

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии
имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской
Федерации**

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

Диссертация
на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
д.м.н., профессор., чл.-корр. РАН
Имянитов Е.Н.

Санкт-Петербург
2024

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1 Критерии синдрома Ли-Фраумени.....	12
1.2 Интерпретация вариантов наследственных мутаций <i>TP53</i>	16
1.3 Оценка риска и пенетрантность.....	17
1.4 Эпидемиология СЛФ	17
1.5 Деление пациентов на возрастные группы	18
1.6 <i>BRCA1/2</i> -ассоциированный РМЖ и СЛФ	19
1.7 Влияние радио- и химиотерапии на развитие последующих первичных опухолей	20
1.8 Протоколы наблюдения	21
1.9 Применение препаратов гадолиния.....	22
1.10 Структура гена <i>TP53</i>	23
1.11 Функции гена <i>TP53</i>	26
1.11.1 Сохранение и потеря свойств белка дикого типа.....	26
1.11.2 Доминантно-негативный эффект	29
1.11.3 Приобретение новой функции	30
1.11.4 Чувствительность к изменению температуры.....	31
1.12 Влияние мутаций с эффектами LOF, DNE и GOF на экспрессию <i>TP53</i> при помощи MDM2.....	31
1.13 Проявление эффекта GOF, LOF, DNE в зависимости от вида генной мутации	33
1.14 Модификаторы СЛФ	35
1.15 Тканевая специфичность	37
1.16 Мозаичные мутации.....	38
1.17 Структура синдрома Ли-Фраумени	42

1.17.1 Общие положения	42
1.17.2 Возрастная группа 0-15 лет	43
1.17.3 Возрастная группа 16-50 лет	48
1.17.4 Возрастная группа старше 50 лет	54
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	58
2.1 План работы и общее описание дизайна исследования.....	58
2.2. Материалы	60
2.2.1 Коллекция образцов	60
2.2.2 Обоснование выбора образцов в отдельных локализациях	60
2.2.3 Подход к диагностике наследственных мутаций.....	62
2.3 Методы исследования.....	64
2.3.1 Диагностические методики в исследовании	64
2.3.2 Выделение ДНК из цельной крови.....	64
2.3.3 Этапы метода NGS	65
2.3.4 Обоснование выбора панели обогащения при помощи гибридизации ДНК с зондами.....	66
2.3.5 Синтез биотинилированных зондов для ДНК-библиотек.....	69
2.3.6 Выделение ДНК для апробации.....	73
2.3.7 Исключение «частых» мутаций в генах <i>BRCA1/2</i>	74
2.4 Статистическая обработка полученных результатов.....	80
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	81
3.1 Дизайн и синтез гибридизационной NGS-панели обогащения	81
3.2 Апробация протокола секвенирования с использованием синтезированных зондов	82
3.3 Исследование коллекции образцов по возрастным группам	87
3.3.1 Возрастная группа 0-15 лет	87
3.3.2 Возрастная группа 16-50 лет	87
3.3.3. Возрастная группа старше 50 лет	89

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	90
4.1 Общая характеристика <i>TP53</i>-ассоциированных РМЖ	90
4.2 Совпадающий с модифицированными критериями Шомпре случай РМЖ	90
4.3 Несовпадающие с модифицированными критериями Шомпре случаи РМЖ	90
4.4 Пациенты с первично множественными злокачественными опухолями.....	92
4.5 Распределение обнаруженных мутаций в доменах белка	93
4.6 Сопоставление вклада <i>BRCA1/2</i>- и <i>TP53</i>-ассоциированных РМЖ	93
4.7 Распространенность СЛФ у пациентов с ПМЗО и возможности диагностики нетипичных случаев	94
4.8 Распространенность СЛФ у пациентов с глиобластомой	95
4.9 Пенетрантность мутаций и аллельная гетерогенность	95
4.10 Возможные <i>de novo</i> мутации	99
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	100
ВЫВОДЫ	100
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	101
ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	101
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	102
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	104
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	117
ПРИЛОЖЕНИЕ Б	118
ПРИЛОЖЕНИЕ В.....	121

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

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

Название «h*TP53*rc» – 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 [1], однако они были существенно дополнены и переработаны. Современные критерии выпущены под новым названием – критерии Шомпре [2].

Критерии Ли-Фраумени-подобного синдрома (ЛФПС), менее строгие и специфичные, чем критерии Шомпре [3–5], изредка применяются в клинике [6]. 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 [7] до 1/20000 [8]. Предполагалось, что манифестация происходит в молодом возрасте. Появляются новые публикации, в которых авторы предполагают, что СЛФ встречается с гораздо большей частотой (1/2000) [9], а опухоли, ассоциированные с наследственными мутациями в гене *TP53*, поражают индивидуумов разных возрастных групп [12].

Разработанные клинические рекомендации для СЛФ в России ограничиваются рассмотрением адренокортикальных 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) [10].

Наиболее специфичные и актуальные критерии разработаны European Reference Network on Genetic Tumour Risk Syndromes (ERN GENTURIS) [11]. Разделение на возрастные группы в структуре СЛФ описано А. Амаду [12].

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 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 закупать. После синтеза панели, олигонуклеотиды остаются в количестве, позволяющем проводить пробоподготовку (а именно – селекцию таргетного участка) сотни раз. Это приводит к снижению стоимости NGS. По показателям приложения HsMetrics синтезированная панель 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.

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 (χ^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

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

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, 6.

Структура и объём диссертации

Диссертация изложена на 121 странице и состоит из введения, глав обзора литературы, материалов и методов, результатов и их 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Критерии синдрома Ли-Фраумени

Синдром Ли-Фраумени / hTP53rc – заболевание с аутосомно-доминантным типом наследования. Причина – мутация в гене-супрессоре *TP53* (гетерозиготная мутация). Впервые описан в 1969 г. Фридериком Ли и Джозефом Фраумени в ретроспективном исследовании. Ученые обнаружили 5 семей с непривычно богатым семейным онкологическим анамнезом. Дальнейшее изучение заболевания привело к первому определению СЛФ (ОМIM # 151623 [13]) в 1988 [1].

Классическое определение синдрома Ли-Фраумени предполагает: пациентов с саркомой до 45 лет. Обязательно учитываются критерии семейного анамнеза: наличие родственника первой степени родства со злокачественным новообразованием (ЗНО), диагностированным в возрасте до 45 лет, и еще одного родственника первой или второй степени родства с любой злокачественной опухолью до 45 лет или же саркомой, возникшей в любом возрасте [1].

В 1995 году Т. Фребур, после серии успешных экспериментов на мышах, связал возникновение СЛФ с мутациями в гене *TP53* [14]. К 1997 году Дж. Ворли опубликовал описание 50 семей с СЛФ, вызванным наследственными мутациями *TP53* [15]. СЛФ определялся строгими клиническими критериями Ли и Фраумени [1]. С течением времени данное положение изменилось в связи с работой А. Шомпре. Проспективное исследование выявило 2691 семью с богатым семейным онкологическим анамнезом. Для наблюдения выбирались дети, у которых впоследствии развивались онкологические заболевания.

В этом исследовании были впервые обнаружены носители наследственных мутаций в гене *TP53*, которые не соответствовали критериям Ли и Фраумени. Так были разработаны критерии Шомпре для постановки диагноза СЛФ (2001 год) [16]. Эти критерии прошли 2 обновления: в 2009 опубликованы коллективом Дж. Тайнат [2] и в 2015 году ее коллегой Дж. Бужард [17] (эта наиболее актуальная версия называется «модифицированные критерии Шомпре»).

В 2020 году модифицированные критерии Шомпре (2015) вошли в рекомендации от European Reference Network on Genetic Tumour Risk Syndromes [11] с дополнением. Критерии Шомпре оперируют термином «*TP53* core tumor», то есть типичные новообразования при СЛФ: рак молочной железы, саркома мягких тканей, остеосаркома, опухоль центральной нервной системы, карцинома коры надпочечников.

С момента открытия СЛФ предпринимались другие попытки объяснить возникновение опухолей у пациентов с клиническими проявлениями, не подходящими под критерии Ли и Фраумени. Обозначены Ли-Фраумени подобный синдром (ЛФПС, Li Fraumeni like syndrome, LFL), синдром Ли-Фраумени 2 типа (ОМIM #609265) [18] и синдром Ли-Фраумени 3 типа (ОМIM #609266) [19]. Все эти понятия встречаются в статьях и вызывают разночтения.

Ли-Фраумени подобный синдром описан двумя определениями по именам ученых: Дж. М. Берч [3] и Р.А. Илс [4; 5]. Они (также как критерии Шомпре) созданы для тестирования кандидатов, не соответствующих классическим критериям Ли и Фраумени. Критерии Берч и Илс описали раньше критериев Шомпре, они имеют низкую чувствительность. Приведены ниже в качестве ознакомления, их применение может ограниченно рассматриваться в клинической практике.

Синдром Ли-Фраумени 2 типа предполагает наличие наследственной мутации в гене *CHK2*, когда пациент соответствует классическим критериям Ли и Фраумени, но не имеет мутации в гене *TP53*. Синдром Ли-Фраумени 2 типа [20] имеет очень ограниченное количество описанных случаев и ввиду актуальных рекомендаций от ERN GENTURIS [11] не может рассматриваться в клинической практике как и СЛФ3 (Синдром Ли-Фраумени 3 типа [19]), который предполагает связь между мутацией в первой хромосоме (1q23) и возникновением СЛФ [21]. Переход к *hTP53c* устраняет разночтения, так как в самом названии отражается главное условие – наличие наследственной мутации только в гене *TP53*.

Таблица 1 – Клинические критерии диагностики СЛФ / hTP53rc

	Критерий	Источник
Рекомендации European Reference Network	<p style="text-align: center;">Рекомендация 1</p> <p>Соответствие «модифицированным критериям Шомпре». Рекомендуется пройти тестирование наследственной мутации в гене <i>TP53</i> в случае:</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Наличия семейного анамнеза</i>: пробанд с «<i>TP53</i> core tumor» («core tumor» – спектр наиболее характерных опухолей: рак молочной железы, саркома мягких тканей, остеосаркома, опухоль центральной нервной системы, карцинома коры надпочечников) до 46 лет И, по крайней мере, при наличии одного родственника первой или второй степени с core tumor до 56 лет, ИЛИ • <i>Наличия первичных множественных опухолей</i>: пробанд с множественными опухолями, включая как минимум 2 из «<i>TP53</i> core tumor», первая – до 46 лет, независимо от семейного анамнеза, ИЛИ • <i>Наличия редкой опухоли</i>: пациент с карциномой коры надпочечников, карциномой сосудистого сплетения или рабдомиосаркомой эмбрионального анапластического подтипа, независимо от семейного анамнеза, ИЛИ • <i>Возникновения рака молочной железы в очень раннем возрасте</i>: рак молочной железы до 31 года, независимо от семейного анамнеза. <hr/> <p style="text-align: center;">Рекомендация 2</p> <p>Детям и подросткам рекомендуется проходить тестирование на наличие наследственной мутации в <i>TP53</i> при диагнозе:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Гиподиплоидный острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), ИЛИ • Необъяснимая Sonic Hedgehog-ассоциированная медуллобластома, ИЛИ • Остеосаркома челюсти. 	[11]

	<p style="text-align: center;">Рекомендация 3</p> <p>Пациентам, у которых развивается вторая первичная опухоль в области воздействия лучевой терапии на первую «<i>TP53 core tumor</i>», возникшую до 46 лет, рекомендуется проходить тестирование на наличие наследственной мутации в <i>TP53</i>.</p> <hr/> <p style="text-align: center;">Рекомендация 4</p> <ul style="list-style-type: none"> • Пациентам старше 46 лет при раке молочной железы без личного онкологического или семейного анамнеза, не соответствующего «модифицированным критериям Шомпре» не рекомендуется проходить тестирование на наличие наследственной мутации в гене <i>TP53</i>. • Любому пациенту при изолированном раке молочной железы, который не подходит под «модифицированные критерии Шомпре», но выявлена патогенная мутация в <i>TP53</i>, следует обратиться к специалистам многопрофильной команды для обсуждения тактики лечения. <hr/> <p style="text-align: center;">Рекомендация 5</p> <p>Детям из семей с юга Бразилии рекомендуется проходить тестирование на вариант <i>TP53 p.R337H</i> (бразильский вариант с эффектом основателя).</p>	
<p>Ли-Фраумени подобный синдром, определение Берч (LFL- В)</p>	<p style="text-align: center;">Критерии Берч:</p> <p>Пробанд с любой злокачественной опухолью эпителиального происхождения или саркомой, опухолью головного мозга или карциномой коры надпочечников, диагностированной в возрасте до 45 лет, у которого:</p> <p>Родственник первой или второй степени родства с типичными для СЛФ опухолями (саркома, рак молочной железы, опухоль головного мозга, карцинома коры надпочечников или лейкемия) в любом возрасте, И</p> <p>Родственник первой или второй степени родства с любой злокачественной опухолью в возрасте до 60 лет.</p>	<p>[3]</p>

<p>Ли-Фраумени подобный синдром, определение Илс (LFL-E1 и LFL-E2)</p>	<p>Критерии Илс:</p> <p>LFL-E1 (первое определение)</p> <p>Требования для семейного анамнеза пробанда: две различные опухоли, у родственников первой или второй степени в любом возрасте (саркома, рак молочной железы, опухоль головного мозга, лейкемия, опухоль коры надпочечников, меланома, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы).</p> <p>LFL-E2 (второе определение)</p> <p>Саркома в любом возрасте у пробанда с двумя из следующих опухолей (саркома + две опухоли у одного человека): рак молочной железы в возрасте <50 лет и/или опухоль головного мозга, лейкемия, опухоль коры надпочечников, меланома, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы в возрасте <60 лет ИЛИ если ранее перенесена саркома в любом возрасте (саркома + саркома).</p>	<p>[4; 5]</p>
---	---	---------------

Из самых известных источников, регламентирующих различные аспекты в диагностике и профилактике СЛФ можно привести следующие:

1. Модифицированные критерии Шомпре [17];
2. Рекомендации NCCN [22];
3. Европейские рекомендации ERN GENTURIS [11] ;
4. Протокол наблюдения К.П. Кратц [23];
5. Протокол наблюдения А. Виллани [24].

Самый новый документ, объединяющий все перечисленные выше – Европейское руководство по диагностике и профилактике *TP53*-ассоциированных опухолевых синдромов от ассоциации European Reference Network on Genetic Tumour Risk Syndromes [11].

1.2 Интерпретация вариантов наследственных мутаций *TP53*

Интерпретация различных вариантов мутаций в гене *TP53*: патогенные, условно-патогенные, вероятно доброкачественные, доброкачественные и варианты с неясной клинической значимостью, регламентируется совместными

рекомендациями Американского колледжа медицинской генетики и Ассоциацией молекулярной патологии (Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology – ACMG/AMP). Эти рекомендации объединяют в себе частоту встречаемости варианта в популяции по базе GnomAD [25], анализ функциональной активности белка p53 [26; 27] и «модифицированные критерии Шомпре» [17]. Примечательно, что патогенные и условно-патогенные варианты рассматриваются под одним термином – «disease-causing variant» [11]. Рекомендации опубликованы на сайте ClinGen (Clinical Genome Resource) [28].

1.3 Оценка риска и пенетрантность

Активно развивающееся направление диагностики СЛФ – оценка риска возникновения опухоли у носителей наследственных мутаций. Первые работы по СЛФ оценили риск у носителей от рождения до 70 лет в 100% [29]. Затем открыли, что эффект мутации на белок определяет возраст манифестации при опухолевом синдроме. Также выявили тканевую специфичность, иногда свойственную наследственным мутациям в гене *TP53* [30].

Возраст манифестации разный в каждом случае. Есть наблюдение, что один патогенный вариант вызывает опухоли в одинаковой локализации внутри одной семьи, однако у разных семей – разные опухоли [10].

При обнаружении мутации в семье необходимо установить, кто носитель, и предполагать развитие такой же опухоли, как у других членов примерно в том же возрасте [31].

1.4 Эпидемиология СЛФ

Первая опубликованная оценка популяционной частоты 1:5000 основывается на выборке из 36 пациенток с РМЖ младше 30 лет с отягощенным семейным анамнезом [7]. Вторая оценка 1:20000 – на выборке из 341 пациента, 296 (87%) соответствовали критериям СЛФ или Ли-Фраумени-подобному синдрому [8].

В ряде статей авторы утверждают, что распространенность СЛФ недооценивается. В работе К. де Андреде анализировали последовательность гена *TP53* у более 63 тысяч не связанных друг с другом пациентов из трех баз

данных. Исследователи определили 34 потенциально патогенные мутации в гене *TP53* у 131/63 983 человек (0,2%) популяции [9; 32]. Обнаруженные варианты ранее идентифицировались как очень редкие в популяции. Авторы пришли к выводу, что распространенность мутаций в гене *TP53* в 10 раз выше, чем ранее указанные значения в семейных исследованиях [9].

Оценка распространенности по К. де Андреде уникальна тем, что исследовались люди не связанные родством, не отсортированные ни по личному, ни по семейному онкологическому анамнезу [9].

Однако, только первое в истории исследование частоты Ф. Лаллу, описанное у пациенток с РМЖ (самой частой локализацией при СЛФ (1:5000) [7]), принято в качестве референса при составлении модифицированных критериев Шомпре.

Критерии Шомпре выявляют наиболее характерные случаи СЛФ. Если учитывать, что распространенность СЛФ больше, чем ожидалось изначально, тогда пациентки старше 30 лет с семейным анамнезом или нет (учитывая весомый вклад *de novo* мутаций) представляют потенциально неисследованную группу. Современные критерии привязаны к чувствительности – количеству выявленных случаев СЛФ при применении, они не могут охватить такую разнородную группу, как пациенты с РМЖ. Критерии ограничиваются тем, что только пациенткам с ранним РМЖ до 31 года (без семейного анамнеза) показано тестирование на наличие наследственной мутации в гене *TP53* и это положение не пересматривалось со времен публикации Ф. Лаллу (2001 год).

1.5 Деление пациентов на возрастные группы

Интерес представляют пенетрантность мутаций и вопросы ранней диагностики и профилактики. СЛФ гетерогенен, важно оценить структуру – опухоли каких локализаций возникают чаще всего. Корректный подход к представлению структуры СЛФ описан А. Амаду [12]. Он основан на деление пациентов с патогенной мутацией в гене *TP53* на 3 группы: 0-15 лет, 16-50 и старше 50 лет. Такие возрастные границы обусловлены спектром опухолей в каждой возрастной группе.

А. Амаду использует данные Международной Ассоциации Исследований Рака [10] (МАИР/IARC) версии R18 – с 1989 до 2015 года.

В возрастной группе 0-15 лет спектр опухолей резко контрастирует с другими группами. СЛФ в группе старше 50 лет отличается от диапазона 16-50 лет не спектром опухолей, а частотой возникновения конкретных локализаций – на первые места выходят предстательной железы, рак легкого, рак поджелудочной железы (для других возрастных групп считаются достаточно редкими). Пенетрантность мутаций различна [33].

Патогенная мутация – не единственная причина возникновения опухоли в определенном возрасте, существуют другие факторы, вносящие вклад в развитие СЛФ (см. тканевая специфичность, мозаицизм, модификаторы заболевания).

1.6 *BRCA1/2*-ассоциированный РМЖ и СЛФ

Выявляемость СЛФ при РМЖ осложняется наличием в популяции наследственного *BRCA1/2*-ассоциированного опухолевого синдрома, с частой локализацией – РМЖ [34].

Есть особенности *BRCA1/2*-ассоциированного РМЖ: трижды негативный рецепторный статус и наличие в ряде популяций эффекта основателя – распространенных повторяющихся мутаций в генах *BRCA1/2*, составляющих значительную часть всех мутаций в популяции.

TP53-ассоциированные опухоли молочной железы обычно отличаются по морфологическим характеристикам от *BRCA*-ассоциированного рака молочной железы [35]. Молекулярная диагностика наследственного РМЖ учитывает особенности регионов, где обнаружен эффект основателя (в России выявлены случаи, связанные с эффектом основателя) [36].

Целесообразно в таких случаях диагностику разделять на два этапа: сначала выявлять «частые» мутации в генах *BRCA1/2* при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР), после проводить анализ полной последовательности генов *BRCA1/2* при помощи высокопроизводительного секвенирования (выявление семейных случаев, «редкие мутации») [37]. Удобно одновременно расшифровывать и полную последовательность гена *TP53* – для

СЛФ не существует эффекта основателя (кроме одного исключения – *TP53 R337H* [38], уникальной для населения юга Бразилии, но не России), мутация может располагаться в любом кодоне.

Не всегда исследование частых мутаций в генах *BRCA1/2* заканчивается расшифровкой полной последовательности. Часть *BRCA1/2*-ассоциированных РМЖ и СЛФ (если ген *TP53* входит в панель NGS вместе с генами *BRCA1/2*) не обнаруживают. Вклад СЛФ в структуру наследственных опухолевых синдромов в должной мере не учитывается.

Во многие наборы для проведения NGS для *BRCA1/2* стали включаться системы обогащения для анализа гена *TP53*, что помогает обнаружить больше случаев СЛФ.

1.7 Влияние радио- и химиотерапии на развитие последующих первичных опухолей

Протоколы наблюдения учитывают, что носители наследственных мутаций в гене *TP53* имеют очень высокий риск развития двух и более опухолей. В начале века опубликована статья о пациентке с 17 опухолями в течение жизни, 10 опухолей развились в течение короткого времени после лучевой терапии опухоли эндометрия и одновременного приема тамоксифена для лечения РМЖ [39].

У другой пациентки развилось 9 опухолей в течение жизни, причем 8 – после химиолучевой терапии первой остеосаркомы [40].

Позже опубликованы сообщения о том, что лучевая терапия приводит к отсроченному развитию последующих опухолей у пациенток с карциномами молочной железы [41].

Дж. Бужард [17] установил, что примерно 40% носителей наследственных мутаций имеют риск первично-множественных опухолей, у 30% пациентов развивается опухоль в поле лучевой терапии. Так, сформированы рекомендации, об исключении химиотерапии и радиотерапии ввиду чрезмерного риска развития последующих опухолей [42]. Предпочтение должно отдаваться хирургическим методам лечения [43]. Сведений об индуцированных опухолях химиолучевой терапией недостаточно.

Подход в профилактических протоколах остается консервативным: все патогенные мутации вне зависимости от локализации считаются опасными из-за риска последующих опухолей [11; 23].

Необходимы исследования механизмов патогенеза вторых первичных новообразований, клинико-патологических характеристик опухолей, связанных с лечением и их прогноз [44].

При СЛФ принципиально важно тестирование патогенных мутаций в гене *TP53* до начала лечения. Это правило следует применять и к пациентам с мозаичными мутациями в гене *TP53*. Пациентам с мозаичными мутациями также обследуются по протоколам наблюдения (см. протоколы наблюдения).

Эти протоколы включают ультразвуковое исследование брюшной полости каждые 6 месяцев, МРТ всего тела и головного мозга ежегодно. Для женщин в возрасте от 20 лет – ежегодно МРТ молочной железы [45].

1.8 Протоколы наблюдения

Протоколы наблюдения опираются на исследования авторов из Австралии (2015) [46], Канады (2016) [24] и США (2017 и 2021) [22; 23].

Протокол М. Бэллинджер (Австралия) [46] предполагает исследования с различной периодичностью и применением магнитно-резонансной терапии (МРТ) всего тела как наиболее эффективного метода скрининга.

Протокол от А. Виллани (Канада) или «протокол Торонто» [24] регламентирует набор схожих характеристик с М. Бэллинджер, но приводит подробное описание скрининговых методик в зависимости от возраста.

В исследовании А. Виллани две группы: пациенты, которые соблюдали протокол скрининга и нет. Пятилетняя выживаемость составила 88,8% в группе, регулярно проходившей скрининговые исследования и 59,6% в группе без наблюдения.

Протокол от К.П. Кратц (США) [23] опирается на результаты исследования протокола А. Виллани с обновленной статистикой (анализом более 250 описанных случаев СЛФ). В дополнение приводятся: протокол NCCN [22], «протокол Торонто» и протокол М. Бэллинджер, с которыми можно ознакомиться и сравнить между собой [23].

Современный подход к диагностике опухолей при СЛФ – сочетание различных неинвазивных методов с определенной периодичностью. С момента публикации «протокола Торонто» предусматривается скрининг наиболее важных локализаций в разных возрастных группах при помощи различных методов исследования. Скрининг адренокортикальной карциномы при помощи МРТ всего тела необходимо дополнять УЗИ брюшной полости в детском возрасте.

МРТ используется в сочетании с другими методами [24]. Наглядный пример демонстрируется в протоколе К.П. Кратц. В процессе диагностики две адренокортикальные карциномы обнаружены с помощью ультразвукового исследования брюшной полости и одна с помощью МРТ [23].

Из-за риска развития сарком в любом возрасте рекомендуется ежегодно МРТ всего тела и УЗИ брюшной полости и таза (каждые 3-4 месяца у детей и ежегодно у взрослых; каждые 6 месяцев МРТ).

Протокол К.П. Кратц предусматривает ограниченное использование препаратов ферромагнитных парамагнетиков на основе гадолиния Gadolinium-Based Contrast Agent (GBCA). Целесообразно применение указанных контрастных препаратов считается только в случае первого МРТ-исследования, после не рекомендовано использование контрастного препарата, т.к. GBCA накапливаются в базальных ядрах и в костях.

1.9 Применение препаратов гадолиния

Препараты на основе гадолиния имеют 4 характеристики, связанные со структурой молекулы препарата. Существуют линейные формы молекул и макроциклические. Кроме того, в зависимости от способности диссоциировать на заряженные частицы или нет, препараты разделяют на ионные и неионные формы [47].

Около десяти лет известно, что препараты гадолиния вызывают фиброзирующую дермопатию (утолщение кожи конечностей и частично тела) [48], в подавляющем большинстве это связано с использованием линейных молекул GBCA (ионные и неионные формы), однако только у пациентов со сниженной почечной фильтрацией [49].

Препараты гадолиния накапливаются в костях, причем существует зависимость от структуры [50]. Линейные формы молекул имеют большую тенденцию к отложению в костях, чем макроциклические примерно в 2-2,5 раз [51]. Ионы Gd^{3+} способны встраиваться в структуру костной ткани. Гадолиний может несколько десятилетий находиться в трубчатых костях после хотя бы одного применения [52; 53].

Существует эффект, связанный с накоплением в базальных ядрах мозга [54; 55]. Линейные молекулы имеют тенденцию к большему накоплению в тканях мозга [50]. Нет данных о зависимости накопления ионных или неионных форм [56].

Нет данных, что накопление гадолиния в тканях имеет патогенный эффект, ограничение применения скорее связано со стремлением оградить пациентов от предполагаемого токсического действия. Однако в рекомендациях К.П. Кратц не указано, препаратам с какими характеристиками отдавать предпочтение [23].

К.П. Кратц указывает, что почти 50% людей, у которых развилась одна опухоль, развилась хотя бы одна другая [29]. Отмечается, что эти оценки страдают от предвзятости, так как большинство анализов было проведено у детей с отягощенным семейным анамнезом (указанные ранее данные Дж. Бужард [17] - примерно 40%). Трудно переоценить вклад профилактических исследований при СЛФ.

1.10 Структура гена *TP53*

Стоит рассмотреть особенности транскрипции, молекулярные механизмы работы p53 и распространенность СЛФ в популяции и для лучшего понимания возможности прогноза и пенетрантности отдельных мутаций.

При молекулярной диагностике необходимо учитывать, как именно мутация влияет на функцию белка.

Ген *TP53* расположен на хромосоме 17 (17p13.1). p53 (продукт гена *TP53*) содержит 393 аминокислоты (Рисунок 1). N-концевой домен включает в себя субдомен трансактивации и область РХХР, которая представляет собой регион, богатый пролином. На Рисунке 1 буквой Р обозначен пролин, Х – любая аминокислота. Этот домен необходим для связывания с белком MDM2 (см.

далее в тексте). Центральный ДНК-связывающий домен необходим для взаимодействия с ДНК (со специфичной последовательностью), наиболее часто мутации возникают в этом домене.

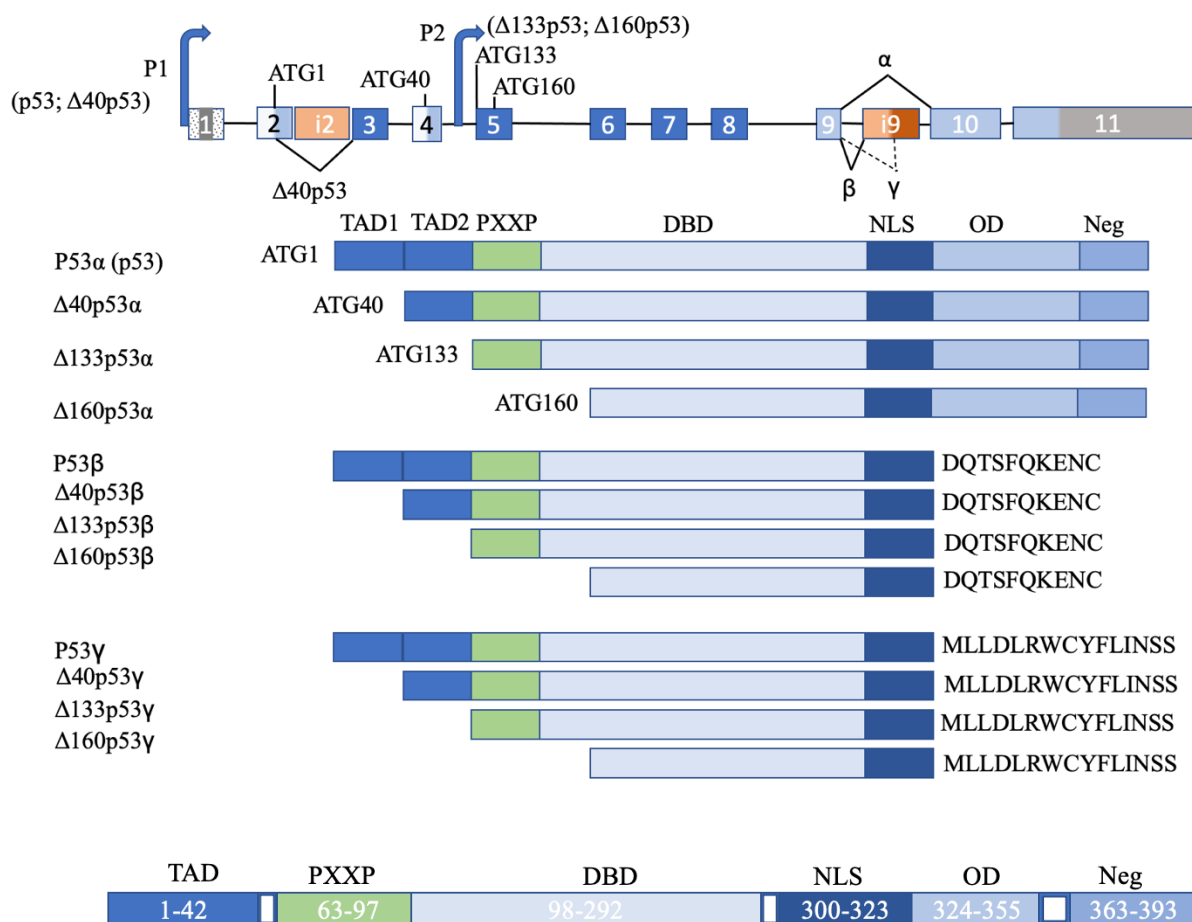


Рисунок 1 – Структура гена TP53 и p53

Ген TP53 кодирует двенадцать различных белковых изоформ.

TP53 содержит одиннадцать экзонов и кодирует некоторые изоформы p53 с использованием альтернативных промоторов (обозначены стрелками) и сайтов сплайсинга (обозначены указателем ^).

Цифрами обозначены номера аминокислот (ак).

Канонический белок p53 имеет два домена трансаактивации (TAD1 ак1-42 и TAD2 ак43-62), домен, богатый пролином (PXXP ак 64-97), домен, связывающий ДНК (DBD ак 98-292), функциональную последовательность ядерной локализации (Nuclear Localization Signal Sequence, NLS ак 300-355), домен олигомеризации / тетрамеризации (oligomerisation domain, OD ак 324-355) и домен отрицательной регуляции (negative regulation, Neg ак 363-393).

P1, P2 – промотор 1 и 2. ATG 1, 40, 133, 160 – различные старт-кодены для различных изоформ; i2-интрон 2, i9 участок интрона 9, содержащий альтернативные участки 9β и 9γ. Рисунки по материалам источников [57; 58].

Область С-концевого домена выполняет регуляторную функцию. Аминокислоты в С-концевом домене подвергаются посттрансляционным модификациям, включая фосфорилирование и ацетилирование; этот домен условно делится на два: домен тетрамеризации, необходимый для олигомеризации p53 (для правильной работы необходим процесс тетрамеризации – взаимодействия 4 молекул p53) и регуляторный домен. Регуляторный домен может закрывать ДНК-связывающий сайт в ДНК-связывающем домене и переводить белок в неактивное состояние в зависимости от посттрансляционной модификации [24].

Кроме указанных выше, в составе белка выделяют две функциональные последовательности. NLS (Nuclear Localization Signal Sequence), последовательность сигнала ядерной локализации [59] и NES (Nuclear Export Signal Sequence [60]) не указан на Рисунке 1 (находится в регионе домена олигомеризации, oligomerization domain, OD), последовательность сигнала ядерной локализации/экспорта. NLS и NES необходимы для проникновения белка в ядро клетки и из ядра. Более подробная структура с наиболее частыми мутациями представлена на сайте Pscan (Pediatric Cancer) [61].

Из 11 экзонов, десять, кодируют полноразмерный 393-аминокислотный p53 [57], первый экзон всегда не кодирующий. Три альтернативных экзона: i2, 9 β и 9 γ могут включаться или нет в состав белка, и в зависимости от этого осуществляется экспрессия одной из изоформ. Участки интрона 2 и 9 включают участки альтернативного сплайсинга. Участок i2 может стать «экзоном 2/3», но в середине такого экзона содержится стоп-кодон, тогда трансляция такого транскрипта начинается с ATG40. Экзон 9 может быть полностью исключен из состава p53 и тогда белок принимает каноническую α -форму (9 α). Участки экзона 9 могут частично удерживаться в составе белка - 9 β и 9 γ - и тогда транскрипты p53 принимают соответствующую изоформу. Ген имеет 2 промотора: один выше первого экзона, второй в 4 интроне, в сумме ген имеет 12 альтернативных вариаций мРНК [58].

Возникновение мутаций в разных участках гена может повлиять на работу различных изоформ, это одна из причин многогранности проявлений СЛФ.

Опережая основное обсуждение темы мутаций в интронах, следует отметить, что потенциально опасными являются мутации в 4 интроне, в нем располагается второй промотор альтернативных транскриптов p53. Впрочем, случаются и другие интересные случаи в нетранскрибируемой последовательности гена.

1.11 Функции гена *TP53*

На сайте IARC/МАИР [10] описаны основные функциональные свойства для p53 с любой мутацией:

1. Сохранение свойств дикого типа;
2. Полная или частичная потеря свойств дикого типа (loss of function, LOF или Partial Loss of Function);
3. Доминантно-негативный эффект (Dominant Negative Effect, DNE);
4. Приобретение функции (Gain of Function, GOF);
5. Чувствительность к изменению температуры в отношении способности белка активировать конкретные промоторы.

1.11.1 Сохранение и потеря свойств белка дикого типа

Сохранение свойств дикого типа характерно для полиморфизмов, пример – синонимичные замены. Полная (loss of function) или частичная (partial loss of function) – утрата правильной функции определяется по двум классификациям.

Существует классификация С. Като, она основана на исследованиях в университете Тохоку в Японии. Оценивалась активность 2314 вариантов мутаций в *TP53*, функциональное исследование на дрожжах с применением сайт-направленной техники мутагенеза [26]. Функциональность белка характеризовалась по способности к трансактивации (увеличение экспрессии гена-мишени p53) по отношению к 8 промоторам генов *MDM2*, *BAX*, *14-3-3σ*, *p53AIP1*, *GADD45*, *Noxa*, *p53R2* и *WAF1*. Промотор каждого из этих генов встраивался в плазмиду, кодирующую красный белок-биосенсор DsRed с флуоресцентной активностью. После трансформации, дрожжам проводили сайт-специфический мутагенез и оценивали уровень флуоресценции DsRed в присутствии мутантного p53 в отношении каждого промотора. Результаты экспрессии сравнивались с данными дикого типа.

Подход по классификации С. Като делил мутантные p53 на функциональный и нефункциональный в зависимости от интегральных показателей по экспрессии всех промоторов:

1. Полная утрата функции (0% активности (трансаktivации) в отношении всех промоторов).
2. Частичная утрата функции (partially functional):
 - 2.1. <20% низко-функциональный белок;
 - 2.2. от 20% до 75% – умеренное снижение функции;
 - 2.3. 76-100% - активный белок.

Эта классификация вошла в протокол ACMG/AMP [28] для оценки мутаций в гене *TP53*, содержит критерии доброкачественности (benign criteria) и патогенности (pathogenic criteria).

Подход С. Като обеспечивал возможность для сравнения мутантных p53. Однако 8 показателей — не все характеристики сигнального пути p53. Интерес представляли альтернативные методы оценки потери свойств белка для подтверждения предложенного С. Като метода.

Альтернативный подход предложил А. Джакомелли спустя 15 лет [27]. Этот подход базируется на внесении мутаций в клеточные линии рака легкого при помощи CRISPR-Cas9. В эксперименте создали изогенные клеточные линии (то есть оба аллеля содержат одинаковые мутации – p53null) и гетерозиготные клеточные линии (один аллель дикого типа, другой с мутацией), а также клеточные линии без мутаций (изогенные, дикого типа – p53wt). Изогенные линии с мутацией использовались для оценки потери функции, а гетерозиготные для оценки доминантно-негативного эффекта.

После внесения мутаций, клетки обрабатывали нутлином-3 или этопозидом. Нутлин-3 нарушает взаимодействие MDM2 и p53. Следствие – накопление p53 в клетке, отсутствие экспрессии MDM2, замедление роста клетки опухоли и апоптоз. Нутлин-3 нарушает рост клетки, если p53 обладал активностью и не оказывает никакого эффекта на клетки, где p53 инактивирован.

Обработка нутлином-3 помогла обогатить клеточные гетерозиготные и изогенные линии с мутантными белками, функция которых утратилась полностью. В гетерозиготных линиях обработка нутлином-3 возможность изучить доминантно-негативный эффект (формирование неактивных p53wt-p53mut комплексы). Обработка нутлином-3 изогенных линий привела к получению клеток с утраченной функцией p53 преимущества, и как следствие – выживанию.

Этопозид – ингибитор топоизомеразы 2 – приводит к образованию двойных разрывов ДНК. Если клетка сохраняет функцию p53, то она переносит воздействие этопозидом, так как активируются механизмы репарации. Если p53 не функционален – клетка замедляет рост и погибает.

Обработка этопозидом помогла обогатить клеточные изогенные и гетерозиготные линии, где мутантные белки сохраняли функцию, так как преимущество таких клеток заключалось в способности активировать репарацию двуцепочечных разрывов ДНК.

Клетки p53wt обрабатывали нутлином-3, а клетки p53null и гетерозиготные линии обрабатывали либо нутлином-3, либо этопозидом.

После 12-дневного роста всех указанных линий, из клеток выделяли ДНК и проводили секвенирование нового поколения для оценки встречаемости мутаций в различных кодонах.

Эксперимент выявил 2 показателя для определения функциональности белка. В классификации отмечают характеристики обогащения аллелей p53wt после обработки нутлином-3 и p53null после обработки этопозидом.

Чтобы определить показатель обогащения аллелей использовался z-score (z-оценка) – мера наблюдаемого значения, показывающая, сколько стандартных отклонений составляет его разброс относительно среднего значения. Классификация определяет класс белка в зависимости от двух показателей – утраты функции (Loss of function, LOF) и наличия доминантно-негативного эффекта (Dominant Negative Effect, DNE).

Оценка z-score принята МАИР/IARC и рассматривается в критериях ACMG/AMP вместе с классификацией С. Като.

Таблица 2 – Классификация А. Джакомелли

	p53WT Нутлин-3 Z-score	p53null Этопозид Z-score
DNE_LOF	≥ 0.61	≤ -0.21
notDNE_notLOF	< 0.61	> -0.21 ;
notDNE_LOF	< 0.61	≤ -0.21 ;

Классификация А. Джакомелли по трем параметрам z-score:

1. DNE_LOF = Полная потеря функции белка и наличие доминантно-негативного эффекта
2. notDNE_notLOF = Частичная потеря функции белка и отсутствие доминантно-негативного эффекта
3. notDNE_LOF = Полная потеря функции белка и отсутствие доминантно-негативного эффекта

1.11.2 Доминантно-негативный эффект

Доминантно-негативный эффект – DNE, способность мутантного p53 физически взаимодействовать с функциональным p53 дикого типа (без мутации) и ингибировать его. Некоторые миссенс-мутации в гене *TP53* оказывают DNE [17]. Для связывания с промотором гена-мишени p53 должен сформироваться тетрамер из белков [62]. Важно отметить, что DNE-ассоциированные миссенс-мутации располагаются не только в домене тетрамеризации, но и в других доменах [10].

Присутствие мутантного p53 в тетрамере значительно снижает способность белка дикого типа связываться с промоторами генов-мишеней p53. Таким образом, доминантно-негативный эффект фактически элиминирует работу p53 дикого типа в клетке и приводит к развитию опухолей в раннем возрасте. В некоторых случаях потеря функции с присутствием или отсутствием DNE дополняется приобретением новой функции и изменением чувствительности к температуре в отношении способности активировать промоторы [63].

Оценка DNE проводится по классификации А. Джакомелли. Существуют другие системы классификации, основанные на способности к активации

промоторов генов WAF1 и RGC [64; 65]. В настоящей работе будет главным образом использована классификация А. Джакомелли [27].

1.11.3 Приобретение новой функции

Эффект приобретения новой функции характеризуется получением мутантным p53 свойств, отличных от p53 дикого типа. Рассмотрим несколько примеров GOF [66].

Один из механизмов – инактивация белков p63/p73 мутантным p53; p63 и p73 – транскрипционные факторы, контролирующие клеточный цикл, их активность регулируется непосредственно p53 [67]. Мутантный p53 связывается с p63/p73 и нарушает способность подавлять пролиферацию клеток и инициировать апоптоз [68].

Другой механизм GOF – контроль экспрессии специфических генов-мишеней. Например, регуляция транскрипции гена множественной лекарственной устойчивости 1, Multiple Drug Resistance 1 (*MDR1*), который придает лекарственную устойчивость клеткам опухоли, содержащим мутации в гене *TP53* [69]. Ген *MDR1* кодирует белок-эффлюкс систему P-gP, которая обладает способностью транспортировать из клетки химиопрепараты. По такому механизму возникает резистентность, например, к оксалиплатину. Белки-посредники регуляторного механизма p53-*MDR1* – DNAJB8, могут распространяться от клетки к клетке при помощи экзосом и передавать способность к резистентности другим клеткам[70].

Это один из многих механизмов работы p53. Дополнительные гены, которые aberrантно регулируются мутантным p53, включают *NFKB1*, *MYC*, *EGR1* и *TERT* [66].

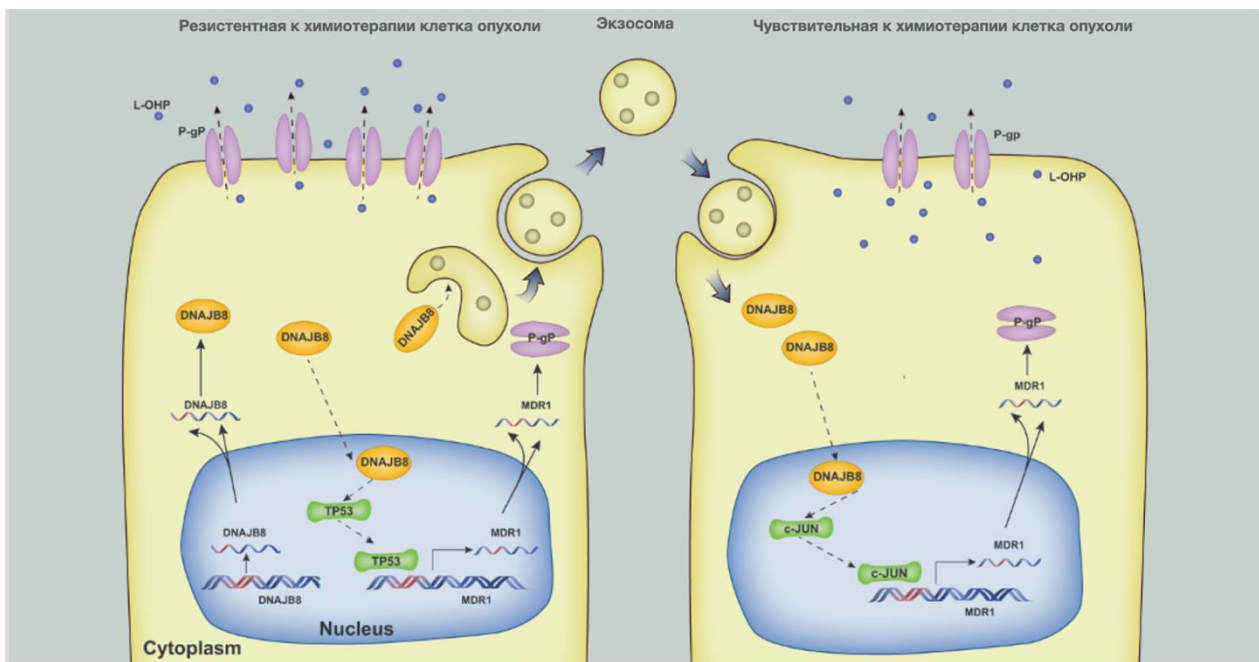


Рисунок 2 – Механизм резистентности по механизму взаимодействия TP53-DNAJB8-MDR1.

P-gP – Член семейства P-гликопротеинов, АТФ- транспортер – эффлюкс-система для оксалиплатина, L-OHP – оксалиплатин [70]

1.11.4 Чувствительность к изменению температуры

Активация в зависимости от изменения температуры влияет на трансактивацию мутантного белка. Существуют характеристики: повышение/понижение температуры снижает активность мутантного белка или изменение температуры не приводит к изменению активности белка [10]. Характеристика интересна для экспериментов *in vitro*, на данный момент продолжается теоретическое накопление данных.

1.12 Влияние мутаций с эффектами LOF, DNE и GOF на экспрессию TP53 при помощи MDM2

Для понимания молекулярного патогенеза СЛФ важно рассмотреть еще один аспект: экспрессия p53 регулируется MDM2 (белком гомологом E3 убиквитинлигазы Mouse Double Minute 2), нарушение связывания с которым приводит к активации p53.

Независимо от механизма действия, патогенные мутации в гене TP53 нарушают функции белка, изменяют взаимодействие MDM2-p53, происходит

накопление мутантного p53, деление клетки ускоряется и нарушается репарация ДНК (Рисунок 3).

В ответ на повреждение ДНК, в норме, тетрамеры p53 дикого типа (wild type p53, Wt p53) связываются с ДНК (левая часть рисунка) и запускают активацию генов, ответственных за репарацию ДНК, остановку клеточного цикла и апоптоз.

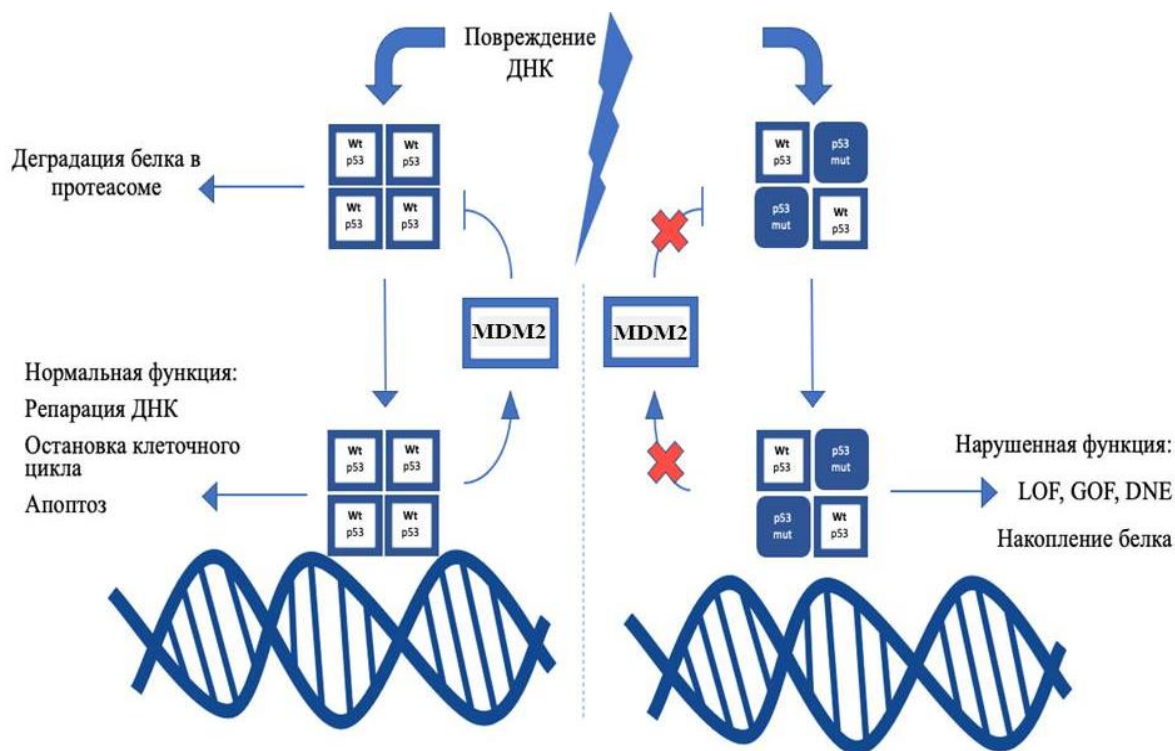


Рисунок 3 – Взаимодействие белков MDM2 и p53

При этой активности, p53 индуцирует экспрессию белка MDM2, способного связываться с комплексом из тетрамеров, после чего p53 деградирует в протеасомах. MDM2 связывается с N-концевым доменом p53 и ковалентно присоединяет убиквитин, тем самым отмечает p53 для деградации ядерными и цитоплазматическими протеасомами. В нормальных клетках p53 нестабилен, период полураспада составляет от 5 до 30 минут [71]. После воздействия, такого как ионизирующее излучение, окислительный стресс и истощение нуклеотидов, p53 и MDM2 фосфорилируются.

В результате взаимодействие белков MDM2-p53 ослабляется. Это уменьшает деградацию p53, позволяя p53 накапливаться, формировать тетрамеры и связываться с определенными последовательностями ДНК.

Функциональные тетрамеры p53 затем индуцируют экспрессию многочисленных генов-мишеней, регулирующих критические клеточные процессы: остановка клеточного цикла, репарация ДНК и апоптоз [72].

В отличие от p53 дикого типа, мутантные p53 (mut p53) не могут эффективно связываться с ДНК (правая часть рисунка), следовательно, происходит накопление p53 [62].

В здоровых клетках уровни экспрессии p53 поддерживаются на низком уровне с помощью механизма отрицательной регуляторной обратной связи, опосредованного MDM2, экспрессия которого индуцируется после связывания p53 с ДНК [73; 74].

При накоплении в клетке тетрамеров образованных мутантными и здоровыми белками все больше проявляется GOF, LOF, DNE [75–78]. Этот механизм важен в патогенезе СЛФ, т.к. однонуклеотидные (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) замены в гене *MDM2* являются важными модификаторами заболевания.

1.13 Проявление эффекта GOF, LOF, DNE в зависимости от вида генной мутации

По данным модифицированных критериев Шомпре [17], снижение экспрессии, потеря функции (LOF) по большей части – результат делеций или инсерций.

Другие эффекты (ниже) в большинстве случаев возникают вследствие замен. Миссенс-мутации влияют на изменение функций белка, таких как: снижение функции (как и описанные выше делеции/инсерции), доминантно-негативный эффект (DNE), приобретение новых функций (GOF).

Многие миссенс-мутации в p53, связанные с СЛФ, находятся в ДНК-связывающем домене, нарушают взаимодействие белка с ДНК и изменяют регуляцию генов-мишеней. Мутации могут находиться в других доменах, эффект каждой на белок уникален.

Итогом всех рассмотренных выше аспектов становится упрощенное деление всех мутаций. Дж. Бужард [17], классифицирует мутации в *TP53* на 2 вида. Мутации миссенс с наибольшей пенетрантностью и другой вид мутаций,

обозначенные общим термином “null” – инактивирующие (в подавляющем большинстве ведут к полной потере функции мутантного белка).

1. Мутации миссенс:

1.1 Миссенс-мутации без доминантно-негативного эффекта;

1.2 Миссенс-мутации с доминантно-негативным эффектом;

2. Инактивирующие мутации: сдвиг рамки считывания или делеции/инсерции без сдвига рамки считывания, нонсенс мутации, транслокации.

Миссенс-мутации без доминантно-негативного эффекта не приводят к инактивации p53, но значительно изменяют трансактивацию. Такие мутации часто ассоциированы с развитием опухолей в молодом возрасте. Средний возраст начала заболевания 23.8 ± 17.7 .

Миссенс-мутации с доминантно-негативным эффектом приводят к DNE, происходит полная инактивация p53 в клетке, пенетрантность мутаций такого класса – самая высокая. Средний возраст начала заболевания 21.3 ± 14.8 лет.

Спектр опухолей: аденокарциномы, карциномы сосудистого сплетения, саркомы мягких тканей, опухоли ЦНС, остеосаркомы.

Аденокарциномы чаще развиваются у носителей миссенс-мутаций без DNE, а карцинома сосудистого сплетения, саркома мягких тканей, опухоли ЦНС, остеосаркомы чаще развиваются при миссенс-мутациях с DNE [8; 79].

В отличие от описанных выше, инактивирующие мутации вызывают опухоли у людей в немного более позднем возрасте. Для инактивирующих мутаций характерна потеря функции продукта пораженного аллеля (то есть один аллель дикого типа в клетке присутствует и частично компенсирует отсутствие активности мутантного). У таких носителей развивается опухоль из числа «core tumor». В случае сдвига рамки считывания или делеций/инсерций без сдвига рамки считывания, нонсенс мутаций, возраст манифестации 28.5 ± 16.4 лет, в случае транслокаций 35.8 ± 18.3 лет согласно модифицированным критериям Шомпре [17].

1.14 Модификаторы СЛФ

Проявление СЛФ зависит не только от специфических мутаций, но и от генетических модификаторов – полиморфизмов или других генетических событий, изменяющих возраст начала заболевания.

Полиморфизм в гене *MDM2* *SNP309* (*rs2279744*, *NM_002392.3:c.14+309T>G*) – генетический фактор-модификатор СЛФ. Вариант *MDM2* *SNP309* *T>G* приводит к увеличению уровня белка MDM2 и его протеазной деградации p53.

Исследование 2006 года коллектива Дж. Бужард (автор модифицированных критериев Шомпре) [80] показало, что у носителей варианта *MDMD2* *SNP309* *G* средний возраст начала опухоли – 19,6 лет, у носителей *MDMD2* *SNP309* *T* – 29,9 лет. Выборка из 61 пациента. В исследовании 2014 года участвовало 195 человек (подобное исследование). Оценивался вклад в гене *MDM2* полиморфизма, *SNP285* (*rs117039* *649*, *NM_002392.3: c.14+285G>C*) совместно с *MDM2* *SNP309*) [80].

Средний возраст возникновения опухоли при одновременном присутствии *SNP285–309* с генотипом *G–G/G–G* равен 23,1 годам, а средний возраст при генотипах *G–T/G–T* и *G–T/C–G* – 27,3 годам, $p=0.044$ (то есть *SNP285* нейтрализует действие *SNP309*).

Вклад полиморфизма *MDMD2* *SNP309* *G* по сравнению с другими аллелями *MDMD2* *SNP309* и одновременным присутствием наследственной мутации в гене *TP53* оказался статистически не значимым [81].

Надежнее изучать вклад обоих модификаторов с генотипом *SNP285G-G* и *SNP309* *G-G*, в случае их одновременного присутствия у человека с наследственной мутацией в гене *TP53* делать вывод, что такой пациент имеет шанс развития опухоли примерно на 5 лет раньше.

Предпринимаются попытки подбора ингибитора белка MDM2 [82].

Еще один модификатор – полиморфизм, дупликация 16 пар оснований в интроне 3 гена *TP53* (*16bp duplication polymorphism in intron 3, PIN3* [*rs17878362*]) и дупликация 5 пар оснований в 3' фланкирующем регионе (*6 bp duplication in 3' flanking region* [*rs17880560*]). В интроне 3 располагаются

регионы, богатые гуанином, они формируют квадруплексы РНК для правильного сплайсинга (одна молекула РНК складывается особым образом, взаимодействуют 4 гуанина при помощи водородных связей в одной плоскости, G4). Эти структуры играют значимую роль в регуляции транскрипции, сплайсинга и стабилизации готовой мРНК [83; 84].

Комплекс G4 в интроне 3 регулирует сплайсинг гена *TP53* пре-мРНК либо в форму, когда сплайсинг осуществлен полностью (fully spliced form, FSp53), либо в форму p53I2, вариант мРНК с сохранением интрона 2 p53I2. Изоформа p53I2 кодирует белок без первых 39 N-концевых остатков, соответствующих домену трансактивации. Полиморфизм оказывает действие только в случае мутации *TP53*. Проявление полиморфизма не наблюдается, если не диагностирован СЛФ [85].

Если в регионе, богатом гуанином (интрон 3) появляется полиморфизм, структура из квадруплексов не образуется и регуляторное действие p53I2 на мутантный p53 прекращается. [86] Результаты исследований показывают, что при наличии хотя бы одного из двух полиморфизмов (*rs17878362* или *rs17880560*) в одном аллеле гена *TP53*, увеличивает возраст возникновения опухоли на 15 лет [87].

Эпигенетические факторы вносят вклад в развитие СЛФ. Гиперметилирование промотора *miR-34A*, регуляторной молекулы микро-РНК в сигнальном пути p53 характерно для СЛФ. Предполагается корреляция между повышенным профилем метилирования и возрастом начала заболевания, однако и эта тема требует глубокого анализа [88].

Другой пример эпигенетической регуляции – *miR-605*. Эта микроРНК играет регуляторную роль в посттрансляционной модификации p53. В *miR-605* может возникать полиморфизм *rs2043556 A>G* [89].

Генотип GG связан с многократным увеличением риска первично-множественных опухолей [90].

Описан перспективный маркер, полиморфизм *XAF1 (E134*/Glu134Ter/rs146752602)*. Ген *XAF1* – опухолевый супрессор. Его обнаружили при исследовании носителей *TP53 R337H* в бразильской популяции [91].

Одновременное носительство указанного полиморфизма и *TP53 R337H* характеризуется ранним началом при широком спектре опухолей [92].

Исследовать вклад полиморфизма *XAF1* необходимо и у носителей других мутаций в гене *TP53*, не только в бразильской популяции. Нарушенная работа двух генов супрессоров может стать результатом раннего начала заболевания вне зависимости от того, какой патогенный вариант в гене *TP53* [30].

1.15 Тканевая специфичность

Одно из первых наблюдений после создания базы данных IARC/МАИР [10] – развитие при СЛФ опухоли из ткани мезенхимальных и эктодермальных зародышевых листков, с риском в 10-1000 раз выше, чем в популяции. Риск развития опухоли из энтодермального зародышевого листка всего в 2-3 раза выше. Это контрастирует с частотой обнаружения мутаций в *TP53* в опухолях толстой кишки (75%), легких (75%), поджелудочной железы (80%) и яичников (100%) – тканей энтодермального происхождения [93].

Существует разница во влиянии на возникновение опухолей у наследственных мутаций в гене *TP53* и соматических [94]. Наследственные мутации *TP53* позиционируются как первые в серии, вызывающих опухоль. Это событие модифицирует клетку, возникают дополнительные мутации, способствующие росту и делению [95]. Спонтанные (соматические) мутации *TP53* обычно не являются первыми в серии, поэтому набор мутаций при малигнизации отличается у опухолей при СЛФ и драйверных соматических, одной из которых может стать мутация в гене *TP53*. Соматическая мутация вносит определенный вклад в эволюцию опухоли, но не является пусковым фактором [96; 97].

Второе наблюдение о тканевой специфичности – опухоли различаются в зависимости от возраста пациента. Адренокортикальные карциномы надпочечников встречаются со 100-кратным риском в возрасте от 6 месяцев до 4 лет. Другие опухоли с идентичным риском: карциномы сосудистого сплетения с 6 месяцев до 3 лет, медуллобластомы от 2 до 9 лет, рабдомиосаркомы от 1 до 4 лет,

С риском в 5-10 раз выше: лейомиосаркомы от 20 до 60 лет, липосаркомы от 1 до 50 лет и опухоли молочной железы от 18 до 45 лет у пациентов с СЛФ [98; 99].

Возраст отражает время активного деления клеток ткани и тканеспецифичных стволовых клеток в мезенхимальном и эктодермальном зародышевых листках (но не в энтодермальном) [100; 101].

Эти данные демонстрируют связь работы гена *TP53* в определенном типе ткани (вероятно, в плюрипотентных клетках), в определенном возрасте и на различных стадиях развития конкретных тканей [93].

1.16 Мозаичные мутации

Наследственная гетерозиготная мутация в гене *TP53* в здоровой ткани обнаруживается в 50% прочтений при помощи метода секвенирования нового поколения (NGS). В каждой клетке присутствует один аллель гена *TP53* дикого типа и один мутантный (50:50). Если присутствуют соматические клетки с разным генотипом, часть несет наследственные мутации – это мозаицизм.

Стандартная процедура выявления гетерозиготных мутаций в гене *TP53*: высокопроизводительное секвенирование ДНК из крови пациентов и обнаружение мутации. Есть исключения в ряде локализаций (ниже).

Если возникает опухоль с наследственной мутацией в гене *TP53*, а при NGS-исследовании вариант обнаруживается в более 50% прочтений, это объясняется потерей здорового аллеля (LOH, loss of heterozygosity) – делеция здорового аллеля вследствие геномной нестабильности, важного феномена в развитии опухоли любой локализации [102].

LOH встречается и в клетках спорадических опухолей. Если пациент предоставил для исследования гистологический материал, а не кровь, то можно взять ткань с различным процентом опухолевых клеток. Если высокий процент опухолевых клеток с LOH, прочтений мутантного аллеля также больше 50% [103]

Решить вопрос, наследственная или соматическая мутация в опухоли позволяет исследование здоровой ткани, она может быть взята из предоставленного парафинового блока или ДНК из крови. Если в здоровой

ткани или ДНК из крови не обнаруживается мутации в гене *TP53*, то мутация соматическая. Если обнаруживается – подтверждается гетерозиготная мутация в гене *TP53*, соответственно, СЛФ [104].

Проводить исследование при помощи NGS не обязательно из 3 типов тканей: крови, ткани опухоли и здоровой ткани, окружающей опухоль одновременно. В подавляющем большинстве случаев достаточно будет исследовать только ДНК из крови для выявления наследственных мутаций в случае, если речь не идет о мозаицизме [105].

Если проведен анализ последовательности ДНК из опухолевого материала при помощи NGS и обнаружен патогенный вариант, исследование ДНК из крови или здоровой ткани – достаточно постановки ПЦР и секвенирования по Сэнгеру (верификации наследственного или соматического статуса мутаций). Такая стратегия – не основная, оптимально сразу проводить исследование наследственных мутаций из ДНК крови [45].

Если у пациента наблюдается мозаицизм (не все ткани содержат наследственную мутацию), обнаружить ее может быть затруднительно. Согласно Европейским рекомендациям ERN GENTURIS [11] всегда нужно допускать наличие мозаичных мутаций у пациентов с аденокортикальным раком, карциномой сосудистого сплетения, раком молочной железы до 31 года и у пациентов с первично-множественными опухолями. Это и есть исключения, когда рекомендуется исследовать все 3 типа ткани одновременно при помощи NGS. Отсутствие мутаций в образце из крови не может гарантировать отсутствие мозаицизма. При указанных локализациях проводится исследование из образца опухоли, здоровой ткани вокруг опухоли и крови одновременно, потому что клетки крови могут не содержать мозаичные мутации [11].

Для проверки мозаицизма, исследование образца из опухоли проводится при помощи NGS. Образцы из крови и здоровой ткани вокруг опухоли могут быть проанализированы при помощи секвенирования по Сэнгеру. Если возникают сомнения при верификации мутации, то применение NGS для образцов из всех трех типов тканей – идеальный подход [106].

Если при мозаицизме в крови не обнаруживаются копии мутантного гена *TP53*, то в опухоли мозаичного организма будет присутствовать наследственная гетерозиготная мутация в гене *TP53* в 50% копий и более (по причине ЛОН); в здоровой ткани, окружающей опухоль – 50% [107].

В настоящий момент далеко не всегда исследование всех трех типов тканей реализуется на практике.

В крови может быть обнаружена мутация в гене *TP53*, представленная в малом проценте прочтений (10-15%), и при этом в опухоли содержится такая же мутация, а в крови и окружающей опухоль здоровой ткани, мутация отсутствует. Следует интерпретировать мутацию как соматическую из свободно циркулирующей ДНК (сцДНК), разрушающихся опухолевых клеток [108; 109].

Еще одна проблема диагностики мозаицизма связана с клональным кроветворением – в стволовых клетках возникают соматические мутации *TP53*, дающие преимущество при гемопоэзе. В таком случае мутация обнаруживается в ДНК из крови в малом проценте копий и не обнаруживается в ДНК из опухоли и здоровой ткани.

Частота клонального кроветворения увеличивается с возрастом, употреблением табака и воздействием химиотерапии или лучевой терапии. Наибольший вклад в развитие клонального кроветворения вносит именно химиотерапия [110; 111].

В исследовании AGO-TR1 у 3 пациентов из 523 с признаками наследственных опухолей обнаружены патогенные мутации в крови, но в малом проценте копий – 0-15%. В ткани опухоли эти мутации не обнаруживались. Все пациенты получали химиотерапевтическое лечение: таксаны и препараты платины. Соответственно, все 3 пациента идентифицированы как пациенты без СЛФ, наличие мутаций объяснено клональным кроветворением, вероятно, спровоцированным химиотерапией. [112].

Оба примера выше – ситуации, когда мутация в *TP53* в ДНК из крови не может быть интерпретирована как СЛФ. Стоит дифференцировать оба случая,

когда малое количество прочтений мутантного *TP53* указывает на мозаицизм при СЛФ – мозаичную мутацию может иметь лишь небольшая фракция клеток крови.

Существует пример семейства, в котором у отца была мозаичная мутация в гене *TP53*, но опухоль у него не развилась. Мозаичная мутация затрагивала гонады отца семейства и передалась потомству как наследственная мутация (то есть у ребенка была представлена как гетерозиготная мутация во всех клетках организма) и у ребенка опухоль развилась. В крови отца мутация обнаруживалась в количестве прочтений 5% [45].

Безусловно, такие случаи сложно верифицировать, можно неправильно определить такого рода мутацию, как особенности кроветворения при химиотерапии или сцДНК из опухоли. Если подобная находка обнаруживается в крови у человека, не страдающего от онкологических заболеваний, это должно натолкнуть на мысль о мозаицизме.

Еще один немаловажный аспект – вклад *de novo* мутаций в СЛФ. Т. Фребур [45] в одном из исследований выяснил, что 48 (14%) из 336 носителей наследственных мутаций в гене *TP53* имели мутации *de novo*, 8 (17%, 8/48) из них – мозаичные мутации. То есть вклад *de novo* мутаций в СЛФ считается вполне значимым и достаточно распространенным.

Вклад мутаций *de novo* в СЛФ в дополнение к неполной пенетрантности усиливает мысль о том, что диагноз СЛФ следует рассматривать, независимо от семейного анамнеза, у пациентов с подозрительными на СЛФ клиническими проявлениями. К ним относятся пациенты с: адренокортикальной карциномой, карциномой сосудистого сплетения, ранний рак молочной железы или первичные множественные опухоли, из спектра СЛФ [105].

Выявление мозаичной мутации в гене *TP53* имеет серьезные последствия для генетического консультирования семей. Возникновение злокачественного новообразования у ребенка или молодого взрослого вызывает тревогу.

Носители мозаичных мутаций могут подвергать потомство тому же риску, что и люди с СЛФ с отсутствием мозаицизма. Идентификация мозаичной мутации требует отношения к пациенту как при СЛФ.

1.17 Структура синдрома Ли-Фраумени

1.17.1 Общие положения

Количество зарегистрированных пациентов с мутацией в гене *TP53* в мире растет с каждым годом из-за распространения молекулярно-генетических тестов, однако в настоящее время данных для анализа структуры СЛФ все еще недостаточно. Случаи СЛФ в мире совершенно точно непропорционально описаны: одним локализациям уделяется большое внимание, а другим – нет, случаи СЛФ остаются нераспознанными.

К этой проблеме относится:

1. Чувствительность критериев – возможность распознать характерные случаи, значительная часть других *TP53*-ассоциированных опухолей не диагностируются должным образом;
2. Возникновение СЛФ в определенных локализациях у представителей различных наций – бразильский эффект основателя *TP53 R337H* и другие случаи детских злокачественных опухолей;
3. Возможность заподозрить и выявить СЛФ в различных странах – наличие крупных онкологических центров, возможность провести сложные генетические исследования.

В настоящей работе для точности описываются данные из базы МАИР/IARC[10] по версии R20 от июля 2019 года, одна из крупнейших в мире. В таблицах ниже объединены локализации, морфологические характеристики и частые мутации. Представлен медианный возраст (делит выборку всех пациентов пополам, 50% всех случаев моложе и старше), чтобы охарактеризовать возраст манифестации, если распределение ассиметричное – не по Гауссу. Отмечен эффект мутации на белок: DNE – доминантно-негативный эффект, LOF – полная потеря функции мутантного белка, notDNE – доминантно-негативный эффект отсутствует, notLOF – частичная потеря функций мутантного белка.

Для анализа использовались 3 таблицы, полученные при применении фильтров возраста диагноза. Для того, чтобы применить фильтры необходимо перейти на вкладку «Search Germline Data», после чего указать в поле

«Individual and Pedigree» три возрастные группы: 1-15 (1 to 15), 16-50 (16 to 50) и 51-100 (51 to 100) перейдя по ссылке: https://tp53.isb-cgc.org/search_germline_mut [113]. После чего появляется возможность скачать таблицу с отдельными зарегистрированными случаями по интересующему признаку – возрасту – и провести анализ по другим критериям.

Вычисления производились при помощи приложения RStudio и команд:

1. Mean – для вычисления среднего возраста;
2. Median – для определения медианы возраста;
3. Range – для определения минимального и максимального возраста.

1.17.2 Возрастная группа 0-15 лет

Таблица 3 – Структура СЛФ в возрастной группе 1-15 лет

Локализация	Общее количество		Морфологическая характеристика	Количество		Мин. возраст начала ЗНО	Макс. возраст начала ЗНО	Средн. возраст начала заболевания	Медиана возраста	Наиболее частые/ характерные мутации при данной локализации	Изменение функции и домен
Опухоли надпочечников	199	Адренокортикальный рак	196	1	15	3.4	2	<i>p.R337H</i> 40,3% (79)	notDNE_notLOF домен тетрамеризации		
								<i>p.R248</i> 5,1% (10)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен		
								<i>p.P152L</i> 4,6% (9)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен		
			Феохромоцитома	2	3	14	8.5	8.5	нет	нет	
			Ганглионейробластома	1	1	1	1	1	нет	нет	
Опухоли мозга	694	159	Астроцитомы	12	2	14	7.3	6.5	нет	нет	
			Карцинома сосудистого сплетения	60	1	14	3.1	2	<i>p.R337H</i> 23,3% (14)	notDNE_notLOF домен тетрамеризации	
									<i>p.R248</i> 11,6% (7)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен	
									<i>p.R175H</i> 5% (3)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен	
			Глиобластома	12	3	15	8.9	10	нет	нет	
			Медуллобластома	39	2	15	8.7	8	<i>p.R248</i> 20,5% (8)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен	
			Примитивная нейроэктодермальная опухоль	10	1	14	8.3	9	нет	нет	
Другие ОГМ/неопределенные ОГМ	26	1	15	6.2	5	нет	нет				
Опухоли мягких тканей	129	Рабдомиосаркома	Эмбриональный подтип	11	1	5	3.2	3	нет	нет	
			Не определен подтип	80	1	15	3.7	2	<i>p.R273H</i> 12,5% (10)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен	

									<i>p.R282W</i> 6,25% (5)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен						
									<i>p.R175H</i> 5% (4)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен						
									Фибросаркома	6	1	10	3.3	2.5	нет	нет
									Липосаркома	7	4	15	8.9	7	<i>p.R282W</i> 33% (2)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен
									Другие саркомы/неопределенные саркомы	25	1	14	6.6	5	<i>p.G245S</i> 8% (2)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен
Остеосаркомы и хондросаркомы (не конечности)	74								<i>p.R248</i> 12,5% (8)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен						
									<i>p.R282W</i> 9,3% (6)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен						
									<i>p.R175H</i> 7,8% (5)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен						
									Хондросаркома	6	10	15	12.5	12.5	нет	нет
									Неопределенные саркомы	4	9	13	10.8	10.5	нет	нет
Гемобласты	34								Острый миелоидный лейкоз	10	2	12	6.2	5	нет	нет
									Гиподиплоидный острый лимфобластный лейкоз	5	11	15	13.2	13	нет	нет
									Другие гемобласты/неопределенные гемобласты	19	3	15	10.1	12	<i>p.Y220C</i> 10,5 % (2)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен
Остеосаркомы и хондросаркомы (конечностей)	22	Остеосаркома	22	5	15	11.9	12.5	нет	нет							
Опухоли нервов	16								<i>p.R248</i> 33% (5)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен						
									Ганглионеврома	1	7	7	7	7	нет	нет
Другие	61	Другие редкие локализации	61	1	15	6.8	5		<i>p.R248</i> 16,4% (10)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен						
									<i>p.R273</i> 8,2% (5)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен						

В структуру 1-15 лет входят 694 описанных случая СЛФ из разных стран. Обращает на себя внимание, что среди них 79 случаев с адренокортикальным раком и 14 с карциномой сосудистого сплетения у носителей наследственной мутации с эффектом основателя *TP53 p.R337H* с DNE, характерной для юга Бразилии. Этих пациентов относительно много, они доживают до репродуктивного возраста [114].

Если взять общую выборку, от 0 до 100 лет, то носителей *TP53 p.R337H* всего 139. В возрастной группе 1-15 лет – 96 случаев *TP53 p.R337H*, действительно преобладают АКК (79/96) и КСС (14/96), только 3 – с другими локализациями (саркома мягких тканей, лейкемия и рак почки). Всего АКК и КСС в возрастной группе 1-15 описано 196 и 60 соответственно. *TP53 p.R337H* в этих локализациях 96/256 (37,5%).

Возраст других носителей *TP53 p.R337H* в количестве 43 (неполная пенетрантность – они старше 18 лет) распределяются в диапазоне от 19 до 72 лет, среди них преобладает РМЖ (19 случаев) и АКК (11 случаев). *TP53 p.R337H* действительно вызывает всего несколько видов опухолей в молодом возрасте. Выводы:

1. Пациентам с этой мутацией обращать внимание при скрининге на 3 локализации: АКК, КСС и РМЖ в течение всей жизни. Минимум 1 раз в год обязательно УЗИ брюшной полости и МРТ всего тела [23];
2. Большое количество этих пациентов стягивает на себя выборку возрастной группы 1-15 лет. АКК и КСС встречаются у носителей других мутаций. Если исключить пациентов из Бразилии с *TP53 p.R337H*, то в возрастной группе АКК и КСС будут оставаться на лидирующих позициях. АКК и КСС – редкие опухоли, часто при диагностике прибегают к определению наследственных мутаций в гене *TP53*.

Современные рекомендации указывают на возможность СЛФ при любых саркомах и опухолях головного мозга у детей. Распространенность СЛФ в данных локализациях не исследована, выявляемость синдрома ниже в сравнении с АКК и КСС (не при каждой опухоли головного мозга (ОГМ) и саркоме проводится тестирование на наличие наследственной мутации в гене *TP53*).

Если исключить долю пациентов с *TP53 p.R337H* из возрастной группы 1-15 лет базы данных МАИР/IARC, останется 117 АКК, 46 КСС и 99 различных опухолей головного мозга (астроцитомы, глиобластомы, медуллобластомы, примитивные нейроэктодермальные опухоли), 129 сарком мягких тканей, 74 остеосарком и хондросарком.

Накопленные современные данные демонстрируют, что саркомы мягких тканей, остеосаркомы, опухоли головного мозга имеют сопоставимые доли с лидирующими АКК и КСС, если исключить долю бразильских пациентов, которые в России не встречаются.

Перечисление опухолей головного мозга, сарком, гемобластозов в составе критериев и рекомендаций дает возможность заподозрить СЛФ. Рекомендации предписывают тестирование на наличие мутации в *TP53* любым пациентам с ОГМ младше 18 лет. Однако ОГМ при СЛФ можно встретить в более позднем возрасте – область не исследована.

При гемобластозах предписано тестирование только для гиподиплоидных острых лимфобластных лейкозов (ОЛЛ), эти случаи имеют высокую степень риска, частоту рецидивов и уникальный кариотип [11]. Случаев острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) по данным МАИР/IARC представлено в два раза больше, чем гиподиплоидного ОЛЛ; выборка по гемобластозам мала и нельзя сделать вывод о распространённости гемобластозов при СЛФ – область также не исследована.

Рекомендации совершенствуются в направлении оценки риска по годам жизни в зависимости от мутации и локализации. Таким образом, появляется вопрос о специфичности мутаций к конкретной локализации вследствие аллельной гетерогенности [115].

Мутации при СЛФ повторяются в разных локализациях часто, указывались в Таблицах 3–9 для демонстрации часто встречающихся вариантов, различной пенетрантности мутаций (меняются или нет в зависимости от возрастной группы), их расположения в гене (какой домен белка затрагивает) и эффекта на функции гена.

В базе данных МАИР/IARC встречаются семейные случаи, когда один вариант у людей, объединенных кровным родством. В таких случаях встречаются опухоли одной локализации, морфологии, возникают у пациентов из примерно в одном возрасте. Происходит это из-за схожей работы сигнального пути *p53*, который поражается по одинаковому сценарию у

родственников. Сигнальный путь p53 работает у не связанных родством людей по-разному.

В Таблице 3 намеренно исключались семейные случаи. Демонстрируются мутации у людей, не связанных родством (или процент семейных случаев присутствовал, но доля несущественна), чтобы не создавать подозрений о тканевой специфичности мутаций, когда редкий вариант повторяется у большого количества родственников с одной локализацией.

В диапазоне 1-15 лет и других возрастных группах нельзя выявить еще одну мутацию, обладающую схожим эффектом с *TP53 R337H* (вызывать опухоли в узком спектре локализаций). Наиболее частые мутации в этой группе располагаются в основном ДНК-связывающем домене и обладают DNE+LOF (доминантно-негативным эффектом и полной потерей функции мутантного белка).

Список опухолей для СЛФ в группе 1-15 лет: АКК, опухоли головного мозга, саркомы, гиподиплоидный ОЛЛ, нейробластома.

Таблица 4 – Частые варианты в возрастной группе 1-15 лет

Кодон	Мутация		Количество пациентов	Процент (всего 646 пациентов 1-15 лет)	Функция домена	Изменение функциональности белка
	На уровне кДНК	На уровне белка				
152	<i>c.455C>T</i>	<i>p.P152L</i>	15	2,32%	ДНК-связывающий домен	DNE_LOF
175	<i>c.524G>A</i>	<i>p.R175H</i>	33	5,11%	ДНК-связывающий домен	DNE_LOF
213	<i>c.637C>T</i> / <i>c.638G>A</i>	<i>p.R213*</i> / <i>p.R213Q</i>	18	2,79%	ДНК-связывающий домен	notDNE_LOF DNE_LOF
220	<i>c.659A>G</i>	<i>p.Y220C</i>	17	2,63%	ДНК-связывающий домен	DNE_LOF
241	<i>c.721T>A</i> / <i>c.722C>T</i>	<i>p.S241T</i> / <i>p.S241F</i>	18	2,79%	ДНК-связывающий домен	DNE_LOF
245	<i>c.733G>A</i>	<i>p.G245S</i>	16	2,48%	ДНК-связывающий домен	DNE_LOF
248	<i>c.742C>T</i> / <i>c.743G>A</i>	<i>p.R248W</i> / <i>p.R248Q</i>	65	10,06%	ДНК-связывающий домен	DNE_LOF
273	<i>c.817C>T</i> / <i>c.818G>A</i>	<i>p.R273C</i> / <i>p.R273H</i>	45	6,97%	ДНК-связывающий домен	DNE_LOF
282	<i>c.844C>T</i>	<i>p.R282W</i>	29	4,49%	ДНК-связывающий домен	DNE_LOF
306	<i>c.916C>T</i>	<i>p.R306*</i>	14	2,17%	Домен тетрамеризации	notDNE_LOF
337	<i>c.1010G>A</i>	<i>p.R337H</i>	99	15,33%	Домен тетрамеризации	notDNE_LOF

В Таблице 3 – 694 пациента, а в Таблице 4 – 646. Расхождение в количестве из-за мутаций в интронах и других некодирующих областях. В Таблице 3 пациенты с мутациями любых областях гена, в Таблице 4 – только в кодирующей последовательности.

Таблицы по каждой возрастной группе с мутациями в некодирующей части гена *TP53* в Приложении А, Б, В. Описанные мутации располагаются в пределах ста нуклеотидов от начала и конца каждого экзона.

При СЛФ встречаются делеции некодирующих экзонов. Примечателен случай астроцитомы в 3 года, у пациента обнаружилась делеция 1 экзона. Встречаются мутации в промоторных областях (Приложение А). Описана дупликация первого промотора у пациента с остеосаркомой в 11 лет (Приложение А).

Последовательности интронов (первые 100 нуклеотидов от начала/конца экзона) и 1 экзон (всегда остается нетранскрибируемым) включаются в протоколы NGS для повышения качества молекулярной диагностики.

1.17.3 Возрастная группа 16-50 лет

Таблица 5 – Структура СЛФ в возрастной группе 16-50 лет

Локализация	Общее количество		Морфологическая характеристика	Количество	Мин. возраст начала ЗНО	Макс возраст начала ЗНО	Средний возраст начала заболевания	Медиана возраста	Наиболее частые/ характерные мутации при данной локализации	Изменение функции и домен	
Рак молочной железы	1352	644	Карцинома in situ	23	24	49	35	36	<i>p.T125T</i> 8,7% (2)	notDNE_notLOF ДНК-связывающий домен	
			Инфильтрирующая протоковая карцинома	115	19	49	32.5	32	<i>p.R175H</i> 5,2% (6)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен	
									<i>p.R273C</i> 4,3% (5)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен	
									<i>p.R273H</i> 3,5% (4)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен	
									<i>p.R282W</i> 3,5% (4)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен	
										<i>p.G245S</i> 2,6% (3)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен
			Рак Педжета	6	19	42	28	24.5	нет	нет	
Филлоидная опухоль	15	17	31	24	27	<i>p.R248W</i> 26,7% (4)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен				
Карцинома, неуточненная	473	16	50	32.9	32	<i>p.R248Q</i> 4,9% (23)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен				
						<i>p.R248W</i> 4,4% (21)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен				
						<i>p.R181C</i> 3,6% (17)	notDNE_notLOF ДНК-связывающий домен				

									<i>p.G245S</i> 3,4% (16)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен	
										<i>p.R213*</i> 2,3% (11)	notDNE_LOF ДНК-связывающий домен
										<i>p.R273H</i> 2,3% (11)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен
			Другие	12	19	48	32.9	30.5	<i>p.R273H</i> 16,7% (2)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен	
Саркомы мягких тканей	138	Лейомиосаркома	29	18	49	37.5	39	<i>p.R248Q</i> 10% (3)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен		
		Липосаркома	13	18	48	33	32	<i>p.G245S</i> 15,4% (2)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен		
		Злокачественная фиброзная гистиоцитома	11	19	48	34.9	36	<i>p.G245S</i> 18,2% (2)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен		
		Рабдомиосаркома	12	16	48	30	30.5	<i>p.R273H</i> 16,7% (2)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен		
		Саркома неуточненная	51	17	50	32	31	<i>p.R306*</i> 9,8% (5)	notDNE_LOF Домен тетрамеризации		
		Веретенклеточная саркома	5	26	37	32.6	34	<i>p.R213*</i> 60% (3)	notDNE_LOF ДНК-связывающий домен		
		Другие	17	17	49	34.9	35	<i>p.R175H</i> 11,8% (2) <i>p.R248Q</i> 11,8% (2)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен DNE_LOF ДНК-связывающий домен		
Опухоли мозга	94	Астроцитوما	34	16	50	30.5	30	<i>p.R175H</i> 11,8% (4)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен		
		Неуточненная ОГМ	21	20	47	31.7	29	<i>p.R248W</i> 9,5% (2)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен		
								<i>p.R273C</i> 9,5% (2)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен		
		Глиобластома	18	17	50	27.7	27	нет	нет		
		Карцинома сосудистого сплетения	4	17	29	24.3	25.5	нет	нет		
		Злокачественная глиома	5	20	35	28.6	30	нет	нет		
		Олигодендроглиома	6	24	41	35	37	нет	нет		
Другие	6	19	45	28.5	25.5	нет	нет				
Кости и суставные хрящи (не конечности)	73	Хондросаркома	4	16	38	27.8	28.5	нет	нет		
		Остеосаркома	58	16	49	23.9	20	<i>p.R282W</i> 8,6% (5)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен		
<i>p.R248Q</i> 5,2% (3)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен										

									<i>p.R248W</i> 5,2% (3)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен
		Другие	11	16	49	31	28	нет	нет	нет
Легкие	43	Аденокарцинома	11	18	48	33.5	34	<i>p.G245S</i> 27,3% (3)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен	
		Бронхоальвеолярный РЛ	4	17	34	27	28.5	<i>p.R273H</i> 50% (2)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен	
		Неуточненный РЛ	25	22	50	38	38	<i>p.R248W</i> 12% (3)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен	
								<i>p.R273C</i> 8% (2)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен	
								<i>p.Y220C</i> 8% (2)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен	
Другие	3	28	40	32.7	30	нет	нет			
Неясной первичной локализации	43	РМЖ или РЯ	17	23	46	33.5	33	<i>p.R248W</i> 11,8% (2)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен	
		Саркома неуточненная	7	20	39	31	31	нет	нет	
		Другие	19	25	50	32	31	<i>p.R175H</i> 26% (5)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен	
Другие редкие локализации	317		317	16	50	33	33	<i>p.R248Q</i> 5,9% (19)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен	
								<i>p.R248W</i> 4,7% (15)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен	
								<i>p.R273H</i> 4,4% (14)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен	
								<i>p.R273C</i> 4,4% (14)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен	
								<i>p.R175H</i> 3,8% (12)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен	
								<i>p.R196*</i> 2% (7)	notDNE_LOF ДНК-связывающий домен	
								<i>p.R282W</i> 2% (7)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен	

Группа 16-50 лет гетерогенна. В ней, как и в предыдущей группе, чаще встречаются мутации с DNE+LOF (с доминантно-негативным эффектом и полной потерей функции мутантного белка) в ДНК-связывающем домене.

Накопленных данных по РМЖ в версии R20 МАИР/IARC [10] достаточно, чтобы разделить пациенток с РМЖ на группы в зависимости от морфологии и

рецепторного статуса. Но эти данные плохо представлены. Так, большую часть занимает доля неуточненного РМЖ.

Все случаи РМЖ разделены по морфологии опухоли, в Таблице 5 не указаны общие показатели возраста для всех 644 описанных случаев РМЖ. Средний возраст – 32,7 лет, *медианный* – 31 год; максимальный и минимальный – 16 и 50 лет соответственно. Модифицированные критерии Шомпре [17] рекомендуют обязательное тестирование СЛФ при РМЖ до 31 (без семейного анамнеза).

31 год в критериях – медианный возраст, выделяет характерные РМЖ и затрагивает 50% пациенток. Пациентам старше 31 тестирование проводится на усмотрение врача. Если повысить возраст диагностики в модифицированных критериях Шомпре, то снизится чувствительность. Половина случаев РМЖ при СЛФ возникает позже 31, стоит обсуждать это с пациентками и искать возможность проведения теста при наличии подозрений.

Случаи молодых *TP53*-ассоциированных РМЖ могут быть похожи на *BRCA*-ассоциированные РМЖ (манифестируют в раннем возрасте в сравнении со спорадическими случаями). Усложняют процесс диагностики и вклад мутаций *de novo* – отсутствие семейного анамнеза, а также мозаичные мутации.

Тестирование проводят, опираясь не только на критерии, но и на частоту рецидивов в других локализациях, помимо РМЖ.

В версии R20 есть возможность оценить структуру опухолей в зависимости от рецепторного статуса РМЖ, он описан у 104 подробно. Всего случаев с описанием рецепторного статуса больше, однако, в некоторых случаях был указан только «люминальный тип В» без статуса Ki-67, что не давало возможность однозначно сделать вывод о статусе *HER2* (люминальный тип В позитивный/негативный). В некоторых – статус *HER2* не указан или неизвестен. Они удалены из выборки. Выбраны те, где ясен статус всех трех рецепторов (Таблица 6), а значение *HER2* – 3 балла (далее – 6).

Исследования рецепторного статуса в мировой практике проводились, но выборки ограничены – десятки пациенток (количество в R20 превышает даже с учетом фильтра) [35; 116; 117].

Таблица 6 – Рецепторный статус РМЖ в возрастной группе 16-50 лет

Локализация	Общее количество с указанием рецепторного статуса	Рецепторный статус	Количество	Мин. возраст начала ЗНО	Макс возраст начала ЗНО	Средний возраст начала заболевания	Медиана возраста	Наиболее частые/ характерные мутации при данной локализации	Изменение функции и домен
Рак молочной железы	104	ER-PR-HER2 – 0б	17 (16,3%)	16	49	33	33.5	<i>p.R248</i> 17,6% (3)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен
								<i>p.R273</i> 11,8% (2)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен
		ER-PR-HER2 – 3б	33 (31,7%)	18	50	33.8	33	<i>p.R248</i> 9,1% (3)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен
								<i>p.R181C</i> 6,1% (2)	notDNE_notLOF ДНК-связывающий домен
		ER-PR+HER2 – 0б	2 (1,9%)	23	46	34	33.5	нет	нет
		ER-PR+HER2 – 3б	4 (3,8%)	22	47	34.9	35	нет	нет
		ER+PR-HER2 – 0б	2 (1,9%)	17	50	31	31	нет	нет
		ER+PR-HER2 – 3б	4 (3,8%)	17	45	30	28	нет	нет
		ER+PR+HER2 – 0б	14 (13,5%)	18	49	31.7	30	<i>p.R181</i> 21,4% (3)	notDNE_notLOF ДНК-связывающий домен
								<i>p.R175H</i> 14,2% (2)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен
		ER+PR+HER2 – 3б	28 (26,9%)	18	50	31	30	<i>p.R248</i> 10,7% (3)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен
								<i>p.Y220C</i> 10,7% (3)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен
								<i>p.R306*</i> 11,1% (2)	notDNE_LOF Домен олигомеризации

Выборка мала для адекватной оценки РМЖ с определенным рецепторным статусом. В Таблице 6 представлены все случаи, включая СЛФ у родственников. Отмечается, что у родственников в большинстве случаев возникает РМЖ примерно в одинаковом возрасте, имеют одинаковую морфологию и рецепторный статус. Весомый вклад в выборку составляют всего 4 категории (выделены жирным шрифтом). Одинаковые доли у трижды негативных РМЖ и **ER+PR+HER2 – 0б** (16,3% и 13,5% соответственно). Большой вклад вносят **ER+PR+HER2 – 3б** и **ER-PR-HER2 – 3б** (26,9% и 31,7% соответственно).

Учитывая, что случаи **ER+PR+HER2 – 3б** встречаются редко, то характерный статус РМЖ при СЛФ – это пациентки с рецепторным статусом **ER+PR+HER2 – 3б** и **ER+PR+HER2 – 0б**. В реальности необходимо учитывать,

что *TP53*-ассоциированный РМЖ имеет абсолютно любой рецепторный статус. Трижды негативные случаи характерны для *BRCA*-ассоциированных РМЖ, однако СЛФ может встретиться при таком рецепторном статусе.

В Таблице 7 все мутации – частые варианты и не могут объяснить возникновение РМЖ с конкретным рецепторным статусом.

Другие группы опухолей в группе 16-50 лет преимущественно саркомами, ОГМ и рак легкого (РЛ). Главная отличительная черта всех групп – манифестация преимущественно в молодом возрасте, по сравнению со спорадическими случаями. О раке легкого сведения появились после 2018 года, ранее локализация не входила в структуру СЛФ.

Таблица 7 – Частые варианты возрастной группы 16-50 лет

Кодон	Мутация		Количество пациентов	Процент (всего 1209 пациентов 16-50 лет)	Функция домена	Изменение функциональности белка
	На уровне кДНК	На уровне белка				
133	<i>c.398T>C</i>	<i>p.M133T</i>	25	2,07%	DNE_LOF	ДНК-связывающий домен
175	<i>c.524G>A</i>	<i>p.R175H</i>	66	5,46%	DNE_LOF	ДНК-связывающий домен
181	<i>c.541C>T</i>	<i>p.R181C</i>	28	2,32%	notDNE_notLOF	ДНК-связывающий домен
196	<i>c.586C>T</i>	<i>p.R196*</i>	25	2,07%	notDNE_LOF	ДНК-связывающий домен
213	<i>c.637C>T / c.638G>A</i>	<i>p.R213* / p.R213Q</i>	45	3,72%	notDNE_LOF DNE_LOF	ДНК-связывающий домен
220	<i>c.659A>C</i>	<i>p.Y220S</i>	31	2,56%	DNE_LOF	ДНК-связывающий домен
245	<i>c.733G>A</i>	<i>p.G245S</i>	48	3,97%	DNE_LOF	ДНК-связывающий домен
248	<i>c.742C>T / c.743G>A</i>	<i>p.R248W / p.R248Q</i>	120	9,93%	DNE_LOF	ДНК-связывающий домен
273	<i>c.817C>T / c.818G>A</i>	<i>p.R273C / p.R273H</i>	95	7,86%	DNE_LOF	ДНК-связывающий домен
282	<i>c.844C>T</i>	<i>p.R282W</i>	38	3,14%	DNE_LOF	ДНК-связывающий домен
306	<i>c.916C>T</i>	<i>p.R306*</i>	30	2,48%	notDNE_LOF	Домен тетрамеризации
337	<i>c.1010G>A</i>	<i>p.R337H</i>	43	3,56%	notDNE_notLOF	Домен тетрамеризации

Если попробовать выявить мутации с тканевой специфичностью или более свойственные для возрастной группы 16-50 лет, то сделать это не представится возможным: гетерогенность локализаций и мутаций слишком велика. Частые варианты (в Таблице 7), отличаются от ранее описанной возрастной группы несколькими новыми позициями в кодонах: 133, 181, 196.

Исчезают варианты в: 152, 241 кодонах.

Сохраняются в: 175, 213, 220, 245, 248, 273, 282, 306, 337 кодонах.

Из 1352 случаев (в Таблице 5), описаны 1209 мутаций в кодирующей последовательности (в Таблице 7). 143 случая включают мутации в интронах и прочие (Приложении Б).

Список опухолей, характерных для СЛФ в группе 16-50 лет: РМЖ, опухоли головного мозга, саркомы, рак легкого преимущественно в молодом возрасте.

1.17.4 Возрастная группа старше 50 лет

Последняя возрастная группа – наиболее сложная для диагностики.

Таблица 8 – Структура СЛФ в возрастной группе старше 50 лет

Локализация	Общее количество	Морфологическая характеристика	Количество	Мин. возраст начала ЗНО	Макс. возраст начала ЗНО	Средний возраст начала заболевания	Медиана возраста	Наиболее частые/характерные мутации при данной локализации	Изменение функции и домен
Рак молочной железы	42 (18,1%)	Инфильтративная протоковая карцинома	5	51	63	56.6	56	нет	нет
		РМЖ неуточненный	37	51	69	59.9	59	<i>p.R273</i> 13,5% (5)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен
								<i>p.R181C</i> 10,8% (4)	notDNE_notLOF ДНК-связывающий домен
								<i>p.P82L</i> 8,1% (3)	notDNE_notLOF Домен богатый пролином
								<i>p.R213Q</i> 8,1% (3)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен
<i>p.G245S</i> 8,1% (3)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен								
Рак легкого	28 (12,1%)	Аденокарцинома	8	51	73	57.5	55	<i>p.H179Y</i> 25% (2)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен
		Чешуйчатоклеточный рак	4	51	79	64.8	64.5	нет	нет
		Неуточненный РЛ	16	51	73	57.9	55	<i>p.R248</i> 12,5% (2)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен
Саркомы мягких тканей	28 (12,1%)	Лейомиосаркома	12	53	71	61	60	<i>p.R158L</i> 16,7% (2)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен
								<i>p.R248</i> 16,7% (2)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен
		Саркома неуточненная	13	52	62	57.8	58	<i>p.R248</i> 23,1% (3)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен
Неуточненные саркомы	3	51	57	54	54	нет	нет		
Рак кожи	15 (6,5%)	Базально-клеточная карцинома	5	62	76	71	73	нет	нет
		Меланома	3	53	65	57.7	55	нет	нет
		Неуточненные опухоли кожи	7	52	71	61.7	63	<i>p.R273C</i> 28,5% (2)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен
Опухоль	14 (6%)	Астроцитомы	3	54	54	54	54	нет	нет

головного мозга			Глиобластома	9	51	74	63	64	<i>p.R158</i> 22% (2)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен
			Неуточненная ОГМ	2	51	67	59	59	нет	нет
Опухоли яичников	14 (6%)		Цистаденокарцинома	6	51	76	62.8	62	нет	нет
			Цистаденома	1	79	79	79	79	нет	нет
			Неуточненный РЯ	7	51	79	61.7	59	<i>p.R175H</i> 28,5% (2)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен
Гемобласты	12 (5,2%)		Острый миелоидный лейкоз	7	51	80	58.6	52	нет	нет
			Миелодиспластический синдром	2	52	54	53	53	нет	нет
			Другие / неуточненные гемобласты	3	51	60	56.7	59	нет	нет
Рак простаты	11 (4,7%)		Неуточненный рак простаты	11	51	66	57	55	нет	нет
Другие редкие локализации	68 (29,3%)	Другие редкие локализации	68	51	85	61.5	60	<i>p.R337H</i> 10,2%(7)	notDNE_notLOF Домен тетрамеризации	
								<i>p.R283C</i> 4,4% (3)	notDNE_notLOF ДНК-связывающий домен	
								<i>p.R306*2</i> ,9% (2)	notDNE_LOF Домен олигомеризации	
								<i>p.T125T</i> 2,9% (2)	notDNE_notLOF ДНК-связывающий домен	
								<i>p.R158</i> 2,9% (2)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен	
								<i>p.R213Q2</i> ,9% (2)	DNE_LOF ДНК-связывающий домен	

Группа мала по численности и гетерогенна. Чаще, чем в предыдущих группах встречаются мутации не в ДНК-связывающем домене и notDNE + notLOF (без ДНК-негативного эффекта и без полной потери функции белка).

В структуре группы самой распространенной локализацией остается РМЖ, после которого следует рак легкого. По мере накопления данных сформировались характеристики РЛ при СЛФ. Это преимущественно некурящие люди с немелкоклеточным раком легкого. Часто встречаются драйверные мутации в гене *EGFR*, такие как *L858R*, *ex19del*. Важно отметить, описана резистентность к ингибиторам тирозинкиназы (ТКИ). Ингибиторы первого и второго поколения эффективны ограниченное время или неэффективны. Осимертиниб имеет лечебный эффект, но непродолжительное время [118; 119]. Резистентность объясняется вторичными патогенными мутациями в гене *EGFR*.

Рак предстательной железы при СЛФ ассоциирован с резистентностью к химиолучевой терапии, антиандрогенам. Прогноз хуже, рекомендуется прибегать к агрессивной лечебной тактике [120].

Диагностировать СЛФ старше 50 лет сложно – сходство со спорадическим опухолями.

Необходимо больше сведений по следующим ЗНО: раку яичников, гемобластозам, раку кожи, ассоциированными с СЛФ для определения особенностей (описаны рак простаты и рак легкого выше). Группа ОГМ гетерогенна и требует накопления сведений. Нет характерных для этой возрастной группы частых вариантов.

В описанной выше статье А. Амаду [12] упоминается, что старшая возрастная группа характеризуется относительно частым возникновением опухолей поджелудочной железы и рака толстой кишки. В версии R20 эти локализации не характерны для СЛФ (редкие).

Таблица 9 – Частые варианты возрастной группы старше 50 лет

Кодон	Мутация		Количество пациентов	Процент (всего 216 пациентов 51-100 лет)	Функция домена	Изменение функциональности белка
	На уровне кДНК	На уровне белка				
110	<i>c.329G>T</i>	<i>p.R110L</i>	5	2,31%	ДНК-связывающий домен	notDNE_LOF
152	<i>c.455C>T</i>	<i>p.P152L</i>	5	2,31%	ДНК-связывающий домен	DNE_LOF
158	<i>c.473G>A</i>	<i>p.R158H</i>	8	3,70%	ДНК-связывающий домен	DNE_LOF
175	<i>c.524G>A</i>	<i>p.R175H</i>	9	4,17%	ДНК-связывающий домен	DNE_LOF
181	<i>c.541C>T</i>	<i>p.R181C</i>	8	3,70%	ДНК-связывающий домен	notDNE_notLOF
213	<i>c.638G>A</i>	<i>p.R213Q</i>	16	7,41%	ДНК-связывающий домен	DNE_LOF
235	<i>c.704A>G</i>	<i>p.N235S</i>	6	2,78%	ДНК-связывающий домен	notDNE_notLOF
238	<i>c.713G>A</i>	<i>p.C238Y</i>	5	2,31%	ДНК-связывающий домен	DNE_LOF
245	<i>c.733G>A</i>	<i>p.G245S</i>	10	4,63%	ДНК-связывающий домен	DNE_LOF
246	<i>c.736A>G</i>	<i>p.M246V</i>	6	2,78%	ДНК-связывающий домен	DNE_LOF
248	<i>c.743G>A</i>	<i>p.R248Q</i>	11	5,09%	ДНК-связывающий домен	DNE_LOF
273	<i>c.817C>T</i>	<i>p.R273C</i>	14	6,48%	ДНК-связывающий домен	DNE_LOF
283	<i>c.847C>T</i>	<i>p.R283C</i>	9	4,17%	ДНК-связывающий домен	notDNE_notLOF
306	<i>c.916C>T</i>	<i>p.R306*</i>	5	2,31%	Домен тетрамеризации	notDNE_LOF
337	<i>c.1010G>A</i>	<i>p.R337H</i>	13	6,02%	Домен тетрамеризации	notDNE_notLOF
382	<i>c.1146del</i>	<i>p.K382fs</i>	5	2,31%	Домен отрицательной регуляции	Неклассифицированная мутация

16 случаев в мире обнаружены в интронах (Приложение В).

Лечение СЛФ имеет критически важные особенности, будут представлены ниже.

Список опухолей, характерных для СЛФ в группе старше 50 лет: РМЖ, опухоли простаты, рак легкого, саркомы мягких тканей и опухоли головного мозга.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 План работы и общее описание дизайна исследования

Дизайн исследования 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.

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 из крови);
9. Проанализированы полученные результаты.

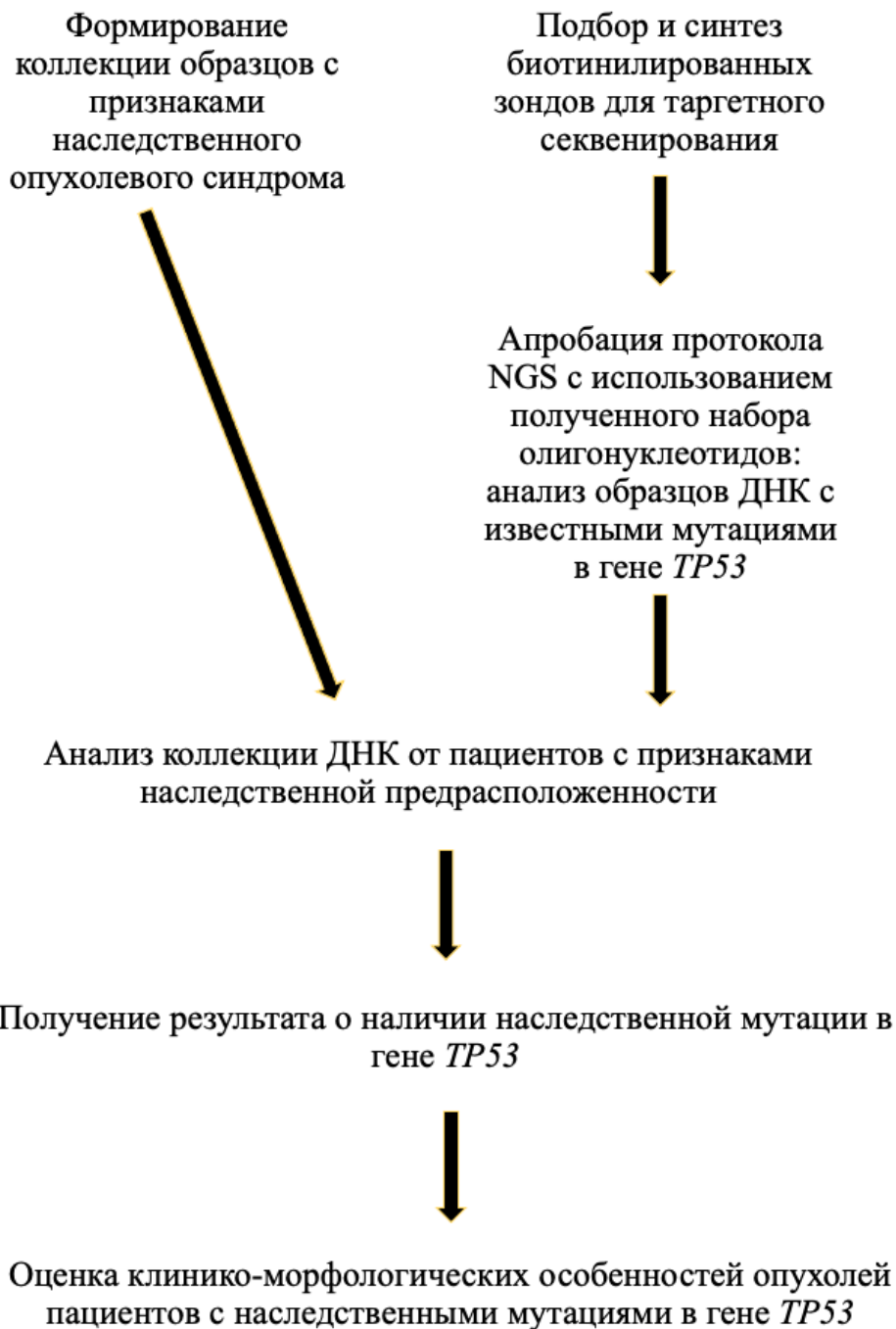


Рисунок 4 – Схема основных этапов исследования

2.2. Материалы

2.2.1 Коллекция образцов

Коллекция образцов:

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

2.2.2 Обоснование выбора образцов в отдельных локализациях

Образцы от пациентов с ОГМ и другими локализациями, не связанных с РМЖ, были выбраны по примеру А. Амаду (Рисунок 5) [12].

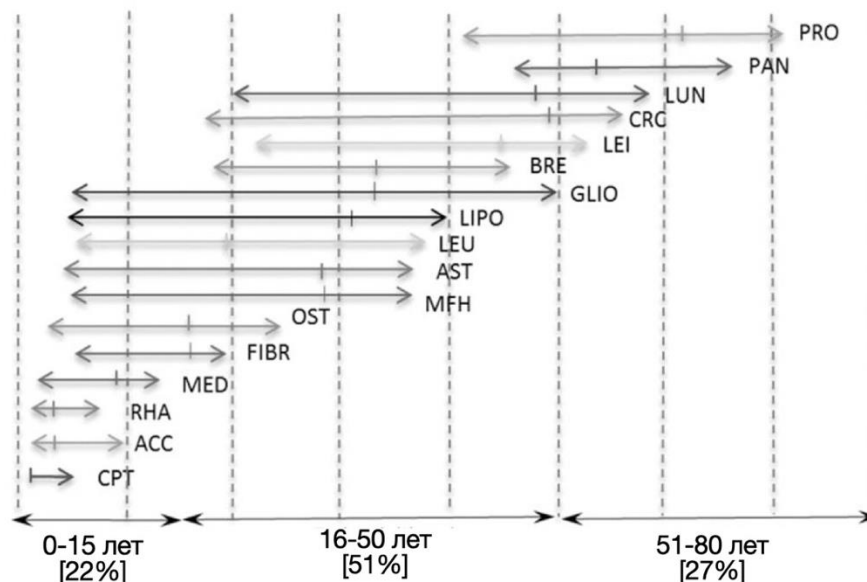


Рисунок 5 – Распределение ЗНО у носителей мутаций в гене TP53

Стрелки указывают диапазон возраста, в течение которого происходит 75% случаев ЗНО в данной локализации. Вертикальные столбики на каждой стрелке: средний возраст при постановке диагноза.

ACC – аденокарцинома; AST - астроцитомы; BRE – рак молочной железы; CPT – карцинома сосудистого сплетения; CRC – колоректальный рак; FIBR - фибросаркома; GLIO - глиобластома; LEI - лейомиосаркома; LEU - лейкемия; LIPO - липосаркома; LUN – рак легкого; MED - медуллобластома; MFH – злокачественная фиброзная гистиоцитома; OST - остеосаркома; PAN – рак поджелудочной железы; PRO – рак предстательной железы; RHA – рабдомиосаркома. По материалам А. Амаду [12]

В возрастную группу 0-15 лет включались пациенты с остеосаркомами и рабдомиосаркомами – эти опухоли ассоциированы с СЛФ в таких возрастных границах.

75% всех TP53-ассоциированных астроцитом встречаются в возрасте от 5 до 40 лет [12]. Астроцитомы в группе 0-15 лет выбраны от пациентов старше 5 лет. В группе 16-50 лет исследовались в возрасте пациентов от 16 до 40 лет.

75% всех TP53-ассоциированных глиобластом встречаются в возрасте от 5 до 40 лет [12]. Глиобластомы в группе 0-15 лет выбраны от пациентов старше 5 лет. В группе 16-50 лет исследовались в возрасте пациентов от 16 до 50 лет.

Опухоли предстательной железы набраны от пациентов старше 50 лет, главное условие – наличие семейного анамнеза.

В выборке РМЖ (1726 образца) возраст пациенток варьирует от 23 до 50 лет. Часть имела первично множественные опухоли, одна из которых – РМЖ.

Количество пациенток с РМЖ до 31 года включительно составило 124 из 1726. 1602 образца от пациенток старше 31 года. Количество с первично множественными злокачественными опухолями (ПМЗО), одно из которых РМЖ – 93, опухоли представлены широким спектром локализаций. Помимо РМЖ у разных пациенток диагностированы: рак щитовидной железы, рак толстой кишки, гастроинтестинальные стромальные опухоли, рак шейки матки, рак эндометрия, рак яичников, рак матки, меланома, рак поджелудочной железы. Из 93 образцов с первично-множественными опухолями, 51 случай – только билатеральный РМЖ.

61 из 124 пациенток с РМЖ до 31 года включительно имели семейный анамнез. Из 1602 пациенток старше 31 года, 635 имели семейный анамнез. Требования к семейному анамнезу такие же, которые применялись к пациентам с опухолями предстательной железы.

Требования к семейному анамнезу менее специфические, в сравнении международными стандартами, например, модифицированными критериями Шомпре.

2.2.3 Подход к диагностике наследственных мутаций

Для тестирования СЛФ все образцы ДНК выделяли из крови. При помощи таргетного секвенирования анализировали последовательность трех генов: *BRCA1/2* (коммерческая панель) и *TP53* («синтезированная панель»).

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» 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.

2.3 Методы исследования

2.3.1 Диагностические методики в исследовании

1. Высокопроизводительное секвенирование (Next Generation Sequencing, NGS) – техника определения нуклеотидной последовательности ДНК. Технология секвенирования нового поколения позволяет проанализировать последовательность одновременно нескольких генов – главное отличие от других методов секвенирования. В данном исследовании этот метод – основной. Принципиальные технические положения рассмотрены ниже.

2. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – метод, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале. ПЦР имеет значительное количество вариантов, в настоящем исследовании использовалась для предварительной диагностики распространённых в российской популяции мутаций в генах *BRCA1/2* перед NGS тестированием.

3. Секвенирование по Сэнгеру (метод обрыва цепи) позволяет определять последовательность фрагментов ДНК небольшой длины (до 1000 п.о.). Технология секвенирования по Сэнгеру позволяет проанализировать короткий участок генома, метод точный и востребованный – использовался для перепроверки обнаруженных наследственных мутаций в гене *TP53* при помощи NGS и для подтверждения мутаций в генах *BRCA1/2* в процессе ПЦР-диагностики.

2.3.2 Выделение ДНК из цельной крови

Для выделения ДНК использовалась цельная кровь. Пробирка для крови содержала антикоагулянт ЭДТА, на 1 мл крови – 30 мкл.

Кровь (3 мл) добавляли в фалькон на 15 мл, затем 12 мл холодной (+4 С) дистиллированной воды. Перемешивали (в руках); центрифугировали на 1,5 тыс. об/мин, 8 мин. Супернатант аккуратно сливали (в банку с 3% хлорамином).

К осадку добавляли 1100 мкл 10% раствора «тритона X-100» (10 ммоль Tris-HCl (pH=8.0), 0,1 ммоль ЭДТА, 10% «тритон X-100»); ресуспендировали и переносили в чистые пробирки на 2 мл.

Осадок в пробирках на 2 мл получали центрифугированием на 12 тыс. об/мин, 5 мин. Супернатант удаляли из пробирки, к осадку добавляли 500мкл 1x TE (10 ммоль Tris-HCl (pH=8.0), 0,1 ммоль ЭДТА), 25 мкл 10% додецилсульфата натрия, 10 мкл протеиназы К (20мкг/мл); экспозиция в термостате на +55°C 12 часов.

После экспозиции к раствору добавляли 200 мкл 5M NaCl и 700мкл хлороформа, перемешивали руками, не встряхивая. Затем, центрифугировали на 12 тыс. об/мин, 5 мин. Супернатант переносили в чистые пробирки на 1,5 мл.

Для осаждения ДНК к раствору добавляли 700 мл изопропанола, перемешивали в руках, центрифугировали на 12 тыс. об/мин, 5 мин. На дне формировался белый осадок из ДНК. Супернатант удаляли дозатором на 1000 мкл.

К осадку добавляли 1 мл этанола, перемешивали на шейкере Bio-San 15 мин и центрифугировали на 12 тыс. об/мин, 5 мин. Супернатант удалялся дозатором на 1000 мкл, осадок высушивался при комнатной температуре, после чего растворялся в 200 мкл 1x TE.

2.3.3 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).

2.3.4 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.

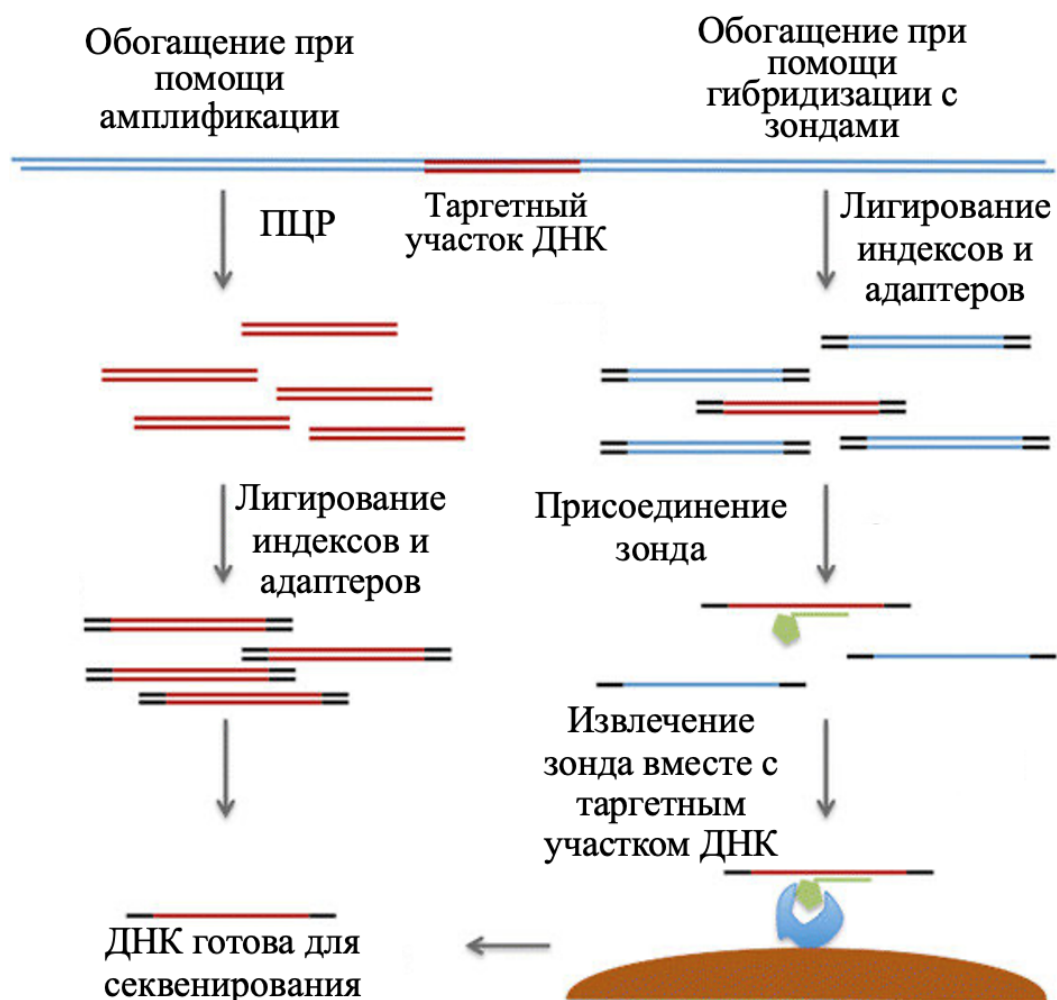


Рисунок 6 – Принципиальная разница в подходах обогащения для таргетного секвенирования (по материалам Г. Уайли [121])

Если применяется техника обогащения при помощи амплификации (амплификационной панели), проводят мультиплексную ПЦР на целевой области генома. Происходит увеличение числа ампликонов – копий участков целевого гена. Достигается это при использовании набора уникальных праймеров (олигонуклеотидов для инициации ПЦР – затравок), комплементарных к целевому 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 большую температуру раствора необходимо поддерживать, чтобы затравка присоединилась к целевой последовательности гена.

Равномерное покрытие всей последовательности обеспечивает прочтение каждого нуклеотида. При наличии GC-богатых областей, возникает сложность взаимодействия праймера и ДНК. Может потребоваться большая 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 целевой последовательности. Если праймер недостаточно специфичен, он отжигается на других участках генома, происходит накопление неспецифического 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).

Амплификационная 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 добавляется магнитные частицы, содержащие на своей поверхности стрептавидин.

Стрептавидин имеет способность связываться с биотином. Зонд с биотином, в свою очередь, комплиментарно 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 оказывается только целевые участки интересующих генов. Подробнее на Рисунке 6 (присоединение индексов не показано отдельным этапом, индексы и адаптеры обозначены черным цветом).

2.3.5 Синтез биотинилированных зондов для ДНК-библиотек

Амидофосфитный метод – вариант твердофазного синтеза, позволяющий синтезировать длинные последовательности ДНК и модифицировать их при помощи дополнительных веществ (например, биотина). Синтез осуществляется на специальных стеклянных шариках с контролируемым размером пор – controlled pore glass (CPG), выступающих в качестве твердой фазы. Они содержат углубления (поры), строго заданного диаметра. Поры служат местом, где происходит элонгация цепи ДНК на каждом цикле.

Наличие пор помогает каждому олигонуклеотиду быть пространственно-разобленным с другим, идентичным. Пора (внутри которой находится растущая цепочка) обеспечивает доступ для нового нуклеотида и высокий выход продукта реакции [122].

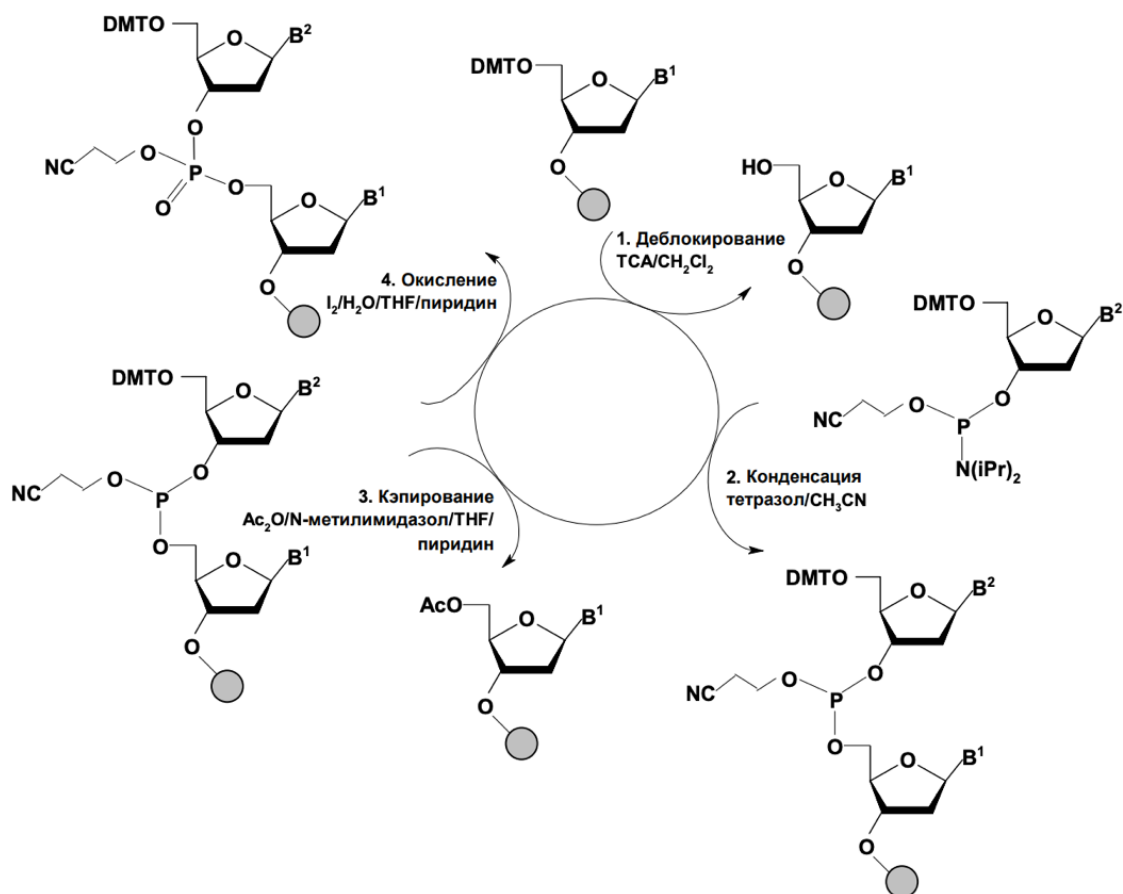


Рисунок 7 – Схема синтеза олигонуклеотидных зондов амидофосфитным методом [123]

Синтез начинается с первого модифицированного нуклеотида, присоединенного к твердой фазе на шарике при помощи специальной молекулы-линкера. Он содержит 5'-О-диметокситритильную группу, блокирует 5' реакционный центр нуклеотида. В процессе деблокирования 5'-О-диметокситритильная группа утрачивается, вследствие чего становится возможным присоединение нового нуклеотида. Далее цепочка претерпевает серию химических реакций, подготавливается для начала нового цикла с присоединенным нуклеотидом в составе.

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.

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

Для начала синтеза подготавливался слив синтезатора и растворы для реакции: W1, W2, Dbl, Oxd, Act1, CpA, CpB.

Таблица 10 – Реактивы для синтеза зондов

Аббревиатура	Объем		Формула	Количество		Вещество
Oxd	1,4	л	I ₂	7,3	г	Йод
			C ₅ H ₅ N	300	мл	Пиридин / Азинин
			C ₄ H ₈ O	1000	мл	Тетрагидрофуран / Оксолан
			H ₂ O	140	мл	Вода Milli-Q
Dbl	2	л	CHCl ₂ COOH	62	мл	DCA (Дихлоруксусная кислота)
			C ₂ H ₄ Cl ₂	2000	мл	DCE (Дихлорэтан)
			C ₂ H ₅ OH	2	мл	Этанол 95%
CpA	0,9	л	(CH ₃ CO) ₂ O	100	мл	Уксусный ангидрид
			CH ₃ CN	800	мл	Ацетонитрил
CpB	0,9	л	CH ₃ C ₃ H ₃ N ₂	100	мл	1-Метилимидазол
			C ₅ H ₅ N	150	мл	Пиридин / Азинин
			CH ₃ CN	650	мл	Ацетонитрил
Act 0,45M	900	мл	C ₃ H ₆ N ₄ S	51,3	г	ЕТТ (Этилтиотетразол)
			CH ₃ CN	900	мл	Ацетонитрил
Мономер	20	мл	A/C/G/T	1	г	Фосфорамидит
			CH ₃ CN	20	мл	Ацетонитрил
TEAA 2M	1	л	H ₂ O	550	мл	Вода Milli-Q
			CH ₃ COOH	120	мл	Уксусная кислота
			N(CH ₂ CH ₃) ₃	275	мл	TEA (Триэтиламин)
F-Wash	1	л	NaCl	100	г	Хлорид натрия
			H ₂ O	950	мл	Вода Milli-Q
			CH ₃ CN	53	мл	Ацетонитрил
Eluent	1	л	CH ₃ CN	500	мл	Ацетонитрил
			H ₂ O	500	мл	Вода Milli-Q
			NH ₃	5	мл	Гидроксид аммония 30%
Acid	1	л	CF ₃ CO ₂ H	20	мл	TFA (Трифторуксусная кислота)
			H ₂ O	1000	мл	Вода Milli-Q

Камера синтезатора закрывалась, заполнялась аргоном из баллона с помощью ключа. На компьютере синтезатора в приложении ASM запускалась вкладка Mode → Preparation. Из морозильной камеры (-20°C) фосфорамидиты (A, C, G, T массой по 2 г) помещались в условия комнатной температуры, за час до начала работы с ними (не образуется конденсат). На точных весах измерялся

1 грамм каждого сухого фосфорамидита, каждый помещался в соответствующий сосуд под вакуум для дегидратации. Спустя 12 часов сосуды заполнялись 20 мл сухого ацетонитрила при помощи шприца и подключались к синтезатору.

Фосфорамидит с введенной последовательностью стрептавидина также проходил дегидратацию под вакуумом, 0,1 г растворялся в 2 мл ацетонитрила и подключался к прибору в дополнительном сосуде R (резерв). После создания протокола синтеза с указанной последовательностью олигонуклеотидов, в планшет для синтеза добавляли стеклянный гранулят (CPG, $d = 1\text{мм}$), и загружали в синтезатор.

Для загрузки выполнялась команда в приложении ASM Mode → Preparation → Load position → Start (выдвинуть штатив для загрузки). Синтез запускался командой Mode → Run → Protocols → File name → TP53_probe, после чего – Start. Фосфорамидит с введенной последовательностью биотина добавлялся в цепь на заключительном цикле, параметр прописывался в протоколе. Синтез длился 12 часов, после олигонуклеотиды смывались с CPG при помощи NH_3 30%. Доступ к планшету обеспечивался командой Resume.

Планшет для синтеза экстрагировали из камеры и вставляли в другой планшет со стрипами (пробирка для хранения зонда после синтеза) для обеспечения промывки аммиаком. В позицию R2 устанавливался полный сосуд с NH_3 30%. После команды Mode → Run → Protocol → C:\ASM-2000\Protocol\DNA_MY\Cleavage, затем Resume, начиналась промывка. Операция длилась 2 часа 20 минут. По окончании, командой Resume экстрагировали планшет, переносили в вытяжку и оставляли на двухсуточный аммонолиз.

Консервация прибора выполнялась по программе “Conservation all no Ar” (длится 10 минут).

После олигонуклеотиды очищались в вытяжке. Использовались специальные дозаторы. Для каждого реагента свой подписанный дозатор. Кассету с колонками для очистки подключали насосу. В стрипы с праймерами, добавляли в каждую пробирку 600 мкл раствора NaCl (100г/л). После чего

колонка промывалась ацетонетрилом (MeCN) – 600 мкл при помощи насоса, затем ТЕАА 2М – 600мкл. После в колонку вводили зонды. Дважды добавлялся реагент F-Wash 1мл, затем дважды Acid 800 мкл и трижды водой Milli-Q.

Кассета для элюирования заполнялась финальными пробирками для зондов. Добавлялся Eluent 1,2 мл.

Любой этап промывки сопровождался прокачиванием жидкости через колонку при помощи насоса. Пробирки из планшета для промывки перемещались в концентратор, после 2 часов сушки зонды готовы к работе.

2.3.6 Выделение ДНК для апробации

ДНК всех образцов для апробации выделена набором Cobas FFPE DNA Sample Preparation Kit по стандартной методике. Материал из гистологических блоков опухоли молочной железы (для обнаружения соматических мутаций TP53).

Сухую протеиназу К (ПК), растворяли в 4.5 мл Milli-Q воды, перемешивали до полного растворения. К DNA Wash Buffer I (промывочный буфер I, WB I) добавляли 15 мл этанола, к DNA Wash Buffer II (промывочный буфер II, WB II) – 50 мл. Срез парафинового блока помещали в пробирку на 1,5 мл, добавляли 1000 мкл гептана для депарафинизации, перемешивали при помощи центрифуги-вортекс 1 минуту, после просушивали срезы 10 мин при 56 градусах на термоблоке в открытых пробирках.

К сухому срезу добавляли 180 мкл DNA Tissue Lysis Buffer (лизис-буфер, DNA TLB) и 70 мкл протеиназы К (ПК), перемешивали и инкубировали при 56 градусах в течение 12 часов. По окончании инкубации перемешивали.

Подготавливали необходимое количество пробирок с фильтрами (filter tubes, FT), вставив их в прилагаемые пробирки без крышек (collection tubes, СТ – требуется по 3 на каждый образец). Подготавливались пробирки на 1.5 мл для элюирования готовых образцов ДНК.

После лизиса к каждому образцу добавляли по 200 мкл DNA RBV, перемешивали и инкубировали 10 минут при комнатной температуре. После экспозиции добавляли 100 мкл изопропанола и помещали раствор в пробирку с фильтром.

Центрифугировали на 8000 x g 1 минуту, перемещали пробирку с фильтром в новую пробирку без крышки (collection tube); старую утилизировали, слив из неё жидкость. В пробирку с фильтром добавляли 500 мкл раствора WB I. Центрифугировали на 8000 x g 1 минуту. Переставляли колонку в новую пробирку без крышки. В пробирку с фильтром добавляли 500 мкл раствора WB II. Центрифугировали на 8000 x g 1 минуту, перемещали пробирку с фильтром в пробирку на 1.5 мл. В центр мембраны, не касаясь самой мембраны, помещали 100 мкл DNA EB (элюирующий буфер). Инкубировали 5 минут при комнатной температуре. Центрифугировали 8000 x g 1 минуту. Пробирку с фильтром утилизировали.

2.3.7 Исключение «частых» мутаций в генах *BRCA1/2*

2.3.7.1 ПЦР с последующим высокоточным плавлением

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 точечных мутаций преимущественно 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.

Температурный режим:

1. 95 °C – 10 мин (денатурация ДНК);
2. 95 °C – 10 сек (денатурация ДНК, с этого шага начинаются все последующие циклы);
3. 60 °C – 20 сек (отжиг праймеров);
4. 72 °C – 25 сек (элонгация);
5. Пункт 2, 3, 4 повторяется 50 раз;
6. Режим высокоточного плавления 72-95 °C с инкрементом 0,2°C/сек.

По истечении 50 циклов реакции выполнялось высокоточное плавление (high resolution melting – HRM), методика оценки скорости падения флуоресценции при нагревании раствора с ДНК. Программное обеспечение предоставляет возможность построить график второй производной падения флуоресценции за единицу времени, определяется различие между несколькими образцами, выявляется мутация.

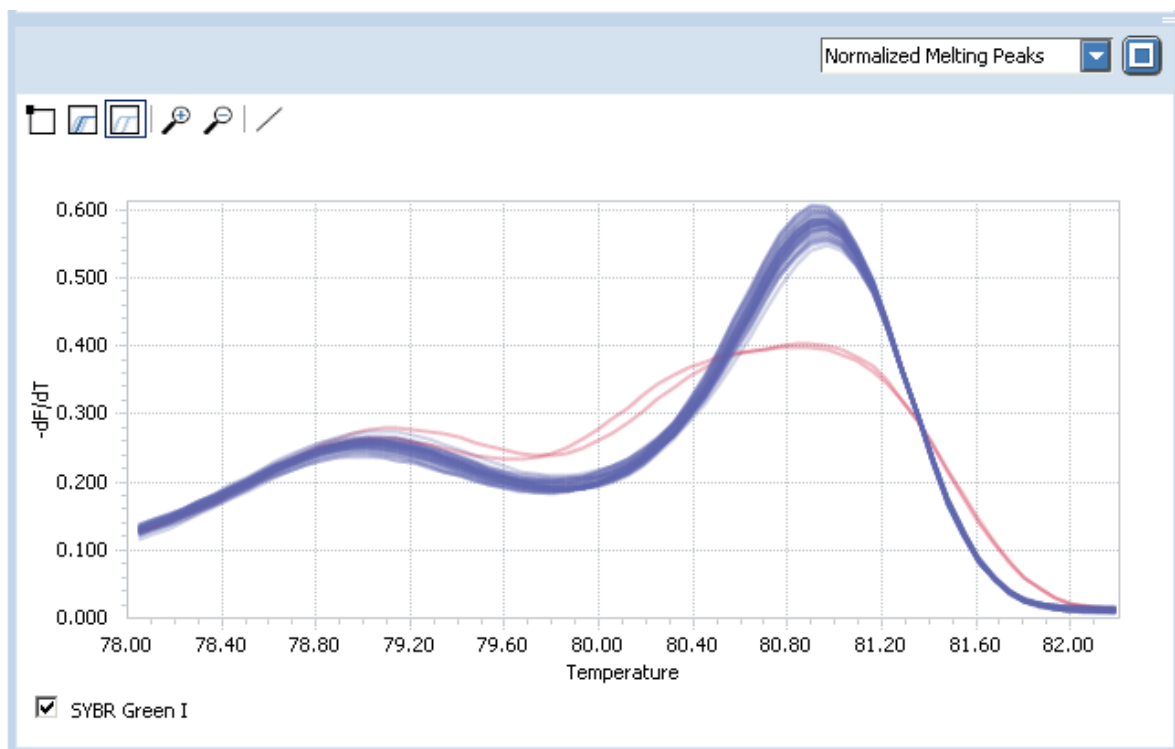


Рисунок 8 – График высокоточного плавления. Образцы, выделенные красным, содержат мутацию BRCA1 C61G

Из-за разной структуры ампликонов в образцах с мутацией и без нее, строятся разные графики. Высокоточное плавление – скрининговый метод, позволяет с большой точностью заподозрить мутацию, требуется верификация альтернативным методом.

Одна реакция выполнялась при помощи аллель-специфической ПРЦ с интеркалирующим красителем SYBR Green для диагностики мутации *BRCA1 5382insC [c.5266dupC]*.

2.3.7.2 Аллель-специфическая ПЦР

Аллель-специфическая ПЦР – вариант реакции, сравнивают время начала экспоненциального роста интенсивности флуоресценции (RFU) в двух лунках плашки ПЦР. Кривая флуоресценции на графике пересекает условную линию начала отсчета – threshold (пороговая линия.)

В одной лунке содержится раствор с двумя праймерами: один (forward или reverse) комплементарен последовательности дикого типа (wild type - WT), другой необходим для проведения реакции (common – общий).

В другой лунке тоже содержится раствор с двумя праймерами: один комплементарен мутантной последовательности (mutant - MUT) другой – общий праймер [124].

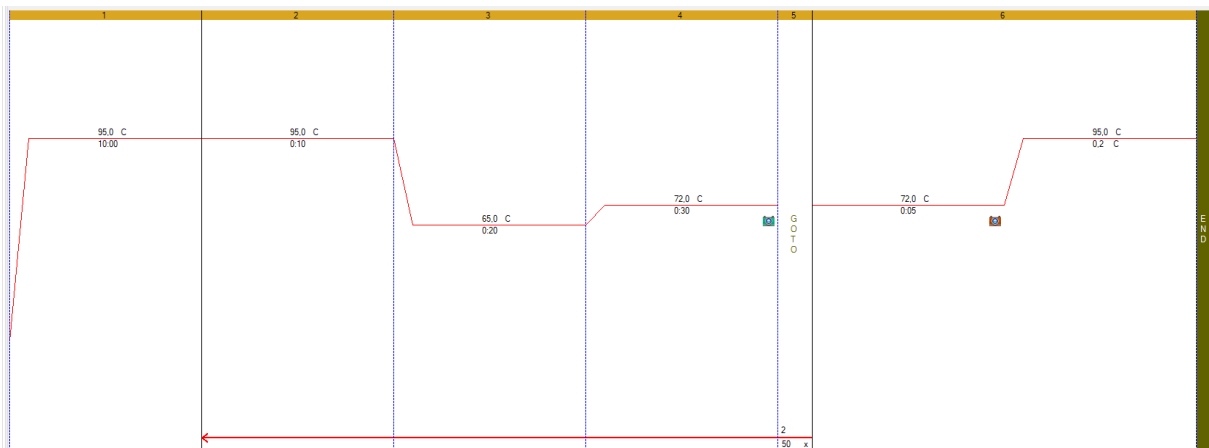


Рисунок 9 – «3-step» протокол аллель-специфической ПЦР

Температурный режим:

1. 95 °C – 10 мин (денатурация ДНК);
2. 95 °C – 10 сек (денатурация ДНК, с этого шага начинаются все последующие циклы);
3. 65 °C – 20 сек (отжиг праймеров);
4. 72 °C – 30 сек (элонгация);
5. Пункт 2, 3, 4 повторяется 50 раз;
6. Режим высокоточного плавления 72-95 °C с инкрементом 0,2°C/сек.

Аллель-специфическая ПЦР выполнялась по стандартному протоколу «3-step» (трех-шаговая ПЦР) с последующим проведением высокоточного плавления на приборе BioRad CFX96.

Если в ДНК отсутствует мутация, то преимущество получает реакция, с праймером к последовательности дикого типа (без мутации). Реакция в лунке с праймером к мутантной последовательности покажет экспоненциальный рост флуоресценции на несколько циклов позднее (из-за меньшего выхода продукта реакции).

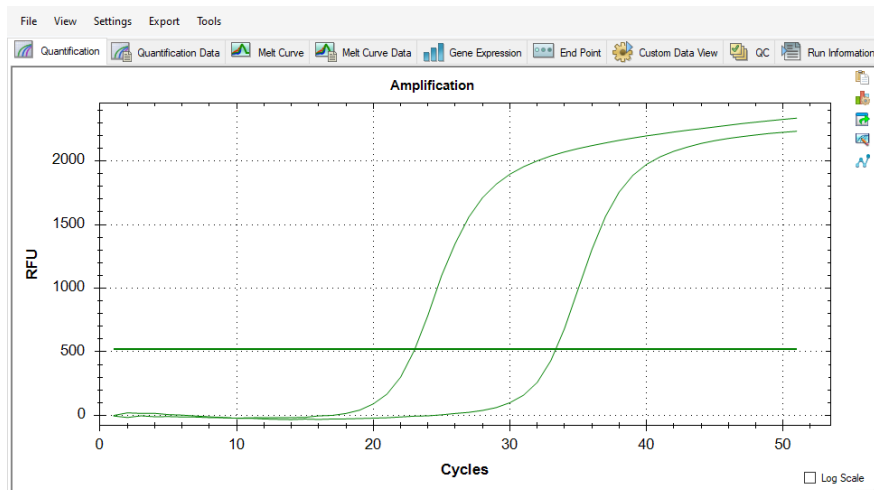


Рисунок 10 – Отрицательный результат аллель-специфической ПЦР, мутация BRCA1 5382insC [с.5266dupC] не обнаружена

Если в растворе присутствует мутантный аллель, то кривые появляются одновременно. Мутации в генах *BRCA1/2* – гетерозиготные, раствор содержит последовательность дикого типа и мутантную одновременно (из двух разных аллелей).

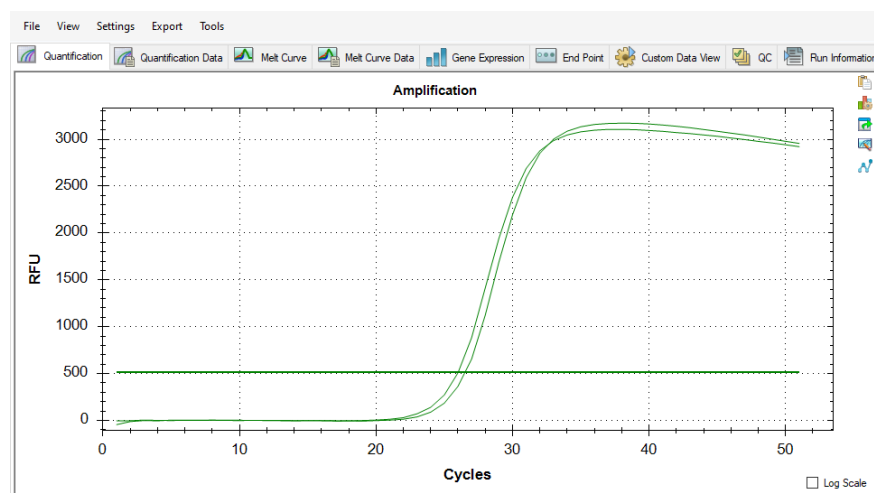


Рисунок 11 – Положительный результат аллель-специфической ПЦР, мутация BRCA1 5382insC [с.5266dupC] обнаружена

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.

Таблица 11 – Праймеры для HRM-диагностики часто встречающихся в популяции мутаций в генах *BRCA1/2*

Праймеры для HRM-диагностики	Последовательность праймера
<i>BRCA1 4153delA (forward)</i>	AATGAGGCATCAGTCTGAAAG
<i>BRCA1 4153delA (reverse)</i>	AAGTTTGAATCCATGCTTTGCT
<i>BRCA2 6174delT (forward)</i>	CACCTTGTGATGTTAGTTTGG
<i>BRCA2 6174delT (reverse)</i>	CACTTGTCTTGCGTTTTGTAAT
<i>BRCA1 185delA (forward)</i>	GAAGTTGTCATTTTATAAACCTTT
<i>BRCA1 185delA (reverse)</i>	TGTGTCTTTTCTTCCCTAGTATGT
<i>BRCA1 C61G (forward)</i>	CCACAAAGTGTGACCACATAT
<i>BRCA1 C61G (reverse)</i>	CCAAACCTGTGTCAAGCTGA
<i>BRCA12080delA (forward)</i>	AGCCCACCTAATTGTAAGTAA
<i>BRCA12080delA (reverse)</i>	GAAAGTATCGCTGTCATGTCT
<i>BRCA13819del5 (forward)</i>	CTTTCACCCATACACATTTG
<i>BRCA13819del5 (reverse)</i>	TGCAGTCATTTAAGCTATTC
<i>BRCA13875del4 (forward)</i>	CTTTCACCCATACACATTTG
<i>BRCA13875del4 (reverse)</i>	TGCAGTCATTTAAGCTATTC

Таблица 12 – Праймеры для диагностики часто встречающихся в популяции мутаций в генах *BRCA1/2* методом аллель-специфической ПЦР

Праймеры для аллель-специфичной ПЦР диагностики	Последовательность праймера
<i>BRCA1 5382insC (common)</i>	AGAACCTGTGTGAAAGTATCTAGCACTG
<i>BRCA1 5382insC (WT)</i>	AAGCGAGCAAGAGAATTCCAG
<i>BRCA1 5382insC (MUT)</i>	AGCGAGCAAGAGAATTCCTCA
<i>BRCA1 4153delA (common)</i>	GACTGCAAATACAAACACCCA
<i>BRCA1 4153delA (WT)</i>	AGCCCGTTCCTCTTTCTTC
<i>BRCA1 4153delA (MUT)</i>	AGCCCGTTCCTCTTTCTCA

2.3.7.3 Секвенирование по Сэнгеру

Секвенирование по Сэнгеру – метод расшифровки последовательности ДНК. Используются модифицированные дидезоксинуклеотиды, к ним присоединен флуоресцентный краситель. ДНК исследуемого образца участвует в реакции секвенирования, сходной с реакцией ПЦР, однако образуются ампликоны различной длины.

К дидезоксинуклеотиду не может присоединиться следующий нуклеотид, ввиду отсутствия сайта связывания. На нем растущая цепь нуклеотидов обрывается, последний дидезоксинуклеотид служит источником флуоресцентного сигнала, используется для детекции. После реакции секвенирования проводится капиллярный гель электрофорез, ампликоны различной длины разделяются, последовательность определяется по флуоресцентному красителю дидезоксинуклеотидов. Метод удобен в применении ввиду простоты и точности [125].

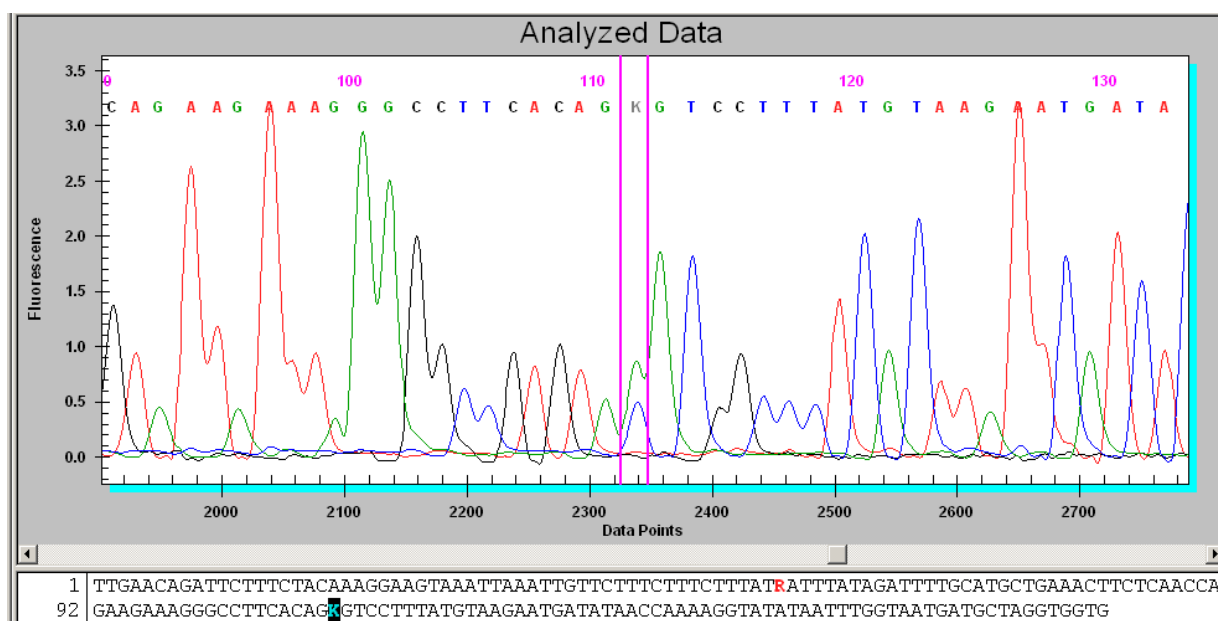


Рисунок 12 – Подтверждение мутации BRCA1 C61G [с.181T>G] методом секвенирования по Сэнгеру

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).

Сток для секвенирования на реакцию по протоколу:

1. DTCS mix (Beckman Coulter) – 4,5 мкл;
2. Праймер – 2мкл;
3. Milli-Q вода – 11 мкл;
4. Очищенная ДНК – 2,5 мкл.

Температурный режим программы для секвенирования на термоциклере:

1. 96 °С – 2 мин (денатурация ДНК);
2. 96 °С – 20 сек (денатурация ДНК, с этого шага начинаются последующие циклы);
3. 50 °С – 20 сек (отжиг праймеров);
4. 60 °С – 4 мин (элонгация);
5. Пункт 2, 3, 4 повторяется 40 раз, конец программы.

Запуск секвенирования в приложении GenomeLab (Beckman Coulter).

2.4 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 (χ^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.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 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 на сайте NCBI [126].

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 13).

Совокупность зондов образуют панель для обогащения при помощи гибридизации. Панель использовалась для пробоподготовки ДНК-библиотек с последовательностью *TP53*. Использовался набор реактивов коммерческой системы реагентов KAPA Hyper Plus (Roche). Панель успешно применялась в

анализе образцов для поиска наследственных мутаций в гене *TP53* («синтезированная панель»).

Таблица 13 – Последовательность биотинилированных зондов для исследования гена *TP53* при помощи NGS

ID зонда	Последовательность
TP53_p1	[Bio-Pro]GGGTGGGAGGCTGTCAGTGGGGAACAAGAAGTGGAGAATGTCAGTCTGAGTCAGGCCCTTCTGTCTTGAACAtgagttt
TP53_p2	[Bio-Pro]AACAAAGAAGTGGAGAATGTCAGTCTGAGTCAGGCCCTTCTGTCTTGAACATGAGTTTTTATGGCGGGAGGTagactga
TP53_p3	[Bio-Pro]GGCGGGAGGTAGACTGACCCTTTTGGACTTCAGGTGGCTGTAGGAGACAGAAGCAGGGAGGAGAGATGACAtcacatg
TP53_p4	[Bio-Pro]GGCAGGGGAGTAGGGCCAGGAAGGGGCTGAGGTCACTCACCTGGAGTGAGCCCTGTCCCCCTGGCTCCTTcccagcc
TP53_p5	[Bio-Pro]CAGCCTGGGCATCCTTGAGTTCACAGGCCTCATTCAGCTCTCGAACATCTCGAAGCGCTCACGCCACGGAtctgcag
TP53_p6	[Bio-Pro]AGCTCTCGAACATCTCGAAGCGCTCACGCCACGGATCTGCAGCAACAGAGGAGGGGAGAAGTAAGTATAtacacag
TP53_p7	[Bio-Pro]ACGAGTTTATCAGGAAGTAACACCATCGTAAGTCAAGTAGCATCTGTATCAGGCAAAGTCATAGAACCATTtcatgct
TP53_p8	[Bio-Pro]CATCTGTATCAGGCAAAGTCATAGAACCATTTCATGCTCTCTTTAAACAATTTCTTTTTGAAAGCTGGTCTggtcctt
TP53_p9	[Bio-Pro]CTGGAACTTTCCAATTGATAAGAGGTCCCAAGACTTAGTACCTGAAGGGTGAAATATTCTCCATCCAGTGGtttctt
TP53_p10	[Bio-Pro]GGAAACTTTCCAATTGATAAGAGGTCCCAAGACTTAGTACCTGAAGGGTGAAATATTCTCCATCCAGTGGTtcttctt
TP53_p11	[Bio-Pro]CTTTGGCTGGGAGAGGAGCTGGTGTGTGTGGGCAGTGCTAGGAAAGAGGCAAGGAAAGGTGATAAAAGTGAatctgag
TP53_p12	[Bio-Pro]CCCTTGGTCTCTCCACCGCTTCTGTGCTGCTTGTCTTACCTCGCTTAGTGCTCCCTGGGGGAGCTCGTGGtgagct
TP53_p13	[Bio-Pro]CCCTTCTTTCGCGAGATTCTCTTCTCTGTGCGCCGCTCTCTCCAGGACAGGCACAAACACGCACCTCAAAGctgttc
TP53_p14	[Bio-Pro]CACGCACCTCAAAGCTGTTCCGTCACAGTAGATTACCACTACTCAGGATAGGAAAAGAGAAGCAAGAGGCAGtaaggaa
TP53_p15	[Bio-Pro]CACAGCAGGCCAGTGTGCAGGGTGGCAAGTGGCTCTGACCTGGAGTCTTCCAGTGTGATGATGGTGAGGATgggectc

3.2 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 [127].

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

Обе панели добавлялись в раствор на этапе гибридизации пробоподготовки NGS (глава 5 протокола КАРА HyperCap Workflow [127]) и обеспечивали расшифровку трех генов: *BRCA1/2* и *TP53*.

До синтеза, панель полностью из коммерческих зондов применялась для диагностики *BRCA1/2*- и *TP53*-ассоциированных опухолевых синдромов в лаборатории молекулярной онкологии.

Для эксперимента взяли 2 набора образцов из опухолевого материала молочной железы (при апробации выявлялись соматические мутации *TP53*). Набор 1 проанализирован при помощи панели из полностью коммерческих зондов (*BRCA1/2* и *TP53* Roche), набор 2 – *BRCA1/2* (Roche) и *TP53* «синтезированной панели». 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, 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 [128]:

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 14 – 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	0,789921	2180	1751215	3327584	0,998693	0,994511	8,903422	1,828958	TP53 Q144X
DS22888	0,79964	3744	2681398	5096864	0,999901	0,999144	4,063902	1,993729	TP53 C176F
DS22892	0,8155	3620	2316466	4945734	0,999908	0,998723	8,987668	1,932572	TP53 c.643_645delAT
DS22940	0,800097	4388	1041291	5863946	0,999878	0,996705	3,582922	1,744854	TP53 H179R
DS22941n	0,797519	4514	1064857	6117034	0,999725	0,997622	6,708818	1,926699	TP53 Y205C
DS22943	0,802833	5635	1379445	8087330	0,996835	0,979206	5,980997	1,494331	TP53 c.606delT
DS22944	0,780469	4311	1063613	6204650	0,999526	0,996919	4,321923	1,641698	TP53 R248W
DS22995	0,719199	1507	367929	2396312	0,991858	0,931203	14,358531	0,283209	TP53 N239D
DS23129	0,761973	3319	801816	4716546	0,99893	0,99539	6,300516	1,634695	TP53 C238Y
DS22886	0,715322	1171	469621	2363672	0,987829	0,924507	6,93257	0,578958	TP53 R273C
Среднее значение	0,7782473				0,9973083			1,5059703	

Таблица 15 – 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	0,823948	1430	153600	420286	0,974742	0,942725	18,165196	7,252673	TP53 R179H
DS25116	0,851006	822	81655	235454	0,971698	0,935808	13,674813	0,706652	TP53 p.Pro316fs
DS25679	0,833376	949	100601	282948	0,983794	0,964149	11,029397	0,307124	TP53 L348X
DS25692	0,787331	430	43326	139242	0,954148	0,773746	4,605645	0,336146	TP53 Y234C
DS25693	0,744897	217	27567	92214	0,55516	0,168149	13,102244	0,303851	TP53 R282W
DS25816	0,785077	218	30240	79096	0,739555	0,251749	5,30397	0,527559	TP53 c.329ins
DS25817	0,831222	508	63007	162370	0,968576	0,83612	11,54475	0,326798	TP53 Y220C
DS25837	0,751131	146	17645	51124	0,313609	0,079647	19,211861	0,249752	TP53 R248G
DS25838	0,846162	911	104223	270640	0,977469	0,959366	3,850961	1,860433	TP53 C238Y
DS25927	0,82194	433	46680	138766	0,940788	0,683663	7,53048	0,322127	TP53 R282W
DS25964	0,859816	1517	159003	423728	0,986521	0,973991	6,213502	2,479645	TP53 Q165X
DS25966	0,85396	907	98508	263588	0,972608	0,952449	7,898652	2,012098	TP53 R175H
DS26064	0,835342	1232	125909	364746	0,978892	0,962805	5,469295	0,705501	TP53 R213X
Среднее значение	0,8128966				0,884925467			1,38930213	

«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 на рисунке ниже. 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 13 – Визуализация в геномном браузере мутации *TP53 R175H*

3.3 Исследование коллекции образцов по возрастным группам

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

3.3.1 Возрастная группа 0-15 лет

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

3.3.2 Возрастная группа 16-50 лет

3.3.2.1 Результаты тестирования образцов от пациенток с РМЖ

Применение двухэтапной диагностической модели позволяет полностью исключить пациентов с *BRCA1/2*-ассоциированным опухолевым синдромом.

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

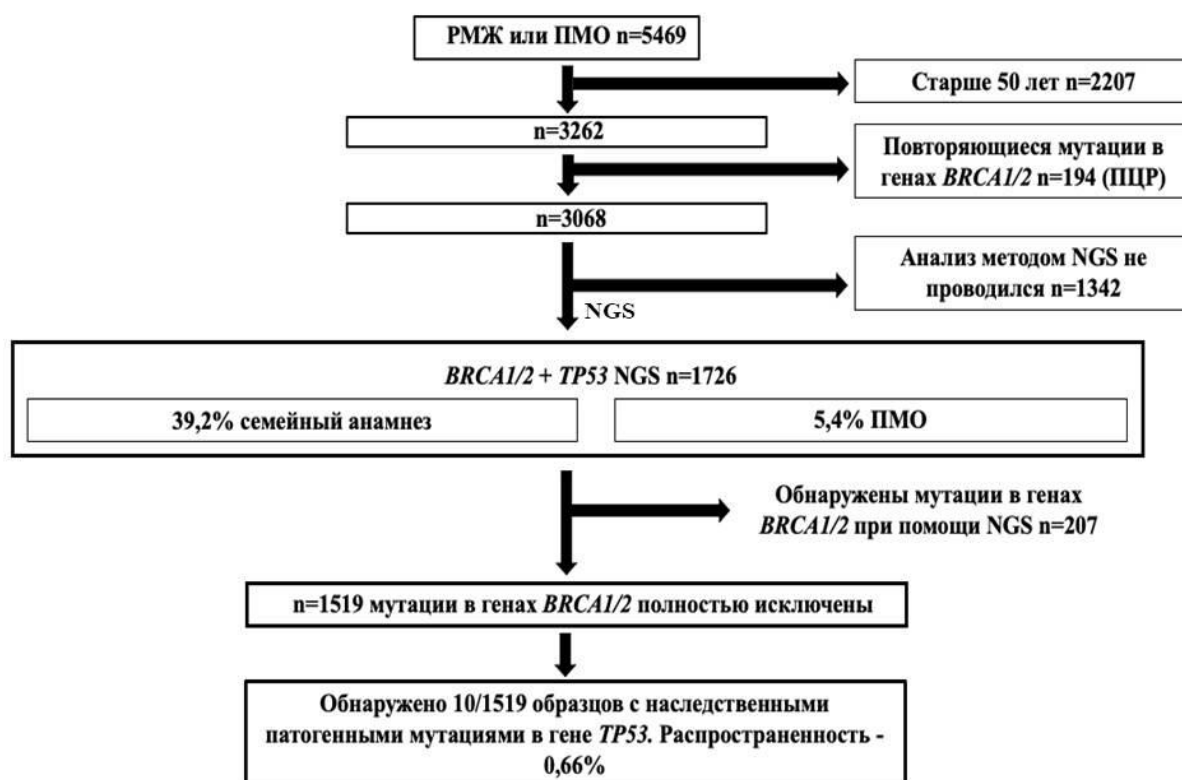


Рисунок 14 – Алгоритм диагностики *TP53*-ассоциированных РМЖ

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

Таблица 16 – Спектр выявленных мутаций и их характеристики

ID образца	Возраст	Диагноз	Обнаруженная мутация	Семейный анамнез	Комментарии
27222	38	РМЖ	<i>TP53 T125T [c.375G>A; rs55863639]</i>	Нет данных	-
26851	39	Билатеральный РМЖ и меланома кожи	<i>TP53 R248Q [c.743G>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>T; rs28934575]</i>	Нет данных	-
22970	50	Билатеральный РМЖ, гастроинтестинальная стромальная опухоль желудка, папиллярная карцинома щитовидной железы	<i>TP53 R156C [c.466C>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>T; rs397516435]</i>	Нет данных	ER+, PR+, HER2 – 06
28411	36	РМЖ	<i>TP53 I195T [c.584T>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> 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>T; rs138729528]</i>	у матери РМЖ в 78, у прабабушки – РЦЖ	-
29336	35	Билатеральный трижды негативный РМЖ	<i>TP53 L194F [c.580C>T; rs587780071]</i>	Нет данных	Обе опухоли ER- PR- HER2 – 06
30303	36	Билатеральный РМЖ в 30 лет	<i>TP53 R248W [c.742C>T; rs121912651]</i>	у матери – РМЖ в 50 лет, у отца-рак простаты в 65 лет	-
A5682	32	Глиобластома	<i>TP53 C141T [c.422G>A; rs587781288]</i>	Нет данных	-
A2111	23	Глиобластома	<i>TP53 D281N [c.841G>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).

3.3.2.2 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*.

3.3.3. 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*.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе представлены результаты создания и апробации NGS-панели, обеспечивающей высокое качество секвенирования гена *TP53*. На ее основе разработан алгоритм исключения *BRCA1/2*-наследственного опухолевого синдрома у пациенток с РМЖ.

4.1 Общая характеристика *TP53*-ассоциированных РМЖ

Двухэтапный подход сформировал «обогащенную выборку», удалось массово диагностировать случаи СЛФ, ассоциированные с РМЖ. Возраст пациенток варьировал от 30 до 51 года, 5 из 10 с первично-множественными злокачественными образованиями. Рецепторный статус установлен у 6 из 10 пациенток, практически во всех случаях различный.

Рассматривать эффективность алгоритма удобно в сравнении случаев СЛФ с современными диагностическими критериями. Соответствие или несоответствие демонстрирует, когда пациенток могли бы направить на молекулярно-генетическое исследование наследственной мутации в *TP53*.

4.2 Совпадающий с модифицированными критериями Шомпре случай РМЖ

Модифицированные критерии Шомпре (современные, самая высокая чувствительность) предписывают обязательную диагностику наследственных мутаций в гене *TP53* в случае рака молочной железы в раннем возрасте – до 31 года, независимо от семейного анамнеза.

«Типичный» среди всех случаев из выборки РМЖ всего 1 из 10. Пациентка 30303 – билатеральный РМЖ в 30 лет, семейный анамнез: РМЖ у матери в 50 лет и рак предстательной железы у отца в 65 лет. У такой пациентки можно заподозрить СЛФ и направить ее на тестирование.

4.3 Несовпадающие с модифицированными критериями Шомпре случаи РМЖ

Ценность диагностического алгоритма: 7 случаев СЛФ, ассоциированных с РМЖ, диагностированы несмотря на несоответствие международным критериям.

Молекулярно-генетическое исследование наследственных мутаций в *TP53* назначается пациенткам с РМЖ при следующих характеристиках (критерии Шомпре):

1. РМЖ до 31 года вне зависимости от семейного анамнеза;
2. Пробанд с «*TP53* core tumor» до 46 лет при наличии, по меньшей мере одного родственника первой или второй степени с «*TP53* core tumor» до 56 лет.

К понятию «core tumor» относится спектр наиболее характерных опухолей: рак молочной железы, саркома мягких тканей, остеосаркома, опухоль центральной нервной системы, карцинома коры надпочечников.

Наследственная мутация в *TP53* обнаружена у пятерых пациенток: 28411, 27222, 24956, 25028 и 22024 старше 31 года с диагнозом РМЖ.

Наиболее близкий к указанному выше описанию – случай 28411. Пациентка с РМЖ 36 лет, семейный анамнез: у отца рак предстательной железы в 60 лет. Рецепторный статус: ER+PR+HER2 – 3б.

Существует предположение, что *TP53*-ассоциированные РМЖ имеют бóльшую вероятность такого рецепторного статуса, несмотря на его редкость в спорадических опухолях [129]. Рецепторный статус *TP53*-ассоциированных РМЖ в реальности – характеристика, не обладающая специфичностью, как, например, при *BRCA*-ассоциированных РМЖ, ориентироваться на него не представляется надежным.

Рецепторный статус делает 28411 наиболее «типичным» среди пяти (РМЖ старше 31 года). Семейный анамнез 28411 не соответствует критериям Шомпре.

Остальные 4 случая тоже не подходят под критерии Шомпре.

Двое – 27222 (38 лет) и 24956 (45 лет) – представили данные о диагнозе, семейный анамнез и рецепторный статус выяснить не удалось.

Пациентка 25028 (49 лет) представила данные о семейном анамнезе: у матери РМЖ в 78, у прабабушки – рак щитовидной железы. Такой семейный анамнез нетипичен для СЛФ (поздний возраст начала РМЖ у матери и

нехарактерная опухоль щитовидной железы у прабабушки). Рецепторный статус установить не удалось.

У пациентки 22024 (44 года) известен рецепторный статус – ER+, PR+, HER2 – 0б. Нет данных о семейном анамнезе. Оценка всех пяти случаев не позволяет заподозрить СЛФ. Их могли упустить при стандартной диагностике СЛФ.

4.4 Пациенты с первично множественными злокачественными опухолями

Определение СЛФ по модифицированным критерия Шомпре при первичных множественных опухолях:

1. Пробанд с множественными опухолями, включая как минимум 2 из «*TP53* core tumor», первая – до 46 лет, независимо от семейного анамнеза.

Оставшиеся 4 случая (пациентки с ПМЗО): два соответствуют критериям СЛФ, два – нет.

Типичные:

У пациентки 29336 диагностирован билатеральный трижды негативный РМЖ в 35 лет. Подходит по критериям, но рецепторный статус характерен для *BRCA1/2*-ассоциированных РМЖ.

Пациентка 26851 (39 лет) имеет диагноз: билатеральный РМЖ и меланома кожи. Меланома – редкая локализация, нетипичная для СЛФ. Выполнено дополнительное молекулярно-генетическое исследование ДНК клеток меланомы (стандартный набор тестов соматических мутаций в генах *NRAS*, *BRAF*, *c-kit*), обнаружена патогенная мутация *BRAF V600E* в ДНК.

Частота и спектр соматических мутаций в *TP53*-ассоциированных опухолях – малоосвещенная проблема. Опираясь на этот случай, целесообразным считается изучение драйверных мутаций, тестируемых в рутинной молекулярной диагностике.

СЛФ повышает вероятность вторичных мутаций, развивается резистентность к таргетной терапии [130].

Нетипичные:

У пациентки 22970 (51 год): билатеральный РМЖ, гастроинтестинальная стромальная опухоль желудка (GIST), папиллярная карцинома щитовидной

железы. Согласно R20 МАИР/IARC, на рак щитовидной железы приходится 20/2591 из всех описанных случаев, то есть 0,77%. GIST описана 25/2591 случаев (0,96%). Эти опухоли не относятся к «*TP53 core tumor*». В семейном анамнезе указывает рак толстой кишки у матери – редкая локализация, 69/2591 (2,6%) случаев из той же базы данных.

У 22970 опухолевый синдром развился в позднем возрасте, у ее матери РТК манифестировал в 58 лет. Мутация *TP53 R156C* этой пациентки не обладает эффектом полной потери функции, ни доминантно-негативным. Такой возраст манифестации СЛФ объясняется эффектами мутации на белок и наличием генетических модификаторов. Такие случаи редко удается диагностировать – они не отвечают характеристикам СЛФ, сложно заподозрить. Низкая пенетрантность мутации не делает заболевание менее опасным. Такой сложный случай удалось диагностировать при помощи применения двухэтапного алгоритма.

У пациентки 27913 в 41 диагностированы РМЖ и рак яичников. Семейный анамнез нетипичен для СЛФ, как и рецепторный статус.

4.5 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.

4.6 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 [131]) 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%) [131]. На долю «редких» (семейных случаев) приходится 19,1% [131]. Банк образцов из исследования выше [131] 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.

4.7 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 (χ^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.

4.8 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 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 [132; 133].

4.9 Пенетрантность мутаций и аллельная гетерогенность

Пенетрантность определяется совокупной вероятностью возникновения конкретного конкурирующего события раньше всех остальных (возраст начала заболевания в данном случае), иначе – кумулятивная частота [134]. Пенетрантность СЛФ напрямую зависит от эффекта мутации на белок.

Эффекты по классификации А. Джакомелли [27]: наличие доминантно-негативного эффекта и способности полностью инактивировать мутантный p53. СЛФ вызывает опухоли широком спектре локализаций в связи с аллельной гетерогенностью – различными эффектами каждой мутации на p53.

Доминантно-негативный эффект (DNE) – способность мутантного p53 образовывать тетрамеры с белком дикого типа и полностью устранять функцию p53 в клетке. Потеря свойств белка (LOF) – полная утрата функции мутантного p53 в сравнении с белком дикого типа. Сочетание этих эффектов представляет опасную комбинацию, такие мутации обладают высокой пенетрантностью и вызывают опухоли в раннем возрасте.

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

Таблица 17 – Эффекты мутации в положительных образцах

ID образца	Возраст	Обнаруженная мутация	Расположение мутации	Эффект
26851	39	TP53 R248Q [c.743G>A, rs11540652]	ДНК-связывающий домен p53	LOF & DNE
29336	35	TP53 L194F [c.580C>T; rs587780071]	ДНК-связывающий домен p53. В мире зарегистрировано 3 случая СЛФ с такой мутацией (IARC/МАИР)	
30303	36	TP53 R248W [c.742C>T; rs121912651]	ДНК-связывающий домен p53	
A5682	32	TP53 C141T [c.422G>A; rs587781288]	ДНК-связывающий домен p53	
A2111	23	TP53 D281N [c.841G>A; rs764146326]	ДНК-связывающий домен p53	
22024	44	TP53 R196X [c.586C>T; rs397516435]	ДНК-связывающий домен p53	LOF & notDNE
28411	36	TP53 I195T [c.584T>C; rs760043106]	ДНК-связывающий домен p53	
27913	41	TP53 L330F [c.988C>T; rs2073148779]	Домен тетрамеризации p53	
27222	38	TP53 T125T [c.375G>A; rs55863639]	Сайт сплайсинга TP53. ДНК-связывающий домен p53	notLOF & notDNE
25028	49	TP53 R175C [c.523C>T; rs138729528]	ДНК-связывающий домен p53. В мире зарегистрировано 4 случая СЛФ с такой мутацией (IARC/МАИР)	
22970	50	TP53 R156C [c.466C>T; rs563378859]	ДНК-связывающий домен p53	
24956	45	TP53 G245C [c.733G>T; rs28934575]	ДНК-связывающий домен p53, в мире зарегистрировано 2 случая СЛФ с такой мутацией (IARC/МАИР)	Влияние на функциональность не изучено

Среди 10 обнаруженных мутаций в образцах РМЖ: три мутации приводили к сочетанию LOF и DNE. Это наиболее опасное сочетание – в двух случаях у пациенток с билатеральным РМЖ, в одном – у пациентки с билатеральным РМЖ и меланомой; все 3 младше 40 лет.

Три мутации обладали LOF без DNE, обнаружены у пациенток: двух случаях с диагнозом РМЖ (44 и 36 лет), в одном – РМЖ и рак яичников (в 41 год).

Еще три мутации не обладали ни эффектом полной потери функции белка, ни доминантно-негативным. У двух пациенток диагностирован РМЖ в возрасте 38 и 49 лет. У одной пациентки – ПМЗО: билатеральный РМЖ,

гастроинтестинальная стромальная опухоль и карцинома щитовидной железы в возрасте 50.

Эффект одной мутации (у пациентки с РМЖ в 45 лет) оказался не изучен – *TP53 G245C* [*c.733G>T*; rs28934575] описана только у еще 2-х людей в мире (замены в 245 кодоне встречаются часто при СЛФ, но не вариант *TP53 G245C*).

Среди *TP53*-ассоциированных опухолей головного мозга, в 2/60 (3,3%) образцах выявлены наследственные мутации в *TP53* с эффектами LOF+DNE, возраст 32 и 23 года. NGS-диагностика СЛФ-ассоциированных ОГМ на практике проводится очень редко.

Все случаи представляют все 3 комбинации эффектов, используемых для оценки пенетрантности. Обнаружение любой патогенной наследственной мутации в гене *TP53* крайне опасно – высокий риск опухолей ПМЗО. По этой причине, увеличение возрастных границ рационально для РМЖ – поиск LOF без DNE или notLOF + not DNE (при таком сочетании эффектов выше возраст манифестации СЛФ).

Прогнозировать локализацию/возраст для определенных мутаций можно приближенно – некоторые из них описаны лишь несколько раз в истории. Случаи таких пациентов практически не с чем сравнить. Даже если известны эффекты мутации на белок, это не улучшает предсказание локализации и возраста начала заболевания. Например, мутация *TP53 R175C* [*c.523C>T*; rs138729528] была зарегистрирована только у еще 4 людей в мире (замены в 175 кодоне – часто встречаются при СЛФ, но замена *R175C* – редкая), а *TP53 L194F* [*c.580C>T*; rs587780071] – только еще у 3 пациентов, согласно IARC/МАИР. Маленькое число известных случаев не позволяет адекватно оценить пенетрантность.

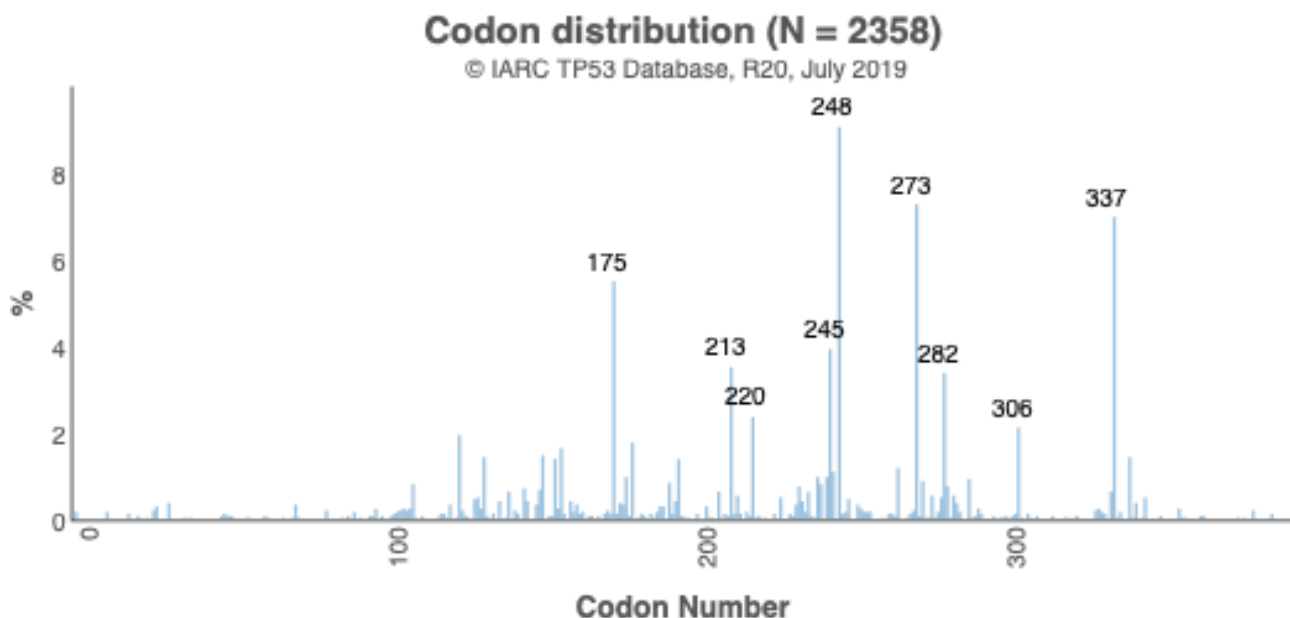


Рисунок 15 – Распределение частоты обнаружения наследственных мутаций в гене TP53 по кодонам [135]

Четыре случая из двенадцати имели мутации в кодонах, мутирующих наиболее часто при СЛФ: в двух случаях мутации обнаружены в 248 кодоне (*TP53 R248W* и *TP53 R248Q*), в одном в 245 кодоне (*TP53 G245C*) и в одном – в 175 (*TP53 R175C*).

Возраст соответствовал эффектам: ранняя манифестация опухолей обнаружена у пациентов с DNE+LOF, при других эффектах возраст пациентов в среднем выше. Предиктивные возможности для всех перечисленных мутаций – ограничены ввиду гетерогенности синдрома и большого количества вариантов даже в случае замен в одном кодоне.

Сложности диагностики СЛФ связаны с мутациями с низкой пенетрантностью – часто сложно заподозрить. Расширение возрастных границ и удешевление процесса в настоящей работе позволило выявить пациентов с СЛФ с различной пенетрантностью. Применение разработанной панели в представленных условиях значительно улучшают диагностику: больше пациентов проходят тесты, выявляются случаи, которые могли быть упущены при применении критериев Шомпре.

4.10 Возможные de novo мутации

De novo мутации встречаются при СЛФ и усложняют диагностику – у пациентов отсутствует семейный анамнез. Не рекомендуется пренебрегать диагностикой наследственных мутаций в *TP53*, когда отсутствует семейный анамнез у пациентов с клиническими проявлениями СЛФ [45].

В исследовании 3 образца от пациенток без сопроводительной информации о семейном анамнезе, но выявлен СЛФ (нельзя исключать de novo мутации). На практике пациенты не всегда могут предоставить такую информацию. Подход без учета семейного анамнеза удобен при диагностике СЛФ.

В настоящее время проводится изучение наследственных опухолей РМЖ только с учетом возраста (*BRCA1/2*). Объединение *BRCA1/2* и *TP53* в единую панель, расширение возрастных границ при РМЖ позволяет выявлять потенциальные случаи de novo мутаций (всегда не соответствуют модифицированным критериям Шомпре).

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/hTP53rc 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, 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 гибридационная 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 аденокортикальными 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

- АКК – адренкортикальная карцинома
- ЗНО – злокачественное новообразование
- КСС – карцинома сосудистого сплетения
- ЛФПС – Ли-Фраумени-подобный синдром
- МАИР/IARC – Международная Ассоциация Исследований Рака (International Agency for Research on Cancer)
- МРТ – магнитно-резонансная томография
- ОГМ – опухоль головного мозга
- ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз
- ПМЗО – первично-множественные злокачественные опухоли
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- РМЖ – рак молочной железы
- СЛФ – синдром Ли-Фраумени
- СЛФ3 – синдром Ли-Фраумени 3
- ACMG/AMP (Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology) –
Согласованные рекомендации американского колледжа медицинской генетики и геномики и ассоциации молекулярной патологии
- BRCA1/2* (Breast cancer type 1 and 2 susceptibility) – ген восприимчивости к раку молочной железы тип 1 и 2
- CHEK2* (Checkpoint kinase 2) – чекпоинт киназа 2
- CNV (copy number variation) – вариация числа копий гена
- DNE (Dominant Negative Effect) – доминантно-негативный эффект
- ER (Estrogen Receptor) – рецептор эстрогена
- ERN GENTURIS (European Reference Network on Genetic Tumour Risk Syndromes) – Европейское референсное агентство по генетическим синдромам риска развития опухолей
- GBCA (Gadolinium-Based Contrast Agent) – контрастный агент на основе гадолиния

GIST (Gastrointestinal Stromal Tumor) – гастроинтестинальная стромальная опухоль

GOF (Gain of Function) – приобретение новой функции

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

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

LFL-B – Ли-Фраумени подобный синдром, определение Дж. М. Берч

LFL-E1 и LFL-E2 – Ли-Фраумени подобный синдром, определение Р.А. Илс №1 и №2

LOF (Loss of Function) – потеря функции белка

LOH (Loss of Heterozygosity) – потеря гетерозиготности

MDM2 (Mouse Double Minute 2) – белок гомолога E3 убиквитинлигазы

MDR1 (Multiple Drug Resistance 1) – ген множественной лекарственной устойчивости

NEG (negative regulation) – домен отрицательной регуляции (p53)

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

NLS (Nuclear Localization Signal Sequence) – домен ядерной локализации (p53)

OD (oligomerisation domain) – домен олигомеризации (p53)

PR (Progesterone Receptor) – рецептор прогестерона

PXXP – домен, богатый пролином (p53)

SNP (Single Nucleotide Polymorphism) – однонуклеотидные полиморфизмы

TAD1 – домен трансактивации 1 (p53)

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A cancer family syndrome in twenty-four kindreds / F.P. Li [et al.] // *Cancer Research*. – 1988. – Vol. 48. – №18. – P. 5358-5362.
2. 2009 version of the Chompret criteria for Li Fraumeni syndrome / J. Tinat [et al.] // *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 2009. – Vol.27. – №26. – P. e108-109.
3. Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families / J.M. Birch [et al.] // *Cancer Research*. – 1994. – Vol.54. – №5. – P. 1298-1304.
4. The role of TP53 in breast cancer development / R.A. Eeles [et al.] // *Cancer Surveys*. – 1993. – Vol.18. – P. 57-75.
5. Germline mutations in the TP53 gene / R.A. Eeles // *Cancer Surveys*. – 1995. – Vol.25. – P. 101-124.
6. Breast cancer patients suggestive of Li-Fraumeni syndrome: mutational spectrum, candidate genes, and unexplained heredity / J. Penkert [et al.] // *Breast Cancer Research*. – 2018. – Vol.20. – P.87.
7. Early Onset Breast Cancer Study Group Prediction of pathogenic mutations in patients with early-onset breast cancer by family history / F. Laloo [et al.] // *Lancet*. – 2003. – Vol.361. – №9363. – P.1101-1102.
8. Beyond Li Fraumeni Syndrome: clinical characteristics of families with p53 germline mutations / K.D. Gonzalez [et al.] // *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 2009. – Vol.27. – №8. – P.1250-1256.
9. Higher-than-expected population prevalence of potentially pathogenic germline TP53 variants in individuals unselected for cancer history [et al.] / K.C. de Andrade // *Human mutation*. – 2017. – Vol.38. – №12. – P.1723-1730.
10. The TP53 Database | International Agency for Research on Cancer [Электронный ресурс]. – URL: <https://tp53.isb-cgc.org/> (дата обращения: 16.08.2022).
11. European Reference Network GENTURIS Guidelines for the Li-Fraumeni and heritable TP53-related cancer syndromes / T. Frebourg [et al.] // *European journal of human genetics*. – 2020. – Vol.28. – №10. – P.1379-1386.

12. Revisiting tumor patterns and penetrance in germline TP53 mutation carriers: temporal phases of Li-Fraumeni syndrome / A. Amadou [et al.] // *Current Opinion in Oncology*. – 2018. – Vol.30. – №1. – P.23-29.
13. OMIM - #151623 - LI-FRAUMENI SYNDROME [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.omim.org/entry/151623> (дата обращения: 17.08.2022).
14. Germ-line p53 mutations in 15 families with Li-Fraumeni syndrome / T. Frebourg [et al.] // *American Journal of Human Genetics*. – 1995. – Vol.56. – №3. – P.608-615.
15. Li-Fraumeni syndrome – a molecular and clinical review / J.M. Varley [et al.] // *British Journal of Cancer*. – 1997. – Vol.76. – №1. – P.1-14.
16. Sensitivity and predictive value of criteria for p53 germline mutation screening / A. Chompret [et al.] // *Journal of Medical Genetics*. – 2001. – Vol.38. – №1. – P.43-47.
17. Revisiting Li-Fraumeni Syndrome From TP53 Mutation Carriers / G. Bougeard [et al.] // *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 2015. – Vol.33. – №21. – P.2345-2352.
18. OMIM - #609265 - LI-FRAUMENI SYNDROME 2 [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.omim.org/entry/609265> (дата обращения: 17.08.2022).
19. OMIM - #609266 - MOVED TO 151623 - LI-FRAUMENI SYNDROME [Электронный ресурс]. – URL: <https://omim.org/entry/609266> (дата обращения: 17.08.2022).
20. p53, CHK2, and CHK1 genes in Finnish families with Li-Fraumeni syndrome: further evidence of CHK2 in inherited cancer predisposition / P. Vahteristo [et al.] // *Cancer Research*. – 2001. – Vol.61. – №15. – P.5718-5722.
21. Genetic mapping of a third Li-Fraumeni syndrome predisposition locus to human chromosome 1q23 / L.L. Bachinski [et al.] // *Cancer Research*. – 2005. – Vol.65. – №2. – P.427-431.
22. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology / M.B. Daly [et al.] // *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. – 2021. – Vol.19. – №1. – P.77-102.
23. Cancer Screening Recommendations for Individuals with Li-Fraumeni Syndrome / C.P. Kratz [et al.] // *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. – 2017. – Vol.23. – №11. – P.e38-e45.

24. Biochemical and imaging surveillance in germline TP53 mutation carriers with Li-Fraumeni syndrome: 11 year follow-up of a prospective observational study / A. Villani [et al.] // *The Lancet. Oncology*. – 2016. – Vol.17. – №9. – P.1295-1305.
25. gnomAD Genome Aggregation Database [Электронный ресурс]. – URL: <https://gnomad.broadinstitute.org/> (дата обращения: 17.08.2022).
26. Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis / S. Kato [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2003. – Vol.100. – №14. – P.8424-8429.
27. Mutational processes shape the landscape of TP53 mutations in human cancer / A.O. Giacomelli [et al.] // *Nature Genetics*. – 2018. – Vol.50. – №10. – P.1381-1387.
28. TP53 Variant Curation Expert Panel - ClinGen | Clinical Genome Resource [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.clinicalgenome.org/affiliation/50013> (дата обращения: 17.08.2022).
29. Risks of first and subsequent cancers among TP53 mutation carriers in the National Cancer Institute Li-Fraumeni syndrome cohort / P.L. Mai [et al.] // *Cancer*. – 2016. – Vol.122. – №23. – P.3673-3681.
30. Li-Fraumeni Syndrome: Mutation of TP53 Is a Biomarker of Hereditary Predisposition to Tumor: New Insights and Advances in the Treatment / Rocca V. [et al.] // *Cancers*. – 2022. – Vol.14. – №15. P.3664.
31. New surveillance guidelines for Li-Fraumeni and hereditary TP53 related cancer syndrome: implications for germline TP53 testing in breast cancer / Evans D.G., Woodward E.R. // *Familial Cancer*. – 2021. – Vol. 20. – №1. P.1-7.
32. Variable population prevalence estimates of germline TP53 variants: A gnomAD-based analysis / de Andrade K.C. [et al.] // *Human Mutation*. – 2019. – Vol. 40. – №1. P.97-105.
33. Penetrance of Different Cancer Types in Families with Li-Fraumeni Syndrome: A Validation Study Using Multicenter Cohorts / Shin S.J. [et al.] // *Cancer Research*. – 2020. – Vol. 80. – №2. P.354-360.
34. Prevalence and Spectrum of Germline BRCA1 and BRCA2 Variants of Uncertain Significance in Breast / Ovarian Cancer: Mysterious Signals From the Genome / Fanale D. [et al.] // *Frontiers in Oncology*. – 2021. – Vol. 11. – P. 682445.

35. Histopathologic features of breast cancer in Li-Fraumeni syndrome / Kuba M.G. [et al.] // *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* – 2021. – Vol. 34. – №3. P.542-548.
36. Наследственные мутации при ранних, семейных и билатеральных формах рака молочной железы у пациенток из России / Соколенко А.П. [и др.] // *Сибирский Онкологический Журнал.* – 2008. – Т. 3. – №27. С.43-49.
37. Molecular Diagnostics in Clinical Oncology / Sokolenko A.P., Imyanitov E.N. // *Frontiers in Molecular Biosciences.* – 2018. – Vol. 5. P. 76.
38. Clinical spectrum of Li-Fraumeni syndrome / Li-Fraumeni-like syndrome in Brazilian individuals with the TP53 p.R337H mutation / A.M. Ferreira [et al.] // *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* – 2019. – Vol.190. – P.250-255.
39. A patient with 17 primary tumours and a germ line mutation in TP53: tumour induction by adjuvant therapy? / C. Nutting [et al.] // *Clinical Oncology.* – 2000. – Vol.12. – №5. – P.300-304.
40. A Japanese patient with Li-Fraumeni syndrome who had nine primary malignancies associated with a germline mutation of the p53 tumor-suppressor gene / N. Izawa [et al.] // *International Journal of Clinical Oncology.* – 2008. – Vol.13. – №1. – P.78-82.
41. Radio-induced malignancies after breast cancer postoperative radiotherapy in patients with Li-Fraumeni syndrome / S. Heymann [et al.] // *Radiation Oncology.* – 2010. – Vol.5. – P.104.
42. Avoidance or adaptation of radiotherapy in patients with cancer with Li-Fraumeni and heritable TP53-related cancer syndromes / Thariat J. [et al.] // *The Lancet. Oncology.* – 2021. – Vol.22. – №12. – P.e562-e574.
43. Increasing genomic instability during cancer therapy in a patient with Li-Fraumeni syndrome / N. Schuler [et al.] // *Clinical and Translational Radiation Oncology.* – 2017. – Vol.7. – P.71-78.
44. Radiation induced secondary malignancies: a review article / C.B. Dracham, A. Shankar, R. Madan // *Radiation Oncology Journal.* – 2018. – Vol.36. – №2. – P.85-94.

45. Contribution of de novo and mosaic TP53 mutations to Li-Fraumeni syndrome / M. Renaux-Petel [et al.] // *Journal of Medical Genetics*. – 2018. – Vol.55. – №3. – P.173-180.
46. Surveillance recommendations for patients with germline TP53 mutations / M.L. Ballinger, G. Mitchell, D.M. Thomas // *Current Opinion in Oncology*. – 2015. – Vol.27. – №4. – P.332-337.
47. Extracellular gadolinium contrast agents: differences in stability / S.K. Morcos // *European Journal of Radiology*. – 2008. – Vol.66. – №2. – P.175-179.
48. Gadolinium--a specific trigger for the development of nephrogenic fibrosing dermopathy and nephrogenic systemic fibrosis? / T. Grobner // *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. – 2006. – Vol.21. – №4. – P.1104-1108.
49. Nephrogenic systemic fibrosis: risk factors and incidence estimation / E.A. Sadowski [et al.] // *Radiology*. – 2007. – Vol.243. – №1. – P.148-157.
50. Gadolinium deposition and the potential for toxicological sequelae - A literature review of issues surrounding gadolinium-based contrast agents / K.A. Layne [et al.] // *British Journal of Clinical Pharmacology*. – 2018. – Vol.84. – №11. – P.2522-2534.
51. Gadolinium deposition in the brain: another concern regarding gadolinium-based contrast agents / N. Karabulut // *Diagnostic and Interventional Radiology*. – 2015. – Vol.21. – №4. – P.269-270.
52. Comparison of Gd (DTPA-BMA) (Omniscan) versus Gd (HP-DO3A) (ProHance) relative to gadolinium retention in human bone tissue by inductively coupled plasma mass spectroscopy / G.W. White, W.A. Gibby, M.F. Tweedle // *Investigative Radiology*. – 2006. – Vol.41. – №3. – P.272-278.
53. Comparison of Gd DTPA-BMA (Omniscan) versus Gd HP-DO3A (ProHance) retention in human bone tissue by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy / W.A. Gibby, K.A. Gibby, W.A. Gibby // *Investigative Radiology*. – 2004. – Vol.39. – №3. – P.138-142.
54. High signal intensity in the dentate nucleus and globus pallidus on unenhanced T1-weighted MR images: relationship with increasing cumulative dose of a gadolinium-based contrast material / T. Kanda [et al.] // *Radiology*. – 2014. – Vol.270. – №3. – P.834-841.

55. Increased signal intensities in the dentate nucleus and globus pallidus on unenhanced T1-weighted images: evidence in children undergoing multiple gadolinium MRI exams / H.H. Hu [et al.] // *Pediatric Radiology*. – 2016. – Vol.46. – №11. – P.1590-1598.
56. Pediatric Brain: Repeated Exposure to Linear Gadolinium-based Contrast Material Is Associated with Increased Signal Intensity at Unenhanced T1-weighted MR Imaging / T.F. Flood [et al.] // *Radiology*. – 2017. – Vol.282. – №1. – P.222-228.
57. Potential therapeutic targets of TP53 gene in the context of its classically canonical functions and its latest non-canonical functions in human cancer / T. Tanaka [et al.] // *Oncotarget*. – 2018. – Vol.9. – №22. – P.16234-16247.
58. Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective / S. Surget [et al.] // *OncoTargets and Therapy*. – 2013. – Vol.19. – №7. – P.57-68.
59. A role of cytoplasmic p53 in the regulation of metabolism shown by bat-mimicking p53 NLS mutant mice / Sanford J.D. [et al.] // *Cell Reports*. – 2023. – Vol.42. – №1. – P.111920.
60. Targeting p53 pathways: mechanisms, structures, and advances in therapy / Wang H. [et al.] // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2023. – Vol.8. – P. 92.
61. PeCan | St. Jude Cloud | Pediatric Cancer [Электронный ресурс]. – URL: <https://pecan.stjude.cloud/proteinpaint/TP53> (дата обращения: 17.08.2022).
62. Li-Fraumeni syndrome: a paradigm for the understanding of hereditary cancer predisposition / J.M. Valdez [et al.] // *British Journal of Haematology*. – 2017. – Vol.176. – №4. – P.539-552.
63. Mutant p53 oncogenicity: dominant-negative or gain-of-function? / Stein Y. [et al.] // *Carcinogenesis*. – 2020. – Vol.41. – №12. – P.1635-1647.
64. Inactive full-length p53 mutants lacking dominant wild-type p53 inhibition highlight loss of heterozygosity as an important aspect of p53 status in human cancers / L.R. Dearth [et al.] // *Carcinogenesis*. – 2007. – Vol.28. – №2. – P.289-298.
65. Dominant-negative features of mutant TP53 in germline carriers have limited impact on cancer outcomes / P. Monti [et al.] // *Molecular cancer research*. – 2011. – Vol.9. – №3. – P.271-279.
66. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field / R. Brosh [et al.] // *Nature Reviews. Cancer*. – 2009. – Vol.9. – №10. – P.701-713.

67. p63 and p73 in human cancer: defining the network / M.P. DeYoung [et al.] // *Oncogene*. – 2007. – Vol.26. – №36. – P.5169-5183.
68. Are interactions with p63 and p73 involved in mutant p53 gain of oncogenic function? / Y. Li [et al.] // *Oncogene*. – 2007. – Vol.26. – №15. – P.2220-2225.
69. Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53 / K.V. Chin [et al.] // *Science*. – 1992. – Vol.255. – №5043. – P.459-462.
70. DNAJB8 in small extracellular vesicles promotes Oxaliplatin resistance through TP53/MDR1 pathway in colon cancer / Z. Wang [et al.] // *Cell Death & Disease*. – 2022. – Vol.13. – №2. – P.1-12.
71. The MDM2-p53 interaction / U.M. Moll [et al.] // *Molecular cancer research*. – 2003. – Vol.1. – №14. – P.1001-1008.
72. Inferring Leading Interactions in the p53/Mdm2/Mdmx Circuit through Live-Cell Imaging and Modeling / Heltberg M.L. [et al.] // *Cell Systems*. – 2019. – Vol.9. – №6. – P.548-558.e5.
73. The roles and regulation of MDM2 and MDMX: it is not just about p53 / Klein A.M [et al.] // *Genes & Development*. – 2021. – Vol.35. – №9-10. – P.575-601.
74. Regulation of the MDM2-p53 pathway by the ubiquitin ligase HERC2 / García-Cano J. [et al.] // *Molecular Oncology*. – 2020. – Vol.14. – №1. – P.69-86.
75. GOF Mutant p53 in Cancers: A Therapeutic Challenge / Dolma L., Muller P.A.J. // *Cancers*. – 2022. – Vol.14. – №20. – P.5091.
76. Targeting mutant p53 for cancer therapy: direct and indirect strategies / Hu J. [et al.] // *Journal of Hematology & Oncology*. – 2021. – Vol.14. – №1. – P.157.
77. p53 partial loss-of-function mutations sensitize to chemotherapy / Klimovich B. [et al.] // *Oncogene*. – 2022. – Vol.41. – №7. – P.1011-1023.
78. p53's Extended Reach: The Mutant p53 Secretome / Pavlakis E., Stiewe T. // *Biomolecules*. – 2020. – Vol.10. – №2. – P.307.
79. Are there low-penetrance TP53 Alleles? evidence from childhood adrenocortical tumors / J.M. Varley [et al.] // *American Journal of Human Genetics*. – 1999. – Vol.65. – №4. – P.995-1006.
80. Impact of the MDM2 SNP309 and p53 Arg72Pro polymorphism on age of tumour onset in Li-Fraumeni syndrome / G. Bougeard [et al.] // *Journal of Medical Genetics*. – 2006. – Vol.43. – №6. – P.531-533.

81. The MDM2 285G-309G haplotype is associated with an earlier age of tumour onset in patients with Li-Fraumeni syndrome / M. Renaux-Petel [et al.] // *Familial Cancer*. – 2014. – Vol.13. – №1. – P.127-130.
82. Discovery of RG7112: A Small-Molecule MDM2 Inhibitor in Clinical Development / B. Vu [et al.] // *ACS Medicinal Chemistry Letters*. – 2013. – Vol.4. – №5. – P.466-469.
83. DNA secondary structures: stability and function of G-quadruplex structures / M.L. Bochman, K. Paeschke, V.A. Zakian // *Nature reviews. Genetics*. – 2012. – Vol.13. – №11. – P.770-780.
84. G-quadruplexes in RNA biology / S. Millevoi, H. Moine, S. Vagner // *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*. – 2012. – Vol.3. – №4. – P.495-507.
85. Regulation of human p53 activity and cell localization by alternative splicing / A. Ghosh, D. Stewart, G. Matlashewski // *Molecular and Cellular Biology*. – 2004. – Vol.24. – №18. – P.7987-7997.
86. Contribute to Cancer Development in Patients with Li-Fraumeni Syndrome / Subasri V. [et al.] // *Cancer Research Communications*. – 2023. – Vol.3. – №5. – P.738-754.
87. Age at cancer onset in germline TP53 mutation carriers: association with polymorphisms in predicted G-quadruplex structures / C. Sagne [et al.] // *Carcinogenesis*. – 2014. – Vol.35. – №4. – P.807-815.
88. Genome-Wide DNA Methylation Analysis Reveals Epigenetic Dysregulation of MicroRNA-34A in TP53-Associated Cancer Susceptibility / N. Samuel [et al.] // *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 2016. – Vol.34. – №30. – P.3697-3704.
89. MicroRNA sequence polymorphisms and the risk of different types of cancer / Y. Hu [et al.] // *Scientific Reports*. – 2014. – Vol.4. – P.3648.
90. MIR605 rs2043556 is associated with the occurrence of multiple primary tumors in TP53 p.(Arg337His) mutation carriers / Bandeira I.C. [et al.] // *Cancer Genetics*. – 2020. – Vol.240. – P.54-58.
91. XAF1 as a modifier of p53 function and cancer susceptibility / E.M. Pinto [et al.] // *Science Advances*. – 2020. – Vol.6. – №26. – P.eaba3231.

92. Spontaneous and inherited TP53 genetic alterations / Levine A.J. // *Oncogene*. – 2021. – Vol.40. – №41. – P.5975-5983.
93. The Evolution of Tumors in Mice and Humans with Germline p53 Mutations / A.J. Levine [et al.] // *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. – 2015. – Vol.80. – P.139-145.
94. Common genetic variants in the TP53 pathway and their impact on cancer / Barnoud T., Parris J.L.D., Murphy M.E. // *Journal of Molecular Cell Biology*. – 2019. – Vol.11. – №7. – P.578-585.
95. TP53 Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use / M. Olivier, M. Hollstein, P. Hainaut // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2010. – Vol.2. – №1. – P.a001008.
96. Somatic TP53 Mutations in the Era of Genome Sequencing / P. Hainaut, G.P. Pfeifer // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. – 2016. – Vol.6. – №11. – P.a026179.
97. A mutant p53 protein is required for maintenance of the transformed phenotype in cells transformed with p53 plus ras cDNAs / G.P. Zambetti [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1992. – Vol.89. – №9. – P.3952-3956.
98. Molecular epidemiology: principles and practices. Molecular epidemiology / N. Rothman [et al.] // Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. – 2011. – P.475-492.
99. Molecular epidemiology: principles and practices. Foreword / J.F. Fraumeni // IARC scientific publications. Molecular epidemiology. – 2011. – P.163.
100. Benefits and burdens of risk management for young people with inherited cancer: A focus on Li-Fraumeni syndrome / Forbes Shepherd R. [et al.] // *Australian Journal of General Practice*. – 2021. – Vol.50. – №8. – P.538-544.
101. Identification of germline cancer predisposition variants in pediatric sarcoma patients from somatic tumor testing / Alba-Pavón P. [et al.] // *Scientific Reports*. – 2023. – Vol.13. – №1. – P.2959.
102. Ordered and deterministic cancer genome evolution after p53 loss / T.Baslan [et al.] // *Nature*. – 2022. – Vol.608. – №7924. – P.795-802.

103. Evaluation of TP53 Variants Detected on Peripheral Blood or Saliva Testing: Discerning Germline From Somatic TP53 Variants / Schwartz A.N. [et al.] // JCO precision oncology. – 2021. – Vol.5. – P.1677-1686.
104. Challenges in Interpreting TP53 Pathogenic Variants With a Low Minor Allele Frequency in Germline Genetic Testing: A Case Report of a Patient With Mosaic Li-Fraumeni Syndrome / Peacock E.G. [et al.] // JCO precision oncology. – 2020. – Vol.4. – P.91-95.
105. Germ Cell Mosaicism: A Rare Cause of Li-Fraumeni Recurrence Among Siblings / Donovan L.N. [et al.] // JCO precision oncology. – 2020. – Vol.4. – P.PO.20.00064.
106. Targeting Loss of Heterozygosity: A Novel Paradigm for Cancer Therapy / Zhang X., Sjöblom T. // Pharmaceuticals. – 2021. – Vol.14. – P 57.
107. A substantial proportion of apparently heterozygous TP53 pathogenic variants detected with a next-generation sequencing hereditary pan-cancer panel are acquired somatically / Coffee, B. [et al.] // Human mutation. – 2020. – Vol.41. – № 1. – P 203–211.
108. Li-Fraumeni syndrome: not a straightforward diagnosis anymore—the interpretation of pathogenic variants of low allele frequency and the differences between germline PVs, mosaicism, and clonal hematopoiesis / F. Batalini [et al.] // Breast Cancer Research. – 2019. – Vol.21. – P.107.
109. Li-Fraumeni versus Pseudo-Li-Fraumeni Syndrome: Key Insights for Interpreting Next-Generation Sequencing Reports in Patients with Suspected Cancer Predisposition Syndromes / S. Sorscher [et al.] // The Oncologist. – 2017. – Vol.22. – №9. – P.1084-1085.
110. Mutant p53 drives clonal hematopoiesis through modulating epigenetic pathway / S. Chen [et al.] // Nature Communications. – 2019. – Vol.10. – №1. – P.5649.
111. TP53-mediated therapy-related clonal hematopoiesis contributes to doxorubicin-induced cardiomyopathy by augmenting a neutrophil-mediated cytotoxic response / S. Sano [et al.] // JCI insight. – 2021. – Vol.6. – №13. – P.146076.
112. Diagnosis of Li-Fraumeni Syndrome: Differentiating TP53 germline mutations from clonal hematopoiesis: Results of the observational AGO-TR1 trial / K. Weber-Lassalle [et al.] // Human Mutation. – 2018. – Vol.39. – №12. – P.2040-2046.

113. TP53 Database: Search Germline Variant Data [Электронный ресурс]. – URL: https://tp53.isb-cgc.org/search_germline_mut (дата обращения: 18.09.2022).
114. Emerging insights into ethnic-specific TP53 germline variants / Fischer N.W., Ma Y.-H.V., Gariépy J. // Journal of the National Cancer Institute. – 2023. – P.djad106.
115. Cancer surveillance and distress among adult pathogenic TP53 germline variant carriers in Germany: A multicenter feasibility and acceptance survey / Rippinger N. [et al.] // Cancer. – 2020. – Vol.126. – №17. – P.4032-4041.
116. Breast cancer characteristics and surgery among women with Li-Fraumeni syndrome in Germany-A retrospective cohort study / Rippinger N. [et al.] // Cancer Medicine. – 2021. – Vol.10. – №21. – P.7747-7758.
117. A matched case-control study of the prognosis of early breast cancer in patients with Li-Fraumeni syndrome (BREAST TP53) / Petry V. [et al.] // Breast (Edinburgh, Scotland). – 2023. – Vol.68. – P.157-162.
118. EFGR-mutant lung adenocarcinoma and Li-Fraumeni syndrome: report of two cases and review of the literature / C. Ricordel [et al.] // Lung Cancer. – 2015. – Vol.87. – №1. – P.80-84.
119. Lung adenocarcinoma in a patient with Li-Fraumeni syndrome bearing a novel germ-line mutation, TP53R333Vfs*12 / S. Takahashi [et al.] // Japanese Journal of Clinical Oncology. – 2020. – Vol.50. – №10. – P.1214-1217.
120. Prostate Cancer and Li-Fraumeni Syndrome: Implications for Screening and Therapy / C.K. Spees [et al.] // Urology Case Reports. – 2015. – Vol.3. – №2. – P.21-23.
121. Use of next-generation DNA sequencing to analyze genetic variants in rheumatic disease / G. Wiley, J. Kelly, P. Gaffney // Arthritis research & therapy. – 2014. – Vol.16. – P.490.
122. On-demand synthesis of phosphoramidites / Sandahl A.F. [et al.] // Nature Communications. – 2021. – Vol.12. – №1. – P.2760.
123. Синтетические нуклеиновые кислоты. Получение и перспективы терапевтического применения / Т.С. Орецкая [и др.] // Учебное пособие Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. – 2015. – С.1-102.

124. Allele-Specific Mutation Genotyping with Mismatches in Primer Design / Y. Saito [et al.] // *Methods in Molecular Biology*. – 2023. – Vol.2638. – P.249-262.
125. Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring / B.M. Crossley [et al.] // *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians*. – 2020. – Vol.32. – №6. – P.767.
126. CCDS | Report for Consensus CDS. [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/CCDS/CcidsBrowse.cgi?REQUEST=CCDS&DATA=CCDS11118> (дата обращения: 27.09.2023).
127. Roche | KAPA HyperCap Workflow. [Электронный ресурс]. – URL: <https://rochesequencingstore.com/wp-content/uploads/2022/02/KAPA-HyperCap-Workflow.pdf>
128. HsMetrics (PICARD JDK API Documentation) [Электронный ресурс]. – URL: <https://broadinstitute.github.io/picard/javadoc/picard/picard/analysis/directed/HsMetrics.html> (дата обращения: 11.05.2023).
129. Changing Trends in Estrogen Receptors/Progesterone Receptors/Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Prevalence Rates Among Jordanian Patients With Breast Cancer Over the Years. / A.M. Alsughayer [et al.] // *JCO global*. – 2022. – Vol.8. – P.e2100359.
130. Melanoma in patients with Li-Fraumeni syndrome (Review) / F. Sandru [et al.] // *Experimental and Therapeutic Medicine*. – 2022. – Vol.23. – №1. – P.75.
131. Frequency and spectrum of founder and non-founder BRCA1 and BRCA2 mutations in a large series of Russian breast cancer and ovarian cancer patients / A.P. Sokolenko [et al.] // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2020. – Vol.184. – №1. – P.229-235.
132. An update on the central nervous system manifestations of Li-Fraumeni syndrome / B.A. Orr [et al.] // *Acta Neuropathologica*. – 2020. – Vol.139. – №4. – P.669-687.
133. Gliomas arising in the setting of Li-Fraumeni syndrome stratify into two molecular subgroups with divergent clinicopathologic features / E.A. Sloan [et al.] // *Acta neuropathologica*. – 2020. – Vol.139. – №5. – P.953-957.

134. Penetrance of Different Cancer Types in Families with Li-Fraumeni Syndrome: A Validation Study Using Multicenter Cohorts | Cancer Research | American Association for Cancer Research [Электронный ресурс]. – URL: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/80/2/354/645643/Penetrance-of-Different-Cancer-Types-in-Families> (дата обращения: 09.04.2023).

135. The TP53 Database | ISB-CGC. [Электронный ресурс]. – URL: <https://tp53.isb-cgc.org/> (дата обращения: 08.05.2023).

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Сплайсинг-мутации в возрастной группе 1-15 лет согласно базе данных МАИР/IARC

ID семьи	Экзон/интрон	Описание кДНК	Морфология	Возраст диагноза
1472	5'UTR	c.? dup Promoter	Остеосаркома	11
238	1-intron	c.1-10782G>T	Остеосаркома	4
238	1-intron	c.1-10782G>T	Саркома	12
1083	2-exon	c.?(del exon2-4)	Неходжкинская лимфома	3
206	2-intron	c.74+2_96+29del	Липосаркома	14
1644	2-intron	c.75-10_81del	Адренокортикальная карцинома	1
1634	3-intron	c.96+31_97-32del	Остеосаркома	13
1634	3-intron	c.96+31_97-32del	Медуллобластома	9
523	3-intron	c.97-11C>G	Эмбриональная рабдомиосаркома	3
203	3-intron	c.97-1G>A	Остеосаркома	15
1648	4-intron	c.375+1G>A	Остеосаркома	12
945	4-intron	c.376-1G>A	Рабдомиосаркома	3
142	4-intron	c.376-2A>G	Медуллобластома	10
790	5-intron	c.559+1G>T	Саркома	13
37	5-intron	c.560-15_560-5del	Остеосаркома	12
504	5-intron	c.560-1G>A	Рабдомиосаркома	11
938	5-intron	c.560-1G>C	Рабдомиосаркома	5
60	5-intron	c.560-2A>C	Карцинома сосудистого сплетения	1
855	6-intron	c.672+1G>A	Остеосаркома	15
760	6-intron	c.672+1G>A	Остеосаркома	15
1455	6-intron	c.672+1G>T	Остеосаркома	13
1626	6-intron	c.672+1G>T	Рабдомиосаркома	1
1626	6-intron	c.672+1G>T	Рабдомиосаркома	2
672	6-intron	c.672+2T>C	Злокачественная опухоль	1
672	6-intron	c.672+2T>C	Злокачественная опухоль	15
188	6-intron	c.672+65_672+66insNN	Медуллобластома	6
188	6-intron	c.672+65_672+66insNN	Рабдомиосаркома	14
1199	6-intron	c.673-2A>G	Хондросаркома	12
1199	6-intron	c.673-2A>G	Рабдомиосаркома	11
755	7-intron	c.782+143_835delinsGCC	Эмбриональная рабдомиосаркома	5
755	7-intron	c.782+143_835delinsGCC	Фибросаркома	10
755	7-intron	c.782+143_835delinsGCC	Острый миелоидный лейкоз	7
1442	7-intron	c.783-2A>G	Эмбриональная рабдомиосаркома	4
1435	8-intron	c.919+1G>A	Саркома	10
498	8-intron	c.919+1G>A	Примитивная нейроэктодермальная опухоль	6
624	8-intron	c.919+1G>A	Саркома	1
498	8-intron	c.919+1G>A	Злокач. опухоль из клеток Лейдига	1
1628	8-intron	c.919+1G>T	Остеосаркома	11
237	9-intron	c.993+1del	Злокачественная опухоль	10
704	10-intron	c.1101-2A>G	Адренокортикальная карцинома	2
1483	9-intron	c.993+1G>A	Адренокортикальная карцинома	5
1413	e1-exon	c.?(del exon1)	Астроцитомы	3
1005	e10-exon	c.?(del exon10-11)	Адренокортикальная карцинома	2
1010	e2-exon	c.?(del exon2-10)	Адренокортикальная карцинома	3
1474	e4-exon	c.?(dup exon4)	Адренокортикальная карцинома	13
1456	e4-exon	c.?(dup exon4)	Эмбриональная рабдомиосаркома	5
1088	e8-exon	c.?(exon8del)	Остеосаркома	14
280	NA	c.?(del45kb)	Лимфома	13

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Сплайсинг-мутации в возрастной группе 16-50 лет согласно базе данных

МАИР/LARC

ID семьи	Экзон/интрон	Описание кДНК	Морфология	Возраст диагноза
1386	1-exon	c.1-10788G>C	РМЖ	45
238	1-intron	c.1-10782G>T	Саркома	40
238	1-intron	c.1-10782G>T	Ангиомиома	45
238	1-intron	c.1-10782G>T	Саркома	17
701	1-intron	c.1-3176A>T	РМЖ	26
1083	2-exon	c.?(del exon2-4)	Остеосаркома	17
1083	2-exon	c.?(del exon2-4)	Остеосаркома	25
1083	2-exon	c.?(del exon2-4)	Меланома	27
1083	2-exon	c.?(del exon2-4)	Лейомиосаркома	33
206	2-intron	c.74+2_96+29del	РМЖ	31
206	2-intron	c.74+2_96+29del	Липосаркома	41
1388	2-intron	c.74+78G>T	РМЖ	45
1387	2-intron	c.75-32C>A	РМЖ	45
523	3-intron	c.97-11C>G	Плексиформная фиброгистиоцит. Опухоль	30
812	3-intron	c.97-11C>G	Злокачественная фиброзная гистиоцитома	31
812	3-intron	c.97-11C>G	РМЖ	25
523	3-intron	c.97-11C>G	РМЖ	27
523	3-intron	c.97-11C>G	РМЖ	25
203	3-intron	c.97-1G>A	Саркома	29
769	3-intron	c.97-28T>A	РМЖ	35
494	4-intron	c.375+1_375+2insN	РМЖ	34
1648	4-intron	c.375+1G>A	РМЖ	35
1648	4-intron	c.375+1G>A	РМЖ	35
227	4-intron	c.375+1G>A	РМЖ	34
44	4-intron	c.375+1G>A	РМЖ	30
44	4-intron	c.375+1G>A	РМЖ	36
44	4-intron	c.375+1G>A	РМЖ	33
44	4-intron	c.375+1G>A	РМЖ	36
44	4-intron	c.375+1G>A	ОГМ	24
44	4-intron	c.375+1G>A	Лейкемия	26
907	4-intron	c.375+2T>C	РМЖ	20
1694	4-intron	c.375+5G>C	РМЖ	28
1694	4-intron	c.375+5G>C	РМЖ	34
1570	5-intron	c.559+1G>A	РМЖ	46
875	5-intron	c.559+1G>A	РМЖ	27
875	5-intron	c.559+1G>A	РМЖ	28
875	5-intron	c.559+1G>A	Фиброма	25
790	5-intron	c.559+1G>T	Опухоль яичка	24
790	5-intron	c.559+1G>T	Саркома	25
790	5-intron	c.559+1G>T	Саркома	39
790	5-intron	c.559+1G>T	Рак кожи	38
1571	5-intron	c.559+2T>A	Злокачественная опухоль, неуточненная	27
278	5-intron	c.559+2T>G	РМЖ	36
324	5-intron	c.560-11_560-1del	РМЖ	45
37	5-intron	c.560-15_560-5del	Опухоль яичка	22
504	5-intron	c.560-1G>A	Олигодендроглиома	40
504	5-intron	c.560-1G>A	Лейомиосаркома	36
504	5-intron	c.560-1G>A	Рак гортани	48
1480	5-intron	c.560-1G>A	РМЖ	25
1657	5-intron	c.560-1G>A	РМЖ	27
60	5-intron	c.560-2A>C	РМЖ	33
60	5-intron	c.560-2A>C	РМЖ	37
60	5-intron	c.560-2A>C	РМЖ	30
60	5-intron	c.560-2A>C	РМЖ	30
60	5-intron	c.560-2A>C	Опухоль яичка	21
60	5-intron	c.560-2A>C	Рак толстой кишки	31
1460	5'UTR	c.? dup Promoter	Остеосаркома	30

486	6-exon	c.?(652del)	PMЖ	34
725	6-intron	c.672+1G>T	PMЖ	35
1455	6-intron	c.672+1G>T	PMЖ	42
1592	6-intron	c.672+2T>G	Меланома	46
1592	6-intron	c.672+2T>G	Лейомиосаркома	38
1592	6-intron	c.672+2T>G	Рак поджелудочной железы	46
1592	6-intron	c.672+2T>G	PMЖ	21
738	6-intron	c.672+389_994-765del	PMЖ	37
738	6-intron	c.672+389_994-765del	Опухоль яичка	39
738	6-intron	c.672+389_994-765del	Острый миелоидный лейкоз	43
188	6-intron	c.672+65_672+66insNN	PMЖ	37
932	6-intron	c.673-1G>A	Рак тела матки	43
244	6-intron	c.673-1G>A	PMЖ	43
932	6-intron	c.673-1G>A	PMЖ	38
932	6-intron	c.673-1G>A	PMЖ	44
746	6-intron	c.673-2A>G	PMЖ	39
1199	6-intron	c.673-2A>G	PMЖ	27
1199	6-intron	c.673-2A>G	Лейомиосаркома	18
1630	7-intron	c.782+1G>A	PMЖ	30
1630	7-intron	c.782+1G>A	PMЖ	30
785	7-intron	c.783-1G>A	Саркома	25
1532	7-intron	c.783-1G>A	PMЖ	35
1313	7-intron	c.783-2A>G	PMЖ	31
1313	7-intron	c.783-2A>G	PMЖ	36
1313	7-intron	c.783-2A>G	PMЖ	37
624	8-intron	c.919+1G>A	PMЖ	28
624	8-intron	c.919+1G>A	Саркома	28
1239	8-intron	c.919+1G>A	PMЖ	33
1239	8-intron	c.919+1G>A	PMЖ	36
1347	8-intron	c.919+1G>A	PMЖ	34
1385	8-intron	c.919+1G>A	PMЖ	45
731	8-intron	c.919+1G>A	PMЖ	29
1435	8-intron	c.919+1G>A	PMЖ	26
1435	8-intron	c.919+1G>A	PMЖ	26
679	8-intron	c.920-1G>T	PMЖ	25
237	9-intron	c.993+1del	PMЖ	42
237	9-intron	c.993+1del	PMЖ	28
237	9-intron	c.993+1del	PMЖ	33
237	9-intron	c.993+1del	PMЖ	32
1483	9-intron	c.993+1G>A	PMЖ	31
1654	9-intron	c.993+307C>G	PMЖ	49
92	9-intron	c.993+851_1100+280del	PMЖ	25
92	9-intron	c.993+851_1100+280del	PMЖ	30
92	9-intron	c.993+851_1100+280del	PMЖ	25
92	9-intron	c.993+851_1100+280del	PMЖ	26
92	9-intron	c.993+851_1100+280del	PMЖ	24
92	9-intron	c.993+851_1100+280del	PMЖ	47
92	9-intron	c.993+851_1100+280del	Рак поджелудочной железы	49
92	9-intron	c.993+851_1100+280del	Доброкачественная фиброзная гистиоцитома	47
92	9-intron	c.993+851_1100+280del	Рак легкого	42
92	9-intron	c.993+851_1100+280del	Остеосаркома	18
92	9-intron	c.993+851_1100+280del	Саркома	23
1583	9-intron	c.994-1G>C	Злокачественная опухоль, неуточненная	33
239	9-intron	c.994-1G>C	PMЖ	28
239	9-intron	c.994-1G>C	PMЖ	36
487	9-intron	c.994-1G>C	PMЖ	27
487	9-intron	c.994-1G>C	PMЖ	27
1449	9-intron	c.994-1G>C	PMЖ	33
1449	9-intron	c.994-1G>C	PMЖ	44
239	9-intron	c.994-1G>C	Меланома	30
721	9-intron	c.994-1G>T	Рак толстой кишки	28
721	9-intron	c.994-1G>T	Саркома	37
1551	e1-exon	c.?(del exon1-10)	PMЖ	28
993	e10-exon	c.?(del exon10-11)	Адренкортикальная карцинома	18
1104	e10-exon	c.?(del exon10-11)	PMЖ	30

1104	e10-exon	c.?(del exon10-11)	Саркома	35
1104	e10-exon	c.?(del exon10-11)	Веретеночклеточная саркома	37
1104	e10-exon	c.?(del exon10-11)	Острый миелоидный лейкоз	40
1048	e2-exon	c.?(large del)	РМЖ	46
1048	e2-exon	c.?(large del)	Саркома	49
1398	e5-exon	c.?(del exon5-9)	РМЖ	30
1481	e5-exon	c.?(del exon5)	Опухоль яичника	30
1481	e5-exon	c.?(del exon5)	Лейомиосаркома	40
1481	e5-exon	c.?(del exon5)	РМЖ	26
1481	e5-exon	c.?(del exon5)	РМЖ	25
1477	e5-exon	c.?(del exon5)	РМЖ	38
1481	e5-exon	c.?(del exon5)	РМЖ	32
1445	NA	c.?(del) rearrangement/large del	Остеосаркома	16
1094	NA	c.?(del) rearrangement/large del	Лейомиосаркома	49
1546	NA	c.?(del) rearrangement/large del	РМЖ	36
1244	NA	c.?(del) rearrangement/large del	Остеосаркома	16
1244	NA	c.?(del)rearrangement/large del	РМЖ	19
280	NA	c.?(del45kb)	РМЖ	29
280	NA	c.?(del45kb)	РМЖ	46
280	NA	c.?(del45kb)	Остеосаркома	17
280	NA	c.?(del45kb)	Лейомиосаркома	47

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Сплайсинг-мутации в возрастной группе старше 50 лет согласно базе данных МАИР/IARC

ID семьи	Экзон/интрон	Описание кДНК	Морфология	Возраст диагноза
1187	4-intron	c.376-2_376-1insN	Рак тела матки	69
227	4-intron	c.375+1G>A	Саркома желудка	55
504	5-intron	c.560-1G>A	Рак легкого	51
504	5-intron	c.560-1G>A	Рак толстой кишки	62
504	5-intron	c.560-1G>A	Рак поджелудочной железы	52
932	6-intron	c.673-1G>A	Рак легкого	52
932	6-intron	c.673-1G>A	Острый миелоидный лейкоз	52
409	6-intron	c.672+1G>T	Папилома в желчном пузыре	60
1592	6-intron	c.672+2T>G	Лейомиосаркома	58
1325	9-intron	c.993+1G>A	Липосаркома	57
1325	9-intron	c.993+1G>A	Рак поджелудочной железы	58
721	9-intron	c.994-1G>T	Опухоль головного мозга	51
280	NA	c.?(del45kb)	Опухоль головного мозга	51
887	NA	c.?(del prom_ex1)	Лейомиосаркома	59
1050	NA	c.?(del prom_ex1)	Саркома	59
1546	NA	c.?(del)	Лейомиосаркома	53