



А.П. Соколенко^{1,2}, Р.В. Бройде³, В.И. Ни¹, Т.Н. Соколова¹, Т.В. Городнова¹,
Е.Л. Савоневич⁴, Р.С. Мулкиджан¹, Е.Ш. Кулигина¹, Е.Н. Имянитов^{1,2}

Поиск новых генов наследственного рака яичника посредством полноэкзомного анализа пациенток, продемонстрировавших выраженный ответ на платиносодержащую терапию

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург
²ФГБОУ ВО СПбГПМУ Минздрава России, Санкт-Петербург
³ГБУЗ «СПб КНПЦСВМП(о) имени Н.П. Напалкова», Санкт-Петербург
⁴УО «Гродненский государственный медицинский университет», г. Гродно

A.P. Sokolenko^{1,2}, R.V. Broyde³, V.I. Ni¹, T.N. Sokolova¹, T.V. Gorodnova¹, E.L. Savonevich⁴,
R.S. Mulkidjan¹, E.Sh. Kuligina¹, E.N. Imyanitov^{1,2}

Search for Novel Hereditary Ovarian Cancer Susceptibility Genes through Whole-Exome Sequencing of Responders to Platinum-Based Therapy

¹N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, St. Petersburg, the Russian Federation
²St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, the Russian Federation
³Napalkov State Budgetary Healthcare Institution «Saint-Petersburg clinical scientific and practical center for specialised types of medical care (oncological)», St. Petersburg, the Russian Federation
⁴Grodno State Medical University, Grodno, the Russian Federation

Введение. Данные клинических наблюдений свидетельствуют, что опухоли яичника и некоторые другие разновидности карцином демонстрируют выраженный ответ на производные платины или схожие препараты, если у пациентки есть наследственные мутации *BRCA1/2* или других генов ДНК-репарации. Изучение *BRCA1/2*-негативных раков яичника (РЯ), которые продемонстрировали хороший ответ на платиносодержащую терапию, представляется перспективным подходом к поиску новых генов наследственного рака.

Цель. Поиск новых генетических детерминант РЯ в коллекции случаев, сформированной на основе сведений о клинической эффективности первичного лечения.

Материалы и методы. Образцы ДНК 123 пациенток с продолжительной клинической ремиссией были подвергнуты трехэтапному анализу: 1) тестирование распространенных мутаций *BRCA1/2*; 2) таргетное секвенирование генов, ассоциированных с наследственными раками (*ATM, BLM, BRCA1, BRCA2, CDH1, CHEK2, MLH1, MRE11A, MSH2, MSH6, MUTYH, NBN, NF1, NF2, PALB2, PMS2, POLD1, POLE, PTCH1, PTEN, RAD51C, RAD51D, RB1, TP53, TSC1, TSC2, WRN*) 3) полноэкзомное секвенирование.

Результаты. В группе 123 РЯ был обнаружен 41 (33 %) случай носительства мутаций *BRCA1/2* и семь случаев носительства патогенных вариантов *ATM, BLM, NBN* (n = 3), *PALB2* и *RAD51D*. По результатам полноэкзомного анализа отобрано 12 генов, в которых были обнаружены инактивирующие варианты и продукты которых вовлечены в различные аспекты канцерогенеза: *AEN, ATF5, BRIP1, CEBPA, FANCM, GREB1, GRWD1, P4HTM, POLA2, RAD50, RAD54B, STK36*. У пациенток, носительниц инактивирующих ва-

Introduction. Clinical data have shown that mutations in *BRCA1/2* and other DNA repair genes confer a high sensitivity of ovarian tumors and certain other types of carcinomas to platinum or similar drugs. Analysis of *BRCA1/2*-negative ovarian cancers (OCs) that have shown a good response to platinum-based therapy appears to be a promising approach in the search for novel hereditary cancer genes.

Aim. To search for novel genetic OC determinants by analyzing clinical cases of successful primary treatment.

Materials and Methods. DNA samples from 123 patients with prolonged clinical remission were subjected to a three-stage analysis: 1) analysis of common pathogenic *BRCA1/2* alleles; 2) targeted sequencing of other hereditary cancer genes (*ATM, BLM, BRCA1, BRCA2, CDH1, CHEK2, MLH1, MRE11A, MSH2, MSH6, MUTYH, NBN, NF1, NF2, PALB2, PMS2, POLD1, POLE, PTCH1, PTEN, RAD51C, RAD51D, RB1, TP53, TSC1, TSC2, WRN*); 3) whole exome sequencing (WES).

Results. There were 41 (33 %) *BRCA1/2* mutation carriers and seven patients carrying pathogenic variants in other hereditary cancer genes: *ATM, BLM, NBN* (n = 3), *PALB2*, and *RAD51D*.

Based on whole exome analysis, 12 genes with putative loss-of-function variants were selected: *AEN, ATF5, BRIP1, CEBPA, FANCM, GREB1, GRWD1, P4HTM, POLA2, RAD50, RAD54B, STK36*. Loss of heterozygosity at the corresponding gene locus was observed in the tumor tissue of carriers of

риантов в генах *ATF5* и *P4HTM*, в опухоли наблюдалась потеря гетерозиготности в локусе соответствующего гена. Исследование дополнительной когорты последовательных диагностических РЯ ($n = 107$) позволило идентифицировать еще три инактивирующих варианта в отобранных генах-кандидатах — *ATF5*, *BRIP1* и *FANCM*.

Заключение. Пациенты с хорошим ответом на платиносодержащую терапию представляют собой перспективную категорию для поиска новых генов, ассоциированных с наследственным РЯ.

Ключевые слова: бесплатиновый интервал; мутация; платиносодержащая терапия; полноэкзомное секвенирование; рак яичника

Для цитирования: Соколенко А.П., Бройде Р.В., Ни В.И., Соколова Т.Н., Городнова Т.В., Савоневич Е.Л., Мулкиджан Р.С., Кулигина Е.Ш., Имянитов Е.Н. Поиск новых генов наследственного рака яичника посредством полноэкзомного анализа пациенток, продемонстрировавших выраженный ответ на платиносодержащую терапию. Вопросы онкологии. 2023;69(4):676-683. doi: 10.37469/0507-3758-2023-69-4-676-683

inactivating variants in *ATF5* and *P4HTM*. In the additional cohort of consecutive diagnostic OCs ($n = 107$), three more cases with putative inactivating variants in *ATF5*, *BRIP1*, and *FANCM* were identified.

Conclusion. Patients who exhibit a good response to platinum-based therapy represent a promising group for identifying hereditary OC susceptibility genes.

Keywords: platinum-free interval; mutation; platinum-based therapy; whole exome sequencing; ovarian cancer

For citation: Sokolenko AP, Broyde RV, Ni VI, Sokolova TN, Gorodnova TV, Savonevich EL, Mulkidjan RS, Kuligina ESh, Imyanitov EN. Search for novel hereditary ovarian cancer susceptibility genes through whole-exome sequencing of responders to platinum-based therapy. *Voprosy Onkologii*. 2023;69(4):676-683. (In Russ.). doi: 10.37469/0507-3758-2023-69-4-676-683

Введение

Рак яичника (РЯ) является одним из самых неблагоприятных онкологических заболеваний. По данным Международного агентства по изучению рака (IACR, <http://gco.iarc.fr/>), в большинстве индустриальных стран мира РЯ имеет самые высокие показатели смертности среди опухолей женской репродуктивной системы — летальность в течение года после постановки диагноза составляет более 30 % [1]. При этом РЯ занимает восьмое место в общей структуре онкологической заболеваемости у женщин [World Cancer Research Fund International, дата обращения: 08.02.2023]. Как правило, РЯ развивается бессимптомно и поэтому часто диагностируется на поздних, зачастую некурабельных, стадиях. Идентификация женщин, имеющих высокую предрасположенность к РЯ, позволяет персонализировать мероприятия по ранней диагностике и профилактике данного заболевания.

Примерно 6–10 % спорадических РЯ и около 46 % РЯ с семейной историей рака молочной железы (РМЖ) или яичника связаны с носительством патогенных мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* [2]. В последние годы список генов наследственного рака молочной железы и яичника (Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome — HBOC) удалось существенно расширить благодаря успехам высокопроизводительного секвенирования (NGS, next-generation sequencing). Почти все известные на сегодня гены наследственного РЯ так или иначе вовлечены в систему репарации повреждений ДНК: *RAD51C*, *RAD51D*, *PALB2*, *BRIP1*, *MSH2*, *MLH1*, *PMS2*, *MSH6*, *ATM* [3-9]. На долю вновь открытых мутаций приходится в совокупности еще примерно 8–10 % наследственных случаев заболевания [3].

Многие разновидности наследственных карцином характеризуются исключительно выра-

женным ответом на лекарственную терапию из-за особенностей молекулярного патогенеза. Опухоли, возникающие у гетерозиготных носителей мутаций в генах репарации ДНК, как правило, инициируются соматической инактивацией оставшегося «нормального» аллеля вовлеченного гена. В результате появляется уникальное терапевтическое окно: в то время как нормальные клетки организма сохраняют способность поддерживать целостность генома, опухолевые клетки отличаются утратой одного из модулей репарации ДНК. Это делает их уязвимыми для ряда цитотоксических препаратов (цисплатин, доксорубин и т. д.), а также для ингибиторов PARP (poly ADP-ribose polymerase inhibitors, PARPi) [6, 10-14]. Примечательно, что изучение пациентов с раком предстательной железы, которые проходили терапию ингибитором PARP, выявило присутствие наследственной мутации в одном из генов репарации ДНК практически у каждого пациента, ответившего на лечение [15]. Сходные результаты были получены при анализе 13 генов гомологичной рекомбинации у больных РЯ, получавших платиносодержащие препараты [16].

Таким образом, изучение BRCA-негативных пациенток с РЯ, которые продемонстрировали необычно выраженный ответ на химиотерапию, может привести к идентификации новых генов наследственного рака. Данное исследование направлено на поиск новых генетических детерминант РЯ с использованием особой когорты пациенток — больных с объективным ответом на первую линию химиотерапии и(или) длительным периодом клинической ремиссии.

Материалы и методы

Коллекция РЯ с выраженным ответом на платиносодержащую терапию. Отбор пациенток в исследование осуществлялся на основании следующих критериев:

1) стадия FIGO IIА-IV; 2) длительность бесплатинового интервала (PFI, platinum-free interval) — времени от завершения первичного лечения (даты последнего цикла адъювантной химиотерапии) до прогрессирования — более 12 мес.; 3) доступность образца крови и/или опухолевой ткани; 4) информированное согласие пациента на проведение молекулярно-генетического исследования; 5) верифицированный морфологический диагноз серозной карциномы высокой степени злокачественности. Основная часть коллекции была сформирована на базе ГБУЗ «СПб КНпЦСВМП(о) имени Н.П. Напалкова» (n = 85), кроме того, часть образцов была отобрана из архива ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (n = 21) и Университетской клиники г. Гродно (n = 17). Клиническое описание представлено в табл. 1. Итоговая серия включала 70 пациенток с первичной циторедуктивной операцией и последующей адъювантной платиносодержащей терапией и 53 пациентки, которые получали системную предоперационную (неoadъювантную) терапию с последующим выполнением интервальной циторедукции. Мы включили в исследование пациенток с различным объемом циторедукции (как полной, так и неполной), основываясь на предположении, что чувствительные к лекарственной терапии опухолевые массы, которые не были удалены при оперативном вмешательстве, должны элиминироваться в ходе адъювантной терапии. Более того, случаи с неоптимальной циторедукцией и длительным бесплатиновым интервалом в контексте данного проекта являются наиболее демонстративными. Медиана бесплатинового интервала в отобранной группе составила 32 мес. (95 % CI 24,4–40,1).

Все пациентки, включенные в исследование, предоставили информированное согласие на проведение молекулярно-генетического тестирования. Исследование одобрено Комитетом по этике ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (протокол № 1 от 23.01.2020).

Дизайн исследования. Образцы ДНК из лимфоцитов периферической крови 123 пациенток с длительным PFI были подвергнуты молекулярно-генетическому исследованию, которое включало несколько этапов: 1) тестирование наиболее распространенных в Российской Федерации мутаций *BRCA1* и *BRCA2* [*BRCA1* c.5266dupC [5382insC], c.4034delA [4153delA], c.68_69delAG [185delAG], c.181T>G [C61G], c.1961delA [2080delA], c.3700_3704delGTAAA [3819del5], c.3756_3759delGTCT [3875del4], c.5117G>A [G1706E], *BRCA2* c.5946delT [6174delT]; 2) таргетное секвенирование случаев РЯ, которые оказались негативны в отношении «повторяющихся» мутаций *BRCA1* и *BRCA2*, с использованием панели известных генов, ассоциированных с наследственными опухолевыми синдромами (*ATM*, *BLM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CDH1*, *CHEK2*, *MLH1*, *MRE11A*, *MSH2*, *MSH6*, *MUTYH*, *NBN*, *NF1*, *NF2*, *PALB2*, *PMS2*, *POLD1*, *POLE*, *PTCH1*, *PTEN*, *RAD51C*, *RAD51D*, *RB1*, *TP53*, *TSC1*, *TSC2*, *WRN*); 3) полноэкзомное секвенирование наиболее демонстративных случаев, в которых не было найдено патогенных мутаций на предыдущих этапах анализа (рис. 1).

Молекулярно-генетический анализ. Тестирование повторяющихся мутаций выполнялось с использованием аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени как описано в [17]. Остальные этапы молекулярно-генетического исследования — методом массивного параллельного секвенирования. Для пробоподготовки был использован протокол КараHyperPlus (Roche) [https://sequencing.roche.com/en/products-solutions/products/sample-preparation/dna-reagents/library-preparation/kara-hyperprep/resources.html]. Обогащение библиотек ДНК по целевым последовательностям (таргетные пользовательские панели КараHyperChoice или КАРА HyperExome Probes) выполняли с применением биотинилированных зондов Roche в соответствии с рекомендациями производителя. Библиотеки секвенировали

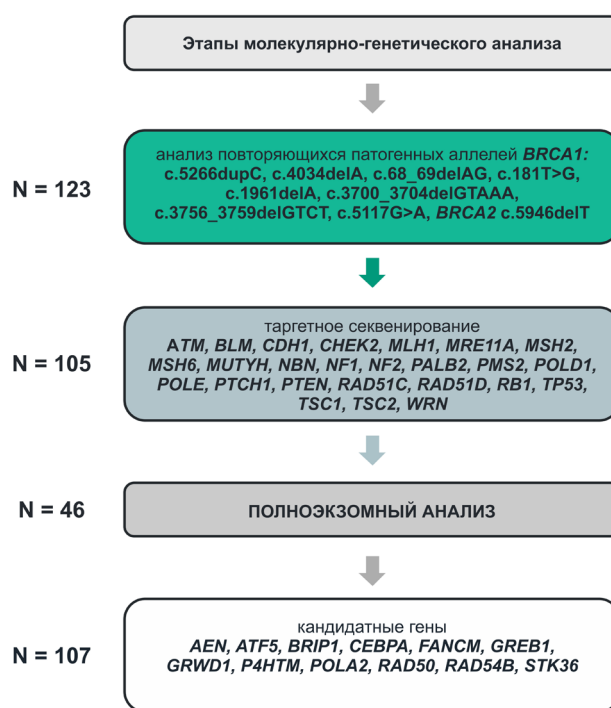


Рис. 1. Схема исследования

в режиме парных прочтений по 150 п.о. на секвенаторе NextSeq 500 с использованием реагентов High Output Kit v2.5 (300 Cycles) со средней глубиной покрытия не менее 100X. Анализ кодирующих последовательностей известных генов, ассоциированных с наследственными мутациями, а также анализ потенциальных кандидатных генов выполнялся с использованием пользовательских наборов зондов, разработанных с помощью ресурса HyperDesign [https://hyperdesign.com/#/].

Для обработки первичных данных высокопроизводительного секвенирования использовали стандартный алгоритм на основе инструментария GATK4 [https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us/articles/360035535932-Germlineshort-variant-discovery-SNPs-Indels-], предназначенный для идентификации герминальных сиквенсных вариантов — однонуклеотидных замен и микроделеций/инсерций. При анализе экзотов файлы VCF были использованы для создания локальной объединенной базы образцов, содержащей отобранные сиквенсные варианты. Варианты с низкой глубиной покрытия (менее 10X) и варианты, которые были классифицированы как LOW IMPACT или MODIFIER в соответствии с аннотацией SnpEff [http://pcingola.github.io/SnpEff/se_introduction/], были отфильтрованы. Для каждого из сиквенсных вариантов были учтены следующие сведения: эффект на структуру и функцию кодируемого продукта (impact) по классификации SnpEff, идентификатор dbSNP, аннотация по данным базы ClinVar [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/], сведения из базы InterPro [https://www.ebi.ac.uk/interpro/], частоты аллеля в популяционных базах (Genome Aggregation Database, GnomAD), а также сравнение частот аллелей в базах образцов, полученных от онкологических больных и неонкологических контролей.

При анализе экзотов для дальнейшего расширенного исследования были отобраны гены, в которых обнаруживались варианты со значимым влиянием на функцию белка (HIGH-impact): сдвиг рамки считывания (frameshift), нонсенс (stop_gained), утрата старт-кодона (start_lost), нуклеотидные замены и делеции/инсерции, затрагивающие сайт сплайсинга (essential_splice_site). Затем перечень из более чем 3 000 сиквенсных вариантов был подвергнут

Таблица 1. Клиническая характеристика пациенток с PFI >12 месяцев, отобранных в исследование

	N = 123
Возраст (диапазон)	56.5 (32-78)
Стадия FIGO	
IIA-IIIC	13 (10.6 %)
IIIA-IIIC	80 (65.0 %)
IV	30 (24.4 %)
Циторедукция	
первичная	70 (56.9 %)
интервальная	53 (43.1 %)
Объем циторедукции	
полная	58 (47.2 %)
неполная оптимальная	34 (27.6 %)
неполная субоптимальная	31 (25.2 %)
Схемы НАПХТ	
ТСьР/ТР	46 (86.8 %)
СР/ССьР	4 (7.5 %)
СьР	2 (3.8 %)
САР	1 (1.9 %)
Клинический ответ	
Полный ответ	7 (13.2 %)
Частичный ответ	30 (56.6 %)
Стабилизация	15 (28.3 %)
Нет данных	1 (1.9 %)
Схемы АПХТ	
ТСьР/ТР	89 (72.4 %)
СР/ССьР	18 (14.6 %)
СьР	9 (7.3 %)
САР	3 (2.4 %)
Другие	2 (1.6 %)
Не было	2 (1.6 %)
Рецидив	
да	76 (62 %)
нет	47 (38 %)
Медиана PFI, месяцы	
НАПХТ	34.9 (95 % CI 23.2-46.6)
Первичная циторедукция	32.3 (95 % CI 25.8-38.8)
Общая	32.3 (95 % CI 24.4-40.1)

Сокращения: АПХТ — адьювантная полихимиотерапия; НАПХТ — неоадьювантная полихимиотерапия; САР — циклофосфамид + антрациклин + платина; СьР — карбоплатин; СР/ССьР — циклофосфамид и платина (цисплатин или карбоплатин); PFI — бесплатиновый интервал; ТСьР/ТР — паклитаксел + платина (карбоплатин или цисплатин)

дальнейшей фильтрации: 1) исходя из ожидаемой частоты кандидатных мутаций, мы выбрали только те варианты, которые встретились в нашей выборке не более 2 раз; 2) качество секвенирования (QS) варианта не менее 1 000; 3) частотные фильтры: AF_рормах < 0.01 и не более 1 гомозиготы в базе GnomAD. Таким образом, был сформирован предварительный список из 274 кандидатных вариантов, который далее курировался с учетом данных о функции гена, а именно способности опосредовать какой-либо из ключевых признаков злокачественных опухолей («hallmarks of cancer»). Первоочередное внимание уделялось генам,

вовлеченным в репарацию ДНК: нарушение именно этой функции лежит в основе сверхчувствительности ряда опухолей к ДНК-повреждающим агентам. В результате был сформирован итоговый список из 12 кандидатных генов. К кодирующим последовательностям этих генов были подобраны олигонуклеотидные пробы, и сформирована пользовательская панель для анализа дополнительной коллекции последовательного (неселективного) РЯ.

В 7 из 12 случаев с патогенными вариантами в отобранных генах для полноэкзомного секвенирования была доступна опухолевая ткань. Образцы ДНК из архивного

гистологического материала были протестированы на предмет потери гетерозиготности (loss-of-heterozygosity, LOH) в локусе кандидатного гена. Кроме того, было проанализировано, характерна ли для конкретной опухоли хромосомной нестабильность, в т. ч. по типу дефицита гомологичной рекомбинации (homologous recombination deficiency, HRD). Процедура подготовки библиотек ДНК из архивных образцов опухолевых тканей, а также анализ профилей хромосомной нестабильности выполнялся, как описано ранее [18].

Статистический анализ. Для сравнения частот аллелей и расчета отношения рисков (OR) был использован метод хи-квадрат Пирсона. Медианы бесплатинового интервала оценивались с использованием процедуры Каплана-Мейера.

Результаты

Анализ мутаций в известных генах, ассоциированных с наследственными опухолевыми синдромами. У 18 из 123 пациенток были обнаружены повторяющиеся мутации *BRCA1/2*: *BRCA1* 5382insC (n = 12), 4153delA (n = 2), 2080delA (n = 1), C61G (n = 1), G1706E (n = 1), *BRCA2* 6174delT (n = 1). 105 случаев, негативных в отношении частых патогенных аллелей, были далее подвергнуты таргетному секвенированию. Редкие патогенные аллели *BRCA1* и *BRCA2* были выявлены у 11 (10,5 %) и 12 (11,4 %)

Таблица 2. Перечень кандидатных генов для расширенного эпидемиологического исследования, отобранных при анализе экзомов *BRCA1/2*-негативных пациенток с выраженным ответом на платиносодержащую терапию

Ген	Описание	pLoF варианты, обнаруженные в экзомах РЯ	Частота варианта в GnomAD	Патогенность (критерии)*	Клинические и молекулярные особенности	Суммарная частота pLoF в GnomAD (non-cancer) v.3.1.2	Суммарная частота pLoF в GnomAD (cancer) v.3.1.2	OR**
AEN	apoptosis-enhancing nuclease	p.Arg123* [rs147393409]	2.79065e-05	Вариант неопределенного значения (PP3)	PFI > 40 месяцев после субоптимальной циторедукции	0.057%	0.09%	1.66 (0.4-2.5), p = 0.4863
ATF5	activating transcription factor 5	p.Arg207* [rs141045405]	9.09638e-05	Вариант неопределенного значения (PP3)	PFI > 16 месяцев; высокий HRD score (59), LOH	0.05%	0.14%	2.95 (0.9-9.6), p = 0.07
BRIP1	BRCA1 interacting helicase 1	p.Ile504fs [rs775735278]	-	Патогенный вариант (PVS1, PP3, PP4)	PFI > 13 месяцев; низкий HRD score (37), нет LOH	0.13%	0.23%	1.85 (0.75-4.6), p = 0.18
CEBPA	CCAAT enhancer binding protein alpha	p.Arg24* [rs1027280601]	7.71551e-05	Вариант неопределенного значения (PP3)	PFI > 48 месяцев	0.003%	0	NA
FANCM	FA complementation group M	p.Arg658* [rs368728266]	9.07885e-05	Вариант неопределенного значения (PVS1, PP3)	PFI > 28 месяцев; низкий HRD score (35), нет LOH	0.27%	0.28%	1.03 (0.46-2.3), p = 0.95
GREB1	growth regulating estrogen receptor binding 1	p.Gln747* [rs766653116]	-	Вариант неопределенного значения (PP3)	PFI > 16 месяцев; низкий HRD score (35), нет LOH	0.07%	0	NA
GRWD1	glutamate rich WD domain containing	p.Asn153fs [rs755338359]	-	Вариант неопределенного значения (PP3)	Полный клинический ответ после НАПХТ; PFI > 24 месяцев	0.06%	0.095%	1.6 (0.4-6.7), p = 0.505
P4HTM	prolyl 4-hydroxylase, transmembrane	p.Gln378fs	-	Вариант неопределенного значения (PP3)	PFI > 46 месяцев; высокий HRD score (54), LOH	0.03%	0	NA
POLA2	DNA polymerase alpha 2, accessory subunit	p.Arg217* [rs763436090]	-	Вариант неопределенного значения (PP3)	PFI > 24 месяцев	0.06%	0.047%	0.7 (0.1-5.4), p = 0.766
RAD50	RAD50 double strand break repair protein	c.756+2T>C [rs764122619]	-	Вариант неопределенного значения (PVS1, PP3)	Частичный клинический ответ после НАПХТ, PFI 18 месяцев	0.4	0.235%	0.6 (0.25-1.5), p = 0.267
RAD54B	RAD54 homolog B	p.Cys592fs [rs1189353686]	-	Вариант неопределенного значения (PP3)	PFI > 48 месяцев; высокий HRD score (46), нет LOH	0.32%	0.189%	0.5 (0.2-1.6), p = 0.29
STK36	serine/threonine kinase 36	p.Arg175* [rs753011053]	1.39678e-05	Вариант неопределенного значения (PP3)	PFI > 16 месяцев; высокий HRD score (59), нет LOH	0.196%	0.14%	0.7 (0.23-2.3), p = 0.6

Обозначения: HRD — дефицит гомологичной рекомбинации; GnomAD — Genome Aggregation Database; LOH — потеря гетерозиготности; OR — отношение рисков; PFI — бесплатиновый интервал; pLoF (putative loss-of-function) — потенциально инактивирующий вариант

*Патогенность варианта определена с использованием ресурса InterVar [https://wintervar.wglab.org/results.php]; PP3 — патогенность варианта подтверждается данными предсказания in silico; PVS1 — LoF-вариант в гене, инактивирующие варианты которого ассоциированы с заболеванием

**Расчет отношения рисков выполнен на основании суммарных частот pLoF-вариантов в каждом гене в группах онкологически-здоровых индивидуумов (non-cancer) и пациентов с онкологическими заболеваниями (cancer)

пациенток соответственно. Таким образом, общая частота мутаций *BRCA1/BRCA2* в исследованной группе составила 41/123 (33 %). При таргетном анализе было выявлено еще семь случаев с мутациями в других генах репарации ДНК: *ATM* DupEx62+63, *NBN* 657del5 ($n = 2$), *NBN* R215W, *PALB2* c.172_175del, *RAD51D* Y47X, *BLM* c.2207_2212delATCTGAinsTAGATTC.

Полноэкзомный анализ. Образцы неопухоловой ДНК 46 пациенток были подвергнуты полноэкзомному секвенированию. На основании результатов полноэкзомного анализа и описанных выше этапов приоритизации сиквенсных вариантов было отобрано 12 генов, в которых были обнаружены потенциально патогенные транквирующие варианты и продукты которых функционально вовлечены в различные аспекты канцерогенеза: *AEN*, *ATF5*, *BRIP1*, *CEBPA*, *FANCM*, *GREB1*, *GRWD1*, *P4HMT*, *POLA2*, *RAD50*, *RAD54B*, *STK36*. Мы сравнили суммарную частоту носительства инактивирующих вариантов (putative loss-of-function, pLoF) для каждого из 12 генов в базе GnomAD v.3.1.2 [<https://gnomad.broadinstitute.org/>] у онкологически-здоровых индивидуумов ($n = 73982$) и онкологических больных ($n = 2125$) (табл. 2). Наибольшая величина отношения рисков (OR) в GnomAD была показана для гена *ATF5* (частоты pLoF в когортах онкологически-здоровых индивидуумов и пациентов с онкологическими заболеваниями составляют 0,05 % и 0,14 % соответственно; OR = 2,95, 95 % CI 0,9-9,6, $p = 0,07$). Однако следует подчеркнуть, что подобный анализ является предварительной оценкой значения гена в онкологической предрасположенности, т. к. не учитывает тип (локализацию) онкологического заболевания и не ограничен конкретной популяцией. Для нескольких пациенток — носительниц транквирующих вариантов в перечисленных генах были доступны образцы опухолевых тканей ($n = 7$), которые также были подвергнуты полноэкзомному секвенированию. Это позволило выполнить локус-специфический анализ потери гетерозиготности, а также оценить уровень хромосомной нестабильности (табл. 2). В частности, ЛОН в локусе соответствующего гена была обнаружена в образцах пациенток с мутациями *ATF5* и *P4HMT* и не обнаружена в карциномах носителей *BRIP1*, *FANCM*, *GREB1*, *STK36*, *RAD54B*. Высокий HRD score (более 42 в соответствии с методикой, предложенной [19]) наблюдался у пациенток с потенциально патогенными вариантами в генах *ATF5*, *P4HMT* и *STK36*.

Таргетный анализ кандидатных генов. Отобранные по результатам полноэкзомного анализа гены были объединены в пользовательскую панель для таргетного секвенирования. Мето-

дом NGS было проанализировано дополнительное количество последовательных случаев РЯ ($n = 107$) из диагностического пула лаборатории молекулярной онкологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова, негативных в отношении носительства патогенных аллелей *BRCA1/2*. Так было обнаружено еще 3 случая носительства потенциально патогенных сиквенсных вариантов: *ATF5* p.Ter283Glnext*?, *BRIP1* c.2992_2993delAA [p.Lys998fs], *FANCM* c.691G>T [p.Glu231*]. Мутация *BRIP1* была обнаружена у пациентки с ранним началом заболевания; у нее также наблюдался длительный бесплатиновый интервал (более 100 мес.) после первичного лечения. Нонсенс-вариант *FANCM* был выявлен у молодой пациентки до 30 лет. Утрата стоп-кодона в гене *ATF5* также была обнаружена у пациентки с ранним началом заболевания.

Обсуждение

В работе впервые представлен подход к идентификации новых генетических детерминант РЯ, основанный на исследовании специфической группы случаев — пациенток с хорошим ответом на первичное лечение, а именно больных с длительной клинической ремиссией. Высокая частота мутаций *BRCA1/2* (33%), выявленных нами в данной серии РЯ, указывает, что подобный подход по меньшей мере не уступает методикам отбора случаев, основанных на семейном анамнезе и других «классических» признаках наследственного рака. Для сравнения, ранее нами были представлены результаты анализа частоты и спектра мутаций *BRCA1* и *BRCA2* в «диагностической» когорте серозных РЯ [20]; у пациенток Северо-Запада России редкие аллели *BRCA1* и *BRCA2* обнаруживались у 6,6 % [31/472; $p = 0,21$] и 4 % [19/472; $p = 0,005$] больных соответственно. Достоверно более высокая частота мутаций *BRCA2* в этой серии РЯ, по сравнению с упомянутыми данными исследования последовательных диагностических РЯ, также может представлять определённый интерес для дальнейшего изучения. При анализе известных генов наследственных опухолевых синдромов в нашей серии были обнаружены мутации *ATM*, *NBN*, *PALB2*, *RAD51D*, *BLM*. Повреждения этих генов ассоциированы примерно с двух-четырёхкратным увеличением риска развития РЯ [3].

Анализ экзомов пациенток, у которых были исключены повреждения *BRCA1/BRCA2* и перечисленных выше других генов репарации ДНК, позволил отобрать еще 12 потенциальных кандидатов для последующего изучения у российских пациенток. В частности, наибольший интерес с точки зрения функции представляет *POLA2*.

Этот ген кодирует регуляторную субъединицу ДНК-полимеразы альфа; в POLA2-дефицитных клетках наблюдается накопление двуниевых разрывов ДНК и повышенная чувствительность к этопозиду, нирапарибу (ингибитор PARP1) и ионизирующему излучению [21].

Анализ дополнительной когорты последовательных РЯ без мутаций *BRCA1/2* ($n = 107$) позволил выявить еще три патогенных варианта в генах *ATF5*, *BRIP1* и *FANCM*. *BRIP1* — известный ген, ассоциированный с наследственным РЯ [22]; однако его вклад в предрасположенность к РЯ и спектр мутации в российской популяции ранее не изучался. Мутации в гене *FANCM*, кодирующем еще один белок группы комплементации анемии Фанкони, ассоциированы с увеличением риска развития трижды-негативного рака молочной железы [23]. Сообщений об ассоциации наследственных повреждений в этом гене с риском РЯ на сегодня нет, поэтому данные настоящего исследования могут свидетельствовать о целесообразности дальнейшего анализа транскрипционных вариантов *FANCM* в дополнительных коллекциях образцов. В отличие от *BRIP1* и *FANCM*, вовлеченность которых в формирование онкологической предрасположенности в той или иной степени продемонстрирована, фенотип пациентов с повреждениями еще одного кандидатного гена, *ATF5*, пока не описан. *ATF5* — это транскрипционный фактор, который участвует в клеточном ответе на нарушение функции митохондрий, т.н. ответе на неправильный фолдинг митохондриальных белков (mitochondrial unfolded protein response) [24]. Известные на сегодня данные о функции *ATF5* скорее свидетельствуют о его протоонкогенной роли [25]. Вместе с тем, показано, что ингибирование функции *ATF5* в экспериментах *in vitro* и ксенографтах сопровождается апоптозом опухолевых клеток с приобретенной лекарственной устойчивостью [26]. Таким образом, можно предположить, что мутации, приводящие к потере функции *ATF5*, могут быть ассоциированы с большей чувствительностью к ряду противоопухолевых препаратов.

Заключение

Использование нестандартных критериев отбора больных, в частности на основании сведений о клинической эффективности терапии, представляется перспективным подходом к поиску новых генетических детерминант злокачественных новообразований. В данном исследовании анализ ограниченной серии пациенток позволил выявить несколько заслуживающих дальнейшего изучения у российских пациенток кандидатных генов РЯ.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование

Работа поддержана грантом РФФИ [20-515-12009].

Участие авторов

Соколенко А.П. — разработка концепции научной работы, получение и анализ данных, составление черновика рукописи;

Бройде Р.В. — получение и анализ данных;

Ни В.И. — получение данных;

Соколова Т.Н. — получение данных;

Городнова Т.В. — получение данных;

Савоневич Е.Л. — получение данных;

Мулкиджан Р.С. — получение данных;

Кулигина Е.Ш. — получение данных;

Имянитов Е.Н. — разработка концепции научной работы, критический пересмотр рукописи с внесением ценного интеллектуального содержания.

ЛИТЕРАТУРА

- Howlader N, Noone AM, Krapcho M, et al. SEER cancer statistics review, 1975–2012. Bethesda, MD: National Cancer Institute. 2015.
- Kast K, Rhiem K, Wappenschmidt B, et al. Prevalence of BRCA1/2 germline mutations in 21 401 families with breast and ovarian cancer. *J Med Genet.* 2016;53(7):465-471. doi:10.1136/jmedgenet-2015-103672.
- Subramanian DN, Zethoven M, McInerney S, et al. Exome sequencing of familial high-grade serous ovarian carcinoma reveals heterogeneity for rare candidate susceptibility genes. *Nature Communications.* 2020;11(1). doi:10.1038/s41467-020-15461-z.
- Yang X, Leslie G, Doroszkuk A, et al. Cancer risks associated with germline PALB2 pathogenic variants: an international study of 524 families. *J Clin Oncol.* 2020;38(7):674-685. doi:10.1200/JCO.19.01907.
- Song H, Cicek MS, Dicks E, et al. The contribution of deleterious germline mutations in BRCA1, BRCA2 and the mismatch repair genes to ovarian cancer in the population. *Hum Mol Genet.* 2014;23(17):4703-4709. doi:10.1093/hmg/ddu172.
- Loveday C, Turnbull C, Ruark E, et al. Germline RAD51C mutations confer susceptibility to ovarian cancer. *Nat Genet.* 2012;44(5):475-6; author reply 476. doi:10.1038/ng.2224.
- Rafnar T, Gudbjartsson DF, Sulem P, et al. Mutations in BRIP1 confer high risk of ovarian cancer. *Nat Genet.* 2011;43(11):1104-1107. doi:10.1038/ng.955.
- Walsh T, Casadei S, Lee MK, et al. Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(44):18032-18037. doi:10.1073/pnas.1115052108.
- Meindl A, Hellebrand H, Wiek C, et al. Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. *Nat Genet.* 2010;42(5):410-414. doi:10.1038/ng.569.

10. Gorodnova TV, Kotiv KB, Ivantsov AO, et al. Efficacy of Neoadjuvant Therapy With Cisplatin Plus Mitomycin C in BRCA1-Mutated Ovarian Cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2018;28(8):1498-1506. doi: 10.1097/IGC.0000000000001352.
11. De Picciotto N, Cacheux W, Roth A, et al. Ovarian cancer: Status of homologous recombination pathway as a predictor of drug response. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016;101:50-59. doi:10.1016/j.critrevonc.2016.02.014.
12. Gorodnova TV, Sokolenko AP, Ivantsov AO, et al. High response rates to neoadjuvant platinum-based therapy in ovarian cancer patients carrying germ-line BRCA mutation. *Cancer Lett*. 2015;369(2):363-367. doi:10.1016/j.canlet.2015.08.028.
13. Alsop K, Fereday S, Meldrum C, et al. BRCA mutation frequency and patterns of treatment response in BRCA mutation-positive women with ovarian cancer: a report from the Australian Ovarian Cancer Study Group. *J Clin Oncol*. 2012;30(21):2654-2663. doi:10.1200/JCO.2011.39.8545.
14. Foulkes WD. BRCA1 and BRCA2: Chemosensitivity, treatment outcomes and prognosis. *Fam Cancer*. 2006;5:135-142. doi:10.1007/s10689-005-2832-5.
15. Mateo J, Carreira S, Sandhu S, et al. DNA-Repair Defects and Olaparib in Metastatic Prostate Cancer. *N Engl J Med*. 2015;373(18):1697-1708. doi:10.1056/NEJMoa1506859.
16. Pennington KP, Walsh T, Harrell MI, et al. Germline and somatic mutations in homologous recombination genes predict platinum response and survival in ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2014;20(3):764-775. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-2287.
17. Sokolenko AP, Rozanov ME, Mitiushkina NV, et al. Founder mutations in early-onset, familial and bilateral breast cancer patients from Russia. *Fam Cancer*. 2007;6(3):281-286. doi:10.1007/s10689-007-9120-5.
18. Sokolenko AP, Gorodnova TV, Bizin IV, 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.
19. Telli ML, Timms KM, Reid J, et al. Homologous recombination deficiency (HRD) score predicts response to platinum-containing neoadjuvant chemotherapy in patients with triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2016;22(15):3764-3773. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2477.
20. 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.
21. Dang TT, Morales JC. Involvement of POLA2 in double strand break repair and genotoxic stress. *Int J Mol Sci*. 2020;21(12):4245. doi:10.3390/ijms21124245.
22. Weber-Lassalle N, Hauke J, Ramser J, et al. BRIP1 loss-of-function mutations confer high risk for familial ovarian cancer, but not familial breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2018;20(1). doi:10.1186/s13058-018-0935-9.
23. Figlioli G, Kvist A, Tham E, et al. The spectrum of FANCM protein truncating variants in european breast cancer cases. *Cancers (Basel)*. 2020;12(2):292. doi:10.3390/cancers12020292.
24. Fiorese CJ, Schulz AM, Lin YF, et al. The transcription factor ATF5 mediates a mammalian mitochondrial UPR. *Curr Biol*. 2016;26(15):2037-2043. doi:10.1016/j.cub.2016.06.002.
25. Nukuda A, Endoh H, Yasuda M, et al. Role of ATF5 in the invasive potential of diverse human cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;3;474(3):509-514. doi:10.1016/j.bbrc.2016.04.131.
26. Karpel-Massler G, Horst BA, Shu C, et al. A synthetic cell-penetrating dominant-negative ATF5 peptide exerts anticancer activity against a broad spectrum of treatment-resistant cancers. *Clin Cancer Res*. 2016;22(18):4698-4711. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2827.

Поступила в редакцию 16.02.2023
 Прошла рецензирование 10.04.2023
 Принята в печать 20.04.2023

Сведения об авторах

*Соколенко Анна Петровна, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6304-1609>, annasokolenko@mail.ru.
 Бройде Роберт Витальевич, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1926-4228>.
 Ни Валерия Игоревна, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2011-2224>.
 Соколова Татьяна Николаевна, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0537-7478>.
 Городнова Татьяна Васильевна, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1719-7498>.
 Савоневич Елена Леонтьевна, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3661-2354>.
 Мулкиджан Римма Сергеевна, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8357-9326>.
 Кулигина Екатерина Шотовна, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2396-6540>.
 Имянитов Евгений Наумович, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4529-7891>.

*Sokolenko Anna Petrovna, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6304-1609>, email: annasokolenko@mail.ru.
 Broyde Robert Vitalievich, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1926-4228>.
 Ni Valeria Igorevna, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2011-2224>.
 Sokolova Tatiana Nikolaevna, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0537-7478>.
 Gorodnova Tatiana Vasilievna, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1719-7498>.
 Savonevich Elena Leontievna, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3661-2354>.
 Mulkidjan Rimma Sergeevna, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8357-9326>.
 Kuligina Ekatherina Shotovna, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2396-6540>.
 Imyanitov Evgeny Naumovich, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4529-7891>.