

# СОМАТИЧЕСКИЕ И ГЕРМИНАЛЬНЫЕ МУТАЦИИ ПРИ РАКЕ ЖЕЛУДКА

**М.В. Немцова**<sup>1,2</sup>, доктор биологических наук, профессор,  
**А.С. Танас**<sup>1,3</sup>, кандидат биологических наук, **Е.А. Алексеева**<sup>3</sup>, аспирант,  
**И.И. Быков**<sup>1</sup>, кандидат медицинских наук,  
**Д.В. Залетаев**<sup>1,3</sup>, доктор биологических наук, профессор,  
**Т.В. Хоробрых**<sup>1</sup>, доктор медицинских наук, профессор,  
**В.В. Стрельников**<sup>3,4</sup>, доктор биологических наук, доцент

<sup>1</sup>Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Российская Федерация, 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8;

<sup>2</sup>Российская медицинская академия последилового образования Минздрава России,  
Российская Федерация, 123995, Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1;

<sup>3</sup>Медико-генетический научный центр,

Российская Федерация, 115478, Москва, ул. Москворечье, д. 1;

<sup>4</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова  
Минздрава России, Российская Федерация, 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1

**E-mail:** nemtsova\_m\_v@mail.ru, vstrel@list.ru

**Введение.** Большинство случаев рака желудка (РЖ) возникают спорадически. До недавнего времени единственной наследственной формой считался связанный с мутациями в гене *CDH1* наследственный диффузный РЖ, который составляет примерно от 1–3% всех опухолей желудка. Однако значительное количество семейных случаев, которые не имеют мутаций в *CDH1*, позволяет предположить существование наследственных мутаций в других генах, что объясняет семейное накопление. В работе предложена стратегия исследования мутаций с применением NGS в опухолевом образце. Для определения герминального или соматического характера выявленных мутаций проведена их последующая верификация в неизмененной ткани.

**Цель исследования.** Применение NGS для выявления новых наследственных мутаций, определяющих развитие РЖ у пациентов.

**Методы.** NGS, секвенирование по Сэнгеру.

**Результаты.** Проведено исследование мутационного профиля 50 генов, ассоциированных с опухолеобразованием, в 10 опухолевых образцах РЖ. Определены мутации и полиморфизмы в 12 генах. Верифицированы 5 герминальных мутаций: *APC* (с.Т3866А:р.11289К), *CDKN2B* (с.С2056А:р.Д86Н), *RB1* (с.С2056А:р.Н686Н), *MET* (с.С2908Т:р.Р970С), *ATM* (с.Т2572С:р.Ф858Л), причем 3 из них выявлены у 1 пациента.

**Заключение.** Определенные мутации могут иметь прямое отношение к развитию РЖ у пациента и в его семье. Клинически выделенные наследственные мутации у пациентов могут приводить к повышению риска развития рецидива опухоли.

**Ключевые слова:** секвенирование нового поколения, рак желудка, герминальные и соматические мутации

## SOMATIC AND GERMLINE MUTATIONS IN GASTRIC CANCER

**M.V. Nemtsova**<sup>1,2</sup>, **A.S. Tanas**<sup>1,3</sup>, **E.A. Alekseeva**<sup>1,3</sup>, **I.I. Bykov**<sup>1</sup>, **D.V. Zaletayev**<sup>1,3</sup>, **T.V. Khorobrykh**<sup>1</sup>, **V.V. Strelnikov**<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Trubetskaya St., 8, Moscow, 119991, Russian Federation;

<sup>2</sup>Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Barricadnay St. 2/1, Moscow, 123995, Russian Federation;

<sup>3</sup>Research Centre for Medical Genetics, Moskvorechie St, 1, Moscow, 115478, Russian Federation;

<sup>4</sup>Pirogov Russian National Research Medical University, Ostrovityanova St, 1, Moscow, 117997, Russian Federation

**Introduction.** Most cases of gastric cancer (GC) occur sporadically. Until recently, diffuse hereditary gastric cancer associated with the *CDH1* gene mutations was considered the only hereditary form (about 1–3% of all tumors of the stomach). However, a significant number of familial cases without mutations in *CDH1* suggests the existence of genetic mutations in other genes, which explains the familial accumulation. We propose a strategy for the mutation search in the tumor sample by use of NGS. To determine the germinal or somatic status of the identified mutations we perform their subsequent verification in normal tissue.

**The aim of the study.** The application of NGS to identify new genetic mutations that determine the development of gastric cancer in patients.

**Methods.** NGS, Sanger sequencing.

**Results.** We have studied mutational profile of 50 genes associated with cancer in 10 tumor samples. Mutations and polymorphisms were identified in 12 genes. Five germline mutations, in *APC* (с.Т3866А: р.11289К), *CDKN2B* (с.С2056А: р.Д86Н), *RB1* (с.С2056А: р.Н686Н), *MET* (с.С2908Т: р.Р970С), *ATM* (с.Т2572С: р.Ф858Л), were verified and three of them were found in one patient.

**Conclusion.** The identified mutations may have a direct bearing on the development of gastric cancer in a patient and his family and lead to the increased risk of tumor recurrence.

**Key words:** next generation sequencing, gastric cancer, germline and somatic mutations

**ВВЕДЕНИЕ**

В структуре онкологической заболеваемости России рак желудка (РЖ) занимает одно из первых мест, уступая лишь раку легкого у мужчин и раку молочной железы (РМЖ) у женщин. В России РЖ встречается в 2,5 раза чаще, чем в западноевропейских странах, и в 6 раз чаще, чем в США; ежегодно регистрируется 40–50 тыс. новых случаев [1].

РЖ, в соответствии с классификацией Лорен, можно разделить на 2 типа: диффузный и интестинальный (кишечный). Эти 2 типа различаются клинически, морфологически и эпидемиологически. Интестинальный (кишечный) тип чаще наблюдается у пожилых пациентов с мультифокальным атрофическим гастритом, который со временем переходит в кишечную метаплазию или дисплазию. Диффузный тип распространен среди молодых пациентов, и его связь с гастритом и метаплазией не очевидна. Клинические различия этих 2 типов, вероятно, определяются различными молекулярными механизмами опухолевого развития и прогрессии [2].

Основная часть случаев РЖ спорадическая. До недавнего времени единственной наследственной формой считался наследственный диффузный РЖ, который составляет примерно 1–3% всех опухолей желудка. К развитию этой формы рака приводят герминальные мутации в гене *CDH1(16q22.1)*, описано >100 герминальных мутаций в *CDH1* в семьях [3]. Риск развития диффузного РЖ у носителей мутации составляет 70%.

Однако значительное количество семейных случаев РЖ, которые не имеют мутаций в *CDH1*, позволяет предположить существование герминальных мутаций в других генах, которые объясняют семейное накопление. Сегодня известно еще несколько наследственных синдромов с предрасположенностью к опухолям желудка, которые дополняют уже известные наследственные формы.

Синдром Линча обычно характеризуется появлением семейного колоректального рака и возникает при наследственных мутациях в генах репарации – *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, *MLH3*. Однако при синдроме Линча встречаются и семейные опухоли желудка. Эти опухоли отличаются отсутствием инфекции *H. pylori*, проявляются в возрасте примерно 56 лет, относятся преимущественно к интестинальному (кишечному) типу [4].

Синдром Ли-Фраумени является редким наследственным синдромом, при котором встречаются различные злокачественные опухоли, саркомы, РМЖ, опухоли мозга, лейкемии, опухоли коры надпочечников, а также РЖ. Причинами возникновения синдрома Ли-Фраумени являются герминальные мутации гена-супрессора *TP53*. Однако частота РЖ при этом редком синдроме составляет <4% всех возможных новообразований [5].

Синдром Пейтца–Егерса – редкое аутосомно-доминантное заболевание, при котором выявляют наследственные мутации гена *STK11*. К основным клиническим характеристикам синдрома можно отнести полипоз желудочно-кишечного тракта, пигментацию губ и слизистой оболочки рта. Носители наследствен-

ных мутаций гена *STK11* имеют повышенный риск развития опухолей различного типа, в том числе и опухолей желудка [6].

РЖ также может выявляться у пациентов с гастроинтестинальным полипозом, особенно ювенильным, при котором наследственные мутации определяются в генах *SMAD4* или *BMPRIA*. Почти у 24% пациентов с гастроинтестинальным ювенильным полипозом развивается РЖ, а опухолевые клетки определяются в 25% случаев превентивной резекции желудка [7].

При синдроме Коудена, или гастроинтестинальном гамартозном полипозе, причиной которого являются наследственные мутации гена *PTEN*, наряду с другими опухолями может возникать и РЖ [8].

До недавнего времени исследование наследственных мутаций у пациентов представляло значительные трудности. Высокая стоимость и трудоемкость традиционного метода секвенирования по Сэнгеру требовали оптимизации подходов к молекулярно-генетической диагностике, заключающейся в последовательном анализе экзонов генов-кандидатов. Появившиеся в последнее время методики секвенирования нового поколения (NGS – Next Generation Sequencing) позволяют в 1 пробирке анализировать от нескольких десятков до нескольких сотен генов с повышенной частотой мутаций в опухолях. При таком подходе можно начинать анализ с исследования мутаций в опухолевом образце, а затем верифицировать их в неизмененных тканях, определяя их герминальный или соматический характер. В работе предложена подобная стратегия исследования для пациентов с опухолями желудка.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ****Характеристика клинического материала**

В исследование включены 10 больных с местнораспространенным РЖ, которые находились на лечении в Клинике факультетской хирургии им. Н.Н. Бурденко Первого МГМУ им. И.М. Сеченова. Средний возраст больных составлял  $63,4 \pm 10,0$  года (от 46 до 80 лет). Всем 10 больным выполнено оперативное лечение в объеме гастрэктомии; операционный образец опухоли использован для анализа. У всех пациентов РЖ подтвержден морфологическим исследованием операционного материала. В соответствии с классификацией Лорен, интестинальный тип РЖ подтвержден в 5 (50%), диффузный – также в 5 (50%) случаях.

**Скрининг мутаций методом секвенирования нового поколения**

Скрининг мутаций в генах, вовлеченных в канцерогенез, проводили методом секвенирования нового поколения на платформе Ion Torrent PGM (Life Technologies, США). Протокол включает этапы подготовки библиотек фрагментов геномной ДНК, клональной эмульсионной полимеразной цепной реакции (ПЦР), секвенирования на геномном анализаторе и биоинформационного анализа результатов. Библиотеки фрагментов ДНК готовили, используя технологию Ion Ampliseq, представляющую собой ультрамультиплексную ПЦР. В качестве набора мультиплексных праймеров применяли коммерчески доступную панель

олигонуклеотидов Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2 (Life Technologies). Панель представляет собой смесь из 207 пар праймеров для одновременной амплификации участков 50 генов, вовлеченных в канцерогенез, для которых показаны наиболее высокая частота мутаций по результатам изучения тысяч образцов злокачественных новообразований (выбор локусов осуществлялся по базе данных COSMIC – Catalogue of Somatic Mutations in Cancer). Гены, входящие в панель исследования, представлены на рис. 1. Мультиплексную ПЦР и последующие этапы подготовки библиотек фрагментов проводили с использованием набора реактивов Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 (Life Technologies) по протоколу производителя. Аликвоты подготовленных библиотек подвергали клональной амплификации на микросферах в эмульсии на приборе Ion OneTouch с использованием набора Ion OneTouch 200 Template Kit v2 DL (Life Technologies). Эффективные продукты эмульсионной ПЦР – микросферы, покрытые целевыми ампликонами, очищали от пустых микросфер на приборе Ion OneTouch ES. Секвенирование проводили на геномном секвенаторе Ion Torrent PGM в чипах серии Ion 314 с использованием набора Ion PGM 200 Sequencing Kit (Life Technologies).

Результаты секвенирования анализировали с использованием программного обеспечения Torrent Suite в составе: Base Caller (первичный анализ результатов секвенирования); Torrent Mapping Alignment Program – TMAP (выравнивание последовательностей относительно референсного генома NCBI build 37 – hg19); Variant Caller (анализ вариаций нуклеотидных последовательностей). Аннотацию функционального значения

генетических вариаций и фильтрацию известных полиморфизмов с использованием базы данных dbSNP проводили с помощью компьютерной программы ANNOVAR [9]. При биоинформационном анализе использовали базу данных dbSNP [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>], архив клинически значимых генетических вариантов ClinVar [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>].

Визуальный анализ данных, ручную фильтрацию артефактов секвенирования и выравнивания последовательностей осуществляли с использованием программы Integrative Genomics Viewer – IGV [10].

#### Валидация мутаций, выявленных посредством секвенирования нового поколения

Валидацию мутаций, выявленных при скрининге, проводили для исключения артефактов геномного секвенирования и для определения соматического или герминального характера мутаций. Применяли метод прямого секвенирования индивидуальных ПЦР-продуктов с праймеров, фланкирующих области конкретных мутаций, на автоматическом генетическом анализаторе ABI PRISM 3100 (Life Technologies) по протоколам производителя (см. рис. 1).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нами исследован мутационный профиль 50 генов, ассоциированных с опухолеобразованием, в 10 опухолевых образцах РЖ, 5 из которых принадлежали к интестинальному и 5 – к диффузному типу. Полученные результаты представлены в таблице. На рис. 2 отмечены гены из исследуемой панели, изменения в которых нами выявлены изменения. Всего нам удалось опреде-

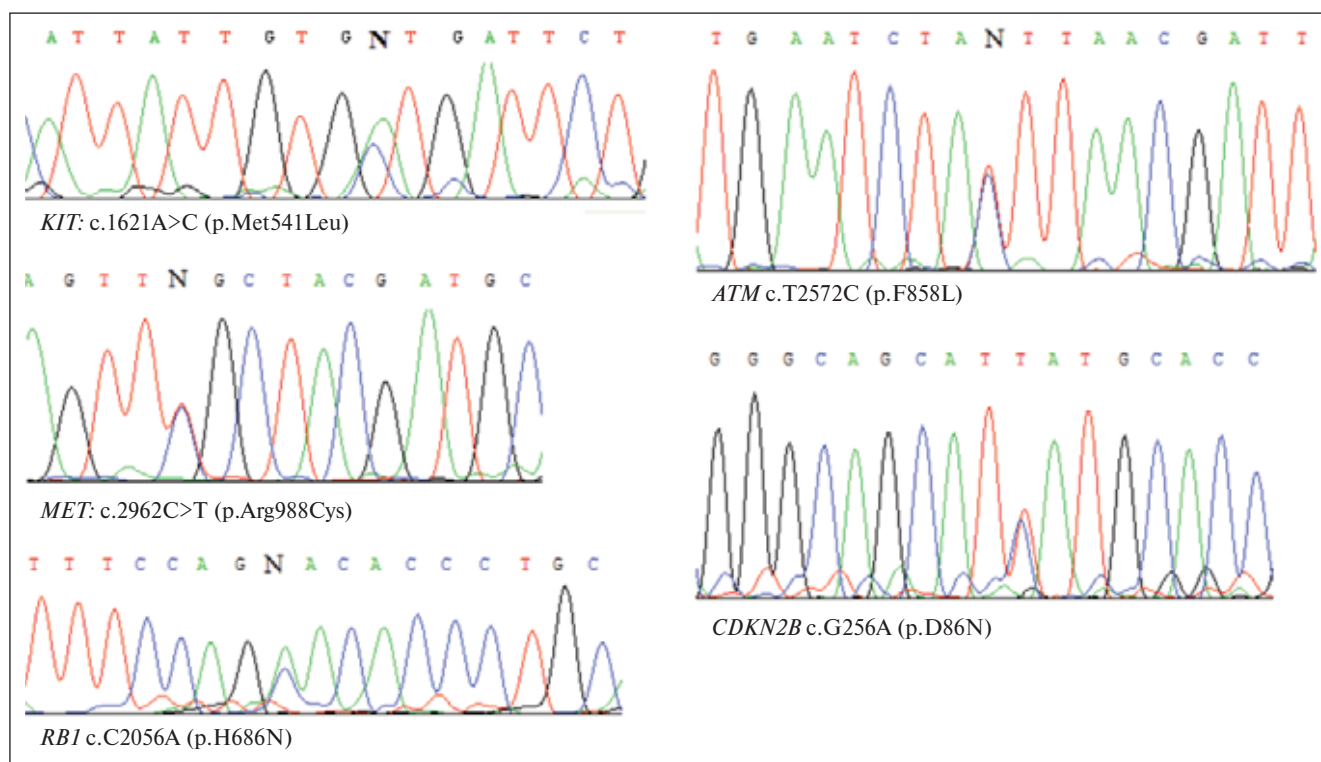


Рис. 1. Валидация мутаций в неизменной ткани методом секвенирования по Сэнгеру

лить мутации и полиморфизмы в 12 генах. Все мутации, полученные при исследовании опухолевого генома в операционном материале, мы верифицировали в крови пациентов для подтверждения или исключения герминального характера.

Из 10 исследуемых опухолевых образцов в 2 при РЖ диффузного типа (№7 и №8) нам не удалось выявить мутаций или патогенных полиморфизмов, связанных с канцерогенезом, представленных в исследуемой панели из 50 генов.

Среди герминальных полиморфизмов чаще всего мы выявили условно-патогенный полиморфизм в 72-м кодоне гена *TP53* (с.С215G:p.P72R: rs1042522) в 5 случаях – в гомозиготном состоянии по аллелю, кодирующему аргинин, и в 3 случаях – в гетерозиготном состоянии. Выявлен также патогенный полиморфизм в гене *KDR* (с.А1416Т:p.Q472Н: rs1870377): в 2 случаях в гетерозиготном и в 2 – в гомозиготном состоянии по аллелю, кодирующему гистидин. У 2 пациентов обнаружен полиморфный вариант в гене *KIT* (с.А1621С:p.M541L; rs3822214) в гетерозиготном состоянии.

Для 5 мутаций, выявленных в ДНК из опухолей желудка, при верификации в крови подтвержден их наследственный характер. У 1 пациента (№6) наследственный характер подтвержден для 3 выявленных мутаций. Для остальных 10 выявленных мутаций при верификации наследственного характера не определено, что позволяет классифицировать эти мутации как соматические.

Канцерогенез представляет собой многостадийный процесс, при котором этапы опухолевого развития характеризуются появлением в геноме клетки различных молекулярных нарушений. Накопление этих нарушений приводит к развитию нестабильности генома, что является отличительной характеристикой опухолевого процесса. Поэтому опухолевая ткань имеет повышенную частоту накопления мутаций, возникающих по причине или вследствие генетической нестабильности. Исследование мутаций в опухолевом геноме имеет как научный, так и практический выход, позволяя выявлять наиболее характерные изменения и перестройки в опухоли для изучения основных этапов ее патогенеза

## ХАРАКТЕРИСТИКА ВЫЯВЛЕННЫХ МУТАЦИЙ

Пациент (пол/возраст, годы; тип РЖ)	Соматические мутации	Герминальные мутации	Полиморфизмы
№1 (М/80; инт)	<i>PIK3CA</i> (с.А1173G:p.I391M; rs3729680) <i>TP53</i> (с.С346T:p.R116W rs121912651)	<i>APC</i> (с.Т3866А:p.I1289К; rs1801155)	<i>KDR</i> (с.А1416Т:p.Q472Н; rs1870377), гетерозигота <i>TP53</i> (с.С215G:p.P72R; rs1042522), гомозигота
№2 (Ж/70; инт)	<i>TP53</i> (с.С77А:p.R26Н rs1042522)	–	<i>KDR</i> (с.А1416Т:p.Q472Н; rs1870377), гомозигота <i>TP53</i> (с.С215G:p.P72R; rs1042522), гомозигота <i>KIT</i> (с.А1621С:p.M541L; rs3822214)
№3 (Ж/79; инт)	<i>RB1</i> (с.С2002Т:p.R668С; rs3092891) <i>CDKN2A</i> (с.С307Т:p.R103W)	<i>MET</i> (с.С2908Т:p.R970С; rs34589476)	<i>KDR</i> (с.А1416Т:p.Q472Н; rs1870377), гетерозигота <i>TP53</i> (с.С215G:p.P72R; rs1042522), гетерозигота
№4 (М/65; инт)	<i>PIK3CA</i> (с.А3140G:p.H1047R; rs121913279) <i>FBXW7</i> (с.С1159Т:p.R387С; rs149680468) <i>PTEN</i> (с.795delA;p.L265fs; rs121913289)	–	<i>TP53</i> (с.С215G:p.P72R; rs1042522), гомозигота
№5 (М/51; инт)	–	–	<i>TP53</i> (с.С215G:p.P72R; rs1042522), гетерозигота
№6 (Ж/62; диф)	<i>STK11</i> (с.С1062G:p.F354L; rs59912467)	<i>CDKN2B</i> (с.С256А:p.D86N; rs148421170) <i>ATM</i> (с.Т2572С:p.F858L; rs1800056) <i>RB1</i> (с.С2056А:p.H686N)	<i>KDR</i> (с.А1416Т:p.Q472Н; rs1870377), гомозигота <i>TP53</i> (с.С215G:p.P72R; rs1042522), гетерозигота
№7 (Ж/56; диф)	–	–	–
№8 (М/67; диф)	–	–	–
№9 (М/46; диф)	–	–	<i>TP53</i> (с.С215G:p.P72R; rs1042522), гомозигота <i>KIT</i> (с.А1621С:p.M541L; rs3822214)
№10 (М/58, диф)	<i>TP53</i> (с.С892Т:p.E298Х)	–	<i>TP53</i> (с.С215G:p.P72R; rs1042522), гомозигота

Примечание: инт – интестинальный, диф – диффузный тип РЖ.

и использовать их в качестве маркера, ассоциированного с клиническим течением. Предложенная нами стратегия мутационного профилирования опухолей с последующей верификацией выявленных мутаций для определения их наследственного характера имеет значительный клинический выход. Поиск герминальных мутаций позволяет модифицировать клинические рекомендации, потому что наличие мутации повышает риск развития повторной опухоли. Выявление наследственных мутаций требует генетической консультации пациентов и их семей с целью выявления бессимптомных носителей для своевременной диагностики возможных опухолей. В нашем исследовании среди 10 пациентов без семейной истории заболевания в 3 случаях подтверждено наличие герминальных мутаций в разных генах (в 1 случае – в 3 генах), прямо не ассоциированных с развитием РЖ, которые могут передаваться детям и приводить к увеличению риска развития опухолей у носителей.

Наиболее часто нами выявлены полиморфизмы в 72-м кодоне гена *TP53* (с.C215G:p.P72R: rs1042522) и в гене *KDR* (с.A1416T:p.Q472H: rs1870377).

Хорошо известно, что ген *TP53* обладает опухолеу-прессорирующей активностью, участвует в поддержании целостности клеточного генома, репрессирует активность теломеразы, препятствуя иммортализации клеток, а также через регуляцию белков, участвующих в ангиогенезе, препятствует образованию новой сосудистой сети в опухолях [11]. Замена Pro>Arg в 72-м кодоне гена приводит к изменению первичной структуры белка и его подвижности, однако не рассматривается как патогенная мутация, потому что отличается высокой частотой встречаемости. Известно, что эта замена приводит к повышению риска развития различных опухолей, например, рака легких, пищевода, шейки матки и др. (OMIM 191170.0005).

**The Ion AmpliSeq™ Cancer Panel targets 50 gene**

<i>ABL1</i>	<i>EZH2</i>	<i>JAK3</i>	<i>PTEN</i>
<i>AKT1</i>	<i>FBXW7</i>	<i>IDH2</i>	<i>PTPN11</i>
<i>ALK</i>	<i>FGFR1</i>	<i>KDR</i>	<i>RB1</i>
<i>APC</i>	<i>FGFR2</i>	<i>KIT</i>	<i>RET</i>
<i>ATM</i>	<i>FGFR3</i>	<i>KRAS</i>	<i>SMAD4</i>
<i>BRAF</i>	<i>FLT3</i>	<i>MET</i>	<i>SMARCB1</i>
<i>CDH1</i>	<i>GNA11</i>	<i>MLH1</i>	<i>SMO</i>
<i>CDKN2A</i>	<i>GNAS</i>	<i>MPL</i>	<i>SRC</i>
<i>CSF1R</i>	<i>GNAQ</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>STK11</i>
<i>CTNNB1</i>	<i>HNF1A</i>	<i>NPM1</i>	<i>TP53</i>
<i>EGFR</i>	<i>HRAS</i>	<i>NRAS</i>	<i>VHL</i>
<i>ERBB2</i>	<i>IDH1</i>	<i>PDGFRA</i>	
<i>ERBB4</i>	<i>JAK2</i>	<i>PIK3CA</i>	

**Рис. 2.** Гены, составляющие панель для исследования. Выделены гены, в которых определены мутации

Ген *KDR/VEGFR2* является рецепторной тирозинкиназой, связывается с фактором роста эндотелия и участвует в развитии сосудистой сети, что делает его хорошим кандидатом для участия в канцерогенных механизмах. Существует несколько работ, в которых выявленный нами вариант последовательности гена ассоциирован с различными патогенными состояниями человека, в том числе опухолями – РМЖ и диффузной В-клеточной лимфомой [12, 13] Однако прямых доказательств канцерогенного влияния этой замены нет, поэтому ее не рассматривают как патогенную мутацию, а относят к условно-патогенным полиморфизмам.

У 2 пациентов (1 – с интестинальным и 1 – с диффузным РЖ) определен полиморфизм в онкогене *KIT*:с.1621A>C (р.Met541Leu). Наследственные мутации в гене *KIT* связаны с развитием семейных гастроинтестинальных стромальных опухолей. Выявленный нами генетический вариант представляет собой довольно редкий аллель, который при исследовании 10 870 хромосом был обнаружен в 8,8% случаев (данные dbSNP). Архив клинически значимых генетических вариантов ClinVar [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>] констатирует, что до сегодняшнего дня исследований по изучению значимости полиморфизма *KIT*:с.1621A>C (р.Met541Leu) не проводилось.

Мы обнаружили наследственный характер мутаций у пациентов, у которых нельзя предположить наличие наследственного диффузного РЖ, связанного с герминальными мутациями гена *CDH1*. Используемая нами панель для NGS Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2 (Life Technologies) имеет ограниченное покрытие гена, кодирующего E-кадгерин, она покрывает мутации только в 3-м и 4-м экзонах, а известно, что мутации распространены равномерно по всем 16 экзонам.

Исследование спектра герминальных мутаций гена *CDH1* у пациентов с диффузным РЖ не было целью нашего исследования. Сегодня наследственный диффузный рак желудка (НДРЖ) хорошо изучен в мире, для пациентов с этим типом рака существует генетический скрининг, определены принципы медико-генетического консультирования семей с этим заболеванием, разработаны подходы к профилактике, основным из которых является профилактическая гастрэктомия. Генетический скрининг для пациентов с НДРЖ проводится с 1999 г., однако в связи с развитием молекулярной генетики, улучшением детекции мутаций и совершенствованием хирургических методик он постоянно развивается [14]. К сожалению, в России недостаточно представлены мероприятия по клиническому наблюдению и генетическому консультированию семей с НДРЖ. Нужно отметить, что молекулярно-генетическая диагностика наследственных форм рака в России значительно обогнала ее генетическое и клиническое применение на практике.

Мы пытались, используя мутационное профилирование, выявить новые гены, мутации в которых могут приводить к развитию РЖ, поэтому в исследование были включены опухолевые образцы от пациентов как с диффузным, так и с интестинальным типом РЖ, не имеющих семейной истории. Наследственные мута-

ции подтверждены для 2 случаев интестинального типа и 1 случая диффузного типа.

В 1 случае мы выявили наследственную мутацию rs1801155 в гене *APC* (с.Т3866А:p.11289К). У пациентов с герминальными мутациями этого гена повышен риск развития рака толстой кишки или РМЖ. Изначально эта мутация была определена у евреев Ашкенази. При тестировании гена *APC* у пациентов с колоректальными карциномами носительство этой мутации определено примерно у 10% евреев Ашкенази, поэтому для ее выявления предложен генетический скрининг [15]. В нашем исследовании у носителя мутации определен интестинальный РЖ, однако даже после проведенной гастрэктомии у пациента сохраняется повышенный риск развития повторной опухоли.

Вторая герминальная миссенс-мутация при интестинальном РЖ определена в гене *MET*: с.С2962Т (р.Р988С). Герминальные активирующие мутации протоонкогена *MET* характерны для семейного папиллярного рака почки, однако эти мутации локализируются в тирозинкиназном домене гена. Выявленная нами однонуклеотидная замена с.С2962Т (р.Р988С) в 14-м экзоне гена *MET* (rs34589476) с частотой минорного аллеля 0,26% приводит к замене аминокислоты в юкстамембранном домене белка *MET* и не влияет на активность тирозинкиназного домена [16]. Тем не менее трансфекция клеток аллелем *MET*, содержащим эту замену, стимулирует автономную пролиферацию, угнетает клеточную адгезию и усиливает миграцию клеток [17]. В то же время авторы исследования отмечают умеренность онкогенного потенциала этой и других мутаций юкстамембранного домена. В единственной опубликованной ранее работе при исследовании герминальных мутаций *MET* у пациентов с РЖ сообщается об аминокислотной замене Р1009S, которая расположена, как и найденная нами Р988С, в юкстамембранном домене *MET* [18].

У 1 пациента с диффузным типом РЖ мы выявили сразу 3 наследственные мутации в генах, ассоциированных с канцерогенезом (*CDKN2B*, *ATM*, *RBI*), каждой из которых было бы достаточно для существенного повышения риска развития опухоли. Из 3 выявленных нами мутаций ни одна не была прямо связана с развитием РЖ.

Герминальная мутация в гене *ATM* с.Т2572С (р.Р858L) была впервые описана в группе пациентов с РМЖ и характеризуется как одна из мутаций, определяющих повышение риска развития повторного РМЖ [19].

Ген *ATM* является ключевым регулятором клеточных путей, защищающих клетки от злокачественной трансформации в результате воздействия генотоксических агентов, таких как ионизирующее излучение, вызывающее 2-цепочечные разрывы ДНК. Многие из белков, прямо или косвенно регулируемых через *ATM*, такие как *BRCA1*, *CHEK2*, *FANCD2* или *TP53*, вовлечены в этиологию различных видов рака, что повышает вероятность того, что генетический вариант *ATM* может влиять на активность этих субстратов и повышать риск развития опухолей разного типа.

Другая наследственная мутация *CDKN2B* с.G256A (р.Д86N) определена во 2-м экзоне гена *CDKN2B*. Ген *CDKN2B* является геном-супрессором опухолевого роста и расположен в локусе 9q21, где локализован целый кластер генов-супрессоров, *CDKN2B*, *CDKN2A* и *ARF*. В этом локусе часто выявляют соматические делеции при разных типах рака — РМЖ, мочевого пузыря, меланоме и глиомах.

Идентифицированная мутация имеет популяционную частоту минорного аллеля 0,24% и описана в базе данных dbSNP как rs148421170 с неустановленной клинической значимостью. Мутация расположена в высококонсервативном районе гена *CDKN2B*, алгоритмы оценки потенциала патогенности показывают значения, соответствующие высокой вероятности патогенного характера мутации. Недавно были опубликованы сообщения о редких герминальных мутациях в гене *CDKN2B* у пациентов с множественной эндокринной неоплазией типа 1 и аденомой паратитовидной железы [20, 21]. Публикаций о герминальных мутациях *CDKN2B*, ассоциированных с РЖ, нами не найдено.

Еще 1 мутация у этого пациента определена в гене *RBI*, который является геном-супрессором опухолевого роста. Его продукт имеет отношение к регуляции клеточного цикла, сдерживая клетку в G1-фазе клеточного цикла. Наследственные мутации в гене определены при ретинобластоме (MIM180200), а соматические мутации и делеции имеют отношение к раку мочевого пузыря (MIM109800), остеосаркоме (MIM259500), а также мелкоклеточному раку легких (MIM182280).

Герминальная мутация в 20-м экзоне гена *RBI* с.С2056А (р.Н686N) выявлена нами впервые. Такая однонуклеотидная замена не упоминается ни в базах данных мутаций (COSMIC, UCSC, dbSNP), ни в базе данных полиморфизмов dbSNP. Проведенный нами биоинформационный анализ говорит о потенциально высокой функциональной значимости этой мутации.

В последнее время в результате использования метода NGS, который позволяет одновременно исследовать десятки генов, появились работы, в которых у 1 пациента выявлено сразу несколько высокопенетрирующих мутаций в генах, ассоциированных с канцерогенезом. Выявление нескольких наследственных мутаций у пациента значительно повышает риск развития у него опухолей разного типа, а также влияет на медико-генетическое консультирование его семьи [22].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявленные нами мутации представляют несомненный интерес: патогенные мутации *APC* (с.Т3866А:p.11289К), *CDKN2B* (с.Г256А:p.Д86N), *RBI* (с.С2056А:p.Н686N) могут иметь прямое отношение к развитию РЖ у пациента и членов его семьи, а также повышать риск развития рецидива. Представляет интерес, что определенные нами мутации не относятся к генам, прямо ассоциированным с развитием РЖ, а заявлены как гены, определяющие развитие других типов опухолей. Таким

образом, гены, еще недавно строго связанные с определенным типом опухоли (например, гены *BRCA1* и *BRCA2* с наследственным РМЖ и яичников) сегодня могут определять также развитие других типов наследственного рака, например поджелудочной и предстательной желез [23].

С другой стороны, мягкие миссенс-мутации *MET*:c.2962C>T (p.Arg988Cys), *ATM* с.T2572C:p.F858L и условно-патогенные полиморфизмы гена *TP53* (с.C215G:p.P72R: rs1042522), *KIT*:c.1621A>C (p.Met541Leu), *KDR* (с.A1416T:p.Q472H: rs1870377) могут модифицировать генетический фон, повышая риск развития опухолей разного типа, в том числе РЖ. Су-

ществует мнение, что наличие нескольких мягких наследственных мутаций в разных генах может приводить к развитию семейных опухолей [24]. Исследования с использованием полногеномного секвенирования выявляют огромное количество мутаций в генах, ассоциированных с опухолеобразованием, в том числе и у лиц, на сегодняшний день не имеющих опухоли. Пока нет однозначного мнения о том, как консультировать такие мутации и патогенные полиморфизмы. Их определение у лиц без онкологической патологии может не снижать их патогенного значения, а напротив, переводить этих индивидуумов в группу повышенного риска развития опухоли.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2006 г. Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМ. 2008; 19: 53–5.
2. Jang B.G., Kim W.H. Molecular pathology of gastric carcinoma. Pathobiol. 2011; 78: 302–10.
3. Uppal D.S., Powell S.M. Genetics/Genomics/Proteomics of Gastric Adenocarcinoma. Gastroenterol Clin N Am. 2013; 42: 241–609.
4. Capelle L.G., Van Grieken N.C., Lingsma H.F. et al. Risk and epidemiological time trends of gastric cancer in Lynch syndrome carriers in the Netherlands. Gastroenterology. 2010; 138: 487–92.
5. Varley J.M., McGown G., Thorncroft M. et al. An extended Li-Fraumeni kindred with gastric carcinoma and a codon 175 mutation in TP53. J Med Genet. 1995; 32: 942–5.
6. van Lier M.G., Westerman A.M., Wagner A. et al. High cancer risk and increased mortality in patients with Peutz-Jeghers syndrome. Gut. 2011; 60: 141–7.
7. Pollock J., Welsh J.S. Clinical cancer genetics: part I: gastrointestinal. Am. J. Clin. Oncol. 2011; 34: 332–6.
8. Stanich P.P., Francis D.L., Sweetser S. The spectrum of findings in Cowden syndrome. Clin Gastroenterol Hepatol. 2011; 9: 2–3.
9. Wang K., Li M., Hakonarson H. ANNOVAR: Functional annotation of genetic variants from next-generation sequencing data Nucleic Acids Research. 2010; 38: 164.
10. Robinson J.T., Thorvaldsdóttir H., Winckler W., Guttman M., Lander E.S., Getz G., Mesirov J.P. Integrative Genomics Viewer. Nature Biotechnology. 2011; 29: 24–6.
11. Б.П. Копнин, П.Б. Копнин, Н.В. Хромова, А.С. Агапова. Многоликий p53: разнообразие форм, функций, опухольсупрессирующих и онкогенных активностей. Клиническая онкогематология. 2008; 1 (1): 2–9.
12. Kim M.K., Suh C., Chi H.S., Cho H.S., Bae Y.K., Lee K.H., Lee G.W., Kim I.S., Eom H.S., Kong S.Y., Bae S.H., Ryoo H.M., Shin I.H., Mun Y.C., Chung H., Hyun M.S. VEGFA and VEGFR2 genetic polymorphisms and survival in patients with diffuse large B cell lymphoma. Cancer Sci. 2012; 103 (3): 497–503.
13. Färsti A., Jin Q., Altieri A., Johansson R., Wagner K., Enquist K., Grzybowska E., Pamula J., Pekala W., Hallmans G. et al. Polymorphisms in the KDR and POSTN genes: association with breast cancer susceptibility and prognosis. Breast Cancer Res Treat. 2007; 101: 83–93.
14. Blair V.R. Familial Gastric Cancer: Genetics, Diagnosis, and Management. Surg. Oncol. Clin. N. Am. 2012; 21: 35–56.
15. Lamlum H., Al Tassan N., Jaeger E., Frayling I., Sieber O., Bin Reza F., Eckert M., Rowan A., Barclay E., Atkin W., Williams C., Gilbert J., Cheadle J., Bell J., Houlston R., Bodmer W., Sampson J., Tomlinson I. Germline APC variants in patients with multiple colorectal adenomas, with evidence for the particular importance of E1317Q. Hum. Molec. Genet. 2000; 9: 2215–21.
16. Voortman J., Harada, T., Chang, R. P., Killian, J. K., Suuriniemi, M., Smith, W. I., et al. Detection and therapeutic implications of c-Met mutations in small cell lung cancer and neuroendocrine tumors. Current pharmaceutical design. 2013; 19 (5): 833–40.
17. Ma P.C., Kijima T., Maulik G., Fox E.A., Sattler M., Griffin J.D., Johnson B.E., Salgia R. c-MET mutational analysis in small cell lung cancer: novel juxtamembrane domain mutations regulating cytoskeletal functions. Cancer Res. 2003; 1; 63 (19): 6272–81.
18. Lee J.H., Han S.U., Cho H., Jennings B., Gerrard B., Dean M., Schmidt L., Zbar B., Vande Woude G.F. A novel germ line juxtamembrane Met mutation in human gastric cancer. Oncogene. 2000; 12; 19 (43): 4947–53.
19. Concannon P., Haile R.W., Børresen-Dale A.L., Rosenstein B.S., Gatti R.A., Teraoka S.N., Diep T.A., Jansen L., Atencio D.P., Langholz B., Capanu M., Liang X., Begg C.B., Thomas D.C., Bernstein L., Olsen J.H., Malone K.E., Lynch C.F., Anton-Culver H., Bernstein J.L. Variants in the ATM gene associated with a reduced risk of contralateral breast cancer. Cancer Res. 2008; 15; 68 (16): 6486–91.
20. Costa-Guda J., Soong C.P., Parekh V.I., Agarwal S.K., Arnold A. Germline and somatic mutations in cyclin-dependent kinase inhibitor genes CDKN1A, CDKN2B, and CDKN2C in sporadic parathyroid adenomas. Horm Cancer. 2013; 4 (5): 301–7.
21. Agarwal S.K., Mateo C.M., Marx S.J. Rare germline mutations in cyclin-dependent kinase inhibitor genes in multiple endocrine neoplasia type 1 and related states. J. Clin. Endocrinol Metab. 2009; 94 (5): 1826–34.
22. Heitze E., Lax S., Lafer I., Mller St., Pristauz G., Ulz P. et al. Multiplex genetic cancer testing identifies pathogenic mutations in TP53 and CDH1 in a patient with bilateral breast and endometrial adenocarcinoma. BMC Medical Genetics. 2013; 14: 129–34.
23. Ghorzo P. Genetic predisposition to pancreatic cancer World J Gastroenterol. 2014; 21; 20 (31): 10778–89.
24. De la Chapelle A. Genetic predisposition to colorectal cancer. Nature Reviews Cancer. 2004; 4, 10: 769–80.

Поступила 16 сентября 2014 г.