

Биологические микрочипы в лабораторной диагностике злокачественных новообразований

Т.В. НАСЕДКИНА¹, М.А. ЕМЕЛЬЯНОВА¹, И.С. АБРАМОВ¹, И.В. ЦЫГАНОВА²,
К.А. АРХИПОВА², И.Б. ЗБОРОВСКАЯ², Н.Н. МАЗУРЕНКО², Л.Н. ЛЮБЧЕНКО³

¹Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва

²НИИ Канцерогенеза ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва

³НИИ КО, ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва

Соматические мутации в генах EGFR, KRAS и BRAF важны для определения чувствительности ряда опухолей к таргетной терапии. Разработан метод, позволяющий детектировать 13 наиболее часто встречающихся мутаций в гене EGFR (9 вариантов делеций в 19 экзоне, точечные мутации в 858 и 719 кодонах), 13 мутаций в 12, 13 и 61 кодонах гена KRAS и мутацию в 600 кодоне гена BRAF. Для выявления минорных фракций опухолевых клеток в клинических образцах использовали амплификацию последовательностей опухолевой ДНК с подавлением амплификации последовательностей дикого типа в ходе ПЦР с помощью LNA (locked nucleic acid)-олигонуклеотидов. Продукты реакции LNA-блокирующей ПЦР далее гибридизовали с олигонуклеотидными зондами, иммобилизованными в геле на поверхности биочипов. С использованием этого подхода протестированы образцы опухолевой ДНК 123 пациентов с немелкоклеточным раком легкого, преимущественно, аденокарциномами. Использовали как образцы свежезамороженной ткани, так и образцы, фиксированные в парафиновых блоках. В качестве референс-метода использовали секвенирование ПЦР продуктов, полученных из клинических образцов с обогащением опухолевыми клетками. Наличие мутации в гене BRAF исследовано в 93 образцах пациентов с меланомой. В качестве референс-метода использовали аллель-специфичную ПЦР и секвенирование. Разработанный метод с использованием биочипов позволяет с высокой достоверностью обнаруживать мутации в генах EGFR, KRAS и BRAF независимо от метода фиксации клинического материала, если доля клеток, несущих мутацию, составляет не менее 1%.

Ключевые слова: соматические мутации, рак легкого, меланома, EGFR, KRAS, BRAF, биочипы, диагностика

ВВЕДЕНИЕ

Злокачественные опухоли человека характеризуются большим числом генетических изменений [1]. Однако для многих видов злокачественных новообразований среди множества генетических, эпигенетических и хромосомных нарушений можно выделить характерные изменения в одном или нескольких генах, которые определяют и поддерживают опухолевый фенотип и выживание клеток [2]. Идентификация таких генов привела к созданию высокоэффективных противоопухолевых агентов для молекулярно охарактеризованных подгрупп пациентов. Мутации в рецепторе эпидермального фактора роста (EGFR) или BRAF мутации при меланоме являются наиболее четкими примерами «ведущих» (driver) мутаций и одно-

временно, предиктивных биомаркеров ответа на терапию специфическими ингибиторами [3, 4].

В последние годы при лечении немелкоклеточного рака легкого активно используют таргетные препараты гефитиниб и эрлотиниб, которые избирательно связываются с тирозинкиназным доменом рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), тем самым, блокируя рост и пролиферацию клеток опухоли [5]. В ряде исследований показано, что данные препараты эффективны исключительно у пациентов, в опухолях которых обнаруживают соматические мутации в гене EGFR [6]. На эффективность таргетных препаратов, подавляющих активность рецептора эпидермального фактора роста EGFR, также влияет наличие соматических мутаций в генах KRAS и BRAF. Знание мутационного статуса этих генов в конкретной

опухоли позволяет подобрать индивидуальное лечение, увеличивая его эффективность и уменьшая риск развития токсических реакций. Другими примерами таргетной терапии, которая сопрягает выбранные низкомолекулярные ингибиторы с опухолями, несущими специфические онкогенные мутации, являются применение ингибитора BRAF-киназы (вемурафениб) при меланоме.

При анализе опухолевого материала доля клеток с анализируемыми соматическими мутациями может быть невелика, что не всегда позволяет выявить мутацию. Для решения этой проблемы используются различные подходы [7-10]. В нашем исследовании предложен высокочувствительный метод, совмещающий LNA(locked nucleic acid)-блокирующую мультиплексную ПЦР с гибридизацией на биочипе, что сделало возможным проведение одновременного анализа 13 соматических мутаций в гене *EGFR*, а также 13 мутаций в гене *KRAS* и мутации в гене *BRAF*. В результате разработаны высокоэффективные тест-системы, которые в дальнейшем можно использовать для скрининга и стратификации пациентов с различными злокачественными новообразованиями. Достоверное определение мутаций позволяет индивидуально подбирать противоопухолевую терапию, основываясь на генетическом портрете опухоли.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 123 больных НМРЛ, прооперированных и/или получавших химиотерапевтическое лечение в НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН. Выборка представлена 109 аденокарциномами (мужчин - 65, женщин - 44) и 14 образцами плоскоклеточного рака легких (мужчин - 12, женщин - 2). Средний возраст больных с аденокарциномами составил 60,3 года (от 28 до 82 лет), а больных с плоскоклеточным раком – 59,2 года (от 30 до 76 лет). В 81 случае исследовали свежемороженый опухолевый материал, полученный в результате оперативного вмешательства и хранившийся в жидком азоте, а в 46 случаях – архивные парафиновые блоки опухолевых биопсий. Для четырех образцов проводили параллельное исследование свежемороженого материала и архивного материала из парафиновых блоков. При анализе мутации *BRAF* у больных меланомой были использованы образцы опухолевой ткани больных (n=93) с гистологически верифицированным диагнозом, проходивших обследование и лечение на базе НИИ клинической онкологии РОНЦ им. Блохина РАМН с 1989 по 2010 г.г. (32,1% мужчин, 67,9%

женщин, средний возраст манифестации заболевания 55 лет).

Для выделения ДНК из свежемороженого операционного материала использовали набор QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen, Германия). При выделении из парафиновых блоков проводили ручную макродиссекцию опухолевых клеток со срезов под контролем серийного среза, окрашенного гематоксилин-эозином, геномную ДНК выделяли или с помощью протеиназы K [11], или с использованием набора QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Германия). В ячейках биочипа были иммобилизованы олигонуклеотиды, позволяющие определять точковые мутации в кодонах 719 и 858, а также делеции в 19 экзоне гена *EGFR*, мутации в 12, 13 и 61 кодонах гена *KRAS* [12] и мутацию V600E гена *BRAF*. Амплификацию интересующих участков генов *EGFR*, *KRAS* и *BRAF* проводили с помощью двухэтапной мультиплексной ПЦР. На первом этапе ПЦР в состав реакционной смеси входили LNA-олигонуклеотиды, комплементарные последовательностям «дикого типа» для каждого варианта мутации. На втором этапе проводили ассиметричную ПЦР с одновременным флуоресцентным маркированием нарабатываемых одноцепочечных фрагментов ДНК за счет включения флуоресцентно меченого дУТФ-Сγ5. Полученные флуоресцентно меченые продукты использовали для гибридизации на биочипе. Биочипы изготавливали, как описано ранее [12, 13]. Флуоресцентный сигнал с ячеек биочипа регистрировали с помощью портативного анализатора биочипов, снабженного камерой ПЗС и программным обеспечением Imageware (ООО «Биочип – ИМБ», Россия). Считали, что сигнал свидетельствует об образовании дуплекса, если интенсивность флуоресценции от соответствующей ячейки не менее чем в пять раз превышала интенсивность флуоресценции фона. В зависимости от локализации сигнала на биочипе можно судить о наличии той или иной мутации в исследуемом образце. При анализе образцов опухоли при НМРЛ все образцы ДНК со срезов были секвенированы параллельно с анализом на биочипах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 приведена схема фрагмента биочипа для анализа мутаций в гене *EGFR* (А) и примеры гибридизационных картин образца с последовательностью гена *EGFR* дикого типа (рис. 1, Б) и образцов с мутациями: 2235-2249del (E746-A750del) в 19 экзоне (рис. 1, В) и Leu858Arg (рис. 1, Г). Разработанный метод генотипирования на биочипе использован при анализе 123 образцов

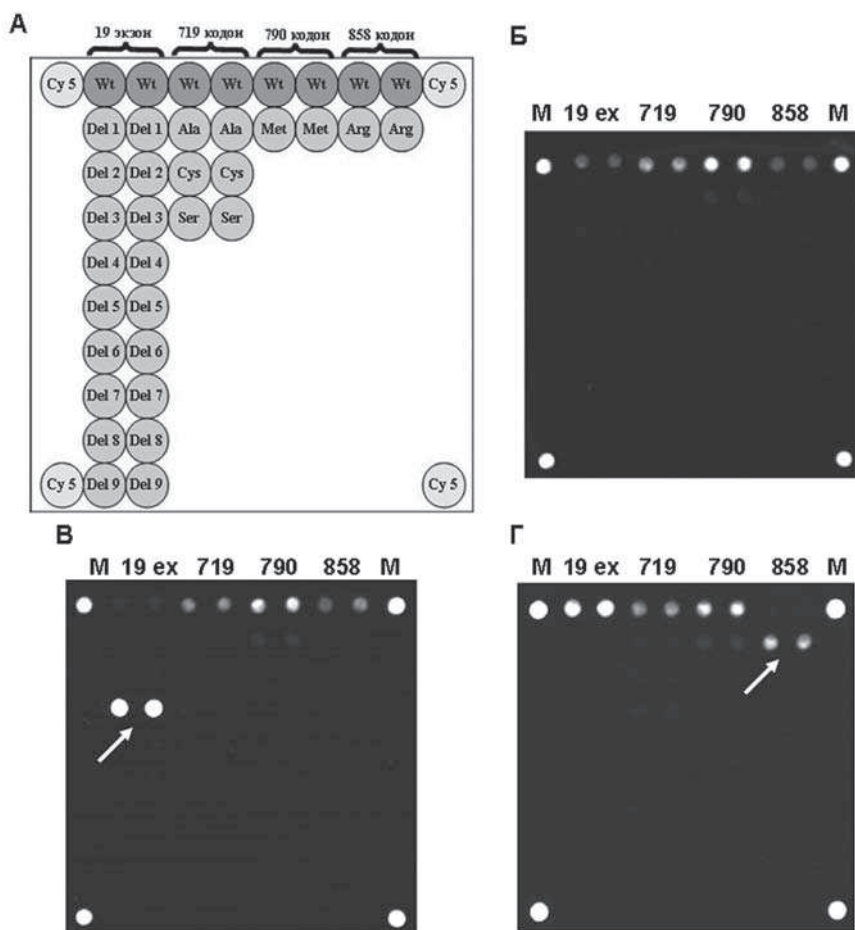
ДНК от больных НМРЛ.

Мутации в гене *EGFR* обнаружены только в образцах пациентов с аденокарциномой легкого. В опухолевых образцах 14 пациентов с диагнозом плоскоклеточный рак мутации отсутствовали. Всего мутации в гене *EGFR* были обнаружены в 21% случаев (23 из 109 аденокарцином). Точечные замены Leu858Arg и делеции в 19 экзоне встречались с равной частотой - в 48% случаев (11 из 23), мутация Gly719Ala присутствовала только в 1(4%) образце. Наиболее часто выявлялась делеция 2235-2249 del (E746-A750del). Анализ мутационного статуса гена *EGFR* у пациентов с аденокарциномой в зависимости от пола показал, что мутации чаще встречаются у женщин (34%,

15 из 44), чем у мужчин (12%, 8 из 65) ($p=0,009$). Результаты генотипирования на биочипе, полученные на образцах архивного материала, фиксированного в парафине, были верифицированы методом секвенирования ($n=46$). Совпадение составило 93,5% (43 из 46). В трех случаях мутации в гене *EGFR* были выявлены секвенированием, но не обнаружены с помощью биочипов. В двух случаях это были делеции в 19 экзоне (E746-T751del и E746-K754del), которые не могут быть выявлены с помощью гибридизации на биочипе, так как комплементарные олигонуклеотиды на биочипе отсутствуют. В одном образце замена Leu858Arg была обнаружена только секвенированием.

Мутационный статус гена *KRAS* определен у

Рис.1. Определение мутаций в гене *EGFR* с использованием биочипов.



А – схема биочипа. Ячейки дублированы. В верхнем ряду расположены олигонуклеотидные зонды, соответствующие последовательностям дикого типа. Зонды для определения делеций в 19 экзоне: Del 1 (2235-2249del (E746-A750del)), Del 2 (2236-2250del (E746-A750del)), Del 3 (2237-2251del (E746-T751 del insA)), Del 4 (2237-2252del insT (E746-T751del insV)), Del 5 (2237-2255del insT (E746-S752del insV)), Del 6 (2239-2248del insC (L747-A750del insP)), Del 7 (2239-2251del insC (L747-T751del insP)), Del 8 (2240-2254del (L747-T751del)), Del 9 (2240-2257del (L747-P753del insS)). М – ячейки, содержащие флуоресцентный краситель Cy 5.

Б-Г – гибридизационные картины образцов ДНК пациентов с раком легкого.

Б – образец не содержит мутаций в гене *EGFR*,

В – в образце выявлена делеция 2237-2251del (E746-T751 del insA),

Г – выявлена мутация L858R.

119 пациентов. Мутации в гене *KRAS* также обнаружены только у пациентов с аденокарциномой, в образцах пациентов с плоскоклеточным раком мутации выявлены не были. Частота мутаций в образцах больных с аденокарциномами составила 18% (19 случаев из 104). Наиболее часто встречались мутации в 12 кодоне (16 из 19), значительно реже – мутации в 13 (2 из 19) и 61 (1 из 19) кодонах.

При анализе образцов меланомы мутация V600E в гене *BRAF* обнаружена у 47,3% (44 из 93) пациентов. Для 56 образцов параллельно был проведен анализ мутации V600E методом аллель-специфичной ПЦР, совпадение результатов генотипирования составило 94,67%. Образцы, в которых было выявлено расхождение результатов, повторно исследовали методом LNA-блокирующей ПЦР с последующим секвенированием. Во всех случаях подтвержден результат, полученный с помощью биочипов, что свидетельствует о высокой специфичности и чувствительности этого метода определения мутации *BRAF*.

Разработанный метод генотипирования мутаций в гене *EGFR*, *KRAS* и *BRAF* с использованием LNA-блокирующей ПЦР и гибридизации на биологическом гидрогелевом микрочипе является удобным и эффективным инструментом при анализе соматических мутаций в опухолевых клетках. Биочип позволяет одновременно анализировать большое количество мутаций. Возможно и дальнейшее увеличение числа анализируемых мутаций. Для детекции флуоресценции на биочипе используется недорогой портативный анализатор биочипов (ООО «Биочип-ИМБ», Россия). Разработанный метод обладает высокой аналитической чувствительностью, позволяя выявлять мутации при низком содержании в образце мутантной ДНК. Это позволяет использовать для анализа клинический материал без предварительного обогащения опухолевыми клетками. Основываясь на результатах генотипирования, можно сделать вывод, что разработанная методика принципиально не уступает в достоверности секвенированию препаратов ДНК, полученных при обогащении препаратов опухолевыми клетками за счет макродиссекции. Следует отметить, что при анализе с помощью биочипов с одинаковой эффективностью могут быть использована как ДНК, выделенная из свежзамороженной ткани, так и ДНК, выделенная из ткани, фиксированной в парафиновых блоках.

Работа была выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы Минобрнауки (ГК №16.512.11.2238) и грантов Российского фонда фундаментальных исследований (№11-04-01950 и 11-04-12097).

ЛИТЕРАТУРА

1. MacConaill LE, Garraway LA. Clinical implications of the cancer genome. // *J Clin Oncol*. 2010. – Vol. 28. – P. 5219-28.
2. Weinstein IB. Cancer. Addiction to oncogenes—the Achilles heel of cancer // *Science*. 2002. - Vol. 297. – P. 63-4.
3. De Luca A, Normanno N. Predictive biomarkers to tyrosine kinase inhibitors for the epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung cancer. // *Curr Drug Targets*. - 2010. – Vol. 11. – P. 851-64.
4. Smalley KS, McArthur GA. The current state of targeted therapy in melanoma: this time it's personal. // *Semin Oncol*. - 2012. – Vol. 39. – P. 204-14.
5. Ciardiello F, Tortora G. EGFR Antagonists in Cancer Treatment // *N Engl J Med*. - 2008. - Vol. 358. – P.1160-1174.
6. Tomizawa Y, Iijima H., Sunaga N., Sato K., Takise A., Otani Y., Tanaka S., Suga T., Saito R., Ishizuka T., Dobashi K., Minna J.D., Nakajima T., Mori M. Clinicopathologic Significance of the Mutations of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. // *Clin Cancer Res*. – 2005. - Vol.11. - P. 6816-6822.
7. Iinuma H., Okinaga K., Adachi M., Suda K., Sekine T., Sakagawa K., Baba Y., Tamura J., Kumagai H., Ida A. Detection of tumor cells in blood using CD45 magnetic cell separation followed by nested mutant allele-specific amplification of p53 and K-ras genes in patients with colorectal cancer. // *Int J Cancer*. - 2000. – Vol. 89. – P. 337–344.
8. Nishikawa T., Maemura K., Hirata I., Matsuse R., Morikawa H., Toshina K., Murano M., Hashimoto K., Nakagawa Y., Saitoh O., Uchida K., Katsu K. A simple method of detecting K-ras point mutations in stool samples for colorectal cancer screening using one-step polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism analysis. // *Clin Chim Acta*. - 2002. – Vol. 318. – P. 107–112.
9. Milbury C.A., Li J., Makrigrigorgos G.M. PCR-based methods for the enrichment of minority alleles and mutations. // *Clin Chem*. - 2009. Vol. 55. – P. 632-640.
10. Beranek M., Jandik P., Sacha M., Rajman M., Sakra L., Stumr F., Soudkova E., Zivny P., Havlicek K. LNA clamped PCR: A specific method for detection of Ki-ras gene mutations in patients with sporadic colorectal carcinomas. // *Klin Biochem Metab*.- 2006. – Vol. 14. – P. 217–220.
11. Гагарин И.М. Молекулярные маркеры эффективности ингибиторов EGFR при немелкоклеточном раке легкого и колоректальном раке. Автореф. дис... канд. мед. наук. — М., 2011. — 34 с.
12. Емельянова М.А., Амосенко Ф.А., Чудинов А.В., Суржилов С.А., Казубская Т.П., Любченко Л.Н., Заседателев А.С., Наседкина Т.В. Определение мутаций в гене *KRAS* в опухолевых клетках с помощью биологических микрочипов. // *Молекулярная биология* - 2011. Том 45 (4). - С. 1–8.
13. Глотов А.С., Наседкина Т.В., Иващенко Т.Э., Юрасов Р.А., Суржилов С.А., Паньков С.В., Чудинов А.В., Баранов В.С., Заседателев А.С. Создание биочипа для анализа полиморфизма в генах системы биотрансформации. // *Молекуляр. биология*. - 2005. – Vol. 39. - С. 403-412.