

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ *TP53*, *ATM*, *NBS1*, *CHEK2* ПРИ РАННИХ ФОРМАХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У ПАЦИЕНТОК ИЗ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

В.Н. КИПЕНЬ¹, С.Б. МЕЛЬНОВ¹, Р.М. СМОЛЯКОВА²

¹Международный государственный экологический университет им. А.Д. Сахарова,
г. Минск, Республика Беларусь

²ГУ «Республиканский научно–практический центр онкологии
и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова»,
г. Минск, Республика Беларусь

Введение. На данный момент общепризнанным является факт, что наследственные мутации являются причиной не более 10% случаев рака молочной железы (РМЖ) [1]. В настоящий момент принято разделять гены по отношению частоты встречаемости (Т,%) предрасполагающего к возникновению данной онкопатологии аллеля и величины относительно риска (relative risk – RR) ее возникновения и развития на следующие группы [2]:

- высокопенетрантные гены (RR>8, Т<0,1%) – *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *PTEN*;
- среднепенетрантные гены (RR>3, Т=0,1÷10%) – *CHEK2*, *ATM*, *BRIP*, *PABL2*, *BARD1*, *XRCC1*;
- низкопенетрантные гены (RR<2, Т>20%) – *NBS1*, *LSP1*, *CASP8*, *TNRC9*, *MAPK3K1*, *FGFR2* и др.

В последнее время все большее внимание уделяется наследственным синдромам и частоте возникновения на их фоне РМЖ.

Наследственные опухолевые синдромы составляют незначительную пропорцию от общего числа новообразований, хотя для отдельных локализаций (молочная железа, яичник, толстый кишечник) их удельный вклад достигает значительно более высоких показателей [3,4]. Причиной подобных заболеваний является носительство наследуемой «раковой» мутации. Лица, имеющие такое генетическое повреждение, до определенного момента остаются практически здоровыми, однако они обладают фатально увеличенным риском возникновения неоплазм – пенетрантность соответствующих мутаций обычно составляет 85–100%.

К числу таких заболеваний относятся рак молочной железы и/или яичников (РМЖ/РЯ), прогрессирующие при синдроме Ли–Фраумени. Предметом исследования в этих случаях являются онкогены и гены–супрессоры злокачественной трансформации клеток, такие как *BRCA1* и *BRCA2*, а также, *TP53*, *CHEK2*, *ATM*, *NBS1* и др., консервативно наследуемые дефекты в которых приводят к парадоксально высокому риску развития рака, достигающему нередко 60–95% [5]. Несмотря на тот факт, что суммарный вклад средне- и низкопенетрантных генов может превышать роль высокопенетрантных генов в возникновении онкопатологии, их значение в генезе РМЖ изучено крайне недостаточно.

Герминальные мутации в гене *TP53* приводят к развитию синдрома Ли–Фраумени (ЛФС), который сопровождается возникновением мультиорганных неоплазий (ОММ 151623): сарком мягких тканей, остеосарком, рака молочной железы, опухолей головного мозга, рака коры надпочечников, лейкоемий или рака легких – в пременопаузальном возрасте [6]. Также в настоящее время общепризнанно, что ген *CHEK2* является молекулярным базисом формирования ЛФС второго типа (ОММ 609265) или, как его еще иначе называют, ЛФС–подобного синдрома (ЛФПС) [7–9]. Его отличительной чертой от ЛФС является ранняя прогрессия онкологического заболевания (до 30 лет) и более тяжелая клиническая картина. Ассоциация гена *NBS1* (мутации в данном гене приводят к развитию тяжелой формы иммунодефицита – синдрома Ниймегена (ОММ 251260), – с развитием РМЖ показана только для мутации 657del5, а вовлеченность ряда полиморфизмов и мутаций в гене *ATM* (мутации в данном гене приводят к развитию наследственного заболевания с мозжечковой атаксией, телеангиэктазиями, нарушением иммунитета и склонностью к злокачественным новообразованиям – атаксии–телеангиэктазии, ОММ 208900) в молекулярный патогенез наследственных форм РМЖ до сих пор остается до конца невыясненной [10,11].

Таким образом, нами была предпринята попытка определить частоту встречаемости основных патогенетически значимых мутаций в основных генах (кроме *BRCA1* и *BRCA2*), вовлеченных в генез РМЖ – *TP53*, *CHEK2*, *ATM*, *NBS1*.

Методика и объекты исследования.

Клинический материал. В исследование были включены 165 пациентов с молатеральным РМЖ. Группа билатерального РМЖ составила: 2 случая синхронного билатерального РМЖ (временной критерий синхронности билатерального рака молочной железы составил не более 12 месяцев [12]) и 7 случаев метакронного билатерального РМЖ. Средний возраст пациентов с молатеральным РМЖ на момент возникновения опухоли составил 41,7±5,8 лет (возрастной интервал – 24–49 лет), пациентов с билатеральными формами РМЖ – 39,8±5,0 лет (возрастной интервал – 33–48 лет).

В группу сравнения вошли 123 условно здоровых пациента без онкологической патологии в анамнезе на момент забора крови, средний возраст составил 39,6±5,1 лет (возрастной интервал – 25–52 года). Группа сравнения соответствует по возрасту и этническому составу выборке больных РМЖ.

Все участники исследования дали информированное согласие на проведение молекулярно-генетических исследований.

Выделение ДНК. Все образцы ДНК были выделены из лейкоцитов периферической крови с помощью наборов «ДНК–экспресс кровь» НПФ Литех (РФ), а также с помощью метода водно-карбинольной экстракции по протоколу Helene C. Johanson с модификациями [13].

Детекция мутаций. Анализ мутаций p.R273C, p.R175H в гене *TP53*, а также мутаций g.1100delC и g.IVS2+1G>A в гене *CHEK2* проводили с помощью аллель-специфической полимеразной цепной реакции (ПЦР) на приборе PeqLab Primus 96 Advanced (Германия). С помощью метода полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) были определены мутации p.R282W, p.R337H, p.R248W в гене *TP53* и мутации p.C49S в гене *ATM*. Анализ мутации g.657del5 в гене *NBS1* выполнен с помощью стандартной двухпраймерной ПЦР. Последовательности олигонуклеотидов и характеристики ПЦР-продуктов и рестрикторов (с указанием температуры отжига и используемых рестриктаз фирмы NEB) представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Последовательности олигонуклеотидов, используемых в ПЦР

Ген/ мутация	Последовательность олигонуклеотидов, 5'>3'	T _a , °C	Метод	Размер ампликона/ рестрикторов (п.о.)
TP53 p.R273C (rs121913343)	R-com. ¹ 5'-CTCGCTTAGTGCTCCCTG-3' F-mut. ² 5'-CGGAACAGCTTTGAGGTGT- 3' F-wt ³ 5'-CGGAACAGCTTTGAGGTGC-3'	56	АС- ПЦР ⁴	121
TP53 p.R248W (rs121912651)	R-com. 5'-TGTGCAGGGTGGCAAGTG-3' F-mut. 5'-GCATGGGCGGCATGAACT-3' F-wt 5'-GCATGGGCGGCATGAACC-3'	59	АС- ПЦР	85
TP53 p.R175H (rs28934578)	R-com. 5'-CCTGTGCAGCTGTGGGTT-3' F-mut. 5'-GCTCATGGTGGGGGCAGT-3' F-wt 5'-GCTCATGGTGGGGGCAGC-3'	59	АС- ПЦР	118
TP53 p.R282W (rs28934574)	F 5'-TGCTGCCGTCAACTAGAACA-3' R 5'-GGGTGGTTGGGAGTAGATGG-3'	56	ПДРФ ⁵ (HpaI)	CC (127,159) CT (127,159,286) TT (286)
TP53 p.R337H (rs121912664)	F 5'-CCCAATGAGATGGGGTCAGC-3' R 5'-GCATGTTGCTTTTGTACCGTC-3'	56	ПДРФ (HhaI)	GG (123,209) AG (123,209,332) AA (332)
ATM p.C49S (rs1800054)	F 5'-TGCTGCCGTCAACTAGAACA-3' R 5'-ATGCCAAATTCATATGCAAGGC-3'	56	ПДРФ (HinfI)	CC (43,149,182) CG (43,149,182,225) GG (149,225)

Окончание таблицы 1

NBS1 g.657del5	F 5'-TGATCTGTCAGGACGGCA-3' R 5'-CATAATTACCTGTTTGGCATTCA-3'	55	ПЦР	82/77 (для делеции)
CHEK2 g.1100delC	R-com. 5'- CTGATCTAGCCTACGTGTCT-3' F-mut. 5'- CTTGGAGTGCCCAAATCAT-3' F-wt 5'-TTGGAGTGCCCAAATCAGT-3'	55	АС- ПЦР	120
CHEK2 g.IVS2+1G>A	R-com. 5'- CAGACTTTGAATAGCAGAGA-3' F-mut. 5'-ACACTTTCGGATTTTCAGGA-3' F-wt 5'-ACACTTTCGGATTTTCAGGG-3'	52	АС- ПЦР	114

¹ – общий реверс-праймер

² – форвард-праймер для мутантного типа аллеля

³ – форвард-праймер для дикого типа аллеля

⁴ – АС-ПЦР – метод аллель-специфической ПЦР

⁵ – ПДРФ – метод полиморфизм длин рестриционных фрагментов (приведена эндонуклеаза рестрикции)

Разделение аллелей осуществляли в 10% неденатурирующем полиакриламидном геле (ПААГ) с последующей окраской бромистым этидием (рисунок 1).

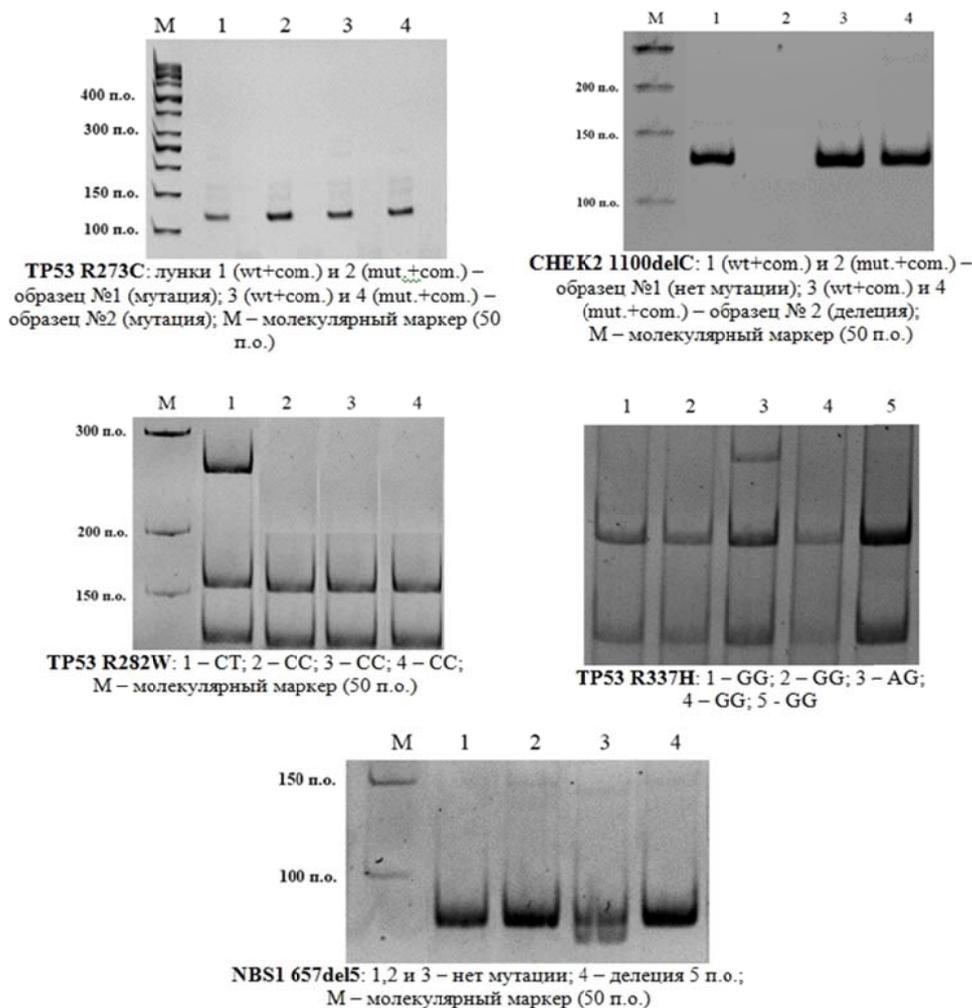


Рисунок 1 – Результаты ПААГ-электрофореза для исследуемых мутаций (в случае их обнаружения)

Результаты и их обсуждение. Результаты проведенного молекулярно–генетического тестирования суммированы в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты генотипирования по девяти исследуемым мутациям

Ген/ мутация	Гаплотип/ аллель	Кол–во пациентов, абс. частота (относительная частота)	
		Основная группа	Группа сравнения
TP53 p.R273C (rs121913343)	CC	171/174 (98,28%)	123/123 (100%)
	CT	3/174 (1,72%)	–
	TT	–	–
	Allele C	99,14%	100%
	Allele T	0,86%	–
TP53 p.R248W (rs121912651)	CC	174/174 (100%)	123/123 (100%)
	CT	–	–
	TT	–	–
	Allele C	100%	100%
	Allele T	–	–
TP53 p.R175H (rs28934578)	AA	–	–
	AG	–	–
	GG	174/174 (100%)	123/123 (100%)
	Allele A	–	–
	Allele G	100%	100%
TP53 p.R282W (rs28934574)	CC	173/174 (99,43%)	123/123 (100%)
	CT	1/174 (0,57%)	–
	TT	–	–
	Allele C	99,71%	100%
	Allele T	0,29%	–
TP53 p.R337H (rs121912664)	GG	173/174 (99,43%)	123/123 (100%)
	AG	1/174 (0,57%)	–
	AA	–	–
	Allele A	0,29%	–
	Allele G	99,71%	100%
ATM p.C49S (rs1800054)	CC	174/174 (100%)	123/123 (100%)
	CG	–	–
	GG	–	–
	Allele C	100%	100%
	Allele G	–	–
NBS1 g.657del5	del+/del+	–	–
	del+/del–	–	1/123 (0,81%)
	del–/del–	174/174 (100%)	122/123 (99,19%)
	del+	–	0,41%
	del–	100%	99,59%
CHEK2 g.1100delC	del+/del+	–	–
	del+/del–	1/174 (0,57%)	–
	del–/del–	173/174 (99,43%)	123/123 (100%)
	del+	0,29%	–
	del–	99,71%	100%
CHEK2 g.IVS2+1G>A	AA	–	–
	AG	–	–
	GG	174/174 (100%)	123/123 (100%)
	Allele A	–	–
	Allele G	100%	100%

TP53 – ген белка p53. В выборке пациентов с РМЖ мутация R273C была обнаружена с частотой 1,72% (3/174), мутации R282W и R337H – в 0,57% случаев каждая (1/174 и 1/174 соответственно), мутации R248W и R175H обнаружены не были. В группе сравнения не было найдено ни одной мутации в гене *TP53*.

Возраст манифестации заболевания у пациенток с мутацией R273C – 48, 49 и 37 лет. Все три женщины белорусской этнической принадлежности. В семейном анамнезе одной из носительниц отмечается случай заболевания раком желудка (первая степень родства). Возраст манифестации РМЖ у пациентки с мутацией R282W – 35 лет, с мутацией R337H – 37 лет. В нашем исследовании был выявлен случай двойного носительства герминальных мутаций в гене *TP53* – мутации R337H и R273C были обнаружены у пациентки с фибросаркомой правой молочной железы (возраст манифестации – 37 лет, эстрогеновый и прогестероновый статус опухоли отрицательный, HER-2/new 0).

ATM – ген атаксии телеангиэктазии. В нашей выборке больных РМЖ, а также среди пациентов из группы сравнения, мутация C49S в гене *ATM* выявлена не была.

NBS1 – ген нибрина. В выборке больных раком молочной железы мутация 657del5 в гене *NBS1* обнаружена не была, в группе сравнения был выявлен один случай мутации – 0,81% (1/123). Возраст пациентки из группы сравнения с делецией 657del5 в гене *NBS1* составляет 39 лет (в этом же возрасте проведена операция по удалению кисты в правой молочной железе). У носительницы данной мутации случаев заболевания РМЖ/РЯ в семье не отмечается.

CHEK2 – ген киназы сверхочных точек 2. Скрининг мутаций 1100delC, IVS2+1G>A в гене *CHEK2* у больных раком молочной железы выявил одну (0,57% – 1/174) носительницу герминальной мутации – 1100delC (возраст манифестации РМЖ – 37 лет, в семейном анамнезе случаев заболевания РМЖ/РЯ не отмечается). Мутация IVS2+1G>A в основной группе (пациенты с РМЖ) выявлена не была. В группе сравнения мутаций 1100delC и IVS2+1G>A в гене *CHEK2* обнаружено не было.

В нашей выборке больных РМЖ была выделена группа из 59 женщин (включая пациентов с билатеральными формами РМЖ) с отягощенным семейным анамнезом (наличие онкопатологии, относящейся к спектру опухолей при синдромах ЛФС и ЛФПС, у родственников первой и второй степеней родства) и/или возрастом манифестации до 40 лет. Спектр и доля выявленных мутаций у пациенток с отягощенным семейным анамнезом и у женщин со спорадическими случаями заболевания представлены на рис.2.

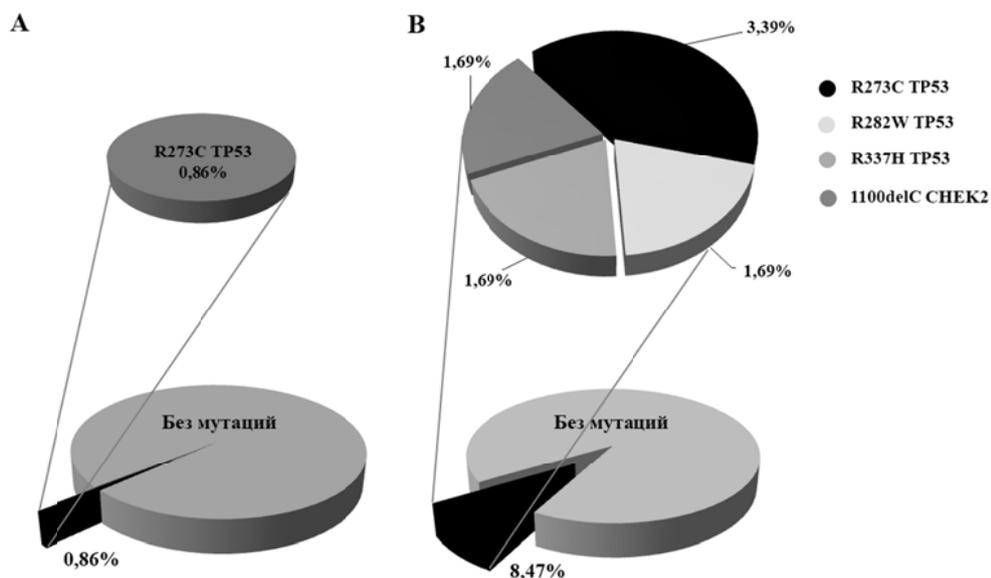


Рисунок 2 – Спектр и доля мутаций генов *TP53* и *CHEK2* у больных А) со спорадическими случаями заболевания (n=115); В) у больных с отягощенным семейным анамнезом и/или ранним сроком манифестации (n=59)

Выводы. Таким образом, среди пациентов с РМЖ нами были выявлены мутации в 2,87% случаев (5/174), из них на мутации в гене *TP53* приходится более 80%. Вклад других генов (*ATM*,

NBS1 и *CHEK2*) представляется менее существенным. Однако при дифференциальном подходе к анализу частоты встречаемости мутаций в исследуемых генах, а именно при выделении группы пациентов с отягощенным семейным анамнезом (наличие онкопатологии, относящейся к спектру опухолей при синдромах ЛФС и ЛФПС, у родственников первой и второй степеней родства) и/или возрастом манифестации до 40 лет, частота встречаемости мутаций возрастает до 8,5% (основной вклад – мутаций в гене *TP53* (около 80%), на *CHEK2* приходится остальные случаи).

ЛИТЕРАТУРА

1. Имятников, Е.Н. Наследственный рак молочной железы / Е.Н. Имятников // Практическая онкология – Т.11 – №4 – 2010 – С.258–266;
2. Garcia-Closas, M. Genetic susceptibility loci for breast cancer by estrogen receptor status / M. Garcia-Closas, S. Chanock // Clin Cancer Res. – 2008 – Vol.14 – №2 – P.8000–8009;
3. Phuong, L. Mai Li-Fraumeni syndrome: report of a clinical research workshop and creation of a research consortium // L. Mai Phuong [et al.] // Cancer Genet. – 2012 – 205(10):479–487;
4. Kory, W. Jasperson Hereditary and Familial Colon Cancer / Kory W. Jasperson [et al.] // Gastroenterology – 2010 – 138(6):2044–2058;
5. Petra van der Groep Pathology of hereditary breast cancer / Petra van der Groep, Elsken van der Wall, Paul J. van Diest // Cell Oncol (Dordr) – 2011 – 34(2):71–88;
6. Chompret, A. The Li-Fraumeni syndrome. / A. Chompret // Biochimie – 2002 – P.75–82;
7. Bell, D.W. Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome / D.W. Bell [et al.] // Science – 1999 – P.2528–2531;
8. Sodha, N. Increasing evidence that germline mutations in CHEK2 do not cause Li-Fraumeni syndrome / N. Sodha [et al.] // Hum. Mutat. – 2002 – P.460–462;
9. Meijers-Heijboer, H. Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2(*)1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations / H. Meijers-Heijboer [et al.] // Nat. Genet. – 2002. – P.55–59;
10. Zhang, Z.H. Current evidence on the relationship between two polymorphisms in the NBS1 gene and breast cancer risk: a meta-analysis / Z.H. Zhang [et al.] // Asian Pac J Cancer Prev. – 2012 – 13(11):5375–9;
11. Ahmed, M. ATM and breast cancer susceptibility / M. Ahmed, N. Rahman // Oncogene – 2006 – 25,5906–5911;
12. Kheirleseid, E.A. Bilateral breast cancer: analysis of incidence, outcome, survival and disease characteristics / E.A. Kheirleseid [et al.] // Breast Cancer Res. Treat. – 2010 – 126(1):131–40;
13. Johanson, H.C. DNA elution from buccal cells stored on Whatman FTA Classic Cards using a modified methanol fixation method / Helene C. Johanson [et al.] // BioTechniques – 2009 – 46:309–311.

FREQUENCY OF MUTATIONS IN *TP53*, *ATM*, *NBS1*, *CHEK2* GENES IN EARLY BREAST CANCER PATIENTS FROM BELARUS

V.N. KIPEN, S.B. MELNOV, R.M. SMOLYAKOVA

Summary

The study presents the results of molecular genetic testing for mutations in *TP53*, *ATM*, *NBS1*, *CHEK2* genes among patients with breast cancer from Belarus. The frequencies of mutations p.R273C, p.R248W, p.R175H, p.R282W, p.R337H in *TP53* gene; p.C49S in *ATM* gene; g.657del5 in *NBS1* gene; g.1100delC and g.IVS +1G>A in *CHEK2* gene in the main group and the comparison group. Among patients with breast cancer have been identified mutations in 2.87% of cases (5/174), of which mutations in the *TP53* gene accounts for more than 80%. The contribution of other genes (*ATM*, *NBS1* and *CHEK2*) seems less important. However, the differential approach to the analysis of the incidence of mutations in the genes studied, namely the allocation of the group of patients with a family history, frequency of mutations is increased to 8.5% (the main contribution – mutations in the *TP53* gene (about 80%) fall in the *CHEK2* the remaining cases).

© Кипень В.Н., Мельнов С.Б., Смолякова Р.М.

Поступила в редакцию 22 сентября 2015г.