

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель директора

_____ Д. А. Шагин

« ____ » _____ 2011 г.

ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

по теме:

Исследование

панели молекулярно-генетических маркеров

в ДНК образца № C.1t1**

Ответственный исполнитель – рук. группы молекулярной онкологии Зарецкий А. Р. _____

Заказчик:

Направил: ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, отделение химиотерапии

Образцы: образец ткани № C**.1t1 (парафиновые блоки с №),
образец слюны № C**.1sl1 (одна пробирка)

Введение

В соответствии с заданием Заказчика, целью настоящей НИР было исследование панели молекулярно-генетических онкомаркеров – мутаций в «горячих точках» 2-го экзона гена *K-Ras*, 15-го экзона гена *B-Raf* и 3-го экзона гена *N-Ras*, полиморфизма ТАТА-бокса промоторной области гена *UGT1A1* (*UGT1A1*28*), статуса метилирования промоторной области гена *MGMT*, микросателлитной нестабильности, уровня экспрессии мРНК генов *TS*, *ECGF1* (*TP*), *DPD*, *ERCC1*, *ERCC5* (*XPG*), *BRCA1*, *RAD51* и *Top I* и уровня экспрессии белков VEGF-A и VEGFR2 – в образце ткани С**.1t1.

Характеристика исследованных молекулярно-генетических маркеров (краткая справка по литературным данным)

Гены *K-Ras*, *B-Raf* и *N-Ras* кодируют цитоплазматические белки, участвующие во внутриклеточной передаче сигнала от рецепторов факторов роста. Гены *K-Ras*, *B-Raf* и *N-Ras* являются протоонкогенами. Примерно в 45% случаев злокачественных опухолей человека (в том числе приблизительно в 55% случаев карциномы толстой и прямой кишки) обнаруживаются активирующие соматические мутации в этих генах, которые чаще всего локализуются во 2-м экзоне гена *K-Ras* (кодоны 12-13)? в 15-м экзоне гена *B-Raf* (кодоны 599-600) и в 3-м экзоне гена *N-Ras* (кодон 61). Описано использование мутантных генов *K-Ras*, *B-Raf* и *N-Ras* в качестве маркеров для неинвазивного мониторинга опухолевого присутствия. Кроме того, мутационный статус генов *K-Ras*, *B-Raf* и *N-Ras* может быть использован как прогностический (при колоректальном раке наличие мутации в гене *B-Raf* и мутация Gly12Val в гене *K-Ras* традиционно интерпретируются как факторы плохого прогноза) и особенно как предиктивный маркер («классические» мутации в генах *K-Ras*, *B-Raf* и *N-Ras* ассоциированы с потенциальной устойчивостью опухолевых клеток к ингибиторам рецепторов ростовых факторов, включая gefитиниб и эрлотиниб, цетуксимаб и панитумумаб, и к сорафенибу; «классические» мутации в гене *B-Raf*, помимо этого, ассоциированы также с потенциальной чувствительностью к препарату PLX4032 и его аналогам; при этом следует учитывать, что мутация Gly13Asp в гене *K-Ras*, по-видимому, сообщает опухолевым клеткам меньшую степень устойчивости к ингибиторам рецепторов ростовых факторов, нежели остальные мутации в этих трех генах).

Ген *UGT1A1* кодирует цитоплазматический белок, участвующий в детоксикации ряда метаболитов и ксенобиотиков. К числу его субстратов (т.е. веществ, дезактивируемых этим белком) относятся, в частности, билирубин и активный метаболит иринотекана — SN-38. Вариации в структуре ТАТА-бокса промоторной области гена *UGT1A1* (отличия от основного варианта (ТА)₆ТАА, в частности, полиморфизм *UGT1A1*28* — (ТА)₅ТАА) ассоциированы с понижением уровня экспрессии данного гена и, соответственно, с накоплением в организме избыточного уровня его субстратов и могут вызывать транзиторную неонатальную гипербилирубинемия (синдром Жильбера, синдром Кригглера-Найара) и повышение риска угрожающей токсичности иринотекана (тяжелой нейтропении и диареи).

Ген *MGMT* кодирует ядерный белок, играющий ключевую роль в репарации повреждений в ДНК, вызываемых алкилирующими агентами. Ген *MGMT* является геном-супрессором опухолевого роста. Примерно в 15% случаев злокачественных опухолей человека этот ген инактивируется (преимущественно путем гиперметилирования промоторной области) – большинство этих случаев приходится на злокачественные глиомы, меланому, нейроэндокринные опухоли брюшной полости, колоректальный рак, плоскоклеточный рак головы и шеи и некоторые гемобластозы. Описано использование гиперметилированного варианта гена *MGMT* в качестве маркера для неинвазивного мониторинга опухолевого присутствия. Прогностическое значение инактивации гена *MGMT* до конца не выяснено. Однако показано, что эта инактивация ассоциирована с потенциальной чувствительностью опухолевых клеток к простым алкилирующим агентам – как метилирующим (темозолomid, дакарбазин, прокарбазин), так и этилирующим (производные нитрозомочевины). Соответствующие данные были получены для злокачественных глиом, нейроэндокринных опухолей, меланомы и в самое последнее время – для колоректального рака.

Характеристика исследованных молекулярно-генетических маркеров (краткая справка по литературным данным) – продолжение

Микросателлитная нестабильность в опухолевых клетках является следствием нарушений в работе механизма репарации неспаренных оснований ДНК (MMR). Гены, кодирующие белки-участники этого механизма (*hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH3*, *hMSH6*, *hPMS1* и *hPMS2*), являются генами-супрессорами опухолевого роста; они инактивируются более чем в 10% случаев злокачественных опухолей человека. Инактивация этих генов может быть не только соматической, но и наследственной; в последнем случае она ассоциирована с т.н. синдромом Линча [OMIM ID #120435], который характеризуется предрасположенностью к ряду злокачественных опухолей, прежде всего, к неполипозному раку толстого кишечника и раку эндометрия; соответственно, тест на микросателлитную нестабильность может использоваться как маркер для скрининга некоторых наследственных форм колоректального рака. Наличие микросателлитной нестабильности при колоректальном раке и, по-видимому, также при раке эндометрия и при раке желудка является положительным прогностическим фактором; однако сочетание микросателлитной нестабильности с мутацией в гене *B-Raf* или с ранним возрастом пациента на момент диагноза (до 30 лет), напротив, является фактором неблагоприятного прогноза. Тест на микросателлитную нестабильность может быть также использован для индивидуализации противоопухолевого лечения. Так, наличие в опухолевой ткани микросателлитной нестабильности при колоректальном раке ассоциировано с потенциальной устойчивостью опухолевых клеток к терапии на основе фторпиримидинов и оксалиплатина, а также с потенциальной чувствительностью к иринотекану. На фоне инактивированного гена *MGMT* наличие микросателлитной нестабильности ассоциировано с потенциальной устойчивостью к метилирующим агентам (темозоломиду, дакарбазину, прокарбазину) и с потенциальной чувствительностью к этилирующим агентам (препаратам нитрозомочевины).

Гены *TS*, *ECGF1 (TP)* и *DPD* кодируют цитоплазматические белки — ферменты, участвующие в метаболизме предшественников пиримидиновых оснований ДНК и, соответственно, антипиримидиновых препаратов, в частности, препаратов из группы 5-фторурацила. Низкий уровень экспрессии всех трех генов ассоциирован с потенциальной чувствительностью опухолевых клеток к 5-фторурацилу. Гиперэкспрессия гена *TS* ассоциирована с потенциальной устойчивостью опухолевых клеток ко всем препаратам данной группы. Крайне низкий уровень экспрессии гена *DPD* (как правило, на фоне наследственных мутаций в этом гене) ассоциирован с повышенным риском высокой токсичности данных препаратов (так называемый DPD-синдром). Высокий уровень экспрессии гена *DPD* ассоциирован с потенциальной устойчивостью опухолевых клеток к 5-фторурацилу и капецитабину, но не к ралтитрексиду и S-1. Высокий уровень экспрессии гена *ECGF1 (TP)* при низком уровне экспрессии генов *TS* и *DPD* ассоциирован с потенциальной устойчивостью опухолевых клеток к 5-фторурацилу и потенциальной чувствительностью к капецитабину.

Гены *ERCC1* и *ERCC5 (XPG)* кодируют ключевые ферменты, участвующие в одном из каскадов репарации повреждений в ДНК – каскаде эксцизионной репарации нуклеотидов (NER). Экспрессия этих генов является важным прогностическим и особенно предиктивным фактором: низкий уровень их экспрессии ассоциирован с потенциальной чувствительностью опухолевых клеток к препаратам платины и потенциальной устойчивостью к трабектедину, тогда как высокий уровень их экспрессии, напротив, коррелирует с потенциальной устойчивостью к препаратам платины и потенциальной чувствительностью к трабектедину.

Ген *BRCA1* кодирует ядерный белок, играющий ключевую роль в распознавании сложных повреждений ДНК и организации процесса репарации таких повреждений. Инактивация этого гена посредством мутаций или низкий уровень его экспрессии делает клетки более чувствительными к цитостатическим агентам-кросслинкерам, таким как препараты платины, митомицин С, мелфалан и хлорамбуцил, а также к ингибиторам PARP.

Ген *RAD51* кодирует ключевой фермент в каскаде гомологичной репарации ДНК (HR). Гиперэкспрессия данного гена ассоциирована с потенциальной устойчивостью опухолевых клеток к препаратам платины, трабектедину, а также к ингибиторам PARP, тогда как низкий уровень экспрессии может свидетельствовать о потенциальной гиперчувствительности к данным препаратам.

Характеристика исследованных молекулярно-генетических маркеров (краткая справка по литературным данным) – окончание

Ген *Toro 1* кодирует топоизомеразу I – ядерный белок, модифицирующий третичную структуру хромосомной ДНК в процессе ее репликации. Уровень экспрессии гена *Toro 1* частично коррелирует с пролиферативной активностью клеток. Гиперэкспрессия гена *Toro 1* может вызывать гиперчувствительность опухолевых клеток к ингибиторам соответствующего белка, в частности, к иринотекану, топотекану и другим камптотецинам.

Гены *VEGF* и *VEGFR2* кодируют белки, вовлеченные в разные этапы клеточного ответа на гипоксию, включающего в себя прежде всего ангиогенез. Профиль экспрессии этих генов может использоваться как потенциальный предиктивный маркер при антиангиогенной терапии. Так, показано, что высокий уровень экспрессии *VEGF* и *VEGFR2* коррелирует с потенциальной чувствительностью опухолевых клеток к бевацизумабу и низкомолекулярным ингибиторам рецепторов *VEGF*.

Материал

Образец ткани С**.1t1 был предоставлен в виде 10 парафиновых блоков с № и 6 соответствующих им гистологических стеклопрепаратов. После анализа этих стеклопрепаратов один из предоставленных блоков (№) был признан удовлетворяющим критериям для достоверного молекулярного анализа опухолевых клеток и использованы для выделения ДНК и РНК без дальнейших диссекционных процедур. ДНК и РНК, выделенная из образца ткани С**.1t1, и ДНК, выделенная из образца слюны С**.1sl1, по концентрации и качеству удовлетворяла критериям для достоверного ПЦР-анализа мутаций, полиморфизмов, микросателлитной нестабильности, метилирования ДНК и уровня экспрессии мРНК.

Методы

Поиск мутаций в «горячих точках» 2-го экзона гена *K-Ras* и 15-го экзона гена *B-Raf* в ДНК, выделенной из образца С**.1t1, проводился методом мутационно-специфической ПЦР с последующим секвенированием.

Поиск мутаций в «горячих точках» 3-го экзона гена *N-Ras* в ДНК, выделенной из образца С**.1t1, проводился методом ПЦР с последующим секвенированием.

Анализ статуса ТАТА-бокса гена *UGT1A1* проводился методом ПЦР с последующим секвенированием.

Анализ статуса метилирования промоторной области гена *MGMT* в ДНК, выделенной из образца С**.1t1, проводился методом бисульфитной обработки ДНК с последующей метилспецифической ПЦР в режиме «реального времени».

Методы (окончание)

Тест на микросателлитную нестабильность в ДНК, выделенной из образца С**.1t1, проводится методом мультиплексной ПЦР (анализировались 5 маркеров в соответствии с рекомендациями NCI) с последующим фрагментным анализом путем капиллярного электрофореза; в качестве контрольного образца использовалась ДНК, выделенная из образца слюны С**.1s11.

Анализ уровня экспрессии мРНК генов TS, ECGF1 (TP), DPD, ERCC1, ERCC5 (XPG), BRCA1, RAD51 и Top I в РНК, выделенной из образца ткани С**.1t1, проводился методом количественной ОТ-ПЦР в режиме «реального времени».

Анализ уровня экспрессии белков VEGF-A и VEGFR2 в образце ткани С**.1t1 проводился иммуногистохимическим методом.

Результаты

(секвенограммы и графики фрагментного анализа приведены в Приложении 2)

Образец	Маркер	Результат	Интерпретация	Примечания
С**.1t1 (ДНК)	<i>K-Ras</i> (экзон 2)	WT + с. 38 G→A (p. Gly13Asp)	Мутация	Мутация описана в литературе (COSMIC ID 532)
С**.1t1 (ДНК)	<i>B-Raf</i> (экзон 15)	WT	Норма	---
С**.1t1 (ДНК)	<i>N-Ras</i> (экзон 3)	WT	Норма	---
С**.1t1 (ДНК)	<i>UGT1A1</i> (промотор)	WT + (TA) ₇ TAA	Вариант UGT1A1*28 в гетерозиготном состоянии	---
** .1t1 (ДНК)	<i>MGMT</i> (промотор)	Метилспеци- фический сигнал отсутствует	Норма	---
С**.1t1 (ДНК), С**.1s11 (ДНК)	Панель из 5 микро- сателлитов: <i>BAT25</i> , <i>BAT26</i> , <i>D2S123</i> , <i>D5S346</i> , <i>D17S250</i>	WT WT WT WT WT	Норма	---

Примечание. WT – аллель «дикого типа» (без мутаций) или соответствующий основному варианту полиморфизма..

Результаты (окончание)

Образец	Маркер	Результат	Интерпретация	Примечания
C**.1t1 (РНК)	<i>TS</i> (уровень экспрессии мРНК)	<i>TS: GAPDH</i> = = 5,3 X 10 ⁻²	Высокий уровень экспрессии	---
C**.1t1 (РНК)	<i>ECGF1</i> (уровень экспрессии мРНК)	<i>ECGF1: GAPDH</i> = = 2,1 X 10 ⁻²	Высокий уровень экспрессии	---
C**.1t1 (РНК)	<i>DPD</i> (уровень экспрессии мРНК)	<i>DPD: GAPDH</i> = = 9,5 X 10 ⁻⁶	Низкий уровень экспрессии	---
C**.1t1 (РНК)	<i>ERCC1</i> (уровень экспрессии мРНК)	<i>ERCC1: GAPDH</i> = = 1,4 X 10 ⁻³	Средний уровень экспрессии	---
C**.1t1 (РНК)	<i>ERCC5</i> (уровень экспрессии мРНК)	<i>ERCC5: GAPDH</i> = = 2,7 X 10 ⁻²	Средний уровень экспрессии	---
C**.1t1 (РНК)	<i>BRCA1</i> (уровень экспрессии мРНК)	<i>BRCA1: GAPDH</i> = = 1,2 X 10 ⁻³	Средний уровень экспрессии	---
C**.1t1 (РНК)	<i>RAD51</i> (уровень экспрессии мРНК)	<i>RAD51: GAPDH</i> = = 4,8 X 10 ⁻⁴	Низкий уровень экспрессии	---
C**.1t1 (РНК)	<i>Top I</i> (уровень экспрессии мРНК)	<i>Top I: GAPDH</i> = = 1,9	Высокий уровень экспрессии	---
C**.1t1	<i>VEGF-A</i> (уровень экспрессии белка)	До 95% позитивных клеток	Высокий уровень экспрессии	---
C**.1t1	<i>VEGFR2</i> (уровень экспрессии белка)	До 70% позитивных клеток	Высокий уровень экспрессии	---

Заключение

1. По результатам исследования методом мутационно-специфической ПЦР с последующим секвенированием в соответствии с заданием Заказчика, во 2-м экзоне гена K-Ras в ДНК образца ткани С**.1т1 обнаружена мутация с. 38 G→A (p. Gly13Asp) [COSMIC ID 532]. Аллель с мутацией присутствует в ДНК данного образца наряду с аллелью «дикого типа». Результаты секвенирования приведены в Приложении 2.1.

2. По результатам исследования методом мутационно-специфической ПЦР с последующим секвенированием в соответствии с заданием Заказчика, в 15-м экзоне гена B-Raf в ДНК образца ткани С**.1т1 мутаций не обнаружено. Результаты секвенирования приведены в Приложении 2.2.

3. По результатам исследования методом ПЦР с последующим секвенированием в соответствии с заданием Заказчика, в 3-м экзоне гена N-Ras в ДНК образца ткани С**.1т1 мутаций не обнаружено. Результаты секвенирования приведены в Приложении 2.3.

4. По результатам исследования методом ПЦР с последующим секвенированием в соответствии с заданием Заказчика, в ДНК образца ткани С**.1т1 в ТАТА-боксе гена UGT1A1 выявлен, наряду с вариантом [(ТА)₆ТАА], вариант с инсерцией [(ТА)₇ТАА] (вариант UGT1A1*28 в гетерозиготном состоянии). Результаты секвенирования приведены в Приложении 2.4.

5. По результатам исследования методом бисульфитной модификации ДНК с последующей метилспецифической ПЦР в режиме «реального времени» в соответствии с заданием Заказчика, в ДНК образца ткани С**.1т1 признаки инактивации гена MGMT (гиперметилирование промоторной области) не выявлены.

Заключение (окончание)

6. По результатам теста на микросателлитную нестабильность методом мультиплексной ПЦР с последующим фрагментным анализом в соответствии с заданием Заказчика, микросателлитная нестабильность в образце ткани C**.1t1 не выявлена. Результаты фрагментного анализа приведены в Приложении 2.5.

7. По результатам анализа методом количественной ОТ-ПЦР в режиме «реального времени» в соответствии с заданием Заказчика, в образце ткани C**.1t1 выявлен высокий уровень экспрессии мРНК генов TS и ECGF1 (TP) при низком уровне экспрессии мРНК гена DPD.

8. По результатам анализа методом количественной ОТ-ПЦР в режиме «реального времени» в соответствии с заданием Заказчика, в образце ткани C**.1t1 выявлен средний уровень экспрессии мРНК генов ERCC1, ERCC5 (XPG) и BRCA1 при низком уровне экспрессии мРНК гена RAD51.

9. По результатам анализа методом количественной ОТ-ПЦР в режиме «реального времени» в соответствии с заданием Заказчика, в образце ткани C**.1t1 выявлен высокий уровень экспрессии мРНК гена Top I.

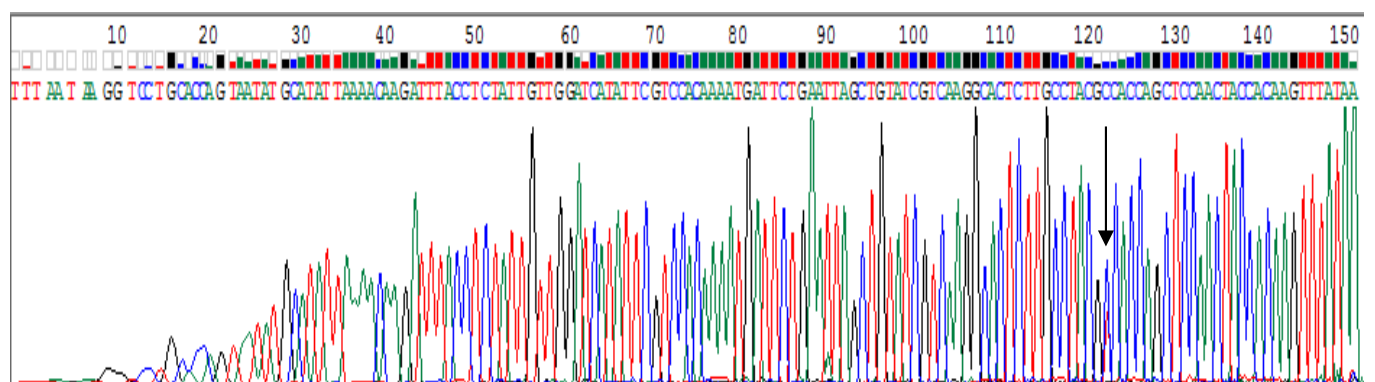
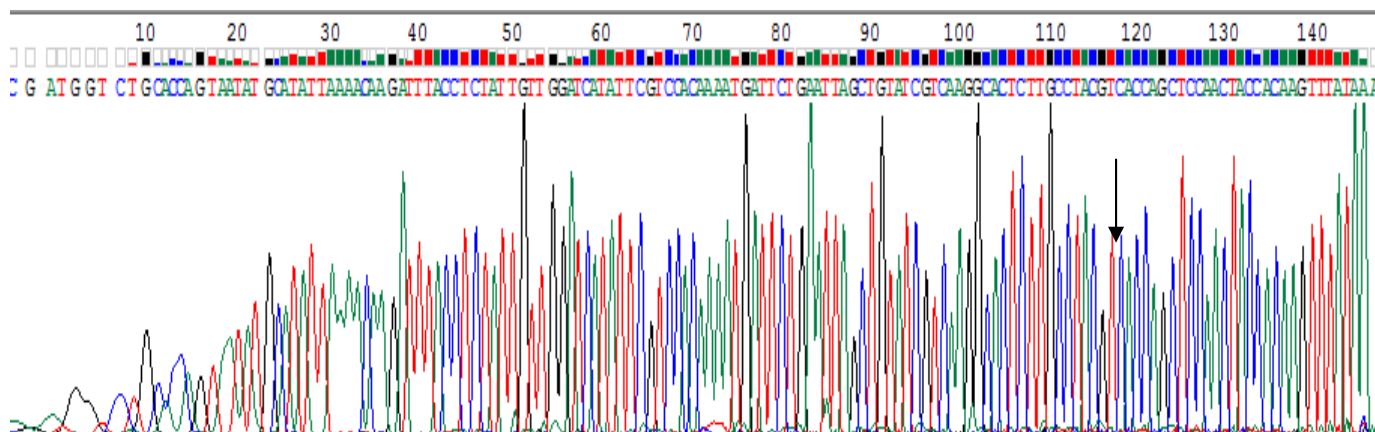
10. По результатам анализа иммуногистохимическим методом в соответствии с заданием Заказчика, в образце ткани C**.1t1 выявлен высокий уровень экспрессии белков VEGF-A и VEGFR2.

Приложение 1. Список источников и литературы

1. HGNC <http://www.genenames.org>
2. Entrez Gene <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene>
3. Ensembl <http://www.ensembl.org>
4. Entrez Nucleotide <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Nucleotide>
5. NCBI CCDS Database <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ccds>
6. Entrez Protein <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Protein>
7. UniProtKB <http://www.uniprot.ch>
8. COSMIC <http://www.sanger.ac.uk/perl/genetics/CGP/COSMIC>
9. Tortola, S., et al. // J Clin Oncol. 2001 Jun 1; 19 (11): 2837-2843
10. Benvenuti, S., et al. // Cancer Res. 2007. Mar 15; 67(6): 2643-2648
11. Amado, R. G., et al. // J Clin Oncol. 2008 Apr 1;26(10):1626-34
12. Hasegawa, A., et al. // Anticancer Res. 2004 May-Jun;24(3b):2047-52
13. Luchtenborg, M. // BMC Cancer. 2005. Dec 15; 5: 160
14. Bishehsari, F., et al. // Ann Oncol. 2006 Jun. 17. Suppl. 7.: vii91-vii96
15. Akkiprik, M., et al. // J Gastrointestin Liver Dis. 2007 Mar; 16(1): 11-17
16. Jackson, E. L., et al. // Genes Dev. 2001. Dec 15. 15(24): 3243-3248
17. Fisher, G. H., et al. // Genes Dev. 2001. Dec 15. 15(24): 3249-3262
18. Ji, H., et al. // Oncogene. 2006. Mar 30. 25(14): 2105-2112
19. Caulin, C., et al. // J Clin Invest. 2007. Jul 2. 117(7): 1893-1901
20. Van Meter, M. E., et al. // Blood. 2007. May 1. 109(9): 3945-3952
21. Tuveson, D. A., et al. // Cancer Cell. 2004 Apr. 5(4): 375-387
22. Shubbert, S., et al. // Curr Opin Genet Dev. 2007 Feb. 17(1): 15-22
23. Young, A. et al. // Adv Cancer Res. 2009;102:1-17
24. Yokota, T., et al. // Br J Cancer. 2011 Mar 1;104(5):856-62
25. Rizzo, S., et al. // Cancer Treat Rev. 2010 Nov;36 Suppl 3:S56-61
26. Di Nicolantonio, F., et al. // J Clin Onc. 2008 Dec 10;26(35):5705-12
27. De Roock, W., et al. // Lancet Oncol. 2010 Aug;11(8):753-62
28. Shima, K., et al. // Cancer Causes Control. 2011 Feb;22(2):301-9
29. Vilar, E., Gruber, S. B.. // Nat Rev Clin Oncol. 2010 Mar;7(3):153-62
30. Clark, A. J., et al. // Fam Cancer. 2004;3(2):85-91
31. De Leeuw, J. W., et al. // J Pathol. 2000 Nov;192(3):328-35
32. Guastadisegni, C., et al. // Eur J Cancer. 2010 Oct;46(15):2788-98
33. Iacopetta, B., et al. // Asia Pac J Clin Oncol. 2010 Dec;6(4):260-9
34. Fallik, D., et al. // Cancer Res. 2003 Sep 15;63(18):5738-44
35. Des Guetz, G., et al. // Anticancer Res. 2009 May;29(5):1615-20
36. Naumann, S. C., et al. // Br J Cancer. 2009 Jan 27;100(2):322-33
37. Caporali, S., et al. // Mol Pharmacol. 2004 Sep;66(3):478-91
38. TCGA // Nature. 2008 Oct 23;455(7216):1061-8
39. Yip, S., et al. // Clin Cancer Res. 2009 Jul 15;15(14):4622-9

Приложение 2. Результаты секвенирования и фрагментного анализа

2.1. Результаты секвенирования 2-го экзона гена *K-Ras* (с обратного праймера)

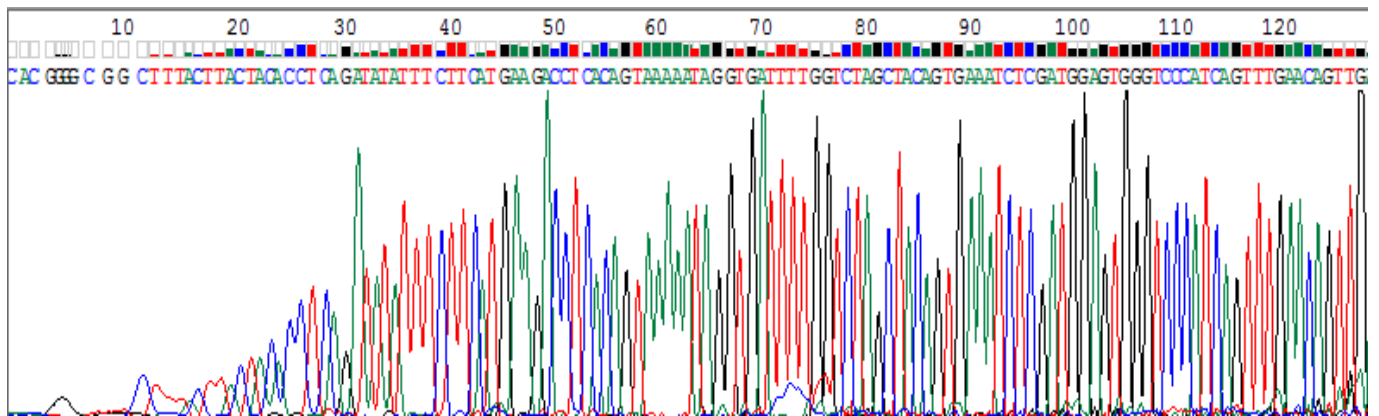


Примечания.

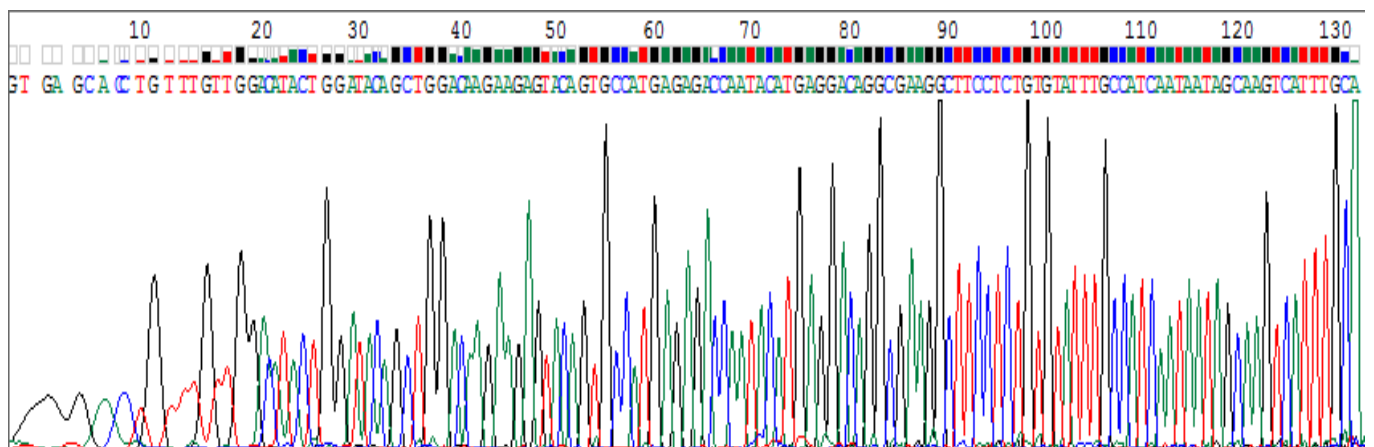
- Верхняя хроматограмма – результат секвенирования продукта ПЦР с добавлением мутационно-специфических реагентов;
- Нижняя хроматограмма – результат секвенирования продукта ПЦР без добавления мутационно-специфических реагентов.

Стрелками выделена позиция мутированного нуклеотида (с. 38).

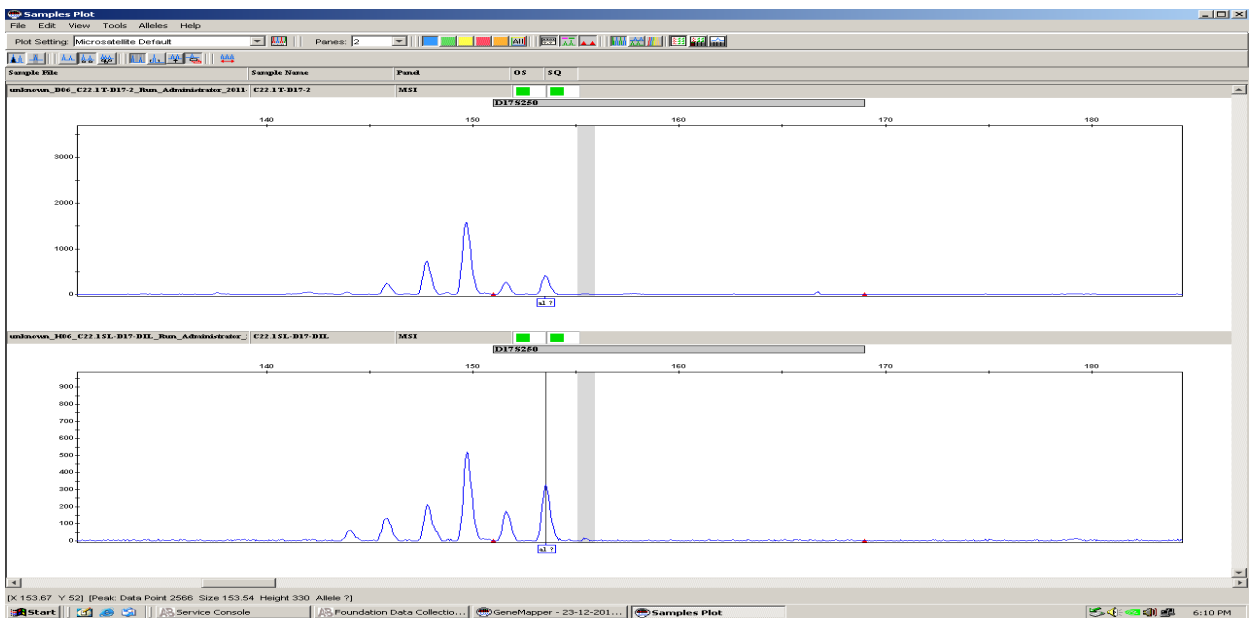
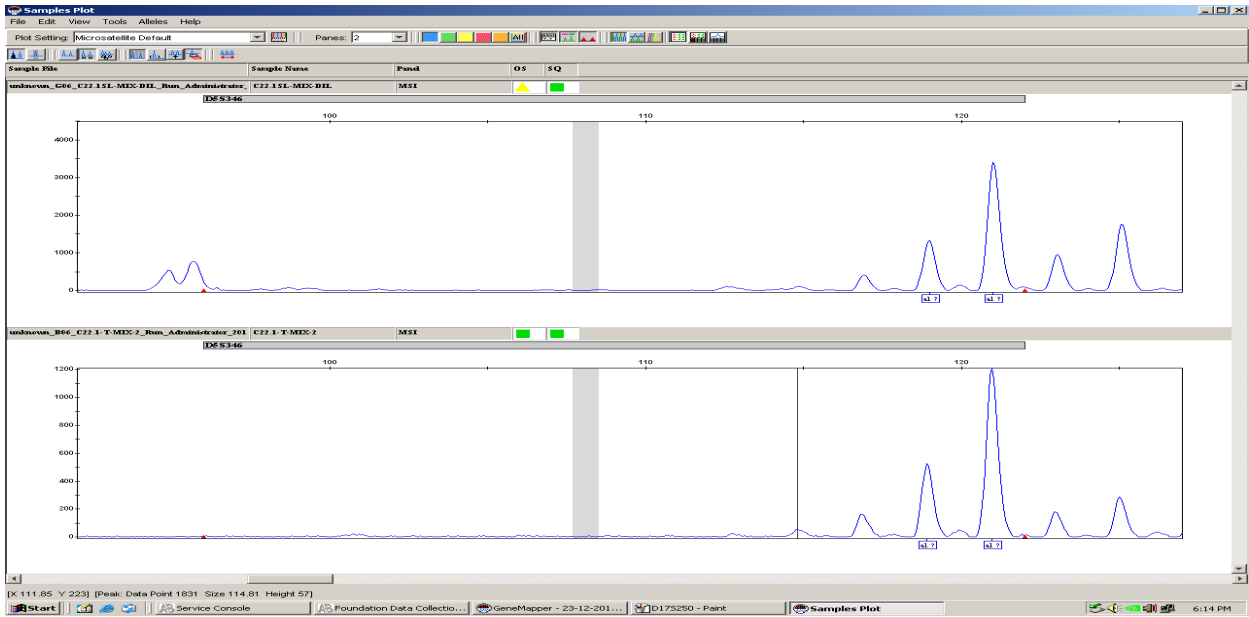
2.2. Результаты секвенирования 15-го экзона гена *B-Raf* (с прямого праймера)



2.3. Результаты секвенирования 3-го экзона гена *N-Ras* (с прямого праймера)



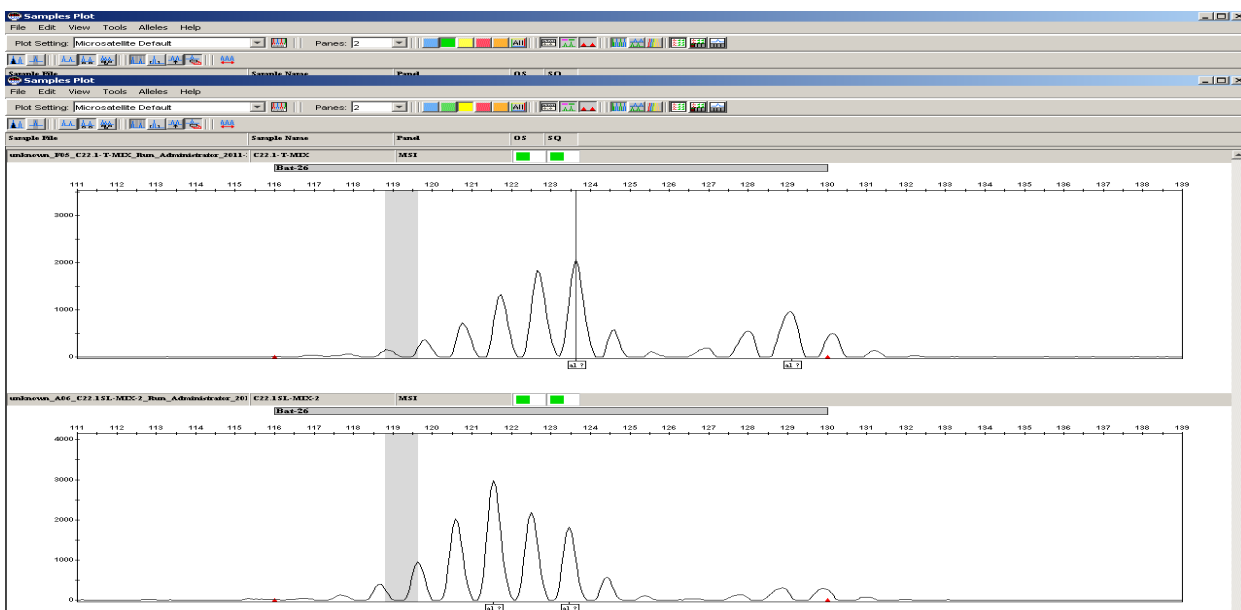
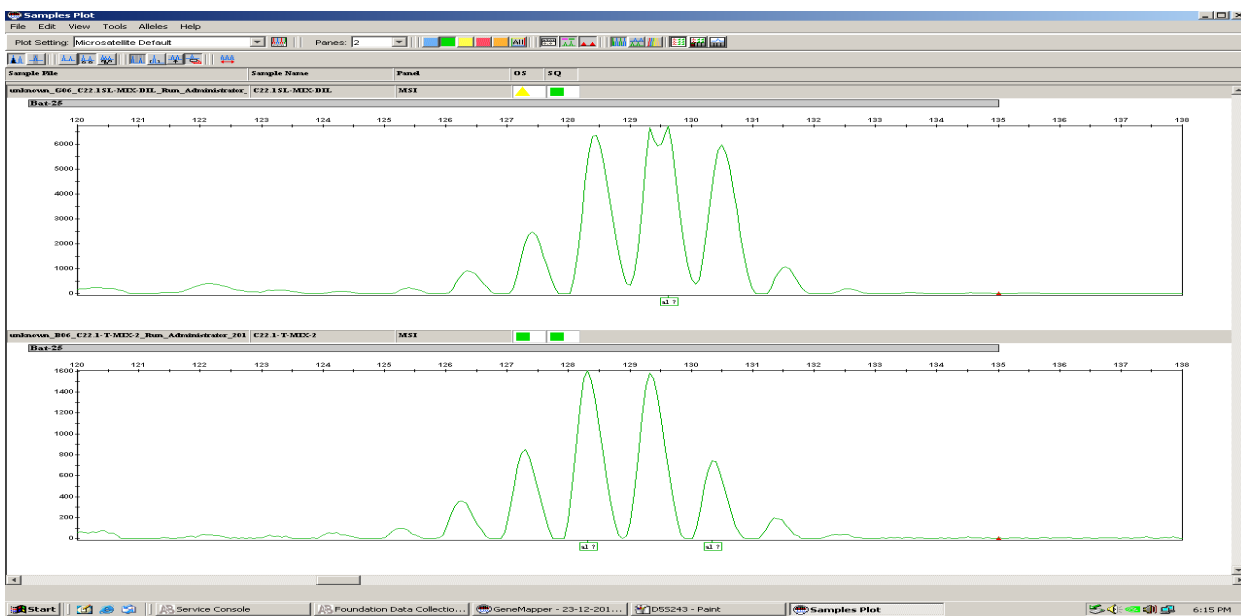
2.5. Результаты фрагментного анализа 5 микросателлитных маркеров



Примечания.

- Верхняя хроматограмма – маркер *D5S346*;
- Нижняя хроматограмма – маркер *D17S250*.

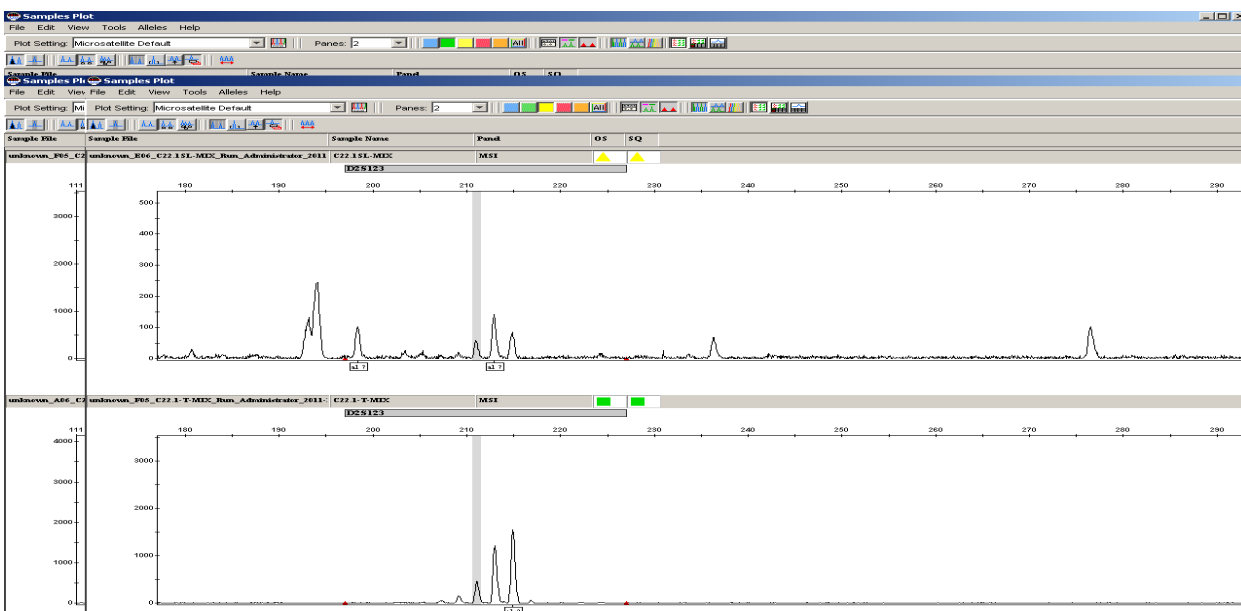
2.3. Результаты фрагментного анализа 5 микросателлитных маркеров (продолжение)



Примечания.

- Верхняя хроматограмма – маркер *BAT-25*;
- Нижняя хроматограмма – маркер *BAT-26*.

2.3. Результаты фрагментного анализа 5 микросателлитных маркеров (окончание)



Примечания.

Маркер – *D2S123*.