

## Молекулярная патология хромосомного района 10q23.3-26.3 при глиобластоме

Алексеева Е.А.<sup>1,2</sup>, Танас А.С.<sup>1,3</sup>, Прозоренко Е.В.<sup>2,4</sup>, Зайцев А.М.<sup>5</sup>, Куржупов М.И.<sup>5</sup>, Кирсанова О.Н.<sup>5</sup>, Руденко В.В.<sup>1</sup>, Залетаев Д.В.<sup>1,2,3</sup>, Стрельников В.В.<sup>1,3</sup>

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

<sup>2</sup> — 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

<sup>3</sup> — Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

«Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова»

Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 117997, ул. Островитянова, д. 1, e-mail: vstrel@list.ru

<sup>4</sup> — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина»

Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 115478, Каширское ш., д. 24, e-mail: prozorenko1984@mail.ru

<sup>5</sup> — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена»

Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 125284, Москва, 2-й Боткинский пр., д. 3, e-mail: azaitsev\_nsi@mail.ru

Потеря гетерозиготности маркеров длинного плеча 10-й хромосомы (10q) — наиболее частое генетическое изменение при глиобластоме, выявляемое с частотой до 80% случаев. Методом микросателлитного анализа определена частота потери гетерозиготности в районе 10q23.3-26.3, содержащем гены-кандидаты *PTEN*, *FGFR2*, *MKI67* и *MGMT*, в выборке 124 образцов глиобластомы. Частота потери гетерозиготности составила 62,1%. Для установления количественного изменения числа копий региона 10q23.3-26.3 в образцах с выявленной потерей гетерозиготности применяли количественный микросателлитный анализ в реальном времени. Методом количественного микросателлитного анализа было исследовано 64 образца глиобластомы с выявленной потерей гетерозиготности в районе 10q23.3-26.3. Определено, что в 37,5% случаев потеря гетерозиготности этого района при глиобластоме является отражением делеции, а в 25% случаев — отражением однородительской дисомии. В 37,5% опухолей участки делеции и однородительской дисомии чередуются на протяжении исследованного локуса, причём в его проксимальной части (гены *PTEN*, *FGFR2*) выше частота делеций, а в дистальной (ген *MGMT*) — делеция и однородительская дисомия равновероятны.

**Ключевые слова:** глиобластома, потеря гетерозиготности, делеция, однородительская дисомия

### Введение

Глиобластома — наиболее частая и агрессивная первичная опухоль головного мозга у взрослого населения. Она составляет около 80% первичных злокачественных новообразований центральной нервной системы, что позволяет считать ее одной из основных проблем нейроонкологии. На молекулярном уровне глиобластома достаточно хорошо изучена и характеризуется многочисленными генетическими и эпигенетическими нарушениями, затрагивающими различные гены, вовлеченные в процессы канцерогенеза [1]. Несмотря на достаточно обширные знания в области молекулярной генетики глиобластомы, на сегодняшний день существует лишь небольшое число маркеров прогноза течения заболевания и ответа на терапию, таких, как аномальное метилирование промоторной области гена *MGMT* и мутации в гене *IDH1*, использующихся в клинической практике [2].

Наиболее частым генетическим изменением при глиобластоме, выявляемым с частотой до 80%, является потеря гетерозиготности (ПГ) маркеров длинного плеча 10-й хромосомы (10q) [3]. На 10q выделяют два

региона, в которых наиболее часто выявляется потеря: 10q23-24 и 10q25-pter [4]. Предполагается, что высокая частота ПГ в этих районах может свидетельствовать о расположении в них ключевых для патогенеза опухоли генов-кандидатов [5]. В ряде работ обнаружена ассоциация ПГ в 10q и пониженной выживаемостью и неблагоприятным прогнозом для пациентов с глиобластомой [6, 7].

Однако исследование ПГ позволяет выявить лишь факт изменения соотношения копий аллелей изучаемого региона без уточнения характера дисбаланса, который может быть следствием либо делеции, либо увеличения числа копий одного из аллелей при утрате другого (однородительская дисомия). Современные подходы для количественной оценки изменения числа геномных локусов, такие, как флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) и сравнительная геномная гибридизация, позволяют решить эту проблему, однако являются дорогостоящими и не всегда доступными для исследователей [5]. На сегодняшний день работ по изучению изменения копийности локусов, расположенных на хромосоме 10q, при глиобластоме недостаточно [8].

Следовательно, в настоящий момент актуальным является более детальное изучение локусов с выявленной ПГ с применением доступных методов, обеспечивающих точное определение копийности генов-кандидатов, расположенных в этих регионах, что позволит использовать выявленные изменения в качестве молекулярных маркеров для диагностики, прогноза течения заболевания и ответа на терапию, а также обнаружить новые мишени для лекарственных препаратов [9].

Среди генов, расположенных в 10q, наибольший интерес с точки зрения исследования молекулярной генетики глиобластомы и использования изменений в них в качестве маркеров прогноза течения заболевания и ответа на терапию представляют гены *PTEN*, *FGFR2*, *MKI67* и *MGMT*.

Ген *PTEN*, расположенный на хромосоме 10q23.31, представляет собой супрессор опухолевого роста. Основными механизмами инактивации этого гена при глиобластоме являются мутации, которые выявляются в 15—40% случаев, и ПГ локуса, содержащего ген, обнаруживаемая в 80% случаев [10]. Yang Y. с соавт. (2010) обнаружили корреляцию между инактивацией гена *PTEN* и более короткой выживаемостью у пациентов с глиобластомой [11].

Расположенный на хромосоме 10q26.13 ген *FGFR2* является онкогеном, активация которого приводит к развитию опухоли с более злокачественным фенотипом [12]. Изменения в гене *FGFR2* при глиобластоме изучены мало. Так Nakahara Y. с соавт. (2004) показали методом сравнительной геномной гибридизации, что при этой опухоли встречаются делеции гена *FGFR2*, возможно, ассоциированные с благоприятным прогнозом [13]. Ader I. с соавт. (2014) обнаружили, что блокирование рецепторов фактора роста фибробластов приводит к повышению чувствительности глиобластомы к лучевой терапии [14].

Ген *MKI67* расположен на хромосоме 10q26.2. Продукт этого гена — ядерный белок Ki-67 — иммуногистохимический маркер пролиферации. Ki-67 экспрессируется во всех клетках, вышедших из G0-фазы, и позволяет определить пролиферативный потенциал опухоли и судить о степени ее злокачественности [15]. Иммуногистохимический анализ экспрессии Ki-67 в настоящее время рутинно выполняется в патоморфологических лабораториях, однако однозначного мнения относительно прогностической значимости результатов такого анализа для больных с глиобластомой не выработано. Работ по изучению молекулярно-генетических изменений в гене *MKI67* при глиобластоме в настоящее время нет.

Ген *MGMT*, расположенный на хромосоме 10q26.3, представляет собой супрессор опухолевого роста. Наиболее изученным механизмом инактивации этого гена является метилирование его промоторной области. В настоящее время метилирование промоторной области гена *MGMT* считается основным клиническим маркером благоприятного ответа пациентов с глиобласто-

мой на терапию темозоломидом [16]. Альтернативным механизмом инактивации гена *MGMT* может служить делеция содержащего его локуса 10q26.3 [17].

В настоящей работе проведено исследование ПГ и копийности района 10q23.3-26.3, содержащего гены-кандидаты *PTEN*, *FGFR2*, *MKI67* и *MGMT*, при глиобластоме.

### Материалы и методы

*Клинический материал.* Образцы ткани глиобластомы и образцы периферической крови получены от 124 пациентов с глиобластомой, прооперированных в ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России и ФГБУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена» Минздрава России.

При заборе крови в пробирку к 1 мл консерванта (0,5М раствор ЭДТА) добавляли 10 мл крови и тщательно перемешивали. После чего кровь замораживали и хранили при температуре от –18 до –70°C.

Опухолевый материал сразу после операции замораживали и хранили в жидком азоте, а также фиксировали в формалине с последующей парафинизацией. Часть операционного материала использовалась для гистологического анализа, а другая часть — для выделения ДНК.

*Экстракция геномной ДНК.* Выделение геномной ДНК из лимфоцитов периферической крови проводили с помощью высаливания. Геномную ДНК из свежзамороженного материала опухоли выделяли стандартным методом фенол-хлороформной экстракции. Выделение геномной ДНК из архивного материала проводили с использованием коммерческого набора «QIAamp DNA FFPE Tissue Kit» («QIAGEN», Германия) по протоколу, рекомендованному производителем.

*Микросателлитный анализ.* Амплификацию областей микросателлитных повторов проводили по следующей схеме: к 0,1 мкг геномной ДНК добавляли 0,05 мкМ каждого олигопраймера (нуклеотидные последовательности и температура отжига праймеров представлены в табл. 1), 200 мкМ каждого дезоксинуклеотидтрифосфата, 2 мкМ MgCl<sub>2</sub>, 1 е.а. Taq-полимеразы, 2,5 мкл десятикратного буфера для ПЦР следующего состава: 50 мМ KCl, 10 мМ Трис-НСl (рН 8,4), деионизированной воды до 25 мкл. На смесь наслаивали 30 мкл вазелинового масла. Реакционную смесь прогревали при 95°C в течение 5 мин и проводили 33 цикла ПЦР с параметрами: 94°C — 40 с, T<sub>отж</sub> — 40 с, 72°C — 40 с. Финальную элонгацию проводили при 72°C в течение 10 мин. Продукты ПЦР разделяли методом вертикального электрофореза в 8% ПААГ и окрашивали нитратом серебра.

*Количественный микросателлитный анализ (КМА) в реальном времени* — подход для определения числа копий геномных локусов. Принцип этого метода подробно описан D. Ginzinger с соавт. в 2000 г. [18]. Эндогенным контролем служит одновременная амплификация в од-

ной лунке набора пар праймеров к 5—6 геномным локусам, содержащим микросателлитные (CA)<sub>n</sub>-повторы, и расположенным на различных хромосомах, нарушения копийности которых не характерны для исследуемой опухоли. Нуклеотидные последовательности праймеров для исследования копийности локуса 10q23.3-26.3 и праймеров для эндогенного контроля приведены в табл. 2. Реакции ПЦР проводили в 96-луночных опти-

ческих плашках в термоциклере для ПЦР в реальном времени (Bio-Rad, США) с использованием 5'-TGTGTGTGTGTGTGT-3'-зонда TaqMan, меченого флуоресцентным красителем VIC. Зонд синтезирован фирмой IDT, США. Конечный объем реакционной смеси для каждой реакции составлял 25 мкл, в том числе: 2X TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA) — 12,5 мкл, 0,2 мкМ каждого олигопрайма-

Таблица 1

**Условия ПЦР и нуклеотидные последовательности праймеров для микросателлитного анализа ПГ в районе 10q23.3-26.3 при глиобластоме**

Аmplифицируемая область		Нуклеотидная последовательность праймера	T <sub>отж</sub> , °C	Размер ПЦР-продукта, п.н.*
PTEN (10q23.3)	D10S579	F: CTGGGCTAGTGTTCAGCGA R: TGCAGCTCCTCTCCAGTAAA	62	181
	D10S1765	F: ACACTTACATAGTGCTTTCTGCG R: CAGCCTCCCAAAGTTGC	62	180
	PTEN-1i	F: TCGTCATTAGTGATCGGTCT R: TGCCCAACCAACTGGTTTTA	60	206
	D10S541	F: GGGCCTGCCAGTGAATAGTT R: ACCACCACAGACATCTCACA	62	170
	PTEN-ACx24	F: CTTGGGCTCTTGTCTGGAA R: TTCTGGCATTMTTATACTCATCCA	62	216
	D10S185	F: TGCTTTCATTTGCCACTTTTCCT R: AAGACACACGATGTGCCAGT	62	151
FGFR2 (10q26.13)	FGFR2-ACx16	F: CAGACCACAGCACAAACAGC R: CTCTTGCCAACCCTGGTGAT	62	142
	FGFR2-CTx19	F: AGAAACCATAGGCTGCTGGG R: TGGGCCGTGTTCTCTGTTTT	62	144
	FGFR2-right	F: TGGACTAGCTATTGCCATTTTCAT R: GTGCACCTGCTCTAGAGGG	62	143
MKI67 (10q26.2)	MKI67	F: AGAAGCACAGCAACTCTTCCA R: GAGCGGTTGTTGTACCTGCG	64	177
MGMT (10q26.3)	D10S1655	F: GGACTTGCCAGACTCCATGA R: TGTTCTCCAGAGAGACAGAACC	64	122
	D10S1248	F: AGCTATTATTACAAAGCATGAACA R: TCCCTTGTCTTGTTATTAAGGAAC	60	207
	MGMT-ACx24	F: TTGCTATGACAAAGTGTACTAATTC R: ATGCGTTGGAGGTCCCTTTT	62	169
	MGMT-AC-1i	F: CCACCTTCTTTCAGCAGCAT R: TGGATCCACACAGTTCAGACC	62	200
	MGMT-GTx22	F: TCAGAAACGGGAACCTTTCAGACA R: TCATCCCCACCCTTCCCTTC	62	146
	MGMT-ATx18	F: GGCATCCTCACTGGTCTTACA R: ACAAGACGCCTGACAAGCATC	60	172
	MGMT-AC-2i	F: AAATGTGGTGACTGCTGAAGA R: ATGACTCCACACAGCTAAGA	60	197
	MGMT-TGx19	F: TTGCCACATGAGTGCCTCTT R: TCCTGTGGGAGTGGCATAAA	60	122
	D10S505	F: GCAGTGAGTCATGATCAGC R: AGGTGGTGTGCAAGATGACA	64	135
	D10S169	F: GATCTGTGACTGCCTTCCT R: AAGAGGAGGAGTCCATTCAG	62	113

Примечание. \* — консенсусная последовательность в соответствии с UCSC Genome Browser

ра, 0,06 мкМ зонда, 0,1 мкг геномной ДНК. Эндогенный контроль и каждый из изучаемых локусов для каждого образца ДНК амплифицировали в отдельной лунке. Таким образом, для всех локусов для конкретного образца ДНК реакцию на эндогенный контроль проводили один раз. Все реакции проводили не менее чем в трех повторностях при следующем температурном режиме: 95°C — 10 мин; 40 циклов с параметрами: 95°C — 20 с, 55°C — 20 с, 72°C — 45 с. В качестве референсного образца использовалась смесь из ДНК лимфоцитов периферической крови 50 пациентов без злокачественных новообразований. Анализ результатов проводился методом  $\Delta\Delta C_T$  с использованием программного обеспечения, предоставленного Bio-Rad.

**Статистическая обработка результатов.** Для оценки значимости различий частот молекулярных событий в локусе 10q23.3-26.3 использовали критерий  $\chi^2$ .

### Результаты и обсуждение

**Исследование ПГ в районе 10q23.3-26.3, содержащем гены-кандидаты PTEN, FGFR2, MKI67 и MGMT, при глиобластоме.** Для детекции локусов с ПГ в настоящее время одним из наиболее доступных и эффективных подходов

является микросателлитный анализ, подразумевающий сравнение аллелей микросателлитных маркеров в нормальной и опухолевой тканях пациента. Этот метод является более дешевым и простым в использовании по сравнению с другими методами оценки копийности ДНК.

Для исследования аллельного состояния района 10q23.3-26.3, содержащего гены-кандидаты *PTEN*, *FGFR2*, *MKI67* и *MGMT*, нами была разработана система микросателлитных маркеров, информативность которой составила 100%. Характеристика и расположение микросателлитных маркеров приведены в табл. 3. Схема расположения маркеров на хромосоме 10q представлена на рис. 1.

Микросателлитный анализ был проведен для образцов, полученных от 124 пациентов с глиобластомой. В качестве контроля использовалась геномная ДНК из лимфоцитов периферической крови пациентов. Вывод о наличии или отсутствии ПГ по каждому маркеру делали на основании разделения аллелей исследуемых микросателлитных повторов в ПААГ и сравнения интенсивностей сигналов ПЦР между ДНК опухоли и контроля (рис. 2). При использовании микросателлитного анализа информацию о ПГ можно получить, если исследуемый образец гетерозиготен (информативен) по нужному микросателлитному маркеру.

Таблица 2

**Нуклеотидные последовательности праймеров для исследования копийности локуса 10q23.3-26.3 методом КМА в реальном времени и праймеров для эндогенного контроля**

Амплифицируемая область		Последовательность праймера	Размер ПЦР-продукта, п.н.*	Единица повтора
Исследуемые локусы	D10S1765 (10q23.31)	F: ACACTTACATAGTGCTTTCTGCG R: CAGCCTCCCAAAGTTGC	180	AC
	D10S185 (10q23.33)	F: TGCTTTCATTTGCCACTTTTCTCT R: AAGACACACGATGTGCCAGT	151	AC
	FGFR2-ACx16 (10q26.13)	F: CAGACCACAGCACAACAGC R: CTCTTGCCAACCCTGGTGAT	142	AC
	D10S1655 (10q26.3)	F: GGACTTGCCAGACTCCATGA R: TGTTCTCCAGAGAGACAGAACC	122	AC
	MGMT-TGx19 (10q26.3)	F: TTGCCACATGAGTGCCTCTT R: TCCTGTGGGAGTGGCATAAA	120	AC
	D10S169 (10q26.3)	F: GATCTGTGACTGCCTTCTCT R: AAGAGGAGGAGTCCATTCAG	113	AC
Эндогенный контроль	3p25.1-22xTG	F: CACCAGCCTGCTACCAACTA R: TCCCTCAAGTCTGAATGCC	148	AC
	6p21.1-16xGT	F: CTTGCCAGTCAGTCCACACA R: TGATCCCAGATGATTTTGTGGT	138	AC
	7q21.2-15xTG	F: ATCTCTCTGGCGAATCCTGG R: GAAGCCCAATGAACGATGCC	124	AC
	9q21.33-15xGT	F: GGCAGAGAAGAATGATTTGGCA R: TGGTGTTAAGATGCATCCCAA	150	AC
	16p13.12-19xTG	F: AGCTTAAGACAGAATGGCAGG R: CCTCTCTGACCCTCTGCTA	146	AC
	19p13.2-19xGT	F: ACAAAAGCCACAAACTCAAAAGG R: CACACCGAGATTAGGGCTGG	136	AC

Примечание. \* — консенсусная последовательность в соответствии с UCSC Genome Browser

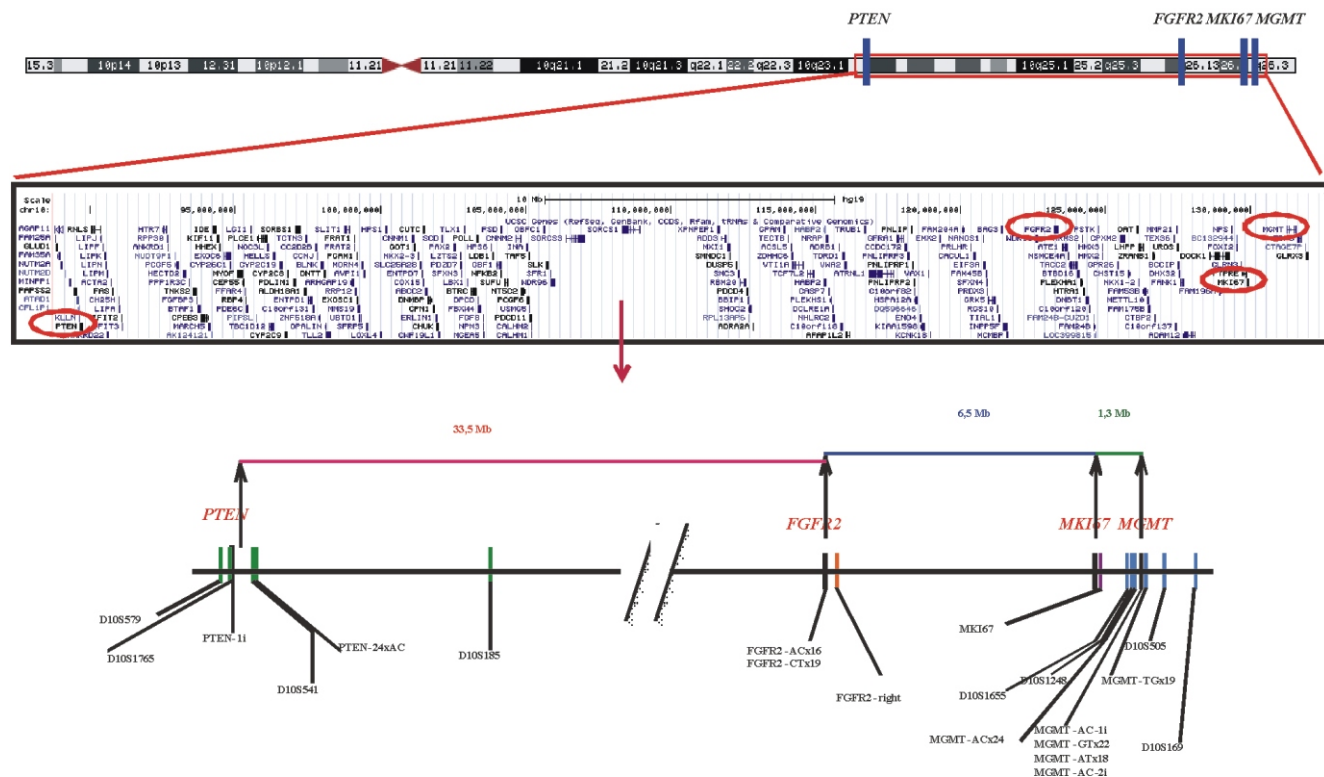


Рис. 1. Схема расположения микросателлитных маркеров для анализа аллельного состояния локуса 10q23.3-26.3. Зеленым отмечены маркеры для определения ПГ области расположения гена *PTEN*, оранжевым – гена *FGFR2*, фиолетовым – гена *MKI67* и синим – гена *MGMT*.

Характеристика и расположение микросателлитных маркеров для исследования аллельного состояния областей расположения генов *PTEN*, *FGFR2*, *MKI67* и *MGMT*

Таблица 3

Микросателлитный маркер	Единица повтора	Расстояние до маркера	Гетерозиготность маркера	
<i>PTEN</i> (10q23.3)	D10S579	AC	~193 тыс. п.н. проксимальнее <i>PTEN</i>	12,1% (15/124)
	D10S1765	AC	~21 тыс. п.н. проксимальнее <i>PTEN</i>	56,5% (70/124)
	PTEN-1i	AC	1 интрон гена <i>PTEN</i>	4,8% (6/124)
	D10S541	AC	~263 тыс. п.н. дистальнее <i>PTEN</i>	57,3 (71/124)
	PTEN-ACx24	AC	~314 тыс. п.н. дистальнее <i>PTEN</i>	52,4% (65/124)
	D10S185	AC	~5,5 млн п.н. дистальнее <i>PTEN</i>	57,3% (71/124)
<i>FGFR2</i> (10q26.13)	FGFR2-ACx16	AC	16 интрон (последний) <i>FGFR2</i>	44,4% (55/124)
	FGFR2-CTx19	CT	4 интрон <i>FGFR2</i>	28,2% (35/124)
	FGFR2-right	AC	~126 тыс. п.н. дистальнее <i>FGFR2</i>	32,3% (40/124)
<i>MGMT</i> (10q26.2)	MKI67	AACT	~7 тыс. п.н. дистальнее <i>MKI67</i>	53,2% (66/124)
<i>MGMT</i> (10q26.3)	D10S1655	AC	~309 тыс. п.н. проксимальнее <i>MGMT</i>	23,4% (29/124)
	D10S1248	CCTT	~173 тыс. п.н. проксимальнее <i>MGMT</i>	32,3% (40/124)
	MGMT-ACx24	AC	~161 тыс. п.н. проксимальнее <i>MGMT</i>	33,1% (41/124)
	MGMT-AC-1i	n(AC)-T-m(AC)	1 интрон <i>MGMT</i>	55,6% (69/124)
	MGMT-GTx22	AC	2 интрон <i>MGMT</i>	40,3% (50/124)
	MGMT-ATx18	TA	2 интрон <i>MGMT</i>	33,1% (41/124)
	MGMT-AC-2i	n(AC)-G-m(AC)	2 интрон <i>MGMT</i>	46,8% (58/124)
	MGMT-TGx19	AC	~79 тыс. п.н. дистальнее <i>MGMT</i>	48,4% (60/124)
D10S505	AAAT	~350 тыс. п.н. дистальнее <i>MGMT</i>	46,0% (57/124)	
D10S169	AC	~956 тыс. п.н. дистальнее <i>MGMT</i>	58,1% (72/124)	



Доля образцов с ПГ, относительно числа информативных (гетерозиготных в нормальных парах) образцов, составила для области расположения гена *PTEN* 53,3% (65/122); области расположения гена *FGFR2* — 56,0% (51/91); области расположения гена *MKI67* — 60,6% (40/66) и области расположения гена *MGMT* — 60,2% (74/123). Доля образцов с выявленной ПГ в локусе 10q23.3-26.3 составила 62,1% (77/124).

Для образцов с выявленной ПГ в локусе 10q23.3-26.3 охарактеризованы особенности границ ПГ. В 84,4% (65/77) образцов с выявленной ПГ участок ПГ содержал области расположения всех 4 изучаемых генов, то есть включал весь исследуемый локус 10q23.3-26.3 (около 43 млн п.н.). В 10,4% (8/77) случаев область ПГ включала гены *FGFR2*, *MKI67* и *MGMT* (около 9 млн п.н.) и не включала ген *PTEN*. В 2,6% (2/77) случаев участок ПГ включал области расположения генов *PTEN*, *FGFR2* и *MKI67* и не включал маркеры области расположения гена *MGMT*. В 2,3% (2/77) случаев выявлена ПГ только области расположения гена *MGMT* (около 1,6 млн п.н.). Таким образом, наиболее часто ПГ на длинном плече 10-й хромосомы при глиобластоме затрагивает протяженный участок, включающий локус 10q23.3-26.3, однако с меньшей частотой может происходить потеря различных более коротких участков хромосомы.

Исследование числа копий локуса 10q23.3-26.3 в образцах с выявленной ПГ. Для установления количественного изменения числа копий района 10q23.3-26.3 в образцах с выявленной ПГ в этом регионе разработана система для КМА в реальном времени.

Дизайн КМА в реальном времени был опубликован Ginzinger D. с соавт. (2000) однако не получил широкого распространения [18]. Использование универсального зонда для детекции амплифицированного продукта этим методом позволяет эффективно решить проблему эндогенного контроля копийности участков опухолевых геномов [19]. Наш опыт использования технологии, описанной D. Ginzinger с соавт. (2000), показал, что предложенная разработчиками система эндогенных контролей содержит локусы, копийность которых часто нарушена в образцах глиобластомы (собственные наблюдения и данные литературы) [20]. Кроме того, нами замечены ошибки в дизайне конкретных специфических пар праймеров, обусловленные, очевидно, неточностями последовательности генома человека, использованной авторами при разработке системы. Опираясь на уточненную и подробно аннотированную версию генома hg19 и используя накопленные за последнее десятилетие сведения о нарушениях копийности геномных локусов при глиобластоме, мы разработали собственную систему эндогенного контроля, а также специфических пар праймеров (табл. 2).

КМА в реальном времени был проведен для 64 образцов с выявленной ПГ в локусе 10q23.3-26.3. Результаты КМА в реальном времени приведены на рис. 3.

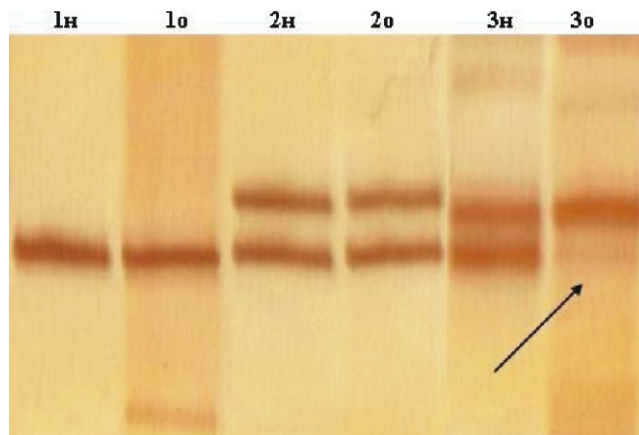


Рис. 2. Пример электрофореграммы, демонстрирующей результаты микросателлитного анализа внутригенного маркера *MGMT-AC-2i*. n — ДНК нормальной ткани (из лимфоцитов периферической крови); o — ДНК опухоли; стрелкой указан ПЦР-продукт, ослабление интенсивности сигнала с одного из аллелей которого свидетельствует о ПГ. В случае 1 в образцах нормы и опухоли в ПААГ присутствует только один фрагмент, соответствующий одному аллелю и свидетельствующий о неинформативном состоянии микросателлитного маркера. В случае 2 в ПЦР-продуктах, полученных из ДНК крови и опухоли, детектируются по 2 аллеля сравнимой интенсивности, что говорит о гетерозиготном состоянии маркера и отсутствии ПГ. В 3 случае выявляется явное снижение интенсивности одного аллеля в опухолевом образце по сравнению с нормой, что указывает на ПГ.

Для определения значения копийности, отличающейся от копийности нормальной ДНК, для каждого из выбранных локусов рассчитали порог. Выборку образцов с нормальной копийностью в локусе сформировали на основе образцов, которые по результатам микросателлитного анализа показали отсутствие аллельного дисбаланса. На основании значений КМА в реальном времени в этой выборке образцов определили толерантный интервал значений, соответствующих нормальной копийности [18]. Значения порогов для каждого локуса приведены в табл. 4.

С помощью КМА в реальном времени в 37,5% (24/64) образцов с выявленной ПГ определена одна копия ДНК по всем исследованным микросателлитным маркерам, то есть, выявлена делеция локуса 10q23.3-26.3. В 25,0% (16/64) образцов с выявленной ПГ выявлено две копии ДНК по всем исследованным микросателлитным маркерам, то есть, определена однородительская дисомия (ОРД) в исследуемом локусе. В остальных 37,5% (24/64) образцов выявлены локусы как с одной копией ДНК, так и с двумя копиями (рис. 3). В табл. 5 приведены частоты делеции и ОРД для каждого из исследуемых микросателлитных локусов.

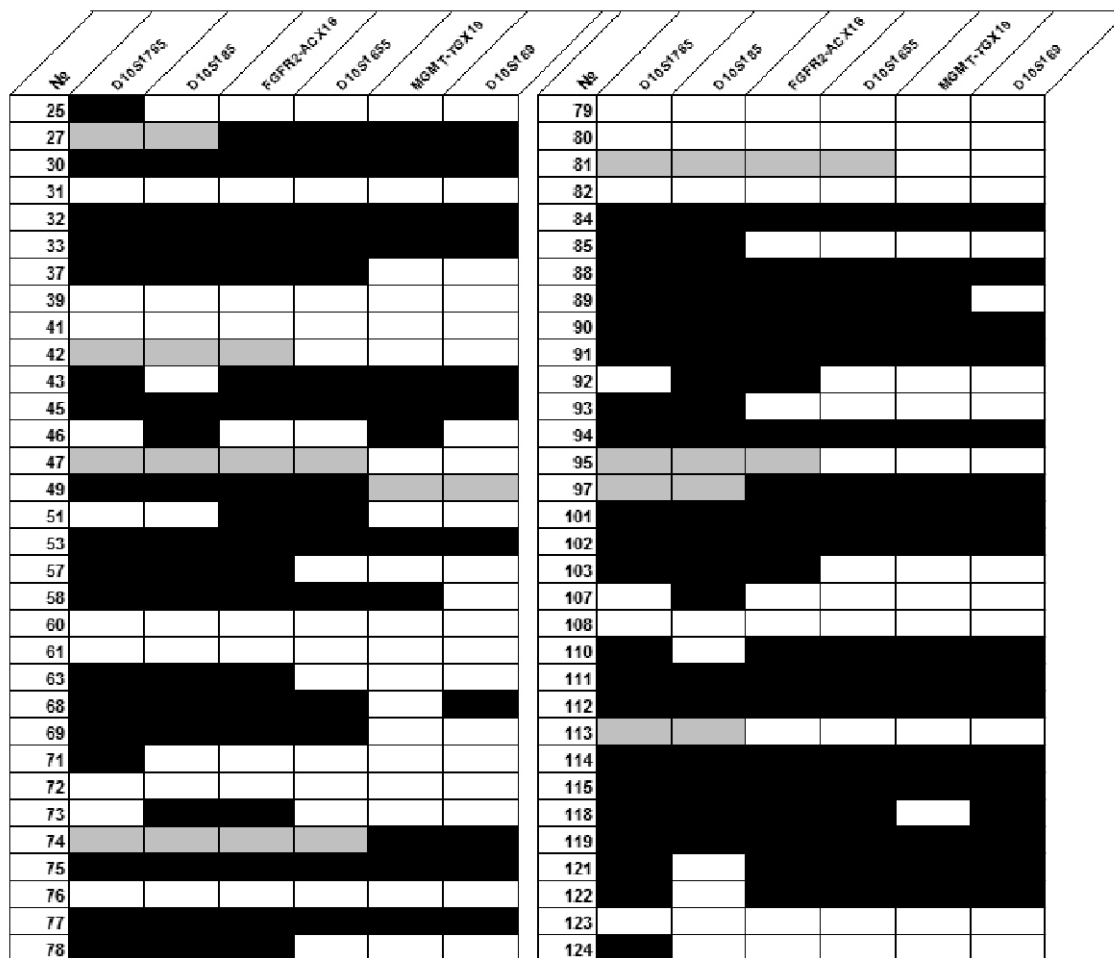


Рис. 3. Результаты КМА в реальном времени. Черным цветом отмечены локусы с делецией; белым цветом — локусы с неизменной копийностью (ОРД), серым цветом отмечены локусы, в которых методом микросателлитного анализа не выявлено изменения копийности в образце.

**Значения порогов для определения копийности, отличающейся от копийности нормальной ДНК, для каждого микросателлитного локуса**

Таблица 4

Микросателлитный локус	Значение порога	
	1 копия ДНК	2 копии ДНК
D10S1765	≤1,332	>1,332
D10S185	≤1,332	>1,332
FGFR2-ACx16	≤1,542	>1,542
D10S1655	≤1,249	>1,249
MGMT-TGx19	≤1,083	>1,083
D10S169	≤1,042	>1,042

**Частоты делеции и ОРД для исследованных микросателлитных локусов**

Таблица 5

Локус	D10S1765	D10S185	FGFR2-ACx16	D10S1655	MGMT-TGx19	D10S169
Частота делеции	71,4% (40/56)	66,1% (37/56)	68,4% (41/60)	55,7% (34/61)	47,6% (30/63)	46,0% (29/63)
Частота ОРД	28,6% (16/56)	33,9% (19/56)	31,7% (19/60)	44,3% (27/61)	52,4% (33/63)	54,0% (34/63)

Следовательно, методом КМА в реальном времени мы показали, что ПГ в районе 10q23.3-26.3 может быть отражен как делеция, так и ОРД. Кроме того, делеция и ОРД может подвергаться не только целый район 10q23.3-26.3, но в нем могут присутствовать как участки с делецией, так и участки с ОРД. Для маркеров, расположенных в проксимальной части региона (D10S1765, D10S185, FGFR2-ACx16) выше вероятность делеции, чем ОРД, а для маркеров, расположенных в дистальной части (D10S1655, MGMT-TGx19 и D10S169), частота делеции и ОРД статистически неотличима (рис. 4). Различие распределений частот молекулярных событий в проксимальном и дистальном районах достоверно ( $p = 0,00002$ ). Обнаружено также достоверное различие частот встречаемости делеций и ОРД в проксимальном и дистальном районах изучаемого локуса ( $p = 0,0002$ ).

Гетерозиготная делеция целого района 10q23.3-26.3 или его частей приводит к потере функции генов-супрессоров, расположенных в них. Делеция является одним из механизмов инактивации генов-супрессоров опухолевого роста [21]. При ОРД происходит утрата одной копии участка хромосомы и восстановление ее нормальной копийности за счет дупликации участка оставшейся хромосомы. Считается, что, как правило, делетируется нормальный аллель, а измененный аллель удваивается, что приводит к инактивации генов-супрессоров, расположенных в таких участках [4, 22]. Однако для точного понимания влияния ОРД необходим поиск других молекулярно-генетических изменений в регионе с копий-нейтральной ПГ.

Таким образом, в ходе проведенного исследования изучена молекулярная патология локуса 10q23.3-26.3, содержащего гены-кандидаты *PTEN*, *FGFR2*, *MKI67* и *MGMT*, в контексте копийности генетического материала. Показано, что ПГ в локусе 10q23.3-26.3 связана не только исключительно с утратой одной из копий участка хромосомы, но также и с дупликацией оставшегося аллеля. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости дальнейшего более детально изучения геномной области для выявления потенциальных маркеров течения заболевания и ответа на терапию.

### Список литературы

- Dunn GP, Rinne ML, Wykosky J et al. Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma. *Genes Dev.* 2012;26(8):756-784.
- Hutter A. Overview of Primary Brain Tumors: Pathologic Classification, Epidemiology, Molecular Biology, and Prognostic Markers. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2012 Aug;26(4):715-732.
- Jesionek-Kupnicka D, Szybka M, Potemski P et al. Association of loss of heterozygosity with shorter survival in primary glioblastoma patients. *Pol J Pathol.* 2013 Dec;64(4):168-275.
- Mizoguchi M, Kuga D, Guan Y et al. Loss of heterozygosity analysis in malignant gliomas. *Brain Tumor Pathol.* 2011 Jul;28(3):191-196.

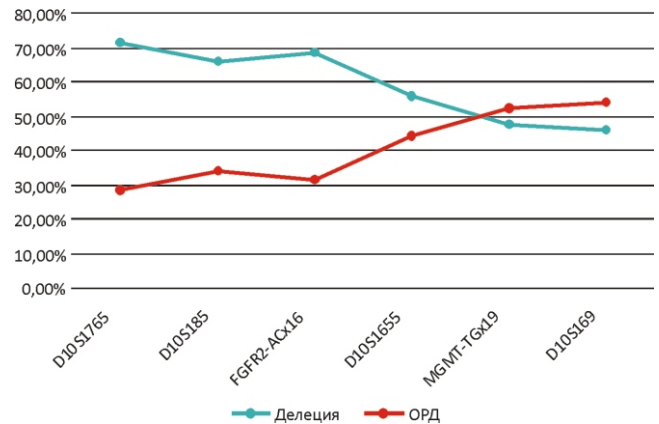


Рис. 4. График, отражающий изменение частоты делеции и ОРД в исследованных микросателлитных локусах.

- Ohgaki H, Kleihues P. Genetic Pathways to Primary and Secondary Glioblastoma. *Am J Pathol.* 2007 May;170(5):1445-1453.
- Balesaria S, Brock C, Bower M et al. Loss of chromosome 10 is an independent prognostic factor in high-grade gliomas. *Br J Cancer.* 1999 Dec;81(8):1371-1377.
- Tada K, Shiraishi S, Kamiryo T. Analysis of loss of heterozygosity on chromosome 10 in patients with malignant astrocytic tumors: Correlation with patients age and survival. *J. Neurosurg.* 2001 Oct;95(4):651-659.
- Crespo I, Tao H, Nieto AB et al. Amplified and Homozygously Deleted Genes in Glioblastoma: Impact on Gene Expression Levels. *PLoS One.* 2012 Sep;7(9):e46088.
- Heroux MS, Chesnik MA, Halligan BD et al. Comprehensive characterization of glioblastoma tumor tissues for biomarker identification using mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. *Physiol Genomics.* 2014 Jul 1;46(13):467-481.
- Gupta K, Salunke P. Molecular markers of glioma: an update on recent progress and perspectives. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2012 Dec;138(12):1971-1981.
- Yang Y., Shao N, Luo G et al. Mutations of *PTEN* Gene in Gliomas Correlate to Tumor Differentiation and Short-term Survival Rate. *Anticancer Res.* 2010 Mar;30(3):P. 981-985.
- Katoh M, Nakagama H. FGF Receptors: Cancer Biology and Therapeutics // *Med Res Rev.* 2014 Mar;34(2):280-300.
- Nakahara Y, Shiraishi T, Okamoto H et al. Detrended fluctuation analysis of genome-wide copy number profiles of glioblastomas using array-based comparative genomic hybridization. *Neuro-Oncology.* 2004 Oct;6(4):281-289.
- Ader I, Delmas C, Skuli N et al. Preclinical evidence that SSR128129E — A novel small-molecule multi-fibroblast growth factor receptor blocker — Radiosensitises human glioblastoma. *Eur J Cancer.* 2014 Sep;50(13):2351-2359.
- Arshad H, Ahmad Z, Hasan SH. Gliomas: correlation of histologic grade, Ki67 and p53 expression with patient survival. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2010;11(6):1637-1640.
- Hegi ME, Liu L, Herman JG et al. Correlation of O<sup>6</sup>-Methylguanine Methyltransferase (MGMT) Promoter Methylation With Clinical Outcomes in Glioblastoma and Clinical Strategies to Modulate MGMT Activity. *J Clin Oncol.* 2008 Sep 1;26(25):4189-4199.
- Стрельников ВВ, Малышева АС, Шубина МВ и др. Делеция области расположения гена *MGMT* на хромосоме 10q26.3. *Молекулярная медицина.* 2011;(2):28-31.



18. Ginzinger DG, Godfrey TE, Nigro J et al. Measurement of DNA Copy Number at Microsatellite Loci Using Quantitative PCR Analysis. *Cancer Res.* 2000 Oct;60(19):5405-5409.

19. Nigro JM, Takahashi MA, Ginzinger DG et al. Detection of 1p and 19q Loss in Oligodendroglioma by Quantitative Microsatellite Analysis, a Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction Assay. *Am J Pathol.* 2001 Apr;158(4):1253-1262.

20. Алексеева Е.А., Танас А.С., Прозоренко Е.В. и др. Анализ аллельного дисбаланса при глиобластоме: новые хромо-

сомные участки потери гетерозиготности и новые гены-кандидаты. *Медицинская генетика.* 2014;(11):41-46.

21. Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1971 Apr.;68(4):820-823.

22. Yin D, Ogawa S, Kawamata N et al. High Resolution Genomic Copy Number Profiling of Glioblastoma Multiforme by Single Nucleotide Polymorphism DNA Microarray. *Mol. Cancer Res.* 2009 May; 7(5): 665-677.

## Molecular pathology of the 10q23.3-26.3 chromosome region in glioblastoma

Alekseeva E.A.<sup>1</sup>, Thanas A.S.<sup>1,2</sup>, Prozorenko E.V.<sup>3,4</sup>, Zaytsev A.M.<sup>5</sup>, Kurzhupov M.I.<sup>5</sup>, Kirsanova O.N.<sup>5</sup>, Rudenko V.V.<sup>1</sup>, Zaletaev D.V.<sup>1,2,3</sup>, Strelnikov V.V.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> — Research Centre for Medical Genetics,

Moscow, Russian Federation, 115478, Moskvorechie st.1, e-mail: ekater.alekseeva@gmail.com

<sup>2</sup> — Pirogov Russian National Research Medical University,

Moscow, Russian Federation, 117997, Ostrovityanova st. 1, e-mail: vstrel@list.ru

<sup>3</sup> — I.M. Sechenov First Moscow State Medical University,

Moscow, Russian Federation, 119991, Trubetskaya st. 8, e-mail: zalnem@mail.ru

<sup>4</sup> — N.N. Blockin Russian Research Center for Oncology,

Moscow, Russian Federation, 115478, Kashirskoe highway, 24, e-mail: prozorenko1984@mail.ru

<sup>5</sup> — P.A. Hertsen Research Centre for Oncology,

Moscow, Russian Federation, 125284, 2nd Botkinsky Avenue, 3, e-mail: azaitsev\_nsi@mail.ru

Loss of heterozygosity on chromosome 10q is the most frequent genetic alteration in glioblastoma and occurs in up to 80% of cases. Using microsatellite analysis we have determined the frequency of loss of heterozygosity in the 10q23.3-26.3 chromosome region, containing candidate genes *PTEN*, *FGFR2*, *MKI67* and *MGMT*, in 124 samples of glioblastoma. Frequency of loss of heterozygosity at the region under investigation equals 62.1%. We have used quantitative microsatellite analysis to establish a quantitative change of copy number of the 10q23.3-26.3 in 64 samples of glioblastoma with identified loss of heterozygosity in 10q23.3-26.3 area. In 37,5% of the samples only one copy of 10q23.3-26.3 chromosome region was found (deletion), in 25,0% two copies were detected (acquired uniparental disomy,). In 37,5% (24/64) of the samples areas of alternation of deletion and acquired uniparental disomy throughout the tested region were identified. Higher frequencies of deletions were characteristic for the proximal part of 10q23.3-26.3 region (*PTEN* and *FGFR2* genes), while acquired uniparental disomy and deletion were equally in the distal part (*MGMT* gene).

**Keywords:** glioblastoma, loss of heterozygosity, deletion, acquired uniparental disomy