

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ОНКОЛОГИИ  
ИМЕНИ Н.Н. ПЕТРОВА»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

АЛЕКСАХИНА

Светлана Николаевна

ХАРАКТЕРИСТИКА СНЕК2-АССОЦИИРОВАННЫХ ОПУХОЛЕЙ  
МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

14.01.12 – онкология

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор медицинских наук, профессор,  
член-корреспондент РАН  
Е.Н. Имянитов

Санкт-Петербург – 2019

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений	3
<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	5
<b>ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	11
1.1 Синдром наследственного рака молочной железы и яичников	11
1.2. Ген СНЕК2, киназа Chk2 и ее физиологическая роль в функционировании клеток	16
1.3. Наследственные мутации СНЕК2: спектр, частота мутаций и их функциональные последствия	19
1.4. Иммунофенотипические и клинические особенности СНЕК2-ассоциированных опухолей	23
1.5. Инактивация аллеля дикого типа в СНЕК2-ассоциированных опухолях и другие клинико-биологические особенности опухолей	28
1.6. Высокопроизводительные исследования СНЕК2-ассоциированных опухолей	31
<b>ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b>	34
2.1. Материалы	34
2.2. Методы	35
2.2.1. Выделение ДНК из лимфоцитов периферической крови	35
2.2.2. Выделение ДНК из опухолевого материала	36
2.2.3. Анализ наследственных мутаций	37
2.2.4. Анализ потери гетерозиготности в СНЕК2-ассоциированных опухолях	38
2.2.5. Анализ соматических мутаций в гене СНЕК2	41
2.2.6. Экзомное секвенирование СНЕК2-ассоциированных опухолей молочной железы	42
2.2.7. Биоинформатическая обработка результатов экзомного секвенирования	44
2.2.8. Подтверждение наличия амплификации гена EMSY	45
<b>ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ</b>	47
3.1. Анализ частоты повторяющихся мутаций СНЕК2 у больных раком молочной железы и здоровых доноров	47
3.2. Анализ клинико-морфологических особенностей пациенток с наследственными мутациями СНЕК2	50
3.3. Анализ соматического статуса локуса СНЕК2 в СНЕК2-ассоциированных опухолях	52

3.4. Высокопроизводительное экзомное секвенирование СНЕК2-ассоциированных карцином молочной железы	62
<b>ГЛАВА IV. ОБСУЖДЕНИЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b>	79
<b>ВЫВОДЫ</b>	88
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b>	89

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АС-ПЦР – аллель-специфическая полимеразная цепная реакция

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РМЖ – рак молочной железы

CNV – copy number variations, вариации копийности

ER – Estrogen Receptor, рецептор эстрогена

HRMA – High Resolution Melting Analysis, анализ кривых плавления с высоким разрешением

LOH – loss of heterozygosity, потеря гетерозиготности

NGS – Next generation sequencing, секвенирование нового поколения

OR – Odds ratio, отношение шансов

PR – Progesterone Receptor, рецептор прогестерона

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность проблемы

До 10% опухолей молочной железы являются наследственными [Cybulski et al., 2019]. Самые известные высокопенетрантные мутации в генах BRCA1 и BRCA2 объясняют около 40% семейных случаев рака молочной железы (РМЖ). СНЕК2-ассоциированные новообразования составляют значительную долю наследственного РМЖ. Клинические и молекулярные характеристики СНЕК2-ассоциированных опухолей отличаются как от BRCA1-ассоциированных карцином, так и от спорадических раков. Так, известно, что опухоли пациенток-носительниц мутаций BRCA1/2 чаще всего представлены т.н. «трижды-негативным» фенотипом, обладают характерными экспрессионными и мутационными профилями, а также 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 СНЕК2-ассоциированных опухолей молочной железы изучены менее обстоятельно. Известно, что СНЕК2-зависимые опухоли отличаются от BRCA1-ассоциированных и спорадических образований 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 СНЕК2-позитивных опухолей к антрациклинам и лучшей эффективности таксан-содержащих схем [Chrisanthar et al., 2008; Pfeifer et al., 2014].

Ген СНЕК2 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 (с.444+1G>A, p.E149Ifs\*6), с.1100delC (p.T367Mfs\*15) и del5395 (p.M304Lfs\*16). Все три мутации являются транкрирующими, 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 ведутся в Германии, Польше, Чехии [CHEK2 Breast Cancer Case-Control Consortium, 2004; Cybulski et al., 2019; Kleiblova et al., 2019]. В Российской Федерации данные мутации включены в диагностические генетические панели, однако систематической оценки встречаемости всех трех мутаций не проводилось. Существенным в данном аспекте также является и отсутствие клиничко-морфологической характеристики CHEK2-ассоциированных опухолей молочной железы.

Механизмы молекулярного патогенеза опухолей являются предметом пристального внимания исследователей. Понимание процессов, запускающих онкогенез наследственных опухолей, позволяет выявлять новые возможности и мишени для их терапии. С этой точки зрения чрезвычайно важным представляется изучение механизмов инактивации нормального аллеля в СНЕК2-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 СНЕК2 [Domagala et al., 2012; Kleiblova et al., 2019]. Такие различия могут носить принципиальный характер при выборе терапии.

### **Цель исследования**

Оценить молекулярно-генетические характеристики СНЕК2-ассоциированных опухолей молочной железы.

### **Задачи исследования**

1. Выполнить молекулярно-эпидемиологическое исследование частоты повторяющихся мутаций гена СНЕК2у больных раком молочной железы и здоровых контролей.
2. Оценить вклад разных мутаций СНЕК2 в заболеваемость раком молочной железы.
3. Сравнить клиничко-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-зависимых опухолей.

### **Новизна исследования**

Впервые выполнен систематический анализ соматического статуса локуса СНЕК2 в СНЕК2-ассоциированных опухолях. Выполнено масштабное исследование «случай-контроль» для определения вовлеченности 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. Высокопроизводительные исследования наследственных и спорадических опухолей молочной железы показали, что некоторые спорадические опухоли имеют характерный для BRCA-ассоциированных раков генетический профиль, т.н. BRCAness. Выявление среди СНЕК2-ассоциированных опухолей группы BRCA-подобных опухолей может значительно улучшить показатели выживаемости таких больных.

Наличие биологических различий в патогенезе СНЕК2-ассоциированных опухолей с разными мутациями является важным фактором диагностики и лечения данной разновидности новообразований.



## **Содержание исследования**

В данное исследование включены несколько выборок образцов. Для исследования вклада наследственных мутаций СNEК2 в заболеваемость раком молочной железы проанализированы образцы ДНК 1024 онкологически здоровых женщин и 1750 больных раком молочной железы. Было выполнено молекулярно-эпидемиологическое исследование «случай-контроль». Клинико-морфологические параметры СNEК2-зависимых опухолей были проанализированы для 91 пациентки. Молекулярно-генетические исследования опухолевой ткани СNEК2-ассоциированного РМЖ были выполнены для 46 случаев. Для образцов опухолевой ткани был осуществлён анализ статуса потери нормального аллеля СNEК2. 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), 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 клиничко-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 del5395, чем для опухолей связанных с мутациями 1100delC или IVS2+1G>A ( $p = 0,0007$  [OR: 7,11; 95% CI 1,54-40,5]).

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 102 страницах и состоит из введения, глав обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения полученных данных, заключения и выводов. Работа иллюстрирована 18 рисунками и 16 таблицами. Библиографический указатель включает 149 источников, в том числе 2 отечественных и 147 зарубежных.

## ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Синдром наследственного рака молочной железы и яичников

Наследственные опухолевые синдромы являются самой частой медико-генетической патологией: носительство онкоассоциированных генетических дефектов наблюдается примерно у 1-2% людей. У подобных индивидуумов наблюдается практически фатальное повышение риска возникновения новообразований.

В 1971 г. А. Knudson сформулировал 2-ударную модель возникновения раковых синдромов. Основной мишенью зародышевых мутаций являются т.н. “рецессивные онкогены”. Если в соматической клетке повреждён лишь один аллель подобного гена, то клетка остаётся фенотипически нормальной. Однако, если мутированы и материнская, и отцовская копии, то клетка приобретает черты злокачественной трансформации. В популяции всегда присутствуют люди, у которых мутация одного из аллелей рецессивного онкогена передана через гаметы. У таких людей все соматические клетки содержат лишь одну “здоровую” копию данного гена, что само по себе достаточно для поддержания нормального фенотипа. Однако, достаточно повреждения оставшегося (интактного) аллеля в любой из миллионов клеток органа-мишени, и возникнет клон с потенциями к злокачественному росту. Существенно, что если на уровне клетки подобные нарушения носят рецессивный характер - опасно лишь повреждение обоих аллелей, то на уровне организмов наследование происходит по доминантному типу. Носительство зародышевых раковых мутаций всегда гетерозиготное, т.к. соответствующие гомозиготные состояния, по-видимому, несовместимы с нормальным развитием эмбриона или вызывают тяжелые наследственные синдромы [Suspitsin et al., 2014].

Можно выделить ряд общих клинико-генетических характеристик наследственных опухолевых синдромов:

- отягощенный семейный анамнез – высокая частота заболевания у кровных родственников.
- ранний возраст возникновения опухоли - развиваются примерно на 20-25 лет раньше, чем «обычные», спорадические раки.
- наличие первично-множественных опухолей - поскольку наследственная мутация содержится во всех клетках организма, велика вероятность того, что она реализуется в более чем одном органе. В случае парных органов существует тенденция к билатеральному (двухстороннему) поражению. Опухоли могут возникать синхронно (одновременно в обоих органах), либо с существенным временным интервалом (метахронно).

Следует заметить, что ни один из перечисленных критериев наследственного рака не является абсолютным: так, у некоторых больных могут присутствовать все признаки, у других наблюдаются только некоторые, а в редких случаях у подтвержденных носителей наследственной мутации не отмечается ни одного из этих критериев. Однако необычно ранний возраст заболевания и/или отягощённый семейный анамнез и/или наличие синхронных или метахронных первично-множественных новообразований дают основание для проведения медико-генетического консультирования пациента или его родственников.

В 1866 году французский хирург и антрополог Поль Пьер Брока впервые описал семью, четыре поколения женщин которой заболевали раком молочной железы. Кроме того, он первый предположил наследственный характер данного заболевания [van der Groep et al., 2011].

Рак молочной железы (РМЖ) и рак яичников (РЯ) представляют собой заболевания одной и той же системы организма – репродуктивной, поэтому они характеризуются определенным сходством гормональных, метаболических и поведенческих факторов риска. Самый частый наследственный опухолевый синдром у человека - так называемый синдром наследственного РМЖ/РЯ (breast-ovarian hereditary cancer syndrome)

[Соколенко и соавт., 2010]. На долю наследственных случаев РМЖ и РЯ приходится около 10% случаев РМЖ и до 15-20% случаев РЯ.

В 1994 г. был открыт первый ген, ассоциированный с наследственным РМЖ и РЯ – BRCA1 (BRest CAncer 1), а годом позже – второй, BRCA2 [Hall et al., 1990; Miki et al., 1994]. Гомология в первичной последовательности генов BRCA1 и BRCA2 отсутствует. Несмотря на различие первичных последовательностей генов BRCA1 и BRCA2, имеются убедительные доказательства общности биологических функций данных генов. BRCA1 и BRCA2 гены имеют сходные профили экспрессии и внутриклеточную локализацию. Они экспрессируются в клетках многих тканей, причем уровни экспрессии одинаково меняются в течение клеточного цикла. Самый высокий уровень экспрессии наблюдается во время S-фазы, что указывает на их функционирование во время репликации ДНК [Venkitaraman et al., 2002].

Мутации генов BRCA1/2 характеризуются высокой пенетрантностью (до 70%) и широкой географической распространенностью [Risch et al., 2001; Singletary 2003]. Первые данные о причастности генов BRCA1 и BRCA2 к возникновению РМЖ и РЯ были получены на пациентках, проживающих в Европе и Северной Америке. Оказалось, что спектр мутаций в этих генах исключительно широк. Это обстоятельство значительно затрудняет диагностику соответствующих нарушений нуклеотидной последовательности; поэтому полноценный анализ BRCA1 и BRCA2 включает в себя не только полное секвенирование всех кодирующих участков этих, достаточно протяжённых, генов, но и детекцию изменений копийности (анализ делеции/дупликации отдельных экзонов с использованием метода MLPA – Multiple Ligation-dependent Probe Amplification).

Ещё в середине 1990-х гг. было обнаружено, что многие народности характеризуются выраженным «эффектом основателя» (“founder effect”) в отношении BRCA1 и BRCA2, т.е. преобладанием повторяющихся мутаций [Simard et al., 1994]. Хорошо известный пример «эффекта основателя» -

популяция евреев Ашкенази. Ашкеназами принято называть субэтническую группу людей, сформировавшуюся в Восточной и Центральной Европе в эпоху Средневековья (на территории таких стран, как Германия, Польша, Литва, Украина, Россия). Количество наследственных случаев рака молочной железы и яичников значительно выше среди евреев Ашкенази, что связано с происхождением данной популяции от небольшого числа предков и особенностями культуры (заключение браков внутри субэтнической группы). Общепопуляционная частота носительства «founder»-мутаций (BRCA1185delAG, BRCA1 5382insC, BRCA2 6174delT) среди евреев Ашкенази достигает 2,6%, в то время как в других популяциях она составляет 0,2% [Roa et al., 1996; Neuhansen et al., 1996]. Наоборот, у жителей Исландии практически все повреждения BRCA-генов сводятся к мутации BRCA2999del5 [Rebbeck et al., 2018]. Повышенная частота определенных аллельных вариантов в популяции чаще всего вызвана длительной географической или социальной изоляцией данной группы людей.

«Эффект основателя» для мутаций гена BRCA1 был обнаружен и в России [Gayther et al., 1997; Sokolenko et al., 2006]. К повторяющимся в российской популяции мутациям можно отнести следующие: BRCA1 5382insC, BRCA14153delA, BRCA1185delAG, BRCA2 6174delT. Инсерция цитозина в позиции 5382 гена BRCA1 (5382insC) составляет до 70-90% всех мутаций гена BRCA1 у пациенток, проживающих в достаточно отдалённых друг от друга регионах России – в Москве, Санкт-Петербурге, Краснодаре, Томске [Gayther et al., 1997; Грудина и соавт., 2005; Loginova et al., 2003; Sokolenko et al., 2006; Tereschenko et al., 2002]. Эта мутация также распространена среди пациентов в государствах с высокой долей славянского населения (Польша, Белоруссия, Латвия, Литва), так и в неславянских странах (Германия, Франция, Италия) [Rebbeck et al., 2018]. Встречаемость аллеля BRCA1 5382insC у здоровых женщин в России составляет примерно 0,1% [Sokolenko et al., 2014]. Данный вариант отвечает примерно за 2-5% общей заболеваемости РМЖ у славян. Среди пациенток «высокого риска», а

именно больных с наличием семейного онкологического анамнеза, билатерального поражения молочных желёз или ранним началом заболевания, данная мутация обнаруживается примерно в каждом десятом случае. Помимо BRCA1 5382insC, у российских больных РМЖ и РЯ наблюдается относительно частая встречаемость аллелей BRCA1 4153delA (4154delA) и BRCA1 185delAG. Мутация BRCA1 4153delA, по-видимому, имеет славянское происхождение, в то время как присутствие «еврейского» варианта BRCA1 185delAG скорее можно объяснить межэтническими браками [Rebbeck et al., 2018].

Достаточно подробно разработаны рекомендации для носительниц дефектных вариантов генов BRCA1 или BRCA2. Скрининг РМЖ у женщин с наследственной предрасположенностью к заболеванию заметно отличается от рекомендаций по ранней диагностике новообразований молочной железы в общей популяции. Пациенткам с выявленными мутациями в генах BRCA рекомендуется осуществлять обследования молочных желёз с интервалами раз в месяц, начиная с 18-летнего возраста. При этом только маммографии молочных желез недостаточно, необходимо включить в схему скрининга магнитно-резонансной томографии (МРТ). Также существует ряд рекомендаций и для скрининга РЯ [Имянитов, 2010].

До недавних пор лекарственное лечение РМЖ у больных с мутациями гена BRCA1 не отличалось от терапии спорадического заболевания. Однако в 2009 году польские ученые опубликовали результаты клинического исследования, показавшие высокую чувствительность опухолей, ассоциированных с мутациями BRCA1, к цисплатину [Byrski et al., 2009]. Подобный эффект связан с наличием уникального терапевтического окна. В опухолях у носительниц мутаций BRCA1 часто наблюдается полная инактивация упомянутого гена (потеря гетерозиготности – loss of heterozygosity, LOH), что приводит к дефекту гомологичной рекомбинации. BRCA1-дефицитные клетки исключительно уязвимы для цисплатина – препарата, вызывающего одно- и двунитевые разрывы ДНК. Существенно,

что нормальные ткани, в отличие от опухолевых, сохраняют гетерозиготный статус BRCA1, причем наличия единственной функциональной копии данного гена достаточно для выполнения его функций. Помимо цисплатина, перспективным направлением лечения наследственных раков является применение ингибиторов поли-АДФ-рибоз-полимеразы (PARP); некоторые PARP-ингибиторы уже зарегистрированы для клинического использования [Iyevleva and Imyanitov, 2016].

## 1.2. Ген CHEK2, киназа Chk2 и ее физиологическая роль в функционировании клеток

Ген CHEK2 (22q12.1) относится к онкосупрессорам и кодирует филогенетически консервативную ядерную серин-треониновую киназу, которая реагирует на повреждение ДНК и играет ключевую роль в поддержании целостности генома [Bartek et al., 2001]. Киназа Chk2, была обнаружена в 1998 году как гомолог дрожжевого белка Rad53 (*Saccharomyces cerevisiae*) и Cds1 (*Schizosaccharomyces pombe*) [Matsuoka et al., 1998]. Chk2 консервативен у мышей, крыс, *Danio rerio*, *Xenopus laevis*, *Drosophila melanogaster* и *Caenorhabditis elegans* [Zannini et al., 2014]. мРНК-транскрипт гена CHEK2 состоит из 16 экзонов, а белковый продукт содержит три основных домена: N-концевой SQ/TQ домен (аминокислоты 20–75), FHA (fork head-associated) домен (аминокислоты 112-175) и серин/треониновый киназный домен (аминокислоты 225-175). SQ/TQ кластер является регуляторным: с этим доменом связывается киназа ATM, которая активирует Chk2 в ответ на воздействие ионизирующей радиацией и других генотоксических агентов [Kastan and Bartek, 2004]. Домен FHA участвует в связывании с другими фосфорилированными белками, благодаря распознаванию фосфотреониновых остатков. Этот домен участвует в динамическом переходе протеин-фосфопротеин в процессе активации Chk2 и может влиять на другие функциональные регионы белка [Li et al., 2002].



Каталитический киназный домен имеет высокую гомологичность с другими серин-треониновыми киназами.

Активация киназы Chk2 в ответ на повреждение ДНК - это многоступенчатый динамический процесс, который приводит к торможению клеточного цикла до репарации ДНК и/или апоптозу клеток [Hirao et al, 2000, Cai et al., 2009]. В случае возникновения разрывов ДНК, Chk2 фосфорилируется протеинкиназой АТМ, что приводит к его гомодимеризации и активации [Harper et al., 2007]. Активированная протеинкиназа Chk2 отделяется от локуса повреждения и запускает дальнейший каскад фосфорилирования (Рисунок 1). Спектр известных в настоящее время субстратов фосфорилирования включает белки, вовлеченные в контроль клеточного цикла, апоптоз и репарацию ДНК: опухолевый супрессор TP53, циклин-зависимая киназа CDC25C, транскрипционные факторы E2F1 и FOXM1, белки BRCA1 и BRCA2 [Magni et al., 2014; Zannini et al., 2014]. Таким образом, Chk2 регулирует клеточное деление в ответ на повреждение ДНК. Кроме того, Chk2 обладает функциями независимыми от присутствия повреждений ДНК: участвует в процессах модификации структуры ДНК, продвижении клеток по клеточному циклу. По данным атласа белков человека (The Human Protein Atlas, <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000183765-CHEK2/tissue>) CHEK2 экспрессируется в широком спектре тканей (Рисунок 2). В большинстве исследований уровень экспрессии мРНК CHEK2 коррелирует с уровнем экспрессии белка [Uhlen et al., 2017].

Рисунок 1. Сигнальный каскад Chk2 [по Apostolou et al 2017].

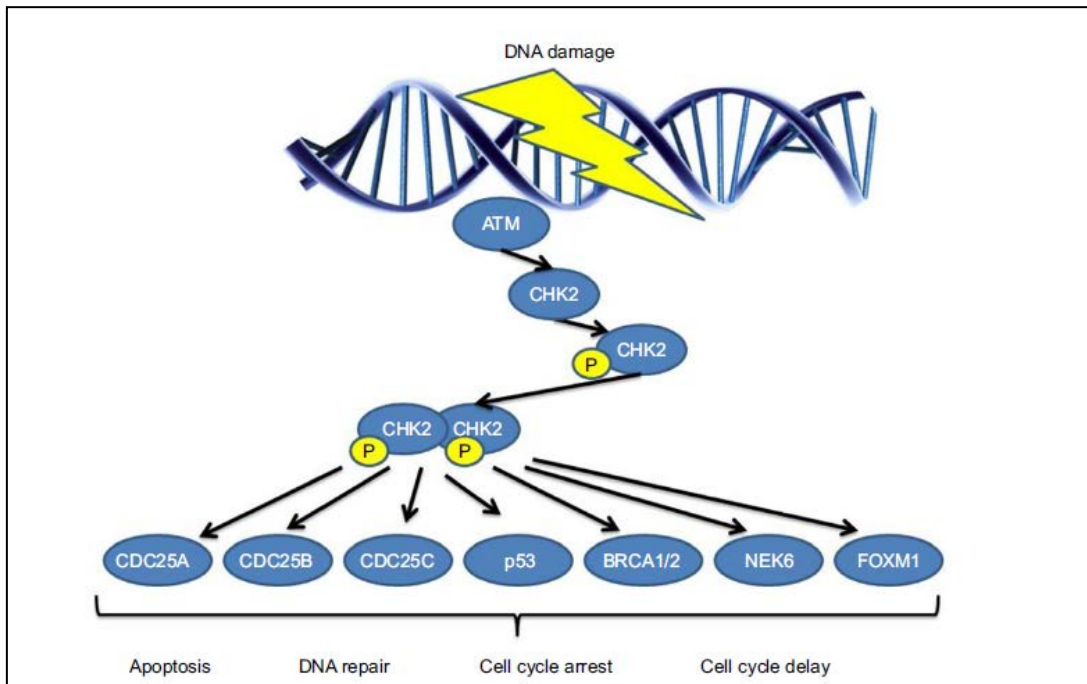
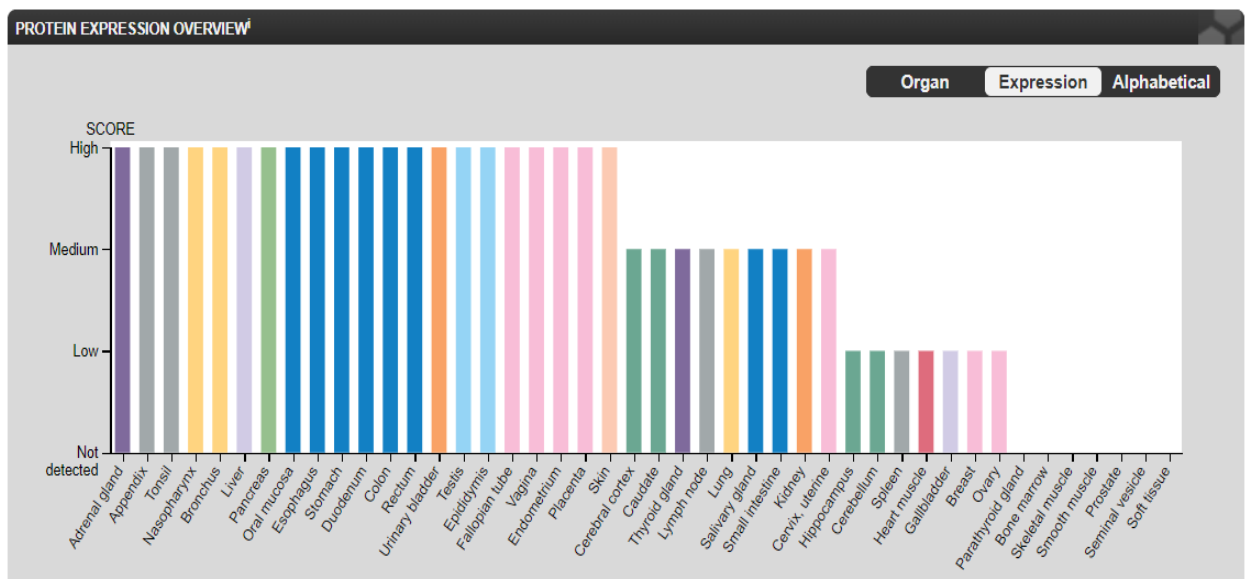


Рисунок 2. Уровень белковой экспрессии Chk2 в тканях разных органов (по данным The Human Protein Atlas, <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000183765-CHEK2/tissue>). Уровень экспрессии оценивается по интенсивности окраски и количеству окрашенных клеток: high: интенсивное окрашивание более 25% клеток; medium: умеренное окрашивание 25-75% клеток или интенсивное окрашивание <25%; low: слабое окрашивание 25-75% клеток или умеренное окрашивание <25%.



### 1.3. Наследственные мутации СНЕК2: спектр, частота мутаций и их функциональные последствия

Впервые мутации в гене СНЕК2 упоминаются в роли причин наследственного рака в работе Bell et al.: было обнаружено 3 различные мутации в семьях с наследственным синдромом Ли-Фраумени [Bell et al., 1999]. 2 варианта (1100delC и 470T>C (I157T)) с тех пор широко изучаются с точки зрения предрасположенности к раку молочной железы (и другим опухолям). Это открытие стало новым шагом в изучение наследственных форм РМЖ.

В 2002 году научные коллективы из Нидерландов и Финляндии продемонстрировали убедительную связь мутации 1100delC предрасположенностью к раку молочной железы [Meijers-Heijboer et al., 2002; Vahteristo et al., 2002]. Данная мутация приводит к сдвигу рамки считывания и появлению стоп-кодона (p.T367Mfs\*15). В 2004 было поведено масштабное исследование «случай-контроль», в него было включено 10860 случаев РМЖ и 9065 контролей из 10 европейский научных центров [The СНЕК2 Breast Cancer Case-Control Consortium, 2004]. Была показана очевидная связь мутации 1100delC с риском развития рака молочной железы (OR 2,34; 95% CI 1,72–3,20; p = 0,0000001).

Частота аллеля 1100delC в европейской популяции составляет 0,2-1,5% [Zhang et al., 2008]. Среди российских пациенток встречаемость аллеля 1100delC варьирует от 1% в неселективной группе РМЖ (последовательные случаи) до 4% в семейных случаях [Chekmariova et al., 2006; Sokolenko et al., 2007]. Риск возникновения РМЖ у женщин–носительниц мутации 1100delC увеличивается в 1,4–4,7 раза. В редких случаях данный дефект обнаруживается в гомозиготном состоянии. При этом риск развития РМЖ также увеличивается вдвое по сравнению с гетерозиготным носительством [Huijts et al., 2013; Adank et al., 2011]. Мутация СНЕК2 1100delC ассоциирована с дополнительным риском развития контралатерального РМЖ, а также с плохими показателями долгосрочной безрецидивной и

общей выживаемости и выживаемости без появления отдаленных метастазов [DeBrock et al., 2004; Schmidt et al., 2007; Kriege et al., 2014; Fletcher et al., 2009].

Чуть менее изучены другие повторяющиеся транкирующие мутации СНЕК2: сплайсинговая мутация СНЕК2 IVS2+1G>A и крупная делеция, затрагивающая экзоны 9 и 10 (del5395). Мутация IVS2 +1G>A в сайте сплайсинга экзона 2 СНЕК2 приводит к нарушению границ сшиваемых экзонов, появлению в мРНК лишних 4 нуклеотидов и сдвигу рамки считывания, что в итоге выражается в синтезе усечённого белка с нарушенными функциями (p.E149fs\*6). Впервые она была обнаружена в США у больного с наследственной формой рака простаты [Dong et al., 2003]. Этот аллель встречается также в Германии (0-0,4%), Польше (0,3%) и Белоруссии (0,2%) [Cybulski et al., 2004, Bogdanova et al., 2005]. Носительство этого аллеля ассоциировано с двукратным повышением риска развития РМЖ [Bogdanova et al., 2005]. Исследование на выборке женщин из Восточной Европы показало, что популяционный риск развития РМЖ в течение жизни составил 6%, но у женщин-носительниц мутаций 1100delC или IVS2 +1G>A СНЕК2 при отсутствии РМЖ у родственников – уже 20%, при наличии мутации и выявленном РМЖ у одного родственника второй линии – 28%, при наличии мутации и выявленном РМЖ у одного родственника первой линии – 34%, при наличии мутации и нескольких поражённых родственников – 44% [Cybulski et al., 2011; Weischer et al., 2008].

Делецию 5395 нуклеотидов, затрагивающую 9-10 экзоны СНЕК2, описали Walch et al., 2006 у пациентов с раком молочной железы восточно-европейского происхождения. Идентифицировать данное повреждение удалось при помощи анализа длин рнк-транскрипта гена СНЕК2. Встречаемость данной мутации варьирует у больных от 1,1% у неселектированных пациенток до 2,3% у пациенток с семейным анамнезом [Cybulski et al., 2011; Cybulski et al., 2019]. OR для пациенток с семейным анамнезом достигает 6,5 (95%CI 3.2-13.4).

Существуют и другие транквирующие варианты (с.277delT, p.D265\_H282del, del5601), встречающиеся, например, у пациентов из Чехии [Kleiblova et al., 2019]. Однако вклад данных повреждений в предрасположенность к РМЖ среди российских пациентов не изучен.

Таким образом, для популяции российских пациентов Северо-западного региона характерны 3 повторяющиеся мутации гена СНЕК2: 1100delC, del5395, IVS2+1G>A. Эти же мутации характерны для пациентов из Польши, Германии, Финляндии, Чехии.

Описан также ряд миссенс-вариантов СНЕК2. В отличие от транквирующих мутаций, приводящих к утрате функции белка и, в подавляющем большинстве, патогенных, значение однонуклеотидных вариантов, сопровождающихся заменой аминокислоты (миссенс) установить сложнее. К числу миссенс-аллелей СНЕК2, которые могут иметь потенциальное клиническое значение по результатам *in silico* предикторов, функциональных экспериментов и анализа родословных, относятся p.E64K, p.R145W, p.I160M, p.G167R, p.I189V, p.Y424H, p.S428F [Roeb et al., 2012; Kleiblova et al., 2019]. Самой частой миссенс-мутацией, ассоциированной с различными типами новообразований, является замена p.I157T. Однако, ее влияние на риск развития РМЖ относительно небольшой [Han et al., 2013]. Аминокислотная замена p.H371Y относится к числу «founder»-вариантов, встречающихся в Китае [Liu et al., 2015].

Функциональным последствиям даже самой известной мутации СНЕК2 – 1100delC – посвящено достаточно мало работ. Однонуклеотидная делеция приводит к сдвигу рамки считывания и формированию стоп-кодона в позиции 381 в 10-ом экзоне (киназный домен) белка. Транскрипты с преждевременным сигналом остановки трансляции у эукариот могут являться мишенью нонсенс-опосредованного распада мРНК (nonsense-mediated mRNA decay, NMD) – консервативного процесса, основной функцией которого является предотвращение синтеза дефектных белков [Fatscher et al., 2015]. В исследованиях на лимфобластоидных клеточных

культурах от носителей данной делеции было показано, что, действительно, за счет NMD количество мутантных транскриптов существенно снижено (до 20-25%) по сравнению с мРНК дикого типа [Jekimovs et al., 2005; Anczukow et al., 2008; Nguyen-Dumont et al., 2011]. Кроме того, несмотря на присутствие небольшой фракции мРНК с делецией, соответствующий дефектный белок полностью отсутствовал в клетках носителей мутаций [Jekimovs et al., 2005; Anczukow et al., 2008]. Вероятным объяснением этого факта может быть сниженная стабильность мутантного белка [Sodha et al., 2006]. Также было зафиксировано снижение количества полноразмерного полипептида СНЕК2 и эффективности его АТМ-опосредованного фосфорилирования в клетках у гетерозиготных носителей мутации [Vahteristo et al., 2002; Dong et al., 2003; Jekimovs et al., 2005]. Таким образом, патогенный эффект делеции СНЕК2 1100delC, по-видимому, реализуется за счет уменьшения количества функционального белка.

Относительно двух других «транскирующих» вариантов СНЕК2 – IVS2+1G>A и делеции 9-10 экзонов - существует значительно меньше экспериментальных данных. Мутация СНЕК2 IVS2+1G>A нарушает донорский сайт сплайсинга во втором интроне, что приводит к использованию альтернативного сайта, 4-нуклеотидной инсерции и к образованию стоп-кодона в позиции 154 в экзоне 3 (FHA-домен) [Dong et al., 2003]. При изучении иммортализованных лейкоцитов от носителя данной замены было показано, что мутантный аллель может экспрессироваться на уровне мРНК, и что уровень нормального белка СНЕК2 значительно снижен [Dong et al., 2003]. Реализуется ли, и в какой степени, механизм NMD, и присутствует ли укороченный белок в случае данной мутации, неизвестно.

Делеция СНЕК2 del5395 приводит к утрате экзонов 9 и 10 с последующим образованием стоп-кодона в той же позиции (кодон 381), что и при мутации СНЕК2 1100delC [Walsch et al., 2006]. Мутантный СНЕК2 del5395-транскрипт, таким образом, отличается от 1100delC-транскрипта только отсутствием двух экзонов (9 и 10), и также может становиться

субстратом для NMD. Тем не менее, данный вариант был детектирован в кДНК из лимфоцитов, что свидетельствует о, по крайней мере, неполной элиминации мутированной мРНК по механизму нонсенс-опосредованного РНК-распада [Walsch et al., 2006]. Экспрессия белка в случае мутации CHEK2 del5395 до сих пор не изучалась.

#### **1.4. Иммунофенотипические и клинические особенности CHEK2-ассоциированных опухолей**

В соответствии с общепринятой мировой практикой иммунофенотипически опухоли молочной железы разделяют на несколько подтипов. Для определения подтипа рекомендовано использование 4 иммуногистохимических маркеров:

- ERBB2 (HER2, рецептор эпидермального фактора роста 2);
- ESR1 (ER, рецептор эстрогена 1);
- PGR (PR, рецептор прогестерона);
- MKI67 (маркер пролиферации Ki-67, маркер, экспрессирующийся в делящихся клетках) [Goldrich et al., 2013].

CHEK2-ассоциированные опухоли по иммунофенотипической молекулярной классификации в основном представлены люминальными вариантами [Domagala et al., 2012; Huszno et al., 2019] (Таблица 1). Domagala et al., 2012 показали, что опухоли, содержащие транквирующие мутации CHEK2, чаще всего относятся к люминальному В подтипу, а опухоли ассоциированные с заменой I157T – к люминальному А. Каждый из подтипов характеризуется определенным паттерном нарушений копийности ДНК, так для люминального В подтипа характерно большее количество амплификаций («амплифицирующий паттерн»), чем для люминального А варианта [Kwei et al., 2010]. Таким образом, транквирующие CHEK2 мутации скорее ассоциированы с высоким уровнем амплификаций и нарушений копийности.

Большинство (80-90%) СNEK2-ассоциированных опухолей демонстрируют экспрессию рецепторов эстрогена (ER) вне зависимости от типа наследственной мутации [Domagala et al., 2012]. Несмотря на то, что пациенты с ER/PR-позитивными опухолями обычно имеют лучший прогноз, СNEK2-зависимые опухоли (в частности с мутацией 1100delC) демонстрируют неблагоприятное течение заболевания [deBock et al., 2004; Chevallier et al., 1988]. Nagel et al. подтвердили преимущественно люминальный характер СNEK2-ассоциированных опухолей методом высокопроизводительного экспрессионного анализа [Nagel et al., 2012].

Что касается гистологических характеристик СNEK2 опухолей, некоторые исследования показывают корреляцию СNEK2-ассоциированных опухолей с лобулярным строением. Однако такая ассоциация сохраняется только для случаев с мутацией I157T [Huzarski et al., 2005; Domagala et al., 2012].

Таблица 1. Основные иммунофенотипические характеристики опухолей молочной железы.

Подтип РМЖ	Иммунофенотипическое описание
Люминальный А	HER2 – негативный ER – позитивный PR – позитивный Ki-67 – низкий (менее 14%)
Люминальный В (HER2-)	HER2 – негативный ER – позитивный PR – низкий или негативный И/ИЛИ Ki-67 - высокий
Люминальный В (HER2+)	HER2 – позитивный ER – позитивный PR – любой Ki67 – любой
HER2-позитивный	HER2 – гиперэкспрессия или амплификация ER – негативный PR - негативный
Базальный (трижды негативный)	HER2 – негативный ER – негативный PR - негативный



Рекомендации ведущих европейских и американских онкологических ассоциаций не дают конкретных представлений по ведению пациенток с РМЖ при наличии мутаций в гене CHEK2. Результаты систематических клинических исследований чувствительности CHEK2-ассоциированного РМЖ на данный момент не опубликованы. Однако несколько клинических исследований для носительниц CHEK2-ассоциированных опухолей по данным базы ClinicalTrials на данный момент осуществляются. В конце 2017 года стартовало исследование олапариба (II фаза) для лечения метастатического рака молочной железы (NCT03344965). Критериями включения является наличие наследственной мутации в одном из РМЖ-ассоциированном гене средней пенетрантности: CHEK2, ATM, PALB2, RAD51, BRIP1, NBN. Кроме того, в исследования допускаются пациенты с соматическими мутациями BRCA1 или BRCA2. Исследование проводится на базе Института онкологии Дана-Фарбер (Бостон, США) при поддержке Университета Джона Хопкинса (Балтимор, США) и компании Астразенека. Аналогичное исследование с 2018 года ведется в Калифорнийском Университете (Сан-Франциско, США) (NCT03344965), однако критерии включения в нем значительно шире: допускаются носители наследственных мутаций в генах ATM, ATR, BARD1, BRIP1 (FANCI), CHEK2, FANCA, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCM, MRE11A, NBN, PALB2, RAD50, RAD51C, RAD51D. Олапариб является одним из PARP-ингибиторов. Предполагается, что по аналогии с BRCA1/2-ассоциированными опухолями, мутации в других генах системы репарации также могут быть связаны с чувствительностью к PARP-ингибиторам. Исследование эффективности олапариба в Университете Джона Хопкинса также ведется для почечно-клеточного рака у пациентов с соматическими или наследственными мутациями в генах BAP-1, ATM, BRCA1, BRCA2, PALB2, CHEK2, BRIP1, RAD51C, BARD1, CDK12, CHEK1, FANCL, PP2R2A, RAD51B, RAD51D и RAD54L (NCT03786796). Первые результаты перечисленных клинических исследований будут опубликованы в 2020-2021 гг.

Клиническое исследование ассоциации между наследственными мутациями и уровнем PD-L1 экспрессии в опухолевой ткани проводится в Республиканском клиническом онкологическом центре (Казань, Россия) (NCT03495544). В исследование будут включены как случаи наследственных опухолей, так и спорадические РМЖ. Ожидается, что исследование позволит оптимизировать выбор групп пациентов для анти-PD-L1 терапии. Список генов, мутации в которых будут учитываться в исследовании, довольно значителен. В него вошло 35 генов, в том числе BRCA1/2, CHEK2, PALB2, ATM и др.

Существуют и отдельные исследования взаимосвязи между наследственными мутациями CHEK2 и эффективностью терапии. Первая работа, в которой сообщается о связи между мутацией в гене CHEK2 и резистентности к неoadьювантной терапии, было опубликовано Chrisanthar et al. в 2008 году. В данной работе биопсийный материал от 109 пациентов, получавших терапию эпирубицином, был протестирован на наличие CHEK2 мутаций. В результате, было выявлено два случая патогенной мутации CHEK2R95X и один случай с мутацией I364T. В опухолях носителей мутаций R95X наблюдалась потеря гетерозиготности. Обе карциномы прогрессировали на фоне проводимой химиотерапии. Аналогичные результаты были получены для CHEK2-ассоциированного рака яичника [Ow et al., 2014]. Существенно, что наличие именно транквирующих мутаций было ассоциировано с худшими показателями выживаемости.

В голландском исследовании было установлено, что CHEK2 1100delC-ассоциированный РМЖ связан с более высоким риском развития контралатерального РМЖ, а также с худшими показателями 6-летней выживаемости после постановки диагноза [Kriege et al., 2014]. Дифференциальная чувствительность к адьювантной химиотерапии у пациентов с мутацией в CHEK2 не наблюдалась. В представленной работе было генотипировано 4722 пациента на наличие мутации гена CHEK2 1100delC и выявлено 193 носителя мутации. Не было отмечено

существенных различий по размеру опухоли, статусу лимфоузлов, гистологической степени злокачественности и экспрессии HER2 между носителями мутации CHEK2 1100delC и контрольной группой. В результате проведенного анализа показателей выживаемости было установлено, что безрецидивная и общая выживаемость по заболеванию были одинаковыми в течение первых 6 лет от момента проведения лечения как для пациентов с мутацией CHEK2 1100delC, так и для пациентов без мутации. Однако после 6 лет показатели выживаемости пациенток-носительниц CHEK2-мутации оказались значительно хуже вне зависимости от проведения полихимиотерапии.

Частота мутации в гене CHEK2 1100delC в Нидерландах относительно высока: 1% в общей популяции, 2–4% у пациентов больных РМЖ и 5–6% у пациентов с диагнозом РМЖ с наличием семейного анамнеза [Tung et al., 2016]. В другом голландском исследовании были приведены данные о том, что высокий процент возникновения контралатерального РМЖ был связан с проведением лучевой терапии [Broeks et al., 2004]. В данной работе пациентки с контралатеральным РМЖ разделены на две группы: женщины, которым было проведено лучевое лечение в составе комплексного лечения по поводу РМЖ и пациентки без проведенной лучевой терапии. Отмечено, что наибольший процент носителей CHEK2 был выявлен среди тех пациенток с двусторонним РМЖ, которые получали лучевую терапию при лечении первой опухоли. Повреждающее ДНК воздействие – лучевая терапия – может оказывать неблагоприятный эффект на пациентов с мутацией CHEK2 из-за нарушения процессов репарации и приводить к повышению риска развития рака контралатеральной молочной железы. Этот факт целесообразно учитывать при планировании лечения таких пациенток.

В НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова было выполнено сравнение эффективности антрациклин- и таксан-содержащих схем неoadьювантной химиотерапии при раке молочной железы у носителей мутаций CHEK2, BRCA1 и пациенток без мутаций: у носителей патогенных аллелей гена

СНЕК2 не было зарегистрировано ни одного полного регресса, а частота объективных ответов была достоверно ниже, чем у пациентов как со спорадическими карциномами, так и BRCA1-индуцированными опухолями [Pfeifer et al., 2014]. Более того, данные различия были особенно выражены в группе карцином, подвергшихся лечению антрациклинами без использования таксанов. С другой стороны, было показано, что наличие наследственной мутации СНЕК2 р.Н371У ассоциировано с большей частотой патологического ответа на неоадьювантную терапию, особенно при комбинированном применении антрациклинов и таксанов [Liu et al., 2015].

Таким образом, данные об эффективности различных видов терапии для носителей СНЕК2 мутаций весьма противоречивы. Эти пациентки характеризуется относительно неблагоприятным течением заболевания, поэтому подбор оптимальных схем химиотерапии представляется актуальной задачей.

### **1.5. Инактивация аллеля дикого типа в СНЕК2-ассоциированных карциномах и другие клинико-биологические особенности опухолей**

Возникновение злокачественных новообразований у лиц, страдающих наследственными опухолевыми синдромами, исторически считалось связанным с соматической инактивацией оставшейся копии соответствующего гена («потеря гетерозиготности», loss of heterozygosity, LOH). Опухоли, возникающие у носителей наследственных мутаций в генах BRCA1 и BRCA2, характеризуются уникальной чувствительностью к препаратам платины и ингибиторам фермента PARP (poly (ADP-ribose) polymerase). Это свойство связано с особенностью их патогенеза, а именно с соматической утратой оставшегося аллеля вовлечённого гена в опухолевых клетках. В результате формируется уникальное терапевтическое окно: в то время как нормальные клетки организма сохраняют интактным хотя бы один из аллелей генов BRCA1 и BRCA2 и, таким образом, характеризуются сохранностью механизмов репарации ДНК, опухолевые клетки отличаются

селективной утратой функции одного из перечисленных генов и, следовательно, снижением способности восстанавливать структуру ДНК после повреждений [Sodha et al., 2002; Oldenburg et al., 2003; Jekimovs et al., 2005; Suspitsin et al., 2014]. В основе повышенной «уязвимости» BRCA-зависимых новообразований лежит недостаточность гомологичной репарации, связанная, в большинстве случаев, с утратой аллеля дикого типа [Neuhausen et al., 1994; Imyanitov, Byrski, 2013]. Оказалось, что определённые категории спорадических РМЖ (а также ряд опухолей других локализаций - рак яичника, рак поджелудочной железы, рак простаты) по своим биологическим свойствам являются фенотипами наследственных BRCA1/2-зависимых карцином. При этом в некоторых из них выявляются соматические мутации BRCA1/2 или альтернативные механизмы инактивации этих генов [Hennessy et al., 2010; Stefansson et al., 2012]. Данный феномен стали обозначать термином «BRCAness», подразумевающим схожесть с BRCA-индуцированными опухолями. В настоящее время понятие «BRCAness» расширилось и обозначает наличие в опухоли дефектной системы гомологичной рекомбинации повреждений ДНК в отсутствие наследственных дефектов BRCA1/2; молекулярными причинами этого фенотипа могут быть повреждения самых разных генов [Lord and Ashworth, 2016]. У «BRCA-подобных» новообразований есть ряд особенностей: для них характерны своеобразные мутационные паттерны и профили хромосомных перестроек [Lips et al., 2011; Abkevich et al., 2012; Birkbak et al., 2012; Popova et al., 2012; Vollebergh et al., 2014], а также особые экспрессионные профили [Konstantinopoulos et al., 2010; Severson et al., 2015]. Предложен также функциональный тест для определения недостаточности системы рекомбинационной репарации ДНК [Shah et al., 2014]. Важно, что фенотип «BRCAness» коррелирует с чувствительностью опухоли к препаратам платины и PARP-ингибиторам [Schouten et al., 2015; Telli et al., 2016].

В BRCA1-ассоциированных опухолях молочной железы потеря гетерозиготности локуса BRCA1 встречается достаточно часто – до 90%

случаев [Maxwell et al., 2017]. Кроме того, замечено, что спорадические опухоли молочной железы с соматической инактивацией одной из копий BRCA1 по клинико-морфологическим характеристикам напоминают опухоли с наследственными мутациями [Rhiem et al., 2010]. Дополнительные соматические мутации в качестве инактивации второго аллеля среди BRCA-ассоциированных опухолей практически не описаны. Однако описаны случаи соматического восстановления функции BRCA1/2 за счет появления второй мутации в BRCA1/2-зависимых опухолях яичника [Norquist et al., 2011]. Восстановление функции BRCA1/2 ассоциировано с резистентностью к препаратам платины и, вероятно, PARP-ингибиторам. В соответствии с современными рекомендациями, наличие соматической мутации BRCA1 в опухолях молочной железы или яичников позволяет использовать препараты платины и PARP-ингибиторы в терапии [Gori et al., 2019].

Вопрос о внутриопухолевом статусе нормального аллеля CHEK2, т.е. о наличии или отсутствии т.н. «потери гетерозиготности» (loss of heterozygosity, LOH) представляет особый интерес, так как полная функциональная инактивация гена может приводить к дефекту гомологичной репарации ДНК и повышенной чувствительности опухолевых клеток к терапии ДНК-повреждающими цитостатиками (цисплатин, митомицин и т.д.). Биаллельная инактивация CHEK2 - один из вероятных механизмов формирования фенотипа «BRCAness» [Lord and Ashworth, 2016]. Потеря гетерозиготности при CHEK2-индуцированных РМЖ встречается реже, чем при BRCA-ассоциированных опухолях [Sodha et al., 2002; Oldenburg et al., 2003; Jekimovs et al., 2005; Suspitsin et al., 2014]. В работе Suspitsin et al., 2014 частота данного события составила 3/18 (17%), при этом все три опухоли с LOH были получены от женщин с мутацией CHEK2 del5395. Соматические мутации CHEK2 в опухолях молочной железы по данным базы COSMIC обнаруживают примерно в 1,2% случаев. Такие мутации преимущественно представлены однонуклеотидными заменами и не рассматриваются в качестве соматической инактивации гена CHEK2. По данным базы cBioPortal

транскируемые соматические мутации встречаются в не более, чем 1% опухолей разных типов (среди них рак легкого, рак толстой кишки, рак почки). Примечательно, что для немногих описанных случаев спорадических опухолей молочной железы с соматическими мутациями СНЕК2, также как и для наследственных опухолей не характерны соматические мутации в гене TP53 [Sullivan et al., 2002].

### **1.6. Высокопроизводительные исследования СНЕК2-ассоциированных опухолей**

Развитие высокопроизводительных методов генетического анализа значительно увеличило количество данных о различиях и сходствах экспрессионных и генетических паттернов разных подтипов РМЖ. Так в 2010 году по результатам нескольких высокопроизводительных экспрессионных и геномных исследований были определены генетические паттерны, характерные для разных категорий РМЖ. Для люминального В подтипа характерным оказалось большое количество амплификаций, особенно в сайтах 8p12 (*FGFR1*), 8q24 (*MYC*), 11q13 (*CCND1*), 12q15 (*MDM2*), 17q12 (*ERBB2*) и 20q13 (*ZNF217*) [Kwei et al., 2010]. Для BRCA1-ассоциированных опухолей, как и для спорадических трижды-негативных случаев, оказалось характерным значительное количество низкоамплитудных вставок и делеций, а также вариаций копийности.

Nagel et al., 2012 выполняли прицельное исследование экспрессионных паттернов СНЕК2-ассоциированных опухолей (1100delC). Группе исследователей удалось выявить 40 генов, дифференциально экспрессирующихся в СНЕК2-ассоциированных случаях, среди них: СНЕК2, RECQL5, ZNF333, MRCL3, MKL1.

Аналогичное исследование Muranen et al., 2016 выявило 7 участков вариации копийности, которые характерны для СНЕК2-зависимых опухолей, а именно утрату участков 1p13.3-31.3, 8p21.1-2, 8p23.1-2и17p12-13.1, и увеличение копийности 12q13.11-3, 16p13.3и 19p13.3. Результаты этого

исследования также показали, что WNT-сигнальный путь является в значительной степени драйверным для CHEK2 1100delC мутантных опухолей.

На результаты оценки вариаций копийности значительный эффект могут оказывать опухоль-инфильтрирующие лимфоциты. Однако высокий уровень инфильтрации в большей степени характерен для базального подтипа РМЖ [Massink et al., 2015]. В исследовании Massink et al. потеря гетерозиготности в локусе CHEK2 была продемонстрирована в 4/14 (28,6%) 1100delC мутантных случаев. Однако авторы отмечают, что потеря хромосомы 22 характерна не только для CHEK2-ассоциированных опухолей.

Исследование генетического паттерна CHEK2-ассоциированных опухолей было выполнено Mandelker et al в 2019 году. На основании результатов экзомного (The Cancer Genome Atlas) и таргетного (Memorial Sloan Kettering-Integrated Mutation Profiling of Actionable Cancer Targets) секвенирования из открытых баз данных были охарактеризованы 16 пациентов с высокопатогенными мутациями (транскирующие, мутации сплайс-сайтов, патогенные замены) и 17 пациентов с мутацией I157T. Соматические мутации были в целом представлены мутациями генов, характерных для ER-позитивного РМЖ: PIK3CA, GATA3, CDH1. Мутации TP53 оказались нехарактерными для группы опухолей с высокопатогенными мутациями. Данное исследование представляет одно из немногих систематических анализов статуса потери гетерозиготности в CHEK2-зависимых опухолях. Так, среди опухолей с высокопатогенными мутациями частота потери гетерозиготности составила 81% (13/16), а с мутацией I157T только 29% (5/17,  $p = 0,005$ ). По клинико-морфологическим и генетическим характеристикам CHEK2-ассоциированные опухоли значительно отличаются от BRCA1-зависимых, но более похожи на ATM-ассоциированные карциномы.

Высокопроизводительные геномные исследования показали, что потеря BRCA1 или BRCA2 приводит к возникновению в опухоли



конкретного паттерна нуклеотидных замен, обозначенных как сигнатура 3 [Nik-Zainal et al., 2016; Polak et al., 2017]. Данная сигнатура ассоциирована с утратой функций BRCA1 или BRCA2, однако проявляется и в других типах опухолей. Предполагается, что наличие сигнатуры 3 может свидетельствовать о наличии дефекта гомологической рекомбинации. Кроме того, вероятно, сигнатура 3 отражает степень патогенности наследственной мутации. В исследовании Polak et al., 2017 ATM- и CHEK2-зависимые опухоли не были ассоциированы с высоким уровнем сигнатуры 3. Опухоли с наследственными мутациями PALB2 и BARD1, напротив, продемонстрировали высокий уровень указанной сигнатуры.

## ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Материалы

Для 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. Коллекция образцов ДНК больных была представлена «последовательными» случаями, а также образцами, поступившими в лабораторию в диагностических целях. Средний возраст больных составил 50,4 года (24-84). Средний возраст женщин в контрольной группе составил 43,4 (18-75).

Для анализа клиническо-морфологических особенностей развития СНЕК2-ассоциированных опухолей были проанализированы истории болезней 91 пациентки, положительный статус наследственных мутаций СНЕК2 которых был определен в ходе лечения. Статус СНЕК2 определялся на базе научной лаборатории молекулярной онкологии. 27 пациенток проходили лечение в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова, 9 пациенток - в Санкт-Петербургском клиническом научно-практическом онкологическом центре, 54 пациентки – в Ленинградском областном онкологическом диспансере, 1 пациентка – в Первом Санкт-Петербургском Государственном Медицинском Университете им. акад. И.П. Павлова.

Опухолевый материал для молекулярно-генетического исследования был доступен в 46 случаях. От 20 пациенток был получен свежий опухолевый материал. Образец карциномы, полученный при оперативном лечении, транспортировался в лабораторию и хранился до выделения ДНК при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Для 26 пациенток опухолевый материал был представлен архивными

патоморфологическими блоками. Для исследования соматического статуса гена СNEK2 были собраны пары образцов – ДНК, выделенная из лимфоцитов периферической крови и ДНК, выделенная из опухолевого материала (архивные парафиновые блоки и/или свежемороженая ткань). В данной группе были исследованы «хемонаивные» опухоли до начала лечения.

## **2.2. Методы**

### **2.2.1. Выделение ДНК из лимфоцитов периферической крови**

Для анализа наследственных мутаций использовалась ДНК, выделенная из лимфоцитов периферической крови. Выделение ДНК проводилось посредством модифицированного соль–хлороформного метода [Müllenbach et al., 1989]. Использовалась кровь, собранная в вакуумные пробирки, содержащие ЭДТА. Гипоосмотический лизис эритроцитов достигался посредством 3-кратного разведения 5 мл крови дистиллированной водой, охлажденной до +4 °С. Затем лейкоциты осаждали центрифугированием. Полученный осадок ресуспендировали в 1 мл раствора Трис-НСl (рН = 8,3), 1 мМ ЭДТА. Для разрушения цитоплазматической мембраны клеток к суспензии добавляли Тритон Х-100 до конечной концентрации 1%. Ядра осаждали центрифугированием. Осадок вновь ресуспендировали в 1 мл Трис-НСl (рН = 8,3) и лизировали посредством добавления лаурилсульфата натрия до конечной концентрации 1%. Протеолиз белков и деградация комплексов «белок-ДНК» осуществлялась посредством инкубации пробы в присутствии протеиназы К (200 мкг/мл) при +60°С в течение 12 часов. Затем к лизату добавляли раствор NaCl до конечной концентрации 1.5М и равный объем хлороформа. Экстракция проводилась в течение 30 минут при медленном покачивании с целью удаления из раствора ДНК нерастворимых компонентов клеточного лизата – белков и липидов. Последующее центрифугирование приводило к

образованию в пробирке трех четко различимых фаз. Верхняя водная фаза содержала растворенную ДНК и неорганические соли, промежуточная – белки, а нижняя (хлороформная) – гидрофобные компоненты. Для осаждения ДНК к осторожно отобранной верхней фазе добавляли два объема абсолютного этанола и оставляли на 20 минут при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ . Осадок затем собирали центрифугированием в течение 5 минут при 12000 g. Отмывание осадка от солей производили в 1 мл 70% этанола и затем, после центрифугирования, растворяли в 0,5 мл 200 мМ раствора Трис-ЭДТА (pH = 7,6). Полученный раствор ДНК хранился при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  до использования в исследовании.

### **2.2.2. Выделение ДНК из опухолевого материала**

Для анализа опухолевого материала 26 пациенток использовались операционные архивные патоморфологические блоки. Для пациенток, получавших недьювантную химиотерапию, исследовался биопсийный материал, полученный до начала лечения.

Для анализа опухолевой ткани выполнялась микродиссекция под контролем световой микроскопии. Выделение тотальной ДНК из парафиновых срезов было проведено с использованием протеиназы К. Срезы очищались от парафина в двух сменах ксилола по 5 минут. Затем образцы промывались в двух сменах 96%-ого этанола по 2 минуты. После тщательного удаления этанола к тканям добавлялся лизирующий буфер (10 ммоль Tris-HCl (pH=8.0), 0.1 ммоль ЭДТА; pH=8.0, 2% натрия додецилсульфат) и протеиназа К (20мг/мл). Инкубация образцов проводилась при  $t=60^{\circ}\text{C}$  в течение 8-16 часов до полного лизиса тканей. При необходимости на второй день инкубации дополнительно добавлялась протеиназа К (до концентрации 700 мкг/мл). Обработка образцов после лизиса проводилась методом фенол-хлороформной очистки. К лизату добавлялся однократный объем реагента TRIzol (Invitrogen) и 0,3 объема смеси хлороформ-изоамиловый спирт (24:1). После интенсивного

встряхивания пробирки в течение 10 минут пробы центрифугировались при 15000g в течение 20 минут. Затем из проб в чистые эппендорфы отбиралась надосадочная жидкость, к которой добавляли 0,1 объема 3M ацетата Na (pH=4.0), 1 мкл раствора гликогена (20 мг/мл) в качестве ко-осадителя и 1 объем холодного изопропанола. Пробы оставлялись не менее чем на 3 часа при -20°C. Затем пробирки центрифугировались при 15000g в течение 30 минут. После центрифугирования на дне пробирки образовывалось небольшое количество белого осадка. После удаления изопропанола осадок однократно промывался в 70% этаноле в течение 10 минут. После тщательного удаления этанола осадок подсушивался в термостате при 40°C, а затем растворялся в 30 мкл стерильной воды при 65°C в течение 10 минут. Раствор ДНК хранился при -20°C до использования в исследовании.

Для выделения ДНК из свежзамороженного материала небольшой фрагмент опухоли, не размораживая, помещали в пробирку с керамическими частицами для гомогенизации (Minilys, BertinTechnologies). Пробирку встряхивали в течение 90 сек при 5000 об./мин. При необходимости процедуру повторяли до полной гомогенизации фрагмента ткани. К лизату добавляли 200 мкл реагента TRIzol (Invitrogen) и 0,3 объема смеси хлороформ-изоамиловый спирт (24:1). Дальнейшие процедуры проводили аналогично протоколу выделения ДНК из парафиновых срезов.

### **2.2.3. Анализ наследственных мутаций**

В рамках исследования выполнялся анализ повторяющихся «founder» мутаций в гене CHEK2 (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 CHEK2 определялись методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-амплификатор CFX96, Bio-Rad). Праймеры для детекции мутаций CHEK2 представлены в таблице 2.

Таблица 2. Праймеры для аллель-специфической детекции мутаций в гене CHEK2.

Мутация	Тип праймера	Длина фрагмента	Последовательность праймеров 5'-3'
<i>CHEK2</i> <i>1100delC</i>	общий wt mut	120 п.о.	CTGATCTAGCCTACGTGTCT- TTGGAGTGCCCCAAAATCAGT CTTGGAGTGCCCCAAAATCAT
<i>CHEK2</i> <i>IVS2+1G&gt;</i> A	общий wt mut	114 п.о.	CAGACTTTGAATAGCAGAGA ACACTTTCGGATTTTCAGGG ACACTTTCGGATTTTCAGGA
<i>CHEK2</i> <i>del5395</i>	общий wt mut	139 п.о.	TGGGAAGTCAAGGCTGTAAT ATGGCGTAAGATTTGCATATA CATGTTGGCCAGGTTTGAG

#### 2.2.4. Анализ потери гетерозиготности в CHEK2-ассоциированных опухолях

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 анализа методом АС-ПЦР использовались праймеры, представленные в таблице 1. Анализ гетерозиготности опухоли методом секвенирования по Сэнгеру был возможен для образцов с наследственными мутациями CHEK2 1100delC и CHEK2 IVS2+1G>A. Праймеры для амплификаций фрагментов для секвенирования представлены в таблице 3.

Таблица 3. Праймеры для амплификации фрагментов гена CHEK2 для секвенирования по Сэнгеру.

Мутация	Длина фрагмента	Последовательность праймеров 5'-3'
<i>CHEK2</i> <i>1100delC</i>	142 п.о.	AGATTACTGATTTTGGGCACT
		CTCCAGCAGTCCACAGCA
<i>CHEK2</i> <i>IVS2+1G&gt;A</i>	134 п.о.	GCTGTGAATATTGCTTTGATGA
		ATGACCAAATTACCAGCTCTC

Секвенирование по Сэнгеру проводили на приборе CEQ 8000 GeneticAnalysisSystem (Beckman Coulter). Перед реакцией секвенирования была произведена очистка продуктов ПЦР с помощью набора реагентов Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Roche). Реакция секвенирования проводилась в объеме 20 мкл при следующих условиях: 30 циклов 96°C 20 секунд/50°C 20 секунд/60°C 4 минуты на приборе BIS Thermocycler. Продукты реакции секвенирования были преципитированы. В каждую пробу добавлялось: 2 мкл 3М ацетата Na (pH 5,2), 2 мкл 100mM Na<sub>2</sub>-EDTA (pH 8,0) и 1 мкл 20 мг/мл гликогена. После перемешивания добавлялся холодный 95%-ый этанол. Образцы центрифугировались 15 минут при 14000g. Затем удалялся супернатант, а осадок промывался 2 раза холодным 70%-ым этанолом. После тщательного удаления спирта осадок растворялся в 40 мкл формамида (Sample Loading Solution, Beckman Coulter). Полученный раствор ДНК переносили в планшет для образцов и загружали в прибор. Секвенирование проводилось в двух направлениях по протоколу, рекомендованному производителем.

Особенностью гена CHEK2 является наличие в геноме человека нескольких участков, гомологичных последовательности экзонов 10-14 гена CHEK2 [Bell et al., 1999; Sodha et al., 2000]. Гомологичность последовательностей достигает 98%, что технически усложняет анализ этого участка гена. Кроме того, наличие высокогомологичных

последовательностей может вносить аномалии при анализе статуса соматической потери гетерозиготности СНЕК2. Для исключения такой возможности в исследовании дополнительно анализировались однонуклеотидные полиморфизмы, окружающие ген СНЕК2.

Для подтверждения статуса гетерозиготности опухолей были подобраны флуоресцентные зонды для анализа однонуклеотидных полиморфизмов, окружающих локус гена СНЕК2 (22: 28,687,743 - 28,742,422). Были выбраны полиморфизмы с высокой частотой минорного аллеля (MAF, Minor allele frequency) в соответствии с данными баз «1000 геномов» и gnomAD. Праймеры для амплификации, последовательности зондов и расположение полиморфизмов в геноме представлено в Таблице 4. Для каждого случая анализировался статус всех полиморфизмов в ДНК, полученной из крови. Для исследования опухолевой ткани каждого случая выбирались только информативные (гетерозиготные) полиморфизмы.

Таблица 4. Последовательность праймеров, флуоресцентных зондов и расположение однонуклеотидных полиморфизмов в геноме.

Однонуклеотидный полиморфизм	Положение в геноме	Последовательность праймеров и флуоресцентных зондов 5'-3'
rs738574 MAF: 0.49	22: 27,450,914	F- TCTGTTATCACAACCTCTTTCT R- CCTGGATGATGAAGGCAGC [R6G]TCTCCCCCTTAAAAGGACTCTC[BHQ1] [FAM]TCTCCCCCTTATAAGGACTCTC[BHQ1]
rs2065036 MAF: 0.50	22: 27,703,363	F- GAAATTAGGAAAAATGGCAAAG R- TTGATTGGGCTGTGAACCT [R6G]CTGCCCCAAGAGAGCCCCT[BHQ1] [FAM]CTGCCCCAAGAGAGCCCCT[BHQ1]
rs5762680 MAF: 0.49	22: 28,549,527	F- AGTAAATGTCTACTGCTGCCA R- ATAGACTTAAAAAGGAGAGAATC [R6G]TCAGGACTGTAAACTATAAAAACAAC [BHQ1] [FAM]TCAGGACTGTAAACAATAAAAACAAC C[BHQ1]



rs5752793 MAF: 0.49	22: 28,764,326	F- GTCTAGGGAGGGATCATTTTC R- GGACACCTGACATAGTTTCTC [R6G]TCCTCCTCTTCCTTTCTTCTTTAGT[BHQ1] [FAM]TCCTCCTCTTCCCTTCTTCTTTAGT[BHQ1]
rs5997408 MAF: 0.48	22: 28,811,927	F- TCAAAGCTAGCACAGATAATTC R- GTTTTGACAAATGTGCCACAG [R6G]CCTCACCCGGTTCGGTTTC[BHQ1] [FAM]CCTCACCCAGTTCGGTTTC[BHQ1]
rs9613777 MAF: 0.50	22: 29,024,494	F- ACTGAGGTCTGCTGTTTACA R- GAAATATCACAGGACTGCAAG [R6G]CTATGTGTCTCCACTTTATATCAAC[BHQ1] [FAM]CTATGTGTCTCCATTTTATATCAAC[BHQ1]

### 2.2.5. Анализ соматических мутаций в гене CHEK2

Для 16 образцов CHEK2-ассоциированных опухолей был выполнен анализ соматических мутаций в гене CHEK2 (1-10 экзоны). Исследование выполнялось методом анализа кривых плавления с высоким разрешением (HRMA, High Resolution Melting Analysis) с последующим секвенированием фрагментов с аберрантной кинетикой плавления. Праймеры, использованные для данного анализа, представлены в таблице 5. Метод анализа кривых плавления основан на регистрации флуоресценции интеркалирующего красителя (Eva Green, Biotium) при медленном нагревании проб после завершения ПЦР. При наличии изменения (мутаций) в исследуемом фрагменте образуются гетеродуплексы, кинетика плавления которых значительно отличается от таковой для контрольного образца без мутации.

Таблица 5. Праймеры для исследования последовательности гена CHEK2 методом HRM.

Праймер	Последовательность 5'→3'	Длина фрагмента
Chek2-ex2_1-F	GTCGTGATGTCTCGGGAGT	168 п.о.
Chek2-ex2_1-R	GTGAGAGGACTGGCTGGA	
Chek2-ex2_2-F	CTCCAGCCAGTCCTCTCA	201 п.о.
Chek2-ex2_2-R	ACCTGGTAATACAACCTTTCTG	
Chek2-ex3-F	CCTCTGATGCATGCTTTTAT	246 п.о.
Chek2-ex3-R	CCTACCCTGAAAATCCGAA	
Chek2-ex4-F	AGGAGAGCTGGTAATTTGGT	246 п.о.
Chek2-ex4-R	ATTACCTTTATTTCTGCTTAGT	
Chek2-ex5-F	GTGATCGCCTCTTGTGAATA	213 п.о.
Chek2-ex5-R	AGAAACCACCAATCACAAATG	
Chek2-ex6-F	CTCTAGTGGTGCCTGTGGA	121 п.о.
Chek2-ex6-R	ACTTACTGCCTCTCTTGCTG	
Chek2-ex7-F	AAGGACCCAGCTCTCAATGT	158 п.о.
Chek2-ex7-R	CACACCTGGCCAATATTATCT	
Chek2-ex8-F	CTTCTTAGCCTTGCATCATC	194 п.о.
Chek2-ex8-R	CATTAGATTCTTTGGTGGCTT	
Chek2-ex9-F	CCTTGCCTTGCCTTTGTGT	281 п.о.
Chek2-ex9-R	CAGTGAAAGGAGTAGGACAT	
Chek2-ex10-F	GGTCATGCCTGCCTTTCTG	139 п.о.
Chek2-ex10-R	AGCCACATACAGAATGCCAA	

### 2.2.6. Экзомное секвенирование CHEK2-ассоциированных опухолей молочной железы

В рамках данного исследования для выявления полного спектра соматических мутаций было выполнено экзомное секвенирование 9 CHEK2-

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). Перед подготовкой библиотек концентрация ДНК в образцах измерялась флуориметрически (Qubit, ThermoFisher). Для подготовки NGS-библиотеки использовалось не менее 50 нг ДНК. Подготовка библиотек выполнялась по рекомендуемому производителем протоколу и включала следующие этапы:

- Тагментация (обработка геномной ДНК ферментом (Nextera transposome), которая приводит к фрагментации ДНК и одновременному пришиванию адаптерных последовательностей);

- Очистка тагментированной ДНК (удаление излишков ферментов – очистка ДНК осаждением на магнитных частицах);

- Аmplификация (в процессе реакции пришиваются уникальные для каждого образца адаптеры)

- Очистка (очистка ДНК осаждением на магнитных частицах);

- Оценка качества библиотек (капиллярный электрофорез проводился на приборе Experion, Bio-Rad);

- Пулирование образцов, гибридизация и захват проб (данный шаг позволяет с помощью меченных биотином проб захватить экзомные последовательности);

- Аmplификация и очистка обогащенной ДНК-библиотеки.

По окончании всех этапов качество библиотеки оценивалось с помощью капиллярного электрофореза (Experion, Bio-Rad). Ожидаемое распределение фрагментов составляло 200-400 п.о. Готовая библиотека денатурировалась и помещалась в картридж для секвенирования для прибора NextSeq (Illumina).

### 2.2.7. Биоинформатическая обработка результатов экзомного секвенирования

На первых этапах данные секвенирования ДНК из крови и из опухоли обрабатывались одинаково. Парные прочтения выравнивались на референсный геном человека hg19 при помощи утилиты BWA-MEM v.0.7.12. Выходные данные конвертировались в формат BAM программой samtools v.1.8. Дальнейшие шаги обработки выполнялись утилитами, интегрированными в программный комплекс GenomeAnalysisToolkit (GATK) v.4.beta.5. Из них для маркировки дубликатов и калибровки значений качества прочтений были использованы команды: MarkDuplicates, BaseRecalibrator, and ApplyBQSR.

Соматические мутации определялись при помощи команды Mutect2, которая одновременно обрабатывает пары файлов в формате BAM опухолевой ДНК и нормы, выделенной из крови. Полученные «сырые» вызовы соматических мутаций фильтровались при помощи команды FilterMutectCalls. Достоверными считались мутации, определенные как минимум по двум прочтениям в прямом и обратном направлениях, а также прошедшие все стандартные фильтры утилиты.

Аннотирование мутаций производилось при помощи утилиты snpEff v.4.3t. Оно дополнялось данными об интегрированной оценке важности изменений CADD при помощи команды annotate утилиты bcftools v.1.9.

Наследственные варианты, присутствующие в гетерозиготном состоянии, определялись командой HaplotypeCaller с последующей фильтрацией командой SelectVariants. В итоге отбирались однонуклеотидные замены (SNP), которые имели устойчиво определенный гетерозиготный генотип и хорошее общее качество варианта (GT>98, QUAL>300).

В опухолевых образцах при помощи команды GetHetCoverage определялись частоты аллелей (MAF) на гетерозиготных участках генома, которые были определены на предыдущем шаге. Далее, геном

сегментировался по состояниям копийности (CNV) при помощи модели, использующей одновременно информацию о покрытии и MAF в гетерозиготных участках. Для этого использовались команды: `PerformAlleleFractionSegmentation` и `AllelicCNV`. Полученные сегменты визуализировались при помощи команды `PlotACNVResults`.

Сегменты из сгенерированного списка разбивались на два кластера по значениям моды MAF при помощи команды `kmeans` программной среды для статистической обработки данных R. Далее определялось отношение суммарной длины сегментов из кластера с наименьшим центром к общей длине секвенируемых геномных регионов. Полученное отношение и есть искомое значение. Оно, совместно с количеством сегментов, попавших в кластер с минимальным центром MAF, характеризует BRCAness генотип опухоли.

После фильтрации вариантов по глубине покрытия ( $>10$ ) и показателю качества секвенирования ( $QS>50$ ) в них было определено общее количество соматических мутаций (включая синонимичные замены), и с учетом комплексного показателя патогенности CADD (Combined Annotation Dependent Depletion (CADD) score) выбраны потенциально патогенные соматические мутации.

### **2.2.8. Подтверждение наличия амплификации гена EMSY**

По результатам высокопроизводительного секвенирования в одном из образцов была обнаружена амплификация участка 11 хромосомы, содержащая ген EMSY. Для подтверждения вовлеченности гена в амплификацию был выполнен анализ наличия амплификации EMSY методом ПЦР в реальном времени. В качестве гена-рефери был использован ген TMEM. Последовательности праймеров и меток представлены в таблице 6.

Таблица 6. Последовательности праймеров и флуоресцентных меток для анализа амплификации гена EMSY.

Ген	Последовательность праймеров 5'-3' и флуоресцентных зондов	Длина фрагмента
EMSY	F: TCGTCGATTGGTACCACTGA	143 п.о.
	R: TCTACTCACCTTCCTTGCTT	
	[FAM]AGCTATCCAGCATAATGCATCTCT[BHQ1]	
TMM	F: TGTGTGCTATTAACGTGGAAA	163 п.о.
	R: GTAACGCCACAGGACAATC	
	[R6G]CTCCTTCTCCTAGTTTGATGCCA[BHQ1]	

## ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

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

Анализ мутаций СНЕК2 с.1100delC, del5395 и с.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. Клинические характеристики исследованных пациентов и здоровых доноров представлены в таблицах 7 и 8.

Таблица 7. Клинические характеристики онкологически здоровых женщин, включенных в исследование (n=1024).

<b>Здоровые женщины (n = 1024)</b>	
<b>Средний возраст</b>	43,4 (18-75)
<b>Статус курения</b>	
Курит	468 (45,7%)
Не курит	516 (50,4%)
Нет данных	40

Молекулярно-генетический анализ удалось выполнить для всех исследованных образцов ДНК. Мутации в гене СНЕК2 были обнаружены в 54 (54/1750, 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. Среди онкологически здоровых женщин мутация СНЕК2 была обнаружена в 6 случаях (6/1024, 0,58%).

Таблица 8. Клинические характеристики больных раком молочной железы, включенных в исследование (n=1750).

<b>Средний возраст</b>	50,4 (24-84)
<b>Возраст постановки диагноза</b>	
≤50	920 (52,6%)
>50	830 (47,4 %)
<b>Билатеральность поражения</b>	
Монолатеральный РМЖ	1612 (92,1%)
Билатеральный РМЖ	138 (7,9%)
<b>Семейный анамнез РМЖ и/или РЯ</b>	
Положительный	301 (17,2%)
Отрицательный	1449 (82,8%)

Соотношение между частотами разных мутаций среди больных и здоровых женщин сохранялось одинаковым. Так, самой частой мутацией стала del5395, примерно в два раза реже встречалась 1100delC, мутация IVS2+1G>A встречалась реже всего. Отношения рисков заболевания для мутаций 1100delC и del5395 оказались сопоставимыми (4,42 и 4,6 соответственно). Отношение рисков РМЖ для мутации IVS2+1G>A рассчитать не удалось в связи с отсутствием носительниц данной мутации среди здоровых женщин. Наличие любой из исследованных мутаций СНЕК2 увеличивало риск возникновения заболевания в 5,6 раз (95% CI 2,32-12,6; p=0,0001). Расчеты отношения рисков для носителей мутаций в гене СНЕК2 представлены в таблице 9.

Таблица 9. 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



В таблице 10 представлены клинические характеристики носительниц повторяющихся мутаций в гене CHEK2. Также представлены данные носительниц мутаций в генах BRCA1/2, полученные на этой же группе пациенток ранее [Sokolenko et al., 2014]. Достоверных отличий между средним возрастом пациенток с разными мутациями CHEK2 не наблюдалось. Так, средний возраст женщин с мутациями 1100delC, IVS2+1G>A и del5395 составил 52,7, 48,3, 47,3 лет соответственно. Не наблюдалось достоверных отличий в среднем возрасте пациенток с мутациями CHEK2 и без РМЖ-ассоциированных наследственных мутаций. Однако по сравнению с BRCA1/2-носительницами у пациенток с CHEK2 мутациями заболевание диагностируется значительно позже ( $p = 0,0021$ , t-тест Стьюдента).

Таблица 10. Клинические характеристики пациенток с РМЖ - носительниц повторяющихся мутаций в гене CHEK2 и BRCA1/2.

Мутация	Средний возраст	Диагноз в возрасте <50	Семейный анамнез	Билатеральность	Всего
<b>1100delC</b>	52,7 (25-73)	6 (40,0%)	4 (26,6%)	1 (6,6%)	15
<b>IVS2+1G&gt;A</b>	48,3 (35-66)	5 (62,5%)	4 (50,0%)	2 (25,0%)	8
<b>del5395</b>	47,3 (24-68)	19 (61,3%)	9 (29,0%)	0	31
<b>Любая мутация CHEK2</b>	49,0 (24-73)	30 (55,6%)	17 (31,5%)	3 (5,6%)	54
<b>BRCA1/2</b>	43,8 (26-78)	119 (80,4%)	52(35,1%)	29 (19,6%)	148*
<b>WT</b>	51,1 (24-84)	772 (49,8%)	242 (15,6%)	106 (6,8%)	1550

\* В двух случаях мутация CHEK2 del5395 была обнаружена у пациенток с BRCA1 мутацией

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

Основные клинико-морфологические параметры пациенток с наследственными мутациями СНЕК2 были проанализированы для 91 случая. В таблице 11 представлены результаты анализа историй болезни. В эту часть исследования были включены пациентки с тремя 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 (Таблица 11).

Таблица 11. Сравнение основных клинико-морфологических параметров в группах РМЖ, ассоциированного с тремя распространёнными типами мутаций в гене СНЕК2.

	<b>СНЕК2 1100delC</b>	<b>СНЕК2 del5395</b>	<b>СНЕК2 IVS2+1G&gt;A</b>
<b>Возраст</b>	n = 29	n = 39	n = 23
Средний	56,1±2,2	54,4±2,0	57,6±2,7
Диапазон	37-76	27-76	35-86
<b>Размер опухоли (Т)</b>	n = 29	n = 39	n = 23
T1	9 (31.0%)	14 (35.9%)	6 (26.1%)
T2	9 (31.0%)	8 (20.5%)	11 (47.8%)
T3	3 (10.3%)	3 (7.7%)	2 (8.7%)
T4	8 (27.6%)	14 (35.9%)	4 (17.4%)

<b>Вовлеченность лимфоузлов (N)</b>	n = 28	n = 39	n = 23
N0	14 (50.0%)	13 (33.3%)	9 (39.1%)
N>0	14 (50.0%)	26 (66.7%)	14 (60.9%)
Нет данных	1		
<b>Отдаленные метастазы</b>	n = 28	n = 37	n = 22
M0	26 (92.9%)	37 (100%)	22 (100%)
M1	2 (8.1%)	0 (0%)	0
Нет данных	1	2	1
<b>Степень дифференцировки</b>	n = 5	n = 12	n = 6
G1	0 (0%)	1 (8.3%)	0 (0%)
G2	2 (40.0%)	9 (75.0%)	4 (66.7%)
G3	3 (60.0%)	2 (16.7%)	2 (33.3%)
Нет данных	24	27	17
<b>Индекс Ki67, %</b>	n = 12	n = 6	n = 5
Средний	21.0±3.8	28.2±7.0	33.2±11.6
Диапазон	5-50	10-60	14-75
Нет данных	17	33	18
<b>Экспрессия рецепторов эстрогенов</b>	n = 27	n = 37	n = 23
ER+	26 (96.3%)	32 (86.5%)	20 (87.0%)
ER-	1 (3.7%)	5 (13.5%)	3 (13.0%)
Нет данных	2	2	
<b>Экспрессия рецепторов прогестерона</b>	n = 27	n = 37	n = 22
PR+	19 (70.4%)	26 (70.3%)	17 (77.3%)
PR-	8 (29.6%)	11 (29.7%)	5 (22.7%)
Нет данных	2	2	1

<b>Гиперэкспрессия HER2</b>	n = 27	n = 34	n = 20
HER2-	24 (88.9%)	29 (85.3%)	14 (70.0%)
HER2+	3 (11.1%)	5 (14.7%)	6 (30.0%)
Нет данных	2	5	3
<b>Трижды негативный фенотип (ER-/PR-/HER2-)</b>	n = 27	n = 37	n = 23
Нет	27 (100%)	35 (94.6%)	22 (95.7%)
Есть	0 (0%)	2 (5.4%)	1 (4.3%)
Нет данных	2	2	0
<b>Семейный онкологический анамнез</b>			
Есть	9 (32.1%)	11 (28.9%)	8 (34.8%)
Нет/нет данных	19 (67.9%)	27 (71.1%)	15 (65.2%)

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

Опухолевый материал для оценки частоты соматической потери гетерозиготности (loss of heterozygosity, LOH) 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 случая методами. Результаты исследования образцов представлены в таблице 12. Примеры детекции соматической утраты нормального аллеля проиллюстрированы на рисунках 3-5.

На первом этапе исследование статуса потери гетерозиготности выполнялось методом аллель-специфической ПЦР (для всех трех мутаций) и

секвенирования (для мутаций 1100delC и IVS2+1G>A). Для исследования статуса однонуклеотидных полиморфизмов, окружающих ген СНЕК2, сначала выполнялся анализ ДНК, полученной из крови пациенток. Информативными считались только те полиморфизмы, которые в нормальной ДНК находились в гетерозиготном состоянии. Для 11 пациенток обнаружить информативные полиморфизмы не удалось. В этих случаях статус потери гетерозиготности определялся по данным АС-ПЦР и секвенирования. В остальных 35 случаях статус информативных полиморфизмов определялся в опухолевой ткани (таблица 12).

Рисунок 3. Пример оценки потери гетерозиготности в локусе СНЕК2 del5395 при помощи аллель-специфической ПЦР.

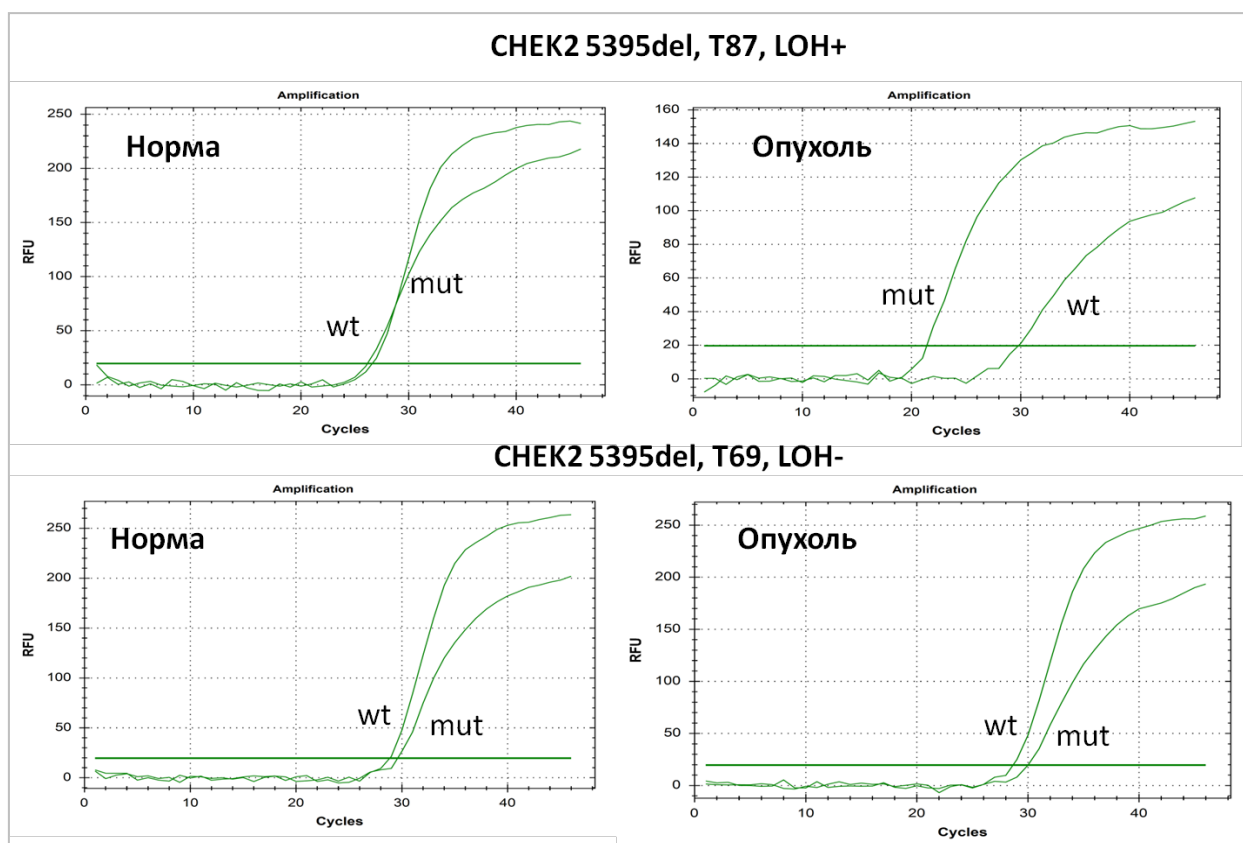


Таблица 12. Результаты исследования соматического статуса CHEK2-ассоциированных опухолей методами АС-ПЦР, секвенирования, генотипирования однонуклеотидных полиморфизмов.

ID образца	Мутация	Статус LOH (АС-ПЦР/секвенирование)	Генотип по выбранным полиморфизмам («+» гетерозигота; «-» гомозигота, na – генотип определить не удалось)						Статус LOH по информативным полиморфизмам	Окончательный результат
			rs7385 74	rs2065 036	rs5762 680	rs5752 793	rs5997 408	rs9613 777		
5534	CHEK2 1100delC	ROH	+	-	na	+	-	na	ROH	ROH
T76	CHEK2 1100delC	ROH	-	+	na	+	na	-	ROH	ROH
T79	CHEK2 1100delC	ROH	-	-	-	na	-	-	na	ROH
T27	CHEK2 1100delC	ROH	na	-	na	na	+	-	ROH	ROH
T72	CHEK2 1100delC	ROH	+	-	+	+	na	-	ROH	ROH
T75	CHEK2 1100delC	ROH	-	+	+	na	na	-	ROH	ROH
T11	CHEK2 1100delC	ROH	na	na	na	na	na	na	na	ROH
T41	CHEK2 1100delC	ROH	na	-	na	na	na	na	na	ROH
T88	CHEK2	ROH	+	+	+	na	na	+	ROH	ROH

	1100delC									
<b>T31</b>	CHEK2 1100delC	ROH	+	+	-	na	na	-	ROH	ROH
<b>CHEK7</b>	CHEK2 1100delC	ROH	-	-	na	na	+	-	ROH	ROH
<b>T30</b>	CHEK2 1100delC	ROH	+	-	na	na	+	-	ROH	ROH
<b>T92</b>	CHEK2 1100delC	ROH	+	+	nd	+		-	ROH	ROH
<b>T74</b>	CHEK2 1100delC	LOH	-	+	+	+		-	LOH	LOH
<b>T56</b>	CHEK2 1100delC	LOH	+	+	+	na	na	na	LOH	LOH
<b>T87</b>	CHEK2 5395 del	LOH	-	+	-	-	na	-	LOH	LOH
<b>T48</b>	CHEK2 5395 del	ROH	na	-	-	na	-	na	na	ROH
<b>CHEK9</b>	CHEK2 5395 del	ROH	-	-	-	+	na	+	ROH	ROH
<b>5539</b>	CHEK2 5395 del	LOH	-	+	-	+	-	+	LOH	LOH
<b>T12</b>	CHEK2 5395 del	LOH	na	na	na	na	na	na	na	LOH
<b>CHEK10</b>	CHEK2 5395 del	ROH	-	+	-	+		+	ROH	ROH
<b>CHEK1</b>	CHEK2 5395	LOH	+	na	-	-	+	-	LOH	LOH

<b>1</b>	del									
<b>T94</b>	CHEK2 5395 del	ROH	+	na	+	-	na	-	ROH	ROH
<b>DS5797</b>	CHEK2 5395 del	ROH	-	-	+	-	+	-	ROH	ROH
<b>T99</b>	CHEK2 5395 del	ROH	na	+	-	-	+	+	ROH	ROH
<b>T90</b>	CHEK2 5395 del	LOH	-	+	-	-		-	LOH	LOH
<b>T10</b>	CHEK2 5395 del	LOH	na	na	na	na	na	na	na	LOH
<b>T7</b>	CHEK2 5395 del	ROH	-	+	-	-	na	+	ROH	ROH
<b>T98</b>	CHEK2 5395 del	LOH	-	-	-	-	-	-	na	LOH
<b>T49</b>	CHEK2 5395 del	LOH	-	-	-	-	+	+	LOH	LOH
<b>T9</b>	CHEK2 5395 del	LOH	na	na	na	na	na	na	na	LOH
<b>7284</b>	CHEK2 5395 del	LOH	-	-	-	-	-	-	na	LOH
<b>T69</b>	CHEK2 5395 del	ROH	-	-	+	-	+	-	ROH	ROH
<b>T36</b>	CHEK2 IVS2+1G>A	ROH	-	-	-	na	+	na	ROH	ROH





Рисунок 4. Пример оценки потери гетерозиготности в локусе CHEK2 IVS2+1G>A при помощи аллель-специфической ПЦР и секвенирования.

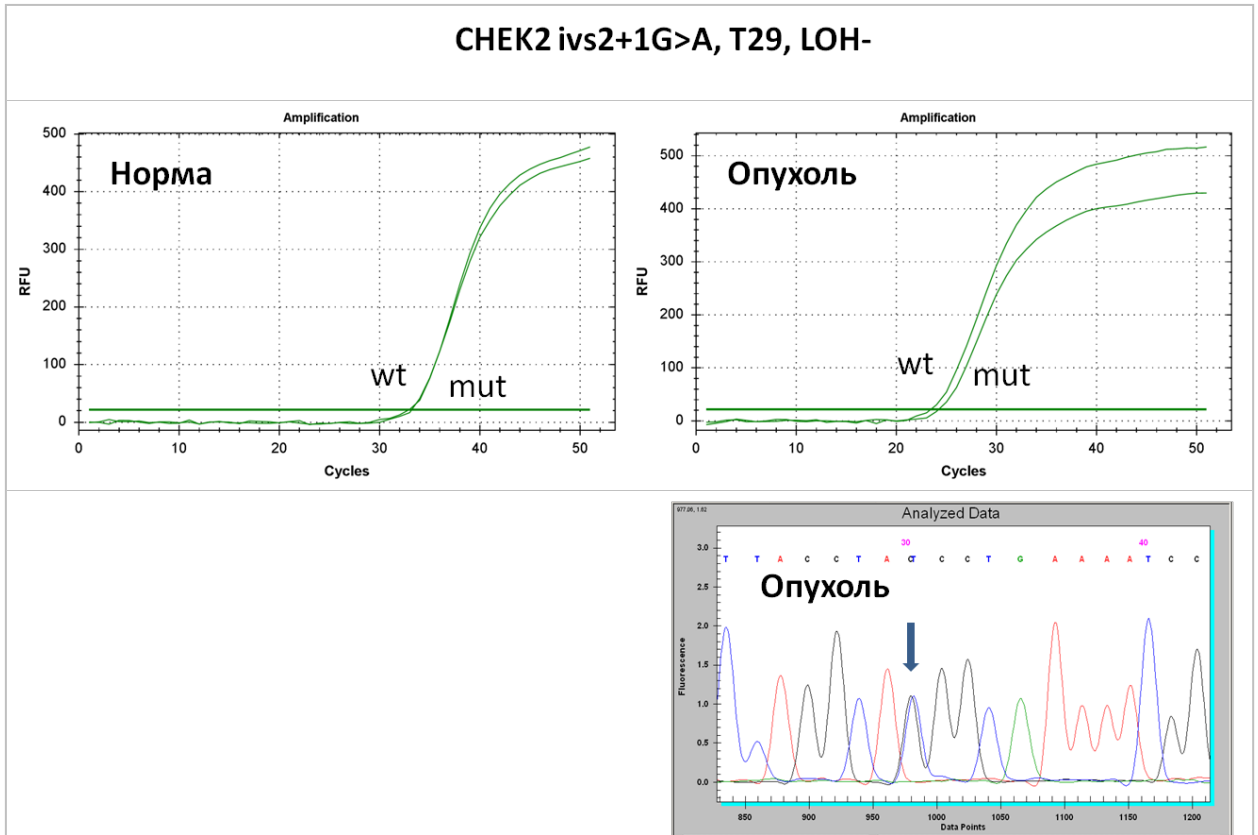
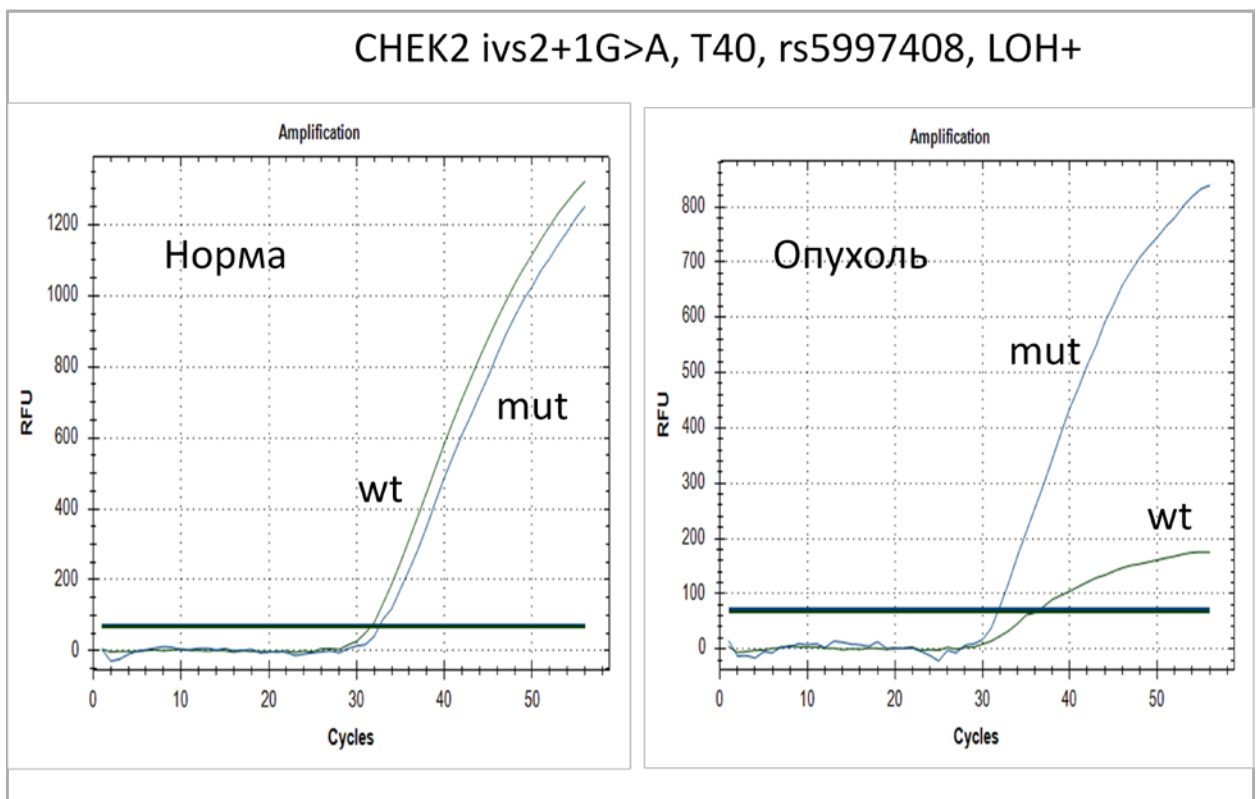


Рисунок 5. Пример оценки потери гетерозиготности в локусе CHEK2 при помощи генотипирования однонуклеотидного полиморфизма rs5997408.



Потеря аллеля дикого типа наблюдалась в 2/15 (13%) СНЕК2 1100delC-позитивных РМЖ, 10/18 (55%) СНЕК2 del5395-ассоциированных опухолей и в 2/13 (15%) карцином от женщин с заменой СНЕК2 IVS2+1G>A. Таким образом, частота ЛОН в случае мутации del5395 оказалась значительно выше, чем при двух других типах мутаций, объединённых вместе (СНЕК2 del5395 vs. СНЕК2 1100delC + IVS2+1G>A,  $p = 0,0007$  [OR: 7,11; 95% CI 1,54-40,5], точный тест Фишера) или проанализированных по отдельности (СНЕК2 del5395 vs. СНЕК2 1100delC,  $p = 0,03$ ; СНЕК2 del5395 vs. СНЕК2 IVS2+1G>A,  $p = 0,03$ ) (Рисунок 6).

Неодинаковая частота делеции нормального аллеля в опухолях с разными мутациями СНЕК2 может свидетельствовать об отличиях молекулярного патогенеза и биологических свойств этих категорий новообразований. Основные клиничко-морфологические характеристики РМЖ были сопоставлены в опухолях с потерей и без потери гетерозиготности (Таблица 13). 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 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 СНЕК2 del5395: в этой группе при наличии ЛОН средний возраст составил 60 лет, а в отсутствие феномена ЛОН – 56,8 ( $p = 0,58$ , t-тест Стьюдента).

Таким образом, три наследственных варианта гена СНЕК2 представляют собой транквирующие варианты, не различающиеся на уровне клиничко-морфологических характеристик, но имеющих значительное отличие в статусе нормального аллеля. Потеря нормального аллеля является одной из важнейших характеристик вовлеченности наследственного варианта

в развитие опухоли. Так, для BRCA1-ассоциированных карцином показано, что утрата нормального аллеля в опухоли происходит чаще при патогенных (транскирующих) наследственных вариантах гена, чем при непатогенных и вариантах неизвестного значения (variant of unknown significance, VUS) [Yost et al., 2019].

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.

Рисунок 6. Частота потери нормального аллеля гена в опухолях с разными наследственными мутациями CHEK2.

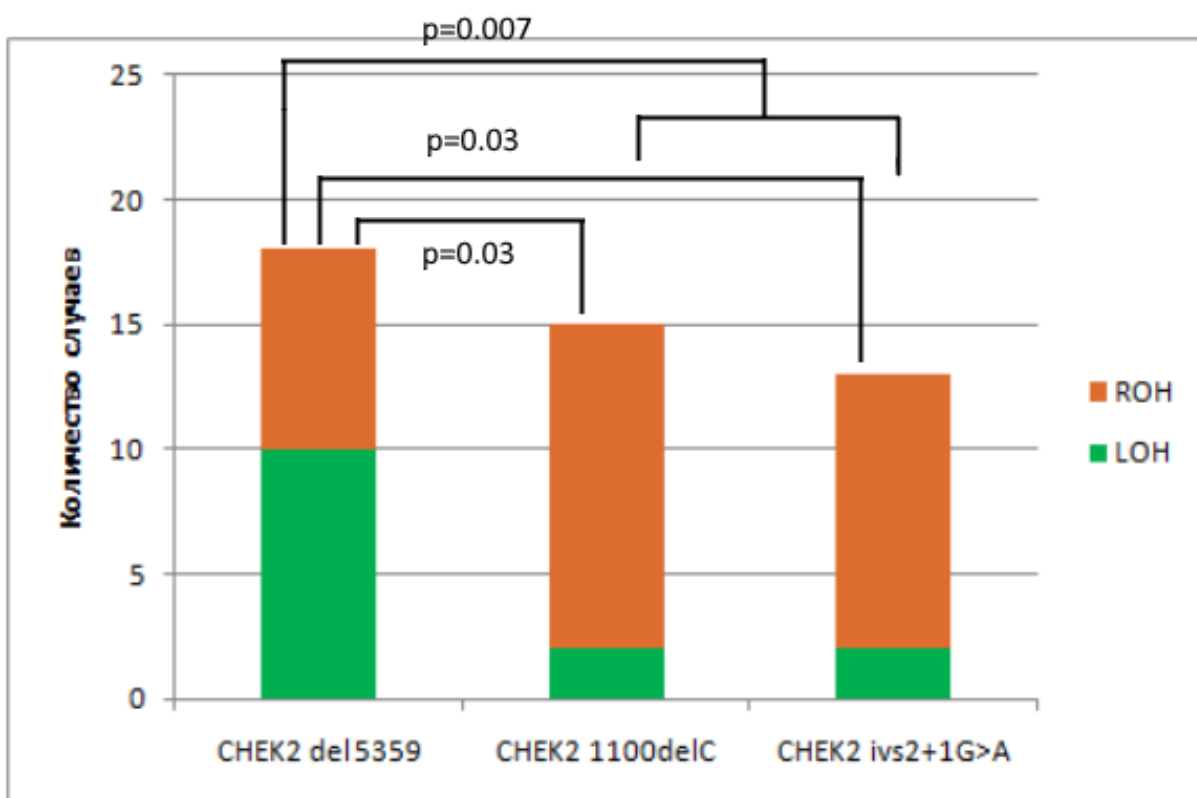


Таблица 13. Сравнение основных клинико-морфологических параметров в группах CHEK2-ассоциированного РМЖ, сопровождающегося и не сопровождающегося феноменом потери гетерозиготности.

	LOH+ vs. LOH- (все случаи)		LOH+ vs. LOH- (CHEK2 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 (T)	n = 14	n = 32	n = 10	n = 8
T1	6 (42,9%)	8 (25,0%)	4 (40%)	1 (12,5%)
T2	3 (21,4%)	18 (56,3%)	2 (20%)	5 (62,5%)
T3	1 (7,1%)	3 (9,4%)	0	0
T4	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 СНЕК2IVS2+1G>A

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

### **3.4. Высокопроизводительное экзомное секвенирование СНЕК2-ассоциированных карцином молочной железы**

Методом высокопроизводительного экзомного секвенирования было проанализировано 9 образцов СНЕК2-ассоциированных опухолей молочной железы. В таблице 14 представлены клинико-морфологические характеристики выбранных пациенток. Для данного этапа исследования были подобраны образцы, полученные от носительниц с разными наследственными мутациями СНЕК2 и, по возможности, с разным статусом ЛОН. Основным критерием включения образца стало достаточное количество и качество нуклеиновых кислот.

В двух случаях у пациенток кроме рака молочной железы был установлен диагноз папиллярного рака щитовидной железы. Папиллярный рак щитовидной железы является одним из самых частых типов опухолей данного органа (до 80%) [Siolek et al., 2015]. Около 5% папиллярных опухолей щитовидной железы являются наследственными. По литературным данным предполагается наличие взаимосвязи между опухолями щитовидной железы и РМЖ: диагноз рака щитовидной железы является фактором риска

для РМЖ и наоборот. Около 3,5% случаев папиллярных карцином щитовидной железы ассоциированы с наличием наследственной мутации CHEK2.

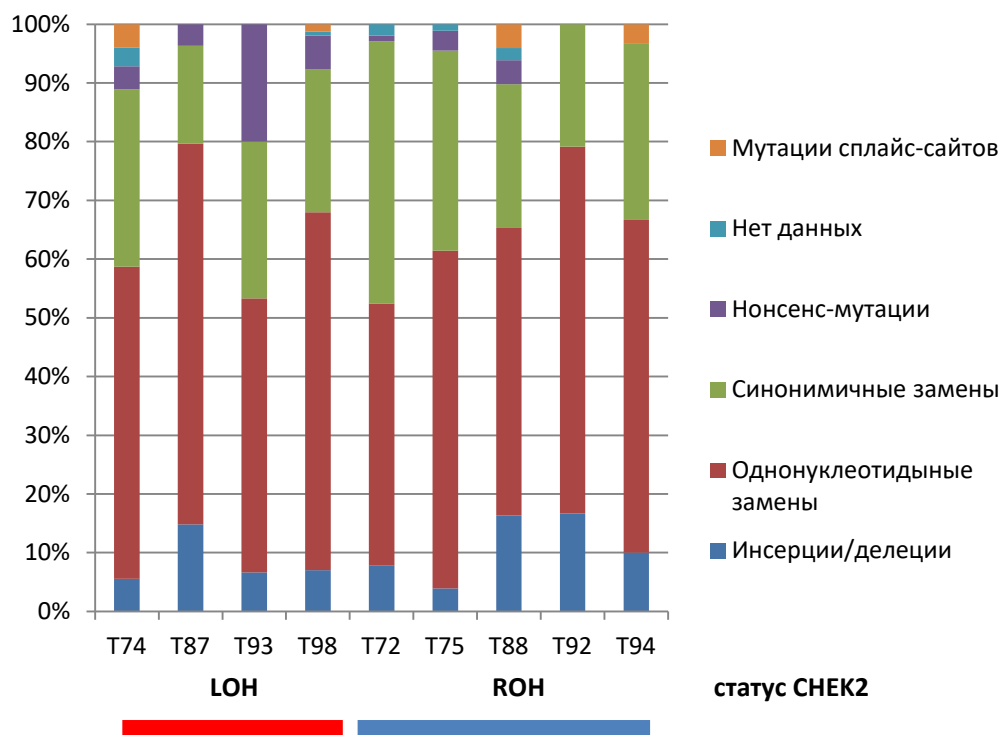
Таблица 14. Клинико-морфологические характеристики опухолей, исследованных методом экзомного секвенирования.

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 wANNOVAR [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 (Рисунок 7). Важно отметить, что по результатам исследования образцов методом высокопроизводительного секвенирования, соматический статус нормального аллеля CHEK2 был конкордантен полученным ранее результатам.

Рисунок 7. Распределение функциональных типов соматических мутаций в CHEK2-ассоциированных опухолях по результатам NGS.



По результатам исследования аннотированных списков соматических мутаций для 9 образцов были выбраны потенциально драйверные события (Таблица 15). Дополнительных соматических мутаций в гене CHEK2 в ходе экзомного секвенирования также не было выявлено.



Таблица 15. Потенциально драйверные соматические мутации в CHEK2-ассоциированных опухолях молочной железы.

Ген	Мутация	ID мутации в базах данных	CADD-score
<b>T72, CHEK21100delC, ROH</b>			
PIK3CA	c.A3140G:p.H1047R	COSM94986	22,7
SMAD7	c.626delC:p.P209Lfs*113	COSM1564050	35
CDC27	c.T508C:p.S170P	COSM4130266	23,3
<b>T74, CHEK21100delC, LOH</b>			
TP53	17:7578358 микроделеция в сплайс-сайте	na	na
PTEN	c.48_66del:p.Q17fs*0	na	na
RAF1	c.G1504A:p.V502I	na	24,5
PAX7	c.G368C:p.R123T	na	26,3
PREX2	c.1879-2A>T	na	34
MARK2	c.C420G:p.Y140X	na	37
ROCK1	c.C3646G:p.Q1216E	na	18,54
<b>T75, CHEK21100delC, ROH</b>			
IGF1R	c.G3229A:p.V1077I	na	28,4
CASP8AP2	c.C4340T:p.P1447L	COSM5737694	17,46
CDC27	c.G1067C:p.G356A	COSM4130235	21,9
RIF1	c.G7235T:p.G2412V	na	27
XPC	c.C1243T:p.R415X	rs757958943	28,7
CASP8	c.C767G:p.S256X	COSM4887186	33
RANBP2	c.G6145A:p.V2049I	rs778673552	15,26
<b>T87, CHEK2del5395, LOH</b>			
POSTN	c.1331dupA:p.Y444fs*	na	na
PRKD2	c.G1848C:p.W616C	na	34
IGF2R	c.263_281del:p.L88Ffs*7	na	na
<b>T88, CHEK21100delC, ROH</b>			
PIK3CA	c.A3140G:p.H1047R	COSM94986	22,70
WNT2	c.C154T:p.R52W	COSM5062134	29,5
NF1	c.C6483A:p.Y2161X	na	38
MSH3	c.T1019C:p.I340T	na	24,4
OXSRI	c.1323-1G>A	na	34
MAP3K1	c.4215_4216del:p.F1405Lfs*13	na	na
<b>T92, CHEK21100delC, ROH</b>			
CDH10	c.C1345T:p.R449C	na	32
CDC27	c.C638A:p.A213D	COSM221832	25,6
SYK	c.172delG:p.R59Gfs*11	na	na

<b>T93, CHEK2IVS2, LOH</b>			
RUNX1	c.211delC:p.L71Sfs*23	COSM24719	34
<b>T94, CHEK2del5395, ROH</b>			
PIK3CA	c.A3140G:p.H1047R	COSM94986	22,70
CDH20	c.G2176A:p.V726M	na	25,90
CASP9	c.G652T:p.D218Y	na	24,90
MAP3K1	c.3954dupT:p.Y1319Lfs*5	na	na
ATRX	c.G7066A:p.V2356I	na	22,80
<b>T98, CHEK2del5395, LOH</b>			
PIK3CA	c.G1633A:p.E545K	COSM125370	31,00
GRB7	c.G947A:p.R316Q	COSM978688	21,80
TLE3	c.A1933G:p.T645A	na	28,30

Самыми частыми соматическими мутациями в CHEK2-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 (T74) (таблица 15).

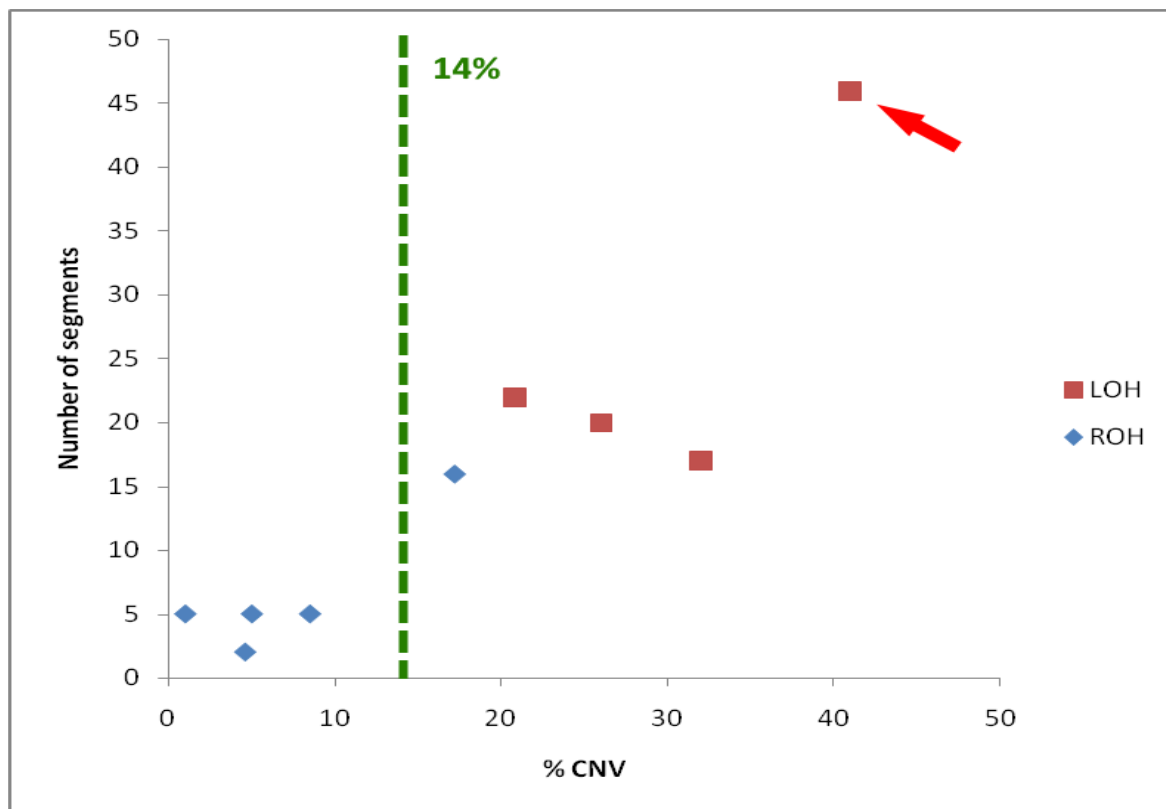
Были обнаружены и другие соматические мутации, характерные, в основном, для люминальных опухолей: MAP3K1, PTEN, NF1.

Мутации в гене кадгерина-1 встречаются примерно в 7% опухолей молочной железы. Считается, что инактивация или снижение экспрессии кадгерина-1 способствует эпителиально-мезенхимальному переходу опухолевых клеток [Kalluri et al., 2009]. Среди 9 исследованных образцов мутации в гене CDH1 обнаружены не были. Однако были обнаружены замены в других генах данного семейства: CDH10 (образец T92) и CDH20 (образец T94). CDH10, вероятно, является опухолевым супрессором: его инактивация стимулирует клеточную пролиферацию [Li et al., 2015].

После биоинформатической обработки и сравнения представленности гетерозигонных вариантов в опухолевой ткани была выполнена оценка вариаций копийности (CNV, copy number variations). Наличие потери гетерозигонности 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 8). Полноэкзомная потеря гетерозиготности отражает геномную нестабильность опухолевой ткани. Для оценки исследуемых образцов использовалось пороговое значение протяженности утраченных локусов 14% [Swisher et al., 2018]. Данное значение используют в клинических исследованиях, когда уровень общей геномной нестабильности опухоли является критерием назначения того или иного препарата. Образцы T74, T87, T92, T93 и T98 продемонстрировали высокий уровень ЛОН (Рисунки 9-17). Наибольшей степенью генетической нестабильности на уровне экзона отличался образец T74, содержащий соматическую мутацию в гене TP53. Для всех образцов с ЛОН по локусу СНЕК2 был показан высокий уровень ЛОН по экзому.

Количество образцов, исследованных методом экзомного секвенирования, недостаточно для выявления характерных для СНЕК2-ассоциированных опухолей крупных участков нарушения копийности. Однако возможно сделать некоторые наблюдения. Участок хромосомы 17,

Рисунок 8. Соотношение протяженности и количества утраченных сегментов в опухолях с потерей нормального аллеля CHEK2 (LOH) и без нее (ROH). Стрелкой обозначен образец с мутацией TP53. Пунктирная линия – для оценки полноэкзомной потери гетерозиготности.



содержащий ген BRCA1 (17q), был утрачен в 5 случаях, в том числе в 3, содержащих утрату локуса CHEK2 (образцы T72, T74, T87, T88, T93). Увеличение копийности длинного плеча хромосомы 1 (1q) наблюдалось в разной степени выраженности в трех образцах (T75, T87, T94). Интересно отметить, что образец T94, характеризующийся общей генетической стабильностью (1,03% CNV), продемонстрировал значительное увеличение копийности участка длинного плеча хромосомы 11 (11q) (Рисунок 16). В данном локусе располагается ген EMSY, кодирующий белок, непосредственно взаимодействующий с BRCA2. Считается, что EMSY может ингибировать функционирование BRCA2, тем самым вызывая развитие спорадических форм РМЖ [Cousineau et al., 2011]. Для проверки вовлеченности в амплификации именно гена EMSY был выполнен анализ

копийности с использованием флуоресцентных меток. Анализ подтвердил наличие в образце T94 амплификации гена EMSY высокого уровня.

В 4 из 5 случаев с высоким уровнем потерь гетерозиготности по экзому наблюдалась и потеря нормального аллеля гена CHEK2 (рисунок 8). 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.

Рисунок 9. Оценка CNV для образца T72, выполненная на основе данных экзомного секвенирования. А – Распределение MAF для гетерозиготных позиций; Б – Количество и размер сегментов с разным MAF; В – Диаграмма CNV.

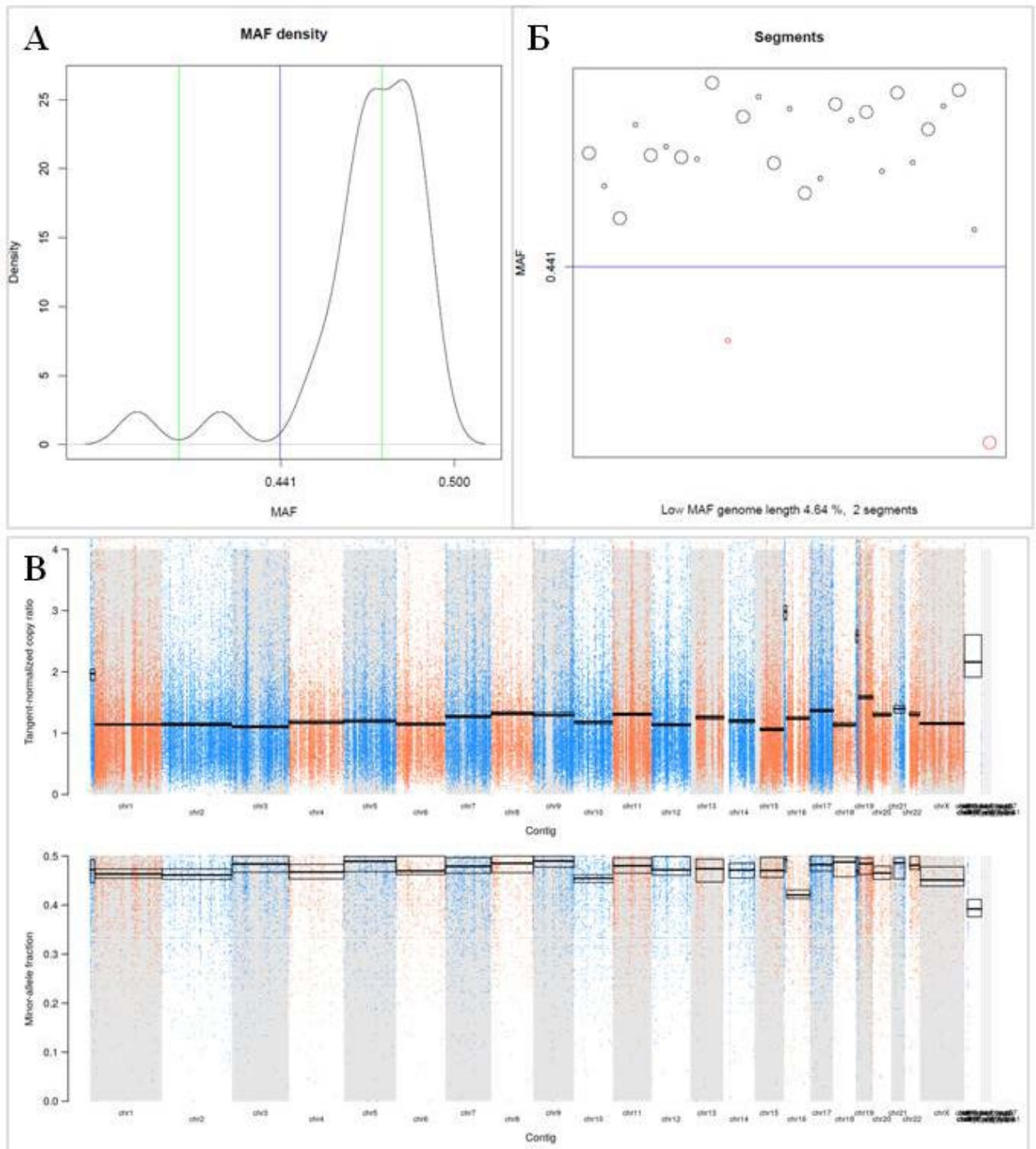


Рисунок 10. Оценка CNV для образца T74, выполненная на основе данных экзомного секвенирования. А – Распределение MAF для гетерозиготных позиций; Б – Количество и размер сегментов с разным MAF; В – Диаграмма CNV.

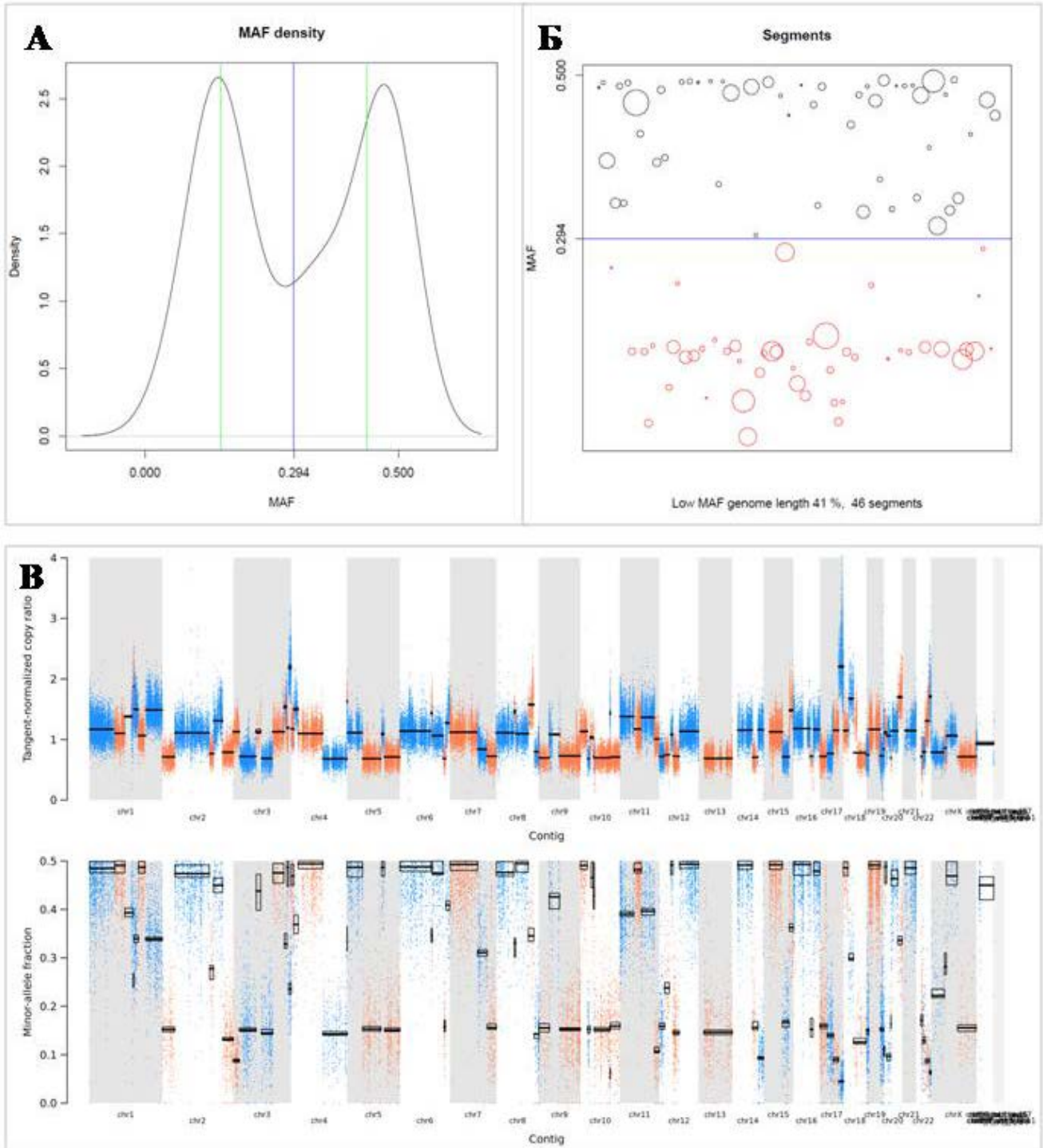


Рисунок 11. Оценка CNV для образца T75, выполненная на основе данных экзомного секвенирования. А – Распределение MAF для гетерозиготных позиций; Б – Количество и размер сегментов с разным MAF; В – Диаграмма CNV.

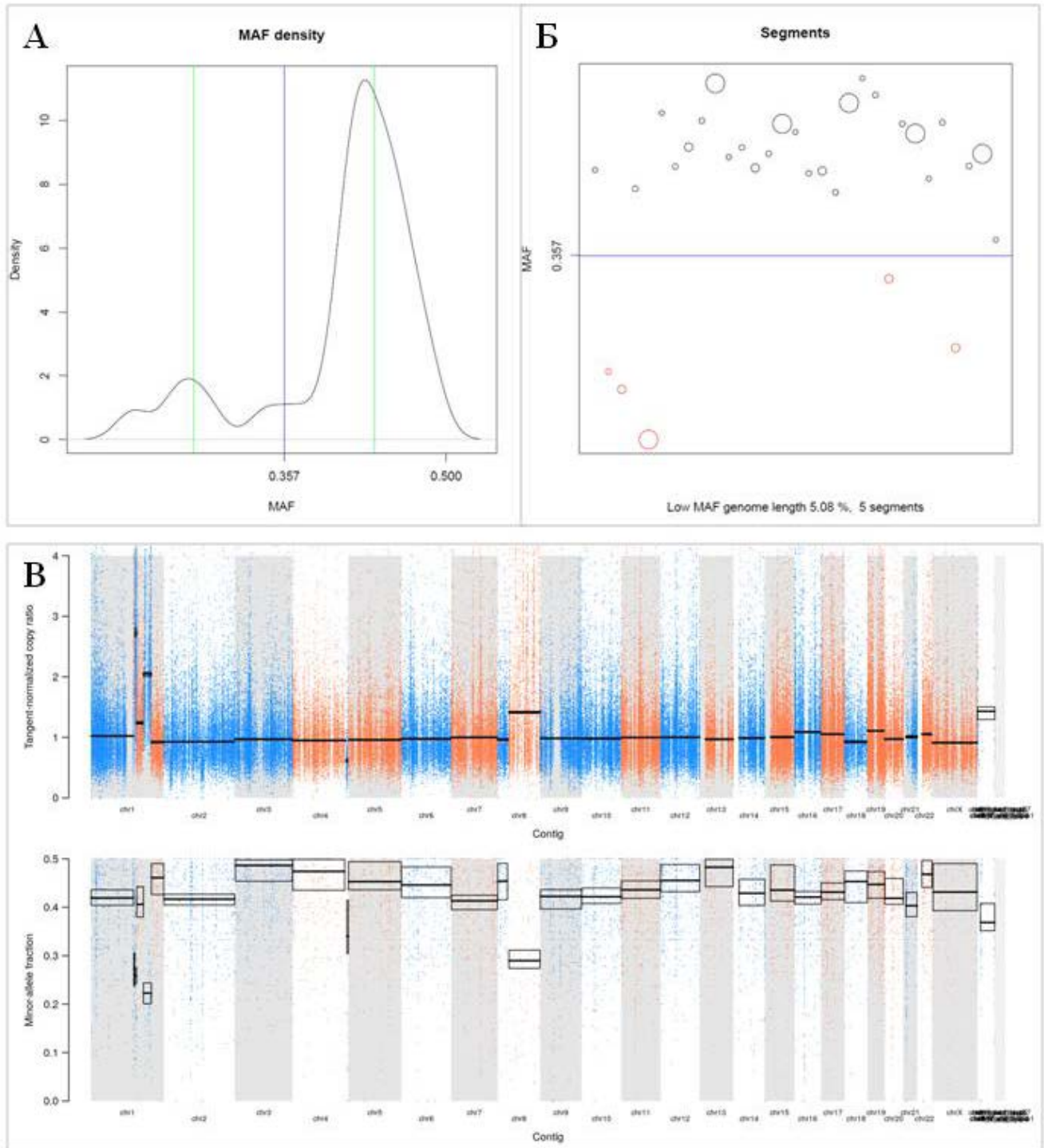




Рисунок 12. Оценка CNV для образца T87, выполненная на основе данных экзомного секвенирования. А – Распределение MAF для гетерозиготных позиций; Б – Количество и размер сегментов с разным MAF; В – Диаграмма CNV.

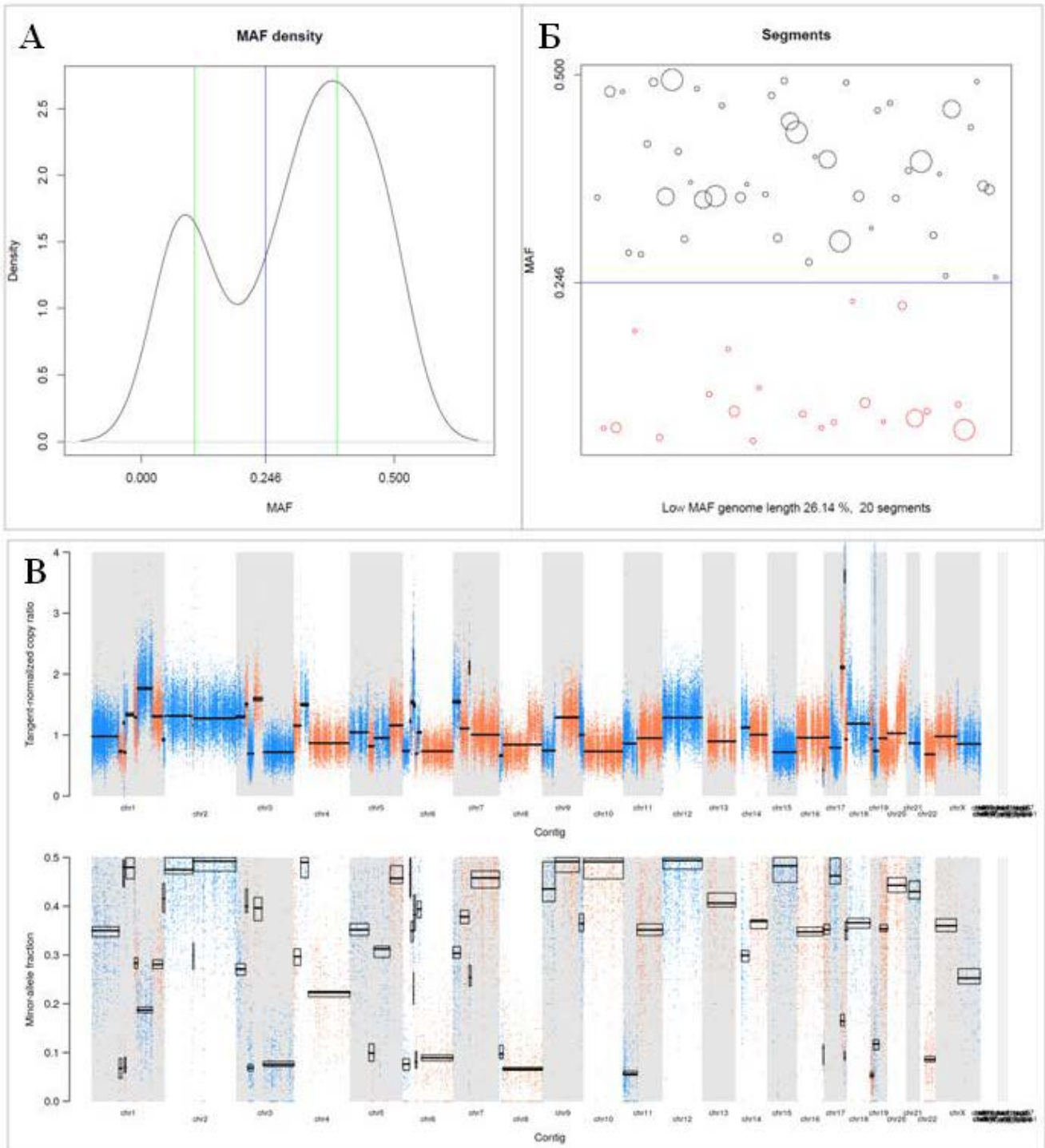


Рисунок 13. Оценка CNV для образца T88, выполненная на основе данных экзомного секвенирования. А – Распределение MAF для гетерозиготных позиций; Б – Количество и размер сегментов с разным MAF; В – Диаграмма CNV.

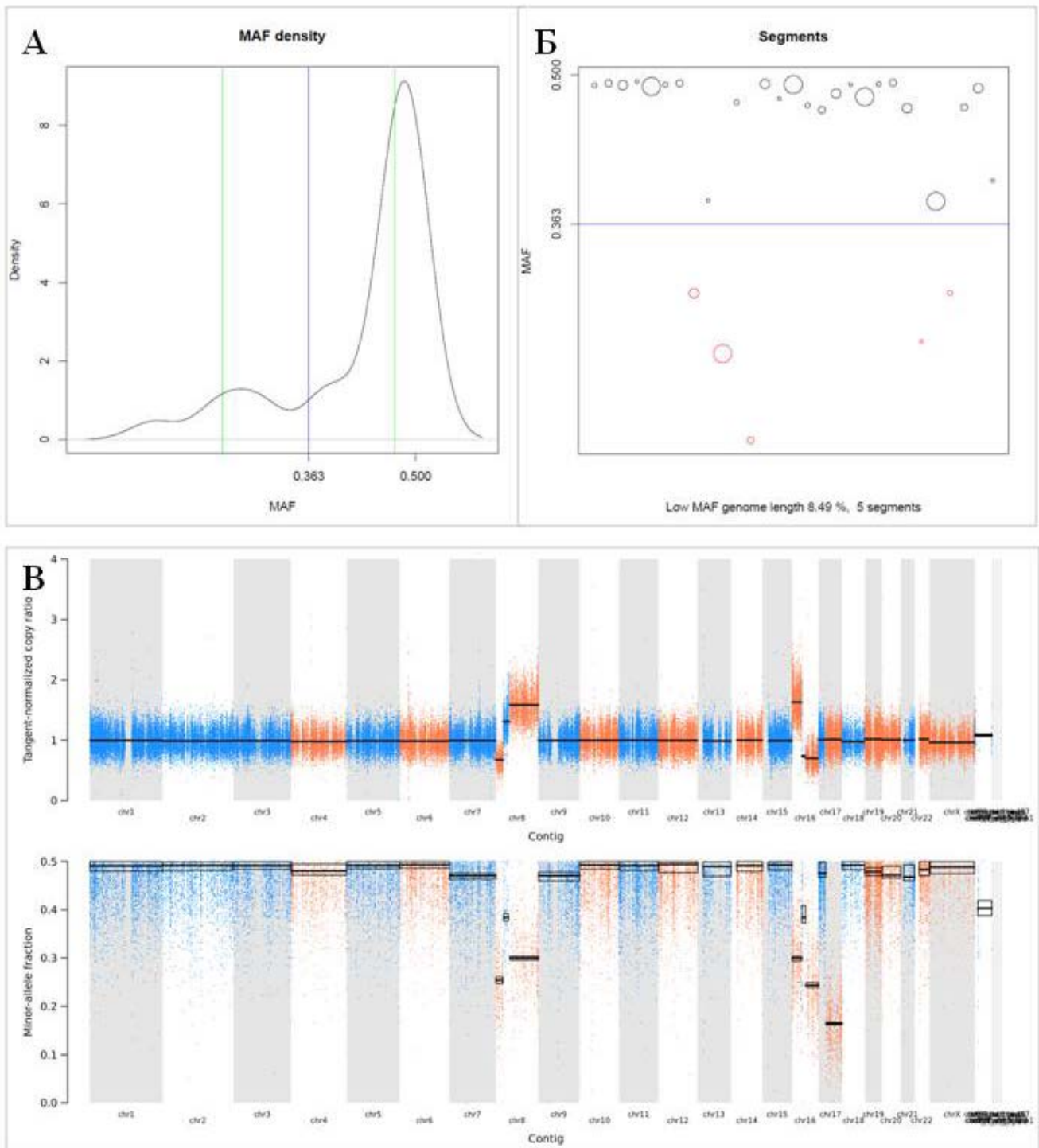


Рисунок 14. Оценка CNV для образца T92, выполненная на основе данных экзомного секвенирования. А – Распределение MAF для гетерозиготных позиций; Б – Количество и размер сегментов с разным MAF; В – Диаграмма CNV.

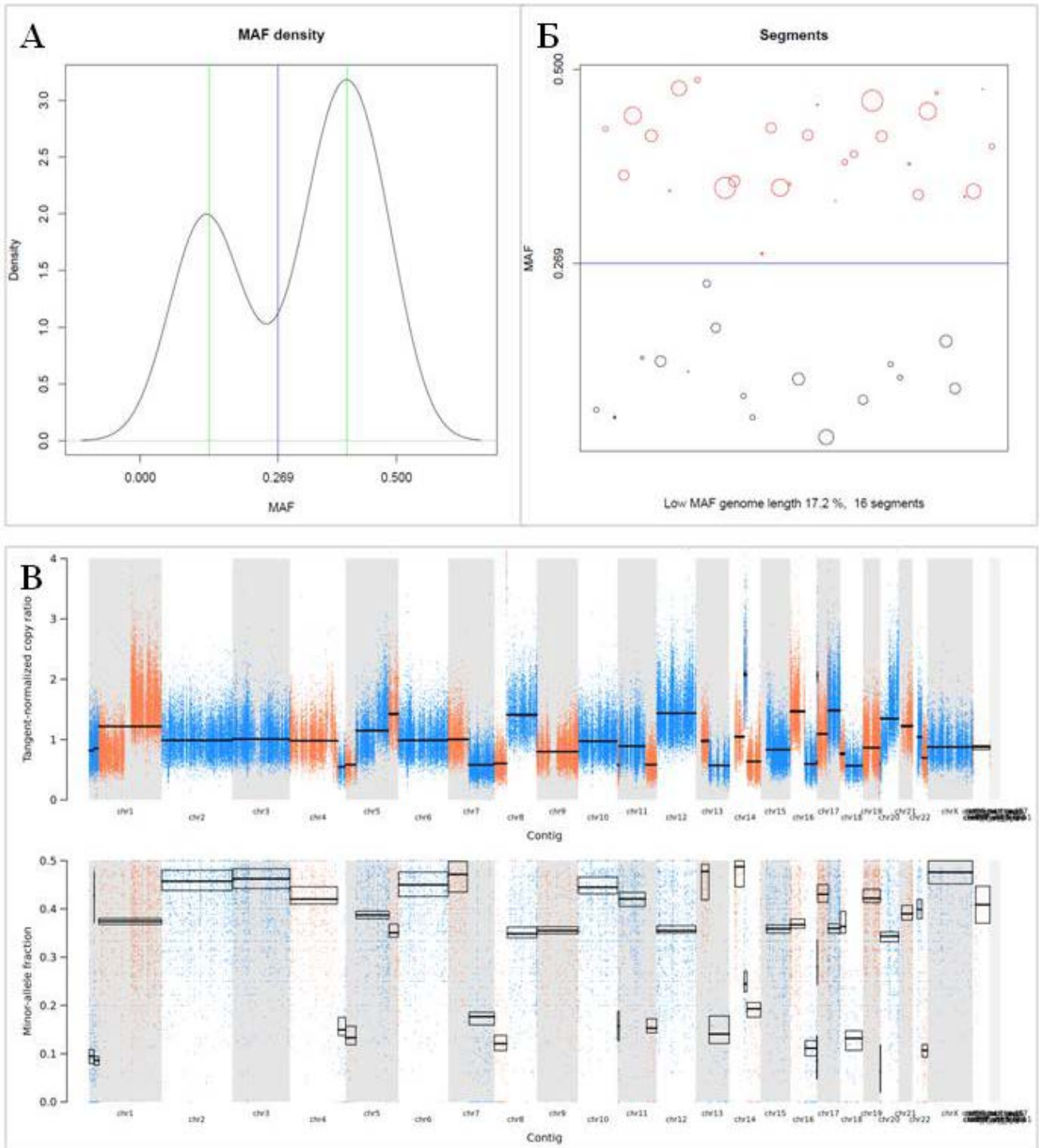


Рисунок 15. Оценка CNV для образца T93, выполненная на основе данных экзомного секвенирования. А – Распределение MAF для гетерозиготных позиций; Б – Количество и размер сегментов с разным MAF; В – Диаграмма CNV.

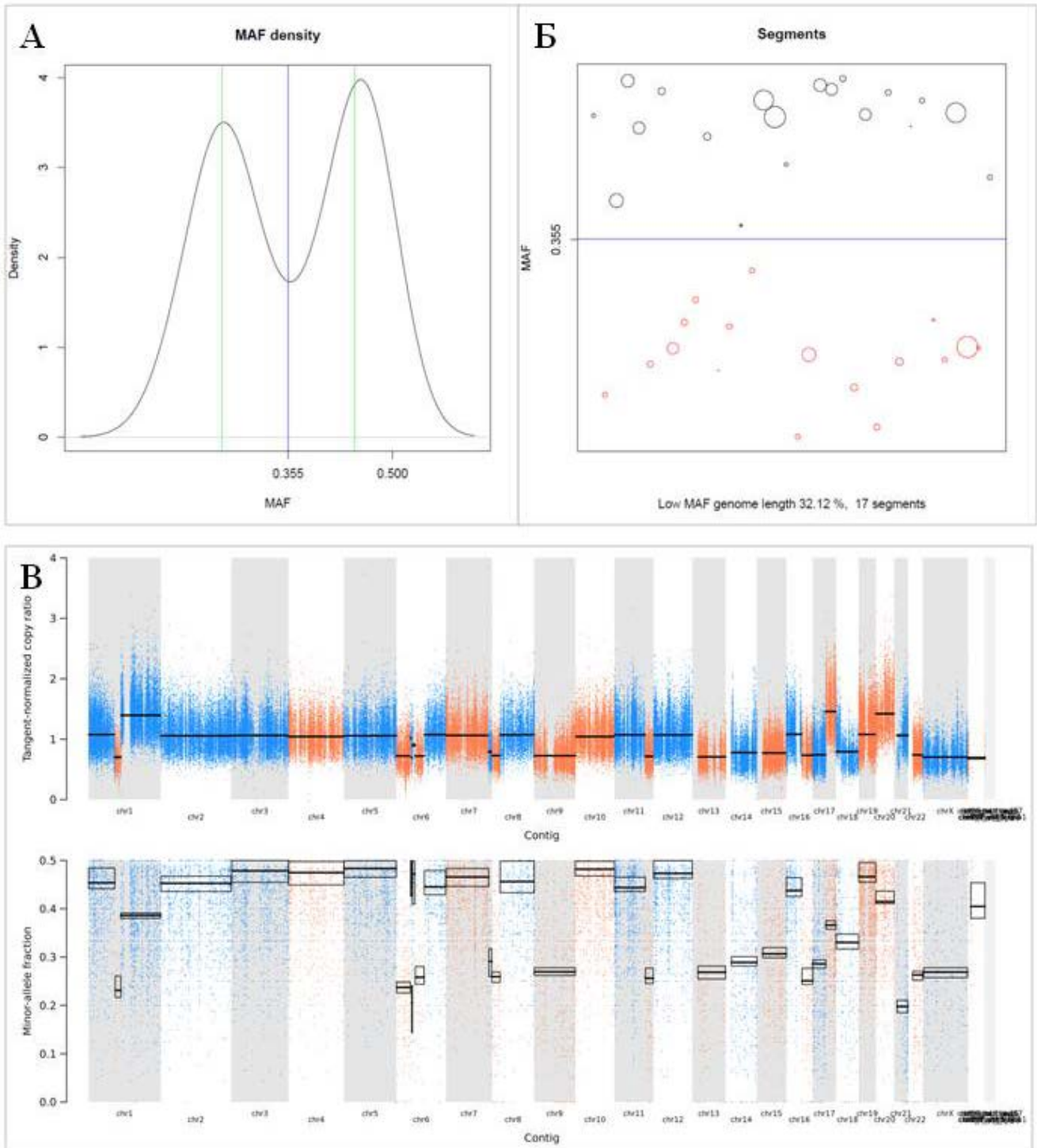


Рисунок 16. Оценка CNV для образца T94, выполненная на основе данных экзомного секвенирования. А – Распределение MAF для гетерозиготных позиций; Б – Количество и размер сегментов с разным MAF; В – Диаграмма CNV. Красным кругом отмечена амплификация гена EMSY.

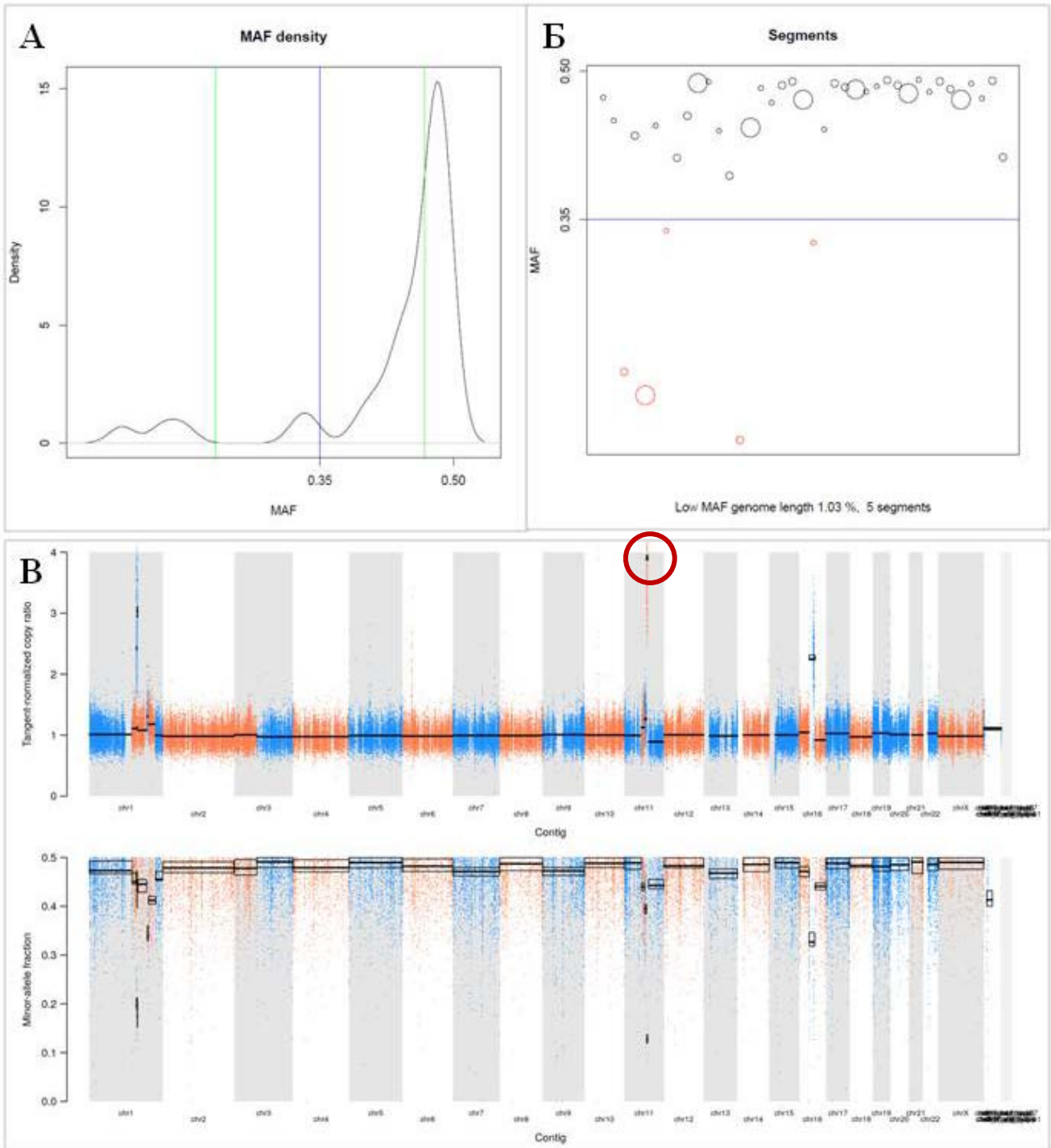
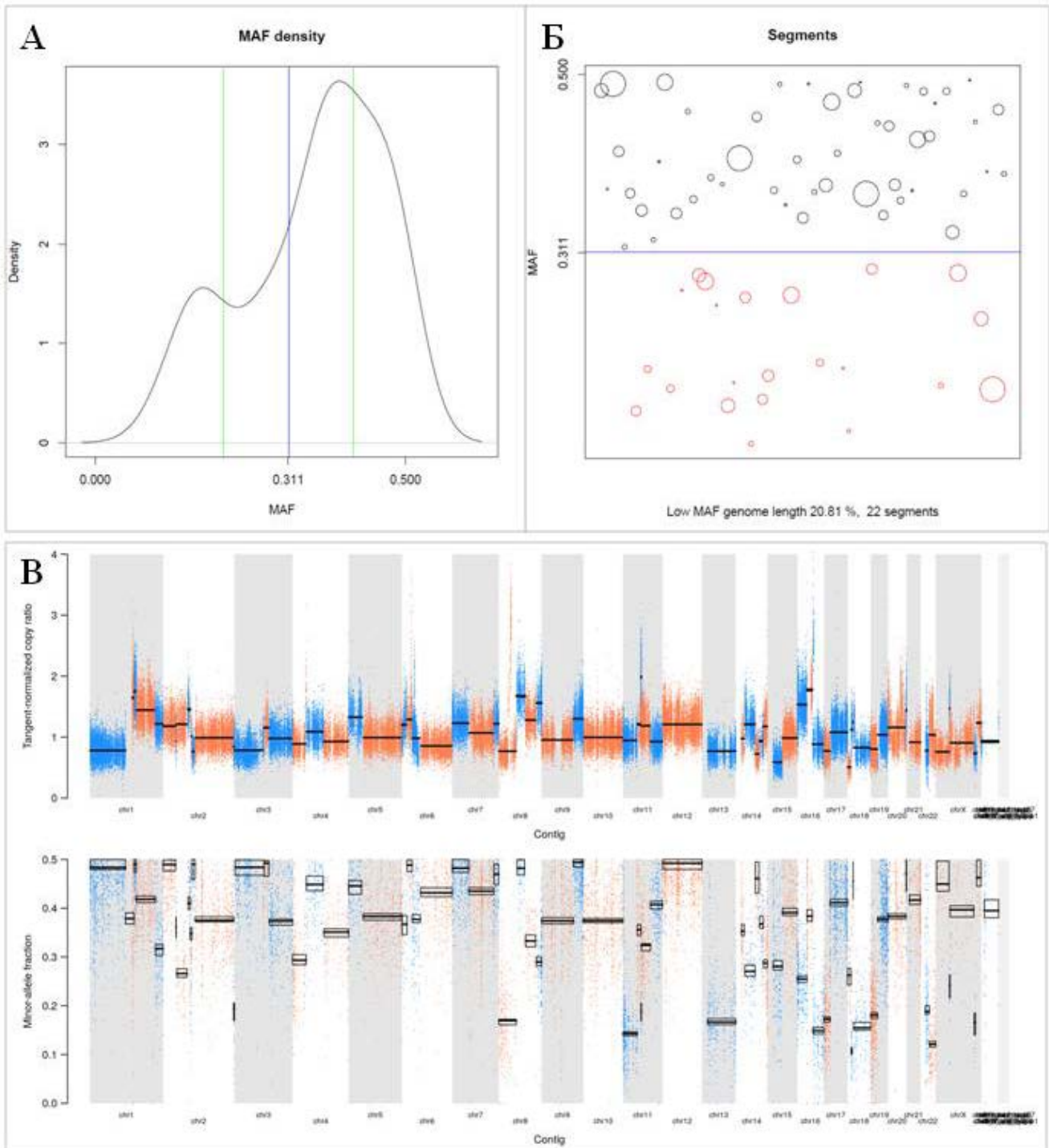


Рисунок 17. Оценка CNV для образца T98, выполненная на основе данных экзомного секвенирования. А – Распределение MAF для гетерозиготных позиций; Б – Количество и размер сегментов с разным MAF; В – Диаграмма CNV.



## ГЛАВА IV. ОБСУЖДЕНИЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе представлены результаты исследования частоты наследственных мутаций в гене СНЕК2 среди больных раком молочной железы. Было выполнено молекулярно-эпидемиологическое исследование «случай-контроль». Такой тип исследований имеет свои ограничения, например, требует большого объема выборок. Тем не менее, исследование «случай-контроль» позволяет достоверно выявлять редкие аллели средней пенетрантности.

Впервые проведено систематическое сравнение встречаемости разных наследственных мутаций СНЕК2 среди больных раком молочной железы и онкологически здоровых женщин Северо-западного региона РФ. Установлено, что 3,1% опухолей молочной железы ассоциированы с наследственной мутацией СНЕК2, при этом наибольший вклад в заболеваемость вносит мутация del5395. Интересно, что соотношение количества случаев с мутациями del5395 и 1100delC в группах больных и здоровых сохраняется одинаковым – del5395 встречается примерно в 2 раза чаще, чем 1100delC. Сплайсинговая мутация IVS2+1G>A встречается среди больных реже всего (0,46%), а у здоровых женщин не была обнаружена.

Результаты исследования показали, что отношения рисков РМЖ для мутаций 1100delC и del5395 сопоставимы (4,42 и 4,6 соответственно). Рассчитать отношение шансов для носителей мутации IVS2+1G>A не удалось, так как среди контролей этот вариант обнаружен не был.

Один из крупнейших мета-анализов, включающий исследование мутаций СНЕК2, был опубликован в 2011 году [Zhang et al., 2011]. Относительный риск возникновения РМЖ для мутаций СНЕК2 варьировал от 2,53 для del5395 до 3,10 для 1100delC. Примечательно, что при анализе пациенток с наличием семейного анамнеза относительные риски возникновения РМЖ у СНЕК2 носительниц значительно возрастают. Так, в исследовании Cybulski et al., 2019 оценивали частоту мутаций в 14 РМЖ-

ассоциированных генах у 1018 больных с чрезвычайноотягощенным семейным анамнезом. Отношение шансов для носителей СНЕК2 мутаций составило для IVS2+1G>A - 6,9; для 1100delC – 8,4; для del5395 – 6,5. По результатам нашего исследования сохраняется аналогичная тенденция – при наличии семейного анамнеза встречаемость мутаций СНЕК2 увеличивается до 6% (17/284).

Одним из клинических признаков наследственных синдромов является более ранняя манифестация заболевания по сравнению со спорадическими случаями. Данный факт хорошо подтверждается ранним выявлением РМЖ у BRCA-носительниц. Однако опухоли молочной железы у СНЕК2-носительниц диагностируют значительно позже (49,0 vs. 43,8;  $p = 0,0021$ ,  $t$ -тест Стьюдента). Таким образом, средний возраст возникновения у пациентки СНЕК2-ассоциированной опухоли не отличается от такового для спорадических новообразований.

Анализ клиничко-морфологических характеристик СНЕК2-зависимых опухолей был выполнен для 91 случая. Парадоксально, средний возраст пациенток в данной группе (55,8 лет) значительно превышал средний возраст носительниц мутаций, обнаруженных в первой части исследования (49,0 лет). Стоит отметить, что выборка пациентов для исследований клиничко-морфологических особенностей была значительно обогащена случаями, диагностированными в Ленинградском областном онкологическом диспансере (54/91, 59,3%), в то время как эпидемиологическое исследование было в первую очередь основано на пациентах из НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова. По нашим собственным неопубликованным данным средний возраст пациентов в ЛООД в целом значительно выше, чем в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова, вне зависимости от наличия наследственной мутации.

Было проведено сравнение целого ряда клиничко-морфологических параметров: размер опухоли, вовлеченность лимфоузлов, наличие отдаленных метастазов, степень дифференцировки опухоли,



иммунофенотипические параметры (индекс Ki-67, ER, PR, HER2), наличие семейного анамнеза. Статистически значимых различий по проанализированным параметрам в группах пациенток с разными вариантами мутаций CHEK2 не обнаружилось. В большинстве своем CHEK2-ассоциированные опухоли представлены люминальным В подтипом. Таким образом, наличие различных транскирующихся мутаций CHEK2 не оказывает влияния на иммунофенотипическую характеристику опухоли.

Стоит отметить, что по своим иммунофенотипическим характеристикам BRCA1-ассоциированные опухоли представляют собой довольно гомогенную группу (трижды негативный рак молочной железы). Однако при изучении большого количества носителей мутаций BRCA1 и BRCA2 (19 581 и 11900 соответственно) были выявлены участки генов, мутации в которых чаще ассоциированы с развитием рака молочной железы или рака яичников [Rebbeck et al., 2015].

Для 46 опухолевых образцов выполнен комплексный анализ соматического статуса гетерозиготности в локусе гена CHEK2. Для исследования были применены несколько подходов: аллель-специфический анализ с использованием ПЦР в реальном времени и секвенирования, анализ полиморфных позиций в локусе гена CHEK2, экзомное секвенирование. Важно отметить, что, в целом, результаты разных методов продемонстрировали значительную конкордантность, а значит при масштабных исследованиях возможно использование одной из этих методик.

Анализ статуса нормального аллеля в CHEK2-ассоциированных опухолях был выполнен для образцов с разными наследственными мутациями CHEK2: 1100delC (n = 15), del5395 (n = 18), IVS2+1G>A (n = 13). Была продемонстрирована статистически достоверная разница между частотой потери гетерозиготности в опухолях с мутацией del5395, по сравнению с двумя другими наследственными детерминантами (p = 0,0007 [OR: 7,11; 95% CI 1,54-40,5], точный тест Фишера).

Нужно отметить, что систематические исследования наличия LOH в опухолях с разными типами мутаций CHEK2 практически отсутствуют в литературе. Потеря участков 22q считается довольно характерным событием для опухолей молочной железы, колоректальных раков, астроцитом и для других новообразований [Castels et al., 2000; Hartmann et al., 2004; Massink et al., 2015; Renault et al., 2018]. Результаты экзомного секвенирования образцов с CHEK2 LOH продемонстрировали утрату довольно протяженного участка длинного плеча 22 хромосомы в этих опухолях. В качестве кандидатных генов опухолевых супрессоров, располагающихся в этом регионе кроме CHEK2, можно рассматривать NF2, INI1 (SMARCB1), PARVG и др. [Huang et al., 2002; Castellvi-Bel et al., 2003; Yamamoto et al., 2011].

Известно, что в BRCA1-ассоциированных опухолях потеря гетерозиготности в локусе наследственной мутации встречается чрезвычайно часто – до 90% случаев [Maxwell et al., 2017]. Однако в контексте изучения CHEK2-ассоциированных карцином большой интерес вызывает частота соматической инактивации гена предрасположенности в опухолях с мутациями других генов средней пенетрантности: ATM, PALB2, NBS1.

Для ATM-ассоциированных опухолей также характерен люминальный подтип РМЖ [Renault et al., 2018]. Данные о частоте потери гетерозиготности в ATM-специфическом локусе (11q22-23) ATM-зависимых опухолей весьма противоречивы. ATM-специфический LOH идентифицируется в 0-60% случаев [Goldgar et al., 2011; Mangone et al., 2015; Renault et al., 2018]. В некоторых исследованиях, напротив, демонстрируют утрату мутантного аллеля гена ATM [Broeks et al., 2000]. Примечательно, что утрата различных участков длинного плеча хромосомы 22 характерна для 70% ATM-зависимых опухолей [Renault et al., 2018].

PALB2-ассоциированный РМЖ чаще всего также представлен ER+, HER2- опухолями [Tischkowitz et al., 2007; Bogdanova et al., 2011; Hartley et al., 2014; Li et al., 2019]. Потеря гетерозиготности в PALB2-зависимых опухолях обнаруживается примерно в 50% случаев. Кроме того, до 20%

PALB2-опухолей имеют соматическую инактивирующую мутацию в этом же гене [Li et al., 2019]. Таким образом, биаллельная инактивация PALB2 в этой группе опухолей молочной железы происходит в 70% случаев.

Исследования NBS1-ассоциированных опухолей не так многочисленны [Gorski et al., 2003; Buslov et al., 2005; Suspitsin et al., 2014]. Вероятно, не менее 25% случаев содержат потерю гетерозиготности в локусе гена NBS1.

Для исключения возможности биаллельной инактивации гена за счет дополнительных мутаций в данном исследовании был также выполнен анализ соматических мутаций экзонов 1-10 гена CHEK2. В 16 образцах, исследованных на предмет наличия соматических мутаций CHEK2, дополнительных изменений последовательности гена обнаружено не было. Исследования уровня белковой экспрессии Chk2 в 1100delC-мутантных опухолях демонстрируют уменьшение количества белкового продукта даже при отсутствии ЛОН в данном локусе [Oldenburg et al., 2003]. Данный факт свидетельствует о возможном наличии дополнительных механизмов инактивации нормального аллеля. Например, в опухолях молочной железы обнаруживают метилирование CHEK2, приводящее к значительному снижению уровня экспрессии мРНК CHEK2 [Sullivan et al., 2002]. Staalesen et al., 2004 выявили большое количество опухоль-специфичных транскриптов CHEK2 в опухолях молочной железы. Они предположили, что высокая вариабельность сплайсинга CHEK2 в опухолях может приводить к отсутствию функциональных доменов Chk2 или неправильной локализации опухоли в цитоплазме [Staalesen et al., 2004].

Дальнейшие исследования механизмов инактивации CHEK2 в наследственных опухолях должны быть, вероятно, направлены на анализ аллель-специфической экспрессии и иммуногистохимическое выявление разных форм белка в опухолевой ткани.

Для 9 образцов CHEK2-зависимых опухолей было выполнено экзомное секвенирование (1100delC n = 5; del5395 n = 3, IVS2+1G>A n = 1). Во всех случаях потеря гетерозиготности в локусе CHEK2 была подтверждена

результатами экзомного анализа. По данным высокопроизводительного секвенирования можно говорить об общем уровне геномной нестабильности (%CNV). В качестве порогового уровня было выбрано значение 14% [Swisher et al., 2018]. Оказалось, что потеря гетерозиготности в локусе СНЕК2 в целом отражает и общий уровень генетической нестабильности (Таблица 16).

Таблица 16. Соотношение между образцами с потерей гетерозиготности в локусе СНЕК2 и образцами с высоким уровнем экзомной нестабильности (>14%) ( $p = 0,476$ , точный тест Фишера)

		Генетическая нестабильность на уровне экзома	
		LOH-H (>14%)	LOH-L (<14%)
Статус гетерозиготности локуса СНЕК2	LOH	4	0
	ROH	1	4

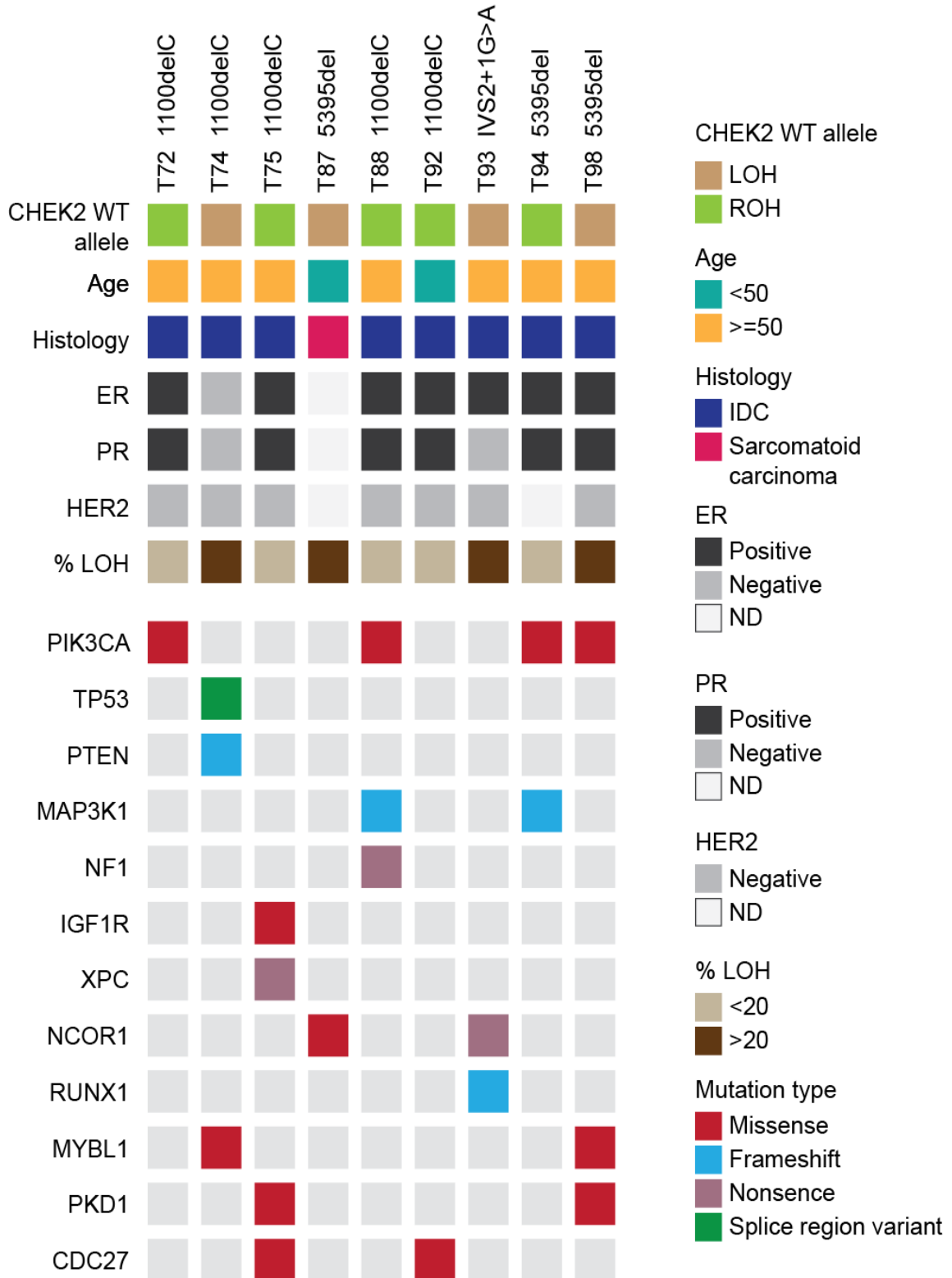
Для дополнительной оценки уровня нестабильности генетического материала в опухоли нами был введен дополнительный параметр – количество сегментов, затронутых потерей гетерозиготности (Рисунок 8). Оказалось, что количество сегментов прямо коррелирует с их размером, то есть отсутствуют варианты с большим количеством мелких выпадений и небольшим количеством крупных потерь генетического материала. Однако надо учесть, что наше исследование было сознательно ограничено только кодирующей частью экзома (<1% генома), на геномном уровне распределение делеций и амплификации может демонстрировать другой паттерн.

На уровне спектра соматических мутаций явных различий между опухолями с разными мутациями СНЕК2 не наблюдалось (Таблица 15, рисунок 18). СНЕК2-ассоциированные опухоли продемонстрировали паттерн мутаций, характерный для всех люминальных опухолей молочной железы.

Так, в 44,4% (4/9) была обнаружена мутация в гене PIK3CA, в 22,2% (2/9) – инактивирующая мутаций MAP3K1. Мутации TP53, напротив, встречались редко (1/9, 11,1%). Известно, что мутации TP53 связаны с высоким уровнем генетической нестабильности в разных типах опухолей [Blandino et al., 2018]. Кроме того, для таких опухолей характерна потеря участка хромосомы 17, содержащей ген TP53. Отдельные исследования также показывают, например, что частота рецидивов рака яичника среди пациенток с полной утратой нормального аллеля TP53 значительно выше, чем при сохранении нормальной копии [Zhang et al., 2017]. Образец T74 с соматической мутацией в гене TP53 продемонстрировал не только самый высокий уровень генетической нестабильности (41% CNV), но и потерю участка 17p (Рисунок 10).

Обнаруженная высокая частота мутаций PIK3CA соответствует литературным данным. В последнее время проводится множество исследований для определения роли мутаций PIK3CA в качестве прогностического фактора. Однако результаты таких исследований не совсем однозначны и, вероятно, значимость мутаций PIK3CA варьирует в зависимости от подтипа РМЖ. Так 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-положительного РМЖ, но негативным фактором для HER2-положительных опухолей [Ellis et al., 2010]. PIK3CA достаточно давно рассматривается в качестве мишени для противоопухолевой терапии. Для клинического применения уже применяется несколько PIK3CA-ингибиторов: иделализиб, копанлисиб, пикрей (алпелисиб) [Janku et al., 2018]. Последний из них, пикрей, одобрен специально 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

Рисунок 18. Спектр генов, затронутых соматическими мутациями, в образцах CHEK2-ассоциированного РМЖ по результатам экзомного секвенирования.



доля PIK3CA-мутантных опухолей среди CHEK2-носителей позволяет рассматривать ингибиторы PIK3CA, а также другие ингибиторы PI3K-AKT-mTOR сигнального пути, в качестве перспективных препаратов для таргетной терапии РМЖ.

В одном из исследованных образцов (T94) по результатам экзомного секвенирования была обнаружена амплификация гена EMSY (рисунок 16). 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 “BRCAness” фенотипа [Jelinic et al., 2017]. CHEK2-ассоциированная опухоль с EMSY амплификацией, напротив, продемонстрировала парадоксально низкий уровень генетической нестабильности (1,03% CNV).

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 CHEK2 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 клиничко-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 ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Имянитов, Е.Н. Скрининг для лиц с наследственной предрасположенностью к раку / Е.Н. Имянитов // Практическая онкология. - 2010. - Т. 11. - № 2. - С. 102 - 109.
2. Соколенко, А.П. Синдром наследственного рака молочной железы и яичников в Российской Федерации / А.П. Соколенко, А.Г. Иевлева, Н.В. Митюшкина [и др.] // Acta Naturae. - 2010. - Т. 2. - С. 53 - 57.
3. Abkevich, V. Patterns of genomic loss of heterozygosity predict homologous recombination repair defects in epithelial ovarian cancer / V. Abkevich, K.M. Timms, B.T. Hennessy [et al.] // Br J Cancer. - 2012. - Т. 107. - № 10. - P. 1776 - 1782.
4. Adank, M.A. CHEK2\*1100delC homozygosity is associated with a high breast cancer risk in women / M.A. Adank, M.A. Jonker, I. Kluijdt [et al.] // Journal of Medical Genetics. - 2011. - Т. 48. - № 12. - P. 860 - 863.
5. Aktas, D. Analysis of CHK2 in patients with myelodysplastic syndromes / D. Aktas, M.J. Arno, F. Rassool, G.J. Mufti // Leuk Res. - 2002. - Т. 26. - P. 985 - 987.
6. Anczuków, O. Does the nonsense-mediated mRNA decay mechanism prevent the synthesis of truncated BRCA1, CHK2, and p53 proteins? / O. Anczuków, M.D. Ware, M. Buisson [et al.] // Hum Mutat. - 2008. - Т. 29 - № 1 - P. 65 - 73.
7. Bartek, J. Chk1 mediates S and G2 arrests through Cdc25A degradation in response to DNA-damaging agents / J. Bartek, J. Falck, J. Lukas // Nat Rev Mol Cell Biol. - 2001. - Т. 2 - P. 877 - 886.
8. Bell, D.W. Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome / D.W. Bell, J.M. Varley, T.E. Szydlo [et al.] // Science. - 1999. - Т. 286. - № 5449 - P. 2528 - 2531.
9. Birkbak, N.J. Telomeric allelic imbalance indicates defective DNA repair and sensitivity to DNA-damaging agents / N.J. Birkbak, Z.C. Wang, J.Y. Kim, [et al.] // Cancer Discov. - 2012. - Т. 2 - № 4. - P. 366 - 375.
10. Blandino, G. New therapeutic strategies to treat human cancers expressing mutant p53 proteins / G. Blandino, S. Di Agostino // J Exp Clin Cancer Res. - 2018. - Т. 37. - № 1. - P. 30.
11. Bogdanova, N. PALB2 mutations in German and Russian patients with bilateral breast cancer / N. Bogdanova, A.P. Sokolenko, A.G. Iyevleva [et al.] // Breast Cancer Res Treat. - 2011. - Т. 126. - № 2. - P. 545 - 550.

12. Bogdanova, N. Association of two mutations in the CHEK2 gene with breast cancer / N. Bogdanova, N. Enssen-Dubrowskaja, S. Feshchenko [et al.] // *Int J Cancer*. - 2005 - T. 116. - № 2. - P. 263 - 266.
13. Broeks, A. ATM-heterozygous germline mutations contribute to breast cancer-susceptibility / A. Broeks, J.H. Urbanus, A.N. Floore [et al.] // *Am J Hum Genet*. - 2000. - T. 66. - № 2. - P. 494-500.
14. Broeks, A. Excess risk for contralateral breast cancer in CHEK2\* 1100delC Germline mutation carriers / A. Broeks, L. de Witte, A. Nooijen [et al.] // *Breast Cancer Res Treat*. - 2004. - T. 83. - № 1. - P. 91-93.
15. Buslov, K.G. NBS1 657del5 mutation may contribute only to a limited fraction of breast cancer cases in Russia / K.G. Buslov, A.G. Iyevleva, E.V. Chekmariova [et al.] // *Int J Cancer*. - 2005. - T. 114. - № 4. - P. 585 - 589.
16. Byrski, T. Response to neoadjuvant therapy with cisplatin in BRCA1-positive breast cancer patients / T. Byrski, T. Huzarski, R. Dent [et al.] // *Breast Cancer Res Treat*. - 2009. - T. 115. - P. 359 - 363.
17. Cai, Z. Structure and activation mechanism of the CHK2 DNA damage checkpointkinase / Z. Cai, N.H. Chehab, N.P. Pavletich // *Mol Cell*. - 2009. - T. 35. - P. 818 - 829.
18. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours / Cancer Genome Atlas Network // *Nature*. - 2012. - T. 490. - № 7418. - P. 61-70.
19. Castells, A. A region of deletion on chromosome 22q13 is common to human breast and colorectal cancers / A. Castells, J.F. Gusella, V. Ramesh, A.K. Rustgi // *Cancer Res*. - 2000. - T. 60. - № 11. - P. 2836 - 2839.
20. Castellví-Bel, S. Evaluation of PARVG located on 22q13 as a candidate tumor suppressor gene for colorectal and breast cancer / S. Castellví-Bel, A. Castells, C.N. Johnstone [et al.] // *Cancer Genet Cytogenet*. - 2003. - T. 144. - № 1. - P. 80 - 82.
21. Chang, X. wANNOVAR: annotating genetic variants for personal genomes via the web / X. Chang, K. Wang // *J Med Genet*. - 2012. - T. 49. - № 7. - P. 433 - 436.
22. CHEK2 Breast Cancer Case-Control Consortium. CHEK2\*1100delC and susceptibility to breast cancer: a collaborative analysis involving 10,860 breast cancer cases and 9,065 controls from 10 studies / CHEK2 Breast Cancer Case-Control Consortium // *Am J Hum Genet*. - 2004. - T. 74. - № 6. - P. 1175 - 1182.

23. Chekmariova, E.V. CHEK2 1100delC mutation is frequent among Russian breast cancer patients / E.V. Chekmariova, A.P. Sokolenko, K.G. Buslov [et al.] // *Breast Cancer Res Treat.* - 2006. - T. 100. - № 1. - P. 99 - 102.
24. Chevaller, B. Prognostic value of estrogen and progesterone receptors in operable breast cancer. Results of a univariate and multivariate analysis / B. Chevaller, F. Heintzmann, V. Mosseri [et al.] // *Cancer.* - 1988. - T. 62. - № 12. - P. 2517 - 2524.
25. Chrisanthar, R. CHEK2 mutations affecting kinase activity together with mutations in TP53 indicate a functional pathway associated with resistance to epirubicin in primary breast cancer / R. Chrisanthar, S. Knappskog, E. Lokkevick [et al.] // *PLoS ONE.* - 2008. - T. 3. - № 8. - P. 3062.
26. Couch, F.J. Associations Between Cancer Predisposition Testing Panel Genes and Breast Cancer / F.J. Couch, H. Shimelis, C. Hu [et al.] // *JAMA Oncol.* - 2017. - T. 3. - № 9. - P. 1190 - 1196.
27. Cousineau, I. Emsy overexpression disrupts the brca2/ rad51 pathway in the DNA-damage response: Implications for chromosomal instability/recombination syndromes as checkpoint diseases / I. Cousineau, A. Belmaaza // *Mol Genet Genomics: MGG.* - 2011. - T. 285. - P. 325 - 340.
28. Cybulski, C. A novel founder CHEK2 mutation is associated with increased prostate cancer risk / C. Cybulski, T. Huzarski, B. Górski [et al.] // *Cancer Res.* - 2004. - T. 64. - № 8. - P. 2677 - 2679.
29. Cybulski, C. Estrogen receptor status in CHEK2-positive breast cancers: implications for chemoprevention / C. Cybulski, T. Huzarski, T. Byrski [et al.] // *Clin Genet.* - 2009. - T. 75. - № 1. - P. 72 - 78.
30. Cybulski, C. Polish Hereditary Breast Cancer Consortium. The spectrum of mutations predisposing to familial breast cancer in Poland / C. Cybulski, W. Kluźniak, T. Huzarski [et al.] // *Int J Cancer.* - 2019.
31. Cybulski, C. Risk of breast cancer in women with a CHEK2 mutation with and without a family history of breast cancer / C. Cybulski, D. Wokołarczyk, A. Jakubowska [et al.] // *J Clin Oncol.* - 2011. - T. 29. - № 28. - P. 3747 - 3752.
32. De Bock, G.H. Tumour characteristics and prognosis of breast cancer patients carrying the germline CHEK2\*1100delC variant / G.H. De Bock, M. Schutte, E.M. Krol-Warmerdam [et al.] // *Journal of Medical Genetics.* - 2004. - T. 41. - № 10. - P. 731 - 735.
33. Domagala, P. Different CHEK2 germline mutations are associated with distinct immunophenotypic molecular subtypes of breast cancer / P.

- Domagala, D. Wokolorczyk, C. Cybulski [et al.] // *Breast Cancer Res Treat.* - 2012. - T. 132. - № 3. - P. 937 - 945.
34. Dong, X. Mutations in CHEK2 associated with prostate cancer risk / X. Dong, L. Wang, K. Taniguchi, [et al.] // *Am J Hum Genet.* - 2003. - T. 72. - № 2. - P. 270 - 280.
35. Ellis, M.J. Phosphatidyl-inositol-3 kinase alpha catalytic subunit mutation and response to neoadjuvant endocrine therapy for estrogen receptor positive breast cancer / M.J. Ellis, L. Lin, R. Crowder [et al.] *Breast Cancer Res Treat.* - 2010. - T. 119. - P. 379 - 390.
36. Falck, J. The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis / J. Falck, N. Mailand, R.G. Syljuasen, J. Bartek, J. Lukas // *Nature.* - 2001. - T. 410. - P. 842 - 847.
37. Fatscher, T. Mechanism, factors, and physiological role of nonsense-mediated mRNA decay / T. Fatscher, V. Boehm, N.H. Gehring // *Cell Mol Life Sci.* - 2015. - T. 72. - № 23. - P. 4523 - 4544.
38. Fletcher, O. Family history, genetic testing, and clinical risk prediction: pooled analysis of CHEK2 1100delC in 1,828 bilateral breast cancers and 7,030 controls / O. Fletcher, N. Johnson, I. Dos Santos Silva [et al.] // *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.* - 2009. - T. 18. - № 1. - P. 230 - 234.
39. Gao, J. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal / J. Gao, B.A. Aksoy, U. Dogrusoz [et al.] // *Sci. Signal.* - 2013. - T. 6. - № 269. - P. 1.
40. Gayther, S.A. Frequently occurring germ-line mutations of the BRCA1 gene in ovarian cancer families from Russia / S.A. Gayther, P. Harrington, P. Russell [et al.] // *Am J Hum Genet.* - 1997. - T. 60. - P. 1239 - 1242.
41. Goldgar, D.E. Rare variants in the ATM gene and risk of breast cancer / D.E. Goldgar, S. Healey, J.G. Dowty [et al.] // *Breast Cancer Res.* - 2011. - T. 13. - № 4. - P. 73.
42. Goldhirsch, A. Panel members. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013 / A. Goldhirsch, E.P. Winer, A.S. Coates [et al.] // *Ann Oncol.* - 2013. - T. 24. - № 9. - P. 2206 - 2223.
43. Gori, S. AIOM-SIGU-SIBIOC-SIAPEC-IAP Working Group. Recommendations for the implementation of BRCA testing in ovarian cancer patients and their relatives / S. Gori, M. Barberis, M.A. Bella [et al.] // *Crit Rev Oncol Hematol.* - 2019. - T. 140. - P. 67 - 72.

44. Górski, B. Germline 657del5 mutation in the NBS1 gene in breast cancer patients / B. Górski, T. Debniak, B. Masojć [et al.] // *Int J Cancer*. - 2003. - T. 106. - № 3. - P. 379 - 381.
45. Hall, J.M. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21 / J.M. Hall, M.K. Lee, B. Newman [et al.] // *Science*. - 1990. - T. 250. - P. 1684 - 1689.
46. Han, F.F. The effect of CHEK2 variant I157T on cancer susceptibility: evidence from a meta-analysis / F.F. Han, C.L. Guo, L.H. Liu // *DNA Cell Biol*. - 2013. - T. 32. - № 6. - P. 329 - 335.
47. Harper, J.W. The DNA damage response: ten years after / J.W. Harper, S.J. Elledge // *Mol Cell*. - 2007. - T. 28. - P. 739 - 745.
48. Hartley, T. Mutation analysis of PALB2 in BRCA1 and BRCA2-negative breast and/or ovarian cancer families from Eastern Ontario, Canada / T. Hartley, L. Cavallone, N. Sabbaghian [et al.] // *Hered Cancer Clin Pract*. - 2014. - T. 12. - № 1. - P. 19.
49. Hartmann, C. Fine mapping of chromosome 22q tumor suppressor gene candidate regions in astrocytoma / C. Hartmann, A. Nümann, W. Mueller, N. Holtkamp [et al.] // *Int J Cancer*. - 2004. - T. 108. - № 6. - P. 839 - 844.
50. Hennessy, B.T. Somatic mutations in BRCA1 and BRCA2 could expand the number of patients that benefit from poly (ADP ribose) polymerase inhibitors in ovarian cancer / B.T. Hennessy, K.M. Timms, M.S. Carey [et al.] // *J Clin Oncol*. - 2010. - T. 28. - № 22. - P. 3570 - 3576.
51. Hirao, A. DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2 / A. Hirao, Y.Y. Kong, S. Matsuoka [et al.] // *Science*. - 2000. - T. 287. - P. 1824 - 1827.
52. Huang, B. Loss of heterozygosity on chromosome 22 in human ependymomas / B. Huang, P. Starostik, J. Kühl [et al.] // *Acta Neuropathologica*. - 2002. - T. 103. - № 4. - P. 415 - 420.
53. Huijts, P.E. CHEK2\*1100delC homozygosity in the Netherlands-prevalence and risk of breast and lung cancer / P.E. Huijts, A. Hollestelle, B. Balliu [et al.] // *European Journal of Human Genetics*. - 2013. - P. 1 - 6.
54. Huszno, J. Comparison between CHEK2\*1100delC/I157T Mutation Carrier and Noncarrier Breast Cancer Patients: A Clinicopathological Analysis / J. Huszno, M. Budryk, Z. Kołosza [et al.] // *Oncology*. - 2016. - T. 90. - № 4. - P. 193 - 198.
55. Huszno, J. Molecular characteristics of breast cancer according to clinicopathological factors / J. Huszno, Z. Kolosza // *Mol Clin Oncol*. - 2019. - T. 11. - № 2. - P. 192 - 200.

56. Huzarski, T. Pathology of breast cancer in women with constitutional CHEK2 mutations / T. Huzarski, C. Cybulski, W. Domagała [et al.] // *Breast Cancer Res Treat.* - 2005. - T. 90. - № 2. - P. 187 - 189.
57. Imyanitov, E.N. Systemic treatment for hereditary cancers: a 2012 update / E.N. Imyanitov, T. Byrski // *Hered Cancer Clin Pract.* - 2013. - T. 11. - № 1. - P. 2.
58. Iyevleva, A.G. Cytotoxic and targeted therapy for hereditary cancers / A.G. Iyevleva, E.N. Imyanitov // *Hered Cancer Clin Pract.* - 2016. - T. 14. - № 1. - P. 17.
59. Janku, F. Targeting the PI3K pathway in cancer: are we making headway? / F. Janku, T.A. Yap, F. Meric-Bernstam // *Nat Rev Clin Oncol.* - 2018. - T. 15. - № 5. - P. 273 - 291.
60. Jazaeri, A.A. Gene expression profiles of BRCA1-linked, BRCA2-linked, and sporadic ovarian cancers / A.A. Jazaeri, C.J. Yee, C. Sotiriou [et al.] // *J Natl Cancer Inst.* - 2002. - T. 94. - № 13. - P. 990 - 1000.
61. Jekimovs, C.R. Low frequency of CHEK2 1100delC allele in Australian multiple-case breast cancer families: functional analysis in heterozygous individuals / C.R. Jekimovs, X. Chen, J. Arnold [et al.] // *Br J Cancer.* - 2005. - T. 92. - № 4. - P. 784 - 790.
62. Jelinic, P. The EMSY threonine 207 phospho-site is required for EMSY-driven suppression of DNA damage repair / P. Jelinic, L.A. Eccles, J. Tseng [et al.] // *Oncotarget.* - 2017. - T. 8. - № 8. - P. 13792 - 13804.
63. Kalluri R. The basics of epithelial-mesenchymal transition // Kalluri R. Weinberg R.A. // *J Clin Invest.* - 2009. - T. 119, №6. - P. 1420-1428.
64. Kastan, M.B. Cell-cycle checkpoints and cancer / M.B. Kastan, J. Bartek // *Nature.* - 2004. - T. 432. - P. 316 - 323.
65. Kircher, M. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants / M. Kircher, D.M. Witten, P. Jain [et al.] // *Nat Genet.* - 2014. - T. 46. - № 3. - P. 310 - 315.
66. Kleibl, Z. The CHEK2 gene I157T mutation and other alterations in its proximity increase the risk of sporadic colorectal cancer in the Czech population / Z. Kleibl, O. Havranek, I. Hlavata [et al.] // *Eur J Cancer.* - 2009. - T. 45. - № 4. - P. 618 - 624.
67. Kleiblova, P. Identification of deleterious germline CHEK2 mutations and their association with breast and ovarian cancer / P. Kleiblova, L. Stolarova, K. Krizova [et al.] // *Int J Cancer.* - 2019. - T. 145. - № 7. - P. 1782 - 1797.
68. Konstantinopoulos, P.A. Gene expression profile of BRCAness that correlates with responsiveness to chemotherapy and with outcome in

- patients with epithelial ovarian cancer / P.A. Konstantinopoulos, D. Spentzos, B.Y. Karlan [et al.] // *J Clin Oncol.* - 2010. - T. 28. - № 22. - P. 3555 - 3561.
69. Kriege, M. Survival and contralateral breast cancer in CHEK2 1100delC breast cancer patients: impact of adjuvant chemotherapy / M. Kriege, A. Hollestelle, A. Jager [et al.] // *Br J Cancer.* - 2014. - T. 111. - № 5. - P. 1004 - 1013.
70. Kwei, K.A. Genomic instability in breast cancer: pathogenesis and clinical implications / K.A. Kwei, Y. Kung, K. Salari [et al.] // *Mol Oncol.* - 2010. - T. 4. - № 3. - P. 255 - 266.
71. Li C. Whole Exome Sequencing Identifies Frequent Somatic Mutations in Cell-Cell Adhesion Genes in Chinese Patients with Lung Squamous Cell Carcinoma / C. Li, Z. Gao, F. Li [et al.] // *Sci Rep.* - 2015. - T. 5. - P. 14237.
72. Li, A. Homologous recombination DNA repair defects in PALB2-associated breast cancers / A. Li, F.C. Geyer, P. Blehna [et al.] // *NPJ Breast Cancer.* - 2019. - T. 5. - P. 23.
73. Li, J. Structural and functional versatility of the FHA domain in DNA-damage signaling by the tumor suppressor kinase Chk2 / J. Li, B.L. Williams, L.F. Haire [et al.] // *Mol Cell.* - 2002. - T. 9. - P. 1045 - 1054.
74. Lips, E.H. BRCA1-Mutated Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer Shows BRCAness, Suggesting Sensitivity to Drugs Targeting Homologous Recombination Deficiency / E.H. Lips, R.D. Debipersad, C.E. Scheerman [et al.] // *Clin Cancer Res.* - 2017. - T. 23. - № 5. - P. 1236 - 1241.
75. Lips, E.H. Quantitative copy number analysis by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) of BRCA1-associated breast cancer regions identifies BRCAness / E.H. Lips, N. Laddach, S.P. Savola [et al.] // *Breast Cancer Res.* - 2011. - T. 13. - № 5. - P. R107.
76. Liu, Y. Association between CHEK2 H371Y mutation and response to neoadjuvant chemotherapy in women with breast cancer / Y. Liu, Y. Xu, T. Ouyang [et al.] // *BMC Cancer.* - 2015. - T. 15. - P. 194.
77. Loginova, A.N. Spectrum of mutations in BRCA1 gene in hereditary forms of breast and ovarian cancer in Russian families / A.N. Loginova, N.I. Pospekhova, L.N. Lyubchenko [et al.] // *Bull Exp Biol Med.* - 2003. - T. 136. - P. 276 - 278.
78. Lord, C.J. BRCAness revisited / C.J. Lord, A. Ashworth // *Nat Rev Cancer.* - 2016. - T. 16. - № 2. - P. 110 - 120.

79. Magni, M. Chk2 and REGγ-dependent DBC1 regulation in DNA damage induced apoptosis / M. Magni, V. Ruscica, G. Buscemi [et al.] // *Nucleic Acids Res.* - 2014. - T. 42. - № 21. - P. 13150 - 13160.
80. Mandelker, D. The Landscape of Somatic Genetic Alterations in Breast Cancers from CHEK2 Germline Mutation Carriers. *JNCI Cancer Spectr* / D. Mandelker, R. Kumar, X. Pei [et al.] // 2019. - T. 3. - № 2. - P. 027.
81. Mangone, F.R. ATM gene mutations in sporadic breast cancer patients from Brazil / F.R. Mangone, E.C. Miracca, H.E. Feilotter [et al.] // *Springerplus.* - 2015. - T. 4. - P. 23.
82. Massink, M.P. Genomic profiling of CHEK2\*1100delC-mutated breast carcinomas / M.P. Massink, I.E. Kooi, J.W. Martens [et al.] // *BMC Cancer.* - 2015. - T. 15. - P. 877.
83. Matsuoka, S. Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro / S. Matsuoka, G. Rotman, A. Ogawa [et al.] // *Proc Natl Acad. Sci USA.* - 2000. - T. 97. - P. 10389 - 10394.
84. Matsuoka, S. Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase / S. Matsuoka, M. Huang, S.J. Elledge // *Science.* - 1998. - T. 282. - № 5395. - P. 1893 - 1897.
85. Matsuoka, S. Reduced expression and impaired kinase activity of a Chk2 mutant identified in human lung cancer / S. Matsuoka, T. Nakagawa, A. Masuda, N. Haruki [et al.] // *Cancer Res.* - 2001. - T. 61. - P. 5362 - 5365.
86. Maxwell, K.N. BRCA locus-specific loss of heterozygosity in germline BRCA1 and BRCA2 carriers / K.N. Maxwell, B. Wubbenhorst, B.M. Wenz [et al.] // *Nat Commun.* - 2017. - T. 8. - № 1. - P. 319.
87. Meijers-Heijboer, H. CHEK2-Breast Cancer Consortium. Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2(\*)1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations / H. Meijers-Heijboer, A. van den Ouweland, J. Klijn [et al.] // *Nat Genet.* - 2002. - T. 31. - № 1. - P. 55 - 59.
88. Miki, Y. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1 / Y. Miki, J. Swensen, D. Shattuck-Eidens [et al.] // *Science.* - 1994. - T. 266. - P. 66 - 71.
89. Miller, C.W. Mutations of the CHK2 gene are found in some osteosarcomas, but are rare in breast, lung, and ovarian tumors / C.W. Miller, T. Ikezoe, U. Krug, [et al.] // *Genes Chromosomes Cancer.* - 2002. - T. 33. - P. 17 - 21.
90. Moiseyenko, V.M. High efficacy of cisplatin neoadjuvant therapy in a prospective series of patients carrying BRCA1 germ-line mutation / V.M. Moiseyenko, G.D. Dolmatov, F.V. Moiseyenko [et al.] // *Med Oncol.* 2015. - T. 32. - № 4. - P. 89.



91. Müllenbach, R An efficient salt-chloroform extraction of DNA from blood and tissues / R. Müllenbach, P.J. Lagoda, C. Welter // Trends Genet. - 1989. - T. 5. - P. 391.
92. Muranen, T.A. Breast tumors from CHEK2 1100delC-mutation carriers: genomic landscape and clinical implications / T.A. Muranen, D. Greco, R. Fagerholm [et al.] // Breast Cancer Res. - 2011. - T. 13. - № 5. - P. R90.
93. Muranen, T.A. Patient survival and tumor characteristics associated with CHEK2:p.I157T - findings from the Breast Cancer Association Consortium / T.A. Muranen, C. Blomqvist, T. Dörk [et al.] // Breast Cancer Res. - 2016. - T. 18. - №1. - P. 98.
94. Nagel, J.H. Gene expression profiling assigns CHEK2 1100delC breast cancers to the luminal intrinsic subtypes / J.H. Nagel, J.K. Peeters, M. Smid [et al.] // Breast Cancer Res Treat. - 2012. - T. 132. - № 2. - P. 439 - 448.
95. Narod, S.A. BRCA1 and BRCA2 mutations and breast cancer / S.A. Narod, L. Salmena // Discov Med. - 2011. - T. 12. - № 66. - P. 445 - 453.
96. Neuhausen, S.L. Founder populations and their uses for breast cancer genetics / S.L. Neuhausen // Breast Cancer Res. - 2000. - T. 2. - P. 77 - 81.
97. Neuhausen, S.L. Loss of heterozygosity in familial tumors from three BRCA1-linked kindreds / S.L. Neuhausen, C.J. Marshall // Cancer Res. - 1994. - T. 54. - №23. - P. 6069 - 6072.
98. Nguyen-Dumont T. Detecting differential allelic expression using high-resolution melting curve analysis: application to the breast cancer susceptibility gene CHEK2 / T. Nguyen-Dumont, L.P. Jordheim, J. Michelon [et al.] // BMC Med Genomics. - 2011. - T. 4. - P. 39.
99. Nik-Zainal, S. Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences / S. Nik-Zainal, H. Davies, J. Staaf [et al.] // Nature. - 2016. - T. 534. - № 7605 - P. 47 - 54.
100. Norquist, B Secondary somatic mutations restoring BRCA1/2 predict chemotherapy resistance in hereditary ovarian carcinomas / B. Norquist, K.A. Wurz, C.C. Pennil [et al.] // J Clin Oncol. - 2011. - T. 29. - № 22. - P. 3008 - 3015.
101. Oldenburg, R.A. Characterization of familial non-BRCA1/2 breast tumors by loss of heterozygosity and immunophenotyping / R.A. Oldenburg, K. Kroeze-Jansema, H. Meijers-Heijboer [et al.] // Clin Cancer Res. - 2006. - T. 12. - № 6. - P. 1693 - 1700.
102. Ow G.S Identification of two poorly prognosed ovarian carcinoma subtypes associated with CHEK2 germ-line mutation and non-CHEK2

- somatic mutation gene signatures / G.S. Ow, A.V. IVShina, G. Fuentes, V.A. Kuznetsov // *Cell Cycle*. - 2014. - T. 13. - № 14. - P. 2262 - 2280.
103. Pfeifer, W. Breast cancer sensitivity to neoadjuvant therapy in BRCA1 and CHEK2 mutation carriers and non-carriers / W. Pfeifer, A. Sokolenko, O. Potapova [et al.] // *Breast Cancer Res. Treat.* - 2014. - T. 148. - № 3. - P. 675 - 683.
104. Polak, P. A mutational signature reveals alterations underlying deficient homologous recombination repair in breast cancer/ P. Polak, J. Kim, L. Braunstein [et al.] // *Nature Genetic.* - 2017. - T. 49. - № 10. - P. 1476-1486.
105. Popova, T. Ploidy and large-scale genomic instability consistently identify basal-like breast carcinomas with BRCA1/2 inactivation / T. Popova, E. Manié, G. Rieunier [et al.] // *Cancer Res.* - 2012. - T. 72. - № 21. - P. 5454 - 5462.
106. Rebbeck, T.R. Association of type and location of BRCA1 and BRCA2 mutations with risk of breast and ovarian cancer / T.R. Rebbeck, N. Mitra, F. Wan [et al.] // *JAMA*. - 2015. - T. 313. - № 13. - P. 1347 - 1361.
107. Rebbeck, T.R. Mutational spectrum in a worldwide study of 29,700 families with BRCA1 or BRCA2 mutations / T.R. Rebbeck, T.M. Friebe, E. Friedman [et al.] // *Hum Mutat.* - 2018. - T. 39. - № 5. - P. 593 - 620.
108. Renault, A.L. Morphology and genomic hallmarks of breast tumours developed by ATM deleterious variant carriers / A.L. Renault, N. Mebirouk, L. Fuhrmann [et al.] // *Breast Cancer Res.* - 2018. - T. 20. - № 1. - P. 28.
109. Rentzsch, P. CADD: predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome / P. Rentzsch, D. Witten, G.M. Cooper [et al.] // *Nucleic Acids Res.* - 2018. - T. 47. - № D1. - P. D886 - D894.
110. Rhiem, K. Sporadic breast carcinomas with somatic BRCA1 gene deletions share genotype/phenotype features with familial breast carcinomas / K. Rhiem, U. Todt, B. Wappenschmidt [et al.] // *Anticancer Res.* - 2010. - T. 30. - № 9. - P. 3445 - 3449.
111. Risch, H.A. Prevalence and penetrance of germline BRCA1 and BRCA2 mutations in a population series of 649 women with ovarian cancer / H.A. Risch, J.R. McLaughlin, D.E. Cole [et al.] // *Am J Hum Genet.* - 2001. - T. 68. - № 3. - P. 700 - 710.
112. Roa, B.B. Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutations in BRCA1 and BRCA2 / B.B. Roa, A.A. Boyd, K. Volcik, C.S. Richards // *Nat Genet.* - 1996. - T. 14. - P. 185 - 187.

113. Roeb, W. Response to DNA damage of CHEK2 missense mutations in familial breast cancer / W. Roeb, J. Higgins, M.C. King // *Hum Mol Genet.* - 2012. - T. 21. - № 12. - P. 2738 - 2744.
114. Schmidt, M.K. Breast cancer survival and tumor characteristics in premenopausal women carrying the CHEK2\*1100delC germline mutation / M.K. Schmidt, R.A. Tollenaar, S.R. de Kemp [et al.] // *Journal of Clinical Oncology.* - 2007. - T. 25. - № 1. - P. 64 - 69.
115. Severson, T.M. BRCA1-like signature in triple negative breast cancer: Molecular and clinical characterization reveals subgroups with therapeutic potential / T.M. Severson, J. Peeters, I. Majewski [et al.] // *Mol Oncol.* - 2015. - T. 9. - № 8. - P. 1528 - 1538.
116. Shah, M.M. An ex vivo assay of XRT-induced Rad51 foci formation predicts response to PARP-inhibition in ovarian cancer / M.M. Shah, Z.C. Dobbin, S. Newsheem [et al.] // *Gynecol Oncol.* - 2014. - T. 134. - № 2. - P. 331 - 337.
117. Shimoi, T. PIK3CA mutation profiling in patients with breast cancer, using a highly sensitive detection system / T. Shimoi, A. Hamada, M. Yamagishi [et al.] // *Cancer Sci.* - 2018. - T. 109. - № 8. - P. 2558 - 2566.
118. Simard, J. Common origins of BRCA1 mutations in Canadian breast and ovarian cancer families / J. Simard, P. Tonin, F. Durocher [et al.] // *Nat. Genet.* - 1994. - T. 8. - P. 392 - 398.
119. Singletary, S.E. Rating the risk factors for breast cancer / S.E. Singletary // *Ann Surg.* - 2003. - T. 237. - P. 474 - 482.
120. Siołek M. CHEK2 mutations and the risk of papillary thyroid cancer / M. Siołek, C. Cybulski, D. Gašior-Perczak [et al.] // *Int J Cancer.* - 2015. - T. 137, №3. - P.548-552.
121. Sodha, N. CHEK2 variants in susceptibility to breast cancer and evidence of retention of the wild type allele in tumours / N. Sodha, S. Bullock, R. Taylor [et al.] // *Br J Cancer.* - 2002. - T. 87. - № 12. - P. 1445 - 1448.
122. Sodha, N. Garrett MD. Rare germ line CHEK2 variants identified in breast cancer families encode proteins that show impaired activation / N. Sodha, T.S. Mantoni, S.V. Tavtigian, R. Eeles // *Cancer Res.* - 2006. - T. 66. - № 18. - P. 8966 - 8670.
123. Sodha, N. Screening hCHK2 for mutations / N. Sodha, R. Williams, J. Mangion, S.L. Bullock [et al.] // *Science.* - 2000. - T. 289. - № 5478. - P. 359.
124. Sokolenko, A.P. Double heterozygotes among breast cancer patients analyzed for BRCA1, CHEK2, ATM, NBN/NBS1, and BLM germ-line

- mutations / A.P. Sokolenko, N. Bogdanova, W. Kluzniak [et al.] // *Breast Cancer Res Treat.* - 2014. - T. 145. - № 2 - P. 553 - 562.
125. Sokolenko, A.P. Founder mutations in early-onset, familial and bilateral breast cancer patients from Russia / A.P. Sokolenko, M.E. Rozanov, N.V. Mitiushkina [et al.] // *Fam Cancer.* - 2007. - T. 6. - № 3. - P. 281 - 286.
126. Sokolenko, A.P. High frequency of BRCA1 5382insC mutation in Russian breast cancer patients / A.P. Sokolenko, N.V. Mitiushkina, K.G. Buslov [et al.] // *Eur J Cancer.* - 2006. - T. 42. - P. 1380 - 1384.
127. Sokolenko, A.P. Molecular Tests for the Choice of Cancer Therapy / A.P. Sokolenko, E.N. Imyanitov // *Curr Pharm Des.* - 2017. - T. 23. - № 32. - P. 4794 - 4806.
128. Staalesen, V. Alternative splicing and mutation status of CHEK2 in stage III breast cancer / V. Staalesen, J. Falck, S. Geisler [et al.] // *Oncogene.* - 2004. - T. 23. - № 52. - P. 8535 - 8544.
129. Stefansson, O.A. BRCA1 epigenetic inactivation predicts sensitivity to platinum-based chemotherapy in breast and ovarian cancer / O.A. Stefansson, A. Villanueva, A. Vidal [et al.] // *Epigenetics.* - 2012. - T. 7. - № 11. - P. 1225 - 1229.
130. Sullivan, A. Concomitant inactivation of p53 and Chk2 in breast cancer / A. Sullivan, M. Yuille, C. Repellin [et al.] // *Oncogene.* - 2002. - T. 21. - № 9. - P. 1316 - 1324.
131. Suspitsin, E.N. Development of breast tumors in CHEK2, NBN/NBS1 and BLM mutation carriers does not commonly involve somatic inactivation of the wild\_type allele / E.N. Suspitsin, G.A. Yanus, A.P. Sokolenko [et al.] // *Med. Oncol.* - 2014. - T. 31. - P. 828.
132. Swisher E.M. Rucaparib in relapsed, platinum-sensitive high-grade ovarian carcinoma (ARIEL2 Part 1): an international, multicentre, open-label, phase 2 trial / E.M. Swisher, K.K. Lin, A.M. Oza [et al.] // *Lancet Oncol.* - 2017. - T. 18. - № 1. - P. 75 - 87.
133. Telli, M.L. Homologous Recombination Deficiency (HRD) Score Predicts Response to Platinum-Containing Neoadjuvant Chemotherapy in Patients with Triple-Negative Breast Cancer / M.L. Telli, K.M. Timms, J. Reid [et al.] // *Clin Cancer Res.* - 2016. - T. 22. - № 15. - P. 3764 - 3773.
134. Tereschenko, I.V. BRCA1 and BRCA2 mutations in Russian familial breast cancer / I.V. Tereschenko, V.M. Basham, B.A. Ponder, P.D. Pharoah // *Hum Mutat.* - 2002. - T. 19. - P. 184.

135. Tischkowitz, M. Analysis of PALB2/FANCN-associated breast cancer families / M. Tischkowitz, B. Xia, N. Sabbaghian [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A. - 2007. - T. 104. - № 16. - P. 6788 - 6793.
136. Tung, N. Counselling framework for moderate- penetrance cancer-susceptibility mutations / N. Tung, S.M. Domchek, Z. Stadler [et al.] // NatRevClinOncol. - 2016. - T. 13. - № 9. - P. 581 - 588.
137. Uhlen, M. A pathology atlas of the human cancer transcriptome / M. Uhlen, C. Zhang, S. Lee [et al.] // Science. - 2017. - T. 357. - P. 6352
138. Vahteristo, P. A CHEK2 genetic variant contributing to a substantial fraction of familial breast cancer / P. Vahteristo, J. Bartkova, H. Eerola [et al.] // Am J Hum Genet. - 2002. - T. 71. - № 2. - P. 432 - 438.
139. Vahteristo, P. p53, CHK2, and CHK1 genes in Finnish families with Li-Fraumeni syndrome: further evidence of CHK2 in inherited cancer predisposition / P. Vahteristo, A. Tamminen, P. Karvinen [et al.] // Cancer Res. - 2001. - T. 61. - № 15. - P. 5718 - 5722.
140. van der Groep, P. Pathology of hereditary breast cancer / P. van der Groep, E. van der Wall, P.J. van Diest // Cell Oncol. - 2011. - T. 34. - P. 71 - 88.
141. Venkitaraman, A.R. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2 / A.R. Venkitaraman // Cell. - 2002. - T. 108. - P. 171 - 182.
142. Walsh, T. Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2, and TP53 in families at high risk of breast cancer / T. Walsh, S. Casadei, K.H. Coats [et al.] // JAMA. - 2006. - T. 295. - № 12. - P. 1379 - 1388.
143. Wang, K. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data / K. Wang, M. Li, H. Hakonarson // Nucleic Acids Research. - 2010. - T. 38. - P. 164.
144. Yamamoto, H. Heterozygosity loss at 22q and lack of INI1 gene mutation in gastrointestinal stromal tumor / H. Yamamoto, K. Kohashi, M. Tsuneyoshi, Y. Oda // Pathobiology. - 2011. - T. - 78. - № 3. - P. 132 - 139.
145. Yost S. Insights into BRCA Cancer Predisposition from Integrated Germline and Somatic Analyses in 7632 Cancers / Yost S., Ruark E., Alexandrov L.B., Rahman N. // JNCI Cancer Spectr. – 2019. – T. 19 №3. - P.pkz028.
146. Zannini, L. CHK2 kinase in the DNA damage response and beyond / L. Zannini, D. Delia, G. Buscemi // J Mol Cell Biol. - 2014. - T. 6. - № 6. - P. 442 - 457.
147. Zhang, B. Genetic variants associated with breast-cancer risk: comprehensive research synopsis, meta-analysis, and epidemiological

- evidence / B. Zhang, A. Beeghly-Fadiel, J. Long, W. Zheng // *Lancet Oncol.* - 2011. - T. 12. - № 5 - P. 477 - 488.
148. Zhang, M. TP53 mutation-mediated genomic instability induces the evolution of chemoresistance and recurrence in epithelial ovarian cancer / M. Zhang, G. Zhuang, X. Sun [et al.] // *Diagn Pathol.* - 2017. - T. 12. - № 1. - P. 16.
149. Zhang, S. Frequency of the CHEK2 1100delC mutation among women with breast cancer: an international study / S. Zhang, C.M. Phelan, P. Zhang [et al.] // *Cancer Research.* - 2008. - T. 68. - №7. - P. 2154 - 2157.