

К.А. Загороднев¹, А.А. Романько^{1, 2}, Ю. Горгуль¹, А.О. Иванцов², А.П. Соколенко^{1, 2},
И.В. Бизин², Е.Ш. Кулигина^{1, 2}

Поиск генетических детерминант наследственного риска рака молочной железы с помощью полноэкзомного секвенирования BRCA-негативных пациентов: новые кандидатные гены USP39, SLIT3, CREB3

¹ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России, Санкт-Петербург,

²ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург

Понимание молекулярно-генетического патогенеза наследственного ракового синдрома чрезвычайно важно для разработки персональных терапевтических подходов и для увеличения эффективности превентивных мер. Тем не менее, более половины случаев рака молочной железы (РМЖ) с признаками наследственной детерминации до сих пор не имеют генетического объяснения. Следовательно, поиск новых генов наследственного РМЖ и достоверный молекулярно-генетический диагноз, определяющий «каузативную» мутацию в каждом конкретном случае, является актуальной и клинически важной задачей.

С помощью полноэкзомного секвенирования (WES) мы провели анализ спектра генетических вариаций у 49 российских больных РМЖ с клиническими признаками наследственного заболевания, что позволило нам составить список из 229 потенциально патогенных мутаций. Далее кандидатные варианты были подвергнуты валидации методом секвенирования по Сэнгеру, частоты аллелей сопоставлены в группах больных РМЖ и здоровых женщин. Полученные сведения подтвердили предрасполагающую роль трех мутаций, затрагивающих онкологически значимые клеточные функции: USP39 с.*208G>C, SLIT3 p.Arg154Cys, и CREB3 p.Lys157Glu. Данные гены-кандидаты впервые упоминаются в связи с наследственным риском рака молочной железы. Окончательным доказательством каузативной роли этих вариантов будут результаты функциональных тестов, а также анализ сегрегации патогенных мутаций в семьях.

Ключевые слова: наследственный рак молочной железы, полноэкзомное секвенирование

Введение

Рак молочной железы (РМЖ) является наиболее частым видом злокачественных опухолей среди женщин. Полагают, что 5-10% РМЖ имеют причиной наследственные патогенные

мутации в генах-регуляторах онкологически важных клеточных процессов [2, 7]. К числу клинических признаков наследственной природы заболевания относят раннюю манифестацию, билатеральный характер поражения, отягощенный семейный анамнез, трижды-негативный рецепторный статус и РМЖ у мужчин [1, 4, 17]. Мутации в самых известных и хорошо изученных генах наследственного РМЖ — *BRCA1* и *BRCA2* — объясняют до 30% случаев заболеваний с признаками наследственного ракового синдрома [11, 13]. Другие гены, с разной степенью пенетрантности, такие как *ATM*, *TP53*, *PALB2*, *PTEN*, *STK11*, *CHEK2*, *BARD1*, *BRIP1*, *CDH1*, *BLM*, *NF1*, *RAD51C* и др. могут объяснить еще 10-15% случаев заболевания РМЖ [9, 12]. У 5-10% пациентов причиной заболевания, вероятно, является унаследованная неблагоприятная комбинация нескольких низко-пенетрантных предрасполагающих вариантов (SNP) (рис. 1). Таких локусов насчитывают десятки, каждый из них в отдельности не представляет угрозы, однако в совокупности, кумулятивный риск может достигать внушительных значений. Так или иначе, причины значительной части случаев наследственного РМЖ до сих пор остаются неизвестными. Между тем, понимание молекулярно-генетического патогенеза наследственного ракового синдрома чрезвычайно важно для разработки персональных терапевтических подходов и для увеличения эффективности превентивных мер [15, 16]. Поэтому поиск новых наследственных мутаций и точный молекулярно-генетический диагноз каузативного события в каждом конкретном, предположительно наследственном случае РМЖ является актуальной и клинически важной задачей.

Первые исследования, направленные на поиск генов ассоциированных с РМЖ, были сосредоточены на анализе обширных родословных пациентов. Такой подход оказался весьма успешным, о чем свидетельствует открытие генов *BRCA1* и *BRCA2*. Однако, исследования, основанные на анализе семейной истории,

способны идентифицировать в основном гены с высокой пенетрантностью, ограничивая возможность выявления клинически значимых генетических детерминант с умеренным вкладом в патогенез.

Разработка методов секвенирования нового поколения (NGS) дало колоссальные возможности для поиска генов наследственного рака и стало ключевым инструментом поиска новых генетических альтераций [1, 18]. Этот метод позволяет одновременно анализировать огромное число локусов и эффективно идентифицировать мутации в них. Важным компонентом успеха является подбор пациентов для NGS анализа. Обычно при этом в расчет берут такие признаки предрасположенности к РМЖ, как ранее начало заболевания (до 45-50 лет) и двустороннее поражение молочных желез. Важно отметить, что исследования наследственного РМЖ сильно затрудняет генетическая гетерогенность популяции. Наличие выраженного эффекта основателя («founder-effect») у жителей таких стран как Польша, Россия, Украина, Беларусь дает в этом отношении большое преимущество. Действительно, в таких популяционных системах если определенный ген играет роль в предрасположенности к заболеванию, то его патогенные аллели обычно представлены несколькими повторяющимися (рекуррентными) вариантами.

Любопытно, что почти все известные наследственные мутации раковых синдромов затрагивают гены-компоненты системы поддержания стабильности генома и защиты от повреждений ДНК. В случае РМЖ к таким локусам относятся *BRCA1/2* либо их непосредственные партнеры — *ATM, TP53, PALB2, PTEN, STK11, CHEK2, BARD1, BRIP1, CDH1, BLM, NF1, RAD51C* [9, 11, 12, 13]. При постановке диагноза «наследственный РМЖ» и поиске причинной («каузативной») мутации традиционно принято ограничивать поле внимания инактивирующими мутациями в генах, уже зарекомендовавшими себя в роли опухолевых супрессоров, включенных в так называемые «таргетные панели». Между тем вполне вероятно, что причиной развития рака могут быть: а) гены не связанные напрямую с системами репарации ДНК, опосредованно благоприятствующие злокачественной трансформации; б) не только белок-инактивирующие транскрибирующие мутации (стоп-кодона, сдвиги рамки считывания), но и точечные замены аминокислот, ассоциированные с утратой функциональности белков.

Проблемой беспристрастного полноэкзомного скрининга является огромное число кандидатных вариантов и необходимость их классифицировать и разделять нейтральные «полиморфизмы» от предрасполагающих мутаций [5]. В 2004 г.

Goldgar et al. создали алгоритм определения патогенности полиморфизмов [6]. Критериями этого алгоритма стали: соотношение частоты варианта у больных и здоровых носителей, существование полиморфизма с известными патогенными мутациями, семейный анамнез онкологического заболевания, а также результаты функционального исследования [6]. Очевидно, что правильная характеристика функциональной значимости полиморфизма крайне важна для оценки, полученной в результате секвенирования генетической информации. Международное агентство по изучению рака (IARC) разделяет полиморфизмы на 5 классов (табл. 1). Классы 1 и 2 включают в себя доброкачественные и условно доброкачественные варианты. Полиморфизмы из классов 4 и 5 являются вероятно патогенными и патогенными соответственно. К классу 3 относятся варианты с неизвестным клиническим значением (VUS) [5, 14]. Важно отметить, что класс 3 является самым многочисленным по числу вариантов и составляет примерно 40% полиморфизмов, которые были открыты до настоящего времени [3].

Таблица 1. Классификация полиморфизмов [6]

Класс	Описание	Вероятность патогенности	Значимость
5	Патогенный	>0.99	Пациента-носителя следует отнести к группе высокого риска
4	Вероятно патогенный	0.95-0.99	Пациента-носителя следует отнести к группе высокого риска
3	Варианты с неизвестным клиническим значением (VUS)	0.05-0.949	Необходимы дополнительные сведения (семейной истории и т. д.)
2	Вероятно доброкачественный	0.001-0.049	Не является значимой мутацией
1	Доброкачественный	<0.001	Не является значимой мутацией

Материалы и методы

С помощью полноэкзомного секвенирования (WES) мы проанализировали полный спектр наследственных вариаций у 49 российских пациентов с клиническими признаками наследственного заболевания. Все пациенты, включенные в исследование, не имели славянских founder-мутаций в генах *BRCA1, BRCA2, CHEK2* и *NBS1*. В дополнение, были подвергнуты анализу 18 онкологически здоровых индивидуумов — эта группа «контрольных» экзомов была использована для уточнения частоты вариантов в российской популяции и исключения нерелевантных частей «полиморфизмов». Секвенирование выполнялось на платформах Illumina NextSeq (33 образца) и Illumina MiSeq (16 образцов). Для приготовления библиотек использовали набор для экзомного обогащения Nextera Rapid Capture Exome (Illumina, USA).

Частоты перспективных кандидатных аллелей изучали путем двухэтапного молекулярно-эпидемиологического исследования по схеме случай-контроль с использованием следующих когорт:

i) группа РМЖ «высокого риска» (high-risk) была представлена 797 женщинами (средний возраст 43 года (23-79 лет)); эти пациентки проходили генетическое тестирование в Институте онкологии им. Н. Н. Петрова (Санкт-Петербург, Россия) в 2008-2018 гг. и имели один или более клинический признак высокой предрасположенности к РМЖ (отягощенный семейный анамнез, двустороннее поражение, ранний возраст (<50 лет) манифестации заболевания);

ii) 1505 «случайных», последовательно отобранных пациенток с РМЖ (consecutive); средний возраст в этой группе составил 57 лет (24 — 90 лет));

iii) в контрольную группу вошли 1070 онкологически здоровых женщин (средний возраст 44 года (21 — 82 лет)).

Кандидатные варианты были генотипированы с помощью высокоточного анализа кривых плавления (HRM) с последующим секвенированием по Сэнгеру. Частоты генотипов в группе больных и контролей сравнивали при помощи критерия χ^2 и точного критерия Фишера.

Результаты

У 21/49 (42,9%) изученных больных РМЖ были обнаружены наследственные мутации в генах с известной онкологической ролью: *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *BLM*, *RAD51C*, *RAD50*, *RAD54L*, *FANCM*, *WRN*, *MMS22L* и *ERCC4*. Анализ оставшихся 28 пациенток позволил идентифицировать 50554 альтернативных варианта, значительная часть которых в дальнейшем была отфильтрована из-за высокой частоты минорного аллеля (MAF) в популяции (более 1%, по данным ExAC database) или на основании присутствия в нашей коллекции «здоровых» экзомов. Это позволило сократить список до 9619 редких аллельных вариантов. Далее мы отобрали транквирующие мутации (n = 664) и миссенс-мутации с индексом патогенности CADD-score > 25 (n = 1737) (рис. 2). Оставшиеся варианты были приоритези-

ваны согласно рекомендациям Американского колледжа медицинской генетики (ACMG) — предпочтение отдавали патогенным и вероятно патогенным повторяющимся («рекуррентным») аллелям [6]. Также учитывались данные о встречаемости варианта в подгруппах онкологических больных и здоровых индивидуумов по сведениям базы gnomAD [<https://gnomad.broadinstitute.org/>], которые позволяли рассчитать величину риска (OR, odds ratio), ассоциированного с носительством аллеля и его достоверность. Превышение более чем в два раза частоты варианта среди онкологических пациентов рассматривалось как аргумент в пользу его потенциальной онкогенной роли. Таким образом, мы составили список из 229 наиболее перспективных мутаций. Сопоставление частот предположительно патогенных аллелей в группах больных РМЖ и здоровых женщин (молекулярно-эпидемиологическая валидация), подтвердила предрасполагающую роль трех мутаций: транквирующей мутации сайта сплайсинга *USP39 c.*208G>C* и двух аминокислотных замен с высокими показателем патогенности *in silico* — *SLIT3 p.Arg154Cys* (CADD = 31) и *CREB3 p.Lys157Glu* (CADD = 29.3) (табл. 2).

Для *USP39 c.*208G>C* частота мутантного гетерозиготного генотипа в группе РМЖ «высокого риска» составила 6/792 (0,75%), а среди «случайных» РМЖ — 9/1340 (0,67%). Примечательно, что среди 1066 здоровых женщин не было найдено ни одной носительницы этой мутации. Показатель риска OR составил, таким образом, 15,2 (95% CI 0.89 — 261.79, p = 0.06) для «случайных» РМЖ и 17,6 (95% CI 1.00 — 312.60, p = 0.05) для РМЖ «высокого риска».

Таблица 2. Частота кандидатных вариантов в группах больных РМЖ и здоровых индивидуумов

Мутация	РМЖ «высокого риска», OR (95% CI) p value	«Случайные» РМЖ, OR (95% CI) p value	Контроль (%)
USP39 c.*208G>C	6/792 (0.75%) 17.6 [1.00–312.60]; p=0.05	9/1340 (0.67%) 15.2 [0.89–261.79] p=0.06	0/1066 (0)
SLIT3 p.Arg154Cys	9/834 (1.1%) 3.99 [1.198–13.270] p=0.024	14/1239 (1.1%) 3.66 [1.041–12.886] p=0.043	3/1024 (0.03)
CREB3 p.Lys157Glu	6/832 (0.72%) 7.34 [0.882 — 61.134]; p=0.065	3/1242 (0.24%) 2.45 [0.254 — 23.570] p=0.439	1/1012 (0.1)

Таблица 3. Распределение идентифицированных аллелей у пациентов с РМЖ в зависимости от наличия клинических признаков наследственного заболевания

Мутация	Отягощенный семейный анамнез		Ранее начало (≤50 лет)		Множественные опухоли		Клинические признаки наследственного РМЖ		Трижды негативный РМЖ	
	Да	Нет	Да	Нет	Да	Нет	Да	Нет	Да	Нет
USP39 c.*208G>C	2/314 (0,64%)	13/1818 (0,72%)	8/974 (0,82%)	7/1158 (0,60%)	0/158 (0%)	15/1974 (0,76%)	9/1228 (0,7%)	9/904 (0,7%)	11/264 (4,2%)*	3/1159 (0,26%)
SLIT3 p.Arg154Cys	2/302 (0,66%)	21/1702 (1,23%)	12/950 (1,26%)	11/1054 (1,04%)	5/145 (3,45%)*	18/1859 (0,97%)	17/1189 (1,43%)	6/815 (0,74%)	5/223 (2,2%)	13/1004 (1,3%)
CREB3 p.Lys157Glu	3/304 (1,00%)	5/1711 (0,29%)	5/958 (0,52%)	3/1057 (0,28%)	1/149 (0,67%)	7/1866 (0,38%)	7/1200 (0,58%)	1/815 (0,12%)	1/223 (0,4%)	6/1010 (0,6%)

Примечание: * статистически достоверная разница между группами (P < 0.05, точный критерий Фишера)



Рис. 1. Генетические детерминанты наследственного рака молочной железы

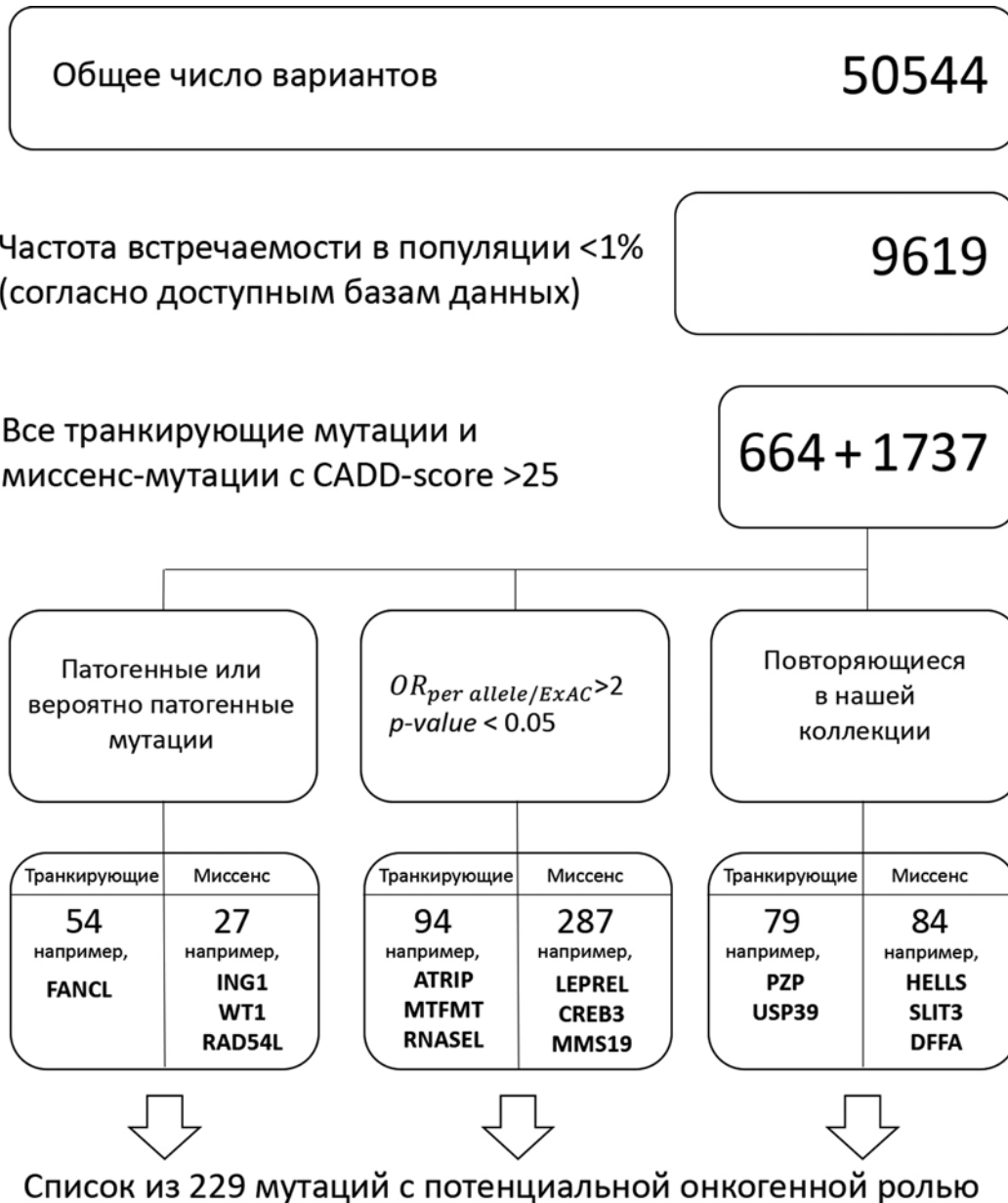


Рис. 2. Алгоритм отбора кандидатных мутаций

Частота гетерозиготного мутантного генотипа *SLIT3 p.Arg154Cys* оказалась равной 1,1% среди РМЖ «высокого риска» и «случайных» РМЖ (9/834 и 14/1239 соответственно), что было достоверно выше, чем в группе здоровых женщин (3/1024 (0.03%); $p = 0.026$). Показатель риска OR достиг 3,99 (95% CI 1.198 — 13.270; $p = 0.024$).

Наибольшая частота носительниц аминокислотной замены *CREB3 p.Lys157Glu* была зафиксирована среди больных РМЖ «высокого риска» 6/832 (0,72%); в группе «последовательных» РМЖ обнаружили 3/1242 (0,24%) носительниц, а в здоровом «контроле» — всего 1/1012. Показатели риска составили: OR (high-risk) = 7,34 (95% CI 0.882 to 61.134; $p = 0.065$), and OR (consecutive) = 2,45 (95% CI 0.254 to 23.570; $p = 0.439$).

Было обнаружено, что носительство мутация *USP39 c.*208G>C* с высокой достоверностью определяет развитие трижды-негативного РМЖ ($p = 0.0001$), а мутация *SLIT3 p.Arg154Cys* была ассоциирована с первично-множественным характером заболевания ($p = 0.022$) (табл. 3).

Дискуссия

Обнаруженные нами мутации затрагивают гены, которые впервые упоминаются в связи с наследственным риском РМЖ. Тем не менее, участие этих белков в регуляции онкологически важных клеточных процессов было неоднократно описано в литературе. Известно, что пептидаза USP39 (ubiquitin specific peptidase 39, или snRNP assembly defective 1 homolog) играет важную роль в сплайсинге пре-мРНК, а также регулирует деление клеток. Позитивная регуляция *USP39* связана со стимуляцией роста опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo* [24]. Нокдаун *USP39* ингибирует пролиферацию в тканях молочной железы, желудка и печени, а также индуцирует апоптоз в опухолевых клетках [20, 22, 23, 26]. Белок *SLIT3* (multiple EGF-like domains protein 5) участвует в регуляции клеточной подвижности, ангиогенеза и пролиферации. *SLIT3* уже упоминался ранее в качестве опухолевого супрессора при различных онкопатологиях [16, 25], более того, на мышинной модели РМЖ было показано, что стимуляция экспрессии *SLIT3* подавляет рост опухолевых клеток [14]. Продукт гена *CREB3* (cyclic AMP-responsive element-binding protein 3) вовлечен в регуляцию пролиферации, клеточной миграции, индуцированную стрессом деградацию белков [10].

Несмотря на весьма вероятные по данным *in silico* анализа белок-инактивирующие последствия обнаруженных нами мутаций, а также их привлекательные потенциально онкогенные

свойства, окончательным доказательством патогенности станут результаты функциональных тестов на клеточных линиях, а также анализ сегрегации патогенных аллелей в «раковых» семьях. Выполненное исследование является серьезным аргументом в пользу целесообразности использования принципа беспристрастного отбора при поиске новых генетических детерминант рака. Выявленные нами кандидатные мутации могут объяснить лишь небольшую долю наследственного риска РМЖ (от 0,7% до 1,1% случаев РМЖ с признаками повышенного генетического риска), тем не менее, затронутые гены, возможно, станут существенным дополнением к таргетным панелям для молекулярной диагностики наследственных раковых синдромов. Следующим шагом, повышающим практическую ценность обнаруженных мутаций, является поиск генетических маркеров и биологических особенностей опухолей у носителей патогенных вариантов, способных стать мишенью для терапевтического воздействия.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-315-90086.

ЛИТЕРАТУРА

1. Afghahi A., Kurian W.A. the changing landscape of genetic testing for inherited breast cancer predisposition. Current treatment options in oncology. 2017; 18: 27. doi: 10.1007/s11864-017-0468-y.
2. Apostolou P., Fostira F. Hereditary breast cancer: the era of new susceptibility genes. BioMed Research International. 2013: 1-11. doi: 10.1155/2013/747318.
3. Balmana J., Digiiovanni L., Gaddam P. et al. Conflicting interpretation of genetic variants and Cancer risk by commercial laboratories as assessed by the prospective registry of multiplex testing. Journal of Clinical Oncology. 2016; 34:4071-4078. doi: 10.1200/JCO.2016.68.4316.
4. Couch F.J., Shimelis H., Hu C. et al. Associations between cancer predisposition testing panel genes and breast cancer. JAMA Oncology. 2017; 3(9):1190–1196. doi: 10.1001/jamaoncol.2017.0424.
5. Federici G., Soddu S. Variants of uncertain significance in the era of high-throughput genome sequencing: a lesson from breast and ovary cancers. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. 2020; 39. doi: 10.1186/s13046-020-01554-6.
6. Goldgar D.E., Easton D.F., Deffenbaugh A.M. et al. Integrated evaluation of DNA sequence variants of unknown clinical significance: application to BRCA1 and BRCA2. The American Journal of Human Genetics. 2004; 75(4): 535-544. doi: 10.1086/424388.
7. Graffeo R., Livraghi L., Pagani O. et al. Time to incorporate germline multigene panel testing into breast and ovarian cancer patient care. Breast Cancer Res treat. 2016; 160:393-410. doi: 10.1007/s10549-016-4003-9.
8. Hahnen E., Hauke J., Engel C. et al. Germline Mutations in Triple-Negative Breast Cancer. Breast Care. 2017; 12(1):15-19. doi: 10.1159/000455999.

9. Hauke J., Horvath J., Gro E. et al. Gene panel testing of 5589 BRCA1/2-negative index patients with breast cancer in a routine diagnostic setting: results of the German Consortium for Hereditary Breast and ovarian Cancer. *Cancer Med.* 2018;7(4):1349-1358. doi: 10.1002/cam4.1376.
10. Howley B.V., Link L.A., Grelet S. et al. A CREB3-regulated ER-Golgi trafficking signature promotes metastatic progression in breast cancer. *Oncogene.* 2018; 37(10):1308-1325. doi: 10.1038/s41388-017-0023-0.
11. Joseph L., Cankovic M., Caughron S. et al. The Spectrum of clinical Utilities in Molecular Pathology Testing Procedures for inherited conditions and Cancer: a report of the Association for Molecular Pathology. *The Journal of Molecular Diagnostics.* 2016; 18(5):605-619. doi: 10.1016/j.jmoldx.2016.05.007.
12. Kast K., Rhiem K., Wappenschmidt B. et al. Prevalence of BRCA1/2 germline mutations in 21 401 families with breast and ovarian cancer. *J. Med. Genet.* 2016; 53: 465-471. doi: 10.1136/jmedgenet-2015-103672.
13. Lu H.M., Li s., Black M.H., Lee s. et al. Association of Breast and ovarian Cancers With Predisposition Genes Identified by Large-scale sequencing. *JAMA oncol.* — 2018. doi: 10.1001/jamaoncol.2018.2956.
14. Marlow R., Strickland P., Lee J.S. et al. SLITs suppress tumor growth in vivo by silencing Sdf1/Cxcr4 within breast epithelium. *Cancer Research.* 2008; 68(19):7819-7827. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1357.
15. Nelson H.D., Pappas M., Zakher B. et al. Risk assessment, genetic counseling, and genetic testing for BRCA-related cancer in women: a systematic review to update the U.S. Preventive services task Force recommendation. *Ann Intern. Med.* 2014; 160: 255-266. doi: 10.7326/M13-1684.
16. Ng L., Chow A.K.M., Man J.H.W. et al. Suppression of Slit3 induces tumor proliferation and chemoresistance in hepatocellular carcinoma through activation of GSK3/-catenin pathway. *BMC Cancer.* 2018; 18(1): 621. doi: 10.1186/s12885-018-4326-5.
17. Oldfield CJ, Dunker AK. Intrinsically disordered proteins and intrinsically disordered protein regions. *Annu Rev Biochem.* 2014; 83: 553-584. doi: 10.2174/092986610791498984.
18. Plon S.E., Eccles D.M., Easton D. et al. Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results. *Human Mutation.* 2008; 29(11):1282-1291. doi: 10.1002/humu.20880.
19. Pohl-Rescigno E., Hauke J., Loibl S. et al. Association of Germline Variant Status with Therapy Response in High-risk Early-Stage Breast Cancer: A Secondary Analysis of the GeparOcto Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncology.* 2020; 6(5):1-5. doi: 10.1001/jamaoncol.2020.0007.
20. Talhouet S., Peron J., Vuilleumier A. et al. Clinical outcome of breast cancer in carriers of BRCA1 and BRCA2 mutations according to molecular subtypes. *Scientific Reports.* 2020;10(1). doi: 10.1038/s41598-020-63759-1.
21. Wang H., Ji X., Liu X. et al. Lentivirus-mediated inhibition of USP39 suppresses the growth of breast cancer cells in vitro. *Oncology Reports.* 2013; 30(6):2871-2877. doi: 10.3892/or.2013.2798.
22. Wang YA., Jian J.W., Hung C.F. et al. Germline breast cancer susceptibility gene mutations and breast cancer outcomes. *BMC Cancer.* 2018; 18(1). doi: 10.1186/s12885-018-4229-5.
23. Xing Z., Sun F., He W. et al. Downregulation of ubiquitin-specific peptidase 39 suppresses the proliferation and induces the apoptosis of human colorectal cancer cells. *Oncology Letters.* 2018; 15(4): 5443-5450. doi: 10.3892/ol.2018.8061.
24. Xu Y., Zhu M.R., Zhang J.Y. et al. Knockdown of ubiquitinspecific peptidase 39 inhibits the malignant progression of human renal cell carcinoma. *Molecular Medicine Reports.* 2018; 17(3): 4729-4735. doi: 10.3892/mmr.2018.8421.
25. Yuan X., Sun X., Shi X. et al. USP39 promotes the growth of human hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Oncology Reports.* 2015; 34(2):823-832. doi: 10.3892/or.2015.4065.
26. Zhang C., Guo H., Li B. et al. Effects of Slit3 silencing on the invasive ability of lung carcinoma A549 cells. *Oncology Reports.* 2015; 34(2):952-960. doi: 10.3892/or.2015.4031.
27. Zhao F., Wang N., Yi Y. et al. Knockdown of CREB3/Luman by shRNA in Mouse Granulosa Cells Results in Decreased Estradiol and Progesterone Synthesis and Promotes Cell Proliferation. *PLoS ONE.* 2016; 11(12). doi: 10.1371/journal.pone.0168246.
28. Суспицын Е.Н., Тюрин В.И., Имянитов Е.Н., Соколенко А.П. Полноэкзомное секвенирование: принципы и диагностические возможности. *Педиатр.* 2016; 7(4): 142-146.

Поступила в редакцию 28.08.2020 г.

*K.A. Zagorodnev¹, A.A. Romanko^{1, 2}, U. Gorgul¹,
A.O. Ivantsov², A.P. Sokolenko^{1,2}, I.V. Bizin²,
E.Sh. Kuligina²*

Searching for the missing genetic determinants of hereditary breast cancer risk by whole-exome sequencing of BRCA-negative patients: new candidate genes USP39, SLIT3, CREB3

¹St.Petersburg State Pediatric Medical University, ²FSBI «N.N. Petrov NMRC of Oncology» of the Ministry of Healthcare of the Russia, St. Petersburg

The search for the new hereditary mutations and a precise molecular genetic diagnosis that determines the causative mutation in each specific case of hereditary breast cancer (BC) is a clinically important task since it helps to define the personal therapeutic approach and increase the effectiveness of preventive measures. Using whole-exome sequencing (WES) we analyzed the full spectrum of hereditary variations in 49 Russian patients with clinical signs of a hereditary disease which allowed us to compile a list of 229 candidate probably pathogenic germ-line variants. Then, the selected candidate mutations were validated by Sanger sequencing and molecular-epidemiological studies, the predisposing roles of three oncologically relevant mutations (*USP39 c.*208G>C*, *SLIT3 p.Arg154Cys*, and *CREB3 p.Lys157Glu*) were confirmed. Our candidate genes are first mentioned in connection with the hereditary risk of BC. The final proofs of the causative roles of these variants could be obtained through functional tests as well as via the analysis of the mutations segregation in BC families.

Key words: hereditary breast cancer, whole exome sequencing