

**Санкт-Петербургский политехнический университет
Петра Великого
Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций**

На правах рукописи

Соколова Татьяна Николаевна

Рецессивные гены, предрасполагающие к раку молочной железы

Направление подготовки 03.06.01 «Физика и астрономия»

Код и наименование

Направленность 03.06.01_12 «Биофизика»

Код и наименование

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

**об основных результатах научно-квалификационной работы
(диссертации)**

Автор работы: Соколова Т.Н.
Научный руководитель: Власова О.Л.,
д.ф-м.н., доц.

Санкт Петербург – 2020

Научно-квалификационная работа выполнена в Высшей школе биомедицинских систем и технологий Института биомедицинских систем и биотехнологий федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого». Основная часть экспериментальных исследований выполнена на базе научной лаборатории молекулярной онкологии федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Директор ВИФШ:	Журихина Валентина Владимировна, д.ф-м.н., доц.
Научный руководитель:	Власова Ольга Леонардовна, д.ф-м.н., доц.
Научный консультант:	Имянитов Евгений Наумович, д.м.н., проф., чл.-корр. РАН
Рецензент:	Кузнецова Дарья Сергеевна, к.б.н., ФГБУ «НМИЦ онкологии им.Н.Н.Петрова» Минздрава России

С научным докладом можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» и на сайте Электронной библиотеки СПбПУ по адресу: <http://elib.spbstu.ru>

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

Рак молочной железы (РМЖ) занимает ведущее место в структуре злокачественных новообразований у женщин: его доля составляет 11.6% среди всех случаев заболевания раком [Ferlay et al, 2018].

Наследственный рак молочной железы является самой частой разновидностью семейных опухолей: его вклад в заболеваемость РМЖ составляет 5 - 10%. В настоящее время известен ряд генов (BRCA1/2, CHEK2, NBS1, PALB2 и т.д.), мутации в которых вносят существенный вклад в формирование предрасположенности к данному заболеванию [Miki et al, 1994; Wooster et al, 1994; Melchor et al, 2013; Mavaddat et al, 2010; Lalloo et al, 2012; Sokolenko et al, 2012]. Следует заметить, что наследование этих мутаций носит, в основном, доминантно-аутосомный характер. Это обстоятельство может быть связано с методологией поиска мутаций: как правило, исследуются пациенты с положительным семейным онкологическим анамнезом (наличие близких родственников с данным заболеванием), что благоприятствует выявлению доминантных онкоассоциированных мутаций. В то же время, не менее логичным является предположение о том, что предрасположенность к раку, может передаваться и по рецессивному типу, как это описано для многих «классических» медико-генетических патологий. В этом случае родители пациента, являясь носителями одного дефектного аллеля, остаются здоровыми, и пациент, как правило, не сообщает о семейной истории рака. Данное исследование нацелено на поиск рецессивных мутаций предрасположенности к РМЖ с помощью экзомного секвенирования (WES). Применение современных технологий увеличения длины прочтений (ридов) позволяет за счёт специфической биоинформатической обработки получать информацию о гаплотипе, что может быть использовано для поиска новых рецессивных генов с биаллельными мутациями. С другой стороны, снижение стоимости

WES делает этот метод подходящим для анализа достаточно больших выборок пациентов.

Цель и задачи исследования

Цель: поиск рецессивных мутаций предрасположенности к раку молочной железы.

Задачи:

1. Формирование группы образцов ДНК, выделенной из периферической крови, пациенток с раком молочной железы с выраженными клиническими проявлениями наследственного опухолевого синдрома, но с отсутствием рекуррентных мутаций в известных генах, ассоциированных с раком молочной железы
2. Выполнение полноэкзомного секвенирования (WES) отобранных образцов.
3. Разработка алгоритма биоинформатического анализа, позволяющего отбирать кандидатные гомозиготные мутации.
4. Верификация полученных результатов биоинформатического анализа с помощью стандартных методов (ПЦР в режиме реального времени, секвенирование по Сэнгеру).
5. Анализ *in silico* кандидатных мутаций.
6. Молекулярно-эпидемиологическое исследование кандидатных мутаций в генетически-обогащенной группе пациентов с РМЖ и в группе онкологически здоровых женщин.
7. Молекулярно-генетическая и клиничко-патологическая характеристика опухолей, полученных от носительниц кандидатных рецессивных мутаций, признанных вероятно клинически значимыми.

Научная новизна

Практически все современные исследования в медицинской онкогенетике ориентированы на идентификацию доминантных генов

семейных опухолевых синдромов, которые реализуют свой эффект при гетерозиготном носительстве инактивирующей мутации. Альтернативная возможность, а именно, формирование предрасположенности к раку у гомозиготных носителей рецессивных аллелей, почти полностью игнорируется. Данная научная работа призвана восполнить этот пробел и привести к открытию новой категории генов наследственного РМЖ – рецессивных генов.

Теоретическая и практическая значимость

Открытие новых рецессивных мутаций предрасположенности к РМЖ позволит усовершенствовать тесты молекулярной диагностики, что приведет к более персонализированному подходу к выбору тактики превентивных мероприятий и лечения больных. В рамках исследования было обнаружено несколько кандидатных гомозиготных (рецессивных) мутаций. Для определения роли мутации в развитии опухоли было проведено молекулярно-генетическое исследование опухолей молочной железы от носительниц кандидатной гомозиготной мутации в гене BRCA1. Наблюдаемая картина генетической нестабильности позволяет предположить, что для данных пациентов, возможно, подходит такое же лечение, как и для носительниц доминантных мутаций в генах BRCA1/2 с BRCAness фенотипом. Целесообразно продолжить изучение молекулярно-генетического портрета опухолей от носительниц и других кандидатных гомозиготных мутаций.

Апробация работы

Основные положения диссертации были представлены на Конгрессе Европейского общества клинических онкологов ESMO 2017 (стендовый доклад), на II Петербургском международном онкологическом форуме «Белые ночи», 22–24 июня 2016 года (стендовый доклад), на V

Петербургском международном онкологическом форуме «Белые ночи», 20–23 июня 2019 года (тезисы).

Публикации

По теме работы опубликовано 10 работ, из которых 7 – в рецензируемых научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК, 7 – в зарубежных изданиях, индексируемых в Web of Science и Scopus.

Представление научного доклада: основные положения

1. По итогам полноэкзомного секвенирования (WES) сформированной группы 49 образцов крови пациенток с РМЖ и 34 образца онкологически здоровых индивидуумов было выявлено более 66000 альтернативных вариантов.

2. Разработанный биоинформатический алгоритм фильтрации позволил отобрать 6 кандидатных мутаций, гомозиготное носительство которых может быть связано с рецессивным наследованием повышенного риска РМЖ: EXO1 p.Thr439Met, HSD17B14 p.Arg130Trp, MADD p.Arg766*, NCOA3 p.Gln586His, XRRA1 p.Ala229Val, BRCA1 p.Gln356Arg. Все варианты были подтверждены стандартными методами (ПЦР в режиме реального времени, секвенирование по Сэнгеру).

3. Разные программные инструменты предикторы патогенности дали разную оценку выявленных кандидатных вариантов, что может быть связано с различием подходов и алгоритмов, лежащих в основе этих программ.

4. Молекулярно-эпидемиологическое тестирование показало, что наиболее подходящими кандидатами для дальнейшего изучения являются гомозиготные мутации EXO1 p.Thr439Met (OR=4.2747, CI 95%: 0.5406 - 33.8029, p=0.1685), BRCA1 p.Gln356Arg (OR=11.1922, CI 95%: 1.4530 - 86.2140, p=0.0204). Кроме того, у мутации BRCA1 p.Gln356Arg наблюдается

отклонение от закона Харди-Вайнберга в сторону двукратного увеличения гомозиготных носителей среди группы больных.

5. Анализ группы пациенток с гомозиготной мутацией BRCA1 p.Gln356Arg показал, что у большинства из них (15/16, 94%) матери не болели РМЖ, что согласуется с гипотезой рецессивного наследования предрасположенности к РМЖ при гомозиготной мутации.

6. Для молекулярно-генетического анализа был доступен опухолевый материал трех пациенток. Была обнаружена картина генетической нестабильности, что является характерным фенотипом для носителей мутации BRCA1/2. Это наблюдение позволяет предполагать, что наличие данной мутации в гомозиготном состоянии может быть предпосылкой для назначения препаратов платины и PARP-ингибиторов. Целесообразно продолжить изучение данного вопроса.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Материалы и методы исследования

Объекты исследования

В качестве объектов исследования было выбрано 49 образцов ДНК, выделенных из лимфоцитов периферической крови, пациенток с раком молочной железы с выраженными клиническими признаками наследственного рака молочной железы, но без рекуррентных мутаций в известных генах, ассоциированных с РМЖ (Таблица 1). Для этих образцов было проведено полноэкзомное секвенирование (WES). Также с помощью WES были проанализированы 34 образца ДНК здоровых доноров в качестве контрольной группы.

Характеристики группы	Образцы РМЖ (N=49)
<i>Семейный онкологический анамнез:</i>	
Были случаи заболевания	20 (40.8%)
Не было случаев заболевания	29 (59.2%)
<i>Возраст постановки диагноза:</i>	
≤50 лет	40 (81.6%)
>50 лет	9 (18.4%)
Средний возраст	39 (25 – 62)
Множественный характер новообразований (РМЖ + другая локализация, в т. ч. билатеральный РМЖ)	37 (75.5%)
Только РМЖ (исключая билатеральный)	12 (24.5%)
<i>Клинические признаки наследственного опухолевого синдрома:</i>	
Наличие семейного анамнеза или множественный характер новообразований или ранняя манифестация заболевания	49 (100%)
Нет	0

Таблица 1. Характеристика группы пациентов, которым было проведено WES.

Для проведения молекулярно-эпидемиологического исследования были использованы группы образцов ДНК онкологически здоровых женщин,

образцов ДНК женщин с высокой степенью предрасположенности к РМЖ и образцов ДНК последовательных неселектированных случаев РМЖ.

Опухолевый материал от носительниц гомозиготной мутации для определения молекулярно-генетического профиля был доступен в трех случаях.

Все коллекции образцов были сформированы в Научной лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова».

Образцы, отобранные на WES, были предварительно протестированы на отсутствие характерных для Северо-Запада России повторяющихся мутаций в известных генах, ассоциированных с наследственным РМЖ: BRCA1 5382insC; BRCA1 4153delA; BRCA1 185delAG; BRCA2 6174delT; CHEK2 IVS2+1G>A; CHEK2 1100delC; NBS1 657del5. Исследование мутаций BRCA1/2 проводили по описанной ранее методике [Sokolenko et al., 2007]. Мутации в гене CHEK2, определялись методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени, мутация в гене NBS1 анализировалась методом ПЦР в режиме реального времени с высокоразрешающим анализом кривых плавления (HRM) и секвенированием по Сэнгеру.

Выделение нуклеиновых кислот

Выделение ДНК из образцов периферической крови пациентов и здоровых доноров проводилось с помощью модифицированного соль-хлороформного метода [Müllenbach et al., 1989].

Выделение нуклеиновых кислот из парафиновых срезов проводилось посредством оптимизированного экспресс - протокола, разработанного в НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова, с использованием протеиназы К (AMRESCO, USA) [54]. Реакция обратной транскрипции для синтеза кДНК на матрице РНК проводилась по с использованием набора RevertAid™ (Thermo Scientific, США) со случайными гексапраймерами.

Полноэкзомное секвенирование (WES)

Полноэкзомное секвенирование было проведено для 49 образцов пациентов с РМЖ без выявленных рекуррентных мутаций в известных генах

предрасположенности к онкологическому заболеванию и для 34 образцов онкологически здоровых лиц.

ДНК-библиотеки для экзомного секвенирования были подготовлены с использованием Nextera Rapid Capture Kit (Illumina, USA). Непосредственно секвенирование проводилась на приборе NextSeq (Illumina). 17 образцов ДНК здоровых доноров было просеквенировано на платформе MiSeq (Illumina).

Биоинформатический анализ

Для идентификации наследственных полиморфизмов (base calling) был использован программный комплекс, в основе которого лежит методика, предложенная в Illumina Best Practices [<http://www.broadinstitute.org/gatk/guide>]. Сборка FASTQ – файлов, генерированных в ходе WES, проводилась с помощью прикладной утилиты zcat. Для картирования данных секвенирования использовалась утилита BWA [<http://bio-bwa.sourceforge.net>] версии 0.7.15, запускаемой в режиме выравнивания алгоритмом Maximal Exact Matches (MEM). В качестве референсного генома была выбрана версия hg19 [<http://hgdownload.soe.ucsc.edu/downloads.html>]. После выравнивания ридов (прочтений) на последовательность референсного генома файлы формата SAM (Sequence Alignment/Map) конвертировались в формат BAM (Binary Alignment/Map) с помощью инструмента Samtools [<http://www.htslib.org>]. Выровненные риды сортировались в порядке геномных координат командой SortSam [<https://broadinstitute.github.io/picard/>]. Риды-дубликаты были помечены с помощью команды MarkDuplicates. Далее проходило определение полиморфизмов (SNP/indel calling), в результате были получены файлы формата VCF (Variant Call Format). Обработка осуществлялась при помощи комплекса инструментов GATK [<https://gatk.broadinstitute.org/>]. Данные были локально выровнены вокруг часто встречающихся инсерций и делеций (indel calling), полученных из базы данных проекта The 1000 Genomes Project [<http://www.internationalgenome.org/data>]. Последовательно выполнялась корректировка показателей качества прочтения ридов

выполнялась с помощью команды BaseRecalibrator и AnalyzeCovariates. Для определения наследственных полиморфизмов использовалась команда HaplotypeCaller.

Перед проведением анализа данных полноэкзомного секвенирования необходимо было провести сравнение и фильтрацию полученных данных. Работа состояла из трех этапов: сбор статистики и нахождение совпадений в VCF-файлах, сбор информации из различных баз данных в одну таблицу, перевод таблицы в формат MS-Excel или LibreOfficeCalc для дальнейшего анализа. Все шаги алгоритма были написаны как правила в Snakefile для утилиты Snakemake [Koster and Rahmann, 2012]. Все входные файлы архивировались и индексировались с помощью утилит bgzip и tabix от проекта HTSlib, для каждого образца была собрана статистика с использованием bcftools [<http://hgdownload.soe.ucsc.edu/downloads.html>]. Все варианты входных файлов были отфильтрованы по качеству Low Quality filter ($QUAL \geq 100$) и по глубине прочтения ($DP \geq 4$). Далее была произведена аннотация объединённых VCF файлов с SnpEff tools и вариантами фильтров с высоким и средним предполагаемым эффектом (HIGH или MODERATE) [Cingolani et al., 2012]. На следующем этапе VCF-файлы сравнивались с публичными базами данных с помощью команды bcftools annotate: The Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP) [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>]; Ensembl Structural Variation Data Base (ESMBL) [<http://www.ensembl.org/>]; The Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC) [<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>]; NHLBI GO exome sequencing project (ESP) [<http://evs.gs.washington.edu/EVS>]; Exome Aggregation Consortium (ExAC) [<http://exac.broadinstitute.org>]; Combined Annotation Dependent Depletion (CADD) [Kircher et al., 2014; <https://cadd.gs.washington.edu/>]; Biological General Repository for Interaction Datasets (BioGRID) [Stark et al., 2006; <http://thebiogrid.org>]. Была собрана дополнительная информация о генах, их функциях, соматических мутациях в опухолях, упоминании в публикациях и др. Окончательное решение о

включении варианта в список для валидации принимали после визуальной инспекции его в геномном браузере GenomeBrowse Golden Helix [<https://www.goldenhelix.com/>].

Алгоритм отбора кандидатных гомозиготных мутаций

В результате обработки данных полноэкзомного секвенирования 49 образцов была сформирована итоговая таблица, включающая в себя более 66000 альтернативных вариантов. Полученные данные также были обработаны по следующему алгоритму фильтрации:

1. Для отбора рецессивных мутаций были выбраны только варианты, представленные в гомозиготном состоянии, с частотой в популяции (MAF) <10%. Частоту мутаций определяли согласно публичным базам данных ExAC [<http://exac.broadinstitute.org>], ESP [<https://evs.gs.washington.edu/EVS/>] и dbSNP [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>].

2. Учитывалась встречаемость варианта в подгруппах онкологических больных (TCGA) и здоровых индивидуумов (nonTCGA), которые позволяли рассчитать величину риска (odds ratio, OR), ассоциированного с носительством аллеля и его значимость (p-value). Превышение более чем в два раза частоты аллеля среди онкологических пациентов оценивалось в пользу его потенциальной онкогенной роли.

3. Фильтрация по типу мутации: транспирующие мутации (инсерции, делеции, мутации в сайтах сплайсинга) почти всегда являются патогенными. Среди миссенс - мутаций были отобраны варианты с показателями патогенности CADD-score > 18 [<https://cadd.gs.washington.edu/>].

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

5. Проводилось сравнение с «контрольной» группой экзотов онкологически здоровых индивидуумов: отсутствие полиморфизма в

гомозиготном состоянии в данной группе позволяло оставить его для дальнейшей работы.

6. Оценка патогенности при помощи «калькулятора патогенности» INTERVAR, рекомендованного American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology (ACMG/AMP) [Richards et al., 2015].

7. Для оценки потенциального вклада мутации в молекулярный фенотип клетки применялся инструмент WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit [<http://www.webgestalt.org/>].

Валидация результатов WES

Для верификации отобранных гомозиготных мутаций в образцах, у которых они были обнаружены в ходе полноэкзомного секвенирования, был использован метод ПЦР в режиме реального времени с высокоразрешающим анализом кривых плавления (HRM) и секвенирование по Сэнгеру. В рамках работы была разработана программа для автоматизированного подбора праймеров [<http://github.com/zoldrax/primer-way>].

Тестирование наличия кандидатных гомозиготных (рецессивных) мутаций в ходе молекулярно-эпидемиологического исследования проводилось с использованием аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени.

Молекулярно-эпидемиологическое исследование

Молекулярно-эпидемиологическое исследование проводилось с целью оценки вклада мутации в формирование наследственной предрасположенности к заболеванию. В его основе лежит предположение о том, что предрасполагающие к заболеванию аллели должны достоверно чаще встречаться в группе больных («случаев»), чем группы здоровых («контролей»): исследование по схеме «случай-контроль». Для поиска рецессивных генов обращалось внимание на частоту аллеля именно в гомозиготном состоянии. Величина риска, ассоциированного с аллелем, оценивалась с помощью показателя OR (odds ratio): отношение шансов

заболеть среди носителей патогенного генотипа (с наличием гомозиготной мутации) и среди носителей генотипа «дикого типа» [Pagano and Gauvreau, 2000]. Проводилось сравнение образцов «крайних» групп: больных и онкологически здоровых индивидуумов [Kuligina et al., 2010; Kuligina et al., 2000]. В группу больных («случаев») входили образцы крови i) пациенток с РМЖ высокого риска развития заболевания (ранний возраст возникновения новообразования (≤ 50 лет)) и/или наличие случаев онкологического заболевания среди родственников и/или множественный характер опухолей) (N = 695) случайно отобранных пациенток с РМЖ (средним возраст 56 лет), вне зависимости от наличия и отсутствия клинических признаков наследственного ракового синдрома (N = 916). В группу «контролей» были включены образцы крови от онкологически здоровых женщин среднего и старшего возраста (46 – 89 лет) (N = 1151). Частоты генотипов в группе больных и контролей сравнивали с использованием критерия χ^2 или точного критерия Фишера.

Молекулярно-эпидемиологическое исследование в разном объеме было проведено для 6 мутаций: EXO1 p.Thr439Met, HSD17B14 p.Arg130Trp, MADD p.Arg766*, NCOA3 p.Gln586His, XRRA1 p.Ala229Val, BRCA1 p.Gln356Arg.

Анализ патогенности мутаций in silico

Анализ *in silico* изменений в структуре мутантного белка был проведен с использованием программных инструментов предикторов патогенности: PolyPhen-2 HDIV [Adzhubei et al., 2010], SIFT [Ng, Henikoff, 2003], MutationTaster [Schwarz et al., 2010], UMD-Predictor [Salgado D., et al, 2016], PROVEAN [Choi, Chan, 2015], MutationAssessor [Reva B., et al, 2007], FATHMM [Shihab et al., 2009], PANTHER [Mi et al, 2013].

Молекулярно-генетическая характеристика опухолей, полученных от носительниц кандидатных мутаций.

Для трех носительниц гомозиготной мутации BRCA1 p.Gln356Arg был доступен фиксированный в парафине архивный опухолевый материал,

пригодный для молекулярно-генетического исследования. В этих случаях был определен уровень экспрессии гена BRCA1 в образцах опухолей и оценена их генетическая нестабильность (BRCAness) методом MLPA.

Оценка экспрессии гена BRCA1 проводилась методом мультиплексной количественной ПЦР в режиме реального времени. Анализ генетической нестабильности с помощью MLPA проводили по описанной ранее коллективом научной лаборатории молекулярной онкологии методике [Preobrazhenskaya et al, 2017].

Результаты и их обсуждение

В ходе обработки данных биоинформатического анализа просеквенированных экзомов по описанному ранее алгоритму был сформирован список кандидатных мутаций, гомозиготное носительство которых может быть связано с повышенным риском РМЖ (Таблица 2).

Таблица 2. Список кандидатных мутаций

Ген	Мутация	RSdbSNP	Тип мутации	Генотип	CADD-score	MAF, %
EXO1	p.Thr439Met	4149963	missense	гомозигота	20.2	7.89%
HSD17B14	p.Arg130Trp	35299026	missense	гомозигота	34	3,675
MADD	p.Arg766*	35233100	stop_gained	гомозигота	38	3,848
NCOA3	p.Gln586His	2230782	missense	гомозигота	22.3	7,115
XRRA1	p.Ala229Val	61736355	missense	гомозигота	23.7	4,935
BRCA1	p.Gln356Arg	1799950	missense	гомозигота	18.3	4.41

Ген EXO1 кодирует фермент экзонуклеазу 1. Этот белок обладает 5' - 3' экзонуклеазной активностью и РНКазной Н-активностью (катализируют расщепление гибридных молекул РНК/ДНК). Есть сведения о взаимодействии экзонуклеазы 1 с белками MSH2, MLH1, MSH3, таким образом, она участвует в репарации неспаренных оснований ДНК [Schmutte et al, 2001]. Мутация EXO1 p.Thr439Met расположена в регионе,

взаимодействующим с белком репарации MSH3. Возможно, что мутация в этой позиции ухудшает работу белков репарации, что может иметь вредоносные последствия для системы поддержания стабильности генома и быть, в итоге, клинически значимым.

Ген HSD17B14 кодирует фермент 17 β -гидроксистероидную дегидрогеназу типа 14. Этот белок катализирует стереоспецифичные реакции окисления, восстановления эстрогенов и андрогенов, кофактором является НАД/НАДН. Экспрессируется в эпителиальных железистых тканях молочной железы, яичников и яичек [Sivik et al, 2012]. Вариант HSD17B14 p.Arg130Trp находится в домене, обладающем еноил-редуктазной активностью.

Ген MADD кодирует белок - домен MAPK-активирующей клеточной смерти. Играет важную роль в регуляции пролиферации, выживаемости и смерти клеток через механизм альтернативного сплайсинга. Есть несколько изоформ этого белка.

Ген NCOA3 кодирует ядерный рецептор – коактиватор 3. Также этот белок известен под названиями AIB1 ('amplified in breast 1' – «амплифицируется в молочной железе»), SRC-3 (стероидный рецептор – коактиватор 3), TRAM-1 (молекула – активатор 1 рецептора к гормону щитовидной железы). Противоположный сочетанный уровень экспрессий генов PAX2 и AIB1 может быть предиктивным маркером эффективности использования тамоксифена в лечении рака молочной железы [Hurtado et al, 2008]. Обнаруженный нами вариант находится между доменами NCOA_u2 и SRC-1.

Ген XRRA1 кодирует белок типа 1, ассоциированный с резистентностью к рентгеновскому излучению, может быть вовлечен в клеточный ответ на повреждение ДНК. Вариант XRRA1 p.Ala229Val находится в лейцин-богатом повторяющемся домене.

Ген BRCA1 является, пожалуй, самым известным доминантным геном предрасположенности к раку молочной железы, раку яичников, раку желудка. [Yap et al, 2011; Rich et al, 2015; Rebbeck et al, 2018]. Кроме

известных патогенных мутаций, предрасполагающих к наследственным ракам, для гена BRCA1 известен ряд вариантов с неясной клинической значимостью (VUS – variant of uncertain significance), которые также могут иметь клиническое значение и, таким образом, представляют интерес для исследователей [<http://priors.hci.utah.edu/>; Siddharth et al, 2020; Hongyan et al, 2020; Zuntini et al, 2018; Irwin et al, 2018]. Ген BRCA1 находится на хромосоме 17q21, кодирует белок, состоящий из 1863 аминокислот, с молекулярной массой 220 кДа. Белок состоит из мультифункциональных доменов, включающих в себя N-концевой RING – домен, 2х сигналов ядерной локализации ядерных и 2х C-концевых BRCT – доменов. Мутация p.Gln356Arg расположена в серин-богатом домене, ассоциированном с BRCT (BRCA1 C terminus). Серин – богатый домен принадлежит к IDR – региону (intrinsically disorder region – внутренне неупорядоченный регион), в котором высока вероятность возникновения структурных изменений.

Анализ *in silico* обнаруженных кандидатных мутаций

Инструменты-предикторы вычисляют возможное влияние замены аминокислоты на структуру и функции белка. Существующие инструменты, разработанные для предсказания патогенности аллельных вариантов, могут базироваться на анализе отдельных предиктивных параметров и их комбинаций (SIFT, PolyPhen, Panther, MutationTaster, PROVEAN, UMD - predictor) или использовать нейросетевой интегральный подход и машинное обучение (CADD, FATHMM). Например, SIFT [<http://sift.jcvi.org/>] главным образом учитывает степень консервативности участка гена, в котором [Ng, Henikoff, 2003]. PolyPhen-2 [<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>] объединяет 8 различных параметров, в том числе, влияние замены на вторичную структуру белка, аминокислотный контекст и консервативность фрагмента [Adzhubei et al., 2010]. MutationTaster [<http://www.mutationtaster.org/>] интегрирует информацию из разных интернет ресурсов (e.g. 1000 Genomes Project, ExAc, UniProt, ClinVar, NNsplice, Ensembl, phyloP, phastCons, HGMD) [Schwarz et al., 2010].

Следует заметить, что между перечисленными биоинформатическими инструментами не существует полного согласия в плане классификации вариантов с неясным значением. Для анализа *in silico* целесообразно применять разные предикторы.

Результаты *in silico* анализа обнаруженных нами кандидатных вариантов приведены в таблице 3.

Все использованные нами программы-предикторы сочли вариант EXO1 p.Thr439Met непатогенным, за исключением MutationAssessor, который оценил уровень патогенности варианта как средний, и CADD (показатель патогенности больше 20).

Аминокислотная замена HSD17B14 p.Arg130Trp является вероятно патогенной по версии SIFT, Polyphen2, PROVEAN, Panther, CADD; напротив, по версии UMD-predictor, MutationTaster, FATHMM эта мутация патогенной не является.

MADD p.Arg766* по умолчанию считается патогенной мутацией, т.к. происходит замена аргинина на стоп-кодон, CADD - показатель довольно высок (равен 38), однако, согласно MutationTaster, эта мутация является нейтральным полиморфизмом.

Мутация NCOA3 p.Gln586His относится к «вероятно-патогенным» по версии Polyphen2, Panther. Остальные программы-предикторы оценивают эту мутацию как нейтральную. Аналогичная ситуация наблюдается в отношении XRRA1 p.Ala229Val.

Потенциальная патогенность миссенс-мутации BRCA1 p.Gln356Arg достаточно высока по версии SIFT, Polyphen2, PROVEAN. Остальные предикторы полагают, что этот вариант, скорее, нейтральный.

Различия в оценке патогенности мутаций у разных программ – предикторов по всей видимости связаны с различием подходов, лежащих в основе этих инструментов. Кроме того, не учитывается генотип проявления мутации: в гетерозиготном состоянии вариант может быть непатогенным, а при проявлении в гомозиготе, возможно, будет иметь клиническое значение.

Таблица 3. Анализ *in silico* с помощью инструментов – предикторов.

Вариант Предиктор	EXO1 p.Thr439Met	HSD17B14 p.Arg130Trp	MADD p.Arg766*	NCOA3 p.Gln586His	XRRA1 p.Ala229Val	BRCA1 p.Gln356Arg
UMD-predictor	polymorphism	polymorphism	-	polymorphism	polymorphism	probably polymorphism
SIFT	tolerated	deleterious	-	tolerated	deleterious	deleterious
PolyPhen2	benign	probably damaging	-	possibly damaging	probably damaging	probably damaging
MutationTaster	polymorphism	polymorphism	polymorphism	polymorphism	polymorphism	polymorphism
PROVEAN	neutral	deleterious	-	neutral	neutral	deleterious
Panther	probably benign	probably damaging	-	probably damaging	possibly damaging	probably benign
MutationAssessor	medium	medium	-	low	medium	medium
FATHMM (Cancer)	passenger/other	passenger/other	-	passenger/other	passenger/other	passenger/other
CADD-score	20.2	34	38	22.3	23.7	18.3

Polymorphism/ Benign/ tolerated/ neutral – полиморфизм, непатогенный, нейтральный вариант

Probably polymorphism/ probably benign – возможно, полиморфизм; вероятно, непатогенный вариант

Probably/ possibly damaging – возможно, патогенный вариант

Deleterious – патогенный вариант

Medium/ low – средний/низкий уровень патогенности

Passenger/other – вариант, не являющийся значимым для онкологического заболевания

CADD – score >20 позволяет считать вариант патогенным

Результаты молекулярно-эпидемиологического исследования

Результаты молекулярно-эпидемиологического исследования представлены в таблице 4. Генотип wt/wt обозначает отсутствие варианта в образце, wt/mut – наличие кандидатного варианта в гетерозиготном состоянии, mut/mut – в гомозиготном состоянии.

Был произведен расчет показателя риска, ассоциированного с кандидатным генотипом (OR) (Таблица 5). Показатель OR (odds ratio) представлял собой отношение шансов заболеть среди носителей патогенного генотипа и носителей «дикого типа» [Pagano and Gauvreau, 2000]; он рассчитывался для двух вариантов событий: наличие мутантного аллеля (OR *per allele*) и носительство мутантного аллеля в гомозиготе (OR *per homozygota*).

Согласно гипотезе о связи повышенной предрасположенности к РМЖ с гомозиготным носительством мутации (рецессивная модель наследования), предполагалось, что носительство мутантного аллеля в гетерозиготном состоянии не является фактором риска возникновения новообразований молочной железы, а присутствие варианта в гомозиготном состоянии увеличивает риск заболевания.

Таблица 4. Результаты молекулярно-эпидемиологического исследования.

Генотип Вариант	Группа РМЖ				Контрольная группа				p-value
	wt/wt	wt/mut	mut/mut	Всего	wt/wt	wt/mut	mut/mut	Всего	
EXO1 p.Thr439Met	1566 (97.2%)	36 (2.2%)	9 (0.6%)	1611	749 (98.6%)	10 (1.3%)	1 (0.1%)	760	0.101
HSD17B14 p.Arg130Trp	239 (92.3%)	19 (7.3%)	1 (0.4%)	259	165 (93.7%)	11 (6.3%)	0	176	0.643
MADD p.Arg766*	483 (91.6%)	41 (7.8%)	3 (0.6%)	527	560 (90.6%)	56 (9.1%)	2 (0.3%)	618	0.613

NCOA3 p.Gln586His	274 (79.4%)	65 (18.8%)	6 (1.7%)	345	203 (85.7%)	27 (11.4%)	7 (2.9%)	237	0.038
XRRA1 p.Ala229Val	177 (93.7%)	12 (6.3%)	0	189	169 (94.4%)	10 (5.6%)	0	179	0.954
BRCA1 p.Gln356Arg	1088 (87.4)	145 (11.6%)	12 (0.96%)	1245	1001 (87%)	149 (12.9%)	1 (0.1%)	1151	0.010

Таблица 5. Отношение шансов развития заболевания для носителей мутаций.

Вариант	OR _{BC vs. healthy/ per allele}	95% CI:	p-value	OR _{BC vs. healthy/ per homo}	95% CI:	p-value
EXO1 p.Thr439Met	2.1420	1.1425 – 4.0160	0.0175	4.2747	0.5406 - 33.8029	0.1685
HSD17B14 p.Arg130Trp	1.3099	0.6235 – 2.7520	0.4761	2.0484	0.0830 - 50.5731	0.6612
MADD p.Arg766*	0.9148	0.6188 – 1.3524	0.6553	1.7634	0.2935 - 10.5934	0.5352
NCOA3 p.Gln586His	1.3266	0.8907 – 1.9759	0.1644	0.7676	0.2544 - 2.3158	0.6387
XRRA1 p.Ala229Val	1.1410	0.4867 – 2.6747	0.7616	0.9472	0.0187 - 47.9951	0.9784
BRCA1 p.Gln356Arg	1.0372	0.8264 - 1.3018	0.7525	11.1922	1.4530 - 86.2140	0.0204

Обнаружено, что частота мутации EXO1 p.Thr439Met в группе больных была выше, чем в группе здоровых; это наблюдение оказалось справедливым как для гетерозиготных, так и для гомозиготных генотипов: 2.2% vs 1/3% и 0.6% vs 0.1%, соответственно. Однако, показатель риска OR, ассоциированный с предположительно патогенным генотипом, оказался в два раза выше для гомозиготного варианта (4.27 vs 2.14). Данные наблюдения требуют подтверждения в расширенном исследовании.

Мутация HSD17B14 p.Arg130Trp в гомозиготном состоянии обнаружена лишь в одном случае в группе больных. Данный генотип признан редким, «приватным». Исчезающе низкая частота этого предположительно патогенного генотипа не позволяет сделать статистически достоверные выводы относительно его вклада в наследственный риск РМЖ.

Частота гетерозиготной мутации MADD p.Arg766* оказалась выше в группе здоровых, чем в группе больных (9.1% vs 7.8%). Несмотря на то, что замена нуклеотида С на Т в 2296 положении приводит к образованию стоп-кодона, по всей видимости данное событие не является патогенным.

Гомозиготный генотип NCOA3 p.Gln586His с одинаковой частотой встречался среди здоровых доноров и в группе РМЖ (2.9% vs 1.7%). По всей видимости, данный вариант можно считать нейтральным по отношению к риску РМЖ полиморфизмом.

Вариант XRRA1 p.Ala229Val признан уникальным «приватным» событием – единичной находкой WES: в гомозиготном состоянии не был обнаружен ни в группе больных, ни в группе здоровых индивидуумов.

Наиболее интересные данные получены в отношении миссенс-мутации с неоднозначным функциональным значением BRCA1 p.Gln356Arg. Частота гомозиготного генотипа BRCA1 p.Gln356Arg была достоверно выше в группе больных, по сравнению с группой здоровых (0.7% vs 0.1%, $p=0.0095$). Более того, было обнаружено достоверное увеличение показателя OR (OR = 11.1922, CI 95%: 1.4530 - 86.2140, $p = 0.0204$) для больных РМЖ при проявлении мутации в гомозиготном состоянии, что позволяет предполагать клиническую значимость именно гомозиготного генотипа.

Была выполнена оценка равновесия генотипов в группах пациенток и здоровых женщин согласно закону Харди-Вайнберга при помощи критерия хи-квадрат (Таблица 6). Этот анализ позволяет сделать вывод, соответствуют ли частоты генотипов в исследуемой группе принципу равновесия или наблюдается смещение в пользу определенных генотипов (в нашем случае - в сторону гомозигот по мутантному аллелю).

Таблица 6. Распределение по Харди-Вайнбергу (тест хи-квадрат)

Кандидатная мутация	Группа	Количество	Вариант носительства			Всего	χ^2	p-value
			wt/wt	wt/mut	mut/mut			
EXO1 p.Thr439Met	Пациенты с РМЖ	Наблюдаемое	1566	36	9	1611	65.455	0
		Ожидаемое	1566	44	1			
	Здоровые	Наблюдаемое	749	10	1	760	5.897	0.052
		Ожидаемое	739	21	0			
HSD17B14 p.Arg130Trp	Пациенты с РМЖ	Наблюдаемое	239	19	1	259	0.06	0.971
		Ожидаемое	240	18	1			
	Здоровые	Наблюдаемое	165	11	0	176	0.089	0.956
		Ожидаемое	164	12	0			
MADD p.Arg766*	Пациенты с РМЖ	Наблюдаемое	483	41	3	527	4.799	0.091
		Ожидаемое	479	47	1			
	Здоровые	Наблюдаемое	560	56	2	618	1.025	0.599
		Ожидаемое	562	55	1			
NCOA3 p.Gln586His	Пациенты с РМЖ	Наблюдаемое	274	65	6	345	3.153	0.207
		Ожидаемое	279	63	3			
	Здоровые	Наблюдаемое	203	27	7	237	19.207	0.000
		Ожидаемое	191	43	2			
XRRA1 p.Ala229Val	Пациенты с РМЖ	Наблюдаемое	177	12	0	189	0.097	0.953
		Ожидаемое	178	11	0			
	Здоровые	Наблюдаемое	169	10	0	179	0	1
		Ожидаемое	169	10	0			
BRCA1 p.Gln356Arg	Пациенты с РМЖ	Наблюдаемое	1088	145	12	1245	6.66	0.036
		Ожидаемое	1084	155	6			
	Здоровые	Наблюдаемое	1001	149	1	1151	3.968	0.138
		Ожидаемое	1008	139	5			

Для мутации EXO1 p.Thr439Met в целом по когорте подтверждено соответствие закону Харди-Вайнберга. Однако в группе больных РМЖ наблюдается достоверное увеличение наблюдаемой частоты гомозигот. Данный вариант требует дальнейшего изучения.

Интересно, что ожидаемые и наблюдаемые частоты распределения варианта NCOA3 p.Gln586His в когорте здоровых женщин достоверно различаются в пользу большей частоты гомозигот (wt/wt и mut/mut).

В случае мутации BRCA1 p.Gln356Arg мы зафиксировали достоверное двукратное увеличение количества гомозигот среди больных РМЖ, что нарушает равновесие Харди-Вайнберга и позволяет считать данный генотип

клинически-значимым. Важно, что в группе здоровых распределение аллелей соответствует распределению Харди-Вайнберга.

Молекулярно-генетическая и клинико-патологическая характеристика опухолей, полученных от носительниц кандидатных мутаций.

В таблице 7 представлена информация о носителях гомозиготной мутации BRCA1 p.Gln356Arg: диагноз, семейный анамнез, гистологическая и молекулярно-генетическая характеристика опухолевой ткани.

Таблица 7. Носители гомозиготной мутации BRCA1 p.Gln356Arg.

№	#	Диагноз	Наличие второй насл. мутации	Возраст	Семейный анамнез	TNM	Статус рецепторов : ER, PgR, HER2	Гист.тип карциномы	Экспрессия BRCA1 (мРНК)
1	551	PMЖ	-	60	нет	T3N1M0	ER+, PgR+, HER2-	протоковая	Средний уровень
2	617	PMЖ	-	61	нет	T1N1M0	ER-, PgR-, HER2++	медуллярная	Средний уровень
3	730	PMЖ	-	62	нет	T2N1M0	ER+, PgR-, HER2-	Нет данных	
4	845	PMЖ	-	46	нет	T2N1Mx	ER-, PgR-, HER2 nd	протоковая	
5	872	PMЖ	NBS 657del5	61	нет	T2N1M0	ER+, PgR+, HER2-	протоковая мультифокальная	
6	1059	PMЖ	CHEK2 1100delC	72	нет	T2N1M0	Нет данных	Нет данных	
7	1554	PMЖ	-	44	нет	T2N2M0	ER-, PgR-, HER2 nd	протоковая	
8	1613	PMЖ	-	48	нет	T2N3M0	ER+, PgR+, HER2-	протоковая	Средний уровень
9	3423	Билат. PMЖ	-	35/39	нет	Нет данных	Нет данных	Нет данных	
10	4148	PMЖ	-	76	Да (сестра – PMЖ)	T2N3M0	ER+, PgR+, HER2-	протоковая	
11	5052	PMЖ	-	39	нет	T2N1M0	ER+, PgR+, HER2-	Мультифокальная: протоковая + муцинозная + муцинозно-папиллярная	
12	5600	PMЖ	-	33	нет	Нет данных	ER-, PgR-, HER2-	Нет данных	
13	6480	PMЖ	-	64	нет	T4bN2M1	ER+, PgR+, HER2-	Нет данных	
14	9323	PMЖ	-	30	нет	Нет данных	Нет данных	Нет данных	
15	9565	PMЖ	-	39	нет	Нет данных	ER+, PgR +/-, HER2++	муцинозная + неспецифическая	
16	10178	PMЖ	-	41	Да (мать – билат. PMЖ)	T2N0M0	ER+, PgR+, HER2-	неспецифическая	

Было обнаружено, что у большинства пациенток с мутацией BRCA1 p.Gln356Arg (15/16, 94%) матери не болели РМЖ, что согласуется с гипотезой рецессивного наследования предрасположенности к РМЖ. У двух пациенток (2/16, 12.5%) были обнаружены известные рекуррентные мутации: NBS 657del5, CHEK2 1100delC. Надо заметить, что у 11/12 (91.7%) пациенток с известным TNM-статусом обнаружены метастазы в регионарных лимфатических узлах (N1-N3 stages), это существенно выше, чем в среднем по когорте - 54% ($p = 0.0008$, Fisher exact test). Как известно, для «канонических» BRCA1-ассоциированных опухолей молочной железы обычно характерен отрицательный статус рецепторов эстрогена, прогестерона и HER2 (т.н. «трижды-негативный» рак) [Rich et al, 2015]. Среди пациенток с гомозиготной мутацией BRCA1 p.Gln356Arg только у одной (1/13, 7.7%) опухоль была трижды-негативна, у 9/13 (69%) опухоль является эстроген-зависимой.

Материал опухолевой ткани от трех носительниц гомозиготной мутации BRCA1 p.Gln356Arg был пригоден для молекулярно-генетического исследования. В этих образцах зафиксирован средний уровень экспрессия мРНК гена BRCA1, что характерно для злокачественных новообразований молочной железы [<https://www.proteinatlas.org/>]. Полагают, что интенсивность экспрессии мРНК гена BRCA1 может служить прогностическим маркером ответа на лечение.

Результаты исследования генетической нестабильности опухолевых клеток (BRCAness) методом MLPA представлены на рис.1 (a, b, c). В качестве «стабильного» контроля использовали опухолевую ткань молочной железы без мутаций BRCA1/2.

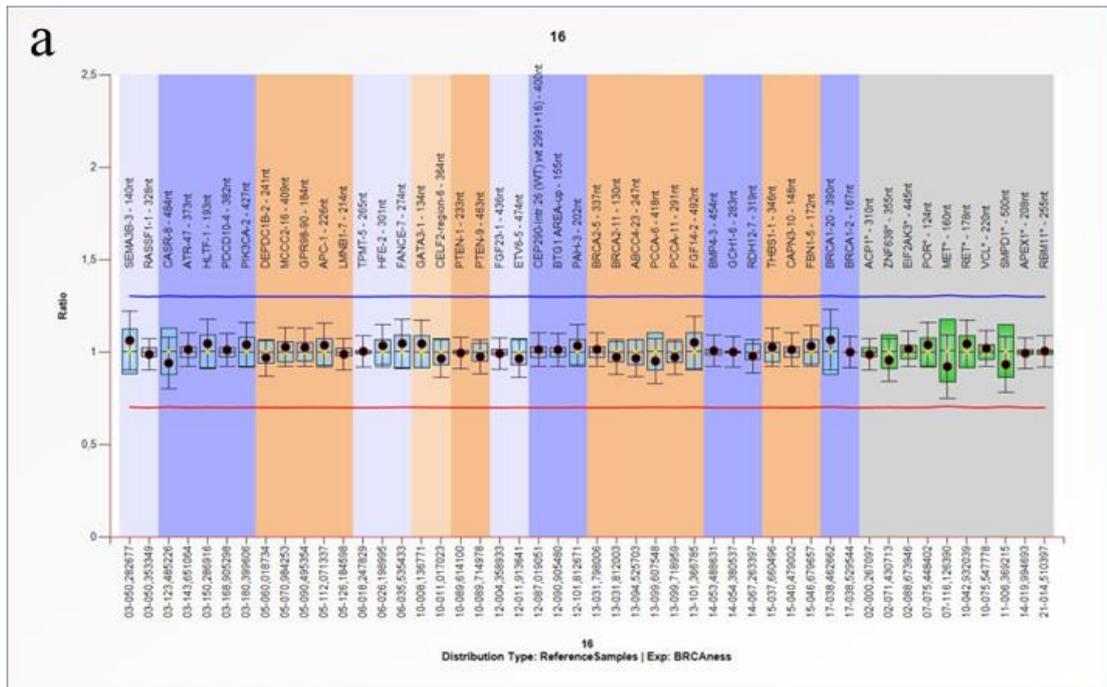


Рисунок 1а. Контрольный генетически стабильный образец (РМЖ без мутаций BRCA1/2)

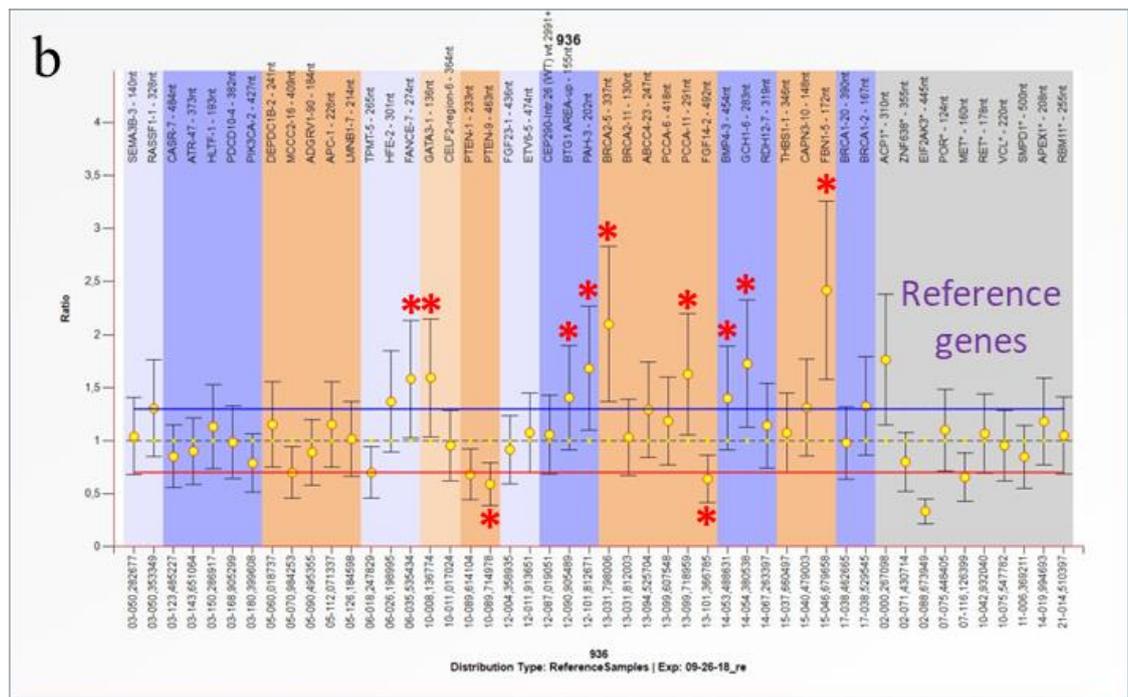


Рисунок 1б. Образец РМЖ #10178 (BRCA1 p.Gln356Arg mut/mut),
* -аллельный имбаланс (loss или gain)

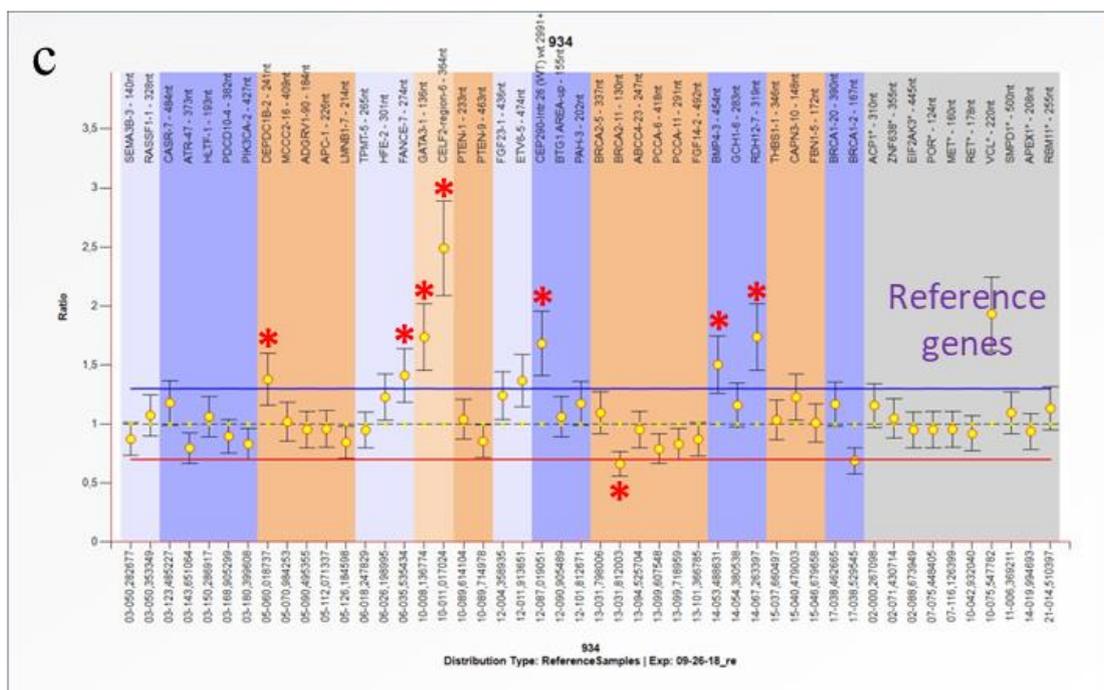


Рисунок 1с. Образец РМЖ #1613 (BRCA1 p.Gln356Arg mut/mut),

*- аллельный имбаланс (loss или gain)

Обнаруженная в обеих «мутантных» опухолях картина множественных аллельных имбалансов, соответствует феномену генетической нестабильности (BRCAness) и позволяет предположить, что фенотип опухолей с гомозиготной мутацией BRCA1 p.Gln356Arg сходен с фенотипом злокачественных образований молочной железы у носителей «классических» доминантных гетерозиготных мутаций в генах BRCA1/2. Таким образом, наличие данной мутации в гомозиготном состоянии может быть предпосылкой для назначения такого же лечения, как для пациенток с BRCA1/2-ассоциированным РМЖ - препаратов платины и PARP-ингибиторов.

Заключение

1. По итогам полноэкзомного секвенирования (WES) сформированной группы 49 образцов крови пациенток с РМЖ и 34 образца онкологически здоровых индивидуумов было выявлено более 66000 альтернативных вариантов.

2. Разработанный биоинформатический алгоритм фильтрации позволил отобрать 6 кандидатных мутаций, гомозиготное носительство

которых может быть связано с рецессивным наследованием повышенного риска РМЖ: EXO1 p.Thr439Met, HSD17B14 p.Arg130Trp, MADD p.Arg766*, NCOA3 p.Gln586His, XRRA1 p.Ala229Val, BRCA1 p.Gln356Arg. Все варианты были подтверждены стандартными методами (ПЦР в режиме реального времени, секвенирование по Сэнгеру).

3. Разные программные инструменты предикторы патогенности дали разную оценку выявленных кандидатных вариантов, что может быть связано со спецификой подходов и алгоритмов, лежащих в основе этих программ.

4. Молекулярно-эпидемиологическое тестирование показало, что наиболее подходящими кандидатами для дальнейшего изучения являются гомозиготные мутации EXO1 p.Thr439Met (OR=4.2747, CI 95%: 0.5406 - 33.8029, p=0.1685), BRCA1 p.Gln356Arg (OR=11.1922, CI 95%: 1.4530 - 86.2140, p=0.0204). Кроме того, у мутации BRCA1 p.Gln356Arg наблюдается отклонение от закона Харди-Вайнберга за счет двукратного избытка гомозиготных носителей среди группы больных.

5. Анализ группы пациенток-носительниц гомозиготного генотипа по мутации BRCA1 p.Gln356Arg показал, что у большинства из них (15/16, 94%) матери не болели РМЖ, что согласуется с гипотезой рецессивного наследования предрасположенности к РМЖ.

6. Материал опухолевой ткани от трех носительниц гомозиготной мутации BRCA1 p.Gln356Arg был пригоден для молекулярно-генетического исследования. В этих образцах РМЖ была обнаружена картина генетической нестабильности (BRCAness), которая является характерным признаком РМЖ у носительниц мутации BRCA1/2. Сделанное наблюдение позволяет предполагать, что наличие мутации BRCA1 p.Gln356Arg в гомозиготном состоянии может быть предпосылкой для назначения препаратов платины и PARP-ингибиторов. Целесообразно продолжить изучение данного вопроса.

Таким образом, в ходе данного исследования были впервые получены данные, свидетельствующие о существовании предрасполагающих к РМЖ генов, действующих по рецессивному механизму. Интересно, что такой мутацией в данном случае оказалась мутация самого знаменитого «ракового» гена - *BRCA1*, который до сих пор являлся общепризнанным примером доминантной трансмиссии.

Список работ, опубликованных по теме научно-квалификационной работы (диссертации)

Публикации в изданиях, рецензируемых ВАК

1. Sokolenko A.P., Preobrazhenskaya E.V., Aleksakhina S.N., Iyevleva A.G., Mitiushkina N.V., Zaitseva O.A., Yatsuk O.S., Tiurin V.I., Strelkova T.N., Togo A.V., Imyanitov E.N. Candidate gene analysis of BRCA1/2 mutation-negative high-risk Russian breast cancer patients // *Cancer Lett*, 2015, Vol. 359(2), P. 259-261.
2. Moiseyenko V.M., Moiseyenko F.V., Yanus G.A., Kuligina E.S., Sokolenko A.P., Bizin I.V., Kudriavtsev A.A., Aleksakhina S.N., Volkov N.M., Chubenko V.A., Kozyreva K.S., Kramchaninov M.M., Zhuravlev A.S., Shelekhova K.V., Pashkov D.V., Ivantsov A.O., Venina A.R., Sokolova T.N., Preobrazhenskaya E.V., Mitiushkina N.V., Togo A.V., Iyevleva A.G., Imyanitov E.N. First-line cetuximab monotherapy in KRAS/NRAS/BRAF mutation-negative colorectal cancer patients // *Clin Drug Investig.*, 2018, Vol. 38(6), P. 553-562.
3. Yanus GA, Akhapkina TA, Iyevleva AG, Kornilov AV, Suspitsin EN, Kuligina ES, Ivantsov AO, Aleksakhina SN, Sokolova TN, Sokolenko AP, Togo AV, Imyanitov EN. The spectrum of Lynch syndrome-associated germ-line mutations in Russia // *Eur J Med Genet*, 2020, Vol. 63(3), P. 103753 (1-4).
4. Mitiushkina N.V., Kholmatov M.M., Tiurin V.I., Romanko A.A., Yatsuk O.S., Sokolova T.N., Ivantsov A.O., Kuligina E.S., Stepanov I.A., Belyaev A.M., Togo A.V., Imyanitov E.N. Comparative analysis of expression of mutant and wild-type alleles is essential for reliable PCR-based detection of MET exon 14 skipping. // *Biochimie*, 2019, Vol. 165, P. 267-274.
5. Kuligina E.S., Sokolenko A.P., Bizin I.V., Romanko A.A., Zagorodnev K.A., Anisimova M.O., Krylova D.D., Anisimova E.I., Mantseva M.A., Varma A.K., Hasan S.K., Ni V.I., Koloskov A.V., Suspitsin E.N., Venina A.R., Aleksakhina S.N., Sokolova T.N., Milanović A.M., Schürmann P., Prokofyeva D.S., Bermisheva M.A., Khusnutdinova E.K., Bogdanova N., Dörk T., Imyanitov E.N. Exome sequencing study of Russian breast cancer patients suggests a predisposing role for USP39 // *Breast Cancer Res Treat*, 2020, Vol. 179(3), P. 731-742.
6. Sokolenko AP, Sokolova TN, Ni VI, Preobrazhenskaya EV, Iyevleva AG, Aleksakhina SN, Romanko AA, Bessonov AA, Gorodnova TV, Anisimova EI, Savonevich EL, Bizin IV, Stepanov IA, Krivorotko PV, Berlev IV, Belyaev AM, Togo AV, Imyanitov EN. Frequency and spectrum of founder and non-founder BRCA1 and BRCA2 mutations in a large series of Russian breast cancer and ovarian cancer patients. // *Breast Cancer Res Treat.*, 2020 Aug 9. doi: 10.1007/s10549-020-05827-8. Online ahead of print.PMID: 32776218
7. Соколова Т.Н., Лайдус Т.А., Меерович Р.И., Загороднев К.А., Холматов М.М., Тюрин В.И., Романько А.А., Анисимова М.О., Власова О.Л., Кулигина Е.Ш. , Янус Г.А. Технические аспекты «жидкостной биопсии»: влияние физиологических и преаналитических параметров на уровень циркулирующей опухолевой ДНК // *Вопросы онкологии*. 2020. №4

Публикации в других изданиях

1. Соколова Т.Н., Имянитов Е.Н., Соколенко А.П., Бизин И.В., Суспицын Е.Н., Кулигина Е.Ш. Разработка программы автоматизированного подбора специфичных праймеров для полного секвенирования кодирующей

- последовательности гена // Форум «Белые ночи 2019». 20-23 июня, Санкт-Петербург. Тезисы, С. 495-496
2. Бройде Р.В., Соколенко А.П., Ни В.И., Соколова Т.Н. Таргетный анализ генов репарации ДНК у больных раком яичника, продемонстрировавших выраженный ответ на платиносодержащую терапию // Форум «Белые ночи 2019». 20-23 июня, Санкт-Петербург. Тезисы, С. 349-250.
 3. Лайдус Т.А., Соколова Т.Н., Меерович Р.И., Загороднев К.А., Мартьянов А.С., Холматов М.М., Тюрин В.И., Романько А.А., Кулигина Е.Ш., Янус Г.А. Влияние индивидуальных физиологических и клиникопатологических факторов на эффективность «жидкостной биопсии» // Форум «Белые ночи 2020». 25-28 июня, Санкт-Петербург. Тезисы, С.294.

Аспирант _____ **Соколова Т.Н.**