

Новые регионы с потерей гетерозиготности участков хромосом при спорадической ангиомиолипоме почки

Аношкин К.И.^{1,2}, Мосякова К.М.⁴, Карандашева К.О.¹, Пьянков Д.В.⁵,
Канивец И.В.⁵, Кузнецова Е.Б.^{1,3}, Танас А.С.^{1,2}, Шпот Е.В.⁴,
Винаров А.З.^{3,4}, Залетаев Д.В.^{1,2,3}, Стрельников В.В.^{1,2}

¹ — ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва, 115522, ул. Москворечье, д. 1; e-mail: anoshkiri@gmail.com

² — ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 117997, ул. Островитянова, д. 1; e-mail: vstrel@list.ru

³ — ФГБОУ ВО «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

⁴ — НИИ уронефрологии и репродуктивного здоровья человека Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, г. Москва, 119435, ул. Б. Пироговская д. 2, стр. 1; e-mail: Cristina.imago27@yandex.ru

⁵ — ООО «Геномед», Москва, 115093, Подольское шоссе д.8, корпус 5; e-mail: dp@genomed.ru

Спорадическая ангиомиолипوما (АМЛ) почки является наиболее распространенным типом доброкачественных опухолей в почках — 1 случай на 250 чел. Несмотря на бессимптомное течение, с увеличением размеров АМЛ растет и риск разрыва микро- и макроаневризм, что несет в себе угрозу для жизни пациента. Применение ингибиторов протеинкиназы mTOR приводит к редукции опухоли, однако оно показано только при наличии у пациента соматической или герминальной мутации в генах *TSC1* или *TSC2*, продукты которых являются эндогенными ингибиторами mTOR и регулируют каскад реакций в пути PI3K/Akt/mTOR. По данным базы COSMIC, лишь в 57% случаев АМЛ зафиксированы драйверные мутации в генах *TSC1* и *TSC2*, тогда как в остальных случаях причины возникновения АМЛ не ясны. Нами проведен скрининг геномных нарушений в 20 образцах спорадической АМЛ почки на уровне потери гетерозиготности (ПГ) участков хромосом методом высокопроизводительного параллельного секвенирования. В семи из двадцати образцов обнаружены ПГ разных участков хромосом. В пяти образцах ПГ локализована в области 16p13.3, где расположен ген *TSC2*. В трех образцах с нормальным аллельным состоянием области 16p13.3 нами зафиксированы альтернативные события: в одном случае — ПГ в регионе 15q14q15.1, и в другом — множественные ПГ (выраженная хромосомная нестабильность).

Ключевые слова: ангиомиолипوما, потеря гетерозиготности, высокопроизводительное параллельное секвенирование ДНК, хромосомный микроматричный анализ.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Работа выполнена в рамках государственного задания на выполнение НИР в 2018 году.

Novel chromosomal regions with loss of heterozygosity in sporadic angiomyolipoma of the kidney

Anoshkin K.I.^{1,2}, Mosyakova K.M.⁴, Karandasheva K.O.¹, Pyankov D.V.⁵,
Kanivets I.V.⁵, Kuznetsova E.B.^{1,3}, Tanas A.S.^{1,2}, Shpot E.V.⁴,
Vinarov A.Z.^{3,4}, Zaletayev D.V.^{1,2,3}, Strelnikov V.V.^{1,2}

¹ — Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation, 115522, Moskvorechie st.1, e-mail: anoshkiri@gmail.com

² — Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation, 117997, Ostrovityanova st. 1, e-mail: vstrel@list.ru

³ — I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation, 119991, Trubetskaya st. 8, e-mail: zalnem@mail.ru

⁴ — Scientific Research Institute of Human Morphology and Reproductive Health of the First Moscow State Medical University named after I.M. Sechenov, Moscow, 119435, Moscow, Bolshaya Pirogovskaya Street 2, Building 1; e-mail: Cristina.imago27@yandex.ru

⁵ — Genomed Ltd, Moscow, Russian Federation, 115093, Podolskoe highway 8, Building 5; e-mail: dp@genomed.ru

Sporadic angiomyolipoma of the kidney is the most common type of renal benign tumors with an estimated frequency of 1 case per 250 people. Despite the asymptomatic course, with the increase of the tumor size, the risk of rupture of micro- and macroaneurysms also increases, which threatens the patient's life. The use of mTOR protein kinase inhibitors leads to tumor reduction. However, such drugs are prescribed only if the patient has a somatic or germline mutation in the *TSC1* or *TSC2* genes the products of which are endogenous mTOR inhibitors in the reaction cascade of the PI3K/Akt/mTOR pathway. According to the COSMIC database, driver mutations in the *TSC1* and *TSC2* genes were identified only in 57% of angiomyolipoma cases, whereas the causes of the remaining cases are still not clear. We have conducted a loss of heterozygosity (LOH) screening in 20 sporadic kidney AML sam-

ples by use of the NGS. In seven of the twenty samples, LOH was found in different chromosome regions. In five samples, LOH encompasses the 16p13.3 region, where the *TSC2* gene is located. In two samples with the normal allelic state of the 16p13.3 region, we have detected alternative LOH events encompassing 15q14q15.1 in one case, and multiple chromosomal regions in another (high chromosomal instability).

Keywords: angiomyolipoma, loss of heterozygosity, NGS, Chromosomal Microarray Analysis.

Введение

Согласно двухударной модели канцерогенеза, или так называемой гипотезе Кнудсона, для трансформации нормальной клетки в опухолевую необходимо два последовательных мутационных события. Одним из этих событий зачастую является потеря гетерозиготности.

Потеря гетерозиготности (ПГ) является одним из наиболее частых событий в геноме опухолевой клетки. Понятие *потеря гетерозиготности* подразумевает либо потерю копийности, при которой наблюдается частичная или полная делеция хромосомы, либо приобретенную однородительскую дисомию (acquired uniparental disomy — aUPD), при которой сохраненная хромосома удваивается до или после делеции участка парной хромосомы (сору-neutral LOH [1]). Также однородительская дисомия может возникать вследствие нарушения гомологичной рекомбинации, что может приводить к образованию опухоли. Области аллельного дисбаланса, то есть участки с увеличением или потерей копийности одного из аллелей, исторически успешно используются в выявлении онкогенов или генов супрессоров опухолевого роста, которые вовлечены в процесс онкогенеза [2, 3].

Ангиомиолипома (АМЛ) — одна из наиболее типичных форм патологии почек при tuberозном склерозе. Поскольку tuberозный склероз как генетическое заболевание ассоциирован с мутациями в генах *TSC1* и *TSC2*, мутационное профилирование АМЛ до сих пор также ограничивалось лишь этими двумя генами [4].

При sporadicческой АМЛ почки, согласно базе данных COSMIC, лишь в 57% случаев АМЛ фиксируются мутации в гене *TSC2*, и ни одной в гене *TSC1* (9q34) [5]. ПГ в хромосомном сегменте 16p13.3, содержащем ген *TSC2*, встречается в 1/4 случаев [6]. Исследование, в котором проводилось полноэкзомное секвенирование 30 образцов АМЛ почки, из которых 9 были sporadicческими, показало соблюдение двухударной модели канцерогенеза в 94% случаев, причем было отмечено, что биаллельная инактивация, при которой встречаются две точковые мутации, является более частым событием при sporadicческой АМЛ почки, а однородительская дисомия более характерна для АМЛ, сочетанной с tuberозным склерозом [6].

Высокопроизводительное параллельное секвенирование является на данный момент наиболее эффективным методом анализа геномной последовательности. Помимо несомненного преимущества данного

метода в анализе точковых мутаций, включая делеции и инсерции размером до 30 нуклеотидов, его также можно использовать как метод выявления регионов с ПГ [7].

В настоящей работе нами было проведено исследование по выявлению участков хромосом с потерей гетерозиготности в 20 образцах sporadicческой АМЛ почки с использованием широкой панели генов, вовлеченных в опухолеобразование, методом высокопроизводительного параллельного секвенирования.

Материалы и методы

Клинический материал

В исследование включены 20 образцов sporadicческой АМЛ почки от 20 пациентов (19 женщин и 1 мужчина) с установленным диагнозом *sporadicческая АМЛ почки*. Исследование одобрено биоэтическим комитетом ФГБНУ «МГНЦ» (протокол №5/1 от 09.02.2015). Все пациенты проходили лечение в НИИ уронефрологии и репродуктивного здоровья человека Первого МГМУ им. И.М. Сеченова. Возраст пациентов варьировал от 31 до 72 лет. До момента поступления в НИИ уронефрологии и репродуктивного здоровья человека, все пациенты проходили плановое обследование по месту жительства, при котором во время ультразвукового исследования были обнаружены унilaterальные образования с четкими неровными контурами. Клинические проявления отсутствовали. Всем пациентам была проведена магнитно-резонансная томография или мультиспиральная компьютерная томография для подтверждения диагноза. Образования по своим характеристикам соответствовали АМЛ. Размер опухолей варьировал от 3 до 11 см в диаметре. Пациентам проводилась лапароскопическая резекция опухоли. Гистологическая картина всех образцов имела ярко выраженный характер АМЛ с разным содержанием жира, сосудов и мышц. В качестве материала для исследования использовалась опухолевая ткань, полученная после резекции и сохраненная при -20°C. Микродиссекция образцов не проводилась. В качестве контрольной выборки использовали образцы крови этих же пациентов.

Выделение ДНК из образцов биологического материала проводили согласно протоколу стандартной фенол-хлороформной экстракции.

Определение потери гетерозиготности

ПГ в образцах АМЛ почки определяли методом высокопроизводительного параллельного секвенирования с использованием панели праймеров Ion AmpliSeq Comprehensive Cancer Panel (ThermoFisher, США), покрывающей экзоны и фланкирующие их участки интронов 409 генов, участвующих в опухолеобразовании. Для создания библиотек использовали набор Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 (ThermoFisher, США). Клональную эмульсионную ПЦР проводили с использованием системы Ion Chef, секвенирование проводили на приборе Ion S5 согласно протоколу производителя.

Для выявления ПГ использовали метод, описанный в статье Dubbink с соавт. [7]. Аллельное соотношение одонуклеотидных генетических вариантов (single nucleotide variant — SNV) со значениями между 45% и 55% считали соответствующим гетерозиготному состоянию SNV, а со значениями выше 55% и ниже 45% — аллельному дисбалансу. Значения соотношений аллелей SNV выше 95% или ниже 5% считались соответствующими гомозиготному состоянию. Рассматривались только генетические варианты в участках с глубиной прочтения не менее 50х.

Хромосомный микроматричный анализ (SNP-array) проводили для валидации результатов определения участков ПГ, полученных методом высокопроизводительного параллельного секвенирования ДНК. Валидацию провели на примере двух образцов (№7 и №20). Использовали чипы производства компании Affymetrix серии CytoScan. Исследование выполняли в соответствии с протоколом компании-производителя. Анализ полученных данных проводили с использованием программного обеспечения ChAS 3.0 Affymetrix (Thermo Fisher).

Результаты и обсуждение

Мы показали, что использование панели праймеров для секвенирования 409 генов, вовлеченных в опухолеобразование, позволяет выявлять не только точковые генетические варианты, но и участки хромосом с ПГ. Это достигается за счет довольно равномерного распределения секвенируемых фрагментов по геному (рис. 1). Мы предположили, что в развитии спорадической АМЛ почки могут быть задействованы другие гены, помимо генов онкосупрессоров *TSC1* и *TSC2*, и использовали потенциал панели Ion AmpliSeq Comprehensive Cancer Panel для анализа ключевых генов, участвующих в опухолеобразовании, в том числе с точки зрения их копийности.

Методом высокопроизводительного параллельного секвенирования нами суммарно выявлено 10 регионов с потерей гетерозиготности в 7 из 20 образцов (35%) спорадической АМЛ почки. Результаты идентификации участков ПГ полностью валидированы проведенным хромосомным микроматричным анализом двух информативных образцов (№7 и №20). В табл. 1 границы выявленных участков ПГ обозначены для этих образцов в соответствии с результатами микроматричного анализа, обеспечивающего более высокое разрешение по сравнению с используемой нами системой высокопроизводительного параллельного секвенирования.

Наиболее часто ПГ встречалась в сегменте 16p13.3 — 5 из 7 образцов (71%). В данном сегменте располагается ген онкосупрессор *TSC2*, продукт которого — туберин — формирует комплекс с белком гамартином (кодируемым геном *TSC1*), где туберин исполняет роль ГТФаза-активирующего белка, а гамартин необходим для его

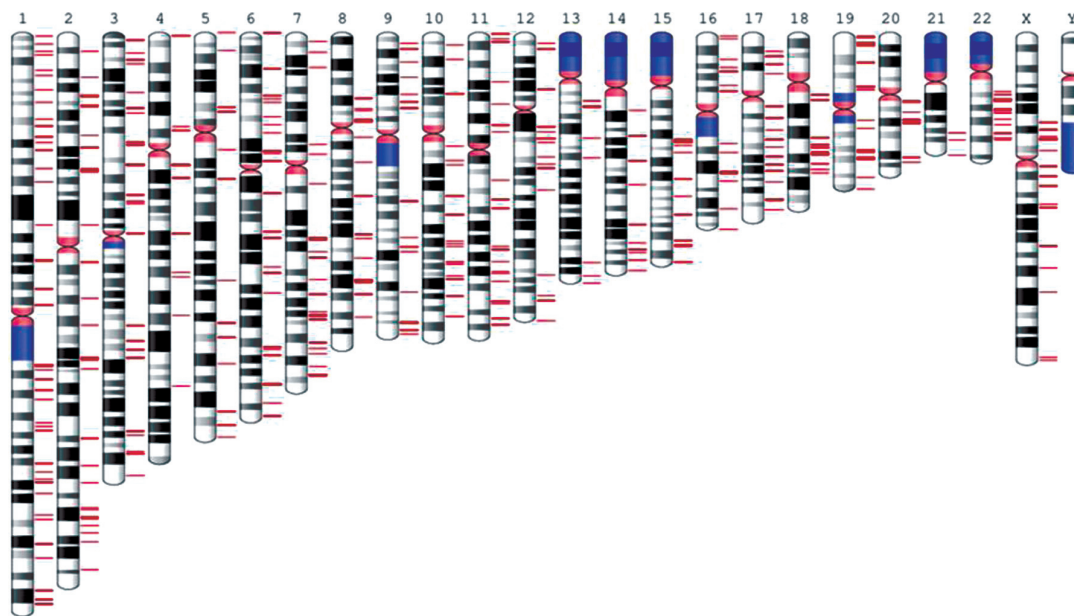


Рис. 1. Локализация таргетных ампликонов панели для высокопроизводительного параллельного секвенирования ДНК Ion AmpliSeq Comprehensive Cancer Panel (отмечено красным). Синим цветом обозначены вариательно окрашиваемые участки хромосом.

стабилизации и предотвращения его убиквитин-опосредованной деградации. Этот комплекс играет важную роль в сигнальном пути PI3K/akt/mTOR, где посредством ингибирования ГТФ-связывающего белка Rheb он инактивирует серин/треониновую протеинкиназу mTOR [8]. Была доказана ассоциация мутаций в генах *TSC1* и *TSC2* с такими заболеваниями, как туберозный склероз, лимфангиолейомиоматоз и спорадическая АМЛ. В последнем случае мутации разного рода в данных генах встречаются примерно в 57% случаев. Частота встречаемости ПГ в регионе 16p13.3, по данным Henske с соавт., отличалась в группе спорадической АМЛ от таковой в группе АМЛ, сочетанной с туберозным склерозом. При спорадической АМЛ, ПГ в 16p13.3 была выявлена в 3 из 29 случаев (10,34%), а при сочетанной форме — в 5 из 8 (62,5%) [9]. Интересным является исследование Kattar с соавт. [10], в котором методом сравнительной геномной гибридизации было показано отсутствие

каких-либо изменений копийности в сегментах хромосом 16p13.3 или 9q34, однако была выявлена хромосомная нестабильность в других регионах (табл. 2).

Нами показана высокая (35%) встречаемость ПГ сегмента 16p13.3 при спорадической АМЛ (рис. 2), что говорит о большей частоте хромосомной нестабильности в данном регионе, чем было выявлено ранее [9].

В нашем исследовании в двух случаях (образцы №4 и 20) не было зафиксировано нарушений копийности ДНК в областях 16p13.3 или 9q34, а также точковых мутаций в генах *TSC1* или *TSC2*. При этом в образце №20 выявлено 4 участка ПГ (табл. 1), представленных, согласно результатам проведенного хромосомного микроматричного анализа, делециями. Немногочисленные цитогенетические исследования спорадической АМЛ почки, проводившиеся ранее, показывали различные результаты. Наиболее часто фиксировались трисомии хромосомы 7 [11] и делеции области 5q33-q34 [12]. По

Таблица 1

Координаты участков хромосом с ПГ, выявленных в настоящем исследовании

Образец №	Координаты участков хромосом с ПГ в соответствии с номенклатурой ISCN 2016
4	seq[GRch37/hg19]15q14q15.1(39884882_40494960)hmz
7	arr[GRch37/hg19] 16p13.3(1925000_2120000)x1
9	seq[GRch37/hg19] 16p13.3p13.11(2129637_15820863)hmz
11	seq[GRch37/hg19] 16p13.3 (chr16:2110608-27460360)hmz
12	seq[GRch37/hg19] 16p13.3 (2105335_2138422)hmz
19	seq[GRch37/hg19]16p13.3(2136360_3779115)hmz
20	arr[GRch37/hg19] 3p26.3q27.3(61891-187040043)x1-2 arr[GRch37/hg19] 7q35(146631506_147643306)x1 arr[GRch37/hg19] 11p15.2q25(13396951_134938470)x1-2 arr[GRch37/hg19] 16q12.2q24.3(53484187_90155062)x1-2

Таблица 2

Результаты ранее опубликованных исследований хромосомной нестабильности в спорадической АМЛ почки

Исследование	Наблюдения	Количество пациентов в исследовании
de Jong B с соавт. [3165694]	47,XX,+7	1
Paola Dal Cin с соавт. [9398869]	47,XX,+7;47,XX+8	9
Debiec-Rychter с соавт. [1377003]	44,XX,-8, -12, -14, -21, +der (8q14q), +der(12)(12pter----12q14-15::12q24----12q14-15::+ +21q21----21qter)	1
Kattar с соавт. [10088548]	del 5q33-qter; del 4cen-p15.3; del 5q31-qter; add4qcen-qter; del 2q14.1-q23; del 5q 21-q34; del 2q13-q32; del 3q21-q26.2; del 11q14-q23; del 7q22-q33; +19; del 5q32-q34	7
Wullich с соавт. [9209469]	47,XY,+7; 46,XX,t(7,12)(q?; q?)	5

данным исследований, трисомия седьмой хромосомы является весьма распространенным явлением, которое фиксируется как при злокачественных и доброкачественных солидных опухолях, так и при заболеваниях, не связанных с опухолеобразованием, таких, как артрит [13]. Интересным также является то, что трисомия седьмой хромосомы наблюдалась при стандартном цитогенетическом исследовании и в нормальной ткани почки [14]. Нами не зафиксировано полной дупликации хромосомы 7, однако в образце №20 определена делеция сегмента 7q35. Все хромосомные аномалии, за исключением случаев потерь гетерозиготности, захватывающих хромосомный сегмент 16p13.3, зафиксированы нами единично.

Высокий уровень хромосомной нестабильности в отдельных образцах спорадической АМЛ почки, выявленный в ранее проведенных исследованиях и в настоящей работе, возможно, указывает на процесс малигнизации опухоли. Известный подтип АМЛ — эпителиоидная АМЛ — в некоторых случаях проявляет признаки злокачественной опухоли. Nobuyoshi с соавт. описали два случая, когда в классической АМЛ, состоящей из кровеносных сосудов, гладких мышц и жировых клеток, содержалось также некоторое количество эпителиоидных клеток — основного показателя эпителиоидной АМЛ [15]. В образце №20 с высокой хромосомной нестабильностью гистологическая картина соответствует классической АМЛ. Однако столь высокая хромосомная нестабильность вполне может быть предвестником малигнизации этой опухоли.

Заключение

Проводимые генетические исследования спорадической АМЛ почки в основном направлены на гены комплекса *TSC1/TSC2*, что обосновано частой встречаемостью (80%) АМЛ почек у пациентов с туберозным склерозом. Однако с учетом малых выборок пациентов со спорадической АМЛ, изученных в ранее проведенных исследованиях [9, 16], нельзя однозначно говорить об универсальной специфичности данных генов по отношению к этому типу опухолей.

В нашей выборке в 7 случаях из 20 была обнаружена ПГ, которая в 5 случаях затрагивала хромосомный сегмент 16p13.3, что говорит о большей встречаемости ПГ (35%) в регионе 16p13.3 в образцах спорадической АМЛ почки, чем это ранее было показано. Впервые обнаружено 5 новых регионов с ПГ, и выявлен образец опухоли с высокой хромосомной нестабильностью, которая может являться маркером малигнизации. В двух случаях нами не обнаружено ПГ в регионах 16p13.3 и 9q34, равно как и точковых мутаций в генах *TSC1* и *TSC2*. Это оставляет открытым вопрос о драйверных причинах возникновения этих опухолей.

Дальнейшие исследования мутационного профиля спорадической АМЛ почки позволят внести вклад в изу-

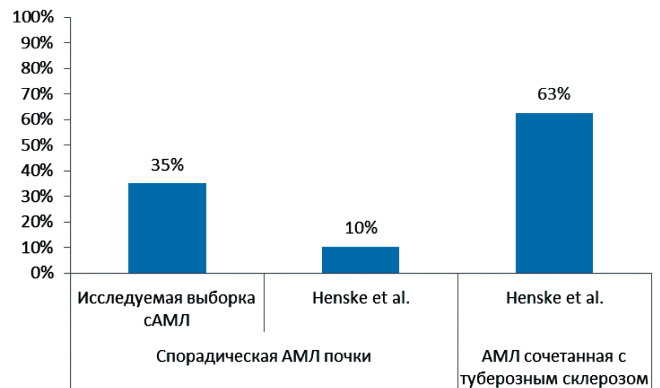


Рис. 2. Сравнение встречаемости потери гетерозиготности в регионе 16p13.3 при спорадической АМЛ почки и АМЛ, сочетанной с туберозным склерозом, в исследуемой нами выборке и выборке, исследованной Henske с соавт. [9].

чение ее этиопатогенеза, а также будут способствовать разработке новых способов профилактики и лечения данного заболевания.

Список литературы

1. Стрельников В.В., Основные направления молекулярно-генетических исследований в онкологии. Медицинская генетика, 2012. 11(10): p. 3-16.
2. Алексеева Е.А., Танас А.С., Прозоренко Е.В., Зайцев А.М., Кирсанова О.Н., Самарин А.Е., Залетаев Д.В., Стрельников В.В., Анализ аллельного дисбаланса при глиобластоме: Новые хромосомные участки потери гетерозиготности и новые гены-кандидаты. Медицинская генетика, 2014. 13(11): p. 41-47.
3. Кузнецова Е.Б., Пудова Е.А., Танас А.С., Залетаев Д.В., Стрельников В.В., Sema6b — кандидат на роль гена супрессора опухолевого роста в критическом хромосомном районе 19p13.3. Медицинская генетика, 2013. 12(2): p. 32-36.
4. Кузнецова Е.Б., Мосякова К.М., Танас А.С., Чаплыгина М.С., Алексеева Е.А., Шпоть Е.В., Аношкин К.И., Залетаев Д.В., Винаров А.З., Стрельников В.В., Опыт использования высокопроизводительного параллельного секвенирования днк для характеристики молекулярно-генетических особенностей ангиомиолипом почки. Клиническая нефрология, 2016. 1: p. 29-32.
5. Forbes, S.A., et al., COSMIC: somatic cancer genetics at high-resolution. Nucleic Acids Res, 2017. 45: p. D777-D783.
6. Giannikou, K., et al., Whole Exome Sequencing Identifies TSC1/TSC2 Biallelic Loss as the Primary and Sufficient Driver Event for Renal Angiomyolipoma Development. PLoS Genet, 2016. 12(8): p. e1006242.
7. Dubbink, H.J., et al., Diagnostic Detection of Allelic Losses and Imbalances by Next-Generation Sequencing: 1p/19q Co-Deletion Analysis of Gliomas. J Mol Diagn, 2016. 18(5): p. 775-86.

8. Huang, J., et al., The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2. *Mol Cell Biol*, 2008. 28(12): p. 4104-15.

9. Henske, E.P., et al., Loss of heterozygosity in the tuberous sclerosis (TSC2) region of chromosome band 16p13 occurs in sporadic as well as TSC-associated renal angiomyolipomas. *Genes Chromosomes Cancer*, 1995. 13(4): p. 295-8.

10. Kattar, M.M., et al., Chromosomal analysis of renal angiomyolipoma by comparative genomic hybridization: evidence for clonal origin. *Hum Pathol*, 1999. 30(3): p. 295-9.

11. Dal Cin, P., et al., Chromosome analysis in angiomyolipoma. *Cancer Genet Cytogenet*, 1997. 99(2): p. 132-4.

12. Debiec-Rychter, M., H. Saryusz-Wolska, and M. Salagierski, Cytogenetic analysis of renal angiomyolipoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 1992. 4(1): p. 101-3.

13. Broberg, K., et al., Trisomy 7 accumulates with age in solid tumors and non-neoplastic synovia. *Genes Chromosomes Cancer*, 2001. 30(3): p. 310-5.

14. van den Berg, E., et al., Chromosomal abnormalities in non-neoplastic renal tissue. *Cancer Genet Cytogenet*, 1995. 85(2): p. 152-4.

15. Takahashi, N., et al., Malignant transformation of renal angiomyolipoma. *Int J Urol*, 2003. 10(5): p. 271-3.

16. Qin, W., et al., Angiomyolipoma have common mutations in TSC2 but no other common genetic events. *PLoS One*, 2011. 6(9): p. e24919.