



Белобокова В.Д.✉, Кальченко К.О., Керезь М.А., Михалевская Т.М., Киселев Л.П.
Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии
и иммунологии, Минск, Беларусь

Молекулярное разнообразие рабдомиосаркомы. Применение метода высокопроизводительного секвенирования

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования – В.Д. Белобокова, К.О. Кальченко, Т.М. Михалевская, Л.П. Киселев; сбор материала – В.Д. Белобокова, К.О. Кальченко, Т.М. Михалевская; обработка материала и выполнение лабораторного исследования – В.Д. Белобокова, Т.М. Михалевская; обработка данных – В.Д. Белобокова, К.О. Кальченко, М.А. Керезь; написание текста – В.Д. Белобокова, М.А. Керезь, Л.П. Киселев; редактирование – В.Д. Белобокова, Л.П. Киселев.

Подана: 11.09.2023

Принята: 26.10.2023

Контакты: Vika04091995@gmail.com, kse-kalchenko@yandex.ru, kerez-z@mail.ru, aisiat@tut.by, leonslight@mail.ru

Резюме

Поиск новых подходов для индивидуализации терапии пациентов детского возраста с рабдомиосаркомами является актуальным направлением современных научно-практических исследований. Молекулярно-генетические особенности опухоли могут быть эффективно использованы для более точного прогнозирования клинического исхода заболевания, генетически направленной терапии, а также посттерапевтического мониторинга качества ремиссии. Не вызывает сомнений, что в основе успешного лечения и контроля агрессивности клинического течения болезни лежит детальное изучение и глубокое понимание механизмов регуляции опухолевой прогрессии, что определяет актуальность этого направления исследований. В настоящей работе представляются результаты проведенного высокопроизводительного секвенирования для образцов опухолевой ткани 21 пациента с установленным диагнозом РМС (66,6% эмбрионального подтипа РМС и 33,4% альвеолярного подтипа РМС). В ходе анализа полученных данных было обнаружено 85 мутаций (однонуклеотидных замен, инсерций, делеций) в 170 различных генах. Наиболее часто мутации были обнаружены в генах EGFR (12/85; 14,1%), NRAS (8/85; 9,4%), BRCA (7/85; 8,2%), MYC (6/85; 7%), CHEK (6/85; 7%) и NF1 (5/85; 5,8%), MYCN (4/85; 4,7%). Находкой данного исследования является обнаружение новой транслокации – NSD1/FGFR4, которая на момент анализа актуальных литературных данных не описана при РМС, но является патогенной драйверной молекулярной поломкой и имеет онкогенный потенциал у генов-партнеров при другой онкопатологии.

Ключевые слова: высокопроизводительное секвенирование, рабдомиосаркома, мутации, транслокация, амплификация



Belobokova V., Kalchenko K., Kerez M., Mihaleuskaya T., Kisialeu L.
Republican Scientific and Practical Center for Pediatric Oncology, Hematology
and Immunology, Minsk, Belarus

Molecular Diversity of Rhabdomyosarcoma. Application of the Next Generation Sequencing Method

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: research concept and design – Belobokova V., Kalchenko K., Mihaleuskaya T., Kisialeu L.; collection of material – Belobokova V., Kalchenko K., Mihaleuskaya T.; material processing and laboratory research – Belobokova V., Mihaleuskaya T.; data processing – Belobokova V., Kalchenko K., Kerez M.; text writing – Belobokova V., Kerez M., Kisialeu L.; editing – Belobokova V., Kisialeu L.

Submitted: 11.09.2023

Accepted: 26.10.2023

Contacts: Vika04091995@gmail.com, kse-kalchenko@yandex.ru, kerez-z@mail.ru, aisiat@tut.by, leonslight@mail.ru

Abstract

The search for new approaches to the individualization of therapy for children with rhabdomyosarcoma is an actual direction of modern scientific and practical research. Molecular and genetic features of the tumor can be effectively used for more accurate prediction of the clinical outcome of the disease, genetically directed therapy, as well as post-therapeutic monitoring of the quality of remission. There is no doubt that the basis of successful treatment and control of the aggressiveness of the clinical course of the disease lies in a detailed study and deep understanding of the mechanisms of tumor progression regulation, which determines the relevance of this direction of research. This paper presents the results of high-throughput sequencing of tumor tissue samples from 21 patients with an established diagnosis of RMS (66.6% embryonic subtype RMS and 33.4% alveolar subtype RMS). During the analysis of the obtained data, 85 mutations (single nucleotide substitutions, insertions, deletions) were found in 170 different genes. The most frequent mutations were detected in the genes EGFR (12/85; 14.1%), NRAS (8/85; 9.4%), BRCA (7/85; 8.2%), MYC (6/85; 7 %), CHEK (6/85; 7%), and NF1 (5/85; 5.8%), MYCN (4/85; 4.7%). The finding of this study is the discovery of a new translocation – NSD1/FGFR4, which at the time of analysis of current literature data has not been described in RMS, but is a pathogenic driving molecular breakdown and has oncogenic potential in partner genes in the second oncology.

Keywords: high-throughput sequencing, rhabdomyosarcoma, mutations, translocation, amplification

■ ВВЕДЕНИЕ

Рабдомиосаркома (РМС) – наиболее часто встречающееся злокачественное новообразование мягких тканей у детей. Использование протокольного комплексного лечения, включающего хирургический этап, лучевую терапию, системную полихимиотерапию, а также сопроводительное лечение, обусловило увеличение

долгосрочных показателей выживаемости при данной патологии на сегодняшний день, однако результаты терапии для рецидивирующих и изначально распространенных (метастатических) форм заболевания в большинстве случаев являются фатальными. Классические варианты прогностической стратификации пациентов на основании известных клинических маркеров (пол, возраст, размер новообразования и др.) осуществляются относительно давно, но имеют ограниченное значение. Данный факт свидетельствует о необходимости поиска новых подходов в лечении исследуемой патологии, основанных на современных возможностях понимания молекулярно-биологических механизмов функционирования и развития опухоли, а также ее микроокружения. Оценка активности генов, контролирующих ключевые пути жизнедеятельности и распространения новообразования, может предоставить дополнительную информацию о биологическом поведении РМС, что обеспечит преимущество в выборе максимально адекватной терапии уже в первой линии лечения, а также будет способствовать установлению мишеней для целевого воздействия лекарственных средств.

Эмбриональный и альвеолярный подтипы РМС являются основными подтипами РМС и значительно отличаются по клиническим и молекулярным характеристикам, отражающим различия в биологических механизмах [1, 2]. Для ЭРМС характерны потеря гетерозиготности (LOH) в локусе 11p15 гена IGF-II [3] и наличие дополнительной хромосомы 8 [1–3]. Эмбриональный подтип РМС имеет более высокую частоту спонтанных мутаций в отличие от других подтипов данного новообразования. Также высока частота соматических мутаций в генах семейства RAS (NRAS, KRAS, HRAS и NF1), которые наблюдаются примерно в одной трети случаев РМС. Известно и о других генах, мутации в которых связаны с патогенезом ЭРМС: FGFR4, PIK3CA, CTNNB1, FBXW7 и BCOR. На долю этих мутаций приходится около 10% случаев всех РМС. Для альвеолярного подтипа РМС (примерно от 70 до 80% случаев) характерны перестройки в гене FOXO1: t (1; 13) (PAX3-FOXO1) или t (2; 13) (PAX7-FOXO1) [4, 5]. Также встречаются более редкие транслокации – PAX3-NCOA1 и PAX3-INO80D [6]. Транслокации с участием гена PAX3 встречаются приблизительно в 60% случаев АРМС. Транслокации с участием гена PAX7 встречаются реже – в 20% АРМС [7].

В случае установления новых мутаций в генах, ассоциированных с РМС, появляется возможность контроля проводимого лечения посредством раннего выявления рецидивов на молекулярном уровне. Однако для 40–50% пациентов с РМС не выявлено рекуррентных мутаций, что подразумевает необходимость дальнейшего исследования в данном направлении. Разработка и внедрение метода высокопроизводительного секвенирования направлены на расширение перечня генов, мутации которых участвуют в патогенезе РМС и могут иметь клиническое значение. Высокопроизводительное секвенирование следующего поколения рассматривается в качестве перспективного подхода как для подбора таргетной терапии, так и для прогнозирования степени агрессивности биологического поведения опухоли.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование был включен 21 пациент детского возраста с РМС (66,6% эмбрионального подтипа и 33,4% альвеолярного подтипа), проходивший лечение в Центре детской онкологии, гематологии и иммунологии. Распределение по стадиям: 10 пациентов со 2-й стадией заболевания, 6 пациентов с 3-й стадией и 5 пациентов



с 4-й стадией. 11 пациентов имели метастазы в костном мозге, легких и костях. В качестве исследуемого материала выступала опухолевая ткань пациентов.

Из полученных образцов ДНК и РНК опухолевой ткани пациентов были приготовлены библиотеки с применением наборов реагентов TruSight™ Tumor 170 (Illumina, США) согласно протоколу производителя. Пробоподготовка образцов для высокопроизводительного секвенирования генов, ассоциированных с опухолями мягких тканей (170 генов), включала фрагментирование ДНК, синтез кДНК, фланкирование целевых регионов, лигирование технических последовательностей, гибридизацию зондов, амплификацию фрагментов библиотеки и нормализацию библиотеки. На следующем этапе образцы эквимоларно пулировались.

С целью достижения хорошего покрытия (более 500 прочтений на 1 нуклеотид) оптимальным количеством на 1 запуск прибора является 8 образцов. Денатурация и разведение библиотеки осуществлялись согласно протоколу Illumina: Denature and Dilute Libraries Guide for NextSeq System. Высокопроизводительное секвенирование проводили на приборе NextSeq 500 с использованием реагентов NextSeq Reagent Kit V3 (Illumina, США).

В панель вошли 170 генов, которые условно делятся на 3 группы:

- однонуклеотидные замены, короткие инсерции и делеции – 153 гена;
- амплификация (увеличение количества копий гена) – 152 гена;
- перестройки генов – 55 генов.

В большинстве случаев экзоны указанных генов кодируют важные функциональные домены, изменение аминокислотной последовательности или потеря которых приводят к нарушению функций белка или его аномальной активности. В зависимости от выполняемых функций белки, кодируемые представленными в панели генами, можно разделить на следующие группы:

- белки сигнальной трансдукции (ALK, BRAF, CSF1R, CTNNB1, EGFR, FBXW7, GNAS, KRAS, NRAS, NTRK2, NTRK3, PDGFRA, PIK3CA, SMO и т. д.);
- транскрипционные факторы (CEBPA, CREBBP, MYC, MYCN, PAX3, PAX7, TERT и т. д.);
- белки эпигенетической регуляции ДНК (DNMT3A, TET2 и т. д.);
- опухолевые супрессоры (APC, NF1, PTCH1, PTEN, TP53 и т. д.);
- белки регуляции клеточного цикла (ABL1, CDK6 и т. д.).

В ходе анализа данных высокопроизводительного секвенирования были выполнены поиск и аннотация однонуклеотидных вариантов, коротких инсерций/делеций и перестроек в геноме опухолей. Обработка полученных данных производилась с помощью автоматизированного софта от Illumina: BaseSpace. Для оценки патогенности и консервативности выявляемых генетических вариантов использовали данные, которые извлекали из следующих баз данных: COSMIC, Clinvar, OMIM. Информация о частоте мутаций получена на основе данных GnomAD.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Однонуклеотидные замены, короткие инсерции и делеции

В результате проведения высокопроизводительного секвенирования было идентифицировано 85 мутаций в 170 различных генах. Среди них 19 генов мутировали более чем в 1 случае (рис. 1). Наиболее частыми были мутации в генах EGFR (12/85), NRAS (8/85), BRCA (7/85), MYC (6/85), CHEK (6/85) и NF1 (5/85), MYCN (4/85). 12 вариантов мутаций в выборке пациентов отмечаются как патогенетически значимые.

Наиболее распространенной группой мутаций при РМС являются мутации генов сигнальной трансдукции. К данному подклассу функциональных молекул относятся протеинкиназы (CTNNB1, EGFR, FBXW7 и др.); белки, участвующие в RAS-RAF-MAPK-сигнальном каскаде; белки, участвующие в PI3K-Akt-mTOR-сигнальном каскаде, регуляторные компоненты сигнальной трансдукции (субъединица G-белка GNAS). Мутационные изменения в генах, ответственных за процессы сигнальной трансдукции, составили 49,4% (42/85) от всех обнаруженных мутаций.

Важным механизмом злокачественной трансформации клеток является нарушение эпигенетической регуляции экспрессии генов посредством нескольких ключевых процессов, таких как метилирование ДНК (DNMT3A, TET2 и др.) и модификация гистонов (KMT2A и др.). Мутационные изменения в генах, ответственных за процессы эпигенетической регуляции, составили 12,9% (11/85) от всех обнаруженных мутаций.

Мутации транскрипционных факторов (CEBPA, MYC, MYCN и др.) при РМС детектировались в 14,1% (12/85) случаев и приводят к нарушению дифференцировки клеток. Патогенез около 16,4% всех РМС связан с мутациями в генах опухолевых супрессоров (TP53, CHEK2 и др.). Мутации в генах элементов когезинового комплекса (RAD21, SMC3 и др.) детектировались в 7% РМС.

Большая часть верифицированных мутаций представляла собой однонуклеотидные замены (63/85) (рис. 2). В большинстве случаев замены были представлены транзицией С>Т. На долю небольших инсерций и делеций приходится 11 и 10% соответственно. С функциональной точки зрения наиболее распространенными были миссенс-мутации. В 3 случаях мутации локализовались в интронах и были представлены однонуклеотидными заменами в сайтах сплайсинга.

Таким образом, генные мутации, выявляемые методом высокопроизводительного секвенирования, могут быть использованы в качестве дополнительных факторов прогноза, а также в качестве молекулярных маркеров для определения динамики МОБ на различных этапах терапии для пациентов, не имеющих рекуррентных генетических аномалий.

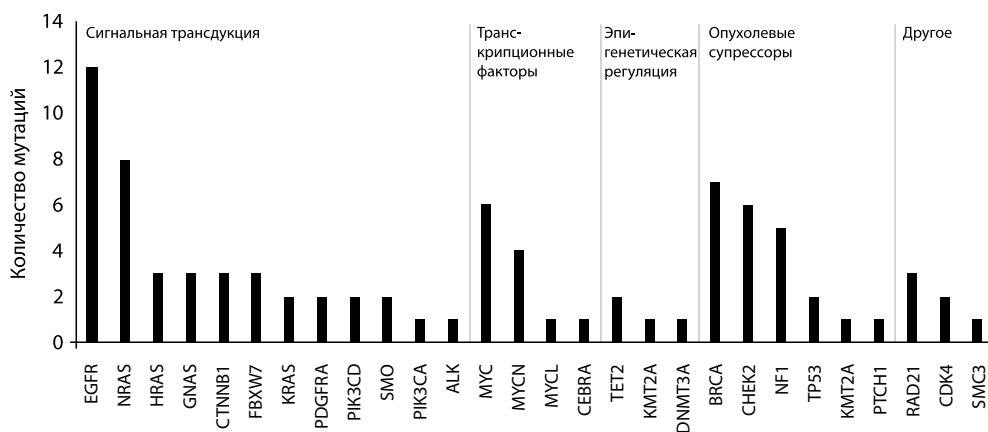


Рис. 1. Относительная частота встречаемости мутантных форм генов, ассоциированных с рабдомиосаркомой

Fig. 1. Relative frequency of mutant forms of genes associated with rhabdomyosarcoma

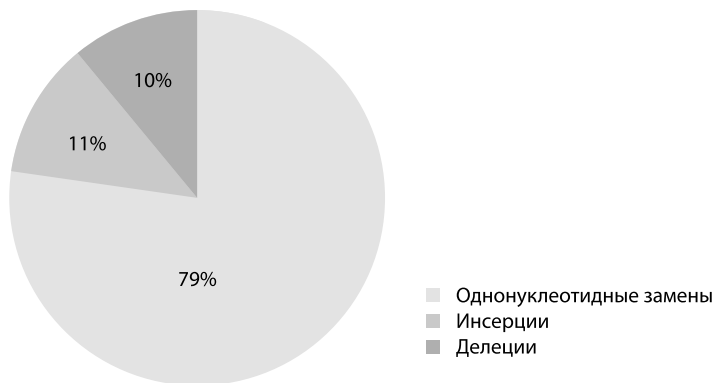


Рис. 2. Типы генных мутаций
Fig. 2. Types of gene mutations

Перестройки генов

Необходимым стандартом для верификации диагноза альвеолярной рабдомиосаркомы является обнаружение транслокации PAX3-FOXO1 или PAX7-FOXO1. Выявление одного из указанных вариантов транскрипта является определяющим доказательством альвеолярного варианта рабдомиосаркомы, который характеризуется неблагоприятным прогнозом и подразумевает необходимость использования более интенсивных программ терапии [8]. В случае отсутствия транслокации PAX3-FOXO1 или PAX7-FOXO1 (FOXO1-negative варианты) для пациентов (около 20% случаев) рекомендовано использование стандартных, не интенсифицированных подходов

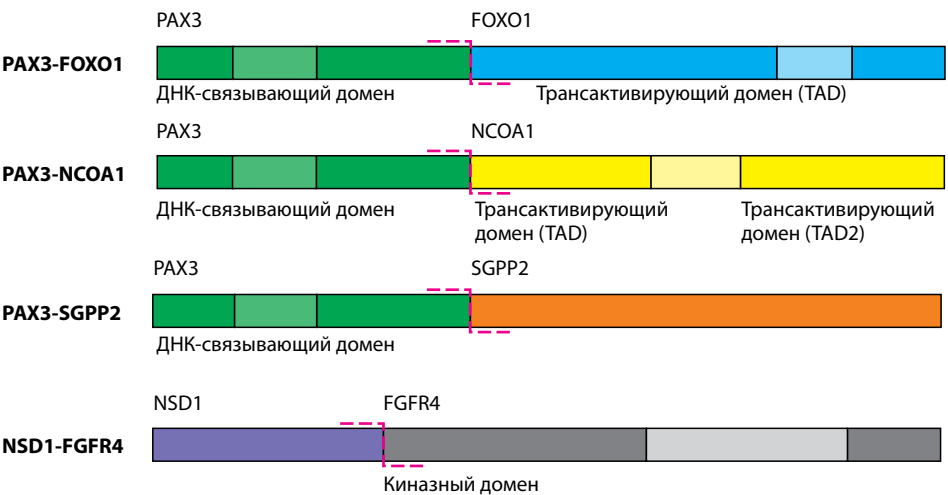


Рис. 3. Перестройки генов, ассоциированные с рабдомиосаркомой
Fig. 3. Gene rearrangements associated with rhabdomyosarcoma

в лечении, разработанных для эмбриональной РМС [8, 9]. Таким образом, молекулярно-генетические особенности РМС оказывают непосредственное влияние на выбор стратегии терапии. Обнаружение новых редких транслокаций может принести клиническое преимущество посредством прогнозирования клинических исходов в первую очередь для пациентов с FOXO1-негативными вариантами альвеолярной РМС.

В ходе выполнения исследования были обнаружены следующие транслокации, ассоциированные с РМС (рис. 3).

Перестройка генов PAX3-FOXO1 была найдена у 2 пациентов (2/21) с альвеолярным подтипом РМС, а перестройка генов PAX3-NCOA1 (1/21) и PAX3-SGPP2 (1/21) – у пациентов с эмбриональным подтипом РМС. Обнаружение транслокации NSD1/FGFR4 у пациента с альвеолярным подтипом (FOXO1-негативным) РМС является оригинальной находкой данного исследования. Литературные данные свидетельствуют о наличии онкогенного потенциала у генов-партнеров и позволяют предположить, что NSD1-FGFR4 [10] является патогенной драйверной молекулярной поломкой.

Амплификация генов

Амплификация генов – один из механизмов активации онкогенов в процессе развития опухоли. Увеличение количества копий и сверхэкспрессия генов при рабдомиосаркоме у детей описаны в ряде небольших исследований. Известно, что нарушение регуляции гена MYCN является характерной особенностью рабдомиосаркомы и определяет группу пациентов с плохим прогнозом, а также является потенциальной мишенью для новых методов лечения [11]. По результатам нашего исследования максимальное количество повышения амплификации приходилось на ген транскрипционного фактора MYCN (рис. 4).

Согласно литературным данным известно, что избыточная экспрессия гена MYCN ассоциирована с неблагоприятным прогнозом и зачастую увеличение копий данного гена приходится на альвеолярный подтип РМС. В ходе нашего исследования повышенная амплификация гена MYCN отмечалась у 3 пациентов (3/21), причем

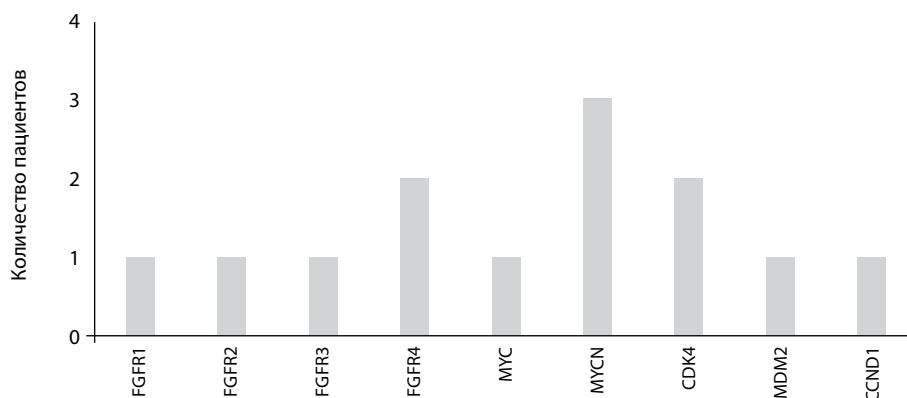


Рис. 4. Относительная частота повышенной экспрессии генов, ассоциированных с РМС
Fig. 4. Relative frequency of increased expression of genes associated with PMC



у двоих из них был альвеолярный подтип и присутствовала транслокация PAX3-FOXO1 [11, 12]. Повышенная амплификация в генах MYC, MDM2, CCND1 встречалась в единичных случаях для пациентов эмбрионального подтипа PMC [11]. В 2 случаях отмечалась повышенная амплификация гена CDK4 из семейства протеинкиназ, который имеет ключевое значение в развитии клеточного цикла. Увеличение копий данного гена отмечалось в 1 случае эмбрионального подтипа и 1 случае альвеолярного подтипа PMC. Как известно, одной из характерных особенностей альвеолярной рабдомиосаркомы является повышенный уровень экспрессии гена FGFR4 – мембранного белка, рецептора из семейства факторов роста фибробластов изучаемого гена. В нашем исследовании повышенная амплификация данного гена отмечалась у 2 пациентов с альвеолярным подтипом PMC.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате выполнения высокопроизводительного секвенирования у 21 пациента детского возраста с PMC было идентифицировано 85 мутаций в 170 различных генах. Среди них 19 генов мутировали более чем в 1 случае. Наиболее часто мутации были обнаружены в генах EGFR (12/85; 14,1%), NRAS (8/85; 9,4%), BRCA (7/85; 8,2%), MYC (6/85; 7%), CHEK (6/85; 7%) и NF1 (5/85; 5,8%), MYCN (4/85; 4,7%). 12 вариантов мутаций в выборке пациентов отмечаются как патогенетически значимые.

Обнаружение стандартной перестройки генов PAX3-FOXO1 отмечается для 2 пациентов (2/21) с альвеолярным подтипом PMC, перестройка генов PAX3-NCOA1 (1/21) и PAX3-SGPP2 (1/21) отмечается у пациентов с эмбриональным подтипом PMC. Обнаружение транслокации NSD1/FGFR4 у пациента с альвеолярным подтипом (FOXO1-негативным) PMC является оригинальной находкой данного исследования. Актуальные литературные данные свидетельствуют о наличии онкогенного потенциала у генов-партнеров при других нозологических формах и позволяют предположить, что NSD1-FGFR4 окажется патогенной драйверной молекулярной поломкой также при PMC.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Barr F.G., Smith L.M., Lynch J.C., et al. Examination of gene fusion status in archival samples of alveolar rhabdomyosarcoma entered on the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study-III trial: a report from the Children's Oncology Group. *Journal of Molecular Diagnostics*. 2006;8(2):202–208.
2. Kashi V., Hatley M., Galindo R. Probing for a deeper understanding of rhabdomyosarcoma: insights from complementary model systems. *Nature Reviews Cancer*. 2015;15(7):426–439.
3. Parham D., Barr F. Classification of rhabdomyosarcoma and its molecular basis. *Advances in Anatomic Pathology*. 2013;20(6):387–397.
4. Qualman S., Lynch J., Bridge J., et al. Prevalence and clinical impact of anaplasia in childhood rhabdomyosarcoma: a report from the Soft Tissue Sarcoma Committee of the Children's Oncology Group. *Cancer*. 2008;113(11):3242–3247.
5. Arnold M.A., Anderson J.R., Gastier-Foster J.M., et al. Histology, Fusion Status, and Outcome in Alveolar Rhabdomyosarcoma with Low-Risk Clinical Features: A Report from the Children's Oncology Group. *Pediatric Blood and Cancer*. 2016;63(4):634–639.
6. Shern J.F., Chen L., Chmielecki J., et al. Comprehensive genomic analysis of rhabdomyosarcoma reveals a landscape of alterations affecting a common genetic axis in fusion-positive and fusion-negative tumors. *Cancer Discovery*. 2014;4(2):216–231.
7. Parham D.M., Qualman S.J., Teot L., et al. Correlation between histology and PAX/FKHR fusion status in alveolar rhabdomyosarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *American Journal of Surgical Pathology*. 2007;31(6):895–901.
8. Chen X., Stewart E., Shelat A., et al. Targeting Oxidative Stress in Embryonal Rhabdomyosarcoma. *Cancer Cell*. 2013;24(6):710–724.
9. Zhao Q. et al. Transcriptome-guided characterization of genomic rearrangements in a breast cancer cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106:1886–1891.
10. Baujat G., Rio M., Rossignol S., Sanlaville D., et al. Paradoxical NSD1 Mutations in Beckwith-Wiedemann Syndrome and 11p15 Anomalies in Sotos Syndrome. *American Journal of Human Genetics*. 2004;74(4):715–720.
11. Jinglan L., Guzman M.A., Pezanowski D., et al. FOXO1-FGFR1 fusion and amplification in a solid variant of alveolar rhabdomyosarcoma. *Modern Pathology*. 2011;24:1327–1335.
12. Toffoltti L., Frascella E., Ninfo V., et al. MYCN expression in human rhabdomyosarcoma cell lines and tumour samples. *The Journal of Pathology*. 2002;199(4):450–458.