

АНАЛИЗ ВСТРЕЧАЕМОСТИ ДЕВЯТИ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ *BRCA1* И *BRCA2* У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В СИБИРСКОМ РЕГИОНЕ

О.Б. Часовникова¹, Д.В. Митрофанов¹, Д.О. Демченко⁴, С.В. Сидоров^{2,3},
О.З. Францкевич³, С.П. Коваленко^{1,2}

НИИ молекулярной биологии и биофизики СО РАМН, г. Новосибирск¹

Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск²

МУЗ «Городская клиническая больница №1», г. Новосибирск³

*ГУЗ «Областной клинический онкологический диспансер», г. Кемерово⁴
630117, г. Новосибирск, ул. академика Тимакова, 2, e-mail:mitrofan@soramn.ru¹*

С помощью тетрапраймерной аллель-специфической ПЦР нами произведен анализ 595 образцов ДНК из периферической крови больных раком молочной железы на 9 мутаций в генах *BRCA1/2*. 11 образцов (1,85 %) показали присутствие мутации 5382insC в гене *BRCA1* в гетерозиготном состоянии. У одной больной (0,17 %) выявлена мутация 185delAG в гене *BRCA1*. Остальные семь мутаций, а именно мутации 4153delA, 2963del10, 3819del5 и 3875del4 в гене *BRCA1*, а также мутации 9318delAAAA, 1528delAAAA и S1099X в гене *BRCA2* в данном исследовании не зарегистрированы. Таким образом, учитывая высокую вероятность развития онкозаболеваний у носителей мутаций в генах *BRCA1/2*, полученные нами данные свидетельствуют о целесообразности включения анализа на наличие мутаций 5382insC и 185delAG в гене *BRCA1* в скрининговые программы по определению риска РМЖ в Сибирском регионе.

Ключевые слова: рак молочной железы, мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2*.

THE INCIDENCE OF NINE *BRCA1* AND *BRCA2* MUTATIONS IN BREAST CANCER PATIENTS IN SIBERIAN REGION, RUSSIA

O.B. Chasovnikova¹, D.V. Mitrofanov¹, D.O. Demchenko⁴, S.V. Sidorov^{2,3}, O.Z. Frantskevich³, S.P. Kovalenko^{1,2}.

Research Institute of Molecular Biology and Biophysics, SD RAMS, Novosibirsk¹

Novosibirsk State University, Novosibirsk²

Municipal Clinical Hospital № 1, Novosibirsk³

Regional Clinical Oncology Dispensary, Kemerovo⁴

2, Timakova Street, 630117-Novosibirsk; e-mail:mitrofan@soramn.ru¹

By means of tetraprimer allele specific PCR we analyzed 595 DNA samples from peripheral blood of breast cancer patients for the presence of nine *BRCA1/2* mutations. Eleven samples (1,85 %) were positive for the heterozygous presence of 5382insC *BRCA1* mutation. One patient (0,17 %) was found to be the carrier of 185delAG *BRCA1* mutation. We failed to register other seven mutations, namely 4153delA, 2963del10, 3819del5 and 3875del4 in *BRCA1* gene as well as 9318delAAAA, 1528delAAAA and S1099X in *BRCA2* gene. Taking in account a high possibility of cancer development in *BRCA1/2* mutations carriers, our data suggest the reasonability of the inclusion of 5382insC and 185delAG *BRCA1* mutations tests in screening programs for breast cancer risk estimation in Siberian region of Russia.

Key words: breast cancer, *BRCA1* and *BRCA2* mutations.

Рак молочной железы (РМЖ) – самое частое онкологическое заболевание у женщин. Примерно каждая десятая жительница развитых стран заболевает РМЖ. Рак яичника (РЯ) встречается несколько реже, однако он занимает лидирующие позиции по онкогинекологической смерт-

ности, в основном вследствие несовершенства ранней диагностики. От 5 до 10 % случаев РМЖ и РЯ являются наследственными. Считается, что до 30–50 % из них обусловлены мутациями, наследуемыми по аутосомно-доминантному признаку, в генах *BRCA1* (MIN 113705) и *BRCA2*

(MIN 600185), локализованных соответственно на хромосомах 17q21 и 13q12 [16]. По литературным данным, повреждающие мутации в данных генах проявляют высокую пенетрантность и приводят к развитию этих онкологических заболеваний с вероятностью до 80–90 % в течение жизни женщины [14, 18]. Случаи го-

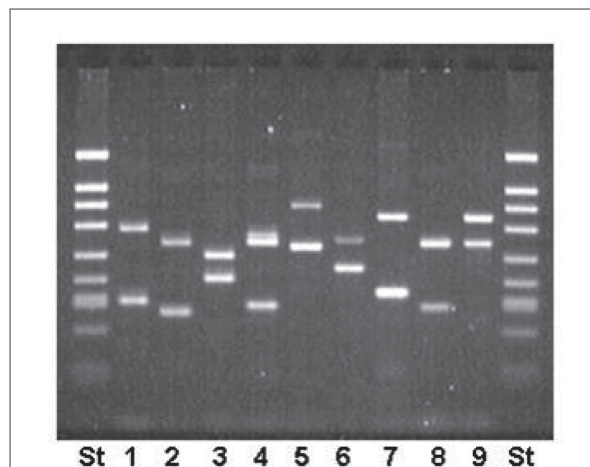


Рис. 1. Генотипирование по сайтам мутаций в генах *BRCA1/2* с помощью тетрапраймерной ПЦП. St – маркеры молекулярной массы ДНК. Генотипирование по сайтам: 1 – S1099X *BRCA2*; 2 – 2963del10 *BRCA1*; 3 – 3819de5 *BRCA1*; 4 – 185delAG *BRCA1*; 5 – 9318delAAAA *BRCA2*; 6 – 3875del4 *BRCA1*; 7 – 5382insC *BRCA1*; 8 – 1528delAAAA *BRCA2*; 9 – 4153delA *BRCA1*. Образец не содержал исследованных мутаций

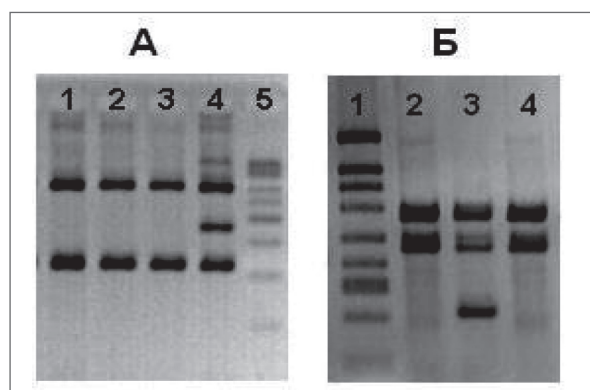


Рис. 2. Идентификация мутаций 5382insC и 185delAG в гене *BRCA1* человека:

А – анализ мутации 5382insC: 1, 2, 3 – гомозиготные образцы без мутации; 4 – гетерозиготный образец ДНК с мутацией; 5 – маркеры молекулярной массы ДНК;
Б – анализ мутации 185delAG: 1 – маркеры молекулярной массы ДНК; 2, 4 – гомозиготные образцы без мутации; 3 – гетерозиготный образец ДНК с мутацией

мозиготного носительства данных мутаций не описаны, по всей видимости, при гомозиготном носительстве мутаций происходит внутриутробная гибель зародыша [2].

Смысл анализа мутаций – в выявлении групп высочайшего риска онкологических заболеваний среди здоровых людей. Здоровые люди, носители таких мутаций, должны находиться под самым пристальным наблюдением онколога, обязательно проходить маммографию, использовать другие существующие способы раннего обнаружения опухолей, принимая во внимание крайне высокую вероятность возникновения раковой опухоли. В США и в ряде европейских стран здоровым людям – носителям мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* рекомендуют делать профилактические операции до возникновения опухоли (офорэктомия и мастэктомия), особенно женщинам старше детородного возраста [12]. На сегодняшний день профилактические операции становятся достаточно принятой процедурой за рубежом для генетически отягощенных женщин. Женщины-носительницы *BRCA1* мутаций особенно подвержены развитию РМЖ и РЯ в раннем возрасте (до 40 лет) с вероятностью 45–60 % и 20–40 % соответственно. Мутации в *BRCA2* повышают риск раннего развития РМЖ и РЯ до 25–40 % и 10–20 % соответственно [8, 9, 15].

Следует отметить, что спектр наследственных мутаций в генах *BRCA1/2* специфичен для разных стран и этнических групп. В отдельных популяциях могут преобладать вполне определенные мутации [10]. В России разнообразие мутаций в гене *BRCA1* не так велико, как это было описано для США и ряда европейских стран. Высказано (и отчасти доказано в работах) предположение, что большую часть наследственных мутаций в генах *BRCA1/2* в России составляют 12–14 мутаций [1, 3].

В данной работе мы провели анализ встречаемости 9 мутаций в генах *BRCA1/2* у пациентов с диагнозом РМЖ, с целью выявления наиболее часто встречающихся мутаций, которые повышают риск развития данного заболевания.

Материал и методы

В работе использовали образцы буккального эпителия (48 образцов) и крови (288 образцов)

Таблица

Размеры амплификационных фрагментов при тетрапраймерной ПЦР

Анализируемые мутации		Длины фрагментов, п.н.	
		ДНК «дикого типа»	ДНК, содержащая мутацию
<i>BRCA1</i>	185delAG	291, 215	291, 115
	5382insC	356, 164	356, 229
	4153delA	349, 269	349, 125
	2963del10	269, 130	269, 178
	3819del5	239, 189	239, 90
	3875del4	279, 211	279, 101
<i>BRCA2</i>	9318delAAAA	395, 263	395, 173
	1528delAAAA	273, 141	273, 182
	S1099X	300, 146	300, 203

пациентов онкодиспансера г. Кемерово, а также крови пациентов РМЖ 1-й Городской клинической больницы г. Новосибирска (259 образцов). Все пациентки имели диагноз рак молочной железы и проходили стационарное лечение. Возраст женщин варьировал от 18 до 81 года. Средний возраст составил $53,5 \pm 12,8$ года.

Образцы геномной ДНК. Выделение ДНК проводили с использованием наборов «Wizard Genomic DNA Purification Kit» (Promega, США). Выделение проводили согласно рекомендациям производителя. Концентрацию и чистоту выделенной ДНК оценивали спектрофотометрически на спектрофотометре «Agilent 8450A» (Agilent Technologies, США). Генотипирование на мутации в генах *BRCA1/2* проводили методом тетрапраймерной ПЦР [20] с использованием наборов «GenePak™ mut/wt DNA PCR test» («Лаборатория Изоген», Москва) согласно рекомендациям производителя. В качестве матрицы использовали 5–10 нг геномной ДНК. Продукты амплификации визуализировали электрофорезом в 3 % агарозном геле.

Результаты и обсуждение

Во многих исследованиях показано, что повреждающие мутации в генах *BRCA1/2* ассоциированы с развитием РМЖ и РЯ. Для анализа были выбраны мутации 5382insC, 185delAG, 2963del10, 3819del5 и 3875del4 в гене *BRCA1*, а также мутации 9318delAAAA, 1528delAAAA и S1099X в гене *BRCA2*, ранее зарегистрированные российскими авторами [1, 5, 17]. Для проведения молекулярно-генетического тестирования образцов ДНК больных РМЖ использо-

вали тетрапраймерную аллель-специфическую ПЦР [20].

При наличии в реакционной смеси ДНК «дикого типа» (без данной конкретной мутации) синтезируются два фрагмента ДНК различной длины. В случае гетерозиготного образца, который содержит как ДНК «дикого типа», так и ДНК с мутацией, появляется дополнительный фрагмент ДНК. В таблице приведены мутации в генах *BRCA1/2*, которые были проанализированы. Показаны размеры фрагментов, которые образуются при наличии в реакционной смеси ДНК «дикого типа» (рис. 1) и ДНК, содержащей соответствующую мутацию.

В ходе работы образцы ДНК 595 пациенток с диагнозом рак молочной железы были тестированы на наличие 9 мутаций в генах *BRCA1/2*. Из общего числа больных 11 человек (1,85 %) оказались носителями мутации 5382insC (рис. 2А). Таким образом, частота встречаемости аллеля *BRCA1* 5382insC в исследованной группе больных раком молочной железы составила 0,0092.

Более высокая частота носительства данной мутации (4,5 %) была получена при обследовании 64 анонимных образцов ДНК от женщин, больных РМЖ, независимо от возраста или семейной истории, в исследованиях на европейской части РФ [6]. Ранее зарегистрирована высокая частота встречаемости мутации 5382insC в гене *BRCA1* у больных семейными формами рака молочной железы (до 9 %) как в Санкт-Петербурге, так и в Москве [3]. По данным, полученным в НИИ онкологии г. Томска, мутация 5382insC в гене *BRCA1* также являет-

ся наиболее частой из мутаций, вызывающих наследственный РМЖ. Частота носительства данной мутации достигала 16 % среди больных с наследственной отягощенностью по данному заболеванию. Данная мутация была также обнаружена в 9 % случаев раннего (до 40 лет) развития РМЖ [4].

У одной больной выявлена мутация 185delAG в гене *BRCA1* (рис. 2Б). Таким образом, данные изменения обнаружены у 0,17 % пациентов с диагнозом рак молочной железы. Частота встречаемости мутантного аллеля составила 0,0008. Ранее эта мутация была зарегистрирована в исследовании наследственных форм РМЖ (ранняя форма и/или билатеральная форма/или семейная история). В НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова в Санкт-Петербурге при обследовании 302 женщин был выявлен один случай носительства мутации 185delAG [17]. Первоначально данная мутация была обнаружена в популяции евреев ашкенази [18], где является преобладающей, однако в российской популяции эта мутация, по-видимому, является минорной [3]. С другой стороны, не стоит недооценивать ее вклад в риск развития РЯ [7].

В нашем исследовании мутация 4153delA в гене *BRCA1* не была найдена, хотя она считается характерной для российской популяции. Эта мутация ранее была обнаружена в группах больных как РМЖ, так и РЯ [11, 13, 17]. Остальные шесть мутаций, а именно мутации 2963del10, 3819del5 и 3875del4 в гене *BRCA1* [3, 1], а также мутации 9318delAAAA, 1528delAAAA и S1099X в гене *BRCA2*, являются минорными [1, 19]. В данном исследовании они не зарегистрированы.

Таким образом, учитывая высокую вероятность развития онкозаболеваний у носителей мутаций в генах *BRCA1/2*, полученные нами данные свидетельствуют о целесообразно-

сти включения анализа на наличие мутаций 5382insC и 185delAG в гене *BRCA1* в скрининговые программы по определению риска РМЖ в Сибирском регионе. Результатом таких программ будет увеличение выявляемости онкологических заболеваний на ранней стадии и, как следствие, увеличение продолжительности и качества жизни онкологических больных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Грудина Н.А., Голубков В.И., Тихомирова О.С. и др. // Генетика. 2005. Т. 41, № 3. С. 405–410.
2. Имянитов Е.Н. // Молекулярная биология. 2008. Т. 42, № 5. С. 772–785.
3. Мандельштам М.Ю., Голубков В.И., Ламбер Е.П. и др. // Генетика. 2001. Т. 37, № 12. С. 1681–1686.
4. Терещенко И.В., Бэшизм В.М., Слонимская Е.М. и др. // Вопросы онкологии. 2002. Т. 48, № 1. С. 24–28.
5. Тихомирова О.С., Грудина Н.А., Голубков В.И. и др. // Генетика. 2007. Т. 43, № 9. С. 1263–1268.
6. Федорова О.Е., Синицкая О.Н., Тихомирова Л.П. и др. // Молекулярная биология. 2006. Т. 40, № 1. С. 1–6.
7. Федорова О.Е., Любченко Л.Н., Паянниди Ю.Г. и др. // Молекулярная биология. 2007. Т. 41, № 1. С. 37–42.
8. Antoniou A., Praroah P.D., Narod S. et al. // Am. J. Hum. Genet. 2003. Vol. 72 (5). P. 1117–1130.
9. Brose M.S., Rebbeck T.R., Calzone K.A. et al. // J. Natl. Cancer Inst. 2002. Vol. 94 (18). P. 1365–1372.
10. Ferla L., Calo V., Cascio S. et al. // Ann. Oncol. 2007. Vol. 18 (S6). P. vi93–98.
11. Gayther S.A., Harrington P., Russel P. et al. // Am. J. Hum. Genet. 1997. Vol. 60 (5). P. 1239–1242.
12. Heemskerk-Gerritsen B.A.M., Brekelmans C.T.M., Menke-Pluymers M.B.E. et al. // Ann. Surg. Oncol. 2007. Vol. 14 (12). P. 3335–3344.
13. Krylova N.Ya., Lobeiko O.S., Sokolenko A. et al. // Hered. Cancer Clin. Pract. 2006. Vol. 4 (4). P. 193–196.
14. Neuhausen S., Gilewski T., Norton L. et al. // Nat. Genet. 1996. Vol. 13 (1). P. 126–128.
15. Robles-Diaz L., Goldfrank D.J., Kauff N.D. et al. // Fam. Cancer. 2004. Vol. 3 (3–4). P. 259–264.
16. Scabo C.I., King M.C. // Hum. Mol. Genet. 1995. Vol. 4. P. 1811–1817.
17. Sokolenko A.P., Rozanov M.E., Mitushkina N.V. et al. // Fam. Cancer. 2007. Vol. 6 (3). P. 281–286.
18. Struwing J.P., Abeliovich D., Peretz T. et al. // Nat. Genet. 1995. Vol. 11 (2). P. 198–200.
19. Tereschenko I.V., Basham V.M., Ponder B.A., Pharoah P.D. // Hum. Mutat. 2002. Vol. 19 (2). P. 184.
20. Ye S., Humphries S., Green F. // Nucleic Acids Res. 1992. Vol. 20 (5). P. 1152.

Поступила 21.05.10