



Разработка метода выявления соматических мутаций гена PIK3CA с помощью мультиплексной аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени и его валидация в опухолях больных раком молочной железы

Филипенко М.Л. • Шамовская Д.В. • Оськина Н.А. • Оскорбин И.П. • Храпов Е.А. • Овчинникова Л.К. • Герштейн Е.С. • Кушлинский Н.Е.

Филипенко Максим Леонидович – канд. биол. наук, заведующий лабораторией фармакогеномики¹, науч. сотр.²

✉ 630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8, Российская Федерация.
Тел.: +7 (913) 921 73 92.

E-mail: mlfilipenko@gmail.com

Шамовская Дарья Вадимовна – сотр.¹

Оськина Наталья Александровна – сотр.¹

Оскорбин Игорь Петрович – сотр.¹, аспирант²

Храпов Евгений Александрович – сотр.^{1,2}

Овчинникова Лариса Константиновна – канд. мед. наук, хирург-онколог, отделение опухолей молочных желез³

Герштейн Елена Сергеевна – д-р биол. наук, профессор, вед. науч. сотр. лаборатории клинической биохимии³

Кушлинский Николай Евгеньевич – д-р мед. наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией клинической биохимии³

Цель – разработать высокочувствительную систему для выявления соматических мутаций в кодонах 542 и 545 экзона 9 и в кодоне 1047 экзона 20 гена PIK3CA, составляющих более 80% всех соматических мутаций этого гена, с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени для работы с гистологическим материалом без проведения макро- и микродиссекции и произвести анализ ассоциаций этих мутаций с клиническими и морфологическими характеристиками опухолей молочной железы.

Материал и методы. Применен метод аллель-специфичной ПЦР с детекцией сигнала с помощью TaqMan зондов. Для определения его аналитической чувствительности стандартными генно-инженерными методами с использованием мутагена были сконструированы плазмиды, несущие исследуемые мутации, приготовлены образцы ДНК, несущие разный процент мутации относительно дикого типа (5,0; 2,0; 1,0; 0,5; 0,25%).

Результаты. Проведена разработка и оптимизация мультиплексной аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени для выявления наиболее распространенных соматических мутаций в гене PIK3CA: p.E542K c.1624G>A, p.E545K c.1633G>A, p.H1047R c.3140A>G,

p.H1047L c.3140A>T. Аналитическая чувствительность выявления мутаций составила 0,5% для p.E542K и 0,25% для p.E545K, p.H1047R и H1047L. Разработанный метод был использован для выявления указанных соматических мутаций в ДНК, выделенной из парафиновых блоков опухолей больных раком молочной железы. Показано, что частота встречаемости соматических мутаций гена PIK3CA увеличивается по мере прогрессии опухоли – 9,6% в опухолях I–II стадии против 21% в опухолях III–IV стадии (83 и 324 образца соответственно, p=0,022) в основном за счет увеличения встречаемости мутации p.H1047R c.3140A>G, локализованной в каталитическом домене фермента.

Заключение. Разработанный метод детекции соматических мутаций в гене PIK3CA является достаточно чувствительным, специфичным и производительным, что позволяет рекомендовать данную методику для потокового скрининга в клиничко-диагностической лаборатории с целью прогнозирования течения заболевания, мониторинга ответа опухоли на терапию и ее коррекции.

Ключевые слова: аллель-специфичная ПЦР в режиме реального времени (AC-ПЦР-PB), ген PIK3CA, мутации, рак молочной железы.

doi: 10.18786/2072-0505-2015-41-12-18

¹ ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук»; 630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8, Российская Федерация

² ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»; 630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2, Российская Федерация

³ ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; 115478, г. Москва, Каширское шоссе, 24, Российская Федерация



Соматические мутации в гене PIK3CA, кодирующем каталитическую субъединицу p110 α фосфатидил-инозитол 3'-киназы (PI3K), играют значительную роль в патогенезе и прогрессии опухолей и часто встречаются при раке молочной железы (8,3–40%), колоректальном раке (18,8–32%), раке эндометрия, мочевого пузыря, желудка, а также в большинстве других опухолей человека [1, 2, 3]. Несинонимичные однонуклеотидные замены составляют 98% соматических мутаций, найденных в этом гене. Из них наиболее часто – более 90% всех мутаций – встречаются p.E542K с.1624G>A, p.E545K с.1633G>A, p.H1047R с.3140A>G и p.H1047L с.3140A>T. Показано, что эти мутации повышают киназную активность PIK3, ведут к активации нижележащей киназы Akt и, таким образом, являются онкогенными [4, 5].

Аллель-специфичная полимеразная цепная реакция (АС-ПЦР) – один из наиболее широко используемых методов выявления соматических мутаций [6]. Поиск соматических мутаций с помощью АС-ПЦР в режиме реального времени (АС-ПЦР-РВ) занимает меньше времени, менее затратен и более чувствителен по сравнению с прямым секвенированием дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) по Сенгеру. Классический вариант АС-ПЦР предполагает использование двух аллель-специфичных праймеров, в которых 3'-концевой нуклеотид комплементарен полиморфному нуклеотиду, и третьего общего праймера. Метод основан на разной эффективности элонгации спаренного и неспаренного 3'-нуклеотида ДНК-полимеразой. В идеале (при полном ингибировании элонгации) это должно вести к отсутствию продукта амплификации в реакции с праймером к мутации на матрице ДНК дикого типа. Однако в реальности полного ингибирования не происходит, более того, для некоторых типов неспаренных оснований (например, G:T) разница в эффективности элонгации несущественна.

Значительному улучшению дискриминации продуктов с «мутантной» и «нормальной» ДНК и точности определения генотипов АС-ПЦР обязан двум его модификациям. Первая представляет собой введение дополнительных неспаренных нуклеотидных оснований на 3'-конце праймера (в -2, -3 или -4 позиции) для дальнейшей дестабилизации дуплекса с целью уменьшения эффективности элонгации ДНК-полимеразой (рис. 1). Вторым очень важным улучшением стал переход к полуколичественному ПЦР-анализу в режиме реального времени (АС-ПЦР-РВ), что позволило

отслеживать даже сравнительно небольшие изменения в эффективности амплификации мутантного аллеля, а также дало возможность мультиплексирования (анализа нескольких мутаций в одной реакционной смеси) при использовании для детекции TaqMan зондов, несущих разные флуоресцентные краски.

АС-ПЦР-РВ – система для выявления соматических мутаций в гене PIK3CA – описана R.E. Board и соавт. в 2008 г. [7]. Однако для мониторинга продуктов ПЦР в данном методе использованы более дорогостоящие по отношению к широко распространенным TaqMan зонды типа “scorpions”. Кроме того, для отдельных мутаций нам не удалось достигнуть приемлемой (< 1%) чувствительности при ее использовании.

Цель данной работы – разработка мультиплексной АС-ПЦР-РВ системы на основе применения модифицированных последовательностей олигонуклеотидных праймеров для более чувствительного выявления мутаций в гене PIK3CA, характеристика ее чувствительности и сравнение с классическим секвенированием методом Сенгера, а также анализ ассоциаций выявляемых мутаций с клиническими и морфологическими характеристиками опухолей молочной железы разных стадий.

Материал и методы

Получение стандартных плазмидных образцов, несущих частые мутации
Фрагменты ДНК, включающие область 542, 545 и 1047 кодонов, для конструирования стандартных образцов амплифицировали с помощью праймеров, приведенных в табл. 1, в следующих условиях: реакционная смесь ПЦР объемом 50 мкл содержала буфер для Taq-полимеразы (65 mM Tris-HCl; pH 8,9; 16 mM (NH₄)₂SO₄; 0,05% Tween 20; 3,5 mM MgCl₂), 0,2 mM дНТФ, 50 нг геномной ДНК, выделенной из парафиновых блоков опухолей молочной железы и валидированной секвенированием по Сенгеру, 1 е.а. Taq-полимеразы («Биосан», Россия). Амплификацию проводили в амплификаторе Терцик (ДНК-технология) согласно следующей программе: 3 мин при 95 °C начальной денатурации, далее 50 циклов: 10 с при 95 °C для денатурации, 10 с при 60 °C для гибридизации праймеров, 20 с при 72 °C для элонгации.

Продукты амплификации с праймерами 542-UC/545-RC (длиной 199 п.н.) и PIK47-clU/PIK47-clR (длиной 213 п.н.) гидролизовали эндонуклеазами рестрикции Hind III и EcoRI («Сибэнзим», Россия) и лигировали с вектором pBluescript II SK (+), гидролизованным теми же

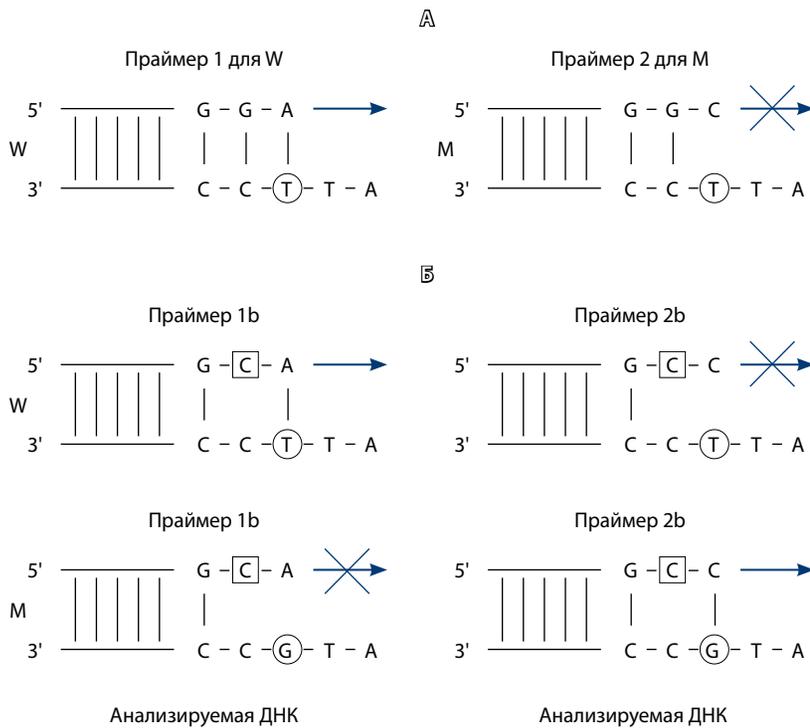


Рис. 1. Стандартный (А) и «улучшенный» (Б) дизайн олигонуклеотидных праймеров для АС-ПЦР

Таблица 1. Список олигонуклеотидных праймеров и флюоресцентно меченных зондов, использованных в работе

№	Название	Нуклеотидная последовательность
1	542-UC	5'-GCGAAGCTTGCTAGAGACAATGAATTAAGGGA-3'
2	545-RC	5'-GCAGAATTCAGCCAAATTCAGTTATTTTTTC-3'
3	PIK47-clU	5'-CTACAAGCTTTTGTATGACATTGCATAC-3'
4	PIK47-clR	5'-GTGTGGAATTCAGAGTGAGCTTTC-3'
5	IL17RA-U	5'-CTTGATGCTCTCGCTCTTCG-3'
6	IL17RA-R	5'-TGTAGCCCTGGTCAGACTG-3'
7	IL17RA-PCy5	5'-Cy5-CTGCCGCTGCTCTCTCG-BHQ2-3'
8	1047mutN2R	5'-TGTTGTCCAGCCACCATGTC-3'
9	545mutN2	5'-CCATAGAAAATCTTTCTCTGct-3'
10	542mutN2	5'-CTTTCTCTGCTCAGTGATTct-3'
11	UU-542	5'-GGAAAATGACAAAGAACAGCTCA-3'
12	PIC-1047L	5'-TTGTTGTCCAGCCACCATGGA-3'
13	Prob-PIC1	5'-FAM-CAATTTCTACACGAGATCCTCTCTC-BHQ1-3'
14	Prob-PIC3	5'-HEX-TCATGAAACAATGAATGATGCA-BHQ1

эндонуклеазами, в течение 8 часов со 100 ед. акт. Т4 ДНК-лигазы («Биосан», Россия). Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *Escherichia coli* штамма XL1-Blue (Stratagene). У плазмидных клонов, отобранных по результатам рестриционного анализа, для подтверждения структуры определяли нуклеотидную последовательность вставки секвенированием по методу Сенгера. Секвенирование выполнено на автоматическом секвенаторе ABI 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) с использованием набора Big dye 3.1 (Центр коллективного пользования «Геномика», ИХБФМ СО РАН). Рекombинантные плазмидные ДНК (p542-5W, p542M, p545m, p1047W, p1047m) выделяли из 50 мл ночной культуры в среде LB с помощью QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN) согласно инструкции фирмы-производителя.

Получение контрольных ДНК, содержащих разный процент мутантного аллеля

Концентрацию полученных стандартных плазмидных ДНК определяли спектрофотометрически и флюорометрически (набор Qubit™ BR, Invitrogen), а именно: 2 мкг ДНК подвергали гидролизу эндонуклеазой рестрикции EcoRI для линейаризации. Полученные линейные стандарты разводили до концентрации 10⁹ и далее до 10⁶ копий плазмидной ДНК на мл в стерильном буфере, содержащем 10 мМ Tris HCl pH 7,6 и ДНК фага лямбда 5 нг/мкл.

Анализ соматических мутаций гена PIK3CA методом мультиплексной АС-ПЦР-РВ

Для детекции соматических мутаций гена PIK3CA проводили мультиплексную АС-ПЦР-РВ. Смесь для ПЦР (объемом 20 мкл) содержала олигонуклеотидные праймеры (см. табл. 1) – 0,3 мкМ; флюоресцентно меченные зонды – 0,1 мкМ, 1x буфер для Таq-полимеразы (см. выше), 0,2 мМ dNTP, 1 е.а. Таq-полимеразы («Биосинтек», Россия) и 5–50 нг ДНК. Реакцию амплификации проводили в амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США) согласно следующей программе: 15 мин при 95 °С начальной денатурации для активации фермента, далее 6 циклов: 8 с при 95 °С для денатурации, 30 с при 60 °С для гибридизации праймеров, 10 с при 72 °С для элонгации; далее 39 циклов: 8 с при 95 °С, 30 с при 60 °С, съём флюоресцентного сигнала на каналах FAM/HEX/Cy5, 10 с при 72 °С. Для каждого образца анализ проводили в двух повторах. Для анализа вычисляли deltaCt по формуле: dCt = Ct-mutation - Ct-w, где Ct-mutation – Ct, полученное при амплификации тестируемой ДНК с аллель-специфичным праймером для мутации и общим праймером,

**Таблица 2.** Оптимизированные концентрации и сочетания олигонуклеотидных праймеров и флюоресцентно меченных зондов

Олигонуклеотидные праймеры	Флюоресцентно меченные зонды
AS-mix 1047R+545K	
PIC3-5U / 1047mutN2R (300 нМ)	Prob-PIC3 (100 нМ)
UU-542 / 545mutN2 (300 нМ)	Prob-PIC1 (100 нМ)
L17RA-U/IL17RA-R (300 нМ)	IL17RA-PCy5 (100 нМ)
AS-mix 1047L+542K	
UU-542 / 542mutN2 (300 нМ)	Prob-PIC3 (100 нМ)
PIC3-5U / PIC-1047L (300 нМ)	Prob-PIC1 (100 нМ)
L17RA-U/IL17RA-R (300 нМ)	IL17RA-PCy5 (100 нМ)

а Ct-w – Ct, полученное при амплификации контрольного локуса ДНК (IL17-RA).

Клинический материал

В исследовании использованы образцы ДНК, экстрагированные из парафиновых блоков опухолей 411 нелеченых больных раком молочной железы в различных стадиях заболевания, проходивших обследование и лечение в ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в 2009–2012 гг.

Выделение ДНК проводили с помощью QIAamp DNA FFPE Tissue Kit согласно инструкции компании-производителя.

Исследование одобрено этическим комитетом ИХБФМ СО РАН от 25.02.2015 (протокол № 2).

Результаты и обсуждение

Выбор олигонуклеотидных праймеров и зондов, оптимизация условий мультиплексной ПЦР

Исследование начали с валидации системы олигонуклеотидных праймеров (описаны в работе R.E. Board и соавт. [7]), отличающейся тем, что для детекции сигнала был введен TaqMan зонд, комплементарный внутренней области фрагмента. Была получена малая разница Ct ($dCt = 7$), соответствующих амплификационным сигналам с контрольной пары праймеров (амплификация ДНК дикого типа) и с праймера, соответствующего мутации PIK3CA H1047R на ДНК дикого типа, выделенной из крови и из гистологического препарата нормальной печени человека. При этом авторы описывали детекцию 1% мутации с Ct = 7,6. Таким образом, мы сделали вывод, что использование системы праймеров, описанной

в этой работе, не позволит нам достичь приемлемой (менее 1%) чувствительности выявления соматических мутаций.

Для дизайна аллель-специфичных праймеров мы выбрали подход, описанный В. Li и соавт. в 2004 г. [8]. Чтобы увеличить дискриминацию мутантного аллеля, они предложили вводить второе неспаренное нуклеотидное основание в -2 позиции аллель-специфичного праймера. Был составлен простой набор правил выбора типа этого основания для достижения максимального эффекта. В соответствии с этими рекомендациями мы синтезировали аллель-специфичные праймеры как для прямой цепи ДНК, так и для обратной. В оптимизации добились максимальной разницы Ct между реакцией с мутантным праймером на нормальной ДНК и реакцией с нормировочным геномным локусом (в нашем случае это был экзон гена IL17RA).

В результате мы вычленили 4 пары олигонуклеотидных праймеров (см. табл. 1), обладающие максимальной дискриминирующей способностью по отношению к выбранным для анализа соматическим мутациям гена PIK3CA. Оптимизация условий АС-ПЦР-РВ также включала подбор оптимальных концентраций олигонуклеотидных праймеров и зондов, параметров программы амплификации и концентрацию ионов магния. Для повышения чувствительности и специфичности ПЦР был применен «горячий старт», который обеспечивается использованием химически модифицированной Taq-полимеразы. Оптимальные параметры разработанной системы приведены в табл. 2.

При оптимизации ПЦР нами было показано, что на геномной ДНК дикого типа, выделенной

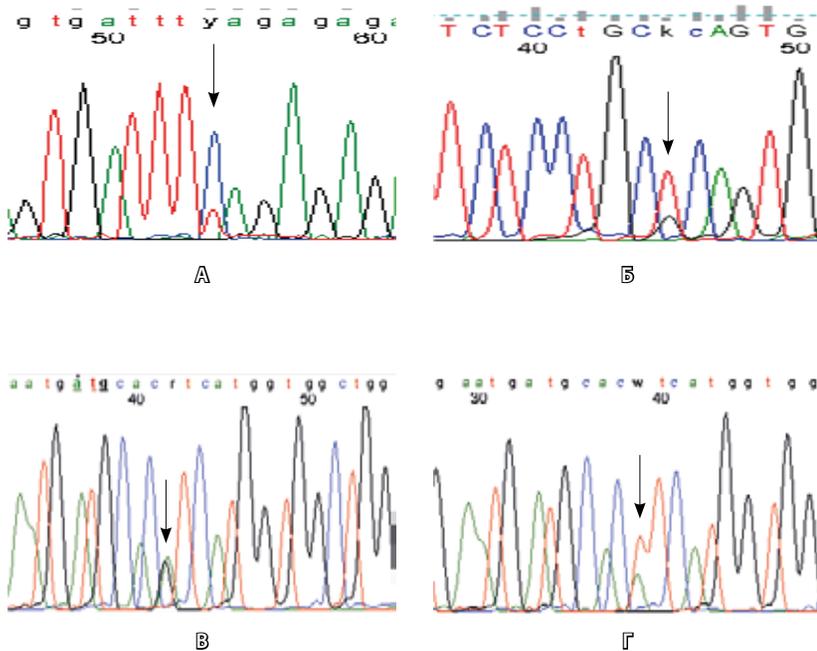


Рис. 2. Выявление соматических мутаций в гене PIK3CA: **А** – p.E542K c.1624G>A, **Б** – p.E545K c.1633G>A, **В** – p.H1047R c.3140A>G, **Г** – p.H1047L c.3140A>T методом секвенирования по Сенгеру

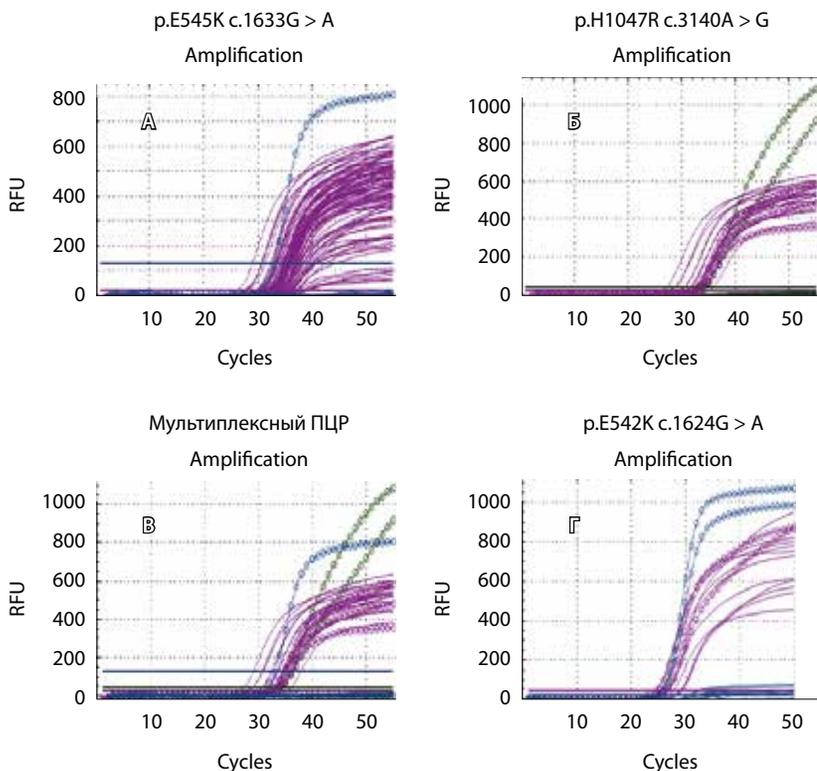


Рис. 3. Мультиплексное выявление соматических мутаций в гене PIK3CA разработанным методом АС-ПЦР-РВ: **А** – ПЦР-дуплекс p.E545K (FAM) + IL-17RA (Cy5); **Б** – ПЦР-дуплекс p.H1047R (HEX) + IL-17RA (Cy5); **В** – ПЦР-триплекс p.E545K (FAM) + p.H1047R (HEX) + IL-17RA (Cy5); **Г** – p.E542K (FAM) + p.H1047L (HEX) + IL-17RA (Cy5)

из крови человека, мы часто практически не наблюдали роста сигнала с праймера, специфичного для мутации. А на образцах, выделенных из гистологических блоков нормальной ткани человека, dCt для мутаций p.E545K, p.H1047R и H1047L составило $8,6 \pm 0,7$; $9,1 \pm 1,1$ и $8,9 \pm 0,6$ цикла соответственно, в то время как для мутации p.E542K – $7,1 \pm 0,4$ цикла.

Для определения чувствительности детекции исследуемых мутаций было проведено клонирование фрагментов гена PIK3CA без мутаций и с мутациями. Нуклеотидная последовательность полученных рекомбинантных плазмид была подтверждена секвенированием по Сенгеру. Концентрация плазмид была определена флуорометрическим методом. Все плазмидные ДНК разводили до концентрации 10^6 копий/мл; стандарты, содержащие необходимый процент мутантного аллеля, получали смешиванием соответствующих плазмид с мутацией и плазмид с ДНК дикого типа в необходимой пропорции. Пределом чувствительности считали стабильное dCt, полученное при амплификации плазмидного стандарта, на 1 Ct меньше, чем dCt, полученное при анализе ДНК из крови или гистологических блоков нормальных тканей человека. Аналитическая чувствительность выявления мутаций составила 0,5% для p.E542K и 0,25% для p.E545K, p.H1047R и H1047L. Разработанный нами подход был использован для выявления указанных соматических мутаций на ДНК, выделенной из гистологических блоков опухолей больных раком молочной железы.

Выявление соматических мутаций гена PIK3CA в образцах ДНК рака молочной железы, выделенной из парафиновых блоков. На первом этапе анализа для валидации разработанного метода мы параллельно проанализировали 334 образца ДНК, выделенной из парафиновых блоков опухолей, удаленных хирургическим методом у больных раком молочной железы III–IV стадий, с применением разработанного нами метода АС-ПЦР и прямого секвенирования по Сенгеру (рис. 2 и 3).

Секвенирование позволило успешно проанализировать 310 образцов и выявить 59 мутаций (31 – p.E542K + p.E545K; 28 – p.H1047R + p.H1047L), то есть частота выявления соматических мутаций гена PIK3CA в обследованной группе составила 19%. В то же время применение АС-ПЦР выявило мутации в 75 из 327 валидных образцов (45 – p.E542K + p.E545K; 30 – p.H1047R + p.H1047L), что составило 24%. Позитивные по АС-ПЦР и негативные по секвенированию образцы во всех



Таблица 3. Распределение типов соматических мутаций в исследуемых опухолях молочной железы в зависимости от стадии заболевания

Рак молочной железы	Мутация E542K	Всего образцов	Мутация E545K	Всего образцов	Мутация H1047R	Всего образцов
I–II стадия	3	83	3	83	2	83
III–IV стадия	27	319	8	324	31	324

случаях имели высокие dCt, что может быть интерпретировано как низкий процент мутантного аллеля.

Для оценки роли соматических мутаций гена PIK3CA в прогрессии опухолей молочной железы были также проанализированы образцы ДНК, выделенной из парафиновых блоков опухолей больших раком молочной железы I–II стадий (табл. 3). Установлено, что частота встречаемости соматических мутаций гена PIK3CA увеличивается по мере опухолевой прогрессии и составляет 9,6% в опухолях I–II стадий против 21% в опухолях III–IV стадий (83 и 324 образца соответственно, $p=0,022$). Увеличение происходит в основном за счет мутации p.H1047R с.3140A>G, локализованной в каталитическом домене фермента.

Заключение

Разработан простой и производительный метод выявления соматических мутаций гена PIK3CA в ДНК, полученной из парафиновых блоков, с помощью мультиплексной АС-ПЦР-РВ, в которой для нормировки количества геномной ДНК дикого типа было использовано измерение количества инвариантного локуса в гене IL17RA. Кроме того, амплификация этого фрагмента ДНК дала возможность контроля этапов экстракции ДНК и проведения ПЦР.

Предложенная система показала высокую эффективность проведения анализа ДНК из парафиновых блоков: для образцов ДНК рака молочной железы она составила 98%. Это в значительной степени обусловлено минимизацией размеров ампликонов (менее 100 п.н.) и высокой эффективностью ПЦР. Ее использование снижает стоимость анализа за счет мультиплексирования, а стандартизация методики уменьшает время получения результата, что позволяет рекомендовать данную методику для потокового скрининга в клинико-диагностической лаборатории.

При сравнении разработанной тест-системы с классическим референсным методом – секвенированием по Сенгеру, проведенным на репрезентативной выборке из 334 образцов рака молочной железы, 16 образцов оказались положительными

по результатам АС-ПЦР, но негативными по секвенированию. Поскольку во всех 16 случаях АС-ПЦР показывала довольно высокие dCt (в районе 5–6), что может означать небольшой процент мутантного аллеля в образце, данное несоответствие, предположительно, обусловлено прежде всего невысокой чувствительностью (не менее 10–15% мутантной ДНК в образце) секвенирования для выявления соматических мутаций.

С помощью разработанной тест-системы нам удалось продемонстрировать статистически значимое накопление соматических мутаций в каталитическом домене PIK3CA по мере прогрессирования рака молочной железы: частота выявления мутаций была достоверно выше при распространенных (III–IV), чем при начальных (I–II) стадиях заболевания. Ранее другими авторами были показаны разные механизмы активации PIK3 в результате двух наиболее распространенных соматических мутаций p110α субъединицы киназы – H1047R, локализуемой в киназном домене, и E545K, лежащей в домене, ответственном за взаимодействие с p85 субъединицей [9, 10]. Так, A. Chakrabarty и соавт. продемонстрировали на модели иммортализованных эпителиальных клеток молочной железы, что именно H1047R, а не E545K мутация, стимулирует HER2-опосредованную трансформацию [11]. Полученные нами данные об увеличении частоты встречаемости мутации H1047R при прогрессии опухоли хорошо согласуются с предложенными механизмами ее онкогенной реализации и требуют дальнейшего более пристального рассмотрения с учетом рецепторного статуса опухоли и других функциональных маркеров.

Полагаем, что разработанный нами метод детекции соматических мутаций в гене PIK3CA является достаточно чувствительным и специфичным и позволяет выявлять эти мутации не только в фиксированных тканях опухоли из парафиновых блоков, но и в плазме пациентов. Он может быть использован для прогноза течения заболевания, а также для коррекции лекарственной терапии и мониторинга ответа опухоли на терапию. ©

Благодарности

Работа поддержана грантом Федеральной целевой программы № 14.604.21.0101, шифр 2014-14-576-0109.



Литература / References

- Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Yan H, Gazdar A, Powell SM, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz S, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science*. 2004;304(5670):554.
- Karakas B, Bachman KE, Park BH. Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers. *Br J Cancer*. 2006;94(4):455–9.
- COSMIC database <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>
- Zhao L, Vogt PK. Class I PI3K in oncogenic cellular transformation. *Oncogene*. 2008;27(41):5486–96. doi: 10.1038/onc.2008.244.
- Gustin JP, Karakas B, Weiss MB, Abukhdeir AM, Lauring J, Garay JP, Cosgrove D, Tamaki A, Konishi H, Konishi Y, Mohseni M, Wang G, Rosen DM, Denmeade SR, Higgins MJ, Vitolo MI, Bachman KE, Park BH. Knockin of mutant PIK3CA activates multiple oncogenic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(8):2835–40. doi: 10.1073/pnas.0813351106.
- Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC, Markham AF. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res*. 1989;17(7):2503–16.
- Board RE, Thelwell NJ, Ravetto PF, Little S, Ranson M, Dive C, Hughes A, Whitcombe D. Multiplexed assays for detection of mutations in PIK3CA. *Clin Chem*. 2008;54(4):757–60. doi: 10.1373/clinchem.2007.098376.
- Li B, Kadura I, Fu DJ, Watson DE. Genotyping with TaqMAMA. *Genomics*. 2004;83(2):311–20.
- Pang H, Flinn R, Patsialou A, Wyckoff J, Roussos ET, Wu H, Pozzuto M, Goswami S, Condeelis JS, Bresnick AR, Segall JE, Backer JM. Differential enhancement of breast cancer cell motility and metastasis by helical and kinase domain mutations of class IA phosphoinositide 3-kinase. *Cancer Res*. 2009;69(23):8868–76. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1968.
- Miled N, Yan Y, Hon WC, Perisic O, Zvelebil M, Inbar Y, Schneidman-Duhovny D, Wolfson HJ, Backer JM, Williams RL. Mechanism of two classes of cancer mutations in the phosphoinositide 3-kinase catalytic subunit. *Science*. 2007;317(5835):239–42.
- Chakrabarty A, Rexer BN, Wang SE, Cook RS, Engelman JA, Arteaga CL. H1047R phosphatidylinositol 3-kinase mutant enhances HER2-mediated transformation by heregulin production and activation of HER3. *Oncogene*. 2010;29(37):5193–203. doi: 10.1038/onc.2010.257.

Development of a multiplex allele-specific real-time PCR method for detection of PIK3CA gene somatic mutations and its validation in the tumors of breast cancer patients

Filipenko M.L. • Shamovskaya D.V. • Oskina N.A. • Oscorbin I.P. • Khrapov E.A. • Ovchinnikova L.K. • Gershteyn E.S. • Kushlinskii N.E.

Aim: To develop a highly sensitive real-time polymerase chain reaction (PCR) system for detection of somatic mutations in 542 and 545 codons of exon 9 and 1047 codon of exon 20 of PIK3CA gene comprising more than 80% of all somatic mutations in this gene for application on histological material without macro- and microdissection, and to analyze associations between these mutations and clinical and pathological characteristics of breast tumors.

Materials and methods: The Allele-specific real-time PCR method with signal detection by TaqMan probes was used. For determination of its analytical sensitivity, plasmids carrying the mutations studied were constructed by standard genetic engineering methods using mutagenesis. DNA samples carrying various mutated/wild type DNA ratios (5.0; 2.0; 1.0; 0.5, 0.25%) were prepared.

Results: Multiplex allele-specific real-time PCR method for detection of most common mutations in PIK3CA gene: p.E542K c.1624G>A, p.E545K c.1633G>A, p.H1047R c.3140A>G, p.H1047L c.3140A>T – was developed and optimized.

Analytical sensitivity of mutation detection comprised 0.5% for p.E542K and 0.25% for p.E545K, p.H1047R and H1047L. This method was applied to detection of the above-mentioned mutations in DNA extracted from paraffin-embedded blocks of the tumors of breast cancer patients. It was shown that frequency of PIK3CA somatic mutations detection increased with tumor progression, being 9.6% in stage 1–2 versus 21% in stage 3–4 tumors (83 and 324 samples respectively; $p=0.022$), mainly due to higher prevalence of p.H1047R c.3140A>G mutation localized in the catalytic domain of the enzyme.

Conclusion: The method developed for detection of somatic mutations in PIK3CA gene is sufficiently sensitive, specific and efficient, that allows to propose it for a routine screening in clinical diagnostic laboratories for evaluation of disease prognosis and monitoring of response to therapy and its modification.

Key words: allele-specific real-time PCR (AS-RT-PCR), PIK3CA gene, mutations, breast cancer.

doi: 10.18786/2072-0505-2015-41-12-18

Filipenko Maksim Leonidovich – PhD (Biol.), Head of Laboratory of Pharmacogenomics¹, Research Fellow²

✉ 8 Akademika Lavrent'eva prosp., Novosibirsk, 630090, Russian Federation.

Tel.: +7 (913) 921 73 92.

E-mail: mfilipenko@gmail.com

Shamovskaya Dar'ya Vadimovna – Research Fellow¹

Oskina Natal'ya Aleksandrovna – Research Fellow¹

Oscorbin Igor Petrovich – Research Fellow¹, PhD student²

Khrapov Evgeniy Aleksandrovich – Research Fellow^{1,2}

Ovchinnikova Larisa Konstantinovna – PhD, Surgeon-Oncologist, Department of Mammary Gland Tumors³

Gershteyn Elena Sergeevna – Doctor of Biol. Sci., Professor, Leading Research Fellow, Clinical Biochemistry Laboratory³

Kushlinskii Nikolay Evgen'evich – MD, PhD, Professor, Member-Correspondent of Russian Academy of Sciences, Head of Clinical Biochemistry Laboratory³

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences; 8 Akademika Lavrent'eva prosp., Novosibirsk, 630090, Russian Federation

² Novosibirsk State University; 2 Pirogova ul., Novosibirsk, 630090, Russian Federation

³ N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center; 24 Kashirskoe shosse, Moscow, 115478, Russian Federation