

Гены *BRCA1* и *BRCA2*: популяционные особенности развития рака молочной железы у татарских женщин

Бровкина О.И.¹, Гордиев М.Г.², Шигапова Л.Х.³, Дружков М.О.²,
Шагимарданова Е.И.³, Еникеев Р.Ф.², Ходырев Д.С.¹, Гусев О.А.^{3,4}, Никитин А.Г.¹

¹ — Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий
Федерального медико-биологического агентства, Москва, e-mail: brov.olia@gmail.com

² — Государственное автономное учреждение здравоохранения «Республиканский клинический онкологический диспансер
Министерства Здравоохранения Республики Татарстан», г. Казань, e-mail: marat7925@gmail.com

³ — Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, e-mail: oleg.gusev@riken.jp

⁴ — RIKEN, г. Йокогама, Япония.

Целью настоящей работы является определение распределения частот встречаемости мутаций генов *BRCA1* и *BRCA2* среди татарских женщин. Методом секвенирования нового поколения (NGS) были проанализированы гены *BRCA1* и *BRCA2* в 56 образцах крови от пациенток из татарской популяции с наследственным раком молочной железы (РМЖ). В качестве группы сравнения были взяты 15 образцов крови от пациенток славянского происхождения. По результатам анализа 56 пациенток с наследственных РМЖ татарской национальности было выявлено 16 мутаций в генах *BRCA1/BRCA2* (28%). Была обнаружена существенная разница в распространенности мутации 5382insC у женщин славянского и татарского происхождения, больных РМЖ.

Ключевые слова: популяционные исследования, *BRCA1*, *BRCA2*, NGS анализ

Введение

В настоящее время в мире известно более 3000 мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* [1]. Распространенность мутаций генов *BRCA1* и *BRCA2* значительно варьирует в зависимости от принадлежности к этническим группам и географическому региону. Особенность спектра мутаций в России заключается в преобладании пяти частых мутаций (5382insC, C61G, 185delAG, 4154delA, 2080delA), которые охватывают до 90% всего спектра. С наибольшей частотой у женщин, проживающих в достаточно отдаленных друг от друга регионах России, встречается одна из этих мутаций — 5382insC в экзоне 20 гена *BRCA1* (от 68 до 90%) [2]. Помимо 5382insC, у российских пациентов РМЖ и РЯ наблюдается относительно высокая частота мутаций *BRCA1* 4154delA и *BRCA1* 185delAG, но почти вся информация, полученная в отношении наследственного РМЖ и рака яичников (РЯ) в России, относится к женщинам славянского происхождения [2–3]. Есть основание полагать, что представительницы других этнических групп, населяющих РФ, имеют отличный от славян спектр мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2*, и принятые диагностические процедуры по поиску только распространенных в славянской популяции мутаций могут привести к большому числу ложноотрицательных результатов [3–4]. Таким образом, основной задачей данной работы было выявление особенностей распределения частот встречаемости мутаций генов *BRCA1* и *BRCA2* среди татарских женщин.

Материалы и методы

Методом секвенирования нового поколения (NGS) были проанализированы гены *BRCA1* и *BRCA2* в 56 образцах крови от пациенток с наследственным РМЖ,

проходивших обследование в Республиканском клиническом онкологическом диспансере Министерства здравоохранения Республики Татарстан (г. Казань) в 2014–2016 гг. и подписавших информированное согласие на проведение исследования. Критерии включения были следующими: молодой возраст возникновения РМЖ (до 40 лет), отягощенный семейный анамнез (наличие одного и более РМЖ или РЯ у родственниц первой или второй степени родства), самоидентификация больных к татарскому этносу (не менее чем в двух поколениях в роду все родственники должны принадлежать к татарскому этносу).

ДНК из лейкоцитов периферической крови выделялась с использованием набора NucleoSpin tissue kit («Macherey Nagel»). Концентрация ДНК была измерена на спектрофотометре NanoVue Plus («GE Healthcare») и составляла 30–50 нг/мкл. Подготовка библиотек для секвенирования осуществлялась с помощью NimbleGen SeqCapEZ Choice («Roche»). Секвенирование проводилось на приборе Illumina MiSeq («Illumina»). Картирование прочтений на референсную последовательность генома человека (hg19) проводилось при помощи алгоритмов BWA-MEM, Bowtie2, SNAP, качество исходных данных, выравнивания, обогащения и покрытия целевых регионов проверялось с помощью FastQC, BAMQC и NGSrich.

Поиск нуклеотидных вариаций выполнялся с помощью GATK HaplotypeCaller, Samtools, FreeBayes. Полученные VCF-файлы всех комбинаций алгоритмов выравнивания и поиска вариаций объединялись методом опорных векторов, что увеличивало общие показатели чувствительности и специфичности при выявлении мутаций.

Консенсусный VCF-файл обрабатывался с использованием программы SnpSift (глубина прочтения более 10) и аннотировался с помощью SnpEff (анализ всех транскриптов), ANNOVAR (анализ частот аллелей в ExAC, 1000G и ESP6500, алгоритмы проверки функциональной значимости SIFT, PolyPhen2, MutationTaster, FATMM, CADD, DANN, Eigen) и Alamut Batch (влияние на сплайсинг, базы данных dbSNP, ClinVar, HGMD Professional).

Среднее покрытие составило 835x, доля корректно картированных прочтений — 99,6%, доля целевых регионов с покрытием выше 100x — 96,2%.

Учитывая описанные в литературе проблемы с секвенированием парафиновых блоков по технологии AmpliSeq (Ion Torrent/Proton), было решено проанализировать выбранную нами методику на двух образцах архивных парафиновых блоков (4 среза толщиной 10 мкм) с известным статусом мутаций. Для выделения ДНК использовали набор QIAamp DNA FFPE Tissue Kit («Qiagen»). Концентрация выделенной ДНК составляла 5–10 нг/мкл. Пробоподготовка и биоинформационный анализ были аналогичными описанным выше.

Среднее покрытие составило 211x, доля корректно картированных прочтений — 99,2%, доля целевых регионов с покрытием выше 100x — 87,3%, но средняя длина прочтения составила 119 п.н. по сравнению с 214 п.н. для ДНК из крови, что при среднем размере ампликонов в 200 п.н. в панели Ion AmpliSeq *BRCA1/BRCA2* может объяснять неудовлетворительные результаты секвенирования ДНК из парафиновых блоков с применением этой технологии.

Для сравнения частот встречаемости мутаций были проанализированы 15 образцов крови от пациентов славянского происхождения, проходивших обследование в Федеральном научно-клиническом центре ФМБА России (г.Москва) в 2014–2016 гг. и подписавших информированное согласие на проведение исследования. Критериями включения были молодой возраст возникновения РМЖ (до 40 лет) и отягощенный семейный анамнез (наличие одного и более РМЖ или РЯ у родственников первой или второй линии родства). ДНК из лейкоцитов периферической крови выделялось с использованием набора QIAamp DNA Blood Mini QIAcube Kit («Qiagen»). Наличие мутаций устанавливали с помощью тест-системы ОнкоГенетика BRCA («ДНК-Технология») для ПЦР «в реальном времени».

Результаты и обсуждение

Полученные данные секвенирования 56 образцов пациенток с наследственным РМЖ можно разделить на две группы.

К первой группе (описанных в литературе патогенных мутаций) можно отнести 3 мутации в гене *BRCA1* и 5 в гене *BRCA2* (табл. 1).

При этом 2 мутации относились к частым (NM_007300.3:c.5329dup и NM_007294.3:c.181T>G).

Ко второй группе предположительно патогенных мутаций по данным компьютерного анализа можно отнести 5 мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* (табл. 2).

Характеристика выявленных патогенных мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2*

Таблица 1

Ген	Координата	Транскрипт:кДНК	Белок	Количество
<i>BRCA2</i>	chr13:32900279	NM_000059.3:c.468dup	p.Lys157*	1
<i>BRCA1</i>	chr17:41215382	NM_007294.3:c.5161C>T	p.Gln1721*	2
<i>BRCA1</i>	chr17:41209079	NM_007300.3:c.5329dup	p.Gln1777Profs*74	2
<i>BRCA1</i>	chr17:41258504	NM_007294.3:c.181T>G	p.Cys61Gly	2
<i>BRCA2</i>	chr13:32907409	NM_000059.3:c.1796_1800del	p.Ser599*	1
<i>BRCA2</i>	chr13:32968950	NM_000059.3:c.9381G>A	p.Trp3127*	1
<i>BRCA2</i>	chr13:32968836	NM_000059.3:c.9269del	p.Phe3090Serfs*14	1
<i>BRCA2</i>	chr13:32906576	NM_000059.3:c.965_966dup	p.Val323Lysfs*2	1

Предположительно патогенные мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2*

Таблица 2

Ген	Координата	Транскрипт:кДНК	Белок	Количество
<i>BRCA2</i>	chr13:32912181	NM_000059.3:c.3689C>T	p.Ser1230Phe	1
<i>BRCA2</i>	chr13:32930673	NM_000059.3:c.7544C>T	p.Thr2515Ile	1
<i>BRCA1</i>	chr17:41223048	NM_007294.3:c.4883T>C	p.Met1628Thr	1
<i>BRCA2</i>	chr13:32972745	NM_000059.3:c.10095_10096insT	p.Ser3366*	1
<i>BRCA2</i>	chr13:32913562	NM_000059.3:c.5070A>C	p.Lys1690Asn	1

По результатам анализа ПЦР «в реальном времени» среди женщин славянского происхождения была выявлена мутация 5382insC в 67% случаев. Эта же мутация обнаруживалась лишь в 7% случаев у татарских женщин. Таким образом, мы подтвердили предположение о том, что ПЦР-наборы, которые используют для поиска мутаций в генах *BRCA1/BRCA2* в РФ, у пациенток татарского происхождения выявляют мутации гораздо в меньшем числе случаев.

Метод NGS позволил выявить редкие мутации, характерные для татарского этноса, что дает возможность исследовать обнаруженные мутации путем секвенирования по Сэнгеру у родственников пациенток.

Результаты анализа образцов из парафиновых блоков совпали с известным статусом мутаций. Таким образом мы подтвердили возможность использования парафиновых блоков для анализа герминальных мутаций методом NGS с помощью NimbleGen SepCapEZ Choice («Roche»), но для анализа соматических мутаций необходимо повышать качество и количество выделяемой ДНК.

Выводы

В результате проведенного NGS-анализа 56 пациенток с наследственных РМЖ татарской национальности было выявлено 13 мутаций у 16 пациенток в генах *BRCA1/BRCA2* (28%). Использование только коммерче-

ских ПЦР-наборов для определения мутаций в генах *BRCA1, BRCA2* у татарских пациенток приводит к большому количеству ложноотрицательных результатов, поэтому при отсутствии мутаций по результатам ПЦР-анализа рекомендуется проводить анализ методом NGS.

В рамках данного проекта планируется дальнейший анализ мутаций в генах репарационной системы, таких, как *ATM, FANCI, FANCL, PALB2, RAD51B, RAD51C, RAD54L, RAD51D, CHEK1, CHEK2, CDK12, BRIP1, PPP2R2A, BARD1, XRCC3, APC, CDH1, MUTYH*, представляющих собой исключительный клинический интерес. Также планируется более широкое использование парафиновых блоков для выявления мутаций в генах системы репарации.

Список литературы

1. Online NHGRI: Breast Cancer Information Core. URL: <https://research.nhgri.nih.gov/bic/>. (дата обращения 04.07.2016).
2. Имянитов Е.Н. Наследственный рак молочной железы // Практическая онкология. — 2010. — Т11(4). — С. 258-266.
3. Любченко Л.Н. Наследственный рак молочной железы и/или яичников: ДНК-диагностика, индивидуальный прогноз, лечение и профилактика: дис. д-ра мед. наук — М.: 2009. — 281 с.
4. Хасанова А.И., Гордиев М.Г., Ратнер Е.Ю. и др. BRCA-ассоциированный рак молочной железы у представительниц татарской национальности на примере клинического случая // Приволжский онкологический вестник. — 2016. — Т2(24). — С. 104-108.

BRCA1 and BRCA2 genes: population aspects of breast cancer between Tatar woman

Brovkina O.I.¹, Gordiev M.G.², Shigapova L.H.⁴, Druzhkov M.O.², Shagimardanova E.I.³, Enikeev R.F.², Khodyrev D.S.¹, Gusev O.A.^{3,4}, Nikitin A.G.¹

¹ — Federal Research and Clinical Center of Federal medical-biology agency of Russia (Moscow, Russia), e-mail: brov.olia@gmail.com

² — Tatarstan Cancer Center (Kazan, Russia), e-mail: marat7925@gmail.com

³ — Kazan Federal University (Kazan, Russia), e-mail: oleg.gusev@riken.jp

⁴ — RIKEN (Yokohama, Japan)

The aim of this work is a definition of occurrence frequency distribution of *BRCA1* and *BRCA2* genes mutations between Tatar woman. By next generation sequencing (NGS) method we analyzed *BRCA1* and *BRCA2* genes in 56 blood samples from Tatar population patients with hereditary breast cancer (BC). 15 blood samples from patients with Slavic origin were taken as a comparison group. The analysis results show that between 56 Tatar origin patients with hereditary BC was identified 16 mutations in *BRCA1/BRCA2* genes (28%). It was found significant difference in the presence of 5382insC mutation between Slavic and Tatar woman.

Key words: population searches, *BRCA1, BRCA2*, NGS analysis