

К.А. Загороднев^{1,3}, Е.Н. Суспицын^{1,3}, А.П. Соколенко^{1,3}, А.А. Романько^{1,3},
М.О. Анисимова^{1,3}, И.В. Бизин¹, Е.Ш. Кулигина¹, Е.Н. Имянитов^{1,2,3,4}

Использование таргетной мультигенной панели для поиска генетических детерминант наследственного рака молочной железы у российских пациенток

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

²ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург,

³ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России, Санкт-Петербург,

⁴ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург

Понимание молекулярно-генетического патогенеза наследственного ракового синдрома чрезвычайно важно для разработки персональных терапевтических подходов и для увеличения эффективности превентивных мер. На данный момент оптимальным решением для диагностики каузативных мутаций наследственного рака молочной железы (РМЖ) является тестирование таргетных мультигенных панелей с помощью высокопроизводительного секвенирования (NGS). Авторы сформировали NGS-панель из 31 гена, основываясь на их потенциальной причастности к формированию онкологической предрасположенности и встречаемости патогенных аллелей в российской популяции. В эту группу вошли «канонические» гены наследственного РМЖ (*BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *PALB2*, *TP53*, *ATM*, *NBN*), «новые» гены, в которых относительно недавно были идентифицированы каузативные мутации (*BLM*, *FANCD2*, *POLE*, *FANCM*, *RAD51C*, *MRE11A*, *RECQL*), а также некоторые другие гены, вовлеченные в репарацию ДНК, апоптоз и поддержание стабильности генома. Был выполнен скрининг мутаций у 94 пациенток с предположительно наследственным РМЖ неизвестной генетической этиологии, отбор пациенток был произведен согласно критериям соответствия наследственным опухолевым синдромам. Применение таргетной панели позволило с высокой долей уверенности назвать генетическую детерминанту заболевания у 21/94 (22,3%) больных, причем у 19 пациенток причиной заболевания были редкие мутации *BRCA1* и *BRCA2*, не относящиеся к российским «фаундер» мутациям, а в оставшихся двух случаях были

нарушены функции генов *ATM* (p.Glu73fs) и *POLE* (p.Leu1171fs). Данное наблюдение имеет большую клиническую значимость, поскольку является основанием для расширения диагностической панели, нацеленной на мониторинг лиц с повышенным онкологическим риском, и внедрения в клиническую диагностику мультигенного таргетного секвенирования.

Ключевые слова: наследственный рак молочной железы, таргетная мультигенная панель

Введение

10-18% всех случаев рака молочной железы (РМЖ) и яичников (РЯ) развиваются в результате наследственного моногенного дефекта [9]. Самые «знаменитые» и хорошо изученные гены наследственного РМЖ и РЯ — *BRCA1* и *BRCA2* — являются причиной заболевания в 17-25% семейных случаев [14, 23]. Ещё 4-6% наследственной составляющей приходится на долю редких «неканонических» раковых мутаций в генах репарации ДНК с разной степенью пенетрантности — *ATM*, *TP53*, *PALB2*, *PTEN*, *STK11*, *CHEK2*, *BARD1*, *BRIP1*, *CDH1*, *BLM*, *NFI*, *RAD51C* и др. [11, 19]. Успехи широкомасштабных исследований генетических ассоциаций (GWAS) позволили добавить в список около сотни низкопенетрантных предрасполагающих вариантов, совокупный вклад которых объясняет еще 8-10% наследственного риска РМЖ [21, 24]. Таким образом, следует признать, что, несмотря на использование высокопроизводительного секвенирования (NGS), полногеномного скрининга и вовлечение в эксперименты огромных когорт пациентов, генов, аналогичных *BRCA1/2*

по клинической значимости, обнаружить пока не удалось, и у большей доли наследственных случаев РМЖ генетические детерминанты повышенного риска так и остаются неизвестными. Тем не менее, понимание генетической природы наследственного ракового синдрома чрезвычайно важно для разработки персональных терапевтических подходов и для увеличения эффективности превентивных мер, поэтому исследователи не оставляют попыток выявить каузативную наследственную мутацию в каждом конкретном, предположительно наследственном случае, используя современные подходы и ресурсы. Основными клиническими признаками наследственной природы РМЖ и РЯ считают: 1) раннее начало заболевания (<45 лет), 2) билатеральный характер поражения, 3) семейный анамнез, отягощенный раком молочной железы и яичников у родственников первого или второго порядка, 5) трижды-негативный рецепторный статус РМЖ 4) рак молочной железы у мужчин [1].

Долгое время внимание молекулярных диагностов было сконцентрировано только на поиске мутаций в высокопенетрантных генах *BRCA1* и *BRCA2* [23]. Однако в последние годы, в связи с открытием ряда новых «раковых» генов и уде-

шевлением высокопроизводительных методик, концепция генетического тестирования предрасположенности к наследственному раку молочной железы претерпела изменения. В настоящее время оптимальным решением является высокопроизводительное секвенирование так называемых «таргетных мультигенных панелей», которые, по мнению разных исследовательских групп, могут включать от 6 до 35 локусов (Таблица 1) [9, 32, 34]. Сегодня не существует единого мнения относительно состава таргетных диагностических панелей и алгоритма интерпретации обнаруженных вариантов. Так, согласно рекомендациям Национальной онкологической сети США (National Comprehensive Cancer Network) [22] от 30 июля 2018 года, *BRCA1/2*-негативным пациентам с отягощенным анамнезом и соответствующими диагностическими критериями наследственного рака молочной железы рекомендовано мультигенное тестирование, включающее следующие 20 генов: *ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, MSH2, MLH1, MSH6, PMS2, EPCAM, NBN, NF1, PALB2, PTEN, RAD51C, RAD51D, STK11, TP53*. Существуют коммерческие панели для определения мутаций в генах, ассоциированных с раком молочной железы (например, Breast-next, BRCAplus), которые, по

Таблица 1.
Мультигенные панели для таргетного секвенирования случаев наследственных РМЖ с неизвестной генетической детерминантой

Genes	Число генов в панели	Число пациентов	Число «объясненных» случаев/ число патогенных мутаций	Ссылка
<i>BRCA1, BRCA2, CDH1, PTEN, STK11, TP53</i> («BRCAplus»)	6	3000 (США)	172 пациентки (5,7%) с инактивирующими мутациями + 228 (7,6%) с аллельными вариантами неоднозначного значения.	Chong HK et al., 2014 [3]
<i>ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, EPCAM, MLH1, MSH2, MSH6, NBN, PALB2, PMS2, PTEN, RAD51C, RAD51D, STK11, and TP53</i> («Color panel»)	19	300 (США)	26 пациенток (9%) / 28 мутаций	Crawford et al., 2017 [4]
<i>ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, MRE11, MUTYH, NBN, NF1, PALB2, PTEN, RAD50, RAD51C, RAD51D, TP53</i> («BreastNext»)	17	874 (США)	64 пациентки (7,3%) с инактивирующими мутациями + 173 (19,8%) с аллельными вариантами неоднозначного значения.	LaDuca H et al., 2014 [18]
<i>TP53, CDH1, PTEN, ATM, CHEK2, STK11, RAD51C, PALB2, BARD1, BRIP1, NBN, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, EPCAM, RAD51D, APC, MUTYH, CDKN2A, SMAD4, CDK4, BMPR1A, BRCA1, BRCA2</i>	25	1781 (США)	241 пациентка (13,5%) / 246 мутаций	Tung et al., 2016 [35]
<i>ATM, CDH1, CHEK2, NBN, PALB2, RAD51C, RAD51D, TP53</i>	8	5589 (Германия)	339 пациенток (6,1%) / 147 транквирующих мутаций	Hauke et al., 2018 [11]
<i>BRCA1, BRCA2, ATM, CDH1, CHEK2, NBN, PALB2, RAD51C, RAD51D, TP53</i>	10	229 трижды-негативных РМЖ (Германия)	57 пациенток (24,9%) / 57 мутаций	Hoyer et al., 2018 [12]
<i>BRCA1, BRCA2, PALB2, BARD1, BRIP1, RAD51C, RAD51D, RAD50, NBN, MRE11A, ATM, CHEK2, TP53, PTEN, APC, BLM, BMPR1A, CDH1, CDK4, CDKN2A, EPCAM, MEN1, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, PMS2, POLE, PRSS1, RET, SLX4, SMAD4, STK11, VLH, WT1</i>	35	120 (Корея)	9 пациенток (7,5%) / 10 мутаций	Park et al., 2018 [26]

сути, представляют собой компромисс между эффективностью выявления каузативных мутаций и стоимостью выполнения анализа. Входным порогом для включения определённого гена в панель обычно является двукратное повышение риска развития рака молочной железы у носителей мутации, что соответствует характеристикам умеренной пенетрантности [20]. Для сравнения, патогенные мутации в генах *BRCA1/2* связаны, в среднем, с пятикратным повышением риска развития рака молочной железы [9, 17]. Кроме *BRCA1* и *BRCA2*, наиболее часто обнаруживаются наследственные повреждения в генах *CHEK2* (2.5%), *ATM* (1.5%), *PALB2* (1.2%), частота остальных мутаций не превышает, как правило, 0.3% [11, 19]. Примерно 3% пациенток являются носительницами одновременно двух патогенных мутаций [4, 18].

Эффективность панели выражается в количестве «объясненных» случаев РМЖ и обнаруженных патогенных мутаций; этот показатель варьирует от 7% до 25% в зависимости от количества проанализированных генов, критериев отбора пациенток, биоинформатической обработки и строгости интерпретации функциональных последствий альтернативных вариантов [7, 36]. Так, например, применение 10-генной панели у неселектированных пациенток с трижды-негативным РМЖ позволяет определить каузативную мутацию в 25% случаев, и это, пожалуй, один из наилучших результатов (табл. 1) [12].

Расширение панели за счет включения большего числа предрасполагающих генов, к сожалению, не приводит к возрастанию её эффективности, так как мутации в новых локусах, как правило, носят «приватный» характер, т.е. встречаются исключительно редко и, таким образом, не представляют большой клинической ценности. Кроме того, не существуют клинических рекомендаций по ведению пациенток-носительниц «неканонических» раковых мутаций — на сегодняшний день они имеют ценность только в плане оценки онкологического риска у родственников [10, 29]. Тем не менее, следует отметить, что разным популяциям присущи специфические черты, отражающие генетическую архитектуру наследственного риска РМЖ. Так, популяция Северо-Запада России оказалась гомогенной в плане генетического груза, для нее характерен выраженный эффект «основателя» с преобладанием среди семейных РМЖ ограниченного набора рекуррентных патогенных мутаций [2, 31]. Это обстоятельство благоприятно для упрощения и удешевления мониторинга и молекулярной диагностики лиц с высоким онкологическим риском РМЖ и РЯ, поскольку позволяет на прак-

тике ограничиться прицельным анализом всего нескольких позиций (*BRCA1 5382insC*; *BRCA1 4153delA*; *BRCA1 185delAG*; *BRCA2 6174delT*; *CHEK2 1100delC*; *CHEK2 IVS2+1G>A*; *NBS1 657del50*, *BLM c.1642C>T*).

Целью данного исследования было изучение структуры генетической предрасположенности больных наследственным РМЖ, оставшейся за пределами стандартного диагностического теста, рутинно используемого в лаборатории молекулярной онкологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова (Санкт-Петербург). С помощью таргетного секвенирования была проанализирована полная кодирующая последовательность 33 генов, известных своим значительным онкологическим потенциалом в отношении РМЖ, у 94 российских пациенток с клиническими признаками наследственного ракового синдрома.

Материалы и методы

Пациентки

В исследование были включены 94 пациентки с РМЖ, проходившие лечение в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова (Санкт-Петербург) с 2015 по 2017 гг. Возраст больных варьировал от 25 лет до 71 года (медиана — 41 год). У пациенток были зафиксированы клинические признаки наследственного ракового синдрома: первично множественный характер поражения (43 (45.7%)), ранний возраст манифестации (<45 лет; 59 (62.8%)) и/или наличие РМЖ или РЯ у кровных родственников (42 (44.7%)). У 40 (42.6%) больных было отмечено сочетание двух, а у 9 (9.6%) — всех трех клинических признаков наследственного РМЖ. Все участницы были предварительно протестированы на предмет отсутствия у них характерных «славянских» фаундер-мутаций *BRCA1 5382insC*; *BRCA1 4153delA*; *BRCA1 185delAG*; *BRCA2 6174delT*; *CHEK2 1100delC*; *CHEK2 IVS2+1G>A*; *NBS1 657del50*, *BLM c.1642C>T*. Материалом для секвенирования служили образцы хромосомальной ДНК, полученные из клеток периферической крови.

Таргетное мультигенное секвенирование

Авторы сформировали NGS-панель из 31 гена, основываясь на их потенциальной причастности к формированию онкологической предрасположенности и встречаемости патогенных вариантов в российской популяции. В эту группу вошли «канонические» гены наследственного РМЖ (*BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *PALB2*, *TP53*, *ATM*, *NBN*) [Hauke et al., 2018], «новые» гены, в которых относительно недавно были идентифицированы каузативные мутации (*BLM*, *FANCD2*, *POLE*, *FANCM*, *RAD51C*, *MRE11A*, *RECQL* [5, 15, 30, 33]), а также другие гены, вовлеченные в репарацию ДНК, апоптоз и поддержание стабильности генома (*FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG*, *FANCI*, *FANCL*, *ATRIP*, *CASP10*, *CASP8*, *CHD7*, *LCK*, *PIK3CD*, *PIK3R1*, *PMS2*, *TERC*, *TERT*).

Для создания библиотек использовали набор SeqCapEZ System (Roche); секвенирование осуществлялось на приборе MiSeq (Illumina, USA). Анализ целевого покрытия оценивали с помощью инструмента GATK DepthOfCoverage; показатели средней глубины покрытия

по всей совокупности таргетных участков (98.8%), а также среднего покрытия по конкретным регионам (70-90х) были признаны удовлетворительными. В дальнейшем учитывали варианты с высоким показателем качества (PHRED > 50). Биоинформатический процессинг и аннотирование вариантов выполняли с помощью последовательного применения инструментов MiSeq Reporter, GATK v.2.7 и Picard v.1.86, Annovar. При отборе потенциально патогенных вариантов учитывались следующие параметры:

Популяционная частота варианта менее 1% по данным ресурса Exome Aggregation Consortium (ExAC) [http://exac.broadinstitute.org]. В расчет принимали также сведения о встречаемости варианта в подгруппах онкологических больных (TCGA) и здоровых индивидуумов (nonTCGA), которые позволяли рассчитать величину риска (odds ratio, OR), ассоциированного с носительством аллеля и его значимость (p-value). Превышение более чем в два раза частоты аллеля среди пациентов рассматривали как аргумент в пользу его потенциальной онкогенной роли.

Тип мутации: транкирующие мутации почти всегда являются патогенными; среди миссенс-мутаций выбирали варианты с высокими показателями патогенности CADD-score > 25 [16; https://cadd.gs.washington.edu/]

Наличие сведений о патогенности в литературе или базах данных PubMed, «BRCA Mutation Database» (http://arup.utah.edu/database/BRCA/), ClinVar [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/], LOVD [https://databases.lovd.nl/shared/genes/]

В качестве дополнительного калькулятора патогенности был использован биоинформатический алгоритм, рекомендованный ACMG (American College of Medical Genetics), согласно которому все варианты подразделяются на «патогенные/вероятно-патогенные», «нейтральные» и «варианты с неизвестным значением, VUS» [28]. Обнаруженные предположительно патогенные мутации вручную анализирова-

ли в геномном браузере IGV [http://software.broadinstitute.org/software/igv/], а затем подтверждали с помощью секвенирования по Сэнгеру.

Секвенирование мультигенной панели позволяет одновременно включить в исследование значительно большее количество образцов ДНК по сравнению с полноэкзомным секвенированием, и, таким образом, уже на первом этапе становится возможным приблизительно оценить частоту кандидатных мутаций среди пациентов.

Результаты и обсуждение

Анализ 94 пациенток с помощью мультигенной панели выявил 264 альтернативных несинонимичных варианта. Среди них обнаружилось 127 мутаций с низкой популяционной частотой (MAF < 1%). Эта группа включала 28 транкирующих мутаций (нонсенсы, сдвиги рамки считывания, нарушения сплайс-сайтов) и 99 аминокислотных замен или других структурных вариаций, из которых 23 имели высокие показатели патогенности CADD > 25. Окончательный список обнаруженных потенциально патогенных мутаций, за вычетом ошибок секвенирования, составил 39 вариантов – 21 транкирующая мутация и 18 аминокислотных замен (таблица 1, рисунок 1).

Хотя бы один кандидатный вариант был обнаружен у 41/94 (43,6%) исследованных пациенток (Рисунок 2). В 19/94 (20,2%) случаях наиболее вероятной генетической детерминантой заболевания служили редкие белок-инактивирующие

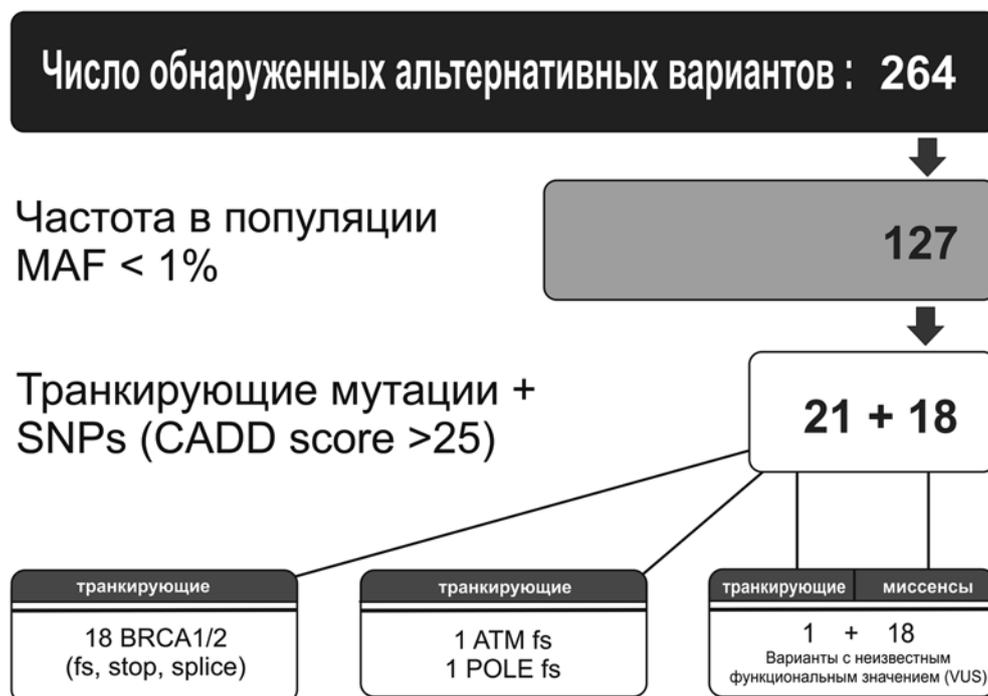


Рис. 1. Результаты таргетного мультигенного секвенирования BRCA-негативных пациенток с РМЖ «высокого риска»: этапы селекции кандидатных вариантов. Fs – сдвиг рамки считывания, stop – нонсенс мутация, splice – мутация сайта сплайсинга, MAF – частота в популяции минорного аллеля (по данным базы данных ExAC), SNP – однонуклеотидный полиморфизм; CADD-score – показатель патогенности, рассчитанный in silico

94 пациентки с признаками наследственного РМЖ

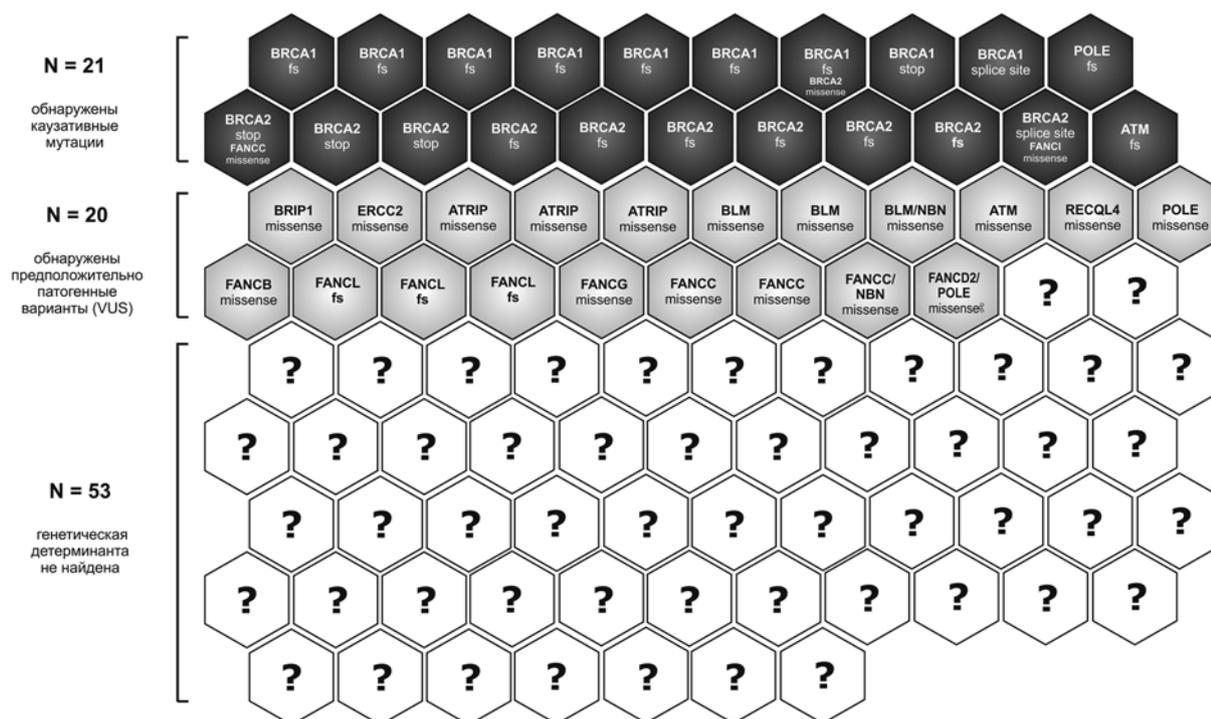


Рис. 2. Каузативные онкогенные мутации и кандидатные предположительно патогенные варианты, обнаруженные в выборке пациенток РМЖ «высокого риска». fs – сдвиг рамки считывания; VUS – вариант с неустановленным функциональным значением

варианты в генах *BRCA1* и *BRCA2*, не относящиеся к числу славянских фаундер-мутаций.

В гене *ATM*, хорошо известном в роли онко-супрессора, было обнаружено две кандидатные каузативные мутации – сдвиг рамки считывания *p.Glu73fs* и аминокислотная замена *p.Val1468Phe* (CADD 30). Две потенциально патогенные мутации были выявлены в гене *POLE* — ключевом элементе системы репарации ДНК — *POLE p.Leu1171fs* и *p.Tyr1046Phe* (CADD 26). Интересной находкой стали предположительно патогенные миссенс-мутации в гене *ATRIP*, ранее не упоминавшимся в связи с онкологическим риском — *p.Arg702Gln* (CADD 28.2) и *p.Ala433Val* (CADD 29.3); одна из этих мутаций оказалась рекуррентной.

11 (11,7%) пациенток несли наследственные мутации с неподтвержденным функциональным значением (VUS) в партнерах *BRCA1* по системе репарации ДНК — генах анемии Фанкони (*FANCC*, *FANCD2*, *FANCG*, *FANCI*, *FANCL*, *FANCB*).

Таким образом, применение таргетной панели позволило с высокой долей уверенности назвать каузативные мутации в 21/94 (22,3%) больных предположительно наследственным РМЖ с неизвестной ранее генетической детерминантой, причем у 19 пациенток причиной заболе-

вания были редкие мутации *BRCA1* и *BRCA2*, а в оставшихся двух случаях были нарушены функции генов *ATM* и *POLE*. Что касается обнаруженных нами 17 миссенс-мутации в генах *ERCC2*, *BRCA2*, *BRIP1*, *NBN*, *BLM*, *LCK*, *ATRIP*, *ATM*, *POLE*, *RECQL*, *FANCG*, *FANCC*, *FANCB*, *FANCD2*, то в пользу мнения об их предрасполагающей онкогенной роли говорят высокие расчетные показатели патогенности (CADD score 25-34), низкая частота в популяции и известные онкосупрессорные функции затронутых генов, однако онкогенный потенциал и клиническую значимость этих вариантов еще предстоит подтвердить с помощью молекулярно-эпидемиологического или функционального подходов.

Доля «объяснённых» нами случаев РМЖ значительно превышает соответствующие цифры, опубликованные другими исследовательскими группами (Таблица 1). Так, по данным Myriad Genetic Laboratories [27], применение 25-генной панели у 252.223 больных с признаками семейной агрегации РМЖ и РЯ выявило патогенные мутации только в 9.8% случаев. По-видимому, причина необычно высокой эффективности применения нашей панели была не в ее расширенном составе (31 locus), а в особенностях селекции пациентов для тестирования. Дело в том, что в данное исследование

Таблица 2. Список предположительно патогенных мутаций, обнаруженных с помощью таргетного мультигенного секвенирования у 94 пациенток с признаками наследственного РМЖ, негативных по «славянским» фаундер-мутациям BRCA1/2, CHEK2, BLM, NBN

Тип мутации	CADD score	Ген	Описание	Мутация	R>A	RS dbSNP	ExAC Normal, %	ExAC Cancer, %	OR	p-value	Носители (n)
frameshift	34	ATM	ATM serine/threonine kinase	p.Glu73fs	CAG>C	762089971	0,001	0,000	0,0	1	1
missense	29,9	ATM	ATM serine/threonine kinase	p.Val1468Phe	G>T	1
missense	29,9	ATRIP	ATR interacting protein	p.Arg391Gln	G>A	142899473	0,081	0,047	0,6	0,206	1
missense	29,6	ATRIP	ATR interacting protein	p.Ala433Val	C>T	2
missense	25	BLM	Bloom syndrome, RecQ helicase-like	p.Asp64Val	A>T	140382474	0,029	0,053	1,9	0,136	2
missense	27,1	BLM	Bloom syndrome, RecQ helicase-like	p.Ala703Val	C>T	1
frameshift	35	BRCA1	breast cancer 1, early onset	p.Arg1747fs	TTTTCT>T	80357975	0,001	0,000	0,0	1	2
splice_site	26,8	BRCA1	breast cancer 1, early onset	na	C>A	80358094	1
stop_gained	37	BRCA1	breast cancer 1, early onset	p.Tyr1584*	G>C	80357433	1
frameshift	35	BRCA1	breast cancer 1, early onset	p.Leu1205fs	TAGAC>T	80357868	0,001	0,000	0,0	1	1
frameshift	12,26	BRCA1	breast cancer 1, early onset	p.Lys654fs	CT>C	80357522	.	0,001	.	.	1
frameshift	29,6	BRCA1	breast cancer 1, early onset	p.Arg504fs	CG>C	80357908	.	0,001	.	.	1
frameshift	29,1	BRCA1	breast cancer 1, early onset	p.Leu502fs	CTTTAA>C	80357888	0,002	0,000	0,0	1	1
frameshift	33	BRCA1	breast cancer 1, early onset	p.Ser282fs	ATGAG>A	80357919	1
frameshift	.	BRCA2	breast cancer 2, early onset	p.Lys157fs	A>AT	1
frameshift	28	BRCA2	breast cancer 2, early onset	p.Ala938fs	TAAAC>T	80359351	.	0,002	.	.	1
stop_gained	35	BRCA2	breast cancer 2, early onset	p.Gln2100*	C>T	1
frameshift	36	BRCA2	breast cancer 2, early onset	p.Pro2334fs	G>GT	754611265	.	0,001	.	.	1
missense	31	BRCA2	breast cancer 2, early onset	p.Thr2515Ile	C>T	28897744	0,066	0,142	2,2	0,003	1
frameshift	.	BRCA2	breast cancer 2, early onset	p.Ile2840fs	CA>C	1
stop_gained	37	BRCA2	breast cancer 2, early onset	p.Tyr2905*	T>A	1
frameshift	35	BRCA2	breast cancer 2, early onset	p.His3010fs	AT>A	80359742	1
splice_site	23,3	BRCA2	breast cancer 2, early onset	na	A>G	81002862	0,004	0,000	0,0	1	1
stop_gained	47	BRCA2	breast cancer 2, early onset	p.Lys3104*	A>T	1
frameshift	.	BRCA2	breast cancer 2, early onset	p.Thr3137fs	CTTACT>C	1
missense	27,6	BRIP1	BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1	p.Arg173Cys	G>A	4988345	0,253	0,388	1,5	0,004	2
missense	33	ERCC2	excision repair cross-complementation group 2	p.Arg592His	C>T	147224585	0,029	0,061	2,1	0,085	1
missense	32	FANCA	Fanconi anemia, complementation group A	p.Arg1409Trp	G>A	139478274	0,019	0,026	1,4	0,532	1
missense	25,4	FANCC	Fanconi anemia, complementation group C	p.Asp195Val	T>A	1800365	0,281	0,499	1,8	0	2
missense	34	FANCD2	Fanconi anemia, complementation group D2	p.Pro279Leu	C>T	1
missense	34	FANCG	Fanconi anemia, complementation group G	p.Arg563Gln	C>T	1
frameshift	35	FANCL	Fanconi anemia, complementation group L	p.Thr372fs	G>GTAAT	759217526	0,272	0,406	1,5	0,008	2
missense	25,2	FANCM	Fanconi anemia, complementation group M	p.Leu1136Ser	T>C	770989272	.	0,002	.	.	1
missense	27,7	LCK	LCK proto-oncogene, Src family tyrosine kinase	p.Val272Met	G>A	1
missense	26,6	NBN	nibrin	p.Arg215Trp	G>A	34767364	0,298	0,273	0,9	0,687	3
frameshift	.	POLE	polymerase (DNA directed), epsilon, catalytic subunit	p.Leu1171fs	G>GT	1
missense	32	POLE	polymerase (DNA directed), epsilon, catalytic subunit	p.Leu1110Ile	G>T	1
missense	26	POLE	polymerase (DNA directed), epsilon, catalytic subunit	p.Tyr1046Phe	T>A	1
missense	29,4	RECQL4	RecQ protein-like 4	p.Gly809Arg	C>T	769977498	0,016	0,037	2,4	0,159	1

вошли пациентки с максимально выраженной предрасположенностью к РМЖ. Действительно, 43/93 (46%) исследованной нами выборки составили случаи билатеральных РМЖ и первично-множественных раков (РМЖ + РЯ), из которых 70% (30/43) имели к тому же необычно молодой возраст на момент диагноза первой опухоли и/или случаи РМЖ среди кровных родственников. В группе первично-множественных раков процент выявления патогенных мутаций был достоверно выше, чем в группе молатеральных РМЖ с семейной историей или ранней манифестацией [14/43 (32.6%) vs. 6/51 (11.8%), $p_{\chi^2} = 0.014$]. Вероятно, такая выборка пациенток оказалась особенно генетически обогащенной в плане «раковых» мутаций.

Существенно, что большинство обнаруженных мутаций оказались редкими транскрипционными вариантами генов *BRCA1* и *BRCA2*, которые не были ранее включены в алгоритмы стандартной диагностики. У 8 пациенток с дефектами гена *BRCA1* был известен рецепторный статус опухолей, и 6 из них оказались трижды-негативными, что является чертой, характерной для *BRCA1*-опосредованного патогенеза [25]. У носительниц мутаций *BRCA2* все 7 информативных карцином были эстроген-позитивными. Одна из обнаруженных редких мутаций, *BRCA1 c.1961delA*, уже описана нами ранее [13], она также встречается в Италии, Польше, Канаде [6, 8]; остальные мутации обнаружены нами в российской популяции впервые. Особый интерес вызвала повторяющаяся в данной выборке транскрипционная мутация в гене *BRCA1 p.Arg1747fs*, найденная в двух индексных случаях.

Полученные данные свидетельствуют о том, что значительная доля пациенток-носительниц мутаций *BRCA1* и *BRCA2* может остаться не диагностированной, если мы будем полагаться только на тестирование стандартного набора славянских фаундер-мутаций — *BRCA1 5382insC*; *BRCA1 4153delA*; *BRCA1 185delAG*; *BRCA2 6174delT*. Данное наблюдение имеет большую клиническую значимость, поскольку является основанием для расширения диагностической панели для мониторинга лиц с повышенным онкологическим риском и внедрением в клиническую диагностику мультигенного таргетного секвенирования.

Безусловно, использование мультигенных панелей имеет некоторые недостатки, затрудняющие их распространение. К числу последних можно отнести сложность лабораторных процедур и процессинга данных, относительно высокую стоимость, и главное — отсутствие стандартов в интерпретации данных. Однако следует признать, что этот подход является мощным диагностическим инструментом и позволяет опре-

делить причину заболевания у существенной доли считавшихся ранее *BRCA1/2*-негативными пациентов, способствует улучшению результатов лечения у больных с наследственным раком и возрастанию эффективности скрининга лиц с повышенной предрасположенностью к РМЖ.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 16-45-02011.

ЛИТЕРАТУРА

1. Afghahi A., Kurian W. A. The changing landscape of genetic testing for inherited breast cancer predisposition // *Curr. Treat. Options in Oncol.* – 2017. – Vol. 18. – P. 27.
2. Balanovsky O., Rootsi S., Pshenichnov A. et al. Two sources of the Russian patrilineal heritage in their Eurasian context // *Am. J. Hum. Genet.* – 2008. – Vol. 82. – P. 236-250.
3. Chong H.K., Wang T., Lu H-M. et al. The Validation and Clinical Implementation of BRCAplus: A Comprehensive High-Risk Breast Cancer Diagnostic Assay // *PLoS ONE.* – 2014. – Vol. 9(5). – P. e97408.
4. Crawford B., Adams S.B., Sittler T. et al. Multi-gene panel testing for hereditary cancer predisposition in unsolved high-risk breast and ovarian cancer patients // *Breast Cancer Res Treat.* – 2017. – Vol. 163(2). – P. 383-390.
5. Cybulski C., Carrot-Zhang J., Kluzniak W. et al. Germline RECQL mutations are associated with breast cancer susceptibility // *Nat. Genet.* – 2015. – Vol. 47. – P. 643-646.
6. Curci A., Capasso I., Romano A. et al. Characterization of 2 novel and 2 recurring *BRCA1* germline mutations in breast and/or ovarian carcinoma patients from the area of Naples // *Int. J. Oncol.* – 2002. – Vol. 20. – № 5. – P. 963-970.
7. Desmond A., Kurian A.W., Gabree M. et al. Clinical Actionability of Multigene Panel Testing for Hereditary Breast and Ovarian Cancer Risk Assessment // *JAMA Oncol.* – 2015. – Vol. 1(7). – P. 943-951.
8. Gayther S.A., Harrington P., Russell P. et al. Frequently occurring germ-line mutations of the *BRCA1* gene in ovarian cancer families from Russia // *Am J. Hum Genet.* – 1997. – Vol. 60. – № 5. – P. 1239-1242.
9. Graffeo R., Livraghi L., Pagani O. et al. Time to incorporate germline multigene panel testing into breast and ovarian cancer patient care // *Breast Cancer Res Treat.* – 2016. – Vol. 160. – P. 393-410.
10. Hall M.J., Obeid E., Daly M.B. Multigene panels to evaluate hereditary cancer risk: reckless or relevant? // *J. Clin. Oncol.* – 2016. – Vol. 34. – P. 4186-4187.
11. Hauke J., Horvath J., Groß E. et al. Gene panel testing of 5589 *BRCA1/2*-negative index patients with breast cancer in a routine diagnostic setting: results of the German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer // *Cancer Med.* – 2018. – Vol. 7(4). – P. 1349-1358.
12. Hoyer J., Vasileiou G., Uebe S. et al. Addition of triple negativity of breast cancer as an indicator for germline mutations in predisposing genes increases sensitivity of clinical selection criteria // *BMC Cancer.* – 2018. – Vol. 18(1). – P. 926.
13. Iyevleva A.G., Suspitsin E.N., Kroeze K. et al. Non-founder *BRCA1* mutations in Russian breast cancer patients // *Cancer Lett.* – 2010. – Vol. 298. – P. 258-263.
14. 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. – Vol. 53. – P. 465-471.
15. Kiiski J.I., Pelttari L.M., Khan S. et al. Exome sequencing identifies FANCM as a susceptibility gene for triple-negative breast cancer // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2014. – Vol. 111. – P. 15172-15177.
 16. Kircher M., Witten D.M., Jain P. et al. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants // *Nat Genet.* – 2014. – Vol. 46(3). – P. 310-315.
 17. Kuchenbaecker K.B., Hopper J.L., Barnes D.R. et al. Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers // *JAMA.* – 2017. – Vol. 317(23). – P. 2402-2416.
 18. LaDuca H., Stuenkel A.J., Dolinsky J.S. et al. Utilization of multigene panels in hereditary cancer predisposition testing: analysis of more than 2,000 patients // *Genet. Med.* – 2014. – Vol. 16. – P. 830-837.
 19. Lu H.M., Li S., Black M.H., Lee S. et al. Association of Breast and Ovarian Cancers With Predisposition Genes Identified by Large-Scale Sequencing // *JAMA Oncol.* – 2018. – doi:10.1001/jamaoncol.2018.2956.
 20. Mainiero M.B., Lourenco A., Mahoney M.C. et al. ACR appropriateness criteria breast cancer screening // *J. Am. Coll. Radiol.* – 2013. – Vol. 10. – P. 11-14.
 21. Michailidou K., Lindström S., Dennis J. et al. Association analysis identifies 65 new breast cancer risk loci // *Nature.* – 2017. – Vol. 551. – № 7678. – P. 92-94.
 22. NCCN Guidelines Version 2.2019.
 23. Nelson H.D., Pappas M., Zakher B. et al. Risk assessment, genetic counseling, and genetic testing for BRCA-related cancer in women: a systematic review to update the U.S. Preventive Services Task Force recommendation // *Ann Intern. Med.* – 2014. – Vol. 160. – P. 255-266.
 24. Njaju U.O., Olopade O.I. Genetic determinants of breast cancer risk: a review of current literature and issues pertaining to clinical application // *Breast J.* – 2012. – Vol. 18. – P. 436-442.
 25. Palacios J., Robles-Frías M.J., Castilla M.A. et al. The molecular pathology of hereditary breast cancer // *Pathobiology.* – 2008. – Vol. 75(2). – P. 85-94.
 26. Park J.S., Lee S.T., Nam E.J. et al. Variants of cancer susceptibility genes in Korean BRCA1/2 mutation-negative patients with high risk for hereditary breast cancer // *BMC Cancer.* – 2018. – Vol. 18(1). – P. 83.
 27. Rosenthal E.T., Bernhisel R., Brown K. et al. Clinical testing with a panel of 25 genes associated with increased cancer risk results in a significant increase in clinically significant findings across a broad range of cancer histories // *Cancer Genet.* – 2017. – Vol. 218-219. – P. 58-68.
 28. Richards S., Aziz N., Bale S. et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology // *Genet. Med.* – 2015. – Vol. 17. – P. 405-423.
 29. Sokolenko A., Imyanitov E. Multigene testing for breast cancer risk assessment: an illusion of added clinical value // *Chin. Clin. Oncol.* – 2017. – Vol. 6(2). – P. 15.
 30. Sokolenko A.P., Iyevleva A.G., Preobrazhenskaya E.V. et al. High prevalence and breast cancer predisposing role of the BLM c.1642 C>T (Q548X) mutation in Russia // *Int. J. Cancer.* – 2012. – Vol. 130. – P. 2867-2873.
 31. Sokolenko A.P., Rozanov M.E., Mitiushkina N.V. et al. Founder mutations in early-onset, familial and bilateral breast cancer patients from Russia // *Fam Cancer.* – 2007. – Vol. 6. – P. 281-286.
 32. Stadler Z.K., Schrader K.A., Vijai J. et al. Cancer genomics and inherited risk // *J. Clin. Oncol.* – 2014. – Vol. 32(7). – P. 687-698.
 33. Thompson E.R., Doyle M.A., Ryland G.L. et al. Exome sequencing identifies rare deleterious mutations in DNA repair genes FANCC and BLM as potential breast cancer susceptibility alleles // *PLoS Genet.* – 2012. – Vol. 8. – P. e1002894.
 34. Tung N., Battelli C., Allen B. et al. Frequency of mutations in individuals with breast cancer referred for BRCA1 and BRCA2 testing using next-generation sequencing with a 25-gene panel // *Cancer.* – 2015. – Vol. 121(1). – P. 25-33.
 35. Tung N., Domchek S.M., Stadler Z. et al. Counselling framework for moderate-penetrance cancer-susceptibility mutations // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* – 2016. – Vol. 13(9). – P. 581-588.
 36. van den Akker J., Mishne G. et al. A machine learning model to determine the accuracy of variant calls in capture-based next generation sequencing // *BMC Genomics.* – 2018. – Vol. 19(1). – P. 263.

Поступила в редакцию 07.12.2018 г.

*K.A. Zagorodnev^{1,3}, E.N. Suspitsin^{1,3}, A.P. Sokolenko^{1,3},
A.A. Romanko^{1,3}, M.O. Anisimova^{1,3}, I.V. Bizin¹,
E.S. Kuligina¹, E.N. Imyanitov^{1,2,3,4}*

Application of the targeted multigene sequencing for the search of hereditary breast cancer mutations in Russian patients

Understanding of the molecular-genetic pathogenesis of hereditary cancer syndrome is extremely important for developing of personal therapeutic approaches and for improving the effectiveness of preventive measures. Today, the optimal solution for the search of causative germ-line mutations in hereditary breast cancer (BC) patients is the next-generation sequencing-based multigene mutational screening. The authors have assembled a targeted panel of 31 genes, based on their potential involvement in the cancer susceptibility and taking into account the frequency of pathogenic alleles in the Russian population. It includes the “canonical” genes of hereditary breast cancer (BRCA1, BRCA2, BRIP1, PALB2, TP53, ATM, NBN), the recently identified “novel” genes (BLM, FANCD2, POLE, FANCM, RAD51C, MRE11A, RECQL), as well as some other genes involved in DNA repair, apoptosis and genome stability maintenance. 94 patients with hereditary BC of unknown genetic etiology were subjected to targeted sequencing. As a result, causative germ-line mutations were identified in 21/94 (22.3%) patients. Importantly, 19 patients harbored rare non-founder BRCA1 and BRCA2 mutations. In the remaining two cases, the functions of the ATM (p.Glu73fs) and POLE (p.Leu1171fs) genes were disrupted. The obtained data are of evident clinical importance; they argue for the expanding of diagnostic panels for monitoring at-risk individuals and for moving the standards of routine clinical diagnostics towards the targeted next-generation sequencing of multigene panels.

Key words: hereditary breast cancer, targeted multigene sequencing