

Спектры герминальных и соматических мутаций при диффузном и интестинальном типах рака желудка

Немцова М.В.^{1,2}, Калинин А.И.^{1,2}, Танас А.С.^{1,3}, Хоробрых Т.В.², Быков И.И.², Кириллова К.И.¹, Алексеева Е.А.^{1,2}, Кузнецова Е.Б.^{1,2}, Залетаев Д.В.^{1,2}, Стрельников В.В.^{1,3}

¹ — ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»,

Москва, 115478, ул. Москворечье, д.1, e-mail: simonova_o.a@mail.ru

² — Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 119991, ул. Трубецкая, д.8, стр.2, e-mail: kuznetsova.k@bk.ru

³ — Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 117997, ул. Островитянова, д.1, e-mail: vstrel@list.ru

Актуальность. Рак желудка (РЖ) — одно из наиболее распространенных онкологических заболеваний, занимающее пятое место в мире по заболеваемости и третье — по смертности среди всех злокачественных новообразований. До недавнего времени классификация РЖ основывалась преимущественно на гистологических критериях. **Цель.** Охарактеризовать спектры мутаций генов, вовлеченных в канцерогенез РЖ, в различных гистологических типах опухолей, и провести поиск новых мутаций в этих генах у российских пациентов. **Материалы и методы.** Для анализа 52 образцов РЖ и парных им образцов морфологически неизмененной ткани применили метод NGS с использованием двух панелей праймеров — Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2, широко используемой в мире для анализа «горячих точек» в генах, вовлеченных в онкогенез, и разработанной нами панели для секвенирования генов, вовлеченных в развитие РЖ. **Результаты.** При использовании двух панелей выявлено 20 генетических вариантов, характеризующихся исключительно низкими популяционными частотами (не выше 0,00004, согласно базе данных gnomAD), и 19 ранее не описанных генетических вариантов. Показано статистически значимое обогащение выборки опухолей интестинального гистологического типа соматическими миссенс-мутациями в гене *TP53*. Герминальный статус определен для 4 новых генетических вариантов в генах *RB1*, *SMO* и *CDH1*.

Ключевые слова: рак желудка, мутации, секвенирование ДНК, NGS.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект № 18-015-00333, и в рамках государственного задания на выполнение НИР.

Spectra of germline and somatic mutations in diffuse and intestinal types of gastric cancer

Nemtsova M.V.^{1,2}, Kalinkin A.I.^{1,2}, Tanas A.S.^{1,3}, Khorobrykh T.V.², Bykov I.I.², Kirillova K.I.¹, Alekseeva E.A.^{1,2}, Kuznetsova E.B.^{1,2}, Zaletaev D.V.^{1,2}, Strelnikov V.V.^{1,3}

¹ — Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation, 115522, Moskvorechie st. 1, e-mail: vstrel@list.ru

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

³ — Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation, 117997, Ostrovityanova St, 1, e-mail: tanas80@gmail.com

Background. Gastric cancer (GC) is one of the most common oncological diseases, with the fifth place in the world in terms of morbidity and the third on mortality among all malignant neoplasms. Until recently, the classification of GC was based mainly on histological criteria. **Objective.** To characterize the spectra of gene mutations in various histological types of gastric tumors, and to search for novel mutations in the Russian patients. **Material and methods.** To analyze 52 GC samples and the samples of morphologically unaltered tissues from the same patients, we have used NGS with two panels, an Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2, widely used for the analysis of «hot spots» in cancer related genes, and an in-house panel developed for sequencing the genes involved in gastric carcinogenesis. **Results.** In total, with two panels, we have identified 20 genetic variants with exceptionally low general population frequencies (no higher than 0.00004 according to the gnomAD database), and 19 genetic variants that have never been reported previously. We report a statistically significant enrichment of a cohort of intestinal tumors with somatic missense mutations in the *TP53* gene compared to diffuse tumors. The germline status was determined for 4 novel genetic variants, in the *RB1*, *SMO* and *CDH1* genes.

Key words. Gastric cancer, mutations, DNA sequencing, NGS.

Введение

Рак желудка (РЖ) — одно из наиболее распространенных онкологических заболеваний. Ежегодно в мире диагностируется почти 1 млн новых случаев РЖ и регистрируется 720 тыс. смертельных исходов, что ставит РЖ на пятое место по заболеваемости и на третье — по смертности среди всех злокачественных новообразований [1]. До недавнего времени классификация РЖ основывалась на гистологических критериях. Наиболее распространенный гистологический классификатор, предложенный Лорен в 1965 году [2] и используемый по настоящее время, делит РЖ на два подтипа — интестинальный и диффузный. В 2000 г. Всемирная организация здравоохранения одобрила дополнительный гистологический классификатор РЖ, выделяющий тубулярный, муцинозный, папиллярный и перстневидноклеточный подтипы [3]. Попытки уточнения морфологической классификации РЖ продолжались и в последующие годы [4]. Большинство опухолей желудка можно однозначно отнести к тому или иному гистологическому подтипу, однако специфических вариантов лекарственной терапии для этих подтипов не выработано [5]. Этим объясняется стремление к разработке молекулярно-генетических классификаторов РЖ, в том числе в рамках крупных международных консорциумов, таких, как The Cancer Genome Atlas (TCGA) [6] и Asian Cancer Research Group (ACRG) [7].

В настоящей работе мы представляем результаты пилотного исследования, целью которого является характеристика спектров мутаций генов, вовлеченных в канцерогенез РЖ, в различных гистологических типах опухолей, и поиск новых мутаций в этих генах у российских пациентов.

Материалы и методы

Клинический материал. Проанализировано 52 образца рака желудка (РЖ) и 52 парных им образца морфологически неизменной ткани. Образцы биологического материала предоставлены Клиникой факультетской хирургии им. Н.Н. Бурденко Первого МГМУ им. И.М. Сеченова. Медиана возраста обследованных больных РЖ и ее стандартное отклонение составили $63,4 \pm 10$ лет. В соответствии с классификацией Лорен [2], интестинальный тип РЖ гистологически подтвержден в 21 (40%), диффузный — в 31 (60%) случаях. Геномную ДНК выделяли стандартным методом фенол-хлороформной экстракции.

Высокопроизводительное параллельное секвенирование ДНК и анализ полученных данных. Скрининг генетических вариантов проводили с использованием двух таргетных панелей — коммерческой Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2 (Thermo Fisher) и разработанной авторами для проведения настоящего исследования Hereditary Gastric Cancer Panel (HGC).

Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2 (далее CHP) включает 207 пар праймеров и рассчитана на скрининг 2850 известных «горячих точек» в 50 генах, вовлеченных в онкогенез: *ABL1*, *AKT1*, *ALK*, *APC*, *ATM*, *BRAF*, *CDH1*, *CDKN2A*, *CSF1R*, *CTNNA1*, *EGFR*, *ERBB2*, *ERBB4*, *EZH2*, *FBXW7*, *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *FLT3*, *GNA11*, *GNAQ*, *GNAS*, *HNFA1A*, *HRAS*, *IDH1*, *IDH2*, *JAK2*, *JAK3*, *KDR*, *KIT*, *KRAS*, *MET*, *MLH1*, *MPL*, *NOTCH1*, *NPM1*, *NRAS*, *PDGFRA*, *PIK3CA*, *PTEN*, *PTPN11*, *RBI*, *RET*, *SMAD4*, *SMARCB1*, *SMO*, *SRC*, *STK11*, *TP53* и *VHL*.

Панель праймеров Hereditary Gastric Cancer Panel (далее HGCP) разработана нами для скрининга генетических вариантов в генах, повреждения которых в герминальной линии приводят к семейным формам рака желудка. Эта панель из 218 пар праймеров позволяет одновременно секвенировать все кодирующие последовательности, некодирующие области крайних экзонов и прилежащие к экзонам интронные участки протяженностью не менее 25 п.н. шести генов: *BMP1A*, *SMAD4*, *CDH1*, *TP53*, *STK11* и *PTEN*.

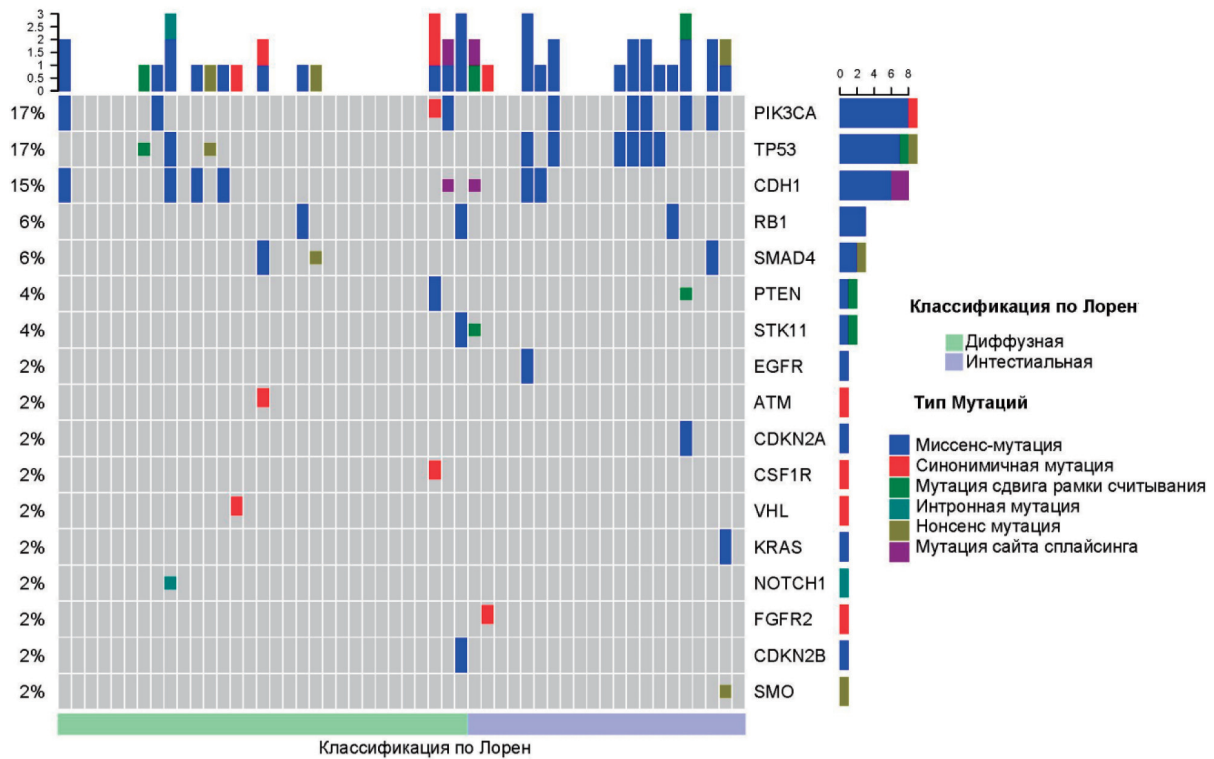
Скрининг генетических вариантов в ДНК материала опухоли проводили высокопроизводительным параллельным секвенированием (NGS) на платформе Ion Torrent (приборы Ion Torrent PGM и Ion S5, Thermo Fisher). Протокол включал подготовку библиотек фрагментов геномной ДНК, клональную амплификацию, секвенирование и биоинформатический анализ результатов.

Верификацию генетических вариантов, выявленных NGS, и определение их герминального или соматического статуса проводили прямым секвенированием по Сэнгеру. Выявление генетического варианта в образце РЖ и в парном ему образце морфологически неизменной ткани расценивали как свидетельство герминального статуса. Выявление генетического варианта исключительно в образце РЖ при отсутствии в парном ему образце морфологически неизменной ткани расценивали как свидетельство соматического статуса. Секвенирование проводили на приборе ABI PRISM 3100, с использованием пар праймеров, последовательности которых не повторяли последовательности праймеров панелей NGS.

Статистический анализ. Сравнение полученных данных проводили с использованием точного теста Фишера.

Результаты и обсуждение

По результатам высокопроизводительного секвенирования в 52 образцах РЖ с использованием панели CHP выявлено 12 генетических вариантов, характеризующихся исключительно низкими популяционными частотами (не выше 0,00004, согласно базе данных gnomAD), а также 3 ранее не описанных генетических варианта. Среди новых вариантов — две герминальные миссенс-мутации в гене *RBI*, p.Leu564Phe и p.His686Asn, соматическая однонуклеотидная замена в гене *ATM* с.9066A>G, не приводящая к замене аминокислоты (p.Glu3022=).



Распределение генетических вариантов, выявленных в образцах РЖ интестинального и диффузного гистологических типов. Каждый столбец соответствует отдельной опухоли, каждая строка — гену.

Среди редких генетических вариантов герминальный статус подтвержден для нонсенс-мутации p.Trp206* в гене *SMO*.

Герминальное происхождение показано также для двух генетических вариантов с популяционной частотой 0,002 — в генах *CDKN2B* (p.Arg103Trp) и *APC* (p.Ile1307Lys). Несмотря на довольно высокую частоту в популяции, мутация *CDKN2B*:p.Arg103Trp была описана ранее как патогенная [8], а *APC*:p.Ile1307Lys рассматривается как генетический вариант предрасположенности к семейному аденоматозному полипозу [9].

С использованием панели праймеров НГС выявлено 8 генетических вариантов с исключительно низкими популяционными частотами и 16 ранее не описанных вариантов. Среди них — 18 миссенс-мутаций в генах *CDH1*, *TP53*, *STK11*, *PTEN* и *SMAD4*, две новые мутации сайтов сплайсинга в гене *CDH1* (с.1320+2T>G и с.531+2_15del), однонуклеотидная делеция в участке донорного сайта сплайсинга 7-го экзона гена *PTEN* (с.800delA), две нонсенс-мутации в гене *TP53* (p.Arg86fs и p.E298*) и нонсенс-мутация в гене *SMAD4* p.Arg445*. Герминальный статус подтвержден только для двух миссенс-мутаций в гене *CDH1* p.Thr303Pro и p.Ser838Gly; первая из них выявлена нами впервые, вторая же представляет собой крайне редкий патогенный генетический вариант, описанный ранее в герминальном состоянии у больной раком яичника [10].

В проведенном нами исследовании при секвенировании ДНК из образцов РЖ наибольшее количество генетических вариантов выявлено в генах *PIK3CA*, *TP53* и *CDH1* (рисунок). Статистически достоверных различий между выборками опухолей интестинального и диффузного гистологических типов по количеству выявленных мутаций в целом, как и по представленности мутаций в отдельных генах, не выявлено; однако показано статистически значимое обогащение выборки опухолей интестинального типа соматическими миссенс-мутациями в гене *TP53* (p=0,01).

Заключение

Скрининг мутаций в 52 образцах рака желудка и парных им образцах морфологически неизменной ткани методом NGS выявил 20 генетических вариантов, характеризующихся исключительно низкими популяционными частотами (не выше 0,00004, согласно базе данных gnomAD), и 19 ранее не описанных генетических вариантов. Показано статистически значимое обогащение выборки опухолей интестинального гистологического типа соматическими миссенс-мутациями в гене *TP53*. Герминальный статус определен для четырех новых генетических вариантов в генах *RB1*, *SMO* и *CDH1*.

Список литературы

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2015;65(2):87-108.
2. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so called intestinal type carcinoma: an attempt at a histoclinical classification. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica*. 1965;64(1):31-49.
3. Hamilton SR, Aaltonen LA (Eds.). Pathology and genetics of tumours of the digestive system. 2000;Vol.48. Lyon:: IARC press.
4. Пирогов СС, Соколов ВВ, Беяков ММ, Каприн АД. Ранний рак желудка: современный взгляд на проблему. *Сибирский онкологический журнал*. 2017;16(5):71-86.
5. Katona BW, Rustgi AK. Gastric cancer genomics: advances and future directions. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*. 2017;3(2):211-217.
6. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*. 2014;513(7517):202-209.
7. Cristescu R, Lee J, Nebozhyn M, et al. Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes. *Nature medicine*. 2015;21(5):449-456.
8. Costa-Guda J, Soong CP, Parekh VI, Agarwal, SK, Arnold A. Germline and somatic mutations in cyclin-dependent kinase inhibitor genes CDKN1A, CDKN2B, and CDKN2C in sporadic parathyroid adenomas. *Hormones and Cancer*. 2013;4(5):301-307.
9. Zauber NP, Sabbath Solitare M, Marotta S, et al. Clinical and genetic findings in an Ashkenazi Jewish population with colorectal neoplasms. *Cancer*. 2005;104(4):719-729.
10. Risinger JI, Berchuck A, Kohler MF, Boyd J. Mutations of the E-cadherin gene in human gynecologic cancers. *Nature genetics*. 1994;7(1), 98-102.