

УДК 577.2:616-006

^{1,2}Г.С. Жунусова, ³Г.А. Афонин, ¹А.С. Амиргалиева,
³Б.Х. Кайдаров, ³Д.Р. Кайдарова, ¹Э.М. Хусаинова, ¹Б.С. Набиева,
⁴М.И. Паркер, ^{1,2}Л.Б. Джансугурова

¹Институт общей генетики и цитологии КН МОН РК, г. Алматы, Казахстан,
²Казахский национальный университет имени аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан,
³Городской онкологический диспансер УЗ, г. Алматы, Казахстан,
⁴Международный Центр геномной инженерии и биотехнологии, г. Кейптаун, ЮАР
 *e-mail: gulnur_j@mail.ru

Анализ мутаций генов *APC*, *TP53*, *MLH1* среди колоректальным раком больных пациентов с семейным отягощенным анамнезом

В статье приводятся результаты молекулярно-генетического анализа лиц с ранним развитием колоректального рака и отягощенным семейным анамнезом по генам, ассоциированным с развитием наследственных синдромов и метастазированием. Методами прямого секвенирования были проанализированы нуклеотидные последовательности «критических» районов генов *APC* (1286 – 1513 кодоны), *TP53* (5-6 экзон) и *hMLH1* (8 экзон). По *APC* гену обнаружены 2 бессмысловые нуклеотидные замены: G4479A и G1317C. Секвенирование 5-6 экзонов *TP53* гена в данной группе обследованных не показало каких-либо значимых изменений. Выявлен 1 вариант нуклеотидной замены по гену *hMLH1* – G655A (Ile219Val).

Ключевые слова: колоректальный рак, *APC*, *TP53*, *MLH1*, мутация, секвенирование.

Г.С. Жүнісова, Г.А. Афонин, А.С. Аміргалиева, Б.Қ. Қайдаров,
 Д.Р. Қайдарова, Э.М. Хусаинова,
 Б.С. Набиева, М.И. Паркер, Л.Б. Жансүгірова

Созылмалы отбасылық анамнезі бар колоректалды обырмен ауыратын науқастардың *APC*, *TP53*, *MLH1* гендерінің мутацияларын талдау

Мақалада тұқым қуалайтын синдромдардың дамуы мен метастаздануымен байланысты гендер бойынша колоректалды обырдың ерте дамуымен және созылмалы отбасылық анамнезі бар адамдардың молекулалық-генетикалық талдауының нәтижелері көрсетілген. Тікелей секвенирлеу әдістері көмегімен *APC* гендерінің «критикалық» аудандары (1286 – 1503 кодандары), *TP53* (5-6 экзон) және *hMLH1* (8 экзон) нуклеотидтік тізбектері талданды. *APC* гені бойынша 2 мағынасыз нуклеотидтік алмасулары табылды: G4479A және G1317C. Талдауға алынған топта *TP53* генінің 5-6 экзондарын секвенирлеу, мәнді өзгерістерді бермеді. G655A (Ile219Val) *hMLH1* гені бойынша нуклеотидтік алмасудың 1 нұсқасы табылды.

Түйін сөздер: колоректалды обыр, *APC*, *TP53*, *MLH1*, мутация, секвенирлеу.

G.S. Zhunussova, G.A. Afonin, A.S. Amirgalieva, B.K. Kaidarov, D.R. Kaidarova, E.M. Khusainova,
 B.S. Nabieva, M.I. Parker, L.B. Djansugurova

Analysis of *APC*, *TP53*, *MLH1* gene mutations of colorectal cancer patients with aggravated family anamnesis

The results of molecular and genetic analysis of individuals with early developed colorectal cancer and aggravated family anamnesis of the genes, associated with development of hereditary syndrome and metastasis are shown here. Nucleotide sequences of «critical» segments of the *APC* (1286-1513 codons), *TP53* (5-6 exon) and *hMLH1* (8 exon) genes were analyzed by direct sequencing methods. Two nonsense nucleotide substitutions were detected in *APC* gene: G4479A and G1317C. Sequencing the 5-6 exon of the *TP53* gene in that observed group did not show any significant changes. One variant of nucleotide substitution was detected in *hMLH1* gene – G655A (Ile219Val).

Keywords: colorectal cancer, *APC*, *TP53*, *MLH1*, mutation, sequencing.

Колоректальный рак (КРР) является одной из наиболее распространенных злокачественных опухолей в структуре онкологической заболеваемости в мире. Смертность от этого вида рака высокая. Ежегодно в мире регистрируется более 1 миллиона новых случаев заболевания, и около 50% больных погибают от прогрессии заболевания – 639 тыс. в год [1]. Среди стран СНГ Казахстан находится на 7-ом месте по заболеваемости КРР. Большинство случаев диагностируется в III-IV ст., когда лечение наиболее затратно и малоэффективно [2].

Есть ряд генов (ген аденоматозного полиποза APC, ген опухолевого супрессора TP53, онкоген k-Ras), мутации в которых тесно связаны с развитием КРР. Известны также наследственные состояния, ассоциированные с КРР, такие как семейный аденоматозный полипоз, аттенуированный (ослабленный) семейный аденоматозный полипоз, MUTY-ассоциированный полипоз, и синдром Линча и др.

Не смотря на то, что основная часть заболеваний раком толстой кишки относится к спорадическим формам, доля пациентов с отягощенным онкологическим анамнезом составляет 20-30%, а около 10% всех КРР являются заболеванием, наследуемым по аутосомно-доминантному типу.

Целью настоящего исследования является анализ мутаций в генах APC, TP53, MLH1 среди колоректальным раком больных с отягощенным семейным анамнезом.

Материалы и методы исследования

На базе Городского онкологического диспансера УЗ г. Алматы были собраны образцы периферической крови у 216 пациентов с первично диагностированным КРР. Перед забором биоматериала получали добровольное информированное согласие на исследование и проводили анкетирование. Протокол исследования был одобрен Этическим Комитетом Казахского Национального Медицинского Университета им. С.Д. Асфендиярова (Алматы, Казахстан). Анализ анкетных данных позволил выявить 16 пациентов с семейным отягощенным анамнезом и 29 больных с ранним началом развития КРР (31-50 года). В соответствии с клиническими симптомами подбирали гены для исследования регионов, ассоциированных с тем или иным наследственным синдромом.

Выделение геномной ДНК

Геномную ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови стандартным фенол-хлороформным методом с модификациями в составе лизирующего буфера (0,2 М ацетата натрия и 1% додецилсульфата натрия, рН 8,0). Количественные и качественные характеристики ДНК определяли спектрофотометрически (*Eppendorf BioPhotometer plus*).

Прямое секвенирование гена APC

Метод прямого секвенирования применен для определения мутационных изменений в критическом районе APC гена – с 1286 по 1513 кодоны. Для этого сначала проводили ПЦР-амплификацию исследуемого фрагмента гена APC (1286 – 1513 кодоны) с использованием специфических праймеров: s 5'-GAAATAGGATGTAATCAGACG-3' и as 5'-CATTCCC-ATTGTCATTTTCC-3'. Амплификацию проводили в 10 мкл реакционной смеси, содержащей 66 мМ ТрисHCl, рН 9,0, 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄, 2 мМ MgCl₂, по 100 мкМ каждого dNTP, 1U Taq-полимеразы (Promega, USA) и по 10 пмоль каждого праймера при едином температурном профиле: 94°C – 15 сек.; 59°C – 15 сек.; 72°C – 15 сек.; 37 циклов. Верификация наличия необходимого ПЦР-продукта (751 п.о.) проводилась путем электрофореза в 1,4% агарозном геле. Очистка амплификатов проводили ферментативным методом, используя Exonuclease I (Fermentas) и щелочную фосфатазу (*Shrimp Alkaline Phosphatase*, Fermentas).

Далее осуществляли секвенирование амплифицированной нуклеотидной последовательности с 1286 по 513 кодон гена APC (MRC кластер). Для этого использовали по 1 мкл разведенного (1:3) ПЦР-продукта и набор ABI Prism BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) на автоматическом секвенаторе 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems). Секвенс-амплификация была проведена в полном соответствии со стандартным протоколом фирмы производителя.

Прямое секвенирование 5-6 экзонов гена TP53

Метод прямого секвенирования применен для определения мутационных изменений в 5-6 экзонах гена TP53. Для этого сначала проводили ПЦР-амплификацию исследуемого фрагмента гена TP53 (5 экзон) с использованием специфических праймеров: s 5'-

ТТСAACTCTGTCTCCTTCC-3', и as 5'-CAGCCCTGTTCGTCTCTCC-3'.

Амплификацию проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 50 нг образца ДНК, 13.35 мкл 10хбуфера для ПЦР, 2.5 мкл 25мМ MgCl₂, по 2.5 мкл каждого 2.5 мМ dNTP, 3 мкл 2.5мкМ AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (Promega, USA) и по 100 пмоль каждого праймера. Условия ПЦР: инициация – 94°C, 4 минуты; 35 циклов: 95°C – 30 секунд, 55°C – 45 секунд, 72°C – 1 минута; финальный шаг – 72°C, 5 минут; остановка при 4°C.

Продукты ПЦР визуализировали в 1,5% агарозном геле и очищали ферментативным способом, используя Exonuclease I (Fermentas) и щелочную фосфатазу (Shrimp Alkaline Phosphatase, Fermentas). 5 нг ПЦР продукта подвергались прямому секвенированию, как это описано выше. Для определения нуклеотидной последовательности использовали 1 мкл разведенного (1:5) ПЦР-продукта, набор ABI Prism BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit на автоматическом секвенаторе 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems). Секвенс-амплификация: 96°C, 1 минута; 25 циклов: 96°C, 10 секунд; 50°C, 5 секунд; 60°C, 2 минуты, остановка при 15°C.

Прямое секвенирование 8 экзона гена hMLH1

Метод прямого секвенирования применен для определения мутационных изменений в 8 экзоне гена hMLH1. Для этого сначала проводили ПЦР-амплификацию исследуемого фрагмента гена hMLH1 (8 экзон) с использованием специфических праймеров: s 5'-СТCAGCCATGAGACA-ATAAATC-3', и as 5'-GGTCCCAAATAATGTGATGG-3'.

Амплификацию проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 50 нг образца ДНК, 13.35 мкл 10хбуфера для ПЦР, 2.5 мкл 25мМ MgCl₂, по 2.5 мкл каждого 2.5 мМ dNTP, 3 мкл 2.5мкМ AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (Promega, USA) и по 100 пмоль каждого праймера. Условия ПЦР: инициация при 95°C – 7 минут; затем 35 циклов: 94°C – 30 секунд, 60°C – 30 секунд, 72°C – 1 минута; финальная стадия при 72°C – 7 минут; остановка при 4°C. Визуализация и очистка продуктов ПЦР 8 экзона гена hMLH1 проведена также как и в случае генов APC и TP53. Для определения нуклеотидной последовательности использовали 1 мкл разведенного (1:5) ПЦР-продукта, набор ABI Prism BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit на автоматическом секвенаторе 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems). Секвенс-амплификация: 96°C, 1 минута; 25 циклов: 96°C, 10 секунд; 50°C, 5 секунд; 60°C, 2 минуты, остановка при 15°C.

Анализ результатов секвенирования

Обработка результатов проводилась с помощью программного обеспечения «Seq. Scanner v1.0» (Microsoft) и программы FinchTV (Geospiza, США).

Результаты и их обсуждение

Среди 16 пациентов с отягощённым семейным анамнезом оказалось 7 женщин и 9 мужчин. Среди них 9 казахов, 5 русских, 1 азербайджанец и 1 уйгур. Гистологически все опухоли были представлены аденокарциномами различной степени дифференцировки. I стадия была отмечена у 2-х больных, II – у 8-ми, III – у 4-х, IV – у 2-х пациентов.

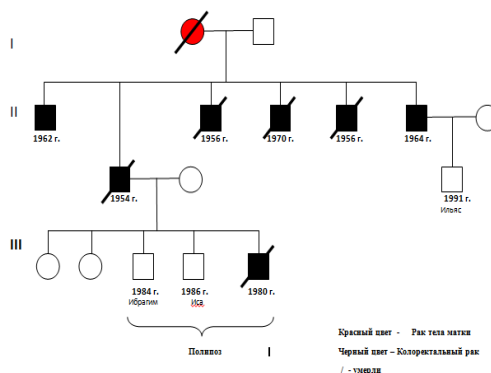


Рисунок 1 – Родословная пациента с подозрением на наследуемый аденоматозный полипозный синдром

По результатам обследования только 1-го пациента (житель г. Алматы, казах, 34 года, рак верхнеампулярного отдела прямой кишки, ст. II) подозревалося наличие наследуемого аденоматозного полипозного синдрома (рисунок 1). В семейном анамнезе этого пациента много больных колоректальным раком (отец и его братья). Явное наличие множественных полипов диагностировано у братьев этого пациента.

В семейном анамнезе других больных с ранним развитием КРР не отмечено развитие колоректального рака, зато были представлены другие раковые заболевания (рак пищевода, желудка, рак молочной железы, рак простаты и др.).

Поскольку, наличие аденоматозного полипозного синдрома подозревалося только для одного пациента, мы предположили, что причиной развития КРР у остальных пациентов может быть синдром Линча или другой вариант непипозного наследственного синдрома.

Основная часть как наследуемых, так и соматических мутаций APC при САП и АСАП ассоциирована с 15 экзонам, составляющим 75% кодирующей последовательности ДНК гена APC. Функциональная значимость мутаций APC связана с ключевой ролью этого гена в регуляции клеточного деления эпителия толстой кишки и других тканей. Структурные перестройки в гене APC выявляют в 95% случаев классического САП (более 500 вариантов) [3]. Спектр мутаций APC очень широк при САП, наиболее значимые мутации между 1200 и 1550 кодонами [4].

Для КРР определены гены, вовлеченные в малигнизацию КРР: TP53 и K-RAS [5, 6, 7, 8]. Мутации TP53 и K-RAS онкогена не инициируют развитие КРР, однако способствуют опухолевой прогрессии метастазированию. Как показывают литературные данные [9, 10, 11] мутации обширного района TP53 (5-8 экзон) наиболее часто обнаруживаются в связи с малигнизацией.

Синдром Линча обусловлен мутациями в одном из четырех генов, отвечающих за систему репарации нуклеотидов ДНК и стабильность генома (MMR), то есть генов MLH1, MSH2, MSH6 и PMS2 [6, 12-14]. Мутации MLH1, MSH2 имеют место в большинстве случаев синдрома Линча, где наблюдается делеция с 1 по 16 экзон. Мутации в этих двух локусах вызывают каскад мутаций в коротких tandemных повторяющихся микросателлитных последовательностях по всему геному [9].

Поэтому для молекулярно-генетического обследования данной когорты с возможным семейным наследованием КРР мы сосредоточили свое внимание на «критических» в отношении отдельных видов КРР районах 3-х генов: APC (1286-1513 кодона) – ассоциирован с аденоматозным полипозным синдромом (САП и АСАП); hMLH1 (8 экзон) – ассоциирован с синдромом Линча; и мутации TP53 (5-6 экзон) – в 50%-75% КРР.

Из всех образцов крови больных с отягощенным семейным анамнезом и ранним началом КРР были выделены ДНК. С применением специфических праймеров были амплифицированы «критические» районы генов APC (1286 – 1513 кодона), MLH1 (8 экзон), TP53 (5-6 экзон) и проведено прямое секвенирование нуклеотидной последовательности.

В результате Секвенс-анализа по «критическому» району гена APC (1286 – 1513 кодона) были зафиксированы только не-смысловые точечные мутации: G4479A и G1317C. Распределение генотипов было следующим: 1) G4479G – 5; G4479A – 1; A4479A – 10; 2) G1317G – 14; G1317C – 2. Других изменений выявлено не было. У пробанда, имеющего полипоз и многочисленные КРР в семейном анамнезе, в результате анализа были найдены следующие 2 замены оснований: G4479A; G1317C (рисунок 2А). Данные нуклеотидные замены еще не изучены функционально и на данном этапе исследования сложно судить об их значении.

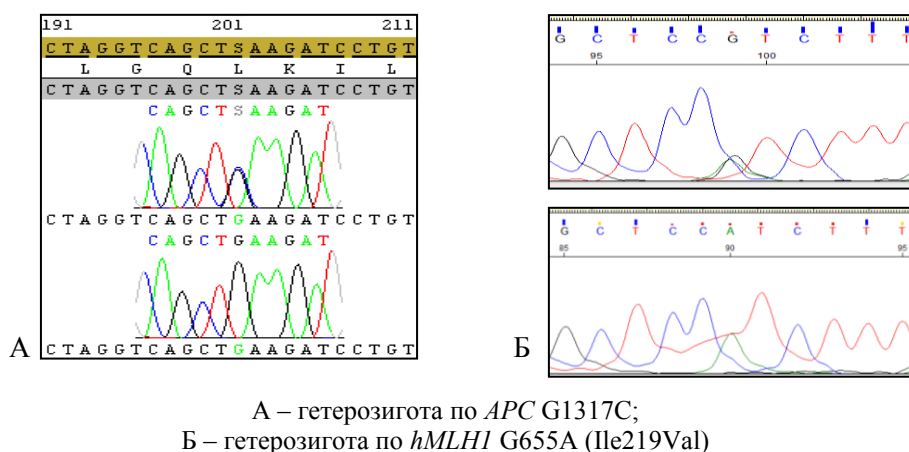
Секвенирование 5-6 экзонов TP53 гена в данной группе обследованных не показало каких-либо значимых изменений нуклеотидной последовательности. В настоящее время начат анализ 7-8 экзонов этого гена.

Результаты прямого секвенирования 8-го экзона гена hMLH1 у обследованных лиц позволили выявить только 1 случай замены оснований G→A по 655 позиции (219 кодон, замена Le→Val), которая была представлена в гетерозиготе. У данного пациента (женщина, 1969 г.р.) был диагностирован рак прямой кишки (St II, цитологически – умереннодифференцированная карцинома). Стоит отметить, что данная пациентка также гетерозиготна по обнаруженным нами заменам нуклеотидов APC (1286 – 1513 кодона) гена: G4479A (рисунок 2Б) и G1317C.

Таким образом, проведенный молекулярно-генетический анализ лиц с отягощенным се-

мейным анамнезом и ранним развитием КРР не определил наличия значимых мутаций в «критических» районах генов *APC*, *TP53* и *hMLH1*, однозначно свидетельствующих о наличии наследственных синдромов. Обнаруженные нами нуклеотидные замены пока мало изучены в функциональном смысле и, возможно, относятся к вариантам полиморфизма. Анализ других значимых районов указанных генов будет продолжен.

Известно, что в отношении КРР эффективны как меры первичной (выявление герминальных мутаций, определяющих высокий риск развития рака) так и вторичной (скрининг родственников больных, выявление семей с отягощенным наследственным онкологическим анамнезом) профилактики. В этой связи начаты работы по поиску и обследованию родственников лиц изученной нами группы с отягощенным семейным анамнезом и ранним развитием КРР).



А – гетерозигота по *APC* G1317C;
Б – гетерозигота по *hMLH1* G655A (Ile219Val)

Рисунок 2 – Варианты нуклеотидных замен в группе лиц с КРР

Литература

- 1 American Cancer Society. Colorectal Cancer Facts & Figures 2011-2013. – Atlanta: American Cancer Society, 2011. – P. 216.
- 2 [http://www.onco.kz/sections/Скрининг колоректального рака в Республике Казахстан](http://www.onco.kz/sections/Скрининг%20колоректального%20рака%20в%20Республике%20Казахстан).
- 3 Любченко Л.Н., Клинико-генотипические варианты семейного рака толстой кишки // Практическая онкология. – 2005. – Т.6, №2. – С.132-136.
- 4 Fearhead N.S., Wilding J.L., Bodmer W.F., Genetics of colorectal cancer: hereditary aspects and overview of colorectal tumorigenesis // Br. Med. Bull. -2002. – Vol.64. – P.27-43.
- 5 Harris T.J., McCormick F., The molecular pathology of cancer // Nat. Rev. Clin. Oncol. – 2010. – Vol.7. – P.251–265.
- 6 Fearhead N.S., Wilding J.L., Bodmer W.F., Genetics of colorectal cancer: hereditary aspects and overview of colorectal tumorigenesis // Br. Med. Bull. – 2002. – Vol.64. – P.27-43.
- 7 Luo J., Solimini N.L., and Elledge S.J., Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction // Cell. – 2009. – Vol.136. – P.823-837.
- 8 Nandan M.O. and Yang V.W., An Update on the Biology of RAS/RAF Mutations in Colorectal Cancer // Curr. Colorectal Cancer Rep. – 2011. – Vol.7, N.2. – P.113–120.
- 9 Migliore L., Migheli F., Spisni R., and Coppede F., Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer // Journal of Biomedicine and Biotechnology. -2011. – Vol.2011. – P.19.
- 10 Deschoolmeester V., Baay M., Specenier P., Lardon F., Vermorken J.B., A Review of the Most Promising Biomarkers in Colorectal Cancer: One Step Closer to Targeted Therapy // The Oncologist. – 2010. – Vol.15. – P. 699–731.
- 11 Kostin P.A., Generozov E.V., Zakhazhevskaya N.B., Govorun V.M., Lapina T.L., Yur'yeva Ye. Yu., Sklyanskaya O.A., Ivashkin V.T., Mayev I.V., Lyubeznova I.J., Golubev N.N., Kucheryavy Yu.A., Spectrum of somatic mutations in APC, k-Ras and TP53 genes at the Russian patients with colorectal cancer and premalignant diseases of the large intestine // РЖГГН – 2008. – №. 4. – С. 53-62.
- 12 Lynch H.T. and de la C.A., Hereditary colorectal cancer // N. Engl. J. Med. -2003. – Vol. 348. – P. 919-932.
- 13 Umar A., Boland C.R., Terdiman J. P., Syngal S., de la C.A., Ruschoff J., Fishel R., Lindor N.M., Burgart L.J., Hamelin R., Hamilton S.R., Hiatt R. A., Jass J., Lindblom A., Lynch H. T., Peltomaki P., Ramsey S.D., Rodriguez-Bigas M.A., Vasen H.F., Hawk E. T., Barrett J.C., Freedman A.N., and Srivastava S. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability // J. Natl. Cancer Inst. – 2004. – Vol.96. – P. 261-268.
- 14 Mitchell R.J, Farrington S.M, Dunlop M.G et al., Mismatch repair genes hMLH1 and hMSH2 and colorectal cancer: a HuGE review // Am. J. Epidemiol. -2002. – Vol. 156. – P. 885-902.