

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Марина Александровна Емельянова¹, Наталья Николаевна Мазуренко²,
Илья Михайлович Гагарин³, Ирина Викторовна Цыганова⁴,
Ирина Борисовна Зборовская⁵, Ксения Анатольевна Архипова⁶,
Валерия Васильевна Мочальникова⁷, Людмила Николаевна Любченко⁸,
Татьяна Васильевна Наседкина⁹

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ *EGFR* ПРИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ЛЕГКОГО С ПОМОЩЬЮ БИОЛОГИЧЕСКИХ МИКРОЧИПОВ

¹ Младший научный сотрудник, лаборатория биологических микрочипов
ФГБУ науки «Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта» РАН
(119991, РФ, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32)

² Профессор, д. б. н., заведующая, лаборатория онкогеномики НИИ канцерогенеза
ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24)

³ К. м. н., лаборант-исследователь, лаборатория онкогеномики НИИ канцерогенеза
ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24)

⁴ К. б. н., научный сотрудник, лаборатория онкогеномики НИИ канцерогенеза
ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24)

⁵ К. б. н., заведующая, лаборатория регуляции клеточных и вирусных онкогенов НИИ канцерогенеза
ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24)

⁶ К. б. н., научный сотрудник, лаборатория регуляции клеточных и вирусных онкогенов НИИ канцерогенеза
ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24)

⁷ Патологоанатом, патологоанатомическое отделение НИИ клинической онкологии
ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24)

⁸ Д. м. н., заведующая, лаборатория клинической онкогенетики НИИ клинической онкологии
ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24)

⁹ Д. б. н., ведущий научный сотрудник, лаборатория биологических микрочипов
ФГБУ науки «Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта» РАН
(119991, РФ, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32)

Адрес для переписки: 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24, НИИ канцерогенеза
ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН, лаборатория онкогеномики,
Мазуренко Наталья Николаевна; e-mail: nnmazurenko@mail.ru

Соматические мутации в гене *EGFR* у больных немелкоклеточным раком легкого предопределяют чувствительность опухоли к таргетной терапии ингибиторами тирозинкиназ — гефитинибом (иресса) или эрлотинибом. Нами разработан метод, позволяющий выявлять 13 наиболее часто встречающихся мутаций в гене *EGFR*: 9 вариантов делеций в 19-м экзоне и точковые мутации в 21-м (Leu858Arg) и 18-м (Gly719Cys, Gly719Ala, Gly719Ser) экзонах. Для повышения чувствительности метода и выявления минорных фракций опухолевых клеток в клинических образцах использован способ подавления амплификации последовательностей «дикого» типа в ходе полимеразной цепной реакции с помощью LNA-олигонуклеотидов. Продукт LNA-блокирующей полимеразной цепной реакции гибридизовали с олигонуклеотидными зондами, иммобилизованными в геле на поверхности биочипа. Биочип протестирован на 127 образцах ДНК больных немелкоклеточным раком легкого, в основном аденокарциномой. В качестве референс-метода использовали секвенирование продуктов полимеразной цепной реакции. Разработанный метод с использованием биочипов позволяет с высокой достоверностью обнаруживать мутации в гене *EGFR*, независимо от метода получения ДНК, даже если доля клеток, несущих мутацию, незначительна.

Ключевые слова: соматические мутации, рак легкого, ген *EGFR*, биочипы, диагностика.

В последние годы при лечении больных немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) активно используют нацеленные на определенный вид молекул (таргетные) препараты гефитиниб и эрлотиниб [1]. Они избирательно связываются с тирозинкиназным доменом рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), тем самым блокируя рост и пролиферацию клеток опухоли [2]. В ряде исследований показано, что данные препараты эффективны исключительно у пациентов, несущих соматические мутации в гене *EGFR* [3–6]. Большинство мутаций локализуется в 18–21-м экзонах гена *EGFR*, кодирующих тирозинкиназный домен рецептора [4; 5]. Это приводит к увеличению киназной активности рецептора, способствующей увеличению клеточной пролиферации, выживаемости, инвазии [7].

Наиболее распространенными мутациями в гене *EGFR*, составляющими 51–56% тестируемых нарушений, являются делеции в 19-м экзоне, которые могут иметь различный размер, но наиболее часто приводят к делеции с 746-й по 750-ю аминокислоту. Кроме того, часто наблюдаются точковые мутации Leu858Arg (36–44%) в 21-м экзоне и Gly719X (5–6%) в 18-м [8–10]. Мутации, наличие которых ассоциировано с эффективностью анти-EGFR-терапии, также различаются по своей клинической значимости. Например, у пациентов с делециями в 19-м экзоне гена *EGFR* общая выживаемость выше, чем у пациентов с мутацией Leu858Arg [11; 12].

При исследовании опухолевого материала доля клеток с соматическими мутациями может быть невелика, что в ряде случаев не позволяет выявить анализируемую мутацию. Наиболее распространенный подход к решению этой проблемы состоит в избирательном выявлении мутантного аллеля [13; 14] или в подавлении амплификации последовательностей дикого типа при проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР) [15; 16]. В частности, для обогащения образца последовательностью определенного типа используют LNA-блокирующую ПЦР [17].

LNA (locked nucleic acid) — синтетический аналог РНК, имеющий дополнительную связь между 2'-О и 4'-С, которая блокирует рибозу в N-конформации, подобно А-форме РНК. Такая «закрытая» конформация способствует увеличению термодинамической стабильности совершенного дуплекса ДНК-LNA и нестабильности несовершенного [18]. В результате присутствия в ПЦР-смеси LNA-олигонуклеотида, который специфически узнает последовательность дикого типа и связывается с ней, препятствуя ее амплификации, происходит преимущественное увеличение числа копий мутантного аллеля [17].

В нашем исследовании предложен высокочувствительный метод, совмещающий LNA-блокирующую мультиплексную ПЦР с гибридизацией на биочипе. Это сделало возможным проведение одновременного анализа 13 соматических мутаций в гене *EGFR*. В результате разработана высокоэффективная тест-система, которую в

дальнейшем можно использовать для скрининга больных НМРЛ на наличие мутаций в гене *EGFR*. Достоверное определение мутаций позволяет индивидуально подбирать противоопухолевую терапию, основываясь на генетическом портрете опухоли.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты. В исследование включены 123 больных НМРЛ, прооперированных и/или получавших химиотерапевтическое лечение в НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН. Выборка опухолей представлена 109 аденокарциномами (у 65 мужчин и у 44 женщин) и 14 образцами плоскоклеточного рака легких (у 12 мужчин и у 2 женщин). Средний возраст больных аденокарциномой составил 60,3 года (от 28 до 82 лет), а больных плоскоклеточным раком — 59,2 года (от 30 до 76 лет). В 81 случае исследовали свежемороженый опухолевый материал, полученный в результате хирургического вмешательства и хранившийся в жидком азоте, а в 65 случаях — архивные парафиновые блоки опухолевых биопсий. У 23 пациентов образцы были представлены одновременно и свежемороженой, и фиксированной в парафиновых блоках опухолевой тканью.

Выделение ДНК. Для выделения ДНК из свежемороженого операционного материала использовали набор QIAamp DNA Micro Kit («Qiagen», Германия).

При выделении ДНК из архивных образцов операционного материала, фиксированного в парафине, проводили ручную макродиссекцию опухолевых клеток со срезов под контролем серийного среза, окрашенного гематоксилином и эозином, что позволяет обогатить препарат опухолевой ДНК. Геномную ДНК выделяли с помощью протеиназы К, как описано ранее [19].

Концентрацию ДНК измеряли на флуориметре Qubit («Life Technologies Corporation», США).

Сайт-направленный мутагенез. Для тестирования биологического микрочипа мутантные последовательности гена *EGFR*, несущие точковые мутации Leu858Arg, Gly719Cys, Gly719Ala и Gly719Ser, получены посредством сайт-направленного мутагенеза [20; 21]. Фрагменты 19-го экзона гена *EGFR*, содержащие все варианты анализируемых на чипе делеций, синтезированы в коммерческой фирме «Евроген» (Москва, Россия).

Мутации. В ячейках биочипа были иммобилизованы олигонуклеотиды, позволяющие определять точковые мутации Gly719Ala, Gly719Cys, Gly719Ser, Leu858Arg и делеции в 19-м экзоне гена *EGFR*: 2235–2249del (E746–A750del), 2236–2250del (E746–A750del), 2237–2251del (E746–T751 del insA), 2237–2252del insT (E746–T751del insV), 2237–2255del insT (E746–S752del insV), 2239–2248del insC (L747–A750del insP), 2239–2251del insC (L747–T751del insP), 2240–2254del (L747–T751del), 2240–2257del (L747–P753del insS).

Олигонуклеотидные пробы представляют собой последовательность гена *EGFR* длиной 15–20 п. о., несущую вариабельный участок в центральном положении. Фрагменты гена *EGFR* с анализируемыми мутациями приведены в табл. 1.

Синтез олигонуклеотидов и изготовление биочипов. Олигонуклеотиды для иммобилизации на биочипе синте-

Таблица 1

Мутации в гене *EGFR*, идентифицируемые на биологическом микрочипе

Сайт	Мутация	Нуклеотидная последовательность
19-й экзон	WT	ATTAAGAGA
	2235—2249del (E746—A750del)	TCAAAACAT
	2236—2250del (E746—A750del)	TCAAGACAT
	2237—2251del (E746—T751del insA)	CAAGGCATC
	2237—2252del insT (E746—T751del insV)	AAGGTATCT
	2237—2255del insT (E746—S752del insV)	AAGGTTCCG
	2239—2248del insC (L747—A750del insP)	GGAACCAAC
	2239—2251del insC (L747—T751del insP)	GGAACCATC
	2240—2254del (L747—T751del)	GGAATCTCC
	2240—2257del (L747—P753del insS)	GGAATCGAA
719-й кодон	Gly (WT)	GCTGGGCTC
	Ala	CTGGCCTCC
	Cys	GCTGTGCTC
	Ser	GCTGAGCTC
858-й кодон	Leu (WT)	GGGCTGGCC
	Arg	GGGCGGGCC

зировали на автоматическом синтезаторе 394 DNA/RNA Synthesizer («Applied Biosystems», США) с использованием стандартной фосфоамидитной процедуры. На 3'-конце олигонуклеотидов находился спейсер со свободной аминогруппой, который вводили при синтезе с помощью 3'-Amino-Modifier C7 CPG 500 («Glen Research», США).

Биочипы изготовлены с помощью фотоиндуцируемой совместной полимеризации олигонуклеотидов и компонентов полиакриламидного геля, как описано ранее [22].

Подбор LNA-олигонуклеотидов. LNA-олигонуклеотиды моделировали с помощью on-line приложения (<http://www.exiqon.com/oligo-tools>). В их состав входили как LNA, так и ДНК-нуклеотиды, 3'-конец молекулы был фосфорилирован для препятствия удлинению олигону-

клеотида Taq-полимеразой. Последовательности LNA-олигонуклеотидов могут быть предоставлены авторами по запросу.

ПЦР. Амплификацию интересующих нас участков гена *EGFR* проводили с помощью двухэтапной мультиплексной ПЦР. Для каждого фрагмента гена были подобраны и синтезированы две пары праймеров. Нуклеотидные последовательности праймеров можно получить у авторов по запросу.

Мультиплексную ПЦР проводили на приборе Dyad («Bio-Rad», США). ПЦР-смесь первого этапа общим объемом 25 мкл включала 67 мМ Трис-НСl (pH 8,6), 166 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01% Тритон X-100, 1,5 мМ MgCl_2 , 0,2 мМ каждого из дНТФ («Силекс», Россия), 2,5 U Taq-полимеразы («Силекс», Россия), по 0,2 мкМ каждого из праймеров, 0,02—0,1 мкМ каждого из LNA-олигонуклеотидов и 20 нг ДНК. Амплификацию проводили по следующей схеме: денатурация при 94 °C (3 мин 30 с), затем 35 циклов: 94 °C (30 с), 62 °C (20 с), 72 °C (10 с), после этого — элонгация при 72 °C в течение 3 мин.

На втором этапе в качестве матрицы использовали продукт первого этапа ПЦР (2 мкл). Состав ПЦР-смеси был таким же, за исключением того, что в ней отсутствовали LNA-олигонуклеотиды, а содержались праймеры второго этапа в концентрации 0,2 мкМ для прямых и 2 мкМ для обратных праймеров. Кроме того, в ПЦР-смесь добавляли 0,2 нМ флуоресцентно меченного ДУФ-Су5, который встраивался в цепь в процессе амплификации. Таким образом, в результате ПЦР получали одноцепочечный флуоресцентно меченный ПЦР-продукт.

Гибридизация меченного продукта на биочипе. Полученный на втором этапе мультиплексной ПЦР флуоресцентно меченный продукт использовали для гибридизации на биочипе. Гибридизационная смесь общим объемом 40 мкл содержала 10 мкл формамида («Serva», США), 10 мкл 20 × SSPE («Promega», США) и 20 мкл амплификата. Гибридизационную смесь денатурировали при 95 °C (5 мин), охлаждали на льду (2 мин), наносили на биочип и оставляли на 12—18 ч при температуре 37 °C. После этого биочип отмывали в растворе 1 × SSPE в течение 15 мин при комнатной температуре, споласкивали дистиллированной водой и высушивали.

Регистрация изображения. Флуоресцентный сигнал от ячейки микрочипа регистрировали с помощью портативного анализатора биочипов, снабженного камерой ПЗС и программным обеспечением Imageware («Биочип-ИМБ», Россия), по описанной ранее методике с экспозицией 100—500 мс [23]. Поскольку все ячейки на биочипе дублированы, в расчетах использовали среднее значение сигнала по двум ячейкам. Считали, что сигнал свидетельствует об образовании дуплекса, если интенсивность флуоресценции от соответствующей ячейки минимум в 5 раз превышала интенсивность флуоресценции фона. В зависимости от локализации сигнала на биочипе можно судить о наличии той или иной мутации в исследуемом образце. При амплификации интересующего нас фрагмента ДНК использовали LNA-блокирующую ПЦР. Поэтому ячейка, содержащая зонд с последовательностью дикого типа, могла иметь очень низкий уровень флуоресцентного сигнала.

Секвенирование. Выделенные из срезов парафиновых блоков образцы опухолевой ДНК ($n = 65$) анализи-

ровали секвенированием параллельно с анализом на биочипах. Для выявления мутаций в гене *EGFR* использовали ПЦР с праймерами к 18, 19 и 21-му экзонам гена *EGFR*, выбранными в результате биоинформационного анализа [19]. В случаях, если ДНК со срезов была сильно фрагментирована и имела низкую концентрацию, использовали полугнездовую ПЦР с праймерами, позволяющими получить более короткие ПЦР-продукты, перекрывающие друг друга [19]. После очистки ПЦР-продуктов проводили секвенирование с помощью набора реактивов ABI PRISM BigDye Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer (ЦКП «Геном», Москва, Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ мутаций в гене *EGFR* с помощью биочипа

На рис. 1 приведена схема биологического микрочипа. Для повышения надежности и точности анализа каждая проба на биочипе дублирована.

Разработанный биочип позволяет анализировать 13 наиболее часто встречающихся мутаций в гене *EGFR*: 9 вариантов делеций в 19-м экзоне, мутации в 719-м кодоне Gly719Ala, Gly719Cys и Gly719Ser, мутацию Leu858Arg. На рис. 2 представлены гибридизационные картины, которые получены при анализе ДНК, выделенной как из свежзамороженных биопсий, так и из парафинового среза. Один образец представлен последовательностью гена *EGFR* «дикого» типа (см. рис. 2, А), другие образцы содержат мутации: 2235—2249del (E746—A750del) в 19-м экзоне (см. рис. 2, Б), Gly719Ala (см. рис. 2, В) и Leu858Arg (см. рис. 2, Г).

Биологический микрочип протестирован на способность определения всех 13 мутаций. Для этого использовали образцы опухолевой ДНК с известными генотипами. В ряде случаев ввиду отсутствия клинических образцов с данной мутацией использованы мутантные последовательности, полученные с помощью сайт-направленного мутагенеза.

Генотипирование пациентов с НМРЛ

Разработанный нами протокол генотипирования на биочипах использован при анализе 127 образцов ДНК от 123 больных НМРЛ. Результаты генотипирования суммированы в табл. 2.

Выборка опухолей состояла из 2 групп. В 1-ю группу входили образцы ДНК из свежзамороженных образцов НМРЛ ($n = 81$), во вторую — образцы ДНК, полученные из парафиновых блоков опухолевой ткани ($n = 46$). Для 4 случаев НМРЛ получены образцы ДНК двух типов.

В результате генотипирования образцов ДНК, выделенных из свежзамороженных опухолевых биопсий, мутации в гене *EGFR* обнаружены у 11 (15%) из 72 пациентов с аденокарциномой легкого. Мутации в 19-м экзоне выявлены в 6 случаях: в 5 зафиксированы делеции 2235—2249 del (E746—A750del) и в одном — 2240—2254 del (L747—T751del). В 5 случаях выявлена миссенс-мутация Leu858Arg в 21-м экзоне. Для 9 случаев НМРЛ получено по два препарата ДНК из разных участков опухоли. При анализе на микрочипах результаты с разными препаратами ДНК от одного больного совпали. Мутации у

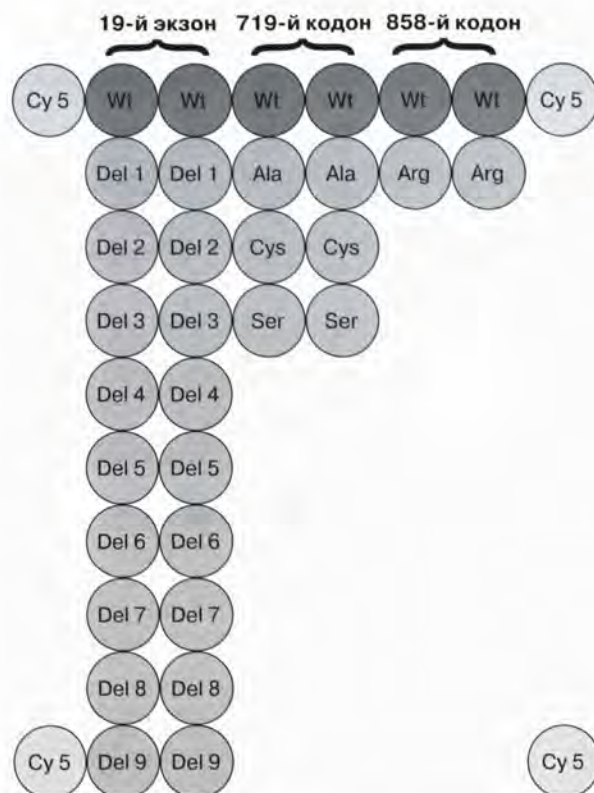


Рисунок 1. Схема расположения олигонуклеотидных проб на биочипе. Олигонуклеотиды, расположенные в верхнем ряду, соответствуют последовательностям «дикого» типа. В двух первых столбцах нанесены олигонуклеотиды, соответствующие наиболее часто встречающимся делециям в 19-м экзоне: Del 1 (2235—2249del (E746—A750del)), Del 2 (2236—2250del (E746—A750del)), Del 3 (2237—2251del (E746—T751 del insA)), Del 4 (2237—2252del insT (E746—T751del insV)), Del 5 (2237—2255del insT (E746—S752del insV)), Del 6 (2239—2248del insC (L747—A750del insP)), Del 7 (2239—2251del insC (L747—T751del insP)), Del 8 (2240—2254del (L747—T751del)), Del 9 (2240—2257del (L747—P753del insS)). В третьем и четвертом столбцах нанесены олигонуклеотиды, соответствующие мутациям Gly719Ala, Gly719Cys и Gly719Ser, в двух последних — мутации Leu858Arg гена *EGFR*. В угловых позициях нанесены ячейки, содержащие флуоресцентный краситель Cy5 и permanently светящиеся, для ориентировки и контроля интенсивности свечения.

пациентов с плоскоклеточным раком легких не обнаружены.

Необходимо отметить, что для 23 случаев аденокарциномы легкого, исследованных на биочипах, проведен параллельный анализ мутаций секвенированием в препаратах ДНК, полученных из парафиновых срезов. Несмотря на то что ДНК получали разными методами и из разных участков опухоли, результаты совпали в 95,6% случаев. Только в одном случае мутация Leu858Arg была обнаружена с помощью биочипа в препаратах ДНК из свежей ткани и парафинового среза, но не выявилась при секвенировании ДНК из среза. Этот спорный случай был проверен с помощью ПЦР в реальном времени: мутация была выявлена в новом препарате ДНК от этой больной.

В результате генотипирования образцов ДНК, выделенных из парафиновых срезов, мутации в гене *EGFR*



Рисунок 2. Гибридизационные картины, полученные при анализе образцов НМРЛ с различным генотипом. Образцы А, Б, Г выделены из свежемороженых биопсий, образец В — из биопсии, фиксированной в парафиновом блоке.

А. Образец ДНК, не содержащий исследуемых мутаций (Wt). **Б.** Образец ДНК, содержащий мутацию 2235—2249del (E746—A750del) в 19-м экзоне. **В.** Образец ДНК, содержащий мутацию Gly719Ala. **Г.** Образец ДНК, содержащий мутацию Leu858Arg.

обнаружены только у пациентов с аденокарциномой, в 13 (32%) случаях из 41. В 7 аденокарциномах выявлена миссенс-мутация Leu858Arg в 21-м экзоне. У 5 больных обнаружены делеции в 19-м экзоне, преимущественно E746-A750del. Причем в одном образце присутствовала делеция E746-A750, одновременно выявленная при гибридизации

на биочипе двумя пробами: 2235—2249 del и 2236—2250 del. Кроме того, в одном образце обнаружена делеция 2240—2257del (L747—P753del insS). У одного пациента обнаружена редкая мутация Gly719Ala в 18-м экзоне.

При анализе мутаций секвенированием в тех же препаратах ДНК из парафиновых срезов мутации вы-

явлены в аденокарциномах у 16 (38%) пациентов из 41. Таким образом, результаты генотипирования двумя различными методами совпали в 43 (93,5%) случаях из 46. В 3 случаях мутации в гене *EGFR* выявлены секвенированием, но не обнаружены с помощью биочипов. В 2 случаях это были делеции в 19-м экзоне (E746—T751del и E746—K754del), которые не могут быть выявлены с помощью гибридизации на биочипе, т. к. олигонуклеотиды, комплементарные им, на биочипе не присутствуют. В одном образце только секвенированием обнаружена замена Leu858Arg. Стоит отметить, что в 2 случаях секвенирования ДНК со срезов мутации в 21-м экзоне вызывали сомнение, но подтвердились при анализе этой же ДНК на биочипах.

Очевидно, что различия по частоте мутаций в аденокарциномах в 1-й (15%) и во 2-й (38%) группах обусловлены составом пациентов: 1-я группа представляла собой рандомизированную выборку больных, прооперированных в ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН в 2007—2010 гг., тогда как во 2-ю группу вошли больные НМРЛ,

которые получали ранее химиотерапию и которым анализ мутаций был необходим при назначении таргетной терапии.

Суммируя результаты генотипирования, заключаем, что всего у пациентов с аденокарциномой легкого мутации в гене *EGFR* были обнаружены в 23 случаях (21%) из 109. Точечные замены Leu858Arg и делеции в 19-м экзоне встречались с равной частотой — в 11 случаях (48%) из 23, мутация Gly719Ala присутствовала только в одном (4%) образце. Наиболее частой была делеция 2235—2249 del (E746—A750del). В одном образце присутствовала делеция E746—A750, одновременно выявленная на биочипе двумя пробами 2235—2249 del и 2236—2250 del. В одном случае обнаружена делеция 2240—2254 del (L747—T751del) и еще в одном — 2240—2257del (L747—P753del insS).

Анализ мутационного статуса гена *EGFR* у пациентов с аденокарциномой в зависимости от пола показал, что мутации чаще встречаются у женщин — 15 (34%) из 44 (у мужчин — 8 (12%) из 65) ($p = 0,0085$). В опухолевых об-

Таблица 2

Результаты генотипирования образцов НМРЛ методом гибридизации на биологическом микрочипе^a

Гистологический тип НМРЛ	Образцы НМРЛ свежемороженые ткани (n = 81)		Образцы НМРЛ парафиновые срезы (n = 46)		Образцы НМРЛ (n = 123) ^b
	мутации <i>EGFR</i>	число случаев	мутации <i>EGFR</i>	число случаев	Мутации, всего
Плоскоклеточный рак (n = 14)	0	0/9 (0)	0	0/5 (0)	0/14 (0)
Аденокарцинома (n = 109, 113 образцов ДНК) ^b	11	11/72 (15)	13	13/41 (32)	23/109 (21)
	Делеции в 19-м экзоне	6/11 (55)	Делеции в 19-м экзоне	5/13 (38)	11/23 (48)
	2235—2249 del (E746—A750del)	5	2235—2249 del (E746—A750del)	4 ^c	9 ^c
	2240—2254 del (L747—T751del)	2		—	1
	—	—	2236—2250 del (E746—A750del)	1 ^c	1 ^c
	—	—	2240—2257 del (L747—P753del insS)	1	1
	Leu858Arg в 21-м экзоне	5/11 (45)	Leu858Arg в 21-м экзоне	7/13 (54)	11/23 (48)
	—	—	Gly719Ala в 18-м экзоне	1/13 (8)	1/23 (4)

^aВ скобках указаны проценты.

^bВсего исследовано 127 образцов ДНК от 123 больных, для 4 аденокарцином исследована ДНК свежемороженой опухоли и из среза. При этом в одной аденокарциноме мутация Leu858Arg выявлена в обоих препаратах ДНК.

^cВ одном образце присутствовала делеция E746—A750, одновременно выявленная при гибридизации на биочипе двумя пробами: 2235—2249 del и 2236—2250 del.

разцах 14 пациентов с диагнозом плоскоклеточный рак легкого мутации не обнаружены.

Таким образом, при анализе на биочипах мутаций гена *EGFR* в опухолевой ДНК 123 больных НМРЛ получены результаты, подтверждающие данные литературы: мутации выявлены в 21% случаев аденокарцином легкого, при этом чаще у женщин.

ОБСУЖДЕНИЕ

Данное исследование посвящено разработке высокочувствительного метода скрининга образцов опухолевой ДНК на наличие соматических мутаций гена *EGFR*.

В настоящее время в крупных клиниках России при назначении противоопухолевой терапии уже используется определение мутационного статуса гена *EGFR* [24; 25]. Существует широкий спектр молекулярно-генетических методов, позволяющих выявлять мутантные последовательности в присутствии большого количества последовательностей «дикого» типа. Однако наибольшее распространение в клинической диагностике получили секвенирование, иногда сопряженное с предварительным обогащением ПЦР-продукта мутантной последовательностью, и аллель-специфичная ПЦР в реальном времени. Эти методы обладают высокой достоверностью, но достаточно трудоемки, так как обуславливают необходимость постановки отдельной реакции для каждой анализируемой мутации. Секвенирование без предварительного обогащения мутантной последовательностью обладает еще и низкой аналитической чувствительностью, позволяя определять не менее 10% мутантной ДНК на фоне ДНК «дикого» типа.

Разработанный нами метод генотипирования мутаций в гене *EGFR* с использованием LNA-блокирующей ПЦР и гибридизации на биологическом гидрогелевом микрочипе не имеет перечисленных выше недостатков. Мультиплексная ПЦР проходит в одной пробирке, при этом биочип позволяет одновременно выявлять 13 различных мутаций в гене *EGFR*. Для анализа с помощью биочипов используется недорогое детектирующее устройство — портативный анализатор биочипов (ООО «Биочип-ИМБ», Россия). Разработанный метод обладает высокой аналитической чувствительностью, позволяя выявлять мутации при низком содержании в образце мутантной ДНК. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что разработанная методика анализа мутаций не уступает по достоверности секвенированию препаратов ДНК, полученных из парафиновых срезов при обогащении их опухолевыми клетками с помощью микродиссекции. Последний метод широко используется в ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН. Стоит также отметить, что при анализе с помощью биочипа с одинаковой эффективностью может быть использована ДНК, выделенная как из свежемороженой ткани, так и из ткани, фиксированной в парафиновых блоках.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Новая диагностическая тест-система на основе гидрогелевых биочипов для одновременного определения 13 вариантов мутаций в 3 экзонах гена *EGFR* позволяет проводить анализ быстро и с высокой достоверностью. Поскольку в настоящее время при назначении ряда про-

тивоопухолевых препаратов онкологам необходимо проведение молекулярно-генетического анализа гена *EGFR*, разработанный биочип может быть рекомендован для широкого использования в целях клинической диагностики в системе практического здравоохранения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы Минобрнауки (ГК № 16.512.11.2238) и гранта РФФИ 11-04-12097.

ЛИТЕРАТУРА

1. Erlotinib in non-small cell lung cancer treatment: current status and future development / Gridelli C., Bareschino M. A., Schettino C., Rossi A., Maione P., Ciardiello F. // *Oncologist*. — 2007. — Vol. 12, N 7. — P. 840—849.
2. Ciardiello F., Tortora G. EGFR Antagonists in Cancer Treatment // *N. Engl. J. Med.* — 2008. — Vol. 358. — P. 1160—1174.
3. Clinicopathologic Significance of the Mutations of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer / Tomizawa Y., Iijima H., Sunaga N., Sato K., Takise A., Otani Y., Tanaka S., Suga T., Saito R., Ishizuka T., Dobashi K., Minna J. D., Nakajima T., Mori M. // *Clin. Cancer Res.* — 2005. — Vol. 11. — P. 6816—6822.
4. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy / Paez J. G., Janne P. A., Lee J. C., Tracy S., Greulich H., Gabriel S., Herman P., Kaye F. J., Lindeman N., Boggon T. J., Naoki K., Sasaki H., Fujii Y., Eck M. J., Sellers W. R., Johnson B. E., Meyerson M. // *Science*. — 2004. — Vol. 304. — P. 1497—1500.
5. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib / Lynch T. J., Bell D. W., Sordella R., Gurubhagavatula S., Okimoto R. A., Brannigan B. W., Harris P. L., Haserlat S. M., Supko J. G., Haluska F. G., Louis D. N., Christiani D. C., Settleman J., Haber D. A. // *N. Engl. J. Med.* — 2004. — Vol. 350. — P. 2129—2139.
6. Pao W., Miller V., Zakowski M. F. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from «never smokers» and correlate with sensitivity of tumors to gefitinib (Iressa) and erlotinib (Tarceva) // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2004. — Vol. 101. — P. 13 306—13 311.
7. Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways / Sordella R., Bell D. W., Haber D. A., Settleman J. // *Science*. — 2004. — Vol. 305. — P. 1163—1167.
8. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene predict prolonged survival after gefitinib treatment in patients with non-small-cell lung cancer with postoperative recurrence / Mitsudomi T., Kosaka T., Endoh H., Horio Y., Hida T., Mori S., Hatooka S., Shinoda M., Takahashi T., Yatabe Y. // *J. Clin. Oncol.* — 2005. — Vol. 23. — P. 2513—2520.
9. Epidermal growth factor receptor gene mutations and increased copy numbers predict gefitinib sensitivity in patients with recurrent non-small-cell lung cancer / Takano T., Ohe Y., Sakamoto H., Tsuta K., Matsuno Y., Tateishi U., Yamamoto S., Nokihiro H., Yamamoto N., Sekine I., Kunitoh H., Shibata T., Sakiyama T., Yoshida T., Tamura T. // *J. Clin. Oncol.* — 2005. — Vol. 23. — P. 6829—6837.
10. Prospective phase II study of gefitinib for chemotherapy-naïve patients with advanced non-small-cell lung cancer with epidermal growth factor receptor gene mutations / Inoue A., Suzuki T., Fukuhara T., Maemondo M., Kimura Y., Morikawa N., Watanabe H., Saijo Y., Nukiwa T. // *J. Clin. Oncol.* — 2006. — Vol. 24. — P. 3340—3346.
11. Clinical course of patients with non-small cell lung cancer and epidermal growth factor receptor exon 19 and exon 21 mutations treated with gefitinib or erlotinib / Riely G. J., Pao W., Pham D., Rizvi N., Venkatraman E. S., Zakowski M. F., Kris M. G., Ladanyi M., Miller V. A. // *Clin. Cancer Res.* — 2006. — Vol. 12. — P. 839—844.
12. Exon 19 deletion mutations of epidermal growth factor receptor are associated with prolonged survival in non-small cell lung cancer patients treated with gefitinib or erlotinib / Jackman D. M., Yeap B. Y., Sequist L. V., Lindeman N., Holmes A. J., Joshi V. A., Bell D. W., Huberman M. S., Halmos B., Rabin M. S., Haber D. A., Lynch T. J., Meyerson M., Johnson B. E., Janne P. A. // *Clin. Cancer Res.* — 2006. — Vol. 12. — P. 3908—3914.
13. Detection of tumor cells in blood using CD45 magnetic cell separation followed by nested mutant allele-specific amplification of p53 and K-ras genes in patients with colorectal cancer / Iinuma H., Okinaka K.,

Adachi M., Suda K., Sekine T., Sakagawa K., Baba Y., Tamura J., Kumagai H., Ida A. // *Int. J. Cancer*. — 2000. — Vol. 89. — P. 337—344.

14. A simple method of detecting K-ras point mutations in stool samples for colorectal cancer screening using one-step polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism analysis / Nishikawa T., Maemura K., Hirata I., Matsuse R., Morikawa H., Toshina K., Murano M., Hashimoto K., Nakagawa Y., Saitoh O., Uchida K., Katsu K. // *Clin. Chim. Acta*. — 2002. — Vol. 318. — P. 107—112.

15. Milbury C. A., Li J., Makrigiorgos G. M. PCR-based methods for the enrichment of minority alleles and mutations // *Clin. Chem*. — 2009. — Vol. 55. — P. 632—640.

16. Detection of tumor mutations in the presence of excess amounts of normal DNA / Sun X., Hung K., Wu L., Sidransky D., Guo B. // *Nat. Biotechnol.* — 2002. — Vol. 20. — P. 186—189.

17. LNA clamped PCR: A specific method for detection of Ki-ras gene mutations in patients with sporadic colorectal carcinomas / Beranek M., Jandik P., Sacha M., Rajman M., Sakra L., Stumr F., Soudkova E., Zivny P., Havlicek K. // *Klin Biochem. Metab.* — 2006. — Vol. 14. — P. 217—220.

18. LNA (locked nucleic acids): synthesis and high-affinity nucleic acid recognition / Sanjay K., Singh S. K., Nielsen P., Koshkin A. A., Wengel J. // *Chem. Commun.* — 1998. — Vol. 4. — P. 455—456.

19. Гагарин И. М. Молекулярные маркеры эффективности ингибиторов EGFR при немелкоклеточном раке легкого и колоректальном раке: Автореф. дис... канд. мед. наук. — М., 2011. — 34 с.

20. Ke S-H., Madison E.L. Rapid and efficient site-directed mutagenesis by single-tube «megaprimer» PCR method // *Nucleic Acids Res.* — 1997. — Vol. 25, N 16. — P. 3371—3372.

21. Detection of rare mutant K-ras DNA in a single-tube reaction using peptide nucleic acid as both PCR clamp and sensor probe / Luo J.-D., Chan E.-C., Shih C.-L., Chen T.-L., Ying Liang Y., Hwang T.-L., Chiou C.-C. // *Nucleic Acids Res.* — 2006. — Vol. 34, N 2. — P. 12.

22. Hydrogel drop microchips with immobilized DNA: properties and methods for large-scale production / Rubina A. Y., Pan'kov S. V., Dementieva E. I., Pen'kov D. N., Butygin A. V., Vasiliskov V. A., Chudinov A. V., Mikheikin A. L., Mikhailovich V. M., Mirzabekov A. D. // *Anal. Biochem.* — 2004. — Vol. 325. — P. 92—106.

23. Создание биочипа для анализа полиморфизма в генах системы биотрансформации / Глотов А. С., Наседкина Т. В., Иващенко Т. Э., Юрасов Р. А., Суржиков С. А., Паньков С. В., Чудинов А. В., Баранов В. С., Заседателев А. С. // *Мол. биол.* — 2005. — № 39. — С. 403—412.

24. Применение Ирессы (гефитиниба) в качестве терапии первой линии для лечения неоперабельных аденокарцином легкого, содержащих мутацию в гене EGFR / Моисеенко В. М., Проценко С. А., Семенов И. И., Моисеенко Ф. В., Левченко Е. В., Мацко Д. Е., Иванцов А. О., Иевлева А. Г., Митюшкина Н. В., Того А. В., Имянитов Е. Н. // *Современ. онкол.* — 2010. — Т. 12, № 1. — С. 60—66.

25. Эффективность ингибиторов рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) у больных распространенным немелкоклеточным раком легкого / Коломейцева А. А., Гагарин И. М., Мочальникова В. В., Мазуренко Н. Н., Горбунова В. А. // *Вестн. РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН*. — 2011. — Т. 22, № 1. — С. 42—49.

Поступила 21.09.2012

*Marina Alexandrovna Emelyanova¹, Natalia Nikolayevna Mazurenko²,
Ilya Mikhailovich Gagarin³, Irina Victorovna Tsyganova⁴,
Irina Borisovna Zborovskaya⁵, Ksenia Anatolievna Arkhipova⁶,
Valeria Vasilievna Mochalnikova⁷, Lyudmila Nikolayevna Lyubchenko⁸,
Tatiana Vasilievna Nasedkina⁹*

EGFR MUTATION DETECTION USING BIOLOGICAL MICROCHIPS IN NON-SMALL CELL LUNG CANCER

¹ MD, Junior Researcher, Biological Microchip Laboratory, V. A. Engelgardt Molecular Biology Institute, RAS (32, ul. Vavilova, Moscow, RF, 119991)

² MSc, PhD, DSc, Professor, Head, Oncogenomics Laboratory, Carcinogenesis Research Institute, N. N. Blokhin RCRC, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

³ MD, PhD, Laboratory Researcher, Oncogenomics Laboratory, Carcinogenesis Research Institute, N. N. Blokhin RCRC, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

⁴ MSc, PhD, Researcher, Oncogenomics Laboratory, Carcinogenesis Research Institute, N. N. Blokhin RCRC, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

⁵ MSc, PhD, Head, Cellular and Viral Oncogene Regulation Laboratory, Carcinogenesis Research Institute, N. N. Blokhin RCRC, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

⁶ MSc, PhD, Researcher, Cellular and Viral Oncogene Regulation Laboratory, Carcinogenesis Research Institute, N. N. Blokhin RCRC, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

⁷ MD, Pathologist, Pathological Anatomy Department, Clinical Oncology Research Institute, N. N. Blokhin RCRC, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

⁸ MD, PhD, DSc, Head, Clinical Oncogenetics Laboratory, Clinical Oncology Research Institute, N. N. Blokhin RCRC, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

⁹ MSc, PhD, DSc, Senior Researcher, Biological Microchip Laboratory, V. A. Engelgardt Molecular Biology Institute, RAS (32, ul. Vavilova, Moscow, RF, 119991)

Address for correspondence: Mazurenko Natalia Nikolayevna, Oncogenomics Laboratory, Carcinogenesis Research Institute, N. N. Blokhin RCRC, RAMS, 24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478; e-mail: nnmazurenko@mail.ru

EGFR somatic mutations predict sensitivity to targeted therapy with tyrosine kinase inhibitors, gefitinib (Iressa) and erlotinib in patients with non-small cell lung cancer. We have developed a method able to detect 13 most common EGFR mutations including 9 deletions in exon 19 and point mutations in exons 21 (Leu858Arg) and 18 (Gly719Cys, Gly719Ala, Gly719Ser). Wild-type sequence amplification was inhibited using LNA oligonucleotides during polymerase chain reaction to increase test sensitivity and to detect minor tumor cell fractions in clinical specimens. Product of the LNA blocking polymerase chain reaction was hybridized with oligonucleotide probes immobilized in gel on biochip surface. The biochip was tested on 127 DNA samples from patients with non-small cell lung cancer, mainly adenocarcinoma. Sequencing of polymerase chain reaction products was used as reference. The developed biochip test can reliably detect EGFR mutations irrespective of DNA sampling procedure even in small fractions of mutation-carrying cells.

Key words: somatic mutations, lung cancer, EGFR, biochip, diagnosis.