МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ГЕНЕТИКА

ЗОРА АКРАМ ХАМУДЕ

ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ВАРИАНТИ, СВЪРЗАНИ С КАРЦИНОГЕНЕЗА И ФАРМАКОГЕНЕТИЧНИ ЕФЕКТИ ПРИ РАК НА БЯЛ ДРОБ И ЩИТОВИДНА ЖЛЕЗА

Д И С Е Р Т А Ц И Я

за присъждане на образователна и научна степен

“ДОКТОР”

Област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика

Професионално направление: 4.3. Биологически науки

Докторска програма: „Генетика”

Научни ръководители: ЧЛ.-КОР., ПРОФ. Д-Р ДРАГА ТОНЧЕВА, ДБН
ДОЦ. Д-Р САВИНА ХАДЖИДЕКОВА, ДМ

Научен консултант: ДОКТОР РАДА СТАНЕВА, ДБ

София, 2018 г.

Благодаря сърдечно на научните си ръководители чл.-кор. проф. д-р Драга Тончева и доц. д-р Савина Хаджидекова за възможността да работя с едни от най-добрите екипи и най-съвременните технологии в областта на молекулярно-генетичните изследвания и за помощта и напътствията при разработването на този научен труд. Благодаря на научния си консултант д-р Рада Станева за ценните съвети, помощта при разработване на дисертационния труд и безрезервната подкрепа, надхвърлящи професионалните задължения. Благодаря на проф. Sabine Weidner за предоставените проби от пациенти с рак на щитовидната жлеза и на колегите от СБАЛГАР „Д-р Малинов“ за помощта при експерименталните изследвания. Благодаря на гл. асистент Драгомира Николова за съдействието и интерпретацията на резултатите. Благодаря на всички колеги от Катедрата по Медицинска генетика за помощта, подкрепата и приятелската атмосфера. Благодаря на семейството ми за подкрепата, търпението и обичта.

Съдържание

Използвани в текста съкращения на кирилица:.....vi

Списък на фигурите в текста.....8

I. Въведение.....10

II. Литературен обзор.....12

1. Фармакогенетика, фармакогеномика и персонализирана медицина.....12

2. Генетична природа на рака.....15

3. Генетични биомаркери при злокачествени тумори.....17

4. Молекулярни подходи за разкриване на генетични биомаркери.....20

5. Нови подходи при лечение на рак.....24
5.1. Таргетна терапия – малки молекулни инхибитори и моноклонални антитела.25
5.2. Антисенс терапия.....29
5.3. CRISPR/Cas9 геномно редактиране.....30

6. Генетични биомаркери и таргетна терапия при рак на белия дроб.....34

7. Генетични биомаркери и таргетна терапия при рак на щитовидната жлеза.....39

III. Цел и задачи.....44

IV. Материали и методи.....45

1. Материали.....45

2. Методи.....45
2.1. Изолиране на ДНК.....46
2.2. ДНК секвениране от ново поколение.....47
2.3. Полимеразна верижна реакция в реално време (Real-time PCR).....64

V. Резултати.....72

1. Данни от NGS секвениране с карциномен панел на туморни проби от НДКБК.....72
1.1. Анализ на варианти, свързани с туморогенеза при НДКБК.....72
1.2. Фармакогенетични варианти при НДКБК, определени чрез секвениране с карциномен панел.....77

2. Мутационен спектър на *EGFR* гена определен чрез експресионен PCR анализ в реално време за избор на таргетна терапия на НДКБК.....84
2.1. Клинико-патологична характеристика на изследваните пациенти.....84
2.2. Мутационен спектър на *EGFR* гена за таргетна терапия на НДКБК.....86
2.3. Анализ на фенотип/генотип корелации.....89

3. Данни от NGS секвениране с карциномен панел на ДНК-и от кръвни проби на пациенти с фамилен папиларен тиреоиден карцином.....91
3.1. Родословия на четири фамилии с ФПТК.....91
3.2. Патогенни варианти в гени, свързани с карциногенеза, определени при NGS секвениране на пациенти с ФПТК.....93

3.3. Фармакогенетични варианти при ФПТК, определени чрез секвениране с карциномен панел 95

VI. Обсъждане 100

1. Обсъждане на патогенни варианти в гени, асоциирани с карциногенеза при НДКБК 100

2. Обсъждане на фармакогенетични варианти в гени за туморогенеза при НДКБК за избор на химиотерапия 105

3. Обсъждане на мутационния спектър на *EGFR* гена за избор на таргетна терапия при НДКБК 115

4. Обсъждане на патогенни варианти в гени, асоциирани с карциногенеза при ФПТК 119

5. Обсъждане на фармакогенетични варианти в гени за туморогенеза при ФПТК за избор на химиотерапия 124

VII. Изводи 134

VIII. Приноси 135

IX. Литературни източници 136

Декларация за оригиналност 149

Използвани в текста съкращения на кирилица:

СГХ - микрочипова сравнителна геномна хибридизация

иРНК - информационна РНК

НДКБК - недребноклетъчен белодробен карцином

АТФ – аденозинтрифосфат

ТК - тиреоиден карцином

ПТК - папиларен тиреоиден карцином

ФПТК – фамилен папиларен тиреоиден карцином

РМЖ – рак на млечната жлеза

НЛР – нежелани лекарствени реакции

Съкращения на латиница:

DNMT - DNA methyltransferase

MGMT - O6-methylguanine DNA methyltransferase

miRNA - microRNA (ribonucleic acid)

CTCs – circulating tumor cells (Циркулиращи туморни клетки)

FISH - fluorescent in situ hybridization

CISH - chromogenic in situ hybridization

SISH - silver-enhanced in situ hybridization

Real-time PCR – Real-time Polymerase Chain Reaction

PCR – Polymerase Chain Reaction

NGS - Next Generation Sequencing

DNA - Deoxyribonucleic acid

Array-based CGH - Microarray based comparative genomic hybridization (микрочипова сравнителна геномна хибридизация)

ASO - antisense oligonucleotide

ODNs – oligodeoxynucleotides

mRNA - Messenger RNA

RNAi – RNA interference (РНК интерференцията)

siRNA - Small interfering RNA (малки интерферентни РНКи)

dsRNA – double-stranded RNA (двойно-верижна РНК)

CRISPR - Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

gRNA - Guide RNAs

PAM - Protospacer Adjacent Motif

DSB - double-strand break

NHEJ - non-homologous end-joining

HDR - homology-directed DNA repair

HPV - Human papillomavirus

NSCLC - Non-small-cell lung cancer

EGFR – Epidermal growth factor receptor

EGFR TKIs – EGFR Tyrosine kinase inhibitors

ALK - Anaplastic lymphoma kinase (Анапластична лимфомна киназа)

NER - Nucleotide excision repair

Списък на фигурите в текста

Фигура 1. Работната процедура за подготвяне на библиотеката за секвениране по протокола TruSight Rapid Capture Sample Preparation guide 55

Фигура 2. Стандартна поточна клетка (flow cell), на която се извършва целият процес на секвениране 61

Фигура 3. Касетата с резервоара за реагентите, в който се добавят ДНК библиотеките от таргетните секвенции 62

Фигура 4А. Първите стъпки в процеса на секвениране с технологията на Illumina 63

Фигура 4Б. Продължение на стъпките в процеса на секвениране с технологията на Illumina 63

Фигура 5. Зареждане на ротора на Rotor-Gene Q апарата с проби 67

Фигура 6. Напречно сечение на Rotor-Gene Q апарата. Отопление и охлаждане се постига чрез бърз въздушен поток в реакционната камера. Епруветките преминават през оптиката на всеки 150 милисекунди, което позволява високоскоростно заснемане на данните. До 6 отделни LED светлинни източници могат да се използват в комбинация с 6 различни високо чувствителни филтъра за детекция 68

Фигура 7. SNP вариантът rs16941 в хомозиготно състояние CC Генотип 74

Фигура 8. SNP вариантът rs1799950 в хетерозиготно състояние TC генотип 75

Фигура 9. SNP вариантът rs80356964 в хетерозиготно състояние GA генотип 75

Фигура 10. SNP вариантът rs75023630 в хетерозиготно състояние CT генотип 76

Фигура 11. SNP вариантът rs1042522 в хомозиготно състояние CC генотип 80

Фигура 12. SNP вариантът rs2228001 в хетерозиготно състояние GT генотип 80

Фигура 13. SNP вариантът rs2227983 в хетерозиготно състояние AG генотип 81

Фигура 14. SNP вариантът rs13181 в хомозиготно състояние GG генотип 82

Фигура 15 Секвенцията на ERCC2 гена в хромозома 19; C алелът е заменен със T алел 82

Фигура16. Замяната на аспарагинова киселина (D) с аспарагин (N) на 312 позиция 83

Фигура 17. Структурата на домейна на ERCC2; полиморфизмът ERCC2 Asp312Asn 84

Фигура 18. Разпределение на пациентите по пол 85

Фигура 19. Разпределението по групи на пушачи и непушачи 85

Фигура 20. Хистологична класификиция на пробите 86

Фигура 21. Разпределението на туморите по стадий 86

Фигура 22. PCR амплификацията на проба с положителна EGFR мутация (делеции в екзон 19 – Deletions Reaction Mix) и амплификация на контролата за същата проба (Control Reaction Mix) 87

Фигура 23. PCR амплификацията на проба с два вида мутации в EGFR гена (делеции в екзон 19 – Deletions Reaction Mix и T790M точкова мутация) и амплификация на контролата за същата проба (Control Reaction Mix) 88

Фигура 24. Разпределението на *EGFR* позитивни тумори според пола на пациентите 89

Фигура 25. Разпределение спрямо пола на *EGFR* позитивни тумори при пациенти непушачи 90

Фигура 26. Разпределение на *EGFR* позитивни тумори спрямо пола на пациенти пушачи 90

Фигура 27. Разпределение на EGFR-положителните случаи според хистологичния вариант на туморите, при които са установени 90

Фигура 28. Родословия на четири фамилии с ФПТК 92

Фигура 29. SNP вариантът rs1799939 в хетерозиготно състояние GA генотип 98

Фигура 30. SNP вариантът rs17655 в хетерозиготно състояние GC генотип 99

Списък на таблиците в текста

Таблица 1. Списък на гените включени в TruSight Cancer панел 48

Таблица 2. Поддържане на цветови баланс при лазерното отчитане на базите за всяка индексова позиция 51

Таблица 3. Разпределението на тестваните и контролните проби в реакционите смеси за Rotor-Gene Q 65

Таблица 4. Каналите на Rotor-Gene Q апарата за оптичното детектиране 69

Таблица 5. Приемливи стойности на реакционната мутация (FAM), за therascreen® EGFR RGQ PCR Kit 70

Таблица 6. Варианти свързани с онкогенеза в пациенти с НДКБК 73

Таблица 7. Фармакогенетични варианти установени в туморите на пациенти с НДКБК 77

Таблица 8. Вариантът (rs1799793 в ERCC2) е толерантен (Tolerated) според предикцията по SIFT; според предикцията PROVEAN се определя като deleterious 83

Таблица 9. Типовете на откритите мутации в EGFR гена 87

Таблица 10. Обобщени данни за изследваните пациенти за EGFR мутационен статус 91

Таблица 11. Секвенирани пациенти с фамилен папиларен тиреоиден карцином от четири семейства 91

Таблица 12. Патогенни варианти, които се срещат в повече от една фамилия 93

Таблица 13. Редки патогенни варианти 93

Таблица 14. Индивидуални патогенни варианти 94

Таблица 15. Варианти асоциирани с терапевтичния отговор към химиотерапевтици при пациенти с фамилен папиларен тиреоиден карцином 96

Таблица 16. Генетични варианти при НДКБК с информация за фармакогенетичен ефект 107

Таблица 17. Резултати от NGS. Таблицата представя ген; хромозомна локализация; прогнозни параметри (SIFT и PolyPhen); SNP; генотипи; брой пациенти с този генотип; чувствителност към лекарства, свързана с rs (според уебсайта на pharmagkb); вид мутация 126

I. Въведение

Настоящият дисертационен труд насочва вниманието към значим здравен проблем – търсенето на нови подходи при лечението на пациенти, страдащи от ракови заболявания. Раковите заболявания са широко разпространени, социално значими и заемат важна роля в човешката патология. Според Световната Здравна Организация (СЗО) туморните заболявания са втората причина за смъртност по света. Ефикасността и резултатите от лечението на злокачествените заболявания зависят от различни фактори. Известно е, че ефикасността на едно и също лекарство, прилагано в терапевтична доза по стандартен протокол, е различна между пациентите. Това може да се дължи на различни причини генетични фактори, физиологични/патофизиологични процеси - фактори на околната среда. Варианти в някои гени, могат да обуславят различия между индивидите в скоростта на лекарствената резорбция, транспорт, свързване с клетъчни рецептори, биотрансформация, образуване на активни субстанции и отстраняване от организма. Фармакогенетиката и фармакогеномиката комбинират възможностите на генетиката и фармакологията за проучване на ролята на генетичните варианти за променения отговор на индивида (повишен, намален или липсващ) към действието на лекарства. Появата на секвенирането от ново поколение (NGS – next generation sequencing) съществено промени пейзажа на геномната медицина. NGS технологията има изключителен потенциал за приложение във фармакогеномиката, тъй като позволява анализ на целия геном, екзом или панел от голям брой гени в една реакция бързо, точно и евтино.

В научната разработка са анализирани два вида рак - недребноклетъчен белодробен карцином (НДКРБ) и папиларен тиреоиден карцином (ПТК), като са приложени два съвременни молекулярно-генетични подхода – секвениране от ново поколение (NGS – next generation sequencing) и PCR (polymerase chain reaction) в реално време.

Недребноклетъчният рак на белия дроб е най – често срещания вид белодробен карцином. В етиологията на НДКРБ стоят различни рискови фактори като тютюнопушене, фактори на околнатапе среда и генетични предразположеност. В зависимост от стадия на тумора и хистологичния тип, пациентите с белодробен

карцином се насочват за различни видове терапии (конвенционална химиотерапия или прицелна терапия). За по-добър ефект от лечението при пациентите се търсят специфични биомаркери, напр. мутации, които създават чувствителност в туморние клетки към определени медикаменти [Zappa and Mousa, 2016].

Папиларният карцином на щитовидната жлеза е най-честата форма на злокачествено заболяване на щитовидната жлеза, което обикновено има добра прогноза и представлява приблизително 80-85% от всички тиреоидни карциноми. Въпреки това, този вид рак може да причини далечни метастази и да бъде по-агресивен при възрастни пациенти. Изборът на терапия въз основа на определянето на биомаркери се очертава като ефикасен подход при лечението на заболяването [Ning, 2015].

Данните от NGS анализа бяха използвани за интерпретиране на варианти, свързани с лекарствената чувствителност и нежелани лекарствени реакции (НЛР). Данните от PCR в реално време бяха анализирани за детектиране на типове мутации в *EGFR* гена в туморни ДНК проби от пациенти с НДКБК за определяна на таргетна терапия.

Фармакогеномиката има потенциала да повиши ефекта от терапията и да намали страничните ефекти на лекарствата като предлага качествено нов подход - предварително геномно тестване на пациентите и индивидуализиране на лечението.

II. Литературен обзор

1. Фармакогенетика, фармакогеномика и персонализирана медицина

Съвременната персонализирана медицина се базира на индивидуална терапия определена въз основа на резултатите от генетични анализи, осъществено преди началото на лечението. Персонализираната медицина се основава на изследвания на редки моногенни дефекти (фармакогенетика) и на полиморфни варианти в гените (фармакогеномика), които имат отношение към биотрансформацията на лекарствата – резорбция, транспорт, свързване с клетъчни рецептори, метаболизъм, екскреция от организма. Целта е съобразно установените генетични варианти (биомаркери) да се определи правилното лекарство, в правилната доза, в правилното време за правилния пациент.

Фармакогенетика

Фармакогенетиката е наука, която изучава ролята на редки генетични дефекти за променения отговор на пациента към действието на лекарствата. Терминът „фармакогенетика“ е предложен от Vogel през 1959 г. при проучването на генетично детерминирани варианти, проявяващи се единствено при прием на определени лекарствени препарати.

Варианти в някои гени, могат да обуславят различия между индивидите в скоростта на лекарствената резорбция, транспорт, свързване с клетъчни рецептори, биотрансформация, образуване на активни субстанции и отстраняване от организма. Някои индивиди са особено чувствителни към страничните ефекти на определени лекарства, докато други реагират добре на същите медикаменти. Най-често индивидуалните различия в лекарсвения ефект са генетично детерминирани. Терапията при много пациенти все още се прилага без предварително изследване на генетично заложения потенциал на болните да реагират на лечението. Терапия, проведена без генетичен анализ, представлява лечение на тъмно. Част от пациентите, които носят фармакогенетични дефекти се нуждаят от алтернативен терапевтичен подход.

Фармакогенетиката е важен клон от генетиката, защото нежеланите лекарствени средства са едни от главните причини за заболеваемост и смъртност. С натрупването на

огромно количество информация в резултат от реализирането на „Човешкия геномен проект“ значението на фармакогенетиката ще става все по-голямо.

С нарастването на информацията и разбирането как точно гените определят реакцията към определено лекарство, ще бъде възможно да се прилага индивидуален подход при избора на лекарства и дози за всеки пациент. Това ще осигури по-ефективна терапия, с по-голяма безопасност и по-малко неуспехи в лечението [Relling and Dervieux, 2001, Lu, 2015, Hertz and Rae, 2015].

Фармакогеномика

Фармакогеномиката е сравнително нова наука, която доразвива фармакогенетиката чрез изучаване на генома и генната експресия, за да бъдат разкрити генетични варианти, определящи предразположение към нежелани лекарствени реакции (Adverse Drug Reaction – ADR). Основната разлика между фармакогенетиката и фармакогеномиката е, че първата изучава различията в лекарствения отговор, дължащи се на отделни генни варианти, докато фармакогеномиката проучва значението на целия геном.

Важна цел на фармакогеномиката е разкриването на нови лекарствени мишени и разработването на ефективни и безопасни лекарства, съобразени с индивидуалния генетичен профил на пациента. Ползата за пациентите е да бъдат лекувани с подходящо лекарство, с индивидуална терапевтична доза, за да бъде постигнато най-добро лечение и да се намалят страничните лекарствени ефекти.

По отношение на раково болните пациенти химиотерапията има добър терапевтичен ефект само при 30-50% от пациентите. Онколозите се сблъскват ежедневно с проблема за различната чувствителност на раково болните към химиотерапевтичните лекарства и развитие на резистентност. При част от пациентите, химиотерапията води до поява на странични/токсични реакции и може да провокира засилена туморна пролиферация и метастази. Това показва острата нужда от създаването на нови, по-ефективни лекарства. Причината за ниската ефективност на терапията и развитие на лекарствена резистентност при повечето болни са особеностите на туморния геном. Той бързо се променя в хода на развитие на тумора и метастазния процес.

Изследванията на ракови геноми допринасят за разкриване на нови знания, които ще помогнат на лекарите да поставят ранна и много по-точна диагноза, да извършват

индивидуално и по-ефективно лечение и да полагат персонализирани грижи за пациентите.

В международен план екзомното секвениране се използва за онкогенетични и фармакогенетични изследвания. При реализирането на международния проект - Раков геномен атлас „National Comprehensive Cancer Network“ са определени с омикс-технологии 10,000 тумори от 12 различни типа ракови заболявания и са разкрити 10,000,000 мутации, свързани с рака.

Фармацевтичната индустрия прави огромни инвестиции за развитие на таргетни лекарства, които атакуват и инактивират генни мишени. Таргетната терапия е по-ефективна и по-малко токсична за пациентите от конвенционалната химиотерапия, но тя се предлага само на около 10% от болни, които са носители на определени генни мутации. Бързо развиващата се таргетна терапия засега не измества химиотерапията, която в момента се прилага без геномно изследване на пациентите. Липсващото звено в терапевтичната верига на химиотерапията е фармакогеномиката и използването на генетични тестове за чувствителност/резистентност към лечението на болните.

Повишаването на ефекта от химиотерапията чрез предварително геномно тестване на туморите ще подобри лечението на онкоболните и ще намали токсичните реакции. Фармакогеномиката предлага нов подход за повишаване на ефекта от терапията и намаляване на страничните ефекти на лекарствата. Тя лежи в основата на персонализираната медицина.

Персонализирана медицина

Основната концепция на персонализираната медицина е поставяне на прецизна диагноза, мониториране на болестния процес и определеляне на ефективно лечение на базата на пациентския геном. Персонализираната медицина е нов здравен модел, който има за цел да постигне значима промяна в начина за поставяне на диагноза, прогноза и терапия на болести и да подобри здравето на пациентите. Досега повечето терапии са предназначени за "средния пациент" и лечението е с добър ефект за някои болни, но не и за други. Прецизираната медицина е иновативен подход, който отчита индивидуалните различия между хората (по отношение на техния геном, околна среда и начин на живот). Тя предлага възможности за поставяне на прецизирана диагноза,

извършване на превенция, ефективно лечение на тежки болести (редки и социално-значими) и намаляване на нежелани лекарствени реакции и неефективни терапии. Прецизираната медицина разкрива нови хоризонти за използване на геномна и клинична информация за пациентите в рутинната медицинска практика. Развива се със съвременни технологии и с мощна база данни и база знания от националния и световния опит. Мотото е „лечение на пациента с правилното лекарство, в подходящата доза и в точното време“.

Персонализираната медицина поставя в центъра на системата отделния пациент, неговото здраве и медицински грижи, чрез промяна в модела на здравеопазване. Ползата за пациентите е, че те ще бъдат лекувани с по-ефективни и по-безопасни лекарства, ще получат по-точна прогноза за развитие на болестта и възможност за по-ранно откриване на заболявания във фаза, в която терапията ще бъде по-успешна.

Всички големи фармацевтични компании насочват значителни финансови ресурси за разработване на таргетни лекарства и нови тестове за диагностика. Агенцията за контрол на храните и лекарствата “FDA” е одобрила над 200 лекарства за таргетни терапии с информация за изследване на определени генетични маркери преди провеждане на лечение. Над 75% от тези лекарства „т. нар. у нас нови молекули“ са за приложение в онкологията и хематологията. Очаква се в бъдеще пациенти с автоимунни, възпалителни, невродегенеративни и други заболявания да се лекуват с такива лекарствени продукти.

2. Генетична природа на рака

Известно е, че ракът е генетично заболяване, причинено от мутации. Развитието на тумори е многостепенен процес, при който са необходими най-малко три до шест мутации, за да се развие злокачествено заболяване [Vogelstein and Kinzler, 1993]. Мутациите възникват в резултат или на фактори на околната среда като химични мутагени, или случайно по време на ДНК репликация [Tomasetti and Vogelstein, 2015]. Около една пета от раковите заболявания при човека се причиняват от вируси [zur Hausen, 1991, Liao, 2006].

Всеки рак е генетично уникален, като скоростта на мутиране силно варира както между различните типове тумори, така и в един и същи вид. Неоплазми от един и същи

хистопатологичен тип могат да се различават по „молекулярния" си профил. Ако честотата на мутациите се повиши над 1000 пъти този фенотип се нарича "мутаторен" и често се установява при раковите клетки. Ракът на пикочния мехур, на белия дроб и меланома са с най-висок процент на мутации.

Първата основна характеристика на туморните клетки е тяхната способност за непрекъсната пролиферация. В тази група се включват вирусни и клетъчни онкогени. Мутации в пътищата на растежни фактори, които се свързват и активират рецептори върху клетъчната повърхност с вътреклетъчни тирозин киназни домени, се срещат често при рак. Втората отличителна характеристика на раковите мутации е прекъсване на механизмите за отрицателна-обратна връзка, които подтискат пролиферативната сигнализация, например мутациите инактивиращи тумор супресорни гени. Други важни отличителни характеристики са подтискане на апоптозата (или програмирана клетъчна смърт), придобиване на клетъчно безсмъртие, репрограмиране на клетъчните енергийни метаболитни пътища, избягване от механизмите на имунната система, възможност за предизвикване на ангиогенеза, активиране на процесите на инвазия и метастази.

Друга особеност на много ракови клетки е така нареченият мутационен фенотип, който може да улесни появата на генетични промени. Той включва мутации в гени, които променят активността на ензими, участващи в ремонта на ДНК структурни дефекти [Roberts and Gordenin, 2014]. Също така от значение са мутации, които позволяват на клетките да станат резистентни на действието на токсични химиотерапевтични лекарства, т.е. химиорезистентността. Тези промени включват повишена експресия на ABC транспортерни протеини, водещи до рефлукс на лекарството или промени в нивата на ензимите, отговорни за активиране или деактивиране на лекарства [Wilson, 2006].

Онкогени

Възникването на онкогени от нормални клетъчни гени (прото-онкогени) може да се получи чрез мутация, водеща до повишаване активността на протеини (ензими), или чрез загуба на нормално регулиране и увеличаване на експресията на протеини, или хромозомна транслокация, водеща до образуване на фузионен ген, например, Филаделфийска хромозома, което създава BCR-ABL и е най-често свързана с хронична

миелогенна левкемия (CML) [Talpaz, 2006]. Онкогените засилват клетъчната пролиферация чрез придобиване на фукнкция и стимулират клетъчната сигнални пътища по неподходящ начин. Тъй като онкогените са активно в присъствието на дивия тип алел на протоонкогена, те имат доминантен ефект.

Туморни супресори

Инактивираните тумор супресорни гени са толкова важни за канцерогенеза, колкото активираните онкогени. Ако онкогени са двигателите на рака, то туморните супресори са спирачките. Над 50% от човешките тумори, съдържат *p53* мутация или делеция [Levine, 1997]. За разлика от онкогените, туморните супресори се инактивират при многостепенния процес на развитието на рак и това може да стане по различни начини. Тумор-супресорният ген може да се инактивира чрез мутация със загуба на функция или може слабо да бъде експресиран. За разлика от онкогените, тумор супресорните гени се инактивират" според хипотезата за „двойните удари“, т.е., двата алела на гена, кодиращ тумор-супресорен протеин трябва да бъдат променени, за да бъде премахната неговата функция. Ако само единият алел е дефектен, вторият все още продължава да функционира и произвежда див тип протеин, т.е., мутантните алели на тумор супресорни гени са рецесивни, докато мутантни алели на онкогените са доминантни.

Епигенетични фактори и контролни локуси

Контролът на генната експресия от епигенетични регулатори често е нарушен в раковите клетки [Rajendran, 2011]. ДНК метилтрансферазите (DNMTs) и ензимите, участващи в хистоновите модификации, например, LSD1, EZH2 и NSD2, често се променят при злокачествени клетки и има доказателства, че тези епигенетични промени са от съществено значение за поддържането на тумори.

3. Генетични биомаркери при злокачествени тумори

Много характерна особеност на злокачествените тумори е тяхната хетерогенност. Молекулярната хетерогенност е непрекъснат процес, отговорен за клоналната еволюция на неоплазмите, както в първичното огнище така и на метастазите. Биомаркерите отразяват генетичната хетерогенност на туморите и дават възможност за персонализиране на терапията. През 2001 г. работна група на Американския здравен институт стандартизира определението за биомаркер като „параметър, който може да

бъде обективно измерен и е индикатор за нормален биологичен процес, патогенетичен процес или фармакологичен отговор към терапевтична интервенция".

Генетични биомаркери

Биомаркерите могат да бъдат разделени на 2 главни групи: прогностични и предиктивни. Възможно е някои маркери да бъдат едновременно и прогностични и предиктивни (*MGMT* promoter methylation, circulating tumor cells). Анализът на прогностичните маркери дава информация за цялостната прогноза и последствия от раковия процес, докато предиктивните маркери спомагат за оптимизиране на терапията, тъй като дават информация за вероятността за повлияване от определена химиотерапия. Добрият биомаркер се характеризира с достатъчна специфичност и чувствителност по отношение на определен тип тумор, а концентрацията му трябва да отразява стадия на болестта и отговора към прилаганата терапия.

Биомаркери за определен вид тумор се определят чрез търсене на полиморфизми, соматични или герминативни мутации, на промяна в ДНК метилирането или генната експресия, на специфични микро РНК-и или циркулиращи туморни клетки.

1. *Геномика (Мутации и полиморфизми)*

Цялостните геномни асоциативни проучвания позволяват бърза детекция на генетични варианти, допринасящи за патогенезата на комплексните генетични болести, но също и откриването на голям брой фармакогенетични маркери.

2. *Транскриптомика*

Генна експресия. Експресионният анализ на ниво РНК дава възможност едновременно да се измери активността на хиляди гени в тоталната РНК, което намира приложение при изучаването на ефектите на определена терапия, на промените на експресията по време на ембрионалното или индивидуалното развитие. Експресионното профилиране може да се използва и при идентификацията на гени с променена експресия под действието на патогенни микроорганизми.

MiRNA експресия. Микро РНК-ите представляват малки некодиращи молекули РНК, които регулират генната експресия като свързват специфични молекули информационна РНК и модулират транслацията им. Доказани са вариации в

експресионните нива на miRNA в различните тъкани и стадии на развитие. Анализът miRNA експресията хвърля светлина върху ролята на miRNA за генната регулация

3. *Метилационни промени (епигеномика)*

Скорошни проучвания показват, че промени в ДНК метилацията могат също да бъдат добър прогностичен маркер. Асоциативни изследвания на целия епигеном, както и на метилацята на отделни туморсупресорни или онкогени, показват, че те могат да претърпят хиперметилация в туморната тъкан, което да блокира техните промотори и да доведе до загуба на генната експресия. Метилирането на ДНК има съществен ефект върху генната експресия. В човешкия геном 4% от цитозиновите остатъци са метилирани в 5' позиция. ДНК метилирането има ключова роля за геномния импринтинг, поддръжката на геномния интегритет и е важен фактор при развитието на неопластичните процеси.

4. *Циркулиращи туморни клетки (CTCs)*

Присъствието на CTCs в периферната кръв е биомаркер. Някои туморни клетки придобиват способността да се откъсват от туморната маса и да мигрират през съдовата стена в периферната кръв. Около 106 туморни клетки на 1 грам туморна тъкан влизат в контакт с кръвта. Присъствието на CTCs в периферната кръв има силна корелация с метастазите и формирането на вторични туморни огнища. Дори малки количества ту клетки 1 на 10 мл кръв има лоша прогноза.

Оценката на броя на CTCs преди, по време и след терапия също улеснява предвиждането на изхода от терапията. Въпреки, че количеството на CTCs, изолирани от пациентски проби е много малко, са разработени достатъчно надеждни техники за концентрирането им за целите на молекулярното и експресионно профилиране.

Чрез детекция и преброяване на CTCs е възможно да се оцени ефектът на химиотерапия още по време на самото лечение. Посредством проследяване на измененията в броя на туморните клетки в кръвообращението се дава възможност за динамично адаптиране на лечението индивидуално за всеки пациент.

Напредъкът в молекулярната биология позволи идентификацията на варианти, които дават възможност за провеждане на истинска персонализирана медицина и улесни избора на подходящи клинични процедури, базирани на „panomics“ технологии за

анализ. За да бъде такава стратегия успешна е необходима детайлна информация за генетичната хетерогенност на тумора, участващите сигнални каскади в туморния процес и отговорните водещи (*driver*) мутации.

4. Молекулярни подходи за разкриване на генетични биомаркери

Биомаркерите са в основата на съвременното определяне на терапията. Изключително важно е да продължи търсенето на нови биомаркери, тъй като те позволяват оценка на степента на злокачественост и вероятността за ремисия, мониторинга на хода на терапията, както и предвиждане на отговора към терапията.

Молекулярните техники позволяват откриването на мутации, генетични профили, микроРНК и протеинови експресионни модели, както и епигенетични промени като ДНК метилиране и хистонови модификации [Ibrahim, 2016]. Първоначалният вариант на проекта на „Човешки геном“ е завършен през 2001 година, използвайки капилярна секвенционна технология. Впоследствие бяха разработени и други платформи за секвениране на ДНК, базирани на пиросеквенирането (pyrosequencing), технология в реално време с единична молекула или технология nanopore (наречена последователност от трето поколение) [Drmanac, 2010].

Класическо секвениране

Секвенирането по Сангер е златен стандарт в продължение на много години и както много други тестове се основава на дидеокси метода. ДНК, която се подлага на секвениране, е получена чрез амплифициране с PCR реакция. ДНК веригите се разделят чрез денатурация. В четири отделни реакционни смеси към едноверижна ДНК се прибавят праймери, дезоксинуклеотид трифосфати (dNTP), ДНК полимераза и един от дидезоксинуклеотид трифосфати (ddNTP). Когато дадена молекула на ddNTP се инкорпорира в растящата ДНК верига, тя препятства по-нататъшната елонгация и предизвиква терминиране на синтеза. Във всяка реакционна смес се образуват ДНК фрагменти, които имат различна дължина, но завършват с един и същи ddNTP. При секвинирането по Сангер, ddNTP са белязани радиоактивно. Продуктите на синтеза се сепарират по размер чрез електрофореза в полиакриламид гел,като се пускат в четири различни старта. При съвременните техники за секвениране ДНК пробата, която трябва да се секвенира, се комбинира в епруветка с праймер, ДНК полимераза и ДНК

нуклеотиди. Добавени са и четири специфично белязани терминатори - ddNTP, които терминират синтеза на ДНК веригата при включването им на мястото на съответния нуклеотид. Реакционата смес се нагрява за денатурация на ДНК веригата, след което се охлажда, така че праймерът да може да се свърже с едноверижната ДНК. ДНК-полимеразата започва да амплифицира нова ДНК верига, докато не се добави дидеокси нуклеотид вместо нормален нуклеотид. По този начин се блокира прибавянето на нови нуклеотиди и веригата завършва с дидеокси нуклеотид. Тази реакция се повтаря определен брой цикли. След приключване на реакциония процес във всяка епруветка се съдържат фрагменти с различни дължини, завършващи с конкретен дидеоксинуклеотид. Следва капилярна електрофореза за разделяне на фрагментите. Всеки фрагмент в края капилярната тръбичка се осветява от лазер, позволявайки да се открие специфичния флуорохром. При регистрирането на цветовете на различните багрила може да се разчете последователността на оригиналната ДНК. Данните, записани от детектора представляват серия от пикове във флуоресцентния интензитет, като ДНК последователността се отчита съгласно пиковете в хроматограмата. Идентифицирането на абнормни пикове в хроматограмите на ДНК последователността може да бъде улеснено от компютърни програми, които не само създават хроматограмата, но и правят сравнение с референтните последователности (RefSeq) и идентифицират различни патологични и полиморфни варианти.

FISH анализ

FISH анализа (Fluorescent in situ hybridization) дава възможност за идентифициране на предиктивни или прогностични генетични варианти при раковите заболявания. Най-често FISH технологията се използва за откриване на промени в броя на копията, които предсказват отговора на лечението, например амплификация на *c-erbB2/neu* (*ERBB2*) гена който кодира HER2 протеина [Ross, 2009]. FISH анализът, базиран на броя копия за три гена *(CYP24, PDCD6IP* и *BIRC5*), вече е успешно приложен за прогнозиране от рецидив за рак на гърдата. Този тест използва собствен алгоритъм за интегриране на информацията от трите гена и прогнозиране на честотата на рецидивите [Davis, 2007]. Адаптирани са вариации на FISH техниката - CISH (chromogenic in situ hybridization) и SISH (silver-enhanced in situ hybridization). При тях интензитета на сигнала не отслабва с времето, което позволява послдващ анализ на пробата [Penault-Llorca, 2009].

Real time PCR (RT-PCR)

Прилагат се няколко метода за откриване на соматични мутации чрез PCR в реално време (real-time PCR). PCR в реално време технологията се базира на детекцията на сигналния интензитет, който се генерира по време на амплификацията от интеркалираната боя или от разграждането на маркираните сонди с багрилото. Процесът на PCR технологията се състои от няколко етапа, кадето температурата се променя според зададената програма. Първия етапа е ДНК денатурация на 95°C (позволява разделянето на двойната верига на нуклеиновата киселина); втори етап е свързване на праймери, при температура от 50-65°C; трети етап е елонгацията на 72°C (амплифицира се таргетния район на ДНК последователността, чрез свързване на Taq полимеразата с PCR праймерите и добавяне на нуклеотиди) [Delidow, 1993].При алел-специфичния PCR се използват два праймера, комплементарни на нормалната и мутантната последователност [Wu, 1989]. Амплификация протича само при пълна комплементарност между праймера и тестваната ДНК последователност [Latorra, 2003]. Процеса на амплификация се провежда в real-time PCR апарат, който има възможността да освети всяка проба с лазарна светлина с определена дължина на вълната. Апаратът детектира флуоресценцията, която е излъчена от възбудените флуорофори в епруветката. Метода на real-time PCR следи амплификацията на таргетната ДНК последователност, докато този процес протича в реално време. Освен детекцията на PCR продукта, real-time PCR технологията определя количествено таргетната ДНК в пробите и анализира вариантите. Едни от първите анализирани с real time PCR биомаркери са мутации в *KRAS* гена при рак на дебелото черво. Честотата на *KRAS* мутациите при пациенти с рак на дебелото черво е 32%, като осем точкови замени представляват по-голямата част от мутациите [Samowitz, 2000].

NGS анализ

Секвениращите технологии претърпяха силен тласък в развитието си през последните пет години. Появата на секвенирането от ново поколение съществено промени картината на геномната медицина, превъзхождайки класическото секвениране по много показатели – бързина (в една реакция могат да се изследват целия геном, екзом или панел от голям брой гени); точност на резултата; скрининг на генома без необходимост от предварителна информация относно суспектната генетична аномалия; ниска цена на

анализа [Fragouli, 2018]. Подобен напредък прави използването на NGS възможно в клиничната практика, и по специално в областта на онкологията. Разработени са платформи, които ползват различни техники - (MPSS) - massively parallel signature sequencing, Polony sequencing, 454 pyrosequencing, Illumina (Solexa) sequencing, SOLiD sequencing, Ion Torrent semiconductor sequencing, DNA nanoball sequencing, Heliscope single molecule sequencing and Single molecule real time (SMRT) sequencing [Shendure and Ji, 2008].

NGS предлага три главни типа анализи – анализ на таргетни панели от гени, екзомно секвениране и цялостно геномно секвениране.

Технологията на NGS обхваща 3 главни стъпки: (1) подготовка на пробата; (2) секвениране и визуализация и (3) анализ на данните [Kamps, 2017].

Подготовка на пробата. Подготовката на пробата включва създаване на библиотека от нуклеинови киселини (ДНК или комплементарна ДНК) и амплификацията им. Секвенционните библиотеки се конструират чрез фрагментиране на ДНК пробата и лигиране на адапторни секвенции (синтетични олигонуклеотиди с известна последователност) в краищата на ДНК фрагментите. Така подготвените библиотеки се амплифицират преди секвенирането им [Quail, 2012].

Секвениране и визуализация. Основният принцип на метода се основава на „секвениране чрез синтез“, включващо синтез на голям брой ДНК секвенции, които впоследствие се секвенират едновременно. Фрагментите от библиотеката служат като матрици, върху които се синтезират новите ДНК фрагменти. При включването на нукеотидите в растящата ДНК верига, те се регистрират дигитално като секвенция. Детекцията на инкорпорирането на нуклеотидите може да стане по два разични механизма: отчитане на pH промяна, индуцирана от освобождаването на водороден йон при свързването на нуклеотидите или детекция на флуоресценция, генерирана при инкорпорацията на флуоресцентно белязани нуклеотиди [Quail, 2012]. NGS-приложение)

Анализ на данните. След приключване на секвенирането суровите данни преминават последователно през няколко вида анализ. Достъпни са редица софтуерни пакети за анализ на NGS - данните [Gogol-Doring and Chen, 2012, Li, 2009, Danecek, 2011,

McKenna, 2010] NGS-приложение). Първичната обработка на информацията включва отстраняване на адапторните секвенции и секвенционните разчитания с ниско качество. Същинският анализ може да са подраздели на 4 първични операции: (1) идентификация на отделните нуклеотиди/бази (base calling); (2) коректно позициониране на късите разчетени ДНК секвенции (50-400 bp) в генома спрямо референтна секвенция (read alignment); (3) идентификация на ДНК вариантите в анализираната секвенция спрямо референтен геном (variant calling); (4) анотация на вариантите (variant annotation) – дава информация за природата на варианта в зависимост от локализацията (в нетранслируем регион, екзон, интрон); функционалния тип (missense, nonsense, frameshift); структурния вид (делеции, инсерции, инверсии); клиничното значение (доброкачествени, вероятно доброкачествени, с неясно клинично значение, вероятно патологични, патологични) и др

Array-based CGH

Методът на микрочип-базираната сравнителна геномна хибридизация е разработен в края 90–те години от Solinas-Toldo и сътр. и Pinkel и сътр [Solinas-Toldo, 1997, Pinkel, 1998]. Принципът на микрочиповата СГХ се базира на конкурентната хибридизация на алтернативно белязани тествана и контролна ДНК върху картирани и секвенирани геномни клонове, фиксирани върху твърд носител под формата на микрочипове. Високата резолюция на array CGH метода го прави основен метод на избор при определяне на кандидат-районите за гени, отговорни за генетични заболявания при човека. Той способства при определянето и прецизирането на критичните региони и броя на кандидат-гените за дадено заболяване или фенотипна изява. Благодарение на голямата си резолюция и чуствителност микрочиповата СГХ бързо се превръща в ключов подход при проучването на генома на раковите клетки [Pinkel, 1998, Davies, 2005, Jonsson, 2005]. Именно високата резолюция е причина за драматично увеличение на гените идентифицирани чрез молуекулярно кариотипизиране в последните десетилетия.

5. Нови подходи при лечение на рак

Персонализираната медицина е нова концепция за таргетна терапия на определена група пациенти. Тя използва молекулярни биомаркери – генетични/белтъчни за избор на лечение и мониториране на ефекта от терапията. Прицелното лечение има потенциал

за подобряване на медицинските резултати, намаляване на страничните лекарствени реакции при пациентите и намаляване на разходите за неефективно или ненужно лечение.

5.1. Таргетна терапия – малки молекулни инхибитори и моноклонални антитела

Конвенционалният подход при лечението на рака, включва различни комбинации от хирургическа намеса, радио - и химиотерапия в рамките на терапевтичния прозорец с цел селективно унищожаване на раковите клетки при минимална токсичност за нормалните клетки. Рутинната цитотоксична химиотерапия е насочена срещу бързоделящите се ракови клетки, но за съжаление така се убиват също и бързопролиферативните клетки на нормалните тъкани. В резултат много пациенти получават общи токсични ефекти като алопеция, гастроинтестинални симптоми и миелосупресия [Corrie, 2011]. Появата на таргетната терапия в последните десетилетия доведе до прелом в цялостната концепция за противораково лечение. Прицелната терапия блокира избирателно деленето на раковите клетки чрез въздействие върху специфични молекули, необходими за развитието и растежа на рака. Тя е вид индивидуално лечение за всеки пациент, при което се използват –специфични таргетни лекарства. Таргетните лекарства избирателно активират или подтискат определени биологични процеси, като атакуват директно и коригират молекулярно-генетичните нарушения (мишени) при карциномите. Механизмът на действие на таргетните лекарства е чрез инактивиране на онкогени или активиране на тумор супресорни гени. Характерни белези на раковия процес и туморните клетки са репликативно безсмъртие, постоянни пролиферативни сигнали, избягване на супресорите на растежа, индуциране на ангиогенеза, тъканна инвазия и метастази, избягване на апоптозта, геномна нестабилност. Всеки от тези отличителни белези предоставя цел за потенциална таргетна терапия [Hanahan and Weinberg, 2011].

Преди избор на терапия се провежда генетичен тест за специфични биомаркери и се определят пациентите, които са подходящи за лечение с прицелни лекарства. Прицелната терапия също има странични ефекти, но те са по-слаби и се понасят много по-леко от пациента. Новите геномни технологии драстично намалиха цената на геномните анализи, които стават все по-достъпни за пациентите. Геномните анализи

предлагат възможности на всеки клиницист да избере персонализирано лечение и да постигне по-добри терапевтични ефекти. Понастоящем фармацевтичните компании усилено разработват и въвеждат нови таргетни лекарства (малки молекули или моноклонални антитела) за по-ефективно лечение на злокачествени, имунни, вирусни и други заболявания.

Таргетните терапии са разделени на два класа: малки молекулни инхибитори - предимно тирозин-киназни инхибитори и моноклонални антитела.

Малки молекулни инхибитори

Малките молекулни инхибитори са насочени срещу вътреклетъчни мишени. Те обикновено блокират пътищата на вътреклетъчното предаване на сигнали от тирозин-киназите. Тирозин-киназните инхибитори са най-често използваните и действат чрез инхибиране на киназите, които фосфорилират ключови протеини, за да активират пътищата на сигнална трансдукция. Те се обозначават с наставка ниб (-nib), напр. иматиниб (imatinib) за хронична миелоидна левкемия и обикновено се разработват за орално приложение [Hartmann, 2009].

Друга група малки молекулни инхибитори са инхибиторите на рапимицин при бозайници (mammalian target of rapamycin - mTOR). Те имат наставка имус (-imus), напр. еверолимус (everolimus) при панкреатичен невроендокринен тумор или темсиролимус (temsirolimus) при бъбречно-клетъчен карцином. Тези молекули се свързват с вътреклетъчен протеин (FKBP-12), блокиращ активността на mTOR киназата. Крайният ефект е инхибиция на ангиогенезата и пролиферацията туморните клетки [Coiffier and Ribrag, 2009].

Моноклонални антитела

Моноклоналните антитела са насочени срещу извънклетъчни таргети - обикновено рецептори или техни лиганди. Те могат да действат чрез активиране на имунната система чрез антитяло-зависима клетъчна цитотоксичност; чрез блокиране на на лигандите и рецепторите, нарушавайки жизнено важни процеси в раковата клетка; чрез конюгирани антитела, пренасящи смъртоносни сигнали в таргетната клетка [Fauvel and Yasri, 2014].

Моноклоналните антитела се обозначават с наставката -маб, напр. лекарството трастузумаб, което се използва при рак на гърдата. Те обикновено изискват интравенозно или подкожно приложение. Произвеждат чрез рекомбинантна ДНК технология и могат да се бъдат химерични антитела (65% човешки компоненти и 35% миши), хуманизирани антитела (95% човешки компоненти), човешки антитела (100% човешки съставки). Химерните антитела имат потенциала да предизвикат при пациентите реакция на свръхчувствителност, дължаща се на съществуващия имунитет към чужди животински протеини [Bernard-Marty, 2006], както и формиране на анти-миши белтъчни антитела, неутрализиращи ефектите на терапията.

Принципи на таргетната терапия

Разработването на прицелни терапии изисква определяне на подходящи цели, които. имат ключова роля в растежа и оцеляването на раковите клетки. Един от подходите е сравнението на количествата на определени протеини в раковите клетки с тези в нормалните клетки. Протеините, които присъстват в раковите клетки, но не и в нормалните клетки или които са повече в раковите клетки, биха могли да бъдат потенциални цели, особено ако участват в процесите на пролиферация, инвазия и миграция. Често тези цели се използват за биомаркери, напр. разликата в експресията на протеина на човешки епидермален растежен фактор рецептор 2 (HER-2). HER-2 се експресира във висока степен на повърхността на някои ракови клетки. HER-2 (HER-2/neu или ErbB2) е важна мишена за таргетна терапия. При 30% от жените с рак на млечната жлеза генът е амплифициран, свръхекспресиран и определя лоша прогноза за пациентките. Тези пациенти се повлияват добре от терапия с моноклоналното антитяло trastuzumab. Антитялото спира растежа на хиперпролиферативните ракови клетки, блокира рецепторите от клетъчната повърхност и превръща клетките в мишени на имунните клетки-убийци. Няколко целеви терапии са прилагат при свръхекспресия на HER-2, включително трастузумаб (Herceptin®), който е одобрен за лечение на някои видове рак на гърдата и стомаха [Tai, 2010].

Друг подход за определяне на потенциални цели е да се определи дали раковите клетки съдържат променени протеини, в резултат на генни мутации, които водят до прогресиране на рака. Например в резултат на *BRAF V600E* мутация се синтезира дефектен сигнален протеин BRAF, който се открива при много меланоми. Подходящо

прицелно лекарство при пациенти с метастазирал меланом и доказана *BRAF V600E* мутация е тирозин-киназния инхибитор Вемурафениб (Zelboraf®) [Ascierto, 2012].

Още един подход за таргетни терапии е търсенето на хромозоми аномалии, специфични за раковите клетки, но не и за нормалните клетки. Понякога тези аберации водят до създаването на фузионни гени или химерни гени (ген, който включва части от два различни гена), чийто продукт, наречен хибриден протеин, може да доведе до развитие на рак. Такива химерни протеини могат да бъдат потенциални цели за таргетни ракови терапии. Напр. при хронична миелогенна левкемия (CML) в резултат на реципрочна транслокация между 9-та и 22-ра хромозома се получава фузионен ген bcr/abl, който се транслира в химерен протеин. Този протеин е с значително повишена тирозин-киназна активност в сравнение с нормалния abl протеин, което води до усилена сигнална трансдукция и пролиферация на левкемичните клетки. Пациенти с доказан химерен протеин BCR-ABL са подходящи за таргетна терапия с тирозин-киназния инхибитор (Gleevec® - imatinib mesylate) [Iqbal and Iqbal, 2014].

Прицелната терапия предлага още по-ндивидуален подход при избора на противотуморно лечение, тъй като таргетните лекарства са ефективни при пациенти, чиито тумори притежават специфична молекулна цел, но нямат очаквания ефект при липсата на такава цел [Padma, 2015].

В определени случаи пациентът е подходящ за прицелна терапия само ако отговаря на конкретни критерии, напр. не се повлиява от други терапии, ракът е метастазирал и има специфична молекулна мишена [Padma, 2015].

Поява на резистентност към таргетните лекарства

Един от недостатъците на таргетната терапия е възникването на резистност на раковите клетки. Резистентността може да се появи по два начина: самата цел се променя чрез мутация, така че прицелната терапия вече не взаимодейства добре с нея и/или туморните клетки намират нов път за осъществяване на растеж, заобикаляйки старата цел. Това налага прицелните терапии да се прилагат в комбинация, насочена към различни части от сигналните пътища на клетките, допринасяйки за забавяне на развитието на резистентност и прогресията на заболяването [Flaherty, 2012].

Друг подход е комбиниране на таргетна терапия с едно или повече традиционни химиотерапевтични лекарства. Например при лечение на жени с метастатичен рак на гърдата и свръхекспресиран протеин HER2/neu се прилага лечение с прицелното лекарство трастузумаб (Herceptin®) и с конвенционалния химиотерапевтик доцетаксел, [Maher, 2014].

Странични ефекти на таргетните терапии

В повечето случаи прицелната терапия се понася по-леко, отколкото конвенционалната химиотерапия, но тя също води до нежелани ракции, като: диария; чернодробни проблеми (хепатит и повишени чернодробни ензими); кожни проблеми (акнеиформен обрив, суха кожа, промени в ноктите, депигментация на косата); проблеми с кръвосъсирването и заразтването на рани; високо кръвно налягане; стомашно-чревна перфорация; сърдечна дисфункция; тромбоза; хипертония и протеинурия.

Страничните ефекти на някои прицелни терапии са показател за ефикасността на лечението. Например появата на обрив при пациенти, лекувани с тирозин-киназните инхибитори ерлотиниб (Tarceva®) или гефитиниб (Iressa®), реагират по-добре на терапията, отколкото пациентите, при които не се наблюдава обрив [Petrelli, 2012]. Друг пример, белег за по-добра лекарствена ефикасност е появата на хипертония при пациенти, приемали бевацизумаб (инхибитор на ангиогенезата) [Cai, 2013]. При децата могат да се наблюдават различни странични ефекти, включително имуносупресия и увреждане на фертилната функция [Gore, 2013].

5.2. Антисенс терапия

Един от подходите при лечението на рака е подтискане на патологично активирани онкогени. Това се постига чрез блокиране на транскрипцията и транслацията на онкогените и прекъсване на информационния поток. Такива антисенс средства се наричат „информационни лекарства“. Антисенс олигонуклеотидите (antisense oligonucleotide - ASO) са едноверижни химически модифицирани ДНК молекули с дължина 17-22 нуклеотида. Те са комплементарни на специфичен уникален район от mRNA като образуват къс двуверижен мотив mRNA/ ODN по модела на Watson-Crick и по този начин специфично инхибират генната експресия [Gleave and Monia, 2005]. В резултат количеството на таргетния протеин се редуцира чрез блокиране на

транслацията и повлияване на последващите каскади, свързани с клетъчната пролиферация, диференциация, хомеостаза и апоптоза.

Антисенс механизъм на действие

Съществуват множество механизми, които могат да бъдат използвани за инхибиране на функцията на иРНК, след като олигонуклеотидът се свърже с таргетната иРНК: блокиране на инициращия кодон; индуциране на рибонулеазата и разцепване на таргетната иРНК в мястото на дуплекса; нарушаване на полиаденилирането и транспорта на иРНК към цитоплазмата; прекъсване на свързването на иРНК с рибозомния комплекс; блокиране на местата, специфични за сплайсинга [Dean and Bennett, 2003].

Друг антисенс механизъм, който предизвиква засилен интерес е РНК интерференцията (RNAi) [Zamore, 2002]. Два са основните типа РНК молекули, които играят роля в този механизъм - микро РНК (miRNA) и малки интерферентни РНКи (siRNA). Тези микро РНК-и се свързват специфично с други РНКи и повлияват тяхната активност.

Въвеждането на дълга двойно-верижна РНК (dsRNA) в еукариотните клетки води до специфично разграждане на секвенции на хомоложни генни транскрипти (RNAi). По-големите РНК молекули се метаболизират на по-малки 20-21 нуклеотидни бази, образувайки двойно-верижни РНК фрагменти (siRNA) чрез ендогенна нуклеаза. Молекулите siRNA на свой ред се свързват с протеинов комплекс, наречен РНК-индуциран заглушителен комплекс (RNA-induced silencing complex - RISC), който разплита двете вериги на РНК молекули, позволявайки на антисенс веригата да се свърже с таргетната РНК молекула [Zamore, 2002, Zamore, 2000]. Синтетични dsRNA могат да бъдат внесени в клетката и да потиснат специфично желани гени чрез селективно разграждане на таргетната РНК [Elbashir, 2001, Caplen, 2001].

5.3. CRISPR/Cas9 геномно редактиране

Редактиране на генома от системата CRISPR

CRISPR е система от прокариотен адаптивен имунитет [Doudna and Charpentier, 2014, Hsu, 2014, Sternberg and Doudna, 2015]. CRISPR / Cas система се намира в ~ 50% от бактериите и се развива като защита срещу вируси [Bhaya, 2011]. От началото на 2013 г., много изследвания са показали, че в еукариотни клетки редактирането на

специфично място в ДНК може да бъде постигнато чрез ко-експресия на Cas9 ензима от Streptococcus pyogenes и къса водеща РНК (gRNA). Силата на CRISPR / Cas9 система се състои в нейната простота, лесна употреба, адаптивност и гъвкавост към различни мишени [Ran, 2013]. Cas9 е ендонуклеаза, която водена от gRNA, действа върху специфична ДНК последователност чрез ДНК: РНК сдвояване на комплементарни бази (принцип на комплементарност на Уотсън-Крик). Дизайнът на водещата gRNA последователност се прави в зависимост от специфичното място на действие на Cas9 ендонуклеаза. Промяната на секвенцията на gRNA е лесен начин за промяна на мястото на действие на системата върху ДНК [Jinek, 2012]. Водещата gRNA е проектирана да съдържа последователност от 20 базови двойки, която насочва комплекса Cas9 / gRNA към определената цел и непосредствено след прицелната последователност допълнително съдържа тринуклеотидна последователност, известна като Protospacer Adjacent Motif (PAM) последователност. Cas9 реже двете вериги на ДНК и причинява двуверижно разкъсване (double-strand break – DSB) в точка, която се намира на 3-4 нуклеотиди разстояние от PAM. DSBs се ремонтират по механизма не-хомоложно присъединяване на краища (NHEJ - non-homologous end-joining). Тъй като NHEJ корекцията е податлива на грешки и често води до генерирането на инсерции / делеции (InDels) в мястото на DSB, това може да доведе до мутации от типа на frameshifts или образуване на преждевременни стоп-кодони, които да нарушават отворена рамка на четене (ORF) на прицелния ген. По-точно редактиране на генома може да бъде постигнато по механизма на HDR (homology-directed DNA repair) с помощта на хомоложна донорна ДНК, която осигурява шаблон за въвеждане на нови последователности в прицелния ген.

Cas9 е ендонуклеаза без специфична последователност, а малката gRNA може просто да се получи чрез химически синтез, ин витро транскрипция или чрез експресия в клетката. Това направи възможно използването на системата за хиляди приложения през последните две години и половина [Doudna and Charpentier, 2014, Hsu, 2014, Sternberg and Doudna, 2015]. Друго предимство на CRISPR/Cas9 система е, че е лесно да се постигне мултиплексно насочване чрез използване на множество gRNAs. Например, две gRNAs специфични за места, които ограждат прицелния ген може да се използват за поправка на хромозомни делеции. Освен че е гъвкава и лесна за използване,

CRISPR/Cas9 е забележителна с това, че има висока степен на специфичност по отношение на определените мишени за разцепване, което е много важно, като се има предвид големия размер на човешкия геном.

Мишени за редактиране на генома при рак

Всички видове рак имат множество мутации и това създава възможност за нов мощен подход за борба с рака чрез коригиране или отстраняване на една или повече части от генома. Раковите клетки се характеризират с постепенно придобиване на множество мутации по време на тяхното развитие и тези мутации могат да бъдат класифицирани в няколко различни групи в зависимост от функцията на гена. Те включват активирани онкогени, инактивиран туморни супресори, мутации в епигенетични фактори и техния контрол локуси, мутации в гените, които придават химиорезистентност гени и други.

Онкогени

Клетъчните протогени, които са мутирали до онкогени, имат огромен потенциал като мишени за лечение на рак при хората. Онкогените са важна движеща сила за злокачествена клетъчна пролиферация. Инактивиране на онкоген от генетична система като CRISPR/Cas9 може да се постигне чрез разрушаване на тирозин-киназния домейн, който е необходим за активността на онкопротеина [Brown and Cooper, 1996]. CRISPR/Cas9 система има потенциала да бъде разработена като нова стратегия за специфичен и ефикасен подход срещу много видове онкогенни в раковите клетки.

Туморни супресори

Използването на CRISPR/Cas9 системата за корекция на мутирал тумор-супресор изисква прецизно връщане към див тип последователност. В случаите на вирусна инактивация на туморен супресор, CRISPR/Cas9 системата може да бъде полезна чрез инактивиране на критични вирусни протеини. Например, въвеждането на Cas9 и E6- и E7-специфични gRNAs в HeLa и SiHa цервикални карциномни клетъчни линии, които съдържат HPV18 или HPV16, съответно предизвиква инактивираща делеция в E6 или E7, водеща до реактивиране на p53 или pRb [Kennedy, 2014].

Освен при вирусна инактивация, туморните супресори могат да станат неактивни в резултат от мутации в клетъчни гени. Те имат огромен потенциал като мишени за лечение на рак при човека чрез тяхното коригиране с CRISPR/Cas9. CRISPR/Cas9 може

да бъде насочена срещу мутиралата форма на тумор супресорния ген, но това е предизвикателство, тъй като се изисква прецизна и ефективна генна корекция. Въпреки това, CRISPR/Cas9 има потенциал да се развива като специфично и ефикасен подход за коригиране на промени в тумор-супресорните гени на раковите клетки.

Епигенетични фактори и контролни локуси

Епигенетичните регулаторни ензими са подходящи мишени за лечение на рака, което беше доказано наскоро за хистон деацетилазната фамилия на протеини [Chessum, 2015]. Един механизъм, чрез който тумор супресорните гени могат да бъдат инактивирани, е ген-специфично хиперметилиране в райони, които често се намират в промоторите на гени, а като *p53*, *PTEN*, *BRCA1* и т.н. [Baylin and Herman, 2000]. Поддържането на ДНК метилиране изисква активни DNMTs ензими, които могат да бъдат подходяща мишена за лечение на рак. Промени в ацетилирането на хистони и диметилиране на пет остатъка в хистони H3 и H4 са установени при рак на простатата [Seligson, 2005]. Въз основа на тези доказателства, епигенетичните ензими са привлекателни мишени за лечение на рак. В тази връзка, хистон деацетилазни инхибитори и DNMT инхибитори са показали, че инхибират растежа на раковите клетки. Въпреки това, ограничената специфичност на такива инхибитори означава, че трябва да бъдат разработени по-добри стратегии за насочване [Zhu, 2015]. Така, че създаването на CRISPR / Cas9 със специфичен дизайн срещу епигенетични регулатори е привлекателна подходи за борба с рака.

Химиорезистентни гени

Способността на раковите клетки да развиват резистентност към химиотерапия е основна пречка при много ракови терапии. Основният механизъм, чрез който много карциноми развиват резистентност към химиотерапевтични лекарства е множествената лекарствена резистентност [Luqmani, 2005]. Най-малко два вида молекулни помпи върху плазмената мембрана са замесени в активното изхвърляне на химиотерапевтика от туморните клетки. Първата от тях, която е открити, представлява P-гликопротеин, чиято експресия корелира със степента на лекарствена резистентност в няколко клетъчни линии и медиира резистентност към лекарства като колхицин, винбластин, доксорубицин, етопозид, таксол и други [Juliano and Ling, 1976]. Генът за P-гликопротеин е MDR-1 и кодира енергийно зависима помпа, която изхвърля малки

молекули от клетките [Ueda, 1986]. Втора протеинова помпа, MRP заедно с P-гликопротеина представляват значителни цели за противоракови съединения и ще бъде много подходящи мишени за CRISPR/Cas9 терапия.

Ензимите, които или активират или деактивират химиотерапевтични лекарства също са важни в химиорезистентността на някои видове рак [Wilson, 2006]. Механизмите, които инактивират лекарства, могат да намалят тяхната концентрация в клетката и те са потенциални клетъчни терапевтични мишени. CRISPR/Cas9 има потенциал да инактивира ген, кодиращ ензим за химиорезистентност на даден рак, като може да се дава преди или в комбинация с химиотерапия.

Системата Crispr/Cas9 е била използвана за коригиране на мутация в гена RPGR, който причинява пигментен ретинит - наследствено дегенеративно заболяване, характеризиращо се със загуба на зрението на 1,5 милиона души по целия свят [Bassuk, 2016]. Изследователите са третирали мутирали стволови клетки от пациент и са постигнали корекция на дефекта и нормална генна структура.

Системата за Crispr/Cas9 се използва успешно за лечение на чернодробни болести при мишки с наследствена тирозинемия (Fah генна мутация, която е идентична при хора) чрез инжектиране на див тип копия на Fah, водени от РНК [Yin, 2014].

Тези уникални резултати показват широк спектър от приложения на тази иновативна технология в лечението на заболявания, произтичащи от генетични дефекти, които в противен случай са нелечими с конвенционална терапия.

6. Генетични биомаркери и таргетна терапия при рак на белия дроб

Ракът на белия дроб е най-често срещаното злокачествено заболяване при мъжете и седмото по честота при жените в България. Обхваща 18.9% от всички онкологични заболявания при мъжете и 4.8% от тези при жените. Ракът на белия дроб се разделя на два вида: дребноклетъчен карцином (Small cell lung cancer - SCLC) и недребноклетъчен карцином (Non-small-cell lung cancer - NSCLC). Недребноклетъчният карцином е около 85% от рака на белия дроб, докато дребноклетъчния представлява останалите 15%.

Белодробният карцином е една от водещите причини за смърт в развитите страни. В България годишно се регистрират около 3500 нови случая. Заболеваемостта от рак на белия дроб се увеличава с напредването на възрастта и достига своя пик при 70-74

годишна възраст. Повечето пациенти, които развиват рак на белия дроб, са дългогодишни пушачи, но също така засяга и непушачи.

Дребноклетъчният карцином се развива бързо и в повечето случаи в момента на диагностицирането са налични метастази. Метастазите се откриват в черния дроб, мозъка, костите и надбъбречните жлези. Повечето пациенти с дребноклетъчен карцином преживяват около една година след поставянето на диагнозата; по-малко от 7% от болните с дребноклетъчен карцином са с 5-годишна преживяемост.

Недребноклетъчният карцином се разделя на три основни типа: аденокарцином, сквамозноклетъчен, едроклетъчен карцином. Аденокарциномът се развива от клетките на белодробните алвеоли. Сквамозноклетъченият карцином възниква от сквамозните клетки, които покриват дихателните пътища от трахеята до бронхите. Едроклетъчен карцином се развива от епителните клетки на белите дробове. Едроклетъчният карцином обхваща недребноклетъчни белодробни ракови заболявания, които не са хистологично класифицирани като адено- или сквамозноклетъчни карциноми. Честотата на 5-годишната преживяемост при пациенти с недребноклетъчен рак на белия дроб обикновено е между 11-17%.

Чести соматични мутации при рак на белите дробове се откриват в *TP53*, *EGFR* и *KRAS* гените. *TP53* генът кодира p53 протеина, който се намира в ядрото на клетките, където се свързва директно с ДНК. P53 протеинът регулира клетъчния растеж и деленето на клетката чрез проверка за увредена ДНК. Когато част от ДНК секвенцията е повредена, p53 участва в ДНК репарацията или насочва клетката към апоптоза в случай на некоригируеми повреди. Гените *EGFR* и *KRAS* кодират протеини, интегрирани в клетъчната мембрана. При активирането им чрез свързване с лиганди, в клетката се задействат сигнални пътища и се активира клетъчната пролиферация.

Мутациите в *TP53* гена водят до транслацията на променен p53 протеин, който не може да се свърже с ДНК молекулата. Промененият протеин не може ефективно да регулира клетъчната пролиферация и позволява увредената ДНК да се натрупва в клетките. Такива клетки могат да продължат да се делят неконтролируемо, което може да доведе до туморен растеж. Мутациите в *EGFR* и *KRAS* гените водят до транслацията на патологично активирани протеини, в резултат на което клетките получават непрекъснати сигнали за пролиферация. Много характерна особеност на

злокачествените тумори е тяхната генетична хетерогенност. Молекулярната хетерогенност е резултат от непрекъснат мутационен процес, водещ до клонална еволюция на неоплазмите, както в първичното огнище така и в метастазите. Открити са мутации в много други гени при случаи на рак на белия дроб, като повечето участват в регулацията на генната експресия, клетъчната пролиферация, клетъчна диференциация и апоптоза [Genetic Home Reference, 2017].

Рецептор на епидермалния растежен фактор

Предиктивни биомаркери. Биомаркери и недребноклетъчен белодробен карцином (НДКБК).

Рецепторът EGFR принадлежи към ErbB/HER семейството на растежни фактори с основна роля за клетъчна пролиферация, адхезия, миграция и инвазия. Вследствие на патологични мутации, EGFR-протенът преминава в постоянно активно състояние, което води до неконтролируемо клетъчно делене. Мутациите в *EGFR* гена са налични при 10-15% от пациентите с НДКБК от европейски произход и в около 30-35% от азиатски произход, при непушачи и предимно жени. Тези мутации се срещат в *EGFR* екзоните 18-21 и променят АТФ-свързващия район на киназния домен [Soh, 2009]. Приблизително 90% от тях са делеции в екзон 19 или точкова мутация L858R в екзон 21 [Ladanyi and Pao, 2008]. Те повишават киназната активност на EGFR, което води до хиперактивиране на сигналните пътища [Sordella, 2004]. В екзон 19 мутациите в по-голямата си част са малки in-frame делеции около аминокиселинните остатъци E746 до A750, а в екзон 21-мутациите най-често включват L858R точкова мутация. И двете мутации засягат АТФ-свързващото място на рецепторната тирозин-киназа (РТК), а резултатът е непрекъснато активиране на РТК и активиране не пролиферативните пътища [Gerber, 2014]. Пациенти с делециите в екзон 19 и L858R мутация в екзон 21 са чувствителни към терапия със следните EGFR тирозин киназни инхибитори:

- Първо поколение EGFR TKIs: Гефитиниб (Iressa) и ерлотиниб (Tarceva)
- Второ поколение EGFR TKIs: афатиниб (Gilotrif), дакомитиниб, neratinib.
- Трето поколение EGFR TKIs: бригатиниб, осимертиниб (osimertinib), rociletinib.

При метастатичните белодробни карциноми, *EGFR* мутациите са важни предиктори на ефикасността на EGFR тирозин киназните инхибитори (ерлотиниб, гефитиниб и

афатиниб). Пациенти с НДКБК и мутация в *EGFR*, лекувани с EGFR TKI имат по-дълга преживяемост без прогресия в сравнение с пациенти с див тип *EGFR* с конвенционална химиотерапия. Пациентите с метастази и мутации в *EGFR*, лекувани с първо и второ поколение EGFR TKI, имат средна преживяемост приблизително две години [Rosell, 2012, Sequist, 2013, Marks, 2008]. Пациентите, лекувани с EGFR TKI като първа линия, живеят по-дълго от пациентите, които са лекувани с EGFR TKI като втора линия [Maemondo, 2010]. При пациенти с НДКБК, прогресирали след терапия с EGFR TKIs от първо поколение, е установена добра ефикасност на EGFR TKI от трето поколение (rociletinib и osimertinib) [Soria, 2013].

Мутацията T790M води до замяна на треонин (T) с метионин (M) аминокиселина на позиция 790 в *EGFR*. Мутацията се намира в екзон 20, който кодира част от киназния домен. T790M мутацията може да се развие като вторична мутация при повече от 50% пациенти с *EGFR* мутации при НДКБК с придобита резистентност към ерлотиниб или гефитиниб [Pao, 2005]. тирозин-киназните инхибитори от трето поколение (rociletinib и osimertinib) са единствените, които необратимо инхибират EGFR при мутация T790M [Jänne, 2015]. T790M мутацията се открива като първична мутация при по-малко от 5% пацинетите с НДКБК. Тя обикновено се появява едновременно с друга мутация в *EGFR* и в комбинация двете водят до намалена чувствителност към EGFR TKIs от първо поколение[Wu, 2011].

Анапластична лимфомна киназа (ALK)

Около 3-7% от всички белодробни тумори имат *ALK*-транслокации, които обикновено се срещат при по-млади пациенти [Soda, 2007, Koivunen, 2008]. Най-честото *ALK*-преустройство при пациенти с НДКБК е формирането на *EML4-ALK* фузионен ген в резултат на сливане между 5`-края на *EML4* гена и 3`-края на *ALK* гена. Възможни са различни варианти като всички кодират един и същи протеин на ALK, но с различни краища на *EML4* (от екзони 2, 6, 13, 14, 15, 18 и 20). *EML4*-мутациите са характерни за пациенти с аденокарцином, непушачи и без установени мутации в *EGFR* и *KRAS*. *ALK* мутациите не се комбинират с други онкогенни мутации, свързани с НДКБК, като мутации в *EGFR* или *RAS* [Inamura, 2009, Kwak, 2010]. Намерени са и други *ALK* мутации, които не включват *EML4*, и това са *KIF5B-ALK* и *TFGALK*. В терапевтично отношение пациенти с *EML4-ALK* сливания или *ALK* пренареждания нямат полза от

EGFR специфична тирозин-киназна терапия. Одобрен *ALK/MET* тирозин-киназен инхибитор е crizotinib, който се насочва специфично към активираните рецептори на тирозин-киназата, резултат от *EML4-ALK*- и други *ALK*-сливания.

KRAS

При НДКБК могат да бъдат установени мутации в *KRAS* онкогена. Тези мутации обикновено са missence-мутации – субституции на аминокиселини на позиции 12, 13 или 61 (най-чести мутации са G12 и G13). *KRAS* мутации са идентифицирани в аденокарциноми при пушачи от кавказката раса и [Riely, 2008]. Приблизително 10-25% от пациентите с аденокарцином имат мутации в *KRAS* гена. Мутации в *KRAS* гена се откриват при тумори с див тип за *EGFR* и *ALK*, което показва, че тези мутации са нов молекулярен субтип при НДКБК. *KRAS* мутациите могат да бъдат добри прогностични биомаркери, но имат ограничена информативност като предиктори за EGFR TKI или химиотерапия [Rekhtman, 2013].

BRAF

BRAF генът е протоонкоген, който кодира B-Raf протеина. Мутации в *BRAF* гена се откриват в около 1–4% от всички НДКБК, най-често при пациенти с аденокарцином [Cardarella, 2013]. Тези мутации се срещат при пушачи или при бивши пушачи. В едно проучване от 697 пациента с белодробен аденокарцином *BRAF* мутации са детектирани в 18 (3%), като са идентифицирани V600E (50%), G469A (39%) и D594G (11%). Повечето *BRAF* мутации не се комбинират с други мутации в НДКБК (като *EGFR* мутации, *ALK* пренареждания и др.) [Paik, 2011].

Наличието на *BRAF* V600E мутация е предиктивен маркер за ефективно лечение с dabrafenib (BRAF-инхибитор) и trametinib (MEK-инхибитор) при предварително третиран НДКБК [Planchard, 2017]. Мутацията V600E води до замяна на аминокиселините валин (V) с глутаминова киселина (E) на позиция 600 в BRAF. Тази мутация засяга в активиращия сегмент на киназния домен. BRAF протеини, които са с V600E мутация, имат повишена киназна активност [Davies, 2002]. Пациенти с НДКБК и *BRAF* V600E мутация (c.1799T> A) имат добър отговор при терапия с вемурафениб или дабрафениб [Gautschi, 2012, Rudin, 2013]. Досега вемурафениб е одобрен от FDA за употреба само в меланома с *BRAF* V600E мутация. В предклинични проучвания

клетъчни линии от рак на белия дроб с *BRAF* V600E мутация не са показали чувствителност към дасатиниб [Sen, 2012].

G469A мутацията води до заместване на аминокиселината глицин (G) с аланин (A) в позиция 469 на *BRAF*. Тази мутация се осъществява в рамките на високо консервативния GXGXXG мотив на киназния домен. Повечето BRAF протеини, които са с мутации, имат повишена киназна активност [Davies, 2002]. Други мутации като *BRAF* G466V и *BRAF* Y472C имат значително намалена киназна активност [Sen, 2012]. Мутациите, водещи до BRAF протеини с повишена киназна активност, са свързани с намалена чувствителност към гефитиниб [Gandhi, 2009, Pratilas, 2008]. Трябва също така да се отбележи, че мутациите в *BRAF* гена обикновено се откриват в тумори от див тип за *EGFR, ALK* и други водещи (driver) мутации. В предклинични проучвания, на клетъчни линии от рак на белия дроб с *BRAF* G469A мутацията, са чувствителни към дасатиниб [Sen, 2012].

ROS1

ROS1 гена нормално се експресира в белия дроб и други органи, но физиологичната му функция все още е неясна. При НДКБК като потенциални активиращи мутации бяха идентифицирани *ROS1*-сливания [Bergethon, 2012] [Takeuchi, 2012]. При белодробен карцином мутациите в *ROS1* са редки - около 2.5% [Yoshida, 2013]. Туморите с мутации в *ROS1* гена са сходни с туморите с *ALK* мутации и се откриват при по-млади пациенти, непушачи или леки пушачи и жени с аденокарцином [Bergethon, 2012]. Данни от in vitro проучване показват, че тумори с *ROS1* мутации се повлияват от ALK-инхибитори. Одобрено лекарство за НДКБК с мутации в *ROS1* гена е crizotinib [Davies, 2012]. При G2032R мутация е установен механизъм на придобита резистентност към crizotinib [Awad, 2013].

7. Генетични биомаркери и таргетна терапия при рак на щитовидната жлеза

Карциномът на щитовидната жлеза е най-честия злокачествен ендокринен тумор – 92%.

При жените се наблюдава по-висока честота (2-3 на 100,000) в сравнение с мъжете (от 1-2 на 100,000). Смъртността от тиреоиден карцином (ТК) е равна на тази от всички ендокринни карциноми, взети заедно. Етиологията на ТК е неясна. Тиреоидният

карцином може да се причини от промяна в *RET* гена. Генът с мутация може да бъде предаден в поколенията. Пациенти с фамилна история на доброкачествено образувание на щитовидната жлеза са застрашени от развитие на тиреоиден карцином [Nikolova, 2008].

Честотата на папиларния карцином на щитовидната жлеза (ПТК) се увеличава, което го прави преобладаващия ендокринен карцином [Zhu]. Пълната тиреоидектомия е първия избор на лечение за пациенти с папиларен и фоликулярен карцином на щитовидната жлеза [Ziegler]. Повече от 90% от пациентите с тиреоиден карцином имат нормална продължителност на живота [Yoshida]. Честотата на смъртните случаи от тиреоиден карцином годишно е намалял от 15% на 5% през последните няколко десетилетия, за разлика от нарастващата честота на заболяването [Wu]. По време на прогресията на щитовидния, карцином клетки на тумора могат да загубят способността за поемане на йод, което води до резистентност към RAI-131I терапия, със значително влошаване на прогнозата [Nikiforova, 2003]. В папиларния тиреоиден карцином, мутациите в *RET*, *RAS* и *BRAF* гените и мутации в β-катенин са свързани със загубата на способноста за поемане на йод от раковите клетки [Pardoll]. Радиотерапията и химиотерапията (доксорубицин) са с ограничена ефикасност при лечението на тиреоиден карцином [Thatcher], което налага търсенето на нови терапии.

RET

В патогенезата на тиреоидния карцином са включени различни молекулярни пътища. Мутации в *RET* гена водат до активиране на RET протеина [Zhenguang Wang]. Мутации в *RET/PTC* гена се откриват при около 40% от пациентите с ПТК, като най-честите мутации са *RET/PTC1* и *RET/PTC3* [Ziegler]. В *RET* гена могат да възникнат както герминативни, така и соматични мутации. Почти всички пациенти с множествена ендокринна неоплазия 2 (MEN 2) имат герминативни мутации в *RET* гена. MEN 2 е разделен на три различни синдрома: MEN 2A, MEN 2B и фамилния медуларен тиреоиден карцином. Спорадичните медуларни тиреоидни ракови заболявания са свързани със соматични мутации. При 90% от медуларния тиреоиден карцином при MEN2A се открива *RET* C634 мутация. което води до активиране на RET протеина. C634 мутацията води до замяна на аминокиселината цистеин в 634-та позиция с триптофан (W), аргинин (R) или тирозин (Y), [Takahashi, 1999]. Приблизително 50% от

спорадичните медуларни тиреоидни карциноми са позитивни за *RET* M918T мутация. M918T мутациите водят до замяна на метионин с треонин в 918-та позиция. Тази мутация променя субстратната специфичност на RET киназата, което води до фосфорилиране на алтернативни вътреклетъчни протеини [Santoro, 1998].

Понастоящем не е налице инхибитор, специфичен само за *RET*, но са проведени опити за лечение с киназни инхибитори с анти-RET активност в тиреоиден карцином. Сорафениб е киназен инхибитор с активност срещу *VEGFR1* и *VEGFR2*, *KIT*, *RET* и *BRAF* от див тип. Този медикамент показва частични нива на отговор при 23-56% от пациентите с диференциран ТК и 6% при лечение на медуларен ТК. Преживяемостта без прогресия варира от 14 до 18,4 месеца при пациенти с диференциран ТК и 17,9 месеца при пациенти с медуларен ТК [Gupta-Abramson, 2008, Kloos, 2009, Lam, 2010]. Сунитиниб е киназен инхибитор с активност срещу *VEGFR2*, *KIT*, *RET* и *PDGFRα*. Този медикамент показва добър отговор при 33% от пациентите и период без прогресия от 12,8 месеца при диференциран ТК и медуларен ТК [Carr, 2010]. Киназният инхибитор вандетаниб е активен при мутации в *VEGFR2*, *VEGFR3*, *EGFR* и *RET* [Wells, 2010]. Вандетаниб е одобрен от FDA за лечение на възрастни пациенти с метастатичен медуларен рак на щитовидната жлеза, които не отговарят на условията за операция и имат прогресивно или симптоматично заболяване.

BRAF

Мутацията V600E в *BRAF* гена се открива при около 45% пациентите с ПТК и е свързана с туморна агресия, риск от рецидив и загуба на способността на туморните клетки за поемане на йод. Други активиращи *BRAF* мутации са открити в позиции 599 и 601, но имат по-малко значение в сравнение с мутацията V600E [Ye]. Доказано е, че V600E мутацията в ПТК е свързана с по-агресивно протичане на заболяването, намалена експресия на йод-метаболизиращи гени (iodide-metabolizing) и NIS гените. При наличие на V600E се индуцира секрецията на TGF-бета, който подтиска експресията на NIS гените и увеличава злокачествения потенциал на ТК [Wei].

Сорафениб (BAY43-9006) е киназен инхибитор с активност срещу *VEGFR1/2*, *KIT*, *RET*, и при див тип *BRAF*. При клинични проучвания лекарството е установена частична степен на отговор при 15-25% от пациентите с медуларен ТК [Gupta-Abramson, 2008].

Вемурафениб, който има ефект при V600E позитивни тумори е прилаган при лечение на меланом, но все още няма одобрение за лечение на пациенти с ТК [Flaherty, 2010].

RAS

KRAS, NRAS и *HRAS* принадлежат към семейството на *RAS* гена, кодиращи вътреклетъчни G-протеини, които участват в активирането на вътреклетъчни сигнални пътища. *RAS* мутациите присъстват в около 10% от пациенти с ПТК и в около 40-50% от пациенти с фоликурен ТК. *RAS* мутациите са тясно свързани с по-агресивно поведение на ТК [Chun-Meng Wang]. Докато повечето не-тиреоидни ракови заболявания имат мутации в *KRAS* кодони 12 и 13, при повечето тумори на щитовидната жлеза се откриват мутации в *NRAS* кодон 61 и *HRAS* кодон 61 [Nikiforov, 2011]. *RAS* мутациите са втората най-често срещана мутация, открита в щитовидни възли и има 80% положителна прогнозна стойност за злокачествени заболявания [Bhaijee and Nikiforov, 2011]. *RAS* точковите мутации се изключват взаимно с други тиреоидни мутации като *BRAF, RET/PTC* или *TRK* пренареждания при папиларен тиреоиден карцином [Kimura, 2003]. При фоликуларните карциноми *RAS* мутациите се изключват взаимно с *PAX8-PPARG* пренареждания [Nikiforova, 2003]. При клинично проучване е установено, че *MEK* инхибиторът selumetinib увеличава отговора към радиоактивен йод при пациенти с метастатичен рефрактерен на радиоактивен йод ТК, особено при тумори с *RAS* мутации. В това проучване при 5 от 5 пациента с *NRAS*-мутирали тумори е постигнато по-голямо поемане на радиоактивен йод в метастази след selumetinib. Частичен отговор е наблюдаван при 4 от пациентите [Ho, 2013].

EGFR

Растежът и разпространението на ТК зависи от EGFR протеина, който е високо експресиран при агресивната форма на тумора. Мутациите в *EGFR* гена допринасят за активирането на RET в карцинома, докато *RET/PTC1* и *RET/PTC3* регулират експресията на *EGFR* [Ziegler]. Експресията на EGFR протеина се повишава значително в дедиференцираните тиреоидни карциноми, а в нормалните клетки на щитовидната жлеза липсва или е ниско експресиран. Това предполага, че изследването на експресията му, може да бъде молекулярен маркер за дедиференцираните тиреоидни карциноми [Nair]. Висока експресия се открива също в метастази в лимфни възли при папиларен ТК [Santoro]. Изследвания показват, че пациенти с метастази от рак на

щитовидната жлеза, позитивни за *EGFR* мутация, имат добри резултати при лечение с EGFR тирозин-киназни инхибитори, напр. ерлотиниб [Zhu].

Обобщение

Прицелните терапии на раковите заболявания започват да изместват конвенциалното лечение като все по-често се преминава към индивидуализиран подход, при който всеки пациент се лекува съобразно специфичния си генетичен профил. Изборът химиотерапия след предварително геномно тестване на пациентите и индивидуализиране на лечението подобрява прогнозата за онкоболните и намалява токсичните реакции. Въпреки че първоначално тези проучвания може да повишат времето и цената на терапията, в дългосрочен план те водят до намаляване на разходите за лечение, подобряване на ефективността му, подобряване на прогнозата и удължаване на живота на пациентите. Напр. приложението на Imatinib доведе до драматично подбряване на прогнозата при хроничната миелоидна левкемия. Същевременно, прицелните лекарства rituximab, sunitinib и trastuzumab направиха революция в лечението на не-ходжкиновите лимфоми, бъбречния карцином и рака на млечната жлеза, респективно.

Приложението на NGS за целите на фармакогеномиката в последните години преобрази областта на персонализираната медицина. Бързото развитие на NGS технологията, позволи анализ на целия геном, екзом или панел от голям брой гени. Това доведе до натрупване на огромно количество информация за десетки хиляди фармакогенетични варианта, имащи отношение към лекарствения метаболизъм. Анализът на тези варианти дава възможност за определяне на предразположеност на носителите им към нежелани реакции, ефикасност на терапията, както и за определяне на нови лекарствени мишени и разработване на лечебни стратегии.

III. Цел и задачи

Цел

Целта на дисертационния труд е да се характеризират генетични варианти при два типа карциноми – недребноклетъчен белодробен карцином (НДКБК) и фамилен папиларен тиреоиден карцином (ФПТК) с TruSight Cancer panel и да се определят фармакогенетични дефекти, свързани с ефективността на химиотерапията и прицелната терапия с тирозин киназни инхибитори.

Задачи

1. Да се секвенират с TruSight Cancer Sequence panel туморни ДНК проби от пациенти с НДКБК;
2. Да се характеризира типа, честотата и клиничното значение на генетичните варианти при НДКБК и да се определят фармакогенетични варианти, свързани с ефективността на химиотерапията чрез използване на базата данните «PharmGKB»;
3. Да се секвенират с TruSight Cancer Sequence panel ДНК проби, изолирани от периферна кръв на пациенти с ФПТК;
4. Да се характеризира типа, честотата и клиничното значение на генетичните варианти при ФПТК и да се определят фармакогенетични варианти, свързани с ефективността на химиотерапията чрез използване на базата данните «PharmGKB»;
5. Да се характеризират с PCR в реално време типовете мутации в *EGFR* гена в туморни ДНК проби от пациенти с НДКБК за избор на подходяща таргетна терапия.

IV. Материали и методи

1. Материали

Пациенти

В изследването са участвали общо 581 пациенти. От тях 569 пациенти са диагностицирани с НДКБК в продължение на пет години и 12 пациенти от четири семейства с фамилна форма на папиларен карцином на щитовидната жлеза. Всички пациенти предоставиха подписано писмено информирано съгласие за извършване на генетичен анализ на техните проби.

Биологични проби

За извличане на геномна ДНК от пациентите с НДКБК са взети туморни проби, включени в парафинови блокчета, фиксирани с формалин (FFPE). Туморната проба е изследвана от патолог за откриване на райони, богати на туморни клетки повече от 30%. ДНК екстракцията е извършена чрез QIAamp DNA FFPE Tissue Kit за пречистване на геномно ДНК. Концентрациите на ДНК пробите е измерена с NanoDrop Lite спектрофотометър система.

При 12 пациента с папиларен карцином на щитовидната жлеза геномната ДНК е изолирана от кръвни проби с QIAGEN QIAamp DNA Blood Mini Kit. ДНК концентрациите е измерена на Qubit 2.0 Fluorometric Система с kit Qubit dsDNA BR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, САЩ). За по-нататъшен анализ са използвани проби със съотношение 260/280 от ~ 1.8, което показва достатъчна чистота на изолираната ДНК.

2. Методи

В настоящата работа са използвани следните молекулно генетични методи – екстракция на геномна ДНК, ДНК секвениране от ново поколение (NGS) и полимеразна верижна реакция в реално време (Real-time PCR).

2.1. Изолиране на ДНК

Изолиране на ДНК от кръв

За изолиране на ДНК от кръв, беше използван кита на QIAGEN QIAamp DNA Blood Mini Kit, а за изолиране на ДНК от туморна тъкан в FFPE беше използван QIAGEN QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.

За процеса на изолиране на ДНК от кръв се взима 200 µl от цялата кръв и се смесва с 20 µl протиназа К и 200 µl лизис буфер AL в 1.5 ml епруветка тип епендорф. Реакцията се вортексира за 10 секунди и се инкубира за 10 минути на 56°C. След кратко центрофугиране за да се съберат капките от стените на епруветката се добавят 200 µl етанол (96-100%), следва вортексиране за 10 секунди и прехвърляне на сместа в QIAamp Mini spin колона, поставена в събирателна епруветка. Колоната се центрофугира за 1 мин на 6000 x g на стайна температура (15-25°C) и се прехвърля в нова събирателна епруветка, а старата събирателна епруветка с течността се изхвърля. Към колоната се добавят 500 µl буфер AW1, центрофугира се за 1 мин на 6000 x g, след което отново се слага в нова събирателна епруветка, а старата събирателна епруветка с течността се изхвърля. Добавят се 500 µl буфер AW2, след което пробата се центрофугира за 3 мин на пълна скорост (20 000 x g). Елуатът се изхвърля. Следва ново центрофугиране за още 1 мин на максимална скорост за пълно изсушаване на колоната, след което колоната се слага в нова епендорф епруветка и се инкубира за 5 мин на стайна температура с елуиращ буфер AE. Следва центрофугиране за 1 мин на 6000 x g, при което се отделя пречистената ДНК. Концентрациите на ДНК бяха измервани с помощта на Qubit 2.0 флуорометрична система за количествено определяне, използвайки Qubit dsDNA BR Assay Kit.

Изолиране на ДНК от туморна тъкан в FFPE

За процеса на изолиране на ДНК от туморна тъкан в FFPE, тъканата проба се нарязва много тънко на специален апарат (микротом) с дебелина на срезовете до 2-3 микрометра, взима се 8 - 10 среза от пробата и се поставят в микроцентрофужна епруветка тип епендорф от 1.5 ml. Добавя се 1 ml ксилен към пробата, със затворени капачки на епруветките се вортексират за 10 секунди. Пробите се центрофугират за 2 мин на пълна скорост (20 000 x g) на стайна температура (15-25°C). Супернатантата се

отстранява чрез пипетиране, без да се отстранява утайката. Добавя се 1 ml етанол (96-100%) към утайката и се вортексиране за 10 секунди. Следва центрофугират за 2 мин на пълна скорост (20 000 x g) на стайна температура. Отново супернатантата се отстранява чрез пипетиране, без да се отстранява утайката. Пробите се инкубират на стайна температура или до 37°C с отворени епруветки за 10 мин или докато цялото количество остатъчен етанол се изпари. Утайката се ресуспендира в 180 µl буфер ATL, добавя се 20 µl протеиназа К и се вортексират за 10 секунди. Реакцията се инкубира за 1 час на 56°C (или докато пробата е напълно лизирана). Следва още една инкубация за 1 час на 90°C. След кратко центрофугиране за да се съберат капките от стените на епруветката се добавят 200 µl лизиращ буфер (AL), следва вортексиране за 10 секунди и се добавят 200 µl етанол (96-100%), следва вортексиране за 10 секунди. Сместа се прехвърля в QIAamp MinElute колона, поставена в събирателна епруветка. Колоната се центрофугира за 1 мин на 6000 x g и се прехвърля в нова събирателна епруветка, а старата събирателна епруветка с течността се изхвърля. Към колоната се добавят 500 µl буфер AW1, центрофугира се за 1 мин на 6000 x g, след което отново се слага в нова събирателна епруветка, а старата събирателна епруветка с течността се изхвърля. Добавят се 500 µl буфер AW2, след което пробата се центрофугира за 1 мин на 6000 x g. Елуатът се изхвърля. Следва центрофугиране за още 3 мин на максимална скорост (20 000 x g) за пълно изсушаване на колоната, след което колоната се слага в нова епендорф епруветка и се инкубира за 5 мин на стайна температура с елуиращ буфер ATE. Следва центрофугиране за 1 мин на максимална скорост (20 000 x g), при което се отделя пречистената ДНК. Концентрацията на ДНК, както и качеството бяха измервани с NanoDrop 2000c (ThermoScientific) след изолирането.

2.2. ДНК секвениране от ново поколение

Общо 30 проби (от 12 пациента с папиларен карцином на щитовидната жлеза и 18 пациенти с НДКРБД) бяха секвениране с TruSight Cancer панел на MiSeq секвенатор на Illumina. За ДНК секвениране е използван протокол на фирмата. Използван е секвенционен панел - TruSight Cancer на Illumina.

TruSight Cancer (Illumina) панелът включва 94 гена за диагностика на мутации, свързани с предразположеност към различни видове ракови заболявания. Списък на гените в панела е показан в Таблица 1. В панела също така са включени и 284 SNPs, за

които големи проучвания са показали, че са асоциирани с рак. Броят на таргетните екзони е >1700 и общият таргетен район на панела е 255 Kb.

Таблица 1: Списък на гените включени в TruSight Cancer панел				
AIP	*DDB2*	*FANCL*	*PALB2*	*SLX4*
ALK	*DICER1*	*FANCM*	*PHOX2B*	*SMAD4*
APC	*DIS3L2*	*FH*	*PMS1*	*SMARCB1*
ATM	*EGFR*	*FLCN*	*PMS2*	*STK11*
BAP1	*EPCAM*	*GATA2*	*PRF1*	*SUFU*
BLM	*ERCC2*	*GPC3*	*PRKAR1A*	*TMEM127*
BMPR1A	*ERCC3*	*HNF1A*	*PTCH1*	*TP53*
BRCA1	*ERCC4*	*HRAS*	*PTEN*	*TSC1*
BRCA2	*ERCC5*	*KIT*	*RAD51C*	*TSC2*
BRIP1	*EXT1*	*MAX*	*RAD51D*	*VHL*
BUB1B	*EXT2*	*MEN1*	*RB1*	*WRN*
CDC73	*EZH2*	*MET*	*RECQL4*	*WT1*
CDH1	*FANCA*	*MLH1*	*RET*	*XPA*
CDK4	*FANCB*	*MSH2*	*RHBDF2*	*XPC*
CDKN1C	*FANCC*	*MSH6*	*RUNX1*	
CDKN2A	*FANCD2*	*MUTYH*	*SBDS*	
CEBPA	*FANCE*	*NBN*	*SDHAF2*	
CEP57	*FANCF*	*NF1*	*SDHB*	
CHEK2	*FANCG*	*NF2*	*SDHC*	
CYLD	*FANCI*	*NSD1*	*SDHD*	

Приготвяне на библиотеки за секвениране

За приготвянето на библиотеки от таргетни райони за всеки пациент е следван протокола TruSight Enrichment DNA Sample Preparation Guide (Revision B).

Геномната ДНК проба се разрежда до 2.5 ng/µl. След това точната концентрация на двойноверижната ДНК в пробата се определя на Qubit 2.0 Fluorometric Quantitation System, използвайки Qubit dsDNA BR Assay Kit.

Хибридизация на праймерни секвенции към ДНК

По време на тази стъпка геномната ДНК минава през процес наречен тагментация (тагване или маркиране и фрагментация) от Nextera транспозоми. Транспозомите на Nextera едновременно фрагментират геномната ДНК и добавя адаптерни секвенции към краищата, позволявайки амплификация чрез PCR в следващите етапи.

За реакцията се ползват 96-ямкови TCY плаки "NET1" (Nextera Enrichment Tagmentation Plate 1). От всяка проба се взимат 20 µl с концентрация 2.5 ng/µl (50 ng) начално количество ДНК и се накапват в отделна ямка. Към тях се добавят 25 µl Tagment DNA Buffer (TD) и 5 µl Tagment DNA Enzyme (TDE1), който съдържа Nextera транспозомите. С помощта на многоканална пипета леко се пипетира няколко пъти, за да се смесят реагентите. Плаката се запечатва със залепящо фолио Microseal 'B' (тази стъпка се повтаря винаги преди плаката да се вортексира, центрофугира или инкубира, след което фолиото се маха и изхвърля). Следва центрофугиране за 1 мин на 280 x g на 20ºC. Плаката NET1 се поставя в PCR апарат като се уверим, че капакът на апарата е нагрят по време на инкубацията и се пуска следната програма:

- 55°C в продължение на 5 минути
- Съхранение на режим от 10 ° C

Продължаваме с пречистването на тагментираната ДНК.

Пречистване

Тагментираната ДНК се пречиства от Nextera транспозомите, защото Nextera транспозомите може да се свържат плътно с ДНК краищата и да компроментират по-нататъшната реакцията ако не бъдат премахнати. Към пробата се добавят 15 µl Stop Tagment Buffer (ST) към всяка ямка. Сместа се пипетира няколко пъти и се инкубира на стайна температура (20ºC – 25ºC) за 5 мин за стопиране на реакцията. След това плаката NET1 се центрофугира на 280 x g на стайна температура за 1 мин.

Използвайки многоканална пипета, се прехвърля целия разтвор от всяко ямка на плаката NET1 към чиста 96 ямкова плака, означена "NET2" (Nextera Enrichment Tagmentation Plate 2). Към всяка ямка от NET2 плаката се добавят 52 µl добре разтворени AMPure XP beads, които преференциално се свързват само с ДНК

фрагментите. Плаката се инкубира за 10 мин на стайна температура, покрива се с фолио и се центрофугира на 280 xg на 20°C в продължение на 1 минута. След което се маха фолиото и се поставя за 2 мин на магнитна стойка, която утаява пречиствателните магнитни частици (beads), свързани с ДНК. Супернатантата се премахва от всяка ямка, без да се нарушава интактността на утаените магнитни частици. Докато плаката е на магнита, се добавят бавно 200 µl пресно приготвен 80% етанол и се изчаква 30 секунди, след което етанолът се премахва от ямките с пипета. Повтаря се накапването с нови 200 µl етанол, последвани от 30 секунди инкубация, след което от ямките се премахва целият остатъчен етанол. Плаката се оставя незапечатана на магнита за 10 мин на стайна температура, за да изсъхне напълно от етанола. След това се маха от магнита и внимателно се добавят 22.5 µl RSB буфер (Resuspension Buffer), разбъркваме суспензията с пепитиране няколко пъти внимателно. Плаката се поставя за 2 мин на магнитната стойка, докато разтворът се избистри. Супернатантата съдържа отделената от магнитните частици ДНК. 20 µl от супернатантата на всяка ямка се прехвърлят в NEA1 плака (Nextera Enrichment Amplification Plate 1), без да се влиза в контакт с утаените магнитни частици.

PCR амплификация

В този етап, пречистената тагментирана ДНК се амплифицира чрез PCR програма с лимитиран брой цикли. Стъпката PCR амплификация добавя към краищата на тагментираната ДНК уникална за всяка проба комбинация от индекс 1 (i7) и индекс 2 (i5) с цел мултиплексиране на секвенционната реакция, както и адапторни секвенции (P5 и P7), служещи по-късно за свързването на фрагментите с flow клетка и генерирането на клъстери. Изключително важно е да се използва пълното препоръчано количество ДНК, както и да не се добавят допълнителни цикли на PCR циклите за осигуряване на висококачествени библиотеки, които произвеждат висококачествени резултати за секвениране (Фиг. 1A).

Комплектът TruSight Enrichment DNA Sample Preparation kit е проектиран да работи само с индекс 2 праймери с префикс "E". По време на секвенирането MiSeq апарата отчита базите гуанин (G) и тимин (T) със зелен лазер, а аденин (A) и цитозин (C) с червен лазер. Подбира се уникална комбинация от индексови праймери i7 (N701, N702, N703 до N712) и i5 (E501, E502, E503 до E512) за всяка проба от една секвенционна

реакция. Всеки индекс се състои от 8 нуклеотида, които служат като баркод за всички секвенции на даден пациент. Двойките индекси за пробите, които впоследствие ще се комбинират в един пул, се избират така, че на всяка една от осемте позиции на индекс i7 и i5 да има поне един нуклеотид, четен от другия лазер (Табл. 2).

Таблица 2: Поддържане на цветови баланс при лазерното отчитане на базите за всяка индексова позиция

Добър индекс				**Лощ индекс**			
	Index 1		Index 2		Index 1		Index 2
705	GGACTCCT	503	TATCCTCT	705	GGACTCCT	502	CTCTCTAT
706	TAGGCATG	503	TATCCTCT	706	TAGGCATG	502	CTCTCTAT
701	TAAGGCGA	504	AGAGTAGA	701	TAAGGCGA	503	TATCCTCT
702	CGTACTAG	504	AGAGTAGA	702	CGTACTAG	503	TATCCTCT
	√√√√√√√√		√√√√√√√√		√√√√√√√√		√√√√xxxx

√ = сигнал и в двата цвята; x = липсва сигнал в един цветен канал

Към всяка ямка на NEA1 плаката, съдържаща проба, се добавя: 5 µl Index 1 (i7, N7xx) прайпер, 5 µl Index 2 (i5, E5xx) праймер и 20 µl PCR Master Mix (PMM), за краен общ обем на реакцията 50 µl. Внимателно се пипетира за да се разбърка сместа хубаво и NEA1 плаката се покрива с фолио (Microseal 'A') и се уплътнява с гумена ролка след това се центрофугира на 280 x g за 1 мин. След което се слага в PCR апарата с предварително загрят до 100°C капак и се пуска следната PCR програма:

- 72°C за 3 минути
- 98°C за 30 секунди
- 10 цикъла по:
  - 98°C за 10 секунди
  - 60°C за 30 секунди
  - 72°C за 30 секунди
- 72°C за 5 минути
- Изчакване на 10°C

Пречистване след PCR

Тази стъпка използва AMPure XP магнитните частици за пречистване на ДНК в библиотеката и осигурява избор за размер на фрагментите, като премахва много къси фрагменти от населението.

Изваждат се AMPure XP магнитните частици и се размразяват на стайна температура за около 30 минути. Изваждат се NEA1 плаката от PCR апарата и се центрофугират на 280 x g за 1 мин. Целият обем (50 µl) от всяка ямка се прехвърля в отделна ямка на нова "NEA2" плака (Nextera Enrichment Amplification Plate 2). След много добро разбъркване на AMPure XP магнитните частици към всяка ямка се добавят 45 µl от пречиствателните магнитните частици. Внимателно се пипетира за да се разбърка хубаво сместа след което се инкубира на стайна температура за 10 мин. NEA2 плаката се поставяне на магнитната стойка за 2 мин или докато супернатантата се избистри. Внимателно супернатантата се отстранява, след което следват две последователни измивания с 200 µl прясно приготвен 80% етанол с по 30 сек изчакване след всяко от тях. След премахване на остатъчния етанол плаката отново се оставя за сушене за 15 мин на стайна температура, след което се маха от магнита и към всяка ямка се добавят 40 µl RSB буфер. Микса се пипетира внимателно за да се ресуспендират магнитните чстици, инкубира се за 2 мин на стайна температура на магнита. От всяка ямка се прехвърлят 38 µl от супернатанта към NEL плаката (Nextera Enrichment Library Plate).

Концентрацията на всяка проба беше измервана посредством Qubit 2.0 Fluorometric Quantitation System.

Първа хибридизация

За хибридизацията се приготвя обща ДНК библиотека (pool), съдържаща различно индексирани проби, която впоследствие да се пусне в една секвенционна реакция. От всяка проба се взимат 500 ng ДНК и се добавят в общия пул. Ако общият обем на смесените проби надвишава 40 µl, пулът се концентрира с помощта на вакуумен концентратор без прилагане на топлина. Ако обемът на пула е под 40 µl, се добавя необходимото количество RSB до 40 µl. Капацитетът на секвенатора MiSeq и уникалното индексиране на всяка проба позволява в едно секвениране да се комбинират подготвените библиотеки на различни индивиди. Броят на пробите, които

могат да се секвенират едновременно, зависи от размера на таргетния район и желаната дълбочина на секвениране. В едно секвениране могат да се комбинират до 12 различни библиотеки (12 различни пациента) подготвени с панела TruSight Cancer.

Преди приготвянето на хибридизационната реакция NCT1 (Nextera Capture Target Buffer 1) се вортексира продължително до пълното ресуспендиране на кристалите в него. След това към всеки приготвен пул (40 µl) се добавят 50 µl NCT1, както и 10 µl от специфичния за всеки панел TruSight Content Set CSO (Custom Selected Oligos), който съдържа набора от олигосонди, комплементарни на таргетните райони, включени в панела. След внимателно пипетиране за да се разбърка сместа, тя се прехвърля във всяка ямка на новите 300 µl 96-ямкова PCR плака или двойна 96-ямкова PCR плака означена като CTP1. Центрофугира се CTP1 плаката на 280 x g за 1 мин, след което се поставят в PCR апарата на следната програма:

- 95°C за 10 минути (денатурация)
- 18 цикъла по една минута, започващи от 93°C, като всеки следващ цикъл температурата спада с 2°C
- 58°C за 16 - 20 часа

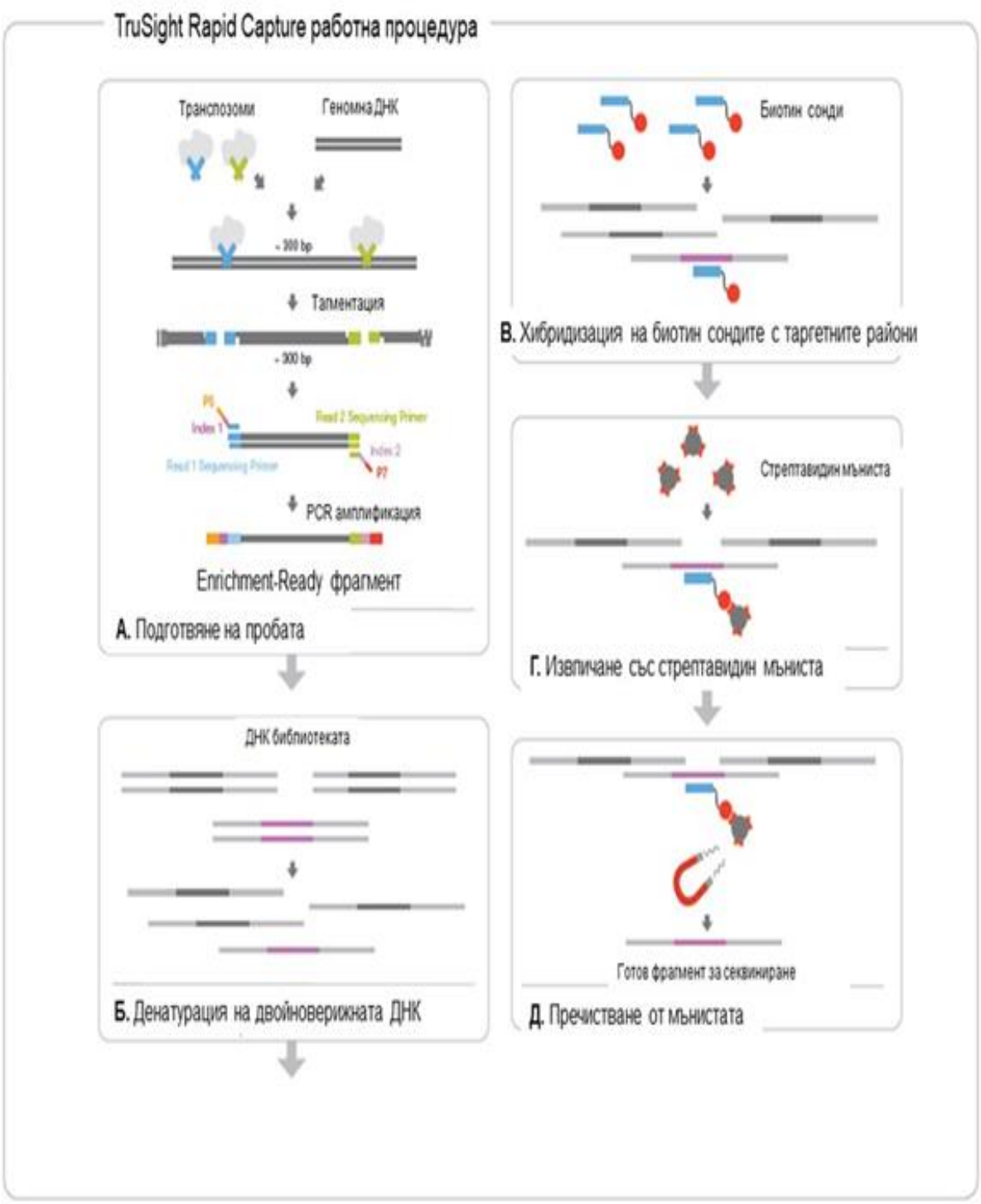
За оптимизиране на ефикасността на хибридизацията продължителността на последната стъпка при първата хибридизация за всеки пул беше между 15 и 20 часа. След денатурацията (Фиг. 1Б) комлементарните олигосонди се свързват само с ДНК фрагментите, съдържащи таргетни райони (Фиг. 1В). Всяка олигосонда е биотинилирана - т.е. представлява нуклеотидна секвенция, към която ковалентно е прикрепена молекулата биотин (витамин B7).

Първо пречистване

Измиването е процедура на извличане на таргетните райони (Capture). По време на извличането на таргетните райони към хибридизационната реакция се добавят магнитни частици, към повърхността на които са прикрепени тетрамерни форми на белтъка стрептавидин. Стрептавидинът и биотинът образуват една от най-силните нековалентни връзки в природата с дисоциационна константа (Kd) ≈ 10−14 mol/L. Така стрептавидиновите магнитни частици се свързват с биотинилираните сонди, които от своя страна са се хибридизирали с таргетните райони (Фиг. 1Г).

След края на хибридизацията CTP1 плаката се центрофугира на 280 x g за 1 мин и съдържанието се прехвърля в нова 96 ямкова MIDI плака с надпис WTP1. След като бъдат добре вортексирани, към всяка ямка на WTP1 се добавят 250 µl Streptavidin Magnetic Beads (SMB). Микса в плаката се пипетира внимателно, плаката се покрива и се инкубира на стайна температура за 30 мин. По време на тази стъпка се осъществява взаимодействието между стрептавидина и биотина. След инкубацията плаката се центрофугира (280 x g, 1 мин) и се поставя за 2 мин на магнитната стойка. Супернатантата се премахва, без да се влиза в контакт с магнитните частици, след което плаката се сваля от магнита.

Следват две последователни измивания за отстраняване на неспецифични взаимодействия на стрептавидиновите частици и изолиране само на таргетните райони. Епруветката с промиващ разтвор (Wash Solution 1 - WS1) се темперира до стайна температура и се вортексира продължително. Добавя се 200 µl от промиващ разтвор WS1 към утаените частици във всяка ямка от плаката, библиотеките се ресуспендират чрез пипетиране на целия им обем 10-20 пъти. Плаката WTP1 се поставя на магнитната стойка за 2 минути на стайна температура или докато течността се избистри. Супернатантата се маха и плаката се сваля от магнита.



Фигура 1: Работната процедура за подготвяне на библиотеката за секвениране по протокола TruSight Rapid Capture Sample Preparation guide

След това наново се накапват 200 µl промиващ разтвор WS2 (Wash Solution 2) към утаените частици във всяка ямка от плаката, библиотеките се ресуспендират чрез пипетиране на целия им обем 10-20 пъти. Плаката WTP1 се поставя на магнитната стойка за 2 минути на стайна температура или докато течността се избистри. Супернатантата се маха и плаката се сваля от магнита. Добавя се отново WS2 към всяка ямка на WTP1 плаката и библиотеките се ресуспендират много добре чрез пипетиране на целия им обем 10-20 пъти. Целия обем на реакцията от всяка ямка на WTP1 плаката се прехвърля в съответната ямка на новата 96 ямкова PCR плака наречена IWP1. Плаката се затваря и се инкубира на PCR апарат за 30 мин на 42°C със загрят капак до 100^{o}C. Плаката IWP1 се изважда от термален сайклър и се поставя веднага върху магнитната стойка за 2 мин или докато течността се избистри. Супернатантата се маха и плаката се сваля от магнита, след което наново се накапват 200 µl WS2 и отново се повтарят същите последователни стъпки.

Добавя се 200 µl от промиващ разтвор WS3 към утаените частици във всяка ямка от плаката, наново библиотеките се ресуспендират чрез пипетиране на целия им обем 10-20 пъти. Плаката IWP1 се поставя на магнитната стойка за 2 минути на стайна температура или докато течността се избистри. Супернатантата се маха и отново се повтарят същите последователни стъпки.

След повторното премахване на супернатантата с WS3 следва елуирането на таргетните райони от стрептавидин-биотиновия комплекс. За всеки пул се приготвя елуционен премикс (elution pre-mix), съдържащ 28.5 µl Elute Target Buffer 1 (ET1) и 1.5 µl 2N NaOH (HP3) прави общ обем за всяка реакция 30 µl. След кратко центрофугиране се добавят 23 µl от премикса към утаените стрептавидинови частици на всеки ямка от IWP1 плаката. Следва ресуспендиране много добре чрез пипетиране 10-20 пъти, затваряме плаката и инкубираме за 5 мин на стайна температура, при която става самото елуиране на ДНК фрагментите, и центрофугиране плаката на 280 x g за 1 мин. Плаката отново се поставя за 2 мин на магнит, като този път ДНК фрагментите не са свързани с утаените частици, а се намират в супернатантата. От нея се взимат 21 µl и се прехвърлят в нова 96 ямкова PCR плака надписана CTP2. Към тях се добавят 4 µl Elute Target Buffer 2 (ET2) за неутрализиране на елуирането. Обогатеният на таргетни райони пул се пипетира внимателно няколко пъти и плакта се покрива.

Втора хибридизация

Този процес смесва първото елуиране на ДНК библиотеката със сондите за улавяне на таргетните райони. Втората хибридизация гарантира, че таргетните райони са допълнително амплифицирани.

Към елуирана библиотеката (25 µl) се добавят 50 µl NCT1 (Nextera Capture Target Buffer 1), след вортексиране и ресуспендиране на кристалите, 10 µl от TruSight Content Set CSO (Custom Selected Oligos), съдържащ олигосондите, и 15 µl PCR Grade Water, което прави общ обем от 100 µl, целия обем се пипитира внимателно в CTP2 плака. Следва центрофугиране на затворената плака на 280 x g за 1 мин, след което CTP2 плаката се поставя в PCR апарата на следната програма:

- 95°C за 10 минути (денатурация)
- 18 цикъла по 1 минута, започващи от 93°C, като всеки следващ цикъл температурата спада с 2°C
- 58°C за 16 – 20 часа

Второ пречистване

Този процес използва частици от стрептавидин за улавяне на сондите, съдържащи таргетните райони. Три стъпки на измиване премахват неспецифично свързваните фрагменти от частиците. След което амплифицираната библиотека се елуира от частиците и се приготвя за секвениране.

След края на хибридизацията CTP2 плаката се центрофугира на 280 x g за 1 мин и съдържанието се прехвърля в нова 96 ямкова MIDI плака с надпис WTP2. След като бъдат добре вортексирани, към всяка ямка на WTP2 се добавят 250 µl Streptavidin Magnetic Beads (SMB). Микса в плаката се пипетира внимателно, плаката се покрива и се инкубира на стайна температура за 30 мин. По време на тази стъпка се осъществява взаимодействието между стрептавидина и биотина. След инкубацията плаката се центрофугира (280 x g, 1 мин) и се поставя за 2 мин на магнитната стойка. Супернатантата се премахва, без да се влиза в контакт с магнитните частици, след което плаката се сваля от магнита.

Следват две последователни измивания за отстраняване на неспецифични взаимодействия на стрептавидиновите частици и изолиране само на таргетните райони. Епруветката с Wash Solution 1 (WS1) се темперира до стайна температура и се вортексира продължително. Добавя се 200 µl от WS1 към утаените частици във всяка ямка от плаката, библиотеките се ресуспендират чрез пипетиране на целия им обем 10-20 пъти. Плаката WTP2 се поставя на магнитната стойка за 2 минути на стайна температура или докато течността се избистри. Супернатантата се маха и плаката се сваля от магнита.

След това наново се накапват 200 µl WS2 (Wash Solution 2) към утаените частици във всяка ямка от плаката, библиотеките се ресуспендират чрез пипетиране на целия им обем 10-20 пъти. Плаката WTP2 се поставя на магнитната стойка за 2 минути на стайна температура или докато течността се избистри. Супернатантата се маха и плаката се сваля от магнита. Добавя се отново WS2 към всяка ямка на WTP2 плаката и библиотеките се ресуспендират много добре чрез пипетиране на целия им обем 10-20 пъти. Целия обем на реакцията от всяка ямка на WTP2 плаката се прехвърля в съответната ямка на новата 96 ямкова PCR плака наречена IWP2. Плаката се затваря и се инкубира на PCR апарат за 30 мин на 42°C със загрят капак до 100ºC. Плаката IWP2 се изважда от PCR апарат и се поставя веднага върху магнитната стойка за 2 мин или докато течността се избистри. Супернатантата се маха и плаката се сваля от магнита, след което наново се накапват 200 µl WS2 и отново се повтарят същите последователни стъпки.

Добавя се 200 µl от WS3 към утаените частици във всяка ямка от плаката, наново библиотеките се ресуспендират чрез пипетиране на целия им обем 10-20 пъти. Плаката IWP2 се поставя на магнитната стойка за 2 минути на стайна температура или докато течността се избистри. Супернатантата се маха и отново се повтарят същите последователни стъпки.

След повторното премахване на супернатантата с WS3 следва елуирането на таргетните райони от стрептавидин-биотиновия комплекс (Фиг. 1). За всеки пул се приготвя елуционен премикс (elution pre-mix), съдържащ 28.5 µl Elute Target Buffer 1 (ET1) и 1.5 µl 2N NaOH (HP3) прави общ обем за всяка реакция 30 µl. След кратко центрофугиране се добавят 23 µl от премикса към утаените стрептавидинови частици на всеки ямка от

IWP2 плаката. Следва ресуспендиране много добре чрез пипетиране 10-20 пъти, затваряме плаката и инкубираме за 5 мин на стайна температура, при която става самото елуиране на ДНК фрагментите, и центрофугиране плаката на 280 x g за 1 мин. Плаката отново се поставя за 2 мин на магнит, като този път ДНК фрагментите не са свързани с утаените частици, а се намират в супернатантата. От нея се взимат 21 µl и се прехвърлят в нова 96 ямкова PCR плака надписана TTP. Към тях се добавят 4 µl Elute Target Buffer 2 (ET2) за неутрализиране на елуирането. Обогатеният на таргетни райони пул се пипетира внимателно няколко пъти и плакта се покрива.

PCR амплификация

По време на този PCR се амплифицират само специфичните таргетни райони, извлечени след двете хибридизации. След прехвърляне на 20 µl от библиотеката от TTP плаката към нова 96 ямкова PCR плака наречена TAP1 се добавят 5 µl PCR Primer Coctail (PPC) и 25 µl PMM (PCR Master Mix). Следва центрофугиране на 280 x g за 1 мин и пускане на следната PCR програма:

- 98°C за 30 секунди
- 12 цикъла по:
  - 98°C за 10 секунди
  - 60°C за 30 секунди
  - 72°C за 30 секунди
- 72°C за 5 минути
- Изчакване на 10°C

Пречистване след PCR амплификация

В тази стъпка се извършва финално пречистване на амплифицираната библиотека, съдържаща таргетните райони, преди секвенирането.

TAP1 плаката се вади от PCR апарата, към съдържанието й (50 µl) се добавят добре вортексирани 90 µl AMPure XP Beads. Суспензията в плаката внимателно се пипетира за да се разбърка хубаво и се инкубира за 15 мин на стайна температура. След това плаката се поставяне на магнитната стойка за 5 мин. Супернатантата (140 µl) от TAP1

плаката се премахва, след което утаените частици се промиват два последователни пъти с 200 µl прясно приготвен 80% етанол с по 30 сек изчакване след всяко от тях. След премахване на етанола плаката се инкубира за 15 мин на стайна температура, за да изсъхнат утаените частици, след което се маха от магнита. Добавят се 30 µl RSB хубаво се разбърква и се инкубира за 2 мин на стайна температура. Плаката се поставя за 5 мин на магнитната стойка. Прехвърля се от всяка ямка на TAP1 плаката 28 µl от супернатантата, съдържаща таргетните ДНК фрагменти в нова 96 ямкова PCR плака надписана CAP. С тази стъпка завършва процесът на приготвяне на библиотеките за секвениране.

Определяне на концентрацията на библиотеките

KAPA Library Quantification Kit е използван за определяне на концентрацията на всяка от приготвените библиотеки преди зареждане на секвенционната реакция. Използван е протоколът KAPA Library Quantification Kit за Illumina platforms на KAPA Biosystems.

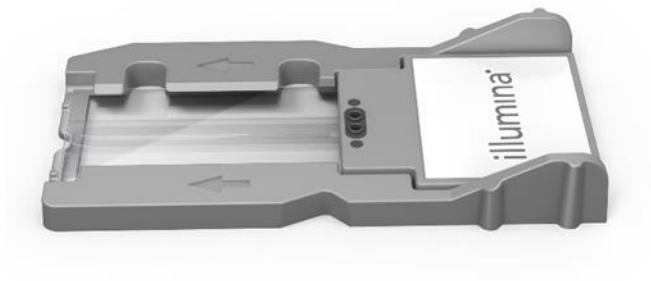
Приготвят се две разредки на приготвената библиотека - 1:1000 и 1:2000. 1 µl от библиотеката се смесва с 999 µl RSB. След 15 сек вортексиране се взимат 100 µl от първата разредка (1:1000) и се смесват с 100 µl RSB, за да се получи втората разредка от 1:2000. Реагентът 10X Primer Premix съдържа праймери, коплементарни на адапторните райони в краищата на всеки фрагмент от библиотеката. 1 ml 10X Primer Premix се смесва с 5 ml 2X KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix, за да се приготви финалния мастър микс. В реакционната смес за определяне на концентрацията се смесват 12 µl мастър микс, 4 µl PCR-grade H2O и 4 µl от разредките на библиотеката или от ДНК стандартите. Използват се 6 ДНК стандарти със следните концентрации: 20 pM/µl, 2 pM/µl, 0.2 pM/µl, 0.02 pM/µl, 0.002 pM/µl и 0.0002 pM/µl. В 48-ямкова плака се накапват по три реакции за всяка от двете разредки на библиотеката и за всеки от шестте стандарта. Пуска се и една негативна контрола, в която вместо ДНК се добавя RSB. Плаката се поставя в qPCR система Illumina Eco и се пуска следната програма:

- 95°C за 5 минути
- 35 цикъла по:
  - 95°C за 30 секунди
  - 60°C за 45 секунди

За изчисляване на концентрацията на библиотеката бе ползвана по-малката разредка от 1:1000. Концентрацията се изчислява по формулата: C x 452/500 x 1000, където C е концентрацията на разредката, установена от qPCR-а, 452 е дължината в бази на стандартите, а 500 бази е средната дължина на фрагментите от приготвените библиотеки.

Денатурация и разреждане на фрагментите за секвениране

За всяко от секвенираният беше използван MiSeq Reagent Kit v2, включващ стандартна поточна (flow) клетка за 500 цикъла (цикъла на секвениране) (Фиг. 2). При всяко секвениране flow клетката беше зареждана с концентрация в диапазона 15-25 pM/µl. Подобни концентрации дават оптимална гъстота на клъстъри по време на секвенирането. След определяне на концентрацията всяка от библиотеките е разреждана до 3-5 nM/µl. За денатурация бе ползвана 0.2 N NaOH. 5 µl от приготвената библиотека се смесва с 5 µl 0.2N NaOH. Сместа се инкубира за 5 мин на стайна температура, след което към нея се добавя 990 µl хибридизационен буфер HT1. Полученият 1 ml се накапва в предварително размразената на лед реагентна касета съдържаща необходимите реагенти за секвенирането (Фиг. 3). Използвани бяха MiSeq Reagent Kit v2. След изплакване поточната клетка, на която се извършва клъстър генерирането и разчитането на базите, се поставя на мястото си в MiSeq апарата. Поставят се също и PR бутилката, съдържаща буфер за изплакване, и реагентната касета, след което се дава начало на секвенирането от контролния софтуер.



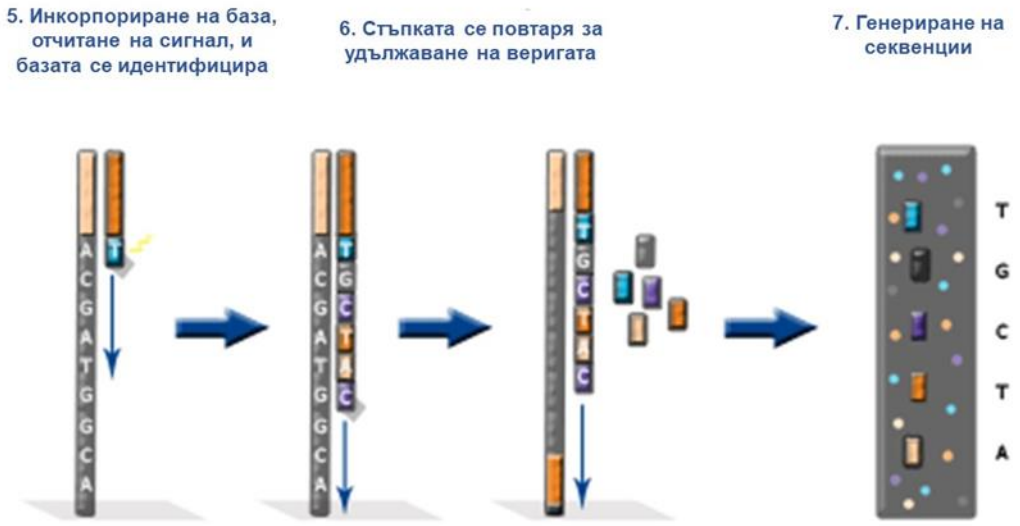
Фигура 2: Стандартна поточна клетка (flow cell), на която се извършва целият процес на секвениране

Фигура 3: Касетата с резервоара за реагентите, в който се добавят ДНК библиотеките от таргетните секвенции

Секвениране с Illumina

Процесът на секвениране започва като подготвените ДНК фрагменти навлизат в поточната клетка чрез микроканалчета. По повърхността ѝ ковалентно са фиксирани огромен брой олигонуклеотиди, комплементарни на адапторните секвенции, добавени по време на приготвянето на библиотеките. ДНК фрагментите се закрепят за поточната клетка (Фиг. 4А - 1), след което чрез така наречената мостова (bridge) амплификация (Фиг. 4А - 2) се генерират клъстъри. Така се създават голям брой клъстъри, всеки съдържащ хиляди копия на един специфичен ДНК фрагмент (Фиг. 4А - 3). След генерирането на клъстърите започва самото разчитане на нуклеотидната последователност. Секвенционни праймери, комплементарни на част от адапторната секвенция, се хибридизират с намножените фрагменти (Фиг. 4А - 4). Секвенирането се извършва по време на синтез (sequencing-by synthesis) чрез използването на dNTP-та, всеки от които е свързан с флуресцентно белязан терминатор. При инкорпориране на дадена база (Фиг. 4Б - 5) флуресцентният сигнал се отчита от лазер и базата се идентифицира. След това терминаторът се отстранява, за да позволи инкорпорирането на следващата флуресцентно белязана база и удължаването на веригата (Фиг. 4Б - 6). Крайният резултат е генерирането на секвенции с висока степен на прецизност (Фиг. 4Б - 7).

Фигура 4А: Първите стъпки в процеса на секвениране с технологията на Illumina



Фигура 4Б: Продължение на стъпките в процеса на секвениране с технологията на Illumina

След приключване на разчитането на базите започва първичният анализ на получените секвенции от самия секвенатор чрез софтуера MiSeq Reporter, който извършва демултиплексиране и разпределяне на секвенциите за всеки един от пациентите в

отделна директория. Освен това получените секвенции се подравняват с референтния човешки геном (версия GRCh37) и несъответствията се отчитат като варианти. За подравняване на последователностите спрямо референтния геном е ползван алгоритъма на BurrowsWheeler (Li H, Durbin R. 2009) или Isaac, а за идентифициране на вариантите (еднонуклеотидни замени, делеции / инсерции с дължина до 25 бази) – приложението GATK Variant Caller или Isaac Variant Caller. Данните от всяко секвениране бяха също така качвани и в облака на Illumina - BaseSpace, където впоследствие могат да се извършват различен тип допълнителни анализи.

Анализ на данните

След завършване на секвенирането, анализът на данните се извършва с Softgenetics NextGene Software (версия 2.3.3). Софтуерът автоматично обработва данните, които извършват подравняването на последователностите с човешкия референтен геном (GRCh37), филтрирането и variant calling. Намерените варианти бяха допълнително анализирани чрез софтуерите за прогнозиране на мутация PROVEAN, SIFT и PolyPhen-2 (версия 2.2.2), за да се установи какъв е техният възможен ефект върху протеиновата функционалност. Вариантите бяха проверени и анализирани допълнително с използване на базата данни PharmGKB (https://www.pharmgkb.org/) за фармакогенетични SNP варианти, свързани с чувствителността към определени лекарства.

2.3. Полимеразна верижна реакция в реално време (Real-time PCR)

Пречистените ДНК проби от 551 туморни проби на пациенти с НДКРБД бяха амплифицирани с therascreen EGFR RGQ PCR Kit за Rotor-Gene Q апарат на QIAGEN. Therascreen EGFR RGQ китът се използва за определяне на 29 соматични мутации в екзони 18-21 на EGFR гена и е базиран на две технологии: ARMS и Scorpions. ARMS (Amplification Refractory Mutation System) техногията извършва алел-специфична амплификация на фрагмент, съдържащ мутацията, докато Scorpions технологията амплифира дивия тип фрагмент, който не съдържа мутация.

Китът therascreen EGFR RGQ PCR позволява откриване на следните типове мутации:

- 19 делеции в екзон 19 (но не ги диференцира);

- Точкови мутации: T790M в екзон 20; L858R в екзон 21; L861Q в екзон 21; S768I в екзон 20;
- Точкова мутация G719X (без да разграничава следните мутации - G719S, G719A или G719C);
- 3 инсерции в екзон 20 (открива тяхното наличие, но не ги разграничава).

Амплификация на ДНК

Амплифицирането на ДНК пробите беше извършено чрез спазване на протокол *therascreen*® EGFR RGQ PCR Kit Handbook (Version 1). Крайната концентрацията на ДНК беше доведена до 10 ng/µl и измерена на спектрофотомет NanoDrop Lite.

PCR процедура

Реакционните смеси в кита *therascreen*® EGFR, както и отрицателната контрола (NTC – no template control) и положителната контрола (PC) за EGFR мутации предварително се размразяват при стайна температура (15 - 25°C). Епруветките се бъркат чрез обръщане около 10 пъти,за да се избегне утаяване на концентрирани соли, след това се центрофугират за кратко, за да се събере съдържанието на епруветките.

Реакционните смеси се приготвя като се смесват 19.5 µl Reaction mix (съответно Ctrl, T790M, Del, L858R, L861Q, G719X, S768I и Ins) и 0.5 µl ДНК Taq полимераза. Сместа се разбърква добре, като внимателно се пипетира 10 пъти (Табл. 3).

Таблица 3: Разпределението на тестваните и контролните проби в реакционите смеси за Rotor-Gene Q

	Контроли		**Номерата на тестваните проби**						
Реакционни смеси	**PC**	**NTC**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
Ctrl - Control Reaction Mix	1	9	17	25	33	41	49	57	65
T790M	2	10	18	26	34	42	50	58	66
Deletions	3	11	19	27	35	43	51	59	67
L858R	4	12	20	28	36	44	52	60	68
L861Q	5	13	21	29	37	45	53	61	69
G719X	6	14	22	30	38	46	54	62	70

S768I	7	15	23	31	39	47	55	63	71
Insertions	8	16	24	32	40	48	56	64	72

Епруветка No 1 съдържа 20 µl реакционна смес Ctrl, към която се добавя 5 µl PC.

Епруветка No 2 съдържа 20 µl реакционна смес T790M, към която се добавя 5 µl PC.

Епруветка No 3 съдържа 20 µl реакционна смес Deletions, към която се добавя 5 µl PC.

Епруветка No 4 съдържа 20 µl реакционна смес L858R, към която се добавя 5 µl PC.

Епруветка No 5 съдържа 20 µl реакционна смес L861Q, към която се добавя 5 µl PC.

Епруветка No 6 съдържа 20 µl реакционна смес G719X, към която се добавя 5 µl PC.

Епруветка No 7 съдържа 20 µl реакционна смес S768I, към която се добавя 5 µl PC.

Епруветка No 8 съдържа 20 µl реакционна смес Insertions, към която се добавя 5 µl PC.

Епруветка No 9 съдържа 20 µl реакционна смес Ctrl, към която се добавя 5 µl NTC.

Епруветка No 10 съдържа 20 µl реакционна смес T790M, към която се добавя 5 µl NTC.

Епруветка No 11 съдържа 20 µl реакционна смес Deletions, към която се добавя 5 µl NTC.

Епруветка No 12 съдържа 20 µl реакционна смес L858R, към която се добавя 5 µl NTC.

Епруветка No 13 съдържа 20 µl реакционна смес L861Q, към която се добавя 5 µl NTC.

Епруветка No 14 съдържа 20 µl реакционна смес G719X, към която се добавя 5 µl NTC.

Епруветка No 15 съдържа 20 µl реакционна смес S768I, към която се добавя 5 µl NTC.

Епруветка No 16 съдържа 20 µl реакционна смес Insertions, към която се добавя 5 µl NTC.

Епруветка No 17 съдържа 20 µl реакционна смес Ctrl, към която се добавя 5 µl проба №1.

Епруветка No 18 съдържа 20 µl реакционна смес T790M, към която се добавя 5 µl проба №1.

Епруветка No 19 съдържа 20 µl реакционна смес Deletions, към която се добавя 5 µl проба №1.

Епруветка No 20 съдържа 20 µl реакционна смес L858R, към която се добавя 5 µl проба №1.

Епруветка No 21 съдържа 20 µl реакционна смес L861Q, към която се добавя 5 µl проба №1.

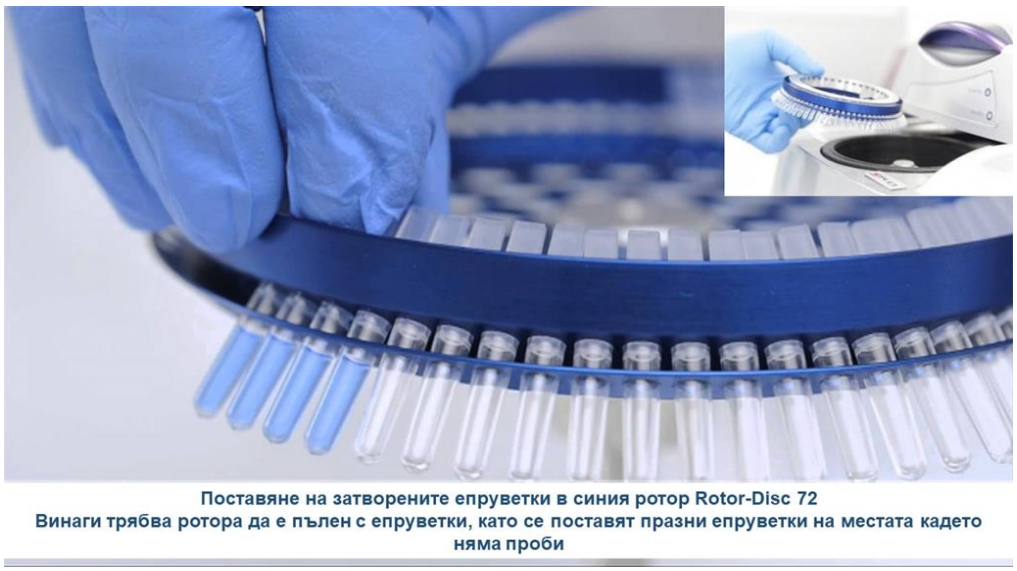
Епруветка No 22 съдържа 20 µl реакционна смес G719X, към която се добавя 5 µl проба №1.

Епруветка No 23 съдържа 20 µl реакционна смес S768I, към която се добавя 5 µl проба №1.

Епруветка No 24 съдържа 20 µl реакционна смес Insertions, към която се добавя 5 µl проба №1.

Добавя се 5 µl от всяка проба към епруветките за PCR (епруветки номер 17-72 при максимален брой за апарата Rotor Gene - 7 проби за едно пускане) и се затварят с капачките.

Всяка ДНК проба трябва да бъде тествана, както за Ctrl, така и за всички останали мутации чрез амплификация в реално време. PCR епруветките се поставят в съответните позиции на ротора (Фиг. 5).



Фигура 5: Зареждане на ротора на Rotor-Gene Q апарата с проби

Роторът се поставя в Rotor-Gene Q апарата и се пуска следната програма:

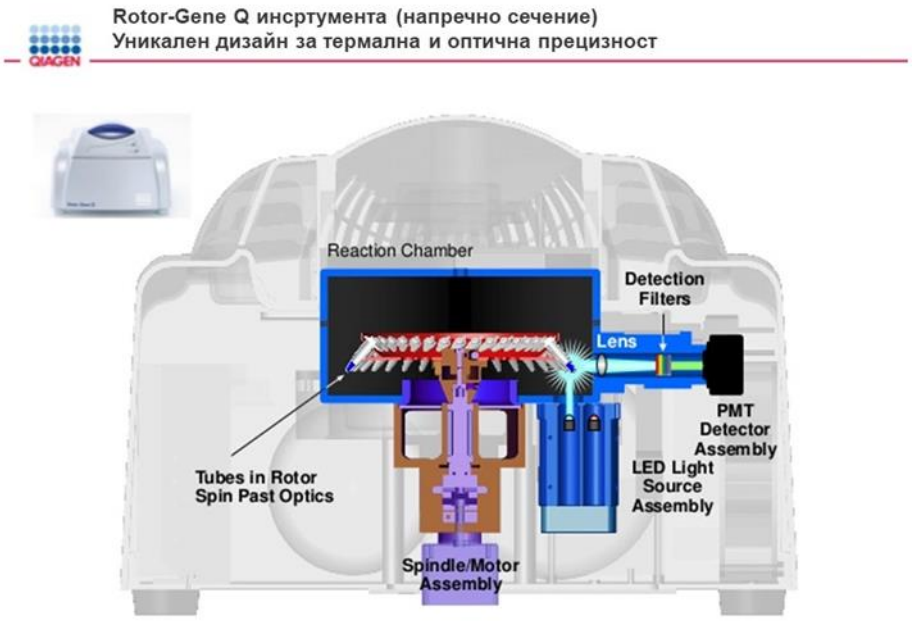
- 95°C за 15 минути
- 40 цикъла по:

- 95°C за 30 секунди

- 60°C за 60 секунди

PCR амплификация

Уникалният центрофужен ротационен дизайн на Rotor-Gene Q го прави най-точният и гъвкав PCR апарат в реално време (Фиг. 6). Всяка епруветка се завърта в камера на движещ се въздух, като всички проби са изложени на една и същата температура по време на бърза термична циркулация. Когато всяка епруветка премине през оптичен детектор, пробите са осветяват и се възбужда флуоресцентен сигнал, който преминава бързо през един единствен, къс оптичен път. Този механизъм води до чувствителен, прецизен и бърз PCR анализ в реално време.



Фигура 6: Напречно сечение на Rotor-Gene Q апарата. Отопление и охлаждане се постига чрез бърз въздушен поток в реакционната камера. Епруветките преминават

през оптиката на всеки 150 милисекунди, което позволява висикоскоростно заснемане на данните. До 6 отделни LED светлинни източници могат да се използват в комбинация с 6 различни високо чувствителни филтъра за детекция (file:///C:/Users/zorah/Downloads/Rotor-Gene-Q--Pure-Detection-IT%20(1).pdf)

Rotor-Gene Q работи с различни видове багрила като SYBR® Green, сонди за хидролиза (TaqMan), хибридизация (FRET) и др. С до 6 канала, обхващащи от ултравиолетовите (UV) до инфрачервените (IR) дължини на вълните, циклера осигурява най-широкия оптичен диапазон (Табл. 4). Освен това, софтуерът позволява да се създадат излъчвания с различни комбинации от дължини на вълните, което означава, че Rotor-Gene Q е съвместими с бои, които потенциално могат да се използват в бъдеще.

Таблица 4: Каналите на Rotor-Gene Q апарата за оптичното детектиране

Каналите	**Възбуждане (nm)**	**Детектиране (nm)**	**Примери за открити флуорофори**
Синьо (Blue)	365±20	460±20	Marina Blue®, Edans, Bothell Blue, Alexa Fluor® 350
Зелено (Green)	470±10	510±5	FAM™, SYBR Green I, Fluorescein, EvaGreen®, Alexa Fluor 488
Жълто (Yellow)	530±5	557±5	JOE™, VIC®, HEX, TET™, CAL Fluor® Gold 540, Yakima Yellow®
Оранжево (Orange)	585±5	610±5	ROX™, CAL Fluor Red 610, Cy®3.5, Texas Red®, Alexa Fluor 568
Червено (Red)	625±5	660±10	Cy5, Quasar® 670, LightCycler® Red640, Alexa Fluor 633
Пурпурно (Crimson)	680±5	712 high pass	Quasar 705, LightCycler Red705, Alexa Fluor 680
HRM	460±20	510±5	SYBR Green I, SYTO®9, LC Green®, LC Green Plus+, EvaGreen

Анализ на EGFR мутации

След завършване на PCR теста, ДНК пробите се анализират за наличие или отсъствие на EGFR мутации със софтуер на Rotor-Gene Q версия (2.0.2).

Ако има амплификация за мутация в определена проба, разликата между прага на цикъла на детектираната мутация (CT) и контролната амплификация (CT) на същата проба се използва за изчисляване на стойноста ΔCT; ΔCT = mutation (мутация) CT – control (контрола) CT. След това сравняваме стойността на ΔCT за пробата с прага (cut-off) съгласно указанията на производителя (Qiagen) (Табл. 5). Резултатът от амплификацията се счита за валиден ако, FAM CT стойността попада в диапазона от 15.00-40.00 цикъла. Ако FAM CT стойноста попада над зададения диапазон или няма амплификация, това е FAM отрицателна амплификация. Ако ΔCT стойността на пробата е по-висока от cut-off стойността, тя се класифицира като "не открита мутация" или извън границите на детекция на кита. Ако ΔCT стойността на пробата е в или под cut-off стойноста, пробата се счита за открита положителна мутация с този анализ.

Таблица 5: Приемливи стойности на реакционната мутация (FAM), за therascreen® EGFR RGQ PCR Kit

Таблица 5: Приемливи стойности на реакционната мутация (FAM), за *therascreen*® EGFR RGQ PCR Kit

Реакционен микс	**Приемлива C_T стайност**	**Cut-off ΔC_T стойност**
T790M	15.00–40.00	6.38
Deletions	15.00–40.00	9.06
L858R	15.00–40.00	8.58
L861Q	15.00–40.00	9.26
G719X	15.00–40.00	9.31
S768I	15.00–40.00	9.26
Insertions	15.00–40.00	7.91

Статистически метод

Използвахме chi-square тест за оценка на връзката между мутациите в EGFR гена и пола, статуса на пушене (пушачи и не-пушачи) и хистологичния туморен фенотип (аденокарцином, сквамозноклетъчен карцином и едро клетъчен карцином). P-стойностите по-малки от 0,05 и се считат за статистически значими.

P- стойността се използва при тестове за значимост на нулева хипотеза, при която първо се избира модел (нулевата хипотеза) и прагова стойност за p, наречена нивото на значимост на теста (5% или 1%). Ако p-стойността е по-малка от избраното ниво на значимост, това предполага, че използваните данни са несъвместими с нулевата хипотеза, и че нулевата хипотеза може да бъде отхвърлена. За анализа праговата стойност се приема за 0.05 (cutoff), като нулевата хипотеза се отхвърля, когато $p < 0.05$ (статистически значима разлика), и не се отхвърля, когато $p > 0.05$ (няма статистически значима разлика).

V. Резултати

1. Данни от NGS секвениране с карциномен панел на туморни проби от НДКБК

1.1. Анализ на варианти, свързани с туморогенеза при НДКБК

Отговарящите на критериите за включване, 18 туморни проби от недребноклетъчен белодробен карцином (НДКБК) са подложени на NGS-базирано таргетно секвениране с панел от 94 гени, асоциирани с онкогенезата (TruSight Cancer Sequencing Panel, Illumina). Установиха се седем типа патогенни SNP-варианти свързани с туморогенезата в гените *BRCA1*, *PMS2*, *MLH1* и *PALB2* (Табл.6), общо 21 на брой, разпределени в 11 пациента. Всички открити варианти са секвенирани по сенс веригата.

Оценката на патогенността на намерените варианти е базирана на SIFT и PROVEAN стойността, генерирани от специално разработени софтуери за оценка на очаквания ефект на мутацията върху функцията на протеина (http://provean.jcvi.org/about.php#about_1).

PROVEAN стойността се изчислява, като се взима средната стойност на резултатите в рамките на и между получените клъстери. Ако стойността на PROVEAN е равна или по-ниска от предварително заложения праг (cutoff -2.5), се очаква вариантът да влияе негативно върху функцията на протеина. При PROVEAN коефицент над зададения праг се приема, че вариантът няма функционален ефект.

SIFT е програма, която класифицира вариантите като „толерантни“ или „патогенни“ (damaging) в зависимост от това дали вариантът се намира в еволюционно консервативен участък и оценката се базира на хипотезата, че еволюцията на протеините корелира с функция им. Варианти в генни сегменти със стойност <0,05 се очаква да бъдат „патогенни“. Тези, при които SIFT коефициентът е ≥0,05, се очаква да бъдат „толерантни“.

Установиха се 7 патогенни варианти в четири гени *BRCA1, PMS2, MLH1* и *PALB2,* свързани с туморогенезата (Табл.6). Всички открити варианти са секвенирани по сенс веригата.

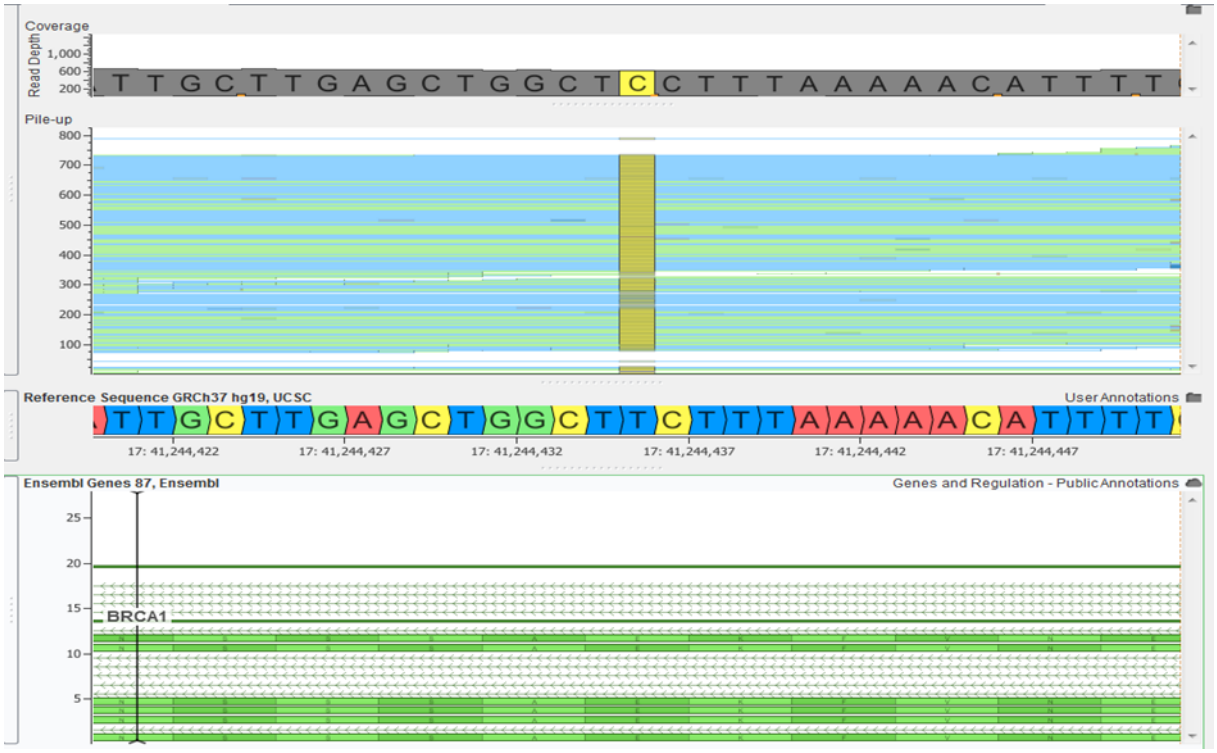
Таблица 6: Варианти свързани с онкогенеза в пациенти с НДКБК

Пациенти	**Гени**	**Варианти**	**Генотип на пациента**	**PROVEAN (cutoff=-2.5)**	**SIFT (cutoff=0.05)**
№1	*BRCA1*	rs16941	CC	Патогенен	Патогенен
	BRCA1	rs80356964	GA	Патогенен	Патогенен
№4	*BRCA1*	rs16941	TC	Патогенен	Патогенен
	BRCA1	rs1799950	TC	Патогенен	Толерантен
№5	*BRCA1*	rs16941	TC	Патогенен	Патогенен
	BRCA1	rs1799950	TC	Патогенен	Толерантен
№6	*BRCA1*	rs1799950	TC	Патогенен	Толерантен
	MLH1	rs63751049	CT	Патогенен	Патогенен
№7	*BRCA1*	rs16941	TC	Патогенен	Патогенен
	BRCA1	rs80356964	AG	Патогенен	Патогенен
№10	*BRCA1*	rs16941	CC	Патогенен	Патогенен
	PMS2	rs146176004	CG	Патогенен	Патогенен
№11	*BRCA1*	rs16941	CC	Патогенен	Патогенен
	PALB2	rs75023630	CA	Патогенен	Патогенен
№15	*BRCA1*	rs80356964	AG	Патогенен	Патогенен
	PMS2	rs146176004	CG	Патогенен	Патогенен
№16	*BRCA1*	rs80356964	AG	Патогенен	Патогенен
	PALB2	rs45551636	CT	Патогенен	Патогенен
№17	*BRCA1*	rs1799950	TC	Патогенен	Толерантен
№18	*BRCA1*	rs16941	CC	Патогенен	Патогенен
	BRCA1	rs1799950	CT	Патогенен	Толерантен

BRCA1

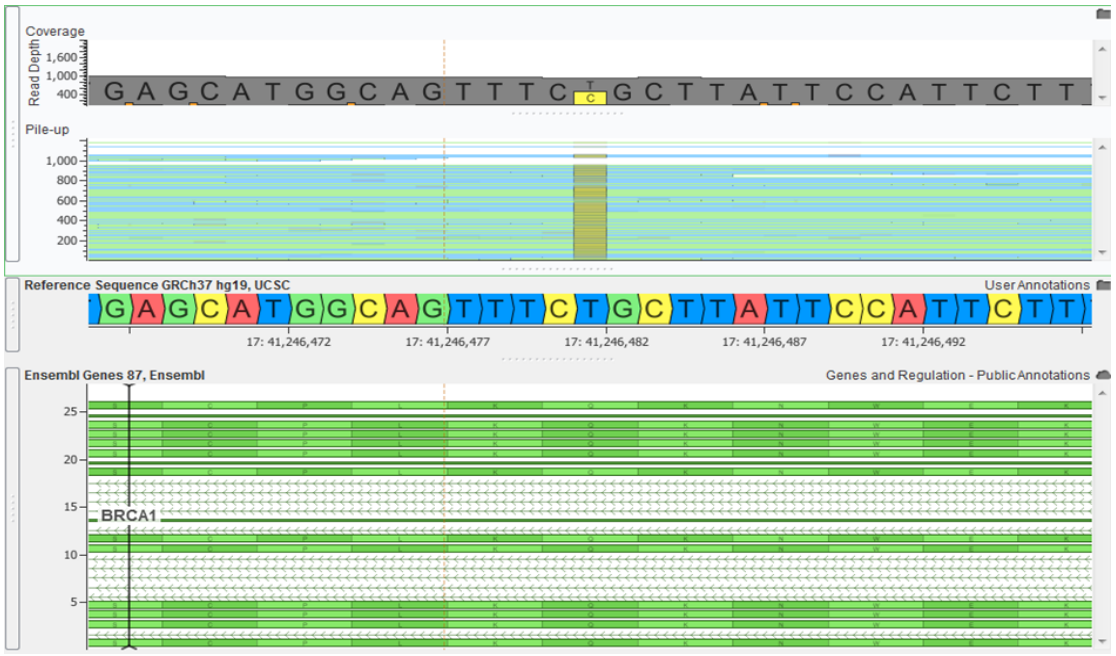
При анализа на данните се установиха три патогенни SNP варианти в *BRCA1* (rs16941, rs80356964 и rs1799950).

Алелните варианти на rs16941 се срещат, като хомозиготи по С-алел са 16,7% (n=3), а хетерозиготи – ТС генотип са 16,7% (n=3), и хомозиготи по ТТ – генотип са 66,6% (n=12) от изследваните пациенти (Фиг. 7).



Фигура 7: SNP вариантът rs16941 в хомозиготно състояние CC генотип

Вариантът rs1799950 се среща в хетерозиготно състояние -ТС генотип, при 27,8% (n=5) от пациентите и хомозиготи по ТТ генотип 72,2% (n=13) (Фиг. 8).



Фигура 8: SNP вариантът rs1799950 в хетерозиготно състояние TC генотип

Вариантът rs80356964 се среща в хетерозиготно състояние – GA генотип, при 22,2% (n=4) от пациентите, хомозиготи носители на GG – алела са 66,6% (n=12) (Фиг. 9).

Фигура 9: SNP вариантът rs80356964 в хетерозиготно състояние GA генотип

Според стойността на PROVEAN коефициента, трите варианта се класифицират като увреждащи функцията. Според SIFT анализа един от вариантите (rs1799950) се определя като „толерантен," а другите два варианта rs16941 и rs80356964 се класифицират като „патогенни".

PMS2

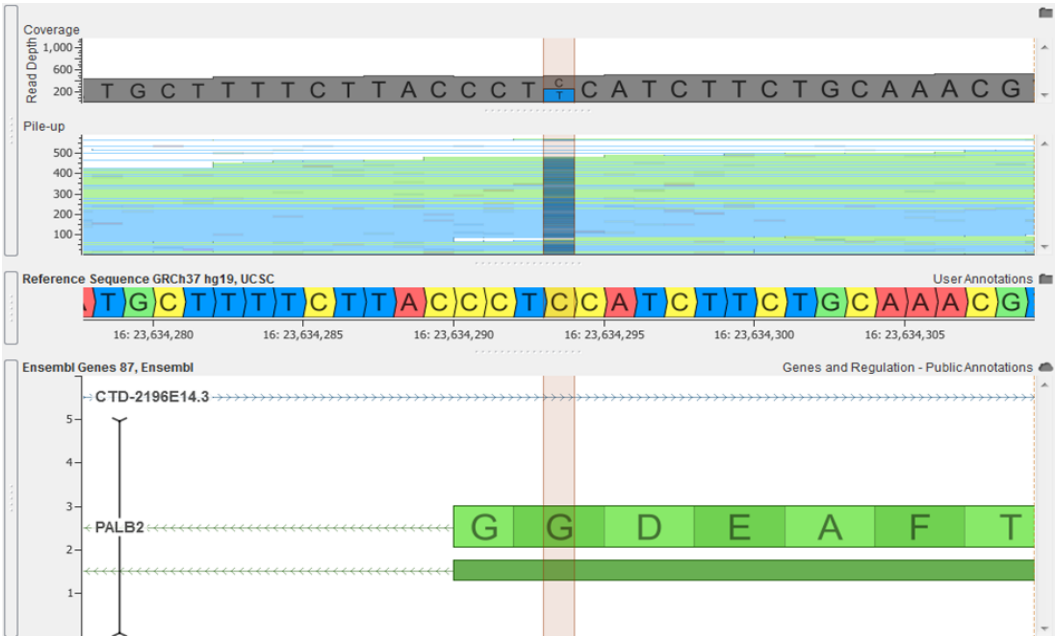
Вариантът rs146176004 се среща при 11,1% (n=2) от туморните проби в хетерозиготно състояние – CG генотип, и хомозиготи CC генотип 88,9% (n=16). И двата софтуера за предикция - PROVEAN и SIFT, определят този вариант като „патогенен", влияещ негативно върху функцията.

PALB2

Два SNP варианта (rs75023630 и rs45551636) са открити в *PALB2* гена, които са „патогенни" и влияят негативно върху функцията, според двата предиктора.

Вариантът rs75023630 се среща при 5,6% (n=1) от туморните проби в хетерозиготно състояние – CA генотип, останалите туморни проби са хомозиготи CC генотип 94,4% (n=17) (Фиг. 10).

Вариантът rs45551636 също така се среща при 5,6% (n=1) в хетерозиготно състояние - CT генотип, останалите туморни проби са хомозиготи CC генотип 94,4% (n=17).



Фигура 10: SNP вариантът rs75023630 в хетерозиготно състояние CT генотип

MLH1

Вариантът rs63751049 се среща при 5,6% (n=1) в хетерозиготно състояние - CT генотип. Според предикцията по PROVEAN, този вариант се определя като увреждащ функцията, а според SIFT се класифицира като „патогенен“.

1.2. Фармакогенетични варианти при НДКБК, определени чрез секвениране с карциномен панел

Установените при секвенирането варианти бяха подложени на анализ за потенциалната роля като фармакогенетични дефекти при химиотерапия. Всички открити варианти са секвенирани по сенс веригата. За референтна база данни, включително и за алелните честотите в европейска популация, беше използвана PharmGKB.

Установихме 5 типа фармакогенетични варианта (rs1799793, rs13181, rs1042522, rs2228001, rs2227983) в 4 гена (*ERCC2*, *TP53*, *XPC* и *EGFR),* в туморите на изследваните пациенти, които имат отношение към ефекта на различни противотуморни препарати. Общият брой на вариантите е 54, като варианти бяха открити между всички пациенти.

Приложихме PROVEAN и SIFT алгоритмите за определяне на ефекта на вариантите върху биологичната функция на протеина (Табл.7).

Таблица 7: Фармакогенетични варианти установени в туморите на пациенти с НДКБК

Пациенти	**Гени**	**Варианти**	**Генотип**	**PROVEAN cut off = -2.5**	**SIFT cut off = 0.05**
№1	*ERCC2*	rs1799793	CT	Патогенен	Толерантен
	TP53	rs1042522	CC	Неутрален	Толерантен
	XPC	rs2228001	GT	Неутрален	Толерантен
№2	*EGFR*	rs2227983	AG	Неутрален	Толерантен
	TP53	rs1042522	GC	Неутрален	Толерантен
	XPC	rs2228001	TT	Неутрален	Толерантен
№3	*EGFR*	rs2227983	AG	Неутрален	Толерантен
	ERCC2	rs1799793	CT	Патогенен	Толерантен
	ERCC2	rs13181	GG	Неутрален	Толерантен

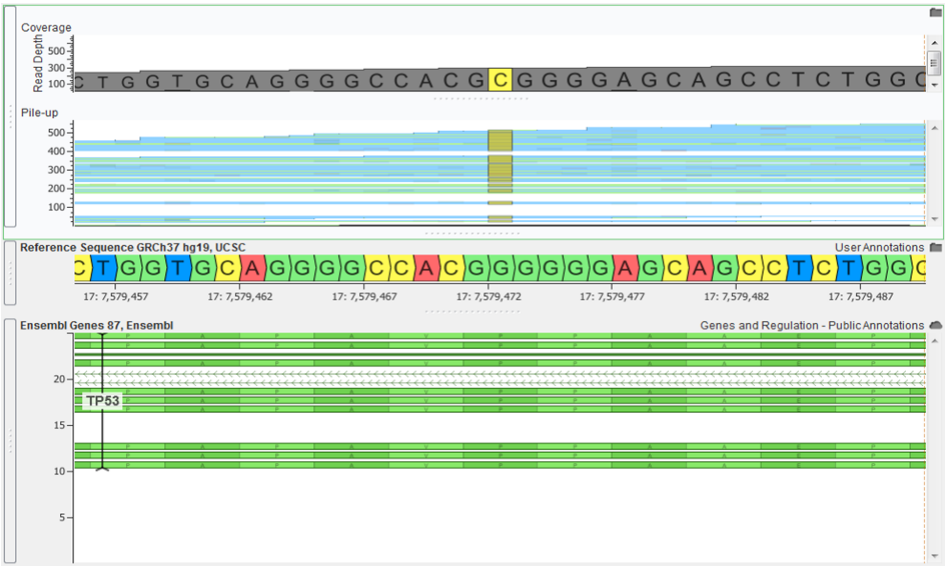
	TP53	rs1042522	CC	Неутрален	Толерантен
	XPC	rs2228001	GT	Неутрален	Толерантен
№4	*ERCC2*	rs1799793	TT	Патогенен	Толерантен
	TP53	rs1042522	CC	Неутрален	Толерантен
	XPC	rs2228001	GT	Неутрален	Толерантен
№5	*ERCC2*	rs1799793	CT	Патогенен	Толерантен
	TP53	rs1042522	CC	Неутрален	Толерантен
	XPC	rs2228001	GT	Неутрален	Толерантен
№6	*EGFR*	rs2227983	AG	Неутрален	Толерантен
	TP53	rs1042522	CC	Неутрален	Толерантен
№7	*ERCC2*	rs13181	TG	Неутрален	Толерантен
	TP53	rs1042522	GC	Неутрален	Толерантен
	XPC	rs2228001	GT	Неутрален	Толерантен
№8	*EGFR*	rs2227983	AA	Неутрален	Толерантен
	ERCC2	rs13181	TG	Неутрален	Толерантен
	TP53	rs1042522	CG	Неутрален	Толерантен
	XPC	rs2228001	GT	Неутрален	Толерантен
№9	*TP53*	rs1042522	CC	Неутрален	Толерантен
№10	*EGFR*	rs2227983	AG	Неутрален	Толерантен
	XPC	rs2228001	TT	Неутрален	Толерантен
№11	*ERCC2*	rs13181	TG	Неутрален	Толерантен
	TP53	rs1042522	CC	Неутрален	Толерантен
	XPC	rs2228001	TT	Неутрален	Толерантен
№12	*EGFR*	rs2227983	AG	Неутрален	Толерантен
	ERCC2	rs13181	TG	Неутрален	Толерастен
	TP53	rs1042522	CC	Неутрален	Толерантен
№13	*EGFR*	rs2227983	AG	Неутрален	Толерантен
	ERCC2	rs1799793	TT	Патогенен	Толерантен
	ERCC2	rs13181	GG	Неутрален	Толерантен
	TP53	rs1042522	CC	Неутрален	Толерантен
	XPC	rs2228001	GT	Неутрален	Толерантен

№14	*ERCC2*	rs1799793	CT	Патогенен	Толерантен
	TP53	rs1042522	CC	Неутрален	Толерантен
	XPC	rs2228001	TT	Неутрален	Толерантен
№15	*EGFR*	rs2227983	AA	Неутрален	Толерантен
	ERCC2	rs13181	TG	Неутрален	Толерантен
	TP53	rs1042522	CC	Неутрален	Толерантен
№16	*EGFR*	rs2227983	AG	Неутрален	Толерантен
	TP53	rs1042522	CC	Неутрален	Толерантен
№17	*ERCC2*	rs13181	GG	Неутрален	Толерантен
	TP53	rs1042522	CC	Неутрален	Толерантен
	XPC	rs2228001	GT	Неутрален	Толерантен
№18	*ERCC2*	rs13181	TG	Неутрален	Толерантен
	TP53	rs1042522	CC	Неутрален	Толерантен
	XPC	rs2228001	GT	Неутрален	Толерантен

Според предикцията по SIFT, всички открити фармакогенетични варианти са класифицирани като „толерантни“, докато PROVEAN определи един от вариантите (rs1799793 в *ERCC2*) като „патогенен“, останалите варианти са категоризирани като неутрални.

TP53

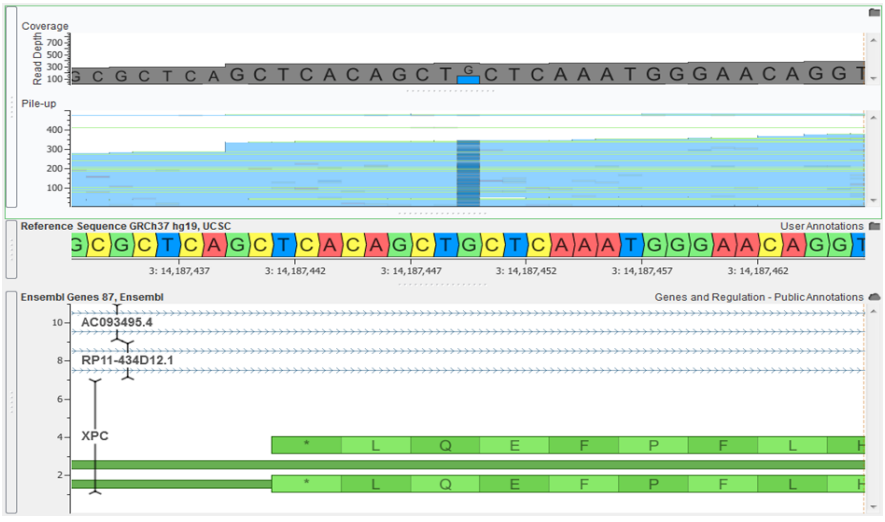
SNP вариантът rs1042522 в *TP53* гена се среща в 88,9% (n=16). Присъствието на C-алел (честота на C-алел в европейска полулация - 0.72) в *TP53* е открит при 11,1% (n=2) в хетерозиготно състояние - генотип GC, а 77,8% (n=14) са хомозиготи по C-алел (Фиг. 11). Този SNP-вариант асоциира с ефекта от химиотерапия с паклитаксел, циклофосфамид, флуроурацил и цисплатина. Генотип CC е асоцииран с намален риск от токсичност при лечение с циклофосфамид и флуроурацил. Наличието на G-алел се свързва с повишаване на риска за токсичност при тези терапии.



Фигура 11: SNP вариантът rs1042522 в хомозиготно състояние CC генотип

XPC

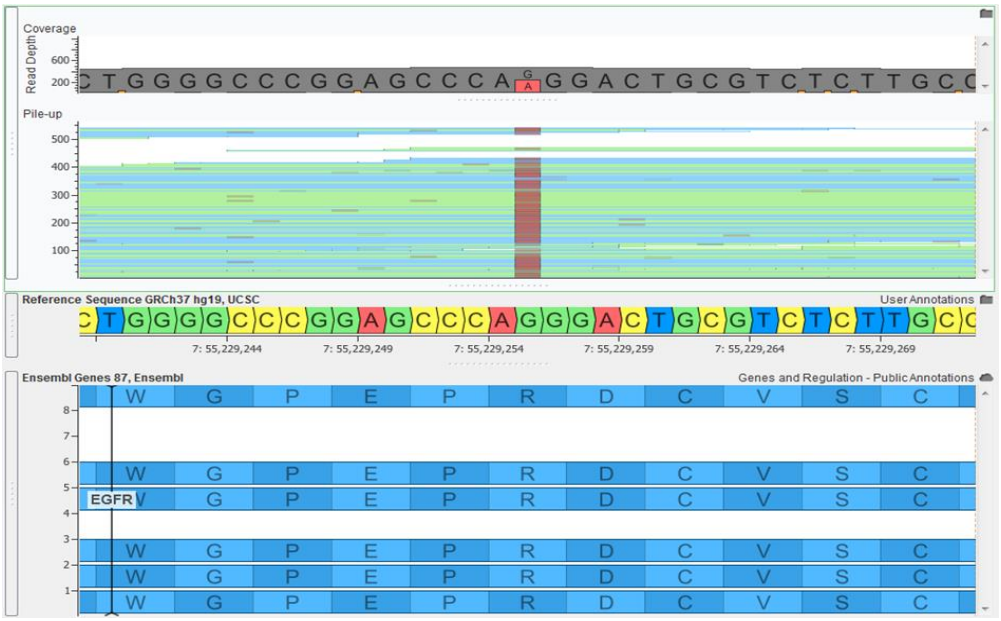
SNP вариантът rs2228001 в *XPC* гена присъства в 72,2% (n=13) от анализираните туморни проби. Присъствието на T-алел (честота в европейската популация 0,60) в *XPC* гена е открито при 50% (n=9) от пациентите в хетерозиготна форма – генотип GT и при 22,2% (n=4) се наблюдава хомозиготен TT генотип (Фиг. 12). Този вариант асоциира с ефекта при химиотерапия с цисплатина. Генотип TT е асоцииран с намален риск от токсичност при лечение с цисплатина спрямо хомозиготите по G-алел и хетерозиготите - GT.



Фигура 12: SNP вариантът rs2228001 в хетерозиготно състояние GT генотип

EGFR

В *EGFR* гена е установен фармакогенетичен вариант rs2227983 в хомозиготно и хетерозиготно състояние на А-алела (честота в европейската популация - 0.28). Туморите с генотип на хетерозиготи AG са 38,9% (n=7), а хомозиготите по А-алела (АА) са 11,1% (n=2) от пациентите и хомозиготи - GG генотип са 50% (n=9) (Фиг. 13). Генотип АА и генотип AG се асоциират с намален риск от нежелани лекарствени реакция свързани с кожна токсичност при лечение с EGFR TKIs.



Фигура 13: SNP вариантът rs2227983 в хетерозиготно състояние AG генотип

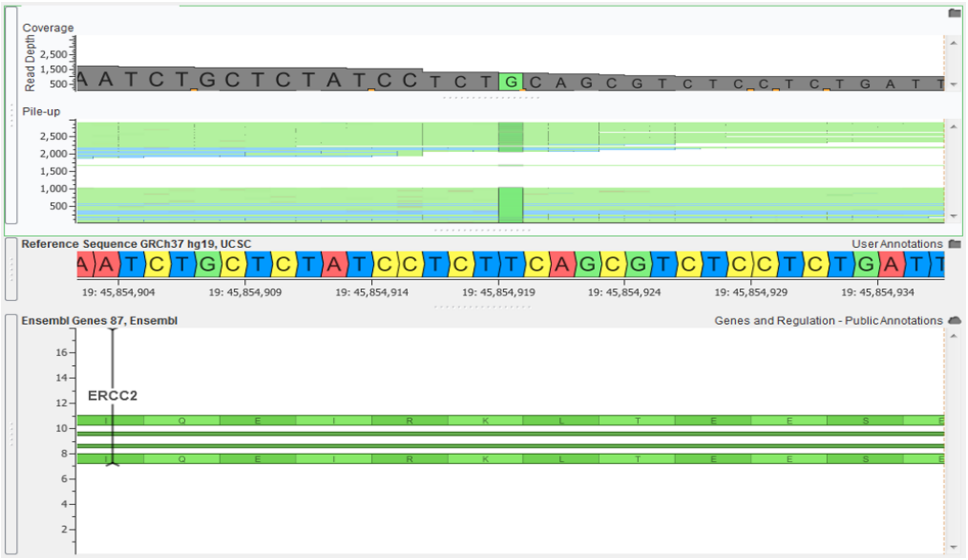
ERCC2

В *ERCC2* гена бяха открити два варианта: rs1799793 и rs13181.

Т-алел на rs1799793 (честота 0.36 в европейска популация) се открива при 33,3% (n=6) от туморите- в 11,1% (n=2) е в хомозиготно състояние - ТТ и в 22,2% (n=4) е в хетерозиготно състояние – СТ. При пациентите след лечение с цисплатин, които са с туморен генотип ТТ и СТ за rs1799793 се наблюдава удължен период без прогресия на заболяването в сравнение с тези с генотип СС.

При 50% (n=9) от пациентите се открива вариант rs13181 с G алел (честота в европейската популация - 0,36), като при 33,3% (n=6) е в хетерозиготно състояние – TG генотип и при 16,6% (n=3) в хомозиготно състояние – GG генотип (Фиг. 14).

Пациенти с туморен генотип GG за rs13181 имат намалена преживяемост при лечение с платинови съединения спрямо пациентите с TT генотип.

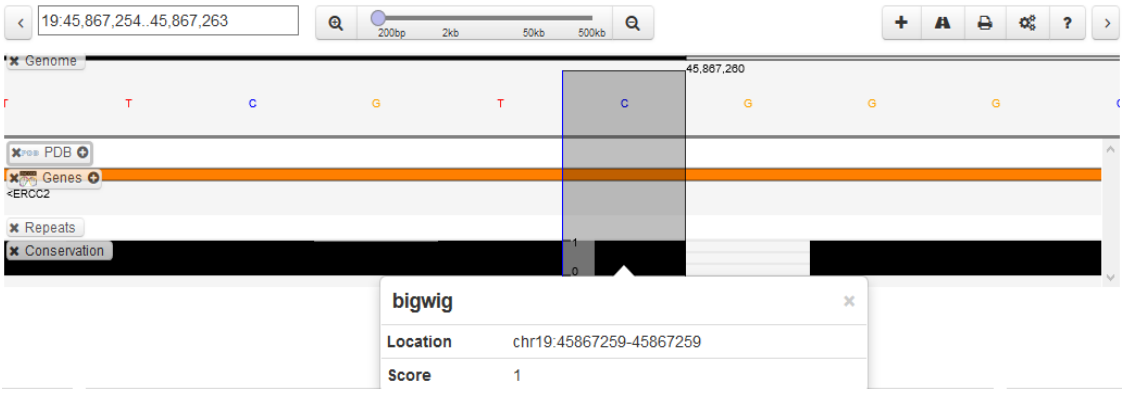


Фигура 14: SNP вариантът rs13181 в хомозиготно състояние GG генотип

In silico анализ на варианта rs1799793

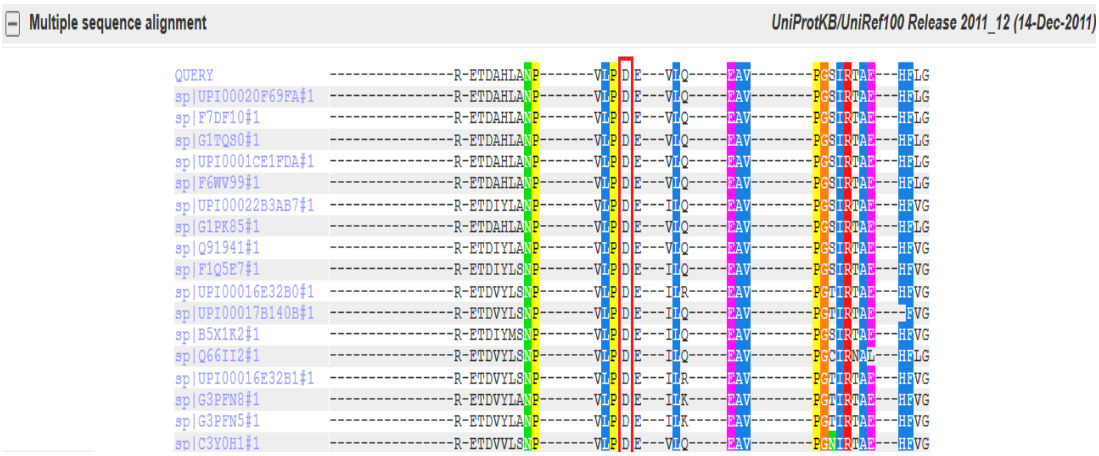
Кодът на варианта според dbSNP база данни е NC_000019.9; NM_000400.3:c.934G>A, с позиция в генома g.45867259, алели C>T, протеин NP_000391.1:p.Asp312Asn; код на протеина според UniProt база данни P18074, D312N (rs1799793).

Цитозинът е еволюционно високо консервативна нуклеотидна база (PhastCons показател – 1) (Фиг. 15).



Фигура 15: Секвенцията на *ERCC2* гена в хромозома 19; С алелът е заменен със Т алел

Откритият миссенс вариант води до замяна на еволюционно високо консервативната аспарагинова аминокиселина (Asp) с аминокиселина аспарагин (Asn) (Фигура 16).



Фигура 16: Замяната на аспарагинова киселина (D) с аспарагин (N) на 312 позиция

Според различни предиктори (SIFT и PROVEAN), за този вариант има противоречива информация (Табл. 8).

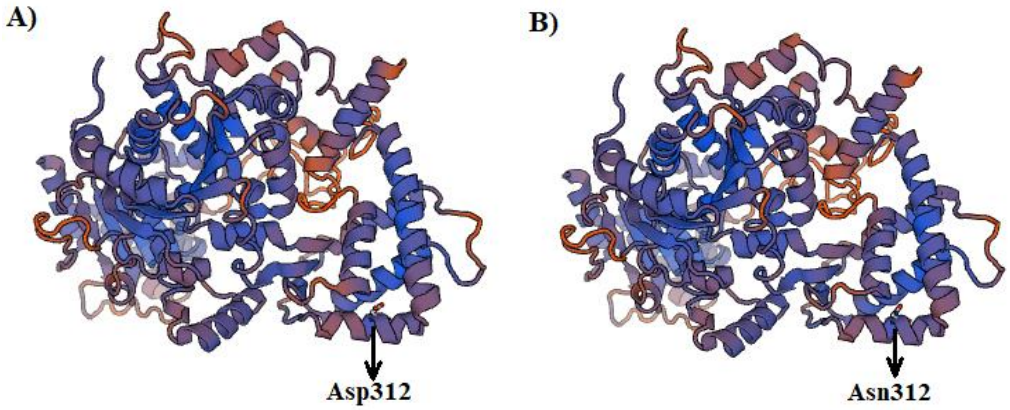
Таблица 8: Вариантът (rs1799793 в *ERCC2*) е толерантен според предикцията по SIFT; според предикцията PROVEAN се определя като deleterious

	Prediction	Score
UniProt	Non-disease (reviewed)	NA
PROVEAN	Deleterious	-2.80
SIFT	Tolerated	0.174
PolyPhen-2 HumDiv	benign	0.053
PolyPhen-2 HumVar	benign	0.051

Вариантът (c.934G>A) води до потенциално нарушение на нативна нуклеотидна последователност (5′─TGCCCGA─3′) в екзон 10, която е необходима за свързване на пре-мРНК сплайсинг-фактор SF2/ASF (IgM-BRCA1) и създава мутантен екзон сплайс репресорен мотив (ESS: 5′─CTGCCCAA─3′). Евентуалното нарушение на нормалния сплайсинг може да доведе до изпускане на екзон 10 от *ERCC2* транскрипта (ENST00000391945.8). Като ефект, мутацията (c.934G>A) води до изместване на рамката на четене (фреймшифт) и преждевременно формиране на стоп кодон в екзон 12

(p. Arg272ArgfsTer376). При *in silico* моделиране установихме, че това нарушение не води до промяна в третичната структура на протеина (Фиг. 17), но води до промяна в афинитета на протеина към други молекули в клетката, поради смяната на заряда на аминокиселината.

Полиморфизмът *ERCC2* Asp312Asn оказва влияние върху репарацията на ДНК чрез NER (Nucleotide excision repair) пътя. Увреденият механизъм за ДНК репарация е рисков фактор за развитието на рак.



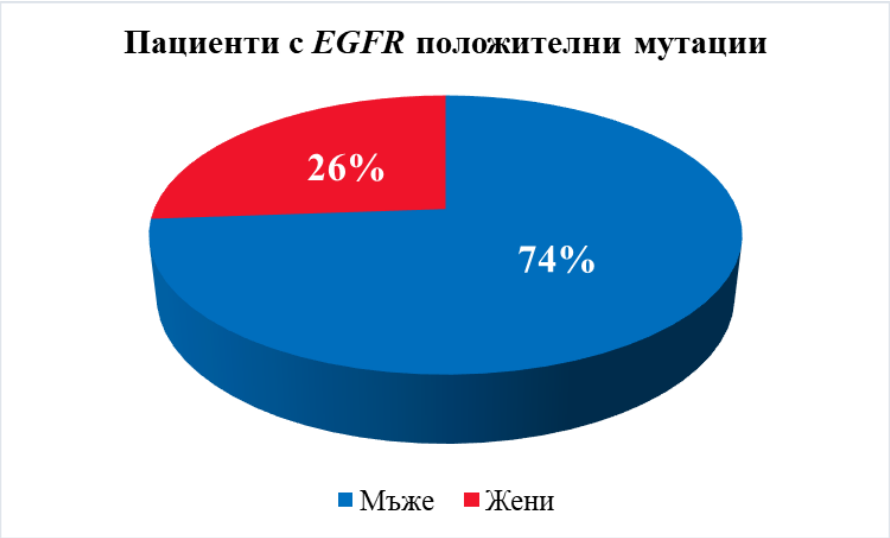
Фигура 17: Структурата на домейна на *ERCC2*; полиморфизмът *ERCC2* Asp312Asn

2. Мутационен спектър на *EGFR* гена определен чрез експресионен PCR анализ в реално време за избор на таргетна терапия на НДКБК

2.1. Клинико-патологична характеристика на изследваните пациенти

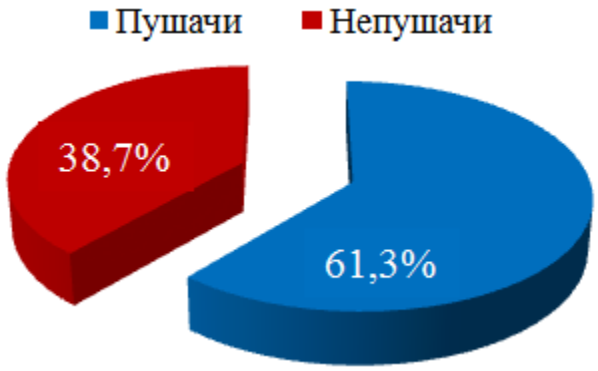
За период от 5 години са събрани 551 FFPE-туморни проби от пациенти диагностицирани с НДКБД в IIIB и IV стадий след предоставено подписано писмено информирано съгласие.

Средната възраст на пациентите в изследваната кохорта е 63 години, като възрастта към момента на диагностициране на заболяването варира между 24 и 84 години. В тази извадка се наблюдава превес на мъжкия пол - 73,8% (n=407) мъже срещу 26,2% жените (n=144). Съотношението мъже: жени в тестваната група е 2,83:1 (Фиг. 18).



Фигура 18: Разпределение на пациентите по пол

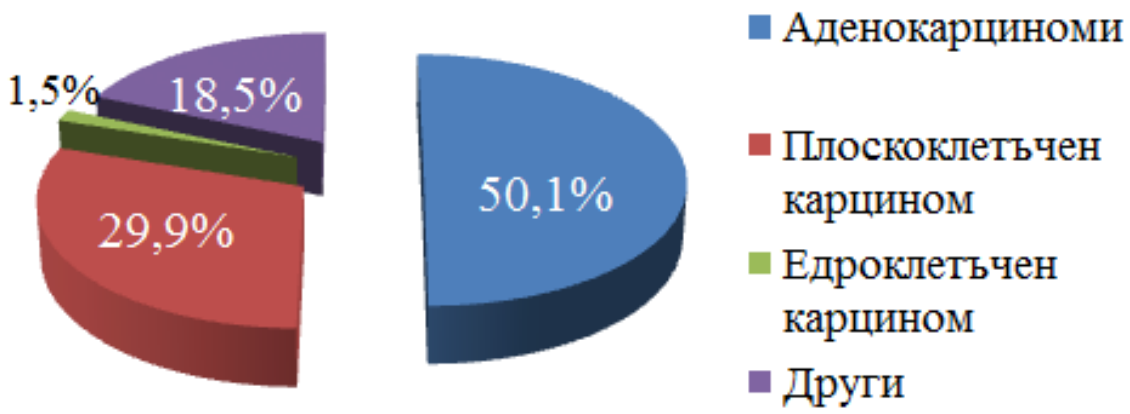
В изследваната кохорта се наблюдава предоминиране на пациентите, които са или са били дългогодишни пушачи - 61,3% (n=338). Непушачите са съответно 38,7% (n=213) (Фиг.19).



Фигура 19: Разпределението по групи на пушачи и непушачи

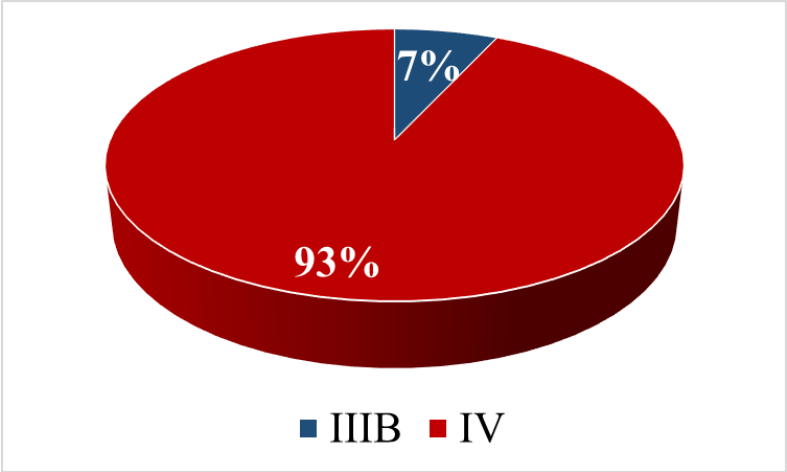
Всички туморни проби са преминали през хистологичната оценка и са класифицирани от клиничен патолог в 4 групи.

На фиг. 20 е представено разпредлението на туморните проби въз основа на хистологичния тип. Аденокарциномите представляват 50,1% (n=276) от всички тумори в изследваната кохорта. Делът на плоскоклетъчни карциноми е 29,9% (n=165). Едроклетъчни карциноми имат най-малък дял - 1,5% (n=8). Останалите хистологични варианти съставляват групата „други“ - 18,5% (n=102).



Фигура 20: Хистологична класификиция на пробите

Разпределението по стадии е както следва: стадий IIIB - 6,9% (n=38); стадий IV- 93,1% (n= 513) (Фиг. 21).



Фигура 21: Разпределението на туморите по стадий

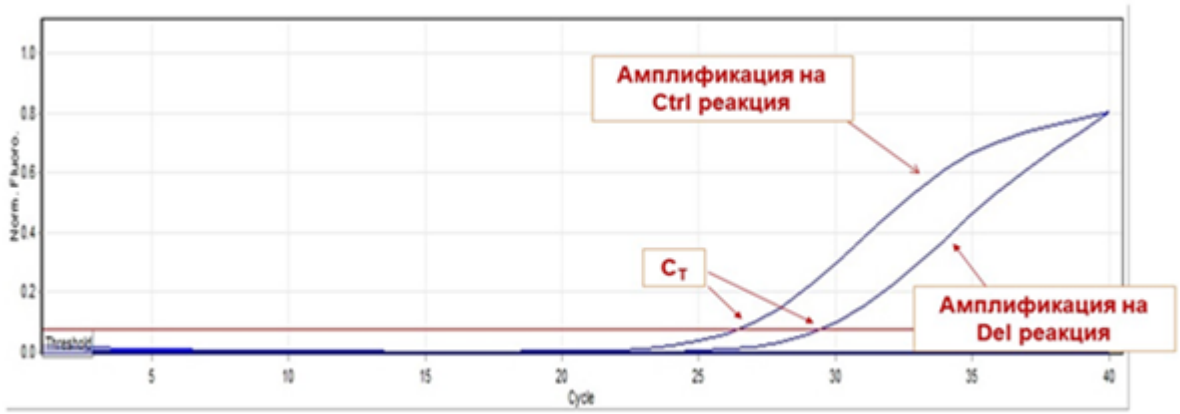
2.2. Мутационен спектър на *EGFR* гена за таргетна терапия на НДКБК

Мутациионният статус на *EGFR* в туморните проби беше определен чрез теста „*therascreen* EGFR assay“, с който се изследват 29 мутации в гена. Установени са генни мутации в *EGFR* в 10% от изследваните туморни проби с НДКБК (n=55) (табл. 9).

Таблица 9: Типовете на откритите мутации в EGFR гена

Открити мутации	Пациенти	Процент
Делеции в екзон 19	31	56.40%
L858R	20	36.40%
Инсерции в екзон 20	2	3.60%
Делеции в екзон 19 и T790M	1	1.80%
Делеции в екзон 19 и S768I	1	1.80%

EGFR делеции в екзон 19 се откриват при 23 белодробни аденокарциноми, 3 плоскоклетъчни карциноми и 5 едроклетъчни карциноми (Фиг. 22).



Фигура 22: PCR амплификацията на проба с положителна *EGFR* мутация (делеции в екзон 19 – Deletions Reaction Mix) и амплификация на контролата за същата проба (Control Reaction Mix);

Стойностите на ΔCT за пробата се изчисляват като разликата между CT стойността на амплифицираната мутация и контролен CT стойност същата проба:

ΔCT = mutation (мутация) CT – control (контрола) CT

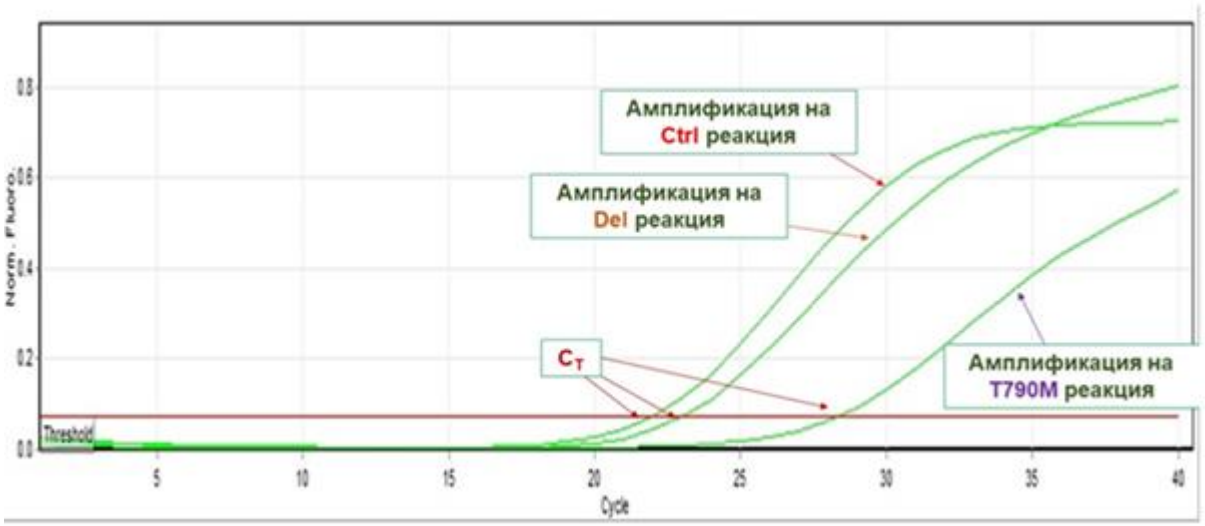
ΔCT (2.97) = 29.42 (мутация Del) CT – 26.45 (контрола Ctrl) CT

Стойността на ΔCT за пробата се сравнява с cut-off стойността за тази мутация съгласно указанията на производителя (Qiagen) (Табл. 5 на страница 70); При ΔCT стойност под cut-off (9.06) пробата се счита за положителна мутация за делеции в екзон 19;

Мутация L858R в *EGFR* гена е установена при 17 белодробни аденокарциноми и 3 плоскоклетъчни карциноми. Мутация с инсерции в екзон 20, определяща

нечувствителност към EGFR тирозин-киназни инхибитори е открита в два тумора – един аденокарцином и един плоскоклетъчен карцином.

При двама от пациентите се откриват две мутации едновременно. При единия пациент с плоскоклетъчен карцином са определени: делеции в екзон 19 и точкова мутация T790M в екзон 20, която е нечувствителна към тирозин-киназни инхибитори (Фиг. 23). При втория пациент с аденокарцином се откри делеции в екзон 19 и точковата мутация S768I в екзон 20, която е с намалена чувствителност към тирозин-киназните инхибитори.



Фигура 23: PCR амплификацията на проба с два вида мутации в EGFR гена (делеции в екзон 19 – Deletions Reaction Mix и T790M точкова мутация) и амплификация на контролата за същата проба (Control Reaction Mix).Стойностите на ΔCT за пробата се изчисляват като разликата между CT стойността на амплифицираната мутация и контролна CT стойност на същата проба:

ΔCT = mutation (мутация) CT – control (контрола) CT
ΔCT (1.02) = 23.07 (мутация Del) CT – 22.05 (контрола Ctrl) CT
ΔCT (6.38) = 28.43 (мутация T790M) CT – 22.05 (контрола Ctrl) CT

Стойността на ΔCT за пробата се сравнява с cut-off стойността за тази мутация в таблица съгласно указанията на производителя (Qiagen) (Табл. 5 на страница 70); При ΔCT стойност на пробата под cut-off стойността (9.06), пробата се счита за открита положителна мутация за делеции в екзон 19; ΔCT стойността на пробата за втората мутация е в cut-off стойността (6.38), пробата се счита за открита положителна мутация за T790M точкова мутация;

С най-висока честота са делециите в екзон 19 - 56.40% (n=31), следвани от мутацията L858R в екзон 21 - 36.40% (n=20). Общо те представляват около 92.7% от всички *EGFR*

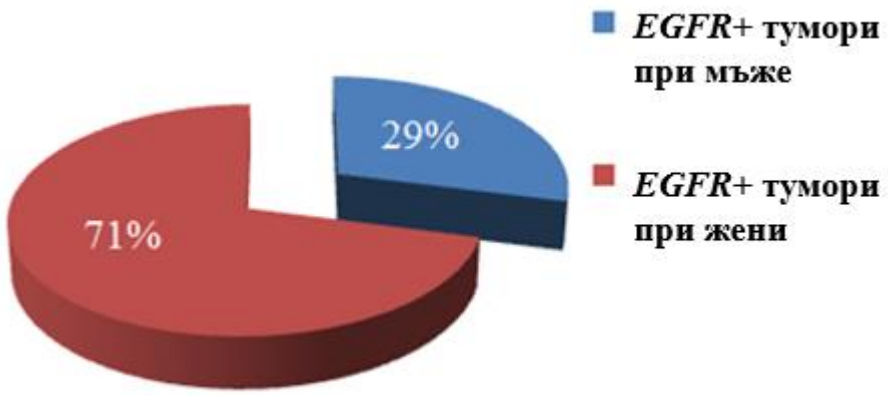
активиращи мутации. В нашата кохорта тези два вида мутации са установени само в аденокарциноми. Всички делеции в екзон 19 са в проби на пациенти в IV-ти стадий. Мутацията L858R предоминиращо се открива в IV стадий в нашата извадка – 90% (n=18). Останалите мутации са по-редки: инсерции в екзон 20 - 3,6% (n=2), двойна мутация - T790M, комбинирана с делеция в екзон 19 - 1,8% (n=1) и двойна мутация - S768I с делеция в екзон 19 - 1,8% (n=1). Не са доказани останалите мутации, включени в теста: L861Q, S768I, G719A, G719S, G719C.

Проведен е анализ за честотата на мутациите в туморните проби в зависимост от:

- Пол;
- Туморна хистология ;
- Тютюнопушене.

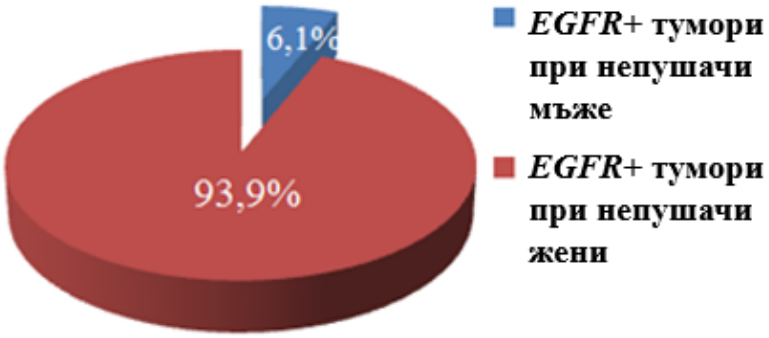
2.3. Анализ на фенотип/генотип корелации

EGFR положителен мутационен статус е установен при 55 тумори, които разпределени по пол са 71% при жени (n=39) и 29% при мъже (n=16) (P <0,001) (Фиг. 24).



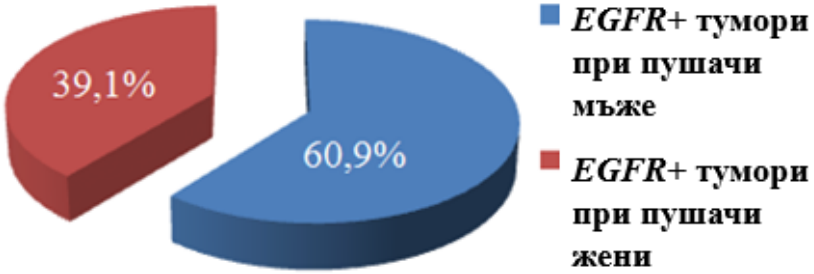
Фигура 24: Разпределението на *EGFR* позитивни тумори според пола на пациентите

В групата на непушачите (n=32) *EGFR* позитивни тумори са установени предимно при жени 93,9% (n=30) (фиг.25).



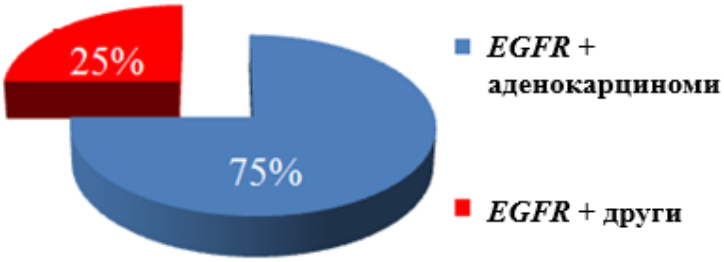
Фигура 25: Разпределение спрямо пола на *EGFR* позитивни тумори при пациенти непушачи

В групата на пушачите (n=23), *EGFR* позитивните тумори предоминират при мъжете - 60,9% (n=14) спрямо жените 39,1% (n=9) (P <0,003) (Фиг. 26).



Фигура 26: Разпределение на *EGFR* позитивни тумори спрямо пола на пациенти пушачи

EGFR позитивни тумори (n=55) са значимо по-чести при аденокарциноми 75% (n=41) спрямо другите хистологични типове 25% (n=14) (P < 0.001) (плоскоклетъчен карцином и едроклетъчен карцином), (фиг. 27).



Фигура 27: Разпределение на *EGFR*-положителните случаи според хистологичния вариант на туморите, при които са установени

На табл.10 са представени обобщените данни за *EGFR* мутациите в изследваната кохорта пациенти с НДКБК по отношение на клинико-патологични данни.

Таблица 10: Обобщени данни за изследваните пациенти за *EGFR* мутационен статус

Клинични и килинопатологични характеристики	**Брой пациенти**	**Брой пациенти с див тип ген или с мутация**		**P-value**
		Mut	**WT**	
Пол				$1x10^{-15}$
Мъже	407	16	391	
Жени	144	39	105	
Хистология				0.000232
Аденокарцином	276	41	235	
Други хистологични типове	275	14	261	
Тютюнопушене				0.002807
Пушачи	338	23	315	
Непушачи	213	32	181	

3. Данни от NGS секвениране с карциномен панел на ДНК-и от кръвни проби на пациенти с фамилен папиларен тиреоиден карцином

3.1. Родословия на четири фамилии с ФПТК

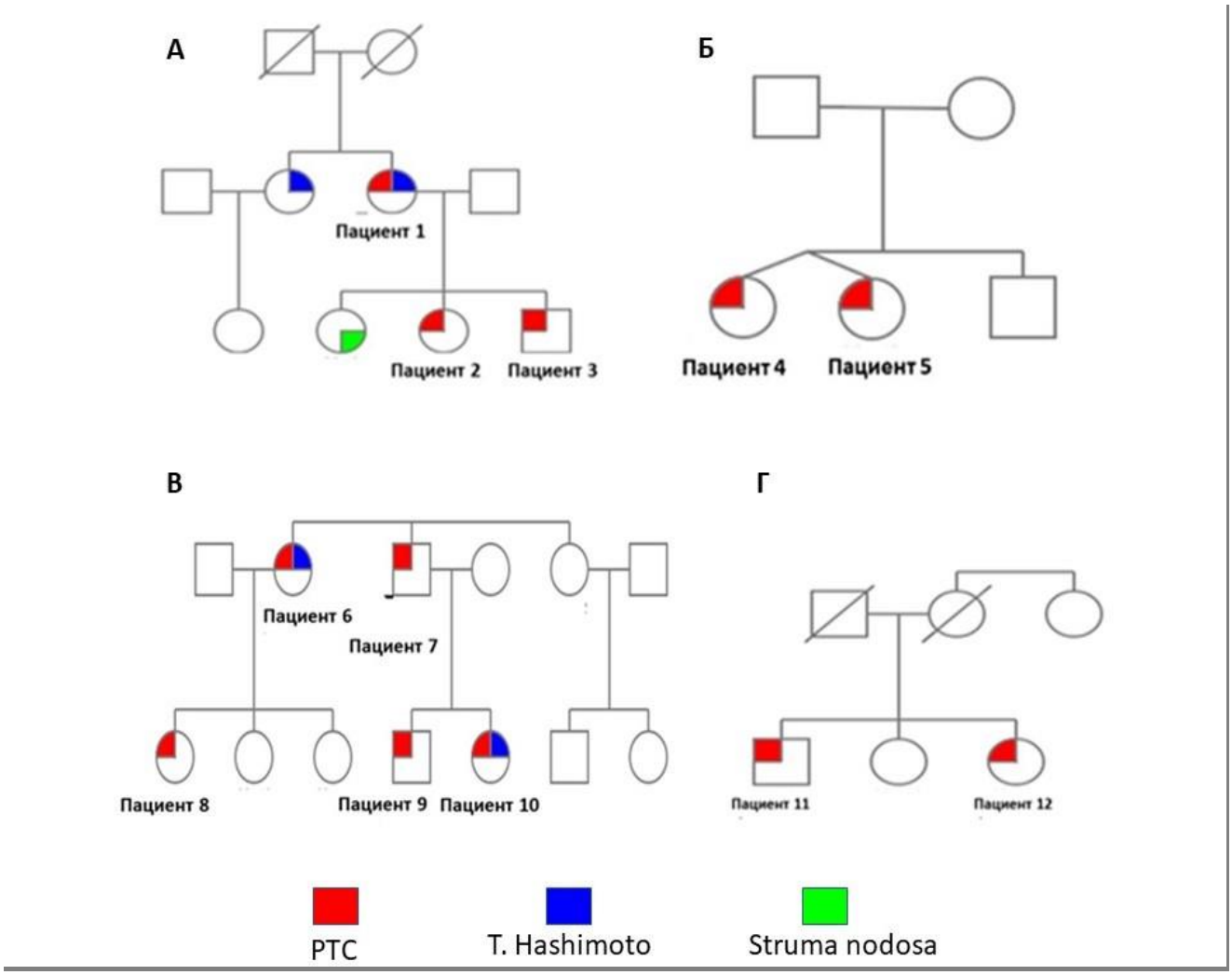
Извършено е NGS секвениране с карциномен панел на ДНК-и, изолирани от кръвни проби на 12 пациента от четири семейства (I,II,III,IV) с ФПТК (Табл. 11).

Таблица 11. Секвенирани пациенти с фамилен папиларен тиреоиден карцином от четири семейства

Фамилии	**Пациенти**	**Туморен статус**
I	№1	pT4 N0 M0
	№2.	pT1b N0 M0
	№3	pT1a N0 M0
II	№4,	pT4 N1 M0
	№5.	pT2 N1b M0

III	№6,	pT1a N0 M0
	№7.	pT1b N0 M0
	№8,	pT2 N1 M0
	№9,	pT1b N1 M0
	№10	pT3 N1a M0
IV	№11,	pT2 N1a M0
	№12	pT2 N0 M0

На фигури 28 А, Б, В и Г са представени родословните дървета на четирите семейства със заболявания на щитовидната жлеза.



Фигура 28: Родословия на четирите фамилии с ФПТК;

3.2. Патогенни варианти в гени, свързани с карциногенеза, определени при NGS секвениране на пациенти с ФПТК

Извършено е NGS секвениране с TruSight Cancer Sequencing Panel, Illumina на ДНК-и, изолирани от кръвни проби на 12 пациенти с фамилен папиларен тиреоиден карцином. Всички открити варианти са секвенирани по сенс веригата. Анализирани са варианти в гени, свързани с карциногенезата. Определени са 8 типа патогенни варианти в 3 гени (*MET, RET, MLH1*), общо 15 на брой, които се срещат при 9 пациента в повече от една фамилия или са редки варианти (Табл. 12 и Табл. 13).

Таблица 12: Патогенни варианти, които се срещат в повече от една фамилия

Гени	**Варианти**	**Ф а**	**Ф б**	**Ф в**	**Ф г**	**Болни брой**	**Sift**	**PolyPhen**
MET	rs56391007		1	2		**3**	патогенни	вероятно патогенни
RET	rs181856591		2	1		**3**	патогенни	вероятно патогенни
MLH1	NP_000240.1:p.Glu23Gly			3	1	**4**	патогенни	вероятно патогенни

Таблица 13: Редки патогенни варианти

Гени	**Варианти**	**Ф а**	**Ф б**	**Ф в**	**Ф г**	**Болни брой**	**Sift**	**PolyPhen**
MET	NP_001120972.1:p.Leu1080Met		1			**1**	патогенни	вероятно патогенни
MET	NP_001120972.1:p.Phe1234Ser				1	**1**	патогенни	вероятно патогенни
MET	NP_001120972.1:p.Pro712Gln			1		**1**	патогенни	вероятно патогенни
MET	NP_001120972.1:p.Ser823Tyr			1		**1**	патогенни	вероятно патогенни
MLH1	NP_000240.1:p.Gly634Val				1	**1**	патогенни	вероятно патогенни

От 12 пациенти, 9 са носители на патогенни варианти. От тях 5 пациента имат повече от 1 мутантен ген (Табл. 14).

Таблица 14: Индивидуални патогенни варианти

Пациенти	Гени	Варианти	Генотип	Sift (cutoff=0.05)	PolyPhen
№4	*MET*	NP_001120972.1:p.Leu1080Met	CA	патогенни	вероятно патогенни
	RET	rs181856591	CA	патогенни	вероятно патогенни
№5	*MET*	rs56391007	CT	патогенни	вероятно патогенни
	RET	rs181856591	CA	патогенни	вероятно патогенни
№6	*MET*	NP_001120972.1:p.Pro712Gln	CA	патогенни	вероятно патогенни
	MLH1	NP_000240.1:p.Glu23Gly	AG	патогенни	вероятно патогенни
№7	*MET*	NP_001120972.1:p.Ser823Tyr	CA	патогенни	вероятно патогенни
№8	*MET*	rs56391007	CT	патогенни	вероятно патогенни
	MLH1	NP_000240.1:p.Glu23Gly	AG	патогенни	вероятно патогенни
	RET	rs181856591	CA	патогенни	вероятно патогенни
№9	*MET*	rs56391007	CT	патогенни	вероятно патогенни
№10	*MLH1*	NP_000240.1:p.Glu23Gly	AG	патогенни	вероятно патогенни
№11	*MET*	NP_001120972.1:p.Phe1234Ser	TC	патогенни	вероятно патогенни
	MLH1	NP_000240.1:p.Gly634Val	GT	патогенни	вероятно патогенни
№12	*MLH1*	NP_000240.1:p.Glu23Gly	AG	патогенни	вероятно патогенни

RET

Вариантът rs181856591 се среща при 25% от пациенти (n=3) в хетерозиготно състояние – CA генотип и хомозиготи - CC генотип 75% (n=9). Според предикцията по SIFT, този вариант се класифицира като патогенен или вреден (deleterious) и според PolyPhen се определя като вероятно патогенен (probably damaging).

Патогенни мутации в този ген водят до развитието на наследствени ракови синдроми - множествената ендокринна неоплазия тип 1 и тип 2 и медуларен тиреоиден карцином.

MET

Вариантът rs56391007 се среща при 25% от пациентите (n=3) в хетерозиготно състояние – CT генотип и хомозиготи - CC генотип 75% (n=9). Според предикцията по SIFT, този вариант се класифицира като патогенен (deleterious) и според PolyPhen се определя като вероятно патогенен (probably damaging).

Варианти в този ген са асоциирани с папиларен карцином на бъбреците и хепатоцелуларен карцином. В 33% (n=4) от пациентите са намерени SNPs варианти в

MET, които не са публикувани в базите данни и няма докладвана асоциация между тях и патологичен фенотип (NP_001120972.1:p.Leu1080Met, NP_001120972.1:p.Phe1234Ser, NP_001120972.1:p.Pro712Gln, NP_001120972.1:p.Ser823Tyr). Според предикцията по SIFT, тези варианти се класифицират като патогенен (deleterious) и според PolyPhen се определят като вероятно патогенен (probably damaging).

MLH1

В общо 41,7% (n=5) от пациентите се откриха варианти в този ген, като и двата не са публикувани досега. При 33,3% (n=4) от изследваните пациенти, се открива вариантът NP_000240.1:p.Glu23Gly. Според SIFT стойността той се определя като вреден (deleterious) и според PolyPhen се определя като възможно вреден (possibly damaging). В 8,3% (n=1) е открит също неанотиран вариант - NP_000240.1:p.Gly634Val, който според предикцията по SIFT се класифицира като патогенен (deleterious) и според PolyPhen се определя като вероятно патогенен (probably damaging).

Патогенни мутации в този ген са докладвани, че са асоциирани с колоректален карцином.

3.3. Фармакогенетични варианти при ФПТК, определени чрез секвениране с карциномен панел

Определени са 6 типа фармакогенетични варианти, общо 45 на брой, които се срещат при 12 пациента. Тези варианти са локализирани в 6 гена - *ERCC2* (rs13181), *TP53* (rs1042522), *XPC* (rs2228001), *EGFR* (rs2227983), *ERCC5* (rs17655) и *RET* (rs1799939) (Табл. 15). Откритите генетични варианти бяха подложени на анализ за ролята им като фармакогенетични варианти свързани с терапията със специфични химиотерапевтици. Всички открити варианти са секвенирани по сенс веригата. За референтна база данни, включително и за алелните честотите в европейска популация, беше използвана PharmGKB. Установи се, че 6 от вариантите имат фармакогенетично значение за определени химиотерапевтици. Според двата предиктора SIFT и PolyPhen тези фармакогенетични варианти са съответно толерантни и доброкачествени.

Таблица 15: Варианти асоциирани с терапевтичния отговор към химиотерапевтици при пациенти с фамилен папиларен тиреоиден карцином

Пациенти	Гени	Варианти	Генотип	SIFT	PolyPhen
№1	*EGFR*	rs2227983	AA	Толерантен	Доброкачествен
	ERCC2	rs13181	TG	Толерантен	Доброкачествен
	TP53	rs1042522	GC	Толерантен	Доброкачествен
	XPC	rs2228001	GT	Толерантен	Доброкачествен
	RET	rs1799939	GA	Толерантен	Доброкачествен
№2	*EGFR*	rs2227983	GA	Толерантен	Доброкачествен
	TP53	rs1042522	CC	Толерантен	Доброкачествен
№3	*EGFR*	rs2227983	GA	Толерантен	Доброкачествен
	ERCC2	rs13181	TG	Толерантен	Доброкачествен
	TP53	rs1042522	GC	Толерантен	Доброкачествен
№4	*EGFR*	rs2227983	GA	Толерантен	Доброкачествен
	ERCC2	rs13181	TG	Толерантен	Доброкачествен
	TP53	rs1042522	CC	Толерантен	Доброкачествен
	XPC	rs2228001	GT	Толерантен	Доброкачествен
	RET	rs1799939	GA	Толерантен	Доброкачествен
№5	*ERCC2*	rs13181	TG	Толерантен	Доброкачествен
	TP53	rs1042522	CC	Толерантен	Доброкачествен
	XPC	rs2228001	TT	Толерантен	Доброкачествен
	RET	rs1799939	GA	Толерантен	Доброкачествен
№6	*ERCC5*	rs17655	GC	Толерантен	Доброкачествен
	TP53	rs1042522	GC	Толерантен	Доброкачествен
	XPC	rs2228001	GT	Толерантен	Доброкачествен
	RET	rs1799939	GA	Толерантен	Доброкачествен
№7	*ERCC5*	rs17655	GC	Толерантен	Доброкачествен
	ERCC2	rs13181	TG	Толерантен	Доброкачествен
	TP53	rs1042522	CC	Толерантен	Доброкачествен
	RET	rs1799939	GA	Толерантен	Доброкачествен
№8	*ERCC2*	rs13181	TG	Толерантен	Доброкачествен
	XPC	rs2228001	GT	Толерантен	Доброкачествен
№9	*ERCC5*	rs17655	GC	Толерантен	Доброкачествен
	EGFR	rs2227983	GA	Толерантен	Доброкачествен
	ERCC2	rs13181	TG	Толерантен	Доброкачествен
	TP53	rs1042522	CC	Толерантен	Доброкачествен

	XPC	rs2228001	TT	Толерантен	Доброкачествен
	RET	rs1799939	GA	Толерантен	Доброкачествен
№10	*ERCC5*	rs17655	GC	Толерантен	Доброкачествен
	ERCC2	rs13181	TG	Толерантен	Доброкачествен
	TP53	rs1042522	CC	Толерантен	Доброкачествен
	XPC	rs2228001	GT	Толерантен	Доброкачествен
№11	*EGFR*	rs2227983	GA	Толерантен	Доброкачествен
	TP53	rs1042522	CC	Толерантен	Доброкачествен
	XPC	rs2228001	GT	Толерантен	Доброкачествен
№12	*EGFR*	rs2227983	GA	Толерантен	Доброкачествен
	XPC	rs2228001	TT	Толерантен	Доброкачествен
	RET	rs1799939	GA	Толерантен	Доброкачествен

TP53

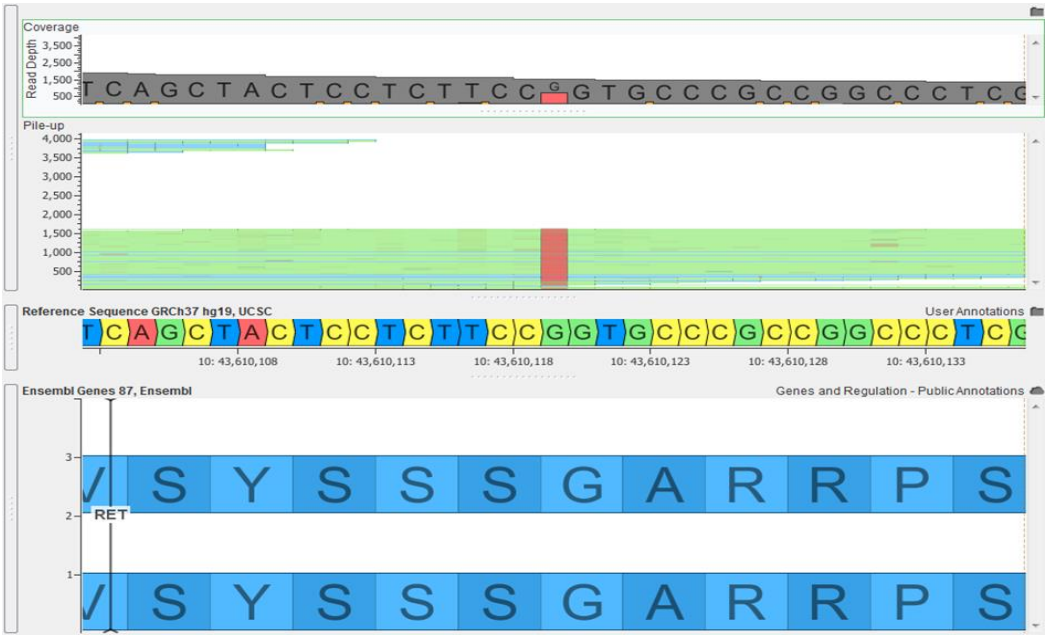
Резултатите показват, че SNP вариантът rs1042522 в *TP53* се среща при 83,3% от нашите пациенти (n=10). C-алел (честота в европейска популация 0,71) е представен в хетерозиготно състояние (GC генотип) при 25% (n=3) и в хомозиготно състояние (CC) в 58,3% (n=7) от изследваните пациенти и хомозиготи - GG генотип са 16,7% (n=2). Алел-C е асоцииран с намален риск за токсичност при лечение с циклофосфамид и флуроурацил в сравнение с алел-G.

ERCC2

SNP вариантът rs13181 в *ERCC2* гена се среща при 66,7% (n=8) от пациентите, като при всички е в хетерозиготно състояние – TG генотип и при TT генотип 33,3% (n=4). Честотата на G-алел в европейска популация се оценява на 0,36. При пациентите, лекувани с платинови съединения, се наблюдава по-висока преживяемост при TT генотипв сравнение с тези с GG генотип. В допълнение алел-G се асоциира с повишена токсичност на флуороурацил и леуковорин.

RET

Честотата на SNP варианта rs1799939 е 58,3% (n=7) при изследвани пациенти в хетерозиготно състояние – GA генотип и при хомозиготи GG генотип е 41,7% (n=5) (Фиг. 29). Честотата на A-алела в европейска популация е 0,19. Алел-A не се асоциира с по-висока токсичност при лечение със сунитиниб, но статистическата значимост на това твърдение е недостатъчна.



Фигура 29: SNP вариантът rs1799939 в хетерозиготно състояние GA генотип

EGFR

Резултатите показват, че SNP вариантът rs2227983 в *EGFR* гена се среща при 58,3% от нашите пациенти (n=7). Честотата на А-алела в европейска популация е 0,28. От изследваните пациенти 50% (n=6) са хетерозиготи (GA генотип) и 8,3% (n=1) са хомозигот по А-алел (АА генотип) и хомозиготи - GG генотип са 41,7% (n=5). Генотип АА и генотип GA са асоциирани с намален риск от обрив при лечение с EGFR инхибитори.

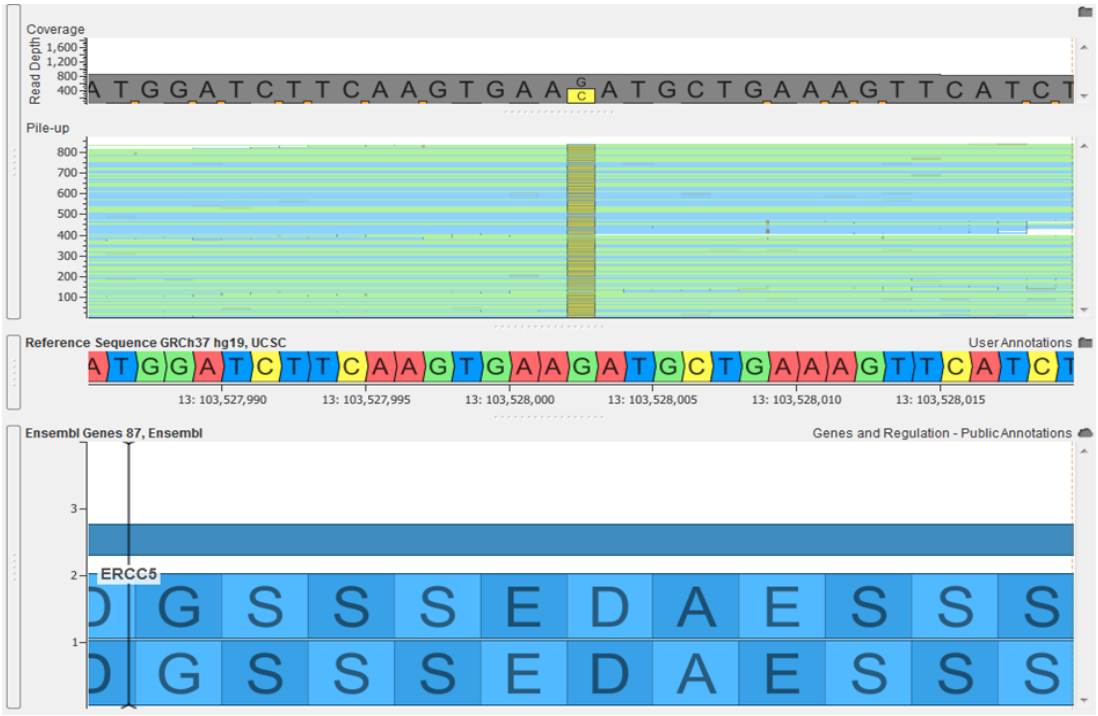
XPC

SNP вариантът rs2228001 в гена *XPC* се среща при 75% от нашите пациенти (n=9). Честотата на Т-алела в европейска популация е 0,6. От изследваните пациенти 50% (n=6) са хетерозиготи (GT генотип), и 25% (n=3) са хомозиги (TT генотип) и хомозиготи - GG генотип са 25% (n=3). Генотип GT и GG се асоциират с повишен риск от токсичност при лечение с цисплатин при сравнение с честотата на токсични реакции при пациенти с TT генотип.

ERCC5

SNP вариантът rs17655 в *ERCC5* гена присъства при 33,3% (n=4) от пациентите в хетерозиготна форма – GC генотип и 66,7% (n=8) от пациентите в хомозиготно

състочние GG генотип (Фиг. 30). Честотата на C-алела в европейска популация е 0,25. Данните за този вариант са противоречиви. Търсената асоциация между него и преживяемостта при лечение с цисплатина е неубедителна според литературата.



Фигура 30: SNP вариантът rs17655 в хетерозиготно състояние GC генотип

VI. Обсъждане

1. Обсъждане на патогенни варианти в гени, асоциирани с карциногенеза при НДКБК

При анализа на данните от NGS секвенирането на 18-те туморни проби се установиха 7 типа патогенни варианти (според PolyPhen и SIFT предикторите), общо 21 на брой, разпределени в четири гена свързани с туморогенезата - *BRCA1, PMS2, MLH1* и *PALB2*.

BRCA1

BRCA1 е тумор-супресорен ген участващ в процесите на ДНК-репарация и регулация на транскрипционната активност в отговор на ДНК-увреждания. BRCA протеините са необходими за поддържане на хромозомна стабилност, като по този начин осъществяват протективна функция спрямо геномни увреждания. Нови данни показват също така, че BRCA регулират транскрипцията на гени, участващи в репарацията на ДНК, клетъчния цикъл и апоптозата [Yoshida and Miki, 2004]. *BRCA1* е един от основните гени, мутации, в които водят до развитие на наследствен рак на млечната жлеза и овариума, а варианти с малък самостоятелен ефект в него увеличават риска за развитие на заболяване при спорадичните и фамилни форми на РМЖ [Ricks-Santi, 2013]. Мутации в този ген също се асоциират още със серозен папиларен карцином на перитонеума и рак на простатата.

Литературните данни подкрепят клиничното значение на вариантите с малък ефект за развитието на фамилната форма на РМЖ. SNP варианти с малък индивидуален рисков потенциал са описани в *BRCA1*, *BRCA2, ATM, CHEK2* и *TP53* [Pharoah, 2004, Rahman, 2007, Johnson, 2007]. Те имат кумулативен ефект и едновременното присъствие на всички или някои от тях води до клинично значимо увеличение на риска за РМЖ. Pharoah et al, и Rahman, et al доказват, че варианти в тези гени, при достигане на определен надпрагов брой и в комбинация с определени фактори на средата, стила на живот и репродуктивната история могат да доведат до развитие на заболяването ($P = 0,005$) [Pharoah, 2004, Rahman, 2007]. Анализът на Johnson et al. също демонстрира ясната тенденция за увеличаване на тежестта и ролята на вариантите с малък ефект при увеличаване на броя изследвани генетични варианти ($P = 0.00004$) [Johnson, 2007].

Всеки потенциално функционален SNP вариант в тези гени има значение, тъй като при акумулиране на достатъчен брой, влияе на проявата на фенотипа [Johnson, 2007].

При анализа на нашите данни се установиха три патогенни SNP варианти в *BRCA1* - rs16941, rs80356964 и rs1799950.

В нашата извадка SNP вариантът rs16941 в *BRCA1* гена се открива в хетерозиготно състояние - генотип TC при 16,7% (n=3), в хомозиготно състояние - CC-генотип в 16,7% (n=3) и в хомозиготно състояние – генотип TT в 66,6% (n=12). Предполага се, че rs16941 влияе на експресията на BRCA1 протеина [Mangia, 2009]. В европейската популация този SNP вариант се асоциира с риска за развитие на РМЖ - CC генотип определя слабо повишен риск за РМЖ в сравнение с генотип TT (OR, 1.17, 95% Cl, 1.07–1.35, P = 0.033) [Xu, 2018]. Няма данни за rs16941 и неговата асоциация с рак на белия дроб.

В нашата извадка SNP вариантът rs1799950 в *BRCA1* гена се открива в хетерозиготно състояние - генотип TC при 27,8% (n=5) и в хомозиготно състояние – генотип TT в 72,2% (n=13). Няма установени тумори с генотип CC. Предполага се, че rs1799950 също има влияние върху риска за развитие на РМЖ при европейска популация – CC-генотип се асоциира с леко повишен риск спрямо генотип TT [snpedia.com, 2018]. Няма данни за rs1799950 и неговата асоциация с рак на белия дроб.

В нашата извадка SNP вариантът rs80356964 в *BRCA1* гена се открива в хетерозиготно състояние - генотип GA при 22,2% (n=4) и в хомозиготно състояние – генотип GG в 77,8% (n=14). Няма тумори с други генотипни комбинации. Вариант rs80356964 е с неясно значение. In silico анализът показва, че този SNP, намиращ се в богатия на серин домен води до промяна на неконсервативен нуклеотид, който в 4/5 програми за in silico анализ се определя като патогенен [Henrie, 2018]. Тези предварителни данни трябва да бъдат потвърдени с функционален анализ преди да може да се направи окончателна оценка на ролята му.

При нашия софтуерен анализ двата предиктора дават различна оценка за патогенността на един от вариантите. Според стойността на PROVEAN коефициента, трите варианта се класифицират като патогенни, докато според SIFT анализа един от вариантите (rs1799950) се определя като „толерантен," а другите два варианта rs16941 и rs80356964

се класифицират като патогенни. Данните от нашата извадка туморни проби са основа за разширяване на изследванията върху ролята и значението на тези варианти в контекста на рака на белия дроб. *BRCA1* е един от тумор-супресорните гени, в който често се установяват соматични мутации при различни неоплазми. Имайки предвид водещата му роля за поддържане на хромозомна стабилност и регулацията на активността на гени, участващи в репарацията на ДНК, клетъчния цикъл и апоптозата не би било изненадващо установяването на ролята на вариантите в *BRCA1* за развитието на туморния процес при редица злокачествени заболявания, включително и рака на белия дроб.

MLH1

MLH1 е тумор-супресорен ген, кодиращ протеин, участващ в отстраняването на погрешно сдвоени бази в ДНК (mismatch repair system) и е един от гените, в които патогенни мутации водят до развитие на наследствен неполипозен колректален карцином като част от спектъра на синдромите на Линч. Носителството на патогенна мутация в *MLH1* определя риск от 34% за развитие на КРК до 70 год. възраст при мъжете и 47% при жените. Рискът за развитие на ендометриален карцином при патогенна мутация в *MLH1* е 18% [Dowty, 2013].

При нашето изследване се установи един вариант в *MLH1*. Вариантът rs63751049 се среща при 5,6% (n=1) в хетерозиготно състояние - CT генотип и в хомозиготно състояние - TT-генотип в 94,4% (n=17). Хомозиготи по алел C не се наблюдават в нашата извадка. Според двата използвани предиктора (PROVEAN и SIFT) този вариант се определя като патогенен. Литературните данни относно значението му са противоречиви, като класификията варира от „доброкачествен“ до „вариант с неясно значение“. C-алелът на варианта rs63751049 в *MLH1* (c.977T> C (p.Val326Ala)) води до аминокиселинна замяна в еволюционно консервативен регион. 75% от in silico софтуерните предиктори класифицират мутацията като патогенна. Този вариант е докладван при засегнати членове от четири семейства с HNPCC [Spaepen, 2006, Hardt, 2011], но за тези семейства не е налице подробна генотипна и фенотипна информация, за да се установи дали вариантът сегрегира с болестта. При популационни проучвания този вариант се открива в 65 от 122538 контролни хромозоми, преобладаващо в южноазиатската субпопулация - честота 0.0033113 (3/906). Тази честота е около 2 пъти

над очакваната максимална алелна честота за патогенен *MLH1* вариант (0.0007105), което предполага вероятно доброкачествения характер на този полиморфизъм за южноазиатската популация. В противовес на данните на Spaepen и Hardt, Pastrello et al. докладват семейство, при което вариантът се среща както при засегнати, така и при здрави членове на семейството [Pastrello, 2011]. В допълнение, туморните тъкани от пациенти с този вариант не показват загуба на хетерозигозност, загуба на експресия на *MLH1* или *MSH2* или микросателитна нестабилност [Spaepen, 2006, Hardt, 2011, Pastrello, 2011, Dieumegard, 2000]. При двухибриден анализ на дрожди е устновено, че *hMLH1* V326A не влияе на асоциацията на протеина с hPMS2 и hEXO1 [Kondo, 2003]. Проучванията на Borras et al. показват, че мутацията не засяга и сплайсинга [Borras, 2012]. Всички тези проучвания свидетелстват за липсата на съществен фунционален ефект на този вариант. На базата на публикуваните данни настоящата оценка клони към „доброкачествен / вероятно доброкачествен“. Няма литературни данни дали вариантът спада към групата на вариантите с малък ефект, които могат да определят предразположение към злокачествени заболявания. Необходимо е провеждането на по-мащабни и задълбочени проучвания върху туморогенния му потенциал, както при рак на белия дроб, така и при други неоплазми, за да се даде окончателна оценка на значението му за развитието на неопластичните процеси.

PMS2

PMS2 е тумор-супресорен ген, кодиращ протеин, участващ в отстраняването на погрешно сдвоени бази в ДНК (mismatch repair system) и е един от гените, в които патогенни мутации водят до развитие на наследствен неполипозен колректален карцином като част от спектъра на синдромите на Линч. PMS2 е основният партньор на MLH1. Носителството на патогенна мутация в *PMS2* определя риск от 19% за развитие на КРК до 70 год. възраст при мъжете и 11% при жените. Рискът за развитие на ендометриален карцином при патогенна мутация в *PMS2* е 12% [Broeke, 2015].

При нашето изследване се установи един вариант в *PMS2*. В нашата кохорта вариантът rs146176004 се среща при 11,1% (n=2) от туморните проби в хетерозиготно състояние – CG генотип, в 88,9% (n=16) се открива хомозиготен CC-генотип и не се откриват тумори с генотип GG. И двата софтуера за предикция - PROVEAN и SIFT, определят този вариант като патогенен, влияещ негативно върху функцията на протеина.

Публикуваните данни го определят като „вариант с неясно значение“. Вариантът rs146176004 засяга еволюционно консервативен нуклеотид, което води до промяна на аминокиселината от Gly към Ala. In silico анализът на 4 от 4 софтуерни алгоритми прогнозира патогенния му характер. Тези in silico данни не са потвърждават от експериментални проучвания. Вариантът е открит в 60/118094 контролни хромозоми (1 хомозигот) - честота от 0.0005081. Тази честота може да не е репрезентативна, тъй като използваната технология за определяне на последователността не е в състояние да различи *PMS2* от многобройните му псевдогени. Вариант rs146176004 е докладван при поне един *BRCA1/2*-негативен пациент с ранен рак на млечната жлеза [Maxwell, 2015], един пациент с КРК, при който също е установена и делеция в екзон 10 на *PMS2* [Goodenberger, 2016]. Така настоящата оценка за този вариант остава „с неясно значение“ и ролята му общо за злокачествените процеси, както и в по-тесен смисъл за рака на белия дроб, предстои да бъде изяснена.

PALB2

PALB2 е ген кодиращ протеин първоначално идентифициран като партньор на BRCA2 с решаващо значение за правилното му функциониране. В последствие също така е установено, че си партнира и с BRCA1 [Antoniou, 2014]. Герминативните биалелни мутации водят до развитие на анемия на Fanconi, докато моноалелни мутации се асоциират с повишен риск за рак на млечната жлеза и панкреаса [Tischkowitz and Xia, 2010]. Носителството на патогенна мутация в *PALB2* определя риск от 33% за развитие на РМЖ до 70 год. възраст при жените без фамилна анмнеза за РМЖ и 58% за жените с фамилна анамнеза за РМЖ [Antoniou, 2014].

При нашето изследване се установиха два варианта в *PALB2* - rs75023630 и rs4555163.

В нашата извадка вариантът rs75023630 се среща при 5,6% (n=1) от туморните проби в хетерозиготно състояние – CA генотип и в хомозиготни състояние - CC-генотип 94,4% (n=17). Не се открива генотип AA в изследваните тумори. Този вариант се счита за „вероятно доброкачествен“ или „доброкачествен“. Тази оценка се основава на следните критерии: мутацията води до консервативна аминокиселинна замяна, in silico анализите я определят като вероятно доброкачествена, популационната честота е по-висока от тази характерна за патогенните мутации. Няма литературни данни, доказващи

еднозначно патогенния или доброкачествения характер на този вариант [Thompson, 2015].

В нашата извадка вариантът rs45551636 се среща при 5,6% (n=1) в хетерозиготно състояние - CT генотип и в хомозиготно състояние - CC-генотип в 94,4% (n=17). Няма установени тумори с хомозиготен TT генотип. Този вариант се счита за „вероятно доброкачествен“ или „доброкачествен“. Тази класификация се основава на следните критерии: мутацията води до консервативна аминокиселинна замяна, in silico анализите я определят като вероятно доброкачествена, популационната честота е по-висока от характерната за патогенните мутации честота. Ограничените литературни данни показват асоциация на T-алела на *PALB2* c.2993C>T (rs45551636 CT вариант) с повишен риск за РМЖ в семейства с фамилна анамнеза за заболяването - $OR = 3.3$ $p < 0.01$ [Leyton, 2015]. Няма литературни данни, доказващи еднозначно патогенния или доброкачествения характер на този вариант.

И за двата варианта открити в *PALB2* в нашата туморна извадка литературните данни са оскъдни. Няма достоверни прочувания за ролята им в патогенезата, както на РМЖ така и на рака на белия дроб и другите злокачествени процеси. PALB2 е участник в един от основните пътища в клетката, чиято регулация е нарушена при неопластичната трансформация при множество злокачествени заболявания и се очаква в бъдеще ролята на вариантите с неясно значение в него, както и в другите тумор-супресорни гени да бъдат подложени на задълбочени анализи при големи кохорти пациенти, които да открият мястото на тези полиморфизми поотделно и заедно в развитието на туморния процес.

2. Обсъждане на фармакогенетични варианти в гени за туморогенеза при НДКБК за избор на химиотерапия

Съгласно препоръките за поведение при НДКБК (MOPE 2013) [Georgieva M., 2013], изборът на първа линия терапия при напреднал НДКБК се основава на патохистологични изследвания и присъствие на определени генетични маркери – активиращи мутации в *EGFR* гена и *ALK* пренареждания. При пациенти с НДКБК, които имат *EGFR* положителен мутационен статус или *ALK* пренареждане е показано лечение с EGFR тирозин-киназни инхибитори като гефтиниб, ерлотиниб или афатиниб или съответно - ALK инхибитори като кризотиниб. Прицелната терапия е приложима

само при подходящи пациенти, след провеждане на генетично изследване за мутационен статус.

При липса на мутации, които създават чувствителност към тези медикаменти, пациентите се лекуват с платина базирани химиотерапевтични режими [Novello, 2016].

Като предиктивен маркер за отговора към лечение с платина-базирана химиотерапия се препоръчва изследване на *ERCC1*-експресия. Като предиктивен маркер за отговора към лечение с гемцитабин базирана химиотерапия се препоръчва изследване на *RRM1*-експресия [Georgieva M., 2013].

Новите NGS технологии разширяват възможностите за диагностициране на генетични варианти и за определяне на SNPs с фармакогенетично значение, които дават възможност за допълнително персонализиране на терапията според мутационния профил на тумора и генетичните характеристики на пациента.

При анализа на данните от NGS-секвенирането на туморите от нашата извадка са установени пет SNP варианта в четири гена - rs1042522 в *TP53*, rs2228001 в *XPC*, rs2227983 в *EGFR*, rs1799793 и rs13181 в *ERCC2*, като четири от вариантите са толерантни или неутрални и само един - rs1799793 в *ERCC2* гена, е патогенен според PROVEAN предиктора (Табл. 16). Тези данни са в съответствие с тезата, че фармакогенетичните варианти не влияят на появата или развитието на онкологичния процес, но могат да имат значение за терапевтичния отговор, преживяемостта и риска от нежелани лекарствени реакции (НЛР).

Таблица 16: Генетични варианти при НДКБК с информация за фармакогенетичен ефект

Ген	**Хромозома**	**SNP**	**Генотип**	**Брой на пациенти със съответния генотип**	**Фармакогенетичен ефект**	**Тип на полиморфизма**	**Ефект на мутацията в полипептидната верига**	**SIFT cutoff =0.05**	**PROVEAN cutoff = -2.5**
TP53	chr17	rs1042522	CC	14	Намален риск от токсичност при лечение с циклофосфамид и флуроурацил	Missense	72P > R	Толерантен	Неутрален
			GC	2	Повишаване на риска от токсичност при лечение с циклофосфамид и флуроурацил				
			GG	2					
XPC	chr3	rs2228001	TT	4	Намален риск от токсичност при лечение с цисплатин	Missense	939Q > K	Толерантен	Неутрален
			GT	9	Повишен риск от токсичност при лечение с цисплатин				
			GG	5					
EGFR	chr7	rs2227983	AA	2	Намален риск от обрив при лечение с EGFR инхибитори	Missense	521R > K	Толерантен	Неутрален
			AG	7					

			GG	9	Повишен риск от обрив при лечение с EGFR инхибитори				
ERCC2	chr19	rs1799793	TT	2	При терапия с цисплатин се наблюдава по-нисък период без прогресия на заболяването.	Missense	312D > N	Толерантен	Патогенен
			CT	4					
			CC	12	При терапия с цисплатин се наблюдава по-дълъг период без прогресия на заболяването				
ERCC2	chr19	rs13181	TG	6	По-висока преживяемост, при терапия с платинови съединения	Missense	751K > Q	Толерантен	Неутрален
			TT	9					
			GG	3	намалена преживяемост при лечение с платинови съединения				

TP53

TP53 се счита за един от класическите тумор-супресорни гени. P53 е ядрен транскрипционен фактор с про-апоптотична функция. При повече от 50% от човешките туморни заболявания се установяват мутации, които намаляват функционалната му активност [Ozaki and Nakagawara, 2011]. В отговор на разнообразни клетъчни стимули, като увреждане на ДНК, p53 се натрупва в клетъчното ядро, където активира транскрипцията на редица гени. Активираният p53 води до блокиране на клетъчния цикъл, за да се позволи възстановяване на ДНК-увреждането и / или да се стартира процеса на апоптоза и така да се предотврати пролиферацията на клетки с тежки ДНК-увреждания.

В нашата туморна извадка е открит един вариант в *TP53*. SNP вариантът rs1042522 се открива в хетерозиготно състояние - генотип GC при 11,1% (n=2), в хомозиготно състояние - CC-генотип в 77,8% (n=14) и в хомозиготно състояние – генотип GG в 11,1% (n=2). Вариантът rs1042522 в *TP53* има слабо клинично значение и несигурен патогенен ефект. Той е един от 25 SNP варианта, за които има данни, че самостоятелно са с малък ефект по отношение на повишаването на риска за развитие на РМЖ, но в комбинация с други варианти с малък ефект могат да доведат до клинично значимо повишен риск за РМЖ [Johnson, 2007]. Литературните данни по отношение на фармакогенетичния му ефект показват, че пациентите с РМЖ, които са хомозиготни носители на CC генотип за rs1042522, имат средно 3 години по-висока продължителност на живота от пациенти с хомозиготен GG генотип. Тази корелация е установена в проучване на Bojesen SE et al., включващо 9200 датски граждани [Bojesen and Nordestgaard, 2008]. При пациенти с авансирал рак на стомаха хетерозиготният CG генотип на rs1042522 е свързан с по-слаб отговор при комбинираната химиотерапия с паклитаксел и цисплатина в сравнение с хомозиготния генотип (CC) на rs1042522 варианта и допълнително този генотип се асоциира с по-бърза прогресия на злокачествения процес [Kim, 2009]. Честотата на C-алела в европейска популация е 0,71, а в нашата извадка е 0,83 - наблюдава се известно повишение на честотата му. Може да се предположи, че по – високата честота на C-алела би допринесла за потенциално по-добрия ефект на комбинираната химиотерапия с паклитаксел и цисплатина спрямо други терапевтични схеми в тази кохорта.

За G алелът е известно, че в хомозиготно и хетерозиготно състояние повишава риска от токсичност при лечение с циклофосфамид и флуроурацил. G алелът в хомозиготно състояние се установява в 11.1% (n=2) от туморите при пациенти с НДКБК в настоящата извадка. Вероятността за герминативна мутация е висока и ако бъде доказана, съществува повишен риск от токсичност при лечение с циклофосфамид и флуроурацил при тези пациенти. В такива случаи химиотерапията следва да бъде съобразена с генотипа на пациента, за да се избегнат нежелани лекарствени реакции.

XPC

XPC е важен участник в ДНК-репарацията (NER). Експерименталните проучвания показват, че XPC образува заедно с RAD23B комплекс, който участва в разпознаването на ДНК увреждането и дава началото на репаративния процес чрез NER пътя [Sankhwar, 2016]. Терапевтичните режими на основата на платина са лечение от първа линия при пациенти с НДКБК, като ефикасността му показва значителна вариация - 26% до 60% [Bahl and Falk, 2001]. Предполага се, че тази разлика в терапевтичния отговор, може да е свързана с индивидуалната вариабилност в способността на туморните клетки да репарират ДНК увреждания, предизвикани от платина базирани химиотерпевтици [Reed, 1998].

В нашата туморна извадка е открит един вариант в *XPC*. SNP вариантът rs2228001 се открива при 50% (n=9) от туморите в хетерозиготна форма – генотип GT, при 22,2% (n=4) се наблюдава хомозиготен TT генотип и при 27,8% (n=5) от туморите е установен хомозиготен GG-генотип. Генотипи GT и GG се асоциират с повишен риск от токсичност при лечение с цисплатина.

По литературни данни, пациенти с остеосарком и рак на пикочния мехур с GT генотип имат повишен риск от токсичност при лечение с цисплатина, включително загуба на слуха и неутропения, в сравнение с пациентите, които са носители на TT генотип [S. Sakano, 2010]. Резултатите на Sakano S et. al. [S. Sakano, 2010] подкрепят тезата, че SNPs в ДНК-репаративните гени, особено в *XPC*, могат да бъдат прогностични фактори за остра токсичност при CRT (Cathode Ray Tubes) терапия за рак на пикочния мехур и потенциално могат да бъдат използвани за допълнително стратифициране на пациентите при назначаване на лъчетерпия за избягване на токсичност. Въпреки обещаващите първоначални данни са необходими допълнителни проучвания с по-

големи размери на извадките, за да могат да бъдат направени окончателни заключения за ползата от генотипирането на пациентите за тези варианти.

При хомозиготни соматични мутации в туморна тъкан не може да се изключи герминативна мутация, която повишава риска от токсичност при лечение с цисплатин. При тези случаи следва да се обсъди алтернативна химиотерапия, за да се избегнат странични лекарствени реакции с токсично действие.

Фармакогенетичната роля на соматични мутации в *XPC* гена следва да се потвърди при едновременни изследвания в кръв и туморна тъкан.

EGFR

Рецепторът за епидермалния растежния фактор (EGFR) е трансмембранен протеин с тирозинкиназа активност, който заема важно място в сигналната трансдукционна каскада, стимулираща клетката към делене. Като се има предвид, че повече от 60% от НДКБК експресират EGFR и при 10-20% от тях се открива мутантна форма на протеина, този рецептор се превърна във важна терапевтична мишена при лечението на НДКБК [da Cunha Santos, 2011].

В нашата туморна извадка е открит един варинат в *EGFR*. Вариантът rs2227983 се установява в 38,9% (n=7) от пациентите в хетерозиготно състояние - генотип AG, в 11,1% (n=2) в хомзиготно състояние - AA генотип и в 50% (n=9) - хомозиготен GG-генотип.

A-алелът кодира аминокиселината лизин в позиция 521 вместо аргинин. Braig et al. докладват за резистентност към анти-EGFR моноклонални антитела базирана на този полиморфизъм. При пациенти с плоскоклчетъчен карцином генотип AA и генотип AG се асоциират с намалена преживяемост без прогресия на заболяването при терапия с анти-EGFR моноклонални антитела в сравнение с генотип GG [Braig, 2017]. В разработените ракови модели те демонстрират намаление на ефекта на терапевтичната молекулата, чиято основа е нарушената стабилност на протеина, дължаща се на по-ниски нива на сиализиране на въглехидратните остатъци в молекулата на EGFR. Така при терапия с моноклонални антитела наличието на A-алел води до инхибиране в по-ниска степен на EGFR-сигналния път в сравнение с G-алела. Доказаната връзката между високите нива на експресия на *EGFR* и по-добрата чувствителност към EGFR

тирозин-киназни инхибитори [Liu, 2005, Amador, 2004] подкрепя тезата, че терапевтичният ефект на прицелната терапия зависи от нивата на експресия на мишената и способността на лекарствената молекула да подтисне активността ѝ. Може да се заключи, че варианти, които променят силата на отговора при образуването на комплекса лекарство-мишена влияят на крайния ефект от лечението.

В проучвания върху туморна тъкан от колоректален карцином са доказани намалените нива на фосфорилирането на EGFR при наличие на лизин на 521-ва позиция в протеина и по-слаба активация на c-Myc. В резултат на намалената сила на сигналната трансдукция този вариант се асоциира с намалена инвазивност (P = 0,01), по-рядко засягане на лимфните възли (P = 0,02) и по-рядко метастазиране (P <0,01) при пациенти във II/III стадий, при които хирургично е отстранен първичният тумор. При пациентите с метастатичен колоректален карцином този полиморфизъм е свързан с по-добър отговор към лечението с 5-флуороурацил / оксалиплатин (P = 0,02) и по-висока продължителност на живота(P <0,01) [Wang, 2007].

Установена е отлична корелация на генотипа за този вариант в периферна кръв и туморна тъкан [Wang, 2007]. Така при пациенти с генотип AA и генотип AG в туморните проби може да се очаква по-нисък риск от кожни НЛР, тъй като тези генотипи се асоциират с намален риск от кожна токсичност при лечение с EGFR TKIs. Проучването на S Parmar el al. [Parmar, 2011] показва, че rs2227983 е свързан с кожен обрив при пациенти с НДКБК. Кожна токсичност се наблюдава в 86% от пациентите, носещи хомозиготен GG генотип за rs2227983, в 61.7% при тези с хетерозиготен GA генотип и в 10% от пациентите с AA генотип (Fisher стойност P = 0,008). В заключение, кожни НЛР са по-чести сред носителите на GG хомозиготен генотип в сравнение с носители на поне един A-алел (OR = 3.24 (1.27-8.31), P = 0.014). Необходимостта от терапевтична намеса при НЛР по типа на кожна токсичност е по-честа сред носителите на GG хомозиготен генотип спрямо носителите на хетерозиготен GA или хомозиготен AA генотип (78,9% срещу 59,4%, Fisher стойност P = 0,037). S Parmar el al. допълнително изследват адитивния ефект на промоторния вариант -216G/T и rs2227983 за чувствителността към EGFR тирозин-киназни инхибитори. Носителите на -216G,-191C,521G хаплотип имат намален риск да развият кожна токсичност (P = 0.003) [Parmar, 2011].

В заключение, значението на алел-А на варианта rs2227983 е различна в зависимост от прилаганата терапия. По отношение на прицелните лекарства - А-алелът се асоциира с намалена преживяемост без прогресия на заболяването при терапия с анти-EGFR моноклонални антитела поради по-слабото подтискане на мишената от лекарството, но при лечение с EGFR TKIs е намален рискът от нежелани лекарствени реакции свързани с кожна токсичност. По отношение на конвенционалните химиотерапевтични протоколи - А-алелът се асоциира с по-рядко засягане на лимфните възли, по-рядко метастазиране, по-добър отговор към лечението с 5-флуороурацил/оксалиплатин и по-висока продължителност на живота.

Честотата на А-алела в европейска популация е 0,28, а в нашата извадка е 0,31. В нашата пациентска извадка се наблюдава слабо повишение на честотата на А-алела, което не се предполага да е статистически значимо и да определя значимо по-висок риск от НЛР при нашите пацинети.

ERCC2

ERCC2 играе ключова роля при възстановяването на ДНК-нарушения индуцирани най-често от химически агенти (вкл. и химиотепаевтици) чрез NER-пътя. Предполага се, че функционални единични нуклеотидни полиморфизми (SNPs) в този ген биха могли да влияят върху клиничните резултати от химиотерапията при онкологични пациенти. В нашата туморна извадка се откриват два варината в *ERCC2.*

Един от най-често изследваните полиморфизми в *ERCC2* с потенциално значение в тази насока е rs1799793. В нашата кохорта се установява: хетерозиготен CT генотип в 22,2% (n=4), хомозиготен TT генотип при 11,1% (n=2) и хомозиготен CC генотип в 66,7% (n=12), като честотата на Т-алела е по-ниска спрямо средната европейска честота. Т-алелът води до замяна на аминокиселината аспартат с аспарагин на 312 позиция в протеина (Asp312Asn). Повечето от проучванията, които анализират ролята на полиморфизма Asp312Asn (rs1799793), показват, че 312Asn-вариантът се асоциира с по-високи нива на ДНК-увреждане под действието на химически агенти в сравнение с тези при пациенти с 312Asp-варианта. При хомозиготите по дивия тип алел – генотип CC на rs1799793 се наблюдава значително по - дълъг период без прогресия на заболяването, вероятно поради по-ефективната ДНК-репарационна система, което намалява цитотоксичността на химиотерапевтиците от групата на цисплатината и съответно

тяхната ефективност [Biason, 2012]. Така може да се предположи, че наличието на Т-алел в туморната тъкан води до намалена ДНК-репарационна способност на туморните клетки, което повишава тяхната чувствителност към химиотерапевтици, индуциращи ДНК-повреди. В нашата извадка алелът Т се намира с по-ниска честота спрямо средната за европейската популация, което може да се асоциира с по-ниска ефективност на някои терапевтични схеми.

Sullivan et.al. [I. Sullivan, 2014] разглеждат генетичните варианти в гени, които участват в механизмите за репарацията на ДНК, тъй като се предполага, че тези гени могат да имат важно значение за ефективността на платиновата химиотерапия и токсичността на лъчетерапията при НДКБК. Sullivan и колеги анализират 17 SNP варианти в осем гена (*ERCC1, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, XPA, XRCC1* и *XRCC2*), участващи в механизмите за репарация на ДНК и тяхната връзка с терапевтичния отговор при НДКБК и установяват, че при пациентите в стадий III токсичността на лъчетерапията се асоциира със SNP варианти rs1799793 и rs13181 в *ERCC2* гена. При пациенти с генотип CT и TT за rs1799793 се наблюдава по-често остър пневмонит. В нашата кохорта над 80% от пацеинтите са носители на поне един Т-алел за rs1799793, което предполага по-добър терапевтичен отговор и по-добра прогноза при химиотерапия с горепосочените медикаменти при тези пациенти. Нашите резултати показват, че 16,7% от НДКБК (n=3) са с генотип GG. При тези пациенти ефективността на платиновата химиотерапия може да е ограничена и потенциално да доведе до намалена преживяемост.

Фармакогенетичен вариант rs13181 се установява в 33,3% (n=6) в хетерозиготно състояние – TG-генотип, в 16,7% (n=3) в хомозиготно състояние - GG-генотип и в 50% (n=9) - хомозиготен TT-генотип. Наличието на Т-алел води до замяна на аминокиселината лизин с глутамин на 751-ва позиция в протеина. Предполага се, че 751Gln алелът се асоциира по-високи нива на ДНК-увреда и по-ниска репаративна способност [Benhamou and Sarasin, 2005, Kiyohara, 2006].

Генотипи TG и TT се асоциират с по-висока преживяемост при терапия с платинови съединения спрямо генотип GG. Проучване на Park et. al. [Park, 2001] установява, че пациентите носители на 751TT генотип (rs13181) имат най-висока степен на ремисия при терапия с 5-флуоцил/оксалиплатин (P = 0,015). Boige et al. [Boige, 2010] установяват, че при пациентите с колоректален карцином и GG генотип за rs13181,

лекувани с двойна терапия – флуороурацил и левковорин или с тройна терапия – флуороурацил, левковорин и оксалиплатин, се наблюдават повишен риск от лекарствена токсичност, повишен риск от ранен рецидив и намалена преживяемост без прогресия в сравнение с пациентите, които са носители на TT генотип. Тази тенденция се наблюдава и при хетерозиготно състояние на полиморфизма - GT генотипът също се асоциира с повишена преживяемост без прогресия в сравнение с пациентите, които са носители на GG генотип. Giovannetti et. al. [Giovannetti, 2011] докладват същата асоциация и при рак на панкреаса. Мета-анализът на Wei SZ et. al. [Wei, 2011], показва, че ефективността на платина базираната химиотерапия се определя от комбинация от полиморфизми в *ERCC2* гена, а не индивидуално от генотипа за rs13181.

При пациентите с НДКБК на платина базирана терапия, които са носители на хомозиготния GG генотип в rs13181 се наблюдава повишен риск от пневмонит, спрямо тези, които са носители на GT или TT генотип [I. Sullivan, 2014].

Така крайната оценка за очакваната преживяемост, риск от рецидив и т.н. зависят от сумарния ефект на всички полиморфизми в гените с потенциално фармакогенетично значение, но ролята на *ERCC2*-вариантите се очертава водеща предвид натрупващите се данни в литературата. Корелацията между генотипите на SNP вариантите в *ERCC2* и ефективността на платина базираните химиотерапевтични протоколи остава тема за обсъждане при пациенти с рак на белия дроб.

3. Обсъждане на мутационния спектър на *EGFR* гена за избор на таргетна терапия при НДКБК

В нашето проучване беше определен мутациионният статус на *EGFR* гена в 551 туморни проби от НДКБК чрез експресионен PCR анализ в реално време „therascreen EGFR assay“ тест, информативен за 29 мутации. В 10% от изследваните туморни проби бяха установени генни мутации.

Многобройни проучвания показват, че мутациите в *EGFR* тирозин-киназния домен са най-добрият предиктор за отговора към EGFR тирозин-киназни инхибитори и преживяемостта без прогресия на заболяването при НДКБК [Ziegler]. Предишни изследвания доказват високата ефективност на EGFR тирозин-киназните инхибитори при *EGFR* положителни тумори в късните стадии (IIIB и IV). Проучването на Ziegler et

al. [Ziegler] при пациенти с НДКБК с мутация в *EGFR* гена демонстрира, че употребата на TKIs води до два пъти по – висока преживяемост без прогресия на заболяването спрямо карбоплатин-паклитаксел базираната химиотерапия. При сравнението на ефективността на гефитиниб и карбоплатин-паклитаксел като първа линия лечение за напреднал недребноклетъчен карцином на белия дроб в проучването на Wang et al. [Wang] също се демонстрира цялостното превъзходство на TKI - честотата на преживяемост без прогресия при пациенти с НДКБК, които са лекувани с гефитиниб е 24,9%, спрямо 6,7% при пациенти лекувани със стандартни химиотерапевтични схеми. Наличието на мутации в *EGFR* гена е най-важният критерий за назначаване на лечение с TKIs при НДКБК [Zappa and Mousa].

Като друг предиктивен маркер за ефекта от лечението е изследван и броя копия на *EGFR,* но литературните данни относно ролята на броя *EGFR* копия за ефективността на TKIs са противоречиви. Няколко проучвания издигат хипотезата, че броят *EGFR* копия може да бъде по-добър предиктивен биомаркер за ефикасността на EGFR тирозин-киназните инхибитори [Zhou] [Yan]. В противовес на тази теза са данните от проучването на Ziegler и колеги [Ziegler], което демонстрира, че по - високата преживяемост без прогресия при пациентите с НДКБК е асоциирана с мутации в *EGFR* гена, които определят чувствителност към тирозин-киназните инхибитори, но не и с високия брой *EGFR* копия. В заключение, настоящите клинични ръководства не препоръчват тест за оценка на броя *EGFR* копия, когато е проведен анализ за *EGFR* мутации [Novello, 2016, Kerr, 2014].

В клиничната практика се наложи като стандарт определянето на *EGFR* мутационния статус чрез RT-PCR метода, поради неговата бързина, чувствителност, специфичност, възпроизводимост на резултатите и доброто съотношение на цена и информативност на изследването. Друго предимство на RT-PCR базираните протоколи за определяне на *EGFR* мутационен статус е, че те са изцяло фокусирани върху мутации с ясно клинично значение и с утвърден терапевтичен подход при наличието им.

Честотата на *EGFR* мутациите варира сред различните етнически групи – при пациенти с азиатски произход - 38,8% , при пациенти с европейски произход - 17,4%, при пациенти афро-американци - 17,2% и в смесени популации - 27% [Zhang, 2016].

Нашите резултати показват честота от 10% на *EGFR* мутациите при НДКБК при български пациенти, което е значително по-ниска честота от средната за пациентите от европейска популация. Факторите определящи тези разлики, както между българската и европейската популация, така и между европейската и азиатската популация са неизвестни. Предполага се, че различия във факторите на околната среда и / или генетични варианти, специфични за популациите, могат да са в основата тези разлики в честота на *EGFR* мутациите в световен мащаб [Graham, 2018].

Литературните данни показват ясна тенденция в характеристиката на *EGFR*-позитивните НДКБК - *EGFR* мутациите са по-чести при аденокарциноми, при жени и при непушачи [Wu, Jimeno and Hidalgo, 2006, Paez, 2004, Lynch, 2004, Shigematsu and Gazdar, 2006, Sakurada, 2006]. Нашите резултати са в съответствие с данните от предишни проучвания. Мнозинството от нашите пациенти с *EGFR* мутации, лекувани с TKI, са жени от европеидната раса и непушачи. В нашата извадка *EGFR* положителен мутационен статус е установен при 71% (n=39) от туморите при жени и 29% (n=16) при мъже, което определя 2,4 пъти по-висока честота на *EGFR* мутациите при пациенти от женски пол. Тези данни свидетелстват за ясния превес на женския пол (P <0,001) докладван и в литературата.

В нашата извадка *EGFR* мутациите са статистически значимо по-чести при аденокарциноми 75% (n=41) спрямо другите хистологични типове (плоскоклетъчен карцином и едроклетъчен карцином) - 25% (n=14), (P < 0.001). Тези данни са в съзвучие с докладваните в литературата честоти на *EGFR* мутации при различните хистологични варианти на НДКБК. Това наблюдение е залегнало в актуализираните препоръки на ESMO (European Society of Medical Oncology), където не се препоръчва определяне на *EGFR*-мутационен статус при плоскоклетъчен карцином, с изключение на случаите при непушачи [Novello, 2016].

В извадката ни *EGFR* мутациите са статистически значимо по-чести при непушачи 17,7% (n=32) спрямо пушачи 7,3% (n=23) (P=0.002807). В нашата кохорта *EGFR* мутации се срещат 2,4 пъти по-често при непушачи, което потвърждава литературните данни.

Резултатите от анализа на откритите мутации показва, че с най-висока честота в нашата кохорта са делециите в екзон 19 - 56.40% (n=31), следвани от мутацията L858R в екзон

21 - 36.40% (n=20). Общо те представляват около 92.7% от всички *EGFR* активиращи мутации. В кохорта ни тези два вида мутации са установени само в аденокарциноми. Всички делеции в екзон 19 са в проби на пациенти в IV-ти стадий. Мутацията L858R предоминиращо се открива в IV стадий в нашата извадка – 90% (n=18). Останалите мутации са по-редки: инсерции в екзон 20 - 3,6% (n=2), двойна мутация - T790M, комбинирана с делеция в екзон 19 - 1,8% (n=1) и двойна мутация - S768I с делеция в екзон 19 - 1,8% (n=1). Не са доказани останалите мутации, включени в теста: L861Q, S768I, G719A, G719S, G719C. Така в нашата кохорта 92,7% от откритите *EGFR* мутации определят чувствителност към тирозин-киназни инхибитори, а останалите 7,3% от откритите мутации се асоциират с резистентност към първо и второ поколение тирозин-киназни инхибитори. Разработваните в момента трето поколение тирозин-киназни инхибитори са насочени към T790M положителните пациенти [Tan, 2018, Barnes, 2017]. Те са структурно различни от първо и второ поколение TKIs - свързват се необратимо с EGFR и са ефективни, както при чувствителните на първо и второ поколение мутации (делеции в екзон 19 и L858R), така и при резистентната на тях T790M [S. Sakano]. Вече има FDA и EMA одобрени трето поколение TKIs, които се прилагат в клиничната практика [Peng]. За сега няма данни в литературата за потенциалното приложение на тези медикаменти при двойните мутанти (комбинация между T790M и друга мутация).

В нашата кохорта най-честата мутация в *EGFR* е делецията в екзон 19 - 56,4% (n=31) от всички *EGFR* мутации и се среща в 5,6% от НДКБК. Честотата на делециите в екзон 19 варира в различните популации. В Южна Азия се наблюдава значително по-висока честота на тази мутация - 20,3% от всички изследвани случаи, в сравнение с всички останали региони. Също така висока честота се наблюдава и в популации от Северна Азия - 12,8%. За Европа е докладвана честота от 9.0%, за Северна Америка - 4,5% и Южна Америка - 4,2% [Graham, 2018]. Така наблюдаваната в нашата кохорта честотата е по – ниска от средната за европейската популация и най-близо до тази рапортувана в северно- и южно-американските популации.

Втората по-честота мутация в нашата кохорта е L858R – 36,4% (n=20) от всички открити *EGFR* мутации и се установява при 3,6% от изследваните пациенти. Най-висока честотата на тази мутация се наблюдава в Южна Азия - 21,6% и Северна Азия -

13,9% от всички изследвани пациенти. В останалите региони честотата е какво следва: Европа – 3,3%, за Северна Америка – 3,4% и Южна Америка – 2,6% [Graham, 2018]. Честотата наблюдавана в нашата кохорта е съизмерима с тази рапортувана за Европа и Северна Америка.

Инсерции в екзон 20 са установени при 0,4% от изследваните пациенти и представляват 3,6% от всички установени мутации в нашата кохорта. Средната честота на тази мутация за Европа се оценява на 0,3%, което е сравнимо с наблюдаваната в нашата извадка. Най-висока честота на тази мутация е докладвана при пациенти от Африка (вкл. и Близкия Изток) – 1,9% [Graham, 2018]. За Северна и Южна Америка честотата е съответно – 0,4% и 0,3%. Най-ниската честота се открива в Северна Азия – 0,07%.

Честотата на двойните мутанти в нашата кохорта е 3,6% от *EGFR* положителните случаи и 0,4% от всички пациенти. Честотата на двойните мутанти в Азия е 2-7% [Wei, 2014, Zhang, 2007, Toshihiko, 2006]. Честотата в Европейска популация е 0,1% от всички изследвани и 0,8% от *EGFR* положителните случаи [Gahr, 2013]. Така делът на двойните мутанти в нашата кохорта *EGFR* положителни случаи, както и делът им в общата популация изследвани НДКБК, са значително по-високи в сравнение с този в Европа - (3,6% vs 0,8%) и (0,4% vs 0,1%).

В заключение, общата честота на мутациите в *EGFR* в нашата кохорта е по-ниска от средната за Европа. Делът на отделните мутации е съизмерим с европейския за L858R и инсерциите в екзон 20, докато делециите в екзон 19 са с по-ниска честота спрямо европейската, а двойните мутанти се срещат по-често от средното за Европа.

4. Обсъждане на патогенни варианти в гени, асоциирани с карциногенеза при ФПТК

При анализа на данните от NGS секвенирането на 12-те кръвни проби от пациенти с ФПТК се установиха 9 патогенни варианти (според PolyPhen и SIFT предикторите) в три гена свързани с туморогенезата - *MET, RET* и *MLH1*.

RET

RET генът спада към групата на прото-онкогените. Той кодира трансмембранен рецептор с тирозин-киназна активност. Свързването на лиганди като GDNF (невротрофичен фактор произхождащ от глиална клетъчна линия) и други растежни

фактори към рецептора води до активирането на сигнални пътища, които играят роля в клетъчната диференциация, растеж, миграция и оцеляване. Кодираният рецептор е важен за развитието на нервната система и органите и тъканите, произлизащи от невралния гребен. Герминативни мутации повишаващи активността на протеина (gain-of-function) - цитогенетично пренареждане и различни точкови мутации, водят до развитието на наследствени форми на тиреоиден карцином, докато соматични мутации в него като цяло се асоциират с карциногенезата и се установяват в 50% от случаите на медуларен тиреоиден карцином [Yeganeh, 2015] [Santoro, 2004]. Мутациите, които водят до загуба на функцията (loss-of-function) се асоциират с болестта на Hirschsprung (аганглионарен мегаколон), синдрома на централна хиповентилация, като също така са идентифицирани и при пациенти с бъбречна агенезия [Chin, 2008, Fitze, 2003, Skinner, 2008, Santoro and Carlomagno, 2013].

В нашата извадка SNP вариантът rs181856591 в *RET* гена се открива в хетерозиготно състояние - генотип CA при 25% (n=3) и в хомозиготно състояние - CC-генотип в 75% (n=9). Няма установени пациенти с хомозиготен AA генотип. Според предикцията по SIFT, този вариант се класифицира като патогенен или вреден (deleterious) и според PolyPhen се определя като вероятно патогенен (probably damaging).

A-алелът води до замяна на аминокиселината треонин с лизин в кодон 754 на RET протеина (p.Thr754Lys). Тази замяна не е описана досега в литературата – не се установява и в популационните бази данни (ExAC, 1000Genomes, TOPMED). В този кодон е описана транзиция C>T, която води до замяна на треонин с метионин. Популационната честота (ExAC) на T-алела за този вариант се оценява на 0,01%, което е съизмеримо с честотата на редица патогенни варианти в *BRCA1* и *BRCA2* [Kobayashi, 2017]. Няма убедителни данни, че T-алелът е патогенен и на базата на наличната информация се класифицирана като вариант на неясно значение. Треониновият остатък се намира в силно консервативен участък и умерената разлика във физикохимичните свойства на треонин и лизин би могла да доведе до промяна в активността на RET, но ролята на A-алела (Lys), който се установява за първи път при нашите пациенти, предстои да бъде установена. SNP вариантът rs181856591 - CA генотип, се открива при засегнати инидивиди от две семейства. В фамилия Б и всички засегнати индивиди (n=2) са хетерозиготни носители на CA-генотип. Във фамилия В 20% от засегнатите (n=1) са

с хетерозиготен генотип. Така този вариант, при потвърждаване на патогенния му характер, най-вероятно би бил с умерен ефект по-отношение на риска за развитие на злокачествени заболявания на щитовидната жлеза и би се класифицирал като фактор определящи фамилно предразположение. Фактът,че вариантът досега не е описан в нито една популация в глобален мащаб, свидетелства за възможния локален характер на този алел.

MET

MET генът спада към групата на прото-онкогените. Той кодира трансмембранен рецептор с тирозин-киназна активност. Свързването на неговия лиганд, хепатоцитен растежен фактор води до активиране на рецептора и стартиране на сигнална трансдукционна каскада, която има роля за клетъчното оцеляване, ембриогенезата, клетъчната миграция и туморната инвазия. Мутациите в този ген са свързани с развитието на папиларен бъбречноклетъчен карцином, хепатоцелуларен карцином и различни злокачествени заболявания на главата и шията [Neklason, 2011]. Дерегулация - амплификация и свръхекспресия на този ген, се установяват в множество човешки неоплазми [Mo and Liu, 2017, Ma, 2008]. Свръхактивирането на HGF / MET сигналния път потиска апоптозата и стимулира пролиферацията, инвазията, неоангиогенеза и метастазирането на злокачествения процес [Jung, 2012, Gherardi, 2012].

При нашето изследване се установиха пет варианта в *MET* гена - rs56391007, NP_001120972.1: p.Leu1080Met, NP_001120972.1: p.Phe1234Ser, NP_001120972.1: p.Pro712Gln и NP_001120972.1:p.Ser823Tyr. Само един от тези варианти - rs56391007 е описан в литаратурата.

В нашата извадка вариантът rs56391007 се среща при 25% (n=3) от кръвните проби в хетерозиготно състояние – CT генотип и в хомозиготни състояние - CC-генотип 75% (n=9). Не се открива генотип TT в изследваните тумори. Според предикцията по SIFT, този вариант се класифицира като патогенен (deleterious) и според PolyPhen се определя като вероятно патогенен (probably damaging).

SNP вариантът rs56391007 - CT генотип, се открива при две фамилии – Б и В, като във фамиля Б вариантът се установява в 50% (n=1) от засегнатите, а във фамиля В 40% (n=2) от пациентите с тиреоиден карцином.

Т-алелът на rs56391007 в *MET* гена води до замяна на аминокиселината треонин с изолевцин на 1010 позиция в протеина (Thr1010Ile), която се намира в консервативен нуклеотид и 3/4 in silico софтуерни програми определят патогенния характер на този вариант. Вариантът се намира в с-MET JM домен, който регулира цитоскелетните функции: адхезията, подвижността и миграцията. Има литературни данни, че мутация в този регион в in vitro условия стимулира туморния растеж при рак на белия дроб [Lawrence and Salgia, 2010]. Според ExAC популационната база данни общата честота на варианта се оценява на 8/1000, като при 6 от индивидите Т-алелът е в хомозиготно състояние. Особено висока честота се наблюдава в африканската субпопулация – 2%. Тези честоти надвишават очакваната максимална алелна честота за патогенен алел в този ген (15/10 000 000). Вариантът е рапортуван, както при здрави индивиди, така и при пациенти с метастатичен рак на гърдата, рак на белия дроб и рак на дебелото черво [Liu, 2016, Agarwal, 2015]. Той не се асоциира с повишен риск от развитие на рак на млечната жлеза при големи асоциативни проучвания и литературните данни за функционалния му ефект са противоречиви. На базата на оценката на множество реномирани бази данни / клинични лаборатории и литературните данни, този вариант се класифицира като „доброкачествен“. Оценката на двете предикторни програми използвани при анализа на нашите NGS-данни е в съответствие с тази на другите предикторни софтуери и класифицира варианта като засягащ функцията на протеина. Тази начална оценка не е окончателно потвърдена при функционалните анализи и са необходими допълнително задълбочени проучвания за еднозначната класификация на този вариант.

В нашата извадка вариантът NP_001120972.1:p.Leu1080Met се среща при 8.3% (n=1) от кръвните проби в хетерозиготно състояние – CA генотип и в хомозиготни състояние - CC-генотип 91.7% (n=11). Не се открива генотип AA в изследваните пациенти. Замяната в аминокиселинната последователност е малко вероятно да доведе до тежки промени във функцията на протеина поради същите физикохимични свойства на двете аминокиселини (неутрални аминокиселини с алифатен радикал).

В нашата извадка вариантът NP_001120972.1:p.Phe1234Ser се среща при 8.3% (n=1) от кръвните проби в хетерозиготно състояние – TC генотип и в хомозиготни състояние - TT-генотип 91.7% (n=11). Не се открива генотип CC в изследваните кръвни проби.

Трудно е да се оцени ефекта на замяната в аминокиселинната, тъй като и двете аминокиселина са неутрални, но фенилаланинът е с алифатен радикал за разлика от серина, който има полярен радикал.

В нашата извадка вариантът NP_001120972.1:p.Pro712Gln се среща при 8.3% (n=1) от кръвните проби в хетерозиготно състояние – CA генотип и в хомозиготни състояние - CC-генотип 91.7% (n=11). Не се открива генотип AA в изследваните пациенти. Трудно е да се оцени ефекта на замяната в аминокиселинната, тъй като и двете аминокиселина са неутрални, но пролинът е с алифатен радикал за разлика от глутамина, който има полярен радикал.

В нашата извадка вариантът NP_001120972.1:p.Ser823Tyr се среща при 8.3% (n=1) от кръвните проби в хетерозиготно състояние – CA генотип и в хомозиготни състояние - CC-генотип 91.7% (n=11). Не се открива генотип AA в изследваните проби. Замяната в аминокиселинната последователност е малко вероятно да доведе до тежки промени във функцията на протеина поради същите физикохимични свойства на двете аминокиселини (неутрални аминокиселини с полярен радикал).

Според предикцията по SIFT, тези варианти се класифицират като патогенни (deleterious) и според PolyPhen се определят като вероятно патогенни (probably damaging). Няма експериментални данни за ефекта на вариантите in vitro и in vivo. Тези варианти не са рапортувани досега в международните бази данни. Тяхното отношение към канцерогенезата не може да бъде изяснено на базата на нашите изследвания. Възможно е да се касае за редки доброкачествени варианти, характерни за изследваната популация или за варианти определящи предразположение към щитовиден карцином с малък до умерен ефект.

MLH1

MLH1 е тумор-супресорен ген, кодиращ протеин, участващ в отстраняването на погрешно сдвоени бази в ДНК (mismatch repair system). Този ген е асоцииран с колоректален и ендометриален карцином [Dowty, 2013].

При нашето изследване се установиха два варианта в *MLH1* - NP_000240.1:p.Glu23Gly и NP_000240.1:p.Gly634Val, които не са публикувани в международните бази данни досега.

В нашата извадка вариантът NP_000240.1:p.Glu23Gly се среща при 33.3% (n=4) от кръвните проби в хетерозиготно състояние – AG генотип и в хомозиготни състояние - AA-генотип 66.7% (n=8). Не се открива генотип GG в изследваните пациенти. Може да се предположи, че тази промяна в аминокиселинната последователност би имала ефект върху функцията на протеина поради различните физикохимични свойства на референтната аминокиселина (Glu), която е киселинна - с отрицателен електрически заряд и аминокиселината, която се кодира от G-алела (Gly), която е неутрална с алифатен радикал.

В нашата извадка вариантът NP_000240.1:p.Gly634Val се среща при 8.3% (n=1) от изследваните проби в хетерозиготно състояние – GT генотип и в хомозиготни състояние - GG-генотип 91.7% (n=11). Не се открива генотип TT в нашата извадка. Замяната в аминокиселинната последователност е малко вероятно да доведе до тежки промени във функцията на протеина поради същите физикохимични свойства на двете аминокиселини (неутрални аминокиселини с алифатен радикал).

Според предикцията по SIFT и двата варианта се класифицират като патогенни (deleterious) и според PolyPhen се определят като вероятно патогенни (probably damaging). Няма експериментални данни за ефекта на вариантите in vitro и in vivo. Тези варианти не са реапортувани досега в международните бази данни. Тяхното отношение към канцерогенезата не може да бъде изяснено на базата на нашите изследвания. Възможно е да се касае за редки доброкачествени варианти, характерни за изследваната популация или за варианти определящи предразположение към щитовиден карцином с малък до умерен ефект.

5. Обсъждане на фармакогенетични варианти в гени за туморогенеза при ФПТК за избор на химиотерапия

При анализа на данните от NGS-секвенирането на кръвни проби от нашата извадка са установени шест SNP варианта в шест гена - rs1042522 в *TP53*, rs13181 в *ERCC2*, rs1799939 в *RET*, rs2227983 в *EGFR*, rs2228001 в *XPC* и rs17655 в *ERCC5*, които са толерантни или бенигнени, според SIFT и PolyPhen предикторите (Табл. 17). Тези данни са в съответствие с тезата, че фармакогенетичните варианти не влияят на появата или развитието на онкологичния процес, но могат да имат значение за терапевтичния отговор, преживяемостта и риска от нежелани лекарствени реакции (НЛР).

TP53

В нашата извадка е открит един вариант в *TP53*. SNP вариантът rs1042522 се открива в хетерозиготно състояние - генотип GC при 25% (n=3), в хомозиготно състояние - CC-генотип в 58.3% (n=7) и в хомозиготно състояние – генотип GG в 16.7% (n=2).

GC и GG генотипите определят повишен риск от токсичност при лечение със стандартни химиотерапевтични режими включващи флуороурацил и циклофосфамид [Henríquez-Hernández, 2010]. Проучването на Borchiellini et al. показва, асоциацията на C-алела (Pro) с повишен риск от остеонекроза при пациенти с рак на главата и шията, които са подложени на лъчетерапия [Borchiellini, 2017].

Интересни са данните за този полиморфизъм и връзката му с рака на щитовидната жлеза. При проучването на Yan et. al. [Yan] е установено, че разпределението на генотипните честоти при пациенти с рак на щитовидната жлеза за rs1042522 е както следва: Arg/Arg (GG) генотип - 0.286, Arg/Pro (GC) генотип - 0.343 и Pro/Pro (CC) генотип - 0.371. Наблюдаваните генотипни честоти при контролите са Arg/Arg (GG) - 0.45, на Arg/Pro (GC) генотип - 0.37 и Pro/Pro (CC) генотип - 0.18. Честотата на C-алела (Pro) е значително по - висока от честотата на G-алела (Arg) в групата на пациентите (OR = 2,06, 95% C.I = 1,5-2,8). Това изследване показва, че C-алелът на SNP варианта rs1042522 определя по-висок риск за рак на щитовидната жлеза, особено при млади индивиди, жени и непушачи.

Така при 41,7% (n=5) от изследваните пациенти може да се очаква по – висока честота на НЛР, което да наложи понижаване на лекарствената доза или промяна на терапевтичния режим. При 58,3% (n=7), които са хомозиготи по C-алел при прилагане на лъчетерапия може да се очаква повишен риск от остеонекроза. По – слабо изразено повишаване на рисковете свързани с лъчетерапията се очаква при 25% (n=3) от нашите пациенти (хетерозиготи). При пациентите, които са с по-нисък риск за НЛР при химиотерапия (CC-генотип), същевременно се наблюдава по-висок риск за развитие на щитовиден карцином и наличието на този генотип е най-вероятно един от допринасящите фактори за развитие на основното заболяване.

Таблица 17: Резултати от NGS. Таблицата представя гените, хромозомната локализация, прогнозните параметри (SIFT и PolyPhen), SNP, генотипите, броя пациенти със съответния генотип, чувствителността към лекарства съобразно rs варианта (според уебсайта на pharmagkb)и вида мутация.

Ген	**Хромозома**	**SIFT/PolyPhen**	**SNP**	**Генотип**	**Брой на пациенти с определения генотип**	**Лекарства**	**Тип на полиморфизъм**
TP53	17	Tolerated/Benign	rs1042522	Хетерозигот GC	3	Повишаване на риска от токсичност към лечение с циклофосфамид и флуроурацил	Missense
				Хомозигот GG	2		
				Хомозигот CC	7	Намален риск от токсичност към лечение с циклофосфамид и флуроурацил	
ERCC2	19	Tolerated/Benign	rs13181	Хетерозигот TG	7	По-висока преживяемост, когато се лекува с платинови съединения	Missense
				Хомозигот TT	1		
				Хомозигот GG	4	Намалява оцеляването при лечение с платинови съединения	
RET	10	Tolerated/Benign	rs1799939	Хетерозигот GA	7	Не са свързани с токсичност към лекарства със сунитиниб	Missense
				Хомозигот AA	0		
				Хомозигот GG	5	Предполагаема токсичност на сунитиниб	

EGFR	7	Tolerated/Benign	rs2227983	Хетерозигот GA	6	Намален риск от обрив при лечение с EGFR инхибитори	Missense
				Хомозигот AA	1		
				Хомозигот GG	5	Повишен риск от обрив при лечение с EGFR инхибитори	
XPC	3	Tolerated/Benign	rs2228001	Хетерозигот GT	6	Повишен риск от токсичност при лечение с цисплатин	Missense
				Хомозигот GG	3		
				Хомозигот TT	3	Намален риск от токсичност при лечение с цисплатин	
ERCC5	13	Likely benign	rs17655	Хетерозигот GC	4	Повишава оцеляването без прогресия при химиотерапия с платина	Missense
				Хомозигот CC	0		
				Хомозигот GG	8	Намалява оцеляването без прогресия при химиотерапия с платина	

ERCC2

В нашата извадка е открит един вариант в *ERCC2* гена. Фармакогенетичен вариант rs13181 се установява в 58,3% (n=7) в хетерозиготно състояние – TG-генотип, в 33.4% (n=4) в хомозиготно състояние - GG-генотип и в 8.3% (n=1) – в хомозиготен TT-генотип.

Полиморфизмът rs13181 в *ERCC2* гена е известен като фактор, влияещ върху риска за НЛР при химиотерапия. При пациенти с рак на гърдата, носители на GG генотип и GT генотип се установява намален риск от неутропения при лечение с доцетаксел в сравнение с пациенти, които са носители на TT генотип [Boso, 2014]. Според изследванията на Sullivan et. al. [Ivana Sullivan, 2014] върху НДКБК SNP вариантът rs13181 не определя съществени разлики в токсичността на стандартните химиотерапевтични схеми, но се открива значима асоциации между SNPs (rs13181) в *ERCC2* гена и НЛР от типа на остър пневмонит при радиотерапия. Техните данни показват, че 32.3% от пациентите, които са носители на T алел (TT и TG генотип), развиват пневмонит, като при носителите на GG генотип това усложнение се наблюдава в 83.3%. Ролята на варианта rs13181 конкретно при карцином на щитовидната жлеза не е изследвана и предстои да бъде уточнена. При нашите пациенти повишен риск за неутропения при химиотерапия на базата на генотипа на rs13181 може да се очаква при 8,3% (n=1) и повишен риск за пневмонит при лъчетерапия може да се очаква при 33,4% (n=4).

RET

В нашата извадка е открит един вариант в *RET* гена. Фармакогенетичен вариант rs1799939 се установява в 58,3% (n=7) в хетерозиготно състояние – AG-генотип, в 41.7% (n=5) в хомозиготно състояние - GG-генотип. Няма установени пациенти с хомозиготен AA генотип.

A-алелът води до замяна на аминокиселината глицин със серин на 691-ва позиция в протеина. Предполага се, че тази замяна води до появата на две нови места за фосфорилиране на RET и може да има слаб ефект върху функцията на протеина [Lantieri, 2013, Figlioli, 2013]. In vitro проучвания показват, че този вариант е свързан с амплифициране на отговора на сигналната каскада и стимулира клетките към

репликация / инвазия [Sawai, 2005]. Проучването на Quintela-Fandino et al. показва, че наличието на 691Ser 10-кратно повишава нивата на фосфорилиране на RET и води до неговата свръхактивация. Авторите предполагат, че тази мутация е подходяща за лечение с тирозин-киназния инхибитор довитиниб, като двамата пациенти с тази соматична мутация подложени на лечението постигат контрол на заболяването, а при спиране на медикамента неопластичният процес прогресира [Quintela-Fandino, 2014]. Мета-анализите показват, че този вариант е с ниска пенетрантност и има модифицираща роля по отношение на риска за развитие на рак [Quintela-Fandino, 2014].

Проучването на Kim et al. разглежда в дълбочина риска от хематологична токсичност - тромбоцитопения, неутропения и анемия при лечението със сунитиниб. Общо 12 генетични полиморфизми в 8 кандидат-гени (*CYP1A1, CYP3A5, ABCB1, ABCG2, PDGFRα, VEGFR2, RET* и *FLT3*) са анализирани за връзка с терапевтичната токсичност на сунитиниб. При пациенти с бъбречноклетъчен карцином, SNP (rs1799939) варианта не се асоциира с нежелани странични реакции към сунитиниб [Kim, 2013].

Няма литературни данни за ефекта на този вариант при тиреоиден карцином. В нашата извадка 58,3% (n=7) хетерозиготни носители на А-алел. При тези пациенти би било подходящо изследване на туморната проба за RET-активност и включването им в клинични проучвания за довитиниб.

EGFR

В нашата извадка е открит един вариант в *EGFR*. Вариантът rs2227983 се установява в 50% (n=6) от пациентите в хетерозиготно състояние - генотип GA, в 8.3% (n=1) в хомозиготно състояние - AA генотип и в 41.7% (n=5) - хомозиготен GG-генотип. Генотипите GG се асоциират с повишен риск за реакции на кожна токсичност при лечение с TKIs.

Литературните данни за значението на този полиморфизъм са противоречиви. Мета-анализът на Wang et al. на 13 проучвания върху различни видове рак (рак на млечната жлеза, колоректален карцином, белодробен карцином, рак на щитовидната жлеза и др.) показва, че няма значима връзка между полиморфизма rs2227983 в *EGFR* гена и риска за развитие на рак. Тяхното проучване също така не показва еднозначна асоциация между rs2227983 полиморфизма и ефекта от химиотерапия и свидетелства за

необходимостта от допълнителни мащабни изследвания, които да потвърдят или отхвърлят такава асоциация [Wang, 2014].

Противно на данните на Wang, резултатите от проучването на Parmar et al. при пациенти с НДКБК, колоректален карцином и рак на панкреаса показват, че AA и AG генотипите се асоциират с намален риск от кожна токсичност при лечение с тирозин-киназни инхибитори в сравнение с GG генотип (P = 0.008) [Parmar, 2013].

В литературата има ограничени данни за ефикасността на лечението с EGFR-TKIs [Lote, 2014, Kim, 2017] при рак на щитовидната жлеза. Така в нашата извадка при 41,7% (n=5) от пациентите при лечение с тирозин-киназни инхибитори може да се очаква повишен риск от реакции на кожна токсичност. В тези случаи може да се предложи по-активно поведение по отношение на профилактиката на този тип НЛР.

XPC

В нашата извадка е открит един варинат в *XPC*. SNP вариантът rs2228001 се открива при 50% (n=6) от пробите в хетерозиготна форма – генотип GT, при 25% (n=3) се наблюдава хомозиготен TT генотип и при 25% (n=3) от пробите е установен хомозиготен GG-генотип. SNP вариантът се асоциира с риска от токсичност при някои химиотерапевтици. Така при пациенти с генотип GT и GG е отчетен по-висок риск от хематологична токсичност при лечение с цисплатина [Shigeru Sakano, 2010, Lamba, 2014]. Алелът G се асоциира и с по-висок риск от ототоксичност, по – изразен в хомозиготно състояние [Caronia, 2009].

Изследвана е и връзката на този полиморфизъм с ефективността от химиотерапията. Според данните на Caronia et al. [Caronia, 2009] наличието на поне един G-алел се асоциира с по - добър терапевтичен отговор в сравнение с хомозиготите за T-алел (OR = 0,34, P = 0,032).

Така вариантите в гените за ДНК репарацията се очертават като добър прогностичен маркер за токсичността на определени терапевтични режими [S. Sakano, 2010]. При 75% от нашите пациенти на базата на генотипа rs2228001 може да се очаква по-висок риск за потискане на хематопоезата и слухово увреждане. За тези пациенти в бъдеще може да се предвиди, както по-често проследяване на базовите хематологични

параметри за навременно третиране на усложненията, така и аудиологично изследване за установяване на отклонения в слуха.

ERCC5

Този ген кодира ДНК ендонуклеаза, която участва в ДНК репарационните механизми при UV-индуцирано ДНК-увреждане [Soltys, 2013]. *ERCC5* участва и в други клетъчни процеси – транскрипция на РНК полимераза II. Патогенните мутации в този ген водят до развитието на кожното заболяване xeroderma pigmentosum, характеризиращо се с свръхчувствителност към ултравиолетова светлина и висок риск за развитие на рак на кожата [Wang, 2015].

В нашата извадка е открит един вариант в *ERCC5*. Вариантът rs17655 се установява в 33.3% (n=4) от пациентите в хетерозиготно състояние - генотип GC, в 66.7% (n=8) в хомозиготно състояние - GG генотип. Няма установени пациенти с хомозиготен CC генотип.

Този SNP се намира в С-края на протеина ERCC5, където се намират домените за свързване на протеина с другите участници в NER репарационния комплекс - XPB, XPD, p62 и p44 субединиците на транскрипционния фактор IIH. С-алелът води до промяна на аминокиселината Asp на His на 1104-та позиция в протеина и се предполага, че пречи на изграждането на NER-репарационния комплекс и неговата ефикасност [E. Caiola, 2011].

В литературата SNP вариантът rs17655 в *ERCC5* гена се асоциира с общата преживяемост и преживяемостта без прогресия при пациенти с рак на яйчника подложени на химиотерапия [Elisa Caiola, 2011]. Наличието на G-съдържащ генотип е свързано с по-добра прогноза в ранен стадий и с по-лоша прогноза при късната фаза на заболяването. Този феномен може да се дължи на различната физиопатологията на рака на яйчника в ранен и късен стадий [Kurman and Shih Ie, 2010]. Данните на Caiola et. al. показват, че генотипирането на *ERCC5*, може да помогне за прогнозиране на отговора към платина базирана химиотерапия – при пациентите с CC генотип и в късен стадий се очаква по-лош терапевтичен отговор.

Ролята на този полиморфизъм при щитовиден карцином не е изследвана досега и предстои да бъде изяснена. В нашата извадка не са открити пациенти хомозиготи с CC

генотип, което предполага, при наличие на същата асоциация както при рака на овариума, добър ефект на химиотерапията с платина в тази кохорта.

Заключение

Проведеното изследване е в модерна област на медицината, тъй като е свързано с характеризиране на фармакогенетични варианти, асоциирани с химиотерапия при пациенти с НДКБК и ФПТК, използвайки NGS технологията. Изборът на подходящо лечение в зависимост от молекулния туморен фенотип ще доведе до намаляване на нежелани лекарствени реакции и подобряване на ефекта от лечението. Това от своя страна ще подобри качеството на живот на конкретния пациент и ще намали финансовото бреме на обществото.

Получените резултати имат научно и научно-приложно значение, тъй като определят фармакогенетични варианти в онкогени и тумор-супресорни гени, които имат отношение към ефекта от химиотерапията при пациенти с НДКБК и с фамилна предразположеност към тиреоиден карцином.

С настоящото проучване е определен мутационния спектъра на *EGFR* гена при белодробен карцином чрез изследване с real-time PCR. Установен е типа и честотата на чувствителните мутации за прицелна терапия с тирозин киназни инхибитори.

Нашите резултати добавят доказателства в подкрепа на диагнозата, че всички пациенти с аденокарцином на НДКБК трябва да се подложат на генетичен тест за мутации в *EGFR* гена за лечение с EGFR тирозин-киназни инхибитори.

Бъдещи насоки

NGS – технологията има потенциал да подобри откриването на нови генетични варианти свързани с раковите заболявания, което ще доведе до по-добри решения за лечение и различни подходи за мониторинг. Разработването на различни видове NGS панели, ще позволи разкриването на редки фармакогенетични варианти и разработването на стратегии за индивидуализиране на терапията съобразно генните варианти, оптимизиране на ефикасността и минимизиране на токсичността на лекарствените средства.

VII. Изводи

1. В туморни проби на пациенти с НДКБК са установени седем патогенни варианта в четири от 94-те изследвани гена, асоциирани с туморогенеза: rs16941, rs80356964 и rs1799950 в *BRCA1*, rs146176004 в *PMS2*, rs75023630 и rs45551636 в *PALB2* и rs63751049 в *MLH1*.
2. При НДКБК са доказани пет фармакогенетични варианта в четири от 94-те изследвани гена - rs1042522 в *TP53*, rs2228001 в *XPC*, rs2227983 в *EGFR*, rs1799793 и rs13181 в *ERCC2*.
3. Потвърдено е, че активиращите мутации в *EGFR* гена при пациенти с НДКБК са по-чести при женски пол, при аденокарциноми в сравнение плоскоклетъчни или/и едроклетъчни карциноми и при непушачи.
4. Установено е, че общата честота на мутациите в *EGFR* гена в българска популация е по-ниска (10%) в сравнение със средната за Европа (17%). Делът на отделните мутации е съизмерим с европейския по отношение на точкова мутация L858R в екзон 21 (3,6%) и инсерции в екзон 20 (0,4%), докато делециите в екзон 19 са с по-ниска честота (5,6%) спрямо европейската (съответно 3,3%; 0,3%; 9,0%).
5. В кръвни проби на пациенти с ФПТК са установени осем патогенни варианта в три от 94-те изследвани гена, свързани с туморогенезата - два публикувани rs56391007 в *MET* и rs181856591 в *RET* и шест нови варианта, непубликувани в литературата - NP_001120972.1: p.Leu1080Met, NP_001120972.1: p.Phe1234Ser, NP_001120972.1:p.Pro712Gln, NP_001120972.1:p.Ser823Tyr в *MET* и NP_000240.1:p.Glu23Gly, NP_000240.1:p.Gly634Val в *MLH1*.
6. При секвениране с панел TruSight Cancer на пациенти с НДКБК или ФПТК от общо 7800 установени варианти са доказани 7 фармакогенетични варианти, от които 4 се откриват при двата типа карциноми - rs1042522 в *TP53*, rs2228001 в *XPC*, rs2227983 в *EGFR* и rs1318 в *ERCC2*.

VIII. Приноси

Приноси с научен характер

1. Онкогени/туморсупресорни гени освен патогенни варианти могат да съдържат фармакогенетични варианти, асоциирани с неефективно лечение с платинови съединения и намалена преживяемост на пациентите.
2. Доказани са 6 нови патогенни герминативни варианти при фамилен папиларен тиреоиден карцином.
3. Установено е, че българската популация има по-ниска обща честота на мутациите в *EGFR* гена в сравнение със средната за Европа за сметка на делециите в екзон 19.

Приноси с приложен характер

1. Секвенирането на ДНК-и от туморни проби с TruSight Cancer Sequence панел може да определи соматични фармакогенетични варианти, свързани с неефективна платина базирана химиотерапия.
2. Секвенирането на ДНК-и от кръвни проби с TruSight Cancer Sequence панел може да определи герминативни фармакогенетични варианти, определящи токсично действие при химиотерапия.

IX. Литературни източници

1. Zappa C, Mousa SA. Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. Translational Lung Cancer Research. 2016;5(3):288-300.
2. Ning L, et al. Association Analysis of MET Gene Polymorphism with Papillary Thyroid Carcinoma in a Chinese Population. International Journal of Endocrinology. 2015;2015:405217.
3. Relling MV, Dervieux T. Pharmacogenetics and cancer therapy. Nature reviews Cancer. 2001;1(2):99-108.
4. Lu D-Y, et al. Pharmacogenetics of cancer therapy: breakthroughs from beyond? Future Science OA. 2015;1(4):FSO80.
5. Hertz DL, Rae J. Pharmacogenetics of cancer drugs. Annual review of medicine. 2015;66:65-81.
6. Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. Trends in genetics : TIG. 1993;9(4):138-41.
7. Tomasetti C, Vogelstein B. Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. Science. 2015;347(6217):78-81.
8. zur Hausen H. Viruses in human cancers. Science. 1991;254(5035):1167-73.
9. Liao JB. Viruses and Human Cancer. The Yale Journal of Biology and Medicine. 2006;79(3-4):115-22.
10. Roberts SA, Gordenin DA. Hypermutation in human cancer genomes: footprints and mechanisms. Nature reviews Cancer. 2014;14(12):786-800.
11. Wilson TR, et al. Chemoresistance in solid tumours. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology. 2006;17 Suppl 10:x315-24.
12. Talpaz M, et al. Dasatinib in Imatinib-Resistant Philadelphia Chromosome–Positive Leukemias. New England Journal of Medicine. 2006;354(24):2531-41.
13. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. Cell. 1997;88(3):323-31.
14. Rajendran G, et al. Epigenetic regulation of DNA methyltransferases: DNMT1 and DNMT3B in gliomas. Journal of neuro-oncology. 2011;104(2):483-94.
15. Ibrahim R, et al. Omics for personalized medicine: defining the current we swim in. Expert review of molecular diagnostics. 2016;16(7):719-22.
16. Drmanac R, et al. Human genome sequencing using unchained base reads on self-assembling DNA nanoarrays. Science. 2010;327(5961):78-81.
17. Ross JS. Breast cancer biomarkers and HER2 testing after 10 years of anti-HER2 therapy. Drug news & perspectives. 2009;22(2):93-106.
18. Davis LM, et al. Amplification Patterns of Three Genomic Regions Predict Distant Recurrence in Breast Carcinoma. The Journal of molecular diagnostics : JMD. 2007;9(3):327-36.
19. Penault-Llorca F, et al. Emerging technologies for assessing HER2 amplification. Am J Clin Pathol. 2009;132(4):539-48.
20. Delidow BC, et al. Polymerase chain reaction : basic protocols. Methods in molecular biology (Clifton, NJ). 1993;15:1-29.
21. Wu DY, et al. Allele-specific enzymatic amplification of beta-globin genomic DNA for diagnosis of sickle cell anemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989;86(8):2757-60.

22. Latorra D, et al. Enhanced allele-specific PCR discrimination in SNP genotyping using 3' locked nucleic acid (LNA) primers. Human mutation. 2003;22(1):79-85.
23. Samowitz WS, et al. Relationship of Ki-ras mutations in colon cancers to tumor location, stage, and survival: a population-based study. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology. 2000;9(11):1193-7.
24. Fragouli E. Next generation sequencing for preimplantation genetic testing for aneuploidy: friend or foe? Fertil Steril. 2018;109(4):606-7.
25. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. Nature biotechnology. 2008;26(10):1135-45.
26. Kamps R, et al. Next-Generation Sequencing in Oncology: Genetic Diagnosis, Risk Prediction and Cancer Classification. International Journal of Molecular Sciences. 2017;18(2):308.
27. Quail MA, et al. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. BMC Genomics. 2012;13:341.
28. Gogol-Doring A, Chen W. An overview of the analysis of next generation sequencing data. Methods in molecular biology (Clifton, NJ). 2012;802:249-57.
29. Li H, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. Bioinformatics. 2009;25(16):2078-9.
30. Danecek P, et al. The variant call format and VCFtools. Bioinformatics. 2011;27(15):2156-8.
31. McKenna A, et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. Genome Res. 2010;20(9):1297-303.
32. Solinas-Toldo S, et al. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. Genes, chromosomes & cancer. 1997;20(4):399-407.
33. Pinkel D, et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. Nature genetics. 1998;20(2):207-11.
34. Davies JJ, et al. Array CGH technologies and their applications to cancer genomes. Chromosome Res. 2005;13(3):237-48.
35. Jonsson G, et al. Distinct genomic profiles in hereditary breast tumors identified by array-based comparative genomic hybridization. Cancer Res. 2005;65(17):7612-21.
36. Corrie PG. Cytotoxic chemotherapy: clinical aspects. Medicine. 2011;39(12):717-22.
37. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011;144(5):646-74.
38. Hartmann JT, et al. Tyrosine kinase inhibitors - a review on pharmacology, metabolism and side effects. Current drug metabolism. 2009;10(5):470-81.
39. Coiffier B, Ribrag V. Exploring mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibition for treatment of mantle cell lymphoma and other hematologic malignancies. Leukemia & lymphoma. 2009;50(12):1916-30.
40. Fauvel B, Yasri A. Antibodies directed against receptor tyrosine kinases: Current and future strategies to fight cancer. mAbs. 2014;6(4):838-51.
41. Bernard-Marty C, et al. Monoclonal antibody-based targeted therapy in breast cancer: current status and future directions. Drugs. 2006;66(12):1577-91.
42. Tai W, et al. The role of HER2 in cancer therapy and targeted drug delivery. Journal of Controlled Release. 2010;146(3):264-75.

43. Ascierto PA, et al. The role of BRAF V600 mutation in melanoma. Journal of Translational Medicine. 2012;10:85-.
44. Iqbal N, Iqbal N. Imatinib: A Breakthrough of Targeted Therapy in Cancer. Chemotherapy Research and Practice. 2014;2014:9.
45. Padma VV. An overview of targeted cancer therapy. BioMedicine. 2015;5(4):19.
46. Flaherty KT, et al. Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. The New England journal of medicine. 2012;367(18):1694-703.
47. Maher M. Current and Emerging Treatment Regimens for HER2-Positive Breast Cancer. Pharmacy and Therapeutics. 2014;39(3):206-12.
48. Petrelli F, et al. Relationship between skin rash and outcome in non-small-cell lung cancer patients treated with anti-EGFR tyrosine kinase inhibitors: a literature-based meta-analysis of 24 trials. Lung Cancer. 2012;78(1):8-15.
49. Cai J, et al. Correlation of bevacizumab-induced hypertension and outcomes of metastatic colorectal cancer patients treated with bevacizumab: a systematic review and meta-analysis. World journal of surgical oncology. 2013;11:306.
50. Gore L, et al. Targeting developmental pathways in children with cancer: what price success? The Lancet Oncology. 2013;14(2):e70-8.
51. Gleave ME, Monia BP. Antisense therapy for cancer. Nature Reviews Cancer. 2005;5(6):nrc1631.
52. Dean NM, Bennett CF. Antisense oligonucleotide-based therapeutics for cancer. Oncogene. 2003;22:9087.
53. Zamore PD. Ancient pathways programmed by small RNAs. Science (New York, NY). 2002;296(5571):1265-9.
54. Zamore PD, et al. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. Cell. 2000;101(1):25-33.
55. Elbashir SM, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature. 2001;411(6836):494-8.
56. Caplen NJ, et al. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98(17):9742-7.
57. Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science (New York, NY). 2014;346(6213):1258096.
58. Hsu PD, et al. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. Cell. 2014;157(6):1262-78.
59. Sternberg SH, Doudna JA. Expanding the Biologist's Toolkit with CRISPR-Cas9. Molecular cell. 2015;58(4):568-74.
60. Bhaya D, et al. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. Annu Rev Genet. 2011;45:273-97.
61. Ran FA, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Nature protocols. 2013;8(11):2281-308.
62. Jinek M, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science. 2012;337(6096):816-21.
63. Brown MT, Cooper JA. Regulation, substrates and functions of src. Biochimica et biophysica acta. 1996;1287(2-3):121-49.
64. Kennedy EM, et al. Inactivation of the human papillomavirus E6 or E7 gene in cervical carcinoma cells by using a bacterial CRISPR/Cas RNA-guided endonuclease. Journal of virology. 2014;88(20):11965-72.

65. Chessum N, et al. Recent advances in cancer therapeutics. Progress in medicinal chemistry. 2015;54:1-63.
66. Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. Trends in genetics : TIG. 2000;16(4):168-74.
67. Seligson DB, et al. Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence. Nature. 2005;435(7046):1262-6.
68. Zhu B, et al. Developing new chemical tools for DNA methyltransferase 1 (DNMT 1): a small-molecule activity-based probe and novel tetrazole-containing inhibitors. Bioorganic & medicinal chemistry. 2015;23(12):2917-27.
69. Luqmani YA. Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. Medical principles and practice : international journal of the Kuwait University, Health Science Centre. 2005;14 Suppl 1:35-48.
70. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. Biochimica et biophysica acta. 1976;455(1):152-62.
71. Ueda K, et al. The mdr1 gene, responsible for multidrug-resistance, codes for P-glycoprotein. Biochemical and biophysical research communications. 1986;141(3):956-62.
72. Bassuk AG, et al. Precision Medicine: Genetic Repair of Retinitis Pigmentosa in Patient-Derived Stem Cells. Sci Rep. 2016;6:19969.
73. Yin H, et al. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. Nature biotechnology. 2014;32(6):551-3.
74. Genetic Home Reference. Lung cancer 2017 [https://ghr.nlm.nih.gov/condition/lung-cancer#genes]. Available from: https://ghr.nlm.nih.gov/condition/lung-cancer#genes.
75. Soh J, et al. Oncogene mutations, copy number gains and mutant allele specific imbalance (MASI) frequently occur together in tumor cells. PLoS One. 2009;4(10):e7464.
76. Ladanyi M, Pao W. Lung adenocarcinoma: guiding EGFR-targeted therapy and beyond. Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc. 2008;21 Suppl 2:S16-22.
77. Sordella R, et al. Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. Science. 2004;305(5687):1163-7.
78. Gerber DE, et al. Management and future directions in non-small cell lung cancer with known activating mutations. American Society of Clinical Oncology educational book American Society of Clinical Oncology Meeting. 2014:e353-65.
79. Rosell R, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. The Lancet Oncology. 2012;13(3):239-46.
80. Sequist LV, et al. Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2013;31(27):3327-34.
81. Marks JL, et al. Prognostic and therapeutic implications of EGFR and KRAS mutations in resected lung adenocarcinoma. Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer. 2008;3(2):111-6.
82. Maemondo M, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. The New England journal of medicine. 2010;362(25):2380-8.
83. Soria JC, et al. Systematic review and meta-analysis of randomised, phase II/III trials adding bevacizumab to platinum-based chemotherapy as first-line treatment in patients with

advanced non-small-cell lung cancer. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology. 2013;24(1):20-30.
84. Pao W, et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. PLoS Med. 2005;2(3):e73.
85. Jänne PA, et al. AZD9291 in EGFR Inhibitor–Resistant Non–Small-Cell Lung Cancer. New England Journal of Medicine. 2015;372(18):1689-99.
86. Wu JY, et al. Effectiveness of tyrosine kinase inhibitors on "uncommon" epidermal growth factor receptor mutations of unknown clinical significance in non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res. 2011;17(11):3812-21.
87. Soda M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. Nature. 2007;448(7153):561-6.
88. Koivunen JP, et al. EML4-ALK fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2008;14(13):4275-83.
89. Inamura K, et al. EML4-ALK lung cancers are characterized by rare other mutations, a TTF-1 cell lineage, an acinar histology, and young onset. Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc. 2009;22(4):508-15.
90. Kwak EL, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. The New England journal of medicine. 2010;363(18):1693-703.
91. Riely GJ, et al. Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma. Clin Cancer Res. 2008;14(18):5731-4.
92. Rekhtman N, et al. KRAS mutations are associated with solid growth pattern and tumor-infiltrating leukocytes in lung adenocarcinoma. Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc. 2013;26(10):1307-19.
93. Cardarella S, et al. Clinical, pathologic, and biologic features associated with BRAF mutations in non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res. 2013;19(16):4532-40.
94. Paik PK, et al. Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2011;29(15):2046-51.
95. Planchard D, et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously untreated BRAF(V600E)-mutant metastatic non-small-cell lung cancer: an open-label, phase 2 trial. The Lancet Oncology. 2017;18(10):1307-16.
96. Davies H, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. Nature. 2002;417(6892):949-54.
97. Gautschi O, et al. A Patient With BRAF V600E Lung Adenocarcinoma Responding to Vemurafenib. Journal of Thoracic Oncology. 2012;7(10):e23-e4.
98. Rudin CM, et al. Molecular Characterization of Acquired Resistance to the BRAF Inhibitor Dabrafenib in a Patient with BRAF-Mutant Non–Small-Cell Lung Cancer. Journal of Thoracic Oncology. 2013;8(5):e41-e2.
99. Sen B, et al. Kinase-impaired BRAF mutations in lung cancer confer sensitivity to dasatinib. Science translational medicine. 2012;4(136):136ra70.
100. Gandhi J, et al. Alterations in genes of the EGFR signaling pathway and their relationship to EGFR tyrosine kinase inhibitor sensitivity in lung cancer cell lines. PLoS One. 2009;4(2):e4576.
101. Pratilas CA, et al. Genetic predictors of MEK dependence in non-small cell lung cancer. Cancer Res. 2008;68(22):9375-83.

102. Bergethon K, et al. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2012;30(8):863-70.
103. Takeuchi K, et al. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. Nat Med. 2012;18(3):378-81.
104. Yoshida A, et al. ROS1-rearranged lung cancer: a clinicopathologic and molecular study of 15 surgical cases. The American journal of surgical pathology. 2013;37(4):554-62.
105. Davies KD, et al. Identifying and targeting ROS1 gene fusions in non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res. 2012;18(17):4570-9.
106. Awad MM, et al. Acquired resistance to crizotinib from a mutation in CD74-ROS1. The New England journal of medicine. 2013;368(25):2395-401.
107. Nikolova DN, et al. Genome-wide gene expression profiles of thyroid carcinoma: Identification of molecular targets for treatment of thyroid carcinoma. Oncology reports. 2008;20(1):105-21.
108. Ziegler A, et al. Personalized medicine using DNA biomarkers: a review. Human genetics. 2012;131(10):1627-38.
109. Wu YL, et al. Afatinib versus cisplatin plus gemcitabine for first-line treatment of Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (LUX-Lung 6): an open-label, randomised phase 3 trial. The Lancet Oncology. 2014;15(2):213-22.
110. Nikiforova MN, et al. RAS point mutations and PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2003;88(5):2318-26.
111. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. Nature reviews Cancer. 2012;12(4):252-64.
112. Thatcher N, et al. Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer: results from a randomised, placebo-controlled, multicentre study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer). Lancet (London, England). 2005;366(9496):1527-37.
113. Wang Z, et al. New development in CAR-T cell therapy. Journal of Hematology & Oncology. 2017;10(1):53.
114. Takahashi M, et al. Co-segregation of MEN2 and Hirschsprung's disease: the same mutation of RET with both gain and loss-of-function? Human mutation. 1999;13(4):331-6.
115. Santoro M, et al. Molecular biology of the MEN2 gene. Journal of internal medicine. 1998;243(6):505-8.
116. Gupta-Abramson V, et al. Phase II trial of sorafenib in advanced thyroid cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2008;26(29):4714-9.
117. Kloos RT, et al. Phase II trial of sorafenib in metastatic thyroid cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2009;27(10):1675-84.
118. Lam ET, et al. Phase II clinical trial of sorafenib in metastatic medullary thyroid cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2010;28(14):2323-30.
119. Carr LL, et al. Phase II study of daily sunitinib in FDG-PET-positive, iodine-refractory differentiated thyroid cancer and metastatic medullary carcinoma of the thyroid with functional imaging correlation. Clin Cancer Res. 2010;16(21):5260-8.

120. Wells SA, Jr., et al. Vandetanib for the treatment of patients with locally advanced or metastatic hereditary medullary thyroid cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2010;28(5):767-72.
121. Ye Y, et al. Inhibition of epidermal growth factor receptor signaling prohibits metastasis of gastric cancer via downregulation of MMP7 and MMP13. Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine. 2014;35(11):10891-6.
122. Wei SZ, et al. Predictive value of ERCC1 and XPD polymorphism in patients with advanced non-small cell lung cancer receiving platinum-based chemotherapy: a systematic review and meta-analysis. Medical oncology (Northwood, London, England). 2011;28(1):315-21.
123. Flaherty KT, et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. The New England journal of medicine. 2010;363(9):809-19.
124. Wang C-M, et al. Autologous T Cells Expressing CD30 Chimeric Antigen Receptors for Relapsed or Refractory Hodgkin Lymphoma: An Open-Label Phase I Trial. Clinical Cancer Research. 2017;23(5):1156-66.
125. Nikiforov YE. Molecular diagnostics of thyroid tumors. Archives of pathology & laboratory medicine. 2011;135(5):569-77.
126. Bhaijee F, Nikiforov YE. Molecular analysis of thyroid tumors. Endocrine pathology. 2011;22(3):126-33.
127. Kimura ET, et al. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. Cancer Res. 2003;63(7):1454-7.
128. Ho AL, et al. Selumetinib-enhanced radioiodine uptake in advanced thyroid cancer. The New England journal of medicine. 2013;368(7):623-32.
129. Nair M, et al. Prognostic and Predictive Biomarkers in Cancer. Current cancer drug targets. 2014;14(5):477-504.
130. Santoro M, et al. Minireview: RET: normal and abnormal functions. Endocrinology. 2004;145(12):5448-51.
131. Yoshida K, Miki Y. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. Cancer science. 2004;95(11):866-71.
132. Ricks-Santi LJ, et al. BRCA1 polymorphisms and breast cancer epidemiology in the Western New York Exposures and Breast Cancer (WEB) study. Genetic epidemiology. 2013;37(5):504-11.
133. Pharoah PD, et al. Association studies for finding cancer-susceptibility genetic variants. Nature reviews Cancer. 2004;4(11):850-60.
134. Rahman N, et al. PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. Nature genetics. 2007;39(2):165-7.
135. Johnson N, et al. Counting potentially functional variants in BRCA1, BRCA2 and ATM predicts breast cancer susceptibility. Human molecular genetics. 2007;16(9):1051-7.
136. Mangia A, et al. BRCA1 expression and molecular alterations in familial breast cancer. Histology and histopathology. 2009;24(1):69-76.
137. Xu G-P, et al. The association between BRCA1 gene polymorphism and cancer risk: a meta-analysis. Oncotarget. 2018;9(9):8681-94.
138. snpedia.com. https://www.snpedia.com/index.php/Rs1799950 2018 [Available from: https://www.snpedia.com/index.php/Rs1799950.

139. Henrie A. ClinVar Miner 2018 [Available from: https://clinvarminer.genetics.utah.edu/submissions-by-variant/NM_007294.3%28BRCA1%29%3Ac.1396C%3EG%20%28p.Arg466Gly%29.
140. Dowty JG, et al. Cancer risks for MLH1 and MSH2 mutation carriers. Human mutation. 2013;34(3):10.1002/humu.22262.
141. Spaepen M, et al. Germline mutations of the hMLH1 and hMSH2 mismatch repair genes in Belgian hereditary nonpolyposis colon cancer (HNPCC) patients. Familial cancer. 2006;5(2):179-89.
142. Hardt K, et al. Missense variants in hMLH1 identified in patients from the German HNPCC consortium and functional studies. Familial cancer. 2011;10(2):273-84.
143. Pastrello C, et al. Integrated analysis of unclassified variants in mismatch repair genes. Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics. 2011;13(2):115-24.
144. Dieumegard B, et al. Extensive molecular screening for hereditary non-polyposis colorectal cancer. British journal of cancer. 2000;82(4):871-80.
145. Kondo E, et al. A yeast two-hybrid assay provides a simple way to evaluate the vast majority of hMLH1 germ-line mutations. Cancer Res. 2003;63(12):3302-8.
146. Borras E, et al. Comprehensive functional assessment of MLH1 variants of unknown significance. Human mutation. 2012;33(11):1576-88.
147. Broeke SWt, et al. Lynch Syndrome Caused by Germline PMS2 Mutations: Delineating the Cancer Risk. Journal of Clinical Oncology. 2015;33(4):319-25.
148. Maxwell KN, et al. Prevalence of mutations in a panel of breast cancer susceptibility genes in BRCA1/2-negative patients with early-onset breast cancer. Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics. 2015;17(8):630-8.
149. Goodenberger ML, et al. PMS2 monoallelic mutation carriers: the known unknown. Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics. 2016;18(1):13-9.
150. Antoniou AC, et al. Breast-Cancer Risk in Families with Mutations in PALB2. New England Journal of Medicine. 2014;371(6):497-506.
151. Tischkowitz M, Xia B. PALB2/FANCN: recombining cancer and Fanconi anemia. Cancer Res. 2010;70(19):7353-9.
152. Thompson ER, et al. Prevalence of PALB2 mutations in Australian familial breast cancer cases and controls. Breast Cancer Research. 2015;17(1):111.
153. Leyton Y, et al. Association of PALB2 sequence variants with the risk of familial and early-onset breast cancer in a South-American population. BMC Cancer. 2015;15:30.
154. Georgieva M. TD. ПОВЕДЕНИЕ ПРИ БЕЛОДРОБЕН КАРЦИНОМ

Версия 2. Varna2013. p. 72-4.
155. Novello S, et al. Metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. Annals of Oncology. 2016;27(suppl_5):v1-v27.
156. Ozaki T, Nakagawara A. Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. Cancers. 2011;3(1):994-1013.
157. Bojesen SE, Nordestgaard BG. The common germline Arg72Pro polymorphism of p53 and increased longevity in humans. Cell cycle (Georgetown, Tex). 2008;7(2):158-63.
158. Kim JG, et al. TP53 codon 72 polymorphism associated with prognosis in patients with advanced gastric cancer treated with paclitaxel and cisplatin. Cancer Chemother Pharmacol. 2009;64(2):355-60.

159. Sankhwar M, et al. Polymorphisms in the XPC gene affect urinary bladder cancer risk: a case-control study, meta-analyses and trial sequential analyses. Scientific Reports. 2016;6:27018.
160. Bahl A, Falk S. Meta-analysis of single agents in the chemotherapy of NSCLC: what do we want to know? British journal of cancer. 2001;84(9):1143-5.
161. Reed E. Platinum-DNA adduct, nucleotide excision repair and platinum based anti-cancer chemotherapy. Cancer treatment reviews. 1998;24(5):331-44.
162. Sakano S, et al. Nucleotide excision repair gene polymorphisms may predict acute toxicity in patients treated with chemoradiotherapy for bladder cancer. Pharmacogenomics. 2010;11(10):1377-87.
163. da Cunha Santos G, et al. EGFR mutations and lung cancer. Annual review of pathology. 2011;6:49-69.
164. Braig F, et al. Cetuximab Resistance in Head and Neck Cancer Is Mediated by EGFR-K₅₂₁ Polymorphism. Cancer Research. 2017;77(5):1188-99.
165. Liu W, et al. A functional common polymorphism in a Sp1 recognition site of the epidermal growth factor receptor gene promoter. Cancer Res. 2005;65(1):46-53.
166. Amador ML, et al. An epidermal growth factor receptor intron 1 polymorphism mediates response to epidermal growth factor receptor inhibitors. Cancer Res. 2004;64(24):9139-43.
167. Wang WS, et al. Epidermal growth factor receptor R497K polymorphism is a favorable prognostic factor for patients with colorectal carcinoma. Clin Cancer Res. 2007;13(12):3597-604.
168. Parmar S, et al. Pharmacogenetic predictors for EGFR-inhibitor-associated skin toxicity. The Pharmacogenomics Journal. 2011;13:181.
169. Biason P, et al. Nucleotide excision repair gene variants and association with survival in osteosarcoma patients treated with neoadjuvant chemotherapy. Pharmacogenomics J. 2012;12(6):476-83.
170. Sullivan I, et al. Pharmacogenetics of the DNA repair pathways in advanced non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. Cancer Lett. 2014;353(2):160-6.
171. Benhamou S, Sarasin A. ERCC2 /XPD gene polymorphisms and lung cancer: a HuGE review. American journal of epidemiology. 2005;161(1):1-14.
172. Kiyohara C, et al. Association of genetic polymorphisms in the base excision repair pathway with lung cancer risk: a meta-analysis. Lung Cancer. 2006;54(3):267-83.
173. Park DJ, et al. A Xeroderma pigmentosum group D gene polymorphism predicts clinical outcome to platinum-based chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. Cancer Res. 2001;61(24):8654-8.
174. Boige V, et al. Pharmacogenetic assessment of toxicity and outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with LV5FU2, FOLFOX, and FOLFIRI: FFCD 2000-05. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2010;28(15):2556-64.
175. Giovannetti E, et al. Association between DNA-repair polymorphisms and survival in pancreatic cancer patients treated with combination chemotherapy. Pharmacogenomics. 2011;12(12):1641-52.
176. Zhou W, et al. Gene-environment interaction for the ERCC2 polymorphisms and cumulative cigarette smoking exposure in lung cancer. Cancer Res. 2002;62(5):1377-81.

177. Yan LX, et al. Knockdown of miR-21 in human breast cancer cell lines inhibits proliferation, in vitro migration and in vivo tumor growth. Breast cancer research : BCR. 2011;13(1):R2.
178. Kerr KM, et al. Second ESMO consensus conference on lung cancer: pathology and molecular biomarkers for non-small-cell lung cancer. Annals of Oncology. 2014;25(9):1681-90.
179. Zhang Y-L, et al. The prevalence of EGFR mutation in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. Oncotarget. 2016;7(48):78985-93.
180. Graham RP, et al. Worldwide Frequency of Commonly Detected EGFR Mutations. Archives of pathology & laboratory medicine. 2018;142(2):163-7.
181. Jimeno A, Hidalgo M. Pharmacogenomics of epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors. Biochimica et biophysica acta. 2006;1766(2):217-29.
182. Paez JG, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. Science (New York, NY). 2004;304(5676):1497-500.
183. Lynch TJ, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. The New England journal of medicine. 2004;350(21):2129-39.
184. Shigematsu H, Gazdar AF. Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signaling pathway in lung cancers. International journal of cancer. 2006;118(2):257-62.
185. Sakurada A, et al. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in lung cancer: impact of primary or secondary mutations. Clinical lung cancer. 2006;7 Suppl 4:S138-44.
186. Novello S, et al. Metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology. 2016;27(suppl 5):v1-v27.
187. Tan C-S, et al. Third generation EGFR TKIs: current data and future directions. Molecular Cancer. 2018;17:29.
188. Barnes TA, et al. Third-Generation Tyrosine Kinase Inhibitors Targeting Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer. Frontiers in Oncology. 2017;7:113.
189. Peng C, et al. VEGF-C antisense oligoxydeonucleotide suppression of invasive ability of the A-549 lung carcinoma cell line. Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP. 2011;12(8):2097-9.
190. Wei Z, et al. Patients harboring epidermal growth factor receptor (EGFR) double mutations had a lower objective response rate than those with a single mutation in non-small cell lung cancer when treated with EGFR-tyrosine kinase inhibitors. Thoracic Cancer. 2014;5(2):126-32.
191. Zhang GC, et al. Epidermal Growth Factor Receptor Double Activating Mutations Involving Both Exons 19 and 21 Exist in Chinese Non-small Cell Lung Cancer Patients. Clinical Oncology. 2007;19(7):499-506.
192. Toshihiko Y, et al. EGFR point mutation in non-small cell lung cancer is occasionally accompanied by a second mutation or amplification. Cancer science. 2006;97(8):753-9.
193. Gahr S, et al. EGFR mutational status in a large series of Caucasian European NSCLC patients: data from daily practice. British journal of cancer. 2013;109(7):1821-8.
194. Yeganeh MZ, et al. RET proto oncogene mutation detection and medullary thyroid carcinoma prevention. Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP. 2015;16(6):2107-17.

195. Chin T-W, et al. Analysis of the RET Gene in Subjects with Sporadic Hirschsprung's Disease. Journal of the Chinese Medical Association. 2008;71(8):406-10.
196. Fitze G, et al. Association of germline mutations and polymorphisms of the RET proto-oncogene with idiopathic congenital central hypoventilation syndrome in 33 patients. Journal of medical genetics. 2003;40(2):e10-e.
197. Skinner MA, et al. Renal Aplasia in Humans Is Associated with RET Mutations. American Journal of Human Genetics. 2008;82(2):344-51.
198. Santoro M, Carlomagno F. Central Role of RET in Thyroid Cancer. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 2013;5(12):a009233.
199. Kobayashi Y, et al. Pathogenic variant burden in the ExAC database: an empirical approach to evaluating population data for clinical variant interpretation. Genome Medicine. 2017;9:13.
200. Neklason DW, et al. Activating mutation in MET oncogene in familial colorectal cancer. BMC Cancer. 2011;11:424-.
201. Mo H-N, Liu P. Targeting MET in cancer therapy. Chronic Diseases and Translational Medicine. 2017;3(3):148-53.
202. Ma PC, et al. Expression and mutational analysis of MET in human solid cancers. Genes, chromosomes & cancer. 2008;47(12):1025-37.
203. Jung KH, et al. Progress in cancer therapy targeting c-Met signaling pathway. Archives of pharmacal research. 2012;35(4):595-604.
204. Gherardi E, et al. Targeting MET in cancer: rationale and progress. Nature reviews Cancer. 2012;12(2):89-103.
205. Lawrence RE, Salgia R. MET molecular mechanisms and therapiesin lung cancer. Cell Adhesion & Migration. 2010;4(1):146-52.
206. Liu X, et al. Next-Generation Sequencing of Pulmonary Sarcomatoid Carcinoma Reveals High Frequency of Actionable MET Gene Mutations. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2016;34(8):794-802.
207. Agarwal D, et al. Characterization of DNA variants in the human kinome in breast cancer. Scientific Reports. 2015;5:14736.
208. Henríquez-Hernández LA, et al. Distribution of TYMS, MTHFR, p53 and MDR1 gene polymorphisms in patients with breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. Cancer epidemiology. 2010;34(5):634-8.
209. Borchiellini D, et al. Candidate apoptotic and DNA repair gene approach confirms involvement of ERCC1, ERCC5, TP53 and MDM2 in radiation-induced toxicity in head and neck cancer. Oral oncology. 2017;67:70-6.
210. Boso V, et al. SNPs and taxane toxicity in breast cancer patients2014. 1845-58 p.
211. Sullivan I, et al. Pharmacogenetics of the DNA repair pathways in advanced non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. Cancer Letters. 2014;353(2):160-6.
212. Lantieri F, et al. The involvement of the RET variant G691S in medullary thyroid carcinoma: conflicting results of meta-analyses need to be reconciled. International journal of cancer. 2013;133(7):1760-1.
213. Figlioli G, et al. Medullary thyroid carcinoma (MTC) and RET proto-oncogene: mutation spectrum in the familial cases and a meta-analysis of studies on the sporadic form. Mutation research. 2013;752(1):36-44.

214. Sawai H, et al. The G691S RET polymorphism increases glial cell line-derived neurotrophic factor-induced pancreatic cancer cell invasion by amplifying mitogen-activated protein kinase signaling. Cancer Res. 2005;65(24):11536-44.
215. Quintela-Fandino M, et al. Selective activity over a constitutively active RET-variant of the oral multikinase inhibitor dovitinib: Results of the CNIO-BR002 phase I-trial. Molecular Oncology. 2014;8(8):1719-28.
216. Kim HR, et al. Pharmacogenetic determinants associated with sunitinib-induced toxicity and ethnic difference in Korean metastatic renal cell carcinoma patients. Cancer Chemother Pharmacol. 2013;72(4):825-35.
217. Wang Y, et al. A Meta-Analysis on the Relations between EGFR R521K Polymorphism and Risk of Cancer. International Journal of Genomics. 2014;2014:312102.
218. Parmar S, et al. Pharmacogenetic predictors for EGFR-inhibitor-associated skin toxicity. Pharmacogenomics J. 2013;13(2):181-8.
219. Lote H, et al. Epidermal Growth Factor Mutation as a Diagnostic and Therapeutic Target in Metastatic Poorly Differentiated Thyroid Carcinoma: A Case Report and Review of the Literature. Case Reports in Oncology. 2014;7(2):393-400.
220. Kim SY, et al. Association between thyroid cancer and epidermal growth factor receptor mutation in female with nonsmall cell lung cancer. Annals of Thoracic Medicine. 2017;12(1):36-41.
221. Sakano S, et al. Nucleotide excision repair gene polymorphisms may predict acute toxicity in patients treated with chemoradiotherapy for bladder cancer. Pharmacogenomics. 2010;11(10):1377-87.
222. Lamba JK, et al. Genetic variation in platinating agent and taxane pathway genes as predictors of outcome and toxicity in advanced non-small-cell lung cancer. Pharmacogenomics. 2014;15(12):1565-74.
223. Caronia D, et al. Common variations in ERCC2 are associated with response to cisplatin chemotherapy and clinical outcome in osteosarcoma patients. Pharmacogenomics J. 2009;9(5):347-53.
224. Soltys DT, et al. Novel XPG (ERCC5) mutations affect DNA repair and cell survival after ultraviolet but not oxidative stress. Human mutation. 2013;34(3):481-9.
225. Wang T, et al. Novel germline ERCC5 mutations identified in a xeroderma pigmentosum complementation group G pedigree. JAAD Case Reports. 2015;1(2):66-70.
226. Caiola E, et al. DNA-damage response gene polymorphisms and therapeutic outcomes in ovarian cancer. The Pharmacogenomics Journal. 2011;13:159.
227. Caiola E, et al. DNA-damage response gene polymorphisms and therapeutic outcomes in ovarian cancer2011.
228. Kurman RJ, Shih Ie M. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. The American journal of surgical pathology. 2010;34(3):433-43.

Декларация за оригиналност

Декларирам, че всички представени данни в настоящия дисертационен труд са от собствени изследвания и резултатите, обсъжданията и изводите не са заимствани от други източници без цитиране.

Дата:. Подпис:.

гр. София /Зора Хамуде/