



Оригинальная статья

# Выявление активирующих соматических мутаций в гене *PIK3CA* в опухолях молочной железы и определение их минимального набора для клинико-диагностического тестирования

Боярских У.А.<sup>1</sup> • Кечин А.А.<sup>1</sup> • Зюзюкина А.В.<sup>2,3</sup> • Храпов Е.А.<sup>1</sup> • Оскорбин И.П.<sup>1</sup> • Алексеенок Е.Ю.<sup>1</sup> • Авдюк Г.А.<sup>4</sup> • Зуков Р.А.<sup>2,3</sup> • Кушлинский Н.Е.<sup>5</sup> • Филипенко М.Л.<sup>1</sup>

**Обоснование.** Для эффективного скрининга больных раком молочной железы с целью назначения таргетной терапии аллелисидом необходимо выявление активирующих соматических мутаций в гене *PIK3CA* методом аллель-специфичной полимеразной цепной реакции (ПЦР), для разработки которого требуется составить оптимальный список мутаций.

**Цель** – определение спектра соматических мутаций в гене *PIK3CA* в опухолях молочной железы методом таргетного высокопроизводительного секвенирования (англ. next generation sequencing, NGS) и установление их минимального набора для рутинного клинико-диагностического тестирования методом аллель-специфичной ПЦР.

**Материал и методы.** Для определения мутаций в гене *PIK3CA* в ДНК, полученной из парафиновых блоков с опухолевым материалом 431 пациентки с гормонозависимым HER2-отрицательным (HR+HER2-) раком молочной железы, использовали таргетное NGS. Набор наиболее часто встретившихся соматических мутаций также детектировали с помощью аллель-специфичной ПЦР.

**Результаты.** Нами разработаны набор реагентов и протокол проведения таргетного NGS часто мутируемых районов генов *PIK3CA* и *ESR1*, который был применен для анализа образцов HR+HER2- рака молочной железы 431 пациентки. Клинически значимые активирующие мутации в гене *PIK3CA* выявлены в 32,7% (141/431) образцов. Частота мутантного аллеля варьировала в пределах 15–65%. Наиболее часто встретились 6 мутаций: с.3140A>G p.His1047Arg (69), с.1633G>A p.Glu545Lys (32), с.1035T>A p.Asn345Lys (12), с.1624G>A p.Glu542Lys (9), с.3140A>T p.His1047Leu (8), Cys420Arg с.1258T>C (3). В сумме эти мутации составили 94,3% (133/141). В 3,5% (15/431) образцов обнаружены клинически значимые соматические мутации в гене *ESR1* – с.1613A>G p.Asp538Gly (7), с.1610A>C p.Tyr537Ser (6), с.1609T>A p.Tyr537Asn (1), с.1610A>G p.Tyr537Cys (1), обуславливающие резистентность к гормональной терапии пациентов с раком молочной железы. Ввиду того что редкие мутации составили лишь 5,7% выборки, проведена валидация набора реагентов для детекции только 6 вышеперечисленных мутаций методом аллель-специфичной ПЦР. NGS и ПЦР показали полную конкордантность.

**Заключение.** ПЦР-тестирование активирующих соматических мутаций гена *PIK3CA* удовлетворяет требованиям к чувствительности (> 90%) и специфичности (100%) теста для клинического применения и может быть использовано при отборе пациентов для проведения таргетной терапии ингибиторами *PIK3CA*.

**Ключевые слова:** *PIK3CA*, NGS, аллель-специфичная полимеразная цепная реакция, рак молочной железы (РМЖ), соматические мутации

**Для цитирования:** Боярских УА, Кечин АА, Зюзюкина АВ, Храпов ЕА, Оскорбин ИП, Алексеенок ЕА, Авдюк ГА, Зуков РА, Кушлинский НЕ, Филипенко МЛ. Выявление активирующих соматических мутаций в гене *PIK3CA* в опухолях молочной железы и определение их минимального набора для клинико-диагностического тестирования. Альманах клинической медицины. 2024;52(3):132–139. doi: 10.18786/2072-0505-2024-52-017.

Поступила 15.02.2024; доработана 06.05.2024; принята к публикации 23.07.2024; опубликована онлайн 04.09.2024



**Ф**осфатидилинозитол-3-киназы (PI3Ks) – группа липидкиназ, являющихся значимыми компонентами сигнальных путей, стимулирующих клеточную пролиферацию, адгезию, выживание и подвижность [1]. Сигнальный путь PI3K играет важную роль в онкогенезе. Нарушение его регуляции связано с развитием различных онкологических заболеваний. Среди генетических изменений этого сигнального пути наиболее известны потеря опухолевого супрессора *PTEN*, амплификация гена *AKT* и активирующие мутации в генах *PIK3CA* и *PIK3R1* [2].

Впервые соматические мутации гена *PIK3CA* при злокачественных опухолях человека описали Y. Samuels и соавт. [3]. Исследователи проанализировали нуклеотидные последовательности 8 PI3K и 8 PI3K-подобных генов первичных колоректальных опухолей и обнаружили, что *PIK3CA* был единственным геном, содержащим соматические мутации. Соматические мутации в гене *PIK3CA*, кодирующем каталитическую субъединицу p110α PI3K, наиболее часто встречаются при раке эндометрия и раке молочной железы (РМЖ) – до 50 и 40% случаев соответственно – и присутствуют более чем при половине всех солидных опухолей человека, но в меньшем проценте [4].

Соматические мутации гена *PIK3CA* могут быть разделены на 4 класса, определяемых 4 доменами каталитической субъединицы, в которых они встречаются: домен-адаптер (ABD), домен C2, спиральный домен и каталитический домен [5].

Большинство мутаций локализуется в 3 кодонах: E542 и E545 – в спиральном домене (экзон 9), H1047 – в киназном домене (экзон 20). E542 и E545 обычно заменяются на лизин, тогда как H1047 часто замещается аргинином. Мутации *PIK3CA* усиливают сигнал PI3K, стимулируют последующую передачу сигнала на АКТ, что способствует росту опухоли, и повышают клеточную инвазию и метастазирование [5].

В силу того что нарушение регуляции сигнального пути PI3K является одним из наиболее частых драйверных мутационных событий при многих видах рака человека, воздействие на отдельные компоненты этого пути, и в первую очередь на *PIK3CA*, может быть потенциальным терапевтическим средством при различных злокачественных новообразованиях [6]. Эта идея в течение двух десятилетий активных поисков стимулировала разработку почти сотни ингибиторов сигнального каскада PI3K, которые в настоящее время проходят различные фазы клинических испытаний [7, 8]. Среди них можно выделить алпелисиб – низкомолекулярный специфический ингибитор *PIK3CA* [9]. В мае 2019 г. Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (англ. Food and Drug Administration, FDA) по результатам III фазы рандомизированного исследования SOLAR-1 одобрило алпелисиб для лечения пациентов с позитивным по экспрессии гормональных рецепторов и негативным по амплификации гена *HER2* (HR+/HER2-) РМЖ с активирующими

**Боярских Ульяна Александровна** – канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории фармакогеномики<sup>1</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5660-2276>.

✉ 630090, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 8, Российская Федерация. E-mail: boyarskih.u@gmail.com

**Кечин Андрей Андреевич** – канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории фармакогеномики<sup>1</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4822-0251>. E-mail: a.a.kechin@gmail.com

**Зююкина Алена Владимировна** – канд. мед. наук, врач-онколог<sup>2</sup>; доцент кафедры онкологии и лучевой терапии с курсом последипломного образования<sup>3</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6758-4800>. E-mail: alena-vz@mail.ru

**Храпов Евгений Александрович** – мл. науч. сотр. лаборатории фармакогеномики<sup>1</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0991-5349>. E-mail: khrap80@gmail.com

**Оскорбин Игорь Петрович** – канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории фармакогеномики<sup>1</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3754-5824>. E-mail: osc.igor@gmail.com

**Алексеенок Ефим Юрьевич** – ст. лаборант лаборатории фармакогеномики<sup>1</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7850-7931>. E-mail: alekseenokefim@gmail.com

**Авдюк Галина Александровна** – канд. мед. наук, доцент кафедры акушерства и гинекологии лечебного факультета<sup>4</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-0264-9377>. E-mail: galasoft@bk.ru

**Зуков Руслан Александрович** – д-р мед. наук, профессор, главный врач<sup>2</sup>; зав. кафедрой онкологии и лучевой терапии с курсом ПО<sup>3</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7210-3020>. E-mail: zukov\_rus@mail.ru

**Кушлинский Николай Евгеньевич** – д-р мед. наук, профессор, академик РАН, научный руководитель клиничко-диагностической лаборатории консультативно-диагностического центра<sup>5</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3898-4127>. E-mail: biochimia@yandex.ru

**Филипенко Максим Леонидович** – д-р биол. наук, зав. лабораторией фармакогеномики<sup>1</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8950-5368>. E-mail: mfilipenko@gmail.com

<sup>1</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук; 630090, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 8, Российская Федерация

<sup>2</sup> КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер им. А.И. Крыжановского»; 660133, г. Красноярск, ул. 1-я Смоленская, 16, Российская Федерация

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России; 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1, Российская Федерация

<sup>4</sup> ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; 630091, г. Новосибирск, Красный пр., 52, Российская Федерация

<sup>5</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; 115522, г. Москва, Каширское шоссе, 24, Российская Федерация

мутациями *PIK3CA* [10]. Вместе с алпелисибом был также одобрен сопутствующий диагностический тест *therascreen PIK3CA* (QIAGEN, ФРГ) для отбора пациентов с мутациями *PIK3CA* с использованием образцов опухолевой ткани или образцов плазмы для анализа циркулирующей опухолевой ДНК. В основу дизайна набора *therascreen PIK3CA*, по-видимому, были положены данные спектра мутаций *PIK3CA* в различных типах опухолей. Он позволяет выявлять 11 мутаций в экзонах 9 и 20 гена *PIK3CA*.

Значительный прогресс в технологии секвенирования ДНК привел к резкому увеличению числа случаев обнаружения новых мутаций *PIK3CA*, в том числе не локализованных в экзонах 9 и 20. Закономерно возник вопрос о чувствительности диагностического теста *therascreen PIK3CA* и других появляющихся на рынке наборов реагентов для обнаружения соматических мутаций гена *PIK3CA*. Чтобы ответить на него, необходима информация о полном спектре соматических мутаций этого гена, полученных методом секвенирования. Систематических исследований соматических изменений гена *PIK3CA* у больных РМЖ в Российской Федерации не проводилось.

Цель исследования – определение спектра соматических мутаций в гене *PIK3CA* в опухолях молочной железы методом таргетного высокопроизводительного секвенирования (англ. *next generation sequencing*, NGS) и установление их минимального набора для рутинного клинико-диагностического тестирования методом аллель-специфичной полимеразной цепной реакции (ПЦР).

## Материал и методы

Клинический материал

В исследовании использованы образцы ДНК, выделенные из парафиновых блоков с опухолевой тканью 381 больной с различными стадиями РМЖ, проходивших молекулярно-генетическое тестирование в Институте химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН) в 2019–2021 гг. Из них 46 пациенток получали неoadъювантную гормональную терапию. Проанализированы также образцы ДНК из парафиновых блоков с опухолевой тканью 71 больной РМЖ, которые получали комплексное лечение в КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер имени А.И. Крыжановского» (КГБУЗ «КККОД им. А.И. Крыжановского») с 2017 по 2020 г.

Проведение исследования одобрено этическим комитетом ИХБФМ СО РАН (протокол № 2 от 25.02.2018) и локальным этическим комитетом

КГБУЗ «КККОД им. А.И. Крыжановского» (протокол № 6 от 22 марта 2016 г.). Все пациентки подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Выделение ДНК проводили с помощью QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, ФРГ) согласно инструкции компании-производителя.

Таргетное высокопроизводительное секвенирование

Олигонуклеотидные праймеры для амплификации часто мутирующих областей гена *PIK3CA*, а также часто встречающихся соматических мутаций в генах *AKT1*, *CDH1*, *ERBB2*, *ESR1*, *GNAS*, *IRF5*, *SF3B1* и *KEAP1* были разработаны программой NGS-PrimerPlex [11]. Всего в NGS-панель вошли 24 пары праймеров, распределенных по двум мультиплексным реакциям (таблица). NGS-библиотеки были приготовлены при помощи двухстадийной ПЦР, при которой на первом этапе происходит наработка ген-специфичных последовательностей с праймеров, содержащих адаптеры на 5'-конце, а на втором – встройка индексированных последовательностей с адаптерами для секвенирования технологией Illumina [12]. Секвенирование проводили на приборе MiniSeq Illumina с использованием картриджа MiniSeq Mid Output Kit 300 cycles (Illumina, США). Анализ NGS-данных был выполнен по протоколу, описанному ранее [13], с добавлением аннотации выявленных вариантов по базе данных COSMIC (release 70) [14].

Анализ соматических мутаций гена *PIK3CA* методом мультиплексной аллель-специфичной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

Для детекции соматических мутаций гена *PIK3CA* методом мультиплексной аллель-специфичной ПЦР применяли набор реагентов HUM-PIK3CA-AS-1 производства ИХБФМ СО РАН. Использовали 10–50 нг ДНК на реакцию, амплификацию осуществляли в термоциклере CFX96 (Bio-Rad, США). Для каждого образца анализ проводили в двух повторах. Для анализа вычисляли dCqMUT по формуле:

$$dCqMUT = Cq\text{-mutation} - CqNORM,$$
где *Cq-mutation* – *Cq*, полученное при амплификации тестируемой ДНК с аллель-специфичным праймером для мутации, а *CqNORM* – *Cq*, полученное при амплификации контрольного однокопийного локуса ДНК.

Полученное значение dCqMUT сравнивали с критическими значениями, приведенными



Информация о праймерах, вошедших в таргетную NGS-панель для секвенирования гена *PIK3CA*

Прямой праймер	Обратный праймер	Хромосома	Начало	Конец	Кодоны <i>PIK3CA</i> или ген
AGAATGTTTACTACCAAATGGAATGA	AAATAGTTCATGCTTTATGTTATTAATGTAG	3	178916679	178916763	32–39
AGATGAATCTTCTTACATTTTCGTA	GGGTTGAAAAAGCCGAAG	3	178916802	178916904	73–90
ACAAGACGACTTTGTGACCT	CTCGATTGAGGATCTTTCTTC	3	178916869	178916959	93–118
AAGTAATTGAACCAGTAGGCAAC	TTGCATTTAGAAATAGGATATTGTATCATAAC	3	178916912	178916996	93–118
ATGCTGTGTATGTAATAGAATGTTATATTC	ATCAAATTCACACACTGGCATG	3	178917428	178917512	118–121
GTGCACTCAGAATAAAAAATCTTTGTG	GCATCAGCATTTGACTTTACCTT	3	178921513	178921597	342–351
CTTATGTGACAATGTGAACACTCAA	ATAACCTTTGAAAATATAAATCTATATACTTCCT	3	178922329	178922413	376–381
TGAAATGTGTTTTATAATTAGACTAGTGA	AGTTTATATTTCCCATGCCAA	3	178927922	178928007	420
AATGGCTTTGAATCTTTGGCCA	ATTTGATCCAGTAACACCAATAGGG	3	178928042	178928117	449–464
GTACCTCATGGATTAGAAGATTTGCTG	TTTATGACAATAAAACCTTACTTTATTTGGA	3	178928064	178928148	449–464
CTCAAAGCAATTTCTACACGAGA	TAGCACTTACCTGTGACTCC	3	178936049	178936132	539–551
TGTTTATTTGTTTCTCCACACA	TTCCATTTAACAGACAGAAGCAATT	3	178936959	178937043	558–566
TGGAAAAGCTCATTAACTTAAGTGA	AAACACAACTAGAGTCACACAC	3	178938884	178938968	713–728
CAGCATGCCAATCTTTCATAAAT	ATGCAATGTCATCAAAGATTGTAGTT	3	178951922	178952006	1002–1010
GCAAGAGGCTTTGGAGTATTTTC	GGAAGATCCAATCCATTTTTG	3	178952041	178952123	1041–1049
GGAGGAAGTAGCGTGGCCG	TGGCGAGGGTCTGACGGGTA	14	105246515	105246609	<i>AKT1</i>
GGTTCATCTACCTTTCCCC	GCGTCAAAGCCAGGGTG	16	68772172	68772252	<i>CDH1</i>
AATGTGAAAATCCAGTGGCCA	GGGGCTTACGTCTAAGATTTCTTT	17	37880189	37880272	<i>ERBB2</i>
CCCATACCTCTCAGCGTAC	CCAGAAGCGGGAGACATAT	17	37880947	37881030	<i>ERBB2</i>
CAGCATGAAGTGCAAGAACG	GGCTAGTGGGCGCATGTA	6	152419891	152419976	<i>ESR1</i>
TTGGCTTTGGTGAGATCCATT	TCTCAAAGATTCCAGAAGTCAGGA	20	57484365	57484447	<i>GNAS</i>
TTTACTCAAAGAGGATGCAAGTGGC	CTGCAGAGTGGGCGGCT	7	128587321	128587375	<i>IRF5</i>
TTTGCCCGTCAAAGCCC	CCAATGCTGACACGAAGGAT	19	10600410	10600492	<i>KEAP1</i>
AATGGCCAAAGCACTGATGG	TGGGGCATAGTTAAACCTGT	2	198266805	198266889	<i>SF3B1</i>

NGS (next generation sequencing) – высокопроизводительное секвенирование; ПЦР – полимеразная цепная реакция.

Последовательности праймеров указаны в направлении 5'→3'. Столбцы «Начало» и «Конец» обозначают координаты ПЦР-продукта на хромосоме 3 референсного генома человека сборки hg19

в инструкции к набору реагентов. В случае их меньшего значения делали заключение о наличии соответствующей мутации.

#### Статистический анализ

Для оценки статистической значимости различий распределения соматических мутаций использовали таблицы сопряженности и критерий хи-квадрат Пирсона в программе MedCalc V22.023.

### Результаты

Выявление соматических мутаций гена *PIK3CA* в образцах ДНК рака молочной железы методом таргетного высокопроизводительного секвенирования

Выделена ДНК из 452 парафиновых блоков с операционным материалом больных HR+HER- РМЖ. По результатам анализа количества и качества ДНК, проведенного с помощью количественной амплификации двух локусов из ядерного генома – *RPP30* и *ALB* (размеры ампликонов 68 и 105 п.н. соответственно), 21 образец оказался непригоден для таргетного NGS ввиду значительного уменьшения доли длинного ампликона *ALB*, что свидетельствует о деградации ДНК. Таким образом, NGS-анализ выполнен для 431 образца ДНК. При секвенировании добивались не менее чем 500-кратного прочтения анализируемых областей ДНК. В результате была выявлена 141 клинически значимая активирующая мутация в гене *PIK3CA* (32,7% образцов, 141/431):

- H1047R – 69;
- E545K – 32;
- N345K – 12;
- E542K – 9;
- H1047L – 8;
- C420R – 3;
- G1049R – 2;
- E545G – 1;
- Q546L – 1;
- Q546E – 1;
- R88Q – 1;
- R108H – 1;
- M1004I – 1.

Частота обнаружения мутантного аллеля варьировала в пределах 15–65%. Наиболее часто встречались 6 мутаций – с.3140A>G p.His1047Arg (69), с.1633G>A p.Glu545Lys (32), с.1035T>A p.Asn345Lys (12), с.1624G>A p.Glu542Lys (9), с.3140A>T p.His1047Leu (8), Cys420Arg с.1258T>C (3). В сумме эти мутации составили 94,3% (133/141). В 5 случаях мы наблюдали 2 соматические мутации в одном образце с сопоставимой долей. В 3,5% случаев (15/431) выявлены клинически значимые соматические

мутации в гене *ESR1* – с.1613A>G p.Asp538Gly (7), с.1610A>C p.Tyr537Ser (6), с.1609T>A p.Tyr537Asn (1), с.1610A>G p.Tyr537Cys (1), вызывающие резистентность к гормональной терапии пациентов с РМЖ. Из них 6 мутаций обнаружены у пациентов, получавших неоадъювантную гормональную терапию. Таким образом, встречаемость активирующих соматических мутаций в гене *ESR1* у нелеченых пациентов составила 2,3% (9/391). Не наблюдалось статистически значимой ассоциации между наличием мутации *PIK3CA* и *ESR1* (4 ESR1m+/141PIK3Cm+ против 11 ESR1m+/290 PIK3Cm+,  $p > 0,8$ ).

Выявление соматических мутаций гена *PIK3CA* в образцах ДНК рака молочной железы методом аллель-специфичной полимеразной цепной реакции

Использованный в работе набор реагентов HUM-PIK3CA-AS-1 позволяет с помощью мультиплексной аллель-специфичной ПЦР выявлять мутации с.3140A>G p.His1047Arg, с.1633G>A p.Glu545Lys, с.1035T>A p.Asn345Lys, с.1624G>A p.Glu542Lys, с.3140A>T p.His1047Leu, Cys420Arg с.1258T>C – наиболее частые из мутаций, определенных в нашей выборке методом таргетного NGS. Нами проведена валидация данного набора реагентов на анализируемой выборке образцов. В данном случае мы не отбраковывали 21 образец ДНК, которые оказались непригодны для NGS. Из них 17 образцов нормально прошли анализ, в них были дополнительно выявлены мутации с.3140A>G p.His1047Arg (4) и с.1633G>A p.Glu545Lys (1). Установлены все положительные по результатам NGS образцы ДНК, в том числе с двойной мутацией p.His1047Arg/p.Cys420Arg. Аллель-специфичная ПЦР также показала наличие 3 дополнительных образцов с мутацией. При детальном анализе данных NGS мы поняли, что эти образцы были отсеяны в биоинформационном анализе ввиду малого (менее 5%) количества прочтений с мутацией. В то же время чувствительность аллель-специфичной ПЦР была заявлена на уровне 2% мутантного аллеля. Таким образом, данный метод характеризуется 100% чувствительностью в выявлении 6 частых мутаций относительно «золотого стандарта» NGS.

### Обсуждение

Полученные нами данные о спектре и частоте активирующих соматических мутаций в гене *PIK3CA* могут иметь важное значение для организации рутинного клинико-диагностического тестирования в России. Безусловно, NGS все шире внедряется в клиническую практику. Например, некоторые



NGS-тесты, одобренные для клинического использования, такие как Foundation One CDx (Foundation Medicine Inc., США) или Guardant360 (Guardant Health, США), позволяют анализировать большинство или все экзоны гена *PIK3CA*. Весьма вероятно, что благодаря идентификации редких мутаций увеличится число пациентов, которым может быть рекомендована таргетная терапия. Вместе с тем важен потенциальный ответ пациентов с такими мутациями на терапию алпелисибом. Например, мутация N345K, которая составила 8,5% от всех мутаций *PIK3CA* в анализируемой нами выборке, не входит в зарегистрированный набор реагентов theascreen PKI3CA и не изучалась в клиническом исследовании SOLAR-1 [10]. Достаточно ли нам функциональных преклинических исследований, которые показывают ее явный онкогенный эффект? В любом случае функциональные характеристики и клиническое значение редких мутаций в пути PI3K еще предстоит выяснить. И хотя анализ *in silico* может предсказать влияние мутации на фолдинг и сохранение функции белка, необходимы более надежные доказательства биологических эффектов редких соматических мутаций в гене *PIK3CA* [2]. Все вышесказанное в значительной степени определяет целесообразность включения редких мутаций в схемы клинико-диагностического тестирования.

Ранее было показано существование двойных функциональных мутаций гена *PIK3CA* в 12% всех случаев с мутацией [15]. Двойные мутации вызывают большее повышение активности белка PI3K по сравнению с одиночными. Эти сложные мутации, по-видимому, определяют повышенную чувствительность опухолевых клеток к PI3K альфа-специфичным ингибиторам в доклинических моделях, а также у отдельных пациентов с РМЖ, получавших лечение в ранней фазе клинических исследований [15]. В нашей работе мы также детектировали двойные мутантные последовательности гена *PIK3CA* с сопоставимой частотой альтернативного аллеля (30–55%), но с более низкой частотой встречаемости – 2,1% (3/141).

Полученные нами данные демонстрируют относительно малый вклад редких мутаций в общий пул – всего 4,7%. Исследования, проведенные в других странах с участием представителей других этнических групп, показывают несколько большую частоту встречаемости редких мутаций *PIK3CA* [16]. Так, в широкомасштабном исследовании, проведенном в КНР с применением NGS, 5 частых мутаций гена *PIK3CA* составили 73% от общего количества: H1047R (35%), E545K (17%), E542K (11%), N345K (6%) и H1047L (4%) [16].

Наше исследование имеет явные ограничения: относительно небольшой объем анализируемой выборки и NGS только части гена *PIK3CA*. Возможно, расширение выборки увеличит как спектр, так и процент редких мутаций. Тем не менее данные нашего исследования пока вполне оправдывают применение для клинического тестирования более простых, чем NGS, методов. Из них сегодня самым распространенным является аллель-специфичная ПЦР, которая уже много лет используется в реальной клинической практике для обнаружения соматических мутаций. Для проведения аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени в клинико-диагностической лаборатории не требуется дорогостоящего оборудования, и исследование занимает меньше времени, чем секвенирование. В нашей работе аллель-специфичная ПЦР также показала большую эффективность анализа ДНК из парафиновых блоков: 4 невалидных образца ДНК против 21 невалидного образца для NGS. Это в значительной степени обусловлено минимизацией размеров ампликонов (менее 80 п.н.) и, как следствие, более эффективным использованием деградированной ДНК. За счет мультиплексирования возможно снизить стоимость и повысить удобство постановки, а стандартизация методики сокращает время получения результата, что позволяет рекомендовать данную методику для рутинного применения в клинико-диагностической лаборатории.

Использованная для секвенирования панель также позволила проанализировать область частых мутаций в гене *ESR1* (536–538-й кодоны). Показано, что активирующие мутации этого гена в основном возникают в процессе прогрессирования опухоли и в результате гормональной терапии [17]. Частота первичных мутаций у нелеченых пациентов, описанная в литературе, составляет около 1% и значительно варьирует (12–55%) для метастатических опухолей [18, 19]. В нашем исследовании высокий процент (2,3%) мутаций резистентности у нелеченых пациентов может быть объяснен особенностями формирования выборки. Требуются дальнейшие исследования на более полно охарактеризованных образцах, полученных от больных РМЖ, для определения частоты встречаемости этих мутаций.

## Заключение

В настоящей работе определен спектр соматических мутаций в гене *PIK3CA* при помощи таргетного NGS. Показано, что 6 частых мутаций составляют значительную долю и могут быть использованы для их выявления методом аллель-специфичной ПЦР, характеризующимся простотой и низкой



стоимостью. Использование аллель-специфичной ПЦР позволяло проанализировать большее количество ДНК с низким качеством ввиду большей устойчивости теста. Применение набора HUM-PIK3CA-AS-1 показало полную конкордантность

с таргетным NGS и может быть рекомендовано для использования в рутинной клинической практике с целью стратификации больных РМЖ для последующей таргетной терапии ингибиторами PIK3CA. 

## Дополнительная информация

### Финансирование

Исследование поддержано в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 121031300045-2.

### Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

### Участие авторов

У.А. Боярских, Е.А. Храпов, И.П. Оскорбин, Е.Ю. Алексеенко – проведение экспериментов, редактирование текста; А.А. Кечин – биоинфор-

мационная обработка полученных данных, редактирование текста; А.В. Зюзюкина, Р.А. Зуков, Г.А. Авдюк – сбор клинического материала, ведение больных, анализ историй болезни, редактирование текста; Н.Е. Кушлинский – концепция исследования, утверждение итогового варианта рукописи; М.Л. Филипенко – концепция и дизайн исследования, анализ полученных данных, написание текста. Все авторы прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией, согласны нести ответственность за все аспекты работы и гарантируют, что ими надлежащим образом были рассмотрены и решены вопросы, связанные с точностью и добросовестностью всех частей работы.

## Список литературы / References

1. Fruman DA, Chiu H, Hopkins BD, Bagrodia S, Cantley LC, Abraham RT. The PI3K pathway in human disease. *Cell*. 2017;170(4):605–635. doi: 10.1016/j.cell.2017.07.029.
2. Chen L, Yang L, Yao L, Kuang XY, Zuo WJ, Li S, Qiao F, Liu YR, Cao ZG, Zhou SL, Zhou XY, Yang WT, Shi JX, Huang W, Hu X, Shao ZM. Characterization of PIK3CA and PIK3R1 somatic mutations in Chinese breast cancer patients. *Nat Commun*. 2018;9(1):1–17. doi: 10.1038/s41467-018-03867-9.
3. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Yan H, Gazdar A, Powell SM, Riggins GJ, Willson JKV, Markowitz S, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science*. 2004;304(5670):554. doi: 10.1126/science.1096502.
4. Alqahtani A, Ayesh HSK, Halawani H. PIK3CA gene mutations in solid malignancies: Association with clinicopathological parameters and prognosis. *Cancers (Basel)*. 2020;12(1):1–18. doi: 10.3390/cancers12010093.
5. Jenkins ML, Ranga-Prasad H, Parson MAH, Harris NJ, Rathinaswamy MK, Burke JE. Oncogenic mutations of PIK3CA lead to increased membrane recruitment driven by reorientation of the ABD, p85 and C-terminus. *Nat Commun*. 2023;14(1):1–14. doi: 10.1038/s41467-023-35789-6.
6. Yang J, Nie J, Ma X, Wei Y, Peng Y, Wei X. Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials. *Mol Cancer*. 2019;18(1):26. doi: 10.1186/s12943-019-0954-x.
7. Belli C, Repetto M, Anand S, Porta C, Subbiah V, Curigliano G. The emerging role of PI3K inhibitors for solid tumour treatment and beyond. *Br J Cancer*. 2023;128(12):2150–2162. doi: 10.1038/s41416-023-02221-1.
8. Faes S, Dornmond O. PI3K and AKT: unfaithful partners in cancer. *Int J Mol Sci*. 2015;16(9):21138–21152. doi: 10.3390/ijms160921138.
9. André F, Ciruelos E, Rubovszky G, Campone M, Loibl S, Rugo HS, Iwata H, Conte P, Mayer IA, Kaufman B, Yamashita T, Lu YS, Inoue K, Takahashi M, Pápai Z, Longin AS, Mills D, Wilke C, Hirawat S, Juric D; SOLAR-1 Study Group. Alpelisib for PIK3CA-mutated, hormone receptor – positive advanced breast cancer. *N Engl J Med*. 2019;380(20):1929–1940. doi: 10.1056/NEJMoa1813904.
10. André F, Ciruelos EM, Juric D, Loibl S, Campone M, Mayer IA, Rubovszky G, Yamashita T, Kaufman B, Lu YS, Inoue K, Pápai Z, Takahashi M, Ghaznavi F, Mills D, Kaper M, Miller M, Conte PF, Iwata H, Rugo SH. Alpelisib plus fulvestrant for PIK3CA-mutated, hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor-2-negative advanced breast cancer: final overall survival results from SOLAR-1. *Ann Oncol*. 2021;32(2):208–217. doi: 10.1016/j.annonc.2020.11.011.
11. Kechin A, Borobova V, Boyarskikh U, Khrapov E, Subbotin S, Filipenko M. NGS-PrimerPlex: high-throughput primer design for multiplex polymerase chain reactions. *PLoS Comput Biol*. 2020;16(12):e1008468. doi: 10.1371/journal.pcbi.1008468.
12. Boyarskikh UA, Gulyaeva LF, Avdalyan AM, Kechin AA, Khrapov EA, Lazareva DG, Kushlinskii NE, Melkonyan A, Arakelyan A, Filipenko LM. Spectrum of TP53 mutations in BRCA1/2 associated high-grade serous ovarian cancer. *Front Oncol*. 2020;10:1103. doi: 10.3389/fonc.2020.01103.
13. Kechin A, Khrapov E, Boyarskikh U, Kel A, Filipenko M. BRCA-analyzer: Automatic workflow for processing NGS reads of BRCA1 and BRCA2 genes. *Comput Biol Chem*. 2018;77:297–306. doi: 10.1016/j.compbiolchem.2018.10.012.
14. Tate JG, Bamford S, Jubb HC, Sondka Z, Beare DM, Bindal N, Boutselakis H, Cole CG, Creatore C, Dawson E, Fish P, Harsha B, Hathaway C, Jupe SC, Kok CY, Noble K, Ponting L, Ramshaw CC, Rye CE, Speedy HE, Stefancsik R, Thompson SL, Wang S, Ward S, Campbell PJ, Forbes SA. COSMIC: The Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D941–D947. doi: 10.1093/nar/gky1015.
15. Vasan N, Razavi P, Johnson JL, Shao H, Shah H, Antoine A, Ladewig E, Gorelick A, Lin TY, Toska E, Xu G, Kazmi A, Chang MT, Taylor BS, Dickler MN, Jhaveri K, Chandraratnam S, Rabadan R, Reznik E, Smith ML, Sebra R, Schimmoller F, Wilson TR, Friedman LS, Cantley LC, Scaltriti M, Baselga J. Double PIK3CA mutations in CIS increase oncogenicity and sensitivity to PI3Kα inhibitors. *Science*. 2020;366(6466):714–723. doi: 10.1126/science.aaw9032.
16. Huang Q, Zhou Y, Wang B, Zhao Y, Zhang F, Ding B. Mutational landscape of pan-cancer patients with PIK3CA alterations in Chinese population. *BMC Med Genomics*. 2022;15(1):146. doi: 10.1186/s12920-022-01297-7.
17. Grinshpun A, Chen V, Sandusky ZM, Fanning SW, Jeselsohn R. ESR1 activating mutations: From structure to clinical application. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2023;1878(1):188830. doi: 10.1016/j.bbcan.2022.188830.
18. Dahlgren M, George AM, Brueffer C, Gladchuk S, Chen Y, Vallon-Christersson J, Hegardt C, Häkkinen J, Rydén L, Malmberg M, Larsson C, Grubberg-Saal SK, Ehinger A, Loman N, Borg Å, Saal LH. Preexisting somatic mutations of estrogen receptor alpha (ESR1) in early-stage primary breast cancer. *JNCI Cancer Spectr*. 2021;5(2):pkab028. doi: 10.1093/jncics/pkab028.
19. Kinslow CJ, Tang A, Chaudhary KR, Cheng SK. Prevalence of estrogen receptor alpha (ESR1) somatic mutations in breast cancer. *JNCI Cancer Spectr*. 2022;6(5):kac060. doi: 10.1093/jncics/pkac060.



# Identification of activating somatic mutations in the *PIK3CA* gene in breast tumors and determination of their minimal set for clinical diagnostic testing

U.A. Boyarskih<sup>1</sup> • A.A. Kechin<sup>1</sup> • A.V. Zyuzukina<sup>2,3</sup> •  
E.A. Khrapov<sup>1</sup> • I.P. Oskorbin<sup>1</sup> • E.Yu. Alekseenok<sup>1</sup> •  
G.A. Avdiyuk<sup>4</sup> • R.A. Zukov<sup>2,3</sup> • N.E. Kushlinskii<sup>5</sup> •  
M.L. Filipenko<sup>1</sup>

**Background:** For effective screening of breast cancer patients for candidates for target therapy with alpelisib, it is necessary to identify activating somatic mutations in the *PIK3CA* gene by allele specific polymerase chain reaction (PCR); this requires that an optimal list of mutations should be compiled.

**Aim:** To determine the spectrum of somatic mutations in the *PIK3CA* gene in breast cancer tumors by means of high performance sequencing (next generation sequencing, NGS) and to identify their minimal set for clinical diagnostic testing by allele specific PCR.

**Methods:** Targeted NGS was used to identify mutations in the *PIK3CA* gene in DNA obtained from paraffin blocks with tumor material from 431 patients with HR+HER2- breast cancer. A set of the most common somatic mutations was also detected by allele specific PCR.

**Results:** We have developed a set of reagents and a protocol for targeted NGS of frequently mutating regions of the *PIK3CA* and *ESR1* genes, which was used to analyze samples from 451 HR+/HER2- breast cancer patients. Clinically significant activating mutations in the *PIK3CA* gene were found in 32.7% of the samples (141/431). The frequency of the mutant allele ranged from 0.15 to 0.65. Six mutations were most common: c.3140A>G p.His1047Arg (69), c.1633G>A p.Glu545Lys (32), c.1035T>A p.Asn345Lys (12), c.1624G>A p.Glu542Lys (9), c.3140A>T p.His1047Leu (8), Cys420Arg c.1258T>C (3). In total, these mutations amounted to 94.3% (133/141). In 3.5% of

the samples (15/431), there were clinically significant somatic mutations in the *ESR1* gene: c.1613A>G p.Asp538Gly (7), c.1610A>C p.Tyr537Ser (6), c.1609T>A p.Tyr537Asn (1), c.1610A>G p.Tyr537Cys (1), causing resistance to hormone therapy in patients with breast cancer. While rare mutations comprised only 5.7% of our sample, we validated a set of reagents to identify the six mutations described above by allele specific PCR. NGS and PCR were completely concordant.

**Conclusion:** PCR testing of activating somatic mutations of the *PIK3CA* gene meets the requirements for sensitivity (> 90%) and specificity (100%) for a clinical test and can be used in the selection of patients for targeted therapy with PIK3CA inhibitors.

**Key words:** PIK3CA, NGS, allele specific polymerase chain reaction, breast cancer, somatic mutations

**For citation:** Boyarskih UA, Kechin AA, Zyuzukina AV, Khrapov EA, Oskorbin IP, Alekseenok EYu, Avdiyuk GA, Zukov RA, Kushlinskii NE, Filipenko ML. Identification of activating somatic mutations in the *PIK3CA* gene in breast tumors and determination of their minimal set for clinical diagnostic testing. Almanac of Clinical Medicine. 2024;52(3):132–139. doi: 10.18786/2072-0505-2024-52-017.

Received 15 February 2024; revised 06 May 2024; accepted 23 July 2024; published online 4 September 2024

## Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

## Authors' contribution

U.A. Boyarskih, E.A. Khrapov, I.P. Oskorbin, E.Yu. Alekseenok, experimental studies, text editing; A.A. Kechin, bioinformatical data analysis, text editing; A.V. Zyuzukina, R.A. Zukov, G.A. Avdiyuk, clinical data collection, patient management, analysis of the medical files, text editing; N.E. Kushlinskii, the study concept, approval of the final version of the manuscript; M.L. Filipenko, the study concept and design, data analysis, text writing. All the authors have read and approved the final version of the manuscript before submission, agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

**Ulyana A. Boyarskih** – PhD (in Biol.), Research Fellow, Laboratory of Pharmacogenomics<sup>1</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5660-2276>.  
✉ Pr. Akademika Lavrentyeva 8, Novosibirsk, 630090, Russian Federation.  
E-mail: boyarskih.u@gmail.com

**Andrey A. Kechin** – PhD (in Biol.), Research Fellow, Laboratory of Pharmacogenomics<sup>1</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4822-0251>.  
E-mail: a.a.kechin@gmail.com

**Alyona V. Zyuzukina** – MD, PhD, Oncologist<sup>2</sup>, Associate Professor, Chair of Oncology and Radiation Therapy with Postgraduate Course<sup>3</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6758-4800>.  
E-mail: alena-vz@mail.ru

**Yevgeny A. Khrapov** – Junior Research Fellow, Laboratory of Pharmacogenomics<sup>1</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0991-5349>.  
E-mail: khrap80@gmail.com

**Igor P. Oskorbin** – PhD (in Biol.), Research Fellow, Laboratory of Pharmacogenomics<sup>1</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3754-5824>.  
E-mail: osc.igor@gmail.com

**Yefim Yu. Alekseenok** – старший лаборант, Laboratory of Pharmacogenomics<sup>1</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7850-7931>.  
E-mail: alekseenokefim@gmail.com

**Galina A. Avdiyuk** – MD, PhD, Associate Professor, Chair of Obstetrics and Gynecology of the Medical Faculty<sup>4</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-0264-9377>. E-mail: galasoft@bk.ru

**Ruslan A. Zukov** – MD, PhD, Professor, Chief Physician<sup>2</sup>, Head of Chair of Oncology and Radiation Therapy<sup>5</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7210-3020>. E-mail: zukov\_rus@mail.ru

**Nikolay E. Kushlinskii** – MD, PhD, Professor, Member of Russ. Acad. Sci., Scientific Director of the Clinical Diagnostic Laboratory, Consultative and Diagnostic Center<sup>5</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3898-4127>. E-mail: biochimia@yandex.ru

**Maksim L. Filipenko** – Doctor of Biol. Sci., Head of the Laboratory of Pharmacogenomics<sup>1</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8950-5368>.  
E-mail: mlfilipenko@gmail.com

<sup>1</sup>Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; pr. Akademika Lavrentyeva 8, Novosibirsk, 630090, Russian Federation

<sup>2</sup>A.I. Kryzhanovskiy Krasnoyarsk Regional Clinical Oncological Dispensary; ul. 1ya Smolenskaya 16, Krasnoyarsk, 660133, Russian Federation

<sup>3</sup>Prof. V.F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, ul. Partizana Zheleznaya 1, Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation

<sup>4</sup>Novosibirsk State Medical University; Krasny pr. 52, Novosibirsk, 630091, Russian Federation

<sup>5</sup>N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology; Kashirskoe shosse 24, Moscow, 115522, Russian Federation