А. Клинические исследования

© Коллектив авторов, 2022
УДК 618.19
DOI 10.37469/0507-3758-2022-68-5-589-597
Вопросы онкологии, 2022. Том 68, № 5

И.А. Степанов[1], Е.В. Васильева[2], А.П. Соколенко[1], Е.Н. Имянитов[1]

Частота и спектр наследственных мутаций в гене *TP53* в обширном исследовании российских пациенток с раком молочной железы

[1] ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург
[2] ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург

Введение. Наиболее распространенной опухолевой локализацией при *TP53*-ассоциированном опухолевом синдроме (heritable *TP53*-related cancer syndrome — hTP53rc), который ранее назывался «синдром Ли-Фраумени» — является рак молочной железы (РМЖ). Синдром характеризуется возникновением наследственной мутации в гене *TP53*. В настоящем исследовании демонстрируется относительно высокая встречаемость hTP53rc в структуре наследственных опухолей молочной железы, а также представлен корректный алгоритм диагностики *TP53*-ассоциированных РМЖ в российской популяции.

Цель исследования. Изучение частоты и спектра наследственных мутаций в гене *TP53* у пациенток с РМЖ.

Материалы и методы. Проведено исследование 1726 образцов от пациенток с РМЖ при помощи секвенирования нового поколения (next generation sequencing — NGS) для обнаружения наследственных мутаций в генах *TP53, BRCA1/2.* Особенностью этого исследования служила возможность использования «обогащенной» выборки — из нее были исключены все образцы от пациенток с любыми мутациями в генах *BRCA1/2* при помощи особого алгоритма. В генах *CHEK2, NBS1, BLM* были дополнительно исследованы методом ПЦР наиболее часто встречающиеся в популяции мутации: *CHEK2 del5395 (del ex9-10), CHEK2 c.444+1G>A [IVS2+1G>A], CHEK2 1100delC, NBS1 657del5, BLM p.Q548X [c.1642C>T]* в образцах от 1322 пациенток из 1726. Такая методика была применена для возможности обнаружения носительства двойных мутаций и могла бы позволить оценить особенности клинических проявлений таких ситуаций в случае их обнаружения. Применение алгоритма на основе секвенирования нового поколения с исследованием нескольких генов позволило исключить образцы с мутациями и сформировать итоговую выборку, по которой оценивалась встречаемость hTP53rc.

Результаты. Частота hTP53rc в сформированной выборке составила 10/1494, т е. 0,67%.

Заключение. Распространенность hTP53rc в российской популяции, очевидно, оценена недостаточно. Вклад hTP53rc в структуру наследственных РМЖ целесообразно учитывать.

Ключевые слова: наследственные опухолевые синдромы, синдром Ли-Фраумени

Введение

Современные методы диагностики наследственных опухолевых синдромов, связанных с развитием злокачественных опухолей молочной железы, предполагают проведение стандартного молекулярно-генетического исследования на наличие мутаций в генах *BRCA1/2, CHEK2, BLM, NBS1.*

Наследственный *TP53*-ассоциированный опухолевый синдром (heritable *TP53*-related cancer syndrome, или сокращенно — hTP53rc), который до 2020 г. назывался «синдром Ли-Фраумени» [1] в России описан в ряде единичных случаев и на первый взгляд представляется редким наследственным синдромом, однако настоящее исследование демонстрирует, что распространенность этого синдрома, очевидно, сильно недооценена.

hTP53rc характеризуется фатальной предрасположенностью к возникновению широкого спектра опухолей в течение жизни, в зависимости от тканевой специфичности и пенетрантности наследственной мутации в гене *TP53*. Наиболее распространенной опухолевой локализацией является рак молочной железы (РМЖ). В настоящее время необходимо учитывать вклад наследственных мутаций в гене *TP53* в структуру наследственных злокачественных опухолей молочной железы. Прежде всего по причине особого подхода к лечению и профилактике.

Для *TP53*-ассоциированным РМЖ рекомендуется избегать генотоксической терапии и лучевой терапии, ввиду чрезмерного риска развития последующих опухолей, главный упор

целесообразно делать на хирургические методы лечения, а также регулярно проводить широкий спектр диагностических манипуляций, включающих МРТ всего тела, УЗИ и другие методы для своевременной диагностики возникновения опухолей других локализаций при hTP53rc. Наиболее авторитетными профилактическими протоколами являются рекомендации от Американской Ассоциации Исследования Рака (AAИР/American Association for Cancer Research) [2] и от European Reference Network on Genetic Tumour Risk Syndromes (ERN GENTURIS) [1]. Благоприятным фактором для лечения hTP53rc является тестирование на патогенные мутации в гене *TP53* до начала лечения.

В России диагностика hTP53rc ограничена описанием отдельных случаев. Массовое выявление *TP53*-ассоциированных опухолей молочной железы стало возможным в связи с применением секвенирования нового поколения (next generation sequencing — NGS), которое мы включили в алгоритм диагностики.

Особенностью исследования гетерозиготных наследственных мутаций в гене *TP53* является отсутствие эффекта основателя в России (единственный известный эффект основателя — мутация *TP53 R337* [3], характерная для населения юга Бразилии), т е. в России нет часто встречающихся в популяции мутаций в гене *TP53* и исследование должно затрагивать все участки, в которых могут быть обнаружены патогенные мутации (в кодирующей и некодирующей последовательности). Кроме того, существует техническая сложность исследования гена, так как *TP53* имеет богатый GC-состав, что на практике связано с предпочтительным использованием гибридизационных панелей обогащения для NGS перед амплификационными панелями.

Применение секвенирования нового поколения позволяет исследовать все необходимые участки одного или нескольких генов. В связи с этим мы связали исследование всех необходимых генов наследственных РМЖ *(BRCA1/2, CHEK2, BLM, NBS1, TP53)* в единый алгоритм, одним из этапов которого является секвенирование нового поколения. Это дает возможность оценить вклад мутаций во всех перечисленных генах в структуру наследственных РМЖ и создать «обогащенную» выборку для обеспечения точности измерения распространенности *TP53*-ассоциированных РМЖ.

Наиболее частым исследованием при подозрении на наследственный РМЖ является молекулярно-генетический анализ на наличие мутаций в генах *BRCA1/2*, *CHEK2*, *BLM*, *NBS1*. Стоит отдельно отметить, что и семейный анамнез, и рецепторный статус опухолей при *BRCA1/2*-, *CHEK2*-, *BLM*-, *NBS1*-ассоциированных РМЖ и при *TP53*-ассоциированных РМЖ различаются. Так, настоящее исследование обосновывает необходимость включения гена *TP53* в стандартные диагностические протоколы наследственных РМЖ.

Так как исследование проводилось с учетом объединения генов в единый алгоритм, требуется кратко охарактеризовать особенности и роль других генов, помимо *TP53* в лечении, профилактике и эпидемиологии.

Особенностью *BRCA*-ассоциированного РМЖ является наличия эффекта основателя в различных популяциях. Большинство представителей российской популяции являются частью общей славянской популяции, в которую входят представители из различных стран восточной Европы: России, Украины, Беларуси, Польши, Чехии, Словакии, Словении и славяне из других стран. Представители данной славянской популяции объединены наличием общих для этих народов наиболее часто встречающимися мутациями [4]. Кроме того, часть наиболее распространенных мутаций в славянской популяции характерна и для евреев-ашкенази.

Для *CHEK2-, BLM-, NBS1*-ассоциированных РМЖ также характерен эффект основателя, но в общеевропейской популяции, а не в популяции восточных славян. Исходя из представленных особенностей, удобно использовать метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) для исключения наиболее частых в популяции мутаций в генах *BRCA1/2, CHEK2, BLM, NBS1,* после чего переходить к NGS. Для hTP53rc не характерен эффект основателя, поэтому целесообразно сразу проводить NGS-тестирование для исследования мутаций в гене *TP53*.

Мы исследовали обогащенную выборку, в которой были исключены любые мутации в генах *BRCA1/2*, а также дополнительно были исследованы самые распространенные мутации в генах *CHEK2, BLM* и *NBS* у 77% пациенток с РМЖ из выборки образцов, которым проведено исследование полной последовательности генов *BRCA1/2* и *TP53* при помощи метода NGS. В получившейся выборке обнаружились 10 пациентов с наследственной мутацией в гене *TP53*.

Обращаем внимание, что согласно обновленным критериям Chompret, современные протоколы диагностики hTP53rc предусматривают обязательное тестирование только для пациенток с РМЖ не старше 31 года вне зависимости от семейного анамнеза [5]. Возможно тестирование пациенток на наличие наследственных мутаций в гене *TP53* старше 31 года только при наличии особого семейного анамнеза (подробнее в обсуждении). Выборка для нашего исследования

была представлена шире в связи с исследованием сразу нескольких генов.

Итак, грамотная диагностика наследственных РМЖ предполагает несколько этапов: диагностику наиболее часто встречающихся в популяции мутаций, если это целесообразно (при помощи серии ПЦР-тестов) и применение NGS для поиска так называемых «редких мутаций» в генах *BRCA1/2*, а также для анализа последовательности гена *TP53*.

Материалы и методы

Исследование одобрено этическим комитетом по этике ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России выпиской № 11/253 от 22 октября 2020 г. От всех пациенток, проходивших молекулярно-генетические исследования было получено информированное согласие. Материалом для исследования всех образцов РМЖ была хромосомальная ДНК, выделенная из периферической крови. В представленную выборку вошли образцы от пациенток с РМЖ от 23 до 50 лет. Часть пациенток имела первично множественные опухоли, одна из которых — РМЖ. Всего образцов РМЖ, прошедших исследование при помощи NGS, было представлено 1726, в них были исключены часто встречающиеся в популяции мутации в генах *BRCA1/2*. В 1322 из 1726 образцах (77%) также были исследованы частые мутации в генах *CHEK2, BLM, NBS,* после чего вне зависимости от наличия или отсутствия мутации в этих генах было проведено исследование полной последовательности генов *BRCA1/2* и *TP53* при помощи NGS.

Такой подход был избран для возможности обнаружения носительства двойных мутаций у одного пациента (т. е. одновременное присутствие наследственных мутаций в генах *BRCA1/2* или *TP53* и часто встречающихся мутаций в генах *CHEK2, BLM, NBS*), что могло бы выявить особенности клинического проявления таких ситуаций. В настоящем исследовании случаи носительства двойных мутаций не обнаружены.

Количество пациенток до 31 года включительно составило 124 из 1726. 1602 образца были от пациенток старше 31 года. Количество пациенток с первично-множественными злокачественными образованиями, одно из которых РМЖ — 93. Первично-множественные опухоли были представлены широким спектром локализаций, помимо РМЖ у разных пациенток наблюдался рак щитовидной железы, рак толстого кишечника, гастроинтестинальные стромальные опухоли, рак шейки матки, рак эндометрия, рак яичников, рак матки, меланома, рак поджелудочной железы. Из 93 образцов с первично-множественными опухолями представлен 51 случай только с билатеральным РМЖ.

У 61 из 124 пациенток с РМЖ до 31 года включительно был семейный анамнез. Из 1602 пациенток старше 31 года, 635 имели семейный анамнез. Требования к семейному анамнезу не являлись строгими, их можно охарактеризовать следующими критериями: пробанд хотя бы с одним родственником первой или второй степени родства с любым злокачественным новообразованием вне зависимости от возраста родственника. Остальные пациентки не имели семейного анамнеза.

В качестве первого этапа формирования обогащенной выборки мы отобрали 5469 образцов от пациенток с РМЖ различного возраста, после чего выбрали 3262 образца от пациенток младше 50 лет. Эти образцы были предварительно протестированы на предмет наличия/ отсутствия у них характерных «славянских» фаундер-мутаций: *BRCA1 5382insC [c.5266dupC], BRCA1 4153delA [c.4034delA], BRCA1 185delAG [c.68_69delAG], BRCA2 6174delT [c.5964delT], BRCA1 C61G [c.181T>G], BRCA1 2080delA [c.1961delA], BRCA1 3819del5 [c.3700_3704delGTAAA] и BRCA1 3875del4 [c.3756_3759delGTCT].* После исключения образцов с часто встречающимися славянскими мутациями мы выбрали 1726, которым провели исследование полной последовательности генов *BRCA1/2* и *TP53*.

Из 1726 образцов 1322 были протестированы на предмет наличия или отсутствия следующих мутаций: *CHEK2 del5395 (del ex9-10), CHEK2 c.444+1G>A [IVS2+1G>A], CHEK2 1100delC, NBS1 657del5, BLM p.Q548X [c.1642C>T].* После проведения данной серии исследований мы установили, что носительство двойных мутаций в образцах в настоящей выборке отсутствует. По этой причине были исключены из 1726 образцов 207 «редких» патогенных наследственных мутаций в генах *BRCA1/2.* Из 1322 исследованных при помощи метода ПЦР образцов на частые мутации в генах *CHEK2, BLM, NBS1* было обнаружено 7 образцов с мутацией *CHEK2 1100del,* 7 образцов с мутацией *CHEK2 del5395 (del ex9-10),* 5 образцов с мутацией *CHEK2 c.444+1G>A [IVS2+1G>A].* В результате всего обнаружено 19 образцов с часто встречающимися наследственными мутациями в гене *CHEK2.* Кроме того, в одном образце обнаружена мутация *BLM p.Q548X [c.1642C>T],* в 5 — *NBS1 657del5.* Все эти 25 образцов были также исключены из выборки 1726 образцов от пациенток до 50 лет, а злокачественные новообразования пациенток идентифицированы как *CHEK2-, BLM-, NBS1-* ассоциированные РМЖ, так как не обнаружено случаев носительства двойных мутаций.

Исключение мутаций было проведено при помощи постановки серии ПЦР различных модификаций: аллель-специфической ПЦР или ПЦР с применением интеркалирующего красителя Eva Green и последующим осуществлением плавления в высоком разрешении (High Resolution Melting) (рисунок).

После проведения серии указанных выше ПЦР-тестов проводилось таргетное секвенирование в качестве 2 этапа исследования.

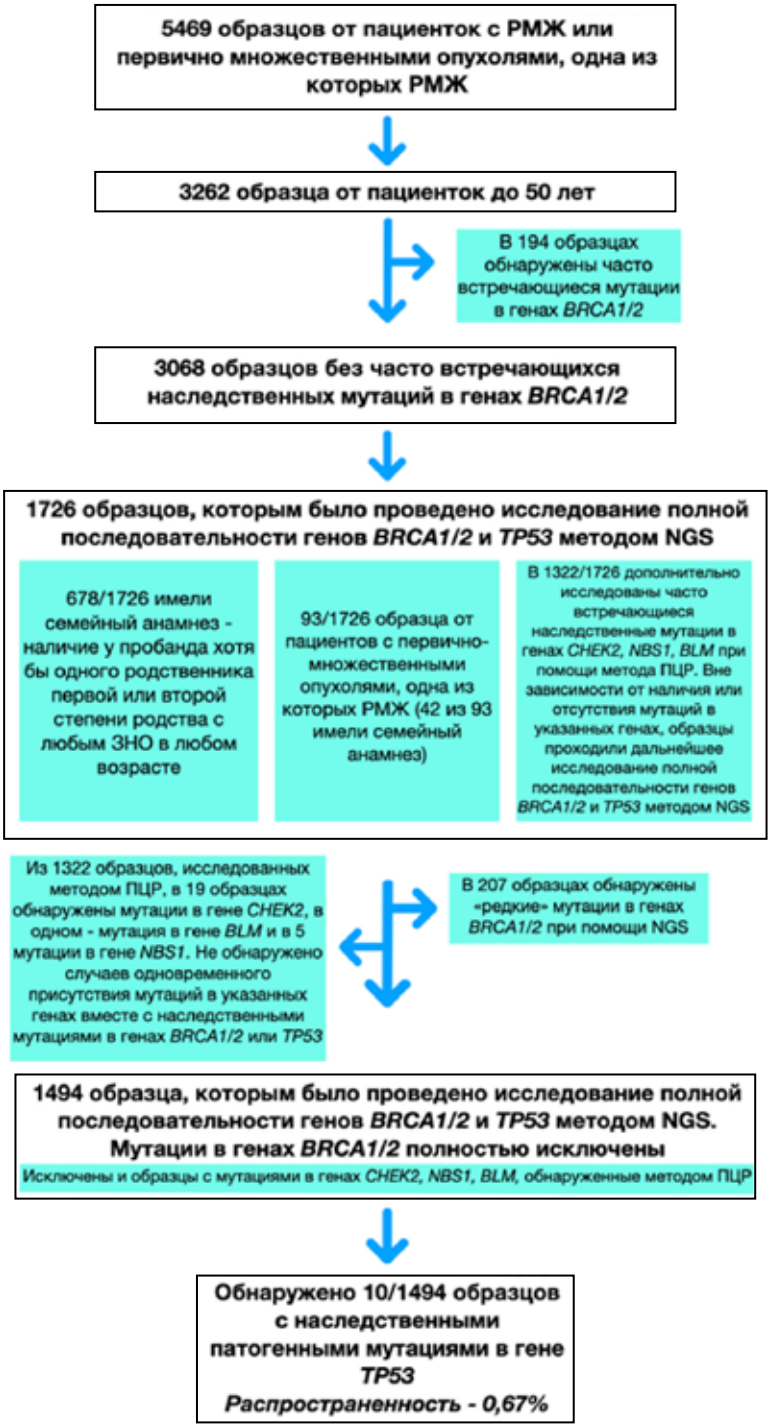
Обогащение ДНК-библиотеки было выполнено при помощи гибридизационной панели биотинилированных зондов с последовательностью генов *TP53, BRCA1, BRCA2.*

Последовательность зондов для гена *TP53* включала 1 нетранслируемый экзон и (примерно) первые и последние сто нуклеотидов от начала и конца каждого интрона.

В качестве системы пробоподготовки использовался набор реагентов KAPA Hyper Plus (Roche). Данная панель из трех генов успешно применялась в анализе образцов для поиска наследственных мутаций в указанных генах. Секвенирование осуществлялось на приборе MiSeq (Illumina, USA). Полученная обогащенная выборка гарантировала объективную оценку распространенности hTP53rc среди пациенток с РМЖ, так как полностью исключался вклад наиболее распространенной причины возникновения наследственного РМЖ — мутации в генах *BRCA1, BRCA2.*

Результаты исследования

В результате проведенного исследования мы выявили 10 из 1494 пациентов с наследственными мутациями в гене *TP53.* Следовательно, встречаемость hTP53rc в представленной обогащенной выборке пациенток с РМЖ составила 0,67%. Описание случаев представлено ниже (табл. 1).



Алгоритм исследования наследственного рака молочной железы

Характеристика пациентов с наследственными мутациями в гене *TP53*

ID образца	Возраст начала заболевания	Диагноз	Обнаруженная мутация	Расположение мутации и ее эффект на белок	Семейный анамнез	Рецепторный статус РМЖ/ Примечания
27222	38	РМЖ	*TP53 T125T [c.375G>A, rs55863639]*	Мутация располагается в сайте сплайсинга гена *TP53*. Мутация затрагивает ДНК-связывающий домен p53, не приводит к полной потере функции белка и не обладает доминантно-негативным эффектом	Нет данных	–

ID образца	Возраст начала заболевания	Диагноз	Обнаруженная мутация	Расположение мутации и ее эффект на белок	Семейный анамнез	Рецепторный статус РМЖ/ Примечания
26851	37	Билатеральный РМЖ и меланома кожи	*TP53 R248Q [c.743G>A, rs11540652]*	Мутация располагается в ДНК-связывающем домене p53, приводит к полной потере функции белка и обладает доминантно-негативным эффектом	У матери — рак легкого диагностирован в 33 года	РПМЖ- ER+, PR-, HER2+. РЛМЖ- HER2- изолированный. Обнаружена мутация *BRAF V600E* в меланоме. Сначала манифестировала меланома в 37 лет, позже в 38 РПМЖ, в 39 лет РЛМЖ
24956	45	РМЖ	*TP53 G245C [c.733G>T; rs28934575]*	Мутация располагается в ДНК-связывающем домене p53, влияние на функциональность белка не изучено, однако в мире зарегистрировано 2 случая hTP53rc с такой мутацией согласно IARC/МАИР	Нет данных	–
22970	48	Билатеральный РМЖ, гастроинтестинальная стромальная опухоль желудка, папиллярная карцинома щитовидной железы	*TP53 R156C [c.466C>T; rs563378859]*	Мутация располагается в ДНК-связывающем домене p53, не приводит к полной потере функции белка и не обладает доминантно-негативным эффектом	У матери рак прямой кишки с манифестацией в 58 лет	Обе опухоли МЖ ER+, PR-, HER2+ РПМЖ диагностировали в 48 лет, РЛМЖ в 49лет, гастроинтестинальную стромальную опухоль желудка в 49 лет, папиллярную карциному щитовидной железы в 49 лет
22024	44	РМЖ	*TP53 R196X [c.586C>T; rs397516435]*	Мутация располагается в ДНК-связывающем домене p53, приводит к полной потере функции белка и не обладает доминантно-негативным эффектом	Нет данных	ER+, PR+, HER2-
28411	36	РМЖ	*TP53 I195T [c.584T>C; rs760043106]*	Мутация располагается в ДНК-связывающем домене p53, приводит к полной потере функции и не обладает доминантно-негативным эффектом	У отца рак простаты диагностирован в 60 лет	ER+PR+HER2+
27319	41	РМЖ+РЯ	*TP53 L330F [c.988C>T; rs2073148779]*	Мутация располагается в домене тетрамеризации p53, приводит к полной потере функции белка и не обладает доминантно-негативным эффектом	У матери рак гортани диагностирован в 39; у деда по материнской линии — рак трахеи (возраст начала неизвестен); у тети по материнской линии — РМЖ в 61 год	ER+ PR- HER2 -
25028	49	РМЖ	*TP53 R175C [c.523C>T; rs138729528]*	Мутация располагается в ДНК-связывающем домене p53, не приводит к полной потере функции белка и не обладает доминантно-негативным эффектом. В мире зарегистрировано 4 случая hTP53rc с такой мутацией согласно IARC/МАИР	У матери РМЖ в 78, у прабабушки — РЩЖ	
29336	35	Билатеральный трижды негативный РМЖ в 35 лет	*TP53 L194F [c.580C>T; rs587780071]*	Мутация располагается в ДНК-связывающем домене p53, приводит к полной потере функции белка и обладает доминантно-негативным эффектом. В мире зарегистрировано 3 случая hTP53rc с такой мутацией согласно IARC/МАИР	Нет данных	ER- PR- HER2-
30303	30	Билатеральный РМЖ в 30 лет	*TP53 R248W [c.742C>T; rs121912651]*	Мутация располагается в ДНК-связывающем домене p53, приводит к полной потере функции белка и обладает доминантно-негативным эффектом	У матери РМЖ в 50 лет, у отца рак простаты в 65 лет	

Стоит отметить, что комплексный подход для изучения наследственных РМЖ требует учета всех критериев, которые могут повысить специфичность исследования. Прежде всего в контексте hTP53rc. Если рассматривать мировые рекомендации по hTP53rc, то они ограничиваются критериями для наиболее ярких клинических случаев. Ориентироваться в случае РМЖ необходимо на обновленные критерии Chompret в составе рекомендаций от ERN GENTURIS [1], которые предусматривают тестирование на наследственные мутации в гене *TP53* у пациенток моложе 31 года вне зависимости от семейного анамнеза. Существует и ряд других критериев, которые предусматривают тщательный анализ семейного анамнеза пациента. К таким критериям относятся: классические критерии Ф. Ли и Дж. Фраумени [6], критерии Birch [7], критерии Eeles [8, 9], а также один из разделов обновленных критериев Chompret [5].

Безусловно, соблюдение критериев обеспечивает высокую специфичность [5], однако, в настоящем исследовании мы применили все критерии hTP53rc, после тщательного изучения, в сочетании с наиболее характерными признаками других наследственных РМЖ. Кроме того, мы изучили мировые данные, связанные с рецепторным статусом *TP53*-ассоциированных РМЖ и учли их в этом исследовании. Основой для изучения случаев послужила база данных Международной Ассоциации Исследований Рака (МАИР/International Agency for Research on Cancer, IARC, Лион, Франция) [10]. Анализ последней версии R20, выпущенной в 2020 г. показывает, что 31 год у пациенток с *TP53*-ассоциированным РМЖ — это возрастная медиана. Соответственно, примерно половина пациенток с *TP53*-ассоциированным РМЖ (старше 31 года) должны проходить тестирование на наличие наследственных мутаций в гене *TP53* на усмотрение врача, который должен изучить семейный анамнез и сопоставить его с критериями hTP53rc. В данной ситуации приходится сталкиваться с рядом практических проблем: не так просто распознать кандидата на тестирование наследственной мутации в гене *TP53,* так как пациентки находятся в общем пуле с *BRCA1/2*-, *CHEK2*-, *BLM*-, *NBS1*-ассоциированными РМЖ (для которых тоже свойственно наличие семейного анамнеза) и также со спорадическими РМЖ, при этом семейный анамнез hTP53rc может быть крайне разнообразным. Необходимо подчеркнуть существенные различия в клинических характеристиках наследственных РМЖ.

Так для *TP53*-ассоциированных РМЖ нет определенного характерного рецепторного статуса, однако чаще встречаются случаи ER+, PR+, HER2+ или ER+, PR+, HER2-, трижды негативный фенотип менее характерен, хотя и такие опухоли встречаются [11]. Семейный анамнез может быть гетерогенным, представлять широкий спектр локализаций у родственников в различном возрасте (из-за различной пенетрантности мутаций). Для *BRCA*-ассоциированных РМЖ характерен тройной отрицательный фенотип (трижды негативный: ER-, PR-, HER2-) [12]. Для родственников первой и второй линии наиболее характерны опухолевые локализации: РМЖ, рак желудка, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы. Для *CHEK2*-, *BLM*-, *NBS1*-ассоциированных РМЖ более характерен не трижды негативный рецепторный статус [13]. При этом семейный анамнез, по существу, такой же как у *BRCA*-ассоциированных РМЖ.

Для точной оценки распространенности hTP53rc были учтены все перечисленные выше критерии, поэтому набор пациентов проводился по следующим требованиям: РМЖ до 50 лет вне зависимости от семейного анамнеза и рецепторного статуса или наличие у пациентки первично-множественных опухолей, одна из которых РМЖ.

Такой подход, безусловно, существенно снизил специфичность критериев. Однако была решена важная прикладная проблема, связанная со сбором семейного анамнеза и подбором соответствия критериев для каждой пациентки. Ввиду наличия достаточно большой выборки на практике была оценена распространенность hTP53rc.

Обсуждение

Оценим наиболее актуальные данные по структуре наследственных РМЖ для демонстрации вклада hTP53rc.

В российской славянской популяции наиболее часто встречается следующий набор наследственных мутаций в генах *BRCA1/2: BRCA1 5382insC [c.5266dupC], 4153delA [c.4034delA], 185delAG [c.68_69delAG], BRCA2 6174delT [c.5964delT].* Наиболее актуальные данные указывают на то, что эти 5 мутаций в совокупности встречаются в 4,7% у последовательно поступающих на исследование пациентов с РМЖ [14].

В добавление к этому другие 4 мутации в генах *BRCA1/2*:

BRCA1 C61G [c.181T>G], 2080delA [c.1961delA], 3819del5 [c.3700_3704delGTAAA] и *3875del4 [c.3756_3759delGTCT]* обнаруживаются еще в 1,6% случаев в последовательно поступивших образцах РМЖ [14].

Банк образцов из исследования, на которое мы ссылаемся [14], частично был использован в настоящем проекте, в силу чего была обеспечена дополнительная объективность и точность оценки распространенности *TP53*-ассоциированных РМЖ.

Кроме того, встречаются другие наследственные мутации с эффектом основателя, прежде всего в генах *BLM, NBS, CHEK2:*

CHEK2 del5395 (del ex9-10), CHEK2 c.444+1G>A [IVS2+1G>A], CHEK2 1100delC, NBS1 657del5, BLM p.Q548X.

Мутация *BLM p.Q548X* встречается примерно в 0,8% пациентов с РМЖ в России [15].

Мутация *NBS1 657del5* встречается у 0,6% пациентов с РМЖ в европейской популяции [16].

В гене *CHEK2* три описанные выше мутации в совокупности встречаются в европейской популяции в 3% случаев последовательно изученных образцов с РМЖ [17].

Таким образом, полученные результаты распространенности hTP53rc сопоставимы с данными о других генах, вносящих вклад в структуру наследственных РМЖ. В связи с этим, мы считаем включение гена *TP53* в общий алгоритм исследования обоснованным.

Подводя итог, охарактеризуем пациенток с обнаруженными наследственными мутациями в гене *TP53.* Все пациентки старше 31 года, 5 из 10 пациенток с первично-множественными опухолями. Все пациентки, у которых удалось выяснить рецепторный статус РМЖ, имеют не трижды негативный фенотип, кроме одной пациентки 29336 с билатеральным трижды негативным РМЖ (всего с такой мутацией описано 3 случая, согласно IARC/МАИР). Ориентироваться на рецепторный статус РМЖ при отборе пациенток на тестирование hTP53rc не корректно, так как встречаются как случаи трижды негативного РМЖ, так и опухоли не с трижды негативным фенотипом. Вопрос рецепторного статуса РМЖ при hTP53rc остается изученным недостаточно.

У пациентки 26851 с билатеральным РМЖ и меланомой кожи обнаружена патогенная соматическая мутация *BRAF V600E* в меланоме. Установленный факт подтверждает тенденцию *TP53*-ассоциированных опухолей к увеличению вероятности приобретения соматических драйверных мутаций, причем, очевидно, в опухолях любых локализаций (например, описано увеличение вероятности обнаружения драйверных мутации в гене *EGFR* при раке легкого [18, 19]). Соответственно, при выявлении наследственных мутаций в гене *TP53,* целесообразным является изучение наиболее часто встречающихся драйверных мутаций, характерных для конкретных локализаций. Частота и спектр соматических мутаций в *TP53*-ассоциированных опухолях остается мало освещенной проблемой.

Мутация у пациентки 27222 затрагивает сайт сплайсинга в ДНК-связывающем домене продукта гена *TP53.* Мутация у пациентки 27319 затрагивает домен тетрамеризации. Остальные обнаруженные мутации располагаются в ДНК-связывающем домене. В связи с широким спектром мутаций в гене *TP53,* а также большим количеством вариантов альтернативного сплайсинга этого гена, отдельно хотим подчеркнуть о необходимости применения NGS-панелей, которые адекватно могли бы охватывать не только кодирующую часть гена *TP53*, но и сайты сплайсинга.

Обнаруженные у пациенток мутации отличаются по молекулярно-биологическим свойствам. Пенетрантность hTP53rc напрямую зависит от того, какие эффекты оказывает мутация на белок. Удобнее всего оценивать вклад мутации с точки зрения наличия доминантно-негативного эффекта и способности полностью инактивировать мутантный p53.

Доминантно-негативный эффект (Dominant Negative Effect, DNE) характеризуется способностью мутантного p53 образовывать тетрамеры с белком дикого типа и полностью устранять функцию p53 в клетке. Полная потеря свойств белка (Loss Of Function, LOF) характеризуется полной утратой функции мутантного p53 в сравнении с белком дикого типа с нормальной активностью. Сочетание этих двух эффектов представляет зачастую опасную комбинацию, такие мутации обладают высокой пенетрантностью [20].

Если мутация не приводит к LOF или DNE, подразумевается, что в этом случае мутантный белок либо приобретает новую функцию, несвойственную для белка дикого типа (Gain of Function, GOF), либо происходит не полная потеря функций белка, а лишь частичная) [20].

Среди 10 обнаруженных мутаций: 3 не обладали ни эффектом полной потери функции белка, ни доминантно-негативным эффектом; 3 мутации обладали LOF без DNE, 3 мутации приводили к сочетанию LOF и DNE (стоит отметить, что в двух случаях мутации обнаружены у пациенток с билатеральным РМЖ, в одном — у пациентки с билатеральным РМЖ и меланомой; все 3 пациентки младше 40 лет); эффект 1 обнаруженной мутации оказался не изучен — мутация (*TP53 c.733G>T*) описана только у еще 2-х людей в мире. Мутация как у пациентки 25028 была зарегистрирована только у еще 4 людей в мире, а в случае пациентки 29336 — только еще у 3 пациентов, согласно IARC/МАИР. Сведения о них указывают на то, что когорта *TP53*-ассоциированных РМЖ остается достаточно неисследованной.

Из представленных данных можно сделать вывод, что методика изучения в настоящем проекте *TP53*-ассоциированных РМЖ ориентирована на обнаружение мутаций, вызывающих опухоли у пациентов старше 30 лет. Отдельно стоит подчеркнуть, что обнаружение любой патогенной наследственной мутации в гене *TP53* является крайне опасным с точки зрения возникновения первично-множественных опухолей.

Необходимо отметить еще один немаловажный аспект — вклад de novo мутаций в hTP53rc. Группа экспертов при участии авторов рекомендаций от ERN GENTURIS [21] в недавнем исследовании продемонстрировали, что 48 (14%) из 336 носителей наследственных мутаций в гене *TP53* имели мутации de novo, 8 (17%, 8/48) из них имели мозаичные мутации. Вклад de novo мутаций в hTP53rc считается вполне значимым и достаточно распространенным.

Вклад мутаций de novo в hTP53rc в дополнение к неполной пенетрантности мутаций *TP53* подтверждает мысль о том, что диагноз hTP53rc следует рассматривать независимо от семейного анамнеза у пациентов с сильно подозрительными на hTP53rc клиническими проявлениями.

В нашем исследовании присутствуют 4 образца от пациенток без сопроводительной информации о семейном анамнезе, у которых позже был выявлен hTP53rc. На практике пациентки не всегда могут иметь семейный анамнез по причине мутаций de novo, либо не предоставить такую информацию. При установленной нами распространенности синдрома, подход без ориентировки на семейный анамнез представляется передовым с точки зрения диагностики hTP53rc. В настоящее время актуальным является изучение наследственных опухолей РМЖ при помощи изучения сразу нескольких генов: *BRCA1/2, CHEK2, BLM, NBS1* и *TP53*.

Заключение

Вклад hTP53rc в структуру наследственных РМЖ сильно недооценен, исходя из массового выявления случаев *TP53*-ассоциированных опухолей молочной железы в настоящем исследовании. Учитывая необходимые меры профилактики и особенности лечения hTP53rc, дальнейшее изучение этого синдрома представляется крайне актуальным.

Вклад авторов:

Степанов И.А., Васильева Е.В. — написание текста рукописи, обзор публикаций по теме статьи, получение данных для анализа, анализ полученных данных;

Соколенко А.П. — написание текста рукописи, анализ полученных данных;

Имянитов Е.Н. — написание текста рукописи.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии в статье конфликта интересов.

Финансирование

Работа была поддержана грантом 20-315-90088 РФФИ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Frebourg T, Bajalica-Lagercrantz S, Oliveira C et al. Guidelines for the Li–Fraumeni and heritable TP53-related cancer syndromes // Eur. J. Hum. Genet. 2020;28:1379–1386. doi:10.1038/s41431-020-0638-4
2. Kratz CP, Achatz MI, Brugières L et al. Cancer Screening Recommendations for Individuals with Li-Fraumeni Syndrome // Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research. 2017;23(11):38–45. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-0408
3. Mathias C, Bortoletto S, Centa A et al. Frequency of the TP53 R337H variant in sporadic breast cancer and its impact on genomic instability // Sci. Rep. 2020;10(1):16614. doi:10.1038/s41598-020-73282-y
4. Janavičius R. Founder BRCA1/2 mutations in the Europe: implications for hereditary breast-ovarian cancer prevention and control // The EPMA J. 2010;1(3):397–412. doi:10.1007/s13167-010-0037-y
5. Bougeard G, Renaux-Petel M, Flaman JM et al. Revisiting Li-Fraumeni Syndrome From TP53 Mutation Carriers // J. Clin. Oncol. 2015;33(21):2345–2352. doi:10.1200/JCO.2014.59.5728
6. Li FP, Fraumeni JFJr, Mulvihill JJ et al. A cancer family syndrome in twenty-four kindreds // Cancer Res. 1988;48(18):5358–5362.
7. Birch JM, Hartley AL, Tricker KJ et al. Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families // Cancer Res. 1994;54(5):1298–1304.
8. Eeles RA, Bartkova J, Lane DP et al. The role of TP53 in breast cancer development // Cancer Surv. 1993;18:57–75.
9. Eeles RA. Germline Mutations in the TP53 Gene in Breast and Other Cancers // Thesis. Institute of Cancer Research. University of London, 2000.
10. https://tp53.isb-cgc.org/
11. Masciari S, Dillon DA, Rath M et al. Breast cancer phenotype in women with TP53 germline mutations: a Li-Fraumeni syndrome consortium effort // Breast cancer research and treatment. 2012;133(3):1125–30. doi:10.1007/s10549-012-1993-9
12. Chen H, Wu J, Zhang Z et al. Association Between BRCA Status and Triple-Negative Breast Cancer: A Meta-Analysis // Frontiers in pharmacology. 2018;9(909). doi:10.3389/fphar.2018.00909
13. Wei G, Teng M, Rosa M et al. Unique ER PR expression pattern in breast cancers with CHEK2 mutation: a hormone receptor and HER2 analysis based on germline cancer predisposition genes // Breast Cancer Res. 2022;24(11). doi:10.1186/s13058-022-01507-1
14. Sokolenko AP, Sokolova TN, Ni VI et al. Frequency and spectrum of founder and non-founder BRCA1 and BRCA2 mutations in a large series of Russian breast cancer and ovarian cancer patients // Breast Cancer Res. Treat. 2020;184(1):229–235. doi:10.1007/s10549-020-05827-8
15. Prokofyeva D, Bogdanova N, Dubrowinskaja N et al. Nonsense mutation p.Q548X in BLM, the gene mutated in Bloom's syndrome, is associated with breast cancer in Slavic populations // Breast Cancer Res. Treat. 2013;137(2):533–9. doi:10.1007/s10549-012-2357-1
16. di Masi A, Antoccia A. NBS1 Heterozygosity and Cancer Risk // Curr. Genomics. 2008;9(4):275–281. doi:10.2174/138920208784533610
17. Cybulski C, Wokołorczyk D, Jakubowska A et al. Risk of breast cancer in women with a CHEK2 mutation with and without a family history of breast cancer // J. Clin. Oncol. 2011;29(28):3747–52. doi:10.1200/JCO.2010.34.0778

18. Ricordel C, Labalette-Tiercin M, Lespagnol A. EFGR-mutant lung adenocarcinoma and Li-Fraumeni syndrome: report of two cases and review of the literature // Lung Cancer. 2015;87(1):80–84. doi:10.1016/j.lungcan.2014.11.005
19. Shodai T, Kazuhiro S, Koya K et al. Lung adenocarcinoma in a patient with Li–Fraumeni syndrome bearing a novel germ-line mutation, TP53R333Vfs*12 // Japanese Journal of Clinical Oncology. 2020;50(10):1214–1217. doi:10.1093/jjco/hyaa095
20. https://tp53.isb-cgc.org/help
21. Renaux-Petel M, Charbonnier F, Théry JC et al. Contribution of de novo and mosaic TP53 mutations to Li-Fraumeni syndrome // J. Med. Genet. 2018;55(3):173–180. doi:10.1136/jmedgenet-2017-104976

Поступила в редакцию 23.06.2022 г.

I.A. Stepanov[1], E.V. Vasilyeva[2], A.P. Sokolenko[1], E.N. Imyanitov[1]

The frequency and spectrum of hereditary mutations in the *TP53* gene in an extensive study involving Russian breast cancer patients

[1] NMRC of Oncology named after N.N. Petrov of the Ministry of Health of Russian Federation, Saint Petersburg
[2] Pavlov First Saint Petersburg State Medical University of the Ministry of Health of Russian Federation, Saint Petersburg

Introduction. Breast cancer is the most common tumor localization in heritable TP53-related cancer syndrome (hTP53rc), previously called «Li-Fraumeni syndrome». This syndrome is characterized by the occurrence of a hereditary mutation in the TP53 gene.

We wanted to demonstrate the relatively high incidence of hTP53rc in the structure of hereditary breast tumors, as well as to present a correct algorithm for the diagnosis of TP53-associated breast cancer in the Russian population.

Aim. To study the incidence and spectrum of hereditary mutations in the TP53 gene in breast cancer patients.

Materials and methods. We studied 1726 samples from breast cancer patients using next generation sequencing (NGS) to detect hereditary mutations in the *TP53, BRCA1/2* genes. The feature of this study was the creation of «enriched» sample collection — all samples from patients with any mutations in the *BRCA1/2* genes were excluded from sample group using a special algorithm. *CHEK2, NBS1,* and *BLM genes* in 1322 from 1726 samples were additionally tested by PCR for the most common mutations in the population: *CHEK2 del5395 (del ex9-10), CHEK2 c.444+1G>A [IVS2+1G>A], CHEK2 1100delC, NBS1 657del5, BLM p.Q548X [c.1642C>T]*. Such a technique was used for detecting the carriership of double mutations and could make it possible to assess the features of the clinical manifestations of such situations in case of their detection. Usage of an algorithm based on NGS with the study of several genes made it possible to exclude samples with mutations and form a final sample group by which the occurrence of hTP53rc was calculated.

Results. The occurrence of hTP53rc in the formed sample was 10/1494, which is 0.67%.

Conclusion. The frequency of hTP53rc in the Russian population is obviously insufficiently estimated. The contribution of hTP53rc to the structure of hereditary breast cancer should be taken into account.

Key words: heritable cancer syndromes, Li-Fraumeni syndrome

Сведения об авторах

Степанов Илья Александрович, аспирант, лаборант научной лаборатории молекулярной онкологии, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, 197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68, Stepanov.Ilya1.0@gmail.com

Васильева Елена Вячеславовна, студент ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова Минздрава РФ, 197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6–8, elena.v.vasilyeva98@gmail.com

Соколенко Анна Петровна, канд. мед.х наук, старший научный сотрудник научной лаборатории молекулярной онкологии, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, 197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68, annasokolenko@mail.ru

Имянитов Евгений Наумович, д-р мед. наук, профессор, член-корр. Российской академии наук, заведующий научным отделом биологии опухолевого роста, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, 197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68, evgeny@imyanitov.spb.ru

Stepanov Ilya, PhD student, laboratory assistant at the Scientific Laboratory of Molecular Oncology, NMRC of Oncology named after N.N. Petrov of the Ministry of Health of Russian Federation, 68 Leningradskaya str., Saint Petersburg, Pesochny, 197758, Russia, Stepanov.Ilya1.0@gmail.com

Vasilyeva Elena, student of Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, 6–8 Leo Tolstoy str., Saint Petersburg, 197022, Russia, elena.v.vasilyeva98@gmail.com

Sokolenko Anna, Candidate of Medical Sciences, Senior Researcher at the Scientific Laboratory of Molecular Oncology, NMRC of Oncology named after N.N. Petrov of the Ministry of Health of Russian Federation, 68 Leningradskaya str., Saint Petersburg, Pesochny, 197758, Russia, annasokolenko@mail.ru

Imyanitov Evgeny, Doctor of Medical Sciences, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Scientific Department of Tumor Growth Biology, NMRC of Oncology named after N.N. Petrov of the Ministry of Health of Russian Federation, 68 Leningradskaya str., Saint Petersburg, Pesochny, 197758, Russia, evgeny@imyanitov.spb.ru