывания в таких опухолях, как колоректальный рак, рак пищевода и РЖ [22]. В нашей работе обнаружена инактивирующая нонсенс-мутация p.E6941X.

Ген *CASK* кодирует кальций/кальмодулин-зависимую сериновую протеиназу, члена семейства мембран-зависимых гуанилат-киназ MAGUK. Это каркасный белок, локализованный в синапсах головного мозга. Мутации в этом гене описаны при умственной недостаточности и микроцефалии. *CASK* гиперэкспрессирован в опухолевых образцах РЖ и образцах желудка, инфицированных *H. Pylori*. В работе Zhou с соавторами показано, что опухолевый супрессор miR-203 ингибирует пролиферацию клеток РЖ за счет инактивации *CASK*, что подтверждает онкогенный потенциал последнего [24]. Мы нашли несинонимичную замену p.R554W с предположительным активирующим действием.

В нашем исследовании, у пациентов со II стадией количество мутаций варьировало от 8 до 12, с III стадией — от 8 до 20, с IV стадией — от 20 до 43. Аналогичным образом, количество повреждающих мутаций, т.е. мутаций, изменяющих функцию белка, у пациентов со II стадией варьировало от 0 до 2, с III стадией — от 4 до 9, с IV стадией — от 4 до 13. У пациента №1 можно отметить инактивирующую мутацию в гене-супрессоре *ARID1A*, у пациента №4 — инактивирующую мутацию в гене-супрессоре *TP53*, которые могут являться драйверными для развития опухоли. Chen с соавторами проанализировали экзомные данные 78 пациентов с РЖ и

разделили опухоли на две различные подгруппы: с высокой клональностью и низкой клональностью. Так, для РЖ с высокой клональностью были характерны более старший возраст пациентов, мутации в гене *TP53* и достоверно более низкая выживаемость, тогда как опухоли с низкой клональностью были ассоциированы с такими параметрами, как молодой возраст, мутации в гене *ARID1A* и большая продолжительность жизни [3].

У пациента №7 значимыми опухолевыми изменениями могут являться три мутации: две предположительно активирующие мутации в онкогенах *ECM1* и *CD55* и одна инактивирующая мутация в гене-супрессоре *CD81*. У пациента №25 можно предположить наличие двух значимых мутаций: инактивирующая мутация в гене *SYNE1* и активирующая мутация в гене *CASK*. Однако, для более точного заключения, необходимо проведение тестов определения функциональной активности мутированных белков. В опухолевых образцах пациентов №12 и №15 повреждающих соматических мутаций, которые можно было бы обозначить как драйверные, не обнаружено, что предполагает наличие крупных перестроек, которые невозможно детектировать методом секвенирования следующего поколения.

Заключение

Знание молекулярных характеристик опухоли пациента является крайне важным в эпоху активного внедрения и использования молекулярно-ориентированных таргетных препаратов. Все более актуальным становится идентификация мишеней для таргетной терапии и разработка клинических рекомендаций применения геномных технологий в лечении пациента. Секвенирование следующего поколения позволило определять мутации в опухоли на качественно и количественно ином уровне, что привело к интенсивному поиску и нахождению новых драйверных мутаций и мутаций с клинической значимостью. Однако проблема разделения клинически значимых мутаций и пассажирских мутаций все еще остро стоит перед исследователями. В настоящей работе мы выполнили поиск соматических изменений в клиническом экзOME пациентов с РЖ. Обнаружено 82 новых мутации, из них 10 мутаций локализованы в генах, участвующих в патогенезе РЖ. Соматическая мутация известной клинической значимости обнаружена у одного пациента, и предположительно драйверные мутации найдены у трех пациентов. Дальнейшие функциональные исследования с последующим длительным наблюдением за пациентом позволят установить значимость найденных мутаций. Стратегии для эффективной и достоверной интерпретации данных секвенирования следующего поколения, наряду с доступностью тестов оценки функциональной активности измененных белков, крайне необходимы для внедрения данных геномных технологий в клиническую практику.

Список литературы

1. Bera R., Chiou C., Yu M. et al. Functional genomics identified a novel protein tyrosine phosphatase receptor type F-mediated growth inhibition in hepatocarcinogenesis // *Hepatology*. — 2014. — Vol. 59. — P. 2238–2250.
2. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma // *Nature*. — 2014. — Vol. 513. — P. 202–209.
3. Chen K., Yang D., Li X. et al. Mutational landscape of gastric adenocarcinoma in Chinese: implications for prognosis and therapy // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2015. — Vol. 112. — P. 1107–1112.
4. Chia N., Tan P. Molecular Classification of Gastric Cancer // *Ann. Oncol.* — 2016. — doi: 10.1093/annonc/mdw040.
5. Fiszer-Maliszewska L., Kazanowska B., Padzik J. et al. p53 Tetramerization domain mutations: germline R342X and R342P, and somatic R337G identified in pediatric patients with Li-Fraumeni syndrome and a child with adrenocortical carcinoma // *Fam. Cancer*. — 2009. — Vol. 8. — P. 541–546.
6. Hanazono K., Natsugoe S., Stein H. et al. Distribution of p53 mutations in esophageal and gastric carcinomas and the relationship with p53 expression // *Oncol. Rep.* — 2006. — Vol. 15. — P. 821–824.
7. Jiang Z., Zhang Z., Wang Z. et al. Association of the 463G-A myeloperoxidase gene polymorphism with gastric cancer risk // *Hepatogastroenterology*. — 2012. — Vol. 59. — P. 757–761.
8. Jinawath N., Furukawa Y., Hasegawa S. et al. Comparison of gene-expression profiles between diffuse- and intestinal-type gastric cancers using a genome-wide cDNA microarray // *Oncogene*. — 2004. — Vol. 23. — P. 6830–6844.
9. Jones S., Anagnostou V., Lytle K. et al. Personalized genomic analyses for cancer mutation discovery and interpretation // *Sci. Transl. Med.* — 2015. — Vol. 7. — P. 283ra53.
10. Krishnan V., Ebert P., Ting J. et al. Whole-genome sequencing of Asian lung cancers: second-hand smoke unlikely to be responsible for higher incidence of lung cancer among Asian never-smokers // *Cancer Res.* — 2014. — Vol. 74. — P. 6071–6081.
11. Lee E., Jin G., Lee S. TP53 Mutations in Korean Patients with Non-small Cell Lung Cancer // *J. Korean Med. Sci.* — 2010. — Vol. 25. — P. 698–705.
12. Li Q., Liu X., Gibbs R. et al. Gene-specific function prediction for non-synonymous mutations in monogenic diabetes genes // *PLoS One*. — 2014. — 9 (8). — e104452.
13. Liu J., McClelland M., Stawiski E. et al. Integrated exome and transcriptome sequencing reveals ZAK isoform usage in gastric cancer // *Nat. Commun.* — 2014. — Vol. 8. — P. 3830.
14. Liu Y., Chen L., Peng S. et al. Role of CD97 and CD55 as molecular markers for prognosis and therapy of gastric carcinoma patients // *J. Zhejiang Univ. Sci. B*. — 2005. — Vol. 6. — P. 913–918.
15. Parsons D., Roy A., Yang Y. et al. Diagnostic Yield of Clinical Tumor and Germline Whole-Exome Sequencing for Children With Solid Tumors // *JAMA Oncol.* — 2016. — doi: 10.1001/jamaoncol.2015.5699.
16. Vega A., Medrano C., Navarrete R. et al. Molecular diagnosis of glycogen storage disease and disorders with overlapping clinical symptoms by massive parallel sequencing // *Genetics in medicine*. — 2016. — doi:10.1038/gim.2015.217.
17. Wang K., Kan J., Yuen S. et al. Exome sequencing identifies frequent mutation of ARID1A in molecular subtypes of gastric cancer // *Nat. Genet.* — 2011. — Vol. 43. — P. 1219–1223.
18. Wang Q., Jia P., Li F. et al. Detecting somatic point mutations in cancer genome sequencing data: a comparison of mutation callers // *Genome Med.* — 2013. — Vol. 5. — P. 91.
19. Wu Q., Li X., Yang H. et al. Extracellular matrix protein 1 is correlated to carcinogenesis and lymphatic metastasis of human gastric cancer // *World J. Surg. Oncol.* — 2014. — Vol. 12. — P. 132.
20. Wu R., Wang T. and Shih I. The emerging roles of ARID1A in tumor suppression // *Cancer Biol. Ther.* — 2014. — Vol. 15. — P. 655–664.
21. Yoo T., Ryu B., Lee M., Chi S. CD81 is a candidate tumor suppressor gene in human gastric cancer // *Cell Oncol (Dordr)*. — 2013. — Vol. 36. — P. 141–153.
22. Yu J., Wu W., Li X. et al. Novel recurrently mutated genes and a prognostic mutation signature in colorectal cancer // *Gut*. — 2015. — Vol. 64. — P. 636–645.
23. Zang Z., Cutcutache I., Poon S. et al. Exome sequencing of gastric adenocarcinoma identifies recurrent somatic mutations in cell adhesion and chromatin remodeling genes // *Nat. Genet.* — 2012. — Vol. 44. — P. 570–574.
24. Zhou X., Xu G., Yin C. et al. Down-regulation of miR-203 induced by *Helicobacter pylori* infection promotes the proliferation and invasion of gastric cancer by targeting CASK // *Oncotarget*. — 2014. — Vol. 5. — P. 11631–11640.

Clinical exome sequencing of gastric cancer

Kekeeva T.V.^{1,2,3}, Khashimov L.Kh.³, Lyadov V.K.¹, Kanygina A.V.⁴, Andreeva Yu.Yu.³, Zavalishina L.E.³, Poddubnaya I.V.³, Strelnikov V.V.², Zaletaev D.V.², Frank G.A.³

¹ — Medical and Rehabilitation Center, Moscow, Russia

² — Research Center of Medical Genetics, Moscow, Russia

³ — Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow, Russia

⁴ — Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow Region, Dolgoprudny, Russia

Correspondence to T. Kekeeva: kekeeva@mail.ru

The identification of somatic mutations has the potential to offer diagnostic and prognostic information and inform the selection of therapies. The present study is focusing on implementation of clinical exome sequencing using a Trusight one sequencing panel targeted 4,813 genes associated with known clinical phenotypes. Paired-ended sequencing was performed in six gastric cancer samples and six corresponding adjacent normal gastric specimens using Trusight one sequencing panel on a NEXTSEQ500 platform. We found 102 somatic mutations, all of them were SNP, 30 of them were synonymous substitutions, 66 were nonsynonymous substitutions and six were nonsense mutations. We found 82 novel mutations, from them 10 mutations were localized in genes previously associated with gastric cancer pathogenesis. Somatic mutation of established clinical utility was identified for one patient, and predictively driver mutations were found for three patients. Strategies to effectively and responsibly use these diverse results are required to incorporate tumor exome sequencing and other NGS tests into clinical practice.

Key words: clinical exome, gastric cancer, somatic mutations