



Московская Городская
Онкологическая Больница № 62

ДЕПАРТАМЕНТ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ Г. МОСКВЫ

143423 Московская область, Красногорский район, п/о Степановское, поселок Истра, 27

Лаборатория молекулярной диагностики
Телефон: 8-495-536-02-32, e-mail: moldiag62@gmail.com

ПАНЕЛЬ ГЕНОВ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ПЕНЕТРАНТНОСТИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ПАЦИЕНТОВ С РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ЯИЧНИКОВ

Баринов А.А. Гагарин И.М. Гикало М.Б. Демидова И.А.

Лаборатория молекулярной биологии
Московская городская онкологическая больница 62 ДЗМ



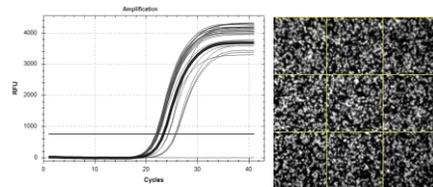
Рак молочной железы и рак яичников

В структуре онкологической заболеваемости РМЖ и РЯ занимают лидирующие позиции среди онкологических нозологий формируя социально-медицинскую проблему в связи с высокой заболеваемостью и смертностью

До 5-10% РМЖ и до 17 % РЯ имеют наследственную природу

Клинико-генетическая консультация или патогенетическое обследование:

- Прогноз
- Ранняя диагностика
- Лечение



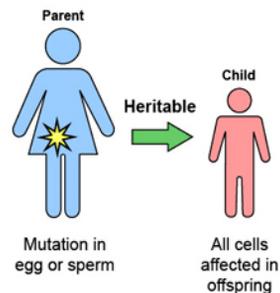
Типы генетических нарушений

Герминальные варианты
Наследственные формы РЯ-РМЖ



Germline mutations

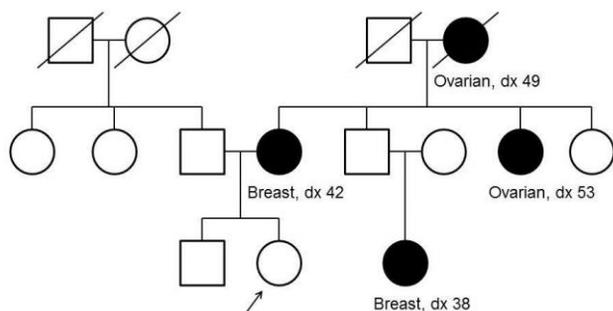
- Present in egg or sperm
- Can be inherited
- Cause cancer family syndrome



Adapted from the National Cancer Institute and the American Society of Clinical Oncology

BRCA1 BRCA2 Miki et al., Wooser et al., 1994

Classic *BRCA1* Pedigree



- Примерно 20-50% генетических дефектов приходится на поломки в генах *BRCA1* и *BRCA2* среди семейных случаев РМЖ
- До 95% нрЯ
- Наследуются по аутосомно доминантному типу
- *BRCA1/2* мутации также ассоциированы с раком предстательной железы, яичек, поджелудочной железы, кишки, гортани, кожи, эндометрия.

Синдромы, ассоциированные с наследственным РМЖ и рЯ:

Меньше 1% приходится на:

Синдром Ли-Фраумени - *TP53(CHEK2)*- риск развития рмж 49% (к 44 годам)

Синдром Коудена – *PTEN* риск развития РМЖ до 50% (к 46 годам)

Синдром Пейца-Егерса - *STK11* риск развития 29% (к 64 годам)

Синдром наследственного диффузного рака желудка - *CDH1*

Анемия Фанкони - *PALB2*

Синдром Луи-Бар – *ATM*

Синдром Линча – *MSH2,MSH3,MSH6,MLH1,PMS1,PMS2*

и др.

Пенетрантность

Кумулятивный риск

BRCA1mut для нРМЖ до **65%** к возрасту 70 лет
(пожизненный риск **74%**)

BRCA1mut для нРЯ до **59%** к возрасту 70 лет

(Mavaddat et al, 2013)

ВЫСОКИЙ

НО! Риск РЯ при BRCA2mut до 18% к возрасту 70 лет

Уровни пенетрантности развития нРМЖ/РЯ

- Гены высокой пенетрантности:

BRCA1, BRCA2, RAD51, TP53, STK11, PTEN, BLM и др.

- Гены умеренной пенетрантности

CHEK2, PALB2, BRIP1, ATM и др

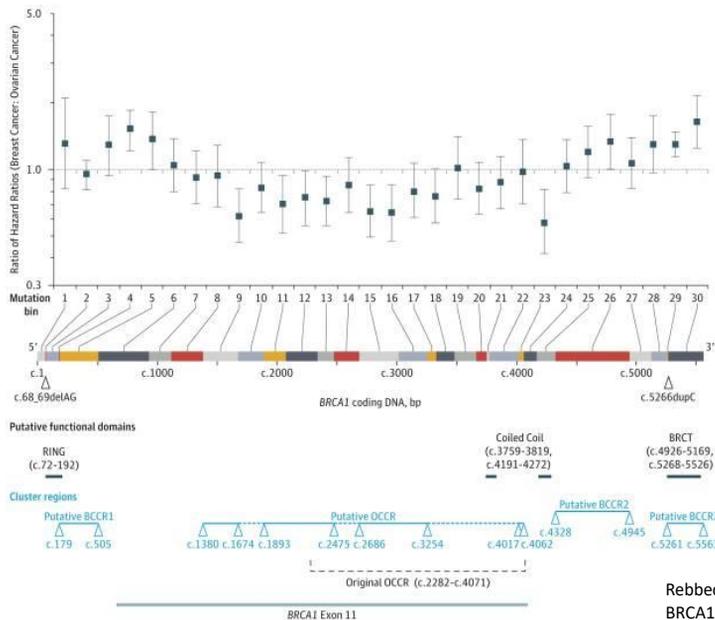
Разнообразие генетических нарушений в генах *BRCA1* *BRCA2*

- Фаундерный эффект, (эффект основателя)

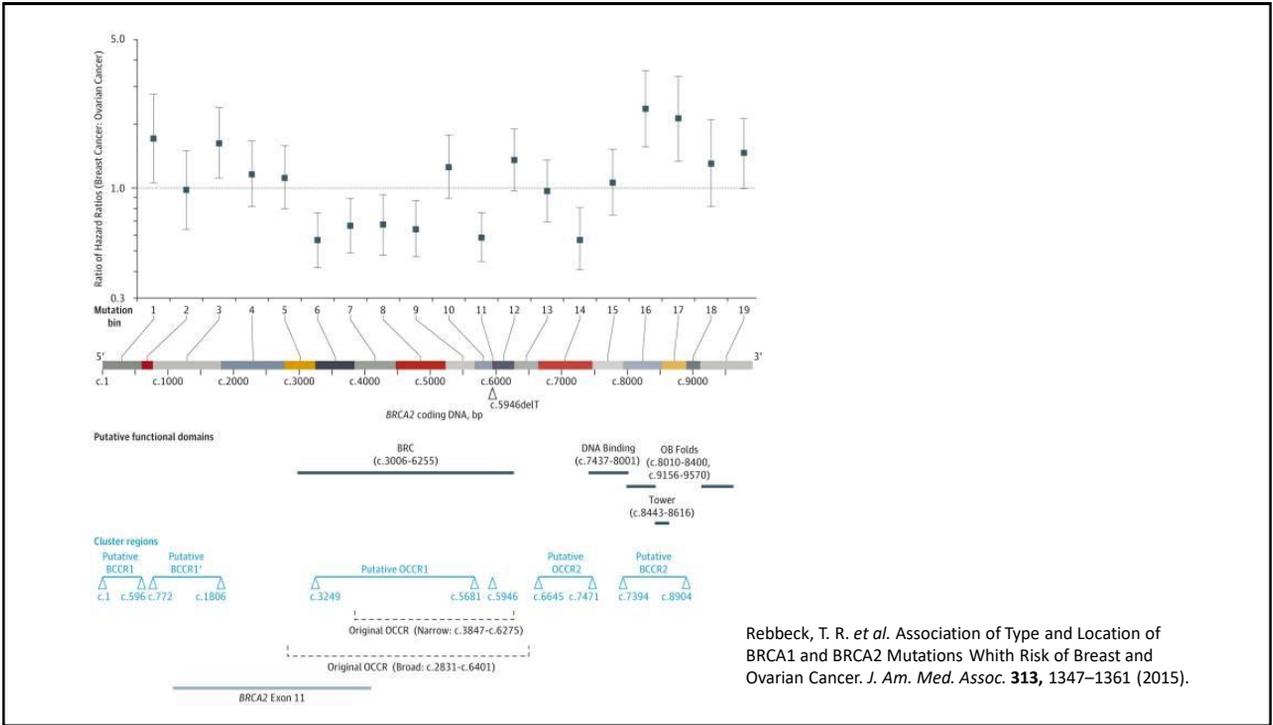
Например *BRCA1* c.5266 **dupC**

- *BRCA1* 1863AA
- *BRCA2* 3418 AA

missense, nonsense, indel, exon skipping (large deletions), heavy methylation



Rebeck, T. R. *et al.* Association of Type and Location of BRCA1 and BRCA2 Mutations With Risk of Breast and Ovarian Cancer. *J. Am. Med. Assoc.* **313**, 1347–1361 (2015).



Типы генетических нарушений

**Соматические мутации
Спорадические формы РЯ-
РМЖ**

- Somatic mutations**
- Occur in *nongermline* tissues
 - Cannot be inherited



Nonheritable

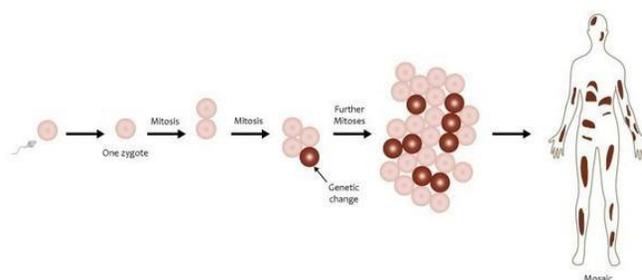
Mutation in tumor only
(for example, breast)



Adapted from the National Cancer Institute and the American Society of Clinical Oncology

Соматические нарушения

- **Спорадический** и семейный рак
- Могут приводить к потере функции BRCA1/2
- Могут влиять на лечение и прогноз (Alsop et al.)



original articles

Annals of Oncology

Annals of Oncology 27: 1532–1538, 2016
doi:10.1093/annonc/mdw209
Published online 18 May 2016

**Targeted s
a large uns
that one-th**

Cancer Medicine

Open Access

ORIGINAL RESEARCH

C. Winter^{1,2,††}, M. F.
T. Törngren^{1,2}, J. Ve
D. Grabau⁵, M. Mali
Å. Borg^{1,2,4}, N. Lorr

¹Division of Oncology and Pathol
Skåne University Hospital, Lund; ²
University Hospital, Lund; ³Depan
Cancer Research, Lund University

Detection of somatic *BRCA1/2* mutations in ovarian cancer – next-generation sequencing analysis of 100 cases

Magdalena Koczkowska^{1,a}, Monika Zuk^{1,a}, Adam Gorczynski², Magdalena Ratajska¹,
Marzena Lewandowska^{3,4}, Wojciech Biernat², Janusz Limon¹ & Bartosz Wasag¹

¹Department of Biology and Genetics, Medical University of Gdansk, Gdansk, Poland

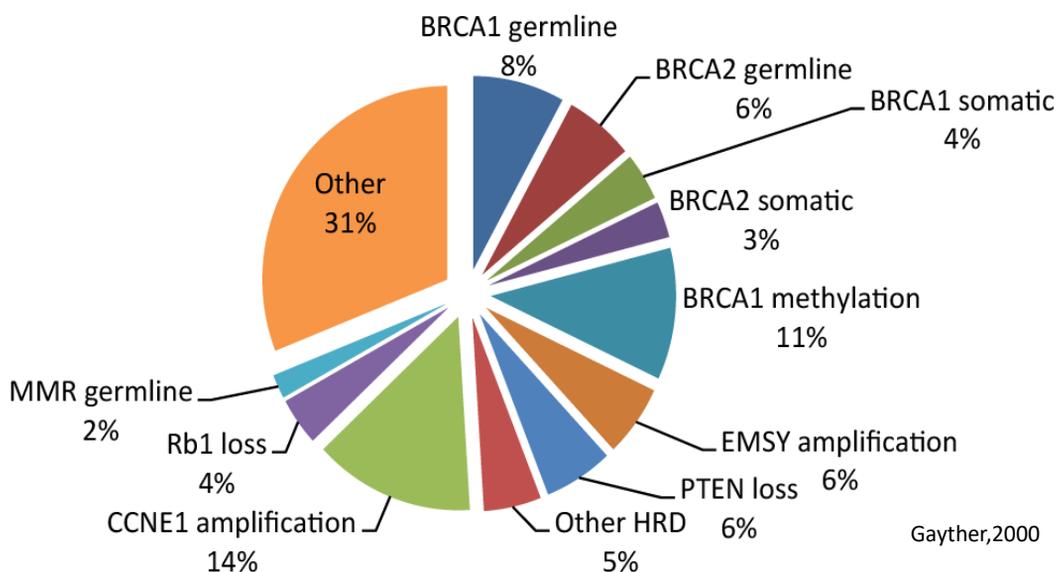
²Department of Pathology, Medical University of Gdansk, Gdansk, Poland

³Molecular Oncology and Genetics Department, Innovative Medical Forum, The Franciszek Łukaszczyk Oncology Center, Bydgoszcz, Poland

⁴Department of Thoracic Surgery and Tumors, Ludwik Rydygier Medical College in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Torun, Bydgoszcz, Poland

“Частота выявляемости *BRCA1/2* мутаций среди пациентов с серозной карциномой 15–28% без предварительного скрининга на частые мутации”

Molecular Profiling of Serous Ovarian Cancer



Патоморфологические характеристики BRCA ассоциированных РМЖ РЯ

Генетические повреждения BRCA1/2 генов для:

гистологических типов

РМЖ – ER-/PR-/HER2- BRCA1 ассоциированный рак

РЯ – опухоли эпителиального происхождения (злокачественные серозные карциномы, светлоклеточные и эндометриоидные опухоли)

Кому показано генетическое исследование?



ESMO

- Семейный анамнез
- Наличие в семье случая РМЖ до 40 лет
- Билатеральный РМЖ или сочетание РМЖ и РЯ

И др.

(Balmana et al., 2011)

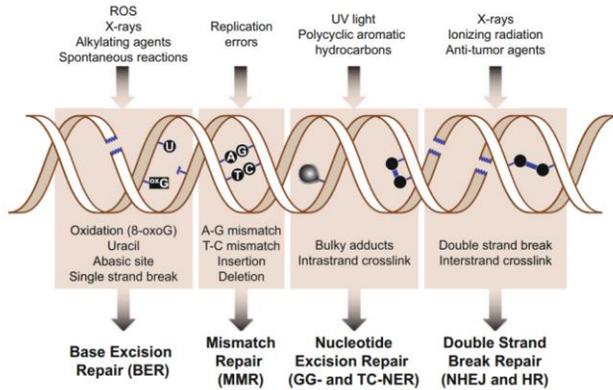
- Серозная карцинома РЯ
- Трижды негативный РМЖ
- BRCA1/2 подобный раки

Дефект - мишень

Для наследственных и спорадических форм РМЖ РЯ клинические исследования и схемы с включением :

- **препаратов платины** (цисплатин, карбоплатин)
- **ингибиторов PARP** (Олапариб, Велипариб и др)
- **ионизирующее излучение**

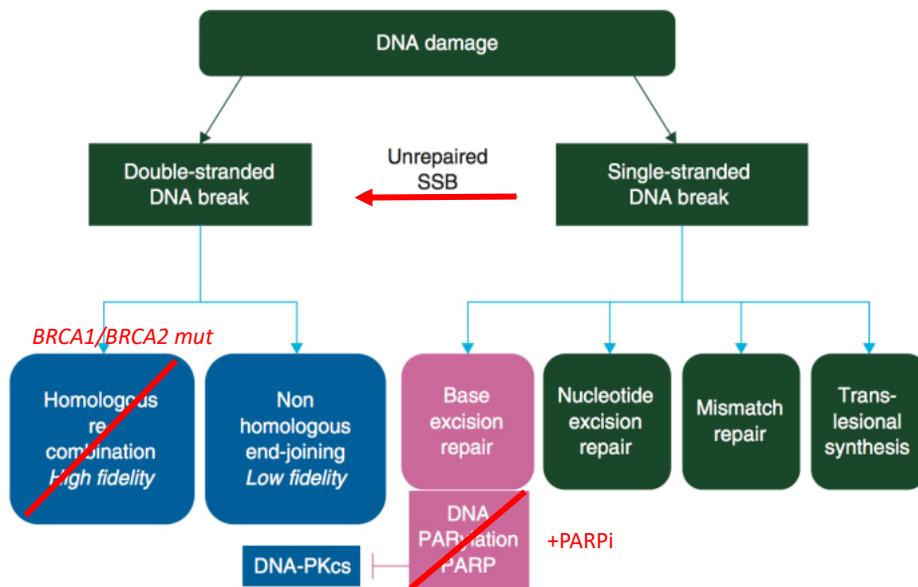
Системы DSB репарации и участие BRCA1/2 В НИХ



Починка двуцепочечных разрывов:

- Негомологичная G0-1
- Гомологичная S-G2

10.1126/science.1056154
10.1259/bjr.20130685



Lee J-m et al Ann Oncol 2014

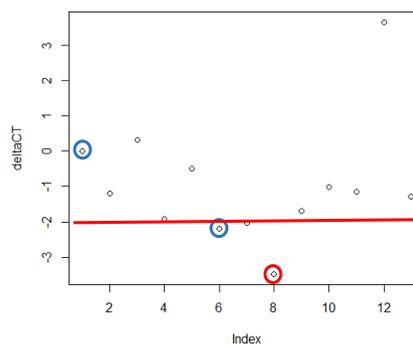
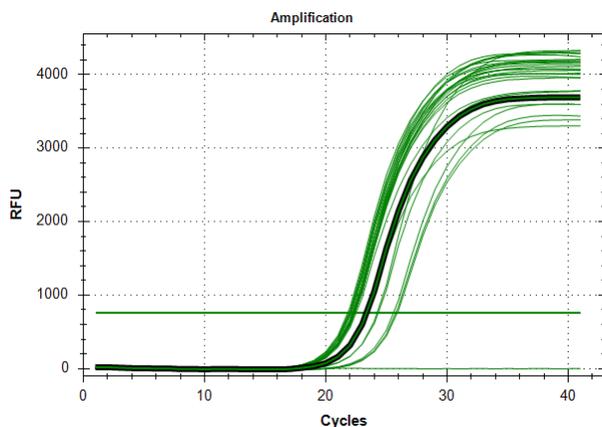
Итог: архивный материал как источник- ДНК



- **Герминальные и соматические генетические нарушения**
- Парафиновые блоки (операционной материал, биопсионный материал)
- Обязательная оценка количества неопластический относительно общего количества нуклеированных клеток
- Оценка степени фрагментирования и “амплифицируемость” таргетных участков
- Наличие артефактов фиксации (Дезаминирование цитозина C:G>T:G vs C:G>T:A)

Количество и степень деградации ДНК

- Qubit HS, флуоресцентный метод, оценка общее количество ДНК
- Real time PCR delta-Ct метод, оценка степени деградации ДНК (ALU 115 247)



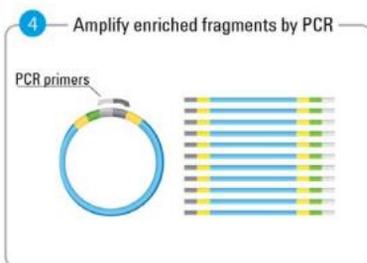
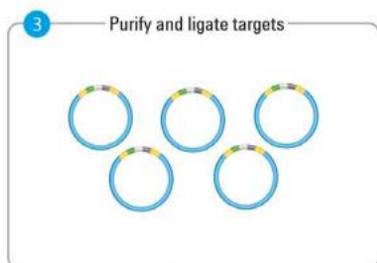
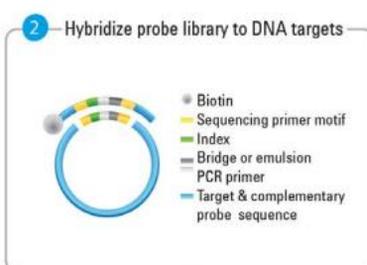
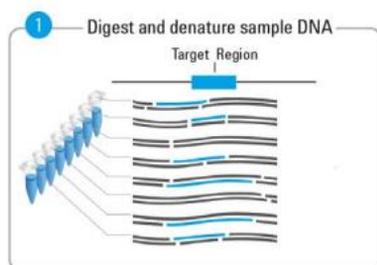
Панель генов

В исследовательскую панель вошли кодирующие области и прилегающие интронные акцепторные и донорные участки (+10 пар нуклеотидов) генов :

BRCA1, BRCA2, CDH1, CHEK2, PALB2, PTEN, STK11, TP53

для обогащения с помощью комплементарных РНК зондов и последующего парноконцевого высокопроизводительного секвенирования.

Как найти ответы на все вопросы?



Производительность:

- Изучать десятки генов
- Соматические и герминальные нарушения
- Экономические аспекты

ОБРАЗЦЫ

- Для исследования было отобрано 53 пациента без выявленных частых мутаций описанных для лиц славянского происхождения в генах *BRCA1* и *BRCA2* методом ПЦР (HRM и ДНК-Технология Онкогенетика): с трижды негативным (ER0, PR0, her2neu 0-1) РМЖ 8 пациентов; с аденокарциномой РЯ 45 пациентов, преимущественно серозного типа (60%).
- Средний возраст по нозологиям составлял 40 и 60 лет соответственно.
- В работе использованы парафиновые блоки всего 23 образца (РМЖ 1, РЯ 22) с содержанием неопластических клеток не менее 25% от общего числа нуклеированных клеток, венозная кровь всего 30 образцов (РМЖ 7, РЯ 23)

Нозология	всего	Миссен и варианты в сайтах сплайсинга		клинически значимые мутации			VOUS	
		BRCA 1 BRCA 2	CDH1, CHEK2, PALB2, PTEN, STK11, TP53	BRCA1 BRCA2	CDH1, CHEK2, PALB2, PTEN, STK11, TP53	BRCA1 BRCA2	CDH1, CHEK2, PALB2, PTEN, STK11, TP53	
РМЖ	91	22	16	1	0	0	0	
РЯ	541	210	85	4	8	5	6	

WWW

BIC BRCAshare ClinVar

Для 4 из 48 (8,9%) пациентов с серозным РЯ удалось дополнительно обнаружить клинически значимые варианты после секвенирования кодирующих последовательностей генов *BRCA1* и *BRCA2*.

Для пациентов с РЯ патогенные варианты обнаружены в генах *CHEK2*(2) и *TP53*(6).

Варианты неясного клинического значения обнаруживались в 20% случаев среди генов *BRCA1*(4) *BRCA2*(1) *PALB2* (2) *TP53*(2) *SKT11* (1) *CHEK2* (1).

PALB2 + *TP53*



- NM_024675.3:c.1671_1677delTATTCAA VOUS (LOH)
- +
- NM_000546.5:c.536A>G COSM Pathogenic

Dansonka-Mieszkowska, A. *et al.* A novel germline PALB2 deletion in Polish breast and ovarian cancer patients. *BMC Med. Genet.* **11**, 20 (2010).

О PALB2

Колокализуется с BRCA1 и BRCA2

Участвует в гомологичной рекомбинации в виде комплекса BRCA1-PALB2-BRCA

Выявлена у пациентки без мутаций в генах BRCA1/2 с отягощённым семейном анамнезом

Более 200 генов участвующих в репарации ДНК

ACLY	DDB1	FANCB	IARS	MSH4	PPP2R5C	RPA1	TP53	OGT	CCT4	SPO11	FANCM	ALKBH3
PARP1	DDB2	FANCF	IFNGR2	MSH5	PRKDC	RPA2	TP53BP1	MBD4	PAICS	RAD54B	MMS19L	NEIL2
AHCY	DNMT1	FANCG	ILF2	NUDT1	PSMA1	RPA3	HSP90B1	MBD2	POLQ	MLH3	DCLRE1C	FLJ35220
APEX1	TRDMT1	FAP	KPNA2	MUTYH	PSMC4	RPL13	TSTA3	EXO1	MTHFD2	SND1	DCLRE1B	POLN
ATM	DNMT3A	FEN1	LDHA	NBN	PSME2	RPL27	UBE2A	COPB2	KDELRL2	APEX2	NEIL1	SETD8
ATR	DNMT3B	XRCC6	LIG1	NME1	PTMA	MRPS12	UBE2B	RECQL5	DMC1	UBE2S	SUV39H2	GTF2H5
BLM	DUT	MSH6	LIG3	NONO	RAD1	SDHC	UBE2N	RECQL4	CHEK2	POLL	EHMT1	
BRCA1	DVL3	GTF2H1	LIG4	NTHL1	RAD9A	HLTF	UBE2V2	TRAF4	POLI	POLM	NHEJ1	
BRCA2	EZF5	GTF2H2	MBD1	OGG1	RAD17	SMARCA4	UNG	HDAC4	TREX2	RPA4	HDAC11	
CANX	ERCC1	GTF2H3	MCM3	PAFAH1B3	RAD23A	SNRPE	WRN	KIAA0101	MRPL3	RRM2B	MUS81	
CCNH	ERCC2	GTF2H4	MECP2	PCNA	RAD23B	SNRPF	XPA	EIF4A3	RPL35	POLK	SETD7	
CDC2	ERCC3	H2AFX	MGMT	PLK1	RAD51	SOX4	XPC	DCLRE1A	TREX1	REV1	HDAC10	
CDK7	ERCC4	H2AFX	MLH1	PMS1	RAD51C	SSBP1	XRCC1	HDAC6	PNKP	MBD3	BRIP1	
CDKN3	ERCC5	HDAC1	MLL	PMS2L3	RAD51L1	SSR1	XRCC2	CHAF1A	CBX3	APTX	DOT1L	
CETN2	ERCC6	HDAC2	MMP9	PMS2	RAD51L3	SUV39H1	XRCC3	PARP2	NCBP2	FANCL	HEL308	
CHEK1	EZH2	HNRPA2B1	MNAT1	POLB	RAD52	TARS	XRCC4	RAD50	CCT5	NEIL3	ALKBH2	
ERCC8	FANCA	PRMT1	MPG	POLD1	RBM4	TDG	XRCC5	G3BP1	TPX2	TMEM30A	C18orf37	
CKS2	FANCC	HSPD1	MRE11A	POLE	RECQL	PRDX2	ARMET	MAD2L2	NUP205	TDP1	EME1	
COL1A2	FANCD2	HSPE1	MSH2	POLG	REV3L	TGIF1	SHFM1	CARM1	ZDHC17	RAD18	RDM1	
CRIP2	FANCE	HUS1	MSH3	POLH	RFC4	TOP2A	RAD54L	PRDX4	SMUG1	XAB2	TUBB	

Human DNA Repair Genes Richard D. Wood,¹ * Michael Mitchell,² John Sgouros,² Tomas Lindahl¹



**Спасибо
за Ваше
внимание**