

УДК 577.2:616–006

АНАЛИЗ МУТАЦИОННОЙ НАГРУЗКИ ПРИ КАРОТИДНЫХ ПАРААНГЛИОМАХ

**А.В. Снежкина¹, Е.Н. Лукьянова¹, М.С. Федорова¹, А.Ф. Садритдинова¹, Е.А. Пудова¹,
Д.В. Калинин^{1,2}, А.Л. Головюк^{1,2}, В.С. Павлов¹, Г.С. Краснов¹, А.В. Кудрявцева¹**

¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

² Национальный медицинский исследовательский центр хирургии им. А.В. Вишневского Минздрава России, Москва, Россия

Каротидные параанглиомы (КПА) относятся к наиболее часто встречающимся параанглиомам головы и шеи (60 %). Эти опухоли имеют нейроэндокринное происхождение, высоко васкуляризованы и образуются из каротидного параанглия, располагающегося в области бифуркации сонной артерии. Согласно современной классификации Всемирной Организации Здравоохранения КПА относят к опухолям с вариабельным потенциалом метастазирования (El-Naggar et al., 2017), что объясняется способностью к малигнизации и агрессивному течению (Tan et al., 1996; Kumari et al., 2017). До 30–40 % параанглиом ассоциированы с наличием герминальных мутаций в одном или нескольких онко-ассоциированных генах.

Большинство наследственных случаев КПП связаны с мутациями в генах *SDHx*, кодирующих субъединицы сукцинатдегидрогеназы (митохондриальный комплекс II) (Bayley et al., 2010; Hensen & Bayley, 2011; Hensen et al., 2011). В этих генах также обнаружены и соматические мутации (Zhikrivetskaya et al., 2017). Несмотря на имеющиеся данные, молекулярно-генетические особенности КПП остаются не до конца изученными. Кроме случаев заболевания, ассоциированных с мутациями в генах *SDHx*, часто встречаются опухоли с неясной генетической картиной. При этом любые КПП склонны к метастазированию, биомаркеры агрессивных форм не найдены.

Нами проведено исследование мутационной нагрузки при КПП. Следует отметить, что в силу редкости данного заболевания, собрать репрезентативную выборку для проведения молекулярно-генетических исследований представляет большую сложность. Благодаря сотрудничеству с Институтом хирургии им. А.В. Вишневского, в котором наблюдаются и лечатся пациенты с КПП, нами сформирована уникальная и единственная в России коллекция каротидных параганглиом, которая состоит из архивных образцов опухолей. Однако для этих образцов недоступны парные нормальные ткани, полученные от тех же пациентов. Поэтому при генетическом исследовании этих образцов необходимо проводить корректировку алгоритма анализа данных.

В работе использовались 52 образца каротидных параганглиом – опухолевые ткани, заключенные в парафиновые блоки (FFPE). Выделение ДНК из образцов проводили с использованием High Pure FFPE DNA Isolation Kit (Roche, Швейцария). Далее осуществляли подготовку экзомных библиотек с помощью набора Nextera Rapid Capture Exome Kit фирмы Illumina (США). Высокопроизводительное секвенирование проводили в режиме парных прочтений (76 + 76) на приборе NextSeq 500 System (Illumina) на базе ЦКП «Геном» ИМБ РАН (http://www.eimb.ru/rus/ckp/ccu_genome_c.php). Покрывание для каждого образца составляло не менее 300х. Данные секвенирования доступны в ресурсе NCBI Sequence Read Archive (BioProject PRJNA411769).

Биоинформатический анализ результатов секвенирования выполнен в среде R. С помощью программ FASTQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) и Trimmomatic (Bolger et al., 2014) проведена оценка качества полученных прочтений и их очистка. Удалены последовательности адаптеров и нуклеотиды с качеством ниже Q20. Далее с помощью программного пакета BWA проведено картирование чтений на референсный геном человека GRCh37/hg19 (Li & Durbin, 2010). С помощью набора утилит SAMtools проведен анализ выравниваний (Li et al., 2009; Li, 2011). Идентификация мутаций выполнена с использованием программы freebayes (Garrison & Marth, 2012), фильтрация вариантов – с помощью vcfilter пакета vcflib (<https://github.com/vcflib/vcflib#vcflib>). Аннотацию мутаций проводили с использованием SnpSift пакета snpEff (Cingolani et al., 2012). В качестве информационных ресурсов использовали следующие базы данных: dbSNP, dbNSFP, ClinVar, MutationTaster, SIFT, PolyPhen-2, LRT, FATHMM, PhastCons, PhyloP, 1000 Genomes Project, ExAC, COSMIC, GO, ConsensusPathDB и OMIM. Мутационную нагрузку рассчитывали, как число соматических потенциально «вредных» мутаций на мегабазу (Mb) кодирующих областей генов. Для удаления потенциальных герминальных вариантов исключали все мутации, встречающиеся в базах данных 1000 Genomes Project и ExAC (наиболее строгий параметр). Кроме того, из анализа исключали все мутации, которые встречались в экзоме нормальных тканей лимфатических узлов и крови, полученных от больных КПП (данные секвенирования экзема отдельно взятых больных с КПП 2016–2018 гг., для которых доступны образцы нормальных тканей).

Число потенциальных соматических мутаций после фильтрации по базам данных 1000 Genomes Project и ExAC оказывается явно завышенным. Дальнейшая фильтрация герминальных вариантов с помощью данных экзема нормальных тканей больных КПП улучшает результат – среднее значение мутационной нагрузки составило 6–8 вариантов на мегабазу кодирующих областей генов (от 2/Mb до 10,5/Mb). Кроме того, экзом нормальных тканей лимфатических узлов также подготавливали из FFPE образцов. Это позволило учесть варианты, связанные с нарушением целостности ДНК в процессе обработки формалином и исключить из анализа исследуемой выборки КПП. Однако такой подход все же не позволяет исключить все герминальные варианты. Этот подход исключает 96–98 % или более герминальных вариантов, но оставшиеся 2–3 % мутаций могут превосходить по количеству соматические. Для более точного расчета необходимы парные образцы нормальных тканей, полученные от тех же больных КПП.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 17–75–20105).

ЛИТЕРАТУРА

- El-Naggar A.K., Chan J.K.C., Grandis J.R., Takata T., Slootweg P.J. (2017) Classification of Head and Neck Tumours. Fourth edition. World Health Organization. 9, 348.
- Tan K.L., Mah P.K., Rajasoorya C., Sim C.S., Chia F.K. (1996) Paraganglioma with pulmonary metastases: a case report. *ANNALS Academy of Medicine Singapore*. 25(4), 592–595.
- Kumari K., Jain D., Kumar R., Mohan A., Kumar R. (2017) Metastatic carotid body paraganglioma of lungs and lymph nodes: Unsuspected diagnosis on EBUS-TBNA. *Diagnostic Cytopathology*. 45(4), 327–332.
- Bayley J.P., Kunst H.P., Cascon A., Sampietro M.L., Gaal J., Korpershoek E., Hinojar-Gutierrez A., Timmers H.J., Hoefsloot L.H., Hermesen M.A., Suarez C., Hussain A.K., Vriends A.H., Hes F.J., Jansen J.C., Tops C.M., Corssmit E.P., de Krijger R.R., Robledo M. (2010) SDHAF2 mutations in familial and sporadic paraganglioma and pheochromocytoma. *Lancet Oncology*. 11, 366–372.
- Hensen E.F., Bayley J.P. (2011) Recent advances in the genetics of SDH-related paraganglioma and pheochromocytoma. *Familial Cancer*. 10, 355–363.
- Hensen E.F., Siemers M.D., Jansen J.C., Corssmit E.P., Romijn J.A., Tops C.M., van der Mey A.G., Devilee P., Cornelisse C.J., Bayley J.P., Vriends A.H. (2011) Mutations in SDHD are the major determinants of the clinical characteristics of Dutch head and neck paraganglioma patients. *Clinical Endocrinology*. 75, 650–655.
- Zhikrivetskaya S.O., Snezhkina A.V., Zaretsky A.R., Alekseev B.Y., Pokrovsky A.V., Golovyuk A.L., Melnikova N.V., Stepanov O.A., Kalinin D.V., Moskalev A.A., Krasnov G.S., Dmitriev A.A., Kudryavtseva A.V. (2017) Molecular markers of paragangliomas/pheochromocytomas. *Oncotarget*. 8, 25756–25782.
- Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 30, 2114–2120.
- Li H., Durbin R. (2010) Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 26, 589–595.
- Li H., Handsaker B., Wysoker A., Fennell T., Ruan J., Homer N., Marth G., Abecasis G., Durbin R., Genome Project Data Processing S. (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 25, 2078–2079.
- Li H. (2011) A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics*. 27, 2987–2993.
- Garrison E., Marth G. (2012) Haplotype-based variant detection from short-read sequencing. *arXiv*. 1207.3907 [q-bio. GN].
- Cingolani P., Platts A., Wang le L., Coon M., Nguyen T., Wang L., Land S.J., Lu X., Ruden D.M. (2012) A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)*. 6, 80–92.