

DOI: 10.18027/2224-5057-2018-8-3s1-107-109

**Цитирование:** Гордиев М.Г., Сакаева Д.Д., Петкау В.В., Еникеев Р.Ф., Бровкина О.И., Шигапова Л.Х. и др. Таргетное секвенирование нового поколения генов для выявления редких мутаций при наследственном раке молочной железы // Злокачественные опухоли 2018; 3s1:107-109

## Таргетное секвенирование нового поколения генов для выявления редких мутаций при наследственном раке молочной железы

М.Г. Гордиев<sup>1</sup>, Д.Д. Сакаева<sup>2</sup>, В.В. Петкау<sup>3</sup>, Р.Ф. Еникеев<sup>1</sup>, О.И. Бровкина<sup>4</sup>, Л.Х. Шигапова<sup>5</sup>, М.О. Дружков<sup>1</sup>, Е.И. Шагимарданова<sup>5</sup>, Д.С. Ходырев<sup>4</sup>, О.А. Гусев<sup>5,6</sup>, А.Г. Никитин<sup>4</sup>, Р.Р. Фаисханова<sup>2</sup>, А.Ф. Насретдинов<sup>2</sup>, Ю.К. Моляка<sup>7</sup>, Е.Г. Овчинникова<sup>8</sup>, И.С. Шумская<sup>9</sup>

<sup>1</sup> ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер Министерства Здравоохранения Республики Татарстан», Казань, Россия

<sup>2</sup> ГБУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер», Уфа, Россия

<sup>3</sup> ГБУЗ Свердловской Области «Свердловский областной онкологический диспансер», Екатеринбург, Россия

<sup>4</sup> Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

<sup>5</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

<sup>6</sup> RIKEN, Йокогама, Япония

<sup>7</sup> ГБУЗ «Клинический онкологический диспансер №1», Краснодар, Россия

<sup>8</sup> ГБУЗ Нижегородской Области «Нижегородский областной клинический онкологический диспансер», Нижний Новгород, Россия

<sup>9</sup> Медицинский Центр «МЕДИС», Нижний Новгород, Россия

Для корреспонденции: marat7925@gmail.com

### Введение

В настоящее время в мире известно более 3000 мутаций в генах BRCA1 и BRCA2 [1]. Распространенность мутаций генов BRCA1 и BRCA2 значительно варьирует в зависимости от принадлежности к этническим группам и географическому региону. Особенность спектра мутаций в России заключается в преобладании пяти частых мутаций (с. 5266dupC, с. 181T>G, с. 66\_67delAG, с. 4035\_4035delA, с. 1961\_1961delA), которые охватывают до 90% всего спектра. С наибольшей частотой у женщин, проживающих в достаточно отдаленных друг от друга регионах России, встречается одна из этих мутаций – с. 5266dupC в экзоне 20 гена BRCA1 (от 68 до 90%) [2]. На основе этих данных разработаны и внедрены в клиническую практику коммерческие наборы на основе метода ПЦР для детекции наиболее частых мутаций генов BRCA1 и BRCA2. Однако на настоящий момент такой подход не является оптимальным, так как в этом случае не учитываются редкие мутации и этническая принадлежность пациента. Кроме того, не учитываются мутации в других генах, ответственных за развитие наследственного рака молочной железы. В данной работе мы проанализировали частоту мутаций генов BRCA1 и BRCA2, а также мутации в других генах репарации ДНК у пациенток с синдромом наследственного рака молочной железы (PMЖ) и дали характеристику некоторым редким мутациям из перечисленных генов.

### Материалы и методы

Методом секвенирования нового поколения (NGS) были проанализированы следующие гены: TP53, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, EPCAM, APC, MUTYH, CDKN2A, CDK4, ATM, KIT, PDGFRA, CDH1, CTNNA1, PRSS1, SPINK1, CFTR, BRCA1, BRCA2, FANCI, FANCL, PALB2, RAD51B, RAD51C, RAD54L, RAD51D, CHEK1, CHEK2, CDK4, CDK12, FANCI/BRIP1, PPP2R2A, BARD1, PARP1, NTHL1, POLE, POLD1, BMPR1A, SMAD4, MLH3, MSH6, PMS1, NBN, NF1, PPM1D, DICER1, PPM1D, RB1, HOXB13, BMPR1A, BLM, FANCA, FANCB, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FANCM, RHBDF2, HRAS, BAP1, EGFR, SDHB, SDHC, SDHD, SFTPA1, HER2, SLX4, BAP1, MRE11, FAM175, CtIP, H2AX, RPA, NTHL1, RPS20, BUB1, BUB3, LRP6, STK11, AKT1, ATR, BABAM1, BAP1, BMPR1A, CTNNA1, FAM175A, MRE11A, NBN, PMS2, POLD1, POLE, PRSS1, RAD50, RET, TP53BP1, VHL, XRCC2 в 519 образцах крови от пациенток с наследственным PMЖ, проходивших обследование в различных учреждениях онкологического профиля РФ в 2014–2018 гг. и подписавших информированное согласие на проведение исследования. Критерии включения были следующими: молодой возраст возникновения PMЖ (до 40 лет), отягощенный семейный анамнез (наличие одного и более PMЖ или PЯ у родственниц первой или второй линии родства).

ДНК из лейкоцитов периферической крови выделяли с помощью набора DNeasy Blood & Tissue Kit («Qiagen»). Концентрация ДНК была измерена на спектрофотометре

Таблица 1

Ген	Координата	Транскрипт: кДНК	Белок	Количество
BRCA1	chr17:41209079	NM_007300.3: c. 5329dup	p. Gln1777Profs*74	40
BRCA1	chr17:41258504	NM_007300.3: c. 181T>G	p. Cys61Gly	11
BRCA1	chr17:41215382	NM_007300.3: c. 5224C>T	p. Gln1742*	8
BRCA2	chr13:32972745	NM_000059.3: c. 10095_10096insT	p. Ser3366*	6
BRCA2	chr13:32906576	NM_000059.3: c. 965_966dup	p. Val323Lysfs*2	5
BRCA2	chr13:32913562	NM_000059.3: c. 5070A>C	p. Lys1690Asn	4
BRCA1	chr17:41209095	NM_007300.3: c. 5314C>T	p. Arg1772*	4
BRCA1	chr17:41243844	NM_007300.3: c. 3700_3704del	p. Val1234Glnfs*8	4
BRCA1	chr17:41245587	NM_007300.3: c. 1961del	p. Lys654Serfs*47	3
BRCA1	chr17:41226348	NM_007300.3: c. 4738G>A	p. Glu1580Lys	3
BRCA2	chr13:32950929	NM_000059.3: c. 8754+1G>A	Splice site	3
BRCA1	chr17:41215969	NM_007300.3: c. 5138-1G>A	Splice site	3
BRCA2	chr13:32900279	NM_000059.3: c. 468dup	p. Lys157*	2
BRCA2	chr13:32907409	NM_000059.3: c. 1796_1800del	p. Ser599*	2
BRCA2	chr13:32968950	NM_000059.3: c. 9381G>A	p. Trp3127*	2
BRCA2	chr13:32911298	NM_000059.3: c. 2808_2811del	p. Ala938Profs*21	2
BRCA1	chr17:41243513	NM_007300.3: c. 4035del	p. Glu1346Lysfs*20	2
BRCA1	chr17:41234451	NM_007300.3: c. 4327C>T	p. Arg1443*	2
BRCA2	chr13:32907434	NM_000059.3: c. 1819A>T	p. Lys607*	2
BRCA1	chr17:41244145	NM_007300.3: c. 3403C>T	p. Gln1135*	2
BRCA1	chr17:41245197	NM_007300.3: c. 2351C>A	p. Ser784*	2

Таблица 2

Ген	Частота встречаемости в выборке
BRCA1	19,80%
BRCA2	8,50%
ATM	3,11%
CDKN2A	2,20%
CDH1	2%
CHEK2	2%
POLE	1,90%
APC	2%
FANCL	1,55%
MLH1	1,55%
MSH6	1,40%
PALB2	1,40%
CDK11	1,40%
TP53	1,16%
MLH3	1%
MSH2	0,90%
STK11	0,90%
FaNC2	0,77%
RAD51C	0,77%
NF1	0,77%
PM2	0,77%
NBN	0,54%
POLD1	0,54%
RAD50	0,54%
BUB1	0,54%
RET	0,54%
Отрицательные образцы	42,6%

NanoVue Plus («GE Healthcare») и составляла 30–50 нг/мкл. Подготовка библиотек для секвенирования осуществлялась с помощью NimbleGen SepCapEZ Choice («Roche»). Секвенирование проводилось на приборе Illumina MiSeq («Illumina»). Картирование прочтений на референсную последовательность генома человека (hg19) проводилось при помощи алгоритмов BWA-MEM, качество исходных данных, выравнивания, обогащения и покрытия целевых регионов проверялось с помощью FastQC, BAMQC и NGSrich.

Поиск нуклеотидных вариаций выполнялся с помощью GATK HaplotypeCaller, Samtools, FreeBayes. Полученные VCF-файлы всех комбинаций алгоритмов выравнивания и поиска вариаций объединялись методом опорных векторов, что увеличивало общие показатели чувствительности и специфичности при выявлении мутаций.

Консенсусный VCF-файл обрабатывался с помощью программы SnpSift (глубина прочтения более 10) и аннотировался с помощью SnpEff (анализ всех транскриптов), ANNOVAR (анализ частот аллелей в ExAC, 1000G и ESP6500, алгоритмы проверки функциональной значимости SIFT, PolyPhen2, MutationTaster, FATMM, CADD, DANN, Eigen) и Alamut Batch (влияние на сплайсинг, базы данных dbSNP, ClinVar, HGMD Professional).

Среднее покрытие составило 473x, доля корректно картированных прочтений – 99,6%, доля целевых регионов с покрытием выше 100x – 96,2%.

## Результаты и обсуждение

В результате секвенирования 519 образцов крови пациенток с наследственным РМЖ было выявлено 196 патогенных и 102 предположительно патогенных мутаций. Мутации в генах BRCA1-2, встречаемость в выборке которых больше двух, представлены в табл. 1. Самой частой мутацией, как и ожидалось, оказалась NM\_007300.3: c. 5329dup (21% всех мутаций в BRCA1-2). Суммарная доля мутаций, считающихся частыми и представленных в коммерческих наборах на основе ПЦР, составила 30%. Таким образом, даже если анализировать мутации только в генах BRCA1-2, для большинства пациенток (70%) из выборки результаты анализа ПЦР методом будут неинформативными.

34% мутаций в генах BRCA1-2 в выборке имели редкие мутации, встречаемость которых в выборке не более одного раза. Это сравнительно большое количество носительниц мутаций, которое можно выявить только методом NGS.

Если говорить о мутациях в других генах, участвующих в системе репарации ДНК, то частота мутаций в этих генах представлена в табл. 2.

На сегодня идет поиск корреляций и взаимосвязи между мутационным статусом в генах репараций ДНК и особенностями возраста манифестации, анамнестическими особенностями и рецепторным статусом в выборке наследственного РМЖ.

## Выводы

В результате NGS анализа образцов от 519 пациентов было выявлено 196 патогенных и 102 предположительно патогенных мутаций в генах репараций ДНК. Большинство из этих мутаций не входит в ПЦР-панель коммерческих наборов для выявления наследственных мутаций РМЖ. С появлением все большего массива данных о встречаемости и представленности наследственных мутаций в РМЖ возрастает необходимость использования NGS для секвенирования большой панели генов, формирующих наследственный синдром РМЖ.

## Литература • References

1. NHGRI: Breast Cancer Information Core. [Online]. Available: <https://research.nhgri.nih.gov/bic/>. [Accessed: 25-Jul-2016].
2. Имянитов Е. Н., Наследственный рак молочной железы. Практическая онкология. 2010. Т. 11. №4. С. 258–266.
3. Хасанова А. И., Гордиев М. Г., Ратнер Е. Ю., Жаворонков В. В., Хасанов Р. Ш., Никитин А. Г., BRCA-ассоциированный рак молочной железы у представительниц татарской национальности на примере клинического случая. Приволжский онкологический вестник. 2016. Т. 24. №2. С. 104–108.