

С.Н. Алексахина¹, А.Г. Иевлева¹, А.П. Соколенко¹, С.В. Баскина¹,
А.Р. Венина¹, Е.И. Анисимова², Н.А. Ахмедов³, А.О. Иванцов¹, Я.В. Бельшева¹,
А.П. Чернякова¹, Е.Н. Имянитов^{1,4,5}

Феномен потери гетерозиготности при *CHEK2*-ассоциированном раке молочной железы

¹ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург

² СПб ГБУЗ «Городская Мариинская больница», Санкт-Петербург

³ ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный университет», Республика Дагестан, г. Махачкала

⁴ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России

⁵ ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург

Актуальность. *CHEK2*-ассоциированные новообразования составляют значительную, сопоставимую с *BRCA1*-опосредованными опухолями, долю наследственного рака молочной железы (РМЖ) в России. Феномен соматической делеции нормального аллеля гена, затронутого наследственной мутацией, или потери гетерозиготности, — частый механизм полной инактивации соответствующего белка, реализующийся при развитии наследственных карцином молочной железы. Вклад потери гетерозиготности в патогенез *CHEK2*-зависимых опухолей малоизучен, и практически все имеющиеся данные касаются только одной мутации — *CHEK2 1100delC*.

Целью исследования стало определение частоты потери гетерозиготности (ЛОН, loss of heterozygosity) в опухолевой ткани при трёх распространённых в нашей стране типах мутаций: *CHEK2 1000delC*, *CHEK2 IVS2+1G>A* и *CHEK2 del5395*.

Материалы и методы. Анализ потери гетерозиготности был выполнен в группе из 50 случаев РМЖ, представленных опухолями от носительниц мутаций *CHEK2 1000delC* (n=19), *CHEK2 IVS2+1G>A* (n=12) и *CHEK2 del5395* (n=19). Детекция ЛОН осуществлялась посредством комбинации методов, анализирующих непосредственно locus мутации (аллель-специфическая ПЦР, секвенирование по Сэнгеру, цифровая капельная ПЦР) и оценивающих статус окружающих ген *CHEK2* однонуклеотидных полиморфизмов (цифровая капельная ПЦР).

Результаты. Частота феномена ЛОН в исследуемой выборке составила 27/50 (54%). Потеря гетерозиготности наблюдалась в 10/19 (52,6%) *CHEK2 1000delC*-ассоциированных, 6/12 (50%) *CHEK2 IVS2+1G>A*-ассоциированных и 11/19 (57,9%) связанных с мутацией *CHEK2 del5395*

опухолей. В одной из карцином от носительницы мутации *CHEK2 IVS2+1G>A* при этом была выявлена потеря не нормального, а мутантного аллеля. Основные клинико-морфологические характеристики РМЖ были сопоставлены в опухолях с потерей и без потери гетерозиготности. Значимых отличий по проанализированным параметрам в этих группах обнаружено не было.

Заключение. Потеря гетерозиготности наблюдается примерно в половине случаев РМЖ у носителей наследственных дефектов *CHEK2*; частота этого феномена не отличается при трёх разновидностях мутаций.

Ключевые слова: рак молочной железы; наследственная мутация; ген *CHEK2*; потеря гетерозиготности

Введение

CHEK2-ассоциированные новообразования составляют значительную долю наследственного рака молочной железы (РМЖ) в России: в нашей стране и других регионах с преимущественно славянским населением их частота сопоставима с *BRCA1*-индуцированными опухолями [1]. К преобладающим в российской популяции мутациям относятся три типа повреждений (*CHEK2 1000delC*, *CHEK2 IVS2+1G>A* и делеция экзонов 9-10 (*CHEK2 del5395*)), суммарная доля которых при неселективном РМЖ составляет около 2–3%.

Изучение различных аспектов *CHEK2*-обусловленного РМЖ до сих пор было сфокусировано вокруг распространённых в странах Северной, Восточной и Западной Европы мутаций *CHEK2 1100delC* и *CHEK2 1157T* [2, 3]. Особенности двух других «транквирующих», т.е. нарушающих структуру белка, вариантов, характерных для славянских популяций, *CHEK2 IVS2+1G>A* и *CHEK2 del5395*, посвящено мень-

ше работ, выполненных, в основном, польской группой ученых [4–7]. На основании анализа, включающего преимущественно опухоли от носителей варианта *CHEK2 1100delC*, известно, что *CHEK2*-ассоциированный РМЖ отличается от спорадических и BRCA-опосредованных наследственных опухолей. Для него характерен положительный ER-статус [8, 9]; люминальный экспрессионный подтип [7, 10, 11]; более поздний, в сравнении с BRCA-зависимым РМЖ, возраст манифестации [11, 12]; высокий риск контралатеральных карцином молочной железы [13–16]; худшие, по сравнению со спорадическими опухолями, показатели РМЖ-специфической выживаемости [10, 15–18].

Делеция второго, не затронутого наследственной мутацией аллеля гена в опухолевой ткани, т. е. потеря гетерозиготности (Loss of Heterozygosity, LOH) — это частый механизм полной инактивации гена-супрессора, необходимой для развития злокачественной опухоли. Например, при BRCA1-опосредованных карциномах LOH наблюдается в более чем 90% случаев [19]. Вопрос о внутриопухолевом статусе нормального аллеля представляет не только фундаментальный, но и практический интерес, поскольку полная функциональная инактивация *CHEK2*, как предполагается, может приводить к дефекту гомологичной репарации ДНК и повышенной чувствительности опухолевых клеток к терапии ДНК-повреждающими цитостатиками. Данный механизм химиочувствительности продемонстрирован для BRCA1- и BRCA2-опосредованных РМЖ, в которых недостаточность гомологичной репарации связана именно с утратой аллеля дикого типа [20, 21]. Систематическая характеристика статуса нормального аллеля при разных типах мутаций *CHEK2* до сих пор не проводилась. Опубликованные сведения о феномене LOH при *CHEK2*-ассоциированном РМЖ немногочисленны и, в основном, касаются мутации *CHEK2 1100delC*. Так, в работе Sodha и соавт., 2002, при помощи анализа микросателлитных маркеров в 4 интроне *CHEK2* и секвенирования были проанализированы две опухоли, в одной из которых наблюдалась потеря аллеля с мутацией [22]. В работе Oldenburg и соавт., 2003, утрата нормального аллеля была обнаружена в 3 из 11 (27,3%) *CHEK2 1100delC*-опосредованных РМЖ (использовался фрагментный анализ микросателлитных маркеров) [23]. В другом исследовании одна из двух карцином от носительниц *CHEK2 1100delC* содержала делецию нормального, а вторая — мутантного аллеля (метод анализа — секвенирование) [24]. По данным Mrganen и соавт., 2011, частота LOH при этой мутации составила 6/22 (27,3%) (метод — arrayCGH) [25]. В единствен-

ной посвященной изучению феномена LOH российской работе потеря гетерозиготности наблюдалась в 3/9 (33,3%) опухолей с мутацией *CHEK2 5395del*, и отсутствовала в 5 карциномах с *CHEK2 IVS2+1G>A* и 3 — с делецией *CHEK2 1100delC* (метод анализа — аллель-специфическая ПЦР) [26]. В недавнем исследовании, посвященном изучению генетического паттерна *CHEK2*-ассоциированных опухолей при помощи полноэкзомного секвенирования, частота потери гетерозиготности среди опухолей с высокопатогенными мутациями *CHEK2* составила 81% (13/16) [27]. Надо отметить, что спектр изученных патогенных мутаций включал только 5 повреждений *CHEK2 1100delC* и 1 *CHEK2 IVS2+1G>A*, а остальные случаи были представлены миссенс-вариантами.

Целью настоящего исследования стало определение частоты потери гетерозиготности в опухолях, ассоциированных с тремя распространенными мутациями *CHEK2*.

Материалы и методы

Анализ потери гетерозиготности был выполнен в группе из 50 случаев РМЖ, представленных опухолями от носительниц мутаций *CHEK2 1000delC* (n=19), *CHEK2 IVS2+1G>A* (n=12) и *CHEK2 del5395* (n=19). ДНК для исследования выделялась из свежемороженого или архивного опухолевого материала, полученного до лекарственного лечения. Стандартный ПЦР-анализ в области мутации *CHEK2 1100delC* (NM_007194.3, *CHEK2* экзон 11) затрудняется наличием в геноме нескольких локусов, обладающих высокой степенью гомологии с 10–14 экзонами гена [28]. В связи с этим тестирование LOH осуществлялось при помощи комбинации методов, включающей аллель-специфическую ПЦР (АС-ПЦР), секвенирование по Сэнгеру [26, 29] и анализ 6 однонуклеотидных полиморфизмов, окружающих ген *CHEK2*. Статус информативных (гетерозиготных в образцах неопухолевой ДНК) полиморфизмов оценивался в опухоли посредством аллельной дискриминации с использованием цифровой капельной ПЦР (digital droplet PCR, ddPCR). Помимо этого, ddPCR была также использована для анализа потери гетерозиготности непосредственно в локусе *CHEK2 IVS2+1G>A*. Праймеры для амплификации, последовательности зондов и расположение полиморфизмов в геноме представлены в табл. 1.

Результаты

В работу были включены 50 случаев РМЖ с тремя типами «транквирующих» мутаций *CHEK2*. Средний возраст в группе составил 58,3 года. Большая часть карцином экспрессировала рецепторы эстрогенов (42/48, 87,5%) и прогестерона (31/48, 64,6%), а в 7 из 43 случаев (16,3%) наблюдалась гиперэкспрессия HER2. У 9 из 50 (18,0%) пациенток были диагностированы первично-множественные опухоли: билатеральный РМЖ (n=6), сочетание РМЖ с раком яичника (n=1) или папиллярным раком щитовидной железы (n=2).

Таблица 1. Последовательности праймеров и флуоресцентных зондов, использованные для детекции потери гетерозиготности при тестировании однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в локусе *CHEK2* и мутации *CHEK2 IVS2+1G>A* с помощью цифровой капельной ПЦР

SNP/мутация	Положение в геноме	Последовательность праймеров и флуоресцентных зондов 5'-3'
rs738574	22: 27,450,914	F- TCTGTTATCACAACCTCCTTTCT
MAF: 0.49		R- CCTGGATGATGAAGGCAGC
		[R6G]TCTCCCCCTAAAAGGACTCTC[BHQ1]
		[FAM]TCTCCCCCTATAAGGACTCTC[BHQ1]
rs2065036	22: 27,703,363	F- GAAATTAGGAAAAATGGCAAAG
MAF: 0.50		R- TTGATTGGGCTGTGAACCT
		[R6G]CTGCCCAAGAGAGCCCCT[BHQ1]
		[FAM]CTGCCCAAAAGAGCCCCT[BHQ1]
rs5762680	22: 28,549,527	F- AGTAAATGTCTACTGCTGCCA
MAF: 0.49		R- ATAGACTTAAAAGGAGAGAATC
		[R6G]TCAGGACTGTAAACTATAAAAACAAAC[BHQ1]
		[FAM]TCAGGACTGTAAACAATAAAAACAAAC[BHQ1]
rs5752793	22: 28,764,326	F- GTCTAGGGAGGGATCATTTC
MAF: 0.49		R- GGACACCTGACATAGTTTCTC
		[R6G]TCCTCCTCTCCTTTCTTCTTAGT[BHQ1]
		[FAM]TCCTCCTCTCCTTTCTTCTTAGT[BHQ1]
rs5997408	22: 28,811,927	F- TCAAAGCTAGCACAGATAATTC
MAF: 0.48		R- GTTTTGACAAATGTGCCACAG
		[R6G]CCTCACCCGGTCCGGTTTC[BHQ1]
		[FAM]CCTCACCCAGTCCGGTTTC[BHQ1]
rs9613777	22: 29,024,494	F- ACTGAGGTCTGCTGTTTACA
MAF: 0.50		R- GAAATATCACAGGACTGCAAG
		[R6G]CTATGTGTCTCCACTTTATATCAAC[BHQ1]
		[FAM]CTATGTGTCTCCACTTTATATCAAC[BHQ1]
<i>CHEK2 IVS2+1G>A</i> (с.444+1G>A)	22: 28,725,242	F- GAACATACAGCAAGAAACACT
		R- ACCAAATTACCAGCTCTCCT
		[R6G]TCATTACCTACCCTGAA[BHQ1]*
		[FAM]TCATTACCTATCCTGAA[BHQ1]*

* Выделенные жирным шрифтом нуклеотиды модифицированы LNA (locked nucleic acids).

Частота феномена ЛОН в исследуемой выборке составила 27/50 (54%). Потеря гетерозиготности наблюдалась в 10/19 (52,6%) *CHEK2 1000delC*-ассоциированных, 6/12 (50%) *CHEK2 IVS2+1G>A*-ассоциированных и 11/19 (57,9%) связанных с мутацией *CHEK2 del5395* опухолях (табл. 2). В одной из карцином от носительницы мутации *CHEK2 IVS2+1G>A* наблюдалась потеря не нормального, а мутантного аллеля. Значительные расхождения в оценке ЛОН разными методами были выявлены при анализе мутаций *CHEK2 1000delC* и *CHEK2 IVS2+1G>A*: в 7 и 4 опухолях соответственно, потеря гетерозиготности не была обнаружена

посредством стандартной АС-ПЦР/секвенирования, но детектировалась с помощью цифровой капельной ПЦР. В случае делеции *CHEK2 del5395* результаты АС-ПЦР и анализа окружающих ген полиморфизмов совпали во всех информативных случаях.

Основные клинико-морфологические характеристики РМЖ были сопоставлены в опухолях с потерей и без потери гетерозиготности (табл. 3). Значимых отличий по проанализированным параметрам (возраст манифестации заболевания, классификация TNM, экспрессия гормональных рецепторов, семейный онкологический анамнез) в этих группах обнаружено не было.

Таблица 2. Результаты исследования потери гетерозиготности CHEK2-ассоциированных опухолей методами аллель-специфической ПЦР, секвенирования, генотипирования однонуклеотидных полиморфизмов (LOH – loss of heterozygosity, потеря гетерозиготности, ROH – retention of heterozygosity, сохранение гетерозиготности)

ID образца	Мутация CHEK2	Статус LOH (АС-ПЦР/секвенирование)	Статус LOH CHEK2 IVS2+1G>A (ddPCR)	Генотип по выбранным полиморфизмам («+» гетерозигота; «-» гомозигота, na – генотип не определен) (ddPCR)						Окончательный результат
				rs738574	rs2065036	rs5762680	rs5752793	rs5997408	rs9613777	
1	1100delC	ROH		+ (LOH)	-	+ (LOH)	+	-	+ (LOH)	LOH
2	1100delC	ROH		-	+ (ROH)	+ (ROH)	+	na	-	ROH
3	1100delC	ROH		+ (LOH)	-	+ (LOH)	na	+ (LOH)	-	LOH
4	1100delC	ROH		+ (ROH)	-	+ (ROH)	+ (ROH)	na	-	ROH
5	1100delC	ROH		-	+ (ROH)	+ (ROH)	na	na	-	ROH
6	1100delC	ROH		na	-	+ (ROH)	na	na	+ (ROH)	ROH
7	1100delC	ROH		+ (LOH)	-	+ (LOH)	+ (LOH)	na	+ (LOH)	LOH
8	1100delC	ROH		+ (ROH)	+ (ROH)	+ (ROH)	na	na	+ (ROH)	ROH
9	1100delC	ROH		+ (LOH)	+ (LOH)	-	na	na	-	LOH
10	1100delC	ROH		-	-	na	na	+ (ROH)	-	ROH
11	1100delC	ROH		+ (LOH)	-	na	na	+ (LOH)	-	LOH
12	1100delC	ROH		+ (ROH)	+ (ROH)	nd	+		-	ROH
13	1100delC	LOH		-	+ (LOH)	+ (LOH)	+		-	LOH
14	1100delC	LOH		+ (LOH)	+ (LOH)	+ (LOH)	na	na	+ (LOH)	LOH
15	1100delC	ROH		+ (ROH)	-	na	+	+ (ROH)	-	ROH
16	1100delC	LOH		-	+ (LOH)	na	+ (LOH)	-	+ (LOH)	LOH
17	1100delC	ROH		+ (LOH)	+ (LOH)	na	+ (LOH)	-	+ (LOH)	LOH
18	1100delC	ROH		-	+ (LOH)	+ (LOH)	-	-	-	LOH
19	1100delC	ROH		-	-	na	+ (ROH)	+ (ROH)	+ (ROH)	ROH
20	del5395	LOH		-	+ (LOH)	-	-	na	-	LOH
21	del5395	ROH		+ (ROH)	-	-	na	-	+ (ROH)	ROH
22	del5395	ROH		-	-	-	+ (ROH)	na	+ (ROH)	ROH
23	del5395	LOH		-	+ (LOH)	-	+	-	+ (LOH)	LOH
24	del5395	LOH		na	na	na	na	na	na	LOH
25	del5395	ROH		-	+ (ROH)	-	+		+ (ROH)	ROH
26	del5395	LOH		+ (LOH)	+ (LOH)	-	-	+ (LOH)	-	LOH
27	del5395	ROH		+ (ROH)	+ (ROH)	+ (ROH)	-	na	-	ROH
28	del5395	ROH		-	-	+ (ROH)	-	+ (ROH)	-	ROH
29	del5395	ROH		+ (ROH)	+ (ROH)	-	-	+ (ROH)	+ (ROH)	ROH
30	del5395	LOH		-	+ (LOH)	-	-		-	LOH
31	del5395	LOH		na	na	na	na	na	na	LOH
32	del5395	ROH		-	+ (ROH)	-	-	na	+ (ROH)	ROH
33	del5395	LOH		-	-	-	-	-	-	LOH
34	del5395	LOH		-	-	-	-	+ (LOH)	+ (LOH)	LOH
35	del5395	LOH		na	na	na	na	na	na	LOH
36	del5395	LOH		-	-	-	-	-	-	LOH
37	del5395	ROH		-	-	+ (ROH)	-	+	-	ROH
38	del5395	LOH		-	+ (LOH)	na	-	+ (LOH)	-	LOH
39	IVS2+1G>A	ROH	LOH	-	-	-	na	+ (LOH)	+ (LOH)	LOH
40	IVS2+1G>A	ROH		-	-	+ (ROH)	+ (ROH)	na	-	ROH
41	IVS2+1G>A	ROH		+ (ROH)	-	-	na	na	-	ROH
42	IVS2+1G>A	ROH		-	+ (ROH)	+ (ROH)	na	na	+ (ROH)	ROH
43	IVS2+1G>A	ROH	LOH	-	+ (LOH)	-	+ (LOH)	-	+ (LOH)	LOH
44	IVS2+1G>A	ROH		na	-	+ (ROH)	na	na	+ (ROH)	ROH
45	IVS2+1G>A	LOH	LOH	-	-	+	+ (LOH)	+ (LOH)	-	LOH
46	IVS2+1G>A	LOH	LOH	-	-	-	na	+ (LOH)	+ (LOH)	LOH
47	IVS2+1G>A	ROH	ROH	-	+ (ROH)	-	+	na	-	ROH
48	IVS2+1G>A	ROH	LOH	-	+ (LOH)	-	+ (LOH)	na	-	LOH
49	IVS2+1G>A	ROH		-	-	+	na	+ (ROH)	-	ROH
50	IVS2+1G>A	ROH	LOH (mut)	na	na	na	na	na	na	LOH (mut)

Таблица 3. Клинико-морфологические характеристики CHEK2-ассоциированного РМЖ, сопровождающегося и не сопровождающегося феноменом потери гетерозиготности (LOH — loss of heterozygosity, потеря гетерозиготности, ROH — retention of heterozygosity, сохранение гетерозиготности)

Характеристика	LOH	ROH*
	(n=26)	(n=24)
Возраст, лет		
Средний ± станд. отклонение	59,8±11,9	56,7±10,9
Диапазон	35–76	38–77
Размер опухоли (Т)	n=25	n=19
T1	10 (40,0%)	8 (42,1%)
T2	9 (36,0%)	8 (42,1%)
T3	3 (12,0%)	1 (5,3%)
T4	3 (12,0%)	2 (10,5%)
Вовлеченность лимфоузлов (N)	n=25	n=19
N0	14 (56,0%)	10 (52,6%)
N>0	11 (44,0%)	9 (47,4%)
Отдаленные метастазы	n=26	n=17
M0	24 (92,3%)	17 (100%)
M1	2 (7,7%)	0 (0%)
Гистотип	n=26	n=24
Инвазивный протоковый рак	14 (53,8%)	18 (75,0%)
Инвазивный неспецифицированный рак	7 (26,9%)	5 (20,8%)
Инвазивный дольковый рак	1 (3,8%)	0 (0%)
Инвазивный протоковый и дольковый рак	2 (7,7%)	0 (0%)
Другие	2 (7,7%)	1 (4,2%)
Экспрессия рецепторов эстрогенов	n=24	n=24
ER+	22 (91,7%)	20 (83,3%)
ER-	2 (8,3%)	4 (16,7%)
Экспрессия рецепторов прогестерона	n=24	n=24
PR+	13 (54,2%)	18 (75,0%)
PR-	11 (45,8%)	6 (25,0%)
Гиперэкспрессия HER2	n=22	n=21
HER2-	19 (86,4%)	17 (81,0%)
HER2+	3 (13,6%)	4 (19,0%)
Семейный онкологический анамнез	n=26	n=24
Есть	8 (30,8%)	10 (41,7%)
Нет/нет данных	18 (69,2%)	14 (58,3%)

* Случай с потерей мутантного аллеля CHEK2 в данной таблице включён в группу «ROH».

Обсуждение

В соответствии с полученными данными, примерно в половине карцином молочной железы у носительниц патогенных наследственных мутаций *CHEK2* наблюдается феномен потери гетерозиготности, и его частота не отличается при трех разновидностях генетических дефек-

тов: *CHEK2 1000delC*, *CHEK2 IVS2+1G>A* и *CHEK2 del5395*. Необходимо учесть, что из 20 опухолей, для которых феномен LOH был детектирован непосредственно в локусе с мутацией, в 19 была подтверждена делеция нормального, а в одном — мутантного аллеля гена. Ещё в 7 карциномах с мутациями *CHEK2 1100delC* потеря гетерозиготности была зафиксирована исключительно при помощи генотипирования близлежащих полиморфизмов, что не позволяет идентифицировать делецированный аллель. Можно отметить, что потеря целого плеча или фрагментов хромосомы 22q (ген *CHEK2* расположен в локусе 22q12.1) — достаточно частое событие при РМЖ (25–50%) [30–32]. Тем не менее, преобладание потери именно неизменённого аллеля подтверждает неслучайный характер этого события в патогенезе опухоли. Альтернативные варианты инактивации нормального аллеля гена в опухолевой ткани, такие как соматические мутации или гиперметилование, по-видимому, практически не встречаются [31]. Вопрос о значимости мутаций *CHEK2* в развитии РМЖ при сохранении гетерозиготности и механизме канцерогенеза в присутствии функциональной копии гена остаётся открытым. В клетках у гетерозиготных носителей мутации *CHEK2 1100delC* было зафиксировано снижение количества полноразмерного полипептида *CHEK2* и эффективности его АТМ-опосредованного фосфорилирования [12, 24, 33]. Вероятно, что само по себе уменьшение количества функционального белка *CHEK2* может predispose к злокачественной трансформации.

Ген *CHEK2* кодирует ядерную серин-треониновую киназу, играющую роль в поддержании целостности генома. В случае возникновения повреждений ДНК (в клетке) *CHEK2* фосфорилируется белком АТМ, 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 [34]. Можно предположить, что биаллельная инактивация *CHEK2* ассоциирована с повышенной генетической нестабильностью или фенотипом BRCAness, который, в свою очередь, является маркером чувствительности опухолей к ДНК-повреждающей химиотерапии [35]. В нашем исследовании случаи РМЖ с наличием и отсутствием потери гетерозиготности не отличались по основным клинико-морфологическим параметрам. Тем не менее, ввиду потенциальной роли LOH *CHEK2* в формировании фенотипа BRCAness, представляется необходимым в дальнейшем сопоставить особенности химиочувствительности LOH+ и LOH- карцином.

Детекция ЛОН посредством разных методик обнаружила высокую долю несоответствий при анализе мутаций *CHEK2 1000delC* и *CHEK2 IVS2+1G>A*: «обычные» ПЦР-тесты выявили меньше потерь гетерозиготности, чем цифровая капельная ПЦР. Объяснением этому может служить как неспецифичная амплификация гомологичных *CHEK2* последовательностей в случае мутации *CHEK2 1000delC*, так и в целом значительно более высокая чувствительность методики цифровой капельной ПЦР.

Заключение

Потеря гетерозиготности в опухолевой ткани наблюдается примерно в половине случаев РМЖ у носителей наследственных дефектов *CHEK2*, и встречается с одинаковой частотой при мутациях *CHEK2 1000delC*, *CHEK2 IVS2+1G>A* и *CHEK2 del5395*. Представляет интерес сравнение особенностей чувствительности карцином с потерей и сохранением гетерозиготности к ДНК-повреждающей терапии.

Вклад авторов:

Алексахина С.Н., Иевлева А.Г., Имянитов Е.Н. — концепция и дизайн исследования;

Анисимова Е.И., Венина А.Р., Ахмедов Н.А. — сбор и обработка клинического материала;

Соколенко А.П., Баскина С.В., Иванцов А.О., Бельшева Я.В., Чернякова А.П. — молекулярно-генетическое тестирование потери гетерозиготности;

Алексахина С.Н., Иевлева А.Г., Имянитов Е.Н. — анализ результатов, подготовка и редактирование рукописи.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии в статье конфликта интересов.

Финансирование

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант №_17-29-06046 офм_м).

ЛИТЕРАТУРА

1. Sokolenko AP, Bogdanova N, Kluzniak W et al. Double heterozygotes among breast cancer patients analyzed for BRCA1, CHEK2, ATM, NBN/NBS1, and BLM germline mutations // *Breast Cancer Res Treat.* 2014;145:553–562. <https://doi.org/10.1007/s10549-014-2971-1>
2. Schutte M, Seal S, Barfoot R et al. Variants in CHEK2 other than 1100delC do not make a major contribution to breast cancer susceptibility // *Am J Hum Genet.* 2003;72:1023–1028.
3. Weischer M, Bojesen SE, Ellervik C et al. CHEK2*1100delC genotyping for clinical assessment of breast cancer risk:

- meta-analyses of 26,000 patient cases and 27,000 controls // *J Clin Oncol.* 2008;26:542–548.
4. Cybulski C, Huzarski T, Górski B et al. A novel founder CHEK2 mutation is associated with increased prostate cancer risk. *Cancer Res.* 2004;64:2677–2679.
5. Cybulski C, Wokolorczyk D, Huzarski T et al. A large germline deletion in the Chek2 kinase gene is associated with an increased risk of prostate cancer // *J Med Genet.* 2006;43:863–866.
6. Cybulski C, Wokolorczyk D, Huzarski T et al. A deletion in CHEK2 of 5,395 bp predisposes to breast cancer in Poland // *Breast Cancer Res Treat.* 2007;102:119–122.
7. Domagala P, Wokolorczyk D, Cybulski C et al. Different CHEK2 germline mutations are associated with distinct immunophenotypic molecular subtypes of breast cancer // *Breast Cancer Res Treat.* 2012;132:937–945.
8. Cybulski C, Huzarski T, Byrski T et al. Estrogen receptor status in CHEK2-positive breast cancers: implications for chemoprevention // *Clin Genet.* 2009;75:72–78.
9. Schmidt MK, Hogervorst F, van Hien R et al. Age- and Tumor Subtype-Specific Breast Cancer Risk Estimates for CHEK2*1100delC Carriers // *J Clin Oncol.* 2016;34:2750–2760.
10. Nagel JH, Peeters JK, Smid M et al. Gene expression profiling assigns CHEK2 1100delC breast cancers to the luminal intrinsic subtypes // *Breast Cancer Res Treat.* 2012;132:439–448
11. Huszno J, Budryk M, Koosza Z et al. A Comparison between CHEK2*1100delC/1157T Mutation Carrier and Noncarrier Breast Cancer Patients: A Clinicopathological Analysis // *Oncology.* 2016;90:193–198.
12. Vahteristo P, Bartkova J, Eerola H et al. A CHEK2 genetic variant contributing to a substantial fraction of familial breast cancer // *Am J Hum Genet.* 2002;71:432–438.
13. Kilpivaara O, Bartkova J, Eerola H et al. Correlation of CHEK2 protein expression and c.1100delC mutation status with tumor characteristics among unselected breast cancer patients // *Int J Cancer.* 2005;113:575–580.
14. Fletcher O, Johnson N, Dos Santos Silva I et al. Family history, genetic testing, and clinical risk prediction: pooled analysis of CHEK2 1100delC in 1,828 bilateral breast cancers and 7,030 controls // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18:230–234.
15. Schmidt MK, Tollenaar RA, de Kemp SR et al. Breast cancer survival and tumor characteristics in premenopausal women carrying the CHEK2*1100delC germline mutation // *J Clin Oncol.* 2007;25:64–69.
16. Weischer M, Nordestgaard BG, Pharoah P et al. CHEK2*1100delC heterozygosity in women with breast cancer associated with early death, breast cancer-specific death, and increased risk of a second breast cancer // *J Clin Oncol.* 2012;30:4308–4316.
17. Zhang S, Phelan CM, Zhang P et al. Frequency of the CHEK2 1100delC mutation among women with breast cancer: an international study // *Cancer Res.* 2008;68:2154–2157.
18. de Bock GH, Schutte M, Krol-Warmerdam EM et al. Tumour characteristics and prognosis of breast cancer patients carrying the germline CHEK2*1100delC variant // *J Med Genet.* 2004;41:731–735.
19. Maxwell KN, Wubbenhorst B, Wenz BM et al. BRCA1 locus-specific loss of heterozygosity in germline BRCA1 and BRCA2 carriers. *Nat Commun.* 2017;8:319. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00388-9>

20. Neuhausen SL, Marshall CJ. Loss of heterozygosity in familial tumors from three BRCA1-linked kindreds // *Cancer Res.* 1994;54:6069–6072.
21. Imyanitov EN, Byrski T. Systemic treatment for hereditary cancers: a 2012 update // *Hered Cancer Clin Pract.* 2013;11:2.
22. Sodha N, Bullock S, Taylor R et al. CHEK2 variants in susceptibility to breast cancer and evidence of retention of the wild type allele in tumours // *Br J Cancer.* 2002;87:1445–1448.
23. Oldenburg RA, Kroeze-Jansema K, Kraan J et al. The CHEK2*1100delC variant acts as a breast cancer risk modifier in non-BRCA1/BRCA2 multiple-case families // *Cancer Res.* 2003;63:8153–8157.
24. Jekimovs CR, Chen X, Arnold J et al. Low frequency of CHEK2 1100delC allele in Australian multiple-case breast cancer families: functional analysis in heterozygous individuals // *Br J Cancer.* 2005;92:784–790.
25. Muranen TA, Greco D, Fagerholm R et al. Breast tumors from CHEK2 1100delC-mutation carriers: genomic landscape and clinical implications // *Breast Cancer Res.* 2011;13:R90.
26. Suspitsin EN, Yanus GA, Sokolenko AP et al. Development of breast tumors in CHEK2, NBN/NBS1 and BLM mutation carriers does not commonly involve somatic inactivation of the wild-type allele // *Med Oncol.* 2014;31:828.
27. Mandelker D, Kumar R, Pei X et al. The Landscape of Somatic Genetic Alterations in Breast Cancers from CHEK2 Germline Mutation Carriers // *JNCI Cancer Spectr.* 2019;3:pkz027. <https://doi:10.1093/jncics/pkz027>
28. Sodha N, Williams R, Mangion J et al. Screening hCHK2 for mutations // *Science.* 2000;289:359.
29. Sokolenko AP, Preobrazhenskaya EV, Aleksakhina SN et al. Candidate gene analysis of BRCA1/2 mutation-negative high-risk Russian breast cancer patients // *Cancer Lett.* 2015;359:259–261.
30. Castells A, Gusella JF, Ramesh V, Rustgi AK. A region of deletion on chromosome 22q13 is common to human breast and colorectal cancers // *Cancer Res.* 2000;60:2836–2839.
31. Williams LH, Choong D, Johnson SA, Campbell IG. Genetic and epigenetic analysis of CHEK2 in sporadic breast, colon, and ovarian cancers // *Clin Cancer Res.* 2006;12:6967–6972.
32. Massink MP, Kooi IE, Martens JW et al. Genomic profiling of CHEK2*1100delC-mutated breast carcinomas // *BMC Cancer.* 2015;15:877.
33. Dong X, Wang L, Taniguchi K et al. Mutations in CHEK2 associated with prostate cancer risk // *Am J Hum Genet.* 2003;72:270–280.
34. Zannini L, Delia D, Buscemi G. CHK2 kinase in the DNA damage response and beyond // *J Mol Cell Biol.* 2014;6:442–457.
35. Lord CJ, Ashworth A. BRCAness revisited // *Nat Rev Cancer.* 2016;16:110–120.

S.N. Aleksakhina¹, A.G. Iyevleva¹, A.P. Sokolenko¹, S.V. Baskina¹, A.R. Venina¹, E.I. Anisimova², N.A. Akhmedov³, A.O. Ivantsov¹, Y.V. Belisheva¹, A.P. Cherniakova¹, E.N. Imyanitov^{1,4,5}

Loss of heterozygosity in CHEK2-associated breast cancer

¹ NMRC of Oncology named after N.N. Petrov of MoH of Russia, St Petersburg

² Mariinskaya City Hospital, St Petersburg

³ Dagestan State University, Makhachkala, Dagestan Republic, Russian Federation

⁴ Saint-Petersburg State Pediatric Medical University, St Petersburg

⁵ I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, St Petersburg

Background. CHEK2-associated neoplasms account for a significant proportion of hereditary breast cancer (BC) in Russia. The phenomenon of somatic deletion of the normal allele of a gene affected by a hereditary mutation, or loss of heterozygosity (LOH), is a frequent mechanism of complete inactivation of the corresponding protein, which is realized during the development of hereditary breast carcinomas. The contribution of the LOH phenomenon to the pathogenesis of CHEK2-dependent tumors is poorly understood, and almost all available data concern only one type of mutations — *CHEK2 1100delC*.

The aim of the study was to characterize the frequency of LOH in breast tumor tissues from carriers of the three types of *CHEK2* alterations: *CHEK2 1000delC*, *CHEK2 IVS2+1G>A*, and *CHEK2 del5395*.

Materials and methods. LOH analysis was performed in a group of 50 breast cancer cases from women carrying *CHEK2 1000delC* (n=19), *CHEK2 IVS2+1G>A* (n=12), and *CHEK2 del5395* (n=19) mutations. Detection of LOH was carried out using a combination of methods that directly analyze the mutation locus (allele-specific PCR, Sanger sequencing, digital droplet PCR), and assess the status of single nucleotide polymorphisms surrounding the *CHEK2* gene (digital droplet PCR).

Results. The frequency of the LOH phenomenon in the studied cohort reached 27/50 (54%). Loss of heterozygosity was observed in 10/19 (52.6%) *CHEK2 1000delC*-associated, 6/12 (50%) *CHEK2 IVS2+1G>A*-associated, and 11/19 (57.9%) *CHEK2 del5395*-associated tumors. In one carcinoma from a carrier of the *CHEK2 IVS2+1G>A* alteration, the loss of mutated allele was confirmed. The main clinical and pathological characteristics were compared between tumors with loss and retention of heterozygosity. This comparison did not reveal any significant differences.

Conclusion. Loss of heterozygosity is observed in about half of breast carcinomas arising in *CHEK2* mutation carriers; the frequency of this phenomenon does not differ between three types of *CHEK2* genetic defects.

Key words: breast cancer; hereditary mutation; *CHEK2*; loss of heterozygosity

Поступила в редакцию 16.03.2021 г.