

## Патогенные мутации в генах *TSC1* и *TSC2* — частое событие при инсулиномах

Аношкин К.И.<sup>1</sup>, Васильев И.А.<sup>2</sup>, Карандашева К.О.<sup>1</sup>, Танас А.С.<sup>1,3</sup>,  
Бяхова М.М.<sup>4</sup>, Гуревич Л.Е.<sup>4</sup>, Долудин Ю.В.<sup>2</sup>, Багмет Н.Н.<sup>5</sup>, Шатверян Г.А.<sup>5</sup>,  
Егоров А.В.<sup>2</sup>, Немцова М.В.<sup>1,2</sup>, Секачева М.И.<sup>2</sup>, Стрельников В.В.<sup>1,3</sup>

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

<sup>2</sup> — 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: sekach\_rab@mail.ru

<sup>3</sup> — ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 117997, ул. Островитянова, д. 1; e-mail: vstrel@list.ru

<sup>4</sup> — ГБУ здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского», Москва, 129110, ул. Щепкина 61/2; e-mail: biakhovamm@mail.ru

<sup>5</sup> — ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б. В. Петровского», Москва, 119991, ГСП-1, Абрикосовский пер., д.2; e-mail: gshatverian@mail.ru

**Актуальность.** Инсулиномы — редкие (1–4 случаев на 1 млн человек) и, как правило, спорадические нейроэндокринные опухоли (НЭО) поджелудочной железы, проявляющиеся в основном гипогликемией, вызванной эндогенным гиперинсулинизмом. До сих пор проведены лишь единичные исследования геномов этих опухолей, и общепринятого представления об их этиопатогенезе на молекулярно-генетическом уровне не выработано. **Гипотеза.** В последнее время исследования в области медикаментозной терапии инсулином показали эффективность применения ингибитора протеинкиназы серин-треониновой специфичности mTOR — эверолимуса. Эверолимус известен как основной таргетный препарат для лечения туберозного склероза, ключевую роль в этиопатогенезе которого играют повреждения генов *TSC1* и *TSC2*. Мы предположили, что высокая терапевтическая эффективность эверолимуса в отношении инсулином может быть обусловлена широкой вовлеченностью мутаций в генах *TSC1* и *TSC2* в развитие этих опухолей. **Материалы и методы.** Для проверки гипотезы нами проведено секвенирование генов *TSC1* и *TSC2* методом высокопроизводительного параллельного секвенирования экзонов и прилежащих к ним интронных участков для выявления точковых мутаций и потери гетерозиготности (ПГ) в 9 образцах инсулином поджелудочной железы. **Результаты.** В 9 образцах инсулином выявлено восемь точковых мутаций и семь событий потери гетерозиготности. В 4 случаях показано соответствие генотипа опухоли двухударной модели опухолеобразования (по два различных мутационных события в гене *TSC2*). В двух образцах обнаружены одновременно ПГ генов *TSC1* и *TSC2*. Лишь в одном случае не было зафиксировано ни точковых мутаций, ни ПГ в генах *TSC1* или *TSC2*. **Выводы.** Нами впервые показана высокая встречаемость мутаций в генах комплекса туберозного склероза в инсулиномах поджелудочной железы, что может говорить о вовлеченности повреждений белкового комплекса *TSC1/TSC2* в развитие большинства опухолей этого типа. Дальнейшие исследования должны привести к более глубокому пониманию причин возникновения НЭО поджелудочной железы и к совершенствованию их лечения, в том числе ингибиторами mTOR.

**Ключевые слова:** инсулинома, ген *TSC1*, ген *TSC2*, mTOR, высокопроизводительное параллельное секвенирование ДНК.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

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

## Pathogenic mutations in the *TSC1* and *TSC2* genes are frequent in insulinomas

Anoshkin K.I.<sup>1</sup>, Vasiliev I.A.<sup>2</sup>, Karandasheva K.O.<sup>1</sup>, Tanas A.S.<sup>1,3</sup>,  
Byakhova M.M.<sup>4</sup>, Gurevich L.E.<sup>4</sup>, Doludin Yu.V.<sup>2</sup>, Bagmet N.N.<sup>5</sup>, Shatveryan G.A.<sup>5</sup>,  
Yegorov A.V.<sup>2</sup>, Nemtsova M.V.<sup>1,2</sup>, Sekacheva M.I.<sup>2</sup>, Strelnikov V.V.<sup>1,3</sup>

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

<sup>2</sup> — I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation, 119991, Trubetskaya st. 8, e-mail: sekach\_rab@mail.ru

<sup>3</sup> — Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation, 117997, Ostrovityanova st. 1, e-mail: vstrel@list.ru

<sup>4</sup> — State budgetary healthcare institution of the Moscow region «Moscow Regional Scientific Research Clinical Institute. MF Vladimirsky», Moscow, Russian Federation, 129110, Shchepkina street 61/2; e-mail: biakhovamm@mail.ru

<sup>5</sup> — Federal State Budget Scientific Institution «Russian Research Center for Surgery named after Academician B.V. Petrovsky», Moscow, Russian Federation, 119991, Abrikosovsky lane house 2, e-mail: gshatverian@mail.ru

**Background.** Insulinomas are rare (1-4 cases per million people) and typically sporadic neuroendocrine tumors of the pancreas, manifesting mainly by hypoglycemia caused by endogenous hyperinsulinism. So far, only a few studies of the genomes of these tumors have been carried out, and a generally accepted idea of their etiopathogenesis at the molecular genetic level has not been developed. **Hypothesis.** Recently, studies in the field of insulinomas drug therapy have demonstrated the effectiveness of everolimus, an inhibitor of a protein kinase of the serine-threonine specificity mTOR. Everolimus is known as a targeted drug for the treatment of tuberous sclerosis, a key role in the etiopathogenesis of which is played by alterations of the *TSC1* and *TSC2* genes. We hypothesized that the high therapeutic efficacy of everolimus against insulinomas, by analogy, may be due to the pivotal involvement of mutations in the *TSC1* and *TSC2* genes in the development of these tumors. **Material and methods.** To test the hypothesis, we performed NGS of exons and adjacent introns of the *TSC1* and *TSC2* genes in order to identify point mutations and losses of heterozygosity in 9 pancreatic insulinomas. **Result.** Totally in 9 samples we have identified eight point mutations and seven cases of loss of heterozygosity. In 4 samples, the tumor genotype corresponds to a two-hit tumorigenesis model (two different mutational events in the *TSC2* gene). In two samples, losses of heterozygosity encompassing simultaneously the *TSC1* and *TSC2* genes were identified. In only one case, no point mutations nor losses of heterozygosity in the *TSC1* or *TSC2* genes were found. **Conclusion.** This is the first report of a high occurrence of mutations in the genes of the tuberous sclerosis complex in insulinomas of the pancreas, indicating possible involvement of the *TSC1/TSC2* protein complex disruption in the development of most tumors of this type. Further research should lead to a deeper understanding of the causes of pancreatic neuroendocrine tumors and to the improvement of their treatment, including that with mTOR inhibitors.

**Key words:** Insulinoma, *TSC1* gene, *TSC2* gene, mTOR, NGS.

### Введение

Инсулиномы — редкие нейроэндокринные опухоли поджелудочной железы (НЭО ПЖ), которые встречаются в 1—4 случаях на 1 млн человек [1] и составляют 30—45% от всех функционирующих опухолей этого органа [2]. Наиболее часто они встречаются спорадически, однако в 4—10% случаев возникают при синдроме множественной эндокринной неоплазии 1 типа (МЭН-1 или синдром Вермера) [3]. Инсулиномы диагностируются в любом возрасте, и не имеют превалирования по полу [1]. В 90—93% случаев инсулиномы являются доброкачественными, а в остальных 7—10% — злокачественными с десятилетней выживаемостью около 29%. Проявляются они в основном гипогликемией, вызванной эндогенным гиперинсулинизмом. Такие пациенты в 90% случаев подвергаются хирургическому лечению. В предоперационный период таким пациентам проводится гормональное лечение в виде внутривенного вливания глюкозы с малыми дозами диазоксиды, которое позволяет хорошо контролировать симптомы. В 50% случаев положительный эффект показало лечение аналогами соматостатина [4]. В последнее время исследования в области медикаментозной терапии показали эффективность применения ингибитора протеинкиназы серин-треониновой специфичности mTOR — эверолимуса. Эверолимус был одобрен для лечения прогрессирующих НЭО ПЖ управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) в 2011 году [5]. Данное высокомолекулярное лекарственное средство в большинстве своем применяется после неудачного применения аналогов соматостатина и/или системной химиотерапии, либо при невозможности хирургического вмешательства [6, 7]. Клиническими исследованиями подтверждена противоопухолевая активность эверолимуса при метастатических НЭО ПЖ [7]. Применение эверолимуса при инсулиномах позволяет эффективно контролировать уровни инсулина, а

также глюкозы в крови [8], и существенно сдерживает рост опухоли [6].

Проведенное ранее мутационное профилирование спорадических НЭО ПЖ выявило соматические мутации в генах сигнального пути mTOR в 14% опухолей; мутации в генах *TSC2*, *PTEN* и *PI3KCA* были обнаружены в 9%, 7% и 1% образцов соответственно [9]. Ген *TSC2* кодирует белок туберин, взаимодействующий с белком гамартином (кодируется геном *TSC1*), и формирует комплекс, являющийся эндогенным ингибитором протеинкиназы mTOR. Мутации в генах этого комплекса приводят к постоянной активации mTOR, что ведет к ускоренной пролиферации клеток и усиленному ангиогенезу [10]. Также мутации в данных генах прямо ассоциированы с таким орфанным заболеванием, как туберозный склероз (ТС), который характеризуется множественными доброкачественными опухолями разной локализации.

Поскольку основным таргетным препаратом для лечения туберозного склероза, ключевую роль в этиопатогенезе которого играют повреждения генов *TSC1* и *TSC2*, является ингибитор mTOR эверолимус, мы предположили, что высокая терапевтическая эффективность эверолимуса в отношении НЭО ПЖ по аналогии может быть обусловлена широкой вовлеченностью мутаций в генах *TSC1* и *TSC2* в развитие инсулином. Для проверки этой гипотезы нами проведено секвенирование генов *TSC1* и *TSC2* методом высокопроизводительного параллельного секвенирования (NGS) экзонов и прилежащих к ним интронных участков для выявления точковых мутаций и потери гетерозиготности в образцах НЭО ПЖ.

### Материалы и методы

В исследование включены 9 образцов НЭО ПЖ, 6 из которых — спорадические инсулиномы и 3 — инсулино-

мы при синдроме МЭН-1. Средний возраст пациентов — 43,7 года, среди них пять женщин и четверо мужчин.

Выделение ДНК из парафиновых блоков проводили согласно протоколу стандартной фенол-хлороформной экстракции.

Секвенирование генов *TSC1* и *TSC2* проводили методом NGS согласно разработанной и опубликованной авторами ранее медицинской технологии комплексной ДНК-диагностики туберозного склероза [11].

Анализ потери гетерозиготности (ПГ) в генах *TSC1* и *TSC2* проводили по алгоритму Dubbink с соавт. [12], адаптированному к используемому протоколу NGS [13]. Для оценки аллельного дисбаланса использовали полиморфные генетические варианты в участках с глубиной прочтения не менее 300х.

### Результаты и обсуждение

Проведено NGS генов *TSC1* и *TSC2* в 9 инсулиномах поджелудочной железы. Медиана по образцам медиан глубины покрытия таргетных локусов составила 2162 прочтения. Суммарно было выявлено 8 точковых мутаций и шесть событий ПГ.

Соответствие генотипа опухоли двухударной модели опухолеобразования, которая говорит о необходимости для возникновения опухоли как минимум двух последовательных мутационных событий, затрагивающих ген супрессора опухолевого роста [14], обнаружено в 4 случаях из 9 (в образцах №№ 3, 5, 6, 9). В образцах №1 и №2 методом NGS обнаружены одновременно ПГ генов *TSC1* и *TSC2*. Лишь в одном случае (образец №4) не было зафиксировано ни точковых мутаций, ни ПГ в генах *TSC1* или *TSC2* (таблица).

В трех случаях инсулиномы, в которых зафиксированы мутации в генах комплекса туберозного склероза, являются опухолями, возникшими при синдроме МЭН-1. Синдром Вермера, или множественная эндокринная неоплазия (МЭН-1, МИМ\*131100) является аутосомно-доминантным заболеванием, которое характеризуется сочетанием гормонально активных опухолей (в том числе инсулином), образующихся из эндокринных клеток, и гормонально неактивных опухолей [15]. Причиной возникновения данного заболевания являются герминальные мутации в гене *MEN1*. Соматические мутации в этом гене, сопровождающиеся потерей аллеля дикого типа, встречаются в 10–27% инсулином, а ПГ при всех НЭО

Таблица

Мутации в генах *TSC1* и *TSC2*, выявленные в образцах инсулином в настоящем исследовании

№	Тип опухоли	Тип точковой мутации	Ген	Нуклеотидная замена	Аминокислотная замена	Предсказание патогенности — Mutation Taster	rsID	Границы областей ПГ
1	Спорадическая инсулинома	Точковых мутаций не обнаружено				—	—	chr16: 2110571-2133901  chr9: 135767943-135770134
2	Спорадическая инсулинома	Точковых мутаций не обнаружено				—	—	chr16: 2110571-2138584  chr9: 135770250-135772717
3	Спорадическая инсулинома	Миссенс	<i>TSC2</i>	c.G997A	p.V333M	Патогенная	—	chr16: 2100446-2112177
4	Спорадическая инсулинома	Не выявлено мутаций						
5	Спорадическая инсулинома	Миссенс	<i>TSC2</i>	c.C2164T	p.L722F	Патогенная	rs1029969953	—
		Сплайсинг	<i>TSC2</i>	c.2838-1G>A	—	Патогенная	—	
6	Спорадическая инсулинома	Нонсенс	<i>TSC2</i>	c.C2647T	p.Q883*		rs45476100	—
		Миссенс	<i>TSC2</i>	c.C2671T	p.H891Y	Патогенная	—	
7	Инсулинома при МЭН-1	Миссенс	<i>TSC1</i>	c.C1075T	p.P359S	Патогенная	—	—
		Сплайсинг	<i>TSC2</i>	c.649-1G>A	—	Патогенная	—	
8	Инсулинома при МЭН-1	Точковых мутаций не обнаружено				—	—	chr16: 2125937-2126414
9	Инсулинома при МЭН-1	Сплайсинг	<i>TSC2</i>	c.2355+1G>A	—	Патогенная	rs45517227	chr16: 2114475-2126167

ПЖ — в 46% случаев, и не всегда сопровождается «вторым ударом» [16], что говорит о возможной вовлеченности других событий, отличных от непосредственной инактивации *MEN1*, в развитие таких опухолей, и не исключает вклада повреждений других генов. В нашей выборке мутации в генах *TSC1* и/или *TSC2* обнаружены во всех образцах инсулином при синдроме МЭН-1 и в 5 из 6 случаев спорадических инсулином.

Суммарно при инсулиномах мутации в генах комплекса туберозного склероза выявлены нами в 8 опухолях. В подавляющем большинстве случаев мутационные события представлены точковыми мутациями (8/15) (рис. 1), однако при рассмотрении по типам мутаций на первом месте по встречаемости находится ПГ (7/15), на втором — миссенс-мутации (4/15) определенные как патогенные, по данным Mutation Taster, на третьем месте — мутации в сайте сплайсинга (3/15) и на четвертом месте — нонсенс-мутации (1/15).

В подавляющем большинстве случаев мутационные события встречаются в гене *TSC2* (12/15); наиболее часто — ПГ (рис. 2).

Редкая представленность инсулиномы в общей популяции является серьезной преградой в исследовании ее биологии, однако в то же время представляет огромный интерес в поисках причин ее возникновения. Несмотря на хорошую изученность с клинической точки зрения, генетические исследования инсулиномы немногочисленны. Экзомное исследование восьми пациентов со спорадической инсулиномой выявило повторяющуюся соматическую мутацию в гене *YY1* — Thr372Arg (в двух случаях). Последующий анализ когорты, состоящей из 47 пациентов, выявил наличие этой мутации в 13% опухолей [17]. Корреляций мутации Thr372Arg с клинико-морфологическими свойствами опухолей выявлено не было, однако было замечено, что в обследованной выборке она наблюдалась только у больных женского пола. Другое исследование, в которое входило 68 больных НЭО ПЖ, выявило мутации в генах *MEN1*, *DAXX*, *ATRX*, *PTEN*, *TSC2* и *PIK3CA* в 44,1%, 25%, 17,6%, 7,3%, 8,8% и 1,4% опухолей соответственно [18]. В цитируемом исследовании не было проведено раздельного анализа частот мутаций по типам НЭО ПЖ, поэтому оно дает только общие представления о спектре генов, наиболее часто повреждаемых при НЭО ПЖ как таковых. Этим обусловлена актуальность проведения дополнительных исследований для уточнения представленности мутаций в генах-кандидатах в тех или иных типах НЭО ПЖ. В проведенном нами пилотном исследовании соматического мутационного статуса конкретного типа НЭО ПЖ — инсулиномы поджелудочной железы — нами впервые

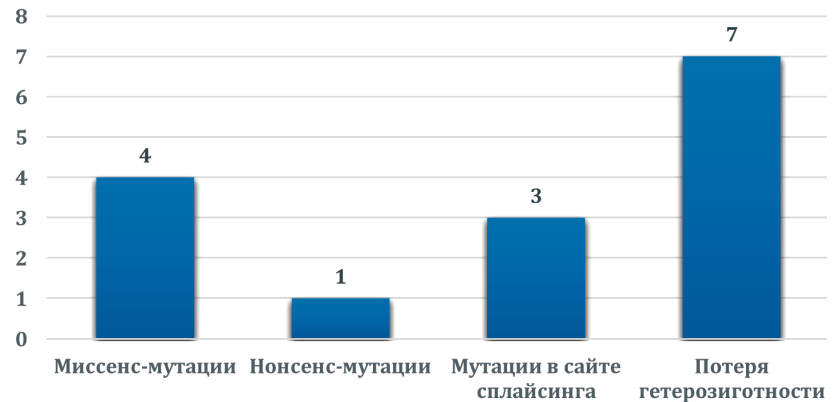


Рис. 1. Представленность типов мутаций генов *TSC1* и *TSC2*, обнаруженных в опухолевом материале инсулином в настоящем исследовании.

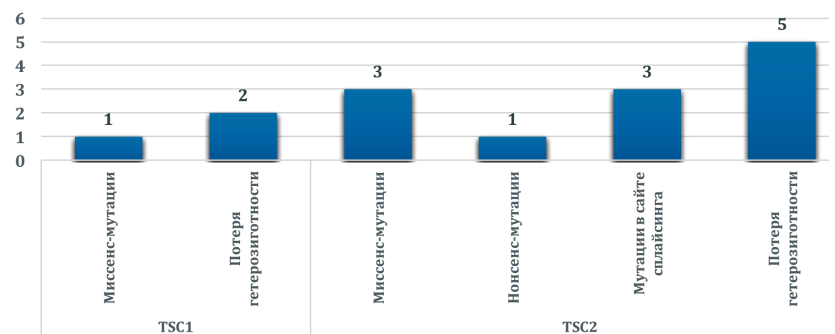


Рис. 2. Распределение типов мутаций по генам *TSC1* и *TSC2* в опухолевом материале инсулином (результаты настоящего исследования).

показана высокая (89% образцов) встречаемость мутаций в генах комплекса туберозного склероза при этом типе опухолей, что может говорить о вовлеченности пути mTOR в развитие большинства инсулином. Дальнейшие исследования должны привести к более глубокому пониманию причин возникновения НЭО ПЖ и к совершенствованию их лечения, в том числе ингибиторами mTOR.

#### Список литературы

- Okabayashi, T., et al., Diagnosis and management of insulinoma. World J Gastroenterol, 2013. 19(6): p. 829-37.
- Batcher, E., P. Madaj, and A.G. Gianoukakis, Pancreatic neuroendocrine tumors. Endocr Res, 2011. 36(1): p. 35-43.
- Гуревич, Л.Е., Диагностика нейроэндокринных опухолей желудочно-кишечного тракта. Практическая онкология, 2005. 6(4): p. 193-201.
- Ito, T., L. Lee, and R.T. Jensen, Treatment of symptomatic neuroendocrine tumor syndromes: recent advances and controversies. Expert Opin Pharmacother, 2016. 17(16): p. 2191-2205.
- Jensen, R.T., et al., ENETS Consensus Guidelines for the management of patients with digestive neuroendocrine neoplasms:

functional pancreatic endocrine tumor syndromes. *Neuroendocrinology*, 2012. 95(2): p. 98-119.

6. Bollard, J., et al., Combinatorial Treatment with mTOR Inhibitors and Streptozotocin Leads to Synergistic In Vitro and In Vivo Antitumor Effects in Insulinoma Cells. *Mol Cancer Ther*, 2018. 17(1): p. 60-72.

7. Yao, J.C., et al., Daily oral everolimus activity in patients with metastatic pancreatic neuroendocrine tumors after failure of cytotoxic chemotherapy: a phase II trial. *J Clin Oncol*, 2010. 28(1): p. 69-76.

8. Baratelli, C., et al., Intermittent everolimus administration for malignant insulinoma. *Endocrinol Diabetes Metab Case Rep*, 2014. 2014: p. 140047.

9. Pea, A., R.H. Hruban, and L.D. Wood, Genetics of pancreatic neuroendocrine tumors: implications for the clinic. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2015. 9(11): p. 1407-19.

10. Karar, J. and A. Maity, PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis. *Front Mol Neurosci*, 2011. 4: p. 51.

11. Аношкин, К.И., et al., Медицинская технология комплексной ДНК-диагностики туберозного склероза. *Медицинская генетика*, 2018. 17(8): p. в печати.

12. 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. 775-786.

13. К.И. Аношкин, et al., Новые регионы с потерей гетерозиготности участков хромосом при спорадической ангиомиолипеме почки. *Медицинская генетика*, 2018. 17(9): p. в печати.

14. Knudson, A.G., Jr., Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1971. 68(4): p. 820-3.

15. Palermo, A., et al., A novel germline mutation at exon 10 of MEN1 gene: a clinical survey and positive genotype-phenotype analysis of a MEN1 Italian family, including monozygotic twins. *Hormones (Athens)*, 2018.

16. Chen, M., et al., Molecular pathology of pancreatic neuroendocrine tumors. *J Gastrointest Oncol*, 2012. 3(3): p. 182-8.

17. Lichtenauer, U.D., et al., Frequency and clinical correlates of somatic Ying Yang 1 mutations in sporadic insulinomas. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015. 100(5): p. E776-82.

18. Jiao, Y., et al., DAXX/ATRX, MEN1, and mTOR pathway genes are frequently altered in pancreatic neuroendocrine tumors. *Science*, 2011. 331(6021): p. 1199-203.