

Результаты использования новой медицинской технологии комплексной ДНК-диагностики ретинобластомы

Алексеева Е.А.^{1,2}, Бабенко О.В.¹, Козлова В.М.³, Ушакова Т.Л.³, Саакян С.В.⁴,
Танас А.С.^{1,5}, Немцова М.В.², Стрельников В.В.^{1,5}, Залетаев Д.В.^{1,2,5}

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр»,
Москва, 115478, ул. Москворечье, д. 1; e-mail: ekater.alekseeva@gmail.com

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения
Российской Федерации, Москва, 119991, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2; e-mail: zalnem@mail.ru

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 115478, Каширское шоссе, д. 24;
e-mail: valentine-mk2011@yandex.ru

⁴ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней
им. Гельмгольца» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Москва, 105062, ул. Садовая-Черногрозская, д. 14/19; e-mail: kanc@igb.ru

⁵ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Пирогова» Министерства здравоохранения
Российской Федерации, Москва, 117997, ул. Островитянова, д. 1; e-mail: vstrel@list.ru

Проведено комплексное молекулярно-генетическое обследование больных с ретинобластомой. Для диагностики заболевания использовалась внедренная в практическую деятельность ФГБНУ «МГНЦ» новая медицинская технология, включающая методы таргетного высокопроизводительного параллельного секвенирования ДНК и мультиплексной амплификации лигированных зондов (MLPA). Поиск точечных мутаций и коротких инсерций/делеций в гене *RB1* осуществляли с применением секвенирования нового поколения на приборе Ion Torrent PGM. Для выявления протяженных делеций в гене *RB1* использовали метод MLPA. В группе пациентов с билатеральной формой ретинобластомы мутации в гене *RB1* выявлены в 96,4% случаев. В выборке больных с односторонней формой заболевания генетические нарушения обнаружены у 31,7% пациентов. Методом MLPA выявлены соматические делеции в гене *RB1* в ДНК опухолей у 47,6% пациентов и герминальные делеции — у 4,4% больных.

Ключевые слова: ретинобластома, ген *RB1*, медицинская технология, высокопроизводительное параллельное секвенирование ДНК, MLPA.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

The results of the use of new medical technology for comprehensive DNA analysis in retinoblastoma

Alekseeva E.A.^{1,2}, Babenko O.V.¹, Kozlova V.M.³, Sahakyan S.V.⁴,
Tanas A.S.^{1,5}, Nemtsova M.V.², Strelnikov V.V.^{1,5}, Zaletayev D.V.^{1,2,5}

¹ Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation, 115478, Moskvorechie st. 1,
e-mail: ekater.alekseeva@gmail.com

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation, 119991, Trubetskaya st. 8,
e-mail: zalnem@mail.ru

³ N.N. Blokin Russian Research Center for Oncology, Moscow, Russian Federation, 115478, Kashirskoe highway, 24,
e-mail: valentine-mk2011@yandex.ru

⁴ Helmholtz Moscow Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation, 105062, Sadovaya-Chernogryazskaya st. 14/19;
e-mail: kanc@igb.ru

⁵ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation, 117997, Ostrovityanova st. 1,
e-mail: vstrel@list.ru

We performed a comprehensive molecular genetic examination of patients with retinoblastoma. For establish molecular diagnosis of the disease, we applied a set of new medical technologies, including targeted high-throughput parallel DNA sequencing (NGS) and multiplex ligation probe amplification (MLPA). Search for point mutations and small indels in *RB1* gene was carried out with next generation sequencing on the Ion Torrent PGM. To detect extended deletions in the *RB1* gene MLPA method was used. In a group of patients with a bilateral form of the disease, mutations in the *RB1* gene were detected in 96.4% of cases. In a sample of patients with a unilateral form of the disease, genetic abnormalities were found in 31.7% of patients. MLPA technique has allowed us to identify somatic deletions in the *RB1* gene in tumors of 47.6% patients and germline deletions in 4.4% patients.

Key words: retinoblastoma, *RB1* gene, medical technology, NGS, MLPA.

Ретинобластома — наиболее частая интраокулярная опухоль сетчатки глаза, развивающаяся у детей, как правило, до пяти лет [1]. Опухоль возникает из эмбриональных клеток сетчатки с частотой 1:15000—20000 новорожденных [2]. Основными клиническими признаками ретинобластомы являются лейкокория («кошачий глаз»), косоглазие, изменение цвета радужки, воспаление и уменьшение остроты зрения. Опухоль характеризуется высокой степенью злокачественности, инвазивностью и способностью быстро метастазировать в соседние органы и ткани. Без ранней диагностики и надлежащего лечения ретинобластома быстро прорастает в ткани глаза и метастазирует в центральную нервную систему и отдаленные органы [1, 3].

Основной причиной развития ретинобластомы является инактивация обоих аллелей гена *RB1* в клетках опухоли [4].

Выделяют наследственную и спорадическую формы заболевания [4]. Наследственная форма ретинобластомы обусловлена наличием герминальной мутации в одном из аллелей гена *RB1* и встречается у 40% больных, причём 10% составляют семейные случаи, а в 30% заболевание является результатом мутации *de novo*. Опухоль развивается при инактивации второго аллеля гена в клетках сетчатки (соматическая мутация) у детей в раннем возрасте. Заболевание передается по аутосомно-доминантному типу наследования с пенетрантностью 90% [4, 5]. Наследственная ретинобластома представляет собой, как правило, мультифокальную опухоль, которая возникает в более раннем возрасте по сравнению со спорадической формой. При наследственной ретинобластоме поражение глаз в 2/3 случаев носит двусторонний характер (билатеральная форма) и в 1/3 — односторонний характер (унилатеральная форма) [1].

При спорадической форме ретинобластомы (60% случаев) инактивация обоих аллелей гена *RB1* происходит только в клетках сетчатки (две соматические мутации). Спорадическая форма проявляется как унилатеральная монофокальная опухоль и диагностируется, как правило, после 2 лет [1, 4].

Следовательно, своевременное молекулярно-генетическое исследование изменений в гене *RB1* при ретинобластоме необходимо для подтверждения или исключения наследственного характера заболевания, что позволяет выбрать адекватный алгоритм наблюдения и лечения опухоли и определить прогноз для всех членов семьи, а также планировать дальнейшее деторождение. Кроме того, при наследственной форме ретинобластомы ген *RB1* поврежден во всех соматических клетках, для таких пациентов существует большой риск развития других опухолей различной локализации [6, 7].

Ген-супрессор *RB1* картирован на длинном плече хромосомы 13 в районе 13q14.1, занимает около 183 т.п.н. и состоит из 27 экзонов [4]. Молекулярные нарушения, описанные в гене *RB1*, представлены широ-

ким спектром генетических изменений: точковые мутации (нонсенс-мутации, миссенс-мутации, мутации сайта сплайсинга), короткие инсерции/делеции и протяженные делеции. Мутации распределены по всей кодирующей последовательности гена *RB1* равномерно [6, 7]. Таким образом, значительная протяженность гена и отсутствие в нем «горячих» точек делают молекулярно-генетическую диагностику заболевания трудоемкой и продолжительной по времени.

Кроме того, дополнительной трудностью в диагностике ретинобластомы является выявление мозаичных соматических мутаций, которые возникают в раннем эмбриогенезе, и для обнаружения которых требуются высокоразрешающие методики. Примерно в 10% семей первоначальная мутация в гене *RB1* является мозаичной. Способность идентифицировать мозаичный вариант мутации в гене *RB1* имеет важное значение для генетического консультирования, поскольку мозаицизм повышает риск развития опухоли в другом глазу, других опухолей и передачи мутации следующему поколению [6].

Применение высокопроизводительного параллельного секвенирования (ВПС) позволяет сделать поиск структурных изменений в гене *RB1* более эффективным и относительно экономичным. Однако, поскольку методы секвенирования позволяют выявить только однонуклеотидные замены, небольшие инсерции и делеции, необходимо включить в протокол комплексной диагностики ретинобластомы метод MLPA для обнаружения протяженных делеций, которые также характерны для этого заболевания.

Совокупность этих двух методов позволяет охватить практически полный спектр генетических нарушений у больных с ретинобластомой, что способствует проведению грамотного и объективного медико-генетического консультирования.

Материалы и методы

Клинический материал

Обследован 91 пациент с ретинобластомой, среди которых 28 пациентов с билатеральной формой заболевания и 63 — с унилатеральной.

Скрининг точковых мутаций, малых инсерций/делеций в гене *RB1* осуществляли методом ВПС.

Скрининг протяженных делеций в гене *RB1* проводили методом MLPA.

Молекулярный анализ гена *RB1* проводили в ДНК из фиксированных формалином тканей опухолей и ДНК из лимфоцитов периферической крови (21 пациент). Такой подход обусловлен необходимостью определения характера молекулярной патологии гена — является ли повреждение герминальным или носит только соматический характер. При отсутствии материала опухоли исследование проводили только на ДНК из лимфоцитов периферической крови (70 пациентов).

Выделение ДНК

Выделение ДНК из тканей и лимфоцитов периферической крови проводили стандартным методом фенол-хлороформной экстракции.

Выделение ДНК из фиксированных формалином тканей опухолей проводили с использованием коммерческого набора «QIAamp DNA FFPE Tissue Kit» («QIAGEN», Германия) по протоколу, рекомендованному производителем.

Высокопроизводительное параллельное секвенирование

ВПС гена *RB1* проводили на приборе Ion Torrent PGM (Life Technologies, США) в ФГБНУ «МГНЦ». Панель праймеров для секвенирования разработана с использованием программного обеспечения AmpliSeq Designer (Life Technologies). Таргетные регионы включают все кодирующие последовательности гена *RB1*, прилегающие области интронов и 5', 3'-нетранслируемые области (UTR). Для создания библиотек использовали реагенты Ion AmpliSeq Library Kit2.0 (Life Technologies). Реакцию проводили по стандартному протоколу, рекомендованному производителем.

Клональную эмульсионную ПЦР проводили с использованием PGM Template OT2 200 Kit (Life Technologies) на приборе Ion One Touch 2 в соответствии с протоколом производителя. Секвенирование мультиплексированных образцов выполняли на секвенаторе Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) на чипах Ion 318 с использованием Ion PGM Sequencing 200 Kit (Life Technologies) по протоколу производителя.

Результаты секвенирования анализировали с использованием программного обеспечения Torrent Suite, в составе: Base Caller (первичный анализ результатов секвенирования); Torrent Mapping Alignment Program — TMAP (выравнивание последовательностей относительно референсного генома NCBI build 37 — hg19); Variant Caller (анализ вариаций нуклеотидных последовательностей). Аннотацию функционального значения генетических вариаций и фильтрацию известных полиморфизмов с использованием базы данных dbSNP проводили с использованием компьютерной программы ANNOVAR. Визуальный анализ данных, ручную фильтрацию артефактов секвенирования и выравнивания последовательностей осуществляли с использованием программы Integrative Genomics Viewer — IGV.

С целью верификации выявленных точковых мутаций применяли секвенирование по Сэнгеру, с предварительной амплификацией целевых фрагментов генов методом ПЦР.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

В состав реакционной смеси для ПЦР входили следующие реагенты: 2,5 мкл 10х буфера для ПЦР (50 mM KCl, 10 mM трис-HCl, pH 8,4), по 200 мкМ каждого dNTP, 0,2 е.а. Таq-полимеразы. Оптимальное содержание MgCl₂ и праймеров в буфере подбирали экспери-

ментальным путем. В реакционную смесь добавляли 100 нг геномной ДНК. Объем реакционной смеси доводили деионизированной водой до 25 мкл. Сверху наслаивали 40—60 мкл вазелинового масла. Прогревали смесь при 94°C в течение 10 мин и проводили 35 циклов по следующей программе: 95°C — 1 мин, T_{отжига} праймеров — 1 мин, 72°C — 30 с.

ПЦР проводили в программируемом термоциклере MC2 фирмы «ДНК-технология», Москва.

Продукты реакции детектировали методом вертикального электрофореза в 8% ПААГ при напряжении 600 В. Визуальный контроль пробега фрагментов ДНК осуществляли по красителям ксиленианолу и бромфеноловому синему. По окончании электрофореза гель окрашивали нитратом серебра. Маркером молекулярного веса служили фрагменты плазмиды pUC19, полученные в результате ее обработки рестриктазой HpaII («СибЭнзим», Новосибирск).

Секвенирование ДНК по Сэнгеру

Определение нуклеотидных последовательностей продуктов ПЦР проводили с использованием секвенирования по Сэнгеру в соответствии с протоколом фирмы-производителя «Applied Biosystems», США. Капиллярный электрофорез меченых фрагментов осуществляли на генетическом анализаторе ABI3500 по протоколу ABI Prism 3500 Genetic Analyzer Kits («Applied Biosystems»). Полученные результаты секвенирования анализировали с использованием программы Chromas и сопоставляли с базой данных GenBank с помощью алгоритма BLAST.

Анализ количества копий гена *RB1*

Анализ протяженных делеций гена *RB1* в ДНК материала опухоли и крови пациентов осуществляли с использованием мультиплексной пробзависимой лигазной реакции (MLPA, multiplex ligation-dependent amplification). Реакцию MLPA проводили по стандартному протоколу, рекомендованному производителем (MRC-Holland, <http://www.mlpa.com>). В работе использовали набор: MRC-Holland SALSA® MLPA® P047-D1 RB1.

Капиллярный электрофорез продуктов MLPA проводили на генетическом анализаторе ABI3500 в соответствии с протоколом ABI Prism 3500 Genetic Analyzer Kits («Applied Biosystems»). Полученные данные обрабатывали с использованием программного обеспечения Coffalyser.NET, предоставленного компанией MRC-Holland.

Результаты и обсуждение

В настоящем исследовании применен комплексный подход, включающий ВПС и MLPA, для выявления молекулярно-генетических изменений в гене *RB1* у больных с ретинобластомой.

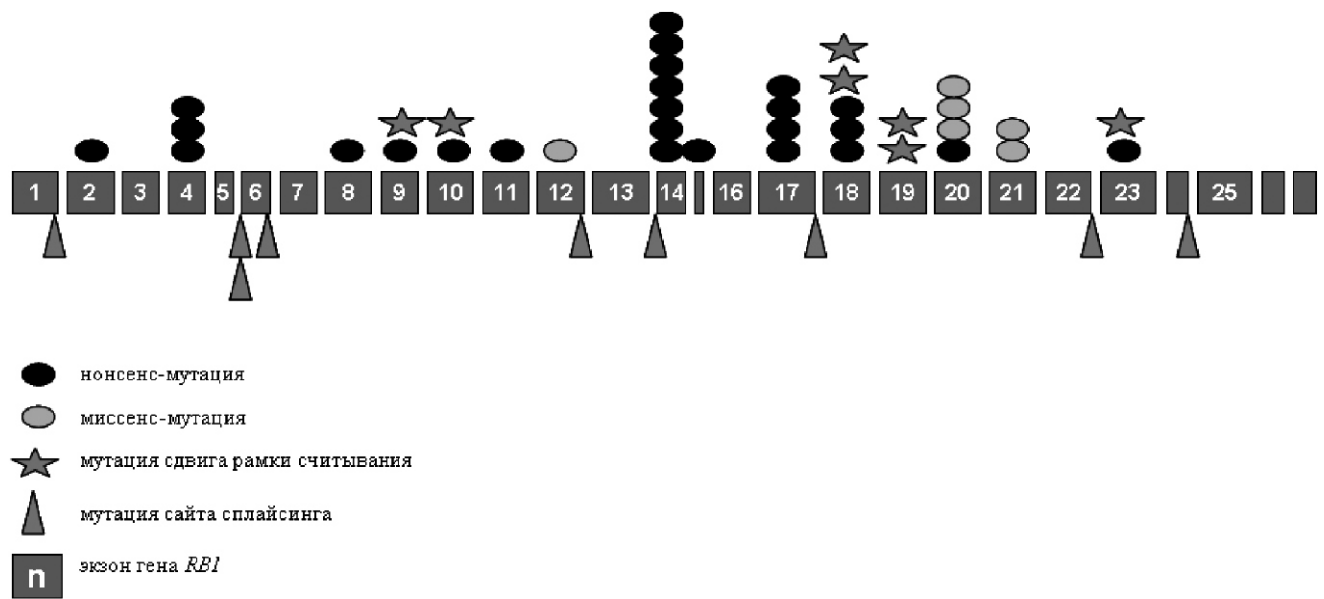


Рис. 1. Распределение и спектр мутаций, обнаруженных в гене *RB1*, по результатам ВПС ДНК (собственные данные).

В результате скрининга точковых мутации и коротких инсерций/делетий в гене *RB1* методом секвенирования нового поколения в выборке из 28 больных с двусторонней формой заболевания, изменения обнаружены в 96,4% (27/28) случаев. В группе из 63 больных с односторонней формой заболевания генетические нарушения выявлены у 31,7% (20/63) пациентов.

В результате проведенного исследования на всем протяжении кодирующих и прилежащих областей гена *RB1* выявлена 31 мутация в ДНК из лимфоцитов периферической крови и 23 мутации в ДНК опухолевого материала. Всего в гене *RB1* в исследованной выборке пациентов выявлено 47 мутаций (у 21 пациента, у которых одновременно исследовались ДНК ткани опухоли и периферической крови, одинаковые мутации, выявленные в ДНК ткани опухоли и периферической крови, принимались за одну). Выявлен полный спектр аномалий (табл. 1 и рис. 1), представленный нонсенс-мутациями

(53,2% (25/47)), мутациями сайтов сплайсинга (19,1% (9/47)), малыми делециями/инсерциями, приводящими к сдвигу рамки считывания (14,9% (7/47)) и миссенс-мутациями (12,8% (6/47)).

Как видно из табл. 1, в нашем исследовании самым распространенным классом мутаций *RB1* являются нонсенс-мутации. Выявленные мутации в гене *RB1* распределены по всему гену, за исключением экзонов 3, 5, 7, 13, 16, 25, 26, 27. Отсутствие мутаций в экзонах 3, 5, 7, 13, 16 и 25 может быть связано с размером выборки. Кроме того, низкая представленность мутаций в экзонах 5, 13 и 25 коррелирует с результатами других исследователей [8, 9]. Мутации в экзонах 26 и 27 практически не встречаются [9]. В исследованной выборке пациентов с ретинобластомой наиболее часто мутации встречались в экзонах 14, 17, 18 и 20 гена *RB1*, что также согласуется с распределением мутаций в этом гене, выявленным другими авторами [8, 9] (рис. 1).

Таблица 1

Спектр мутаций, обнаруженных в гене <i>RB1</i> , по результатам ВПС ДНК (собственные данные)		
Тип мутации	Билатеральная форма	Унилатеральная форма
Нонсенс-мутации	с.1735C>T ² ; с.409G>T; с.460A>T; с.1030C>T; с.1654C>T ³ ; с.763C>T; с.1363C>T ² ; с.179T>G; с.1072C>T; с.958C>T; с.1333C>T	с.1399C>T; с.2104C>T; с.409G>T; с.751C>T; с.1363C>T ³ ; с.880A>T; с.1688G>A; с.2359C>T
Миссенс-мутации	с.2084T>T	с.2069A>G; с.2134T>C ² ; с.1981C>T; с.1161G>A
Мутации сайтов сплайсинга	с.607+1G>T; с.608-12T>G; с.1215+1G>T; с.2520+1delGAGT; с.137+1G>T; с.1695+5G>T; с.2325+1G>T; с.540-2A>G	с.1333-1G>A
Мутации сдвига рамки считывания	с.2356delC; с.1724delA; с.1736delG	с.1875delT; с.1887delGA; с.865delA; с.1014delTC

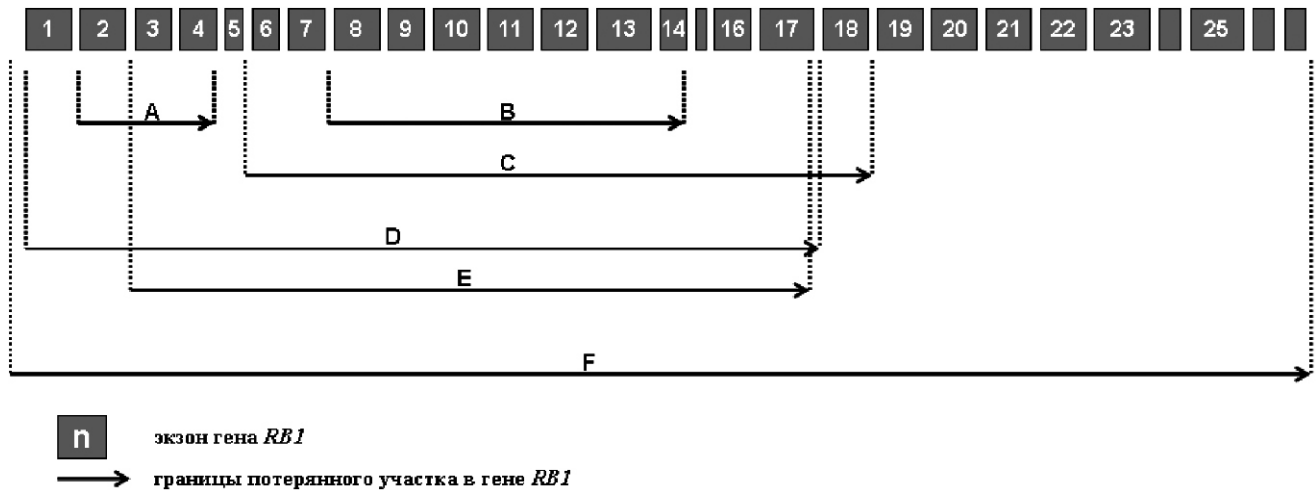


Рис. 2. Протяженные делеции в гене *RB1*, выявленные методом MLPA, в выборке пациентов с ретинобластомой:

- A. 1:10 пациентов с соматической делецией в гене *RB1* (экзоны 2–4);
 B. 1:10 пациентов с соматической делецией в гене *RB1* (экзоны 8–14);
 C. 1:10 пациентов с соматической делецией в гене *RB1* (экзоны 6–18);
 D. 1:4 пациентов с герминальной делецией в гене *RB1* (экзоны 1–17);
 E. 1:4 пациентов с герминальной делецией в гене *RB1* (экзоны 3–17);
 F. 7:10 пациентов с соматической делецией и 2/4 пациентов с герминальной делецией в гене *RB1* (экзоны 1–27).

В гене *RB1* выявлено 5 мутаций (табл. 1 и табл. 2), которые встречались в исследованной выборке пациентов более 1 раза. Эти мутации составили 29,8% (14/47) среди всех молекулярных изменений, обнаруженных методом секвенирования нового поколения. Согласно литературным источникам, выделяют около 14 мутаций в гене *RB1*, которые являются часто встречающимися при ретинобластоме [8]. Для большинства таких мутаций характерна замена С>Т в аргининовом кодоне, приводящая к образованию стоп-кодона [6, 8].

Использование метода MLPA позволило нам выявить соматические делеции в гене *RB1* в ДНК опухолей у 47,6% пациентов и герминальные делеции — у 4,4% больных. Делеции включали несколько экзонов, либо захватывали весь ген (рис. 2).

Таким образом, в настоящей работе методами ВПС и MLPA в группе пациентов с билатеральной формой заболевания герминальная мутация выявлена в 96,4% (27/28) случаев. В 100% (4/4) случаев в гене *RB1* в материале опухоли пациентов с двусторонней формой ретинобластомы выявлено 2 изменения (герминальная и соматическая мутации) в обоих аллелях гена, приводящих к его инактивации.

В группе больных с унилатеральной формой заболевания герминальная мутация определена в 14% (9/63) случаев, то есть установлена наследственная форма заболевания. У 4 из 9 пациентов герминальные мутации представлены миссенс-мутацией (табл. 1). В 1 из 9 случаев выявлен мозаичный вариант герминальной нон-сенс-мутации, приводящий к развитию односторонней формы заболевания. У 4/9 пациентов выявлены протяженные делеции в гене *RB1*. В 88,2% (15/17) случаев в гене *RB1* в материале опухоли пациентов с унилатеральной формой ретинобластомы выявлено 2 изменения (2 соматические мутации). В остальных случаях выявлено только одно событие в материале опухоли, такая ситуация может быть объяснена развитием опухоли вследствие других механизмов (метилование промоторного района гена *RB1* или амплификация гена *MYC*)

В 8 семьях, пробандами в которых были больные с унилатеральной формой ретинобластомы, установлен семейный характер заболевания, то есть мутация выявлена также у одного из родителей.

Таким образом, использование двух новых высокотехнологичных подходов в молекулярно-генетической

Таблица 2

Частые мутации, обнаруженные в гене *RB1*,
по результатам ВПС ДНК (собственные данные)

Экзоны гена <i>RB1</i>	Название мутации (кДНК)	Название мутации (белок)
Экзон 4	c.409G>T	p.E137X
Экзон 14	c.1363C>T	p.R455X
Экзон 18	c.1735C>T	p.R579X
Экзон 21	c.2134T>C	p.C712R

диагностике у пациентов с ретинобластомой обеспечивает эффективную диагностику заболевания и позволяет установить характер генетического нарушения за относительно короткое время. Кроме того, использование секвенирования нового поколения позволяет выявлять мозаичные варианты мутаций, что часто затруднено при использовании секвенирования по Сэнгеру.

Список литературы

1. Lohmann DR, Gallie BL. Retinoblastoma. In GeneReviews [Internet]. 2000 Jul [Updated 2015 Nov].
2. Kivela T. The epidemiological challenge of the most frequent eye cancer: retinoblastoma, an issue of birth and death. Br J Ophthalmol 2009; 93: 1129-1131.
3. Козлова ВМ, Казубская ТП, Соколова ИН и др. Ретинобластома: диагностика и генетическое консультирование. 2015; 2(1): 30-38.
4. Dommering CJ, Mol BM, Moll AC et al. *RB1* mutation spectrum in a comprehensive nationwide cohort of retinoblastoma patients. J. Med. Genet. 2014; 51: 366-374.
5. Quinonez-Silva G, Davalos-Salas M, Recillas-Targa F et al. Monoallelic germline methylation and sequence variant in the promoter of the *RB1* gene: a possible constitutive epimutation in hereditary retinoblastoma. Clin Epigenetics. 2016; 8:1.
6. Li WL, Buckley J, Sanchez-Lara PA et al. A Rapid and Sensitive Next-Generation Sequencing Method to Detect *RB1* Mutations Improves Care for Retinoblastoma Patients and Their Families. The J. of Molec. Diagnostics. 2016; 18(4): 480-493.
7. Babenko OV, Saakian SV, Brovkina AF et al. Spectrum and frequencies of RB1 gene structural defects in retinoblastoma. Molecular Biology. 2002. 36(4): 487-492.
8. Valverde JR, Alonso J, Palacios et al. RB1 gene mutation up-date, a meta-analysis based on 932 reported mutations available in a searchable database. BMC Genet. 2005; 6: 53.