

# Определение мутаций генов *FGFR3* и *PIK3CA* в ДНК из осадка мочи у больных раком мочевого пузыря

Detection of *FGFR3* and *PIK3CA* mutations in DNA isolated from urine sediment of bladder cancer patients

*D.S. Mikhaylenko,  
D.V. Perepechin, G.D. Efremov,  
A.V. Sivkov, O.I. Apolikhin*

More than 13 thousand cases of bladder cancer are registered in Russia annually that represents an actual problem in modern urologic oncology. Searching and characterization of new molecular markers of non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC – 80% of bladder cancer cases), identified in tumor cells from urine sediment are needed. We have provided complex analysis of mutations in the key oncogenes of NMIBC using PCR and subsequent sequencing of exons 7 and 10 of the gene *FGFR3*, exons 9 and 20 of the gene *PIK3CA*. NMIBC cohort includes 22 samples of DNA from urine sediments; control group consists 24 patients with cystitis and urolithiasis. Missense-mutations was detected in 32% NMIBC samples but not in controls. According databases ClinVar, COSMIC and HGMD most of them have been identified as pathogenic DNA-changes during carcinogenesis. Perhaps the panel with aforementioned genes and *TERT* promoter as addition locus with using allele-specific PCR or other method for the preferential amplification of mutant alleles could form the basis for the development a system of markers in non-invasive molecular genetic diagnostics of NMIBC.

*Д.С. Михайленко, Д.В. Перепечин, Г.Д. Ефремов, А.В. Сивков, О.И. Аполихин*

*НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России*

Ежегодно в России регистрируют более 13 тыс. случаев рака мочевого пузыря (РМП), представляющего собой актуальную проблему современной онкоурологии [1]. В настоящее время для неинвазивной лабораторной диагностики РМП применяют рутинный цитологический анализ мочи, чувствительность которого составляет 25-50% при диагностике небольших высокодифференцированных опухолей. FISH-анализ осадка мочи (зонды на хромосомы 3, 7, 17 и 9p21), иммуноферментный анализ на UBC-антиген (цитokerатины 8 и 18), ВТА-тест или определение NMP22 с чувствительностью и специфичностью, близкими к 80-90%, имеют ограниченное применение в клинике [2]. Остается актуальной проблема поиска и характеристики новых молекулярных маркеров РМП, выявляемых в опухолевых клетках из осадка мочи и обладающих высокой диагностической точностью.

В основе развития РМП лежат разнообразные молекулярно-генетические нарушения в соматических клетках: точковые мутации, протяженные делеции (потеря гетерозиготности) в областях локализации генов-супрессоров, амплификация онкогенов, aberrантное метилирование ДНК, изменения паттерна экспрессии регуляторных РНК и большого количества структурных генов [3]. Из всего перечисленного выше, точковые мутации

обладают наибольшей потенциальной ценностью как диагностические маркеры, поскольку они являются частым событием канцерогенеза, могут быть выявлены в опухолевых клетках из осадка мочи (в том числе, при рецидиве заболевания) и представляют собой изменение ДНК, выявляемое рутинными молекулярно-генетическими методами [4, 5].

Около 90% случаев РМП представлены уротелиальной карциномой, у 80% пациентов наблюдают поверхностные и у 20% – мышечно-инвазивные опухоли. За различиями в морфологической классификации, стадировании и прогнозе РМП стоят разные паттерны мутаций. Например, для инвазивного рака характерны множественные делеции районов локализации генов-супрессоров (3p, 5q, 14q, 9q и др.), самой частой из которых является делеция 9p21 с генами-супрессорами *ARF*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, и он развивается через стадию дисплазии. Напротив, характерными чертами поверхностных опухолей являются активирующие мутации и гиперэкспрессия протоонкогенов (*FGFR3*, *ERBB2*, *HRAS*, и др.), поверхностный РМП (ПРМП) развивается через стадию гиперплазии, часто бывает мультифокальным и рецидивирующим [6, 7].

В настоящее время идентифицированы сотни мутаций в протоонкогенах, задействованных в канцерогенезе наиболее частой формы РМП – ПРМП. Среди них можно

выделить точковые мутации, которые встречаются с частотой более 10% в первичных опухолях и локализованы в «горячих точках» мутагенеза. Это активирующие миссенс-мутации в 7 и 10 экзонах гена рецептора фактора роста фибробластов 3 (*FGFR3*), 9 и 20 экзонах гена фосфоти-дилинозитолкиназы (*PIK3CA*).

Ген *FGFR3* локализован в области 4p16.3, содержит 19 экзонов, из которых в образовании полноразмерного транскрипта участвуют экзоны 2-18 [8]. По различным данным, от 50 до 80% первичного уротелиального рака при ПРМП несут мутации *FGFR3*, тогда как в инвазивных опухолях и их метастазах эта частота составляет не более 10% [7, 9]. Ген *FGFR3* принадлежит к семейству генов трансмембранных рецепторов *FGFR1-4*, которые кодируют гликопротеины – рецепторы фактора роста фибробластов (FGF). Рецептор состоит из трех иммуноглобулин-подобных (Ig) доменов, обращенных в цитоплазму и связывающихся с сильным митогеном *FGF1/2*, трансмембранного домена и внутриклеточного тирозинкиназного домена, взаимодействующего со вторичными мессенджерами. После связывания с лигандом рецептор димеризуется и активирует тирозинкиназный домен. *FGFR3* задействован в *PIK3CA/AKT1* сигнальном пути. Почти все описанные миссенс-мутации находятся между Ig-подобными доменами или в трансмембранном домене, способствуя прочной димеризации и конститутивной активации *FGFR3* по механизму образования дисульфидных мостиков или иных прочных взаимодействий. Локализация большинства точковых мутаций *FGFR3* при ПРМП – экзон 7 (кодоны 248 и 249) и экзон 10 (кодоны 373 и 375) [7, 10-12].

Миссенс-мутации *PIK3CA* встречаются в 15-25% случаев ПРМП и значительно реже – при инвазивном РМП. Они локализируются, в основном, в спиральном домене (542 и 545 кодоны) и киназном домене

(1047 кодон). Зачастую мутации сопряжены с потерей гетерозиготности (аллельными делециями) гена *PTEN*, продукт которого ингибирует сигнальный путь *PIK3CA/AKT*. Хотя мутации в указанных доменах обладают сходным трансформирующим эффектом в клеточных линиях, отношение частоты мутаций в киназном и спиральном доменах варьирует в зависимости от типа опухоли: от 0,29 в РМП до 2 в раке эндометрия, что указывает на возможные различия в механизмах активации сигнального пути *PIK3CA/AKT* [13].

Целью настоящей работы является комплексный анализ мутаций в 7-ом и 10-ом экзонах гена *FGFR3*, 9-ом и 20-ом экзонах гена *PIK3CA* в образцах геномной ДНК из осадка мочи у пациентов с ПРМП и контроля для разработки метода неинвазивной молекулярно-генетической диагностики ПРМП.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Выборки пациентов.** Исследовали 22 образца осадков мочи от больных ПРМП, группу контроля составили 24 пациента с циститом и мочекаменной болезнью.

**Пробоподготовка.** Собирали 10-30 мл первой порции мочи, центрифугировали при 3000 g в течение 15 мин, удаляли супернатант. Осадки замораживали при минус 70°C.

**Получение образцов ДНК.** Геномную ДНК из осадков мочи выделяли с помощью набора «ДНК-сорб В» (Интерлабсервис, Россия), при котором нуклеиновые кислоты сорбируются на носителе с последующей отмывкой спиртовыми растворами и элюцией в ТЕ-буфер.

**Полимеразная цепная реакция (ПЦР).** Проводили ПЦР участков гена *FGFR3* с праймерами 7F:5' – agtggcgggtggtgagggag – 3' и 7R:5' – tgtgctgactgtacaccttgag – 3' (экзон 7), 10F:5' – саассccatgtcttgcag – 3' и 10R:5' – aggcggcagagcgtcacag – 3' (экзон 10). Программа амплификации для экзона 7 – 95°C 1 мин 30 с, затем 35

циклов 95°C 40 с, 64°C 25 с, финальная элонгация 72°C 40 с; для экзона 10 – 95°C 1 мин 40 с, затем 35 циклов 95°C 40 с, 62°C 30 с, 72°C 20 с, финальная элонгация 72°C 1 мин. ПЦР участков гена *PIK3CA* проводили с праймерами 9F:5' – gggaataatgacaagaagc – 3' и 9R:5' – ctgagatcagccaaattcagtt – 3' (экзон 9), 20F:5' – ctcaatgatgcttgctctg – 3' и 20R:5' – tggaatccagagtgccttc – 3' (экзон 20) по программе, аналогичной амплификации экзона 10 гена *FGFR3*. Состав реакционной смеси ПЦР: 50-100 нг геномной ДНК, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,5 mM каждого dNTP, по 2 пмоль прямого и обратного праймеров, 1 ед. термостабильной Taq-полимеразы, 5 мкл буфера для ПЦР 5x (Интерлабсервис, Россия), объем смеси составлял 25 мкл.

**Секвенирование ПЦР-продуктов.** Предварительно обрабатывали ПЦР-смесь 1 е.а. щелочной фосфатазы и 4 е.а. экзонуклеазы I из *E.coli* для удаления непрореагировавших праймеров и dNTPs. Затем проводили секвенирование ПЦР-продукта по Сэнгеру с помощью набора «BigDye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit» на 24-х капиллярном секвенаторе 3500xl (Applied Biosystems, США) согласно рекомендациям фирмы-производителя.

**Статистический анализ результатов.** Определяли частоту мутаций в группе ПРМП и сравнивали ее с контролем с помощью двустороннего точного критерия Фишера, используя программу GraphPadInStat. Поиск данных о выявленных мутациях и их патогенетическом значении осуществляли в международных базах данных HGMD (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>), COSMIC (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) и ClinVar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведен комплексный анализ мутаций в ключевых онкогенах ПРМП, включающий ПЦР и

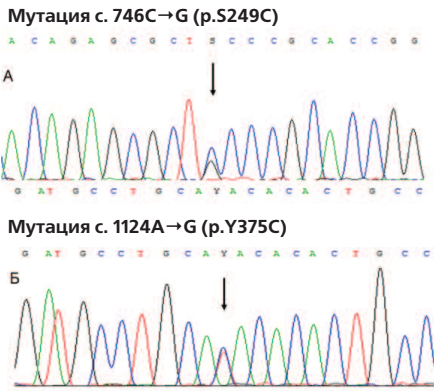


Рис. 1. Примеры секвенирования мутаций в гене *FGFR3*.

последующее секвенирование экзонов 7 и 10 гена *FGFR3*, экзонов 9 и 20 гена *PIK3CA* (рис. 1). Были исследованы образцы ДНК из осадка мочи 22 больных ПРМП и 24 пациентов контрольной группы с неонкологическими заболеваниями мочевого пузыря. Мутации были выявлены у 31,8% (n=7) пациентов с ПРМП, в контрольной группе мутации не обнаружены ( $p < 0,01$ ). Из 7 случаев ПРМП с мутациями, в 6 образцах они были локализованы в гене *FGFR3*: 2 мутации – в седьмом и 4 мутации – в десятом экзонах. Еще одна мутация p.H1047R была детектирована в 20 экзоне гена *PIK3CA* (табл. 1). Аллели, отличающиеся от референсных, были сопоставлены с базами данных клинических ассоциаций с изменениями генома (HGMD, COSMIC, ClinVar) с целью выяснения патогенетической роли выявленных мутаций. За исключением мутации p.H251G и p.F386L, оставшиеся 4 однонуклеотидные за-

мены были охарактеризованы как патогенные мутации в злокачественных опухолях. Наблюдаемое отношение частот мутаций *FGFR3* к *PIK3CA* как 85:15 при ПРМП, в целом, соответствует данным других авторов [7, 12, 13].

В уротелиальной карциноме чаще встречаются мутации в киназном домене (как и обнаруженная в образце ПРМП мутация p.H1047R), тогда как в опухолях других типов преобладают мутации в спиральном домене [14]. Одна из мутаций *FGFR3* (p.H251G) отсутствовала в базах данных клинических ассоциаций, однако в 251 кодоне были описаны другие онкогенные миссенс-мутации.

В настоящей работе показано, что определение мутаций *FGFR3* к *PIK3CA* в осадке мочи с помощью ПЦР и секвенирования по Сэнгеру может быть использовано для выявления ПРМП. Однако частота мутаций *FGFR3* в этой работе оказалась на 20-30% ниже, чем в исследованиях с применением методов целенаправленной амплификации и детекции мутантных аллелей. Вместе с тем, применение тест-систем для выявления мутаций *FGFR3* методом аллель-специфичной ПЦР в реальном времени или ПЦР с последующим минисеквенированием показало целесообразность использования соматических мутаций этого гена как маркеров РМП в первичной диагностике заболевания [12, 15, 16].

Определение специфичных для ПРМП мутаций актуально не только при диагностике первичного РМП, но и при мониторинге рецидива. После удаления первичного РМП необходимо регулярно проводить цистоскопию, т.к. в 70% случаев в последующие годы развивается рецидив заболевания. Проведение цистоскопии сопряжено со значительным дискомфортом для пациента, анализ соматических мутаций в осадке мочи мог бы использоваться, как дополнительный критерий отбора пациентов для проведения этой диагностической процедуры [5].

Увеличение чувствительности теста может быть достигнуто, в том числе, за счет включения в список исследуемых локусов активирующих мутаций -124G→A и -146G→A в промоторе гена теломеразы *TERT*, которые встречаются в 60% случаев ПРМП [18].

Проблему низкого содержания мутантных аллелей *FGFR3* на фоне избытка нормальной ДНК при мониторинге рецидива РМП пытались решить с помощью одной из платформ секвенирования следующего поколения, что позволило выявить мутации *FGFR3* при доле мутантных аллелей, равной 0,02%. Однако в этом случае возникает вопрос о клинической значимости мутаций. Во-первых, соматические мутации *FGFR3* могут возникнуть еще на стадии предраковых изменений до морфологически сформированной опухоли. Во-вторых, конкордантность результатов поиска мутаций в осадке мочи и первичной опухоли составляет не более 90% [18]. Отчасти различия в частоте мутаций могут также зависеть от стратификации выборки ПРМП по степени дифференцировки опухоли (в настоящей работе не было разделения по степени злокачественности вследствие малого объема выборки ПРМП).

По данным мета-анализов, активирующие мутации *FGFR3* при ПРМП ассоциированы с ранней стадией заболевания и высокодифференциро-

Таблица 1. Мутации *FGFR3* и *PIK3CA*, выявленные в настоящей работе

Ген	Экзон	Обозначение мутации на уровне кДНК	Обозначение мутации на уровне белка	Сведения в базе данных HGMD (при отсутствии – COSMIC)	Сведения в базе данных ClinVar
<i>FGFR3</i>	7	с.746C→G	p.S249C	CM950470, патогенная	rs121913483, патогенная
<i>FGFR3</i>	7	с.753C→G	p.H251G	нет в академической версии	rs377554120, нет данных
<i>FGFR3</i>	10	с.1124A→G	p.Y375C	HGMD и COSMIC	rs121913485, патогенная
<i>FGFR3</i>	10	с.1144G→C	p.G382R	CM960657, патогенная	rs28931614, патогенная
<i>FGFR3</i>	10	с.1156T→C*	p.F386L*	CM940785, патогенная	rs17881656, значение не установлено
<i>PIK3CA</i>	20	с.3140A→G	p.H1047R	HM040060, возможно патогенная нет в академической версии HGMD, COSM94986, патогенная	rs121913279, патогенная

Примечание: \* - мутация обнаружена в двух случаях ПРМП; базы данных: HGMD – Human genome mutation database, ClinVar – public archive of relationships among sequence variation and human phenotype в структуре NCBI (The National Center for Biotechnology Information, США), COSMIC – Catalogue of Somatic Mutations in Cancer.

ванной карциномой [11, 12]. Следует отметить, что при низкой частоте встречаемости мутаций *FGFR3* при мышечно-инвазивном РМП, гиперэкспрессия этого гена наблюдается в 40% этих опухолей, а в 5% уротелиального рака и некоторых клеточных линиях РМП при отсутствии точковых мутаций *FGFR3* выявлены химерные онкогены *FGFR3:TACC3* и *FGFR3:BAIAP2L1* [9, 19]. Это указывает на более значительную роль кон-

ститутивной активации *FGFR3* при РМП в целом, чем значение описанного ранее онкогенного потенциала точковых мутаций в нескольких экзонах при поверхностном раке.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, активирующие миссенс-мутации в «горячих точках» генов *FGFR3* и *PIK3CA* были определены в осадке мочи у пациентов с

ПРМП в 32% случаев с помощью ПЦР и последующего капиллярного секвенирования по Сэнгеру. При включении в панель исследуемых локусов промотора гена *TERT* и использовании аллель-специфичной ПЦР или иного метода для преимущественной амплификации мутантных аллелей на фоне избытка нормальной ДНК, возможна разработка системы маркеров для неинвазивной молекулярно-генетической диагностики ПРМП. ■

### Резюме:

Ежегодно в России регистрируют более 13 тыс. случаев рака мочевого пузыря, представляющего собой значительную проблему в современной онкоурологии. Остается актуальной проблема поиска новых молекулярных маркеров поверхностного рака мочевого пузыря (ПРМП, составляющего 80% случаев заболевания), выявляемых в опухолевых клетках из осадка мочи. В настоящей работе был проведен комплексный анализ мутаций в ключевых онкогенах ПРМП, включающий ПЦР и последующее секвенирование экзонов 7 и 10 гена *FGFR3*, экзонов 9 и 20 гена *PIK3CA*. Проанализированы 22 образца ДНК из осадков мочи от пациентов с ПРМП, группу контроля составили 24 пациента с циститом и мочекаменной болезнью. Миссенс-мутации были определены у пациентов с ПРМП в 32% случаев и отсутствовали в контрольной группе. Согласно базам данных ClinVar, COSMIC и HGMD большинство выявленных мутаций охарактеризованы как патогенные при развитии злокачественных опухолей. Возможно, при включении в панель промотора гена *TERT*, использовании аллель-специфичной ПЦР или иного метода для преимущественной амплификации мутантных аллелей будет разработана система маркеров для неинвазивной молекулярно-генетической диагностики ПРМП.

**Ключевые слова:** рак мочевого пузыря, гены *FGFR3* и *PIK3CA*, мутация.

**Key words:** bladder cancer, *FGFR3* and *PIK3CA* genes, mutation.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Злокачественные новообразования в России в 2012 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздрава России. 2014. 250 с.
2. Чиссов В.И., Алексеев Б.Я., Русаков И.Г. Онкоурология: национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2012; 688 с.
3. Mendelsohn J., Howley P.M., Israel M.A., Gray J.W., Thompson C.B. The Molecular Basis of Cancer. 4rd edition. Saunders, Philadelphia (USA), 2015.
4. Tan D., Lynch H.T. Principles of Molecular Diagnostics and Personalized Cancer Medicine. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (USA), 2013.
5. Zuiverloon T.C., Tjin S.S., Busstra M., Bangma C.H., Boeve E.R., Zwarthoff E.C. Optimization of nonmuscle invasive bladder cancer recurrence detection using a urine based *FGFR3* mutation assay. *J. Urol.* 2011; 186(2): 707-712.
6. Høglund M. The bladder cancer genome: chromosomal changes as prognostic markers, opportunities, and obstacles. *Urol. Oncol.* 2012; 30(4): 533-540.
7. Knowles M.A., Hurst C.D. Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nat. Rev. Cancer.* 2015; 15(1): 25-41.
8. Pandith A.A., Zhah Z.A., Siddiqi M.A. Oncogenic role of fibroblast growth factor receptor 3 in tumorigenesis of urinary bladder cancer. *Urol. Oncol.* 2013; 31(4): 398-406.
9. Guancial E.A., Werner L., Bellmunt J., Bamias A., Choueiri T.K., Ross R., Schutz E.A., Park R.S., O'Brien R.J., Hirsch M.S., Barletta J.A., Berman D.M., Lis R., Loda M., Stack E.C., Garraway L.A., Riester M., Michor F., Kantoff P.W., Rosenberg J.E. *FGFR3* expression in primary and metastatic urothelial carcinoma of the bladder. *Cancer Med.* 2014; 3(4): 835-844.
10. Dodurga Y., Tataroglu C., Kesen Z., Satiroglu-Tufan N.L. Incidence of fibroblast growth factor receptor 3 gene (*FGFR3*) A248C, S249C, G372C, and T375C mutations in bladder cancer. *Genet. Mol. Res.* 2011; 10(1): 86-95.
11. Liu X., Zhang W., Geng D., He J., Zhao Y., Yu L. Clinical significance of fibroblast growth factor receptor-3 mutations in bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *Genet. Mol. Res.* 2014; 13(1): 1109-1120.
12. Iyer G., Milowsky M.I. Fibroblast growth factor receptor-3 in urothelial tumorigenesis. *Urol. Oncol.* 2013; 31(3): 303-311.
13. Ross R.L., Askham J.M., Knowles M.A. *PIK3CA* mutation spectrum in urothelial carcinoma reflects cell context-dependent signaling and phenotypic outputs. *Oncogene.* 2013; 32: 768-776.
14. Millis S.Z., Bryant D., Basu G., Bender R., Vranic S., Gatalica Z., Vogelzang N.J. Molecular profiling of infiltrating urothelial carcinoma of bladder and nonbladder origin. *Clin. Genitourin. Cancer.* 2015; 13(1): e37-e49.
15. Silverberg D.M. Urothelial carcinoma of the upper urinary tract diagnosed via *FGFR3* mutation detection in urine: a case report. *BMC Urol.* 2012; 12: 20.
16. Kandimalla R., Masius R., Beukers W., Bangma C.H., Omtoft T.F., Dyrskjot L., van Leeuwen N., Lingsma H., van Tilborg A.A., Zwarthoff E.C. A 3-plex methylation assay combined with the *FGFR3* mutation assay sensitively detects recurrent bladder cancer in voided urine. *Clin. Cancer Res.* 2013; 19(17): 4760-4769.
17. Allory Y., Beukers W., Sagrera A., Flandez M., Marques M., Marquez M., van der Keur K.A., Dyrskjot L., Lurkin I., Vermeij M., Carrato A., Lloreta J., Lorente J.A., Carrillo-de Santa Pau E., Masius R.G., Kogevinas M., Steyerberg E.W., van Tilborg A.A., Abas C., Omtoft T.F., Zuiverloon T.C., Malats N., Zwarthoff E.C., Real F.X. Telomerase reverse transcriptase promoter mutations in bladder cancer: high frequency across stages, detection in urine, and lack of association with outcome. *Eur. Urol.* 2014; 65(2): 360-366.
18. Millholland J.M., Li S., Fernandez C.A., Shuber A.P. Detection of low frequency *FGFR3* mutations in the urine of bladder cancer patients using next-generation deep sequencing. *Res. Rep. Urol.* 2012; 4: 33-40.
19. Williams S.V., Hurst C.D., Knowles M.A. Oncogenic *FGFR3* gene fusions in bladder cancer. *Hum. Mol. Genet.* 2013; 22(4): 795-803.