



© А.Н. Ершова^{1,2}, Д.Е. Мартыненко², Г.А. Янус^{1,2}, Е.Ш. Кулигина²,
 А.С. Мартынов^{1,2}, А.Г. Иевлева^{1,2}, Е.Н. Суспицын^{1,2}, С.Н. Алексахина², Е.Н. Имянитов^{1,2,3}

Детекция и молекулярная характеристика *POLE*-ассоциированных опухолей толстой кишки

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

²Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

³Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

© Anastasia N. Ershova^{1,2}, Darya E. Martynenko², Grigory A. Yanus^{1,2}, Ekaterina S. Kuligina², Aleksandr S. Martianov^{1,2}, Aglaya G. Iyevleva^{1,2}, Evgeny N. Suspitsin^{1,2}, Svetlana N. Aleksakhina², Evgeny N. Imyanotov^{1,2,3}

Detection and Molecular Features of *POLE*-associated Colorectal Tumors

¹Saint-Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, the Russian Federation

²N.N. Petrov National Medical Research Centre of Oncology, St. Petersburg, the Russian Federation

³North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, the Russian Federation

Введение. Мутации в гене *POLE* — редкая причина гипермутабельности при раке толстой кишки (РТК). Согласно результатам недавнего клинического исследования, мутации в экзонуклеазном домене *POLE* при метастатическом РТК оказались маркером стойкого ответа на иммунотерапию. Эффективность блокаторов контрольных точек иммунного ответа в данной категории неоплазм превосходит таковую при MSI-H РТК.

Цель. Обобщить опыт детекции мутаций в гене *POLE* в крупной серии последовательных случаев метастатического РТК.

Материалы и методы. В рамках исследования проанализирована встречаемость мутаций в «горячих точках мутагенеза» гена *POLE* в 7816 случаях колоректального рака с помощью аллель-дискриминационной ПЦР. Для анализа редких вариантов мутаций и вариантов неясной клинической значимости были использованы методы HRM-ПЦР (*high-resolution melting*) и пиросеквенирование.

Результаты. Было выявлено 31/7816 (0,4 %) значимых мутаций в *POLE*, наиболее частыми из которых являлись замены p.V411L (n = 14), p.P286R (n = 13), p.S297F (n = 3). *POLE*-ассоциированные неоплазмы достоверно чаще встречались у пациентов младше 50 лет (11/766, 1,4 %, p = 0,0006), среди РТК с правосторонней локализацией (9/872, 1 %, p = 0,038). Особенно часто они были свойственны пациентам с сочетанием данных характеристик (5/85, 5,9 %), в опухолях с мутациями в 4 экзоне гена *KRAS* (6/204, 2,9 %, p = 1,571*10⁻⁹) по сравнению с любыми другими повреждениями генов каскада RAS-МАРК или амплификацией онкогена *HER2/neu*.

Выводы. Отдельные категории опухолей толстой кишки могут нуждаться в расширенном исследовании на предмет наличия редких мутаций в гене *POLE*.

Ключевые слова: *POLE*; колоректальный рак; мутационная опухолевая нагрузка; гипермутабельность

Introduction. Mutations in the *POLE* gene are a rare cause of hypermutability in colorectal cancer (CRC). According to the results of a recent clinical study, mutations in the exonuclease domain of the *POLE* in metastatic CRC turned out to be a marker of a stable response to immunotherapy. The efficacy of immune checkpoint inhibitors in this category of neoplasms exceeds that in MSI-H CRC.

Aim. This work aims to summarize the experience of detecting mutations in the *POLE* gene in a large series of consecutive cases of metastatic CRC.

Materials and Methods. In this article, we analyzed the occurrence of hotspot mutations in the *POLE* gene in 7.816 colorectal cancer cases using allele-discriminatory PCR. High-resolution melting (HRM) PCR and pyrosequencing were used to analyze rare mutation variants and variants of uncertain significance.

Results. 31/7,816 (0.4 %) significant mutations were identified in *POLE*, the most common of which were p.V411L (n = 14), p.P286R (n = 13), p.S297F (n = 3) substitutions. *POLE*-associated neoplasms were significantly more frequent in patients younger than 50 years (11/766, 1.4 %, p = 0.0006) and in right-sided CRCs (9/872, 1 %, p = 0.038). They were particularly common in patients with a combination of these features (5/85, 5.9 %), in tumors with mutations in exon 4 of *KRAS* (6/204, 2.9 %, p = 1.571*10⁻⁹) compared to any other damage to genes of the RAS-MAPK cascade or amplification of the *HER2/neu* oncogene.

Conclusion. Certain categories of CRCs require expanded investigation for the presence of rare mutations in the *POLE* gene.

Keywords: *POLE*; colorectal cancer; tumor mutation burden; hypermutation

Для цитирования: Ершова А.Н., Мартыненко Д.Е., Янус Г.А., Кулигина Е.Ш., Мартыанов А.С., Иевлева А.Г., Суспицын Е.Н., Алексахина С.Н., Имянитов Е.Н. Детекция и молекулярная характеристика *POLE*-ассоциированных опухолей толстой кишки. *Вопросы онкологии*. 2025; 71 (2): 381-388.-DOI: 10.37469/0507-3758-2025-71-2-OF-2228

For Citation: Anastasia N. Ershova, Darya E. Martynenko, Grigory A. Yanus, Ekaterina S. Kuligina, Aleksandr S. Martianov, Aglaya G. Iyevleva, Evgeny N. Suspitsin, Svetlana N. Aleksakhina, Evgeny N. Imyanitov. Detection and molecular features of *POLE*-associated colorectal tumors. *Voprosy Onkologii = Problems in Oncology*. 2025; 71(2): 381-388. (In Rus).-DOI: 10.37469/0507-3758-2025-71-2-OF-2228

✉ Контакты: Янус Григорий Аркадьевич, e-mail: octavedoctor@yandex.ru

Введение

Значимость соматических мутаций в гене *POLE* была впервые установлена в ходе ранних полноэкзомных исследований колоректального рака [1]. Данные мутации оказались второй по частоте причиной гипермутабельности в опухолях толстой кишки после микросателлитной нестабильности [2]. Приобретенный или наследственный генетический дефект в экзонуклеазном домене полимеразы эpsilon, реплицирующей геном в ходе S-фазы клеточного цикла, сопряжен с колоссальным количеством ошибочно вносимых ферментом однонуклеотидных замен. Некоторое количество этих генетических повреждений устраняется системой репарации неспаренных оснований ДНК, но большая часть сохраняется в виде соматических мутаций. Можно отметить, что для *POLE*-ассоциированных неоплазм характерна высокая частота вторичных дефектов системы репарации неспаренных оснований ДНК. Эти опухоли демонстрируют так называемую «ультрагипермутабельность», характеризующуюся возникновением сотен мутаций на миллион пар оснований (мут/Мб).

Немаловажно, что мутации в гене *POLE* не инактивируют весь ген, а нарушают функцию одного домена: как правило, это миссенс-замены, локализующиеся в кодонах 268–471 [3]. При этом наибольшее влияние на мутационную нагрузку опухолевого генома (*tumor mutation burden*, ТМБ) оказывают мутации, изменяющие работу экзонуклеазного домена таким образом, что фермент становится источником дополнительных повреждений ДНК [3, 4]. Подобными свойствами обладают и наиболее частые соматические дефекты гена *POLE*: p.P286R, p.V411L, p.A456P, p.S459F, в меньшей степени — p.S297F. Значимость некоторых редких миссенс-мутаций даже внутри экзонуклеазного домена все еще остается неясной. «Варианты неясной клинической значимости» (*variants of uncertain significance*, VUS) представляют собой важную практическую проблему, так как без одновременной оценки ТМБ интерпретировать такие находки в рутинной диагностике невозможно [5].

Клиническое значение *POLE*-ассоциированных неоплазм определяется иммуногенностью данных новообразований. Мутации в гене *POLE*

в целом являются благоприятным прогностическим маркером. Распространенность подобных опухолей в общей массе случаев рака толстой кишки (РТК) значительно варьирует (< 0,5–2,5 %), что связано с неоднородностью оцениваемых неоплазм в разных исследованиях [2, 6]. Мутации гена *POLE*, как и микросателлитная нестабильность, чаще обнаруживаются в крупных местнораспространенных новообразованиях и менее характерны для метастатических РТК. Вместе с тем наибольшую клиническую пользу детекция мутаций в гене *POLE* приносит именно в контексте метастатических новообразований. В 2024 г. были опубликованы результаты клинического испытания, включающего серию из 25 *POLE*- и 2 *POLD1*-ассоциированных опухолей толстой кишки. Применение пембролизумаба в монорежиме или в комбинации с ипилимумабом оказалось ассоциировано с 89 %-ной частотой объективных ответов на лечение, причем в 96 % случаев ответ длился до окончания периода наблюдения (медиана — 24,3 мес.) [7]. Таким образом, дефекты экзонуклеазной активности полимеразы эpsilon являются новым важным предиктивным маркером для рутинной молекулярной диагностики при колоректальном раке. Работа призвана обобщить опыт детекции подобных дефектов в крупной серии последовательных случаев метастатического РТК.

Материалы и методы

В исследование вошли 7816 последовательных случаев РТК, поступивших в лабораторию молекулярной онкологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова с целью рутинной молекулярно-генетической диагностики с мая 2023 по ноябрь 2024 г. У пациентов определялись статус микросателлитной нестабильности, наличие мутаций в генах *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, амплификация гена *HER2/neu* [8]. В большинстве случаев для анализа были доступны клинические и молекулярные характеристики (табл. 1).

После проведения микродиссекции и выделения нуклеиновых кислот образцы были подвергнуты аллель-дискриминационной ПЦР для детекции четырех наиболее частых мутаций в гене *POLE*, располагающихся в экзонах 9, 13 и 14: p.P286R, p.V411L, p.S297F, p.A456P (рис. 1). Помимо этого, фрагменты данных экзонов, со-

державшие эти мутации (а также p.S459F), были амплифицированы с последующим высокоточным анализом кинетики плавления продуктов ПЦР (*high-resolution melting analysis*, HRM). Образцы, продемонстрировавшие отклонения кривой от контроля, были подвергнуты пиро-секвенированию на оборудовании PyroMark 24 (Qiagen). Последовательности праймеров и олигонуклеотидных зондов, а также условия реакций приведены в табл. 2. Один из образцов, после получения крови от пациента по сделанному запросу, был подвергнут оценке мутационной опухолевой нагрузки согласно опубликованным ранее методикам [9]. Клинико-молекулярные ассоциации были оценены при помощи критерия хи-квадрат.

Результаты

Было выявлено 31/7816 (0,4 %) случаев патогенных мутаций в гене *POLE* среди когорты опухолей толстой кишки, среди которых наблю-

далось практически равное количество вариантов p.V411L (n = 14) и p.P286R (n = 13). Кроме того, определены три мутации p.S297F, один образец РТК с мутацией p.V411M (рис. 2), а также три варианта неясной клинической значимости: p.D291E, p.M299T и p.S461P. Опухоль с мутацией p.M299T была подвергнута анализу ТМВ: выявлена низкая величина мутационной нагрузки (4,5 мут/Мб). Это косвенно свидетельствует в пользу отсутствия клинического значения у данного генетического варианта. Проведен анализ клинических и молекулярных особенностей *POLE*-ассоциированных опухолей (табл. 1). Выявлена ассоциация мутаций в *POLE* с молодым возрастом пациентов (< 50 лет, 11/766, 1,4 % p = 0.0006), правосторонней локализацией (9/872, 1 %, p = 0,038). Особенно часто они встречались у пациентов с сочетанием данных характеристик (5/85, 5,9 %). Мутации в *POLE* значительно чаще сочетались с мутациями в 4 экзоне *KRAS* (6/204, 2,9 %, p = 1,571*10⁻⁹), нежели с любыми другими повреждениями генов

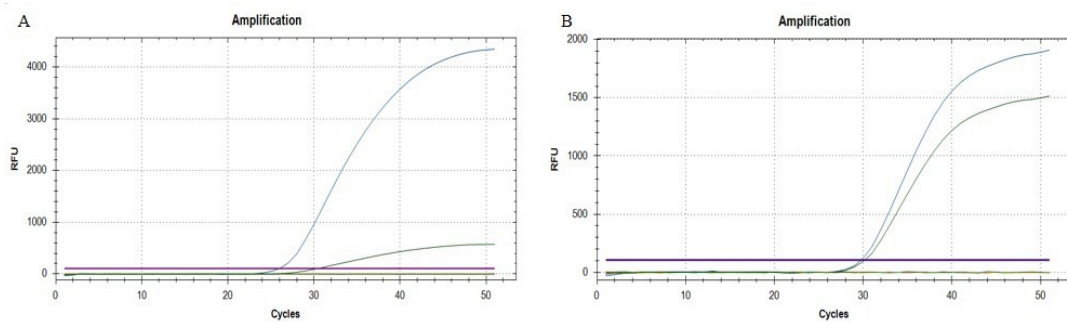


Рис. 1. Кривые флуоресценции, полученные в результате аллель-дискриминационной ПЦР. Синяя кривая флуоресценции соответствует аллелю дикого типа, зеленая — аллелю с миссенс-мутацией. А — соотношение кривых флуоресценции в образце дикого типа; В — соотношение кривых флуоресценции в образце с мутацией p.V411L.

Fig. 1. Fluorescence curves as a result of the allele discrimination PCR. The blue fluorescence curve corresponds to the wild-type allele, the green one to the allele with a missense mutation. A — The ratio of the fluorescence curves in the wild-type sample; B — The ratio of the fluorescence curves in the sample with the p.V411L mutation

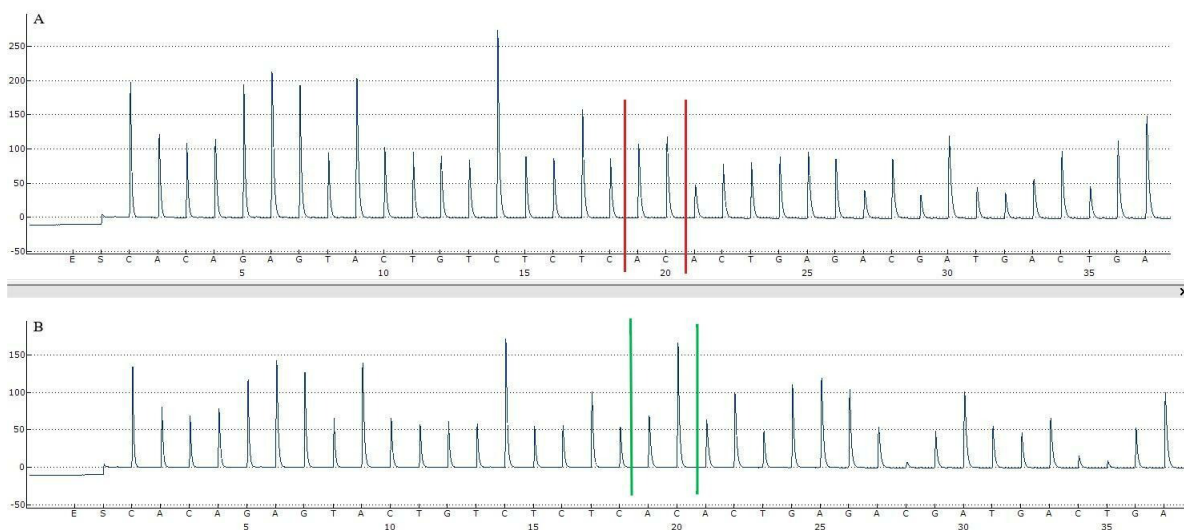


Рис. 2. Пирограммы. А — образец с мутацией p.V411M (область миссенс-мутации выделена красным цветом); В — образец дикого типа (последовательность в норме выделена зеленым).

Fig. 2. Pyrograms. A — Sample with the p.V411M mutation (the region of the missense mutation is highlighted in red); B — Wild type sample (normal sequence is highlighted in green)

каскада RAS-MAPK или амплификацией онкогена *HER2/neu*. Кроме того, мутации, затрагивающие ген *POLE*, чаще встречались в опухолях с отсутствием дефектов генов данного сигнального каскада (19/2092, 0,9 %, $p = 0,013$). Можно отметить отсутствие *POLE*-ассоциированных случаев среди опухолей с микросателлитной нестабильностью (MSI-H — 0/371), хотя статистической достоверности данная тенденция не достигла.

Обсуждение

В поисках *POLE*-ассоциированных неоплазм была проанализирована крупная коллекция РТК, преимущественно метастатических (точная информация доступна по малому числу случаев).

В целом мутации в гене *POLE* встречаются среди случаев метастатического колоректального рака реже 0,5 %, но в некоторых

категориях подобных неоплазм частота *POLE*-ассоциированных случаев достигает намного более высоких значений. Найденные ассоциации уже наблюдались ранее, но масштаб различий в частоте у российских пациентов не исследовался [6, 7]. В связи с высокой предиктивной значимостью мутаций в гене *POLE* данные наблюдения не представляются поводом к ограничению тестирования отдельными категориями мРТК. Для ряда клинических ситуаций (РТК у молодых больных; правосторонние РТК; детекция мутаций в 4 экзоне онкогена *KRAS*; отсутствие мутаций в *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*/амплификации *HER2/neu*) целесообразно не ограничиваться анализом отдельных мутаций, а исследовать весь экзонуклеазный домен *POLE*. При обнаружении вариантов «неясной клинической значимости» следует проводить расширенный анализ посредством высокопроизводительного секвенирования панели генов,

Таблица 1. Клинико-молекулярные характеристики «последовательных» случаев РТК

	Статус <i>POLE</i>	
	мутация не обнаружена	мутация обнаружена
Пол (n = 5869)		$p > 0,05$
Мужчины (n = 3037)	3016 (52 %)	21 (68 %)
Женщины (n = 2832)	2822 (48 %)	10 (32 %)
Возраст (n = 5841)		$p = 0,0006$
< 50 лет (n = 766, 13 %)	755 (13 %)	11 (37 %)
50–70 лет (n = 4537, 78 %)	4520 (78 %)	17 (56 %)
> 75 лет (n = 538, 9 %)	536 (9 %)	2 (7 %)
Локализация (n = 4530)		$p = 0,038$
Правосторонняя опухоль (C18.0–4, n = 882, 19 %), в т.ч.:	873 (19 %)	9 (45 %)
У пациентов < 50 лет	80	5/85 (5,9 %)
Левосторонняя опухоль (C18.5–C20) (n = 3648, 81 %)	3637 (81 %)	11 (55 %)
Микросателлитная нестабильность (n = 5640)		$p > 0,05$
MSI-H (n = 371, 7 %)	371 (7 %)	0
MSS (n = 5269, 93 %)	5240 (93 %)	29 (100 %)
Мутации в генах каскада RTK-RAS-MAPK (n = 5349)		$p = 0,013$
Всего (n = 3228, 60 %) ¹	3216 (61 %) *	12 (29 %)
<i>KRAS</i> (n = 2758) ² , в т.ч.:	2748 (85 %)	10 (83 %)
Мутации в 2 экзоне (12, 13 кодон) (n = 2405, 87 %)	2401 (87 %)	4 (40 %)
Мутации в 3 экзоне (59, 61 кодон) (n = 143, 5 %)	143 (5 %)	0
Мутации в 4 экзоне (117, 146 кодон) (n = 204, 7 %)	198 (7 %)	6 (60 %), $p = 1,571 \times 10^{-9}$
<i>NRAS</i>	295 (9 %)	0
<i>BRAF</i> , в т.ч.:	424 (13 %)	2 (17 %)
V600E (n = 392, 92 %)	391 (92 %)	1 (50 %)
Другие (n = 34, 8 %)	33 (8 %)	1 (50 %), $p = 0,027$
Амплификация гена <i>HER2/neu</i>	69 (2 %)	0
Отсутствие мутаций (n = 2121, 40 %)	2092 (39 %)	19 (61 %)

¹25 образцов продемонстрировали наличие двух мутаций в двух различных генах каскада *RTK-RAS-MAPK*;

²19 образцов продемонстрировали наличие двух мутаций в гене *KRAS*

значимых для колоректального канцерогенеза. Это не только позволит выявить иные клинически значимые генетические дефекты, но и приблизительно оценить мутационную опухолевую нагрузку [10]. Опухоли со значимыми мутациями в гене *POLE* часто демонстрируют более высокую мутационную нагрузку, чем у MSI-H неоплазм. Поэтому для идентификации повышенной TMB часто достаточно NGS-панели малого формата. Проверка целесообразности подобного дизайна исследования нуждается в дальнейших исследованиях.

Высокая частота варианта p.V411L в нашей когорте является относительно необычной находкой [7]. Можно обратить внимание на то, что ни одна из *POLE*-ассоциированных опухолей не отличалась высоким уровнем микросателлитной нестабильности, хотя, по данным литературы, около трети *POLE*-ассоциированных неоплазм демонстрируют вторичные дефекты системы

MMR. Между тем, насколько известно, пока не существует достоверного биологического объяснения отсутствия значимого накопления инсерций/делеций в таких опухолях.

Ограничения

Несмотря на исследование большой когорты РТК, удалось обнаружить лишь несколько десятков *POLE*-ассоциированных неоплазм, что могло помешать выявлению значимых ассоциаций. Также не было выполнено углубленное изучение молекулярного портрета РТК с мутациями в гене *POLE*: анализ ограничивался рутинно определяемыми молекулярными биомаркерами. Наконец, в данной работе были протестированы только «горячие точки мутагенеза» в экзонуклеазном домене *POLE*, что не позволило исчерпывающим образом охарактеризовать спектр клинически значимых мутаций в этом гене.

Table 1. Clinical and molecular features of “sequential” cases of CRC

	<i>POLE</i> status	
	No mutation detected	Mutation detected
Gender (n = 5,869)		p > 0,05
Male (n = 3,037)	3,016 (52 %)	21 (68 %)
Female (n = 2,832)	2,822 (48 %)	10 (32 %)
Age (n = 5,841)		p = 0.0006
< 50 years (n = 766, 13 %)	755 (13 %)	11 (37 %)
50–70 years (n = 4,537, 78 %)	4,520 (78 %)	17 (56 %)
> 75 years (n = 538, 9 %)	536 (9 %)	2 (7 %)
Localization (n = 4,530)		p = 0.038
Right-sided tumor (C18.0–4, n = 882, 19 %), including	873 (19 %)	9 (45 %)
In patients < 50 years	80	5/85 (5.9 %)
Left-sided tumor (C18.5–C20) (n = 3,648, 81 %)	3,637 (81 %)	11 (55 %)
Microsatellite instability (n = 5,640)		p > 0,05
MSI-H (n = 371, 7 %)	371 (7 %)	0
MSS (n = 5,269, 93 %)	5,240 (93 %)	29 (100 %)
Mutations in the <i>RTK-RAS-MAPK</i> gene cascade (n = 5349)		p = 0.013
Total (n = 3,228, 60 %) ¹	3,216 (61 %)*	12 (29 %)
<i>KRAS</i> (n = 2,758) ² , including	2,748 (85 %)	10 (83 %)
Mutations in exon 2 (12, 13 codon) (n = 2,405, 87 %)	2,401 (87 %)	4 (40 %)
Mutations in exon 3 (59, 61 codon) (n = 143, 5 %)	143 (5 %)	0
Mutations in exon 3 (117,146 codon) (n = 204, 7 %)	198 (7 %)	6 (60 %), p = 1.571 x 10 ⁻⁹
<i>NRAS</i>	295 (9 %)	0
<i>BRAF</i> , including	424 (13 %)	2 (17 %)
V600E (n = 392, 92 %)	391 (92 %)	1 (50 %)
Other (n = 34, 8 %)	33 (8 %)	1 (50 %), p = 0.027
<i>HER2/neu</i> amplification	69 (2 %)	0
No mutations (n = 2,121, 40 %)	2,092 (39 %)	19 (61 %)

¹25 samples showed the presence of two mutations in two different *RTK-RAS-MAPK* genes

²19 samples showed the presence of two mutations in the *KRAS* gene

Таблица 2. Последовательности праймеров, зондов и условия ПЦР-реакций

Название	Праймеры и зонды	Условия ПЦР
	Аллель-дискриминационные тесты	
POLEex13F	CTGCATGTTAGAATCATCCT	В состав реакции входили 1 × GeneAmp PCR Buffer I, 250 мкМ каждого дНТФ, по 200 нМ каждого праймера и зонда, 3,5 мМ MgCl ₂ , а также 1 мкл образца и 0,75 Ед полимеразы TaqM. Реакция проводилась в объеме 20 мкл. Программа амплификации включала фазу активации фермента (95 °С, 10 мин) и 50 циклов ПЦР (95 °С, 15 сек, 60 °С, 1 мин). ПЦР-амплификация проводилась на приборе для ПЦР в реальном времени CFX96 (Bio-Rad)
POLEex13R	AGATTATGACTGCCACA	
POLE_V411V	[FAM]CAGGTGGGTGAAGAGG[BHQ1]	
POLE_V411Lc	[R6G]CAGGTGGCTGAAGAGG[BHQ1]	
POLE_V411Lt	[R6G]CAGGTGGTTGAAGAGGG[BHQ1]	
POLEex14F	ACGTACTTCATGTACAGGTA	
POLEex14R	CTCTCTGGCGTTCTCTC	
POLE_A456A	[FAM]AATACGTGGCCAGAGTCT[BHQ1]	
POLE_A456P	[R6G]AATACGTGGGCAGAGTCT[BHQ1]	
POLEex9F	AAGCCACCTGCTCAC	
POLEex9R	TGGTTTTGGCATTGACA	
POLE_S297S	[FAM]ATCGATCATGTAGGAAATCATCAT[BHQ1]	
POLE_S297F	[HEX]CATCGATCATGTAGAAATCATCAT[BHQ1]	
POLE_P286P	[ROX]CTCAAGTTTCTGTATGCTGA[BHQ2]	
POLE_P286R	[Cy5]TCAAGTTTCGTGATGCTGA[BHQ3]	
	ПЦР с последующим HRM	
POLEex9F	ACATTGAGACGACCAAACCTGC	В состав реакции входили 1 × GeneAmp PCR Buffer I, 250 мкМ каждого дНТФ, по 200 нМ каждого праймера, 1X красителя Eva Green, 3,5 мМ MgCl ₂ , а также 1 мкл образца и 0,75 Ед полимеразы TaqM. Реакция проводилась в объеме 20 мкл. Программа амплификации включала фазу активации фермента (95 °С, 10 мин) и 50 циклов ПЦР (95 °С, 15 сек, 60 °С, 30 сек, 72 °С, 30 сек), HRM. ПЦР-амплификация проводилась на приборе для ПЦР в реальном времени LightCycler 96 (Roche)
POLEex9R	[bio]TACTTCCCAGAAGCCACCT	
POLEex13F	[bio]TCCCGGGCTGCATGTTAG	
POLEex13R	CGCCTTGAGATTATGACTGC	
POLEex14F	GGCTCTTGATTTTGTATGGC	
POLEex14R	[bio]GCCGACAGGACAGATAATGC	

Table 2. Primer and probe sequences and PCR reaction conditions

Title	Primers and probes	PCR-conditions
	Allele discrimination PCR	
POLEex13F	CTGCATGTTAGAATCATCCT	The reaction contained 1 × GeneAmp PCR Buffer I, 250 μM of each dNTP, 200 nM of each primer and probe, 3.5 mM MgCl ₂ , 1 μL of sample and 0.75 U of TaqM polymerase. The reaction was performed in a volume of 20 μL. The amplification program included an enzyme activation phase (95 °C, 10 min) and 50 PCR cycles (95 °C 15 s, 60 °C 1 min). PCR amplification was performed on a CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
POLEex13R	AGATTATGACTGCCACA	
POLE_V411V	[FAM]CAGGTGGGTGAAGAGG[BHQ1]	
POLE_V411Lc	[R6G]CAGGTGGCTGAAGAGG[BHQ1]	
POLE_V411Lt	[R6G]CAGGTGGTTGAAGAGGG[BHQ1]	
POLEex14F	ACGTACTTCATGTACAGGTA	
POLEex14R	CTCTCTGGCGTTCTCTC	
POLE_A456A	[FAM]AATACGTGGCCAGAGTCT[BHQ1]	
POLE_A456P	[R6G]AATACGTGGGCAGAGTCT[BHQ1]	
POLEex9F	AAGCCACCTGCTCAC	
POLEex9R	TGGTTTTGGCATTGACA	
POLE_S297S	[FAM]ATCGATCATGTAGGAAATCATCAT[BHQ1]	
POLE_S297F	[HEX]CATCGATCATGTAGAAATCATCAT[BHQ1]	
POLE_P286P	[ROX]CTCAAGTTTCTGTATGCTGA[BHQ2]	
POLE_P286R	[Cy5]TCAAGTTTCGTGATGCTGA[BHQ3]	
	HRM PCR	
POLEex9F	ACATTGAGACGACCAAACCTGC	The reaction contained 1 × GeneAmp PCR Buffer I, 250 μM of each dNTP, 200 nM of each primer, 1X Eva Green, 3.5 mM MgCl ₂ , 1 μL of sample and 0.75 U of TaqM polymerase. The reaction was performed in a volume of 20 μL. The amplification program included an enzyme activation phase (95 °C, 10 min) and 50 PCR cycles (95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s), HRM. PCR-amplification was performed on a LightCycler 96 Real-Time PCR system (Roche)
POLEex9R	[bio]TACTTCCCAGAAGCCACCT	
POLEex13F	[bio]TCCCGGGCTGCATGTTAG	
POLEex13R	CGCCTTGAGATTATGACTGC	
POLEex14F	GGCTCTTGATTTTGTATGGC	
POLEex14R	[bio]GCCGACAGGACAGATAATGC	

Заключение

Соматические и наследственные мутации в гене *POLE*, обладающие корректирующей активностью, являются новым клинически значимым биомаркером. Хотя в целом при РТК данные мутации встречаются относительно редко, их частота сопоставима с частотой рутинно определяемых при раке легкого транслокаций в генах *ROSI*, *RET* или *NTRK1-3*. В рамках работы впервые была определена частота мутаций в гене *POLE* в различных категориях РТК у российских пациентов. Ряд сделанных наблюдений может быть использован для формирования рационально обоснованного плана молекулярного обследования пациентов.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Финансирование

Данная работа поддержана грантом РФФ 23-15-00461.

Funding

This work was supported by the RSF grant № 23-15-00461.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Исследование выполнено в соответствии с Хельсинкской декларацией ВМА в редакции 2013 г. Проведение данной работы одобрено этическим комитетом при «ФГБУ НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, протокол № 04/119 от 03.10.2024. Все больные подписывали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (2013). The study was approved by the Ethics Committee of the NMRC of Oncology named after N.N. Petrov of the MoH of Russia. Protocol № 04/119 dated 03.10.2024. All patients gave written informed consent to participate in the study.

Участие авторов

Янус Г.А., Ершова А.Н., Кулигина Е.Ш., Суспицын Е.Н. — разработка концепции научной работы, написание текста статьи, статистический анализ и интерпретация данных;

Мартыненко А.С., Ершова А.Н., Мартыненко Д.Е. — сбор материала исследования, разработка дизайна и проведение молекулярно-генетического исследования;

Иевлева А.Г., Алексахина С.Н., Имянитов Е.Н. — критический анализ работы и редактирование текста с внесением ценного интеллектуального содержания.

Authors' contributions

Yanus G.A., Ershova A.N., Kuligina E.Sh., Suspitsin E.N. — development of the concept of scientific work, writing the text of the article, statistical analysis and interpretation of data;

Martianov A.S., Ershova A.N., Martynenko D.E. — collection of research material, developing the research design and molecular genetic examination;

Ievleva A.G., Aleksakhina S.N., Imyanitov E.N. — critical analysis of the work and editing of the text with the introduction of valuable intellectual content.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012; 487(7407): 330-337.-DOI: 10.1038/nature11252.
2. Fabrizio D.A., George T.J. Jr, Dunne R.F., et al. Beyond microsatellite testing: assessment of tumor mutational burden identifies subsets of colorectal cancer who may respond to immune checkpoint inhibition. *J Gastrointest Oncol*. 2018; 9(4): 610-617.-DOI: 10.21037/jgo.2018.05.06.
3. Ostroverkhova D., Tyryshkin K., Beach A.K., et al. DNA polymerase ϵ and δ variants drive mutagenesis in polypurine tracts in human tumors. *Cell Rep*. 2024; 43(1): 113655.-DOI: 10.1016/j.celrep.2023.113655.
4. Ahn S.M., Ansari A.A., Kim J., et al. The somatic POLE P286R mutation defines a unique subclass of colorectal cancer featuring hypermutation, representing a potential genomic biomarker for immunotherapy. *Oncotarget*. 2016; 7(42): 68638-68649.-DOI: 10.18632/oncotarget.11862.
5. León-Castillo A., Britton H., McConechy M.K., et al. Interpretation of somatic POLE mutations in endometrial carcinoma. *J Pathol*. 2020; 250(3): 323-335.-DOI: 10.1002/path.5372.
6. Hu H., Cai W., Wu D., et al. Ultra-mutated colorectal cancer patients with POLE driver mutations exhibit distinct clinical patterns. *Cancer Med*. 2021; 10(1): 135-142.-DOI: 10.1002/cam4.3579.
7. Ambrosini M., Rousseau B., Manca P., et al. Immune checkpoint inhibitors for POLE or POLD1 proofreading-deficient metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2024; 35(7): 643-655.-DOI: 10.1016/j.annonc.2024.03.009.
8. Martianov A.S., Mitiushkina N.V., Ershova A.N., et al. KRAS, NRAS, BRAF, HER2 and MSI status in a large consecutive series of colorectal carcinomas. *Int J Mol Sci*. 2023; 24(5): 4868.-DOI: 10.3390/ijms24054868.
9. Sokolenko A.P., Gorodnova T.V., Bizin I.V., et al. Molecular predictors of the outcome of paclitaxel plus carboplatin neoadjuvant therapy in high-grade serous ovarian cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2021; 88(3): 439-450.-DOI: 10.1007/s00280-021-04301-6.
10. Янус Г.А., Мартыненко А.С., Ершова А.Н., et al. Поиск частых мутаций в гене POLE среди крупной когорты «последовательных» случаев рака толстой кишки: масштаб проблемы. Приложение к журналу «Вопросы онкологии». Тезисы X петербургского международного онкологического форума «Белые ночи 2024» (3–7 июля 2024 г., Санкт-Петербург). 2024; 67-68. [Janus G.A., Martianov A.S., Ershova A.N., et al. The search for frequent mutations in the POLE gene among a large cohort of “consistent” colon cancer cases: the scale of the problem. Appendix to the journal Issues of Oncology. Abstracts of the X St. Petersburg International Oncological Forum “White Nights 2024” (July 3–7, 2024, St. Petersburg). 2024; 67-68 (In Rus)].

Поступила в редакцию / Received / 11.12.2024

Прошла рецензирование / Reviewed / 13.12.2024

Принята к печати / Accepted for publication / 19.12.2024

Сведения об авторах / Author's information / ORCID

Анастасия Николаевна Ершова / Anastasia N. Ershova / ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0003-8043-5265>; SPIN-code: 8269-4643.

Дарья Евгеньевна Мартыненко / Darya E. Martynenko / ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0004-7127-900X>; SPIN-code: 9849-4357.

Григорий Аркадьевич Янус / Grigory A. Yanus / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9844-4536>; SPIN-code: 7502-5907; Author ID (Scopus) 36011349100.

Екатерина Шотовна Кулигина / Ekaterina S. Kuligina / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2396-6540>; Researcher ID (WOS) P-4449-2016; Author ID (Scopus) 6701589979.

Александр Сергеевич Мартянов / Aleksandr S. Martianov / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7690-8328>; SPIN-code: 8627-6407; Researcher ID (WOS) AAV-2949-2021; Author ID (Scopus) 57219310050.

Аглая Геннадиевна Ивлева / Aglaya G. Iyevleva / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5454-5186>; Researcher ID (WOS) P-8305-2016; Author ID (Scopus) 6506417697.

Евгений Николаевич Суспицын / Evgeny N. Suspitsin / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9764-2090>; Researcher ID (WOS) P-9775-2016; Author ID (Scopus) 6603370186.

Светлана Николаевна Алексахина / Svetlana N. Aleksakhina / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2149-7728>; SPIN-code: 6898-4687; Researcher ID (WOS) B-2136-2013; Author ID (Scopus) 56003023200.

Евгений Наумович Имянитов / Evgeny N. Imyanitov / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4529-7891>, SPIN-code (RSCI) 1909-7323, Author ID (Scopus).

