

Герминальные мутации в генах системы репарации ДНК у пациентов с раком предстательной железы

Гилязова И.Р.^{1,2}, Кунсбаева Г.Б.², Янкина М.А.¹, Мустафин А.Т.³,
Сафиуллин Р.И.³, Павлов В.Н.³, Хуснутдинова Э.К.^{1,2}

¹ — Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, e-mail: gilyasova_irina@mail.ru

² — Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Башкирский государственный университет, e-mail: kuncbaevagulnaz@mail.ru

³ — Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Башкирский государственный медицинский университет, e-mail: 021gen@mail.ru

Актуальность. Рак предстательной железы (РПЖ) — клинически и генетически гетерогенное заболевание, характеризующееся высокой распространенностью и смертностью. **Цель.** Анализ герминальных мутаций у пациентов с РПЖ. **Материал и методы.** Образцы ДНК, выделенные из периферической крови и нормальной ткани предстательной железы 8 пациентов с РПЖ. Анализ мутаций проводился методом полного секвенирования экзома. **Результаты.** У пациентов с РПЖ выявлен ряд патогенных мутаций в генах системы репарации ДНК. **Выводы.** Полученные данные дополняют информацию о молекулярно-генетической характеристике РПЖ и вносят вклад в разработку алгоритмов генетического консультирования семей и определения тактики лечения заболевания.

Ключевые слова: рак предстательной железы, мутация, репарация ДНК

Введение

Рак предстательной железы (РПЖ) считается одной из самых серьезных медицинских проблем среди мужского населения. Результаты молекулярно-генетических исследований РПЖ существенно изменили понимание механизмов развития данного заболевания. Исследования последних лет, посвященные оценке мутационного профиля при первичном РПЖ, показали наличие рекуррентных мутаций в генах *FOXA1*, *SPOP*, *TP53*, и *PTEN* [2]. Кроме того, обнаружено, что около 53% первичных опухолей предстательной железы демонстрируют слияние генов семейства *ETS* и гена *TMPRSS2*. Считается, что слияние генов *TMPRSS2-ERG* может быть ассоциировано с чувствительностью к ингибиторам поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP) — фермента репарации разрушенной ДНК, расщепляемой каспазой-3 [3]. Фермент играет многофункциональную роль в таких процессах, как репликация ДНК, репарация, рекомбинация, клеточная пролиферация и апоптоз. Кроме того, обнаружено, что в 19% случаев первичного РПЖ имеют место мутации в генах системы репарации ДНК, причем 3% пациентов являются носителями инактивирующих мутаций в гене *BRCA2* [3].

Несмотря на значительные достижения в области исследований онкологических заболеваний, их ранняя диагностика и лечение, установление новых маркеров, создание панелей молекулярных маркеров, обладающих высокой точностью и специфичностью, способных предсказать агрессивность опухоли и прогноз течения заболевания у конкретного пациента, по-прежнему являются актуальной проблемой.

Целью исследования был анализ герминальных мутаций у пациентов с РПЖ на основе полного секвенирования экзома.

Материал и методы

Проведено полное секвенирование экзома восьми пациентов с аденокарциномой предстательной железы. ДНК из тканей предстательной железы и периферической крови пациентов выделяли стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции. Количество ДНК измеряли на флуориметре Qubit 2.0 («Life Technologies», США). Фрагментация ДНК, подготовка библиотек и захват экзома были выполнены в соответствии с инструкциями фирмы-изготовителя. Селекцию специфичных фрагментов ДНК проводили с помощью системы SureSelect с последующим параллельным секвенированием полученных библиотек по технологии Illumina на приборе HiSeq 2000. Все последовательности (прочтения) выровнены на референсный геном с использованием программного пакета Burrows-Wheeler Alignment (BWA) [4]. В качестве референсной использовалась последовательность генома человека (Genome Reference Consortium Human Build 37 (GRCh37-hg19)). Определение вариантов осуществляли с помощью The Genome Analysis Tool Kit (GATK) [5]. Обнаруженные варианты аннотировались с помощью программного обеспечения ANNOVAR [6], позволяющего сравнивать одонуклеотидные замены, полученные в результате секвенирования, с рядом специализированных баз данных и аннотировать предсказательную функциональную значимость выявленных изменений с использованием *in silico* программ SIFT, PolyPhen-2, LRT, Mutation Assessor, MutationTaster, phyloP и GERP++.

Герминальные варианты, обнаруженные у пациентов с РПЖ, в генах системы репарации ДНК

Хромосома	Название гена	rs	Изменение в кодирующей части	Изменение в белке	Частота по базе данных 1000 Genomes (EUR)	Оценка функциональной значимости по различным базам данных				
						SnPEff ¹	SIFT ²	Mutation Taster ³	Mutation Assessor ⁴	PolyPhen2 ⁵
chr11	<i>ATM</i>	rs3218711	—	—	0,007	MD	NA	—	—	—
chr17	<i>BRCA1</i>	—	c.4394_4396 del	p.1465_1466 del	—	M	NA	—	—	—
chr13	<i>BRCA2</i>	—	c.8174delG	p.W2725fs	—	H	NA	—	—	—
chr2	<i>MSH6</i>	—	c.T2227A	p.L743M	—	M	0.00, D	1,1.0,D	3.035, 0.745,M	1.0,D
chr8	<i>NBN</i>	—	—	—	—	MD	NA	—	—	—
chr7	<i>PMS2P3</i>	—	—	—	—	MD	—	—	—	—
chr17	<i>RAD51C</i>	rs142735413	—	—	0,0099	L	NA	—	—	—
chr1	<i>EXO5</i>	rs143142866	c.792_793del	p.S264fs	0,001	H	—	—	—	—

Примечание. ¹ — SnPEff: MD(Modifier) — модифицирующий; M — умеренный (средний), H — высокий, L — низкий; ² — Sift: D-disease causing; ³ — MutationTaster: D-disease causing; ⁴ — MutationAssessor: M-medium; ⁵ — PolyPhen2: D-Probably damaging (>=0.957)

Результаты

В результате биоинформатического анализа у пациентов с РПЖ обнаружены герминальные мутации в генах *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *MSH6*, *NBN*, *PMS2P3*, *RAD51C*, *EXO5*, поддерживающих целостность ДНК (таблица). Мутации в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *RAD51C* и *EXO5* не были обнаружены в контрольных выборках здоровых индивидов русской, татарской и башкирской этнической принадлежности (N = 150).

Обсуждение

Важным фактором риска развития злокачественных новообразований является индивидуальная наследственная предрасположенность, формирование которой обусловлено различными сочетаниями мутаций генетических систем, задействованных в процессе канцерогенеза, в частности, генов системы репарации ДНК. Имеются исследования, посвященные изучению генов репарации ДНК при РПЖ. Так, Castro E. et al. обнаружили, что 22,7% образцов биопсии РПЖ имели дефекты в генах репарации ДНК, в том числе 8% — герминальные мутации в генах *BRCA1/2*, *ATM*, *CDK12*, *FANCA*, *RAD51B* и *RAD51C*. Соматические изменения в гене *BRCA2* были выявлены в 12,7% случаев, герминальные — в 5,3% случаев [7]. Хотя частота мутаций в генах *BRCA1/2* достаточно хорошо изучена, их влияние на прогноз заболевания и терапевтический ответ остаются неясными. Castro et al. при исследовании 2019 пациентов с РПЖ, 18 из которых являлись носителями мутаций в гене *BRCA1*, 61 — в гене *BRCA2*, 1940 — пациенты без мутаций, показали, что герминальные мутации в генах *BRCA1/2* ассоциированы

с неблагоприятным прогнозом. Авторы показали, что носители мутаций в генах *BRCA1/2* чаще имеют индекс Глисона не менее 8, стадию заболевания Т3/Т4, поражение лимфоузлов, метастазы на момент постановки диагноза в отличие от пациентов, не имеющих мутаций в данных генах. При локализованном РПЖ 5-летняя выживаемость без метастазирования была значительно выше (93%) у пациентов без мутаций в генах *BRCA1/2* по сравнению с носителями мутаций (77%) [7]. Однако понимание прогностической значимости мутаций в других генах репарации ДНК (*ATM*, *RAD51B*, *RAD51C* и др.) требует долгосрочных исследований на большой когорте пациентов РПЖ.

Наследственные дефекты в генах репарации ДНК являются ключевыми механизмами в возникновении злокачественных опухолей. Обнаружение мутаций в генах, отвечающих за целостность генома, позволяет выявить индивидов и семьи с предрасположенностью к онкологическим заболеваниям и способных отвечать на конкретную терапию [8]. Идентификация герминальных мутаций в генах системы репарации ДНК у мужчин с РПЖ имеет несколько важных клинических последствий. Углубленное изучение механизмов канцерогенеза и возможных путей воздействия на его этапы привело не только к появлению новых высокоэффективных препаратов, но и целого направления — так называемой молекулярно-направленной терапии. Недавно обнаружено, что фармакологические ингибиторы PARP1 вызывают значительный ответ у пациентов с метастатическим РПЖ, экспрессирующих гомологичную рекомбинацию дефектов репарации ДНК, что позволяет применять определенную стратегию лечения [9].

Кроме того, такие опухоли реагируют на химиотерапию, основанную на препаратах платины, что было подтверждено для пациентов с раком яичников и молочной железы — носителей мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* [10]. Идентификация герминальных мутаций в генах системы репарации ДНК является важной для родственников пациента обоих полов, поскольку может быть полезной для медико-генетического консультирования семьи, в том числе выявления предрасположенности к раку и определения стратегии снижения риска возникновения заболевания. Однако необходимо проведение проспективных исследований по оценке прогностической значимости мутаций в генах репарации ДНК и их влияния на клинический исход заболевания.

Список литературы

1. Jemal A, Bray F, Center MM et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61:69-90.
2. Barbieri CE, Baca SC, Lawrence MS et al. Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer. *Nat Genet.* 2012;44:685-689.
3. Cancer Genome Atlas Research Network. The molecular taxonomy of primary prostate cancer. *Cell.* 2015;163:1011-1025.
4. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2009;25(14):1754-1760.
5. DePristo MA, Banks E, Poplin R et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nature genetics.* 2011;43(5):491-498.
6. Yang H, Wang K. Genomic variant annotation and prioritization with ANNOVAR and wANNOVAR. *Nature protocols.* 2015;10(10):1556-1566.
7. Castro E, Goh C, Olmos D et al. Germline BRCA mutations are associated with higher risk of nodal involvement, distant metastasis, and poor survival outcomes in prostate cancer. *J Clin Oncol.* 2013;31: 1748-1757.
8. Jeggo PA, Pearl LH, Carr AM. DNA repair, genome stability and cancer: a historical perspective. *Nat Rev Cancer.* 2016;16:35-42.
9. Mateo J, Carreira S, Sandhu S et al. DNA-repair defects and olaparib in metastatic prostate cancer. *N Engl J Med.* 2015; 373:1697-708.
10. Isakoff SJ, Mayer EL, He L et al. TBCRC009: a multicenter phase II clinical trial of platinum monotherapy with biomarker assessment in metastatic triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol.* 2015;33:1902-9.

Germline mutations in the DNA repair system genes in prostate cancer patients

Gilyazova I.R.^{1,2}, Kunsbaeva G.B.², Yankina M.A.¹, Mustafin A.T.³, Safiullin R.I.³, Pavlov V.N.³, Khusnutdinova E.K.^{1,2}

¹ — Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Science Centre, RAS, e-mail: gilyazova_irina@mail.ru

² — Bashkir State University, e-mail: kuncbaevagulnaz@mail.ru

³ — Bashkir State Medical University, e-mail: 021gen@mail.ru

Timeliness. Prostate cancer (PC) is clinically and genetically heterogeneous disorder characterized by high prevalence and mortality. **The aim.** Germline mutations analysis in PC patients. **Methods.** DNA samples from blood and normal prostate tissues from 8 PC patients. Analysis of mutations was carried using whole exome sequencing. **Results.** In PC patients a number of pathogenic mutations in DNA repair system genes was found. **Conclusions.** The data supply information on molecular characterization of PC and contribute to the genetic counseling and treatment strategies of PC.

Keywords: prostate cancer, mutations, DNA repair system