

*На правах рукописи*

СТЕПАНОВ  
Илья Александрович

**РАЗРАБОТКА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОДХОДА К ДИАГНОСТИКЕ  
СИНДРОМА ЛИ-ФРАУМЕНИ НА ОСНОВЕ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО  
СЕКВЕНИРОВАНИЯ**

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени  
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург  
2024

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Научный руководитель** – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент Российской академии наук **Имянитов Евгений Наумович**

**Официальные оппоненты:**

**Белогурова Маргарита Борисовна** – доктор медицинских наук, профессор, государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический) имени Н.П. Напалкова», заведующая отделением химиотерапии (противоопухолевой лекарственной терапии) и комбинированного лечения у детей (Санкт-Петербург)

**Кутукова Светлана Игоревна** – доктор медицинских наук, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры стоматологии хирургической и челюстно-лицевой хирургии, доцент кафедры онкологии факультета постдипломного обучения (Санкт-Петербург)

**Ведущая организация** – федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Санкт-Петербург)

Защита состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 г. в \_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета 21.1.033.01 при ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (197758, Россия, г. Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д.68).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России по адресу: 197758, Россия, г. Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д.68 и на сайте <http://www.niioncologii.ru>.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,  
доктор медицинских наук

**Филатова Лариса Валентиновна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Синдром Ли-Фраумени (СЛФ) или *TP53*-ассоциированный опухолевый синдром (heritable *TP53*-related cancer syndrome, сокращенно – hTP53rc) характеризуется фатальной предрасположенностью к возникновению широкого спектра опухолей (рака молочной железы (РМЖ), опухолей головного мозга (ОГМ), аденокарцином, сарком костей и мягких тканей, гемобластозов).

Название «hTP53rc» – альтернативное, равнозначное. Для этого синдрома оно закрепилось после публикации рекомендаций от ассоциации ERN GENTURIS в 2020 году. Название «синдром Ли-Фраумени» по-прежнему широко используется. Причина развития новообразований – наследственный дефект в гене *TP53* (гетерозиготная мутация). Несмотря на существование клинических критериев СЛФ, разнообразие и вариабельность проявлений затрудняет диагностику. При изучении СЛФ разработаны различные подходы и предложены другие термины для заболевания. Так, в ряде случаев предпочитают говорить о «Ли-Фраумени-подобном синдроме» (устаревший термин; СЛФ, установленный по особым критериям, отличающимся от современных).

Исторически при установлении диагноза СЛФ руководствовались клиническими критериями, предложенными Ф. Ли и Д. Фраумени [Li et al., 1988], однако они были существенно дополнены и переработаны. Современные критерии выпущены под новым названием – критерии Шомпре [J. Tinat et al., 2009].

Критерии Ли-Фраумени-подобного синдрома (ЛФПС), менее строгие и специфичные, чем критерии Шомпре [Birch et al., 1994; Eeles et al., 1993; Eeles, 1995], изредка применяются в клинике [Penkert et al., 2018]. Сам подход к разработке критериев – предложить набор условий, который обеспечивает наибольшую вероятность обнаружения пациентов с СЛФ. Использование критериев Шомпре повышает вероятность диагностировать СЛФ по сравнению с критериями ЛФПС.

Существование различных диагностических критериев для СЛФ и/или ЛФПС осложняет выявление пациентов, у части людей синдром остается не диагностированным. При СЛФ необходимо исследование гена *TP53* на наличие наследственной мутации. При ее обнаружении, тестирование такой же мутации необходимо для родственников пациента.

Врачебная тактика при установлении диагноза требует применения широкого спектра скрининговых исследований, а также многолетнего наблюдения за пациентами. Ввиду большой вероятности возникновения опухолей различных, перечисленных выше, локализаций, эти профилактические меры предполагают затраты со стороны системы здравоохранения и требуют внимания врача.

Сведения о распространенности СЛФ в России отсутствуют, а исследования в этой области ограничиваются описанием отдельных клинических случаев. В начале XXI века считалось, что СЛФ – редкое заболевание. Распространенность оценивалась в диапазоне от 1/5000 [Lalloo et al., 2003] до 1/20000 [Gonzalez et al., 2009]. Предполагалось, что манифестация происходит в молодом возрасте. Появляются новые публикации, в которых авторы предполагают, что СЛФ встречается с гораздо большей частотой (1/2000) [de Andrade, 2017], а опухоли, ассоциированные с наследственными мутациями в гене *TP53*, поражают индивидуумов разных возрастных групп [Amadou et al., 2018].

Разработанные клинические рекомендации для СЛФ в России ограничиваются рассмотрением аденокортикальных опухолей, а данные о возрастных группах и других нозологиях не учитываются. Таким образом, каждый клинический случай представляет строго индивидуальную схему ведения пациента, в рамках которой принятие решений остается в компетенции врача.

Молекулярно-генетический анализ последовательности гена *TP53* связан с целым рядом технических сложностей (наличие GC-богатых областей, широкий спектр возможных мутаций). Перспективным путем преодоления подобных трудностей представляется использование метода секвенирования нового поколения с предварительным селективным обогащением ДНК-библиотеки посредством гибридизации с зондами, специфичными к последовательности гена *TP53*. Метод был успешно применен в настоящей работе.

### **Степень разработанности темы**

Описание СЛФ в России сводится к представлению ограниченного количества клинических случаев. В мировой литературе зачастую встречаются разночтения. Объединением информации о случаях СЛФ занимается несколько агентств. В настоящей работе использована база данных Международной Ассоциации Исследований Рака (МАИР/International Agency for Research on Cancer, IARC) [The TP53 Database, URL: <https://tp53.isb-cgc.org/>].

Наиболее специфичные и актуальные критерии разработаны European Reference Network on Genetic Tumour Risk Syndromes (ERN GENTURIS) [Frebourg et al., 2020]. Разделение на возрастные группы в структуре СЛФ описано А. Амаду [Amadou et al., 2018].

Сведения, накопленные в последние десятилетия относительно СЛФ, касаются критериев диагностики, профилактики и лечения. В работе учтен опыт диагностики при опухолях различных локализаций, проведена оценка распространенности, изучен вклад других наследственных опухолевых синдромов, с которым необходимо дифференцировать СЛФ, учтены технические сложности, связанные с выполнением секвенирования нового поколения.

## Цель исследования

Цель исследования – создание диагностической панели для высокопроизводительного секвенирования и изучение наследственных мутаций при СЛФ.

## Задачи исследования

1. Биотинилированные зонды для таргетного секвенирования подобрать на биотехнологической платформе Benchling и синтезировать амидофосфитным методом.
2. Провести апробацию протокола высокопроизводительного секвенирования с использованием полученного набора олигонуклеотидов и проанализировать образцы ДНК с мутациями в гене *TP53*.
3. Проанализировать коллекцию образцов ДНК методом секвенирования нового поколения, используя набор зондов; для образцов из выборки РМЖ предварительно провести серию ПЦР-тестов для исключения «частых» мутаций в генах *BRCA1/2* и расшифровать последовательность трех генов: *TP53*, *BRCA1/2*.

## Научная новизна исследования

Научная новизна исследования заключается в создании диагностической гибридизационной панели (набора) зондов для гена *TP53*, используемой на этапе обогащения при пробоподготовке для высокопроизводительного секвенирования (Next Generation Sequencing, NGS) впервые в России. Последовательность зондов подобрана в программе Benchling, синтез осуществлен на базе лаборатории молекулярной онкологии «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России. Панель предназначена для работы на платформе Illumina.

Существуют коммерческие гибридизационные панели для исследования гена *TP53* методом высокопроизводительного секвенирования, последовательность зондов в них не указывается производителем. Их возможно использовать только 1 раз и необходимо постоянно закупать. Разработанная для настоящего исследования гибридизационная панель, после синтеза, представлена набором зондов в концентрации, позволяющей проводить пробоподготовку (а именно – селекцию таргетного участка) сотни раз, что приводит к удешевлению NGS. По показателям приложения HsMetrics «синтезированная панель» (описанная в работе) не уступает коммерческому аналогу от компании Roche.

Кроме того, впервые исследована выборка образцов от пациенток с опухолью молочной железы младше 50 лет, насчитывающая 1726 образцов – самое масштабное исследование СЛФ в РФ.

## Теоретическая и практическая значимость работы

Протестирована коллекция из 1903 образцов методом секвенирования нового поколения, среди которых обнаружены 12 случаев СЛФ. Массовое выявление позитивных образцов объясняется значительным объемом выборки и разработкой эффективного алгоритма диагностики. Применение разработанной панели зондов для секвенирования нового поколения успешно выявляет случаи СЛФ и удешевляет процесс диагностики, делая его доступнее по сравнению с коммерческими аналогами.

## Методология и методы диссертационного исследования

Настоящее исследование основано на ретроспективном изучении молекулярно-генетических и клинических характеристик опухолей, возникших при СЛФ. Сформированная группа – 1903 образца – была исследована методом секвенирования нового поколения. Образцы взяты от пациентов трех возрастных групп – 0-15 лет, 16-50 и старше 50 лет.

В образцах РМЖ предварительно исключались «частые» в популяции наследственные мутации в генах *BRCA1/2*.

Технические особенности GC-богатого состава гена *TP53* при подборе панели зондов учтены в программе Benchling. Синтез панели зондов осуществлен при помощи амидофосфитного твердофазного синтеза.

В процессе исследования:

1. Сформирована коллекция образцов.
2. Проведена экстракция нуклеиновых кислот из образцов крови и срезов опухолевой ткани с парафиновых блоков.
3. Освоена методика секвенирования нового поколения.
4. Разработан дизайн зондов для панели обогащения (используется при пробоподготовке для NGS).
5. Синтезирована панель зондов.
6. Оценена эффективность высокопроизводительного секвенирования при подготовке ДНК-библиотеки с полученной панелью обогащения.
7. Осуществлена валидация результатов на образцах ДНК с мутацией в гене *TP53* (образцы ДНК из парафиновых блоков).
8. Сформированная коллекция протестирована при помощи высокопроизводительного секвенирования (образцы ДНК из крови).
9. Проанализированы полученные результаты: оценена встречаемость СЛФ, определен оптимальный алгоритм исследования.

## Положения, выносимые на защиту

1. Разработанная панель позволяет проводить селекцию таргетного гена, удешевляет процесс диагностики СЛФ и не уступает коммерческому аналогу – системе компании Roche с неизвестной последовательностью зондов.
2. Использование панели позволяет детектировать известные мутации в гене *TP53* у пациентов с опухолями любых локализаций; алгоритм для диагностики СЛФ при РМЖ эффективен, целесообразно тестировать одновременно с *BRCA1/2*.
3. Встречаемость СЛФ у пациенток с РМЖ – 10/1519 (0,66%); встречаемость СЛФ у пациенток с ПМЗО, при котором одна из опухолей – РМЖ составила 5/93 (5,4%); у пациентов с глиобластомой – 2/60 (3,3%).

### Степень достоверности результатов исследования

Достоверность подтверждается достаточным объемом выборки (1903 образца) и высоким материально-техническим обеспечением научной лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова» Минздрава России.

Алгоритм для диагностики СЛФ исключал вклад *BRCA1/2*-ассоциированного опухолевого синдрома (самого распространенного) в выборке РМЖ. Применение алгоритма позволило создать «обогащенную выборку», по которой оценивалась распространенность СЛФ. При этом, распространенность скорректирована по самому значимому параметру (*BRCA1/2*-позитивные случаи исключены) и соответствует реальной картине.

Метод NGS расшифровывает полную кодирующую последовательность гена *TP53*, сайтов сплайсинга и некоторых участков интронов, это позволяет обнаружить все известные при СЛФ мутации в гене *TP53*. Таким образом, исключается возможность пропуска мутации в любом участке гена. Обнаруженные мутации проходили валидацию альтернативным методом – секвенированием по Сэнгеру.

Доля СЛФ в выборке рассчитана в процентах. Сравнение СЛФ при ПМЗО, когда одна из опухолей – РМЖ, с выборкой от пациенток только с РМЖ выполнено тестом хи-квадрат ( $\chi^2$ ),  $p=0,0001$  (то есть достоверно выше вероятность обнаружения СЛФ при ПМЗО).

### Апробация результатов исследования

Апробация диссертации состоялась на расширенном заседании научной лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова» Минздрава России (выписка из протокола №20/2023 от 29.08.23, протокол заседания № 14 от 14.06.23), устный доклад представлен на VIII Петербургском международном онкологическом форуме «Белые ночи – 2022» (27.06.2022-03.07.2022, Санкт-Петербург) и на вебинаре «Онлайн-школа

молодых ученых. Успехи трансляционной онкологии» (19.12.2022, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург).

### **Внедрение результатов исследования**

Работа выполнена в рамках основных направлений исследования лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова» Минздрава России. Полученные результаты работы были внедрены в научно-практическую деятельность подразделения (акт внедрения результатов от 24.07.23 г.).

### **Личное участие автора в получении результатов**

Личное участие автора состоит в выполнении молекулярно-генетических исследований на всех этапах: выделение нуклеиновых кислот, выполнение ПЦР и секвенирования, анализ результатов. Автором выполнена обработка, обобщение и интерпретация полученных экспериментальных данных их статистическая обработка, проведен анализ литературы.

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Настоящая работа, представленная на соискание учёной степени кандидата медицинских наук, соответствует паспорту специальности «3.1.6. Онкология, лучевая терапия» по п. 2, б. (медицинские науки).

### **Публикация результатов исследования**

По теме диссертации опубликовано 4 печатные работы, из которых 2 – в рецензируемых научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК, 1 – в зарубежном издании, индексируемом в Web of Science и Scopus.

### **Структура и объём диссертации**

Диссертация изложена на 121 странице и состоит из введения, глав обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения полученных результатов, заключения и выводов. Работа проиллюстрирована 15 рисунками и 17 таблицами, содержит 3 приложения с таблицами. Библиографический указатель включает 135 источников, в том числе 4 отечественных и 131 зарубежный.



# ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

## 1. Материалы

### 1.1 План работы и общее описание дизайна исследования

Дизайн исследования (Рисунок 1) разработан для оценки распространенности СЛФ среди российских пациентов с различными опухолевыми локализациями. Исследование – ретроспективное. Работа проведена в лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова Минздрава России», одобрена локальным этическим комитетом (протокол 11/253 № от 15.10.20).

Учитывались известные особенности специфичности описанных критериев – взяты образцы от пациентов с опухолевыми локализациями, при которых вероятность обнаружения СЛФ наиболее высокая, согласно последней версии R20 МАИР/ IARC.

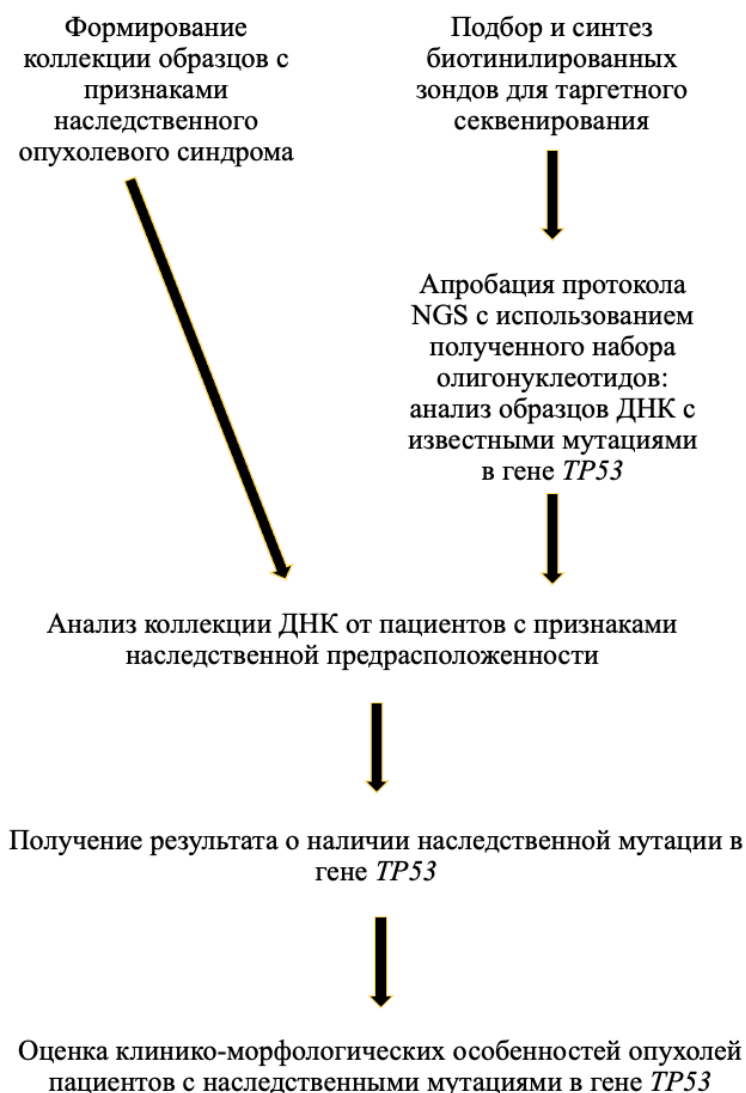


Рисунок 1 – Схема основных этапов исследования

## 1.2 Коллекция образцов

Сформирована коллекция из 1903 образцов, распределенным по трем возрастным группам (0-15лет, 16-50 лет, старше 50 лет).

### Подобранные образцы:

1. В группу 0-15 лет вошли 28 образцов от пациентов со злокачественными новообразованиями. Из них:
  - 2 остеосаркомы;
  - 1 лейомиосаркома;
  - 3 рабдомиосаркомы;
  - 17 нейробластом;
  - 3 астроцитомы;
  - 2 глиобластомы.
  
2. В группу 16-50 лет вошли 1855 образцов. Из них:
  - 1726 РМЖ;
  - 60 глиобластом;
  - 69 астроцитом.
  
3. В группу старше 50 лет вошли:
  - 20 образцов от пациентов с опухолью предстательной железы.

Часть пациенток с РМЖ имела семейный анамнез. Из всех других, только пациенты с опухолями предстательной железы подбирались по следующим требованиям:

- Наличие у пробанда хотя бы одного родственника первой или второй степени со злокачественной опухолью любой локализации в любом возрасте.

Пациенты с опухолью головного мозга и различными видами сарком – не были обеспечены семейным анамнезом.

### 1.3 Подход к диагностике наследственных мутаций

Для тестирования СЛФ все образцы ДНК выделяли из крови. При помощи таргетного секвенирования анализировали последовательность трех генов: *BRCA1/2* и *TP53*.

Образцы от всех пациентов с опухолями, кроме РМЖ, сразу исследовали методом таргетного секвенирования. Предварительных тестов для них не было предусмотрено.

Образцы от пациенток с РМЖ проходили предварительное ПЦР-тестирование локусов *BRCA1/2* для исключения «частых» мутаций в популяции.

Особенность *BRCA*-ассоциированного РМЖ – эффект основателя (founder effect) в различных популяциях. Большинство представителей российской популяции относятся к восточно-европейской славянской популяции. У этих людей обнаруживаются 8 «частых» (повторяющихся) мутаций, встречающихся у людей, не связанных родством. Такие случаи легко выявить без расшифровки всей последовательности гена, достаточно провести ПЦР-тест.

Кроме «частых» мутаций в *BRCA1/2*, существуют уникальные – характерные для одной семьи. Они называются «редкими», и никогда не повторяются у людей не связанных родством. Выявить семейные случаи можно при расшифровке полной последовательности *BRCA1/2* методом NGS (таргетное секвенирование).

Образцы из выборки РМЖ проходили диагностический алгоритм. Сначала были исключены все случаи *BRCA1/2*-ассоциированных РМЖ. Далее распространенность СЛФ оценивалась на обогащенной выборке – без мутаций в *BRCA1/2*.

На первом этапе формирования коллекции отобраны 5469 случаев РМЖ от пациенток различного возраста, среди которых 3262 образца от пациенток младше 50 лет. Все 3262 образца прошли ПЦР-тесты, исключены «частые славянские» мутации:

1. *BRCA1 5382insC [c.5266dupC]*;
2. *BRCA1 4153delA [c.4034delA]*;
3. *BRCA1 185delAG [c.68\_69delAG]*;
4. *BRCA2 6174delT [c.5964delT]*;
5. *BRCA1 C61G [c.181T>G]*;
6. *BRCA1 2080delA [c.1961delA]*;
7. *BRCA1 3819del5 [c.3700\_3704delGTAAA]*;
8. *BRCA1 3875del4 [c.3756\_3759delGTCT]*.

После исключения образцов с «частыми» мутациями осталось 1726, в них исследована полная последовательность генов *BRCA1/2* и *TP53* методом таргетного секвенирования (NGS).

В результате исключены все *BRCA1/2*-ассоциированные РМЖ с «редкими мутациями» (семейные случаи) и обнаружены *TP53*-ассоциированные РМЖ.

## **2. Методы исследования**

### **2.1 Выделение ДНК из цельной крови и парафиновых блоков**

Выделение ДНК из цельной крови проводилось по стандартной методике при помощи хлороформа. Все образцы в коллекции представлены образцами ДНК из крови. Для валидации протокола высокопроизводительного секвенирования использовались образцы из парафинового блока. Срез ткани, содержащий максимальную долю опухолевых клеток (был получен в результате микродиссекции с парафинового блока), подвергался депарафинизации с последующей экстракцией ДНК по стандартной методике набором Cobas FFPE DNA Sample Preparation Kit.

### **2.2 Этапы метода NGS**

Постановка высокопроизводительного секвенирования проходит в несколько этапов:

1. Фрагментация ДНК;
2. Лигирование индексов (уникальных последовательностей, идентифицирующих образец) и адаптеров (необходимых для амплификации в проточной ячейке прибора) ;
3. Амплификация полученных фрагментов при помощи ПЦР;
4. Обогащение – селекция целевых фрагментов ДНК для анализа необходимого гена (применение гибридизационной панели обогащения для гена *TP53*);
5. Получение NGS-библиотеки;
6. Прочтение NGS-библиотек в проточной ячейке прибора MiSeq (Illumina).

### **2.3 Обоснование выбора панели обогащения при помощи гибридизации ДНК с зондами**

Несмотря на распространение методики высокопроизводительного секвенирования нового поколения в диагностических лабораториях, её рутинное использование ограничивается значительной стоимостью и трудоемкостью. Панель олигонуклеотидов разработана для улучшения NGS-диагностики мутаций в гене *TP53* за счет эффективного целевого обогащения при подготовке ДНК-библиотек.

Селективное обогащение целевых генов при высокопроизводительном секвенировании достигается двумя путями: за счет мультиплексной амплификации этих участков или посредством гибридизации с зондами, комплементарными таргетной последовательности с дальнейшей экстракцией фрагментов ДНК.

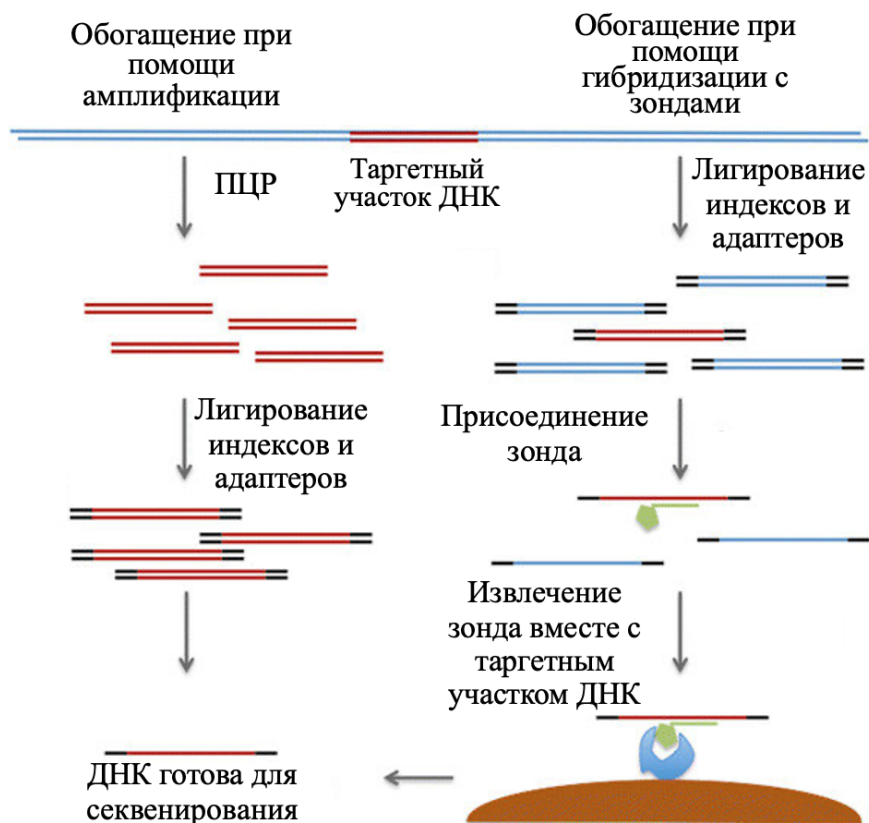


Рисунок 2 – Принципиальная разница в подходах обогащения для таргетного секвенирования

Если применяется техника обогащения при помощи амплификации (амплификационной панели), проводят мультиплексную ПЦР на таргетной области генома. Происходит увеличение числа ампликонов – копий участков целевого гена. Достигается это при использовании набора уникальных праймеров (олигонуклеотидов для инициации ПЦР – затравок), комплиментарных к таргетному участку. Длина праймера в среднем 20 нуклеотидов, может варьировать в зависимости от температуры отжига.

Тугоплавкие последовательности содержат азотистые основания цитозин и гуанин, образующие три водородные связи с комплементарным нуклеотидом. Чем больше водородных связей содержит участок, тем бóльшую температуру раствора необходимо поддерживать, чтобы затравка присоединилась к таргетной последовательности гена.

Равномерное покрытие всей последовательности обеспечивает прочтение каждого нуклеотида. При наличии GC-богатых областей, возникает сложность взаимодействия праймера и ДНК. Может потребоваться бóльшая температура отжига в сравнении с праймером, взаимодействующим не с тугоплавкой последовательностью.

Возникает техническая сложность: чтобы все праймеры имели одинаковую температуру отжига, последовательность для GC-богатых областей подбирают короче. Меньшее число нуклеотидов в составе снижает специфичность – способность присоединяться

к таргетной последовательности. Если праймер недостаточно специфичен, он отжигается на других участках генома, происходит накопление неспецифичного продукта, как следствие – низкий выход реакции.

Другая сложность – праймеры для GC-богатых областей образуют «шпильки» (вторичная структура, один конец праймера комплементарно связывается с другим концом и замыкается сам на себя) или формируют димер (один праймер комплементарно присоединяется к другому).

Аmplификационная панель может не обеспечить равное покрытие GC-богатых областей (покрыты в меньшей степени) в сравнении с нетугоплавкими, что приводит к снижению качества секвенирования. Поэтому распознать мутацию в GC-богатых регионах труднее.

Для исследования гена *TP53* сделан выбор в пользу обогащения при помощи гибридизации ДНК с биотинилированными зондами (гибридизационная панель), это позволяет избежать описанных трудностей.

Биотинилированные зонды необходимы, чтобы осуществить экстракцию целевого фрагмента из раствора.

При пробоподготовке исходная ДНК фрагментируется ферментами (или ультразвуковым воздействием). К фрагментам присоединяются индексы – уникальные последовательности ДНК, позволяющие идентифицировать отдельный образец. И адаптеры – последовательность ДНК для амплификации фрагмента в процессе bridge-ПЦР в проточной ячейке на финальном этапе таргетного секвенирования. Присоединение происходит при помощи ферментов лигаз.

После описанных действий к полученной ДНК-библиотеке добавляются зонды (последовательность ДНК с молекулой биотина на конце, в среднем 80 нуклеотидов). Последовательность зонда длиннее праймеров (следовательно, намного специфичнее), связывается с необходимыми фрагментами интересующего гена, в раствор для пробоподготовки добавляются магнитные частицы, содержащие на своей поверхности стрептавидин.

Стрептавидин имеет способность связываться с биотином. Зонд с биотином, в свою очередь, комплементарно связан с таргетной областью интересующего гена. Все магнитные частицы собирают на стенке пробирки при помощи магнита. Нецелевые фрагменты удаляются вместе с раствором, в котором они находятся. К магнитным частицам на пробирке добавляют чистый буфер, в новом растворе остаются только целевые участки интересующих генов. Подробнее – Рисунок 2 (присоединение индексов не показано отдельным этапом, индексы и адаптеры обозначены черным цветом).

## 2.4 Синтез биотинилированных зондов для ДНК-библиотек

Синтез осуществлен амидофосфитным методом на приборе Biosset ASM2000, проведен по стандартной методике.

Основные этапы кратко представлены в списке ниже:

1. Деблокирование (удаление 5'-О-диметокситритильной группы) – освобождение реакционного центра молекулы защищенного 5'-О-диметокситритильной группой нуклеотида;
2. Конденсация – присоединение необходимого нуклеотида к только что детритилированному нуклеотиду;
3. Кэпирование – создание специальной защитной группы (кэпа) для предотвращения дальнейшего роста тех цепей, к которым не произошло присоединение нового нуклеотида;
4. Окисление – переход фосфиттриэфира в фосфотриэфир (образование фосфатной группы между нуклеотидами), конечная молекула готова для повторения цикла.

## 2.5 Исключение «частых» мутаций в генах *BRCA1/2*

Разработанная панель использовалась в диагностическом процессе СЛФ на регулярной основе.

Образцам из выборки РМЖ, перед NGS проведена предварительная ПЦР-диагностика, исключены «частые» мутации в генах *BRCA1/2*. Такая двухэтапная система позволяет проводить скрининговую диагностику более доступным методом ПЦР и не расходовать реактивы для NGS.

ПЦР-диагностика семи точечных мутаций проводилась с интеркалирующим сатурирующим красителем EVA Green (флуоресцентный краситель, имеет способность к равномерному встраиванию в двойную цепочку ДНК) по стандартному протоколу «3-step» (трех-шаговая ПЦР) с последующим проведением высокоточного плавления на приборе LightCycler 96 Roche. Одна мутация тестировалась при помощи аллель-специфической ППЦ с интеркалирующим красителем SYBR Green для диагностики мутации *BRCA1 5382insC [c.5266dupC]* на приборе BioRad CFX96.

Аллель-специфическая ПЦР использовалась в качестве метода подтверждения после получения результатов высокоточного плавления при мутации *BRCA1 4153delA [c.4034delA]*. В остальных случаях в качестве метода верификации использовалось секвенирование по Сэнгеру. Секвенирование по Сэнгеру выполнялось на секвенаторе GenomeLab GeXP, Beckman Coulter. Очистка ПЦР-продукта от минерального масла осуществлялась набором GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Cytiva).

## 2.6 Статистическая обработка полученных результатов

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы GraphPad Prism версии 9.5.1.

При анализе выборки данных использован расчет критерия хи-квадрат ( $\chi^2$ ) для сравнения пациентов с диагнозом ПМЗО (когда одна из опухолей – РМЖ) с группой пациентов с РМЖ,  $p=0,0001$  (то есть вероятность обнаружения СЛФ при ПМЗО достоверно выше). Использован двухсторонний вариант критерия.

Доля СЛФ в выборке РМЖ и глиобластом рассчитана в процентах. Доли «частых» и «редких» (семейные случаи) мутаций в генах *BRCA1/2* также рассчитаны в процентах.



## РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### Дизайн и синтез гибридационной NGS-панели обогащения

Дизайн зондов (биотинилированных олигонуклеотидов) разработан в приложении Benchling. Зонды перекрывают последовательность друг друга, полностью покрывают кодирующую часть гена *TP53*, первый некодирующий экзон и частично последовательность интронов. Подобраны таким образом, что GC-богатые регионы перекрываются слабее, так как образуют большее число водородных связей. Другие, не тугоплавкие регионы, перекрыты последовательностями зондов на большем протяжении. Таким образом, достигается пропорциональное покрытие. Последовательность гена взята с сайта NCBI [CCDS,NCBI,URL:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/CCDS/CcidsBrowse.cgi?REQUEST=CCDS&DATA=CCDS11118>].

Зонды подбирались примерно одинаковой длины. Количество зондов обусловлено длиной гена с учетом перекрывающихся последовательностей. Длина зонда зависит от метода синтеза. Амидофосфитный метод справляется с синтезом олигонуклеотидов до 150 оснований. Выход реакции на каждом цикле уменьшается на этапе кэпирования (если следующий нуклеотид не присоединился к предыдущему, то предыдущий – блокируется, не допускается пропуск нуклеотида). Длина в 150 нуклеотидов имеет малый выход, существует большая вероятность образования вторичных структур при их использовании. Для гена *TP53* в среднем 80 – оптимальна.

В лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им Н. Н. Петрова» Минздрава России налажен полный цикл синтеза олигонуклеотидов с возможностью введения в последовательность биотина. Олигонуклеотиды (зонды) для гена *TP53* разработаны и синтезированы амидофосфитным методом на приборе Biosset ASM2000.

Размер каждого из 15 зондов индивидуальный (в среднем 80 нуклеотидов, последовательности представлены в Таблице 1).

Совокупность зондов образуют панель (набор) для обогащения при помощи гибридизации. Панель использовалась для пробоподготовки ДНК-библиотек с последовательностью *TP53*. Использовался набор реактивов коммерческой системы реагентов КАРА Hyper Plus (Roche). Панель успешно применялась в анализе образцов для поиска наследственных мутаций в гене *TP53* («синтезированная панель» – разработана для настоящего исследования).

Таблица 1 – Последовательность биотинилированных зондов для исследования гена TP53 при помощи NGS

ID зонда	Последовательность
TP53_p1	[Bio-Pro]GGGTGGGAGGCTGTCACTGGGGAACAAGAAGTGGAGAATGTCACTCTGAGTCAGGCCCTTCTGTCTTGAACAAtgagttt
TP53_p2	[Bio-Pro]AACAAAGAAGTGGAGAATGTCACTCTGAGTCAGGCCCTTCTGTCTTGAACATGAGTTTTTTATGGCGGGAGGTagactga
TP53_p3	[Bio-Pro]GGCGGGAGGTAGACTGACCCTTTTGGACTTCAGGTGGCTGTAGGAGACAGAAGCAGGGAGGAGAGATGACAtcacatg
TP53_p4	[Bio-Pro]GGCAGGGGAGTAGGGCCAGGAAGGGGCTGAGGTCACTCACCTGGAGTGAGCCCTGTCCCCCTGGCTCCTTcccagcc
TP53_p5	[Bio-Pro]CAGCCTGGGCATCCTTGAGTTCCAAGGCCTCATTCACTCTCGGAACATCTCGAAGCGCTCACGCCACGGAtctcag
TP53_p6	[Bio-Pro]AGCTCTCGGAACATCTCGAAGCGCTCACGCCACGGATCTGCAGCAACAGAGGAGGGGAGAAGTAAGTATAAtacacag
TP53_p7	[Bio-Pro]ACGAGTTTATCAGGAAGTAACACCATCGTAAGTCAAGTAGCATCTGTATCAGGCAAAGTCATAGAACCATTTtcatgct
TP53_p8	[Bio-Pro]CATCTGTATCAGGCAAAGTCATAGAACCATTTTATGCTCTCTTTAAACAATTTCTTTTGAAGCTGGTCTggtcctt
TP53_p9	[Bio-Pro]CTGGAAACTTTCCACTTGATAAGAGGTCCCAAGACTTAGTACCTGAAGGGTGAATATTCTCCATCCAGTGtcttctt
TP53_p10	[Bio-Pro]GGAAACTTTCCACTTGATAAGAGGTCCCAAGACTTAGTACCTGAAGGGTGAATATTCTCCATCCAGTGGTTtcttctt
TP53_p11	[Bio-Pro]CTTTGGCTGGGGAGAGGAGCTGGTGTGTGGGCAGTGCTAGGAAAGAGGCAAGGAAAGGTGATAAAAGTGAAtctgag
TP53_p12	[Bio-Pro]CCCTTGCTCCTCCACCGCTTCTGTCTGCTTACCTCGCTTAGTGCTCCCTGGGGGAGCTCGTGGttaggct
TP53_p13	[Bio-Pro]CCCTTCTTGGGAGATTCTCTCCTCTGTGCGCCGGTCTCTCCAGGACAGGCACAAACACGCACCTCAAAGctgttc
TP53_p14	[Bio-Pro]CACGCACCTCAAAGCTGTTCCGTCCAGTAGATTACCACTACTCAGGATAGGAAAAGAGAAGCAAGAGGCAAtaaggaa
TP53_p15	[Bio-Pro]CACAGCAGCCAGTGTGCAGGGTGGCAAGTGGCTCCTGACCTGGAGTCTTCCAGTGTGATGATGGTGAGGATgggcctc

#### Апробация протокола секвенирования с использованием синтезированных зондов

Апробация протокола – проверка способности панели выявлять мутации в гене TP53. Сравнивались «custom-панель TP53» (набор зондов, разработанных на заказ, закрытая система с неизвестной последовательностью от компании Roche) и «синтезированная панель». В обоих случаях для системы пробоподготовки использовались реактивы КАРА HyperPlus (Roche) по протоколу КАРА HyperCap Workflow [Roche, КАРА HyperCap Workflow, URL: <https://rochesequencingstore.com/wp-content/uploads/2022/02/КАРА-HyperCap-Workflow.pdf>].

Зонды TP53 (коммерческие или описанные выше) смешивались с зондами BRCA1/2 закрытой коммерческой системы. На выходе получали 2 набора:

1. Коммерческая панель для BRCA1/2 и TP53 (Roche);
2. Коммерческая панель для BRCA1/2 (Roche) и «синтезированная панель» для TP53.

Обе панели добавлялись в раствор на этапе гибридизации пробоподготовки NGS и обеспечивали расшифровку трех генов: BRCA1/2 и TP53 (глава 5 протокола КАРА HyperCap Workflow [Roche, КАРА HyperCap Workflow, URL: <https://rochesequencingstore.com/wp-content/uploads/2022/02/КАРА-HyperCap-Workflow.pdf>]).

До синтеза, панель полностью из коммерческих зондов применялась для диагностики BRCA1/2- и TP53-ассоциированных опухолевых синдромов в лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им Н. Н. Петрова» Минздрава России.

Для эксперимента взяли 2 набора образцов из опухолевого материала молочной железы (при апробации выявлялись соматические мутации TP53). Набор 1 (Таблица 2) исследован при

помощи панели из полностью коммерческих зондов (*BRCA1/2* и *TP53* Roche). Для набора 2 (Таблица 3) применялись: коммерческие зонды (Roche) для *BRCA1/2* и «синтезированная панель» для *TP53*.

Изначально набор 2 создавался для анализа *BRCA1/2* при помощи коммерческих зондов. «Синтезированную панель» *TP53* добавили в пробоподготовку вместо «custom-панели *TP53*» для проверки основных параметров секвенирования в приложении HsMetrics (покрытие, равномерное распределение прочтений на всем протяжении гена). Приложение показало валидные результаты, сопоставимые с коммерческой «custom-панелью *TP53*» Roche.

В связи с удовлетворительными показателями, апробация признана успешной, а необходимость повторения пробоподготовки с набором 1 – нецелесообразной по причине высокой стоимости коммерческих реактивов КАРА HyperPlus (Roche). Ниже приводятся результаты двух разных наборов образцов для апробации и характеристики HsMetrics. Все обнаруженные соматические мутации *TP53* верифицированы при помощи секвенирования по Сэнгеру.

При помощи панели детектируются мутации разного типа (однонуклеотидные замены, инсерции, делеции). Образцы, протестированные при помощи закрытой «custom-панели» и «синтезированной» – разные. Качество ДНК образцов могло различаться и повлиять на результат сравнения. Однако степень фрагментации ДНК во всех была примерно одинаковой. «Синтезированная панель» удешевляет изучение гена *TP53*, что приводит к отсутствию необходимости в дорогом коммерческом наборе.

Сравнивались следующие характеристики, которые были рассчитаны при помощи программы HsMetrics [HsMetrics (PICARD JDK API Documentation), URL: <https://broadinstitute.github.io/picard/javadoc/picard/picard/analysis/directed/HsMetrics.html>]:

1. Процент уникальных оснований, выровненных на референс (PCT\_SELECTED\_BASES) – процент прочитанных оснований, принадлежащих к интересующему региону (ген *TP53*);
2. Среднее покрытие образца (MEAN\_COVERAGE) – отношение всех прочитанных нуклеотидов к длине референса;
3. Размер библиотеки (HS\_LIBRARY\_SIZE) – число нуклеотидов в полученной библиотеке;
4. Всего прочтений (TOTAL\_READS) – количество прочтений;
5. Процент целевых оснований с покрытием\_50X (PCT\_TARGET\_BASES\_50X) – фракция целевых оснований, достигающих глубины прочтений 50X;
6. Процент целевых оснований с покрытием\_100X (PCT\_TARGET\_BASAS\_50X) – фракция целевых оснований, достигающих глубины прочтений 100X;

7. AT\_DROPOUT – сколько процентов прочтений должны были располагаться в регионах с низким содержанием GC ( $\leq 50\%$ ), но вместо этого располагаются в других регионах; то есть насколько в среднем недостаточно покрыты GC-бедные регионы (рассчитываются в зависимости от содержания GC-состава);
8. GC\_DROPOUT – сколько процентов прочтений должны были располагаться в регионах с высоким содержанием GC ( $\leq 50\%$ ), но вместо этого располагаются в других; то есть насколько недостаточно покрыты GC-богатые регионы (рассчитывается в зависимости от содержания GC-состава).

Таблица 2 – Набор 1, панель коммерческих зондов TP53 (Roche)

ID образца	Процент уникальных оснований, выровненных на референс	Среднее покрытие образца	Размер библиотеки	Всего прочтений	Процент целевых прочтений с глубиной 50X	Процент целевых прочтений с глубиной 100X	AT_DROP OUT	GC_DROP OUT	Тестируемая мутация
DS22887	<b>0,789921</b>	2180	1751215	3327584	<b>0,998693</b>	0,994511	8,903422	<b>1,828958</b>	TP53 Q144X
DS22888	<b>0,79964</b>	3744	2681398	5096864	<b>0,999901</b>	0,999144	4,063902	<b>1,993729</b>	TP53 C176F
DS22892	<b>0,8155</b>	3620	2316466	4945734	<b>0,999908</b>	0,998723	8,987668	<b>1,932572</b>	TP53 c.643_645delAT
DS22940	<b>0,800097</b>	4388	1041291	5863946	<b>0,999878</b>	0,996705	3,582922	<b>1,744854</b>	TP53 H179R
DS22941n	<b>0,797519</b>	4514	1064857	6117034	<b>0,999725</b>	0,997622	6,708818	<b>1,926699</b>	TP53 Y205C
DS22943	<b>0,802833</b>	5635	1379445	8087330	<b>0,996835</b>	0,979206	5,980997	<b>1,494331</b>	TP53 c.606delT
DS22944	<b>0,780469</b>	4311	1063613	6204650	<b>0,999526</b>	0,996919	4,321923	<b>1,641698</b>	TP53 R248W
DS22995	<b>0,719199</b>	1507	367929	2396312	<b>0,991858</b>	0,931203	14,358531	<b>0,283209</b>	TP53 N239D
DS23129	<b>0,761973</b>	3319	801816	4716546	<b>0,99893</b>	0,99539	6,300516	<b>1,634695</b>	TP53 C238Y
DS22886	<b>0,715322</b>	1171	469621	2363672	<b>0,987829</b>	0,924507	6,93257	<b>0,578958</b>	TP53 R273C
Среднее значение	<b>0,7782473</b>				<b>0,9973083</b>			<b>1,5059703</b>	

Таблица 3 – Набор 2, «синтезированная панель TP53»

ID образца	Процент уникальных оснований, выровненных на референс	Среднее покрытие образца	Размер библиотеки	Всего прочтений	Процент целевых прочтений с глубиной 50X	Процент целевых прочтений с глубиной 100X	AT_DROP OUT	GC_DROP OUT	Тестируемая мутация
DS25488	<b>0,823948</b>	1430	153600	420286	<b>0,974742</b>	0,942725	18,165196	<b>7,252673</b>	TP53 R179H
DS25116	<b>0,851006</b>	822	81655	235454	<b>0,971698</b>	0,935808	13,674813	<b>0,706652</b>	TP53 p.Pro316fs
DS25679	<b>0,833376</b>	949	100601	282948	<b>0,983794</b>	0,964149	11,029397	<b>0,307124</b>	TP53 L348X
DS25692	<b>0,787331</b>	430	43326	139242	<b>0,954148</b>	0,773746	4,605645	<b>0,336146</b>	TP53 Y234C
DS25693	<b>0,744897</b>	217	27567	92214	<b>0,55516</b>	0,168149	13,102244	<b>0,303851</b>	TP53 R282W
DS25816	<b>0,785077</b>	218	30240	79096	<b>0,739555</b>	0,251749	5,30397	<b>0,527559</b>	TP53 c.329ins
DS25817	<b>0,831222</b>	508	63007	162370	<b>0,968576</b>	0,83612	11,54475	<b>0,326798</b>	TP53 Y220C
DS25837	<b>0,751131</b>	146	17645	51124	<b>0,313609</b>	0,079647	19,211861	<b>0,249752</b>	TP53 R248G
DS25838	<b>0,846162</b>	911	104223	270640	<b>0,977469</b>	0,959366	3,850961	<b>1,860433</b>	TP53 C238Y
DS25927	<b>0,82194</b>	433	46680	138766	<b>0,940788</b>	0,683663	7,53048	<b>0,322127</b>	TP53 R282W
DS25964	<b>0,859816</b>	1517	159003	423728	<b>0,986521</b>	0,973991	6,213502	<b>2,479645</b>	TP53 Q165X
DS25966	<b>0,85396</b>	907	98508	263588	<b>0,972608</b>	0,952449	7,898652	<b>2,012098</b>	TP53 R175H
DS26064	<b>0,835342</b>	1232	125909	364746	<b>0,978892</b>	0,962805	5,469295	<b>0,705501</b>	TP53 R213X
Среднее значение	<b>0,8128966</b>				<b>0,884925467</b>			<b>1,38930213</b>	

«Синтезированная панель» обеспечивает высокий процент целевых прочтений с глубиной 100X, более 80%.

Сопоставимые низкие показатели GC\_DROPOUT – 1,5% у коммерческой панели и 1,4% у «синтезированной», GC-богатые регионы покрыты равномерно. Удалось решить техническую проблему анализа GC-богатых регионов TP53.

Среднее покрытие (MEAN\_COVERAGE) равнозначное у обеих панелей. Процент уникальных оснований, выровненных на геном – 77% у коммерческой панели против 81,3% «синтезированной».

Процент таргетных прочтений коммерческой панели с глубиной 50X – 99,7%, у «синтезированной» – 88,5%.

Визуализация соматической мутации *R175H* в *TP53* в геномном браузере Golden Helix отражена ниже – Рисунок 3. Эта мутация определена методом NGS при помощи «синтезированной панели». Таргетное секвенирование выполнялось на платформе Illumina MiSeq.

«Синтезированная панель» не уступает коммерческой, ее использование – перспективный метод.



Рисунок 3 – Визуализация в геномном браузере мутации *TP53 R175H*

### Исследование коллекции образцов по возрастным группам

В процессе NGS-тестирования удалось диагностировать 12 случаев СЛФ (Таблица 4). Результаты для каждой возрастной группы представлены ниже.

#### Возрастная группа 0-15 лет

В 28 образцах от пациентов в возрасте 0-15 лет не обнаружено наследственных мутаций в гене *TP53*.

## Возрастная группа 16-50 лет

### Результаты тестирования образцов от пациенток с РМЖ

Применение двухэтапной диагностической модели:

1. ПЦР-тестирования для выявления «частых» (повторяющихся) в популяции мутаций;
2. Последующее NGS-тестирование.

Такая диагностическая модель позволяет полностью исключить пациентов с *BRCA1/2*-ассоциированным опухолевым синдромом (Рисунок 4).

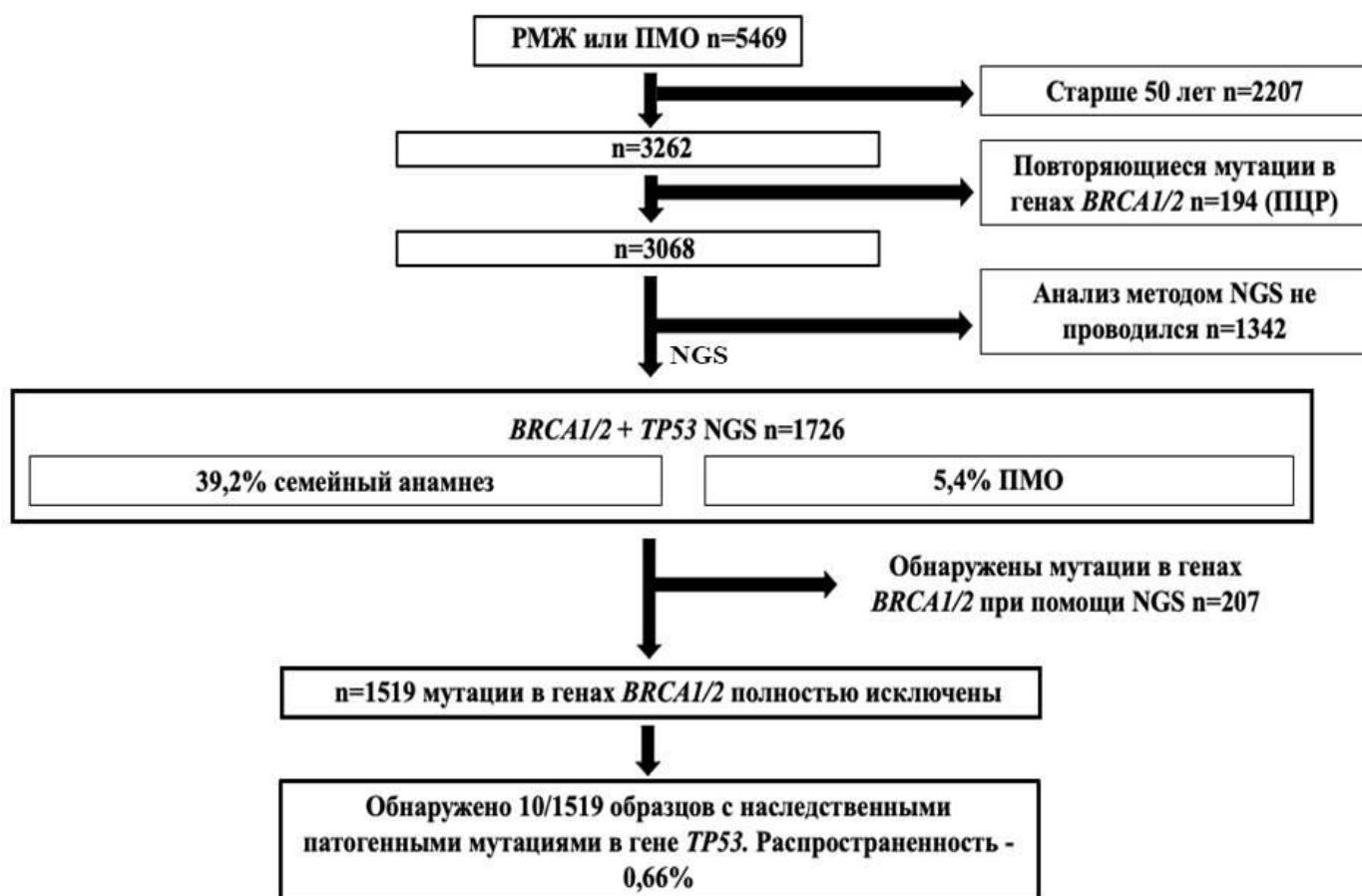


Рисунок 4 – Алгоритм диагностики *TP53*-ассоциированных РМЖ

Обнаружено 10 образцов с наследственными мутациями в гене *TP53* среди 1519 случаев от пациенток с РМЖ младше 50 лет.

Таблица 4 – Спектр выявленных мутаций и их характеристики

ID образца	Возраст	Диагноз	Обнаруженная мутация	Семейный анамнез	Комментарии
27222	38	РМЖ	<i>TP53 T125T [c.375G&gt;A; rs55863639]</i>	Нет данных	-
26851	39	Билатеральный РМЖ и меланома кожи	<i>TP53 R248Q [c.743G&gt;A; rs11540652]</i>	У матери рак легкого в 33 года	ER+, PR-, HER2 – 36, Обнаружена мутация <i>BRAF V600E</i> в меланоме кожи
24956	45	РМЖ	<i>TP53 G245C [c.733G&gt;T; rs28934575]</i>	Нет данных	-
22970	50	Билатеральный РМЖ, гастроинтестинальная стромальная опухоль желудка, папиллярная карцинома щитовидной железы	<i>TP53 R156C [c.466C&gt;T; rs563378859]</i>	У матери рак прямой кишки в 58 лет	Обе опухоли МЖ ER+, PR-, HER2 – 36
22024	44	РМЖ	<i>TP53 R196X [c.586C&gt;T; rs397516435]</i>	Нет данных	ER+, PR+, HER2 – 06
28411	36	РМЖ	<i>TP53 I195T [c.584T&gt;C; rs760043106]</i>	У отца рак предстательной железы в 60 лет	ER+PR+HER2 – 36
27913	41	РМЖ + Рак яичников	<i>TP53 L330F [c.988C&gt; T; rs2073148779]</i>	У матери рак гортани в 39; у деда по материнской линии – рак трахеи (возраст начала неизвестен); у тети по материнской линии – РМЖ в 61 год	ER+ PR- HER2 – 06
25028	49	РМЖ	<i>TP53 R175C [c.523C&gt;T; rs138729528]</i>	у матери РМЖ в 78, у прабабушки – РЩЖ	-
29336	35	Билатеральный трижды негативный РМЖ	<i>TP53 L194F [c.580C&gt;T; rs587780071]</i>	Нет данных	Обе опухоли ER- PR- HER2 – 06
30303	36	Билатеральный РМЖ в 30 лет	<i>TP53 R248W [c.742C&gt;T; rs121912651]</i>	у матери – РМЖ в 50 лет, у отца – рак простаты в 65 лет	-
A5682	32	Глиобластома	<i>TP53 C141T [c.422G&gt;A; rs587781288]</i>	Нет данных	-
A2111	23	Глиобластома	<i>TP53 D281N [c.841G&gt;A; rs764146326]</i>	Нет данных	-

Распространённость СЛФ в выборке РМЖ составила 10/1519, то есть 0,66%. Предварительное ПЦР-тестирование выявило 194/3262 (5,9%) повторяющихся мутаций в

генах *BRCA1/2*. Встречаемость «редких» мутаций (семейных случаев, не связанных с эффектом основателя) в генах *BRCA1/2* составила 11,9% (207/1726).

### **Результаты тестирования образцов от пациентов с опухолями головного мозга**

Исследование представляло собой NGS-тестирование (определения полной последовательности генов *TP53*, *BRCA1/2*) без предварительного этапа ПЦР-диагностики.

В образцах ДНК от пациентов с глиобластомой обнаружилось 2 мутации в *TP53*. Одна – *TP53 C141T [c.422G>A; rs587781288]* у мужчины 32 лет, другая – *TP53 D281N [c.841G>A; rs764146326]* у мужчины 23 лет. Обе располагаются в ДНК-связывающем домене *TP53*, обладают эффектами: полной потери функции белка и доминантно-негативным эффектом. Встречаемость СЛФ среди пациентов с глиобластомой составила 2/60 (3,3%). Все пациенты с опухолью головного мозга не предоставляли сведений о семейном анамнезе.

Наследственных мутаций в *TP53* в образцах от пациентов с астроцитомой не обнаружено. В одном образце ДНК от мужчины 27 лет с астроцитомой выявлена мутация *BRCA2 c.4409\_4413del*.

### **Возрастная группа старше 50 лет**

Образцы ДНК от пациентов старше 50 лет с опухолью предстательной железы исследованы методом NGS, определена полная последовательность *TP53*, *BRCA1/2* без предварительной ПЦР-диагностики.

В коллекции образцов от пациентов старше 50 не обнаружено наследственных мутаций в гене *TP53*.

### **Распределение обнаруженных мутаций в доменах белка**

Мутация у пациентки №27222 (*TP53 T125T [c.375G>A; rs55863639]*) затрагивает сайт сплайсинга в ДНК-связывающем домене p53, у №27319 (*TP53 L330F [c.988C> T; rs2073148779]*) – домен тетрамеризации. Мутации остальных пациентов располагаются в ДНК-связывающем домене.



## Сопоставление вклада *BRCA1/2*- и *TP53*-ассоциированных РМЖ

Рассмотрим вклад СЛФ в структуру РМЖ. В российской популяции славян у 4,7% (данные самого масштабного исследования в России [Sokolenko et al., 2020]) последовательно поступивших пациентов с РМЖ встречаются наследственные мутации *BRCA1/2*:

1. *BRCA1 5382insC [c.5266dupC]*;
2. *BRCA14153delA [c.4034delA]*;
3. *BRCA1 185delAG [c.68\_69delAG]*;
4. *BRCA2 6174delT [c.5964delT]*.

Другие 4 мутации в *BRCA1* обнаруживаются еще в 1,6%:

1. *BRCA1 C61G [c.181T>G]*;
2. *BRCA1 2080delA [c.1961delA]*;
3. *BRCA1 3819del5 [c.3700\_3704delGTAAA]*;
4. *BRCA1 3875del4 [c.3756\_3759delGTCT]*.

В совокупности «частые» мутантные аллели встречаются в 6,3% (4,7%+1,6%). На долю «редких» (семейных случаев) приходится 19,1% [Sokolenko et al., 2020]. Банк образцов из исследования выше [Sokolenko et al., 2020] использован в настоящей работе, но итоговая выборка существенно расширена, набраны новые случаи (1726 образцов исследованы методом NGS против 282). В настоящей работе исследовались не последовательно поступившие образцы, а применен отбор образцов РМЖ (сортировка по возрасту).

По итогам настоящей работы: «частые» варианты аллелей *BRCA1/2* обнаружены у 194/3262 (5,9%), семейные случаи – 207/1726 (11,9%). Распространенность СЛФ в выборке РМЖ – 10/1519 (0,66%). Семейные случаи *BRCA1/2* встречаются в 21 раз чаще, чем СЛФ (207/10).

Результат 0,66% наследственных мутаций в обогащенной выборке РМЖ – существенный показатель, учитывая меры, необходимые для профилактики и лечения опухолевого синдрома у таких пациентов.

### Распространенность СЛФ у пациентов с ПМЗО и возможности диагностики нетипичных случаев

В коллекции, количество пациенток с первично-множественными злокачественными образованиями, одно из которых РМЖ – 93, выявлены 5 позитивных случаев СЛФ (5,4%!).

Тест хи-квадрат ( $\chi^2$ ) при сравнении выборки пациенток с РМЖ (5/1421) и ПМЗО (5/88) –  $p=0,0001$ . Результат статистически значимый, вероятность обнаружения СЛФ при ПМЗО выше, чем при РМЖ у пациенток младше 50 лет.

Частота СЛФ среди пациенток с ПМЗО доказывает, что тестирование – целесообразно.

### **Распространенность СЛФ у пациентов с глиобластомой**

Пациенты с *TP53*-ассоциированными глиобластомами не отличались особенными характеристиками. Случаи подходят под стандартное описание опухолей головного мозга при СЛФ, оно неспецифично. Кроме раннего начала, нет параметров, помогающих заподозрить СЛФ среди пациентов с ОГМ.

Частота в 3,3% (2/60) – показатель, вызывающий интерес. С одной стороны, объем выборки – небольшой, требуется оценка при большем объеме коллекции. С другой – накопление информации об СЛФ-ассоциированных ОГМ сопровождается изменением тактики лечения. Появляются сведения об особенностях ОГМ при СЛФ, предлагаются разные стратегии диагностики, обсуждается молекулярно-генетический профиль [Ott et al., 2020; Sloan et al., 2020].

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Развитие медицины и молекулярной диагностики изменило представление о синдроме Ли-Фраумени, сделан большой прогресс в подходах к диагностике и лечению. Прошло больше полувека с момента открытия синдрома, не удастся с уверенностью заявить, что столь опасное заболевание адекватно диагностируется.

Исследование показывает, что при диагностике СЛФ, может быть оправданным выходить за рамки существующих критериев и объединять диагностику нескольких опухолевых синдромов в один алгоритм. Описаны актуальные направления в области СЛФ.

Оценена распространенность на выборке пациенток с РМЖ по эффективному механизму. Подход удешевляет молекулярную диагностику СЛФ. Скрининговые исследования предлагают пациентам после диагностики СЛФ, это значимо влияет на продолжительность жизни. Кроме того, изменяется тактика лечения. Необходимо рассматривать синдром Ли-Фраумени/*hTP53*с без учета исторической репутации «редкого синдрома».

## ВЫВОДЫ

1. Панель зондов для анализа полной последовательности гена *TP53* успешно синтезирована амидофосфитным методом с введением биотина, состоит из 15 зондов, длина зонда в среднем 80 нуклеотидов.
2. Панель зондов успешно апробирована и применяется в алгоритме диагностике СЛФ, объединена с коммерческой панелью обогащения для генов *BRCA1/2*, полностью исключаются *BRCA1/2*-позитивные случаи.
3. Установлена распространенность СЛФ и мутаций *BRCA1/2*:
  - 3.1. СЛФ при РМЖ – 10/1519 (0,66%);
  - 3.2. СЛФ при глиобластоме – 2/60 (3,3%);
  - 3.3. СЛФ при ПМЗО, где одна из опухолей РМЖ – 5/93 (5,4%);
  - 3.4. «Частые» мутации в *BRCA1/2* – 194/3262 (5,9%);
  - 3.5. «Редкие» (семейные случаи) *BRCA1/2* – 207/1726 (11,9%).

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При NGS-диагностике СЛФ эффективно работает гибридизационная панель обогащения, подбор панели осуществляется с учетом полного покрытия кодирующей части гена *TP53*, первого некодирующего экзона и частично последовательности интронов.
2. Преимущество разработанного подхода к диагностике СЛФ при РМЖ – обозначение границ возраста (опухоль до 50 лет) для NGS-тестирования *TP53*, этот подход позволяет эффективно диагностировать случаи с низкой пенетрантностью и *de novo* мутации.
3. Применение NGS для диагностики одновременно нескольких опухолевых синдромов (*BRCA1/2* и *TP53*) при РМЖ – эффективно и удешевляет диагностику СЛФ.
4. Рецепторный статус РМЖ – ненадежный показатель, чтобы заподозрить СЛФ.
5. При ПМЗО (одна из опухолей РМЖ) рекомендуется направлять пациентов на тестирование СЛФ.
6. Пациентов с опухолями головного мозга до 40 лет, по возможности, направлять на тестирование СЛФ.

## ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Целесообразно увеличение объема тестирования наследственных мутаций *TP53* для пациентов с опухолями различных локализаций, уточнение распространенности СЛФ-ассоциированных опухолей.

Группа пациентов с опухолями головного мозга (особенно молодые пациенты) – практически не исследована. Эта локализация выходит на первые места в структуре СЛФ, при этом ОГМ – не редки в сравнении с адренокортикальными карциномами и карциномами сосудистого сплетения.

Перспективно создание единой базы учета пациентов с СЛФ в России по примеру зарубежных агентств, написание рекомендаций по ведению этих пациентов, разработка национальных критериев диагностики.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ЛФПС – Ли-Фраумени-подобный синдром

МАИР/IARC – Международная Ассоциация Исследований Рака (International Agency for Research on Cancer)

ОГМ – опухоль головного мозга

ПМЗО – первично-множественные злокачественные опухоли

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РМЖ – рак молочной железы

СЛФ – синдром Ли-Фраумени

*BRCA1/2* (Breast cancer type 1 and 2 susceptibility) – ген восприимчивости к раку молочной железы тип 1 и 2

ER (Estrogen Receptor) – рецептор эстрогена

ERN GENTURIS (European Reference Network on Genetic Tumour Risk Syndromes) –

Европейское референсное агентство по генетическим синдромам риска развития опухолей

HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) – рецептор эпидермального фактора роста человека 2

hTP53rc (heritable *TP53*-related cancer syndrome) – *TP53*-ассоциированный опухолевый синдром

NGS (Next Generation Sequencing) – секвенирование нового поколения / высокопроизводительное секвенирование

PR (Progesterone Receptor) – рецептор прогестерона

*TP53* (tumor protein p53 gene) – ген опухолевого белка 53

## Список научных работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Степанов И.А., Васильева Е.В., Соколенко А.П., Имянитов Е.Н.** Частота и спектр наследственных мутаций в гене *TP53* в обширном исследовании российских пациенток с раком молочной железы // Вопросы Онкологии. – 2022. – Т.68. – №5. – С.589-597. DOI 10.37469/0507-3758-2022-68-5-589-597.
2. **Степанов И.А., Васильева Е.В., Соколенко А.П., Имянитов Е.Н.** Особенности наследственного *TP53*-ассоциированного опухолевого синдрома // Вопросы онкологии. – 2022. – Т. 68. – №2. – С.140-148. DOI 10.37469/0507-3758-2022-68-2-140-148.
3. Sokolenko A.P., Sokolova T.N., Ni V.I., Preobrazhenskaya E.V., Iyevleva A.G., Aleksakhina S.N., Romanko A.A., Bessonov A.A., Gorodnova T.V., Anisimova E.I., Savonevich E.L., Bizin I.V., **Stepanov I.A.**, Krivorotko P.V., Berlev I.V., Belyaev A.M., Togo A.V., Imyanitov E.N. 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. – Vol.184. – №1. – С.229-235. DOI 10.1007/s10549-020-05827-8.
4. **Степанов И.А.,** Васильева Е.В., Соколенко А.П., Имянитов Е.Н. Частота и спектр наследственных мутаций в гене *TP53* у российских пациенток с раком молочной железы // Белые ночи 2022: тезисы. VIII Петербургский международный онкологический форум. – Санкт-Петербург: АНМО «Вопросы онкологии», 2022. – Т. 68. – №3. – С. 364. <https://doi.org/10.37469/0507-3758-2022-68-3%20Приложение>

## Благодарности

Выражаю глубокую признательность и благодарность коллективу научной лаборатории молекулярной онкологии и руководителю диссертационной работы – член-корреспонденту РАН, доктору медицинских наук, профессору Евгению Наумовичу Имянитову за обучение молекулярно-генетическим методам, высокие стандарты работы, консультацию и моральную поддержку.