

*На правах рукописи*

АЛЕКСАХИНА

Светлана Николаевна

**ХАРАКТЕРИСТИКА СNEК2-АССОЦИИРОВАННЫХ ОПУХОЛЕЙ  
МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

14.01.12 – онкология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2019

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:**

чл.-корр. РАН, доктор медицинских наук, профессор **Имянитов Евгений Наумович**

**Официальные оппоненты:**

**Орлов Сергей Владимирович**, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии», директор

**Слонимская Елена Михайловна**, доктор медицинских наук, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», профессор кафедры онкологии медицинского факультета

**Ведущая организация:**

федеральное государственное бюджетное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»

Защита состоится «\_\_»\_\_\_\_\_2019 г. в \_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 208.052.01 при ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (197759, Санкт-Петербург, Песочный-2, ул. Ленинградская, д. 68).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России на сайте <http://www.niioncologii.ru>

Автореферат разослан «\_\_»\_\_\_\_\_ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор медицинских наук

**Лариса Валентиновна Филатова**

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность проблемы

До 10% опухолей молочной железы являются наследственными карциномами [Cybulski et al., 2019]. Самые известные высокопенетрантные мутации в генах BRCA1 и BRCA2 объясняют около 40% семейных случаев рака молочной железы (РМЖ). CHEK2-ассоциированные новообразования также составляют значительную долю наследственного РМЖ. Клинические и молекулярные характеристики карцином, ассоциированных с вертикальной передачей патогенных аллелей, отличаются от спорадических раков. Например, опухоли пациенток-носительниц мутаций BRCA1/2 чаще всего представлены т.н. «трижды-негативным» фенотипом, обладают характерными экспрессионными и мутационными профилями, а также высокой чувствительностью к препаратам платины и PARP-ингибиторам [Jazaeri et al., 2002; Narod et al., 2011; Moiseyenko et al., 2015; Nik-Zainal et al., 2016]. Эти примеры свидетельствуют о потенциальных биологических и клинических особенностях неоплазм, индуцированных наследственными мутациями в разных генах.

Молекулярно-генетические характеристики CHEK2-ассоциированных опухолей молочной железы изучены менее обстоятельно. Известно, что CHEK2-зависимые опухоли отличаются от BRCA1-ассоциированных и спорадических новообразований по профилю экспрессии гормональных рецепторов и по чувствительности к химиотерапии. Так, для них характерны положительный ER-статус и люминальный В подтип [Cybulski et al., 2009; Domagala et al., 2012; Nagel et al., 2012; Huszno et al., 2016; Schmidt et al., 2016]. Кроме того, имеются сведения о пониженной чувствительности CHEK2-позитивных опухолей к антрациклинам и лучшей эффективности таксан-содержащих схем [Chrisanthar et al., 2008; Pfeifer et al., 2014].

Ген CHEK2 кодирует ядерную серин-треониновую киназу, играющую ключевую роль в поддержании целостности генома. В случае возникновения повреждений ДНК CHEK2 фосфорилируется белком ATM, что приводит к его гомодимеризации и активации. К основным внутриклеточным мишеням CHEK2, задействованным в регуляции клеточного цикла, апоптоза и репарации ДНК, относятся CDC25A, p53, PML, E2F1 и BRCA1 [Zannini et al., 2014]. Таким образом, механизмы формирования CHEK2-ассоциированных опухолей также связаны с дефектами системы репарации ДНК.

У российских пациентов чаще всего встречаются три «повторяющиеся» мутации гена CHEK2: IVS2+1G>A (c.444+1G>A, p.E149Ifs\*6), c.1100delC (p.T367Mfs\*15) и del5395 (p.M304Lfs\*16). Все три мутации являются транкирующими, т.е. приводят к синтезу в

клетках неполноценного белка. Существуют данные о молекулярных и морфологических различиях опухолей с разными мутациями CHEK2 [Domagala et al., 2012; Muranen et al., 2016].

### **Степень разработанности темы**

Наиболее изученной формой наследственных раков являются BRCA1/2-ассоциированные опухоли. Карциномы, связанные с наследственными мутациями генов средней пенетрантности, охарактеризованы гораздо меньше.

Спектр наследственных мутаций гена CHEK2 в популяции российских пациентов ограничен тремя “founder” вариантами: 1100delC, del5395, IVS2+1G>A. Масштабные исследования вклада этих мутаций в развитие РМЖ проводятся в Германии, Польше, Чехии [CHEK2 Breast Cancer Case-Control Consortium, 2004; Cybulski et al., 2019; Kleiblova et al., 2019]. В Российской Федерации систематической оценки встречаемости всех трех мутаций не проводилось. Существенным в данном аспекте также является и недостаток сведений клинико-биологических особенностях CHEK2-ассоциированных опухолей молочной железы.

Понимание молекулярных процессов, лежащих в основе развития наследственных опухолей, позволяет выявлять новые возможности и мишени для их терапии. С этой точки зрения чрезвычайно важным представляется изучение механизмов инактивации нормального аллеля в CHEK2-зависимых опухолях. Большинство имеющихся исследований фокусируются на анализе характеристик 1100delC-мутантных опухолей, хотя вариант del5395 вносит большой вклад в заболеваемость [Fletcher et al., 2009; Huszno et al., 2016]. Ранее были показаны различия в клинических и генетических характеристиках опухолей с разными наследственными мутациями CHEK2 [Domagala et al., 2012; Kleiblova et al., 2019]. Такие различия могут носить принципиальный характер при выборе терапии.

### **Цель исследования**

Оценить молекулярно-генетические характеристики CHEK2-ассоциированных опухолей молочной железы.

### **Задачи исследования**

1. Выполнить молекулярно-эпидемиологическое исследование частоты повторяющихся мутаций гена CHEK2 у больных раком молочной железы и здоровых контролей.

2. Оценить вклад разных мутаций СНЕК2 в заболеваемость раком молочной железы.
3. Сравнить клинико-морфологические характеристики пациенток с разными наследственными мутациями СНЕК2.
4. Установить частоту соматической потери гетерозиготности в локусе гена СНЕК2 в образцах опухолевой ткани, полученных от носительниц наследственных мутаций.
5. Сопоставить частоты утраты гетерозиготности в опухолевой ткани при разных вариантах наследственных мутаций СНЕК2.
6. Выявить ключевые соматические мутации СНЕК2-ассоциированных опухолей методом высокопроизводительного экзомного секвенирования.
7. Оценить степень генетической нестабильности СНЕК2-ассоциированных опухолей.

### **Новизна исследования**

Впервые выполнен систематический анализ соматического статуса локуса СНЕК2 в СНЕК2-ассоциированных опухолях. Выполнено масштабное исследование «случай-контроль» для определения вовлеченности различных вариантов наследственных мутаций СНЕК2 в формирование предрасположенности к раку молочной железы. Выполнено высокопроизводительное экзомное секвенирование СНЕК2-зависимых опухолей, определены соматические мутации, характерные для этого типа новообразований.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Наследственные мутации в гене СНЕК2 вносят значимый вклад в предрасположенность к раку молочной железы. В отличие от BRCA1-ассоциированных опухолей, эта группа новообразований не имеет выраженных паттернов терапевтической чувствительности. Молекулярные исследования наследственных и спорадических опухолей молочной железы показали, что некоторые спорадические опухоли имеют характерный для BRCA-ассоциированных раков генетический профиль, т.н. BRCAness. В данном исследовании установлено, что среди СНЕК2-ассоциированных опухолей могут наблюдаться карциномы с BRCA-подобным фенотипом. Это наблюдение обосновывает перспективность клинических испытаний производных платины и PARP-ингибиторов для лечения подобной группы больных.

### **Содержание исследования**

В данное исследование включены несколько выборок образцов. Для исследования вклада наследственных мутаций СНЕК2 в заболеваемость раком молочной железы проанализированы образцы ДНК 1024 онкологически здоровых женщин и 1750 больных

раком молочной железы. Клинико-морфологические параметры СНЕК2-зависимых опухолей были проанализированы для 91 пациентки с наследственной мутацией в упомянутом гене. Молекулярно-генетические исследования опухолевой ткани СНЕК2-ассоциированного РМЖ были выполнены для 46 случаев, в частности анализ соматической утраты оставшегося аллеля данного гена. Для 9 случаев был выполнен высокопроизводительный экзомный анализ.

### **Апробация результатов**

Основные положения диссертации были представлены на III Петербургском международном онкологическом Форуме «Белые ночи – 2017» (Санкт-Петербург, 23-25 июня 2017 года) и на Европейском Патологическом Конгрессе (Ницца, 7-11 сентября 2019 года).

По теме диссертации опубликовано 11 работ, из которых 2 – в рецензируемых научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК, 9 – в зарубежных изданиях, индексируемых в Web of Science и Scopus.

### **Внедрение результатов**

Работа выполнена в рамках основных направлений исследования научной лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России. Выполнение исследований поддержано грантом Российского научного фонда №14-15-00528 «Новые разновидности наследственного рака молочной железы: спектр лекарственной чувствительности и биологические особенности опухолевых клеток» и грантом Российского фонда фундаментальных исследований №17-29-06046 «Молекулярные и клинические характеристики СНЕК2-ассоциированного рака молочной железы». Основные положения диссертации будут использованы для совершенствования алгоритмов анализа чувствительности СНЕК2-ассоциированных опухолей к различным видам терапии.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. 3% опухолей молочной железы ассоциированы с наследственными мутациями гена СНЕК2. Наибольший вклад в развитие рака молочной железы вносит мутация del5395 (OR: 4,6; 95% CI 1,62-13,06).
2. По своим клинико-морфологическим характеристикам опухоли, ассоциированные с разными наследственными мутациями СНЕК2, не отличаются между собой и демонстрируют, в основном, характеристики люминального подтипа.

3. Не менее 30% СНЕК2-зависимых опухолей содержат потерю гетерозиготности в локусе гена СНЕК2.
4. Инактивация нормального аллеля СНЕК2 в опухолевой ткани более характерна для образований, полученных от носительниц мутации del15395, чем для опухолей связанных с мутациями 1100delC или IVS2+1G>A ( $p=0,0007$  [OR: 7,11; 95% CI 1,54-40,5]).

#### **Личный вклад автора**

Личный вклад автора состоит в непосредственном выполнении молекулярно-генетических исследований на всех этапах: выделение нуклеиновых кислот, выполнение ПЦР и секвенирования, анализ результатов. Автором выполнена обработка, обобщение и интерпретация данных исследования.

#### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 102 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения полученных данных и выводов. Работа иллюстрирована 18 рисунками и 16 таблицами. Библиографический указатель включает 147 источников.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### *1. Материалы*

Для сравнительного анализа встречаемости наследственных мутаций СНЕК2 среди здоровых доноров и больных раком молочной железы была использована коллекция образцов ДНК лимфоцитов периферической крови, имеющаяся в распоряжении научной лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России. В исследование были включены образцы ДНК 1750 пациенток с раком молочной железы и 1024 онкологически здоровых женщины.

Для анализа клиническо-морфологических особенностей развития СНЕК2-ассоциированных опухолей были проанализированы истории болезней 91 пациентки с наследственными мутациями в упомянутом гене.

Опухолевый материал для молекулярно-генетического исследования был доступен в 46 случаях. Для исследования соматического статуса гена СНЕК2 были собраны пары образцов «норма–опухоль» (ДНК, выделенная из лимфоцитов периферической крови и ДНК, выделенная из опухолевого материала - архивных парафиновых блоков и/или свежесзамороженной ткани). В данной группе были исследованы «хемонаивные» опухоли, полученные до начала лечения.

#### *2. Методы*

Выделение ДНК из крови пациентов и здоровых доноров проводили с помощью модифицированного соль–хлороформного метода [Müllenbach et al., 1989]. ДНК из опухолевой ткани экстрагировали с использованием протеиназы К и фенол-хлороформной очистки.

В рамках исследования выполнялся анализ повторяющихся «founder» мутаций в гене СНЕК2 (del5395, 1100delC, IVS2+1G>A), а также частых мутаций в генах BRCA1 и BRCA2 (BRCA1: 5382insC, 4153delA, 185delAG; BRCA2: 6174delT). Исследование мутаций BRCA1/2 проводили по описанной ранее методике [Sokolenko et al., 2007]. Мутации в гене СНЕК2 определялись методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени.

Анализ статуса соматической утери «дикого» аллеля в опухолевой ткани проводился методом аллель-специфической ПЦР (АС-ПЦР) в реальном времени и/или методом секвенирования по Сэнгеру. Для подтверждения статуса гетерозиготности опухолей были подобраны флуоресцентные зонды для анализа однонуклеотидных полиморфизмов, окружающих локус гена СНЕК2 (22: 28,687,743 - 28,742,422).



Для 16 образцов СНЕК2-ассоциированных опухолей был выполнен анализ соматических мутаций в гене СНЕК2 (1-10 экзоны). Исследование выполнялось методом анализа кривых плавления с высоким разрешением (HRMA, High Resolution Melting Analysis) с последующим секвенированием фрагментов с aberrантной кинетикой плавления.

В рамках данного исследования для выявления полного спектра соматических мутаций было выполнено экзомное секвенирование 9 СНЕК2-ассоциированных опухолей. С целью выявления исключительно соматических событий для высокопроизводительного секвенирования использовались образцы опухолевой ДНК и соответствующие им образцы геномной ДНК. ДНК-библиотеки для экзомного секвенирования были подготовлены с помощью набора реагентов Nextera DNA Exome Kit (Illumina).

## РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 1. Анализ частоты повторяющихся мутаций СНЕК2 у больных раком молочной железы и здоровых доноров

Анализ мутаций СНЕК2 1100delC, del5395 и IVS2G>A был выполнен для образцов ДНК 1750 больных и 1024 онкологически здоровых женщин. Коллекция ДНК здоровых доноров была собрана в научной лаборатории молекулярной онкологии в 2007-2014 гг. Коллекция образцов больных РМЖ была представлена «последовательными» случаями, поступавшими в лабораторию для диагностических целей.

Мутации в гене СНЕК2 были обнаружены в 54 (3,1%) образцах, полученных от больных раком молочной железы. Данная коллекция образцов ранее была исследована на предмет повторяющихся мутаций в генах BRCA1/2 [Sokolenko et al., 2014]. В двух случаях мутация СНЕК2 del5395 была обнаружена у пациенток с мутацией BRCA1. Расчет отношения шансов для носителей мутаций в гене СНЕК2 представлен в таблице 1.

Таблица 1. Отношение шансов заболевания для носителей мутаций в гене СНЕК2

Мутация СНЕК2	РМЖ (n=1750)		Контроли (n=1024)		Odds ratio	95% CI	p-value
	Позитивные	%	Позитивные	%			
1100delC	15	0,86%	2	0,19%	4,42	1,01-19,36	0,04
IVS2+1G>A	8	0,46%	0	-	-	-	0,03
del5395	31	1,8%	4	0,39%	4,6	1,62-13,06	0,0012
Любая мутация	54	3,1%	6	0,58%	5,4	2,32-12,6	0,0001

Достоверных отличий между средним возрастом пациенток с разными мутациями СНЕК2 не наблюдалось. Однако по сравнению с BRCA1/2-носительницами у пациенток с мутациями в гене СНЕК2 заболевание диагностируется значительно позже ( $p = 0,0021$ ,  $t$ -тест Стьюдента).

## 2. *Анализ клинико-морфологических особенностей пациенток с наследственными мутациями СНЕК2*

Основные клинико-морфологические параметры пациенток с наследственными мутациями СНЕК2 были проанализированы для 91 случая. В эту часть исследования были включены пациентки с тремя распространенными типами повторяющихся мутаций СНЕК2: 1100delC ( $n=29$ ), del5395 ( $n=39$ ), IVS2+1G>A ( $n=23$ ). Было выполнено сравнение возраста, размера опухоли, вовлеченности метастазов и наличия отдаленных метастазов на момент выявления заболевания, степень дифференцировки опухолей, пролиферативная активность (индекс Ki-67), уровни экспрессии рецепторов эстрогена и прогестерона, уровень экспрессии HER2, наличие семейного анамнеза. Статистически значимых различий по проанализированным параметрам в этих группах не обнаружилось.

## 3. *Анализ соматического статуса локуса СНЕК2 в СНЕК2-ассоциированных опухолях*

Опухолевый материал для оценки частоты соматической потери гетерозиготности (loss of heterozygosity, ЛОН) был доступен для 46 случаев СНЕК2-ассоциированного РМЖ.

Анализ соматического статуса локуса СНЕК2 проводился с помощью комбинации методов аллель-специфической ПЦР, секвенирования и анализа однонуклеотидных полиморфизмов в локусе гена СНЕК2. Оценка статуса потери гетерозиготности проводилась комплексно по результатам исследования образца всеми возможными для каждого из случаев методами.

Неодинаковая частота делеции нормального аллеля в опухолях с разными мутациями СНЕК2 может свидетельствовать об отличиях молекулярного патогенеза и биологических свойств этих категорий новообразований. Основные клинико-морфологические характеристики РМЖ были сопоставлены в опухолях с потерей и без потери гетерозиготности (Таблица 2). Также отдельно было выполнено сравнение ЛОН-позитивных и ЛОН-негативных карцином от носительниц мутации СНЕК2 del5395. Статистически значимых отличий по проанализированным параметрам в этих группах обнаружено не было. Стоит отметить, что РМЖ с делецией нормального аллеля

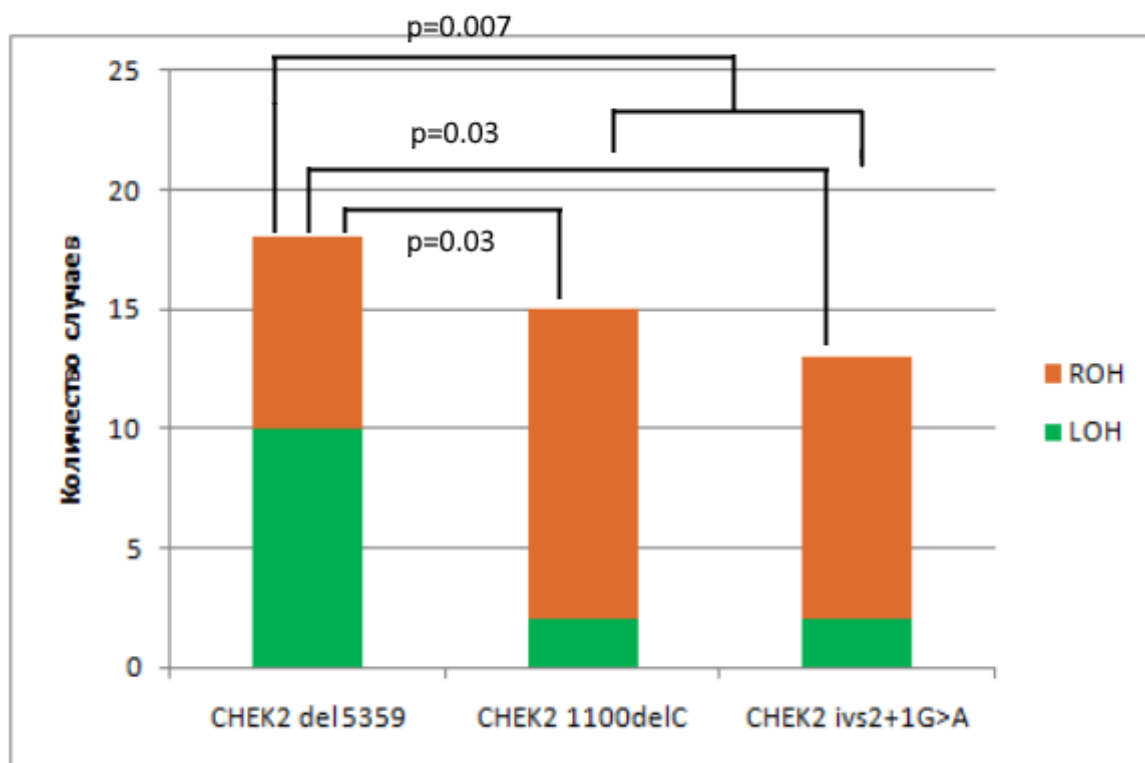
Таблица 2. Сравнение основных клинико-морфологических параметров в группах СНЕК2-ассоциированного РМЖ, сопровождающегося и не сопровождающегося феноменом потери гетерозиготности.

	LOH+ vs. LOH- (все случаи)		LOH+ vs. LOH- (СНЕК2 del5395)	
	LOH+	LOH-	LOH+	LOH-
	n = 14*	n = 32**	n = 10	n = 8
Возраст				
Средний	63,1	57,4	60	56,9
Диапазон	35-76	38-77	35-76	38-76
Размер опухоли (Т)	n = 14	n = 32	n = 10	n = 8
Т1	6 (42,9%)	8 (25,0%)	4 (40%)	1 (12,5%)
Т2	3 (21,4%)	18 (56,3%)	2 (20%)	5 (62,5%)
Т3	1 (7,1%)	3 (9,4%)	0	0
Т4	4 (28,6%)	3 (9,4%)	4 (40%)	2 (25%)
Вовлеченность лимфоузлов (N)	n = 14	n = 32	n = 10	n = 8
N0	0	15 (46,9%)	0	3 (37,5%)
N>0	14 (100%)	17 (53,1%)	14 (100%)	5 (62,5%)
Отдаленные метастазы	n = 13	n = 40	n = 10	n = 18
M0	13 (100%)	31 (100%)	10 (100%)	8 (100%)
M1	0	0	0	0
Нет данных	1	1		
Степень дифференцировки	n = 3	n = 9		
G2	1 (33,3%)	5 (55,6%)		
G3	2 (67,7%)	4 (44,4%)		
Нет данных	11	23		
Индекс Ki67, %	n = 2	n = 5		
Средний	15	22,6		
Диапазон	15-15	18-30		
Нет данных	12	27		
Экспрессия рецепторов эстрогенов	n = 14	n = 32	n = 10	n = 8
ER+	14 (100%)	27 (84,4%)	10 (100%)	7 (87,5%)
ER-	0 (0%)	5 (15,6%)	0 (0%)	1 (12,5%)
Экспрессия рецепторов прогестерона	n = 14	n = 31	n = 10	n = 8
PR+	10 (71,4%)	21 (67,7%)	4 (40%)	5 (62,5%)
PR-	4 (28,6%)	10 (32,3%)	6 (60%)	3 (37,5%)
Нет данных		1		
Гиперэкспрессия HER2	n = 12	n = 30	n = 10	n = 8
HER2-	12 (100%)	21 (70%)	10 (100%)	3 (37,5%)
HER2+	0 (0%)	9 (30%)	0 (0%)	5 (62,5%)
Нет данных	2	2	2	0
Семейный онкологический анамнез	n = 14	n = 32	n=10	n=8
Есть	2 (14,3%)	8 (25%)	1 (10%)	1 (12,5%)
Нет/нет данных	12 (85,7%)	24 (75,0%)	9 (90%)	7 (87,5%)

\*10 СНЕК2 del5395, 2 СНЕК2 1100delC, 2 СНЕК2 IVS2+1G>A

\*\*8 СНЕК2 del5395, 13 СНЕК2 1100delC, 11 СНЕК2 IVS2+1G>A

Рисунок 1. Частота потери нормального аллеля гена в опухолях с разными наследственными мутациями CHEK2.



характеризовались более старшим возрастом на момент диагноза (средний возраст 63,1 г.) по сравнению с опухолями без потери гетерозиготности (средний возраст 57,4 г.) ( $p = 0,12$ , t-тест Стьюдента). Аналогичная тенденция заметна при анализе РМЖ с мутацией CHEK2 del5395: в этой группе при наличии LOH средний возраст составил 60 лет, а в отсутствие феномена LOH – 56,8 ( $p = 0,58$ , t-тест Стьюдента).

Одним из возможных механизмов инактивации второго аллеля гена CHEK2 может стать присутствие дополнительной соматической мутации в опухоли. Для проверки этого предположения мы выполнили анализ последовательности экзонов 1-10 гена CHEK2 в 16 опухолях. Соматических мутаций обнаружено не было.

#### 4. Высокопроизводительное экзомное секвенирование CHEK2-ассоциированных опухолей молочной железы

Методом высокопроизводительного экзомного секвенирования было проанализировано 9 образцов CHEK2-ассоциированных опухолей молочной железы (Таблица 3).

Таблица 3. Клинико-морфологические характеристики опухолей, исследованных методом экзомного секвенирования.

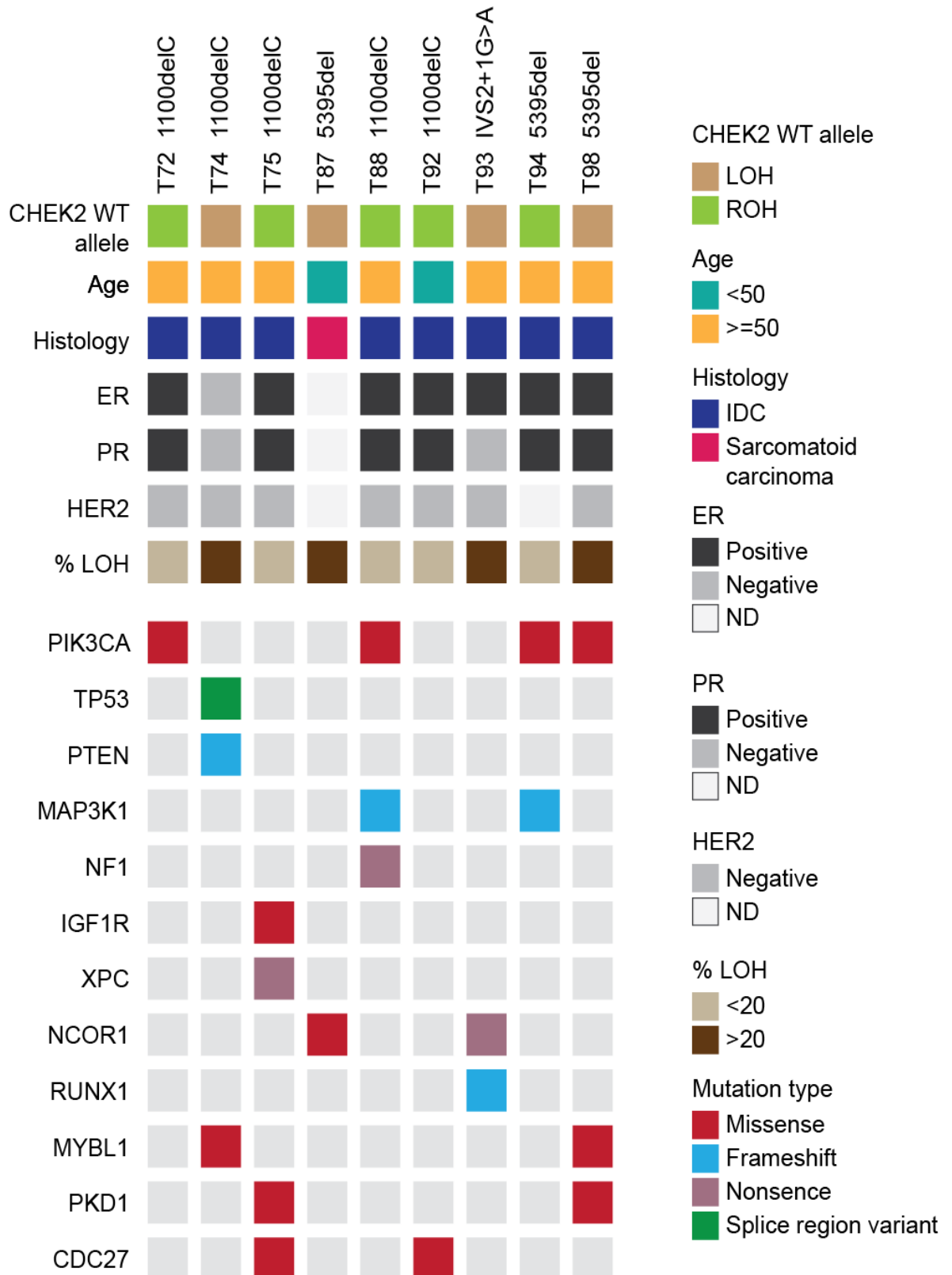
ID	Диагноз	Возраст	TNM	ER/PgR	Мутация CHEK2	Статус LOH
T72	Первично-множественный рак: 1) папиллярный рак щитовидной железы (45 лет), 2) РМЖ	52	T1cN0M0	ER+/PgR+	1100delC	ROH
T74	РМЖ	73	T3N0M0	ER+/PgR-	1100delC	LOH
T75	РМЖ	55	T2N1M0	ER+/PgR+	1100delC	ROH
T88	Первично-множественный рак: 1) Папиллярный рак щитовидной железы pT1NxM0, 2) РМЖ	65	T1cN0M0	ER+/PgR+	1100delC	ROH
T92	Билатеральный РМЖ	44/70	T2N1M0, T2N1M0	ER+/PgR+	1100delC	ROH
T87	Саркоматоидная карцинома молочной железы	35	T4N2M0	ER+/PgR+	del5395	LOH
T94	РМЖ	55	T2N3M0	ER+/PgR-	del5395	ROH
T98	РМЖ	68	T4N2M0	ER+/PgR-	del5395	LOH
T93	РМЖ	69	T1cN1M0	ER+/PgR+	IVS2+1G>A	LOH

После биоинформатической обработки были сформированы списки всех соматических генетических событий для каждого образца. Данные в формате vcf были аннотированы с помощью сервиса wANNOWAR [Chang et al., 2012]. После аннотирования выполнялась дополнительная фильтрация, в частности, исключались вероятные артефакты секвенирования: учитывались только те варианты, которые были «прочитаны» в обе стороны не менее 2 раз. Для дальнейшего анализа использовались только экзонные варианты и мутации сплайс-сайтов. Была выполнена оценка общего количества экзонных мутаций и соотношение их функциональных типов. Паттерн распределения функционально разных генетических событий принципиально не отличался в образцах с потерей нормального аллеля и без нее. Важно отметить, что по результатам исследования образцов методом высокопроизводительного секвенирования соматический статус нормального аллеля CHEK2 был конкордантен полученным ранее результатам.

По результатам исследования аннотированных списков соматических мутаций для 9 образцов были выбраны потенциально драйверные события (Рисунок 2).

Дополнительных соматических мутаций гене CHEK2 в ходе экзомного секвенирования также не было выявлено.

Рисунок 2. Спектр генов, затронутых соматическими мутациями, в образцах CHEK2-ассоциированного РМЖ по результатам экзомного секвенирования.



Самыми частыми соматическими мутациями в СНЕК2-ассоциированных опухолях стали мутации в гене PIK3CA (4/9; 44,4%). Обнаруженные мутации представлены «hotspot» вариантами в экзонах 9 (p.E545K) и 20 (p.H1047R). Мутации гена PIK3CA встречаются в 20-30% случаев опухолей молочной железы, преимущественно в карциномах люминального подтипа [Shimoi et al., 2018]. Ген PIK3CA кодирует каталитическую  $\alpha$  субъединицу PI3K. Мутации PIK3CA представлены активирующими мутациями, таким образом в данных опухолях активируется сигнальный каскад PI3K. За счет различных механизмов данный каскад активирован примерно в 70% всех опухолей молочной железы [The Cancer Genome Atlas Network, 2012].

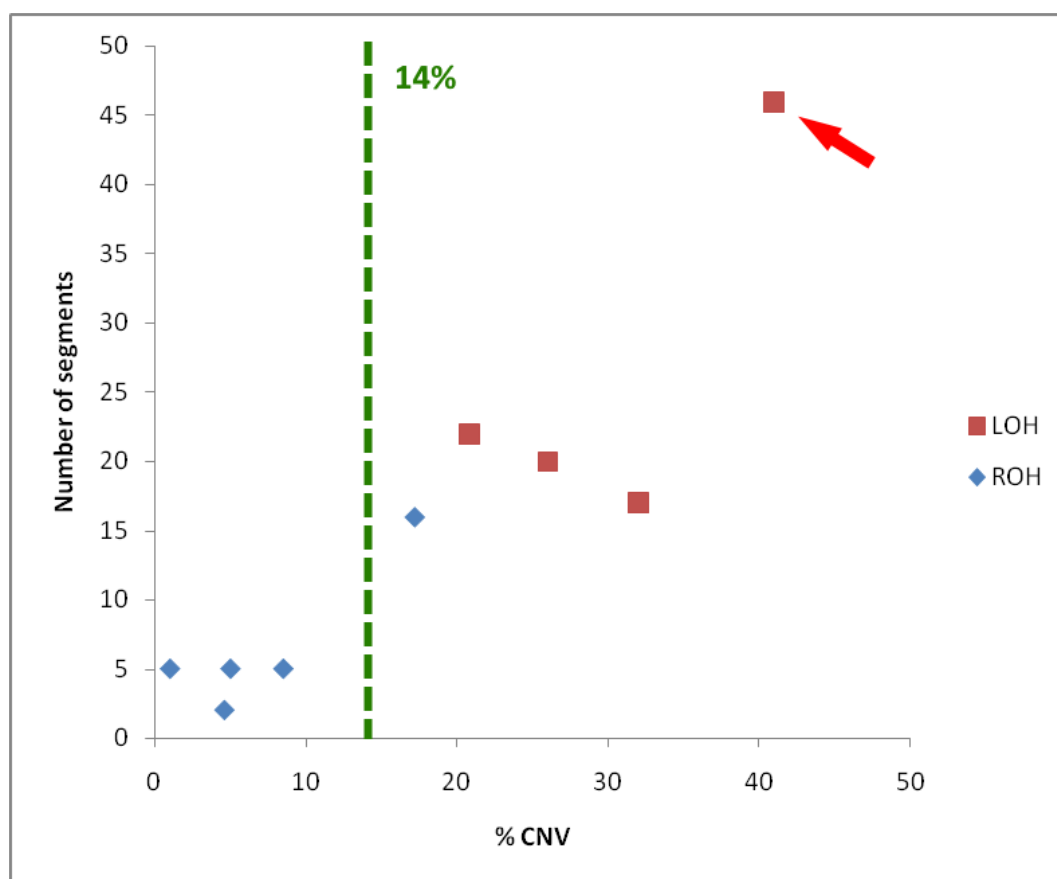
Мутации гена TP53 встречаются примерно в 37% неселектированных опухолей молочной железы [The Cancer Genome Atlas Network, 2012]. Частота нарушений гена TP53 значительно различается в зависимости от подтипа опухоли – от 12% среди люминальных А опухолей до 80% среди трижды негативных карцином. Мутация TP53 была обнаружена только в одном из исследованных образцов (Т74) (таблица 15).

Были обнаружены и другие соматические мутации, характерные, в основном, для люминальных опухолей: MAP3K1, PTEN, NF1.

Обнаруженная высокая частота мутаций PIK3CA соответствует литературным данным. В последнее время проводится множество исследований для определения значения мутаций PIK3CA в качестве прогностического фактора. Однако результаты таких исследований не совсем однозначны и, вероятно, роль мутаций PIK3CA отличается в зависимости от подтипа РМЖ. Мутации PIK3CA являются хорошим прогностическим фактором для безрецидивной выживаемости, но не для общей выживаемости [Shimoi et al., 2018]. Также показано, что мутации PIK3CA являются хорошим прогностическим фактором для гормон-позитивного РМЖ, но негативным фактором для HER2-позитивных опухолей [Ellis et al., 2010]. PIK3CA достаточно давно рассматривается в качестве мишени для противоопухолевой терапии. Несколько PIK3CA-ингибиторов уже используются для лечения пациентов, в частности иделализиб, копанлисиб, пикрей (алпелисиб) [Janku et al., 2018]. Последний из них, пикрей, одобрен для лечения опухолей молочной железы в комбинации с эндокринной терапией. По данным рандомизированного клинического исследования SOLAR-1 пикрей позволил увеличить вдвое безрецидивную выживаемость пациентов [Janku et al., 2018]. Значительная доля PIK3CA-мутантных опухолей среди СНЕК2-носительниц позволяет рассматривать ингибиторы PIK3CA, а также другие ингибиторы PI3K-AKT-mTOR сигнального пути, в качестве перспективных препаратов для таргетной терапии РМЖ.

После биоинформатической обработки и сравнения представленности гетерозигонных вариантов в опухолевой ткани была выполнена оценка CNV (copy number variations, вариации копийности) на экзомном уровне. Наличие потери гетерозиготности в локусе гена СНЕК2 (22q) полностью совпадало с данными, полученными ранее методами АС-ПЦР, секвенирования и анализа отдельных полиморфизмов. Была определена суммарная протяженность утраченных регионов и их количество (Рисунок 3). Полноэкзомная потеря гетерозиготности отражает геномную нестабильность опухолевой ткани. Для оценки исследуемых образцов использовалось пороговое значение протяженности утраченных локусов 14% [Swisher et al., 2018]. Так, образцы Т74, Т87, Т92, Т93 и Т98 продемонстрировали высокий уровень LOH. Наибольшей степенью геномной нестабильности отличался образец Т74, содержащий соматическую мутацию в гене TP53 (Рисунок 4). Для всех образцов с LOH по локусу СНЕК2 был показан высокий уровень LOH по экзому.

Рисунок 3. Соотношение протяженности и количества утраченных сегментов в опухолях с потерей нормального аллеля СНЕК2 (LOH) и без нее (ROH). Стрелкой обозначен образец с мутацией TP53. Пунктирная линия отражает условное пороговое значение уровня CNV, позволяющий классифицировать опухоли на РМЖ с низкой и высокой нестабильностью генома.





Для дополнительной оценки уровня нестабильности генетического материала в опухоли нами был введен дополнительный параметр – количество сегментов, затронутых потерей гетерозиготности (Рисунок 3). Оказалось, что количество сегментов прямо коррелирует с их размером, то есть отсутствуют варианты с большим количеством мелких выпадений и небольшим количеством крупных потерь генетического материала. Однако надо учесть, что наше исследование было сознательно ограничено только кодирующей частью экзона (<1% генома), на геномном уровне распределение делеций и амплификации может демонстрировать другой паттерн.

В 4 из 5 случаев с высоким уровнем потерь гетерозиготности по экзому наблюдалась и потеря нормального аллеля гена CHEK2 (Рисунок 3). Безусловно, определить какое из событий (потеря нормального аллеля или общая генетическая нестабильность опухоли) является первичным, на данном этапе исследований не представляется возможным. Актуальностью и высоким практическим значением в данный момент обладают исследования маркеров «BRCAness»-фенотипа – для терапии таких опухолей возможно использовать специфическое лечение. Несмотря на то, что по результатам высокопроизводительного секвенирования CHEK2-зависимые опухоли не демонстрируют характерной для «BRCAness» паттерн однонуклеотидных замен, представляется целесообразным анализ чувствительности CHEK2-ассоциированных опухолей к производным платины и PARP-ингибиторам.

В одном из исследованных образцов (T94) по результатам экзомного секвенирования была обнаружена амплификация гена EMSY (рисунок 5). Известно, что белок EMSY ингибирует функцию BRCA2, а значит гиперэкспрессия данного гена может нарушать регуляцию процессов репарации ДНК и провоцировать генетическую нестабильность [Hou et al., 2014]. Некоторые исследователи называют амплификацию EMSY как одну из характеристик фенотипа “BRCAness” [Jelinic et al., 2017]. CHEK2-ассоциированная опухоль с EMSY амплификацией, напротив, продемонстрировала парадоксально низкий уровень генетической нестабильности (1,03% CNV).

Рисунок 4. Оценка CNV для образца T74, выполненная на основе данных экзомного секвенирования. А – Распределение MAF для гетерозиготных позиций; Б – Количество и размер сегментов с разным MAF; В – Диаграмма CNV.

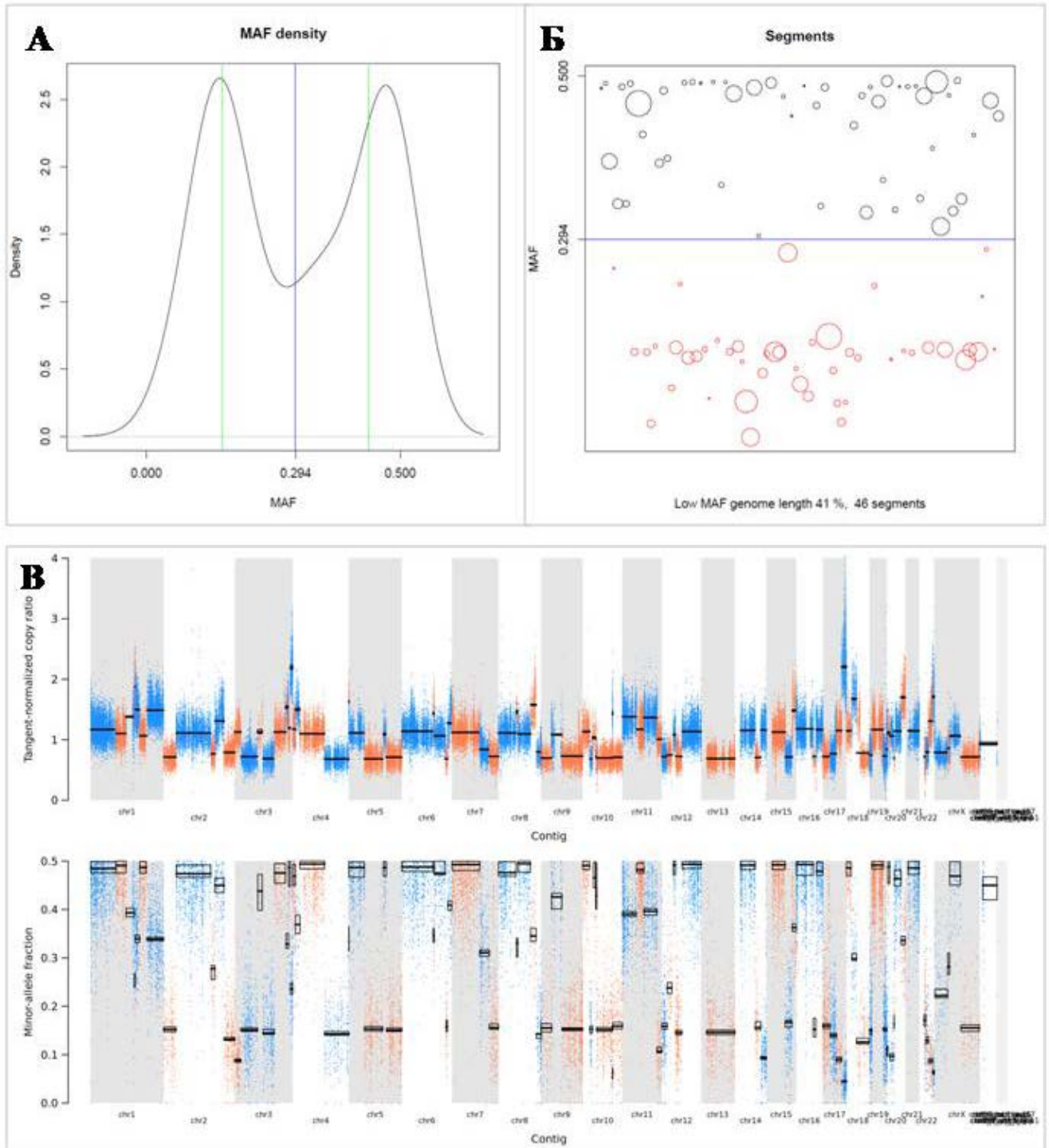
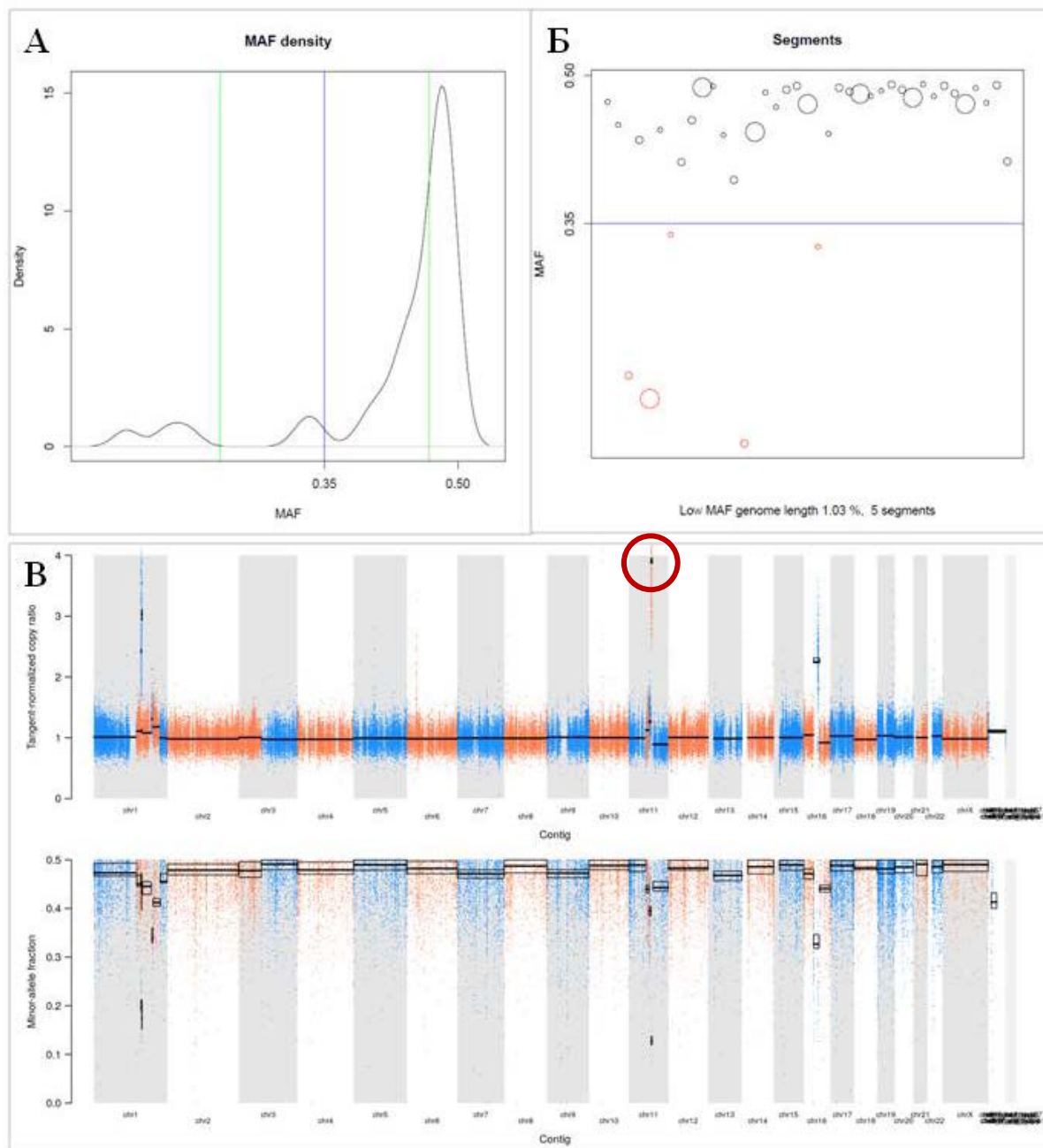


Рисунок 5. Оценка CNV для образца T94, выполненная на основе данных экзомного секвенирования. А – Распределение MAF для гетерозиготных позиций; Б – Количество и размер сегментов с разным MAF; В – Диаграмма CNV. Красным кругом отмечена амплификация гена EMSY.



Результаты данного исследования показывают, что опухоли молочной железы, ассоциированные с тремя разными мутациями, могут развиваться по разным молекулярным механизмам. Важнейшей задачей дальнейших исследований является определение наличия или отсутствия специфического паттерна химиочувствительности SNEK2 LOH+ опухолей молочной железы.

## ВЫВОДЫ

1. 3% опухолей молочной железы ассоциированы с наследственными мутациями гена CHEK2. Наибольший вклад в развитие рака молочной железы вносит мутация del5395 (OR: 4,6; 95% CI 1,62-13,06).
2. Опухоли, ассоциированные с разными наследственными мутациями CHEK2, не отличаются между собой по своим клинико-морфологическим характеристикам и относятся преимущественно к люминальному подтипу.
3. Паттерн соматических мутаций в CHEK2-ассоциированных опухолях также соответствует люминальному подтипу: в частности, характерна низкая частота мутаций TP53 и относительно высокая встречаемость мутаций PIK3CA, MAP3K1, NF1, PTEN.
4. Не менее 30% CHEK2-зависимых опухолей содержат потерю гетерозиготности в локусе гена CHEK2.
5. Инактивация нормального аллеля CHEK2 в опухолевой ткани более характерна для карцином, возникших у носительниц мутации del5395, чем для опухолей ассоциированных с мутациями 1100delC или IVS2+1G>A ( $p = 0,0007$  [OR: 7,11; 95% CI 1,54-40,5]).

### Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Sokolenko A.P., Bulanova D.R., Iyevleva A.G., Aleksakhina S.N., Preobrazhenskaya E.V., Ivantsov A.O., Kuligina E.Sh., Mitiushkina N.V., Suspitsin E.N., Yanus G.A., Zaitseva O.A., Yatsuk O.S., Togo A.V., Kota P., Dixon J.M., Larionov A.A., Kuznetsov S.G., Imyanitov E.N. High prevalence of GPRC5A germline mutations in BRCA1-mutant breast cancer patients // *Int J Cancer*, 2014, Vol. 134(10), P. 2352-2358.
2. Sokolenko A.P., Bogdanova N., Kluzniak W., Preobrazhenskaya E.V., Kuligina E.S., Iyevleva A.G., Aleksakhina S.N., Mitiushkina N.V., Gorodnova T.V., Bessonov A.A., Togo A.V., Lubinski J., Cybulski C., Jakubowska A., Dork T., Imyanitov E.N. Double heterozygotes among breast cancer patients analysed for BRCA1, CHEK2, ATM, NBN/NBS1, and BLM germ-line mutations // *Breast Cancer Research and Treatment*, 2014, Vol. 145, P. 553-562.
3. Sokolenko A.P., Preobrazhenskaya E.V., Aleksakhina S.N., Iyevleva A.G., Mitiushkina N.V., Zaitseva O.A., Yatsuk O.S., Tiurin V.I., Strelkova T.N., Togo A.V., Imyanitov E.N. Candidate gene analysis of BRCA1/2 mutation-negative high-risk Russian breast cancer patients // *Cancer Lett*, 2015, Vol. 359(2), P. 259-261.
4. Gorodnova T.V., Sokolenko A.P., Ivantsov A.O., Iyevleva A.G., Suspitsin E.N., Aleksakhina S.N., Yanus G.A., Togo A.V., Maximov S.Y., Imyanitov E.N. High response rates to neoadjuvant platinum-based therapy in ovarian cancer patients carrying germ-line BRCA mutation // *Cancer Lett*, 2015. Vol. 369(2), P. 363-367.
5. Котив Х.Б., Городнова Т.В., Иванцов А.О., Иевлева А.Г., Алексахина С.Н., Манихас Г.М., Лисянская А.С., Саломатов Р.П., Шушания М.С., Бороденко М.В., Роман Л.Д., Михайлюк Г.И., Михеева О.Н., Григорьева Т.Г., Берлев И.В., Имянитов Е.Н., Соколенко А.П. Клинико-морфологические особенности наследственного рака яичника // *Сибирский онкологический журнал*, 2017, №16(6), С. 31–40.
6. Yanus G.A., Akhapkina T.A., Ivantsov A.O., Preobrazhenskaya E.V., Aleksakhina S.N., Bizin I.V., Sokolenko A.P., Mitiushkina N.V., Kuligina E.S., Suspitsin E.N., Venina A.R., Holmatov M.M., Zaitseva O.A., Yatsuk O.S., Pashkov D.V., Belyaev A.M., Togo A.V., Imyanitov E.N., Iyevleva A.G. Spectrum of APC and MUTYH germ-line mutations in Russian patients with colorectal malignancies // *Clin genet*, 2018, Vol. 93(5), P. 1015-1021.
7. Yanus G.A., Akhapkina T.A., Iyevleva A.G., Kornilov A.V., Suspitsin E.N., Kuligina E.S., Ivantsov A.O., Aleksakhina S.N., Sokolova T.N., Sokolenko A.P., Togo A.V., Imyanitov E.N. The spectrum of Lynch syndrome-associated germ-line mutations in Russia // *Eur J Med Genet*, 2019, P. 103753 (1-4).
8. Yanus G.A., Akhapkina T.A., Whitehead A.J., Bizin I.V., Iyevleva A.G., Kuligina E.S., Aleksakhina S.N., Anisimova M.O., Holmatov M.M., Romanko A.A., Zaitseva O.A., Yatsuk O.S., Zagorodnev K.A., Matsneva M.A., Koloskov A.V., Togo A.V., Suspitsin E.N., Imyanitov E.N. Exome-based search for recurrent disease-causing alleles in Russian population // *Eur J Med Genet*, 2019, Vol. 62(7), P. 103656 (1-7).
9. Aleksakhina S.N., Kashyap A., Imyanitov E.N. Mechanisms of acquired tumor drug resistance. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2019, Vol. 1872(2), P. 188310 (1-9).
10. Raskin G.A., Iyevleva A.G., Aleksakhina S.N., Sokolenko A.P., Ivantsov A.I., Imyanitov E.N. Three types of truncating CHEK2 germline mutations may differ by the frequency of somatic loss of the wild-type allele. *Virchows Arch*, 2019, Vol. 475, S76.

11. Патент № 2522501 Российская Федерация G 01 N 33/574. Способ прогнозирования наследственной предрасположенности к раку молочной железы/ Соколенко А.П., Иевлева А.Г., Абышева С.Н., Преображенская Е.В., Митюшкина Н.В., Суспицын Е.Н., Кулигина Е.Ш., Иванцов А.О., Того А.В., Имянитов Е.Н.; заявители и патентообладатели: ФГБУ «НИИ онкологии им Н.Н. Петрова» Минздрава России, Федеральное государственное унитарное предприятие «Государственный научный центр «Научно-исследовательский институт органических полупродуктов и красителей» (ФГУП «ГНЦ «НИОПИК»). - №2013127373/14; заявл. 14.06.2013.

Выражаю глубокую признательность и благодарность руководителю диссертационной работы – член-корреспонденту РАН, доктору медицинских наук, профессору Евгению Наумовичу Имянитову за внимание и содействие при выполнении работы.

Благодарю за помощь в работе старшего научного сотрудника научной лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» кандидата медицинских наук Иевлеву Аглаю Геннадиевну, старшего научного сотрудника научной лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» кандидата медицинских наук Соколенко Анну Петровну, научного сотрудника научной лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» кандидата технических наук Бизина Илью Валерьевича.

Выражаю глубокую благодарность коллективу научного отдела биологии опухолевого роста за доброжелательное отношение.

Искренне признательна ведущему научному сотруднику научной лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» кандидату биологических наук Того Александру Викторовичу за профессиональную поддержку.

Выражаю благодарность родным и близким за терпение и понимание.