

УДК 572.224

Редкие мутации в гене *IDH1* в астроцитомах спинного мозга

Н. А. Коновалов¹, Д. С. Асютин¹, Е. Г. Шайхаев², С. В. Капровой¹, С. Ю. Тимонин^{1*}¹Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко Минздрава России, Москва, 125047 Россия²Российский научный центр рентгенорадиологии Минздрава России, Москва, 117485 Россия

*E-mail: md.timonin@gmail.com

Поступила в редакцию 11.02.2020

Принята к печати 26.03.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.10915

РЕФЕРАТ Низкая частота встречаемости глиом спинного мозга (4.3% в структуре первичных и глиальных опухолей центральной нервной системы) и связанные с этим сложности формирования статистически значимых когорт больных существенно замедляют разработку эффективных подходов к терапии опухолей спинного мозга по сравнению с опухолями головного мозга. Несмотря на существенный багаж знаний о мутациях гена *IDH* в интракраниальных опухолях, крайне мало известно о мутациях этого гена в астроцитомах спинного мозга. В настоящем исследовании мы сообщаем о пяти мутациях в гене *IDH1*, выявленных в клетках астроцитомы спинного мозга, две из которых, впервые описанные в глиомах центральной нервной системы, являются уникальными.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА *IDH1*, *IDH2*, астроцитома спинного мозга, NGS.

ВВЕДЕНИЕ

Среди первичных опухолевых заболеваний центральной нервной системы (ЦНС) наиболее частыми и, следовательно, наиболее изученными являются опухоли головного мозга. По данным CBTRUS 2014 года, в структуре первичных и глиальных опухолей ЦНС первичные опухоли спинного мозга занимают 4.3%, включая эпендимомы (21%), астроцитомы (3.2%), в том числе глиобластомы, а также опухоли различной природы (5.9%) – метастазы, лимфомы, иные нейроэпидермальные образования, и пилоидные астроцитомы (0.8%). Низкая частота встречаемости глиом спинного мозга и связанная с этим сложность формирования статистически значимых выборок больных существенно замедляют изучение механизмов возникновения, прогнозирование развития, а также разработку подходов к эффективной терапии глиом спинного мозга по сравнению с опухолями головного мозга.

К настоящему времени исследование интракраниальных астроцитов позволило определить ряд генетических маркеров, позволяющих дифференцировать степень злокачественности данных опухолей, прогнозировать течение болезни, а в некоторых случаях и способствовать проведению таргетной терапии.

Одной из важнейших находок в изучении клеток глиом головного мозга (в том числе астроцитом) стало обнаружение соматических миссенс-мутаций в генах

IDH1 и *IDH2*, кодирующих изоцитратдегидрогеназы 1 и 2. Мутации *IDH1/2* чаще всего ассоциированы с астроцитомами II–III степени злокачественности и вторичными глиобластомами (70–80% случаев) и довольно редко (< 5%) обнаруживаются в пилоидных астроцитомах и первичных глиобластомах, что делает их хорошим диагностическим маркером [1]. Кроме того, они служат важным прогностическим признаком: анапластические астроцитомы с *IDH* дикого типа оказываются более агрессивными и близкими к глиобластомам, чем опухоли с мутациями *IDH*; наиболее благоприятное течение болезни характерно для комбинации мутации в *IDH* и делеции 1p/19q [2]. Наконец, данный биомаркер может оказаться потенциально полезным и при разработке препаратов для таргетной терапии опухолей. Так, в одном из исследований выявлена частичная эффективность селективных ингибиторов изоцитратдегидрогеназ в случае опухолей с мутацией R132H *IDH1* как в условиях *in vitro*, так и на моделях глиом [3]. Перечисленные характеристики мутаций *IDH* стали причиной их официального включения в список биомаркеров, используемых для классификации опухолей ЦНС по критериям ВОЗ [2].

В гене *IDH1* в клетках глиом наиболее часто встречается гетерозиготная однонуклеотидная замена, приводящая к замене остатка аргинина на гистидин в положении 132 (R132H, >90% случаев) в активном центре фермента. Существенно реже встречаются

замены аргинина на цистеин, серин, глицин, лейцин, валин и пролин [4]. Описаны также динуклеотидные инсерции/делеции, приводящие к замене аргинина-132 на цистеин (два случая анапластической астроцитомы и один случай глиобластомы головного мозга) [5] и на валин (один случай) [6], а также два случая гомозиготных мутаций в клетках анапластической астроцитомы – замена аргинина-132 на лейцин [5] и гистидин [7]. Опубликованы сообщения об обнаружении редкой замены аргинина на глутамин в положении 100 (R100Q) изоцитратдегидрогеназы, также приводящей к потере функции белка; описаны два случая такой замены при анапластической олигодендроглиоме и один – при диффузной астроцитоме [8]. Один случай замены R100Q выявлен в клетках глиобластомы [5].

Несмотря на существенный багаж знаний о мутациях в гене *IDH* в интракраниальных опухолях, информации о мутациях в астроцитомах спинного мозга (АСМ) пока крайне мало, что связано с редкостью таких опухолей и, следовательно, с малым размером выборок, не обеспечивающим возможность надежного статистического анализа. К настоящему времени нами найдена информация о двух случаях обнаружения мутации *IDH1* в клетках диффузной АСМ и одно описание мутации *IDH2* в клетках пилоцитарной АСМ [9, 10]. Однако различия в механизмах возникновения и развития опухолей ЦНС различной локализации затрудняют возможность экстраполяции данных, полученных для опухолей головного мозга, на опухоли спинного мозга. Таким образом, накопление и анализ информации о мутациях *IDH* в клетках АСМ остаются очень актуальной задачей.

В настоящем исследовании мы сообщаем о пяти мутациях в гене *IDH1*, выявленных в клетках АСМ. Две из этих мутаций можно считать уникальными, так как они впервые описаны в глиомах ЦНС.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В исследование генетических мутаций было включено 50 пациентов с интрамедуллярными глиомами спинного мозга, однако в данной работе мы фокусируемся на 5 пациентах. Клинические проявления были типичными для заболевания и выражались в снижении чувствительности и слабости в конечностях. Пациентам проводили микрохирургическое удаление интрамедуллярной опухоли под контролем нейрофизиологического мониторинга. Исход хирургического лечения во всех случаях был удовлетворительным.

Выделение ДНК

ДНК выделяли из образцов опухолевой ткани, фиксированных в формальдегиде и залитых парафином

(FFPE-образцы, formalin-fixed paraffin-embedded), с использованием коммерческого набора GeneRead DNA FFPE (QIAGEN, США). Была получена пригодная для дальнейшего анализа ДНК, концентрация которой варьировала от 10 до 100 нг/мкл.

Высокопроизводительное секвенирование (NGS)

Анализ опубликованных результатов изучения генетики опухолей ЦНС позволил нам отобрать 15 генов (*ATRX, EGFR, FGFR2, H3F3A, IDH1, IDH2, NF1, NF2, NTRK1, PDGFRA, PIK3CA, PIK3R1, PTEN, PTPN13, TP53*), мутации в которых могут иметь непосредственное отношение к молекулярному патогенезу астроцитом спинного и головного мозга. На основе технологии AmpliSeq при участии компании Illumina разработана панель праймеров, обеспечивающая возможность селективного анализа этих генов в нашей выборке образцов ДНК на секвенаторе нового поколения MiSeq (Illumina, США).

Анализ результатов NGS

Выравнивание прочитанных последовательностей относительно референсной последовательности генома человека (hg19), а также их фильтрацию по качеству осуществляли в автоматическом режиме с помощью программы MiSeq Reporter (Illumina). Анализ (аннотацию) генетических изменений проводили с помощью программы Variant Studio 3.0 (Illumina). Для визуализации геномных данных, оценки глубины прочтения и выявления возможных ложноположительных результатов использовали программу Integrative Genomics Viewer (IGV) (Broad Institute, США). Популяционные частоты аннотированных генетических вариантов оценивали с использованием данных проекта gnomAD (gnomad.broadinstitute.org/variant/2-209113262-C-T?dataset=gnomad_r2_1). Влияние генетических вариантов генов на структуру и функции кодируемых белков предсказания выявляли с использованием биоинформатических методов Pathoman (pathoman.mskcc.org/PathoMANmethodDescription) и Condell (bbglab.irbbarcelona.org/fannsd/). Для оценки их клинической значимости использовали базу данных NCBI ClinVar (ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного исследования ни в одном из проанализированных 46 образцов не обнаружили мутации в гене *IDH2*. В то же время в пяти образцах выявлены мутации в гене *IDH1* (таблица).

Поскольку к настоящему моменту мутации в гене *IDH1* в клетках астроцитом спинного мозга описаны лишь в двух публикациях [9, 10], причем в одной из них отсутствует детализация мутации, эти ре-

Мутации в гене *IDH1*, выявленные в исследовании

Мутация*	Интрамедуллярная опухоль, локализация	Гистологический диагноз	Возраст и пол пациента
R132H	Два узла опухоли на уровне С3-5, Th2-3 позвонков	Пилоидная астроцитомы	Ж, 32
R132H	С2-С3	Анапластическая астроцитомы	Ж, 28
R132G	С5-7	Диффузная астроцитомы	Ж, 33
R82K	С7-Th1	Пилоидная астроцитомы	Ж, 21
I76T	С1-С6	Пилоидная астроцитомы	М, 19

*R – аргинин, H – гистидин, G – глицин, K – лизин, I – изолейцин, T – треонин.

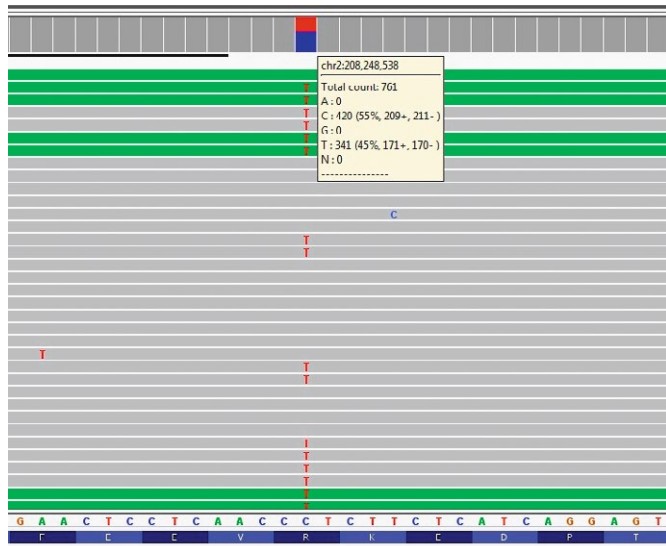


Рис. 1. Обнаружение мутации с.245G> A (p.R82K) в гене *IDH1* методом NGS. Представлен фрагмент диаграммы многократного прочтения фрагмента хромосомы 2, на которой локализован ген *IDH1* (Программа визуализации геномных данных – Integrative Genomics Viewer (IGV)). Красным показана замена С> Т в положении 208248538 хромосомы 2, которая соответствует замене с.245G> А в гене *IDH1*. Общая глубина прочтения данного региона составила 761X, количество прочтений мутантного нуклеотида Т составило 341 (45%)

зультаты имеют высокую степень новизны. В гене *IDH1*, выделенном из образца диффузной астроцитомы спинного мозга, выявлена мутация, определяющая аминокислотную замену R132S (Arg→Ser) в молекуле фермента [9]. Наши результаты показывают, что в клетках АСМ возможно появление еще двух замен в данной позиции *IDH1* – R132H (Arg→His) и R132G (Arg→Gly). Обе эти замены найдены в *IDH1* в астроцитомах головного мозга, причем первая из них относится к наиболее распространенному варианту.

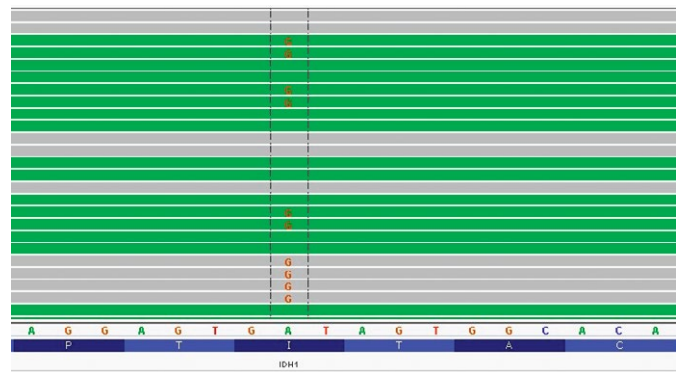


Рис. 2. Обнаружение мутации с.227T> С (p.Ile76Thr) в гене *IDH1* методом NGS. Представлен фрагмент диаграммы многократного прочтения фрагмента хромосомы 2, на которой локализован ген *IDH1* (Программа визуализации геномных данных – Integrative Genomics Viewer (IGV)). Оранжевым показана замена А> G в положении 208248556 хромосомы 2, которая соответствует замене с.227T> С в гене *IDH1*. Общая глубина прочтения данного региона составила 585X, количество прочтений мутантного нуклеотида G составило 317 (54%)

Особого внимания заслуживают еще две замены, обнаруженные в позициях 82 (Arg→Lys, R82K) и 76 (Ile→Thr, I76T) *IDH1* (рис. 1, 2). Это наследственные мутации, имеющие очень низкие частоты встречаемости. По данным ресурса gnomAD, популяционная частота варианта R82K составляет 0.002475%, а I76T – 0.0003977%. Обе эти замены описаны впервые не только в астроцитомах спинного мозга, но и в опухолях ЦНС в целом. Нам удалось найти лишь две публикации, в которых первая мутация (R82K) была описана у пациентов с острым миелоидным лейкозом [11] и первичной меланомой кожи [12]. Данные о второй мутации (I76T) нами не обнаружены. Следует также отметить, что образцы с данными уникальными мутациями не содержали ни одной из других ассоциированных с астроцитомами мутаций, включенных в панель для анализа (*ATRX*, *EGFR*, *FGFR2*, *H3F3A*,

NF1, NF2, NTRK1, PDGFRA, PIK3CA, PIK3R1, PTEN, RPTN13, TP53; данные не приведены).

Использованные нами методы предсказания влияния выявленных аминокислотных замен на структуру и функцию белков (Pathoman и Condel) указывают на повреждающее действие замен R82K и I76T. В базе данных NCBI ClinVar эти мутации характеризуются как варианты с неизвестным значением. Для определения их возможного эффекта необходимы более детальные исследования.

Таким образом, в результате проведенного исследования получена новая информация о мутациях в гене *IDH1* в клетках АСМ. Обнаружены две уникальные мутации, не описанные ранее в клетках опухолей ЦНС. Дополнительное значение полученных результатов связано с тем, что официальная классификация опухолей по версии ВОЗ предусматривает использование мутаций в гене *IDH1* в качестве одного из маркеров, имеющих высокую диагностическую и прогностическую ценность. Поскольку в подавляющем большинстве случаев мутации в данном гене представлены вариантом R132H, то для анализа, как правило, используется иммуногистохимиче-

ское окрашивание соответствующими антителами. Однако выявление других мутантных вариантов в этом случае становится невозможным. В нашем случае из пяти обнаруженных мутаций только две относились к доминирующему варианту, при этом они оказались уникальными. Следовательно, выявление подобного рода мутаций возможно исключительно с применением секвенирования. В связи с этим для выявления редких типов мутаций в генах *IDH* в образцах АСМ желательнее использовать методы NGS-секвенирования.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников получено информированное добровольное согласие. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (номер проекта 18-29-01042).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Huse JT., Aldape K.D. // Clin. Cancer Res. 2014. V. 20. № 22. P. 5601–5611.
- Christians A., Adel-Horowski A., Banan R., Lehmann U., Bartels S., Behling F., Barrantes-Freer A., Stadelmann C., Rohde V., Stockhammer F., et al. // Acta Neuropathol. Commun. 2019. V. 7. Article 156.
- Rohle D., Popovici-Muller J., Palaskas N., Turcan S., Grommes C., Campos C., Tsoi J., Clark O., Oldrini B., Komisopoulou E., et al. // Science. 2013. V. 340. P. 626–630.
- Yang H., Ye D., Guan K.-L., Xiong Y. // Clin. Cancer Res. 2012. V. 18. P. 5562–5571.
- Gupta R., Flanagan S., Li C.C.Y., Lee M., Shivalingham B., Maleki S., Wheeler H.R., Buckland M.E. // Modern Pathol. 2013. V. 26. P. 619–625.
- Balss J., Meyer J., Mueller W., Korshunov A., Hartmann C., von Deimling A. // Acta Neuropathol. 2008. V. 116. P. 597–602.
- Singh A., Gurav M., Dhanavade S., Shetty O., Epari S. // Neuropathol. 2017. V. 37. P. 582–585.
- Pusch S., Sahm F., Meyer J., Mittelbronn M., Hartmann C., von Deimling A. // Neuropathol. Appl. Neurobiol. 2011. V. 37. P. 428–430.
- Takai K., Tanaka S., Sota T., Mukasa A., Komori T., Taniguchi M. // World Neurosurg. 2017. V. 108. P. 991.e13–991.e16.
- Biczok A., Dorostkar M., Egensperger R., Tonn J.-C., Zausinger S. // Neuro Oncol. 2018. V. 20 (suppl. 6). P. vi167.
- Šestáková Š., Krejčík Z., Folta A., Cerovská E., Šálek C., Merkerová M.D., Pecherková P., Ráčil Z., Mayer J., Cetkovský P., Remešová H. // Cancer Biomark. 2019. V. 25. P. 43–51.
- Ticha I., Hojny J., Michalkova R., Kodet O., Krkavcova E., Hajkova N., Nemejcova K., Bartu M., Jakska R., Dura M., et al. // Sci. Rep. 2019. V. 9. Article 17050.