

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ, СОФИЯ  
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ  
КАТЕДРА „МЕДИЦИНСКА ХИМИЯ И БИОХИМИЯ”

**СЪВРЕМЕННИ ПОДХОДИ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА  
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИТЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА  
РАКА НА ГЪРДАТА В БЪЛГАРИЯ**

**ДАНИЕЛА РОСЕНОВА ПЕНЧЕВА**

ДИСЕРТАЦИЯ ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА  
СТЕПЕН ДОКТОР

Научна специалност: „Молекулярна биология”  
Професионално направление 4.3. Биологически науки  
Област на висше образование 4. Природни науки, математика и  
информатика

**НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ:**

АКАД. ПРОФ. Д-Р ВАНЬО ИВАНОВ МИТЕВ, ДБН  
ДОЦ. РАДКА ПЕТРОВА КЪНЕВА, ДБ

**НАУЧЕН КОНСУЛТАНТ:**

ГЛ. АСИСТ. Д-Р АТАНАСКА МИТКОВА, ДБ

СОФИЯ, 2017 г.

Дисертационният труд съдържа 233 страници, 71 фигури, 59 таблици.

Цитирани са 321 литературни източника и 17 интернет сайта.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита от катедра Медицинска Химия и Биохимия към Медицински факултет на Медицински университет – София съгласно правилника за условията и реда на придобиване на придобиване на научни степени в МУ - София на 10.04.2017.

Публичната защита на дисертационният труд ще се проведе на 28.09.2017.

Всички изследвания по дисертационния труд са извършени в Центъра по Молекулна Медицина, Катедра Медицинска Химия и Биохимия, МФ, МУ – София.

## **БЛАГОДАРНОСТИ**

Изказвам благодарности на ръководителите си- Акад. проф. д-р Ваньо Митев и Доц.др Радка Кънева за предоставените условия и възможности за изработването на дисертационният труд. Бих искала да изкажа искрени благодарности и на научния ми консултант гл. ас. д-р Атанаска Миткова за времето и търпението, които посвети. Благодаря за съветите и напътствията, за получените знания и умения. Благодарна съм им за доверието, което получих.

Също така искам да благодаря на всички колеги от Центъра по Молекулна Медицина, които ме насърчаваха в трудните моменти, даваха ми съвети и ми помагаша.

Благодарна съм на нашите колаборатори в „Катедра по обща и клинична патология“, „Клиника по обща и клинична патология“ в УМБАЛ „Александровска“ и екипа на проф. д-р Светлана Христова; „Клиника по онкология“ в МБАЛ „Надежда“ и екипа на проф. д-р Константа Тимчева; „II хирургична клиника „УМБАЛ „Царица Йоана – ИСУЛ“ с насочващ лекар д-р Теофил Седлоев; „Клиника по обща и чернодробно-панкреатична хирургия“ в УМБАЛ „Александровска“ с насочващ лекар д-р Мариела Василева без които изработването на дисертацията не би било възможно.

Благодарна съм и на семейството ми, съпруга ми и дъщеря ми за подкрепата, търпението и вярата в мен.

### Използвани съкращения на кирилица:

бд- базови двойки

ДНК- Дезоксирибонуклеинова киселина

ДТК- Дисеминирали туморни клетки

ИХХ-Имунохистохимия

иРНК- информационна рибонуклеинова киселина

кДНК- копи Дезоксирибонуклеинова киселина

МРГ- Метастатичен рак на гърдата

ОО- Обективен отговор

ПР- Пълна ремисия

ПЗ- Прогресиращо заболяване

РНК- Рибонуклеинова киселина

СЗ- Стабилизирано заболяване

ТЕ буфер- разтвор на 1М Трис-НСl, рН 8, с 0,1М Na<sub>2</sub>EDTA

ЦММ- Център по молекулна медицина

ЦТК- Циркулиращи туморни клетки

ЧР-Частична ремисия

### Използвани съкращения на латиница:

BCLC (Breast Cancer Linkage Consortium) – консорциум за рак на гърдата

bp (base pairs) - нуклеотидни бази

CI (confidence interval) – доверителен интервал

COSMIC (catalog of somatic mutations in cancer)- каталог на соматичните мутации при рака

CTC (Circulating tumor cells) - Циркулиращи туморни клетки

DCIS (Ductal carcinoma in situ) - дуктален карцином in situ

DSB (Double Strand Breaks) - двойноверижни увреждания на ДНК

ddNTP (Dideoxynucleotide triphosphates) - дидезоксинуклеотиди

dNTP(Deoxynucleotide triphosphates) – дезокси нуклеотид трифосфат

dH<sub>2</sub>O- дестилирана вода

DDR (DNA Damage Response) - отговор при ДНК

увреждания DBD (DNA-binding domain) - ДНК свързващ домен dsDNA

ER (Estrogen receptor) – естрогенов рецептор

EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) - етилендиаминотетраоцетна киселина

EmPCR (Emulsion PCR) - емулсионен PCR

FP (False positive)- фалшиво позитивен

FN (False negative)- фалшиво негативен  
GWAS (genome-wide association study) - целогеномно асоциативно проучване  
HBOC (Hereditary Breast Ovarian Cancer) - наследствен рак на гърдата и яйчниците  
HER2 (human epidermal growth factor receptor (HER/EGFR/ERBB) – рецептор за човешки епидермален растежен фактор  
HR (Homologous Recombination) – хомоложна рекомбинация  
IDC (Invasive Ductal Carcinoma) – инвазивен дуктален карцином  
ILD (Invasive Lobular Carcinoma) – инвазивен лобуларен карцином  
ISP (Ion Sphere Particles)- частици получаващи се в следствие на емулсионния PCR  
LCIS (Lobular carcinoma in situ) - лобуларен карцином in situ  
NCCN (National Comprehensive Cancer Network) – национална ракова мрежа  
NGS (Next generation sequencing) - секвениране от ново поколение  
NHEJ – нехомоложно присъединяване на крайщата на ДНК веригата при репарацията  
NLS (nuclear localization signal) – ядрено локализиращ сигнал  
OR (Odds Ratio) – съотношение на вероятност  
PR (Progesteron receptor) – прогестеронов рецептор  
PGM (Personal Genome Machine)- Персонална геномна машина за следващо поколение секвениране  
PCR (Polimerase chain reaction)- Полимеразна верижна реакция  
QPCR (quantitative PCR) – количествен quantitative PCR  
RT PCR (Real Time PCR)- PCR в реално време  
RT (Reverse transcription)- обратна транскрипция  
ROI (Region of Interest)- регион от интерес  
SNPs (Single nucleotide polymorphism) - еднонуклеотидни полиморфизми  
ssDNA (single-stranded DNA) едноверижна ДНК верига  
SNV (Single nucleotide variant)- единичен нуклеотиден вариант  
TNBC (triple negative breast cancer) - тройно негативен рак на гърдата  
TDF (Template dilution factor)- фактор на разреждане  
TNM (Tumor Nodal Metastasis)- класификация за туморите според стадия на тумора, наличие на инфектирани лимфни възли и наличие на метастази  
TP (True positive)- Истински позитивен  
TN (True negative)- Истински негативен  
WES (Whole exome sequencing)- Целоекзомно секвениране  
WGS (Whole genome sequencing)- Целогеномно секвениране  
WS (wash solution)- промиващ разтвор

## СЪДЪРЖАНИЕ

<b>I. Въведение</b> .....	11
<b>II. Литературен обзор</b> .....	12
<b>2.1. Епидемиология</b> .....	12
<b>2.2. Анатомия на гърдата</b> .....	13
<b>2.3. Класификация на туморите при рака на гърдата</b> .....	14
2.3.1 ER <sup>+</sup> тумори.....	15
2.3.2 ER <sup>-</sup> тумори.....	16
<b>2.4. Рискови фактори при рак на гърдата</b> .....	17
<b>2.5. Съвременни подходи за откриване на мутации в гени асоциирани с рака на гърдата</b> .....	20
2.5.1 Приложение на Ion Torrent PGM платформа за следващо поколение секвениране на BRCA гените при рака на гърдата .....	21
2.5.2 Приложение на MiSeq Illumina платформа за следващо поколение секвениране на 94 тумор-асоциирани гени при рака на гърдата .....	23
2.5.3 MiSeq Illumina платформа за анализ на туморната хетерогенност ..	26
<b>2.6. Циркулиращи туморни клетки- подходи за проследяване на пациенти с метастатичен рак на гърдата</b> .....	30
2.6.1 Определение за циркулиращи туморни клетки .....	30
2.6.2 Методи за доказване и количествено определяне на ЦТК .....	32
<b>III. Цел и задачи</b> .....	40
<b>3.1. Цели</b> .....	40
<b>3.2. Задачи</b> .....	40
3.2.1 Валидиране на протокол за следващо поколение секвениране с платформа Ion Torrent PGM за гените BRCA1 и BRCA2 .....	40
3.2.2 Въвеждане на метод за бързо и надеждно диагностично изследване на панел от други гени, свързани с рак на гърдата при BRCA негативни пациентки и оценка на приноса на тези гени за предразположение към фамилен рак на гърдата .....	40
3.2.3 Определяне на спектъра на соматични мутации в 48 тумор-асоциирани гена с платформа MiSeq,Illumina .....	41
3.2.4 Въвеждане на метод за проследяване на пациентки с метастатичен рак на гърдата преди и по време на терапията използвайки циркулиращи туморни клетки .....	41
<b>IV. Материали и методи</b> .....	42
<b>4.1. Валидиране на ION Torrent технология за NGS</b> .....	42
4.1.1 Клиничен материал .....	42
4.1.2. Преданалитична обработка на биологичния материал .....	43
4.1.2.1. Изолиране на високомолекулярна ДНК от кръв.....	43
4.1.2.2. Оценка на качеството и количеството на изолираната ДНК.....	46

4.1.3. Аналитична обработка на биологичния материал .....	46
4.1.3.1. Намножаване на фрагменти ДНК чрез полимеразна верижна реакция (PCR – Polymerase Chain Reaction) .....	46
4.1.3.2. Качествен контрол на PCR реакцията .....	47
4.1.3.3. Хоризонтална агарозна електрофореза .....	48
4.1.3.4. Директно секвениране .....	48
4.1.3.5. Секвениране от второ поколение посредством Ion Torrent PGM (Personal Genome Machine) .....	50
<b>4.2. Следващо поколение секвениране с панел от 94 тумор-асоциирани гени с платформа MiSeq, Illumina .....</b>	<b>55</b>
4.2.1. Клиничен материал .....	55
4.2.2. Преданалитична обработка на биологичния материал .....	55
4.2.3. Аналитична обработка на биологичния материал .....	55
4.2.3.1. Секвениране с помощта на готов панел TruSight Cancer и система MiSeq на Illumina .....	56
<b>4.3 Анализ на спектъра от соматични мутации в тумори от български пациенти с рак на гърдата посредством MiSeq платформата за следващо поколение секвениране .....</b>	<b>62</b>
4.3.1 Клиничен материал .....	62
4.3.2. Преданалитична обработка на биологичния материал .....	64
4.3.3. Аналитична обработка на биологичния материал .....	65
4.3.3.1. Провеждане на QC Real time PCR анализ на ДНК пробите .....	67
4.3.3.2. Подготовка на библиотеките .....	68
<b>4.4 Проследяване на циркулиращи туморни клетки при болни с метастазирал рак на гърдата .....</b>	<b>69</b>
4.4.1. Клиничен материал .....	69
4.4.2. Преданалитична и аналитична обработка на биологичния материал .....	79
4.4.2.1. Събиране на кръвни проби .....	79
4.4.2.2. Изолиране и обогатяване на циркулиращи туморни клетки- AdnaTest BreastCancerSelect .....	79
4.4.3 Аналитична обработка на биологичния материал .....	81
4.4.3.1. Изолиране на иРНК и качествен анализ- AdnaTest BreastCancerDetect .....	81
4.4.3.2. Количествен анализ на експресията на молекулните маркери hMAM, SK-19, CD44 и CD24 в периферна кръв посредством Real Time RT-PCR .....	86
<b>4.5 Биоинформатичен анализ на получените резултати .....</b>	<b>88</b>
4.5.1. Биоинформатичен анализ на резултатите, получени от директното секвениране. При анализа на получените резултати бяха използвани следните софтуерни програми .....	88
4.5.2. Биоинформатичен анализ на резултатите, получени от	

секвенирането от ново поколение с Ion Torrent PGM .....	89
4.5.2.1 NextGene .....	89
4.5.2.2 Контрол на качеството (QC) и alignment (картиране на данните върху геномната последователност) .....	89
4.5.2.3. Определяне на генетични варианти .....	90
4.5.2.4. Подбор и анотация на вариантите.....	91
4.5.3. Биоинформатичен анализ на резултатите, получени от секвенирането от ново поколение с MiSeq .....	91
<b>4.6. Статистически анализ на получените резултати .....</b>	<b>93</b>
4.6.1 Обработка на резултатите от генната експресия чрез Real Time qPCR .....	93
4.6.2. Нулева хипотеза ( $H_0$ ) .....	93
4.6.3. Метод $\chi^2$ .....	94
4.6.4. Анализ на преживяемостта .....	95
4.6.5. Каплан- Майер (Kaplan- Mayer) криви на преживяемост .....	96
4.6.6. Анализ на ROC кривите за определяне на диагностична точност на изследваните биомаркери .....	96
4.6.6.1. Анализ на ROC кривите на единични биомаркери .....	98
4.6.6.2. Мултимаркерен анализ на ROC кривите .....	99
<b>4.7. Използвана апаратура .....</b>	<b>99</b>
<b>V. Резултати .....</b>	<b>100</b>
<b>5.1. Резултати от валидирането на ION Torrent технология за     следващо поколение секвениране на BRCA1 и BRCA2 .....</b>	<b>100</b>
5.1.1 Подготовка на библиотеките и секвениране.....	102
5.1.2 Анализ на покритието и детекция на вариантите.....	102
5.1.3 Валидиране на вариантите .....	105
5.1.4 Открити варианти .....	105
<b>5.2. Резултати от генетичния анализ на 94 тумор-асоциирани гена с     MiSeq новогенерационна система .....</b>	<b>107</b>
<b>5.3. Резултати от генетичния анализ на соматични мутации с MiSeq     новогенерационна система в тумори на български пациентки с     рака на гърдата .....</b>	<b>110</b>
<b>5.4. Резултати от изследванията на циркулиращи туморни     клетки при болни с метастазирал рак на гърдата .....</b>	<b>118</b>
5.4.1 Таргетна популация пациентки и критерии за включване .....	118
5.4.2 Лечение и проследяване на пациентките според установените правила и препоръки .....	119
5.4.3 Резултати от качествения анализ на ЦТК .....	119
5.4.4 Резултати от количествения анализ на експресията на молекулните маркери hMAM, SK-19, CD44 и CD24 в ЦТК от периферна кръв посредством Real Time RT-PCR .....	130
<b>VI. Обсъждане на получените резултати .....</b>	<b>141</b>

<b>6.1 Валидиране на Ion Torrent PGM секвениране на гените BRCA1 и BRCA2</b>	141
6.1.1. Анализ на покритието и откриване на варианти	144
6.1.2. Валидиране на вариантите	146
6.1.3. Сравнение на протоколите за подготовка на библиотеките	148
6.1.4 Приложение на платформата в диагностичното секвениране	149
<b>6.2 Следващо поколение секвениране на 94 тумор-асоциирани гена при BRCA негативни пациентки с рак на гърдата</b>	150
6.2.1 ATM	152
6.2.2 MUTYH	154
6.2.3 CHEK2	155
6.2.4 PTCH1	155
6.2.5 RAD51C	157
6.2.6. MET	157
6.2.7 WRN	158
6.2.8 ERCC4	159
6.2.9 PALB2	159
6.2.10 PRF1	160
6.2.11 RET	161
6.2.12 SDHB	162
6.2.13 AIP..	162
<b>6.3 Анализ на соматични мутации в тумори на пациентки с рак на гърдата с MiSeq платформа за следващо поколение секвениране</b>	165
6.3.1 PIK3CA	167
6.3.2 HNF1A	168
6.3.3 ERBB2	168
6.3.4 ERBB4	170
6.3.5 APC	172
6.3.6 ATM	173
<b>6.4 Анализ на резултатите получени при изследването на циркулиращи туморни клетки при пациенти с метастазирал рак на гърдата</b>	176
6.4.1 GA733-2	177
6.4.2 MUC1	178
6.4.3 HER2	179
6.4.4. CD44	181
6.4.5 CD24	181
6.4.6 Цитокератин 19	182
6.4.7 Човешкият мамаглобин	182
<b>VII. Изводи</b>	186
<b>VIII. Приноси</b>	187

<b>IX. Публикации и участия в конгреси и проекти</b> .....	188
<b>9.1. Публикации свързани с дисертационния труд</b> .....	188
<b>9.2. Участия в конгреси</b> .....	188
<b>9.3. Участия с проекти</b> .....	191
<b>X Библиография</b> .....	192
Приложение 1 .....	217
Приложение 2 .....	218
Приложение 3 .....	219
Приложение 4 .....	220
Приложение 5 .....	231

## I. Въведение

Ракът на гърдата е първото по честота злокачествено заболяване сред жените в световен мащаб. По последни данни на Националия Раков Регистър за 2012 година в България ракът на гърдата е на първо място по честота при жените и представлява 26.4% от всички злокачествени заболявания при тях. Най-честата причина за смърт от злокачествени заболявания при жените в България е рака на гърдата - 18,3%. През 2012 г. са регистрирани 3923 нови случая и са починали 1364 жени. Заболяемостта от рак на млечната жлеза се увеличава с 1.8% средногодишно, смъртността остава без статистически значима промяна.

Увеличената заболеваемост от рак на гърдата определя и нуждата от осъвременяване на клиничните и молекулярно-генетичните средства за диагностициране, лечение и проследяване на заболяването.

Съществуват множество молекулярно-генетични тестове за откриване на мутации в гените. Към днешна дата за златен стандарт при търсенето на мутации се смята директното секвениране по Sanger. Лимитиращи фактори при този метод са неговата трудоемкост, времеемкост и цена, което наложи в много лаборатории да се въведе алтернативен метод, който да бъде по-бърз, по-евтин и по-надежден. Това стана възможно благодарение на секвенаторите от ново поколение като Ion Torrent PGM и MiSeq платформите, които все повече навлизат в диагностиката на различни наследствени заболявания. Увеличената заболеваемост от рак на гърдата определя и нуждата от подобряване на подходите за дианостициране, лечение и проследяване на заболяването. Независимо от ранното откриване, близо една трета от болните ще развият метастатичен процес. В 30-40% от тези болни, циркулиращи туморни клетки могат да бъдат открити в периферната кръв. Съществува наистина интригуващ потенциал за подобряване на възможностите за определяне на прогнозата и мониториране на ефекта от адювантното лечение или лечението при метастазирало заболяване. Едновременно с това има възможности за определяне на биологични маркери, свързани с микрометастатичните клетки, които имат предиктивно значение при приложение на определен вид насочена терапия.

Настоящата разработка е първото изследване за въвеждане и валидиране на методи за новогенерационно секвениране за изследване на мутации в гени свързани с фамилен рак на гърдата и яйчника и за въвеждане на метод за изследване на соматични мутации и циркулиращи туморни клетки при пациенти с рак на гърдата с оглед оптимизиране и проследяване на терапията в България.

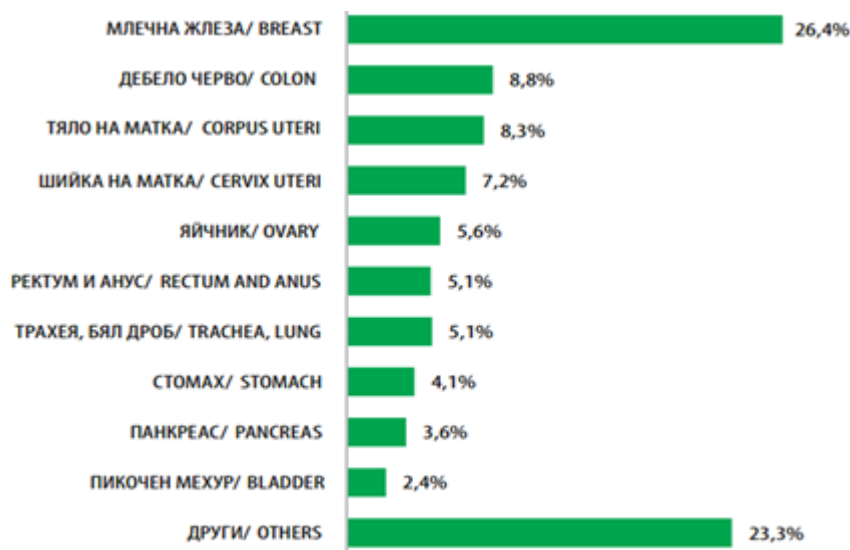
## II. Литературен обзор

### 2.1. Епидемиология

Ракът на гърдата е първото по честота злокачествено заболяване сред жените в световен мащаб, като през 2012 година са диагностицирани 1 671 149 нови случая, а смъртността се равнява на 521 907 души. По последни данни на Националия Раков Регистър, публикувани през 2014 година, за 2012 година в България са регистрирани 36 649 нови случаи на злокачествени заболявания. За сравнение те са с 1 405 повече от регистрираните през 2011 г. Прогнозните данни за 2015 г. сочат 38 403 очакван брой нови случаи от злокачествени заболявания и 17 273 очакван брой починали от рак (1).

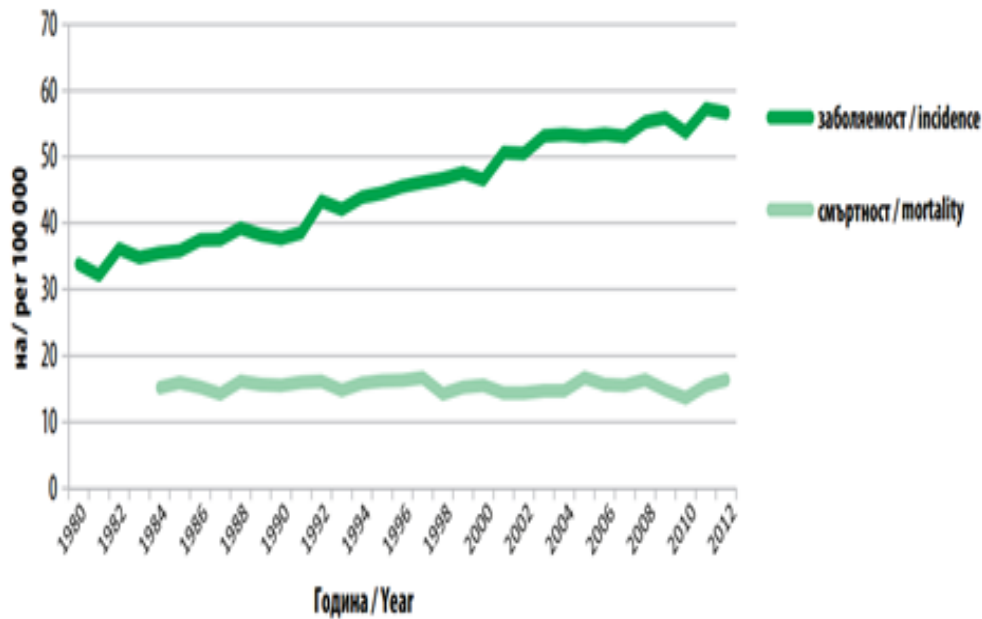
Ракът на гърдата е на първо място по честота при жените и представлява 26.4% от всички злокачествени заболявания при тях (Фиг 1). Процентното разпределение на най-честата причина за смърт от злокачествени заболявания при жените в България за 2012 г. е рака на гърдата - 18,3%. През 2012 г. са регистрирани 3923 нови случаи и са починали 1364 жени. Заболяемостта се увеличава с 1.8% средногодишно, смъртността остава без статистически значима промяна (Фиг 2) (1).

Увеличената заболеваемост от рак на гърдата определя и нуждата от осъвременяване на клиничните и молекулярно-генетичните средства за диагностициране, лечение и проследяване на заболяването. Заболяемостта се увеличава с напредване на възрастта след 35 години и достига своя пик при 65-69 годишните жени. По данни на регистъра смъртността от рак на млечната жлеза в България е малко по-висока от средната за Европа – 24.1 и 23.1 на 100 000 жени, съответно (1–3).



\*без немеланомни кожни карциноми/ but non-melanoma skin

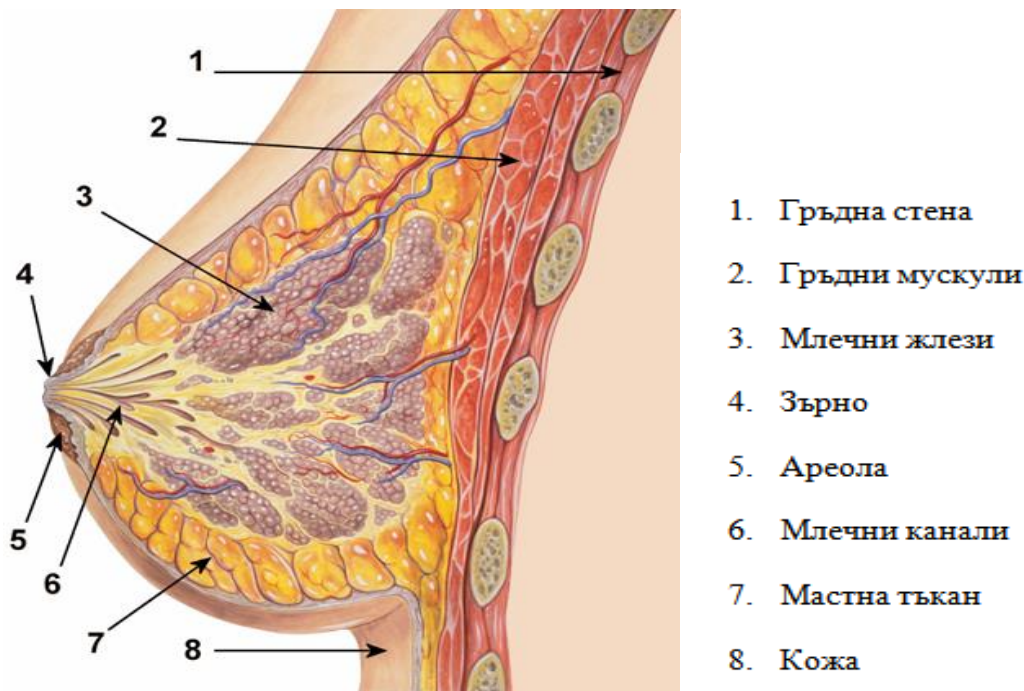
Фигура 1. Процентно разпределение на най-честите злокачествени заболявания\* при жените в България, 2012 г (1)



**Фигура 2. Стандартизирана заболяемост и смъртност (световен стандарт на 100 000) от рак на гърдата при жените по година на диагноза (1)**

## 2.2. Анатомия на гърдата

Гърдата (mammae) е чифтен орган от кожен произход. Млечната жлеза (glandula mammae) представлява съвкупност от 15-20 сложно тубуло-алвеоларни жлези, които се смятат за видоизменени потни жлези. Кожата на млечната жлеза е тънка и нежна. В центъра на млечната жлеза се разполага кръгло поле от пигментирана кожа-ареола. В средата се издига т.н. мамила, където се отварят дисталните млечни канали. Мамилата и ареолите съдържат гладки концентрични и радиални мускулни влакна. Млечната жлеза се изгражда от две основни съставки- паренхим, който е представен от жлезна тъкан и строма на млечната жлеза, която е изградена от съединителна и главно мастна тъкан. Дебел слой мастна тъкан се разполага между кожата и жлезния паренхим. Той се състои от 15-20 радиално разположени лоба, изолирани един от друг чрез стромата на жлезата. Всеки лоб има собствен млечен канал, който се насочва към мамилата (фиг. 3).



**Фигура 3. Анатомично устройство на гърдата при жените (4)**

По време на бременността жлезната тъкан се подлага на бързи промени и подготовка за лактацията. Жлезните тубули се трансформират в алвеоли. В края на бременността и през време на лактацията жлезните клетки отделят секрет - майчино мляко. През целия живот на жената млечните жлези претърпяват непрекъснати, динамични промени - първоначално по време на тяхното развитие, след това по време на повтарящите се менструални цикли, до изпълнението на специфичните функции по време на бременността и след раждането. Гърдата прогресивно се развива до навлизането в пубертета под влиянието основно на хормоните от хипофизната жлеза и яйчниците. Млечната жлеза у мъжа (*mammae masculine*) е чифтно рудиментарно образование. Мамилата представлява малко струпване на съединителна тъкан, в която се разполагат отделни жлезни каналчета, без да се забелязва каквато и да е лобуляция (4).

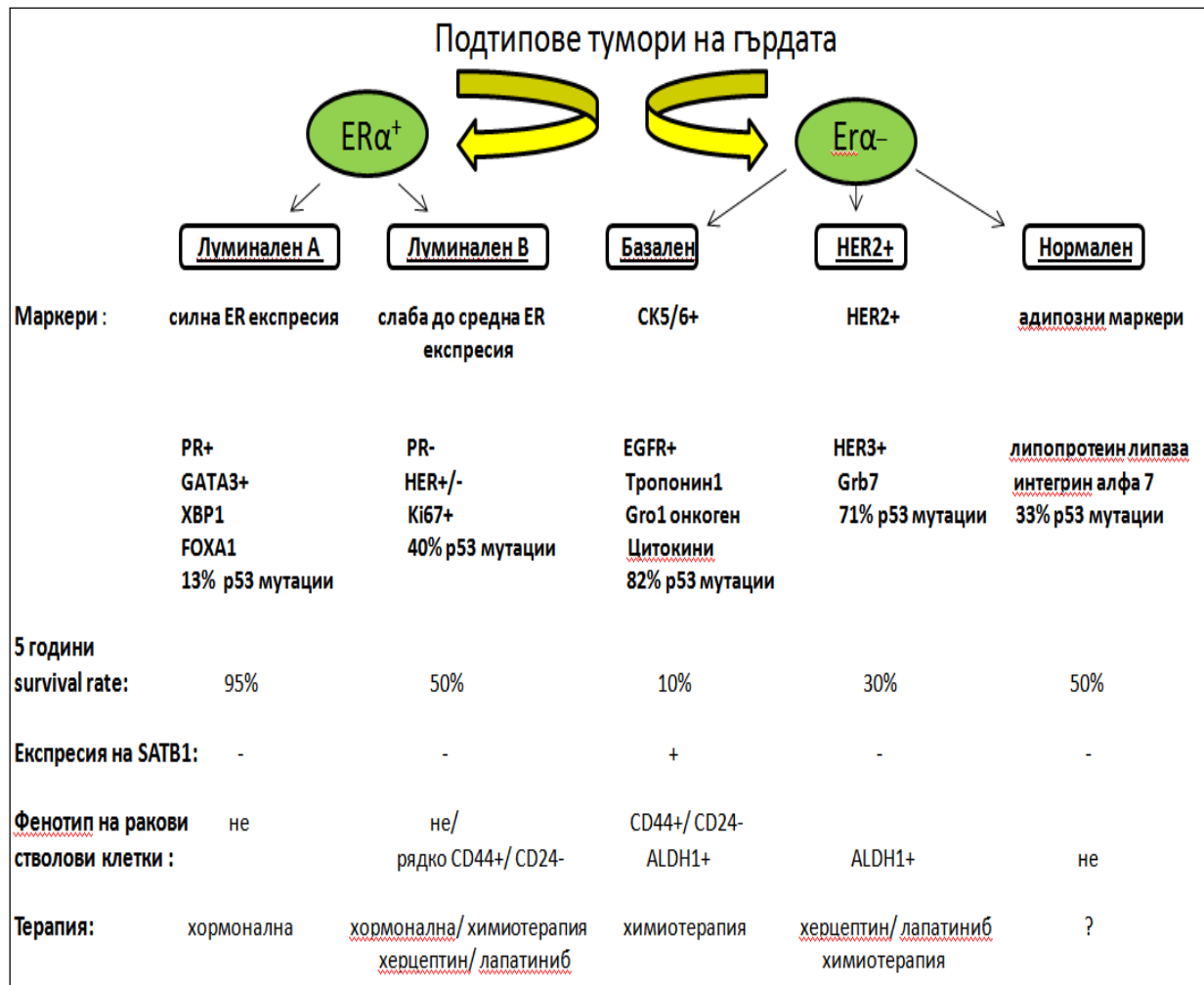
### **2.3. Класификация на туморите при рака на гърдата**

Ракът на гърдата е комплексно и хетерогенно заболяване, чиито тумори се класифицират в няколко подтипа в зависимост от морфологията, имунохистохимичния и молекулярен профил.

BRCA2-асоциираният рак на гърдата възниква в по-късни етапи от развитието на женския организъм (около 48 год., за разлика от BRCA1-асоциирания рак на гърдата, който възниква средно около 43 год.). Международният консорциум, свързан с рака на гърдата BCLC (Breast Cancer Linkage Consortium) определя тубулната формация и митотичният индекс като предиктивни за BRCA2 мутационен статус (5).

Субтипозите на рака на гърдата, различаващи се по генно експресионния си профил и прогноза, са определени чрез технологията на ДНК микрочиповете. По отношение експресията на естрогеновия рецептор (ER) карциномите на гърдата се

разделят на негативни (ER-) и позитивни (ER+). ER+ карциномите, от своя старана, се разделят на луминален А, В и С подтип. Туморите с ER- статус се разделят на HER2+, базален и нормален подтип рак на гърдата (Фиг 4). От гледна точка на прогнозата и терапията на туморите на млечната жлеза, молекулярната класификация има по-голямо значение от хистопатологичната. В допълнение, молекулярният анализ на рака на гърдата и прекурсорите му спомага за разбирането на механизма на развитие на малигнената трансформация.



**Фигура 4. Класификация на туморите на гърдата (6)**

### 2.3.1 ER<sup>+</sup> тумори

Луминалните подтипове представляват значителен дял от карциномите на гърдата (60-70%) (6), сходни са с луминалния епител на млечната жлеза и експресират хормонални рецептори и луминални цитокератини - CK8\18, ER и свързаните с активирането му гени LIV1 и CCND1. По-малко от 20% от луминалните тумори имат p53 мутация и често са в стадий I. За разлика от луминален подтип В, луминален подтип

А има по-силна експресия на гени, свързани с ER – Era , GATA свързващ белтък 3, Х-бокс свързващ белтък 1, трефоил фактор 3, HNF3 $\alpha$  и по-слаба експресия на гени, свързани с клетъчната пролиферация (7). Туморите от луминален подтип А са най-често срещаните карциноми на гърдата (67%), като 13% от тях се характеризират с мутации в p53 гена. Базалният подтип е най-разпространен при афроамериканци и при жени преди настъпване на менопаузата. От гледна точка на терапията, луминалните тумори показват по-добра прогноза, като от тях, луминален подтип В е с по-лоша прогноза. Основната разлика между двата луминални подтипа е пролиферативната активност (8).

Лечението на тази група тумори се осъществява чрез хормонална терапия. При много изследвания те демонстрират слаб отговор към конвенционалната хемотерапия. Показано е, че ER- туморите имат по-добър патологичен отговор към неoadювантната химиотерапия, отколкото ER+ туморите. За сравнение, при терапия с 5-флуороурацил, доксорубин и циклофосфамид 6% от луминалните карциноми показват добър отговор, докато за базалния и HER2+ подтиповете този отговор е 45% (8).

### 2.3.2 ER<sup>-</sup> тумори

Подтип HER2+: Този подтип рак на гърдата, класифициран чрез микрочипова технология, се разграничава от имунохистохимичния HER2+ подтип и обхваща голяма група ER- тумори. По-голямата част от HER2+ туморите, идентифицирани с генно експресионен анализ, може да се причислят към групата на карциномите, характеризирани като HER2+ подтип чрез други методи, но останалата част от тях могат да експресират хормонални рецептори и се причисляват към луминалните групи карциноми. HER2+ туморите свръхекспресират гени от ERBB2 ампликона, като например *GRB7*. Подобно на базалните подтипове те се характеризират с мутации в p53 при 40-80% от случаите и най-често са в стадий 3. Не е открита асоциация между HER2+ туморите и възрастта, расата или друг рисков фактор (9). Свръхекспресията на HER2 в туморните клетки означава по-лоша прогноза за пациента. Гените, асоциирани с патологичния отговор се различават от тези при базалния подтип. Подобно на базалния подтип, лошата прогноза произлиза от ранното появяване на рецидиви. За разлика от базалния подтип, за лечението на HER2+ туморите има разработени прицелни молекулни агенти като моноклоналните антитела, херцептин и трастузумаб. За съжаление, голяма част от карциномите от този подтип показват устойчивост към терапия с трастузумаб, което се свързва с гени като PTEN и CXCR4 (10).

Базален подтип - Наречен е така поради сходството си с базалните епителни клетки и миоепителните клетки на жлезата според модела на генната им експресия. За базалния подтип карциноми на гърдата е характерна липса на експресия на PR, ER и ко-експресиращите се с него гени, много ниска експресия на HER2, увеличена експресия на циклините SK5, 6 и 17, ламинин, FABP7 както и гени, свързани с клетъчна пролиферация (6–8,10). Анализът на тази група тумори с помощта на 5 различни антитела показва имунохистохимичен профил ER-, PR-, HER2-, SK5\6+, HER1+. Ето защо, като имунохистохимичен подтип, базалната група карциноми се означават като тройно негативни (Triple Negative Breast Cancers – TNBCs). Те са негативни по отношение експресията на ER-, PR- и HER2- и представляват 12-24% от всички карциноми на гърдата (7). Асоциират се основно с BRCA1-изключващ механизъм, което включва наличие на BRCA1 мутации или промоторно хиперметиране на гена. Тези тумори са биологично агресивни и трудно податливи на терапия поради липсата на ефективни терапевтични мишени, но за сметка на това са чувствителни към химиотерапия, особено към терапията с цисплатина. Открито е, че нормалните луминални клетки експресират

CK5\6 действат като стволови клетки и търпят малигнени трансформации, водещи до развитието на базалния фенотип (7). При нормални условия BRCA1 регулира пролиферацията им, но при липсата на функционален белтък се стимулира експресията на p53, което от своя страна води до неконтролируемо клетъчно делене. Молекулното профилиране с помощта на микрочипове показва, че 80-90% от тройнонегативните карциноми на гърдата се причисляват към базалния подтип (11). По-голямата част от жените с BRCA1-асоцииран рак на гърдата развиват именно този субтип.

Claudin-low - Prat и сътрудници наскоро описаха още един подтип рак на гърдата, наречен Claudin-low, характеризиращ се с наличие на много свойства, присъщи за мезенхимните и стволовите клетки (8). По-голямата част от туморите с подобен подтип са тройнонегативни дуктални карциноми, но се отличават с биологични свойства, характерни за стволовите клетки на бозайниците, както и за раковите стволови клетки. Claudin low подтипът се характеризира с ниска експресия на 3 claudin гена, отговорни за образуването на тесните адхезионни връзки. Йерархично той се поставя до базалния подтип, поради общите им експресионни свойства - ниска експресия на *HER2* и луминалния генен клъстер, *ESR1*, *GATA3* и луминалните *CK8* и *18* (8).

Нормоподобна група карциноми. Тази група карциноми на гърдата показва най-високо ниво на експресия на много гени, характерни за адипозна тъкан, както и за неепителиални клетъчни типове (12). Те също имат високи експресионни нива на някои гени, характерни за базалните епителиални профили и понижени нива на експресия на луминални епителиални гени. Най-характерни за експресионния профил на нормоподобните карциноми са гените на колагенов тип I рецептор за CD36 антиген, глутатион пероксидаза 3, глицерол-3-фосфат дехидрогеназа, липопротеин липаза, интегрин алфа 7, ретинол свързващ белтък 4 и други (12). Те определят и специфичните молекулни характеристики на този подтип рак на гърдата.

## **2.4. Рискови фактори при рак на гърдата**

Доживотния риск за развитие на рак на гърдата при носители на мутациите в BRCA гените варира според наличието на модифициращи фактори. Освен фамилната предразположеност, определяща се от генетични фактори, други рискови фактори, за развитието на рак на гърдата са възраст, репродуктивна история, хормонална терапия, излагане на радиационни лъчи, мамографската плътност, приемане на алкохол, физическата активност и други. Най-голям брой от пациентите развиват рак на гърдата след 50 годишна възраст. При пациенти с генетична предразположеност възрастовата граница за развитие на това заболяване спада под 50 години (13). Сред носителките на мутации в BRCA1 увеличаването на периода на кърмене увеличава протективния ефект с около 22% за година кърмене (14). Хормоналната терапия, йонизиращата радиация, затлъстяването и генетичната предразположеност са фактори, свързани с повишен риск от заболяемост. Докато раждаемостта в по-ранна възраст, физическата активност и кърменето се смятат за понижаващи риска фактори.

Генетичната основа на наследствената предразположеност към развитието на рак на гърдата активно се изучава в последните две десетилетия. Карциномът на гърдата е хетерогенно, мултифакторно заболяване. Към факторите, които имат отношение за развитие на заболяването се отнасят генетичната предразположеност, начинът на живот и влиянието на околната среда. Освен фамилната предразположеност, определяща се от генетични фактори, важна роля за развитието на рак на гърдата имат: възраст,

репродуктивна история, хормонална терапия, излагане на радиационни лъчи, мамографската плътност, прием на алкохол, физическата активност и други (15).

През последните години беше събрана значителна информация относно гените свързани с наследствен рак на гърдата (16). На базата на получените резултатите от целогеномни асоциативни проучвания от типа пациенти-контроли (Genome Wide Association Studies – GWAS) бяха определени три групи гени, показващи различна степен на асоциация със заболяването. Тези групи се дефинират като високопенетрантни гени, гени с междинна пенетрантност и ниско пенетрантни гени.

Високопенетрантни гени - BRCA1, BRCA2, TP53 и PTEN. Повечето от гените, които се отнасят към тази група са тумор супресорните гени, участващи в контрола на пролиферацията, репарацията, клетъчната диференциация и апоптозата. При мутация се променя тяхната функция, което определя участието им в канцерогенезата (17). Около 25% от случаите с рак на гърдата се счита, че са наследствени, дължащи се на герминативни мутации в гени, свързани с предразположение за развитие на рак (9). Най-честата причина за наследствен рак на гърдата и яйчниците са мутации в BRCA1 и BRCA2 гените (16). Изчислено е, че средният популяционен риск при носителство на мутация в BRCA1 до навършване на 70 годишна възраст е 65% (CI 44%-78%) за рак на гърдата и 36% (CI 18%-54%) за овариален карцином. Съответно оценката при носителство на мутация в BRCA2 е 45% (CI 31%-56%) риск за развитие на рак на гърдата и 11% (CI 2,4%-19%) за овариален карцином. Поради високата алелна хетерогенност на BRCA гените действителният риск вероятно се различава от така определения (16). Носителите на мутация в BRCA1 и BRCA2 гените са с риск за развитие и на други типове злокачествени заболявания, например карцином на ендометриума, фалопиевите тръби, панкреаса и простатата. Честотите на BRCA мутации при пациенти без фамилна анамнеза са съответно 1 до 7% за BRCA1 и 1-3% за BRCA2, като в общата популация честотата на мутации е средно 1 на 800 и значително варира при различните етнически групи и географски области (18).

Около 25% от случаите на рак на гърдата са с фамилна анамнеза (16). Мутации в BRCA1 и BRCA2 гените обединяват около 15-20% от тези случаи, а при около 1% от семействата, свързани с редки синдроми като Li Fraumeni, Cowden, Peutz-Jeghers, са установени мутации в p53, PTEN и STK11 гените (19). Честотата на мутациите в BRCA гените при пациенти с рак на гърдата без фамилна анамнеза са съответно 1-7% за BRCA1 и 1- 3% за BRCA2 гена (16). Докладваните мутации са разпръснати по цялата кодираща последователност на двата гена. Повечето от мутациите са малки инсерции, делеции и безмислени (nonsense), водещи до появата на преждевременен стоп кодон и синтеза на скъсен белтъчен продукт. Този тип мутации са около 70% при BRCA1 гена и 90% при BRCA2 гена (20,21). BRCA1 и BRCA2 са туморсупресорни гени картирани в началото на 90-те години (21) и са със сложна геномна структура (22). BRCA1 генът е картиран на дългото рамо на 17 хромозома (17q12.21) и е изграден от 24 екзона, докато BRCA2 генът е картиран върху дългото рамо на 13 хромозома (13q12.3) и е изграден от 27 екзона (22).

**BRCA1** кодира 1863 аминокиселинен белтък в чиято структура са установени Ring finger домен, NLS мотив (ядрено локализиран сигнал), ДНК свързващ се домен, SDC клъстер и два BRCT домена (20,21). Структурата на Ring finger домен показва голяма консервативност и е характерен за белтъци имащи убиквитин лигазна активност. Друг важен участък е региона обхващащ екзони 11, 12 и 13, те покриват над 65% от последователността на гена и кодират двата NLS мотива и няколко места за свързване с други белтъци, като например RB1, c-MYC, RAD50 и RAD51. В този участък е локализиран и SDC клъстера. Въпреки, че в региона са открити много от мутациите с

важно клинично значение малко се знае за неговата структура и функция. До този момент е доказано, че мутации засягащи NLS мотивите водят до инхибиране на взаимодействието на BRCA1 с импортин  $\alpha$  и измества клетъчната локализация на белтъка от ядрото в цитоплазмата. Това води до потискане на туморсупресорната активност на белтъка поради загуба на възможността за отстраняване на ДНК увреждания. BRCT домените за първи път са били открити при BRCA1. В последствие е установено, че много други белтъци имащи ДНК репарираща функция също имат BRCT домен. Мутациите в него водят до невъзможност на белтъка да вземе участие в ДНК поправката и са от съществено значение за развитието на ракови заболявания (23).

**BRCA2** белтъка не проявява структурно сходство с други известни белтъци. Този ген кодира един от най-големите белтъци в човешкия протеом изграден от 3418 аминикиселини и има само две известни функционални области (20,21). Изграден от осем BRC мотива, всеки един от които е от по 30 до 40 аминокиселини и два NLS (ядрено локализиран сигнал) мотива (20). BRC повторите се свързват с RAD51 белтъка, който при бозайниците е от значение за ДНК поправката и генетичната рекомбинация (24). BRCA1 и BRCA2 белтъците отговарят за поддържане на геномната стабилност. Клетъчният отговор при ДНК увреждане включва процеси на активиране на Checkpoint контрола на клетъчния цикъл. Нарушения в тези процеси водят до повишена чувствителност към генотоксични агенти.

Ролята която играят BRCA1 и BRCA2 в поправката на двойноверижните скъсвания вероятно е различна. При нормално функциониране на BRCA1 и BRCA2 белтъците се формира комплекс от BRCA1, BRCA2, BARD и RAD51. Образуването на комплекса започва с фосфорилирането на BRCA1 от ATM. В отговор на ДНК повреда така формирания комплекс се премества върху хромозомния участък подложен на ДНК репарация, който преди това е бил маркират от PINA (Proliferating Cell Nuclear Antigen). Загубата на функция на BRCA1 и BRCA2 води до невъзможност за поправка на ДНК увредения участък и се нарушава експресията на гени, участващи в checkpoint контрола, като p53 и p21, което води до активирането на клетъчната пролиферация (25). Освен за поддържане на геномната стабилност BRCA1 и BRCA2 белтъците вземат участие в контрола на пролиферацията, репарацията, диференциацията и апоптозата. При мутация в тези гени се променя тяхната функция, което определя участието им в туморогенезата (26). Според мнозина изследователи, работещи в областта на онкогенетиката карциномите на гърдата се дължат на дефекти в ДНК репариращата система (27). Едни от най-опасните увреждания на ДНК са двойноверижните скъсвания (DSBs). Те могат да бъдат резултат от генотоксични агенти или блокиране на прогресията на репликативната вилка. Известно е, че еукариотните клетки притежават най-малко три различни механизма за поправка на двойноверижните скъсвания: нехомоложно свързване на повредените крайща (Non-Homologous End Joining - NHEJ), хомоложна рекомбинация при поправката на двойноверижни скъсвания между две повтарящи се секвенции (едноверижна хибридизация, Single-Strand Annealing - SSA) и хомоложна рекомбинация (Homologous Recombination - HR) (28). В тези механизми вземат участие голяма група от белтъци, като BRCA1, BRCA2, CHEK2, PALB2, BRIP1, RAD51C, ATM, TOPBP1 и други (27–29)

Герминативни мутации в BRCA1 и BRCA2 гените обясняват само около 15 до 20% от фамилените случаи на рак на гърдата (16). Голяма част от генетичната предразположеност, определяща риска от развитие на рак на гърдата и яйчника все още остава неизяснена. Поради тази причина усилията на изследователските екипи са насочени в търсене мутации в гените със средна пенетрантност като функционални партньори на BRCA1 и BRCA2 в ДНК репарацията. В тази група попадат гени като

BRIP1, PALB2, CHEK2, ATM, NBS1, RAD50, TOPBP1, RAD51C, RAP80, които имат предразполагащ ефект за развитието на рак на гърдата и яйчниците (27). Втора насока е определянето на влиянието на ниско пенетрантни алели, асоциирани със заболяването, посредством големи асоциативни проучвания от типа случаи-контроли в рамките на целия геном.

Гени с междинна (средна) пенетрантност - CHEK2, ATM, BRIP1 и PALB2 и др. Гените от тази група участват в поправката на ДНК и се свързват с два пъти повишен риск за развитие на рак на гърдата. Пример за мутация, водеща до предразположение към развитието на заболяването е делецията 1100delC в CHEK2 гена. Тя е установена в северните и източните Европейски популации и се асоциира с 2 до 3 пъти повишен риск за развитие на рак на гърдата (OR= 3.3; 95% CI, 2.3 - 4.7) (30).

Нископенетрантни гени - TNRC9, FGFR2, NBC1, HRAS и MAP3K1 и др. Генът FGFR2 например кодира рецептор на фибрибластния фактор на растежа. Рецепторът FGFR2 притежава екстрацелуларен домен, взаимодействащ с фибробластния растежен фактор, което води до каскада от вътреклетъчни сигнали. На молекулно ниво сигналите повлияват митозата, растежа и диференциацията на клетките. До този момент два полиморфни варианта rs2981579 (OR=1.43, 95% CI=1.35-1.53, p=10-31) и rs2981582 (OR=1.31, 95% CI=1.27-1.36, p=10-13), в FGFR2 гена се асоциират с риска за развитие на рак на гърдата (31,32).

## **2.5. Съвременни подходи за откриване на мутации в гени асоциирани с рака на гърдата**

Съществуват множество молекулярно-генетични тестове за откриване на мутации в гените. При мутационния скрининг се използват методи, целящи да установят промени в кодиращата последователност, които са с патогенен характер - например измествания в рамката на четене, водещи до синтеза на скъсен белтъчен продукт или “missense” мутации в домени с важно функционално значение. Към днешна дата за златен стандарт при търсенето на мутации се смята директното секвениране по Sanger. Лимитиращи фактори при този метод са неговата трудоемкост, времеемкост и цена, което наложи в много лаборатории да се въведе алтернативен метод, който да бъде по-бърз, по-евтин и по-надежден. Това стана възможно благодарение на секвенаторите от ново поколение (**NGS - Next Generation Sequencing**), които все повече навлизат в диагностиката на различни наследствени заболявания (33).

Секвенирането от ново поколение (Next-generation sequencing (NGS)) е второ поколение секвениране, разработено като технология след секвенирането по Sanger метода и е най-значимата разработка в контекста на биологичните науки през последните 30 години (34). Най-общо технологиите за секвениране от ново поколение споделят възможността да секвенират масово и паралелно милиони ДНК матрици. Разработени са няколко платформи с огромна възпроизводителна способност и възможност за дълбоко секвениране на участъци от генома или целия геном (21) . За да достигнат масово паралелно секвениране, платформите използват клонална амплификация на ДНК матрицата върху солидна поддържаща фаза с последващо множествено циклично секвениране. Базира се на 2 принципа: полимеразата – базирана клонална репликация на единична ДНК молекула, пространствено отделена върху солидната поддържаща фаза и циклично секвениране. Всяка от платформите се определя от метода, който използва за достигане на тези два процеса. Приготвят се библиотеки от ДНК фрагментите, които ще се секвенират чрез добавяне на уникални адапторни

секвенции към краищата (35). Тези олигонуклеотиди са комплементарни на праймерите, които се използват за клоналната амплификация на библиотеката и на олигонуклеотиди, разположени на твърдата база.

В последното десетилетие изследванията на нуклеотидната последователност на ДНК чрез секвениране се повиши експоненциално и стана достъпно за провеждане на изследвания и диагностични процедури в много лаборатории по света. Първият голям успех в прилагането на този метод беше постигнат при изпълнението на Човешкия геномен проект HGP (Human Genome Project), завършен през 2003 година. Този проект беше осъществен с помощта на секвениране от първо поколение, известно още като директно секвениране по Sanger. Секвенирането по Sanger е разработено през 1975 от Edward Sanger и се смята за златен стандарт в продължение на 25 години (30). Към днешна дата има множество молекулярно-генетични тестове за откриване на мутации в BRCA гените (36,37). При скрининга за мутации на BRCA гените се използват методи, целящи да установят промени с патогенен характер в кодиращата последователност, като например измествания в рамката на четене, водещи до синтеза на скъсен белтъчен продукт или „missense” мутации в домени с важно функционално значение и др.

Въпреки, че днес е възможно да бъде направено цялостно геномно и екзомно секвениране, при някои заболявания се предпочита таргетно (ампликонно) секвениране на специфичен ген и геномен регион в който се намират горещи точки за болестотворни мутации. Таргетното ресеквениране позволява изследването само на група гени или определени райони в генома, което дава възможност да се фокусират време, разходи и ресурси за съхранение на данни за тези участъци, които са най-интересни за изследователя. Таргетното секвениране позволява много по добро покритие на интересуваният ни геномен участък и елиминира голяма част от геномния анализ, с което се спестява време (30). Използвайки този подход, хиляди ампликони, обхващащи множество ДНК проби могат да бъдат едновременно подготвени и баркодирани в рамките на няколко часа.

### 2.5.1 Приложение на Ion Torrent PGM платформа за следващо поколение секвениране на BRCA гените при рака на гърдата

Секвенирането от ново поколение при използването на платформата Ion Torrent PGM на Life Technologies притежава изключителни предимства пред технологията, определена като златен стандарт в молекулярната биология и диагностика – директното секвениране по Sanger. Едно от тези предимства е възможността за мултиплексиране на различен брой ДНК проби в рамките на един-единствен експеримент (38). Това е причината секвенирането с тази платформа драстично да намалява времето за получаване на данни за голям брой проби, което значително редуцира и цената на самия експеримент. Personal Genome Machine (PGM) е първата по рода си платформа която използва метод за определяне на ДНК последователностите на полупроводников принцип, без прилагане на оптична технология за детекция на нуклеотидите (39). При този съвремен метод се обработват стотици ампликони, което обикновено изисква няколко седмици или месеци, ако се използват конвенционалните технологии. Последните подобрения в технологиите за секвениране позволяват паралелно, мултиплексно ДНК секвениране, което осъществява прочита на къси фрагменти (25-250 бази) с много голяма дълбочина. При първата в света PostLight технология за секвениране, вместо да се използва светлина като проводник се използва полупроводников чип с висока плътност и множество микроямки в които протича

биохимичната реакция(40). Под ямките е разположен чувствителни към йони слой и патентован от Life Technologies сензор в долната му част. За разлика от другите платформи, базирани на пиросеквениране при които се измерва светлината отделена при хемилуминисцентни реагенти, при Ion Torrent директно се измерват освободените протони ( $H^+$ ) от реакцията. Когато нуклеотида се включи в ДНК веригата водородните йони (протони) се освобождават. Зарядът от тези протони променя рН на разтвора, разпознава се от сензора за йони и след това директно се превръща от химически сигнал в цифров формат (41). Липсата на оптика спестява бавното сканиране на изображението, така, че секвенирането е сравнително бързо, а липсата на флуоресценция или хемилуминисценция означава, че системата може да използва немодифицирани нуклеотиди, които са по-добре поносими от ДНК полимеразата, а процента на грешките е в порядъка на 1-2 %. Всички тези характеристики поставят Ion Torrent PGM платформата за новогенерационно секвениране сред една от най-добрите технологии за бърза диагностика и за скрининг за мутации в отделни гени или геномни региони при някои заболявания, в това число и ракови (42).

С възможността да се обработват множество ампликони и проби в един експеримент, PGM позволява на изследователите едновременно да анализират таргетния регион за значително по-малко време и по-ниска цена в сравнение с конвенционалните молекулярно-генетични техники. Тъй като диагностиката поставя високи изисквания пред изпълваните методи по отношение на надеждност, чувствителност, специфичност е необходимо новите технологии и методи да бъдат предварително валидирани, преди използването им за диагностични цели. Двата BRCA гена са известни с големината си, силната полиморфност и липсата на т.нар. „горещи точки“ на мутиране. Ето защо те са очевиден кандидат, който да послужи за определяне на аналитичната способност на различните технологии за масивно паралелно секвениране за молекулярно-генетични и диагностични цели (43–47). Навлизането на технологиите за секвениране от ново поколение в генетичната и геномна диагностика на наследствените заболявания доведе до необходимостта от проучвания за неговото валидиране като метод за анализ на мутации в BRCA1/2 гените при фамилен рак на гърдата и яйчниците..

Една от първите изследователски групи, публикували анализите си върху валидирането на технологията за секвениране на BRCA1/2 гените чрез платформата PGM е тази на Costa и сътрудници (48). Дизайнът на метода се основава върху подбор на група пациенти с известна ДНК последователност като тренировъчна група и подбор на валидационна група пациенти, за които няма информация за ДНК последователността на двата гена. Резултатите показват по-висока чувствителност на PGM в сравнение със секвенирането по Sanger за случайни грешки при анализа и грешки, внасяни от полимеразата, защото методът се базира на секвениране на единична, клонално амплифицирана молекула. При валидирането на метода са достигнати 100% чувствителност и 97% специфичност (48). Другото му голямо предимство, според авторите, е четирикратното скъсяване на времето за анализ на двата гена, на цена, близка до тази със стандартния метод (48).

Tarabeux и сътрудници следват същата стратегия за оптимизация на параметрите на апарата с цел дълбоко секвениране на BRCA1/2 гените. При този анализ тренировъчната група е съставена от по-трудни за анализиране мутации, напр. инсерции и/или делеции с различен размер на засегнатия участък, големи прегрупираня в хромозомните локуси на гените, както и мутации в рамките на големи хомополимерни участъци в BRCA1/2. Резултатите отново показват много голяма чувствителност и специфичност на метода за новогенерационното секвениране, с

помощта на платформата Ion Torrent PGM (Life Technologies). Те дават достатъчно основание на авторите да предприемат стратегия за цялостна замяна на рутинното BRCA1/2 секвениране по Sanger с цел диагностика с новогенерационно секвениране (49).

Други изследователски групи също провеждат експерименти в тази насока за определяне на специфичността, чувствителността и за сравняване на предимствата на новогенерационно секвениране пред секвенирането по Sanger, като бързина, дълбочина на анализ и трудоемкост (50–52).

NGS технологиите значително промениха мащаба, ефективността и времето на секвенирането и доведоха до формирането на нова дефиниция за обхвата на това какво може да се изследва от практическа и клинична гледна точка. Въвеждането на новогенерационното секвениране с платформата Ion Torrent PGM за търсене на мутации в *BRCA1* и *BRCA2* гените при пациенти с фамилен рак на гърдата в Българската популация би довело до значително понижаване на времето за анализ, увеличаване продуктивността и дълбочината на секвениране за по-сигурни резултати и възможност за разработване на схема за бърз, ефективен мутационен анализ за откриване на генетични промени, имащи отношение към развитието на рак на гърдата в Българската популация с голяма точност, чувствителност и специфичност.

## 2.5.2 Приложение на MiSeq Illumina платформа за следващо поколение секвениране на 94 тумор-асоциирани гени при рака на гърдата

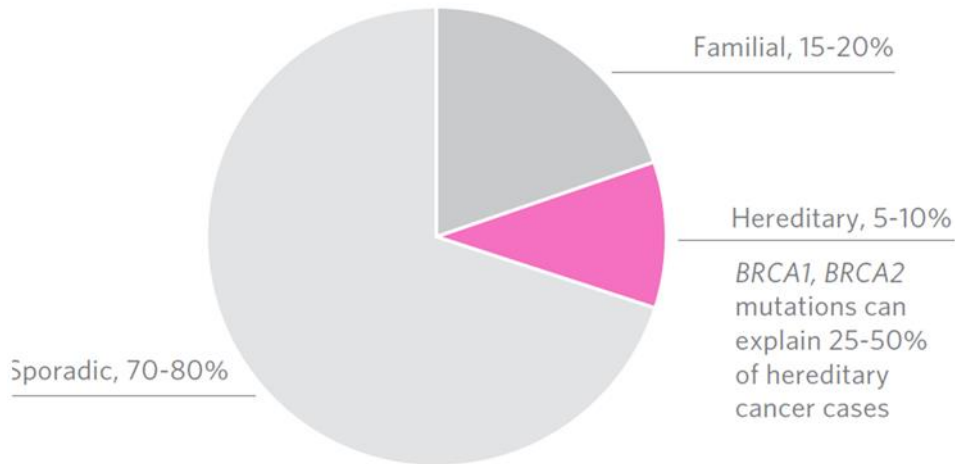
Разчитането на ДНК последователности е от съществено значение за почти всички видове биологични изследвания. В основата на този процес стои секвенирането като молекулярно – генетична технология. Секвенирането от ново поколение при използването на платформата MSeq на Illumina притежава изключителни предимства пред технологията, определена като златен стандарт в молекулярната биология и диагностика – директното секвениране по Sanger . Едно от тези предимства е възможността за мултиплексиране на различен брой ДНК проби в рамките на един-единствен експеримент. Това е причината секвенирането с MiSeq драстично да намалява времето за получаване на данни за голям брой проби, което значително редуцира и цената на самия експеримент. При този тип съвременна технология се обработват стотици ампликони, което обикновено изисква няколко седмици или месеци при конвенционалните технологии. Последните подобрения в технологиите за секвениране позволяват паралелно, мултиплексно ДНК секвениране, което осъществява прочита на къси фрагменти (25-250 бази) в много висока плътност. Голям брой проби вече могат да бъдат секвенирани в рамките на няколко часа и напълно анализирани в рамките на няколко дни. Посредством използването на прецизно автоматизирани и лесни за изпълнение протоколи, е възможно значително редуциране на времето за провеждане на експеримента и по-бързо публикуване на получените резултати (53).

Концепцията, която стои зад секвенирането от ново поколение посредством системата MiSeq (Illumina) се характеризира, подобно на капилярното секвениране по Sanger, с инкорпориране на флуоресцентно белязани дезоксирибонуклеотид трифосфати (dNTP) в ДНК матрични вериги при циклични фази на синтез, катализирано от ДНК полимераза (цитат). При всеки цикъл на добавяне на тези нуклеотиди се емитира светлина, която се детектира от флуорофор. Критичната разлика

е, че при този вид секвениране вместо една ДНК верига се синтезират множество паралелни вериги (т. нар. масивно паралелно секвениране). Illumina използва метод на секвениране чрез синтез, състоящо се от четири важни етапа - подготовка на ДНК библиотеки чрез случайно фрагментиране на ДНК веригата, последвано от 5' и 3' лигиране на адаптори в една стъпка наречена „фрагментиране“ на ДНК; генериране на клъстери чрез прикрепване на библиотечните фрагменти върху флоу-клетка, която има къси фрагменти, комплементарни на лигираните към библиотеката адаптори, които се свързват с фрагментите от твърдата подложка и всеки фрагмент след това се синтезира комплементарно чрез мостов PCR; секвениране, което се характеризира с детектирането на единични бази към момента на инкорпорирането им в ДНК веригата и накрая анализ на данните чрез аотиране на новосинтезираните фрагменти към референтен геном (35).

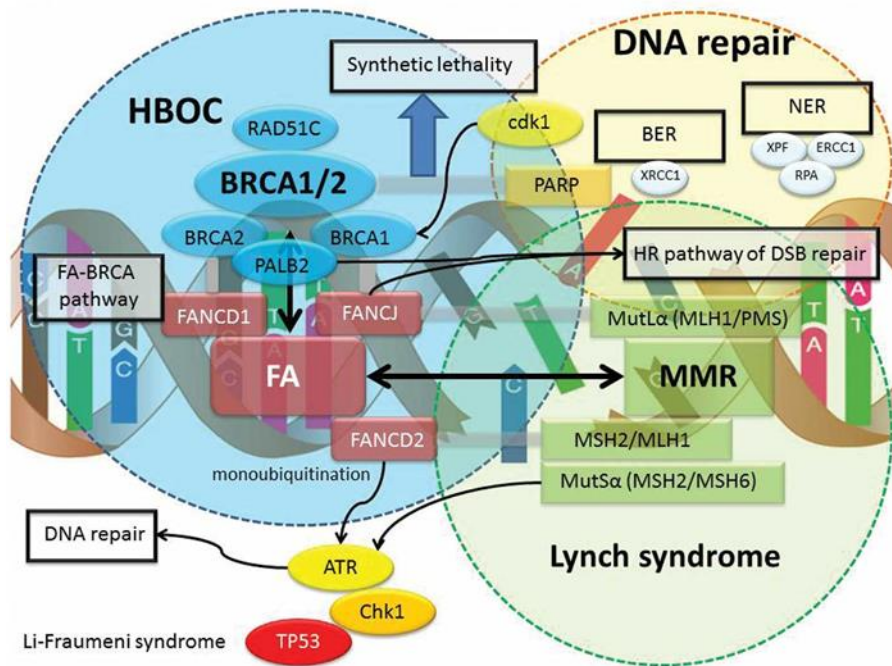
С въвеждането на новите технологии бяха разработени панели от гени които се свързват с предразположение за развитие на онкологични заболявания. Панелът TruSight Cancer (Illumina) (54) е разработен от професор Nazneen Rahman и неговия екип от Institute of Cancer Research (ICR), Лондон. Секвенционният панел покрива кодиращите райони на 94 гени, за които се предполага, че имат роля в предразположението към рак, включително и гени, асоциирани с чести (рак на гърдата, колоректален рак) и по-редки видове рак. В допълнение, панелът включва 284 полиморфни варианти (SNP), асоциирани с предразположение към онкологични заболявания. Панелът включва над 4 000 80-мерни сонди, всяка от които е проектирана спрямо човешкия референтен геном (NCBI37/hg19). Сондите са подбрани така, че да обхващат над 1 700 екзони на прицелните 94 гени (54). Постига се покритие от поне 20x за 95% от прицелните райони. Панелът обхваща тумор-асоциирани гени, участващи в ДНК поправката, гени, кодиращи транскрипционни фактори, протеин кинази и др. В него са включени както BRCA1 и BRCA2 гените, така и гени, кодиращи белтъци, които са техни функционални партньори в репарацията и поддържане на геномната стабилност: PALB2, ATM, CHEK2, RAD51, MLH1, MSH6, BRIP1, NBN (член на MRE11/RAD50 ДНК репарация комплекс), NBS1 (белтък чиято активност се регулира на ATM), RAD50 и др. Това прави TruSight Cancer (Illumina) панела подходящ за мутационен скрининг на фамилен рак на гърдата, особено при семейства, в които не се откриват BRCA мутации.

Герминативни мутации в *BRCA1* и *BRCA2* гените обясняват само около 15 до 20% от фамилените случаи на рак на гърдата (Фиг. 5) (16,29). Голяма част от генетичната предразположеност, определяща риска от развитие на рак на гърдата и яйчника все още остава неизяснена. Поради тази причина усилията на изследователските екипи са насочени в търсене мутации в гените със средна пенетрантност като функционални партньори на *BRCA1* и *BRCA2* в ДНК репарацията (Фиг 6). В тази група влизат гени като *BRIP1*, *PALB2*, *CHEK2*, *ATM*, *NBS1*, *RAD50*, *TOPBP1*, *RAD51C*, *RAP80*, които имат предразполагащ ефект за развитието на рак на гърдата и яйчниците (27). Втора насока е определянето на влиянието на ниско пенетрантни алели, асоциирани със заболяването, посредством големи асоциативни проучвания от типа случаи-контроли в рамките на целия геном (GWASs) (16).



**Фигура 5. Процентно разпределение на случаите с рака на гърдата (55).**

При проведения генетичен анализ на BRCA-негативни семейства с рак на гърдата са открити мутации в други гени като CHEK2, PALB2, BRIP1 и ATM, функционално свързани с BRCA1 и BRCA2 (16). Мутациите в тези гени са по редки и са с междинен риск за развитие на рак на гърдата и яйчника (16,29,56). Част от тези гени се свързват с редица синдроми, при които се развиват ракови заболявания. Така, например синдромите на Li-Fraumeni, Peutz-Jeghers и Cowden се обясняват с мутации в TP53, STK11 и PTEN гените (57).



**Фигура 6. BRCA гените и техните функционални партньори в сигналните пътища свързани с ДНК поправката. Мутациите засягащи тези пътища водят до геномна нестабилност и рак (57).**

Наследствените мутации в *TP53* са редки, но е известно че те са основната причина за синдрома Li-Fraumeni, който се характеризира с появата на тумори в детска възраст като тумори на меките тъкани, остеосаркома, глиома, карцином на адреналния кортекс и рак на гърдата с много ранно начало. Въпреки че този синдром се среща при едва 0.1% от случаите на рак на гърдата, наследствените мутации в *TP53* са асоциирани с 18- до 60-пъти увеличен риск за развитието на заболяването преди 45 г., в сравнение с общата популация (16).

Известно е, че някои редки синдроми също са свързани с 40-60% увеличен риск от развитие на рак на гърдата (29). Например мутации в *CDH1* гена, кодиращ E-Cadherin предизвикват дифузен карцином на стомаха и са асоциирани с увеличен риск за рак на гърдата. Синдромът на Lynch, който е основната причина за неполипозния колоректален карцином и се предизвиква от мутации в гените на „mismatch” репарационната система *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* и *PMS2*, е отговорен за кумулативния риск от развитие на рак гърдата и яйчниците в засегнатите семейства (16).

Хомозиготни мутации в част от гените, кодиращи белтъци, участващи в ДНК репариращата система се свързват с развитието на рядко наследствено рецесивни заболяване, наречено анемия на Fanconi (FA). Заболяването се проявява с вродени костно-мозъчни аномалии и/или левкемия и предразположение към развитието на онкологични заболявания (58). Честотата на FA е приблизително 1:350 000 раждания и обхваща различни етнически групи (16). Към днешна дата, са идентифицирани най-малко 13 подгрупи на заболяването, причинени от дефекти в различни гени. Така, например FA подтипове *FANCD1*, *FANCF* и *FANCG* се причинява от носителството на биалелни мутации в *BRCA2*, *BRIP1* и *PALB2*, респективно (27,59).

Хетерозиготни мутации в *PALB2* гена се свързват с предразположение към развитието на рак на гърдата и рак на панкреаса (59). Относителният кумулативен риск за развитие на рак на гърдата при носителство на герминативна мутация в *PALB2* гена е изчислен на 2.3 пъти ((95% CI [1.5-3.5]) до навършване на 55 годишна възраст и 3.4 пъти (95% CI [2.4-5.9]) до навършване на 85 годишна възраст, респективно (60).

Голяма група от генетични заболявания, проявяващи се с геномна нестабилност и предразположение към развитието на ракови заболявания се свързват с мутации в гени отнасящи се към DEAH хеликазната фамилия (16). Мутации в хеликазите *XPB*, *XPD*, *WRN*, *BLM* и *RecQL4* се свързват с генетични заболявания при човека, като Xeroderma pigmentosum и синдромите на Werner и Bloom (29). Към това семейство се отнася и *BRIP1* (*BACH1/FANCF*) хеликазата (60). *BRIP1* е туморсупресорен ген, който се асоциира не само с предразположение към развитие на рак на гърдата, но също така и с анемията на Fanconi подтип FA-J (29). Сегрегационният анализ оценява относителния риск за развитие на рак на гърдата на 2 (OR=2, 95% CI 1.2–3.2) при носители на *BRIP1* мутации на възраст над 50 г. и на 3.5 (OR=3.5, 95% CI 1.9–5.7) при носители на възраст под 50 г. (56).

### 2.5.3 MiSeq Illumina платформа за анализ на туморната хетерогенност

Увеличената заболяемост от рак на гърдата определя и нуждата от подобряване на подходите за диагностициране, лечение и проследяване на заболяването (1). Независимо от ранното откриване, близо една трета от болните, диагностицирани в стадии I-III ще развият метастатичен процес, въпреки радикалното хирургично лечение. Всяка проба от туморна тъкан съдържа в себе си и нормални клетки на организма като стромни клетки, кръвоносни съдове и клетки на имунната

система, които са част от туморната маса и го обграждат, създавайки строма-благоприятна почва, върху която да се развива туморната маса (48). В своята цялост туморната маса е хетерогенна и поликлонална, изградена от различни клетъчни клонове с характерни за тях соматични мутации. MiSeq платформата на Illumina предлага възможност за детекция на тези соматични мутации или чрез готови лабораторно валидирани китове за целогеномно секвениране (whole-genome sequencing (WGS)) или фокусиращи се върху специфични гени или райони от ДНК чрез секвениране на екзома (whole-exome (WES)) или чрез таргетно секвениране на вече установени горещи точки от туморасоциирани гени (targeted gene sequencing). Таргетното секвениране обхваща гени, за които имаме предварителна информация и са подбрани по определени критерии. Секвенирайки само известни тумор-асоциирани гени можем да детектираме соматичните мутации в тумора много по-бързо и евтино, по-чувствително и по-специфично от стандартното секвениране по Sanger.

Основата за инициране на канцерогенезата се определя от появата на соматични мутации в тумор-асоциирани гени- т.нар. „driver“ (иницииращи) и „passengers“ (съпътстващи) мутации. Подобно на всички клетки в организма на човека, раковите клетки са пряк наследник и следствие на множество митотични събития на една и съща клетка- оплодената яйцеклетка. Въпреки това ДНК последователността на генома в раковите клетки, както и в повечето нормални клетки, е придобил набор от генетични промени, които стоят в основата на процеса на диференциация на клетките по време на развитието на организма (61). Колективно тези промени се наричат соматични мутации и се различават от герминативните мутации, които се унаследяват от предходното поколение и се предават с деленето на клетките. Соматичните мутации в генома на туморната клетка могат да се разделят по видове промени на ДНК ниво-еднонуклеотидни замени, инсерции и делеции на една или няколко бази, големи геномни прегрупираня, вариации в броя копия на даден ген или локус, генна амплификация, генна редукция, която се характеризира с пълната липса на ДНК секвенция от генома на раковата клетка. Освен това раковата клетка може да приеме ДНК секвенции с екзогенен произход, като тази от вирусите или да претърпи различни епигенетични промени, които да влияят на хроматиновата структура и експресията на гените (62). При някои видове тумори се откриват и мутации в 17 килобазовия митохондриален геном на раковата клетка, но ролята им в канцерогенезата не е ясна (63).

Мутациите, които се откриват в раковия геном се акумулират през развитието на организма (61). ДНК постоянно се влияе от различни мутагени и не всяка повреда бива поправяна по време на репликацията. Мутационната честота на различните видове промени в ДНК варира, както варират и соматичните мутации в различните клетъчни клонове. Честотата на соматичните мутации се повишава при някои наследствени болести като анемията на Фанкони, атаксия, ксеродерма пигментоза и др., всяко от които се асоциира с повишен риск от развитие на раково заболяване (64,65).

Всяка соматична мутация в тумора може да се класифицира според влиянието си върху развитието му - т.нар. „driver“ (иницииращи) и „passengers“ (съпътстващи) мутации. „Инициращите“ придават на раковата клетка предимство да нараства по-бързо от тези, които не носят мутацията и са подложени на позитивна селекция при еволюцията на рака. Откриват се в т.нар. тумор-асоциирани гени. „Съпътстващи“ са такива, които не отговарят за предимството за растеж, но присъстват в предшестващите ракови клетки, когато те придобият някоя от „иницииращи“ мутации. Този вид соматични мутации не се подлагат на селекция и не са основната причина за канцерогенезата. Откриват се в туморните клетки, защото соматични мутации без

функционални последствия за клетките възникват често при репликацията, предават се при клоналната експанзия и присъстват във всички клетки на нарастващата туморна маса (63).

Основната цел на изследванията върху генома на туморните клетки е идентифицирането на „инициращите“ мутации в раковите гени. Най-голямото предизвикателство е да се разграничат тези мутации от „съпътстващите“. Основната стратегия е да се използва структурния почерк, който оставят мутациите, намиращи се в условия на позитивна селекция. Един от важните подкласове „инициращи“ мутации са тези, които отговаря за устойчивостта на рака към терапия. Откриват се в рецидивите на пациенти, които първоначално са отговорили на терапията, но в последствие са развили резистентност. Някои мутации са предхождащи терапията - „съпътстващи“ мутации, които присъстват в малки туморни популации. В последствие те се превръщат в „инициращи“ за популацията от клетки-носители които остават устойчиви на терапия и пролиферират преференциално до появата на рецидиви (66,67).

Около 350 (1.6%) от белтък-кодиращите гени в човешкия геном показват рецидивни соматични мутации в туморите с доказателства за участието им в канцерогенезата (68). Мутации в около 10% от тези гени се откриват и в герминативните клетки, като повишават риска от развитието на рак (например в BRCA гените при рак на гърдата и яйчника). С размера на пълния репертоар от човешките „ракови“ гени се спекулира, но при миши модели е установено, че над 2000 гена с мутация засягаща функциите им, имат потенциала да участват в канцерогенезата (69). Някои от тях често мутират при различни видове рак, например TP53 и KRAS, а други са редки и се срещат в определени видове рак. Около 90% от известните мутации в тумор-асоциирани гени са доминантно действащи (за туморогенезата е достатъчна мутация само на единия алел) и най-често активират белтъка, който се кодира от гена. Останалите 10 процента са рецесивни (т.е. и двата алела мутират за да се развие туморогенеза) и пречат на функцията на белтъка (напр. тези в туморсупресорните гени) (63).

Информацията за биологичните пътища на туморните заболявания в литературата идват основно от експерименти, изучаващи функцията на тумор-асоциираните гени. Някои генни семейства, най-вече протеин киназите, са известни с ключовата си роля в клетъчните процеси и при рака. „Раковите“ гени често кълъстерират в едни и същи сигнални пътища, напр. MAPK/ERK пътя (70). Активирани мутации се откриват и при рецепторни тирозин кинази като EGFR, ERBB2, FGFR1, FGFR2, FGFR3, PDGFRA и PDGFRB както и в цитоплазмените сигнални молекули NF1, RPTN11, HRAS, KRAS, NRAS и BRAF (71).

Изследванията за „движещите“ мутации и мутационните процеси, отговарящи за развитието на рака на гърдата не са проучени докрай. Две големи световни колаборативни учреждения International Cancer Genome Consortium (ICGC) и The Cancer Genome Atlas (TCGA) разработват каталог на геномите профили на хиляди висококачествени туморни проби от различни видове ракови заболявания, включително на гърдата (72). В допълнение COSMIC базата данни (Catalog of Somatic Mutations in Cancer) предоставя най-изчерпателния източник за соматични мутации разработена и поддържаща се от Cancer Genome Project в Wellcome Trust Sanger Institute (Hinxton, UK) и съдържаща над 233 000 соматични мутации от над 698 000 туморни проби.

Групата на Stephens и сътр. от Wellcome Trust Sanger Institute, в контекста на Cancer Genome Project изследва геномите на 100 тумора за соматични мутации, включващи промени в броя копия и всички екзони на протеин кодиращите гени (73).

Общо 79 от туморите са положителни по отношение експресията за естрогеновия рецептор, а 21 са отрицателни. Броят на откритите мутации показва големи различия между индивидуалните туморни проби. Намерена е значима корелация между броя мутации и възрастта на която е диагностициран рака с хистологичната оценка на заболяването и мутационния профил. „Движещи“ мутации са установени в няколко нови ракови гена включително AKT2, ARID1B, CASP8, CDKN1B, MAP3K1, MAP3K13, NCOR1, SMARCD1 и TBX3. Сред стотите анализирани тумора, авторите откриват такива мутации в най-малко 40 ракови гена и 73 различни комбинации от мутирани тумор-асоциирани гени. Резултатите на групата потвърждават сложността на канцерогенезата и хетерогенността на този вид често срещани тумори. Соматични движещи мутации са открити при гени, показали вече участие при рака на гърдата като AKT1, BRCA1, CDH1, GATA3, PIK3CA, PTEN, RB1 и TP53. Гени с потенциални „движещи“ мутации като APC, ARID1A, ARID2, ASXL1, BAP1, KRAS, MAP2K4, MLL2, MLL3, NF1, SETD2, SF3B1, SMAD4 и STK11 също са детектирани (73).

Известно е, че ракът на гърдата е силно хетерогенно заболяване и се класифицира в няколко подтипа на база експресията на естрогенов рецептор (ER), прогестеронов рецептор (PR) и ERBB2 (HER2) и според иРНК експресионно профилиране (8,74). В контекста на моделите на геномни промени, тумори на гърдата с тандемни дупликации са често ER и PR отрицателни и по експресионен профил базалоподобни. Туморите с малко прегрупирания или с такива, които са в самите ампликони на гени често са ER позитивни и класифицирани като луминален А и В подтип, съответно (75).

Въпреки, че интратуморната хетерогенност на рака на гърдата е известен феномен, към днешна дата само няколко изследователски групи провеждат изследвания в това направление чрез следващо поколение секвениране на ДНК проби от туморната тъкан (76–78). Nik Zainal и сътр. определят субклоналната архитектура на 21 тумора на гърдата чрез тази технология (76). Резултатите показват клонална и субклонални мутации. Клонланите са тези, които се появяват първи в туморогенезата (PIK3CA, P53, HER2, MYC и CCND1 амплификация или загуба на див тип BRCA1 и BRCA2). В повечето случаи субклоналните мутации са повече от клоналните. При всички тумори се открива доминантен клон, съставляващ 50-95% от туморните клетки. Авторите постулират, че именно експанзията на този доминантен клон дава диагнозата. Откриват също и наличие на предимно C>T замени в ранните етапи на заболяването, както и характерен мутационен профил свързан с наследствените форми на рак на гърдата (76).

През последните години бяха разработени панели за анализ на соматични мутации в тумор-асоциирани гени, свързани с различни онкологични заболявания (79). Според последните литературни данни, четири публикации представят резултати от най-големите проучвания за рака на гърдата в областта (68): Shah и сътр. секвенират ДНК и РНК на съответно 80 и 65 случая на тройно-негативен карцином на гърдата (71). Ellis и сътр. секвенират ДНК на 77 естроген положителни тумора от рак на гърдата (72), а Stephens и сътр. (65) и Vanerji и сътр. (73), секвенират ДНК съответно на 100 и 108 тумора от това заболяване от всички подтипове рак на гърдата. Изводите от анализите на тези групи са, че въпреки откриването на нови тумор-асоциирани гени, не се откриват нови често мутиращи такива. За разлика от известните ракови гени P53 и PIK3CA, мутирани в над 30% от пациентите (съответно в ER- и ER+ тумори), повечето нови гени са мутирани при по-малко от 10% от пациентите. Второ, има голяма генетична разнородност между туморите на гърдата, което показват Stephens и сътр. със 75 различни комбинации на мутации (65). Въпреки това мутациите могат да засягат общи сигнални пътища - 6 от гените участват в сигнализацията, включваща JUN

киназата. При Shah и сътр. най-често се повлияват пътищата на P53, хроматиновото ремоделиране, PIK3 и ERBB (71). Трето, в някои тумори не се откриват очевидни „иницииращи“ мутации, което предполага наличие на друг механизъм, който поема тази индуцираща туморогенезата функция (напр. епигенетични механизми като ДНК метилиране). Четвърто, някои мутации могат да се асоциират с отговор към или устойчивост срещу анти-ракови агенти. Ellis и сътр. предполагат, че мутантния GATA3 корелира с подтискане на пролиферацията под влиянието на лечение с ароматазни инхибитори (72). TruSeq Amplicon-Cancer Panel (TSACP) на Illumina е фиксиран панел от 48 гени. Анализът е базиран на високо ефективна мултиплексна реакция на амплификация и последващо „high throughput“ секвениране на соматичните мутации в таргетните райони. Китът е предварително синтезиран и оптимизиран за подготовка на библиотеки чрез използването на олигонуклеотидни проби за секвениране на горещи мутационни точки, обхващащи над 35 килобази от генома (80). Общият брой на ампликоните, които се генерират за секвенирането на тези 48 гена е 212. Амплификацията на избраните участъци е силно мултиплексна и се случва в една обща реакция, т.нар. „singletube“ реакция. С този оптимизиран протокол се гарантира надеждно откриване на соматични мутации с честота на срещане под 5% .

## **2.6. Циркулиращи туморни клетки- подходи за проследяване на пациенти с метастатичен рак на гърдата**

Увеличената заболяемост от рак на гърдата определя и нуждата от подобряване на подходите за дианостициране, лечение и проследяване на заболяването. Независимо от ранното откриване, близо една трета от болните, диагностицирани в стадии I-III ще развият метастатичен процес, въпреки радикалното хирургично лечение. В 30-40% от тези болни, туморни клетки могат да бъдат открити в костния мозък или периферната кръв посредством имунохистохимия още при диагностицирането (81,82).

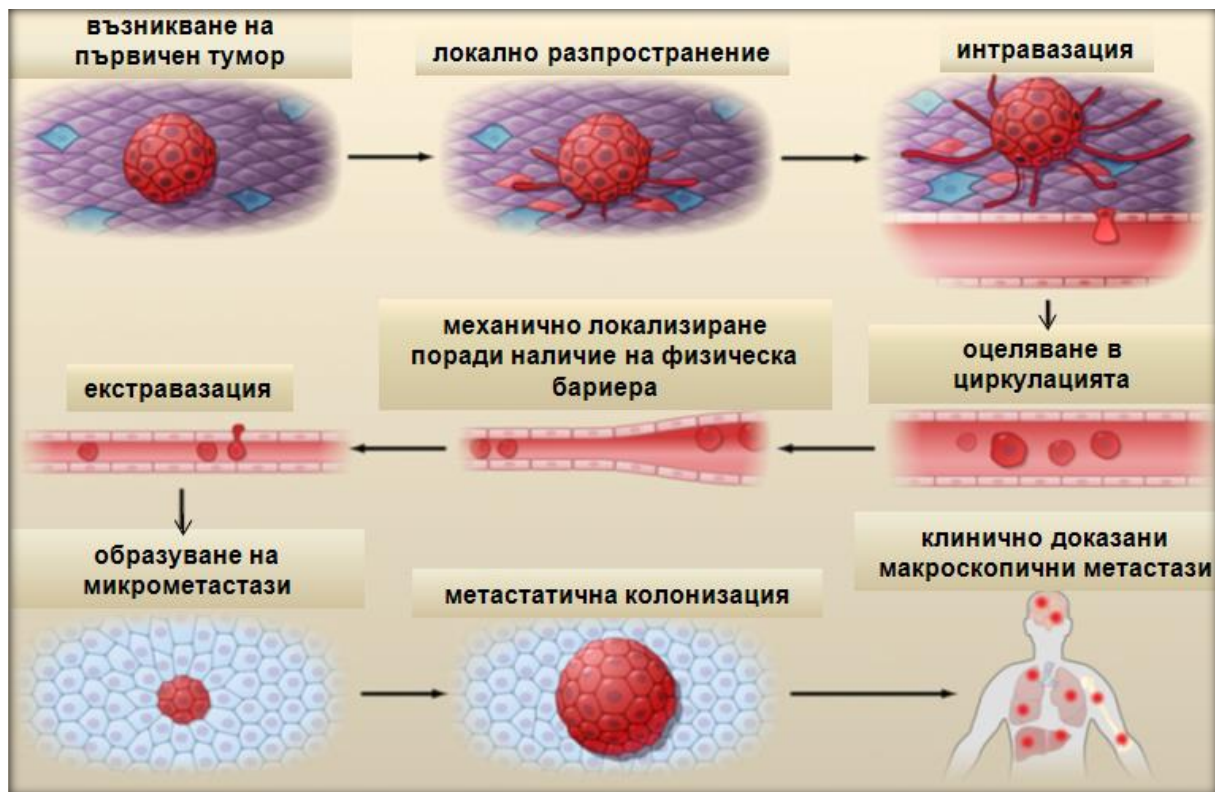
В момента е приета широко хипотезата, че метастазирало заболяване се развива на базата на дисеминация на туморни клетки още в ранните стадии (83–85). Съществува наистина интригуващ потенциал за подобряване на възможностите за определяне на прогнозата и мониториране на ефекта от адювантното лечение или лечението при метастазирало заболяване. Едновременно с това има възможности за определяне на биологични маркери, свързани с микрометастатичните клетки, които имат предиктивно значение при приложение на определен вид насочена терапия. Засега се използват модификации основно на два различни метода за детекция на микромтастази в костния мозък и циркулиращи туморни клетки (ЦТК): имунохистохимичен, чрез който се доказва експресия на белтъци по повърхността на раковите клетки и полимеразна верижна реакция след обратна транскрипция (RT-PCR), чрез който се доказва РНК експресия на гени, специфични за раковите клетки.

### **2.6.1 Определение за циркулиращи туморни клетки**

Циркулиращите туморни клетки (ЦТК) са клетки, които присъстват в периферната кръв и притежават антигенните или генетични характеристики на специфичен тип тумор. ЦТК са клетките, които се отделят от първичната туморна маса и преминават в периферното кръвообръщение. Откриват се при много различни карциномни заболявания, но не и в пациенти с доброкачествени такива (86). Много от

проучванията върху ЦТК се базират на изследвания, включващи дисеминирали туморни клетки (ДТК) - туморните клетки, представени в костния мозък при метастазирало заболяване. Преди време се е смятало, че метастазите възникват късно при прогресията на заболяването, но има доказателства, че всъщност метастатичните събития могат да бъдат по-ранно явление (87). В подкрепа на това твърдение са данни за наличие на ЦТК/ДТК в пациенти с ранно заболяване.

Метастатичната каскада представлява последователност от добре дефинирани стъпки, които трябва да бъдат преодоляни за да възникне истинско метастатично състояние (Фиг 7). Последователно, след възникването на първичният карцином *in situ*, различните клетъчни популации, които го изграждат, добиват нови характеристики (напр. усилена пролиферация и намалена диференциация) и част от тях започват локално да инвазират околната тъкан чрез заобикалящия ги екстрацелуларен матрикс (88). Следват процеси на навлизане в кръвоносните съдове (интравазация) чрез т. нар. епително-мезенхимна транзиция (89,90), която осигурява на отделните се единични или група клетки да отстояват на факторите в новата среда, в която попадат. След различен период на циркулация в кръвоносната или лимфната система тези малко на брой клетки могат да преминат базалната мембрана на съдовете и отново да навлязат в паренхимната тъкан чрез процес на екстравазация (91,92). Съдбата на тези ракови клетки след това се определя от неясни за сега механизми, включващи активирането и дезактивирането на специфични сигнални пътища. Популацията, достигнала този етап остава в т. нар. състояние на латентност за различен период от време и по този начин се образуват микрометастази (93). За да се развие крайното метастатично състояние тези микрометастази трябва да променят генетичната си програма и да активират сигнализация в клетките, възстановяваща техния пролиферативен потенциал (94,95). В литературата се откриват данни в подкрепа и на хипотезата за създаване на преметастатична ниша (фаза „0“), според която първичният тумор отделя сигнални молекули като LOX (96).



**Фигура 7. Последователност на събитията, предхождащи формирането на метастазирало раково заболяване (95).**

## 2.6.2 Методи за доказване и количествено определяне на ЦТК

Последните 10 години бележат огромен научен интерес към тестовете за ЦТК и потенциалните им ползи за клиничната практика. Публикувани са резултати от много проучвания, изследващи детекцията на микрометастази в костния мозък и ЦТК при МРГ (97). Повечето от тези публикации са адресирани към развитието и валидирането на нови лабораторни методи за оценка на туморни клетки в костния мозък. От изследванията върху оценката на значението на ЦТК в периферна кръв, повечето са адресирани към приложението на RT-PCR, като метод на детекция и квантификация (98). При повечето от изследванията е използвана експресията на един единствен ген, като начин на доказване на ЦТК.

ЦТК могат да бъдат доказани посредством няколко метода. Най-общо те могат да бъдат разделени на имуноцитохимични и генетични. Те се прилагат след различни способы за сепарация и обогатяване на туморните клетки в пробата.

За сепарация най-често се използват имуномагнитни носители, които са покрити с антитела, насочени срещу повърхностноклетъчни, туморспецифични антигени (99). След подобна позитивна клетъчна селекция изолираните клетки се типизират имунохистохимично или генетично според експресията на определени маркери. Алтернативен подход е първоначално отстраняване на левкоцитите чрез позитивна клетъчна селекция и впоследствие имунохистохимично или генетично характеризиране на оставащите клетки.

При всички тези методи може да се използва комбинация от повече повърхностноклетъчни маркери при процеса на обогатяване с цел да се увеличи

ефективността на сепарацията и по този начин - чувствителността на изследването. Специфичността на теста може да се подобри, като се използват панели от антигени при имунохистохимичното характеризирание или панели от различни мРНК последователности при характеризирането на генна експресия с RT-PCR.

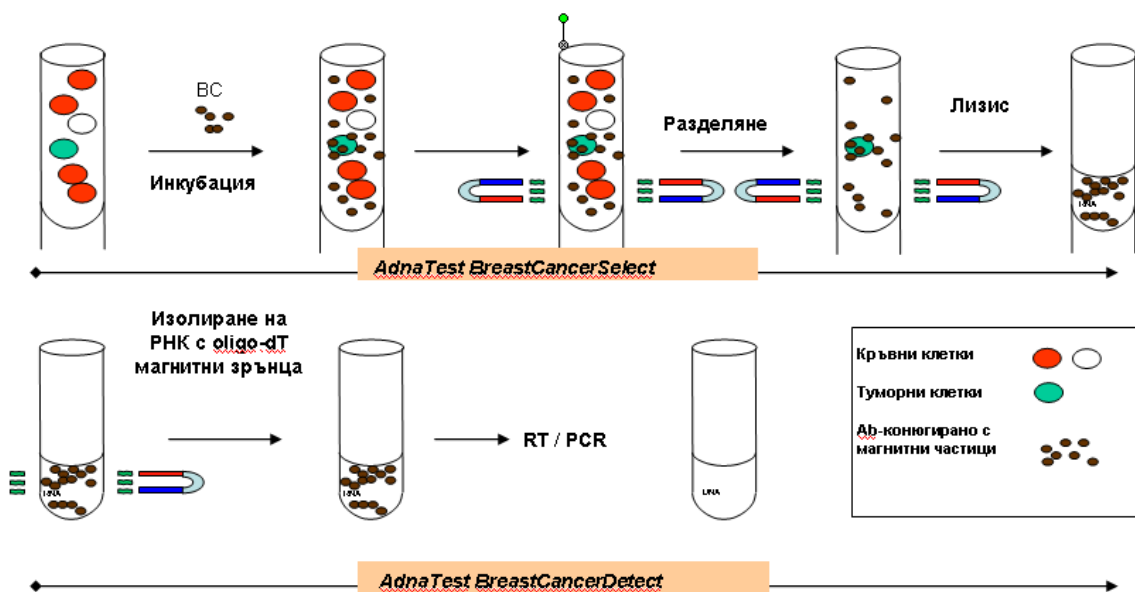
Сред най-чувствителните методи за анализ е количественият PCR в реално време, който позволява определяне експресията на всеки индивидуален ген на ниво една клетка от периферна кръв. Чрез него могат да бъдат разграничени нивата на експресия на туморни и нетуморни клетки (100).

Количественото определяне и молекулярното охарактеризиране на ЦТК чрез неинвазивна „течна“ биопсия (периферна кръв) при неколнократни изследвания и проследяване на пациентите в хода на терапия може да се използва при различни видове карциномни заболявания, включително метастазирал рак на млечната жлеза ((101–103), и спомага за разработването на стратегии за индивидуално лечение на всеки отделен пациент (104,105). Молекулярните експресионни профили на различните подтипове рак на гърдата показват наличие на специфични за тях маркери като HER2, ER, PR, цитокератин 19, човешкият мамаглобин и маркери, характерни за стволови клетки - например CD24, CD44 и ALDH (106,107).

**Анализ на експресията на повърхностноклетъчни маркери чрез комерсиални китове.** Наскоро Агенцията по храните и лекарствата, САЩ (Food and Drug Agency - FDA) одобри използването на комерсиален кит за клетъчна детекция – CellSearch® при МРГ. При този кит за магнитна сепарация се използват антитела срещу епителиални адхезионни молекули. След като пробата се промие, за да се премахнат несвързаните клетки, оставащите клетки се оцветяват имунохистохимично за цитокератини 8, 18, 19, както и за CD45 (специфичен антиген за левкоцити). Наличието на ядро се потвърждава с оцветяване с DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole – флуоресцентно багрило с висок афинитет към ДНК). ЦТК трябва да са позитивни за цитокератин и DAPI, но не и за CD45. В последствие се определя броя на клетките със съответните характеристики (108,109).

По-голямата част от литературните данни за приложение на комерсиалните китове в клиничната практика се основават на изследвания с ЦТК при пациенти с МРГ. Cristofanilli и сътр. изследват 177 пациента с МРГ в проспективно проучване, използвайки системата Cell Search и откриват, че наличието на ЦТК преди започване на терапията има прогностично и предиктивно значение за цялостната преживяемост на пациентите (109).

Друг комерсиален тест е AdnaTest Breast Cancer Detect® (AdnaGen®, Hannover, Germany). При него се използва имуномагнитна сепарация с панел от повърхностно клетъчни антигени, специфични за мембраните на клетки от определен орган напр. гърда, колон, яйчник и др. и последващо определяне РНК експресията на панел от гени, свързани с онкогенезата при съответните типове рак (Фиг 8) (110).



**Фигура 8. Процедура за изолиране на ЦТК с помощта AdnaTest. (1) Взема се проба от периферна кръв, от която се извлича обогатена субстанция ЦТК с помощта на магнитни частици, конюгирани с антитела, специфични срещу антигени от клетъчната им повърхност (AdnaTest BreastCancerSellect®). (2) Изолиране на мРНК с oligo(dT) магнитни зрънца и синтеза на кДНК чрез обратна транскрипция. (3) Мултиплексна полимеразна верижна реакция - експресионен анализ на асоциирани туморни маркери (AdnaTest BreastCancerDetect®).**

**Полимеразна верижна реакция след обратна транскрипция (RT-PCR).** Изследването на ЦТК в периферна кръв (т. нар. „течна“ биопсия) е предпочитано пред изследвания с ДТК от костен мозък. Необходими са точни и възпроизводими техники за измерването и охарактеризирането на ЦТК. Това е от изключително значение, имайки предвид малкия им брой в циркулацията - 1 клетка на  $10^5$ - $10^7$  клетки (111). При МРГ ЦТК са около 5 в 7.5 мл венозна кръв (5/ 7.5 мл). По този параметър могат да се разграничават пациентите с добра и лоша прогноза.

По принцип се счита, че молекулярните методи са по-чувствителни от ИХХ и прилагането им значително увеличава възможността за откриване на малки количества туморни клетки. Две проучвания показаха, че детекцията на туморни клетки, експресиращи СК-19 (цитокератин-19) в периферна кръв и костен мозък е 10 пъти по-силна при използване на RT-PCR с двойна амплификация (nested RT-PCR) в сравнение с ИХХ (112–114). СК-19 е член на семейството на клетъчните кератини - интермедиерни клетъчни филаменти, отговарящи за поддържането на структурния интегритет на епителните клетки. Поради високата си чувствителност той е най-използваният маркер при PCR в реално време за детекция на туморни клетки, отделени се от първичната туморна маса и разпространени в лимфните съдове, кръвоносната система и костния мозък при пациенти с МРГ (86,115–117).

В допълнение към използването на по-чувствителните молекулярни методи, преди анализа могат да се прилагат и техники за обогатяване на туморноклетъчната популация в периферна кръв, което се осъществява с помощта на описаните по-горе комерсиални китове (118). Често използваната преди RT-PCR имуномагнитна сепарация води до увеличаване чувствителността на методиката до една СК-19 експресираща

клетка на  $10^7$ - $10^8$  моноклеарни клетки, което е близо 10 пъти по-висока чувствителност спрямо използването само на RT-PCR (119). Детекцията на туморни клетки по този метод е близо 100 пъти по-чувствителна спрямо използването на ИХХ за детекция на СК-19. Обогаляване на пробата може да се постигне още посредством центрофугиране в плътностен градиент или прилагане на Ficoll. Прилагането на такъв обогатяващ метод, обаче, увеличава както времето, така и цената на изследването (119).

При използването на RT-PCR за детекция на различни туморноспецифични маркери в ЦТК, тестът има различна специфичност и чувствителност в зависимост от избора на конкретния маркер или панел от маркери (101,120,121). Най-добра чувствителност се постига при използването на СК-19, но в процеса на изследвания са открити и други маркери, като цитокератини 8, 18, 19 или 20, СЕА, мамоглобин, маспин, MUC-1, гонадотропин, и Her2/neu, чиято детекция изглежда е 100% специфична, независимо от това каква модификация на молекулярния метод се прилага (122,123).

Вторият най-често използван маркер за анализ на ЦТК при пациенти с МРГ е мамоглобин. Човешкият мамоглобин (hMAM) се локализира в хромозома 11q12-13 и е хомоложен на утероглобиновото семейство белтъци. Той се експресира в ниски нива при нормалния епител на млечната жлеза, но експресията му е много висока в тъканта при МРГ. hMAM не се експресира нормално в кръв от здрави индивиди и в костен мозък (124). Високата експресия на мамоглобиновия белтък не се ограничава до тъканите на МРГ, но се открива и при бенигнени и малигнени епителни тъкани на яйчника, матката, маточната шийка, както и при простатна хиперплазия и рак на простатата (125). В някои от проучванията този маркер е доказан, като 100% специфичен за ЦТК от РМЖ. Watson и сътр. обаче показват, че той е свръхекспресиран едва в 23% от изследваните материали от тумори на гърдата (126). Следователно, може би е по-подходящо, при прилагане на тестове за генна експресия на мамоглобин да се вземе предвид експресията му в материал от първичен тумор.

Съвсем наскоро бе доказано, че раковите клетки от карцином на гърдата, които са способни да формират колонии *in vitro* и тумори *in vivo* експресират CD44 (127). CD44 е антиген, гликопротеин от клетъчната повърхност, участващ в междуклетъчните контакти, клетъчната адхезия и миграция. Той е рецептор за хиалуроновата киселина и може да взаимодейства с други лиганди като остеопонтин, колагенови молекули и матриксни металопротеинази. Този белтък участва в много клетъчни функции, включително активиране на лимфоцитите, рециркулация, хематопоезата и туморното метастазиране. Заедно със CD25 той се използва за проследяване на производството на Т клетки от тимуса и е индикация за ефекторните Т клетки на паметта. CD44 се открива при стволови клетки на рак на гърдата и простата и би могъл да се използва като допълнителен маркер за определяне процентът на клетките с инвазивен метастатичен потенциал спрямо общото количество ЦТК (127).

**Мултимаркерни тестове.** Идеалният маркер за абсолютно специфичен и чувствителен метод на детекция би бил универсално експресиран във всички тумори на млечната жлеза. Той трябва също да е уникален за туморните клетки от МРГ. Такъв единичен маркер за сега не е установен. ЦТК в периферната кръв на определен пациент може да не експресират оценявания туморен маркер. По тази причина, използването на мултимаркерен тест, създаден с презумпцията за хетерогенната експресия на мРНК би подобрил детекцията на ЦТК спрямо тестовете, използващи единични маркери (128). Такива тестове, базирани на панел от маркери, биха могли да дадат и допълнителна ценна информация относно молекулните профили на ЦТК, а от там и за откриване на прицелни мишени за терапия.

Изследването на молекулярно генетичните маркери позволява откриването на генотипни вариации между първичия тумор и ЦТК, което е от изключително важно значение за проследяване хода на заболяването и ефикасността на прилагания терапевтичен подход. Няколко изследователски групи анализират статуса на HER2 в първични тумори и ЦТК на пациенти с МРГ и откриват, че 29% от пациентите, негативни по отношение експресията на HER2 в първични тумори [HER2(-)] имат положителна експресия на маркера в ЦТК [HER(+)], докато при 42% пациентите с HER(+) тумори се наблюдават HER2(-) ЦТК (128). В друго проучване 9 от 24 пациента (37.5%), първоначално HER2(-), активират амплификация на HER2 в ЦТК по време на развитието на заболяването (129).

Изследван е и отговорът към трастузумаб, фаза 1-4, при 30 пациента с рак на гърдата, които са преминали стандартна терапия. Успехът на лечението се потвърждава от факта, че при 93% от всички пациенти, показали наличие на експресия на СК-19 в ЦТК преди започване на терапия с трастузумаб, експресията на маркера е отрицателна след провеждане на терапията (130).

**Клинични проучвания.** Клиничните проучвания се фокусират върху възможното приложение на ЦТК в клиничната практика. Ignatiadis и съавтори използват троен RT-PCR анализ за мониториране на ЦТК на база СК-19, мамаглобин А и HER2 при 175 жени с ранен рак на гърдата. Те откриват, че наличието на СК-19 и мамаглобин А позитивни ЦТК преди инициране на адювантна терапия е свързано с намалена преживяемост [81]. Предходни изследвания на гупата от 444 пациента показват, че наличието на СК-19+ ЦТК се асоциира с намалена преживяемост само при ER-, тройно негативни (ER-, PR-, HER2-) и HER2+ подтипове рак на гърдата (102,131).

В друго изследване Xenidis и съавтори проследяват 167 пациенти, които нямат лимфни метастази и откриват, че наличието на СК-19(+) ЦТК се асоциира с ранен клиничен релапс и смърт вследствие на заболяването (132).

Два независими колектива показват, че откриването на мамаглобин А(+) ЦТК в циркулацията на пациенти с МРГ се асоциира с по-лоша прогноза (133,134).

Strati и съавтори изследват чрез количествен PCR в реално време експресията на маркерите СК-19, MAGE-A3, HER2, TWIST, hTERT  $\alpha+\beta+$  и hMAM при имуномагнитно селектирани ЦТК на 92 пациента с рак на гърдата и 28 здрави контроли, като сравняват получените резултати със системата Cell Search. Експресия на маркерите не се наблюдава при нито една от изследваните контроли, докато при 66 случая на оперативно премахнат карцином на гърдата СК-19 е експресиран при 42.4% от случаите, HER2 - при 13.65%, MAGE-A3 при 21.2%, hMAM при 13.6%, TWIST-1 при 42.4% и hTERT  $\alpha+\beta+$  при 10.2%. При 26 случая на пациенти с доказани метастази, СК-19 е детектиран при 53.8% от пациентите, HER2 при 19.2%, MAGE-A3 при 15.4%, hMAM при 30.8%, TWIST-1 при 38.5% и hTERT  $\alpha+\beta+$  при 19.2%. В предходни свои изследвания групата е показала, че детекцията на маркера СК19 в ЦТК от периферна кръв, преди и след провеждане на три курса химиотерапия на пациенти с МРГ и ранно начало, има прогностично значение (135).

Използвайки мултиплексна RT-PCR, Strati и колеги показват, че позитивните по експресия на СК-19, HER2 и hMAM пациенти имат по-кратък период на време до прогресия на заболяването [85]. При друго изследване на метастазирани карциноми на гърдата експресията и на EpCAM, HER2 и MUC1 в ЦТК корелира със стволотова клетъчни характеристики (102,131).

Saloustros и съавтори (109) провеждат експресионен анализ на СК19 в ЦТК на 312 пациентки с отстранен тумор на гърдата, преди химиотерапия, 3 месеца след приключване на химиотерапията и на всеки 6 месеца след това за период от 5 години

(102,131,136). При 25.6% от пациентките ЦТК не се откриват през целия период на проследяване. Промяна в статуса на ЦТК показват 133 пациентки (42.6%). От случаите с положителна експресия на SK19 20.5% показват загуба на маркера след известен период от време, докато други 22.1%, с отрицателна експресия на SK19 в началото на изследването, показват положителни резултати за експресията на маркера след време. След 107 месечен период на проследяване 31.7% от пациентките остават без промяна в положителния си статус и ипоказват по-висок риск от късна повторна поява на тумор в сравнение с 36.4% от случаите, останали с непроменен негативен SK19 статус. Също така позитивните за ЦТК пациенти показват по-кратък период на време до прогресия на заболяването и по-кратка обща преживяемост. Авторите правят заключение, че постоянната детекция на SK19 в ЦТК през първите 5 години след премахване на първичния тумор се асоциира с повишен риск от късна повторна поява на заболяването и смърт, както и с устойчивост към химиотерапия и хормонално лечение. Тези изследвания могат да бъдат използвани при определяне на последващата адювантна системна терапия (109).

Li и колеги анализират експресията на мамаглобин в костен мозък на пациенти с рак на гърдата и определят връзката между микрометастазите и клиничнопатологичните параметри, както и молекулярните маркери с прогностично значение за изхода от заболяването (137). Положителна експресия показват 38.2% от общо 102 изследвани пациента с рак на гърдата, със стадий 1-3 на тумора, като с повишаване на стадия се повишава и експресията на мамаглобин. Нивата на експресия при различните стадии на заболяването са 8.3%, 30.5% и 64.5% за 1, 2 и 3 стадий, съответно. Големината на туморната тъкан също е от значение, тъй като при по-големите по размер образувания експресията е увеличена. Експресионните нива за размери <2см, 2-5см и >5см са 12.5%, 33.3% и 76.5%, съответно (137).

Gaforio и сътр. (138) изолират ЦТК от 92 пациентки, използвайки фракциониране в двойно-плътностен градиент с последваща имуномагнитна сепарация и ИХХ оцветяване за цитокератин. Клетки, изолирани по този начин, са доказани в 57 (59.37%) от 96-те болни, като не се установяват в нито една от 16-те здрави контроли. Наличието на цитокератин-позитивни циркулиращи клетки преди започване на химиотерапия корелира с по-ниска обща преживяемост. Недостатък на проучването е, че включва пациентки, лекувани както в адювантен аспект, така и за метастазирало заболяване. Не е намерена и връзка между наличието на ЦТК и стадия на заболяването. Екипът открива обаче, че съществува зависимост между наличието на ЦТК и експресионния статус на хормоналните рецептори ER и PR (138).

Weigelt и сътр. (139) извършват количествен RT-PCR анализ за детекция на експресията на четири гена – *SK19*, *PIB*, *PS2*, и *EGP* с цел да изследват прогностичната стойност на ЦТК при МРГ. Взети са проби от 94 пациентки. Екипът използва четвъртична дискриминативна функция, с която информацията от нивата за експресия на четирите гена се комбинира в единична стойност. Функцията дава позитивни резултати при 24 (25.53%) от пациентките. Позитивните за ЦТК пациентки имат значително по-кратко време до прогресия, както и по-ниска обща преживяемост за 2-годишен период на проследяване в сравнение с негативните пациентки (17% срещу 36%) (139).

Резултатите от тези две проучвания са в съгласие с резултатите, публикувани наскоро от Cristofanilli и сътр. в *N Engl J Med* (109,140). Екипът е използвал комерсиален кит (CellSearch<sup>®</sup>) за детекция и количествено определяне на ЦТК при пациентки с МРГ. Целта е да се определи, както прогностичната, така и предиктивната стойност на нивата на ЦТК. Хипотезата зад такъв дизайн се основава на предположението, че ЦТК могат да са характерни за по-агресивен тип заболяване, т.е имат прогностична и предоставят

информация на ранен етап за ефикасността на даден тип лечение, т.е имат предиктивна стойност (103,141). Cristofanilli и сътр. откриват, че наличието на повече от 5 кл./ 7,5 мл. кръв на пациентките преди започване на лечение е предиктивен фактор за лош отговор спрямо отговора при пациентки без ЦТК. Наличието на повече от 5 кл./ 7,5 мл. кръв след края на лечението се съчетава с 0% обективен отговор. Пациентки с повече от 5 кл./ 7,5 мл. кръв при изходното изследване, преди началото на лечението имат по-ниска обща преживяемост (50% срещу 26%) на 22-рия месец (109,140).

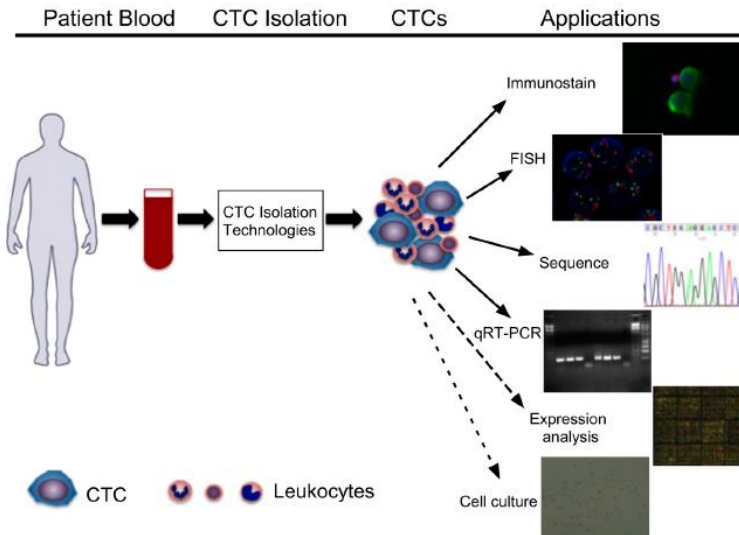
Тези резултати са потвърдени и от екипа на Nole в едно проучване върху 80 болни с МРГ, публикувано през началото на 2008 год. в *Ann of Onc* (142). Екипът заключава, че „тестването на нивата на ЦТК при определени видове лечение може да замести широко използваните досега образни методи за оценка(142).

В една последваща публикация Budd и сътр. (127) показват, че измерването на нивата на ЦТК дава по-ранна информация за отговора на заболяването в сравнение с образните методи. В това проучване пациентки с радиологични данни за прогресия и повече от 5 кл./ 7,5 мл. кръв показват значително по-кратка преживяемост спрямо тези с по-малко от 5 кл./ 7,5 мл. кръв (127).

Доказано е, че някои химиотерапевтични режими, използвани рутинно за лечение на рака на гърдата водят до увеличаване на нивата на ЦТК, като тези нива персистират за различен период от време при различните пациенти (143–145). Хирургичното лечение също води до увеличаване на нивата на ЦТК (146). Съдбата на тези вторично разпръснати след терапия клетки, както и значението им за по-нататъшния клиничен ход на заболяването са неясни.

Разбирането ни за биологията на рака на гърдата и неговата клинична еволюция може да се задълбочи значително, ако ЦТК и микрометастатичните клетки в костния мозък бъдат типизирани според генната си експресия (147). Въпреки, че мнението на някои от водещите изследователи в областта е, че нивата на ЦТК трябва да се ползват за стратифициране на пациентките с МРГ в различни рискови категории, няма почти никакви данни за ползата от определянето им при ранен рак на гърдата (147). Необходими са допълнителни проучвания в тази насока

Привлекателен вариант за дизайн на клинични проучвания, целящи да дефинират прогностичното значение на ЦТК е т. нар. „неoadювантен модел” (136). Една от бъдещите насоки в изследванията ще бъде и по-доброто типизиране на ЦТК според експресионния статус на различни маркери. Изследванията показват, че ЦТК играят важна роля при прогресията на заболяването, но също така предлагат нова ниша за развитие на прицелната терапия и персонализираната медицина при рака на гърдата (136). Лечението на всеки пациент би могло да се провежда според молекулярно-генетичния статус на заболяването чрез определяне нивата на ЦТК в периферна кръв с минимално инвазивни методи. ЦТК имат важна роля за прогностиката както на случаите с ранно начало, така и на случаите с МРГ. Детекцията на ЦТК в хода на терапия би могла да насочи онколозите към смяна на терапевтичния режим и да предотврати прогресията на заболяването до най-злокачествена фаза. Молекулярното профилиране на ЦТК, би могло да послужи за избор на най-подходяща терапия за съответния пациент и за откриване на нови терапевтични мишени (Фиг 9) (136).



**Фигура 9. Приложение на технологиите за анализ на ЦТК в клиничната практика. От пациента се взема периферна кръв („течна биопсия”), от която ЦТК се изолират с помощта на различни методи, като имуномагнитна сепарация или селекция на базата на по-големия им размер от левкоцити. Изолираните ЦТК могат да се подложат на анализ чрез: имунохистохимия - за откриване на специфични маркери; FISH - за откриване на геномни амплификации и транслокации; изолиране на ДНК и анализ на мутации чрез директно секвениране или секвениране от ново поколение; изолиране на РНК, RT-PCR и количествен PCR в реално време; микрочипови технологии за молекулно профилиране и откриване на терапевтични мишени на геномно, епигеномно, транскриптомно и посттранскриптомно ниво; създаване на клетъчни култури (148).**

## III. Цел и задачи

### 3.1. Цели

- Въвеждане и валидиране на методи за новогенерационно секвениране за изследване на мутации в гени свързани с фамилен рак на гърдата и яйчника
- Въвеждане на метод за изследване на соматични мутации и циркулиращи туморни клетки при пациенти с рак на гърдата с оглед оптимизиране и проследяване на терапията

### 3.2. Задачи

3.2.1 Валидиране на протокол за следващо поколение секвениране с платформа Ion Torrent PGM за гените BRCA1 и BRCA2

*За изпълнението на тази цел в проучването бяха изпълнени следните задачи:*

- Подбор на пациенти с рак на гърдата с информация за мутационния статус на гените BRCA
- Секвениране на пациентите за BRCA1 и BRCA2 гените на IonTorrent PGM платформата;
- Оптимизиране на алгоритъм за биоинформатичен анализ
- Сравнение на получените резултати със Sanger секвениране

3.2.2 Въвеждане на метод за бързо и надеждно диагностично изследване на панел от други гени, свързани с рак на гърдата при BRCA негативни пациентки и оценка на приноса на тези гени за предразположение към фамилен рак на гърдата

*За изпълнението на тази цел в проучването бяха изпълнени следните задачи:*

- Подбор на пациентки с фамилен рак на гърдата без мутации в BRCA гените за анализ с панел от други гени, свързани със заболяването.
- Секвениране на пациентките без мутации в BRCA гените с панел от 94 тумор-асоциирани гени с платформа MiSeq, Illumina
- Потвърждение на резултатите със Sanger секвениране
- Анализ на резултатите

### 3.2.3 Определяне на спектъра на соматични мутации в 48 тумор-асоциирани гена с платформа MiSeq,Illumina

*За изпълнението на тази цел в проучването бяха изпълнени следните задачи:*

- Създаване на тъканна и ДНК биобанка от първични туморни тъкани на пациентки с рака на гърдата и събиране на клиничната информация за тях
- Секвениране на пациентките с панел от 48 тумор-асоциирани гени с платформа MiSeq,Illumina
- Биоинформатичен анализ на резултатите

### 3.2.4 Въвеждане на метод за проследяване на пациентки с метастатичен рак на гърдата преди и по време на терапията използвайки циркулиращи туморни клетки

*За изпълнението на тази цел в проучването бяха изпълнени следните задачи:*

- Подбор на пациентки с метастазирал рака на гърдата отговарящи на международните RECIST критерии и създаване на копиДНК банка
- Създаване на копиДНК банка чрез изолиране на кръвните проби от пациентките AdnaTest Breast Cancer Select
- Провеждане на качествен анализ за наличие на циркулиращи туморни клетки с маркери GA733-2, MUC1 и Her2
- Провеждане на количествен анализ за експресията на маркерите hMAM, CK19, CD24, CD44 с RT-PCR
- Статистически и биоинформатичен анализ на данните

## IV. Материали и методи

### 4.1. Валидиране на ION Torrent технология за NGS

#### 4.1.1 Клиничен материал

В настоящето изследване бяха включени 58 пациентки с фамилен рак на гърдата, стриктно отговарящи на установените международни критерии за генетичен анализ на мутации в *BRCA* гените, утвърдени от Breast Cancer Linkage Consortium (BCLC), 1999 и National Comprehensive Cancer Network (NCCN), 2010 (1).

*Breast Cancer Linkage Consortium (BCLC) критерии, базиращи се на фамилната анамнеза на онкологични заболявания:*

- Наличие на фамилна история. Двама засегнати родственици от първо поколение, като поне едната от тях е диагностицирана с рак на гърдата на възраст под 40 г., или рак на яйчниците, на каквато и да е възраст;
- Наличие на фамилна история. Поне трима родственици от първо или второ поколение, диагностицирани с рак на гърдата или рак на яйчниците, на каквато и да е възраст;
- Ранно начало на заболяването. Пациентки, диагностицирани с рак на гърдата на възраст под 40 г., без или с наличие на фамилна история за рак на гърдата или яйчниците;
- Двустранен рак на гърдата. При наличие или отсъствие на фамилна история за рак на гърдата или яйчниците;
- Тройно негативен рак на гърдата. При наличие или отсъствие на фамилна история за рак на гърдата или яйчниците.

*National Comprehensive Cancer Network (NCCN) критерии, базиращи се на фамилната анамнеза на онкологични заболявания и върху клиничната характеристика на заболяването:*

- Два случая на рак на каквато и да е възраст, като отделни събития в една пациентка, както следва: рак на гърдата и рак на яйчниците; рак на гърдата и рак на маточните тръби; рак на гърдата и рак на перитонеума (PPC); два отделни добре разграничени първични тумора в едната гърда;
- Наличие на фамилна история, при която са засегнати близки родственици на пробанда, от една страна на семейството (майчина или бащина линия), както следва: два или повече случаи на рак на гърдата, или комбинация от случаи на рак на гърдата със случаи на един или повече от изброените видове рак на: яйчниците, на маточните тръби или на перитонеума, простата, щитовидната жлеза, ендометриума и панкреаса;
- Наличие на фамилна история, при която са засегнати близки родственици на пробанда, от една страна на семейството (майчина или бащина линия): Два или повече случаи на рак на гърдата; или комбинация от случаи на рак на гърдата със случаи на един или повече от изброените видове онкологични заболявания: мозъчни тумори дифузен стомашен карцином, сарком, карцином на кортекса на надбъбречната жлеза, дерматологични прояви при синдрома на Кауден, левкемия и лимфома;

- Пациентки от семейства с доказани мутации в гените, асоциирани с рак на гърдата. При наличие или отсъствие на фамилна история за рак на гърдата или яйчниците;
- Пациентки с етническа принадлежност към еврейското семейство Ашкенази.
- При наличие или отсъствие на фамилна история за рак на гърдата или яйчниците;
- Мъже с рак на гърдата. При наличие или отсъствие на фамилна история за рак на гърдата или яйчниците.

*Пациентите бяха насочвани към Център по Молекулна Медицина от следните клинични звена:*

- Катедра по обща и клинична патология, МУ/Клиника по обща и клинична патология, УМБАЛ „Александровска” с насочващ екип: проф. д-р Св. Христова, д-р Ал. Влахова и д-р Т. Диков;
- Клиника по онкология МБАЛ „Надежда” с насочващ екип: проф. д-р К. Тимчева, д-р С. Вълев и д-р М. Таушанова;
- II хирургична клиника „УМБАЛ „Царица Йоана – ИСУЛ” с насочващ лекар д-р Т. Седлоев;
- Клиника по обща и чернодробно-панкреатична хирургия, УМБАЛ „Александровска“ с насочващ лекар д-р М. Василева.

Всички участници бяха включени в настоящето изследване след подписване на информирано съгласие и след разяснение на същността на настоящето проучване.

Пациентите бяха разделени в три групи - **тренировъчна група (10 пациентки)**, на които предварително е проведен анализ за наличие на мутации в BRCA1 гените BRCA2 и са с доказана мутация в поне един от гените; **валидационна група (16 пациентки)**, за които не е известен мутационния статус за двата гена и **валидационна група (32 пациентки)** за сравнителен анализ на два различни протокола за подготовка на библиотеките. Всички пациентки от валидационните групи в последствие бяха секвенирани по Sanger метода за потвърждение на резултата.

#### 4.1.2. Преданалитична обработка на биологичния материал

Необходимият биологичен материал, за целите на генетичния анализ беше високомолекулна ДНК, изолирана от периферна венозна кръв. Реактивите, използвани при изолирането на ДНК са представени на Таблица 1.

##### 4.1.2.1. Изолиране на високомолекулна ДНК от кръв.

Целта на изолирането е да се получи високомолекулна ДНК с минимални примеси на белтъци, РНК и гликопротеини. Клетките и ядрата се разрушават с хипотонични буфери. Белтъците се обработват с протеинази в присъствието на EDTA и детергенти, а ДНК молекулите се екстрахират с органични разтворители, като фенол и хлороформ или се изсолват. Нова насока в методите за изолиране на високомолекулна ДНК е чрез автоматизирана магнитна сепарация.

**Изолиране на високомолекулна ДНК по солевия метод на Miller** (Miller SA et al, 1988). Най-широко приложение в практиката намира солевият метод за изолиране на ДНК от незамразена кръв, при което се работи с наситен разтвор на NaCl, за преципитация на белтъците. При този метод на изолиране е необходимо кръвта да бъде с обем между 3 и 10 ml, да не е съсирена и да е прясна. За целта, кръвта се взема в епруветка с Na<sub>2</sub>EDTA (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), като антикоагулант.

Изолирането трябва да започне не по-късно от 36 часа от момента на вземането ѝ. До тогава се съхранява в хладилник на 4°C. Техниката на изолиране се състои в следните етапи:

- *Получаване на клетъчно-ядрен лизат.* От 3 до 10 ml кръв се наливат в 50 ml конична епруветка и се добавя до 40 ml 1 x лизис буфер. Инкубира се 30 минути на лед и се центрофугира за 10 минути на 3000 rpm на 4°C или 18°C. Ядрата на левкоцитите падат на дъното, а в супернатанта остават клетъчните компоненти. Супернатантата се излива, добавят се 20 ml лизис буфер и се центрофугира при същите условия. Ако получената утайка е с бледочервен цвят предходната стъпка се повтаря.

- *Разграждане на белтъците и РНК в лизатите.* Към получената утайка се добавят: нуклеолизиращ буфер (SE буфер), 35-40 µl протеиназа К и 400 µl 10% SDS (NaC<sub>12</sub>H<sub>25</sub>SO<sub>4</sub>). Разбърква се и се оставя на 37°C за 12 часа или на 55° C за 5 часа. При добър лизис разтворът се избистря и не опалесцира.

- *Преципитация на изчистената ДНК.* След протеолизата се добавят 2 ml 6 M NaCl, разбърква се на Vortex за около 15 секунди и се центрофугира за 15 минути на 3000 rpm на стайна температура. ДНК остава в супернатанта, а примесите се утаяват. Супернатантата с ДНК се прехвърля в нова епруветка и се прибавят два обема студен абсолютен алкохол. ДНК видимо преципитира. Преципитиралата ДНК се изважда с пастърова пипета и след промиване с 80% етанол се оставя да изсъхне на въздуха. Изсушената ДНК се разтваря в TE буфер с обем между 300 µl и 1500 µl. Епруветката се запечатва много добре, надписва се и се оставя на клатачна машина за една нощ, за да се разтвори изолираната ДНК. Ако екстрахираната ДНК ще бъде съхранявана в ДНК банка, се прехвърля в епруветка с 96% етанол. Очакваният добив от 10 ml кръв е 300,800 ng/ml ДНК.

**Таблица 1. Реактиви използвани при изолиране на ДНК**

Използвани реактиви	Състав	Количество	dH <sub>2</sub> O
Еритроцитлизиращ буфер pH 7.4	155 mM NH <sub>4</sub> Cl	82.9 g	до 1000 ml
	10 mM KHCO <sub>3</sub>	10 g	
	0,1 mM Na <sub>2</sub> EDTA	0.34 g	
Нуклеолизиращ буфер pH 8.0*	75 mM NaCl	4.39 g	до 1000 ml
	25 mM Na <sub>2</sub> EDTA	8.41 g	
Преситен NaCl	6 M NaCl	360 g	до 1000 ml
10% SDS	SDS	10 g	до 100 ml
Протеиназа К	10 mg/ml	0.1 g	1 ml
100% етилов алкохол	-	-	-
80% етилов алкохол	абсолютен алкохол	800 ml	200 ml
Стерилен TE буфер pH 7.4*	10 mM Tris 0.1	1.21 g	до 1000 ml
	125 mM EDTA	0.04 g	

\*определеното pH на буферите се постига чрез титруване с NaOH/HCl

Ако кръвта е с малък обем, стара, съхранявана при отрицателни температури или съсирена, се прави допълнително пречистване. Към разтвора с ДНК се добавя равен обем фенол:хлороформ:изоамилов алкохол (25:25:1) и се разбърква на Vortex. Центрофугира се за 15 минути/10000 грm на 22°C. Горният слой внимателно се прехвърля в нова епруветка. Добавя се 1/10 (1 част натриев ацетат/10 части проба) 3 М натриев ацетат с рН 5.9 и 2 обема леден абсолютен алкохол. Вместо натриев ацетат, може да се добави амониев ацетат до крайна концентрация 2.5 М и 2 обема леден абсолютен алкохол или 2 обема изопропилов алкохол. Остава се между 2 и 3 часа или цяла нощ на минус 20°C, след което се центрофугира за 15 минути/3000 грm на 22°C. Промива се с 200 µl 80% етанол и се оставя да изсъхне. Екстрахираната ДНК се разтваря в ТЕ буфер или се прехвърля в 96% етанол за съхранение в ДНК банка. Недостатък на фенолната екстракция е нейната токсичност и трудоемкост.

**Изолиране на високомолекулна ДНК чрез CHEMAGEN® Magnetic Separation Station** (ParkinElmer) (2). Изолирането на ДНК от кръв с Chemagen полуавтоматичната сепарираща система е базирано на използването на магнитни частици в присъствието на електромагнитно поле (Фиг. 10). Техниката на изолирането се състои в следните етапи:

- *Получаване на клетъчно-ядрен лизат и разграждане на белтъците и РНК.* В 50 ml конични епруветки се излива между 7 и 10 ml кръв и се добавя 9 ml лизис буфер и 50 µl протеиназа.

- *Свързване на ДНК с магнитните частици.* Към получения лизат се добавят 25 ml свързващ буфер и 1ml поливинил алкохол с магнитни частици (M-PVA Magnetic Beads (ParkinElmer)). При карбоксилизиране на функционални групи в поливинил алкохола се получава високо специфично свързване на магнитните частици с ДНК.



**Фигура 10. Chemagen® magnetic separation station (ParkinElmer) система за изолиране на ДНК (2).**

- *Активиране на магнитното поле и миене на ДНК пробите.* В присъствието на активно електромагнитно поле частиците заедно с ДНК се привличат към металните накрайници (типове) на магнитната глава. Така захванати за металните накрайници пробите биват пренесени в миещ буфер. Следва деактивиране на електромагнитното поле и ротация на накрайниците с цел максимално хомогенизиране на пробите, ново спиране на ротацията, активиране на магнитното поле и прехвърляне на пробите в следващия миещ буфер. Активирането на магнитното поле и миенето се повтаря общо пет пъти в различни по състав миещи буфери.

- *Елуиране на ДНК.* Елуирацията буфер деактивира взаимодействието между магнитните частици и ДНК. Елуирацията буфер съдържа 10 mM Трис–НСI с рН=8.0, аналогичен на ТЕ буфер. Вместо елуиращ буфер може да се използва и dH<sub>2</sub>O, но крайния добив ще бъде по-нисък.

#### 4.1.2.2. Оценка на качеството и количеството на изолираната ДНК

Качеството на изолираната ДНК се оценява с помощта на 0.8% агарозна електорофореза, спрямо известни стандарти. За визуализиране на фрагментите се използва етидиев бромид с концентрация 0.05 µg/ml. Количеството на изолираната ДНК се оценява спектрофотометрично.

#### 4.1.3. Аналитична обработка на биологичния материал

##### 4.1.3.1. Намножаване на фрагменти ДНК чрез полимеразна верижна реакция (PCR – **P**olymerase **C**hain **R**eaction)

Полимеразната верижната реакция е метод, разработен от Kary Mullis през 1985 година. Представява *in vitro* ензимно намножаване (амплифициране) на определени нуклеотидни последователности в 5' → 3' посока. ДНК фрагментът, който ще се намножава е ограничен в двата си края от къси нуклеотиди – праймери, комплементарни на 3' краищата на ДНК матрицата.

Полимеразната верижна реакция започва с продължителна денатурация, имаща за цел разделяне на двойноверижната ДНК. Амплифицирането на интересуваният ни участък се осъществява в условията на многократно повтаряне на три стъпки:

*Денатурация* – термична денатурация, при температура между 90-97°C за пълно разделяне на двойноверижната ДНК на едноверижни ДНК матрици за амплификация. *Хибридизация* – хибридизация между праймерите и комплементарните едноверижни участъци от матричната ДНК. Температурата на хибридизацията е строго специфична и се изчислява в зависимост от базовия състав и дължината на праймерите по следната формула:

$$t^{\circ}C_{annealing} = (A + T) \times 2 + (G + C) \times 4$$

*Елонгация* – изграждане на нова верига, комплементарна на матричната ДНК в посока 5' → 3'. Температурата на този етап се определя от особеностите на ДНК полимеразата и най-често е около 72°C. PCR реакцията завършва с крайна елонгация за доизграждане на всички несвързани фрагменти.

За всяка PCR реакция са необходими:

*Едноверижна матрична ДНК*, получена след топлинна денатурация на геномна ДНК;

*Тақ полимераза*, осъществява процеса на намножаване на определена ДНК последователност. Оптималната температура за синтез на Тақ полимеразата е 72°C, а необходимата концентрация на ензима за амплификационната реакция е 1 до 5U.

*Праймери*, синтетични олигонуклеотиди с дължина около 18 - 24 бр, комплементарни на ограничаващите намножаваната последователност участъци (**Приложение 1 и 2**);

*Дезоксирибонуклетиди (dNTPs) – dGTP, dATP, dTTP, dCTP*, задължително условие е четирите dNTPs да присъстват в еквимоларни количества в реакционната смес, като оптималната концентрация е между 20 и 200 µM за всеки нуклеотид;

*10x реакционен буфер*, осигурява рН на средата от 8.3 до 9.0 и необходимите йони за работа на полимеразата. Съставен е от 10-50 mM Tris- HCl с рН 8.3 – 9.0; до 50 mM KCl, в някои случаи може съдържа от 0.5 до 5.0 mM MgCl<sub>2</sub>. Използваните при PCR реакцията реактиви и условия са представени в Таблицы 2 и 3.

**Таблица 2. PCR реактиви, използвани в хода на изследването**

PCR реактиви при използване на Тақ полимераза (Prime)	
10 x PCR буфер	1 µl
10 mM dNTP	0,4 µl
Праймер F (10 nmol)	0,4 µl
Праймер R (10 nmol)	0,4 µl
Тақ ДНК полимераза (250 U/µl)	0,05 µl
dH <sub>2</sub> O	5,75 µl
ДНК (50 ng/ µl)	2 µl
Общ реакционен обем	10 µl

**Таблица 3. Условия на PCR реакцията**

Етап	Температура	Време	Брой цикли
Начална денатурация	96 °C	5 min	1
Денатурация	95 °C	45 sec.	35
Хибридизация	52 °C – 63 °C*	35 sec.	
Елонгация	72 °C	50 sec	
Елонгация	72 °C	10 min	1
Съхранение в апарата	10 °C	∞	-

\* Температурата на хибридизация се определя експериментално и е различна за използваните при анализите праймери

#### 4. 1.3.2. Качествен контрол на PCR реакцията

Качественият контрол се осъществява, като се залагат положителна и отрицателна контрола. Като положителна контрола за всяка PCR реакция се използва ДНК, за която е известно, че се амплифицира за интересувания ни участък. Липсата на

продукт в положителната контрола показва, че амплификационната реакция не е протекла. Като отрицателна контрола се залага проба с всички компоненти на реакцията, с изключение на матрична ДНК, която се замества с dH<sub>2</sub>O. Липсата на продукт в отрицателната контрола доказва, че реакционната смес не е замърсена с чужда ДНК матрица.

#### 4. 1.3.3. Хоризонтална агарозна електрофореза

Качеството на PCR продуктите се оценява на 2% хоризонтална агарозна електрофореза. Идентифицирането на фрагментите се извършва спрямо подходящ познат молекулен маркер с известна концентрация. Нанесените в агарозния гел ДНК проби се разделят в електрично поле. При слабо алкално рН, фрагментите са заредени отрицателно и се предвижват към положителния полюс, анода. Електрофоретичната подвижност на ДНК фрагментите се влияе силно от състава и йонната сила на използвания буфер. При ниска концентрация на йоните, електричното напрежение е минимално и ДНК фрагментите се придвижват по-бавно. За анализ и разделяне на PCR продукти, най-често се използва трис боратен буфер (ТВЕ). Фрагментите се визуализират с помощта на UV трансилюминатор при 315 nm. Резултатите се документират чрез фотодокументацинна система. Реактивите, използвани при агарозната електрофореза са представени в Таблица 4.

**Таблица 4. Използвани при агарозната електрофореза реактиви**

Използвани реактиви	Състав	Количество	dH <sub>2</sub> O
5 x ТВЕ буфер	90 mM Tris HCl	54 g	до 1000 ml
	90 mM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	27,5 g	
	1 mM EDTA	4,76 g	
0.8% агарозен гел	Агароза	0.8 g	до 100 ml
	ТВЕ буфер	20 ml	
2% агарозен гел	Агароза	2 g	до 100 ml
	ТВЕ буфер	20 ml	

#### 4. 1.3.4. Директно секвениране

Секвенирането на PCR продуктите по Sanger е референтен метод за директен ДНК анализ. При него, определянето на нуклеотидната последователност на ДНК фрагмент става с помощта на автоматични секвенатори. Методът се основава на свойството на дидезоксирибонуклеотидите (ddNTP) да прекъсват синтеза на ДНК на мястото на включването им. По този начин те маркират позицията на определена нуклеотидна база. При използването на ddNTP, комбинирано с PCR амплификация, се образуват голям брой фрагменти, които се анализират чрез електрофоретично разделяне. Характерно е, че при ddNTP в трета позиция на рибозата липсва хидроксилната група, което не позволява ДНК полимеразата да продължи синтеза на ДНК от мястото на тяхното включване. Получават се много различни по дължина PCR продукти, всеки завършващ с ddNTP. Получените PCR продукти се разделят чрез капилярна

електрофореза и се визуализират. Разделянето от старта до мястото, на което се фиксира терминаторът с дадено ddNTP, определя мястото на съответния нуклеотид в ДНК секвенцията. Този метод има следните етапи:

- *Пречистване на продукта с ExoSAP преди директното секвениране.* Получените PCR продукти се пречистват с ExoSAP (ExoSapIT, Affymetrix), с цел премахване на dNTPs, праймери, соли и неспецифични продукти, които могат да окажат влияние върху по-нататъшните реакции. ExoSAP е разтвор на два хидролитични ензима – екзонуклеаза I и алкална фосфатаза. Екзонуклеазата разгражда неизползваните едноверижни ДНК фрагменти и праймери, получени по време на PCR реакцията. Алкалната фосфатаза хидролизира излишъка от дезоксинуклеотиди. Пречистването с ExoSAP се извършва чрез смесването му в съотношение 1:1 с дейонизирана вода (0,4µl ExoSap + 0,4 µl dH<sub>2</sub>O) и директното му добавяне към PCR продукта. Използваните при пречистването реактиви и условия са представени на Таблица 5.

**Таблица 5. Условия за пречистване на PCR продуктите посредством ExoSap**

Компоненти на реакционната смес		Програма за пречистване на PCR продуктите		
ExoSap	0,4 µl	Етап	Температура	Време
dH <sub>2</sub> O	0,4 µl	Пречистване на PCR продукта	37 °C	30 min
				15 min
PCR продукт	1 µl	Инактивиране на ензима	80 °C	∞
Общ обем	1,8 µl	Съхранение в апарата	4 °C	

- *Секвенционна реакция.* Китът за провеждане на секвенционната реакция Big Dye<sup>®</sup> Terminator kit v3.1, (Life Technologies), включва ДНК-полимераза, небелязани нуклеотиди и флуоресцентно белязани дидезоксинуклеотиди. Към 3'-края на всеки един от четирите дидезоксинуклеотиди – ddG, ddA, ddT, ddC е свързано различно флуоресцентно багрило. Използваната за секвенирането реакция съдържа Big Dye реакционна смес, пречистен PCR продукт и един от използваните при амплификацията праймери. Секвенционната реакция включва денатурация, хибридизация и елонгация. Използваните при секвенционната реакция реактиви са представени на Таблица 6.

**Таблица 6. Условия на секвенционната реакция**

Компоненти на реакционната смес		Програма на секвенционната реакция			
5x Seq Buffer	2 µl	Етап	Температура	Време	Брой цикли
Big Dye v3.1	0,5 µl	Начална денатурация	96°C	5 min	1
Праймер	0,1 µl	Денатурация	96 °C	20 s	30
dH <sub>2</sub> O	5,6 µl	Хибридизация	55 °C	20 s	
PCR продукт	1,8 µl	Елонгация	60 °C	2 min	
Общ обем	10 µl	Краен синтез	60 °C	5 min	1
		Съхранение в апарата	10 °C	∞	

- *Преутаяване на продукта.* Прави се с цел отстраняване на несвързаните нуклеотиди. В зависимост от броя проби, преутаяването може да се направи в епруветки или на 96 ямкова плака. Пречистването на продукта включва два етапа. Към пробите се добавя натриев ацетат и EDTA в съотношение 1:1 и абсолютен етанол. Така приготвените проби се инкубират за 15 минути на тъмно. След това се прави допълнително пречистване, като пробите се промиват със 70% етанол. Получените утайки се изсушават на стайна температура и се разтварят в 14 µl високо дейонизиран формамид.

- *Електрофоретично разделяне и отчитане на секвенционните реакции.* Секвенционните реакции се обработват и отчитат след нанасяне на автоматичния секвенатор ABI3130xl Sequence Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Крайният резултат е файл, съдържащ информация за анализираната проба и електрофореграма, съдържаща ДНК секвенцията.

#### 4.1.3.5. Секвениране от второ поколение посредством Ion Torrent PGM (**P**ersonal **G**enome **M**achine)

Съобразно заложените задачи ДНК библиотеките бяха конструирани посредством два различни протокола – Ion Xpress Plus gDNA Fragment Library Preparation и Ion AmpliSeq™ Library Preparation

А. Конструирание на ДНК библиотека с Ion Xpress Plus gDNA Fragment Library Preparation на 26 пациента от тренировъчната група (10 пациента) и първата валидационна група (16 пациента) *Системен ход:*

*Оценка на качеството на изходния ДНК материал.* Като изходен генетичен материал се използва ДНК, изолирана от периферна венозна кръв. Преди началото на конструирането на библиотеката от фрагментите на кодиращите последователности на *BRCA1* и *BRCA2* гените на изходния материал се прави качествен и количествен анализ с помощта на 0.8% агарозна електрофореза (виж точка 4.1.2.2) и последващо измерване на ДНК концентрацията на спектрофотометър NanoDrop1000.

*Намножаване на фрагментите (ампликоните) с кодиращите последователности на BRCA1 и BRCA2 гените чрез PCR.* За нуждите на секвенирането беше направено ензимно размножаване на 81 фрагмента, покриващи кодиращите последователности на *BRCA1* и *BRCA2* гените.

*Пречистване и нормализация на PCR ампликоните.* Получените PCR продукти се пречистват с SequelPrep Normalization Plate (96) Kit на Life Technologies. При пречистването се използва ChargeSwitch® технологията. За постигането на оптимални резултати при използването на SequelPrep Normalization Plate (96) Kit са необходими 250 ng/µl на PCR продукт за реакционен обем 20 µl.

*Измерване на концентрацията на пуловете посредством Qubit флуориметър.*

*Фрагментиране и пречистване на пуловете с дългите ампликони.* Фрагментирането на ампликоните е първата стъпка в изграждането на библиотеката.

Има две възможности за фрагментиране на ДНК (ампликоните) до еднакъв размер, Ion Shere™ Plus Reagents и BioRuptor Sonication System за накъсване на ампликоните с размери между 200 и 400 bp и след това добавяне на адапторните последователности. Ion Shere™ Plus Reagents е ензимен метод, подходящ за конструирание на 100, 200 и 300 bp библиотеки, към които непосредствено след това

могат да бъдат добавени адапторните последователности. При фрагментирането на ампликоните бяха използвани следните реактиви, показани на Таблица 7.

**Таблица 7. Използвани при фрагментирането на пуловете реактиви**

Реактив	Обем
Пул	1 mg в x µl*
Ion Shear Plus 10x Reaction buffer	5 µl
dH <sub>2</sub> O (Nuclease-free)	35 - x µl
Ion Shear Plus Enzyme MixII	10 µl
Общ обем	50 µl

\*Концентрацията на всеки пул се измерва и към реакционната смес се добавят толкова микролитра ампликон, че крайната му концентрация да достигне 1mg (www.allseq.com, L39).

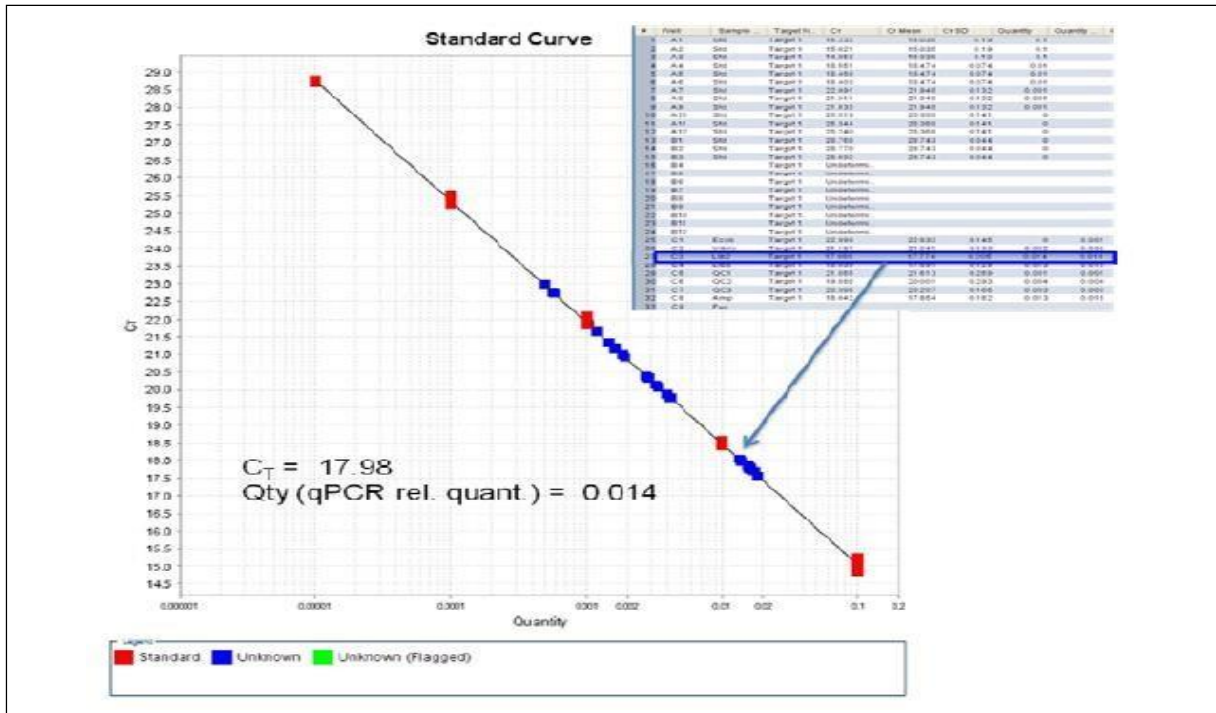
За максилна производителност на методиката е необходимо фрагментите да бъдат пречистени с AGENCOURT® AMPURE® XP на Beckman Coulter Company с цел отстраняване на замърсители. AGENCOURT® AMPURE® XP е кит за пречистване на ампликони посредством магнитни частици (3).

*Определяне на размера на фрагментите чрез Bioanalyzer High Sensitivity Kit.* Успехът на NGS силно зависи от качеството на библиотеката. Определянето на размера на ДНК фрагментите може да бъде направено чрез електрофореза с агарозен гел, чип базирана електрофореза и капилярна електрофореза. При Agilent 2100 Bioanalyzer системата се използва чип-базирана електрофореза за осъразмеряване и количествено определяне на ДНК фрагментите при подготовката на NGS библиотеките.

*Лигиране на адапторите, поправка на участъците „nick repair“ и пречистване.* След определянето на размера на фрагментите, към тях се лигират Ion съвместими адаптори с последваща поправка „nick repair“ с цел доизграждане на връзката между адапторите и ДНК библиотеката.

*Определяне на размерите на фрагментите и пречистване на селектираната по размер библиотека.* Размерът на фрагментите лесно може да бъде определен посредством E-Gel® SizeSelect™ Agarose Gels на Invitrogen. Гелът е с два реда стартове, един за нанасяне на пробата и едни за отпипетиране на интересувания ни фрагмент с определена дължина. Системата съдържа патентовано багрило, чувствително към синя светлина.

*Количествено определяне и амплификация на библиотеката.* Необходимо е, за да се определи дали библиотеката е с необходимата концентрация. Библиотеки с концентрация под 100 ng трябва да бъдат допълнително амплифицирани. Количествената оценка на неамплифицираните проби беше направена с помощта на qPCR в реално време с помощта на Ion Libraly Quantitation Kit. Този метод позволява в реално време да се определи разреждането на библиотеката, така, че да се получи пул с концентрация ~ 26 pM. Като резултат се получава стандартна крива, която софтуерът на QPCR изчислява на базата на относителното количество разредена библиотека, сравнена с неразредената контролна библиотека (фиг 11).



**Фигура 11. Стандартна крива за количествена оценка на библиотеката, получена чрез QPCR**

Така получената стойност позволява да бъде изчислен факторът на разреждане (TDF – Template Dilution Factor) по следната формула:

$$TDF = \frac{qPCR \text{ резултат} \times \text{разреждането на пробата в пътя}}{0,32}$$

например при разреждане 20 000 пъти:

$$TDF = \frac{0,014 \times 20\,000}{0,32} = 875;$$

Б. Конструирание на ДНК библиотека с Ion AmpliSeq™ Library Preparation на 32 пациента от втората валидационна група има следният системен ход:

Използваният панел от праймери Ion AmpliSeq™ BRCA1/BRCA2 Community Panel съдържа три пула от праймери за мултиплексна амплификация на двата гена, които обхващат 10-20 нуклеотидни бази около кодиращите части на отделните екзони. Дължината на ампликоните е 200 базови двойки. Трите пула от праймери съдържат общо 167 праймерни двойки и изискват 30 ng ДНК, като са синтезирани така, че да предлагат 100% покритие на кодиращите области на двата гена и да не съдържат еднуклеотидни полиморфизми с честота в общата популация > 0,5% в последните 5 нуклеотида на праймерите.

Системният ход при конструирание на ДНК библиотеката беше следния:

*Нормализиране на концентрацията на ДНК пробите.* От приготвените вече аликвоти, след изолирането на ДНК от пациентите, се преминава към по-прецизно измерване на ДНК с цел подготовка на нужното количество материал за библиотеките за новогенерационно секвениране. Използван беше кит за измерване на концентрациите Qubit® dsDNA HS (High Sensitivity) Assay Kit и Qubit® 2.0 Флуорометър (Life Technologies), съгласно инструкциите на производителя;

*Амплифициране на ДНК.* За генериране на голямо количество от регионите на гените, които са включени в панела, се започва с намножаване на тези области от гените, съгласно инструкциите в кита. Условието на реакцията и количествата на реакционната смес са представени на Таблица 8.

**Таблица 8. PCR реактиви, използвани в хода на изследването и условия на PCR реакцията**

Използвани при амплификацията реактиви		Условия на PCR амплификацията			
Реактив	Количество	Етап	Температура	Време	Брой цикли
5X Ion AmpliSeq™ HiFi Mix	4 µl	Активиране на ензима	99 °C	2 мин.	1
2X Ion AmpliSeq™ Primer Pool	10 µl	Денатурация	99 °C	15 сек.	14
ДНК	2 µl	Хибридизация на праймерите и синтез	60 °C	4 мин.	14
dH <sub>2</sub> O (Nuclease-free)	4 µl				

*Частично разграждане на праймерите.* Към всяка проба се добавя FuPa Reagent. Условието на реакцията са представени на Таблица 9.

**Таблица 9. Условия на разграждане на праймерите след амплификацията**

Етап	Температура	Време	Брой цикли
1	50 °C	10 мин.	1
2	55 °C	10 мин.	1
3	60 °C	20 мин.	1

*Лигиране на адапторите и пречистване.* Към всяка проба се лигира специфичен адаптор за мултиплексиране и по-нататъшно секвениране. Условието на реакцията и количествата на реакционната смес са представени на Таблица 10:

**Таблица 10. Условия на PCR реакцията за лигиране на адапторите**

Използвани при амплификацията реактиви		Условия на PCR амплификацията			
Реагент	Количество	Етап	Температура	Време	Брой цикли
PCR	PCR	1	22 °C	30 мин.	1
Switch Solution	Switch Solution				

Ion AmpliSeq™ Adapters	Ion AmpliSeq™ Adapters	2	72 °C	10 мин.	1
DNA Ligase	DNA Ligase				

Така конструираниите ДНК библиотеки и при двете методики се пречистват двукратно с помощта на магнит DynaMag™-96 Side Magnet и смес от магнитни частици Agencourt® AMPure® XP Reagent (Beckman Coulter, Inc.) съгласно инструкциите на производителя.

*Количествено измерване на библиотеките.* Приготвените библиотеки се измерват прецизно с помощта на Qubit® dsDNA HS (High Sensitivity) Assay Kit и Qubit® 2.0 Флуорометър (Life Technologies), съгласно инструкциите на производителя и се нормализират до необходимите за емулсионния PCR предхождащ секвенирането 100 pM. Всички баркодирани проби се смесват в общ пул.

*Количествено определяне и амплификация на библиотеката.* За целите на емулсионния PCR е необходимо да се определи дали библиотеката е с необходимата концентрация. Библиотеки с концентрация под 100 ng е необходимо да бъдат допълнително амплифицирани. Количествената оценка на неамплифицираните проби беше направена с помощта на qPCR в реално време с помощта на Ion Library Quantitation Kit. Този метод позволява в реално време да се определи разреждането на библиотеката, така, че да се получи пул с концентрация ~ 100 pM.

#### В. Емулсионен PCR (emPCR)

Емулсионният PCR е ефективен при амплификацията на геномни библиотеки, кДНК, къси фрагменти, както и фрагменти, между които могат да се образуват комплекси (да протекат рекомбинантни събития между фрагментите и хомоложни региони в ДНК). Емулсиите са двуфазни системи, състоящи се от две несмесващи се фази, едната от които служи като среда за дисперсия в която капчиците се диспергират. Съществуват две основни типа емулсии – вода с масло или масло с вода (4). При emPCR формата е PCR в Raindance масло, при която маслото служи като дисперсна среда, а PCR е дисперсна фаза. При PGM, NGS платформите към emPCR са добавени частици хидрогел покрити с праймери, комплементарни на адапторите, които са лигирани по време на конструиране на библиотеката. Частиците хидрогел съдържат хиляди копия на една ДНК молекула, ISP (Ion Sphere particles) с размер на фрагментите в библиотеката до 200 bp. При PGM на Ion Torrent платформата emPCR се осъществява с помощта на Ion One Touch системата. Ion One Touch е автоматизирана система за генериране на ISP за полупроводниково секвениране от второ поколение. За постигане на оптимален резултат от 10 до 30% ISP е необходимо библиотеката да бъде разредена в оказаната по-горе концентрация.

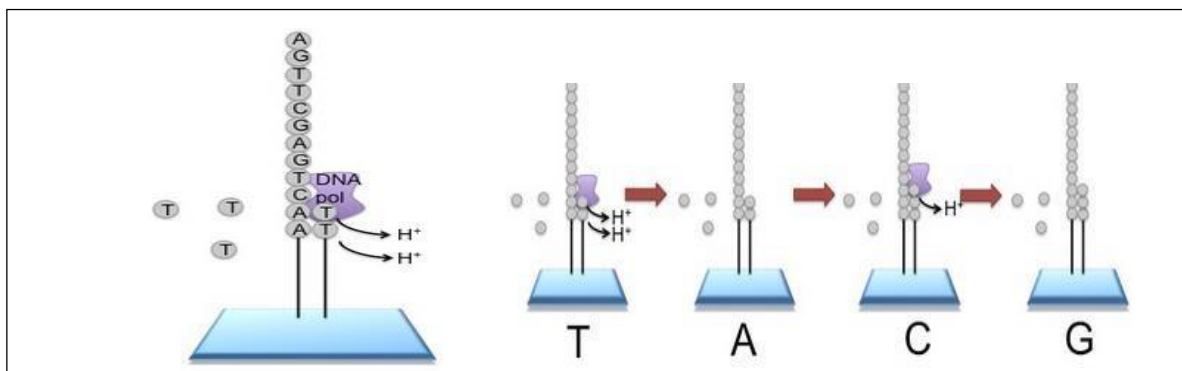
*Обогатяване на ISP (Ion Sphere particles).* Обогатяването се осъществява с помощта на свързани със стрептавидин Dynabeads®. Обогатяването на ISP със стрептавидин свързани Dynabeads осигурява голяма площ, по-голям капацитет и по-бавна скорост на утаяване по време на инкубация.

*Качествен контрол на ISP обогатяването.* Препоръчва се за оценка на степента на обогатяване на ISP. Анализът не измерва точния процент на обогатяване. Най-лесно качественият контрол преди секвенирането може да бъде направен с Qubit 2.0 Fluorimeter.

## Г. Секвениране

При Ion Torrent секвенирането, за разлика от други платформи за новогенерационно секвениране, като Illumina, не се използват оптични сигнали. Вместо това тук се детектират освободените от ДНК полимеразата  $H^+$  йони. Както и при другите NGS платформи входящата ДНК или РНК е фрагментирана до около 200 bp. След емулсионния PCR всяка капчица попада в отделна ямка на чипа от където се освобождават  $H^+$  йони. Промените в рН позволяват да се регистрират базите и да се добавят към последователността, която се прочита (фиг. 12).

В настоящия експеримент беше използван Ion Torrent Sequencing 200 kit V.2, в който са включени реактиви за секвениране на библиотеки с размери до 200 bp и при използването на Ion 314 и Ion 316 чипове.



Фигура 12. Принцип на NGS секвениране с Ion PGM

## 4.2. Следващо поколение секвениране с панел от 94 тумор-асоциирани гени с платформа MiSeq, Illumina

### 4.2.1. Клиничен материал

В настоящето изследване бяха включени 31 пациентки с фамилен рак на гърдата, стриктно отговарящи на установените международни критерии за генетичен анализ на мутации в *BRCA* гените, описани в точка 4.1.1, за които имаме предварителна информация за мутационния статус спрямо двата гена и за които е доказано, че нямат патогенни мутации в тях. Родословните дървета на пациентките са показани в Приложение 4.

### 4.2.2. Преданалитична обработка на биологичния материал

Необходимият биологичен материал беше високомолекулярна ДНК, която е преминала всички етапи на генетична обработка, описани в точките 4.1.2 и 4.1.3 (с изключение на 4.1.3.5)

### 4.2.3. Аналитична обработка на биологичния материал

4.2.3.1. Секвениране с помощта на готов панел TruSight Cancer и система MiSeq на Illumina (Фиг. 13).

Секвенционният панел покрива кодиращите райони на 94 гени, за които се предполага, че имат роля в предразположението към рак, включително и гени, асоциирани с чести (рак на гърдата, колоректален рак) и по-редки видове рак. В допълнение, панелът включва 284 полиморфни варианти (SNP), асоциирани с предразположение към рак. Панелът съдържа над 4 000 80-мерни сонди, всяка от които е проектирана спрямо човешкия референтен геном (NCBI37/hg19). Сондите са конструирани така, че да обхващат над 1 700 екзони на прицелните 94 гени. Постига се покритие от поне 20x за 95% от прицелните райони. Гените, които се включват в панела са показани на Таблица 11. Най-популярните гени, асоцииращи се с рака на гърдата са маркирани в червено.

**Таблица 11. Списък на гените включени в панела.**

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



**Фигура 13. MiSeq секвенатор, Illumina**

Етапи на новогенерационното секвениране:

**Стъпка 1. Тагментиране на геномната ДНК-** процес на тагментиране (фрагментиране и белязване) на геномната ДНК с участието на Nextera транспозоми. Транспозомите на Nextera фрагментират геномната ДНК на къси фрагменти с дължина около 300 базови двойки (бд) и добавят адапторни секвенции към краищата им, правейки възможна последващата амплификация чрез полимеразна верижна реакция (PCR). След като се приготвят според Таблица 12, пробите се миксират добре, покриват се с адхезивно фолио, центрофугират се на 280 xg на 20°C за 1 минута и се поставят в PCR апарата (апарат за Полимеразна Верижна Реакция) за 5 минути на 55 градуса.

**Таблица 12. Тагментиране на геномната ДНК**

реагент	количество
Геномна ДНК (2.5 ng/μl)	20 μl
Tagment DNA Buffer	25 μl
Tagment DNA Enzyme	5 μl

**Стъпка 2. Пречистване на тагментираната ДНК.** Тази стъпка е критична при подготовка на библиотеките за секвениране, защото е възможно при оставане в реакцията, Nextera транспозомите да се свържат здраво към краищата на фрагментираната ДНК и по този начин да окажат негативно влияние като възпрепятстват последващите процеси. Протоколът за нейното изпълнение е следния:

1. Добавят се 15 μl Stop Tagment Buffer към всяка проба от плаката;
2. Внимателно се пипетират пробите;
3. Инкубират се на стайна температура за 5 минути;
4. Центрофугира се на 280 x g на 20°C за 1 минута;
5. Прехвърля се цялото количество проба в нова чиста плака;
6. Добавят се 52 μl AMPure XP beads към пробите и внимателно се разбърква;
7. Инкубира се на стайна температура за 10 мин.;
8. Покрива се плаката с адхезивно фолио и се центрофугира 280 x g на 20°C за 1 минута;
9. Поставя се плаката на магнит докато не се избистри супернатантата;
10. Отделя се супернатантата;
11. Добавят се 200 μl 80% пресен етанол и се изчаква 30тина секунди;
12. Премахва се етанола;
13. Повтарят се стъпки 11 и 12;
14. Изсушава се утайката за не повече от 10 минути на стайна температура;
15. Маха се плаката от магнита и се добавят 22.5 μl Resuspension Buffer;
16. Разбъркваме добре;
17. Поставя се отново плаката на магнита докато не се избистри течността;
18. Прехвърлят се 20 μl от супернатантата в нова плака.

**Стъпка 3. Първа амплификация:** размножаване на пречистената и тагментирана ДНК. Тази стъпка включва добавянето на индекси, необходими при секвенирането, както и на адаптори, необходими за генерирането на клъстери и секвенирането. Към всяка проба се добавят реактивите, посочени в Таблица 13. Плаката се покрива с адхезивно фолио и се центрофугира на 280 x g на 20°C за 1 минута. Поставя се в PCR апарата при условията от таблица 14.

**Таблица 13. Първа амплификация**

реактив	количество
PCR Master Mix, Polymerase	20 µl
Index 1 (i7, N7xx) primer	5 µl
Index 2 (i5, E5xx) primer	5 µl

**Таблица 14. Условия за Първа амплификация**

стъпка	температура	цикли	време
Инкубация	72°C	1	3 минути
Денатурация	98°C	1	30 секунди
Денатурация	98°C	10	10 секунди
Хибридизация	60°C		30 секунди
Синтез	72°C		30 секунди
Синтез	72°C	1	5 минути

**Стъпка 4. Пречистване на продуктите от първата амплификация:**

Протокол:

1. Плаката от апарата тя се центрофугира на 280 x g, 20°C за 1 минута;
2. Прехвърлят се пробите в нова плака;
3. Добавят се 45 µl AMPure XP beads към пробите и внимателно се разбърква;
4. Инкубира се на стайна температура за 10 минути;
5. Постава се плаката на магнит докато не се избистри супернатантата;
6. Отделя се супернатантата;
7. Добавят се 200 µl 80% пресен етанол и се изчаква 30тина секунди;
8. Премахва се етанола;
9. Повтарят се стъпки 7 и 8;
10. Изсушава се утайката за не повече от 15 минути на стайна температура;
11. Маха се плаката от магнита и се добавят 40 µl Resuspension Buffer;
12. Разбърква се добре;
13. Постава се отново плаката на магнита докато не се избистри течността;
14. Прехвърлят се 38 µl от супернатантата в нова плака;
15. Измерва се концентрацията на така получените проби с Qubit флуорометър.

**Стъпка 5. Първа хибридизация:** смесване на получените ДНК библиотеки с т. нар. „capture” проби с цел улавяне само на таргетните фрагменти от ДНК. Тази стъпка от протокола включва и обединяването на няколко ДНК библиотеки с различни индекси в един общ пул, преди процеса на самия „enrichment”. Внимателно се смесват реактивите, посочени в Таблица 15. След това плаката се покрива с адхезивно фолио, центрофугира се на 280 x g, 20°C за 1 минута и се поставя в PCR апарата при условията от Таблица 16:

**Таблица 15. Първа хибридизация**

реактив	количество
ДНК проби	40 µl
Nextera Capture Target Buffer 1	50 µl
TruSight Content Set Custom Selected Oligos	10 µl

**Таблица 16. Условия за първа и втора хибридизация**

стъпка	температура	цикли	време
Инкубация	95°C	1	10 минути
Денатурация	93°C	1	1 минута
Денатурация	91	1	1 минута
Денатурация	89	1	1 минута
Денатурация	87	1	1 минута
Денатурация	85	1	1 минута
Денатурация	83	1	1 минута
Денатурация	81	1	1 минута
Денатурация	79	1	1 минута
Денатурация	77	1	1 минута
Денатурация	75	1	1 минута
Денатурация	73	1	1 минута
Денатурация	71	1	1 минута
Денатурация	69	1	1 минута
Денатурация	67	1	1 минута
Денатурация	65	1	1 минута
Денатурация	63	1	1 минута
Денатурация	61	1	1 минута
Денатурация	59	1	1 минута
	58°C	1	Макс.16-20 часа

**Стъпка 6. Първо улавяне:** използват се стрептавидинови частици за улавяне на „capture” пробите, свързани към прицелните региони. След това „обогатените” библиотеки се елуират от магнитните частици и се подготвят за втория цикъл на хибридизация.

Протокол:

1. Маха се плаката от апарата и се центрофугира на 280 x g, 20°C за 1 минута;
2. Прехвърля се целия обем в нова т.нар. МИДИ плака;

3. Вортексира се епруветката със Streptavidin Magnetic Beads и се добавя 250  $\mu$ l към пробите;
4. Покрива се плаката с адхезивно фолио;
5. Инкубира се на стайна температура за 30 минути;
6. Центрофугира се на 280 x g , 20°C за 1 минута;
7. Маха се фолиото и се поставя плаката на магнит за 2 минути на стайна температура до избистряне на течността;
8. Отделя се супернатантата;
9. Маха се плаката от магнита;
- ✓ *WS1 Пречистване*
10. Добавя се 200  $\mu$ l Wash Solution 1 към всяка проба от плаката и внимателно се пипетира;
11. Поставя се на магнита за 2 минути на стайна температура и се чака до избистряне на течността;
12. Отстарнява се супернатантата;
- ✓ *WS2 Пречистване* – процедурата е същата като при WS1
13. Прехвърлят се всички проби в нова плака;
14. Покрива се плаката с адхезивно фолио и се инкубира в PCR апарат за 30 минути на 42°C;
15. Веднага след инкубацията, плаката от апарата се слага обратно на магнита;
16. Веднага се отстранява супернатантата;
17. Маха се от магнита и се добавят 200  $\mu$ l Wash Solution 2 с внимателно ресуспендиране на утайката;
18. Повтарят се стъпки 11-12;
- ✓ *WS3 Пречистване* - двукратно се повтаря процедурата като при WS1 и WS2
19. Бързо се центрофугира, за да се отстрани всяко минимално количество буфер, което може да е останало след премахване на супернатантата;
- ✓ *Елуиране на пробите* - Смесват се следните компоненти в реда, в който са описани в Таблица 17

**Таблица 17. Елуираща смес**

реактив	количество
Elute Target Buffer 1	28.5 $\mu$ l на проба
2N NaOH	1.5 $\mu$ l на проба

**Таблица 18. Втора хибридизация**

реактив	количество
Nextera Capture Target Buffer 1	50 $\mu$ l
TruSight Content Set Custom Selected Oligos	10 $\mu$ l
PCR Grade вода	15 $\mu$ l
първи елуат на пробите	25 $\mu$ l

### **Стъпка 7. Пречистване на „capture” пробите**

Повтаряме всички етапи на „Стъпка 6. Първо улавяне“

**Стъпка 8. Втора амплификация:** намножаване на обогатената ДНК библиотека. Смесват се изброените компоненти в съответния ред показан в Таблица 19 заедно с елуата на пробите, получен при „Стъпка 8. Пречистване на „capture” пробите“. След

което пробите се микират добре и се центрофугират на 280 xg на 20°C за 1 минута. Постапят се в PCR апарата при условията показани на Таблица 20.

**Таблица 19. Втора амплификация**

реактив	количество
втори елуат на пробите	20 µl
PCR Master Mix, Polymerase	25 µl
PCR Primer Cocktail	5 µl

**Таблица 20. Условия за Втора амплификация**

стъпка	температура	Цикли	време
Денатурация	98°C	1	30 секунди
Денатурация	98°C	12	10 секунди
Хибридизация	60°C		30 секунди
Синтез	72°C		30 секунди
Синтез	72°C	1	5 минути

### **Стъпка 9. Пречистване на продуктите от втората амплификация**

Протокол:

1. След изваждане на плаката от апарата тя се центрофугира на 280 x g, 20°C за 1 минута;
2. Добавят се 90 µl AMPure XP beads към пробите и внимателно се разбърква;
3. Инкубира се на стайна температура за 15 минути;
4. Постапя се плаката на магнита за поне 5 минути докато не се избистри супернатантата;
5. Маха се супернатантата;
6. Добавят се 200 µl 80% пресен етанол и се изчаква за 30тина секунди;
7. Премахва се етанола;
8. Повтарят се стъпки 6 и 7;
9. Изсушава се утайката за не повече от 15 минути на стайна температура;
10. Маха се плаката от магнита и се добавят 30 µl Resuspension Buffer;
11. Разбърква се добре;
12. Постапя се отново плаката на магнита докато не се избистри течността;
13. Прехвърлят се 28 µl от супернатантата в нова плака.

**Стъпка 10. Количествено определяне на готовите ДНК библиотеки:** За да се постигне най-високо качество на секвениране при използване на секвенционната платформа е важно да се генерират клъстери с оптимална плътност върху всяка линия от повърхността на флоу-клетката. Това изисква много точно количествено определяне на генерираните ДНК преди секвениране. За количествено определяне на готовите библиотеки, се използва количествена PCR.

### 4.3 Анализ на спектъра от соматични мутации в тумори от български пациенти с рак на гърдата посредством MiSeq платформата за следващо поколение секвениране

#### 4.3.1 Клиничен материал

Пациентите бяха насочвани към Център по Молекулна Медицина от следните клинични звена:

- II хирургична клиника „УМБАЛ „Царица Йоана – ИСУЛ“ с насочващ лекар д-р Т. Седлоев;
- Клиника по обща и чернодробно-панкреатична хирургия, УМБАЛ „Александровска“ с насочващ лекар д-р М. Василева.

След подписване на информирано съгласие от пациентите, част от туморната им тъкан, отстранена по време на операцията, беше използвана за изолиране на високомолекулна ДНК, останалата част от туморната маса, както и екстрахираната ДНК, която не бе използвана в настоящото изследване, бяха съхранени в ЦММ, според стандартната оперативна процедура за съхранение на биологични проби, за по нататъшни проекти. Събирането и съхранението на данните на пациентите бе осъществено в съгласие с приетите закони за защита и неприкосновеност на личната информация. Използвани бяха 91 туморни проби с характеристики на клиничните данни, показани на Таблицы 21 и 22.

**Таблица 21. Клинични показатели на изследваните пациенти/ тумори**

Характеристики		Брой пациенти
<b>Пол</b>		
	Жени	90
	Мъже	1
<b>Възrastови групи (години)</b>		
	15-29	0
	30-44	14
	45-59	37
	60-74	31
	>75	9
<b>С диагноза билатерален рак на гърдата</b>		
	Да	10
	Не	78
	няма данни	3
<b>Локализация на тумора</b>		
	Лява гърда	51
	Дясна гърда	33
	Лява и дясна гърда	1
	няма данни	6
<b>Мултифокален</b>		
	Да	19
	Не	67

няма данни	5
<b>Наличие на метастази в органите</b>	
Да	5
Не	61
няма данни	25
<b>Размер на тумора според TNM класификацията</b>	
T1 (< 2 cm)	47
T2 (> 2 cm; < 5 cm)	23
T3 (> 5 cm)	4
T4 (тумора е с метастази)	8
неопределен	9
<b>Наличие на метастази в лимфните възли</b>	
Да	31
Не	36
няма данни	24

**Таблица 22. Хистопатологични показатели на изследваните тумори**

Характеристики	Брой тумори
<b>Туморна диференциация</b>	
високодиференциран	2
умеренодиференциран	39
нискодиференциран	18
неопределен	32
<b>Хистопатологичен подтип на тумора според WHO * класификацията</b>	
Инвазивен дуктален карцином (Invasive ductal carcinoma (IDC))	74
Инвазивен лобуларен карцином (Invasive lobular carcinoma (ILC))	5
инвазивен папиларен	1
инвазивен апокринен карцином	1
смесен	1
интрадуктална папиларна неоплазия	1
неопределен	7
<b>Хистопатологичен подтип на тумора според WHO * класификацията</b>	
Дуктален карцином in situ (Ductal carcinoma in situ (DCIS))	25
Лобуларен карцином in situ (Lobular carcinoma in situ (LCIS))	1
неопределен	65
<b>Имунохистохимичен подтип - статус според рецепторите</b>	
<b>Рецептор за естроген (ER+)</b>	
позитивен	68
негативен	12
няма данни	11
<b>Рецептор за прогестерон (PR+)</b>	
позитивен	57
негативен	23
няма данни	11
<b>Рецептор за човешки епидермален растежен фактор (HER2/neu)</b>	

позитивен	34
негативен	46
няма данни	11
<b>Молекулярен подтип - статус според рецепторите</b>	
Базалоподобен - Тройно негативен (Triple Negative Breast Cancer (TNBC)) (ER <sup>-</sup> PR <sup>-</sup> HER <sup>-</sup> /neu <sup>-</sup> )	6
Луминален А (ER <sup>+</sup> and/or PR <sup>+</sup> HER2/neu <sup>-</sup> )	41
Луминален Б (ER <sup>+</sup> and/or PR <sup>+</sup> HER2/neu <sup>+</sup> )	29
HER2 тип (ER <sup>-</sup> PR <sup>-</sup> HER <sup>+</sup> /neu <sup>+</sup> )	29

\* World Health Organization (WHO) classification

#### 4.3.2. Преданалитична обработка на биологичния материал

Като биологичен материал в настоящото проучване беше използвана високомолекулна ДНК, изолирана от замразени на -80 °С в RNeasy 16 туморни проби, които са отделени посредством ексцизионна биопсия. ДНК беше изолирана чрез дезинтеграция на част от туморната тъкан и кит QiaAmp DNA Mini Kit, Qiagen, за ДНК екстракция на колонния принцип, според препоръките на производителя.

Екстракцията на ДНК по този метод включва следните стъпки:

Стъпка 1. Отделя се 10 mg свежа туморна тъкан, хомогенизира се в 180 µl буфер ATL (тъканен лизис буфер) с помощта на хомогенизатор и хомогенатът се поставя в микроцентрифужна епруветка. След това се добавят 20 µl протеиназа К.

Стъпка 2. Пробите се вортексират до пълно смесване на съставките. Това е необходимо условие за пълното разграждане на белтъците и освобождаване на ДНК.

Стъпка 3. Пробите се инкубират на 56°C за една нощ до пълно лизиране на белтъците. При необходимост се добавя още протеиназа К.

Стъпка 4. След пълното лизиране на пробите, те се вортексират и към всяка от тях се добавят по 180 µl AL буфер (лизисен буфер). Отново се вортексират, инкубират се за 10 мин. на 70°C.

Стъпка 5. Следва вортексиране за смесване на съставките. Ако в разтворените проби се наблюдават неразтворени парчета от тъканта, те се центрофугират за 5 мин. на максимална скорост – 14 000 rpm и супернатантата се пренася в нова микроцентрифужна епруветка.

Стъпка 6. Добавят се 200 µl 95% етанол към всяка проба и пробите се вортексират енергично.

Стъпка 7. Цялото количество от центрофужните епруветки се прехвърля в надписани колонки за изолиране на ДНК.

Стъпка 8. Колонките се центрофугират на 8 000 rpm за 1 мин. Течността от колекторната епруветка се изхвърля.

Стъпка 8. Силиций - базираната мембрана на колоната се промива:

8.1. *Първо промиване* – добавят се 500µl буфер AW1. Центрофугира се на 8 000 rpm за 1 мин. Течността от колекторната епруветка се изхвърля.

8.2. *Второ промиване* – добавят се 500µl буфер AW2. Центрофугира се на 14 000 rpm за 3 мин. Изхвърля се течността от колекторната епруветка.

Стъпка 9. Изсушаване на найлоновата мембрана. Центрофугира се за 1 мин. на 14 000 rpm. По този начин се премахва остатъчния етанол от колоните с ДНК. Изхвърля се колекторната епруветка.

Стъпка 10. Колонките се преместват в нови центрофужни епруветки от 1.5µl.

Стъпка 11. Елуиране на високо-пречистена ДНК – Колонките се поставят в микроцентрифужни епруветки от 1.5ml. Добавя се 40µl АЕ буфер (елуиращ буфер) и се инкубира на стайна температура за 5-10 мин.

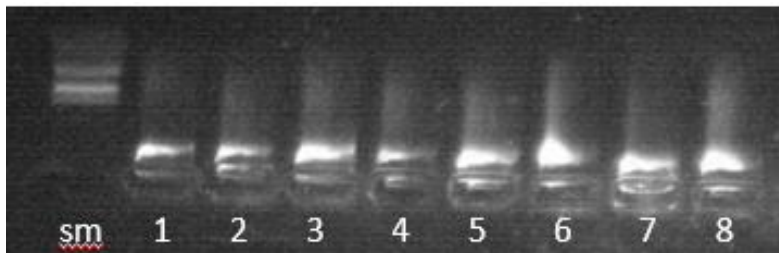
Стъпка 12. Центрофугиране – 8 000 rpm за 1 мин.

Стъпка 13. Елуирането се повтаря още два пъти с останалото количество АЕ буфер (80µl).

Стъпка 14. За получаване на по-висок добив и по-високи концентрации на ДНК от съответната проба, към колонката с ДНК се добавя само половината от количеството елуиращ буфер. Следва инкубиране на стайна температура за 3 мин. и центрофугиране. След това се добавя втората половина от количеството елуиращ буфер. Инкубира се и се центрофугира отново. По този начин 85–100 % от свързаната към мембраната в колонката ДНК се елуира в стандартен обем с висока концентрация.

Концентрацията на изолираната геномна ДНК беше измервана автоматично чрез спектрофотометър NANODROP ND-1000 (Thermo Scientific). Методът се основава на специфичното поглъщане на светлина с дължина на вълната  $\lambda = 260 \text{ nm}$  от пуриновите и пиримидиновите бази на ДНК. Отношението на абсорбциите, измерени съответно при  $\lambda_{260}$  и  $\lambda_{280}$ , показва чистотата на ДНК и трябва да е между 1.7 и 2.0. Стойности под 1.6 показват наличието на примеси от белтъци, а над 2.0 – примеси от РНК. Отношението  $A_{230}/A_{260}$  дава представа за съдържанието на захари и трябва да бъде в диапазона от 0.3 до 0.9 (стойности над 0.9 показват наличие на остатъчни захари).

Качеството на изолираната ДНК, както и добива, се оценяват след електрофореза в 0.8% агарозен гел срещу стандарти с известни концентрации (Фиг. 14).



**Фигура 14. Качествен анализ с 0.8% агарозна електрофореза на част от ДНК проби изолирани от туморни тъкани от рак на млечната жлеза.**

След количественото и качествено анализиране на новоизолираните ДНК проби, бяха подготвени работни разредки от 50 ng/µl, а остатъкът от пробите беше използван за създаването на ДНК банка от тумори на пациенти с рак на гърдата. Пробите от пациентите се съхраняват в сектор „Биобанкиране“ на Центъра по Молекулна Медицина, при стриктно спазване на изискванията за конфиденциалност за по-нататъшни научни разработки. Останалата част от материала използвахме за генетичен анализ.

#### 4.3.3. Аналитична обработка на биологичния материал

Беше проведено таргетно ресеквениране на панел от тумор-асоциирани гени TruSeq Amplicon-Cancer Panel (TSACP) на платформа за следващо поколение секвениране MiSeq (Illumina). В Таблица 23 е представен списък на гените включени в панела.

TSACP съдържа оптимизирани олигонуклеотидни проби за секвенирането на мутационни горещи точки (hotspots) в над 35 килобазова таргетна геномна секвенция. В

рамките на високо мултиплексна единична реакция, 48-те гена са представени от 212 ампликона. Размерът на ампликоните е 170-190 базови двойки. TSACP е много подходящ за ДНК-и, изолирани от формалин фиксирани и парафин включени проби. Преди подготовката на ампликоните се провежда qPCR-базиран ДНК качествен анализ, който показва дали пробите са с достатъчно добро качество.

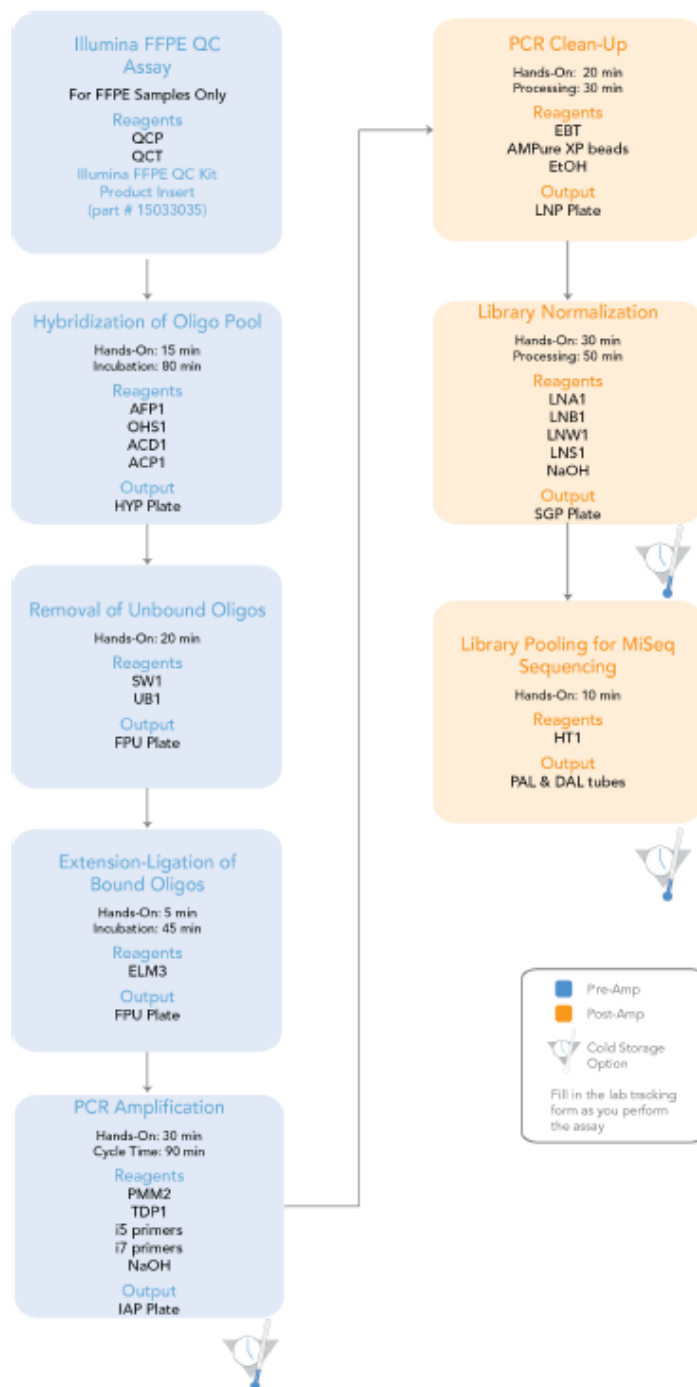
Протоколът на TSACP започва с хибридизация на предварително смесени, оптимизирани олигонуклеотидни проби „upstream“ и „downstream“ от таргетните региони. Всяка проба включва „capture“ последователност и адапторна последователност, които се използват в последващата реакция на амплификация (намножаване). Патентованата реакция на удължаване-лигиране амплифицира таргетния регион и лигира двете проби разположени „upstream“ и „downstream“ от таргетния регион. Това създава нова матрична верига и осигурява отлична специфичност. Матриците, получени при реакцията на удължаване-лигиране се амплифицират с PCR, като се инкорпорират две уникални специфични за всяка проба индекси. Крайният продукт съдържа ампликони, които са готови за секвениране. Интегрираната нормализация с магнитни частици позволява прецизно обединяване на създадените библиотеки. Обединените библиотеки могат директно да се поставят на MiSeq системата, без да е необходимо допълнително процесирание.

**Таблица 23. Списък на гените включени в панела за NGS**

<i>ABL1</i>	<i>EGFR</i>	<i>GNAS</i>	<i>MLH1</i>	<i>RET</i>
<i>AKT1</i>	<i>ERBB2</i>	<i>HNF1A</i>	<i>MPL</i>	<i>SMAD4</i>
<i>ALK</i>	<i>ERBB4</i>	<i>HRAS</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>SMARCB1</i>
<i>APC</i>	<i>FBXW7</i>	<i>IDH1</i>	<i>NPM1</i>	<i>SMO</i>
<i>ATM</i>	<i>FGFR1</i>	<i>JAK2</i>	<i>NRAS</i>	<i>SRC</i>
<i>BRAF</i>	<i>FGFR2</i>	<i>JAK3</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>STK11</i>
<i>CDH1</i>	<i>FGFR3</i>	<i>KDR</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>TP53</i>
<i>CDKN2A</i>	<i>FLT3</i>	<i>KIT</i>	<i>PTEN</i>	<i>VHL</i>
<i>CSF1R</i>	<i>GNA11</i>	<i>KRAS</i>	<i>PTPN11</i>	
<i>CTNNB1</i>	<i>GNAQ</i>	<i>MET</i>	<i>RB1</i>	

Основните етапи на таргетното ресеквениране с TSACP и анализ са основно три:

- Първият етап включва подготовка на пробите, провеждане на QC анализ на ДНК пробите, изолирани от формалин фиксирани и включени в парафин тъкани (FFPE) с помощта на Illumina FFPE QC kit и създаване на библиотеки с помощта на TruSeq Amplicon-Cancer Panel Kit.
- Вторият етап е осъществяване на паралелно масово секвениране на създадените библиотеки на MiSeq.
- Третият етап е анализ на получените резултати. На Фигура 15 са представени първите два етапа на таргетно ресеквениране.



**Фигура 15. Системен ход на TSACP.**

#### 4.3.3.1. Провеждане на QC Real time PCR анализ на ДНК пробите.

След определяне на концентрацията на ДНК пробите чрез флуориметричен метод с помощта на Qubit® dsDNA HS (High Sensitivity) Assay Kit и Qubit® 2.0 Флуорометър (Life Technologies), те се разреждат до 1 ng/μl. Качеството на всяка разреждана ДНК проба се определя с помощта на Illumina FFPE QC kit като се изчислява delta Cq. За по-натъжния етап на създаване на библиотеки се използват проби, които са с достатъчно добро качество. Съдържанието на PCR реакционната смес е представено в Таблица 24.

**Таблица 24. Съдържание на PCR реакционната смес**

	За 10 µl реакция	За 20 µl реакция
2x qPCR Master Mix	5 µl	10 µl
QCP	1 µl	2 µl
DI H <sub>2</sub> O	2 µl	4 µl
Краен обем на реакцията	8 µl	16 µl

Ние използвахме реакционна смес за 10 µl реакция. Всяка една ДНК проба е повторена по три пъти. Във всяка реакция се слага по 2 µl от разрежена ДНК проба и 8 µl от реакционния микс. Подготвят се и NTC, които служат за отрицателни контроли като в тези реакции се слага вода вместо геномна ДНК. Подготвят се и три реакции с QCP-положителна контрола, спрямо която се оценява качеството и концентрацията на ДНК пробите. PCR програмата е представена в Таблица 25.

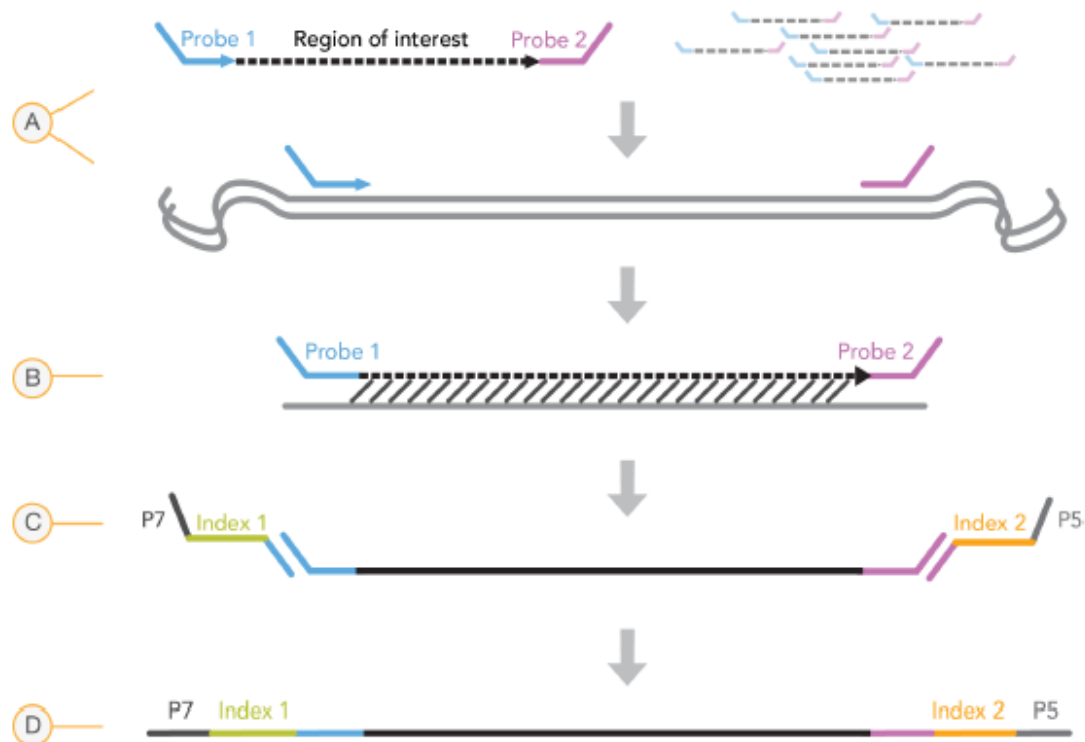
**Таблица 25. PCR програма**

	Температура, °C	Време
	50	2 мин.
	95	10 мин.
40 цикъла	95	30 сек
	57	30 сек
	72	30 сек

След приключване на програмата получените Cq стойности се използват за изчисляване на delta Cq. Всички проби с delta Cq по-малки или равни на 2 могат да бъдат използвани в последващата стъпка на създаване на библиотеки.

#### 4.3.3.2. Подготовка на библиотеките.

За подготовката на библиотеките бяха следвани стриктно инструкциите на фирмата производител. Принципът на създаване на библиотеки с TSACP е представен на Фигура 16.



**Фигура 16. Принцип за създаване на библиотеки с TSACP.**  
**A) Хибризация на Cancer panel олигонуклеотидните проби**  
**B) Удължаване (екстензия) и лигиране**  
**C) Добавяне на индекси и PCR**  
**D) Краен ампликон готов, за секвениране на MiSeq (5)**

## 4.4 Проследяване на циркулиращи туморни клетки при болни с метастазирал рак на гърдата

### 4.4.1. Клиничен материал.

*Пациентите бяха насочвани към Център по Молекулна Медицина от следните клинични звена:*

- Клиника по онкология МБАЛ „Надежда” с насочващ екип: проф. д-р К. Тимчева, д-р С. Вълев и д-р М. Таушанова;
- Клиника по медицинска онкология, Специализирана болница за активно лечение по онкология – ЕАД, София с насочващ екип: проф. д-р К. Тимчева, д-р С. Вълев и д-р М. Таушанова;

Като група, подходяща за проучването, се подбират пациентки, диагностицирани с МРГ, при които съществува поне една мерима лезия, според критериите на Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) и са показни за провеждане на първа линия химиотерапия. Пациентките получават информация за проучването и подписват информирано съгласие. В изследването са включени 43 пациентки и общо 12 контроли, от които 6 здрави пременопаузални и 6 здрави постменопаузални жени, без анамнеза за прекаран карцином на гърдата, за да се направи сравнение на нивата на експресия на

специфичните за рак на гърдата туморни маркери в ЦТК от периферна кръв. Подробна информация за клинично-патологичните характеристики на отделните пациенти е представена в таблица 26.

**Таблица 26 Клинично-патологични характеристики на подбраните за проследяване на ЦТК пациентки с МРГ.**

Номер в ЦММ	Диагноза	Дата на диагноза	Стадий към диагноза (TNM)	Възраст към диагноза	Хистологична диагноза	ER	PR	HER-2
СТС_001	CA GL MAM DEX. ST POST QUADRANTECTOMIAM. MET HEPATIS. ST POST CHIMIOThERAPIA M	11 авг 2011	T1N0M0	59	IDLC	негативен	негативен	негативен
СТС_002	CA GL MAM SIN. ST POST MASTECTOMIAM. ST POST CHIMIOTh. MET OSS. PLEURITIS EXCUDATIVA REACTIVA SIN. ST POST PLEURODESIS. MET OSS. ST POST CHIMIOTh	23 авг 2010	T2N1M0	62	IDC	позитивен	позитивен	негативен
СТС_003	CA GL MAM SIN. ST POST MASTECTOMIAM. ST POST CHIMIOTh. ST POST RADIO- ET HORMONOTH. MET PULMONUM. MET L N MEDIASTINI. PLEURITIS ECXUD REACTIVA BILLAT. ST POST TALK- PLEURODESIS. ST POST CHIMIOTh	15 юни 1986	T4N1M0	44	IDC	ND	ND	ND
СТС_004	CA GL MAM SIN. MET PULMONUM. MET OSS. ASCITES. ST MET OVARIORUM BILLAT. POST BIOPSIAM. GL MAM. MET OSS. ST POST CHIMIOTh	5 яну 2012	T2NXM1	59	ILC	позитивен	позитивен	негативен
СТС_005	CA GL MAM DEX. ST POST BIOPSIAM. MET PULMONUM ET OSS. PLEURITIS EXUDATIVA REACTIVA. ST POST RADIOTH PALL. ST POST CHIMIOTh ET HORMONOTH.	14 фев 2012	T4NXM1	55	IDC	позитивен	позитивен	негативен
СТС_006	CA GL MAM DEX. ST POST MASTECTOMIAM. ST POST RADIOTH. MET PULMONUM.	15 юли 2003	T4N0M0	56	аденокарцином	позитивен	позитивен	негативен

	ST POST CHIMIOTH							
CTC_007	CA GL MAM SIN. ST POST QUADRANTECTO MIAM. ST POST CHIMIOTH. ST POST RADIOTH. ET HORMONOTH. MET L N SUPRACLAV SIN. ST POST CHIMIOTH. MET PULMONUM. MET L N MEDIASTINI ET OSS	15 юни 2007	T1N1M0	35	ILC	позитивен	негативен	ND
CTC_008	CA GL MAM DEX. ST POST TUMORECTOMIA M. MET HEPATIS. MET OSS. ST POST CHIMIOTH	6 апр 2012	T2N1M1	55	ILC	позитивен	позитивен	негативен
CTC_009	CA GL MAM. ST POST MASTECTOMIAM. ST POST CHIMIOTH. ST POST RADIOTH. ST POST HORMONOTH. PLEURITIS EXCUDATIVA REACTIVA SIN. ST POST VATS ET BIOPSIAM. ST POST CHIMIOTH	15 юли 1998	T2N2M0	36	IDC	позитивен	негативен	негативен
CTC_010	CA GL MAM DEX. ST POST QUADRANTECTO MIAM. ST POST CHIMIOTH. ST POST RADIO- ET HORMONOTH. MET PULMONUM. MET HEPATIS. MET OSS. ST POST CHIMIOTH	14 май 2009	T1N0M0	46	IDC	позитивен	позитивен	негативен
CTC_011	CA GL MAM SIN. MET PULMONIS. ST POST MASTECTOMIAM. ST POST CHIMIOETHER	3 авг 2012	T3N0M1	75	ILC	позитивен	позитивен	негативен
CTC_012	CA GL MAM SIN. ST POST MASTECTOMIAM. MET PULMONUM. MET L N MEDIASTINI. ST POST CHIMIOTH.	26 сеп 2012	T2N2M1	88	аденокарци ном	ND	ND	ND
CTC_013	CA GL MAM SIN. ST POST MASTECTOMIAM. MET OSS. ST POST CHIMIOETHERAPIA M.	5 ное 2012	T2N3M1	42	IDC	позитивен	позитивен	негативен
CTC_014	CA GL MAM SIN. ST POST MASTECTOMIAM. MET HEPATIS. ST POST RESECTIONEM. MET OSSIUM. ST	27 сеп 2005	T2N2M0	70	ILC	позитивен	позитивен	негативен

	POST CHIMIOThERAPIA M.							
CTC_015	CA GL MAM SIN. PLEURITIS EXUD REACTIVA SIN. MET PULMO- PULMONALIS. MET L N MEDIASTINI.ST POST CHIMIOTh	7 ное 2012	T2H2M1	75	IDC	позитивен	позитивен	негативен
CTC_016	CA GL MAM SIN. ST POST MASTECTOMIAM. ST POST RADIO- HIMIO- ET HORMONOTHERA PIAM. MET PULMONUM. ST POST CHIMIOThERAPIA M.	4 сеп 2001	T1N1M0	50	IDC	позитивен	негативен	позитивен
CTC_017	CA GL DEX. MET L N MEDIASTINI. MET L N PARATRACHEALIS , AXILLARIS BILLAT. PLEURITIS EXUD REACT BILLAT. ST POST VATS. ST POST TALK- PLEUROD. MET GL SUPRARENALIS. ST POST BIOPS L N AXILLAE.MET OSS. ST POST CHIMIOTh.	29 юни 2012	TXN3M1	66	ILC	позитивен	позитивен	ND
CTC_018	CA GL MAM DEX. ST POST QUADRANTECTO MIAM. ST POST RADIOThERAPIA M. META PULMONUM. ST POST FBS ET BIOPSIAM. ST POST CHIMIOThERAPIA M	20 сеп 2010	T1N0M0	39	IDC	позитивен	позитивен	ND
CTC_019	CA GL MAM DEX. ST POST MASTECTOMIAM. ST POST CHIMIOThERAPIA M. MET OSS. MET PULMONUM	10 сеп 2009	T1N0M0	63	IDC	ND	ND	ND
CTC_020	CA GL MAM DEX. ST POST MASTECTOMIAM. ST POST RADIO- CHIMIO ET HORMONOTHERA PIAM. HEPATIS	10 дек 2007	T2N1M0	53	ILC	позитивен	позитивен	позитивен
CTC_021	CA GL MAM DEX. ST POST MASTECTOMIAM. ST POST CHIMIO- RADIO- ET HORMONOTHERA PIAM. MET HEPATIS. ST POST BIOPSIAM	2 май 2009	T0N1M0	34	IDC	позитивен	негативен	негативен

CTC_022	CA GL MAM SIN. ST POST MASTECTOMIAM. ST POST RADIO- ET HORMONOTHERA PIAM. PLEURITIS EXC REACTIVA DEX. ASCITES	10 май 2005	T2N0M0	50	ITLC	позитивен	негативен	ND
CTC_023	CA GL MAM SIN. PLEURITIS EXUD REACTIVA SIN. ST POST VATS. ST POST CHIMIOTH	15 май 2013	T4NXM1	57	недиферен циран аденокарци ном	позитивен	позитивен	негативен
CTC_024	CA GL MAM SIN.ST POST CHIMIO-RADIO ET HORMONOTERAPI AM. MET OSIUM (STERNI) .MET HEPATIS.MET LN INTRAMAMARIA ET MEDIASINI.MET PLEWRE.PLEURITI S EXUDATIVA REAKTIVA . ST POST VATS MIT BIOPSIAM.ST POST CHIMIOTERAPIAM	4 фев 2011	pT4pN2M 0	65	IDC	позитивен	позитивен	негативен
CTC_025	CA GL MAME SIN ST POST MASTECTOMIAM SIN.ST POST CHIMIO-,RADIO-ET HORMONOTERAPI AM.MET OSSIUM GENERALIZATA.S T POSTBIFOSPHONA T TERAPIAM.MET HEPATIS	7 ное 2011	pT2pN2M 0	56	IDC мультифока лен	позитивен	позитивен	позитивен
CTC_026	CA GL MAME DEX ST POST MASTECTOMIAM ST POST CHIMIOTERAPIAM ET RADIO. REC ST POST OPERACIONEM RADIO- HORMONOTER META PULMONIS PLEURE,PLEURITI S EXUDATIVA REACTIVA DEXTRI	29 ное 2001	pT2pN1M 0	49	IDC	негативен	негативен	негативен
CTC_027	CA GL MAME BILATERALIS MET LN AXILARIS BILATERALE ST POST BIOPSIAM MET OSSIUM MET PULMO BILATERALIS MET LN HILI ET MEDIASINI	14 май 2014	pT4N3M1	43	IDC	позитивен	негативен	негативен
CTC_028	CA GL MAME DEXTRI ST POST MASTECTOMIAM ST POST CHIMIO- RADIO ET HORMONOTERAPI AM REC LOKALIS	12 юни 2012	pT2pN2M 0	51	IDC	позитивен	позитивен	негативен

	PLURITIS EXUDATIVA REAKTIVA DEX ST POST VATS ET PLEURODESIS							
CTC_029	CA GL MAME DEX ST POST QUADRANTECTO MIAM M. ST POST RADIOTERAPIAM POSTOPERATIVA ST POST HORMONOTERAPI AM ADJV MET HEPATIS	29 ное 2011	pT1pN0M 0	47	IDC	позитивен	позитивен	негативен
CTC_030	CA GL MAME DEX ST POST QUADRANTECTO MIAM ST POST RADIO-ET HORMONOTERAPI AM MET LN MEDIASINI.PLEU RITS EXUDATIVA REACTIVA DEX ST POST VATS	18 окт 2012	pT1bpN0 M0	51	IDC	позитивен	позитивен	негативен
CTC_031	CA GL MAM SIN. ST POST MASTECTOMIAM ET DISECTIO AXILE ST POST HT,TARGET,RADIO ET HORMONO. MET HEPATIS PLEURITIS EXUDATIVA DEX OSSIIUM ST POST HIMIOTERAPIAM	01 фев 2009	T?N?M0	48	IDC	позитивен	позитивен	позитивен
CTC_032	CA GL MAM DEX INOPERABILIS MET LN SUPRACLAVICUL ARE DEX ET AXILE DEX MET MEDULLE SPINALIS. MET OSSIIUM ST POST TRENAP BIOPSIAM ST POST HIMIOTERAPIAM	24 юли 2014	T4cN3M1	50	-	позитивен	позитивен	негативен
CTC_033	CA GL MAM DEX ST POST QUADRANTECTO MIAM M. ST POST HIMIOTERAPIAM RADIO-ET HORMONO MET HEPATIS MET PULMONUM.ST POST HIMIOTERAPIAM	16 авг 2011	pT2pN0M 0	58	IDC	позитивен	позитивен	позитивен
CTC_034	CA GL MAM SIN ST POST QUADRANTECTO MIAM, CHIMIO- RADIO- HORMONO-ET TARGETTERAPIA M MET HEPATIS MET OSSIIUM ST POST HIMIOTERAPIAM	11 ное 2002	pT1pN1M 0	44	IDC	позитивен	позитивен	позитивен

CTC_035	CA GL MAM DEX ST POST MASTECTOMIAM ST POST CHIMIOT- RADIO-ET HORMONO MET GLAND PAROTIS SIN MET OSSIUM METRETROBULBA RIS MET OSSIUM MET PULMONUM OBS MET HEPATIS	30 окт 1997	pT2pN1M 0	42	IDC	негативен	негативен	негативен
CTC_036	CA GL MAM SIN ST POST BIOPSIAM ST POST CHIMI NEOADJUVANT ST POST QUADRANTECTO MIAM ST POST CHIMIO ADJUV, ST POST RADIO POSTOPERATIVA MET LN MEDIASTINIET SUPRACLAVICUL ARIS MET HEPATIS MET PULMONUM PERICARDITIS ET PLEURITISEXUDA TIVA REACTIVA.ST POST PERICARDIOCENT ES IM.MET OSSIUM	1 юни 2012	pT2pN2M 0	35	IDC	негативен	негативен	негативен
CTC_037	CA GL MAM DEX ST POST QUADRANTECTO MIAM CUM DA.ST POST CHIMIO ET ANTI HER2 TERAPIAMST POST RADIO REC LOKALIS.MET PULMONUM	1 авг 2012	pT1pN1M 0	35	IDC	негативен	негативен	позитивен
CTC_038	CA GL MAM SIN POST MASTECTOMIAM ST POST CHIMIO ADJUV. ST POST RADIO MET OSSIUM PLEUROITIS EXUDATIVA REACTIVA SIN MET LN MEDIASTINI ST. POST CHIMIOTERAPIAM	21 яну 2008	pT2pN1M 0	49	IDC	негативен	негативен	негативен
CTC_039	CA GL MAM SIN MET PULMONUM ET OSSIUM GENERALIZATA ST POST BIOPSIAM ST POST CHIMIOTERAPIA M	1 дек 2008	T4N2M1	64	ILC	негативен	негативен	негативен
CTC_040	CA GL MAM BILATERALIS. ST POST BIOPSIAM PLEURITIS EXUDATIVA	3 дек 2014	T4NxM1	47	IDC	позитивен	негативен	негативен

	REACTIVA DEXTRI MET LN SUPRACLAVICULARIS ET AXILARIS BILATERALIS ST POST CHIMOT MET OSSIUM GENERALIZATA ST POST HORMONOTERAPIAM							
CTC_041	CA GL MAM SIN ST POST MASTECTOMIAM ST POST CHIMIO MET LN HILI DEX ET MEDIASTINI MET PLEURE DEX ST POST CHIMOITERAPIAM	1 март 2011	pT2N0M0	61	IDC	позитивен	позитивен	негативен
CTC_042	CA GL MAM SIN ST POST MASTECTOMIAM ST POST RADIO ET CHIMIOITERAPIAM MET HEPATIS ST POST CHIMIOITERAPIAM	1 дек 2013	pT3pN3M0	49	IDC	негативен	негативен	позитивен
CTC_043	CA GL MAM DEX ST POST BIOPSIAM MET OSSIUM MET HEPATIS ST POST CHIMIOITERAPIAM	28 фев 2015	pT4N1M1	51	IDC	позитивен	позитивен	позитивен

Пациентките се лекуват в съответствие с приетите норми, че при метастазирало заболяване може да се провежда хормоно- или химиотерапия. Химиотерапия се започва при голям туморен обем, засягане на жизнено важни органи или нужда от бърз отговор. Първа линия химиотерапия при пациентки, получавали антрациклини в адювантен аспект се базира на таксан (обикновено Docetaxel). В случаите, в които антрациклин не е получаван, I линия е базирана на антрациклин (FEC) по схема (Таблица .27)

**Таблица 27. Обобщение на видовете терапия, която са получили пациентите с метастазирал рака на гърдата, локализация и видове на метастазите. Представен е и свободни от заболяване период в месеци.**

Номер в ЦММ	Адювантна/неоадювантна химиотерапия	Адювантна хормонотерапия	Адювантна радиотерапия	Локализация на метастазите	Свободен от заболяване период (мес)
CTC_001	N/A*	N/A	N/A	ч дроб	0
CTC_002	FEC	N/A	N/A	кости, плеврален излив	14
CTC_003	vincristine, tegafur, biocarbazine	да	да	бели дробове, плеврален излив, медиастинални л в	307
CTC_004	N/A	N/A	N/A	овариални, асцит, кости	0
CTC_005	N/A	N/A	N/A	кости, бели дробове, плеврален излив	0
CTC_006	не	не	да	бели дробове	104
CTC_007	FEC	не	да	надключични л в	57
CTC_008	N/A	N/A	N/A	кости, ч дроб	0
CTC_009	CMF	да	да	плеврален излив	166

СТС_010	FEC	да	да	далечни л в, бели дробове, ч дроб, кости	38
СТС_011	N/A	N/A	N/A	бели дробове	0
СТС_012	N/A	N/A	N/A	бели дробове	0
СТС_013	N/A	N/A	N/A	кости	0
СТС_014	FEC	да	да	ч дроб	85
СТС_015	N/A	N/A	N/A	плеврален излив, бели дробове	0
СТС_016	FEC	да	да	бели дробове	134
СТС_017	N/A	N/A	N/A	плеврален излив, надбъбрек, далечни л в, надключични л в, кости	0
СТС_018	не	не	да	бели дробове	26
СТС_019	FEC	не	не	бели дробове, кости	39
СТС_020	FEC	да	да	ч. дроб	63
СТС_021	FEC-T	да	да	ч. дроб	47
СТС_022	не	да	да	Плеврален излив, асцит	96
СТС_023	N/A	N/A	N/A	Плеврален излив	0
СТС_024	FEC-T	ароматазни инхибитори	да	Плеврален излив, кости, черен дроб, медиастинални ЛВ	35
СТС_025	FEC-T	тамоксифен, херцептин	да	Перикарден излив	35
СТС_026	FEC	не	да	локален рецидив	149
СТС_027	N/A	N/A	N/A	кости, бели дробове, контралатерален рак, медиастинални ЛВ	0
СТС_028	FEC-T	тамоксифен, золадекс	да	локален рецидив, плеврален излив	21
СТС_029		тамоксифен	да	черен дроб	30
СТС_030		ароматазни инхибитори	да	плеврален излив, медиастинални ЛВ	19
СТС_031	FEC-T	херцептин, ароматазни инхибитори	не	ч.дроб,кости,плеврален излив	65
СТС_032	FEC	тамоксифен	не	лв, гр.мозък, кости	0
СТС_033		ароматазни инхибитори	да	ч.дроб, б.дроб	36
СТС_034	антрациклини, таксани	херцептин, ароматазни инхибитори	не	ч. Дроб, кости	143
СТС_035	CMF	тамоксифен	да	околоушна слюнчена жлеза,кости,ретробулбарис,бял дроб,ч.дроб	201
СТС_036	FEC	не	да	медиастинални ЛВ, ч. Дроб, бял дроб,плеврален излив, кости	27
СТС_037	XT-FEC	?	не	локален рецидив, бял дроб	25
СТС_038	FEC-T	N/A	да	кости, плевралем излив, медиастинални ЛВ	81
СТС_039	N/A	N/A	N/A	кости, бели дробове	72

СТС_040	N/A	N/A	N/A	билатерален рак, плеврален излив	0
СТС_041	CMF	ароматазни инхибитори	да	медиастинални ЛВ, бели дробове	44
СТС_042	FEC-T	не	да	ч. дроб	12
СТС_043	N/A	N/A	N/A	ч. дроб, кости	1

\*N/A- няма информация

Оценката на заболяването, според установените критерии, е препоръчително да се прави през 3-4 курса. При доказана прогресия, на фона на провеждане на I линия, се инициира провеждане на II линия химиотерапия.

Проследяването на ефекта от химиотерапията на пациентките с метастазирал рак на гърдата включва:

- Обектовен отговор (според критериите на RECIST)
- Време до прогресия след I линия химиотерапия
- Двугодишна преживяемост
- Динамика в нивата на ЦРК

- **качествен анализ** на експресията на специфичните за рак на гърдата туморни маркери GA733-2, Muc-1 и Her-2, както и на  $\beta$ -actin като вътрешна контрола посредством AdnaTest Kit (AdnaGen, Langenhagen, Germany), базиран на обогатяване на клетъчната субстанция чрез имуномагнитна сепарация и оценка на нивата на експресия на три специфични за карциноми на гърдата туморни маркери GA733-2, Muc-1 и Her-2.  
- **количествен анализ** на четири подбрани експресионни маркери hMAM, CK-19, CD44, CD24 с помощта полимеразна верижна реакция в реално време.

Оценката на нивата на ЦТК се извършвана в три точно дефинирани точки (Таблица 28) при: 1) диагностициране на метастазирало заболяване, преди започване на първа линия химиотерапия, 2) след провеждане на III курс химиотерапия, и 3) след провеждане на VI курс химиотерапия.

Успоредно с определянето на нивата на ЦТК, се извършва образна оценка на заболяването посредством КТ (компютърна томография) и определяне на туморен маркер (CA15-3). Поради факта, че курсовете са през 21-дневен интервал, оценката на нивата на ЦТК се извършва през 63 дни (9 седмици).

Отговорът на заболяването спрямо проведеното лечение се оценява по общоприетите критерии за оценка след трети и шести курс химиотерапия, заедно с определяне на нивото на ЦРК.

**Таблица 28. Схема на отправните точки**

Базисна (изходна) оценка	3 курса химиотерапия (I линия)	I контрола	3 курса химиотерапия (I линия)	II контрола	Проследяване (КТ, CA15-3 на всеки два месеца)
КТ		КТ (RECIST)		КТ (RECIST)	
ЦТК		ЦТК		ЦТК	
CA15-3		CA15-3		CA15-3	

#### 4.4.2. Преданалитична и аналитична обработка на биологичния материал

След подписване на информирано съгласие, от пациентите беше взета венозна кръв, от която впоследствие беше създадена копиДНК биобанка в Център по молекулярна медицина. Здравите жени също получиха информация за изследването и подписаха информирано съгласие. От тях еднократно бяха взети кръвни проби, които са обработени аналогично на пациентите за изолиране на ЦТК, респективно мРНК и синтез на копиДНК. Част от тази ДНК бе използвана като отрицателна контрола при експресионните анализи, а останалата бе съхранена в биобанката на Център по молекулярна медицина (ЦММ).

##### 4.4.2.1. Събиране на кръвни проби

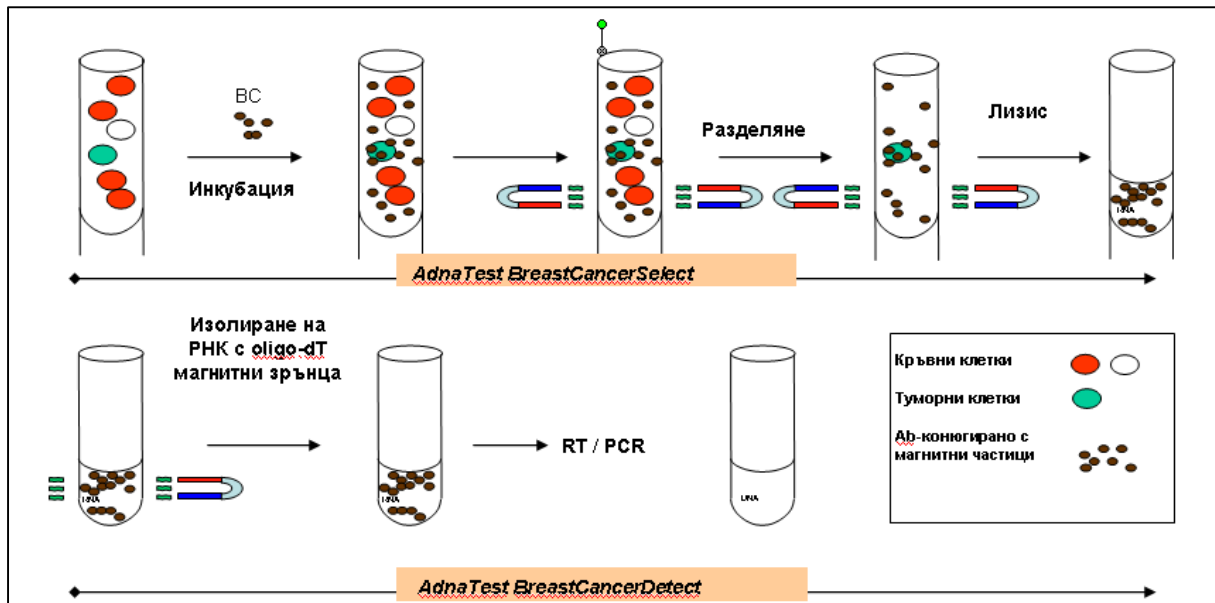
Венозната кръв от пациентките се събира в специални епруветки за кръв (Фиг. 17), които задължително се използват за анализ с готовия AdnaGen Test. Те съдържат ЕДТА и агент, възпрепятстващ нелегитимна иРНК експресия под формата на 150  $\mu$ l течност. След вземане на кръвта, в тези епруветки е нужно тя да се разбърка с агента поне 8-10 пъти и да бъде моментално съхранена в хладилник на 4-8  $^{\circ}$ C. Епруветките не трябва да се замразяват. Кръвта на пациентките трябва да се вземе преди прилагане на терапевтични медикаменти или минимум 5 дни след прилагането на такъв. Пробите следва да се обработят максимум до 24 часа от взимането на кръвта и не трябва да са хемолизирани.



**Фигура 17. Adna Collect епруветки**

##### 4.4.2.2. Изолиране и обогатяване на циркулиращи туморни клетки- AdnaTest BreastCancerSelect

AdnaTest BreastCancerSelect е разработен за изолиране и обогатяване на циркулиращи туморни клетки от периферната кръв на пациенти с рак на гърдата. Препоръчва се последващ експресионен анализ чрез AdnaTest BreastCancerDetect. Специфичността на анализа е 90%, изчислен спрямо откриването на 5 туморни клетки в 5 ml кръв и 70% за 2 клетки в 5 ml кръв. AdnaTest BreastCancerSelect осигурява имуномагнитно обогатяване посредством използването на епителни и тумор асоциирани антигени - GA733-2, Muc-1 и Her-2. Антитела, насочени срещу тези антигени, са конюгирани към магнитни частици - Dynabeads®, за да се изолират специфично туморните клетки. Така образувалите се комплекси се екстрахират посредством магнити - AdnaMag-L and AdnaMag-S и впоследствие се лизират. Клетъчният лизат се използва за последващ анализ с AdnaTest BreastCancerDetect (Фиг 18).



**Фигура 18. Процедура за изолиране на ЦТК с помощта AdnaTest. (1) Взема се проба от периферна кръв, от която се извлича обогатена субстанция ЦТК с помощта на магнитни частици, конюгирани с антитела, специфични срещу антигени от клетъчната им повърхност (AdnaTest BreastCancerSellect®). (2) Изолиране на мРНК с oligo(dT) магнитни зрънца и синтеза на кДНК чрез обратна транскрипция. (3) Мултиплексна полимеразна верижна реакция - експресионен анализ на асоциирани туморни маркери (AdnaTest BreastCancerDetect®).**

*Етапи на изолирането на циркулиращите туморни клетки:*

**А. Подготовка на магнитните частици**

Необходимо е пречистване на частиците от натриевия азид, в който са ресуспендирани.

Стъпка 1. Ресуспендират се внимателно магнитните частици с пипета, а не с вортекс;

Стъпка 2. Отпипетират се 100  $\mu$ л частици за 1 кръвна проба в 1.5 ml Eppendorf епруветка;

Стъпка 3. Поставя се 1.5 ml епруветката в магнита AdnaMag-S;

Стъпка 4. След 1 мин се отстранява супернатантата без да се докосват частиците;

Стъпка 5. Промиват се частиците с 1 ml 1X PBS буфер, като внимателно се извади 1.5 ml епруветката и се ресуспендират частиците в буфера; епруветката се връща отново в магнита за 1 мин., след което се отстранява супернатантата докато епруветката е все още на магнита. Повтаря се процедурата двукратно като се ресуспендират накрая пречистените частици в 100  $\mu$ l PBS буфер

**Б. Селектиране на туморните клетки**

Стъпка 1. Отпипетират се 5 ml венозна кръв от AdnaCollect епруветката и се прехвърля в 15 ml надписана епруветка ;

Стъпка 2. Ресуспендират се промитите вече магнитни частици и се добавят към кръвта;

Стъпка 3. Слагат се така приготвените 15 ml епруветки на ротатор на ниски обороти на стайна температура за 30 минути;

Стъпка 4. Поставят се епруветките на магнита AdnaMag-L, без да е сложена магнитната поставка и внимателно се обръщат трикратно епруветките, за да се стече евентуална кръв от капачката в епруветката;

Стъпка 5. Слага се магнитната поставка и се инкубира за 3 мин на стайна температура;

Стъпка 6. Междувременно се еквилибрира Лизи/свързващия буфер от кита на стайна температура

. Проверява се за преципитати и ако се забележат такива, буфера се затовпя до изчезването им;

Стъпка 7. Отстранява се кръвната супернатанта с 10 ml серологична пипета

Стъпка 8. Промиват се уловените туморни клетки в комплекс с частиците като се отстрани магнита и се добавят 5 ml PBS буфер към 15 ml епруветка, хубаво се разклащат пробите, след това отново се поставят за 1 мин на магнита и се отстранява супернатантата. Процедурата по промиването се повтаря трикратно;

Стъпка 9. Маха се магнита и се добавя добавете 1 ml PBS буфер;

Стъпка 10. Прехвърлят се добре ресуспендираните и промити вече ЦТК-частици комплекси в 1.5 ml Eppendorf епруветка;

Стъпка 11. Поставя се епруветката в магнита AdnaMag-S;

Стъпка 12. Инкубира се на магнита за 1 мин и напълно се отстранява супернатантата, за последващо лизиране на клетките;

Стъпка 13. Маха се епруветката от магнита;

Стъпка 14. Добавят се 200µl Lysis/Binding Buffer 2, еквилибриран на стайна температура и се ресуспендират частиците петкратно;

Стъпка 15. Поставя се епруветката в магнита за 1 мин;

Стъпка 16. Прехвърля се така приготвения лизат (супернатантата) в нова епруветка;

Стъпка 17. Изхвърля се епруветката с частиците;

Стъпка 18. Лизатите могат да се използват за изолиране на иРНК от туморните клетки с AdnaTest BreastCancerDetect веднага или да се съхраняват на -20 °C за не повече от 2 седмици.

#### 4.4.3 Аналитична обработка на биологичния материал

##### 4.4.3.1. Изолиране на иРНК и качествен анализ- AdnaTest BreastCancerDetect

AdnaTest BreastCancerDetect съдържа Oligo (dT)25-лигирани магнитни частици за изолирането на иРНК от лизата, приготвен както е описано по-горе. Така изолираната иРНК се преобразува в копиДНК и се анализира качествено с мултиплексен PCR. Праймерите в кита позволяват амплифициране на няколко тумор сепцифични маркера за качествен анализ за наличие на туморни клетки. Фрагментите са със следната дължина:

GA733-2:	395 бд
Muc-1:	299 бд
Her-2:	265 бд
Actin:	120 бд (като вътрешна контрола)

#### А. Подготовка на Dynabeads Oligo(dT)<sub>25</sub>

Стъпка 1. Еквилибрира се Lysis/Binding Buffer на стайна температура;

Стъпка 2. Проверява се за налични преципитати и и се изчаква докато буфера се избистри;

Стъпка 3. Ресуспендират се Dynabeads Oligo(dT)<sub>25</sub> внимателно с пипета, без вортекс;

Стъпка 4. Добавят се 20 µl частици плюс 10% в 1.5 ml Eppendorf епруветка;

Стъпка 5. Поставя се епруветката на магнита AdnaMag-S за 1 мин

Стъпка 6. Отпипетира се супернатантата;

Стъпка 7. Промиване на частиците

Стъпка 7.1. Отстранява се магнита

Стъпка 7.2. Добавя се Lysis/Binding буфер в количество 1:1 с частиците-22 µl и хубаво се ресуспендира като се внимава да не се разпени сместа прекалено много

Стъпка 7.3. Поставя се магнита и след 1 мин се отстранява супернатантата напълно, като се направи двукратно промиване;

Стъпка 8. Отстранява се магнита и се ресуспендират частиците в 22 µl Lysis/Binding Buffer.

#### Б. Изолиране на иРНК

Еквилибрира се Washing Buffer A и Washing Buffer B на стайна температура;

Охлажда се 10 mM Tris-HCl буфера на лед ;

Затопля се RNase-чиста вода (част от кита Sensiscript Reverse Transcriptase-Kit, QIAGEN);

Настройва се термоблока на 50 °C.

Стъпка 1. Добавят се 20 µl от Dynabeads Oligo(dT)<sub>25</sub>, приготвени както е описано по-горе към епруветките с лизата.

Стъпка 2. Епруветките се поставят на ротатора и се въртят на бавни обороти в за 10 мин на стайна температура;

Стъпка 3. Поставят се епруветките в AdnaMag-S, без да се слага магнитния модул и внимателно се разклащат за да се стече цялото съдържимо от капачките;

Стъпка 4. Слага се магнита за 1 мин и се отстранява супернатантата;

Стъпка 5. Промива се утайката, като се добавят 100 µl промиващ буфер А, ресуспендира се и се поставя магнита за 1 мин. Отделя се супернатантата. Промива се двукратно.

Стъпка 6. Промива се като се добавят 100 µl промиващ буфер Б, ресуспендира се и се поставя магнита за 1 мин. Отстранява се супернатантата. Частиците се промиват се двукратно като предварително се прехвърлят в нова 1.5 епруветка;

Стъпка 7. Отстраняват се епруветките от магнита и се добавят 100 µl леден 10 mM Tris-HCl и се ресуспендират частиците. Епруветките се поставят обратно в магнита за 1 мин, като след това се отстранява супернатантата напълно и частиците се ресуспендират в 29.5 µl RNase-чиста вода

Стъпка 8. Загриват се епруветките в термоблока за 5 мин на 50 °C.

Стъпка 9. Поставят се епруветките веднага на лед и се охлаждат за минимум 2 минути.

Стъпка 10. Веднага се пристъпва към реакцията на обратна транскрипция за синтезиране на копиДНК.

В. Обратна транскрипция със Sensiscript **Reverse Transcriptase Kit, QIAGEN**. Размразява се 10 x Buffer RT и dNTPs на стайна температура, вортексира се, центрофугра се и се поставя на лед.

Стъпка 1. „Мастър миксът“ се приготвя на лед с описаните в Таблица 29 реактиви в обем с 10% излишък. Задължително се приготвя отрицателна контрола без иРНК в нея.

Стъпка 2. Вортексира се микса, центрофугира се и се отпипетират 10.5 µl в 0.2 PCR епруетка.

Стъпка 3. Ресуспендирайте се приготвените в предходната стъпка иРНК-частици комплекс и се прехвърля целия обем към 0.2 ml епруетките с “мастър микса”.

**Таблица 29: Компоненти за реакция на обратна транскрипция**

Реактив			Обем
<b>RT „Мастър Микс“</b>	<i>Sensiscript Reverse Transcriptase Kit (QIAGEN)</i>	10x Буфер RT	4.0 µl
		dNTPs	4.0 µl
		<i>Sensiscript Reverse Transcriptase (SRT)</i>	2.0 µl
	RNase Инхибитор, 40 U/µl (Promega)		0.5 µl
<b>Проба</b>	иРНК/частици комплекс или вода за отрицателната контрола		29.5 µl
<b>Краен обем</b>			40.0 µl

Стъпка 4. копиДНК се синтезира в PCR апарат при следните условия показани на Таблица 30:

**Таблица 30. RT-PCR програма**

37 °C	60 мин
93 °C	5 мин
4 °C	∞

Стъпка 5. Охлаждат се 0.2 ml епруетките с копиДНК на лед и се продължава с мултиплексната полимеразна верижна реакция или могат да бъдат съхранени за не повече от 4 седмици на -20 °C.

### Г. Мултиплексен PCR

Размразяват се *HotStarTaq Master Mix* (QIAGEN), *положителната контрола от кита* (C+), праймерите от кита *PrimerMix BreastDetect* и RNase-чиста вода, вортексирате се, центрофугират се и се поставят на лед.

Стъпка 1. „Мастър миксът“ се приготвя на лед при условията, посочени в Таблица 31.

Добавят се по 10% от всеки компонент за грешка на пипетата и винаги се приготвят както положителна (C+), така и отрицателна контрола (C-).

Стъпка 2. За всяка реакция се добавя 42.0 µl „мастър микс“ в 0.2 ml PCR епруветка. Ресуспендира се микса с копиДНК-частици и добавят по 0.8 µl от него. Като отрицателна контрола се използва 8.0 µl RNase-чиста вода вместо копиДНК.

**Таблица 31. Подготовка на мултиплексния PCR**

Реагент		Обем
<b>PCR „Мастър Микс“</b>	HotStarTaq „Мастър микс“	25.0 µl
	RNase-чиста вода	13.0 µl
	<i>Смес праймери BreastDetect</i>	4.0 µl
<b>Проби</b>	копиДНК контролата, приготвена при преходната стъпка Отрицателна контрола за копиДНК реакцията С- Положителна контрола от кита С+	8.0 µl
<b>Краен обем</b>		50.0 µl

Стъпка 3. копиДНК се синтезира в PCR апарат при следните условия, посочени в Таблица 32:

**Таблица 32. PCR програма за обратна транскрипция**

5 °C	15 min	35 cycles
94 °C	30 sec	
60 °C	30 sec	
72 °C	60 sec	
72 °C	10 min	
4 °C	∞	

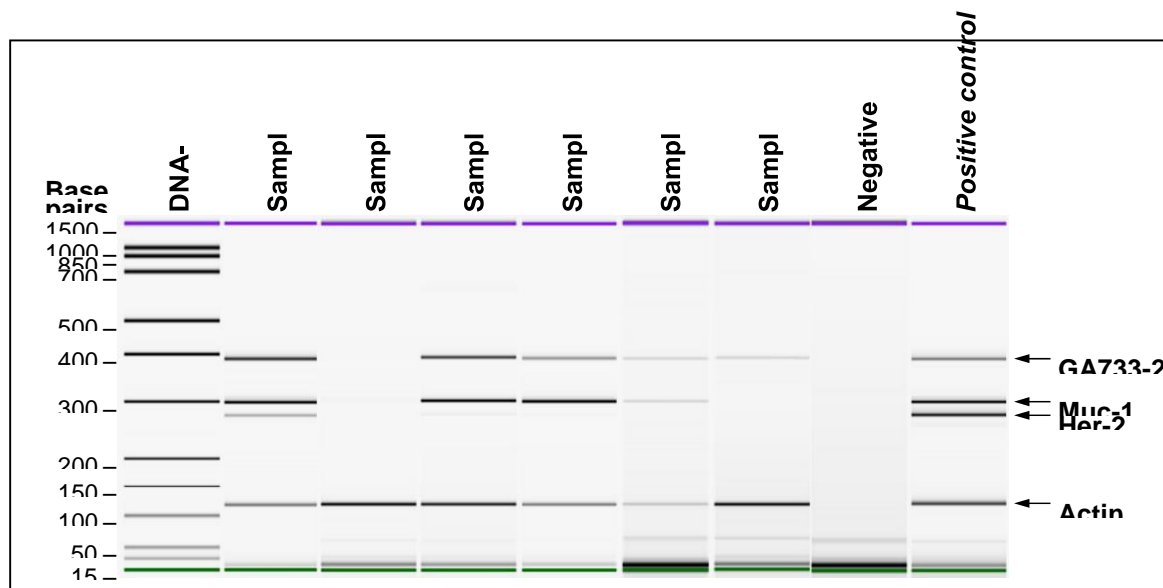
#### Д. Анализ на резултатите

- Agilent 2100 Bioanalyzer – чип базирана технология за прецизна електрофореза (Фиг. 19)



**Фигура 19. Agilent 2100 Bioanalyzer**

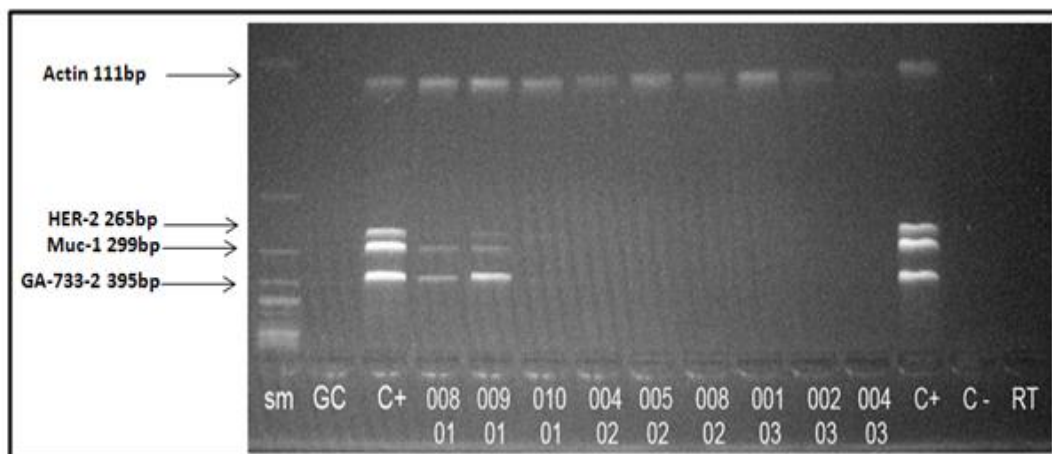
Резултатите се смятат за положителни ако даден PCR фрагмент от поне един от тумор-асоциираните маркери е позитивен с пик над  $\geq 0.15$  ng/ $\mu$ l (Фиг. 20). Заложената вътрешна контрола Актин трябва да е налична при всички изследвани проби. Той показва успешно изолиране на клетките, обратна транскрипция и мултиплексен PCR. Положителните и отрицателни контроли трябва да не показват фрагменти, по-големи от 80 базови двойки (праймерни димери). Фрагменти по-големи от 1 килобаза показват замърсяване с геномна ДНК и неуспех на изолирането.



**Фигура 20. Резултати от електрофореза с Agilent 2100 Bioanalyzer. Първата колонка показва маркера за размерите; Проба №1 е положителна за GA733-2, Muc-1 and Her-2; Проба №2 е отрицателна; Проба №3, 4 и 5 са позитивни за GA733-2 и Muc-1; Проба №6 е позитивна само за GA733-2. Актин се вижда при всички проби. Контролите са показани на последните 2 колонки.**

- 4% агарозна електрофореза

Резултатите могат да се анализират и посредством 4% агарозна електрофореза. Пример е показан на фигура 21.



**Фигура 21.** Агарозна електрофореза на 9 пациентки с метастатичен рак на гърдата. Първата колонка е маркера за размер; втората съдържа калибратор на гела (който трябва да показва никакви или много слаби фрагменти, които да дадат насока за позитивните резултати на истинските проби); Проба № 8-1 е позитивна за Muc-1 и GA-733-2; Проба № 9-1 е позитивна и по трите маркера; останалите проби са отрицателни; Последните три колонки показват контролите. Актин се открива при всички проби.

4.4.3.2. Количествен анализ на експресията на молекулните маркери hMAM, СК-19, CD44 и CD24 в периферна кръв посредством Real Time RT-PCR

Конвенционалната полимеразна верижна реакция (PCR) се състои в амплифицирането на специфичен участък ДНК в *in vitro* условия. Това се осъществява чрез олигонуклеотидни фрагменти (праймери), които на база комплементарност обграждат интересувашата ни последователност от ДНК и чрез термостабилна полимераза я размножават чрез циклични повторения на три основни стъпки - денатурация на двойната спирала, хибридация на праймерите и синтез. При PCR в реално време (Real Time PCR) резултатите се отчитат чрез флуоресцентни сигнали. Различните разновидности на тази методика позволяват отчитането на сигнал под формата на флуоресцентна крива след всеки цикъл на реакцията. Чрез детайлното следене на реакцията и подробен анализ на резултатите се прави количествен анализ на експесионните проби. Съществуват редица флуорофори, които могат да интеркалират между базите на ДНК молекулата. Благодарение на планарната си структура се свързват с нея и излъчват флуоресцентен сигнал. При всяка амплификация в реално време се генерира сигнал, който след определен брой цикли се отчита като покачване на общия сигнал. В зависимост от началното количество на специфичната последователност за размножаване, цикълът, при който флуоресцентната крива пресича линията на позитивиране (threshold line) е различен. На базата на това се изчислява Ct стойност, чрез която се извършва качествен (напр. отчита се само наличие на точката на пресичане) и количествен анализ (напр. определяне на нивото на експресия спрямо вътрешна контрола за даден молекулен маркер), т.нар. RT-qPCR.

Бяха използвани готови праймери за амплификация на – QuantiTect Primer Assay (Qiagen) съответно за следните гени- hMAM, СК-19, CD44, CD24 като вътрешна контрола на реакцията беше избран гена АСТВ, в съчетание с QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen). Генно-експресионният анализ беше направен на всяка здрава контрола и на всяка от 43те проби на пациентките при 1) базисно ниво на диагностициране на метастазирало заболяване, преди започване на химиотерапия, 2) след провеждане на III курс химиотерапия и 3) след провеждане на VI курс химиотерапия. Отделните кръвни проби, които са взети от пациентките в трите дефинирани точки са кодирани (напр. СТС001\_01, СТС001\_02 и СТС001\_03 съответно за базисно ниво, след III и след VI курс химиотерапия). Липсата на проби от някои от пациентките се обяснява с това, че са починали в хода на лечение или по време на проследяването им и не могат да бъдат взети проби след базисното или след трети курс терапия, а други все още не са преминали съответния курс и проба не е налична в биобанката на ЦММ.

Количественият анализ на генната експресия на подбрения панел от маркери се състои от няколко етапа:

- Подготовка на реактивите за работа чрез разтваряне на праймерите за съответните гени в предварително подготвен ТЕ буфер с рН = 7,4 за достигане а желаната концентрация;

- Оптимизиране на условията и извършване на RT-qPCR за анализ на генна експресия. Тъй като за изолиране на ЦТК и съответно копиДНК от тоталната тяхна РНК, беше използван кита на AdnaGen, се наложи оптимизиране на условията на реакцията спрямо количеството изходен материал (копиДНК). Като контрола в оптимизацията беше избрана пробата СТС\_009\_01, която показва при нововъведения в ЦММ качествен анализ позитивен резултат и за трите тумор-асоциирани маркера GA733-2, Muc-1 и Her-2. Тази пациентка е починала в хода на терапията и заедно тези показатели предвещават голямо количество ЦТК, които ефективно да се използват в оптимизацията на условията. Генно-експресионният анализ беше проведен на серийни разрези от пробата (10, 25, 50 и 100 нг/μl). Поради изключително малката концентрация на ЦТК, беше избрана концентрация от 50 ng/μl. Експериментът беше повторен. Първоначално СТС\_009\_01 показва наличие на експресия на CD24, hMAM, и СК19, както и на ендогенната контрола АСТВ, но при второ повторение, заедно с други 8 проби (също избрани да са позитивни по качествения анализ), при избраната концентрация, резултатите бяха различни. Въпреки това CD24 беше маркерът с най-висока честота на срещане сред пробите и беше избран за последващата оптимизация. Всички проби са анализирани на 384 ямкови плаки, в трикратни повторения и в съчетание с отрицателни контроли - вода. В следствие работната концентрация беше избрана да бъде 250 ng /μl, за да се гарантира минимум 2 от трите повторения да са позитивни за маркера за достоверност на резултатите при тези ниски нива на ЦТК в кръвта.

- Приготвяне на real-time PCR миксът. Съставът и концентрацията на компонентите в реакциите, както при оптимизацията, така и при реалните експресионни анализи, е показан в Таблица 33.

**Таблица 33. Състав на real-time PCR „мастер микс“**

Компонент	Количество (µl) за една реакция
2X QuantiTect SYBR Green Reaction Mix	5
10X QuantiTect Primer Assay	1
250 нг/µl кДНК	1
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	3
<b>Общ обем на реакцията</b>	<b>10</b>

- Разкапване на 384 плаки, като за една проба се смесват 6µl RT Mix, 1µl cDNA и 3µl Nuclease-free H<sub>2</sub>O (общ обем на реакцията - 10µl). Изследват се 4 гена – hMAM, СК-19, CD44, CD24 и, един ген ендогенна контрола – АСТВ, като за всеки ген в серията има и по няколко (2) негативни контроли, при които вместо кДНК се налива RNase-free вода.

- Извършване на PCR в реално време с 7900HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems) според следната програма (Таблица 34):

**Таблица 34. Програма за протичане на real-time PCR**

Стъпки	Активиране на полимеразата	PCR		
		40 цикъла		
		Денатурация	Хибридизация	Синтез
Температура	95°C	94°C	55°C	72 °C
Време (мин)	15:00	0:15	0:30	0:50
Обем (µl)	10			

## 4.5 Биоинформатичен анализ на получените резултати

4.5.1. Биоинформатичен анализ на резултатите, получени от директното секвениране. При анализа на получените резултати бяха използвани следните софтуерни програми:

*FinchTV*. FinchTV е лесен за използване инструмент за първична обработка и анализ на малък обем ДНК секвенции. Той се използва за прочитане на файлове с хроматограми с едни от най-често използваните формати, като например ABI, SCF или FASTA. FinchTV е най-популярният софтуер за анализ на ДНК последователности,

съвместим за Linux, Mac OSX, Windows и Solaris операционни системи ([www.en.biosoft.net](http://www.en.biosoft.net), L44; [www.cambridgesoft.com](http://www.cambridgesoft.com), L45). Програмата позволява да се направи анализ на суровите данни за оценка на качеството на получените секвенции, да се направи BLAST за съвпадения на получения резултат с референтната за съответния ген последователност ([en.bio-soft.net](http://en.bio-soft.net), L44).

*SeqScape, CodonCode Aligner и Sequncing Analysis.* SeqScape® софтуер е разработен от Life Technologies ([www.codoncode.com](http://www.codoncode.com), L46), докато CodonCode Aligner е софтуер, разработен от Codon Code Corporation. И двата софтуерни продукта са подходящи за обработка на голям обем ДНК секвенции. Програмите позволяват да бъде направен анализ за различни по тип мутации и са удобни за откриване на хетерозиготни единични нуклеотидни полиморфизми и хетерозиготни делеции или инсерции, сравнени спрямо референтна секвенция. SeqScape е съвместим за повече от операционните системи, подържани от Microsoft Corporation, като например Windows NT, 2000, XP и Windows 7, докато CodonCode Aligner е съвместим и с операционни системи на Mac OS x version 10.3. Sequncing Analysis е друга софтуерна програма за анализ на ДНК секвенции.

#### 4.5.2. Биоинформатичен анализ на резултатите, получени от секвенирането от ново поколение с Ion Torrent PGM

##### 4.5.2.1 NextGene

При анализа на резултатите беше използвана основно NextGene софтуерна програма за обработка на голям обем данни, получени при големия брой прочити на изследваните гени. NextGene е програма за анализ на резултати, генерирани от платформи за секвениране от второ поколение, като Ion Torrent PGM™, Roche Junior, Illumina MiSeq, както и от системи с много висока възпроизводителна способност, като например Ion Torrent Proton, Roche FLX, SOLiD™. NextGENe е удобен за употреба и не изисква специализирана биоинформатична обработка на резултатите. Позволява да бъде направен анализ за измествания в рамката на четене, SNP, CNV анализ (анализ на броя на копията), както и анализи на транскриптома, за алтернативен сплайсинг, SAGE (Serial Analysis of Gene Expression), DGE (Digital Gene Expression) и други. За работа с NextGENe програмата се изисква 32 или 64 bit-ва операционна система на Windows версии: XP, Vista, 7 или 8 и процесор Pentium III, 1GHz, 128 MB PCU и поне 20GB свободно пространство на твърдия диск. Втората операционна система, с която програмата е съвместима е Macintosh, v 10.4.6, RAM 2GB и поне 20GB свободно пространство на твърдия диск ([www.softgenetics.com](http://www.softgenetics.com), L47).

##### 4.5.2.2 Контрол на качеството (QC) и alignment (картиране на данните върху геномната последователност)

Суровите данни бяха подложени на две отделни проверки за качество: вградените алгоритми за QC на Torrent Suite софтуера (Life Technologies) и два самостоятелни алгоритъма за QC, част от софтуерния пакет NextGENe (SoftGenetics). Контролът на качеството на Torrent Suite включва филтриране по общо качество на прочитите и корекция на хомополимерните региони. С NextGENe прочитите бяха филтрирани за качество по статистиката, генерирана от софтуера, както и по брой дефинирани бази и индивидуалното качество на всяка база. По един цикъл на „консолидация“ или

„поправка“ (два алгоритъма за корекция, имплементирани в NextGENe) беше приложен върху филтрираните прочити преди картирането.

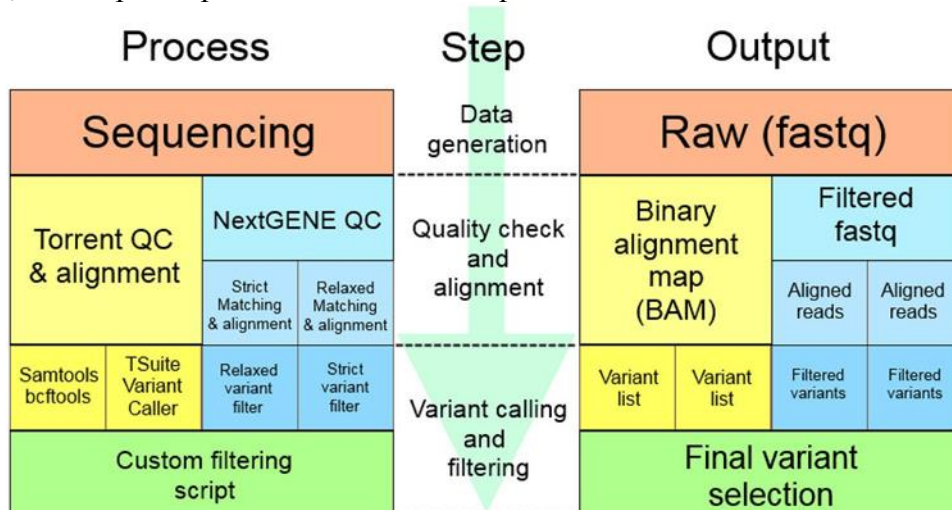
Процесът на „консолидация“ включва получаването на консенсусна последователност, която се използва по време на картирането вместо оригиналните прочити. „Поправка“-та премахва потенциалните грешки без да генерира консенсусна последователност. Настройките за двата алгоритъма бяха направени според входните данни (брой и дължина на прочитите) с автоматичната функция за оценка на NextGENe.

Картирането беше извършено върху референтната геномна последователност на двата гена: вариант GRCh37.p5; BRCA1: NT\_010783, регион: 41196312-41277500; BRCA2: NT\_024524 регион: 32889617-32973809. За картиране с Torrent Suite беше приложена включената в пакета програма. При картирането с NextGENe бяха приложени две различни комбинации за минимален брой нуклеотиди и дължина на съвпадащата последователност: стриктна, с 30 съвпадащи бази и съвпадение на поне 80% от дължината на прочита, в комбинация с алгоритъма за „консолидация“; и свободна, с 25 бази и 75% съвпадение по дължината на прочита в комбинация с алгоритъма за „поправка“.

За анализа бяха създадени BED-файлове с позициите на ампликоните, използвани за подготовка на библиотеките, с цел филтриране на таргетните региони (regions of interest, ROI).

#### 4.5.2.3. Определяне на генетични варианти

Еднонуклеотидните варианти (SNV) бяха ограничени в ROI и определени с три различни софтуерни пакета: NextGENe v2.3.1, Torrent variantCaller v3.4.49252, и Windows базирана версия на Samtools/BCFtools (v0.1.18/v0.1.17, [21]). Последователността на анализа е показана на фигура 22. За резултатите от стриктното картиране бяха приложени по-ниски граници за детекция на SNV - 8% минимална честота в прочитите на алтернативния алел, поне 3 прочита (покрытие от 3x) и без ограничения за баланс на прочитите в двете посоки. Резултатите от свободното картиране бяха анализирани с по-строги критерии - поне 15% алтернативни алели, 5x покритие, стандартни граници за баланс на прочитите.



Фигура 22. Последователност на извършения анализ.

За анализа с Torrent Suite бяха използвани стандартните минимални граници за качество на картирането и определяне на нуклеотидите. Изискванията за минималното

покрытие бяха ниски, за да се получат максимално количество варианти. По-строги изисквания бяха приложени за инсерциите и делециите, като бяха заложили граници за минимално покритие поотделно за правите и обратни прочити, и по-нисък праг за възможен дисбаланс на двете посоки (в случая - максимална стойност на съотношението F/R от 0.8).

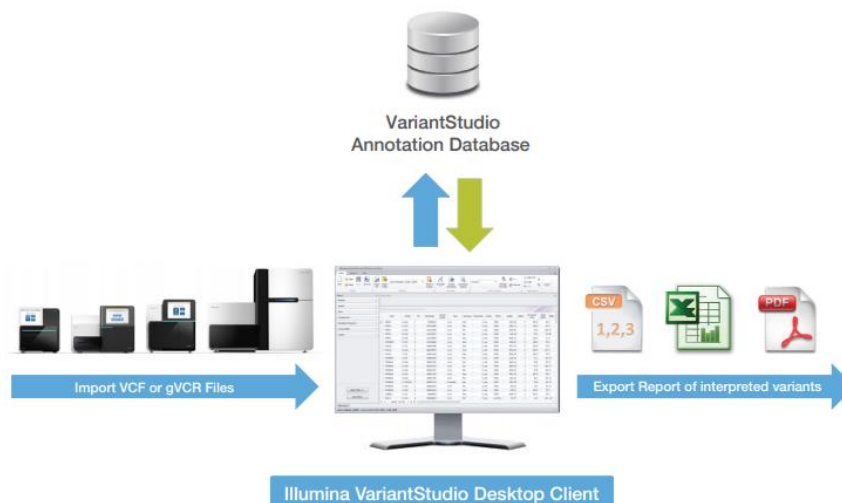
Геномната референция беше индексирани и BAM-файловете бяха сортирани за анализа със Samtools. Вариантите бяха определени с VCFtools, а резултатите бяха форматиращи и филтрирани с написан за целта скрипт. За всяка позиция бяха докладвани вариантите с най-висока честота на алтернативните прочити след като бяха премахнати евентуалните разминавания на позициите с геномната референтна последователност.

#### 4.5.2.4. Подбор и анотация на вариантите

Изборът на крайните варианти беше извършен от пълния списък варианти получени от трите анализа. Двата списъка от NextGENe (със строги и свободни критерии) бяха обединени преди сравнението с другите списъци. Списъците от Torrent Suite и Samtools/VCFtools също бяха обединени предварително. Бяха докладвани само варианти, присъстващи и в двата списъка. Беше разработен скрипт за оценка на инсерции и делеции в хомополимерни или повтарящи се региони с потенциални различия в позициите в двата списъка, поради разлики в алгоритмите за картиране. Варианти в региони с покритие под определен праг бяха филтрирани с цел да се определи как влияе покритието на броя на фалшиво позитивните и фалшиво негативните резултати. Бяха използвани прагове на 3x (минималното покритие за вариант, задоволяващ проверката за баланс на прочитите в двете посоки) и 30x (минималното покритие, при което всички реални варианти бяха регистрирани в тренировъчната група). Крайният списък беше анотиран с информация за съществуващи варианти на същите позиции в dbSNP. Промени във функционалността на белтъчните продукти бяха оценени с програмите PolyPhen [22] и Provean [23]. Вариантите бяха визуализирани с програмите NextGENe Viewer и Tablet [24]. Пълен списък на филтрираните и премахнати варианти поради ниско покритие в ръновете са показани в **приложение 3**.

#### 4.5.3. Биоинформатичен анализ на резултатите, получени от секвенирането от ново поколение с MiSeq

След приключване на анализа се прави оценка на качеството. Първоначално се проверя за всяка една проба процента прочити, които са идентифицирани, проверяват се ампликоните, които нямат покритие или са с лошо такова. Разглеждането на откритите варианти се осъществява с помощта на програмата Illumina VariantStudio Data Analysis Software. Екстрахирането на фенотипно достоверна информация от данни с геномни варианти винаги е предисвикателство за генетичния анализ. Анотирането на варианти и процесът на филтриране са критични за адекватното представяне на данни за даден биологичен процес. Тези процеси осигуряват функционална информация необходима за идентифицирането на вариантите, които ни интересуват, за определянето на биологичния им ефект, идентифицирането на потенциални корелации на генотип с фенотип. Illumina VariantStudio software осигурява бързо анотиране на вариантите, интуитивно филтриране на данните и адекватно класифициране и показване на функционалност на вариантите, за да улесни анализа на данните и интерпретацията им. Това позволява на изследователя да открие патогенните варианти (Фиг. 23).



**Фигура 23. Алгоритъм на Illumina VariantStudio software**

Агрегирайки информация от няколко източника в една единствена поддържаща се база данни, този софтуер елиминира нуждата от ръчно обединяване на информацията с вариантите, което ускорява и улеснява процеса на анализ на данните. Работи в посока аотирането на ниво варианти, гени и транскрипция. Variant Effect Predictor (VEP) е централен ресурс за аотирането на транскрипти като използва като източници NCBI Reference Sequence Database (RefSeq) и алгоритми като Polymorphism Phenotyping (PolyPhen) и SIFT. Информацията за асоциация с известно заболяване на дадения вариант получава от следните бази данни Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC), ClinVar и Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), чрез ClinVar база данни. Ресурси като dbSNP, Ensembl, 1,000 Genomes Project и Exome Variant Server предоставят информация за наличието и честотите на дадените варианти в популацията.

Таргетното екзомно и целогеномно секвениране детектират огромно количество данни за варианти, които е необходимо щателно да бъдат филтрирани, така че да разполагаме само с интересуващите ни варианти, свързани с даден фенотип. Използвайки каскада от опции за филтриране можем бързо да изолираме вариантите, които ни интересуват - по качество на секвенирания вариант, честота, функционално влияние, известна асоциация с дадено заболяване. Софтуерът генерира данните, които са минали предварителен филтър в инструмента за качеството на секвениране и съветните варианти се определят като PASS. Вариантите, които не преминават филтъра за качество на секвенирането и не се дефинират като "PASS" при анализа за герминативни мутации с панела TruSight Cancer за 94 тумор-асоциирани гена се определят като едно от следните:

- LowVariantFreq - честота < 5%
- LowGQ - качество на генотипиране < 30 (което е шанс за false positive > 0.001)
- R8 - за indel броят на съседните повтори (повторения на индела) е > 8
- LowDP - дълбочина (total coverage) < 20
- SB - дисбаланс в прочитите в едната и другата посока

а при анализа на соматичните мутации с панела TruSeq Amplicon Cancer Panel са:

- LowVariantFreq - честота < 1%

- LowGQ - качество на генотипиране < 30 (което е шанс за false positive > 0.001)
- R8 - за indel броят на съседните повтори (повторения на индела) е > 8
- LowDP - дълбочина (total coverage) < 20
- SB - дисбаланс в прочитите в едната и другата посока

## 4.6. Статистически анализ на получените резултати

### 4.6.1 Обработка на резултатите от генната експресия чрез Real Time qPCR.

Количественият анализ се състои в измерване на количеството на определена нуклеинова киселина по време на циклите на амплификация. Това се осъществява с помощта на софтуерът SDS v.2.2.2 предназначена за използване с 7900HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems). Софтуерът използва  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  метод за относителната оценка на експресията. За всеки изследван ген изчислява:

$$\Delta Ct = Ct(\text{ген}) - Ct(\text{ендогенната контрола}),$$

Стойността за Ct (енд.к.) се определя от софтуерът за генът АСТВ, който е подходяща ендогенна контрола, тъй като показва минимални вариации между отделните проби. Това се прилага с цел по-точна количествена оценка на информационната РНК като така се компенсират разлики в тоталната РНК, добавена към реакцията.

Методът дава възможност за сравнение на няколко групи проби – в случая проби на пациентите с пул от контроли (пременопаузални и постменопаузални здрави жени без анамнеза за заболяването). За всяка група се изчислява:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{експ.гр.}) - \Delta Ct(\text{контр.гр.})$$

Накрая за всеки ген се калкулира колко пъти е променена експресията (fold change или Relative Quantification-RQ) на експерименталната в сравнение с контролната група. Прилага се формулата:

$$\text{fold change} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Ако последната стойност е >2,000 тя се представя като положителна промяна в експресията (повишение, fold upregulation) на съответния ген. Ако е <0,500 промяната е с отрицателна стойност (понижение в експресията, fold downregulation) и се изчислява по формулата  $-1/2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

Статистическият анализ на данните бе осъществен посредством готов статистически програмен пакет SPSS v17.0 (Windows). За сравнение на разпределението на дискретните клинични и биологични характеристики на изследваните подгрупи болни беше използван Fisher's exact test. Общата преживяемост (ОП) беше изчислена от датата на поставяне на диагнозата до датата на настъпване на смъртта. Продължителността на ОП беше анализирана посредством метода на Kaplan-Meier, като различията между отделните групи пациенти статистически бяха оценени чрез log-rank теста. За ниво на статистическа значимост бе приета стойност на  $p < 0.05$ .

### 4.6.2. Нулева хипотеза ( $H_0$ )

Нулевата хипотеза се използва при сравняване на групи данни. Приема се, че според нея не съществува статистически значима разлика между сравняваните групи. Получените експериментални резултати се обясняват с действието на случайни фактори.

Алтернативната (или още експериментална) хипотеза ( $H_1$ ) е противоположна на нулевата хипотеза. Не се уточнява какъв е типът на зависимостта – т.е. дали присъствието на даден алел/генотип повишава или понижава риска за развитие на заболяването.

Първоначално трябва да се определи нивото на значимост –  $\alpha$  (т.нар. Significance Level), което представлява вероятността (риска) да отхвърлим  $H_0$  хипотезата, дори ако тя е вярна. Най-често използваното ниво на значимост е  $\alpha=0.05$  или 5% вероятност нулевата хипотеза да се отхвърли, когато всъщност е вярна. След това се изчислява и вероятността ( $P$ ) за получаване на наблюдаваните данни (или на данни с още по-голяма разлика между двете групи) при положение, че нулевата хипотеза е вярна и двете групи всъщност не се различават.

- При  $P > \alpha$   $H_0$  не се отхвърля, което означава, че между сравняваните групи не съществува доказуема (в случая) статистически значима разлика.
- При  $P < \alpha$   $H_0$  се отхвърля, което означава, че между сравняваните групи съществува статистически значима разлика.

Нулевата хипотеза може да бъде проверена с различни статистически методи -  $\chi^2$ , Ман-Уитни U тест, анализа на Крускал-Уолис и др.

#### 4.6.3. Метод $\chi^2$

Методът  $\chi^2$  се използва за сравняване на получените опитни данни с очакваните данни, произлизащи от някой естествен закон или с предварително приета хипотеза. Статистическият критерий  $\chi^2$  за всяка конкретна проверка има една емпирична ( $\chi^2_{EM}$ ) и една теоретична ( $\chi^2_T$ ) стойност. Въз основа на съотношението между тях се приема или отхвърля  $H_0$ . Сравнението се извършва между разпределения в матричен вид по колони и редове изследвани индивиди или обекти, според принадлежността им към една от разглежданите групи и наличието или отсъствието на разглежданите фактори/състояния.

##### Определяне на теоретичната стойност на критерия $\chi^2$ ( $\chi^2_T$ )

Теоретичната стойност се определя чрез готови таблици (или с компютърни програми), като се има предвид нивото на значимост ( $\alpha$ ) и броя на степените на свобода (degrees of freedom, df). Стойностите на  $\chi^2$  зависят от величините степен на свобода и ниво на значимост, които са били възприети при провеждането на експеримента. Степента на свобода (degree of freedom) се изчислява по формулата:

$df = (n-1)$ , където  $n$  е броят на сравняваните класове. При разглеждане на матрица с определен брой редове и колони броят на степените на свобода се изчислява по следната формула:

, където:

$$df = (r-1)(c-1) \quad \begin{array}{l} r - \text{брой на редовете в таблицата (най-често } r = 2); \\ c - \text{брой на колоните в таблицата (най-често } c = 2). \end{array}$$

След това е необходимо да се изчисли теоретично очакваният брой на индивидите във всяка отделна клетка ( $E$ , от англ. expected). Това става с помощта на формулата:

$$E_{\text{cell}} = \frac{R \times C}{N} \quad \begin{array}{l} E_{\text{cell}} - \text{теоретично очакван брой на индивидите в дадена клетка;} \\ R - \text{общ брой на индивидите в реда, в който се намира} \\ \text{клетката;} \\ C - \text{общ брой на индивидите в колоната, в която се намира} \\ \text{клетката;} \end{array}$$

клетката;

$N$  – общ брой на изследваните индивиди.

Изчисляване на емпиричната стойност на  $\chi^2$

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

, където  $n$ : брой сравнявани класове (клетки в матрицата)  
 $O_i$ : опитни (наблюдавани) стойности на клас  $i$   
 $E_i$ : очаквани стойности на клас  $i$

Изваждането на 0.5 от абсолютната разлика между наблюдавания и очаквания брой обекти се нарича корекция на Йейтс (Yates) и се прилага, когато наблюдаваният брой обекти в някой от класовете (клетките) е по-малък от 10.

При приемане верността на нулевата хипотеза по метода  $\chi^2$ , съществуват таблици, които дават взаимовръзката между граничните стойности на  $\chi^2$  и стойностите на вероятността  $P$ , при различни степени на свобода и нива на значимост. Когато емпиричната стойност на  $\chi^2$  е по-голяма от граничната при съответните стойности на ниво на значимост ( $\alpha$ ) и степени на свобода ( $df$ ), първоначалната нулева хипотеза се отхвърля като невярна.

Решението за приемане или отхвърляне на  $H_0$  може да се вземе и въз основа съотношението между теоретичното предварително възприето ниво на значимост ( $\alpha_T = 0.05$ ) и оцененото (по емпиричните данни) ниво на значимост  $\alpha_{EM}$ . Всъщност  $\alpha_{EM}$  е вероятността за появяването на  $\chi^2_{EM}$  и може да се означае с  $p$ .

При  $\chi^2_{EM} > \chi^2_T$  (или респ.  $p < \alpha_T$ ).  $H_0$  се отхвърля в полза на  $H_1$ . Приема се, че между наличието на определен алел/генотип и развитието на РГ съществува зависимост (асоциация).

При  $\chi^2_{EM} < \chi^2_T$  (или респ.  $p > \alpha_T$ ).  $H_0$  не може да се отхвърли. Но това все още не означава, че тя е вярната хипотеза. В този случай интерпретацията е двузначна: или действително  $H_0$  е вярна и поради това не се отхвърля или  $H_1$  е вярната хипотеза, но това не може да се потвърди с конкретното проучване (например поради недостатъчния брой на наблюдаваните случаи).

Методът  $\chi^2$  се прилага, когато са спазени следните условия:

- обемът на извадката надвишава 50 индивида;
- експериментално установеният брой на индивидите във всяка клетка е не по-малък от 5.

#### 4.6.4. Анализ на преживяемостта

Данните за една популация често се обединяват под формата на жизнени таблици Life Tables с цел оценка на преживяемостта/смъртността на индивидите и оценка на риска. Жизнените таблици изследват разпределението на събития, свързани с определен период от време, зависещи от стойностите на независимата променлива. Често не могат да се наблюдават всички събития (начални или крайни) в даден период и такива данни се наричат цензурирани. Поради тази причина се използват жизнени таблици, а не обикновена множествена регресия. Основната идея на жизнените таблици е да подразделят периода на изследване на по-малки времеви периоди. За всеки по-малък интервал всички индивиди, които се наблюдават в този и потенциално в други интервали се използват за изчисление на вероятността на крайното събитие (напр. смърт), присъща за този интервал. Вероятностите за всеки един интервал се използват за оценка на общата вероятност на събитието в различни времеви отрязъци.

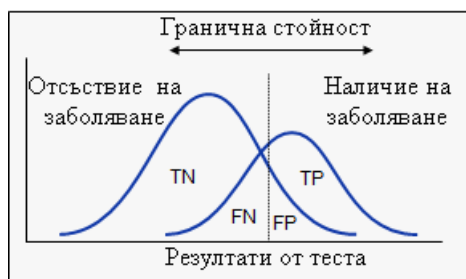
#### 4.6.5. Каплан- Майер (Kaplan- Mayer) криви на преживяемост

Непараметричният оценител на функцията за преживяемост, методът на Kaplan-Meier, е широко използван за оценка и графичното изображение на вероятностите за преживяемост като функция на времето. Този метод може да се използва, за да се получи дескриптивна статистика на един параметър (времето) за такъв тип данни, включително средното време на преживяемост, и за сравнение на данните за преживяемост при две или повече групи от индивиди. За тестване цялостните разлики между кривите на преживяемост на две или повече групи от обекти (например мъже срещу жени) съществуват няколко теста, един от най-често използваните от които е log-rank тестът.

#### 4.6.6. Анализ на ROC кривите за определяне на диагностична точност на изследваните биомаркери

Диагностичната точност на даден биомаркер или точността на даден тест да разграничава пациентите със заболяване от тези без заболяване се определя с помощта на анализа на ROC кривите (Receiver Operating Characteristic curve) [392, 393]. Анализът на ROC кривите може да бъде използван за сравнение на диагностичната точност на два или повече лабораторни или диагностични тестове [394].

С помощта на диагностичните тестове много рядко има абсолютно точно разделяне на групата пациенти със заболяването и групата пациенти (контроли) без заболяването. Това е представено на Фигура 24



**Фигура 24. Разделяне на групата пациенти със заболяването и групата пациенти (контроли) без заболяването**

За всяка възможна гранична стойност избрана за разграничаване на двете групи винаги ще има правилно класифицирани пациенти със заболяването, като това са истински позитивни резултати на теста (TP - True positive fraction), но някои пациенти със заболяването няма да са класифицирани правилно и това са фалшиво негативни резултати (FN - False Negative fraction). От друга страна някои пациенти без заболяването ще бъдат коректно класифицирани (истински негативни резултати: TN- True Negative fraction), но други ще бъдат класифицирани като пациенти със заболяване (фалшиво позитивни резултати: FP- False Positive fraction) (Таблица 35).

**Таблица 35. Резултати след провеждане на диагностичен тест и определяне на TP, FN, FP, TN резултати.**

Резултат от диагностичния тест	Заболяване	
	Присъства	Отсъства
Позитивен резултат	a (TP)	c (FP)
Негативен резултат	b (FN)	d (TN)
Общ брой	<b>a + b</b>	<b>c + d</b>

Въз основа на получените резултати се изчисляват: специфичността, чувствителността, позитивна предиктивна стойност (PPV), негативна предиктивна стойност (NPV) и др.

Чувствителността показва възможността резултатът от теста да е позитивен, когато заболяването присъства (честотата на истинските позитивни резултати, представя се в %).

Чувствителността се определя като:  $TP / (TP + FN) = a / (a + b)$

Специфичността показва вероятността резултатът от теста да е негативен, когато заболяването не присъства (честотата на истински негативните резултати, представя се в %).

Специфичността се определя като:  $TN / (TN + FP) = d / d + c$

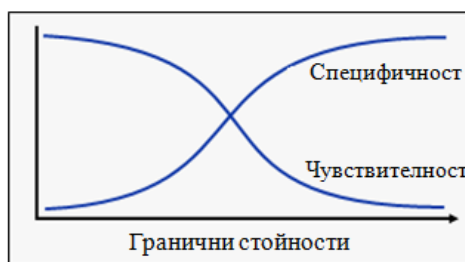
PPV представлява вероятността заболяването да присъства, когато тестът е положителен.

PPV се определя като:  $TP / (TP + FP) = a / (a + c)$

NPV показва вероятността заболяването да отсъства, когато резултатът е негативен.

NPV се определя като:  $TN / (TN + FN) = d / (d + b)$

При избор на високи гранични стойности на теста (биомаркера), то фалшиво позитивните резултати намаляват с увеличаването на специфичността, но в същото време чувствителността (истински позитивните резултати) се понижава. При избор на по-ниска гранична стойност се повишава чувствителността, но се увеличат фалшиво позитивните резултати и по тази причина специфичността намалява (Фиг. 25).



**Фигура 25. Зависимост на специфичността и чувствителността от избора на гранична стойност**

ROC кривите представляват графични диаграми, илюстриращи изпълнението на бинарна класификаторна система при вариране на дискриминираща гранична стойност. Кривата се създава чрез представяне на честота на истински позитивни резултати (чувствителност) по оста y срещу честота на фалшиво позитивни резултати (1-

специфичност) по оста  $x$  при различни стойности на теста (биомаркера). ROC кривите, съответстващи на високо дискриминативни диагностични тестове се локализируют в близост до горния ляв ъгъл на диаграмата. ROC кривите, лежащи на диагоналната референтна линия принадлежат на диагностични тестове с ниска диагностична точност. Площта под кривата - AUC (area under the curve) е ефективна и комбинирана стойност на чувствителността и специфичността, която показва валидността на диагностичните тестове. AUC се изчислява с помощта на непараметричен Mann-Whitney U тест. Максималната стойност  $AUC = 1$  означава, че диагностичният тест прави перфектна дискриминация между болни и здрави. Това се получава, когато разпределенията на резултатите от теста на болните и здравите не се припокриват.  $AUC = 0.5$  означава, че диагностичният тест е толкова точен, колкото и определянето на диагноза на случаен принцип. При  $AUC = 0$  тестът неправилно определя всички здрави като болни, а всички болни като здрави, но това е малко вероятно да се случи в клиничната практика [395]. Доколко конкретната крива се различава от диагонала (и съответно от случайната класификация на обектите) се изчислява с помощта на непараметричен Mann-Whitney U тест.

За определянето на оптималната гранична стойност са предложени три метода. Два от методите дават еднаква тежест на чувствителността и специфичността.

- Първи метод: използва квадрата на разстоянието между  $(0, 1)$  горния ляв ъгъл на диаграмата и коя да е точка от кривата, тоест:  $d^2 = (1-TP)^2 + FP^2 = (1-sensitivity)^2 + (1-specificity)^2$ . За да се получи оптимална гранична стойност се намира най-малката стойност на квадрата на това разстояние. По тази причина трябва да се изчисли това разстояние за всяка една гранична стойност

- Втори метод - наречен още Youden index (индекс на Youden) - използва максималното вертикално разстояние на кривата от точка  $(x, y)$  до диагоналната линия.  $Youden\ Index = TP - FP = \text{Чувствителност} + \text{Специфичност} - 1$ . Определя се сбора на Чувствителността и Специфичността при всяка гранична стойност и се избира тази гранична стойност, при която сборът е най-голям

- Трети метод - включва финансовите разходи за правилно и неправилно диагностициране и цената необходима за по-натъшното диагностициране. За заболявания с ниска честота и голям процент фалшиво позитивни резултати при диагностициране, то се избира висока гранична стойност, за да се повиши специфичността. За заболявания с висока честота с фатални последствия при недиагностициране, се избира по-ниска гранична стойност, за да се повиши чувствителността.

За определянето на граничните стойности на изследваните биоамаркери използвахме метода на Youden.

#### 4.6.6.1. Анализ на ROC кривите на единични биоамаркери.

Диагностичната точност на изследваните биоамаркери в урина и плазма бе определяне чрез анализа на ROC кривите. Получените стойности за AUC, както и специфичността и чувствителността бяха сравнявани при изследваните биоамаркери, за да се определи този който най-добре разграничава пациентите от контролите. За надеждни биоамаркери бяха определени тези, които разграничават по-добре пациентите с рака на простатата от контролите с доброкачествена простатна хиперплазия в сравнение със серумните стойности на PSA - утвърден биоамаркер навлязъл в клиничната практика.

#### 4.6.6.2. Мултимаркерен анализ на ROC кривите

За да определим дали диагностичната точност се подобрява при използване на комбинации от биомаркери проведехме мултимаркерен анализ на ROC кривите. Това бе осъществено с помощта на предварително изчисляване на коефициенти, определящи тежестта на всеки един от маркерите и даващи най-голяма площ на кривата при ROC curve анализа.

### 4.7. Използвана апаратура

*За изработването на дисертационната работа беше използвана следната апаратура:*

- Автоматизирана система за изолиране и пречистване на ДНК и РНК - Модел: Chemagen, Magnetic Separation Module I;
- Хомогенизатор - ULTRA-TURRAX T10 basic Dispenser (IKA);
- Термоблок ThermoE (Bioer);
- ABI PRISM® Автоматичен ДНК секвенатор- модел 3130xl;
- Апарат за PCR в реално време, Модел: 7900 HT Fast Real-time PCR, блок за 384 проби;
- Апарати за PCR амплификация: градиентен PCR апарат- Модел: QB-96 на QUANTA BIOTECH; Bioer XP-F Cycler модел TC XP-A; AB Veriti Thermal Cycler;
- Ванна за хоризонтална електрофореза (Science-Plus-UK);
- Токоизправител (Science-Plus-UK);
- Фотодокументационна система и UV-транслюминатор с дължина на вълната 312 nm (MiniBisPro-Bio Imaging Systems);
- Спектрофотометър ND 1000 (NanoDrop);
- Ion Torrent Personal Genome Machine за секвениране от ново поколение;
- Ion One Touch System;
- MiSeq система за следващо поколение секвениране на Illumina
- Agilent 2100 Bioanalyzer;
- Хладилна центрофуга 5810R – модел Eppendorf за целите на ДНК изолирането - Универсална центрофуга - модел: Eppendorf 5810 за преутаяране на пробите за секвениране
- Универсална центрофуга Micro 200 – модел Hettich;
- Универсална центрофуга - модел: HERMLE Z383, 5000rpm
- Микроцентрофуга >15500 x g за 1,5 и 2,0 ml епроводки;
- Микроцентрофуга за чипове MiniStar Silverline;
- Вортекс за разбъркване Press-to-mix (Snijders);
- рН метър (InLab);
- Магнитна бъркалка (Fisher Scientific);
- Магнитен статив за пречистване на пробите при ДНК изолирането;
- Магнитен статив DynaMaga™- за пречистване на пробите при NGS; - рН Meter;
- Магнити за работа с циркулиращи туморни клетки- DynaMag-S и DynaMag-L
- Едноканални пипети с обем: 0.5 – 10 µl, 2 – 20 µl, 20 – 200 µl и 100- 1000µl;
- Многоканални пипети с обем: 0.5 – 10 µl, 2 – 20 µl и 20 – 200 µl;

## V. Резултати

### 5.1. Резултати от валидирането на ION Torrent технология за следващо поколение секвениране на BRCA1 и BRCA2

В резултат на колаборацията между екипи от патолози, химиотерапевти, хирурзи и молекулярни биолози от Катедра по Обща и клинична патология/Клиника по обща и клинична патология, УМБАЛ „Александровска“, МУ - София; Клиника по медицинска онкология (химиотерапия), СБАЛО, София; Клиника по обща и чернодробнопанкреатична хирургия, УМБАЛ „Александровска“; II хирургична клиника „УМБАЛ „Царица Йоана – ИСУЛ“, и Център по молекулярна медицина (ЦММ), Катедра „Медицинска химия и биохимия“, МУ - София беше избрана група от 58 специфично селектирани пациентки с фамилен рак на гърдата и фамилна история на рак на гърдата и/или яйчника, подбрани по установените международни критерии за генетичен анализ на мутации в *BRCA1/2* гените, утвърдени от Breast Cancer Linkage Consortium (BCLC), 1999 и National Comprehensive Cancer Network (NCCN), 2010. След подписване на информирано съгласие, от пациентите и контролите беше взета венозна кръв, от която бяха изолирани плазма и ДНК с помощта на техника, описана в раздел 4 на глава „Материали и методи“. С цел дълготрайно съхранение, плазмите и част от ДНК материалите бяха замразени на -80 °C, с което се създаде плазмена и ДНК биобанка от пациенти с фамилен рак на гърдата в ЦММ, МУ – София. Останалата част от ДНК пробите беше използвана за генетичен анализ. Всички данни за пациентите бяха оформени в електронен вид и съхранени под формата на клинична база данни.

Пациентките бяха разделени в три групи- тренировъчна група 1 (10 пациентки) с известни мутации в двата гена и две валидационни групи за проверка на специфичност и чувствителност на методиката, както и за сравнение на два различни метода за конструиране на библиотеките. Валидационните групи бяха 2, анализирани в 4 независими ръна, съответно съставени от 16 (Група 2), 8 пациентки и два ръна с 12 пациента (Група 3). Групите са разделени според метода, който е използван за подготовка на библиотеките.

За да определим ефективността на платформата използвахме пациентки за тренировъчната група, които да имат различни видове генетични варианти- инсерции и делеции на една или няколко бази, както и единични нуклеотидни варианти (Single Nucleotide Variants-SNV) намиращи се в нормални и в хомополимерни участъци на гена. Имащи обща дължина на нуклеотидната последователност двата BRCA гена са подходящ модел за изследване на точността, чувствителността и специфичността на настолната NGS платформа ION Torrent PGM. Набора варианти в тренировъчната група пациенти не са всички възможни, които биха могли да съществуват в двата гена. Въпреки това са представителни за всички открити до сега варианти и мутации в тези гени, изследвани при 200 Български пациентки в Център по Молекулярна Медицина до момента чрез Санджер секвениране. Пробите, които използвахме за да тестваме AmpliSeq™ протокола за подготовка на библиотеките също бяха третирани като валидационна група. Тренировъчната група от 10 пациента, предварително секвенирани за анализ на мутационния статус на двата гена има 7 различни патогенни мутации от типа промяна на рамката на четене (frameshift). В подбраната група пациентки бяха наблюдавани общо 35 различни вида варианти: 7 патогенни мутации от типа изместване на рамката на четене (frameshift), 10 варианта от тип промяна на смисъла (missense), 8 синонимни замени (syn), 2 варианта в UTR регионите и 8 интронни варианта (IVS)

(Таблица 36). Всички пациенти бяха секвенирани както по метода на Санджер, така и с платформата за следващо поколение секвениране.

**Таблица 36. Подбрани варианти в BRCA1/2 гените за потвърждение с NGS метод**

Ген	Екзон	dbSNP	Тип на мутация	Пациенти №
BRCA1	8	-	Frameshift	BC134
BRCA1	20	rs80357906	Frameshift	BC006;BC017
BRCA2	11n	rs80359531	Frameshift	BC058;BC076
BRCA2	11n	rs80359544	Frameshift	BC052
BRCA2	11n	rs80359550	Frameshift	BC090
BRCA2	17	rs80359687	Frameshift	BC019A
BRCA2	27a		Frameshift	BC024
BRCA2	10	rs766173	Missense	BC024*;BC052
BRCA2	10	rs144848	Missense	BC017;BC019A;BC020;BC058;BC090
BRCA2	11	rs1799944	Missense	BC017;BC020
BRCA1	11b	rs1799950	Missense	BC006;BC020;BC090
BRCA1	11e	rs4986850	Missense	BC019a;BC020;BC134
BRCA1	11g	rs799917	Missense	BC019a;BC020*;BC134
BRCA1	11i	rs16941	Missense	BC019a;BC020;BC134
BRCA1	11J	rs16942	Missense	BC019a;BC020;BC134
BRCA1	11L	-	Missense	BC020
BRCA1	16	rs1799966	Missense	BC019a;BC020;BC076*BC134
BRCA1	11e	rs1799949	Silent	BC019a;BC020;BC134
BRCA1	11f	rs16940	Silent	BC017*;BC020;BC024*
BRCA1	13	rs1060915	Silent	BC019a;BC020;BC134
BRCA2	10	rs1801439	Silent	BC017;BC020
BRCA2	11	rs1801499	Silent	BC017;BC020
BRCA2	11e	rs1801406	Silent	BC052;BC090
BRCA2	11g	rs543304	Silent	BC006*;BC017;BC019A;BC020;BC134
BRCA2	14	rs1799955	Silent	BC052;BC090
BRCA2	27c	rs15869	UTR-3	BC017;BC019A;BC134
BRCA2	2	rs1799943	UTR-5	BC017;BC052;BC090;BC134
BRCA1	7	rs147856441	IVS	BC019a; BC134
BRCA1	8	rs799923	IVS	BC020;BC024;BC52;BC058;BC076
BRCA1	9	rs8176144	IVS	BC019a;BC020;BC134
BRCA1	15	rs8176212	IVS	BC019a;BC020;BC134
BRCA2	4	rs11571610	IVS	BC020
BRCA2	5	rs3783265	IVS	BC020
BRCA2	8	rs2126042	IVS	BC134
BRCA2	13	rs11571680	IVS	BC020

\* със звезда са означени индивидите, хомозиготни по дивия алел.

### 5.1.1 Подготовка на библиотеките и секвениране.

Всички секвенционни рънове на всяка от групите пациенти са обобщени в таблица 37. Голяма част от ръновете проведени с библиотеката Ion Xpress™ не се картираха на района, който ни интересува (ROI). Вероятна причина за това е метода на фрагментиране посочен в протокола. Вероятно има по-къси фрагменти, които излизат извън района, който ни интересува. Тези рънове също така показаха и много висок процент поликлонални прочити, което намалява общия процент прочити (On-target). Група 3 беше преминала идопълнителен качествен контрол на генерираните ISPs с Qubit 2.0 флуориметър и кит за качествен контрол. Резултатите показаха достатъчни нива на обогатяване на частиците (съответно за трите групи- 22.3%, 14.3% и 13.8%) за да бъдат успешно секвенирани с платформата. Всяка показва ниски нива на поликлоналност (17-22%) и фракция на некартирани фрагменти от 0.2-0.3%. Всички пациенти имат по-малко от 5.5% прочити извън района на гените.

**Таблица 37. Обобщение на параметрите получени при секвенирането на групите пациенти.**

Рън	Chip	Брой проби	Кит за библиотеки	Прочети	Средна дължина	On-target прочети (%)
Тренировъчна	316	10	Ion Xpress	669 k	87	41.7
Валидационна 1	316	16	Ion Xpress	1.49 M	128	54.1
Валидационна 2	314	8	AmpliSeq™	484 k	154	96.0
Валидационна 3	316v2	12	AmpliSeq™	3.9 M	163	97.4
Валидационна 4	316v2	12	AmpliSeq™	3.98 M	163	97.1

### 5.1.2 Анализ на покритието и детекция на вариантите

Процентът покритие на районите от интерес (ROI) беше калкулиран използвайки филтриране на вариантите с покритие 1X и 30X. Резултатите са обобщени в Таблица 38. Всички райони с покритие под 30x покрити бяха премахнати от статистическите изчисления и бяха секвенирани по метода на Санджер.

**Таблица 38. Обобщение на покритието на отделните рънове.**

Рън (Група)	1x покритие (%)	30x покритие (%)	Филтрирани варианти (%)	Средно покритие
Training (1)	92.4	53.6	46.4	51 x
Validation1 (2)	94.3	76.1	23.9	117 x
Validation2 (3)	99.1	98.0	2	370 x
Validation3 (3)	99.5	98.0	2	2106 x
Validation4 (3)	99.5	95.8	4.2	2156 x

Както се очаква от платформата повечето от фалшиво позитивните варианти (10 от 15) бяха делеции или инсерции. Увеличавайки необходимото покритие до 30x намаляха броя фалшиво позитивни и фалшиво негативни резултати (Таблица 39), но също така и общия брой на открити варианти. След анализа на данните с 30x покритие се откриха 4 фалшиво позитивни варианти в тренировъчната група, всеки от които се открива в хомополимерен участък или с много ниска честота в кодиращи райони на ROI.

**Таблица 39. Параметри на откритите варианти с приложените биоинформатични програми.**

Граница на покритие	NextGENe		Torrent server (TS)		NextGENe и TS	
	3x	30x	3x	30x	3x	30x
FN (TP+FN)	9 (106)	0 (49)	10 (106)	3 (49)	9 (106)	0 (49)
FP	1081	638	73	36	15	4
Чувствителност (%)	91.5	100.0	90.6	93.9	91.5	100.0
Специфичност (%)	80.4	82.6	90.2	92.5	96.4	98.3
Positive predictive value (%)	8.2	7.1	56.5	56.1	86.6	92.5
Negative predictive value (%)	56.5	100.0	98.6	99.3	97.8	100.0

*FN- фалшиво позитивни, FP- фалшиво позитивни, TP-истински позитивни варианти*

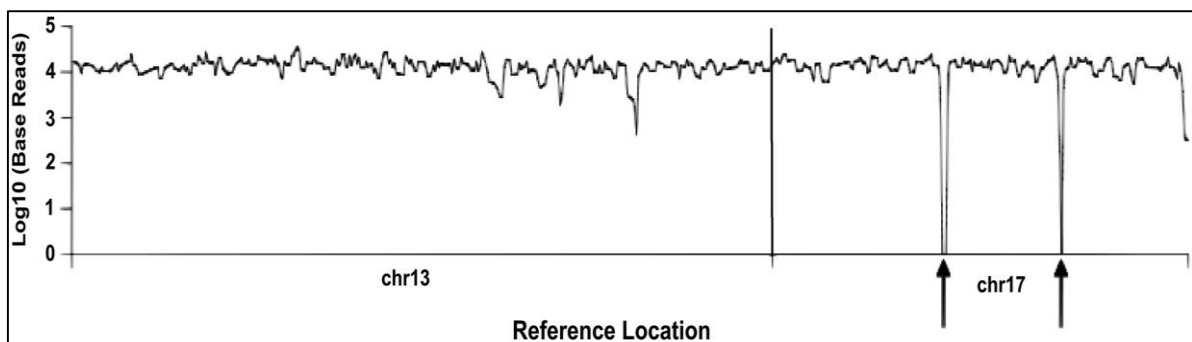
Пробите от тренировъчната група имат средно покритие от 51x с липсващи секвенирани фрагменти в рамките на 7.6%. С покритие минимум 30x бяха 49 варианта. Всички те бяха детектирани чрез биоинформатичния разработен подход и кореспондират на 100% чувствителност и 98.3% специфичност (Таблица 40). Десет от вариантите, включително и фалшиво позитивните, са делеции и инсерции и съставляват 19% (10/53) от всички открити варианти. Всички са хетерозиготни с изключение на 1 (32906729, A>C), който се открива в хомозиготно състояние в един от пациентите и в хетерозиготно в четири други.

**Таблица 40. Резултати получени с биоинформатичния алгоритъм за детекция на вариантите.**

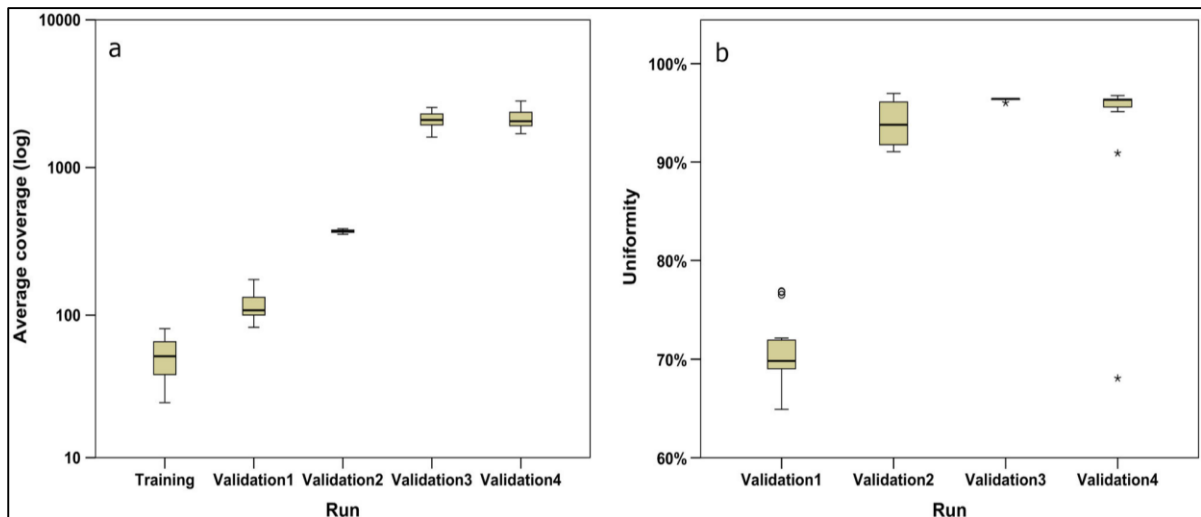
Група	Тренировъчна		Валидационна		
	Ion Xpress™	Ion Xpress™	AmpliSeq™	AmpliSeq™	AmpliSeq™ <sub>M</sub>
Проби	10	16	8	12	12
TP/TP + FN	49/49	200/204	113/118	146/146	141/141
FP (SNV/indels)	0/4	6/31	2/10	7/0	6/0
Sensitivity (%)	100.0	98.0	95.8	100.0	100.0
(CI 95)	(92.7–100)	(95.1–99.2)	(90.5–98.2)	(97.4–100)	(97.3–100)
Specificity (%)	98.3	94.5	93.3	97.6	97.7
(CI 95)	(95.6–99.3)	(92.6–96.0)	(88.6–96.1)	(95.0–98.8)	(95.0–98.9)

*CI- доверителен интервал, FN- фалшиво негативни, FP- фалшиво позитивни, SNV- еднонуклеотидни варианти, TP истински позитивни*

В група 3 дълбочината на покритие беше по-висока – от 370x до 2100x а пропорцията на липсващите участъци падна на 1%. Тези участъци липсват и в останалите три ръна (Фиг 26). Въпреки, че общото покритие е много по-уеднаквено и високо в тези три ръна (Фиг 27), не се откри разлика в броя покрити нуклеотидни бази при настройка на параметрите от 3x и 30x и вариантите получени при тези дълбочини са практически едни и същи. Открити бяха 424 варианта в 52 различни локуса. Получените делеции и инсерции бяха 19 (7 локуса) а по-голямата част (12 от 19) се картираха в интронни райони в близост до екзон 7 на BRCA1 гена. Тези често срещащи се варианти, вариращи от един до четиринайсет нуклеотида са разпределени в почти всички проби от първия рън на третата група (8 проби), докато никоя от пробите в останалите два ръна на група 3 не показаха наличие на варианти в този район. След като премахнахме тези варианти като фалшиво позитивни група 3 показва значително намаление на общия брой варианти в сравнение с другите две групи ( $p < 5e-7$ ).



**Фигура 26. Представителна графика на покритието при трите AmpliSeq ръна от група 3. Оказани със стрелки са два ниско покрити района на хромозома 17 (BRCA1 гена).**



**Фигура 27. Сравнение между покритието (а) и еднаквостта на покритието (б) в различните рънове.**

### 5.1.3 Валидиране на вариантите

Само два от ръновете показват чувствителност под 100%. В първия валидационен рън четирите липсващи варианта бяха с много ниско покритие. Втория валидационен рън показва наличие на 5 фалшиво позитивни варианта, два от които (делеция на TТАА в хромозомна локализация 13:32915413) бяха филтрирани поради силен дисбаланс в покритието. Това може да се обясни с позиционирането на варианта в последния ампликон на екзон 11 на BRCA2 гена, които няма припокриване със съседен ампликон.

Открити бяха общо 62 фалшиво позитивни варианта при всички валидационни групи. Делециите и инсерциите съставляват 66% (41/62) от тях и се срещат само в първите два валидационни ръна, като 12 от тях се намират в повтор на екзон 7 на BRCA1 гена. Останалите са делеции в хомополимерни области от 2,3 или 4 нуклеотидни бази и една инсерция на гуанин в края на един от ампликоните. Наблюдава се чест вариант (delC в chr13:32972389) при 11 пациентки от първи валидационен рън (69% от пробите на ръна). Нито един от гореизброените варианти не се потвърди със секвенирането по Sanger.

От всички 21 варианта на заместване на една база с друга 5 се срещат в 30% от прочетите. Останалите 15 варианта се откриват с високо покритие и добър баланс на прочетите с честоти близо 50% (хетерозиготни) или 100% (хомозиготни), но не се потвърждават със секвениране по Санджер. Тези варианти се срещат само в AmpliSeq ръновете и представляват 100% от фалшиво позитивните нуклеотидни замени в тях. 13 от тези варианти са синонимна замяна в различните пациенти- rs16940 (L771L в BRCA1 гена).

Най-ниската честота за откриване на фалшиво позитивни варианти беше изчислена на 10%. Базирайки се на границата за откриване на варианти по разработения биоинформатичен алгоритъм за минимален абсолютен брой прочети на даден вариант (7 прочета за Torrent Suit софтуера и 3-5 прочета за NextGENe софтуера) беше установено, че минимум покритие от 70x ще осигури откриване на всички варианти като 10% (7 прочета) покриват изискванията и на двата алгоритмични филтъра.

### 5.1.4 Открити варианти

Общо 59 варианта бяха открити със следващо поколение секвениране и потвърдени със Санджер секвениране при всички валидационни рънове: 14 синонимни варианта, 3 варианта от типа frameshift. 21 миссенс замени една от които водещи до стоп кодон, 2 варианта в 3' и 5' областите, 18 интронни варианта един от които в донорното място за сплайсинг на интрон 12 (Таблица 41). Не се срещат в литературата до сега два от frameshift вариантите, една миссенс и два други интронни варианта. Новооткритите варианти от валидационните сетове са показани в Таблица 42.

**Таблица 41. Списък на откритите и потвърдени варианти в изследването**

Gene	Exon	Position	dbSNP ID	HGVS	Type <sup>a</sup>
BRCA1	22	41201142		c.5396_5402delCCCTTGG	Frameshift
	18	41216021	rs8176258	c.5075-53C>T	IVS
	16	41222975	rs1799967	c.4956G>A	Missense

	16	41223094	rs1799966	c.4837A>C	Missense
	13	41234470	rs1060915	c.4308T>C	Silent
	11L	41243509	rs28897689	c.4039A>G	Missense
	11j	41244000	rs16942	c.3548A>G	Missense
	11i	41244429	rs4986852	c.3119G>A	Missense
	11i	41244435	rs16941	c.3113A>G	Missense
	11g	41244936	rs799917	c.2612C>T	Missense
	11g	41245103		c.2445T>C	Silent
	11f	41245237	rs16940	c.2311T>C	Silent
	11f	41245333	rs56329598	c.2215A>T	Missense
	11e	41245466	rs1799949	c.2082C>T	Silent
	11e	41245471	rs4986850	c.2077G>A	Missense
	11e	41245530	rs80357626	c.2019delA	Frameshift
	11b	41246481	rs1799950	c.1067A>G	Missense
	8	41251931	rs799923	c.442-34C>T	IVS
	7	41256101	rs147856441	c.441+36_441+38delCTT	IVS
	6	41256878	rs80358113	c.301+7G>A	IVS
	2	41276061	rs80356929	c.53T>C	Missense
	2	41276247	rs3765640	c.-19-115T>C	IVS
BRCA2	2	32890572	rs1799943	c.-26G>A	UTR-5
	4	32899388	rs11571610	c.425+67A>C	IVS
	4	32899468	rs4942423	c.425+147G>T	IVS
	8	32903685	rs2126042	c.681+56C>T	IVS
	10a	32906480	rs766173	c.865A>C	Missense
	10a	32906729	rs28897706	c.978C>A	Missense
	10c	32906980	rs1801439	c.1365A>G	Silent
	10d	32907407	rs28897710	c.1792A>G	Missense
	11a	32910328	rs2320236	c.1910-74T>C	IVS
	11a	32910351	rs11571651	c.1910-51G>T	IVS
	11a	32910721	rs1801499	c.2229T>C	Silent
	11d	32911463	rs1799944	c.2971A>G	Missense
	11e	32911888	rs1801406	c.3396A>G	Silent
	11g	32912299	rs543304	c.3807T>C	Silent
	11h	32912560	rs28897724	c.4068G>A	Silent
	11i	32912830		c.4338T>C	
	11i	32913055	rs206075	c.4563A>G	Silent

**Таблица 42. Списък на новооткритите и потвърдени варианти в изследването**

Gene	Exon	Position	Variant	Type
BRCA2	11i	32912830	T>C	Synonymous
	12	32918791	G>A	Intronic <sup>a</sup>
	13	32921146	C>T	Intronic
	22	32953732	G>A	Intronic <sup>c</sup>
	27a	32972332	delA	Frameshift <sup>c</sup>
BRCA1	22	41201142	delCCAAGGG	Frameshift
	11g	41245103	T>C	Synonymous
	2	41276061	T>C	Missense <sup>b,c</sup>

*a Intron donor pair variant, b New variant of rs80356929, c Variants that appeared in dbSNP during the revision process*

## 5.2. Резултати от генетичния анализ на 94 тумор-асоциирани гена с MiSeq новогенерационна система

Вследствие на проведеното новогенерационно секвениране с панел от 94 тумор-асоциирани гени, очаквано суровите данни под формата на делеции и инсерции на една до няколко нуклеотидни бази, така и еднуклеотидни замени, наброяват средно 297 варианта на пациент (Таблица 43). Това голямо количество информация трябва да бъде филтрирано спрямо определени параметри за качество и дълбочина на покритието, за да се минимизира вероятността от попадане на фалшиво позитивни или фалшиво негативни резултати свързани с текущия анализ:

**Таблица 43. Данни за секвенирането след приложените филтри.**

№ на пациент / филтър	общ брой варианти	качество на секвениране-PASS	дълбочина на прочит >20	честота на минорния вариант >10%	делеции инсерции и сплайс варианти	популяционна честота <1%	предикция PolyPhen/SIFT
9	298	276	276	276	51	3	1
16	309	293	292	292	58	3	2
20	328	310	310	310	64	3	3
29	278	269	269	269	52	3	2
30	300	286	286	286	68	3	2
38	294	281	281	281	53	0	0
43	300	284	283	283	56	0	0
47	302	287	287	287	54	0	0
56	297	239	235	235	37	2	1
57	300	287	282	282	53	4	3
67	303	291	291	291	52	1	0
74	305	292	292	292	56	2	2
75	300	284	284	284	57	6	4

77	318	309	309	309	63	3	2
94	311	294	292	292	53	2	2
95	303	288	288	288	58	3	1
105	279	262	261	261	43	2	1
112	309	293	293	293	57	2	2
124	289	282	282	282	54	4	4
125	287	278	278	278	59	6	3
127	294	270	270	270	63	6	3
137	321	310	310	310	69	7	5
156	280	265	265	265	55	2	2
158	306	294	294	294	52	2	1
181	291	277	275	275	50	3	3
183	312	296	295	295	56	1	1
191	325	315	315	315	77	5	5
195	308	291	290	290	59	4	1
198	305	290	290	290	57	4	3
200	297	286	286	286	57	3	2
209	281	266	266	266	55	2	2
средно	301	285	284	284	56	3	2

След прилагане на критериите описани в точка 4.5.3. „Материали и Методи“ за качество и ефект, резултатите показаха наличието на следните патогенни и вероятно патогенни варианти в 11 пациента. Откритите мутации са обобщени в таблица 44:

- 1 нова frameshift мутация в гена ATM;
- 6 нови вероятно патогенни миссенс мутации в гените PTCH1, RAD51C, MET, MUTYH, ATM и CHEK2;
- 7 докладвани в литературните източници патогенни миссенс варианти в гените WRN, ERCC4, PALB2, PRF1, RET, SDHB и AIP;

**Таблица 44. Открити патогенни и вероятно патогенни варианти чрез панел за новогенерационно секвениране на 94 тумор-асоциирани гени при Български пациентки с рака на гърдата.**

Ген	Нуклеотидна замяна	Аминокиселинна замяна	Подтип мутация	Засегнат белтъчен домен	rs номер
ATM	delC	p.Glu2139IlefsTer6	неизвестен frameshift вариант	FAT домен	-
MUTYH	c.797G>C	p.Ala266Gly (A266G)	неизвестен missense вариант; вероятно патогенен вариант	-	-
ATM	c.185G>T	p.Arg62Ile (R62I)	неизвестен missense вариант; вероятно патогенен вариант	-	-
CHEK2	c.1309G>A	p.Glu437Lys (E437K)	неизвестен missense вариант; вероятно патогенен вариант	-	-
PTCH1	c.1215 C>A	p.Pro369Thr (P369T)	неизвестен missense вариант; вероятно патогенен вариант	Извънклетъчен-топологичен домен	-
RAD51C	c.80T>G	p.Leu27Pro (L27P)	неизвестен missense вариант; вероятно патогенен вариант	Домен, необходим за т.нар Holliday junction resolution активност	-
MET	c.839G>T	p.Arg280Met (R280M)	неизвестен missense вариант; вероятно патогенен вариант	Sema домен; Извънклетъчен-топологичен домен)	-
WRN	c.1909C>T	p.Arg637Trp (R637W)	известен missense патогенен вариант	Хеликазен АТР-свързващ домен	rs148286708
ERCC4	c.1135C>T	p.Pro379Ser (P379S)	известен missense патогенен вариант	Хеликаза-подобен район	rs1799802
PALB2	c.2816T>G	p.Leu939Trp (L939W)	известен missense патогенен вариант	WD 2 повтор	rs45478192
PRF1	c.272C>T	p.Ala91Val (A91V)	известен missense патогенен вариант	МАСРF домен	rs35947132
RET	c.2372A>T	p.Tyr791Phe (Y791F)	известен missense патогенен вариант	Протеин киназен домен	rs77724903
SDHB	c.379A>C	p.Ile127Leu (I127L)	известен missense патогенен вариант	2Fe-2S ferredoxin-ов домен	rs201372280
AIP	c.911G>A	p.Arg304Gln (R304A)	известен missense патогенен вариант	-	rs104894190

Описаните патогенни и вероятно патогенни мутации в таблицата се срещат при 11 (35.5%) от 31 пациентки като всяка от тях се среща само при един пациент. Три от пациентките носят по две мутации- пациентка № 124 (MUTYH 797G>C; SDHB 379A>C), пациентка № 125 (ATM 185G>T; AIP 911G>A) и пациентка № 209 (CHEK2 1309G>A; RET 2372A>T) и всяка от тях носи по една известна за базите данни и една нова мутация.

### 5.3. Резултати от генетичния анализ на соматични мутации с MiSeq новогенерационна система в тумори на български пациентки с рака на гърдата

В резултат на колаборацията между екипи от патолози, хирурзи и молекулярни биолози от Катедра по Обща и клинична патология/Клиника по обща и клинична патология, УМБАЛ „Александровска”, МУ – София, II хирургична клиника „УМБАЛ „Царица Йоана – ИСУЛ”, и Център по молекулярна медицина (ЦММ), Катедра „Медицинска химия и биохимия”, МУ - София беше събрана група от 91 туморни проби получени от ексцизионна биопсия на пациенти с рак на гърдата. След подписване на информирано съгласие, от пациентите беше взета туморна тъкан, от която беше изолирана ДНК с помощта на техника, описана в раздел 4 на глава „Материали и методи”. С цел дълготрайно съхранение на туморите и част от ДНК материалите бяха замразени на  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , с което се създаде тъканна и ДНК биобанка от пациенти с рак на гърдата в ЦММ, МУ – София. Останалата част от ДНК пробите беше използвана за генетичен анализ. Всички данни за пациентите бяха оформени в електронен вид и съхранени под формата на клинична база данни.

В следствие на проведеното новогенерационно секвениране, суровите резултати наброяват **5029** варианти, включващи както единични нуклеотидни замени (SNV), така и малки инсерции и делеции на една до няколко бази. Това голямо количество информация трябва да бъде филтрирано спрямо определени параметри, за да се минимизира вероятността от попадане на фалшиво позитивни или фалшиво негативни резултати свързани с текущия анализ. Средно на пациент без прилагане на филтрите за качество се откриват 55 броя варианти.

След прилагане на критериите за качество, приложихме допълнителен филтър от дълбочина на прочитите над 50, качество на генотипиране над 30 (което е шанс за false positive  $< 0.001$ , вероятността дадена база да е детектирана с вероятност за точност 99.9%) и честота на алтернативния вариант над 5%, резултатите показаха наличие на **1563** варианта в общия брой от 91 пациенти (в тази бройка се включва всяко едно мутационно събитие, напр. с. 345A>T в ген ATM се среща в 8 от пациентите и тя се смята като 8 мутационни събития (варианта) в изследвата група). Средно на пациент след прилагане на филтрите за качество се откриват 17 варианта.

След селектирането на качествените варианти беше направено обобщение на видовете промени в туморната ДНК и локализацията им в генома. Резултатите са показани в Таблица 45. По-голямата част от тях се откриват в кодиращата част на белтъците. Установени бяха голям брой еднонуклеотидни замени (включващи множество полиморфизми, сплайс варианти, миссенс, нонсенс варианти, част от които патогенни, както и не малък брой делеции и инсерции, водещи до промяна в рамката на четене и генериране на преждевременен стоп кодон и като резултат-скъсен и/или нефункционален белтък.

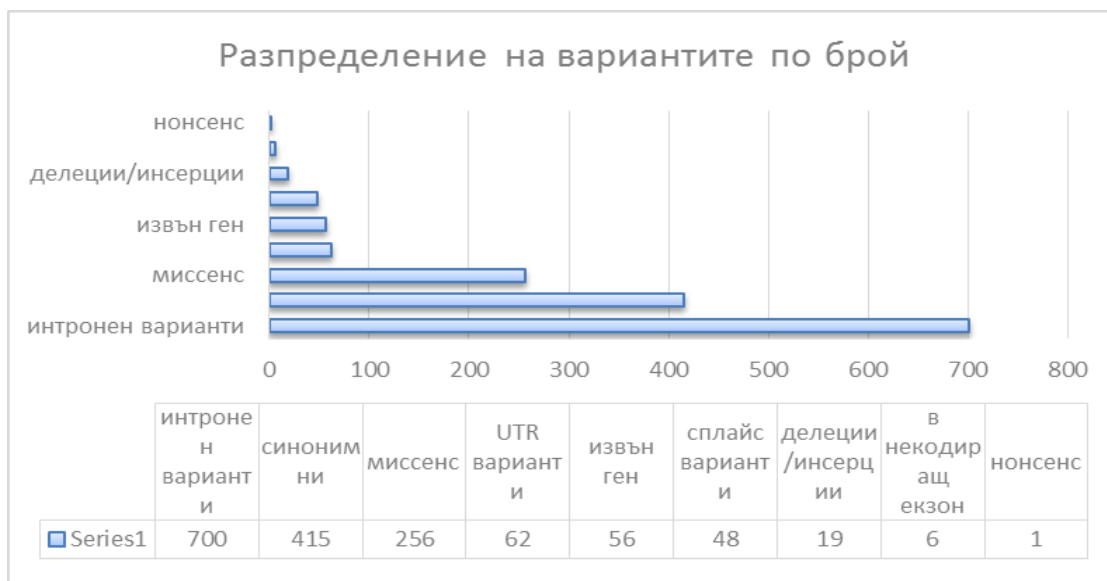
**Таблица 45. Разпределение на видовете промени в туморната ДНК и локализацията им в генома**

Брой открити варианти	1563
<b>Вид</b>	
хомозиготни еднонуклеотидни замени (SNV)	503
хетерозиготни еднонуклеотидни замени (SNV)	966
малки делеции	43
малки инсерции	51
<b>Локализация</b>	
екзогенни (некодираща част на хромозомата)	56
в интрон	671
в екзон	836

Направено беше и детайлно процентно разпределение на всички 1563 промени в гените според локализацията им и ефекта им върху белтъка. Точният им брой по видове е показан на фигура 28. Тъй като туморната маса представлява смесица от различни клетъчни колонии- туморни клетки и нормални клетки, много от вариантите, които се откриват са без патогенен или функционален ефект върху белтъка, който е продукт на гена, в който се появява мутационното събитие. Такива варианти са често срещани полиморфизми в общата популация и са резултат от генетичното разнообразие на дадена популация. Такива са например всички синонимни варианти, интронните варианти, по-голямата част от миссенс вариантите, някои варианти, които се срещат в 3' UTR или районите в близост до екзоните, но които не засягат механизмите на синтез на сплайсинг и други.



**Фигура 28. Процентно разпределение на видовете промени в туморната ДНК по честота на срещане**



**Фигура 29. Разпределение на видовете промени в туморната ДНК.**

На Фигура 29 различните 1563 варианта са разделени по типове, но също така е показан и точния брой на уникалните по вид замени. Тъй като основата за инициране на канцерогенезата се определя от появата и акумулирането на определени видове соматични мутации в туморсупресорни гени или в протоонкогени- т.нар. „driver“ (иницииращи) и „passengers“ (съпътстващи) мутации, за последващите анализи взехме в предвид само тези, които повлияват на функцията на белтъците, които кодират конкретните гени в панела- патогенните и вероятно патогенните варианти. Изключихме класовете като например синонимни варианти тъй като не представляват интерес за целите и задачите на дисертацията. Останаха общо 257 варианта (като се смята всяко едно мутационно събитие), които са общо 63 броя различни варианти. В изчисленията оставихме следните класове като ги разпределихме по видове мутации:

- frameshift инсерции и делеции- Има общо 19 варианта (отделни мутационни събития по честота на срещане в пациентите), разпределени в 3 гена, 6 различни вида варианти. Мутацията в ATM гена се среща най-често (12% от пациентите).

вид на мутацията	ген	вариант	брой пациенти
frameshift инсерции	HNF1A	NM_000545.5:c.863_864insC NP_000536.5:p.Pro289AlafsTer28	1
	PTEN	NM_000314.4:c.934_935insAC NP_000305.3:p.Lys313ThrfsTer5	1
frameshift делеции	PTEN	NM_000314.4:c.950_953delTACT NP_000305.3:p.Thr319Ter	1
	ATM	NM_000051.3:c.5228delC NP_000042.3:p.Thr1743LysfsTer13	11

	HNF1A	NM_000545.5:c.862delG NP_000536.5:p.Pro291GlnfsTer51	4
	HNF1A	NM_000545.5:c.865delC NP_000536.5:p.Pro291GlnfsTer51	1

- stop\_gained

вид на мутацията	ген	вариант	брой пациенти
stop_gained	TP53	NM_000546.5:c.637C>T NP_000537.3:p.Arg213Ter	1

• миссенс- тази група е най-много бройна. Има общо 237 варианта (отделни мутационни събития в пациентите), 57 различни вида варианти разпределени в 25 гена. Част от вариантите са с номер в dbSNP и са известни патогенни, друга част са вероятно патогенни според програмите за предикция SIFT и PolyPhen или са известни патогенни според COSMIC база данни (Таблица 46). От анализа са премахнати 2 варианта inframe миссенс делеции и всички, които са VUS. Бяха взети предвид само патогенните и вероятно патогенните мутации маркирани в червено на Таблица 46.

**Таблица 46. Видове открити миссенс мутации при пациентите.**

вид на мутацията	SIFT	Polyphen	Общ брой/ брой по вид	брой с rs №/ брой по вид	брой с Cosmic № брой по вид	патогенност
миссенс	deleterious	damaging	10/7	10/7	10/7	патогенни
			11/8	0/0	11/8	патогенни
			32/8	0/0	0/0	вероятно патогенни
общо			54/23			
миссенс	tolerated	damaging	4/2	4/2	4/2	патогенни
			6/4	6/4	6/4	вероятно патогенни
			6/2	0/0	6/2	вероятно патогенни
			51/5	0/0	0/0	VUS
общо			67/13			
миссенс	deleterious	benign	3/1	3/1	3/1	вероятно патогенни
			1/1	0/0	0/0	VUS
общо			4/2			
миссенс	tolerated	benign	9/3	9/3	9/3	патогенни
			80/4	80/4	80/4	VUS
			1/1	1/1	0/0	VUS
			5/2	0/0	5/2	VUS
			13/6	0/0	0/0	VUS
общо			108/16			

миссенс	-	-	2/1	2/1	2/1	вероятно патогенни
			1/1	1/1	0/0	VUS
общо			3/2			
миссенс сплайс район	deleterious	damaging	1/1	1/1	1/1	патогенен
общо			1/1			

След филтрирането им по патогенност според базите данни и програмите за предикция, като оставихме само патогенните и вероятно патогенните, остават 105 патогенни и вероятно патогенни варианти, 44 различни по вид, разпределени в 17 тумор-асоциирани гена. Те са от по-голям интерес, защото именно „задвижващите“ мутации придават на раковата клетка предимство да нараства по-бързо от тези, които не носят мутацията и са подложени на позитивна селекция при еволюцията на рака.

- ✓ 1 **stop-gained (нонсенс) мутация**, която терминира транслацията на белтъка на мястото на възникване на мутацията;
  - ✓ 6 различни вида **малки делеции/инсерции**, които също водят до изместване на рамката на четене (**frameshift, FS**) преждевременен стоп кодон и скъсен белтък;
  - ✓ 21 известни в базите данни патогенни **миссенс мутации (missense)**
  - ✓ 16 вероятно патогенни **миссенс мутации (missense)** според програмите за предикция или базите данни
- Пълният списък на 43 варианта, в 17 гена, наблюдавани при 60 пациента е показан в Приложение 5.

Установихме, че патогенни мутации се откриват при 60 от изследваните 91 пациенти (65,8%). Освен известните патогенните мутации бяха открити и 11 нови за базите данни потенциално патогенни мутации в 46 пациента (78% от пациентите в които се открива патогенна мутация), спрямо направения *in silico* биоинформатичен анализ за предполагаемия им ефект върху белтъка, които са предпоставка за продължаване на научната разработка за изследване на ролята им в туморогенезата на рака на млечната жлеза.

В следствие на анализа на резултатите беше направено разпределение на откритите патогенни и вероятно патогенни мутации според гените, в които се откриват. Установено беше, че патогенни мутации се откриват в 35% от изследвания панел от гени. За да установим гените, които най-често биват засегнати от мутации в нашата група пациенти пресметнахме честотата на срещане на даден вид мутация в групата. Резултатите показват, че 70% от всички мутационни събития в тези гени се откриват в гените PIK3CA, ERBB2, APC, ATM и TP53. Степента на засягане на гените е показана на Фигура 30.



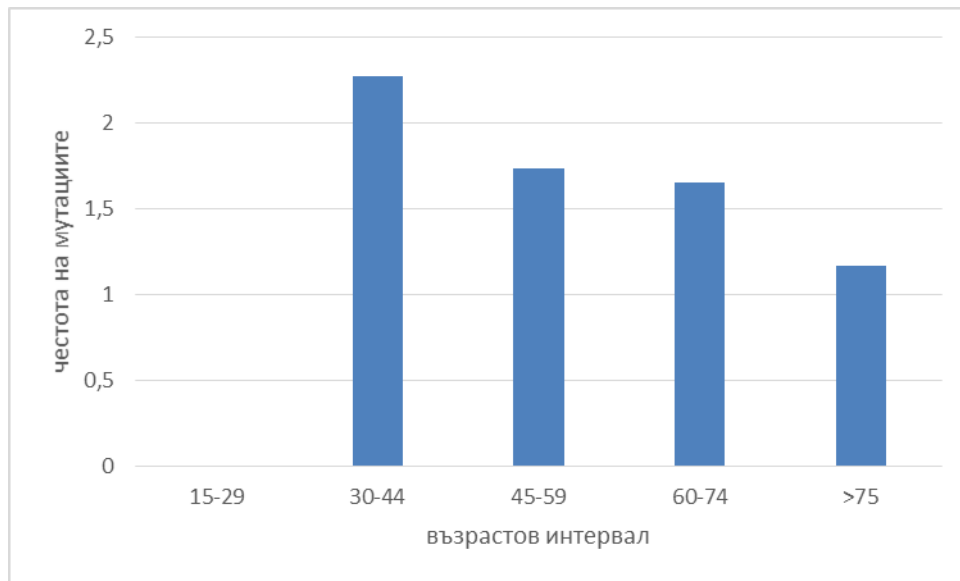
**Фигура 30. Разпределение на гените според брой мутации, наблюдавани в изследваната група пациенти (общ брой наблюдавани мутационни събития)**

Установено беше, че всяка от патогенните мутации посочени в таблица 47 се открива в гени, които заягат основни сигнални пътища с роля в развитието на тумора.

**Таблица 47. Най-често срещаните мутации в групата от избрани пациенти.**

ген	Вид мутация	HGVSc	HGVSp	Брой пациенти
PIK3CA	missense	NM_006218.2:c.270T>G	NP_006209.2:p.Cys90Trp	7
		NM_006218.2:c.3140A>G	NP_006209.2:p.His1047Arg	7
ERBB2	missense	NM_004448.2:c.2275A>C	NP_004439.2:p.Thr759Pro	11
APC	missense	NM_000038.5:c.3854A>T	NP_000029.2:p.Asp1285Val	7
		NM_000038.5:c.4266T>A	NP_000029.2:p.Asp1422Glu	5
ATM	frameshift	NM_000051.3:c.5228delC	NP_000042.3:p.Thr1743LysfsTer13	11

След определянето на патогенните мутации и разпределението им в гените, за изпълнение на всички задачи се направи статистически анализ на мутациите и различни клинични данни на пациентите.



**Фигура 31. Анализ на честотата на мутациите спрямо възрастта на пациентите.**

Беше открито, че не се наблюдава значима разлика в броя мутации в групите различни по възраст (Фиг. 31) и с различна диференциация на туморите, варирането което се вижда на Фигура 32.



**Фигура 32. Анализ на разпределението честотата на мутациите спрямо степента на диференцираност на туморите.**

При направените статистически анализи на разпределението на мутациите спрямо размера на тумора по класификация TNM не се наблюдава връзка на броя мутации с размера на тумора.



- Третата група се открива в останалите пациенти от Луминален А и се характеризира с липсата на frameshift мутацията в ATM гена и наличие на мутации в PIK3CA, ERBB2, ERBB4, APC и имат мутации в TP53 и BRAF
- Четвъртата група се открива в останалите пациенти на Луминален Б тип и се характеризира с предимно миссенс мутации в PIK3CA, единични мутации в APC, TP53, PTEN и RET, но липсват мутации в ATM и BRAF

## 5.4. Резултати от изследванията на циркулиращи туморни клетки при болни с метастазирал рак на гърдата

### 5.4.1 Таргетна популация пациентки и критерии за включване.

В проучването бяха включени 43 пациентки, които отговарят на включващите критерии за Оценка на отговора на лечение при солидни тумори - Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST). Според тези критерии, за да е възможно отговорът да бъде оценен обективно, заболяването на даденият пациент трябва да е меримо. Само пациенти с меримо заболяване могат да бъдат включвани в изследвания, при които обективният отговор (ОО) е първична цел.

Като **«меримо заболяване»**, според RECIST, се дефинира заболяване, при което е налице поне една метастатична **«мерима лезия»**. Ако меримото заболяване е ограничено само в една мерима лезия, тя трябва да бъде верифицирана хистологично или цитологично. Лезиите се дефинират, като **«мерими»** ако в поне едно от измерения диаметърът им надвишава 20 мм., при използване на конвенционален компютърен томограф (КТ) или надвишава 10 мм. при използване на спирален КТ. Повърхностните лезии (кожни лезии, палпируеми лимфни възли) също могат да бъдат мерими.

Всички останали лезии, включително по-малките лезии, костните лезии, лептоменингеално засягане, асцит, плеврален или перикарден излив, карциноматозен мастит, белодробен лимфангит, кистични лезии, а също и абдоминални маси, които не се установяват чрез образните методи спадат към **«немеримите лезии»**.

При документирани таргетните и нетаргетните лезии при базисното изследване беше калкулирана сумата на най-дългите диаметри (НДД) на всички таргетни лезии. Тази сума се използва като референтна за оценка на туморния отговор на лечение. Всички немерими лезии също се документират, като измерването им не е необходимо. Всички пациентки получиха информация за целите на изследването и подписаха информирано съгласие за участие в проучването и за генетично изследване. Бяха им дадени поредни номера от СТС\_001 съответно до СТС\_043. Пациентките са с метастазирало заболяване, като имат поне една мерима лезия. Съгласно критериите на RECIST, базисното измерване на лезиите беше извършвано във възможно най-кратък срок преди започване на химиотерапия, не по-голям от 4 седмици.

По принцип набирането на пациентки с мерима лезия е по-трудно, тъй като при МРГ най-често са немеримите лезии, особено в кости. Ето защо някои от тях са все още в процес на проследяване.

**Контролна група.** Като контроли за целите на експресионния анализ бяха използвани общо 12 здрави жени доброволци (5 пременопаузални и 7 здрави постменопаузални), без анамнеза за прекаран карцином на гърдата. Здравите жени също получиха информация за изследването и подписаха информирано съгласие. От тях

еднократно бяха взети кръвни проби, които са обработени аналогично на пациентите за изолиране на ЦТК, респективно мРНК и синтез на кДНК. Част от тази ДНК бе използвана като отрицателна контрола при експресионните анализи, а останалата бе съхранена в биобанката на Центъра по молекулярна медицина (ЦММ).

#### 5.4.2 Лечение и проследяване на пациентките според установените правила и препоръки.

Пациентките бяха лекувани в съответствие с приетите норми, че при метастазирало заболяване може да се провежда хормоно- или химиотерапия. Химиотерапия се започва при голям туморен обем, засягане на жизнено важни органи или нужда от бърз отговор. Първа линия химиотерапия при пациентки, получаващи антрациклини в адювантен аспект се базира на таксан (обикновено Docetaxel). В случаите, в които антрациклин не е получаван, I линия е базирана на антрациклин (FEC) по схема. Средният период на проследяване на пациентките е 6 месеца. Химиотерапевтичните схеми, които са ползвани основно са:

- FEC (Epirubicin 90 mg/m<sup>2</sup>, 5-Fluorouracil 500 mg/m<sup>2</sup>, Cyclophosphamid 500 mg/m<sup>2</sup>) прилаган на ден 1 от 21 дневен цикъл;
- Docetaxel 75 mg/m<sup>2</sup> прилаган на ден 1 от 21 дневен цикъл;

Поради проявена токсичност при някои от болните, основно миелосупресия се наложи инфузиите да се разреждат, като съответно някои курсове се приложиха през 28 дни. При една от пациентките (СТС\_018) онкокомитетът взе решение, че поради биологията на тумора е по-уместно да се приложи схемата:

- Paclitaxel 80 mg/m<sup>2</sup> прилаган като инфузии на дни 1, 8, 15 + Bevacizumab прилаган на дни 1, 15 от 21-дневен цикъл;

При друга пациентка (СТС\_007) е наличен само иноперабилен локален рецидив, който може да се измерва и оценява за ефект. При нея бе решено, че най-подходящо ще е лечение по схема:

- Vinorelbine 20 mg/m<sup>2</sup>, прилаган като седмични инфузии + Cisplatin 75 mg/m<sup>2</sup> прилаган на ден 1 от 21 дневен цикъл.

Две от пациентките страдат от съпътстващи сърдечно-съдови заболявания и при тях се предпочетоха схеми с ниска кардиотоксичност:

- Capecitabine 2x1250 mg/m<sup>2</sup> дневно ПО, дни 1-14. от 21-дневен цикъл (при СТС\_018)
- CMF (Metotrexate 40 mg/m<sup>2</sup>, Cyclophosphamide 600 mg/m<sup>2</sup>, 5-Fluorouracil 600 mg/m<sup>2</sup>) приложен на ден 1 от 21-дневен цикъл (СТС\_011).

#### 5.4.3 Резултати от качествения анализ на ЦТК

Оценката на нивата на ЦТК се извършва в три точно дефинирани точки: Установява се базисно ниво на ЦРК при: 1) диагностициране на метастазирало заболяване, преди започване на първа линия химиотерапия, 2) след провеждане на III курс химиотерапия – ден 63 от началото на терапията, и 3) след провеждане на VI курс химиотерапия – ден 126 от началото на терапията.

На всички пациентки беше събрана венозна кръв преди започване на химиотерапията за установяване на изходните нива на туморните маркери GA733-2,

Мус-1 и Her-2. Резултатите са показани на таблица 49. На всяка от 12 здрави контроли беше взета венозна кръв и тествана за наличие на някой от маркерите. Всички здрави контроли бяха отрицателни по отношение на трите маркера за ЦТК.

**Таблица 49. Резултатите от проведения качествен анализ на пациентите преди започване на съответната схема химиотерапия.**

Проба ID	GA733-2	Мус-1	Her-2
СТС_001_01	не	не	не
СТС_002_01	не	не	не
СТС_003_01	не	не	не
СТС_004_01	+	+	не
СТС_005_01	+	+	не
СТС_006_01	не	не	не
СТС_007_01	не	не	не
СТС_008_01	+	+	не
СТС_009_01	+	+	+
СТС_010_01	не	не	не
СТС_011_01	не	не	не
СТС_012_01	+	не	не
СТС_013_01	не	не	не
СТС_014_01	+	не	не
СТС_015_01	не	не	не
СТС_016_01	не	не	не
СТС_017_01	+	+	не
СТС_018_01	+	+	+
СТС_019_01	не	не	не
СТС_020_01	не	не	не
СТС_021_01	не	не	не
СТС_022_01	не	не	не
СТС_023_01	не	не	не
СТС_024_01	не	не	не
СТС_025_01	+	+	+
СТС_026_01	не	не	не
СТС_027_01	не	не	не
СТС_028_01	не	не	не
СТС_029_01	не	не	не
СТС_030_01	не	не	не
СТС_031_01	не	не	не
СТС_032_01	+	+	+
СТС_033_01	не	не	не
СТС_034_01	не	не	не
СТС_035_01	не	не	не
СТС_036_01	не	не	не
СТС_037_01	не	не	не
СТС_038_01	не	не	не
СТС_039_01	не	не	не
СТС_040_01	не	не	не

СТС_041_01	не	не	не
СТС_042_01	не	не	не
СТС_043_01	не	не	не

Съгласно инструкциите на производителя AdnaGen китът, който е използван за извършване на анализа, една пациентка се смята за позитивна спрямо наличието на циркулиращи туморни клетки ако показва експресия на поне един от трите маркера с позитивен резултат. При анализа на резултатите направени за изходното изследване на пациентките се установи, че 10 от тях (23.3 %) са позитивни за циркулиращи туморни клетки, като всички са позитивни за маркера GA733-2 (23%), 8 пациентки (18.6%) са позитивни за маркера MUC-1, а 4 от тях са позитивни за маркера Her-2 (9.3%).

От събраната клинична информация (Раздел „Материали и методи точка 4.4.1) има данни за Her-2 статуса на първичния тумор, които позволяват да се сравни профила за маркера на първичния тумор и на циркулиращите туморни клетки произлезли от него. При направения анализ на статуса на Her2 в първичния тумор и този на ЦТК на пациентките, за които има информация за първичния тумор (37 от 43, 86 %) се установи следното:

- 2 пациентки- СТС\_009 и СТС\_032 имат Her-2 негативен хистологичен резултат на първичния тумор, но имат Her-2 позитивен статус на ЦТК;
- 13 пациентки имат Her-2 позитивен хистологичен резултат на първичния тумор, но имат Her-2 негативен статус на ЦТК;
- 21 пациентки (58.1%) имат Her-2 негативен хистологичен резултат на първичния тумор и имат Her-2 негативен статус на ЦТК;
- 1 пациентка има Her-2 позитивен хистологичен резултат на първичния тумор и Her-2 позитивен статус на ЦТК;
- 6 пациентки нямат данни за Her-2 на първичния тумор и са изключени от сметките

След започване на първата линия химиотерапия беше събрана венозна кръв (второ посещение означено със „СТС\_пациент №\_02“ от 25 от проследяваните пациентки, като по време на курса химиотерапия не бяха проследени поради смъртта им общо 6 пациентки, а на останалите 12 не беше взета венозна кръв по други причини. Резултатите за нивата на туморните маркери GA733-2, Muc-1 и Her-2 и обективния отговор са показани на Таблица 50.

**Таблица 50. Резултатит от проведения качествен анализ на пациентите след започване на съответната схема химиотерапия.**

Проба ID	Обективен отговор*	GA733-2	Muc-1	Her-2	Химиотерапия
СТС_001_02	Stable Disease	не	не	не	FEC
СТС_002_02	Partial Response	не	не	не	Docetaxel
починала	-	-	-	-	FEC
СТС_004_02	Stable Disease	не	не	не	FEC
СТС_005_02	Partial Response	не	не	не	FEC
ND	-	-	-	-	FEC
СТС_007_02	Stable Disease	не	не	не	Vinorelbine, cisplatin
СТС_008_02	PROG	не	не	не	FEC

ND	-	-	-	-	FEC
починала	-	-	-	-	FEC
CTC_011_02	Partial Response	не	не	не	CMF
починала	-	-	-	-	Docetaxel
CTC_013_02	Stable Disease	не	не	не	FEC
ND	-	-	-	-	Docetaxel
ND	-	-	-	-	Capecitabine
CTC_016_02	Partial Response	не	не	не	Docetaxel
CTC_017_02	Partial Response	не	не	не	FEC
CTC_018_02	-	не	не	не	Paclitaxel, avastin
CTC_019_02	-	не	не	не	Paclitaxel, avastin
CTC_020_02	-	+	+	+	Docetaxel, Herceptin
CTC_021_02	-	не	не	не	Docetaxel
ND	-	-	-	-	FEC
ND	-	-	-	-	FEC
CTC_024_02	-	+	+	не	Paclitaxel, avastin
починала	-	-	-	-	N/A
CTC_026_02	-	не	не	не	N/A
CTC_027_02	Partial Response	не	не	не	N/A
CTC_028_02	-	не	не	не	N/A
CTC_029_02	PROG	не	не	не	N/A
ND	-	-	-	-	N/A
CTC_031_02	-	не	не	не	N/A
CTC_032_02	-	не	+	не	N/A
CTC_033_02	-	не	не	не	N/A
CTC_034_02	-	не	не	не	N/A
починала	-	-	-	-	doxorubicin, Cyclophosphamide
починала	-	-	-	-	Paclitaxel
ND	-	-	-	-	Docetaxel, herceptin
CTC_038_02	Stable Disease	не	не	не	docetaxel, taxan
ND	-	-	-	-	FEC
ND	-	-	-	-	FEC
ND	-	-	-	-	FEC-T, Docetaxel

CTC_042_02	Partial Response	не	не	не	Docetaxel, herceptin, pertusumab
ND	-	-	-	-	FEC

**\* Обективен отговор (ОО):** Определя се по критериите за оценка на отговора при солидни тумори (RECIST) след извършване на КТ.

**Критерии за обективен отговор:**

**Пълна ремисия (ПР) (Complete Response (CR)):** Изчезване на всички мерими и немерими лезии.

**Частична ремисия (ЧР) (Partial Response (PR)):** Намаляване на сумата от НДД с минимум 30% спрямо базисната оценка; липсва прогресия на немеримите лезии.

**Стабилизирано заболяване (СЗ) (Stable Disease (SD)):** Липсва достатъчно свиване на меримите лезии, за да се дефинира ЧР, както и достатъчно увеличение, за да се дефинира ПЗ; няма нови лезии; няма прогресия недвусмислена прогресия на немеримите лезии.

**Прогресиращо заболяване (ПЗ) (Progressive Disease (PROG)):** Увеличаване на сумата от НДД на меримите лезии с поне 20% спрямо най-малката измерена сума на НДД, постигната след започване на лечение; поява на една или повече нови лезии; недвусмислена прогресия на немеримите лезии.

Резултатите от проведения качествен анализ на 25 (58%) пациентки на второ посещение ни показаха, че спрямо маркера GA733-2 23 от тях 23 (92%) са негативни и 2 (8%) са позитивни. Спрямо маркера MUC-1 22 (88%) са негативни и 3 (12%) са позитивни (Таблица 51). За статуса на Her-2 резултатите показаха, че само 1 пациентка е позитивна, а останалите 24 (96 %) са негативни. Циркулиращи туморни клетки се откриват при общо 3 от изследваните болни. Пациентка CTC\_020\_02 е позитивна и за трите маркера, пациентка CTC\_024\_02 е позитивна за GA733-2 и MUC-1, а CTC\_032\_02 е позитивна само за MUC-1.

При направеното сравнение между първите проби на болните и второто им посещение се установи, че CTC\_020\_02 и CTC\_024\_02 са били първоначално негативни и по трите маркера, но при второто вземане на кръв се появяват ЦТК. CTC\_032\_02 остава позитивна за наличието на ЦТК, но при второто посещение се наблюдава редуция в броя на експресирания маркери - само MUC-1. Всички останали пациентки не показват наличие на ЦТК на второ посещение, като при 20 се запазва негативния статус, а при 5 от болните изчезват откритите преди започване на химиотерапия експресионни маркери маркери и съответно ЦТК (CTC\_004, CTC\_005, CTC\_008, CTC\_017 и CTC\_018).

Измерванията на обективния отговор към лечението, към момента на на пробите от второ посещение беше възможно да бъде направено за 14 пациентки, за които разполагахме с достатъчно информация (Таблица 51). От тях няма такива, които да са показали пълна ремисия на туморите и съответно терапията продължава. Показали частична ремисия са 7 (50%), със стабилизирано заболяване - 5 (35.7%) и с прогресиращо заболяване са 2 (14.3%) от пациентките.

След започване на втора линия химиотерапия беше събрана венозна кръв (трето посещение, означено със „CTC\_пациент №\_03“ от 16 от проследените пациентки на второ посещение, като по на този етап не бяха проследени, поради смъртта им при първа или преди втора линия химиотерапия общо 8 пациентки, а на останалите 8 не беше взета венозна кръв по други причини. Резултатите за нивата на туморните маркери GA733-2, Muc-1 и Her-2 и обективния отговор са показани на Таблица 51.

**Таблица 51. Резултатите от проведения качествен анализ на пациентите след започване на съответната схема химиотерапия.**

Проба ID	Обективен отговор*	GA733-2	Muc-1	Her-2	Химиотерапия
СТС_001_03	Stable Disease	не	не	не	Docetaxel
СТС_002_03	Partial Response	не	не	не	Docetaxel
починала	-	-	-	-	-
СТС_004_03	Stable Disease	не	не	не	-
СТС_005_03	-	не	не	не	FEC
ND	-	-	-	-	-
СТС_007_03	-	не	не	не	-
СТС_008_03	PROG	+	+	не	Docetaxel
починала	-	-	-	-	-
починала	-	-	-	-	-
СТС_011_03	Partial Response	не	не	не	Docetaxel
починала	-	-	-	-	-
СТС_013_03	-	не	не	не	-
ND	-	-	-	-	-
ND	-	-	-	-	-
СТС_016_03	-	не	не	не	-
СТС_017_03	-	не	не	не	-
СТС_018_03	-	не	не	не	-
СТС_019_03	-	не	не	не	-
ND	-	-	-	-	-
СТС_021_03	-	не	не	не	-
ND	-	-	-	-	-
ND	-	-	-	-	-
починала	-	-	-	-	-
починала	-	-	-	-	-
ND	-	-	-	-	-
ND	-	-	-	-	-
СТС_028_03	-	не	не	не	-
ND	-	-	-	-	-
ND	-	-	-	-	-
СТС_031_03	-	не	не	не	-
СТС_032_03	-	не	+	не	-
ND	-	-	-	-	-
ND	-	-	-	-	-
починала	-	-	-	-	-
починала	-	-	-	-	-
ND	-	-	-	-	-

ND	-	-	-	-	capecitabine
ND	-	-	-	-	-
ND	-	-	-	-	-
ND	-	-	-	-	-
ND	-	-	-	-	-
ND	-	-	-	-	-

Резултатите от проведения качествен анализ на 16 (64%) пациентки на трето посещение показаха, че спрямо маркера GA733-2 23 от тях 15 (93.7%) са негативни и 1 (6.3%) е позитивна (Таблица 51). Спрямо маркера MUC-1 23 (92%) са негативни и 2 (8%) са позитивни (Таблица 51). За статуса на Her-2 резултатите показаха, че всички 25 пациентки са негативни. Циркуиращи туморни клетки се откриват при общо 2 от изследваните болни. Пациентка СТС\_008\_03 е позитивна по отношение експресията на два маркера - GA733-2 и MUC-1, а пациентка СТС\_032\_03 е позитивна само за MUC-1. При направеното сравнение между вторите проби на болните и третото им посещение се установи, че СТС\_08 при изходното изследване е била носителка на GA733-2 и MUC-1, които изчезват при лечението и при второто посещение, но на третото посещение се появяват отново. СТС\_032 запазва позитивния статус за маркера MUC-1 през трите посещения (Фигура 33). Този резултат е показателен за неуспеха на приложената терапия и корелира с установената прогресия на заболяването след трети курс на химиотерапия (Таблица 51). Ето защо проследяването на нивата на ЦТК в хода на терапия е от изключително важно значение за оценка на терапевтичния режим и е подкрепено от редица проучвания, свързани с МРГ (6-11).

Измерванията на обективния отговор към лечението в момента на взимане на пробите от трето посещение беше направено за 5 пациентки, за които разполагахме с необходимата информация. От тях няма такива, които да са показали пълна ремисия на туморите и съответно терапията продължава. Показали частична ремисия са 2 (40%), със стабилизирано заболяване са 2 (40%) и с прогресиращо заболяване са 1 (20%). При сравнението, което направихме за оценката на обективния отговор към терапията при второто и третото посещение на болните се установи, че няма промяна в отговора към терапията. СТС\_008\_03 продължава да прогресира, което се подкрепя и от повторната поява на ЦТК. Най-добрият обективен отговор е най-добрият отговор, постигнат от началото на проучването до момента на прогресия. Пациентки с общо влошаване на обективния статус, изискващо преустановяване на химиотерапията без да е документирана прогресия на заболяването се класифицират, като “симптоматично прогресирали”.

За пациентките бяха обобщени и пресметнати датата на диагнозата, дата на прогресия на заболяването, както и времето до прогресия, свободния от заболяване период и преживяемостта на пациентките според дата на тяхната смърт. Време до прогресия (ВП) е времето от започване на лечение с определен режим на химиотерапия до регистрирана прогресия. Обща преживяемост (ОП) е времето от диагностициране на метастазирало заболяване до датата на смъртта (Таблица 52).

**Таблица 52. Данни за диагноза, прогресия и преживяемост на пациентките с метастазирал карцином на гърдата.**

Проба ID	Дата на диагноза	Дата на прогресия	СЗП (мес)	Време до прогресия /месеци/	Дата на смърт	Преживяване /месеци/
СТС_001_01	11 авг 2011	11 авг 2011	0	0	ND	ND
СТС_002_01	23 авг 2010	24 окт 2011	14	14	20 юни 2014	46
СТС_003_01	15 юни 1986	9 янр 2012	307	307	12 март 2012	309
СТС_004_01	5 янр 2012	5 янр 2012	0	0	18 авг 2012	7
СТС_005_01	14 фев 2012	14 фев 2012	0	0	17 май 2013	15
СТС_006_01	29 юни 2003	21 март 2012	104	104	жива към 31 дек 2016	ND
СТС_007_01	15 юни 2007	22 март 2012	57	57	14 фев 2014	512
СТС_008_01	6 апр 2012	6 апр 2012	0	0	19 янр 2013	9
СТС_009_01	15 юли 1998	15 май 2012	166	166	6 март 2013	176
СТС_010_01	14 май 2009	24 юли 2012	38	38	30 сеп 2012	40
СТС_011_01	3 авг 2012	3 авг 2012	0	0	23 окт 2015	38
СТС_012_01	26 сеп 2012	26 сеп 2012	0	0	ND	ND
СТС_013_01	5 ноем 2012	5 ноем 2012	0	0	жива към 31 дек 2016	ND
СТС_014_01	27 сеп 2005	16 окт 2012	85	85	ND	ND
СТС_015_01	7 ноем 2012	7 ноем 2012	0	0	7 май 2015	30
СТС_016_01	30 май 2001	30 ноем 2012	134	134	жива към 31 дек 2016	ND
СТС_017_01	29 юни 2012	29 юни 2012	0	0	12 окт 2014	28
СТС_018_01	20 сеп 2010	4 дек 2012	27	27	16 фев 2014	41
СТС_019_01	19 окт 2009	15 дек 2012	39	39	29 ноем 2016	85

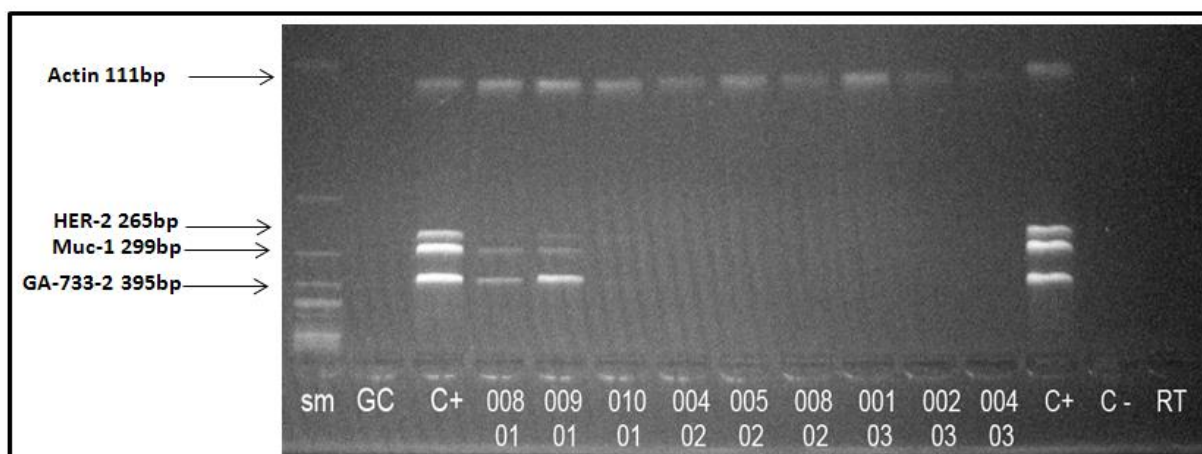
СТС_020_01	10 дек 2007	15 мар 2013	63	63	20 сеп 2014	45
СТС_021_01	2 май 2009	13 апр 2013	47	47	6 ноем 2016	90
СТС_022_01	10 май 2005	18 май 2013	96	96	жива към 31 дек 2016	ND
СТС_023_01	15 май 2013	15 май 2013	0	0	ND	ND
СТС_024_01	4 фев 2011	10 янр 2014	35	35	17 фев 2015	48
СТС_025_01	7 ноем 2011	15 юли 2014	32	32	24 апр 2014	29
СТС_026_01	29 ноем 2001	23 апр 2014	149	149	16 фев 2017	183
СТС_027_01	14 май 2014	14 май 2014	0	0	жива към 31 дек 2016	ND
СТС_028_01	12 юни 2012	13 мар 2014	21	21	16 юли 2015	37
СТС_029_01	29 ноем 2011	20 май 2014	30	30	жива към 31 дек 2016	ND
СТС_030_01	18 окт 2012	21 май 2014	19	19	21 юли 2015	33
СТС_031_01	01 фев 2009	3 юли 2014	65	65	ND	ND
СТС_032_01	24 юли 2014	24 юли 2014	0	0	жива към 31 дек 2016	ND
СТС_033_01	16 авг 2011	20 авг 2014	36	36	6 окт 2015	50
СТС_034_01	11 ноем 2002	7 окт 2014	143	143	жива към 31 дек 2016	ND
СТС_035_01	30 окт 1997	1 юли 2014	201	201	8 дек 2014	206
СТС_036_01	1 юни 2012	19 сеп 2014	27	27	13 ноем 2014	29
СТС_037_01	1 авг 2012	1 сеп 2014	23	23	18 юни 2015	34
СТС_038_01	21 янр 2008	29 окт 2014	81	81	жива към 31 дек 2016	ND
СТС_039_01	17 ноем 2014	3 дек 2014	72	72	29 март 2016	16

СТС_040_01	3 дек 2014	3 дек 2014	0	0	28 окт 2015	10
СТС_041_01	24 март 2011	6 ноем 2014	44	44	29 март 2016	60
СТС_042_01	1 дек 2013	4 дек 2014	12	12	8 май 2016	39
СТС_043_01	28 фев 2015	6 март 2015	1	1	ND	ND

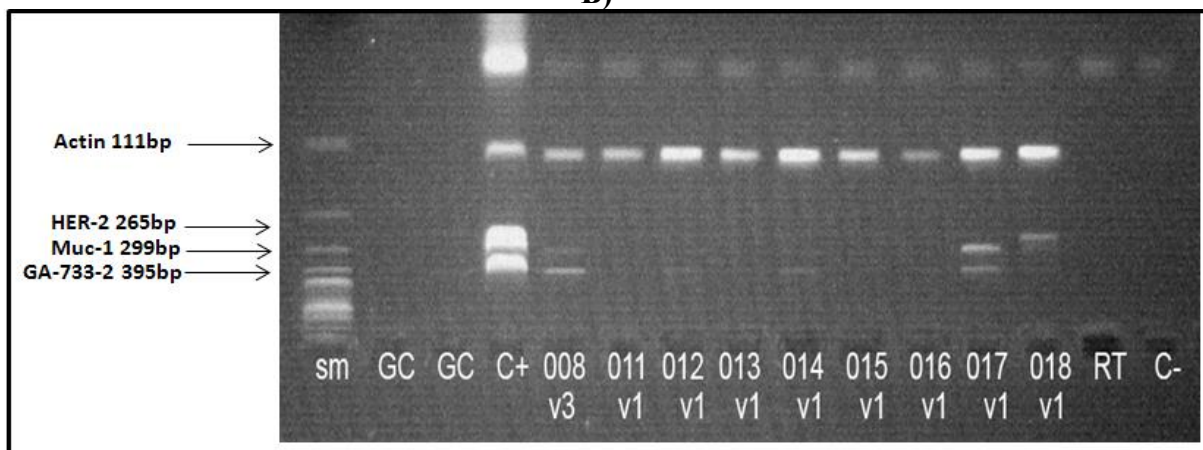
При 16 пациентки анализът бе напълно завършен в трите дефинирани по-горе точки: диагностициране на метастазирало заболяване, преди започване на първа линия химиотерапия; след провеждане на III курс химиотерапия; и след провеждане на VI курс химиотерапия. Останалите пациентки са или починали в хода на изследването или са в процес на терапия и проследяване към днешна дата. Това се дължи на високите изисквания по отношение наличието на мерима лезия, което затрудни набирането на подходяща група за изследване, тъй като при МРГ най-чести са немеримите лезии, особено в кости.

Визуализация на получените данни беше извършена на 4% агарозна електрофореза, оцветена с етидиев бромид. Резултатът от един такъв анализ е представен на Фигура 33. Пациентките се считат за позитивни по отношение наличието на ЦТК в циркулацията ако се детектира поне един от трите маркера. За определяне на качеството на анализа трябва да бъдат изпълнени три критерия: 1) вътрешната контрола - актин, трябва да присъства при всички проби на пациентите, което е индикация за успешно разделяне на клетките, успешна реакция на обратна транскрипция и мултиплексен PCR; 2) негативната контрола (C-) и контролата на обратната транскрипция (RT) не трябва да имат фрагменти по-големи от 80 б.дв (праймер димери); 3) фрагменти над 1 килобаза показват замърсяване с геномна ДНК.

A)

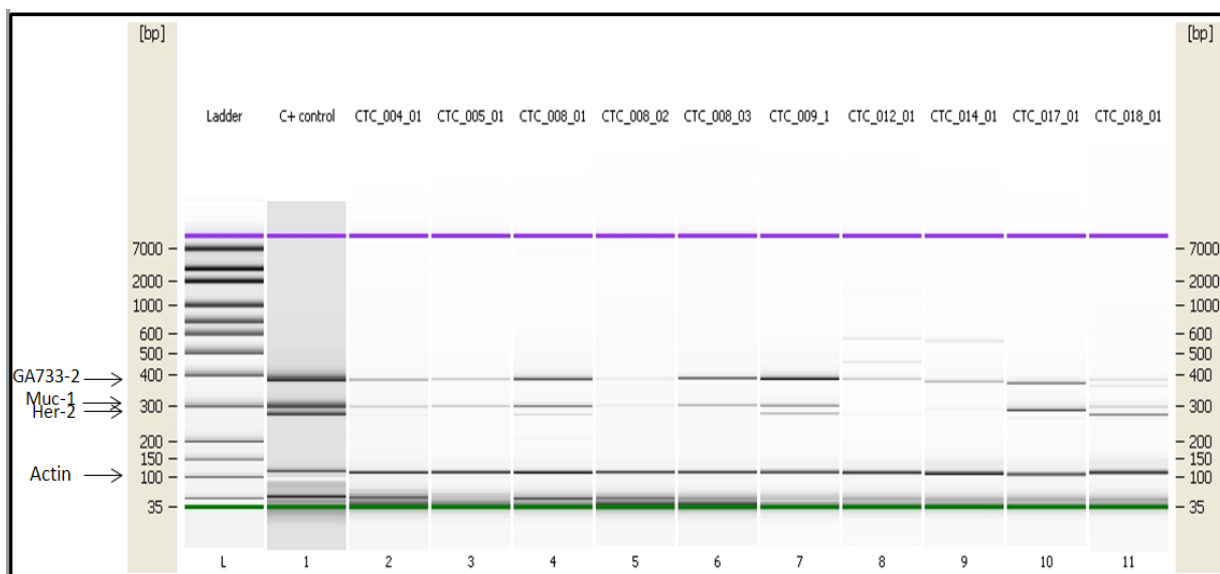


Б)



**Фигура 33. Качествен експресионен анализ за наличие на туморасоциирани маркери при пациентки с МРГ. Детекцията на туморните маркери, амплифицирани чрез *PrimerMix BreastDetect*, е осъществена с помощта на 4 % агарозна електрофореза при оцветяване с етидиев бромид. А). От ляво на дясно са показани експресионните профили на: пациентки СТС\_008, СТС\_009 и СТС\_010 при изходно изследване (01); СТС\_004, СТС\_005 и СТС\_008, след трети курс на химиотерапия (02); и СТС\_001, СТС\_002 и СТС\_004 след шести курс на химиотерапия (03). Б). От ляво на дясно - експресионни профили на пациентки: СТС\_008 след шести курс на химиотерапия (v3) и СТС\_011÷СТС\_018 при изходно изследване (v1). (SM) - маркери за размер; (C-) отрицателната контрола на PCR реакцията; (RT) - контролата на обратната транскрипция, (C+) - положителна контрола.**

Резултатите от електрофоретичния анализ, доказващ експресията на туморасоциирани маркери при позитивните за ЦТК пациентки бяха потвърдени чрез апарат Bioanalyzer 2100 (Agilent) и High Sensitivity DNA Kit, съгласно инструкциите на AdnaTest BreastCancerSelect и AdnaTest BreastCancerDetect китовете (Фигура 34). Agilent 2100 Bioanalyzer е микрофлуидна платформа за анализ на размера на ДНК фрагменти и количество и качествен контрол на ДНК проби. В комбинация с High Sensitivity DNA Kit, чувствителността на метода се повишава значително.



**Фигура 34. Потвърждаване експресията на туморасоциираниите маркери при част от позитивните за ЦТК пациентки с МРГ чрез апарат Bioanalyzer 2100 (Agilent). На фигурата са показани само позитивните за поне един от трите маркера ДНК проби, като и 9-те от тях са позитивни за GA733-2; 6 (СТС\_004, СТС\_005, СТС\_008, СТС\_009, СТС\_017 и СТС\_018) са позитивни за Muc-1, и 2 (СТС\_009 и СТС\_018) са позитивни за Her-2. Пробите, означени като СТС\_008\_01, СТС\_008\_02 и СТС\_008\_03 са три различни проби на пациентката СТС\_008, вземани в трите дефинирани точки според работната програма на проекта - при диагностицирането на заболяването (СТС\_008\_01), след три курса на химиотерапия (СТС\_008\_02) и след шест курса на химиотерапия (СТС\_008\_03). От фигурата се вижда, че пациентката първоначално дава позитивен резултат по два от маркерите- GA733-2 и Muc-1, след три курса на химиотерапия нивата на маркерите значително намаляват до стойности да бъдат отчетени като негативни, но с течение на времето отново дава положителен резултат по двата маркера, което е доказателство за предиктивното за стадия на заболяването значение на ЦТК.**

#### 5.4.4 Резултати от количествен анализ на експресията на молекулните маркери hMAM, СК-19, CD44 и CD24 в ЦТК от периферна кръв посредством Real Time RT-PCR

С провеждането на количествения анализ на експресията на молекулните маркери hMAM, СК-19, CD44 и CD24 в ЦТК (Фиг 35) от периферна кръв очаквахме да бъде установена корелация между нивата ЦТК, респективно нивата на експресия на hMAM, СК-19 и CD44 и Обективния отговор (ОО), Времето до прогресия (ВП) и Общата преживяемост (ОП) при пациентките с метастазирал рак на гърдата. Хипотезата за такъв дизайн се основава на предположението, че ЦТК могат да 1) са характерни за по-агресивен тип заболяване, т.е. имат прогностична и 2) предоставят информация на ранен етап за ефикасността на даден тип лечение, т.е. имат предикативна стойност.

Резултатите от проведения експресионен анализ за маркерите са представени в таблица 53. На таблицата е показано наличието (с ДА), липсата на експресия (с -) или

липсата на копиДНК проба с ЦММ (с N/D), при проследяване на пациентките. В таблицата не е включена информация за ендогенната контрола актин, тъй като тя е позитивна за всички анализирани порби. Резултатите от генно-експресионния анализ проведен и за здравите контроли не е представен, но при тях не се експресира нито един от маркерите с изключение на CD24. Поради този факт, в последствие беше анализирано статистически разликата в експресията на този маркер между болните и здравите участници (таблица 55).

✓ При нито един от пациентите или здравите контроли не беше налице експресия на маркера CD44.

✓ Експресия на другия маркер CD24 беше детектирана както при болните, така и при здравите контроли, но в различна степен - при 69.8 % (30/43) от пациентите на базисно ниво; 44 % (11/25) от пациентите, за които има налична проба на второ посещение след III курс терапия; 31.3 % (5/16) от пациентите, за които имат налична проба на трето посещение след IV курс терапия; при 75% (9/12) от здравите контроли също беше наблюдавана експресия на маркера.

✓ Експресия на маркер hMAM беше детектирана само при болните. При 16.3 % (7/43) от пациентите на базисно ниво; 4 % (1/25) от пациентите, за които има налична проба на второ посещение след III курс терапия; 18.8 % (3/16) от пациентите, за които имат налична проба на трето посещение след IV курс терапия.

✓ Експресия на маркер СК19 беше детектирана както само при болните. При 20.9 % (9/43) от пациентите на базисно ниво; 12 % (3/25) от пациентите, за които има налична проба на второ посещение след III курс терапия; 12.5 % (2/16) от пациентите, за които имат налична проба на трето посещение след IV курс терапия.

**Таблица 53. Обобщени резултати от проведения количествен анализ на избраната група пациенти.**

№ пациент	проследяване в хода на лечението											
	Базисно изследване _01				След III курс терапия _02				След IV курс терапия _03			
	CD24	CD44	hMAM	СК19	CD24	CD44	hMAM	СК19	CD24	CD44	hMAM	СК19
СТС_001	да	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
СТС_002	-	-	-	-	да	-	-	-	-	-	-	-
СТС_003	да	-	-	-	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
СТС_004	да	-	да	да	-	-	-	-	-	-	-	-
СТС_005	да	-	да	-	-	-	-	-	да	-	да	да
СТС_006	да	-	-	-	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
СТС_007	-	-	-	-	да	-	-	-	да	-	-	-
СТС_008	да	-	да	да	да	-	да	да	да	-	да	да
СТС_009	да	-	да	да	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
СТС_010	да	-	-	да	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
СТС_011	да	-	-	-	да	-	-	-	-	-	-	-
СТС_012	да	-	-	-	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
СТС_013	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

СТС_014	да	-	-	-	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
СТС_015	-	-	-	-	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
СТС_016	да	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
СТС_017	да	-	да	да	-	-	-	-	-	-	-	-
СТС_018	да	-	-	-	да	-	-	-	-	-	-	-
СТС_019	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
СТС_020	да	-	-	-	да	-	-	-	N/D	N/D	N/D	N/D
СТС_021	-	-	-	-	-	-	-	-	да	-	-	-
СТС_022	-	-	-	-	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
СТС_023	-	-	-	-	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
СТС_024	да	-	-	-	да	-	-	да	N/D	N/D	N/D	N/D
СТС_025	да	-	да	да	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
СТС_026	да	-	-	-	да	-	-	-	N/D	N/D	N/D	N/D
СТС_027	да	-	-	-	-	-	-	-	N/D	N/D	N/D	N/D
СТС_028	да	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
СТС_029	да	-	-	-	да	да	-	-	N/D	N/D	N/D	N/D
СТС_030	да	-	-	-	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
СТС_031	да	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
СТС_032	да	да	-	да	да	-	-	да	да	-	да	-
СТС_033	да	-	-	-	-	-	-	-	N/D	N/D	N/D	N/D
СТС_034	-	-	-	-	да	-	-	-	N/D	N/D	N/D	N/D
СТС_035	-	-	-	да	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
СТС_036	да	-	да	да	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
СТС_037	-	-	-	-	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
СТС_038	да	-	-	-	-	-	-	-	N/D	N/D	N/D	N/D
СТС_039	-	-	-	-	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
СТС_040	да	-	-	-	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
СТС_041	да	-	-	-	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
СТС_042	да	-	-	-	-	-	-	-	N/D	N/D	N/D	N/D
СТС_043	-	-	-	-	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D

На таблицата е показано наличието (с ДА), липсата на експресия (с -) или липсата на копиДНК проба с ЦММ (с N/D), при проследяване на пациентките. В таблицата не е включена информация за ендогенната контрола актин, тъй като тя е позитивна за всички анализирани порби. Резултатите от генно-експресионния анализ проведен и за здравите контроли не е представен, но при тях не се експресира нито един от маркерите с изключение на CD24. Поради този факт, в последствие беше анализирано статистически разликата в експресията на този маркер между болните и здравите участници (показано е по-надолу).

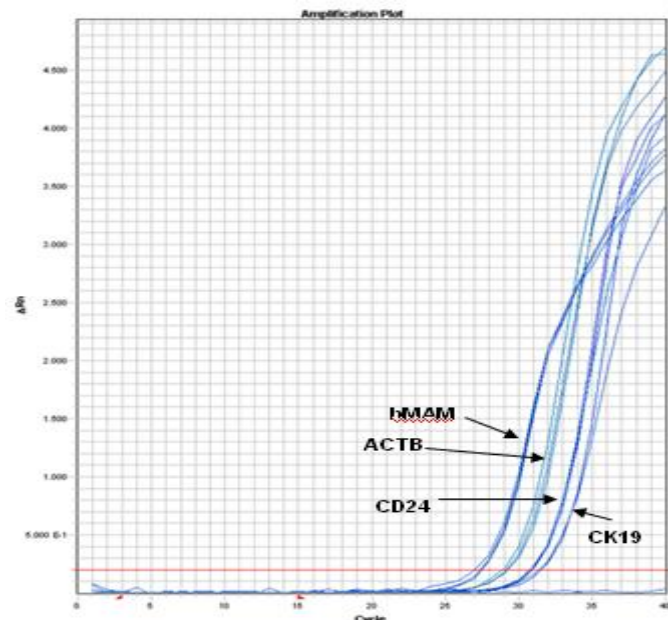
При пациентките, които имат само проба от изходното първо изследване 2 от тях са позитивни само за СК19 (СТС\_010 и СТС\_035), а други 3 са позитивни и за двата маркера (СТС\_009, СТС\_025, СТС\_036). От болните с липсващо трето посещение само 1 е позитивна за маркера СК19 (СТС\_024) и той се появява само на второ посещение-изходната проба е отрицателна. Интересни са пациентите СТС\_009, СТС\_025 и

СТС\_024. СТС\_009 и СТС\_025 освен, че са позитивни и за двата маркера те имат и положителен резултат за наличие на СТС от качествения анализ и по трите изследвани там маркера, а СТС\_024 е негативна за СК19 и hMAM на изходното изследване и негативна за наличие на СТС от качествения анализ, но на второто посещение е позитивна за СК19, но и за СТС.

При болните, за които имаше налична проба от второ и трето посещение и които са били позитивни за експресията на СК19 и hMAM се наблюдава динамика в експресията на маркерите (Таблица 54). Всяка от петте пациентки показва за изходното изследване наличие на поне един от маркерите (СТС\_005 и СТС\_032) или на двата маркера (СТС\_004, СТС\_008, СТС\_017) СК19 и hMAM. Всяка от тях е също така позитивна за минимум два от маркерите за качествен анализ на наличие на СТС.

**Таблица 54. Сравнителен анализ на качествен и количествен анализ на част от пациентките с метастатичен рак на гърдата.**

Проба ID	_01		_02		_03		_01	_02	_03
	hMAM	СК19	hMAM	СК19	hMAM	СК19	GA733-2/ Muc-1/ Her-2	GA733-2/ Muc-1/ Her-2	GA733-2/ Muc-1/ Her-2
СТС_004	да	да	-	-	-	-	да/да/-	-/-/-	-/-/-
СТС_005	да	-	-	-	ND	ND	да/да/-	-/-/-	-/-/-
СТС_008	да	да	да	да	да	да	да/да/-	-/-/-	да/да/-
СТС_017	да	да	-	-	-	-	да/да/-	-/-/-	-/-/-
СТС_032	-	да	-	да	да	-	да/да/да	-/да/-	-/да/-



**Фигура 35. Резултати от генната експресия на пациент СТС008\_01 чрез Real time PCR. Амплификационен плот за гените hMAM,CD24,СК19 и за ендогенната контрола CD24.**

За да се направи сравнение между нивата на експресия на CD24 между извадката от болни и здрави индивиди бяха направени калкулации включващи  $\Delta C_t$  (използвайки  $C_t$  стойностите получени от количествения анализ и  $C_t$  стойностите на бета актин като ендогенна контрола),  $\Delta\Delta C_t$  (като за калибратор и сравнение се ползват  $\Delta C_t$  на здравите контроли) и колко пъти е променена експресията в сравнение с тях (fold change или Relative Quantification-RQ) по формулата  $-1/2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Резултатите са показани на таблица 55.

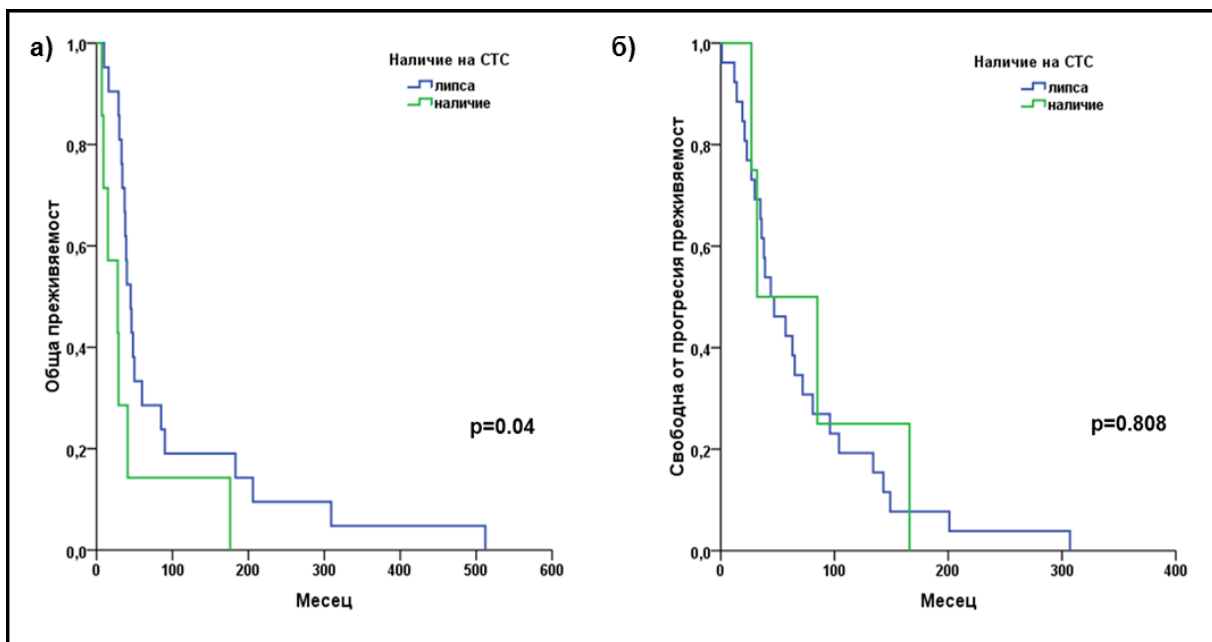
**Таблица 55. Резултати след провеждане на количествен RealTime qPCR анализ при всяко от трите посещения (съотв. \_01, \_02, \_03 на пациентите в хода на проекта) за всяка от числовите стойностите бяха пресметнати  $\Delta Ct$ ,  $\Delta\Delta Ct$  и RQ.**

№ пациент	$\Delta Ct$			$\Delta\Delta Ct$			RQ			P value		
	_01	_02	_03	_01	_02	_03	_01	_02	_03	_01	_02	_03
СТС_001	5,7	-	-	2,1	-	-	0,24	-	-	0,002		
СТС_002	-	4	-	-	0,4	-	-	0,75	-		0,261	
СТС_003	6,8	N/D	N/D	3,2	N/D	N/D	0,11	N/D	N/D	0,002		
СТС_004	2,5	-	-	-1,1	-	-	2,12	-	-	0,032		
СТС_005	2,5	-	4,9	-1,1	-	1,3	2,12	-	0,4			0,196
СТС_006	3,6	N/D	N/D	0	N/D	N/D	1,01	N/D	N/D	0,972		
СТС_007	-	3,1	5,3	-	-0,5	1,7	-	1,43	0,32			0,04
СТС_008	2	4,5	1,3	-1,6	0,9	-2	2,99	0,55	4,93	0,018	0,072	0,0003
СТС_009	3,3	N/D	N/D	-0,3	N/D	N/D	1,22	N/D	N/D	0,281		
СТС_010	2,6	N/D	N/D	-0,9	N/D	N/D	1,93	N/D	N/D	0,014		
СТС_011	4	1,4	-	0,4	-2,2	-	0,77	4,58	-			
СТС_012	3,7	N/D	N/D	0,1	N/D	N/D	0,93	N/D	N/D	0,727		
СТС_013	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
СТС_014	8,9	N/D	N/D	5,3	N/D	N/D	0,03	N/D	N/D	0,001		
СТС_015	-	N/D	N/D	-	N/D	N/D	-	N/D	N/D			
СТС_016	2,3	-	-	-1,3	-	-	2,44	-	-			
СТС_017	5,8	-	-	2,2	-	-	0,22	-	-			
СТС_018	8,8	5	-	5,2	1,4	-	0,03	0,39	-			
СТС_019	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
СТС_020	9,5	8,8	N/D	5,9	5,2	N/D	0,02	0,03	N/D	0,0003	0,0002	
СТС_021	-	-	5,7	-	-	2,1	-	-	0,23			0,19
СТС_022	6,2	ND	ND	2,6	ND	ND	0,17	ND	ND			
СТС_023	9	ND	ND	5,4	ND	ND	0,02	ND	ND	0,0002		
СТС_024	7	5,4	ND	3,4	1,8	ND	0,09	0,28	ND	0,001	0,028	
СТС_025	7,7	ND	ND	4,1	ND	ND	0,1	ND	ND	0,001		
СТС_026	9,3	ND	ND	5,7	ND	ND	0,02	ND	ND	0,0004		
СТС_027	6,2	-	ND	2,6	-	ND	0,2	-	ND	0,001		
СТС_028	7,6	-	-	4	-	-	0,1	-	-	0,012		
СТС_029	6,3	11	ND	2,7	6,9	ND	0,2	0,01	ND	0,004	0,0002	
СТС_030	3,6	ND	ND	0	ND	ND	1	ND	ND	0,883		
СТС_031	7,5	-	-	3,9	-	-	0,1	-	-			
СТС_032	5,3	4,7	ND	1,7	1,1	ND	0,3	0,5	ND	0,016	0,198	
СТС_033	3,6	5,7	ND	0	2,1	ND	1	0,2	ND			
СТС_034	-	ND	ND	-	ND	ND	-	ND	ND			
СТС_035	-	ND	ND	-	ND	ND	-	ND	ND			
СТС_036	5,7	ND	ND	2,1	ND	ND	0,2	ND	ND			
СТС_037	-	ND	ND	-	ND	ND	-	ND	ND			
СТС_038	7	-	ND	3,4	-	ND	0,1	-	ND			
СТС_039	-	ND	ND	-	ND	ND	-	ND	ND			
СТС_040	8,2	ND	ND	4,6	ND	ND	0,04	ND	ND	0,001		
СТС_041	6,2	ND	ND	2,6	ND	ND	0,2	ND	ND	0,003		
СТС_042	9,6	-	ND	6	-	ND	0,02	-	ND			
СТС_043	-	ND	ND	-	ND	ND	-	ND	ND			

Направените изчисления показват, че при първо посещение 16.3% (7/43) от пациентите не показват отклонения в нивата на експресия спрямо здравите контроли; 9.3% (4/43) от пациентките имат повишена, в сравнение със здравите контроли,

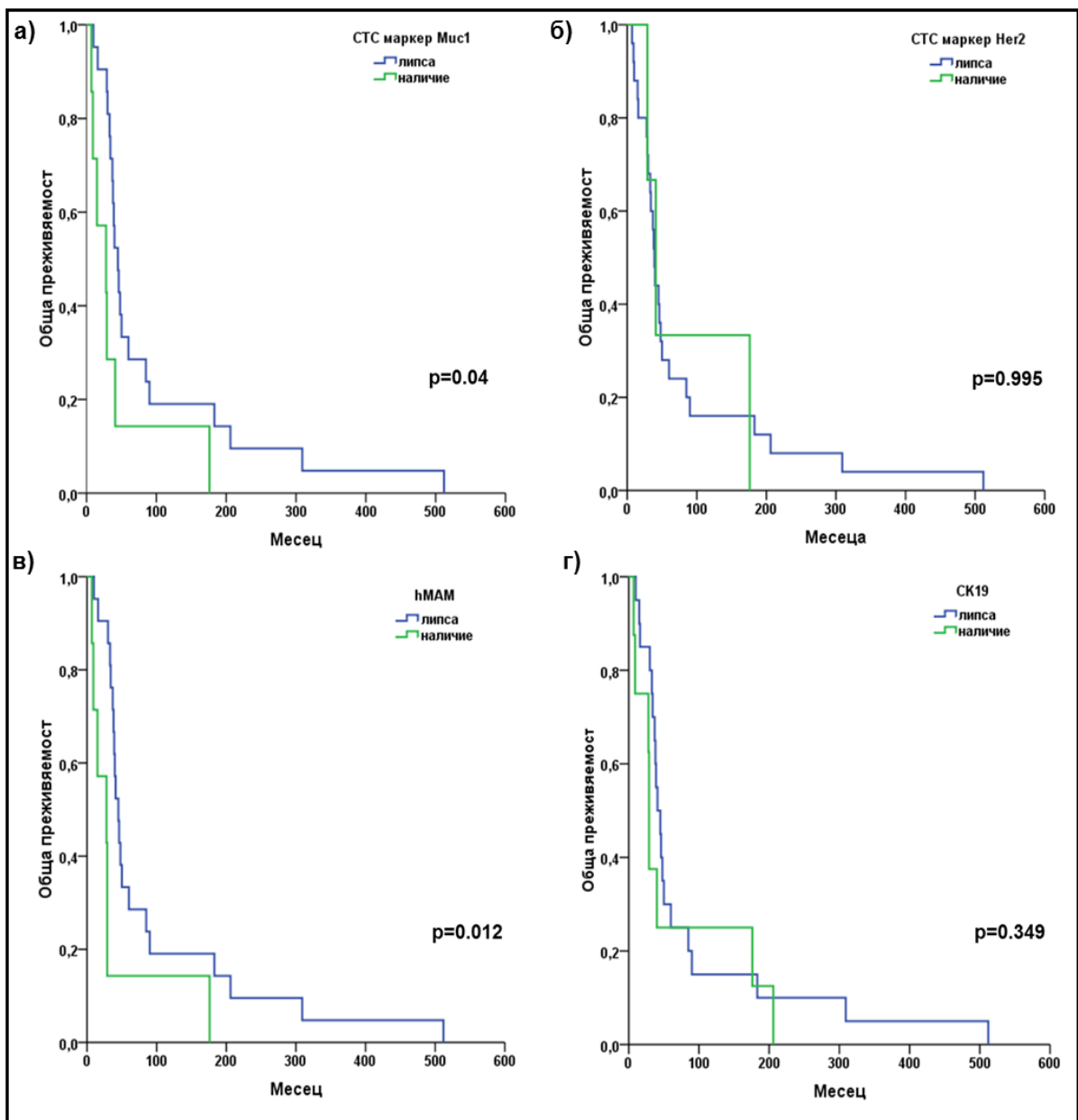
експресия или т.нар. fold upregulation на гена; при 48.8% (21/43) тя е fold downregulation или понижена в сравнение с контролите, а при останалите 25.6% (11/43) липсва експресия на гена CD24. Общо пациентите с фенотип CD24<sup>-low</sup> (74.4%) надвишават тези с непроменена или повишена експресия (25.6%), което е в съответствие с литературните данни.

От Kaplan-Meier графиките показани на фигура 36 се вижда, че наличието на циркулиращи туморни клетки при болни с метастазирал рака на гърдата има статистически значима разлика от тези без ЦТК при анализа за общата преживяемост и е свързано с по-лоша прогноза ( $p=0,04$ ). Средната преживяемост на пациентите с ЦТК е 28 г., а на тези без ЦТК е 45 г. При направения статистически анализ за свободната от заболяване преживяемост не беше открита статистически значима разлика ( $p=0,808$ ) между групите с и без ЦТК.

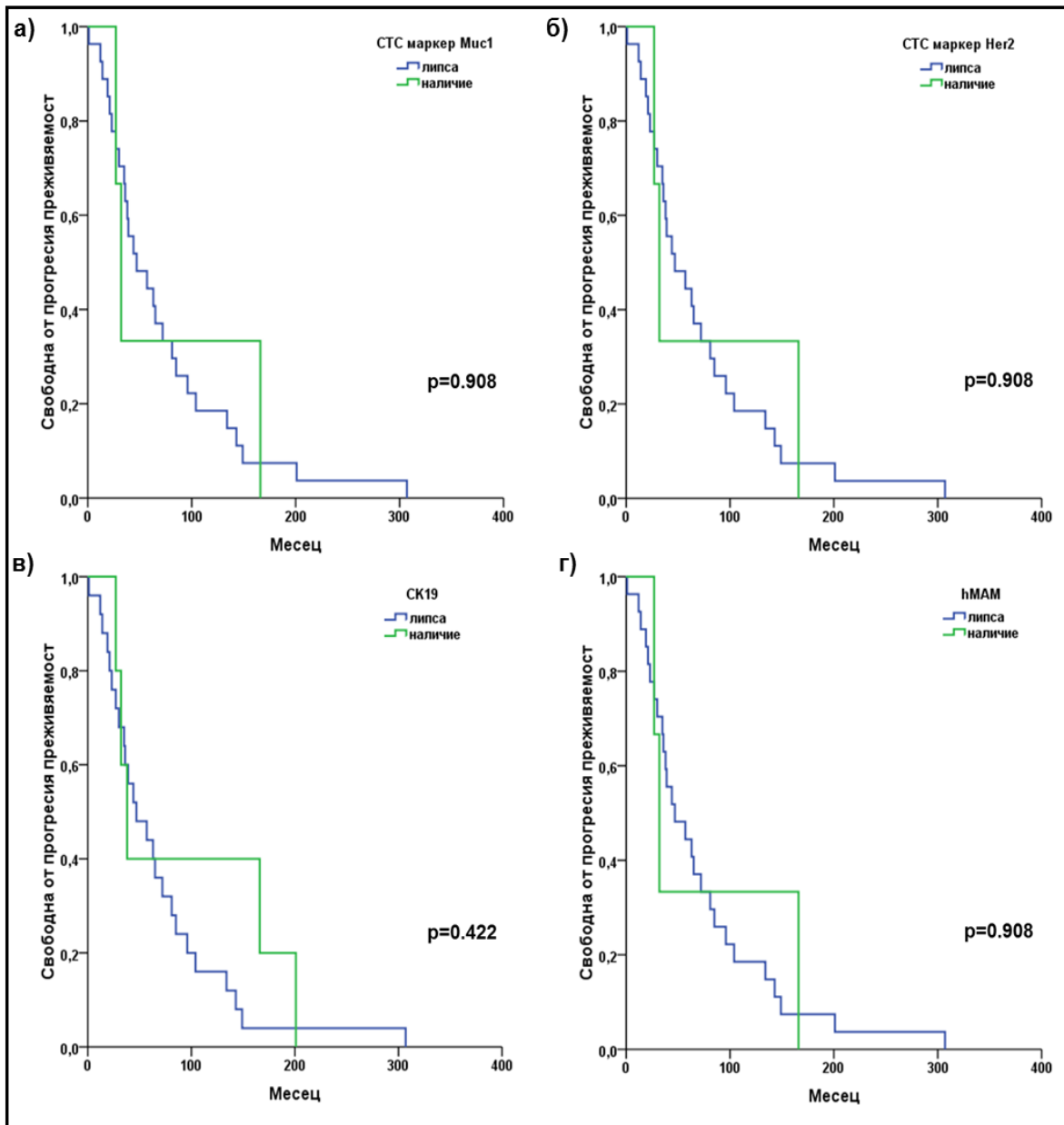


**Фигура 36. Kaplan-Meier графики отразяващи преживяемост и свободната от заболяване преживяемост на пациентите с тумори на гърдата в зависимост от наличието или липсата на ЦТК.**

Беше направен корелационен анализ за общата преживяемост (фиг 37) и свободната от заболяване преживяемост (фиг.38) на пациентите според експресията на маркерите Muc1 (а), Her2 (б), hMAM (в) и СК19 (г). Резултатите показват, че експресията на Muc1 ( $p=0,04$ ) и hMAM ( $p=0,012$ ) в ЦТК преди инициране на адювантна терапия са статистически значими и са показателни за по-ниска преживяемост. За маркерите Her2 и СК19 не беше открита статистически значима ( $p= 0,995$  и  $p= 0,349$  съотв.) разлика между групите с и без маркера.

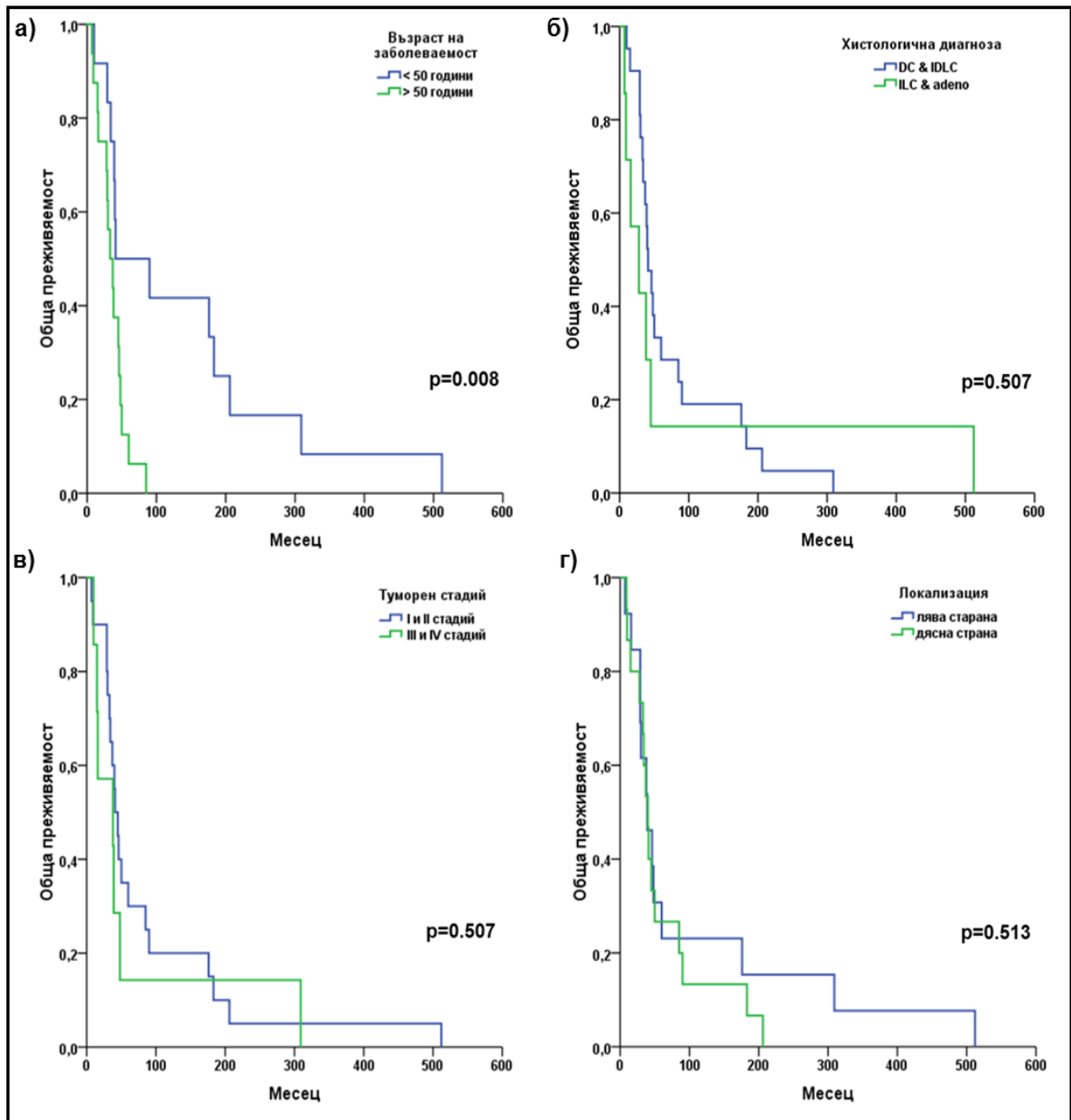


**Фиг 37** Kaplan-Meier графики отразяващи преживяемост на пациентите с тумори на гърдата в зависимост от експресията на маркерите Muc1 (а), Her2 (б), hMAM (в) и CK19 (г).



**Фигура 38. Kaplan-Meier графики отразяващи свободната от заболяване преживяемост на пациентите с тумори на гърдата в зависимост от експресията на маркерите Muc1 (а), Her2 (б), hMAM (в) и SK19 (г).**

Направен беше и анализ за преживяемостта на пациентите според клинични данни като възраст, хистологична диагноза, стадии и локализация на тумора (фиг 39). Статистически значим резултат показва възрастта, която е и единствения независим прогностичен фактор (таблица 56)



**Фигура 39. Kaplan-Meier графики отразяващи общата преживяемост на пациентите с тумори на гърдата в зависимост от възраст на пациентите (а), хистология (б), стадии(в) и локализация (г) на туморите.**

Беше използван Cox регресионен анализ с цел изграждане на модел изчисляващ рисковия коефициент за всеки от изследваните фактори. Всички фактори, показали прогностична стойност бяха индивидуално анализирани с помощта на унивариационния Cox регресионен анализ използващ long-rank теста. С негова помощ фактори като възрастта на заболяемост под 50 год. ( $p=0.027$ ), липсата на CTC маркери ( $p=0.047$ ), липсата на CTC MUC1 маркер ( $p=0.047$ ) и липсата на CTC hMAM маркер ( $p=0.016$ ) показаха по-добра прогностична стойност. За разлика от тях вида хистологична диагноза ( $p=0.604$ ), туморния стадий ( $p=0.509$ ), туморната локализация ( $p=0.515$ ) и наличието на CTC маркери HER2 и CK19 (съответно  $p=0.995$  и  $p=0.353$ ) не показаха статистическа значима връзка с прогнозата – Табл. 56

Факторите показали значима връзка с преживяемостта бяха подложени на Мултивариационен Cox регресионен анализ. С негова помощ бяха отграничени тези фактори, имащи независима прогностична стойност при изследваните пациенти. Мултивариационния регресионен анализ показва, че единствено възрастта има статистическа значимост като независими прогностични фактори, като той е предиктор за лоша преживяемост (HR=1.060, т.е. увеличаването с една година е съпроводено с влошаване на прогнозата на пациентите с 6.0 %).

**Таблица 56. Унивариационен и мултивариационен Cox регресионен анализ за корелация между характеристиките на пациентите и общата преживяемост**

	Унивариационен Cox регресионен анализ			Мултивариационен Cox регресионен анализ		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
Възраст (за година)	<b>1.041</b>	<b>1.005 - 1.079</b>	<b>0.027</b>	<b>1.060</b>	1.020 - 1.103	<b>0.003</b>
Хистологична диагноза DC&IDLC vs. ILC&adeno	1.279	0.505 – 3.236	0.604	*	*	*
Туморен стадий 1&2 vs. 3&4	0.743	0.307 - 1.796	0.509	*	*	*
Туморна локализация (лява vs. дясна)	0.771	0.353 - 1.686	0.515	*	*	*
наличие на CTC маркер # липса vs. наличие	<b>0.406</b>	<b>0.167 – 0.989</b>	<b>0.047</b>	*	*	*
наличие на CTC GA733-2 # липса vs. наличие	<b>0.406</b>	<b>0.167 – 0.989</b>	<b>0.047</b>	*	*	*
наличие на CTC MUC1 # липса vs. наличие	<b>0.406</b>	<b>0.167 – 0.989</b>	<b>0.047</b>	0.887	0.066 - 11.936	0.928
наличие на CTC HER2 липса vs. наличие	0.996	0.296 – 3.352	0.995	*	*	*
наличие на CTC СК19 липса vs. наличие	0.671	0.289 – 1.558	0.353	*	*	*
наличие на CTC hMAM липса vs. наличие	<b>0.329</b>	<b>0.133 – 0.815</b>	<b>0.016</b>	0.198	0.014 - 2.866	0.235
наличие на CD24 експресия понижена vs. норм/повишена	1.355	0.440 – 4.169	0.596	*	*	*

\* Показателят не е включен в мултивариационния анализ; # - двата показателя показват силна корелация по-между. HR – hazard ratio; CI – интервал на достоверност; p – p-стойност

Направения корелационен тест на Spearman показва, че наличието на ЦТК, GA733-2 и Muc1 показват статистически значима силна корелация (Таблица 57).

**Таблица 57. Spearman тест за корелации**

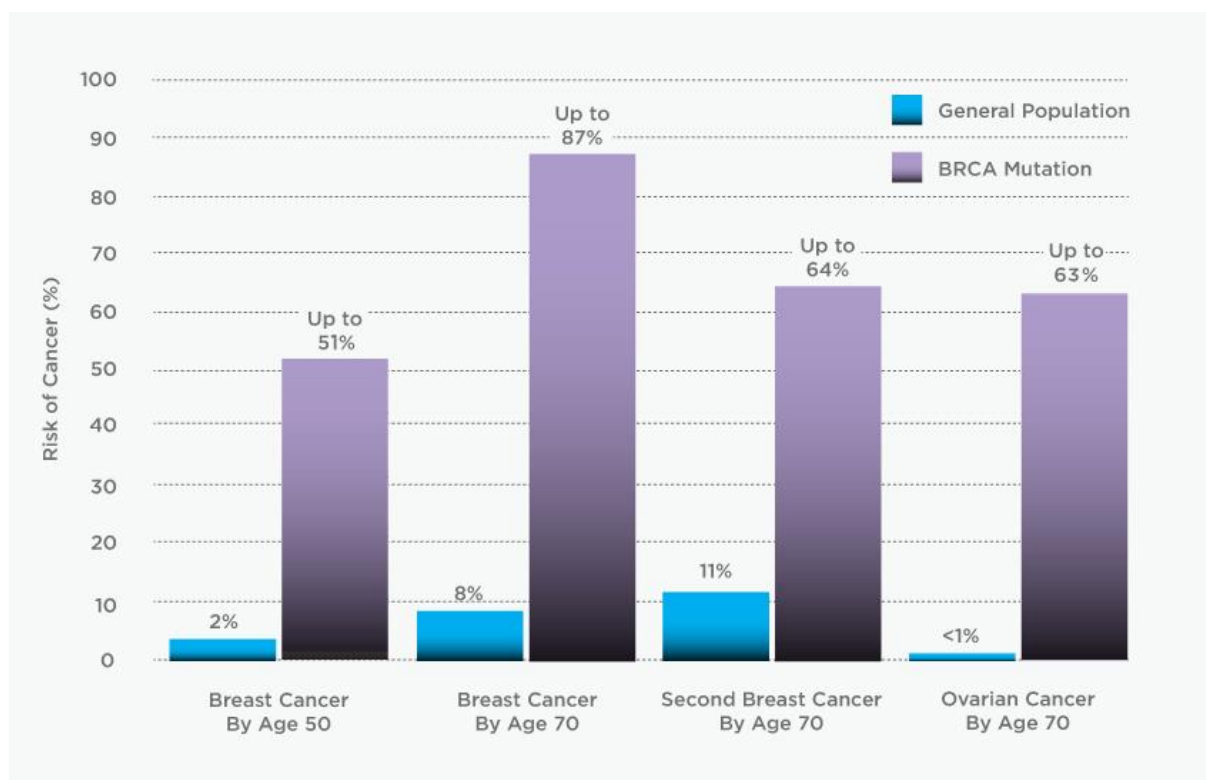
Spearman's rho		CTC_Muc1
	Корелационен коефициент	0,868**
CTC_Ga-733-2	p -стойност (2-tailed)	<0,001
	N	43

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

## VI. Обсъждане на получените резултати

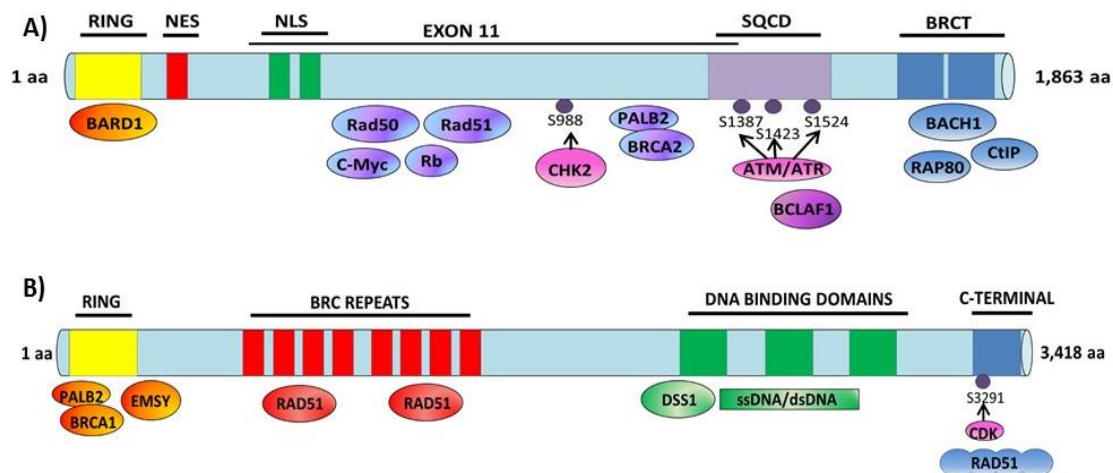
### 6.1 Валидиране на Ion Torrent PGM секвениране на гените BRCA1 и BRCA2

Герминативни мутации в BRCA1 и BRCA2 гените имат отношение към голяма част от наследствените форми на рак на гърдата и яйчниците. Носителите на патогенни мутации в тези гени имат изчислен доживотен риск от 45% до 87% за развитие на рак на гърдата и от 11% до 40% риск за рак на яйчниците (Фиг. 40) (149,150).



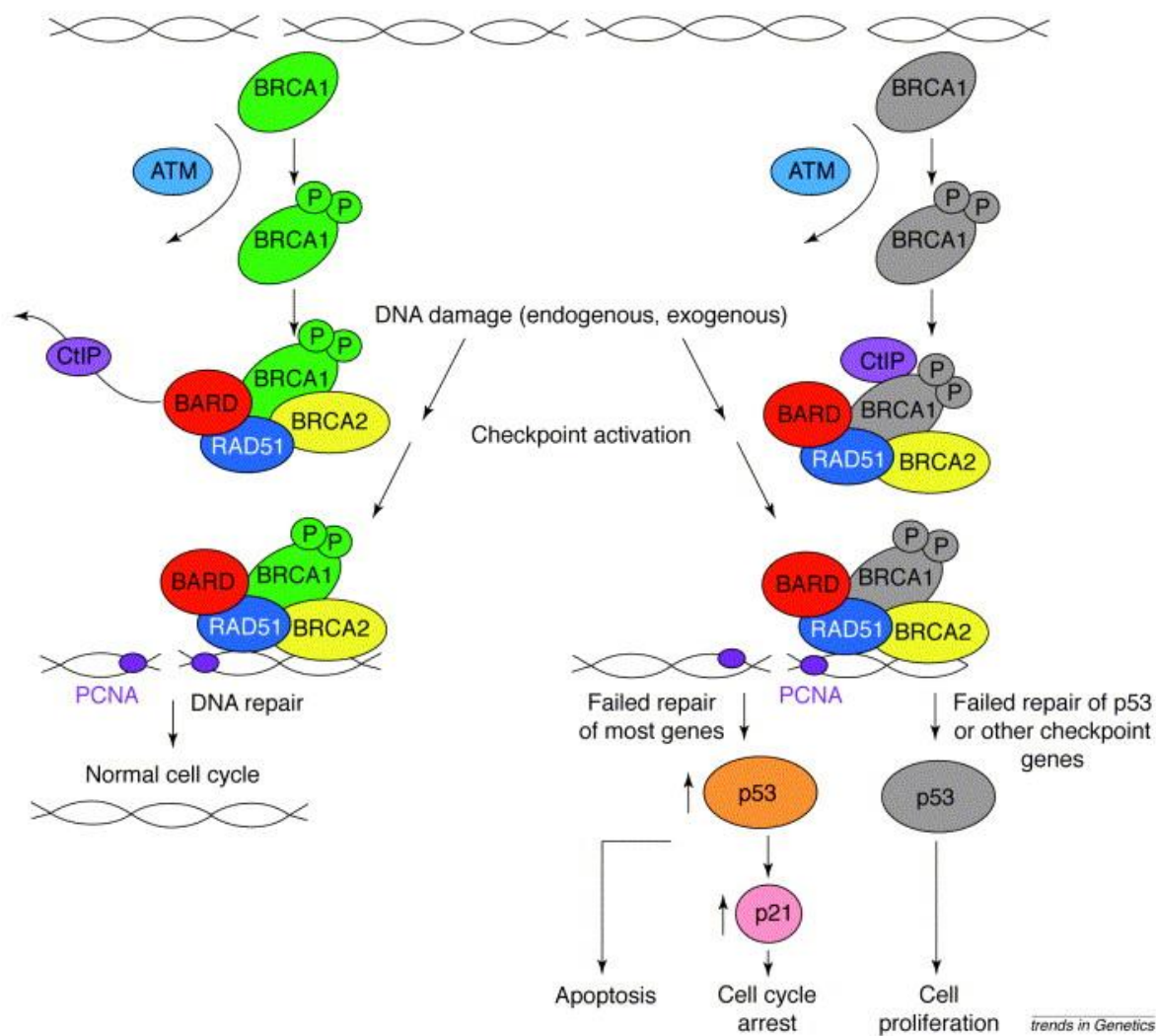
**Фигура 40.** Средно при 7% от пациентите с рак на гърдата причината за заболяването е мутация в BRCA1 или BRCA2 гена (151). Заболяването при пациентите с мутации в тези гени се нарича синдром на наследствен рак на гърдата и яйчника (Hereditary Breast and Ovarian Cancer (HBOC)) (152). Те имат до 87% риск за развитие на тумор в гърдата преди 70 години (153). Освен това носителите на мутации в двата гена и диагностицирани вече с рак на гърдата имат повишен риск от развитие на тумор и в другата гърда в бъдеще време (149,150).

BRCA1 и BRCA2 са туморсупресорни гени картирани в началото на 90-те години (154) и са със сложна геномна структура (Фиг. 41) (22). BRCA1 генът е картиран на дългото рамо на 17 хромозома (17q12.21) и е изграден от 24 екзона, докато BRCA2 генът е картиран върху дългото рамо на 13 хромозома (13q12.3) и е изграден от 27 екзона(22).



**Фигура 41. Структура и функционални партньори на BRCA1(A) и BRCA2 гена (B) (155).**

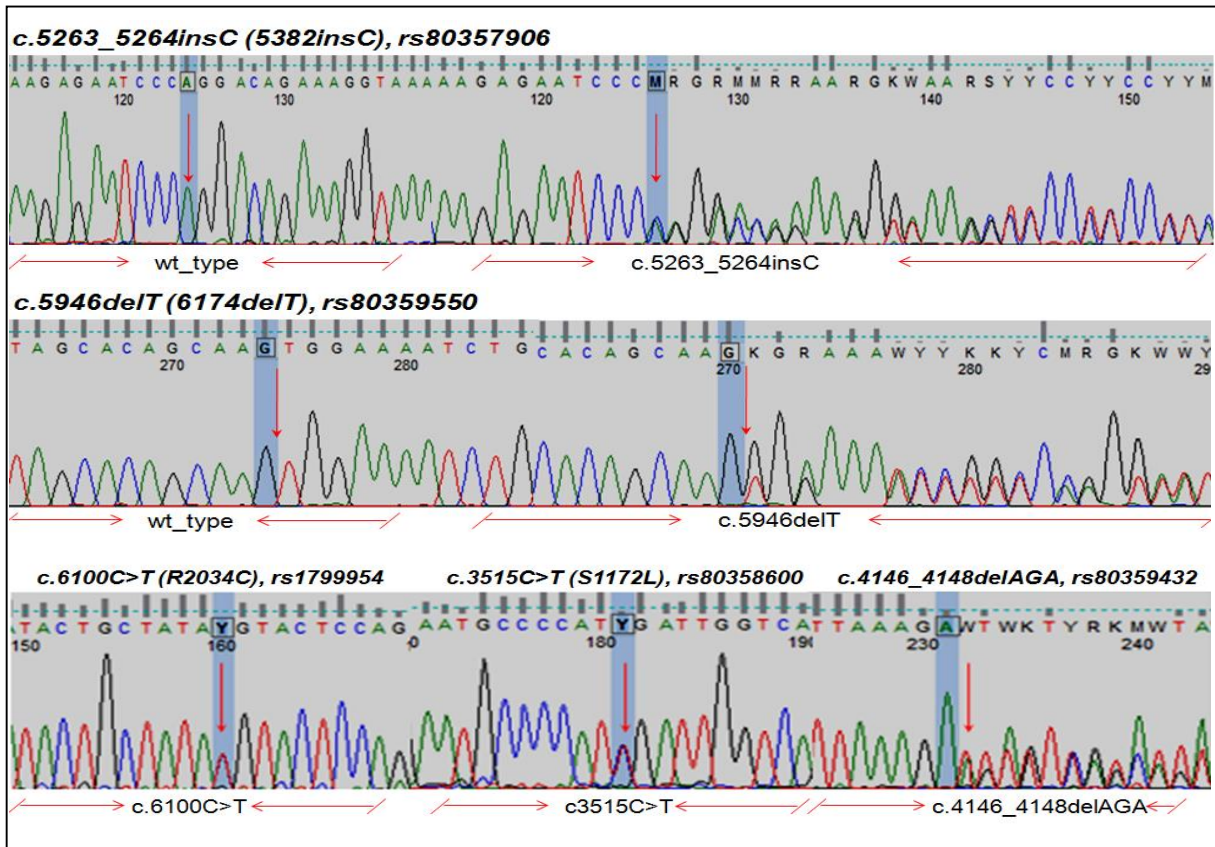
Ролята която играят BRCA1 и BRCA2 в поправката на двойноверижните скъсвания е различна. При нормално функциониране на BRCA1 и BRCA2 белтъците се формира комплекс от BRCA1, BRCA2, BARD и RAD51 (Фиг. 42) (156).Образуването на комплекса започва с фосфорилирането на BRCA1 от ATM. В отговор на ДНК повреда така формирания комплекс се премества върху хромозомния участък, подложен на ДНК репарация, който преди това е бил маркиран от PINA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) (157). Загубата на функция на BRCA1 и BRCA2 води до невъзможност за поправка на ДНК увредения участък и се нарушава експресията на гени, участващи в checkpoint контрола, като p53 и p21, което води до активирането на клетъчната пролиферация. Освен за поддържане на геномната стабилност BRCA1 и BRCA2 белтъците вземат участие в контрола на пролиферацията, репарацията, диференциацията и апоптозата. При мутация в тези гени се променя тяхната функция, което определя участието им в туморогенезата (158).



**Фигура 42. Роля на BRCA1 и BRCA2 гените в поправката на ДНК (157).**

Диагностичното секвениране на двата гена по принцип се базира на стандартна амплификация на екзони от двата гена и секвениране на продуктите по Sanger метода. Въпреки, че днес е възможно да бъде направено цялостно геномно и екзомно секвениране, при някои заболявания се предпочита таргетно (ампликонно) секвениране на специфичен ген и геномен регион, в който се намират горещи точки за болестотворни мутации. Таргетното ресеквениране позволява изследването само на група гени или определени райони в генома, което дава възможност да се фокусират време, разходи и ресурси за разчитане нуклеотидната последователност на тези участъци, които са най-интересни за изследователя. Таргетното секвениране позволява много по-добро покритие на интересувания ни геномен участък и елиминира голяма част от геномния анализ, с което се спестява време (36). Двата *BRCA* гена са известни с големите си размери, силната полиморфност и липсата на т.нар. горещи точки на мутиране. Ето защо те са подходящи кандидати, който да послужат за определяне на аналитичната способност на различните технологии за масивно паралелно секвениране за молекулярно-генетични и диагностични цели (45–47).

За да се направи оценка на ефективността на Ion Torrent PGM платформата при *BRCA1/2* мутационен скрининг, използвахме 10 пациента (тренировъчна група) с известен *BRCA* генетичен профили 48 пациента (валидационни групи) с неизвестен *BRCA* генетичен профил. Избраните пациенти бяха с установени инсерции, делеции и еднонуклеотидни замени, намиращи се както в кодиращите региони, така и в хомополимерни региони на гените. Двата гена са избрани като тестови, т.к. са с големи размери – 15 kВ общо на кодиращите последователности, освен това са силно полиморфни и имат множество хомополимерни региони (фиг. 43).



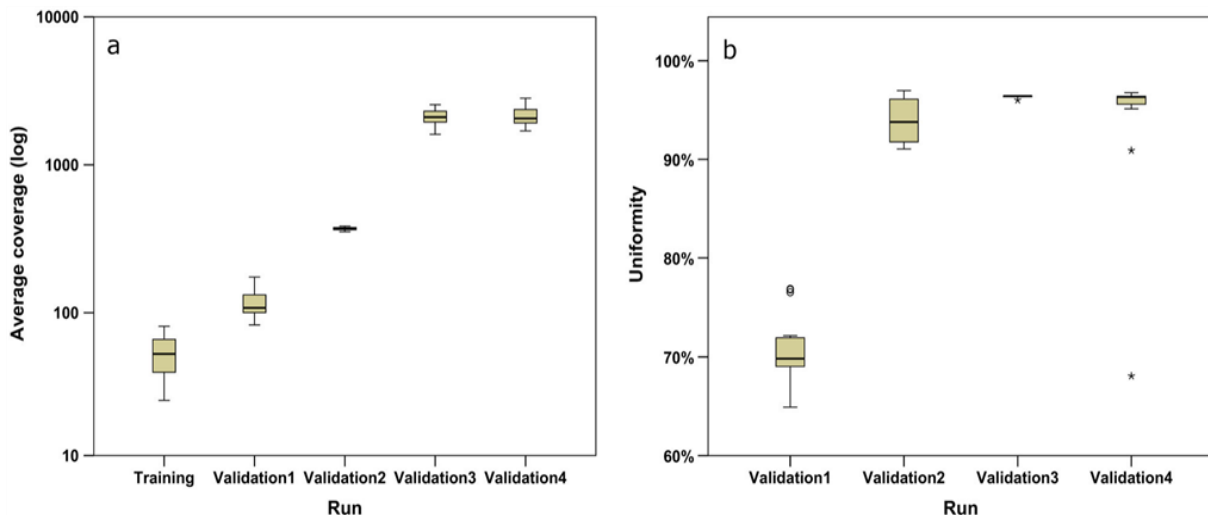
**Фигура 43. Електрофоретични профили на изследваните типове мутации, получени посредством директно секвениране**

Вариантите, заложи като тестови бяха от следните типове: 7 frameshift, 13 IVS, 12 missense, 10 CDS-synon и 2 UTR. Избраните контролни варианти за тестване на методиката са представени на (Таблица 36, „Резултати“).

### 6.1.1. Анализ на покритието и откриване на варианти

Настоящото изследване валидира тест за скрининг на мутации в тумор супресорите *BRCA1* и *BRCA2*. Платформата Ion Torrent PGM беше използвана за сравняване на тестова и валидационна група проби, както и за сравнение на два метода за подготовка на библиотеки. Беше установена аналитичната чувствителност и

специфичност на теста, както и повторемостта на резултатите, получени от платформата и използваните методи за анализ. Резултатите от отделните експерименти се различават значително по качество и производителност, поради разликите в протоколите за създаване на библиотеките, наложени най-вече от промените в химията на различните китове (фиг. 44) Въпреки това при всички експерименти бяха получени достатъчно данни за точно определяне на едно-нуклеотидни варианти, според предишни изследвания (48–50).



**Фигура 44. Сравнение на покритието (а) и еднаквостта на покритието (б) в различните анализи. Високото покачване на ефективността на секвенирането при валидационни групи 3 и 4 е видимо на (а). Повишената униформеност на AmpliSeq™ панела (последните 2 анализа) е видимо на (б).**

Всички сравнения на точността на определяне на вариантите бяха направени при покрития от 3x и 30x, а валидирането на избраните филтри беше извършено при покритие от 30x. Наблюдава се значително повишение в качеството на резултатите от секвенирането при преминаване към версия 2 на апаратурата и китовете за подготовка на библиотеки. Промените в апаратурата бяха наложени и от промените в протоколите, като последващите експерименти използваха апарата за емулсионен PCR One-Touch v2 и 316v2 чипове. Основни причини за по-високото покритие в тези експерименти бяха ниската поликлоналност, ниският процент на прочитите извън таргетните региони, както и равномерното покритие на панела. Въпреки че няма данни за равномерността на покритието за тестовия експеримент, предполагаме че тя не е надхвърлила 70%, тъй като подобни резултати бяха наблюдавани при валидационен експеримент 1, който беше извършен със същите праймери (Приложение 1 и 2).

Чувствителността (100%) и специфичността (98%) в нашето изследване са сравними с резултатите от други подобни проучвания- Costa и съавтори откриват вариантите с чувствителност 98.6% и специфичност 96.9% (48–50). Авторите показват, че за определяне на всички генетични варианти (единични промени и indel) със сигурност, достатъчна за диагностично приложение, е нужно покритие от 130x (48–50). Поради интегрирането на нови китове за подготовка и подобрени версии на оборудването, нашето проучване дава възможност да се сравни качеството на определяне на вариантите при различни нива на ефективност на секвенирането, без нужда да се симулира различно покритие и качество на данните. Беше определена също така и емпиричната стойност на минималното покритие (в случая - 70x), нужно за

определянето на всички варианти в групата от изследвани пациенти. По-високите стойности и равномерност на покритието повишават чувствителността и намаляват броя на фалшиво-позитивните indel варианти, както се вижда от характеристиките на последните няколко експеримента (Фиг. 27 и Таблици 39,40, „Резултати“). Въпреки че в тренировъчната група бяха открити всички очаквани варианти с минимален брой фалшиво-позитивни, частта от генния панел, която достигна изискваното покритие от 30x, беше около 53%. Това подчертава ползата от равномерното покритие за ефективното определяне на реалните генетични варианти.

Осигуряването на равномерно покритие е много по-ефективен начин за постигане на пълно покритие на таргетните региони, отколкото постигането на много високо средно покритие. Доказателство за това е фактът, че не се наблюдават разлики в ширината на покритието (процент на покритие на дължината на таргетния регион) на 309-те ампликона на AmpliSeq панела, въпреки че дълбочината варира до 7 пъти (Таблица 38. „Резултати“). Единствената видима разлика е сигурността на определяне на вариантите (Таблица 39, „Резултати“).

От друга страна наблюдаваната дълбочина от 2100x в последните ни експерименти, както и по-високото качество на данните от 316v2 чиповете дават възможност за секвениране на по-голям брой проби на един чип, без намаляване на ефективността на определяне на вариантите, което би намалило цената на секвенирането на проба.

Наблюдаваните разминавания между резултатите от Ion Torrent платформата и стандартното Sanger секвениране са очаквани поради документираните проблеми на платформата за точно определяне на хомополимерни участъци (41,159). Въпреки това се наблюдава значимо повишение на качеството на определяне на вариантите с увеличаване на равномерността на покритието. Голяма част от фалшиво позитивните резултати, причинени от проблемите на платформата, бяха преодолени с използването на AmpliSeq панела.

Дори резултатите с по-неравномерно покритие от първите два експеримента (тренировъчната група и валидационна група 1) показват, че, дори при дълбочина на покритието под 30x, високо-производителните подходи могат да подпомогнат класическото секвениране по Sanger в региони с висок шум или трудна амплификация.

## 6.1.2. Валидиране на вариантите

Фалшиво-позитивните сигнали в проведените експерименти могат да се разделят на две основни групи: грешки в хомополимерни последователности с дължина над 4 бази и често появяващи се грешки в региони с по-висока сложност (по-малък брой повторения или липса на хомополимер).

Първата група се получава в резултат на известните вече проблеми на платформата да определя правилно дължината на хомополимерните последователности (41). Тези грешки се наблюдават при по-ниски покрития и при липса на контрол на баланса на прочитите в двете посоки. Вариантите от втората група се появяват в голям брой проби, винаги на една и съща позиция, но в малък процент от прочитите. Тази група е слабо свързана с хомополимерните региони, но повсеместната и поява предполага технически фактори като потенциална причина за наблюдаваните грешки. Вариантите от тази група може да са специфични за платформата грешки, които стават по-видими при ниски покрития. Като пример, една от делециите (GRCh37.p13:g.32972389delC) беше открита в половината проби от първите два експеримента (тренировъчния и валидация 1), които имаха сравнително малка дълбочина на покритие. Тази делеция

обаче на беше потвърдена в нито една от пробите. Същата делеция беше открита в малък брой прочити и в следващите експерименти с по-високо покритие, но не беше докладвана от софтуера поради много по-ниската алелна честота. Това потвърждава заключенията от други изследвания, които демонстрират нуждата от филтриране на indel варианти откривани в голям брой проби (на практика - повече от две). Докато Tarabeux и съавт. (49) прилагат статистически подход към премахването на вариантите, които не се наблюдават с достатъчна алелна честота в данните (над две стандартни отклонения от средната честота на други фалшиво-позитивни indel варианти), в нашето изследване използваме няколко различни стратегии за alignment (картиране на прочитите) и определяне на вариантите с цел по-висока чувствителност и специфичност. Въпреки това, в случаите когато източникът на генетичния материал може да предоставя няколко различни популации от последователности (например туморна и нормална тъкан), статистическият подход може да е по-добре пригоден да разграничи истинските от фалшивите indel варианти.

„Честите“ делеции в първите два валидационни експеримента бяха обяснени с двусмисленото картиране на прочитите в региона на екзон 7 на BRCA1, подкрепено от факта, че 17 от 24 проби от тези експерименти съдържаха една или повече делеции на различни позиции и с различна дължина, намиращи се в регион с ниска сложност (GAA повтор и поли-A участък). В този регион не бяха регистрирани варианти в последните два експеримента, въпреки шума, който все още се наблюдаваше в картирането на прочитите, показвайки че по-високото покритие може да компенсира шума в подобни региони.

Наблюдавахме относително голям брой алели на синонимния вариант rs16940 (BRCA1 p.L771L) в данните, повечето от които не бяха потвърдени при секвенирането по Sanger дори при AmpliSeq експериментите с високо покритие. Наблюдаваните честоти на варианта в общата група проби (36 % TC, 7 % CC, 57 % TT) не се различаваше значимо (Chi-squared  $p = 0.202$ ) от честотата, докладвана от NapMap проекта за CEPH кохортата (жители на Utah с произход от северна и западна Европа; съкращение: CEU) в базата dbSNP, а данните не показваха шум на тази позиция. Беше установено, че секвенирането по Sanger не може да потвърди хетерозиготния rs16940 поради полиморфизъм в един от секвенционните праймери, намиращ се в цис с варианта, и най-вероятно водещ до ниска ефективност на амплификацията.

Наблюдаваните фалшиво-негативни резултати във втория валидационен експеримент се състояха от четири интронни варианта (две делеции и две замени) и една синонимна замяна. Делециите са били филтрирани поради липса на поддържащи прочити в едната посока, тъй като се намират на края на ампликона, 80 бази след края на екзон 11 на BRCA2. Варианти в такъв отдалечен регион могат да бъдат изпуснати, при условие че само последният ампликон във веригата проявява съответното ниско качество или липса на баланс на прочитите, както и при условие че експериментът не цели изрично секвениране на интронните региони. От друга страна синонимният вариант не присъстваше изобщо в обработените данни, което води до извода, че трябва да е бил премахнат от алгоритмите за корекция на грешки. Същият вариант беше успешно установен в проби от валидационни рънове 3 и 4. В тези последни експерименти нямаше фалшиво-негативни резултати, а една единствена синонимна замяна (rs16940, BRCA1 L771L) представляваше 84% от фалшиво-позитивите резултати.

Ампликони, съдържащи варианти в хомозиготно състояние, не показваха пониско покритие от съседните ампликони, както и от други региони на гена за съответната проба, водейки до извода че наблюдаваната хомозиготност не е резултат от загуба на

фрагмент от едната хромозома (LOH, loss of heterozygosity), а случайно явление. Хомозиготните варианти бяха потвърдени със секвениране по Sanger и за двете проби.

Въпреки че броят на вариантите в тренировъчната група беше намален поради филтрирането на откритията с ниско покритие (8 в BRCA2 и 12 в BRCA1), това не намали ефективността на използваната система за анализ, както се вижда от положителните резултати на последващите експерименти.

### 6.1.3. Сравнение на протоколите за подготовка на библиотеките

С цел да се сравнят два метода за подготовка на библиотеките бяха взети предвид няколко критични стъпки. Първо, за амплифициране на кодиращата последователност на двата гена използвахме нашите in-house праймери като амплификационните реакции наброяват 81 ампликона за всяка ДНК проба за двата гена. Фрагментите бяха с различна дължина от 190 до 720 базови двойки. Всички фрагменти трябваше да бъдат нормализирани по размер и концентрация преди започването на създаването на библиотеките, тъй като обединяването в общ пул на всички ампликони в еквимоларни концентрации гарантира еднакво покритие на районите. Второ, за да подготвим високо качествени библиотеки от ампликоните включени в тренировъчната група и първата валидационна група, за които използваме метода Ion Xpress Plus gDNA Fragment Library Preparation, трябваше ензимно да фрагментираме ампликоните и да оптимизираме времето на инкубация с рестриктазите, с цел да намалим размера на по-дългите ампликони (тези над 400 базови двойки). Реакцията на фрагментиране е много чувствителна на наличието и концентрацията на ЕДТА, интегритета на пробата както и към лабораторни грешки. Ампликоните по-малки от 250 бази (къси ампликони) не изискват фрагментиране, но изискват модифициране на краищата по начин пригоден за следващата стъпка на лигиране на адапторите. Късите ампликони не изискват селекция по размер, но трябва да бъдат конструирани така, че да са по-къси от средният размер, който се изисква по протокол за генериране на библиотеките - 260 бази, като с добавката на адапторите ще се трансформира в 330 базови двойки библиотека. Трето, така приготвените фрагменти се подлагат на nick-поправка на карищата, за да завърши връзката между адапторите и фрагментите. След това те се подлагат на селекция по размер до 330 базови двойки. Накрая, няколкото стъпки на пречистване с магнитни частици и промиване на фрагментите увеличават риска от загуба на фрагменти с всяка стъпка на пречистване. Като заключение може да се каже, че Ion Xpress Plus gDNA Fragment Library Preparation протокола за подготовка на библиотеките е дълъг и изисква оптимизация на няколко критични стъпки.

За останалите валидационни групи използвахме протокола AmpliSeq™ v2.0 за подготовка на библиотеките. Той не беше наличен към момента на започване на валидирането на метода и подготовката на първите две групи. Имайки предвид гореспоменатите недостатъци на първия протокол, използвайки готов панел за амплификация на районите от интерес - Ion AmpliSeq™ BRCA1 and BRCA2 Community Panel, в комбинация с новия протокол за работа, елиминира проблеми като нуждата от ръчно амплифициране на всеки ампликон индивидуално, нормализация, фрагментиране, загуба на фрагменти при пречистването или при селекцията по размер. Ion AmpliSeq™ BRCA1 and BRCA2 Community Panel панелът от праймери е разработен и валидиран от няколко лаборатории използвайки Ion PGM системата - Drs. Marjolijn Ligtenberg и Arjen Mensenkamp от Radboud University Nijmegen Medical Centre, Холандия и от Drs. Jose Carlos Machado и Jose Luis Costa от The Institute of Molecular Pathology and Immunology

към University of Porto (IPATIMUP), Португалия (160). Трябва да се следват няколко стъпки - амплификация на гените в едновременно в три отделни реакции на пациент, частично разграждане на праймерите, лигиране на баркод адапторите, и само еднократно пречистване с магнитни частици. За това този протокол е по-бърз, по-евтин и много по-удобен за работа. И двете техники за генериране на библиотеките предоставят висока чувствителност и специфичност, които са необходими за диагностичен анализ на двата гена. Но и двата могат да претърпят леки подобрения в протоколите, за да се достигне 100% покритие на кодиращите райони на двата гена с необходимата дълбочина на прочитите. С използването на AmpliSeq™ v2.0 за подготовка на библиотеките и съответния хардуер, се постигна 10 до 20 пъти увеличена дълбочина на четене на секвенциите (Таблица 40 от „Резултати“), по-високо покритие и намаляване на фалшиво-позитивните резултати от 16% до под 7%. Това отговаря на грубо 1 фалшиво позитивен резултат на пациент, което използвайки директното секвениране за много кратко време, бива отстранено като проблем. В допълнение, ако балансът в едната и другата посока на прочитане на секвенцията се поддържа в норма, няма да се изпусне нито един истински позитивен вариант.

#### 6.1.4 Приложение на платформата в диагностичното секвениране

Ion Torrent Personal Genome Machine системата показва затруднения в анализирането на варианти, които са в хомополимерни участъци, делеции и инсерции (фиг 45) (41,159).



**Фигура 45. Специфичност на изследваните гени. А. Хомополимерен регион в интрон 8 на BRCA1 гена, Б, Различни по вид варианти в част от екзон 11 на BRCA1 гена**

Въпреки това според много автори тя може да се използва за диагностични цели, стига да се достигне достатъчна дълбочина на прочитите на районите, които ни интересуват и да се спазват някои правила на качествения анализ (48–50). Важно е да се отбележи, че райони които не показват достатъчно добра дълбочина на прочитите и в

двете посоки могат да съдържат истински позитивни варианти, и че такива райони могат да се наблюдават, въпреки цялостно добро покритие. Те се наблюдават предимно в края на ампликони, чиито краища не се застъпват с ампликони в близост до тях. На този етап специално внимание трябва да се отдели за запазване на покритието, особено при използването на панел от праймери като Ion AmpliSeq, поради честото прилагане на филтриране за PCR дублирани прочити (33). Също така филтрирането на вариантите в тези райони трябва да се направи с по-ниски ограничения на баланса на прочитите. Може да се използва и визуално потвърждаване на вариантите от картирането на ампликоните.

Съществува системна загуба на достатъчно покритие при малък брой ампликони (5 от 167 от целия панел) с използването на AmpliSeq™ Community BRCA1/2 панелът, но проблемът може лесно да се поправи ако праймерите за тези ампликони са просто в по-малко количество. Това се постига като в общия пул от праймери може да се добавят допълнително съответните двойки праймери за ампликоните, показали недостатъчно покритие в предходни експерименти. Ако все още присъства проблема трябва да се прибегне към златния стандарт в секвениране- Sanger метода, за да се покрият липсващите райони.

Ion AmpliSeq™ BRCA1 and BRCA2 панелът в комбинация с Ion AmpliSeq™ химията при използване на платформата Ion Torrent PGM е надежден NGS базиран диагностичен тест за секвениране на *BRCA1* и *BRCA2* гените при диагностика и профилактика при високорискови пациенти с рак на гърдата и яйчниците. Настоящото изследване спомогна за утвърждаване на бърза и точна диагностична методика за детекция на мутации в *BRCA1/2* гените, последвана от директно секвениране за потвърждение на получените резултати. Също така беше определено оптималното покритие от 70x, общо за всички секвенции, което е необходимо за детекция на всички налични варианти. Прилагането на NGS методиката значително ще намали цената и времето за анализ на мутации в *BRCA1* и *BRCA2* гените при диагностиката, лечението и профилактиката на семейства с фамилен рак на гърдата и яйчниците.

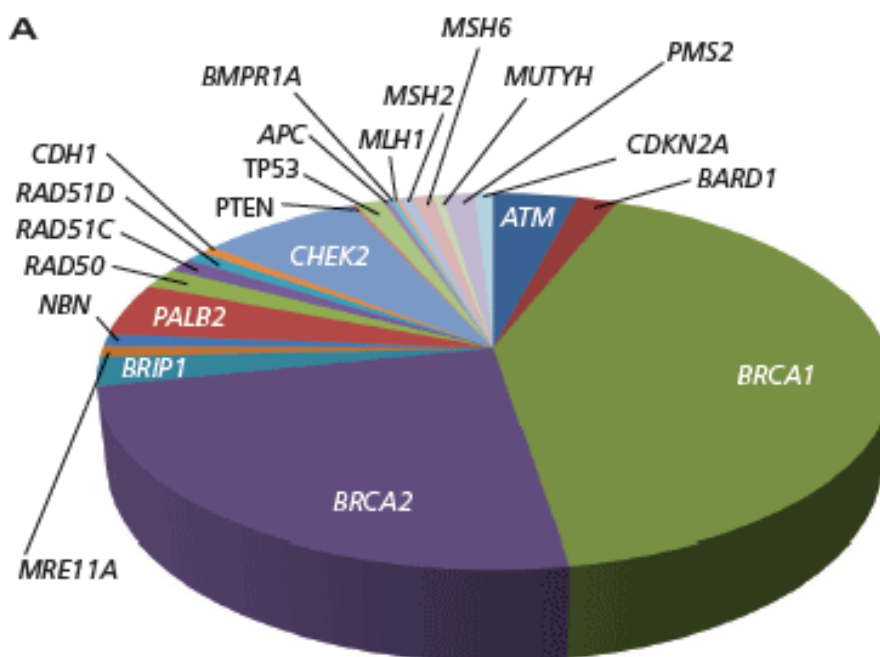
NGS технологиите значително промениха мащаба, ефективността и времето на секвенирането и доведоха до формирането на нова дефиниция за обхвата на това какво може да се изследва от практическа и клинична гледна точка. Въвеждането на Ion Torrent PGM за търсене на мутации в *BRCA1* и *BRCA2* гените при български пациенти с фамилен рак на гърдата и яйчниците значително ще понижи времето за анализ, ще увеличи продуктивността и дълбочината на секвениране за по-сигурни резултати. Това ще позволи да се разработи схема за бърз, ефективен мутационен анализ, с голяма точност за откриване на генетични промени, имащи отношение към развитието на фамилен рак на гърдата и яйчниците в Българската популация.

## **6.2 Следващо поколение секвениране на 94 тумор-асоциирани гена при BRCA негативни пациентки с рак на гърдата**

Според мнозина изследователи, работещи в областта на онкогенетиката карциномите на гърдата и яйчника се дължат на дефекти в ДНК репариращата/репарационната система (27). Едни от най-опасните увреждания на ДНК са двойноверижните скъсвания (DSBs). Те могат да бъдат резултат от генотоксични агенти или блокиране на прогресията на репликативната вилка. Известно е, че еукариотните клетки притежават най-малко три различни механизма за поправка на двойноверижните скъсвания: нехомоложно свързване на повредените краища (Non-Homologous End Joining - NHEJ), хомоложна рекомбинация при поправката на двойноверижни скъсвания между две повтарящи се секвенции (едноверижна

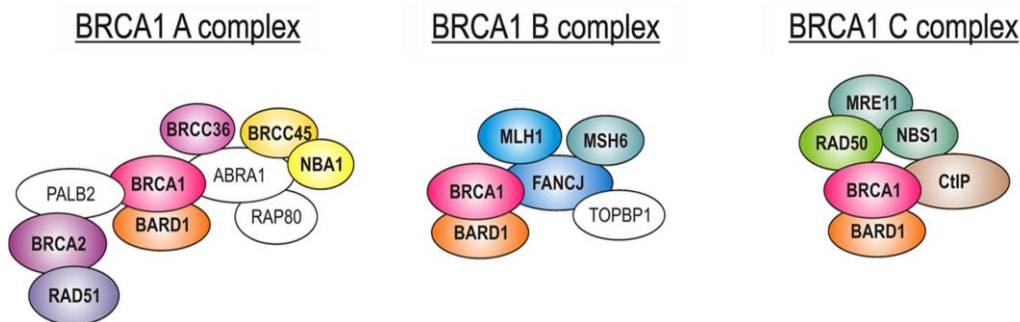
хибридизация, Single-Strand Annealing - SSA) и хомоложна рекомбинация (Homologous Recombination - HR) (161). В тези механизми вземат участие голяма група от белтъци, като BRCA1, BRCA2, CHEK2, PALB2, BRIP1, RAD51C, ATM, TOPBP1 и други (27,161).

Герминативни мутации в BRCA1 и BRCA2 гените обясняват само около 15 до 20% от фамилените случаи на рак на гърдата и яйчника (16,29). Голяма част от генетичната предразположеност, определяща риска от развитие на рак на гърдата и яйчника все още остава неизяснена.



**Фигура 46. Схема на други гени асоцииращи се с рака на гърдата освен високопенетрантните BRCA1 и BRCA2 (162).**

Поради тази причина усилията на изследователските екипи са насочени в търсене мутации в гените със средна пенетрантност като функционални партньори на BRCA1 и BRCA2 в ДНК репарацията (фигура 47). В тази група влизат гени като BRIP1, PALB2, CHEK2, ATM, NBS1, RAD50, TOPBP1, RAD51C, RAP80, които имат предразполагащ ефект за развитието на рак на гърдата и яйчниците (27). Втора насока е определянето на влиянието на ниско пенетрантни алели, асоциирани със заболяването, посредством големи асоциативни проучвания от типа случаи-контроли в рамките на целия геном (GWASs) (16). При проведения генетичен анализ на BRCA-негативни семейства с рак на гърдата са открити мутации в други гени като CHEK2, PALB2, BRIP1 и ATM, функционално свързани с BRCA1 и BRCA2 (16,56). Мутациите в тези гени са по редки и са с междинен риск за развитие на рак на гърдата и яйчника (16,29,56). Част от тези гени се свързват с редица синдроми, при които се развиват ракови заболявания. Така, например синдромите на Li-Fraumeni, Peutz-Jeghers и Cowden се обясняват с мутации в TP53, STK11 и PTEN гените (16,29,56).



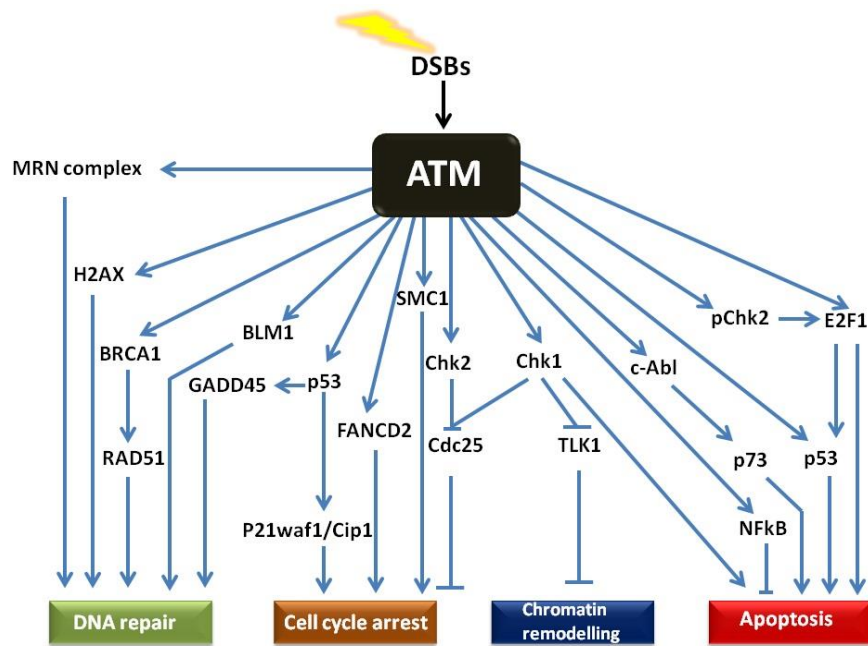
**Фигура 47. BRCA1 образува три комплекса А, В и С. Комплекс А участва в ДНК поправката чрез хомоложна рекомбинация. Комплекс В освен в ДНК поправката взема участие и в контрола на G1/S фазите на клетъчния цикъл. Комплекс С участва в контрола на G2/M фазите на клетъчния цикъл(163).**

Резултатите от проведеното новогенерационно секвениране на панел от 94 тумор асоциирани гени при 31 BRCA-негативни пациентки с рак на гърдата и яйчниците показаха наличие на 1 frameshift патогенна мутация в гена ATM, 6 нови за базите данни и литературата вероятно патогенни варианти в гените MUTYH, ATM, CHEK2, PTCH1, RAD51C и MET гените, както и 7 известни патогенни мутации в гените WRN, ERCC4, PALB2, PRF1, RET, SDHB и AIP гените (Таблица 44, „Резултати“).

### 6.2.1 ATM

ATM е серин/треонин киназа, която се привлича към и се активира от двойноверижните скъсвания на ДНК веригата (164). Фосфорилира и активира ключови белтъци, участващи в активирането на контролиращи клетъчния цикъл механизми в отговор на повреди в ДНК, водещи до клетъчен арест, ДНК поправка или апоптоза. Някои от прицелните за киназата белтъци са туморсупресорите p53, CHK2 и H2AX. Заболяването Ataxia telangiectasia (AT) е рядко заболяване, характеризиращо се с церебрална дегенерация, изключителна чувствителност на клетките към радиация и предразположение към развитието на рак. Всички пациенти диагностицирани с това заболяване имат мутации в гена ATM и са силно предразположени към рак на гърдата, поради взаимодействието между ATM и BRCA1 в ДНК поправката (165–167). ATM е ген, асоцииращ се с рака на гърдата, от групата на нископенетрантните гени и гените с ниска честота. Доказателствата за повишения риск от заболяването идват от изследвания с носители на хетерозиготни ATM мутации (168). Около 0.5%-1% от представителите на общата популция са носители на герминативни хетерозиготни мутации. Епидемиологични проучвания показват, че жените носители на такива мутации имат повишен риск за развитие на заболяването, който е изчислен на 3.9 (95% confidence interval [CI] 2.0–6.0) (169).

ATM е ключов ензим в отговора на клетката към ДНК повреди, т.нар. DNA damage response (DDR) сигнален път, който поддържа интегритета на клетките. ATM осигурява важната връзка между ДНК повредата, клетъчния цикъл и смърт като първи елемент, откриващ мястото на ДНК повредата и осигуряващ фосфорилирането и активирането на следващите участници в поправката (Фиг. 48) (170).



**Фигура 48. ATM медирана сигнална трансдукция в отговор на двойноверижни ДНК скъсвания (т.нар double strand DNA breaks, DSBs)(170).**

Киназните функции на ATM се изпълняват чрез 350 аминокиселинен участък между 2712 и 2962 аминокиселина. Но функциите на киназата могат да бъдат засегнати ако се повлияе и някой от другите домени, например в нашия случай FAT домена, в който се открива патогенната мутация, тъй като той е място за саморегулация чрез автофосфорилиране и вероятно има роля при взаимодействието със субстратите на ATM (Фиг. 49) (171).

Откритата в настоящото проучване frameshift мутация p.Glu2139IlefsTer6 не се открива в литературните източници. Тя е от типа frameshift мутации, която води до терминиране на транслацията на белтъка и скъсен продукт на гена до 2145 аминокиселина. Тази мутация води до отпадането на най-важния домен на белтъка - киназния, (фиг. 49) и крайния домен, отговорен за пълната активация на ATM. Това води до невъзможност за изпълнение на така важните функции в ДНК поправката.

Tavera-Tapia и съавтори (172)извършват цялостно екзомно секвениране на 1477 HBOC семейства, които нямат мутации в BRCA гените и показват новооткрити варианти в други гени. Откриват нова мутация в ATM гена за Испанската популация с честота 1.78% от HBOC пациентите и 1.94% за пациентите само с рак на гърдата (172). В допълнение към изследваните пациенти те анализират и 350 индексни пациенти с друго заболяване което не е свързано с рака на гърдата и не откриват мутацията при нито един от тях. Откритата от нас нова мутация в ATM гена е с честота 3.2% (1 от 31 пациента). Носител на този вариант е пациентка с билатерален рак на гърдата, която има сестра с меланом (Mn) в окото и друга сестра с рак на гърдата, баба по майчина линия с рак на гърдата и дядо по майчина линия с рак на стомаха (Приложение 4, BC181). И при родствениците – двете сестри и нейната здрава дъщеря се открива същата мутация. ATM е среднопенетрантен ген при рака на гърдата, който определя риск от 2.8 (95% CI 2.2–3.7) (173) за развитие на заболяването, но изследването му в миналите години е било ограничено от големия му размер- 150 килобази. Използвайки технологията за следващо поколение секвениране определят честотата на носителството на мутации в този ген, която е малко по-висока от откритата такава в други популации като Япония (0.69%) или САЩ

(1.41%) при BRCA негативни пациентки с рак на гърдата и/или яйчника. Високата честота на мутации в ATM гена в Испанската популация а и при нас определя нуждата от по-обширно изследване герминативните мутации в гена и влиянието му при пациентите с рак на гърдата(172).

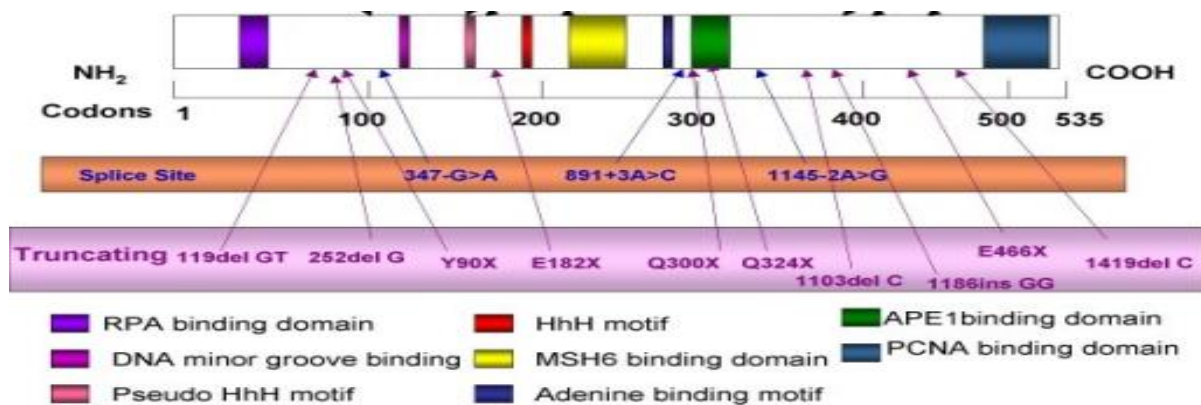
Другия вариант, който се открива е p.Arg62Ile (R62I) в ATM гена (Таблица 44, „Резултати“). Той също не се открива в базите данни, но е определен като вероятно патогенен чрез програмите за предикция на ефекта на еднуклеотидни замени в белтъците- SIFT и PolyPhen-2. Носител на този вариант е пациентка с рак на гърдата с ранно начало (29г), която има леля и чичо по майчин линия с рак на гърдата и дядо по бащина линия с рак на мозък (Приложение 4, BC125). В допълнение към тази мутация при същата пациентка е открита и известната патогенна мутация p.Arg304Gln (R304A) в AIP гена, описана по-долу.



**Фигура 49. Архитектура на домените на ATM киназата и техните функции. 22aa домен- левцинов „цип“ за димеризация на белтъка и взаимодействие със субстратите му; 10aa домен: Взаимодействие с c-Abl за активиране на белтъка след ДНК повреда; FAT домен- автофосфорилиране; PI3K- ATM киназен домен; FATC- взаимодействие с Tip60/HA1 за пълна активация на ATM (171).**

## 6.2.2 MUTYH

MUTYH (mutY DNA glycosylase) е човешки ген кодиращ ДНК гликозилаза, участваща в поправка на ДНК при оксидативен стрес. Мутации в този ген могат да причинят автозомно рецесивна форма на Фамилна Аденоматозна Полипоза (ФАП). Повечето от докладваните мутации в гена водят до синтез на нефункционален или слабо функциониращ гликозилазен ензим. В литературата се откриват данни за асоциация на мутациите в MUTYH гена с рака на гърдата (174–176). Установената при нашата кохорта пациенти мутация p.Ala266Gly (A266G) не се открива в базите данни. На фигура 50 е показана структурата на MUTYH. Откритата мутация попада в домена за свързване с MSH6 белтъка, който е основен в поправката на двувъзржни скъсвания при репликация. Мутацията се определя като вероятно патогенен миссенс вариант чрез програмите за предикция на ефекта на еднуклеотидни замени в белтъците- SIFT и PolyPhen-2. Носител на този вариант е пациентка с рак на гърдата, която има братовчедка по бащина линия с рак на гърдата, майка с ендометриален рак и баба по майчина линия с рак на гърдата (Приложение 4, BC124). При тази пациентка се открива допълнително още една известна патогенна мутация p.Ile127Leu (I127L) в гена SDHB, описана по-долу.

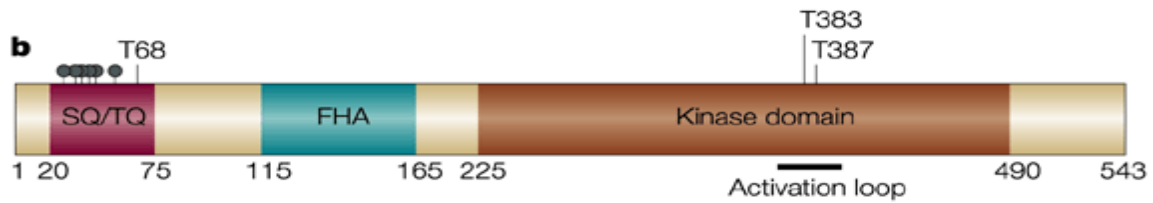


**Фигура 50.** Доменна структура на гена MUTYH и най-честите мутации в него (177).

### 6.2.3 СЧЕК2

СЧЕК2\_генът дава инструкции за синтеза на протеин наречен checkpoint киназа 2. Този белтък действа като туморсупресор като регулира клетъчното делене чрез регулация на скоростта на растежа на клетките по време на клетъчния цикъл. Белтъкът се активира ако ДНК бъде увредена от токсични агенти и химикали, радиация, ултравиолетово лъчение или по време на репликацията(178). В отговор на повредата СЧЕК2 си взаимодейства с други белтъци, включително най-основния туморсупресорен протеин TP53, които да „задържат“ клетъчното делене докато не се установи дали клетката ще продължи успешно в клетъчния цикъл или ще бъде насочена за апоптоза. Този механизъм възпрепятства деленето на мутирани клетки и съответно развитието на тумори (179).

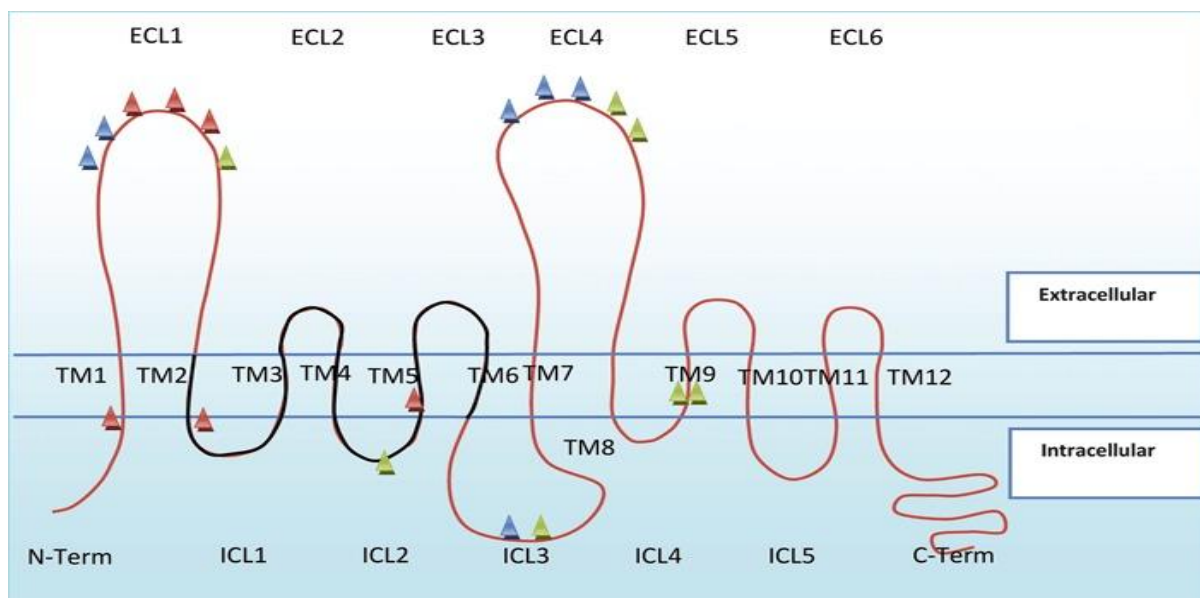
Асоциацията на мутациите в гена с наследствени ракови заболявания е известна още от 1999 г. Bell и съавтори тогава откриват, че три герминативни мутации в гена се откриват в пациенти с Li-Fraumeni синдром и такива с подобен на него (180). Това води до заключението, че мутации в гена водят до предразположение към развитието на синдрома. От тогава насам два от откритите варианти (делеция в киназния домен в екзон 10 и миссенс мутация в домена FHA) се свързват с предразположението към рак на гърдата и други видове тумори (Фиг 51) (178). Две други мутации в СЧЕК2 гена, S428F - замяна в киназния домен екзон 11 и P85L - замяна в N-крайния домен, екзон 1, са открити и при еврейското семейство Ешкенази в контекста на рака на гърдата (181). Откритата мутация p.Glu437Lys (E437K) не се открива в базите данни, но е определена като вероятно патогенна чрез програмите за предикция SIFT и PolyPhen-2. Разполага се в екзон екзон 11 (фиг 51) от киназния домен на гена, подобно на S428F и е с предполагаем патогенен ефект. Носител на този вариант е пациентка с ранен рак на гърдата (28г), която има баща с левкемия, баба по бащина линия с рак на гърдата или яйчника, дядо по майчина линия с рака на стомаха (Приложение 4, BC209). В допълнение към този вариант е открит и друг вариант при същата пациентка p.Tyr791Phe (Y791F) в RET гена, описана по-долу.



Фигура 51. Доменна структура на СНЕК2 гена (182).

### 6.2.4 PTCH1

PTCH1 функционира като рецептор за лиганда Sonic Hedgehog. Patched-1 (PTCH1) и Sonic Hedgehog си взаимодействат в сигналния път, който е много важен за ранното развитие, клетъчния растеж, клетъчната специализация (183). При липсата на лиганда, рецепторът спира клетъчната пролиферация. Поради контрола си върху тези събития се смята, че той е тумор-супресор (183). В литературата се откриват малко данни за асоциацията на гена с рака на гърдата, но се предполага, че засягането на споменатия сигналния път, с участието на двата белтъка, повлиява правилното развитие на клетките на млечната жлеза (184–186). Откритата мутация p.Pro369Thr (P369T) се определя като вероятно патогенна чрез програмите за предикция SIFT и PolyPhen-2 и не се открива в базите данни. Локализира се в първия N-краен екстрацелуларен домен на белтъка, които отговарят за свързването на лиганда (фиг 52). Би могло да се предположи, че тя влияе на ефекта на свързване на рецептора с лиганда. Носител на този вариант е пациентка с рак на гърдата, която има сестра на бабата по бащина линия с рак на гърдата, дядо по майчина линия с рак на белия дроб, сестра на дядото по майчина линия с рак на гърдата, сестра и брат на дядото по майчина линия с друг вид тумори, две лели по майчина линия с рак на гърдата и братовчедка по майчина линия също с рак на гърдата (Приложение 4, BC016)).



Фигура 52. Разпределение на мутациите в PTCH1 белтъчните домени. Сините триъгълници са инсерции; червените- делеции; зелените- точкови мутации; ECL= екстрацелуларен домен; ICL= вътреклетъчен домен; TM= трансмембранен домен; N-term = N-край; C-term = C-край (187).

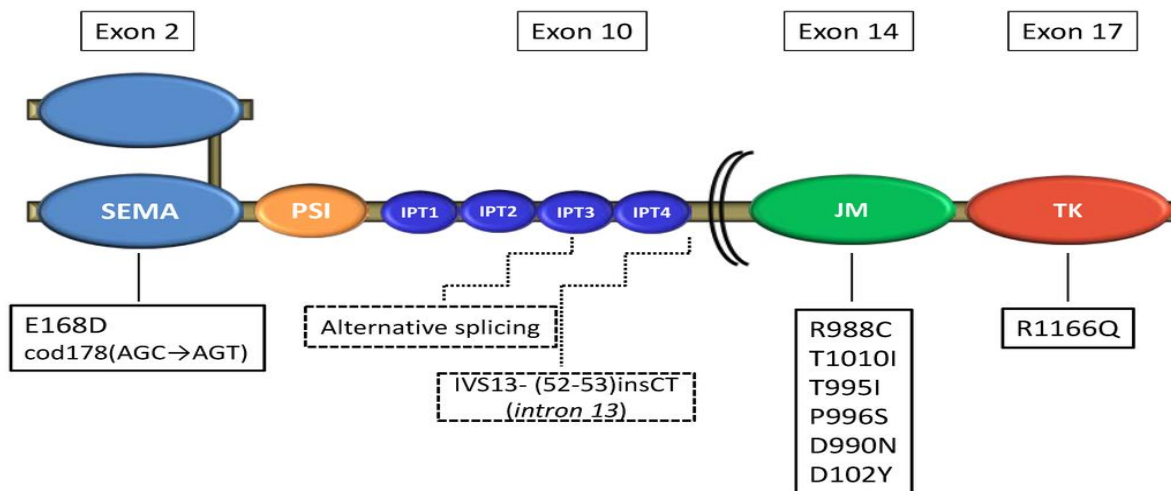
## 6.2.5 RAD51C

**RAD51C** е член на RAD51 семейството белтъци. Те участват в хомоложната рекомбинация и ДНК поправката (188). Този белтък взаимодейства с други от семейството и с BRCA1 и 2 белтъците, основни за т.нар. Holliday junction resolution. Мутации в гена се асоциират със синдрома анемия на Фанкони, част от който е и рака на гърдата (189,190). Установената мутация p.Leu27Pro (L27P) не се открива в базите данни, но е вероятно патогенна спрямо програмите за предикция SIFT и PolyPhen-2. Носител на този вариант е пациентка с рак на гърдата, която има рак на гърдата и в следствие е развила и рак на яйчника, с майка с ранен рак на гърдата (32г.) и ранен рак на яйчника (35г.), както и племенница по майчина линия с рак на гърдата (Приложение 4, BC075)).

## 6.2.6. MET

MET гена кодира член на рецепторните тирозин кинази и е прото-онкоген. Свързването с неговия лиганд - хепатоцит растежния фактор, белтъка MET димеризира и се активира (191). По този начин е способен да участва в клетъчното оцеляване, ембриогенезата, клетъчната миграция и инвазия. Мутациите в гена често се асоциират с карциноми на бъбреците, хепатоцелуларен карцином и различни тумори на главата и шията. Амплификация и свръх експресия на гена също се асоциира с много други видове рак (192–194). След откриването на мутациите в тирозин киназния домен (фиг. 53) на MET гена при наследствени и спорадични случаи на тумори на папиларните клетки на бъбреците, MET мутации са открити и в до 30% от туморите с неизвестна първоначална локализация (192). Тези мутации се откриват в т.нар. SEMA домен и в юкстамембранния домен. Откриват се също и активиращи мутации в тирозин киназния домен (192).

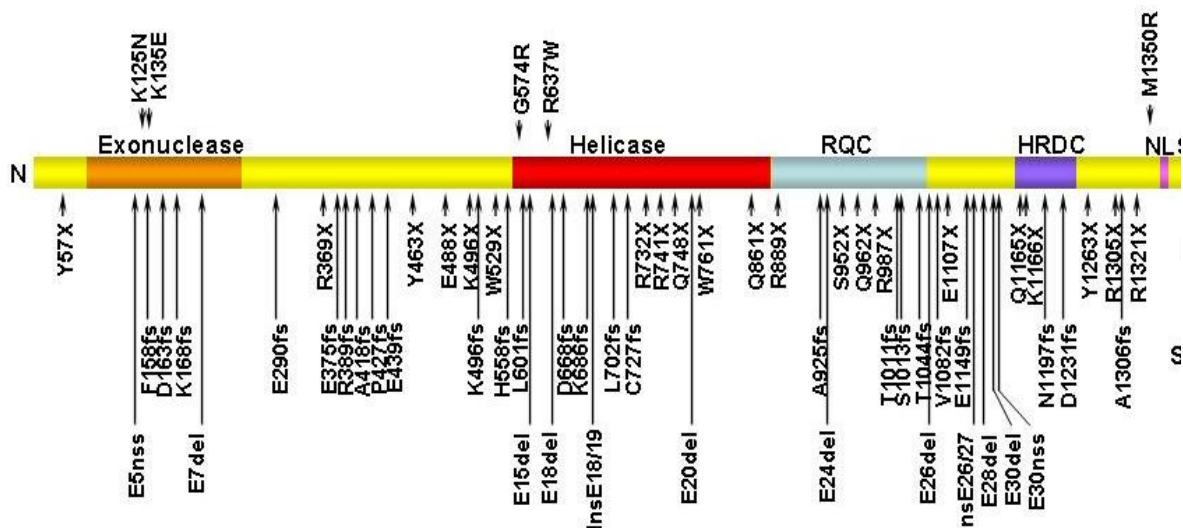
Много малко са проучванията, които показват честотата на MET мутации при рака на гърдата (195). Мутациите в тирозин-киназния домен не са често срещани, но в промоторния HGF район те са установени при около 15% от изследваните пациенти с рак на гърдата в Европа и при над 50% от афроамериканците с това заболяване (42). Откритата в настоящото изследване мутация p.Arg280Met (R280M) не се открива в базите данни, но е вероятно патогенна спрямо програмите за предикция SIFT и PolyPhen-2. Локализира се в SEMA домена. Останалите 7 открити варианта (Таблица 44, „Резултати“) са известни варианти за научната литература и са с докладван патогенен ефект. Локализирант се в известни райони както е описано в таблица 11. Носител на този вариант е пациентка с билатерален ранен рак на гърдата (35г. и 38г, която.), която има чичо по майчина линия с лимфома, дъщеря на чичото с рак на гърдата и чичо по бащина линия с рак на белия дроб (Приложение 4, BC094).



**Фиг 53. Структура на MET гена и някои от откритите мутации в съответния район. SEMA- семафорин домен; PSI- плекси-семафорин-интегринов домен; IPT1-4- четири имуноглобулин плексин транскрипционни домени; JM- юкстамембранен домен; TK- тирозин киназен домен (196).**

## 6.2.7 WRN

WRN е тумор-супресорен ген, който дава инструкции за синтеза на Werner белтъка който участва в поправката на ДНК. Белтъка е вид хеликаза, част от семейството на RecQ хеликазите, и екзонуклеаза, като при възникнали грешки в ДНК първо разплита двете вериги с хеликазната си активност, а след това премахва грешните нуклеотиди с екзонуклеазната (197). Белтъка поддържа структурата и интегритета на генома с важна гункция при репликацията. Установено е, че има важна роля и за поддържането на теломерите (198). Синдрома на Werner, с който се асоциират промени в белтъка е автозомно рецесивно заболяване, характеризиращо се с преждевременно стареене и висока честота на туморогенеза в частност на неепителни тумори като саркома на меките тъкани и бенигна менингиома (199). Откритата p.Arg637Trp (R637W) мутация е известна в базите данни и се локализира в хеликазния домен (Фиг 54). Носител на този вариант е пациентка с рак на гърдата, която има майка с ранен рак на гърдата и сестра с рак на гърдата (Приложение 4, BC009).



Фиг 54. Структура на гена WRN и разпределение на известните мутации при пациенти с Werner синдром. На диаграмата са отбелязани: N-край, C-край, екзонуклеазен домен в оранжево; хеликазен домен в червено; RecQ - хеликаза консервативен домен (RQC) в синьо; хеликазен RNaseD C- краен консервативен домен (HDRC) в лилаво и ядрено локализиращ сигнал (NLS) в розово(199).

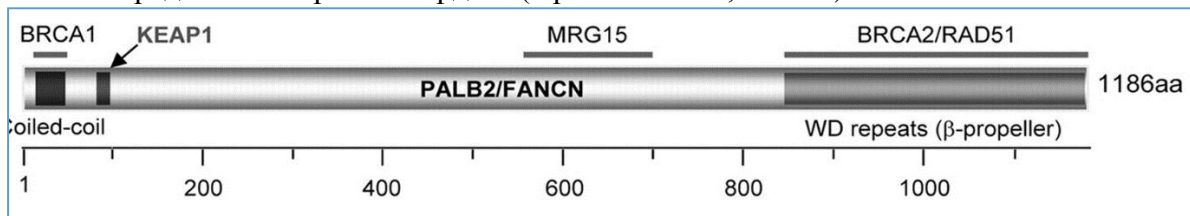
## 6.2.8 ERCC4

ERCC4 белтъка (още известен като XPF или FANCF), кодиран от съответния ген, образува комплекс с ERCC1 и участва в 5' –срязването на ДНК веригата, по време на поправка на ДНК чрез изрязване на нуклеотиди (Nucleotide Excision Repair - NER) по време на хомоложната рекомбинация (200). Този комплекс е структурно специфична ендонуклеаза, която си взаимодейства с EME1. Дефекти в гена ERCC4 са причина за ксеродерма пигментоза комплементационна група F или ксеродерма пигментоза VI. Биалелните мутации в гена са идентифицирани като причина за Анемия на Фанкони тип Q и за синдрома Cockayne (201,202). Фанкони анемията е рядко рецесивно заболяване, характерно за което са вродени малформации, прогресивна костна деструкция и предразположение към различни видове рак. За сега не е ясно как и дали мутации в гена са отговорни за предразположеността към рак на гърдата и яйчника (203). Откритата p.Pro379Ser (P379S) мутация е известна в базите данни и се локализира в хеликазно подобен район на гена. Носител на този вариант е пациентка с ранен рак на гърдата (32г.), която има майка и баба по майчина линия с рак на гърдата (Приложение 4, BC047) в отсъствие на други варианти с доказан патогенен ефект.

## 6.2.9 PALB2

PALB2 гена кодира белтък, който е тумор супресор, свързващ се с BRCA2 и осигуряващ неговата стабилност, активност и локализация (204). Играе критична роля при поправката на ДНК при хомоложната рекомбинация като привлича BRCA2 и RAD51 към местата на скъсванията. Той изпълнява функцията на молекулно скеле за образуването на комплекса BRCA1-PALB2-BRCA2 чрез WD повтора си. Свързва ДНК чрез D-loop (Фиг 55) (205). Известно е, че мутациите в гена водят до повишен риск за

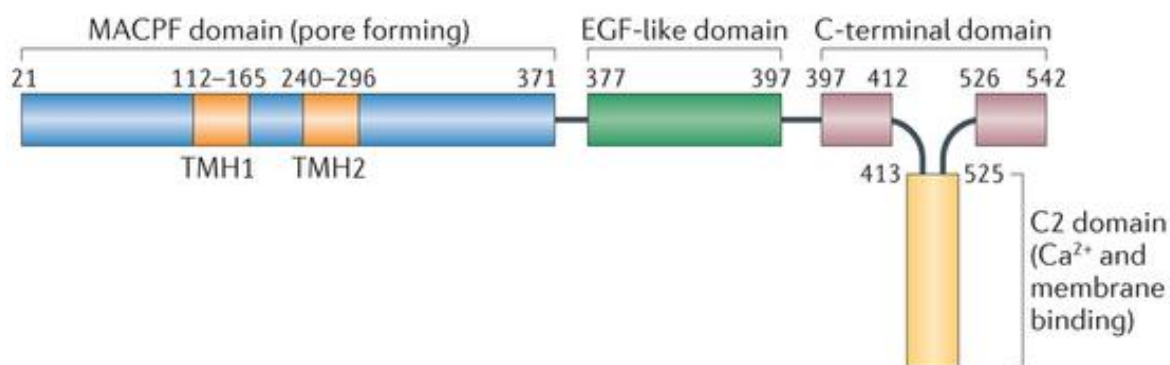
развитие на рака на гърдата. Биалелните мутации водещи до загуба на функция на белтъка, известен още под името FANKN, водят до развитие на Фанкони Анемия, а моноалелните такива се асоциират с повишен риск за рак на гърдата (2 до 4 пъти в сравнение с немутиралите индивиди) и панкреаса (59,206,207). Откритата p.Leu939Tгр (L939W) мутация е известна в базите данни и се локализира в WD 2 повтора, отговорен за свързване с важния комплекс с BRCA2 и RAD51 (Фиг. 55). Носител на този вариант е пациентка с билатерален рак на гърдата (43г. и 53г.), която има майка с рак на гърдата и рак на белия дроб, братовчедка по бащина линия с рак на гърдата и леля по майчина линия с предполагаем рак на гърдата (Приложение 4, BC056).



**Фигура 55. Доменна структура на PALB2 гена и свързващи места за неговите партньори (208).**

### 6.2.10 PRF1

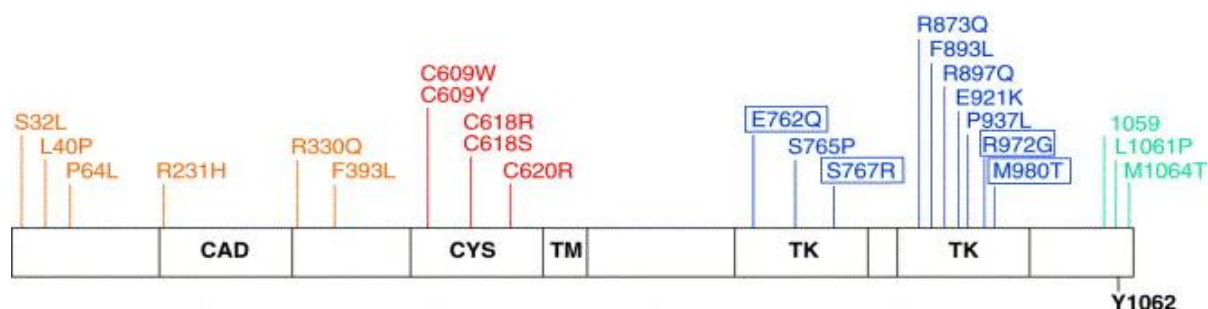
PRF1 генът кодира белтъка перфорин. Той се открива в имунната система, в лимфоцитите и NK клетките „убийци“. Перфоринът участва в процеса на цитоллиза (разрушаване на клетките) и в регулацията на имунната система (209,210). Той е основен компонент от структури наречени цитолитични гранули, които съдържат белтъци за разграждане на клетъчните компоненти, които се пренасят от Т-клетките и „клетките убийци“ на имунната система до повърхността на прицелните клетки. Перфоринът помага за образуване на канали на мембраните, за да проникнат вътре цитолитичните белтъци и да се унищожи клетката. По същия механизъм се унищожават и Т-клетките, които не са нужни на имунната система. Контролирайки нивата на Т-клетките се регулира и нивото на цитокините, които биха могли да доведат до възпаления и повреда на тъканите (211). Мутациите, водещи до загуба на функция на белтъка силно намаляват способността за осъществяване на цитотоксичната активност на клетките на имунната система (212). Откритата p.Ala91Val (A91V) мутация е известна в базите данни и се локализира в MACPF домена на PRF1 (Фиг. 56), отговорен за образуването на порите в мембраната на таргетните клетки. Мутацията в екзон 2 първо е описана като неутрален полиморфизъм, но скорошни изследвания показват потенциален патогенен ефект, особено при сложни хетерозиготни индивиди, за лимфохистиоцитоза тип 2 и лимфоцитна левкемия (213). Носител на този вариант е пациентка с ранен рак на гърдата (38г.), която има майка и баба по майчина линия с рак на гърдата (Приложение 4, BC067).



Фигура 56. Структура на перфорин 1 гена (214).

### 6.2.11 RET

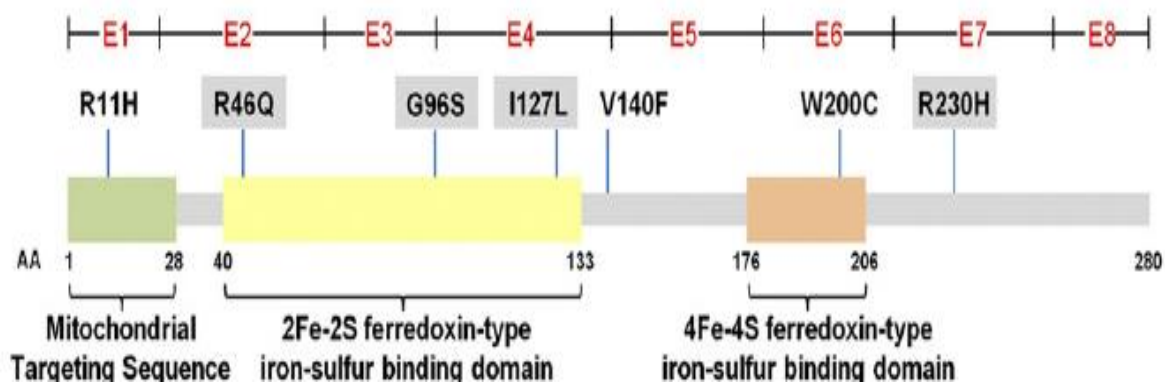
RET кодира трансмембранен белтък, прото-онкоген с рецепторна тирозин киназна активност (215). Мутации, водещи до загуба на функция на гена водят до болест на Хиршпрунг, а тези от типа „придобиване“ на функция водят до различни предразположения към ракова заболявания - на щитовидната жлеза (216), множествена ендокринна неоплазия тип 2А (MEN2) и 2В (216), феохромоцитома и паратиреоидна хиперплазия (217). Мутации и нарушена експресия на гена се асоциират и с рака на гърдата (218–220). Откритата р.Тур791Phe (Y791F) мутация е известна в базите данни и се локализира в тирозин киназния домен, отговорен за каталитичната активност на белтъка **RET** (Фиг 57). Носител на този вариант е пациентка с ранен рак на гърдата (28г), която има баща с левкемия, баба по бащина линия с рак на гърдата или яйчника, дядо по майчина линия с рака на стомаха (Приложение 4, ВС209).



Фигура 57. Доменна структура на RET гена. Показани са районите на мутациите, които имат ефект, свързан с болестта на Хиршпрунг и домените на белтъка: CAD - кадхеринов домен; CYS - цистеин-богат домен; ТМ- трансмембранен домен; ТК - тирозин киназен домен; очертаните в синьо са мутациите, водещи до частична загуба на киназна активност на белтъка (221).

## 6.2.12 SDHB

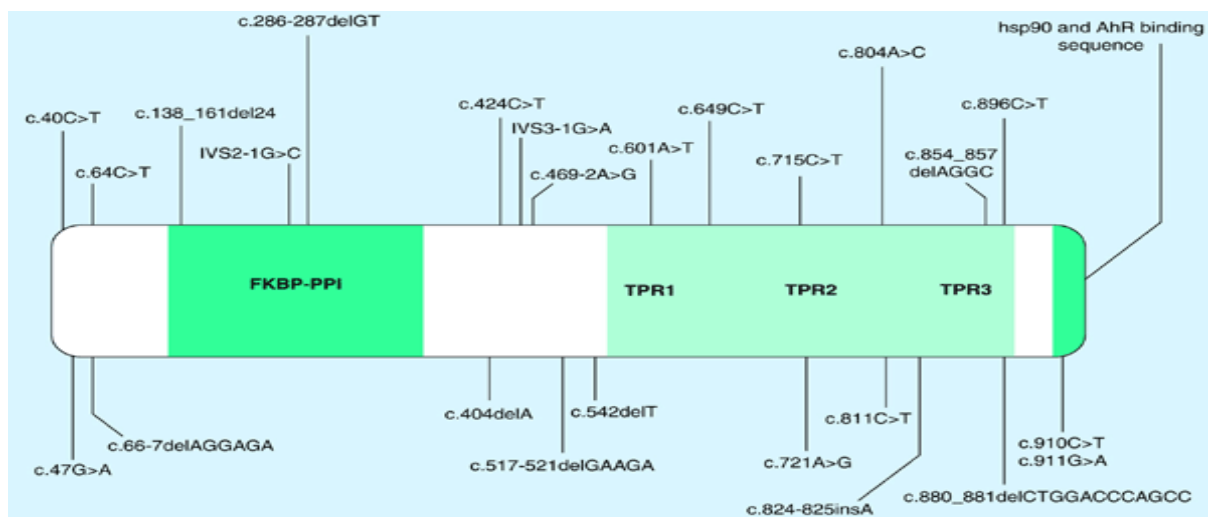
Succinate dehydrogenase subunit B (SDHB) генът кодира една от четирите субединици на сукцинат-убихинон оксидоредуктаза и е установено, че действа като тумор супресор (222). Ролята му при туморите е известна, но в контекста на рака на гърдата проучванията са ограничени (223). Мутации в гена се срещат при параганглиоми/феохромоцитози и асоциираните с тях ракови синдроми (Carney-Stratakis и Carney triad) и могат да бъдат предиктивен фактор за тези заболявания (224). Понижената експресия на гена се асоциира с растеж и дедиференциация на колоректалните туморни клетки (225). Откритата p.Ile127Leu (I127L) мутация е известна в базите данни и се локализира в 2Fe-2S ферредоксин подобен желязо-серен свързващ домен, отговорен за правилното функциониране на белтъка (Фиг 58). Носител на този вариант е пациентка с рак на гърдата, която има братовчедка по бащина линия с рак на гърдата, майка с ендометриален рак и баба по майчина линия с рак на гърдата (Приложение 4, BC124).



**Фигура 58. Доменна структура на гена SDHB. На фигурата се виждат домен за насочване към митохондриите в зелено; 2Fe-2S ферредоксин подобен желязо-серен свързващ домен в жълто и 4Fe-4S ферредоксин подобен желязо-серен свързващ домен в оранжево (226).**

## 6.2.13 AIP

AIP генът кодира белтък, наречен арил хидрокарбон рецептор-свързващ белтък (aryl hydrocarbon receptor-interacting protein). Неговата функция не е напълно ясна, но се знае че той си взаимодейства и се свързва с редица други белтъци, вкл. арил хидрокарбон рецептора, и така се регулират процесите на пролиферация, диференциация, и клетъчно оцеляване (227). Смята се, че действа като тумор-супресор, вероятно като възпрепятства по неизвестен механизъм неконтролируемото делене на клетките (227,228). Фамилна изолатна аденома на щитовидната жлеза (FIPA) е автозомно доминантно заболяване с различни генетични компоненти и непълна пенетрантност. Герминативни мутации в гена AIP са докладвани при 15-40% от FIPA пациентите (227,229). Ролята на мутациите в AIP при фамилния рак на гърдата и яйчника все още не е изяснена. Откритата p.Arg304Gln (R304A) мутация е известна в базите данни и се локализира в FKBP-PP1-изомеразен домен (Фиг. 59). Носител на този вариант е пациентка с рак на гърдата с ранно начало (29г), която има леля и чичо по майчин линия с рак на гърдата и дядо по бащина линия с рак на мозък (Приложение 4, BC125)



**Фигура 59. AIP и известните мутации, асоциирани с FIPA. AhR- арил хидрокарбон рецептор; FKBP-PPI- изомеразен домен; hsp90- Heat-shock protein 90; TPR- Tetratricopeptide повторен домен (230).**

С навлизането на новите технологии за следващо поколение секвениране се откриват все повече публикации при различни популации за анализ на туморната хетерогенност при рака на гърдата и/или яйчника използвайки мултигенни панели.

Couch и съавтори (231) анализират честотата на мутации в панел от 17 тумор-асоциирани гени, включително BRCA1 и BRCA2, при 1824 пациента с тройно-негативен подтип рак на гърдата, които не са селектирани по фамилна история за рака на гърдата или яйчника. Патогенни мутации са открити при 14.6% от всички пациенти. От тях 11.2% са били с мутации в BRCA1 (8.5%) или BRCA2 (2.7%). Патогенни муации са открити и в 15 други гени при 3.7% от пациентите като най-голяма част са гени обвързани с хомоложната рекомбинация- PALB2 (1.2%) и BARD1, RAD51D, RAD51C, BRIP1 (0.3%-0.5%). Пациентите с тройно-негативен рак на гърдата носещи мутации са диагностицирани с ранно начало на заболяването и са с висок грейд на туморите от тези без мутации (231).

Buys и съавтори (232) публикуват едно от най-големите проучвания в сферата на панелното секвениране на пациенти с НВОС. Те анализират 35 409 жени с рак на гърдата, като жени с няколко случая на рак на гърдата и мъжете с това заболяване не са анализирани, със NGS панел от 25 тумор-асоциирани гена. Честотата и разпределението на патогенните варианти са определени при цялата кохорта, сред жените с тройно-негативен рак на гърдата и по възраст на диагноза. Патогенни варианти са наблюдавани при 9.3% от изследваните жени. 51.5% от патогенните варианти са открити в други гени различни от BRCA- CHEK2 (11.7%), ATM (9.7%), и PALB2 (9.3%). Преобладават мутации в BRCA1, PALB2, BARD1, BRIP1 и RAD51C при пациентите с тройно-негативен рак на гърдата. Нивото на мутациите при жените под 40 години е по-високо и по-ниско при тези над 59 години и относително постоянно при жени между 40 и 59 години. Тези резултати показват, че панелното секвениране повишава процента на носителките на патогенни мутации в сравнение само с анализиранието на двата най-високо пенетрантни гени- BRCA1 и BRCA2 (95).

Tung и съавтори (233) анализират честотата на мутации при 488 пациенти от САЩ с рак на гърдата в панел от 25 тумор-асоциирани гена. Патогенни мутации са открити

при 10.7% от жените, като 6.1% са в BRCA1/2 гените (5.1% от еврейското семейство Ешкенази) и 4.6% в други гени свързани с HBOC- CHEK2 (n=10), ATM (n=4), BRIP1(n=4), и по една в PALB2, PTEN, NBN, RAD51C, RAD51D, MSH6, и PMS2. Докато ранната възраст на заболяването, принадлежността към ерейското семейство Ешкенази, тройно-негативен подтип на тумора и фамилната история за HBOC насочват към BRCA носителство на мутации няма фактори, които да насочат към анализ на мутации в другите гени ако те се анализират по отделно, а не с панел от гени (233).

Lin и съавтори (234) разработват панел от 68 гени, които се свързват с повишен риск при пациенти с рак на гърдата с ранно начало или фамилни случаи. Изследват общо 133 пациента и 30 от тях (22.6%) носят герминативна патогенна мутация- 9 в BRCA1, 11 в BRCA2, 2 в RAD50, 2 в TP53 и по една в ATM, BRIP1, FANCI, MSH2, MUTYH и RAD51C. Най-висока честота се открива при тройно-негативните пациенти (45.5%,  $p = 0.025$ ). Седем от BRCA1 мутациите и една във FANCI също са в групата на тройно-негативните жени; RAD51C мутацията се открива при пациентка с позитивни рецептори и негативен резултат за Her2; а останалите мутации в RAD50, ATM и TP53 се откриват при пациенти с позитивни рецептори и позитивен резултат за Her2 (234).

Yang и съавтори (235) изследват герминативни мутации в Китайската популация на жени с HBOC. Изследват 152 гена със следващо поколение секвениране при 99 фамилни случаи на рака на гърдата. Установяват наличие на 42 патогенни мутации в 21 гена и 34 пациента, които включват 18 (18.2%) BRCA1 и BRCA2; 3 (3%) в TP53; 5 (5.1%) MMR гени, 1 (1%) в CDH1, 6 (6.1%) във Fanconi anemia гените и 9 (9.1%) в други гени. Седем пациента носят мутация в повече от един ген като 4 са носители на мутация в BRCA1 или BRCA2 и заболяването при тях е настъпило на по-ранна възраст в сравнение с пациентите само с мутации в BRCA1 или BRCA2 гена (235).

Tedaldi и съавтори (236) използват панел от 94 гена при 255 жени, 57 от които имат патогенни мутации в BRCA1/2 гените, а 17 носят муутации в други гени като PALB2, ATM, BRIP1, RAD51D, MSH6, PPM1D, RECQL4, ERCC3, TSC2, SLX4 и други Fanconi anemia гени. Пациентите с мутации в тези други гени не показват различия с пациентите с мутации в BRCA1 или BRCA2 в контекста на възраст на диагнозата и клинични показатели, което предполага, че те могат да отговарят за повишен риск от развитие на заболяването също както BRCA1/2 гените. Сред тези пациенти се срещат и голям процент случаи на билатерален карцином на гърдата и по-малко случаи на рак на яйчника отколкото BRCA носителите.

Jun Li и съавтори (237) изследват 600 BRCA негативни пациентки с фамилен рак на гърдата за 17 гени асоциирани със заболяването. Откритите патогенни мутации са изследвани и при родственици на пациентите за да се определи ко-сегрегацията на вариантите в семейството. Те откриват 31 патогенни мутации в 7 гена- TP53, PALB2, ATM, CHEK2, CDH1, PTEN и STK11 при 45 пациента и 22 потенциално патогенни мутации при 31 пациентки в 8 гена BARD1, BRIP1, MRE11, NBN, RAD50, RAD51C, RAD51D и CDK4. Вариантите са анализирани при 558 членове на семействата на тези пробанди. Определяйки константния относителен риск за развитие на заболяването сред групите пациенти разделени по възраст само CDH1, CHEK2, PALB2 и TP53 показват доказателства за значително повишен риск от рак на гърдата, а ATM-среден риск.

Bernards и съавтори (238) секвенират ДНК от 47 жени с диагноза рак на яйчника на възраст до 40 години и откриват 11 гени които се асоциират с рака на яйчника BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, MLH1, MSH2, MSH6, PALB2, PMS2, RAD51D и RAD51C и допълнителни гени свързани с поправката на ДНК- ATM, BAP1, CHEK2, MRE11A, NBN, PTEN, TP53. Взимат в предвид само истински патогенните варианти и установяват, че

такива се откриват при 13 от 47 (28%) от пациентите, като 10 (77%) са в BRCA1 и по една в BRCA2, MSH2 и RAD51D (238).

За първи път в България беше използван метод за новогенерационно секвениране на панел от 94 тумор-асоциирани гени при BRCA негативни пациенти с рак на гърдата. Установено беше, че 11 от 31 пациентки (35.5%) са носители на патогенна или вероятно патогенна мутация. Бяха открити мутации в 13 гена- PTCH1, RAD51C, MET, MUTYH, ATM, CHEK2, WRN, ERCC4, PALB2, PRF1, RET, SDHB и AIP като мутациите са 14 различни вида две от които в ATM гена, а останалите носят по една. Осем от откритите мутации са сигурно патогенни, а останалите шест са вероятно патогенни според програмите за предикция на ефекта Sift и Polyphen. Анализът на панел от 94 гени с платформа MiSeq позволи откриването на вероятна генетичната причина за възникване на заболяването при 35.5% от изследваните пациентки с негативен BRCA1/2 мутационен статус, което показва необходимостта от използването на панелно секвениране в диагностичната практика на тези заболявания. При част от пациентите с фамилен рак на гърдата и яйчниците (27.3% от изследваните пациентки с мутации), се откриват патогенни варианти в два различни тумор-асоциирани гени (двойна хетерозиготност), което допълнително потвърждава необходимостта от изследването на панели от гени за диагностика и оценка на риска.

### **6.3 Анализ на соматични мутации в тумори на пациентки с рак на гърдата с MiSeq платформа за следващо поколение секвениране**

Като цяло заболеваемостта от рак на млечната жлеза в България е по-ниска от средната за Европа, но смъртността е малко по-висока (1). Въпреки, че през последните години, благодарение на засилените изследвания в областта на медицинската онкология, молекулярната биология и генетика, бе постигнат напредък в разбирането на неговите молекулярни механизми и в развитието на нови стратегии за насочена терапия, той продължава да бъде водеща причина за смърт при жените в следствие на онкологично заболяване (1). Статистическите данни показват нуждата от подобряване на подходите както за ранното дианостициране, така и за най- адекватното лечение и проследяване на пациентите с това заболяване (1).

Известно е, че ракът на гърдата е силно хетерогенно заболяване и се класифицира в няколко подтипа (239,240). Хистологично туморите могат да бъдат разграничени на дуктални карциноми in situ (DCIS - Ductal carcinoma in situ), инвазивни дуктални карциноми (IDC - Invasive Ductal Carcinoma), лобуларни карциноми in situ (LCIS - Lobular carcinoma in situ) и лобуларни инвазивни карциноми (ILD - Invasive Lobular Carcinoma) (2-4). През последните години, благодарение на микрочипови генно експресионни анализи, карциномите на гърдата бяха класифицирани на пет основни подтипа: луминална А група, луминална В група, HER2 (+) група, Claudin-low и базална група (5-8). Друга класификация е на база експресията на естрогенов рецептор (ER), прогестеронов рецептор (PR) и ERBB2 (HER2) и според иРНК експресионно профилиране (9,10).

В контекста на персонализираната медицина и в ерата на мащабни проучвания в областта на туморната биология, включващи технологичните предимства на платформите за масово новогенерационно секвениране, фокусът на изследванията е насочен върху анти-туморната активност на прицелни медикаменти, насочени към основни мишени, като белтъците участващи в онкогенезата. Основата за инициране на канцерогенезата се определя от появата на соматични мутации в тумор-асоциирани гени- т.нар. „driver“ (задвижващи) и „passengers“ (съпътстващи) мутации (241).

„Задвижващите“ придават на раковата клетка предимство да нараства по-бързо от тези, които не носят мутацията и са подложени на позитивна селекция при еволюцията на рака. Първичната или придобитата с времето резистентност към терапията е огромен проблем, особено при рака на гърдата, където броя на изследванията за определяне на т.нар. “driver” мутации е малоброен (242). Тъй като раковите клетки са зависими от белтъчните продукти на мутиралите гени, те представляват прицелни мишени за разработването на нови таргетни медикаменти.

При проведеното новогенерационно секвениране на панел от 48 тумор-асоциирани гена, бяха открити 43 вида патогенни и вероятно патогенни мутации в 17 от гените (Приложение 5). Най-много различни мутации бяха установени в гените PIK3CA и TP53.

**Таблица 58 Брой, честота и наличие в базите данни на различните по вид открити патогенни и вероятно патогенни мутации.**

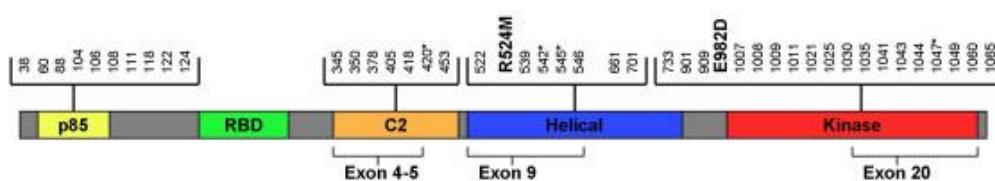
Ген	Брой и честота на мутациите	Известни за бази данни	Нови за бази данни
PIK3CA	9; 20.9%	8	1
TP53	8; 18.6%	7	1
ERBB2	3; 7%	1	2
HNF1A	3; 7%	3	0
PTEN	3; 7%	2	1
APC	2; 4.7%	1	1
ATM	2; 4.7%	1	1
RET	2; 4.7%	2	0
KRAS	2; 4.7%	1	1
SMAD4	2; 4.7%	2	0
BRAF	1; 2.3%	1	0
ERBB4	1; 2.3%	0	1
JAK3	1; 2.3%	1	0
AKT1	1; 2.3%	1	0
FGFR1	1; 2.3%	0	1
PTPN11	1; 2.3%	1	0
RB1	1; 2.3%	0	1

От всички 91 пациентки голяма част имаха само по 1 мутация в изследваните гени. Единичните мутации бяха разпределени най-често в гените PIK3CA, HNF1A, ERBB2, ERBB4 и APC. Тези гени са или рецептори (ERBB2, ERBB4), или активират основни пътища на оцеляване и пролиферация на клетката (PIK3CA, APC), или са транскрипционни фактори (HNF1A) и мутациите в тях биха могли да са „иницииращи“ туморогенезата при съответните пациенти (Приложение 5).

### 6.3.1 PIK3CA

PIK3CA кодира фосфоинозитол-3 киназа, чиято роля е свързана с фосфорилиране на фосфатидинозитол, фосфатидинозитол-4 фосфат и фосфатидинозитол-4-5 бисфосфат до фосфатидинозитол-3,4,5 трифосфат, който от своя страна участва в привличането на PH-домен съдържащи белтъци към мембраната като AKT1 и PDK1, активиращи сигнали за клетъчен растеж, оцеляване, пролиферация, подвижност и морфология на клетките (243).

При изследването на събраната група тумори на пациенти с рак на гърдара беше установено, че най-много мутации се акумулират именно в този ген. Наблюдавани бяха 9 различни миссенс мутации, от които една нова с честота 29.7%. Две от мутациите се намират в p85 свързващия домен на белтъка, три - в „гореща точка“ на мутации в киназния домен и четири - в „гореща точка“ на мутации в хеликазния домен (Фиг. 60).

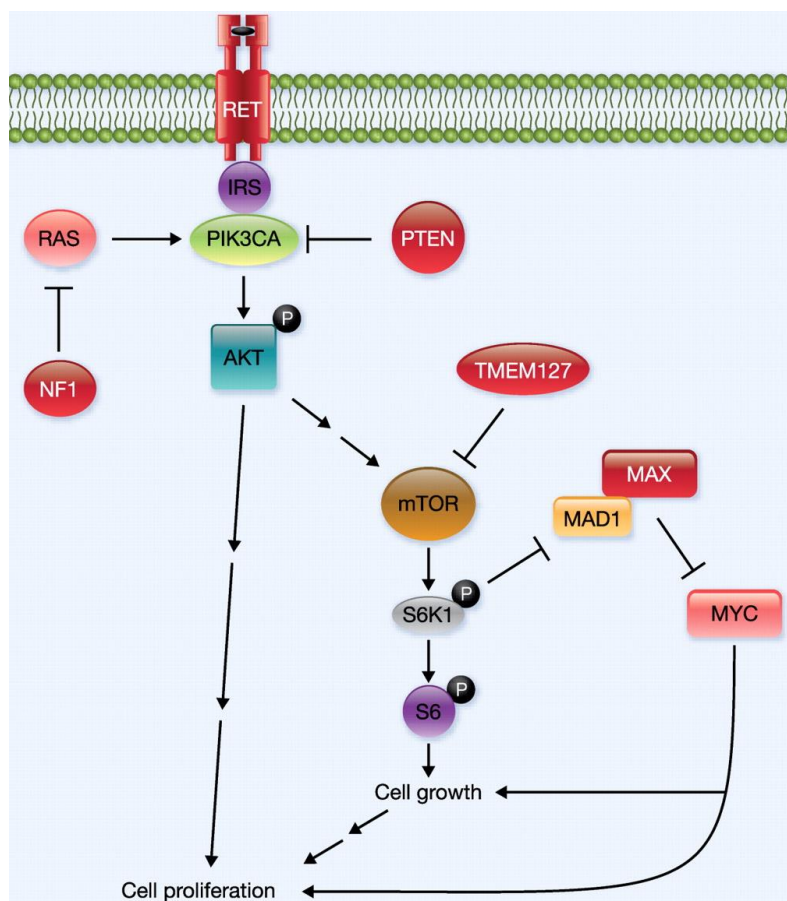


Фигура 60. PIK3CA доменна структура (244).

Сигналният път, включващ PI3K/AKT/mTOR е вътреклетъчен сигнален път важен за регулирането на клетъчния цикъл (245) Ето защо той директно е свързан с клетъчното делене, пролиферацията и туморогенезата. Фосфорилирането и активирането на PIK3CA активира АКТ, локализирайки го в плазмената мембрана. При много видове рак този път е свръх активиран и подтиква апоптозата, увеличавайки клетъчната пролиферация (246) (Фиг 61).

PI3CA сигнализацията е най-често засегнатия път при рака на гърдата (247). Мутации в гена се наблюдават при около 30% от туморите на гърдата, заедно със загуба на функциите на гена PTEN. След първото откриване на мутации в PIK3CA при солидни тумори през 2004 г., множество изследвания са установили прогностичните и терапевтични приложения на тези мутации (248–252). Въпреки че, ролята на някои от тях все още не е напълно изяснена, са установени и потвърдени следните факти: 1) PIK3CA се наблюдават най-вече при ER-позитивни/HER2-негативни тумори; 2) PIK3CA мутациите могат да се наблюдават заедно с други съпътстващи промени като HER2 амплификация или загуба на белтъчните функции на PTEN; 3) Мутациите в гена са добър прогностичен маркер; 4) PIK3CA мутация е маркер и за лош отговор към терапия с трастузумаб, но влиянието ѝ върху свободната от заболяване преживяемост и общата преживяемост е неясно (247).

Към настоящия моменат няма достатъчно доказателства в подкрепа на въвеждането на рутинен анализ за мутации в PIK3CA гена в клиничната практика. Въпреки това, имайки предвид че мутантните по гена ракови клетки при рака на гърдата имат различна туморна биология, се очаква да се разработят нови индивидуализирани терапевтични стратегии (247).



**Фигура 61. PIK3CA/AKT1/mTOR пътя активира процеси като регулация на клетъчния растеж, делене, оцеляване, а когато е нарушен - туморогенеза. В нормалните клетки, след свързването на GDNF лиганди за рецепторни тирозин кинази като RET задейства сигнализацията с участието на PIK3CA, която, от своя страна активира AKT, а тази активна форма на AKT регулира до 100 ефекторни белтъка, свързани с клетъчната пролиферация (246).**

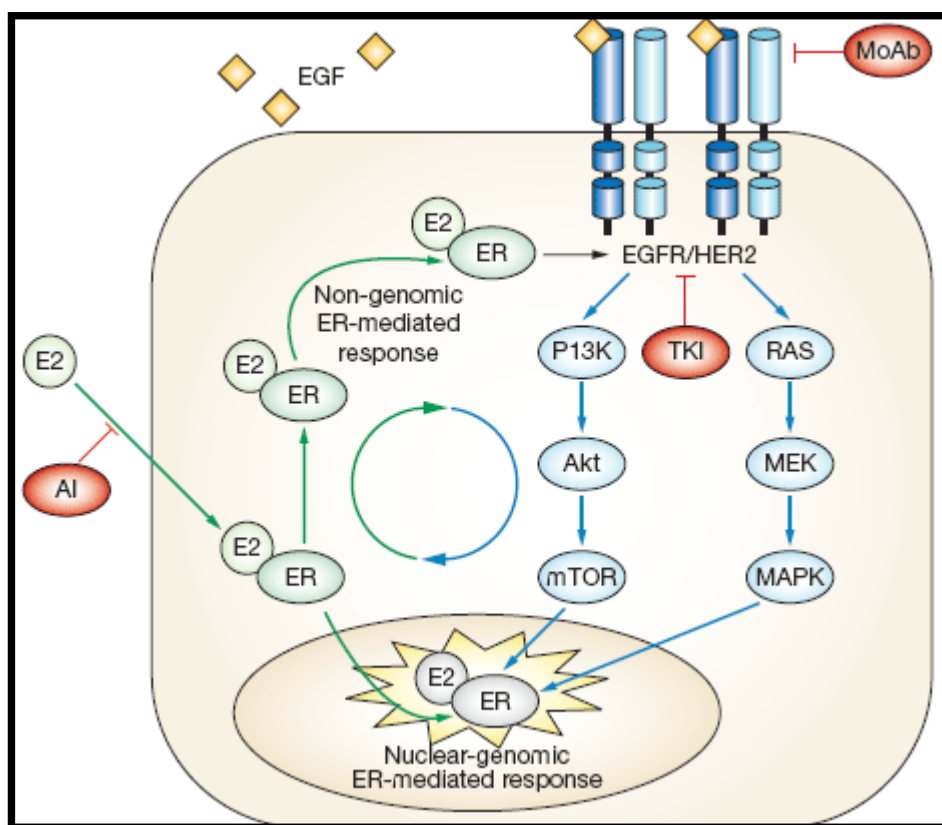
### 6.3.2 HNF1A

HNF1A кодира транскрипционен фактор, необходим за експресията на някои чернодробни специфични гени. Среща се и при някои видове рак (253). Белтъкът действа като хомодимер и свързва обратната палиндромна последователност 5'-GTTAATNATTAAC-3' (254). В настоящото изследване честотата на установените *HNF1A* мутации е 3 вида от общо 43, които се срещат в 6 пациентки. В литературата не се открива информация за асоциация на гена или намутациите в него мутации с рака на гърдата. Въпреки това има изследвания, които показват ролята му като фактор при други видове тумори – например на панкреаса (253).

### 6.3.3 ERBB2

ERBB2 е познат като HER2/neu и кодира член на рецепторите за епидермалните растежни фактори (255). Той е тирозин киназа, но няма собствен лиганд като растежен

фактор, а като хетеродимер се свързва силно с другите рецептори от семейството, като стабилизира и засилва киназната им активност (Фиг. 62). В средата на 80те години ERBB2 е установен като инициращ туморогенезата онкоген (256,257). Амплификацията и/или свръхексперсията на гена е докладвана при редица туморни заболявания, най-често при тези на гърдата и яйчниците (258,259). Установено е, че те играят важна роля в развитието и прогресията на определени агресивни видове рак на гърдата (112). В последните години ERBB2 е важен биомаркер и цел на терапиите за около 30% от пациентите с рак на гърдата (260).

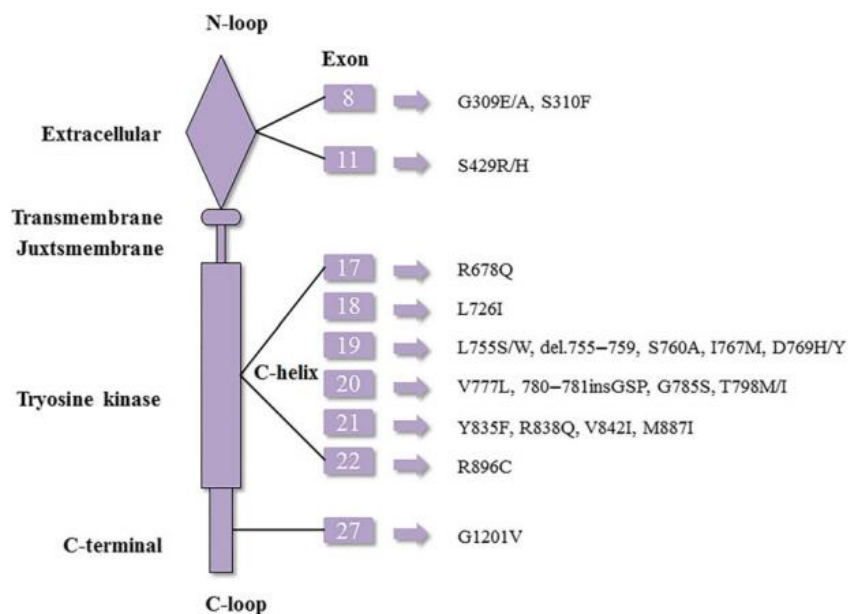


**Фигура 62. Her2/neu сигнализация (261).**

ERBB2/HER2, известни с ролята си при рака на гърдата, могат да бъдат обект на прицелна терапия с два вида фармацевтични медикаменти - антитела срещу извънклетъчния рецепторен домен и малки молекулни съединения, насочени срещу вътреклетъчния тирозин киназен домен (115). Свръхактивирането на белтъка от генната амплификация участва в патофизиологията на рака на гърдата, яйчниците, стомаха, колона, белия дроб, мозъка и при туморите на главата и шията (262). Първоначално като терапевтичен агент при тумори, експресиращи ERBB2 се използва трастузумаб, който значително увеличава преживяемостта на пациентите с рак на гърдата и на стомаха (263). С навлизането на новогенерационното секвениране в гена бяха открити активиращи мутации (262).

След свързване с лиганда, белтъците от семейството на ERBB опосредстват нормалната клетъчна пролиферация и оцеляване чрез два сигнални пътя - Ras-Raf-MAPK и PI3K/Akt/mTOR (Фиг62). ERBB2 действа само под формата на хетеродимер с някой от останалите белтъци от семейството и е предпочитан партньор за димеризация

(262). Най-активният хетеродимер е ERBB2/ERBB3, който действа като онкогенна единица. Активирането на ERBB2 се случва в следствие на три типа соматични мутации - малки инсерции и миссенс мутации в киназния домен, миссенс мутации в екстрацелуларния домен или големи делеции в екстрацелуларния домен (262). Резултатите от настоящото изследване показват наличие на три миссенс мутации в района на вътреклетъчния киназен домен, две от които са нови за базите данни (Приложение 5). Те са локализирани в екзон 21 (2 от мутациите) и в екзон 22 (1 мутация). Повечето, установни до момента мутации са локализирани в три екзона - 19, 20 и 21 на тирозин киназния домен (Фиг 63). Откритите миссенс мутации при нашите пациенти са локализирани в екзон 21 (2 от мутациите) и в екзон 22 (1 мутация).

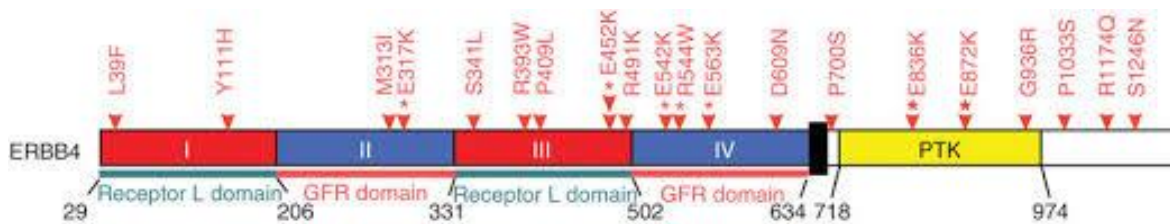


**Фигура 63. ERBB2 доменна структура и разпределение на най-честите мутации (264).**

Според наличната информация в литературата вероятността да има мутация в ERBB2 гена при пациентите с рак на гърдата е 1.67% (264). Честотата на мутациите в него при изследваната от нас група от български пациентки с рак на гърдата е доста висока- 14 от 91 пациентки (15.4%).

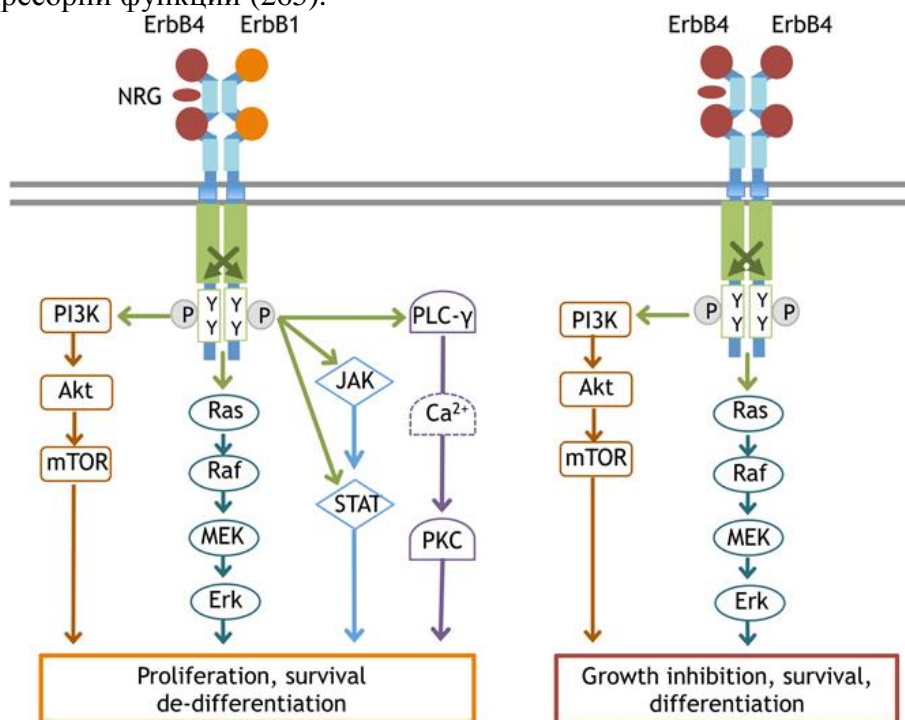
### 6.3.4 ERBB4

ERBB4 е друг член на рецепторите за епидермален растежен фактор и е тирозин киназа. Белтъкът свързва неврорегулини и други фактори, които задействат сигнални каскади за митогенеза (Фиг 64) (118). Мутации в гена се асоциират с ракови заболявания (265).



**Фигура 64.** Доменна структура на ERBB4 белтъка и най-честите мутации в него (266).

Свързването на лиганда към ERBB4 води до активиране на сигналните пътища PI3K/Akt/mTOR и Ras-Raf-MAPK (Фиг 65). Освен чрез сигнални каскади ERBB4 може да активира пътища директно в ядрото, след като бъде процесориран от белтъците TACE и  $\gamma$  secretase, които освобождават разтворим вътреклетъчен рецепторен домен на белтъка, регулиращ транскрипцията. Много са изследванията на гена за ролята му при рака на гърдата и е установено, че той притежава както онкогенни, така и туморсупресорни функции (265).

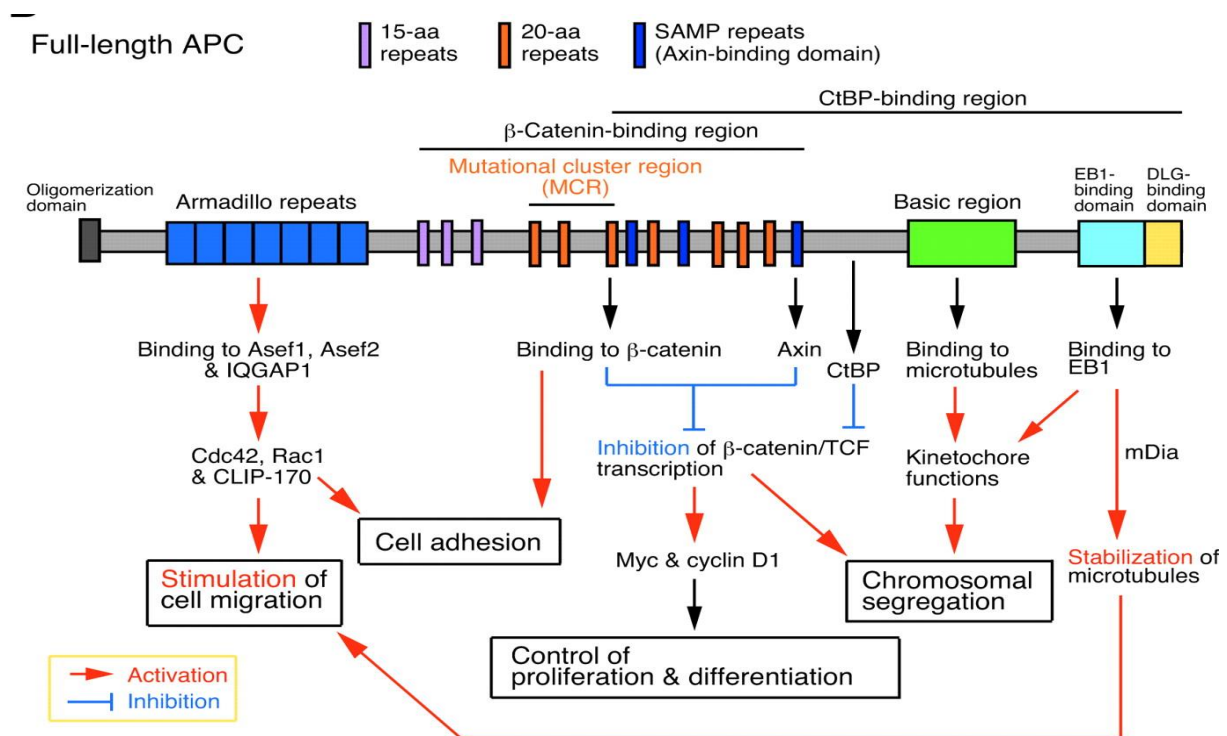


**Фигура 65.** Сигнални механизми на ERBB4 рецептор-тирозин киназата (267).

Свърхекспресията на ERBB4 усилва растежа на човешки ракови клетки от гърда и трансформира миши клетки от млечна жлеза в туморни (265). Свърхекспресията на гена, заедно с всеки друг член от семейството също показва свойството да трансформира нормални клетки в туморни (265). Той регулира и транскрипцията на гени регулирани от естрогена и опосредства естроген-индуциран растеж на клетките от рак на гърдата (265). При нашите пациенти се открива една нова вероятно патогенна мутация в рецепторния тирозин киназен домен при 4.4 % от изследваните пациентки (Фиг. 64, Приложение 5).

### 6.3.5 APC

APC кодира туморсупресорен белтък, който действа като антагонист на Wnt сигналния път(268). Участва в клетъчната адхезия и миграция, активиране на транскрипцията и апоптозата. Дефекти в гена водят до пре-малигненото заболяване фамилна аденоматозна полипоза, което впоследствие преминава в злокачествено заболяване(268). APC генът кодира белтък с големина 312 килодалтона, който има няколко домена, свързващи различни белтъци като  $\beta$ -catenin, axin, CtBP, Asefs, IQGAP1, EB1 и микротубулите(268). Той подтиска каноничния WNT сигнален път, което е от изключително значение за туморогенезата, развитието и хомеостазата на различни клетъчни епителни и лимфоидни тъкани. Играе роля и в няколко други фундаментални процеса - клетъчната адхезия, миграция, организацията на актин и микротубулната мрежа, образуване на делителното вретено и хромозомната сегрегация (268). Нарушението на тези пътища води до туморогенеза (Фиг66) (268).



**Фигура 66. Доменна структура на APC гена, белтъчни партньори и сигнализация (269).**

APC е мутирал или е хиперметиран при 70% от спорадичните случаи на рака на гърдата, като показва зависимост и от подтипа карциноми (270,271). Мутации в гена променят туморната хистопатология от солидни към сквамозни аденокарциноми - най-агресивните метапластични тумори на рака на гърдата (272). Изследванията показват, че FAK/Src/JNK сигналният път регулира усилената пролиферация при мутирал APC ген (272). Въпреки това, ролята на APC в осигуряване на хемотерапевтичната устойчивост на рака на гърдата остава неизяснена. Загубата на функции на APC значително повишава устойчивостта на туморните клетки към цисплатин-медираната апоптоза (272).

Установено е, че загубата на функции на APC най-вече води до активиране на пътя Wnt/ $\beta$ -catenin (268). Много от функциите на APC (регулацията на пролиферацията, организацията на цитоскелета и други), които не зависят от активиране на WNT

сигналния път предполагат, че APC играе важна роля в отговора към терапия (268). Въпреки че терапиите при рака на гърдата зависят от подтипа тумори, има стандартни терапевтични режими. Хормон-чувствителните тумори се лекуват с анти естрогени (тамоксифен) или с моноклонални антитела (трастузумаб при Her2 експресия). Тройно-негативните тумори се третират с хирургични интервенции, радиация и системни цитотоксични химиотерапевтични агенти (273), в комбинация с таксани и антациклинови медикаменти. Учени изследват три вида хемотерапевтични агенти, които се използват за лечението на тройно-негативни пациентки - паклитаксел, доксорубицин и цисплатин (274).

Повторната поява на рак на гърдата (90% от смъртните случаи от рака на гърдата) често е съпътсвано от устойчивост към химиотерапия (274). Критично е да се установят маркерите водещи до тази устойчивост. APC мутации в миши модели водят до повишена експресия на MDR1, който е повишен след третиране с доксорубицин или паклитаксел (274). APC мутации също намаляват цисплатин- и доксорубицин опосредстваната апоптоза. Лечението на тези клетки с комбинацията цисплатин и Src или JNK инхибитори възстановява апоптозата (274). Това е от съществено значение за елиминиране на химиотерапевтичната устойчивост при APC мутирала туморни клетки от гърдата. Взети заедно всички открития водят до заключението, че загубата на функции на APC значително повлиява хемотерапевтичната устойчивост на клетките от рака на гърдата (274).

Откритите мутациите в APC гена при пациентките в настоящото изследване са две миссенс мутации, които се намират в най-важния район със струпване на множество мутации, отговарящ за свързването и разграждането на beta catenin и с GSK3-beta фосфорилирането (Фиг 66). Едната от мутациите е нова, а другата е известна за COSMIC базата данни, но е открита в други видове тумори. APC мутациите се откриват в 13 % от изследваните пациентки.

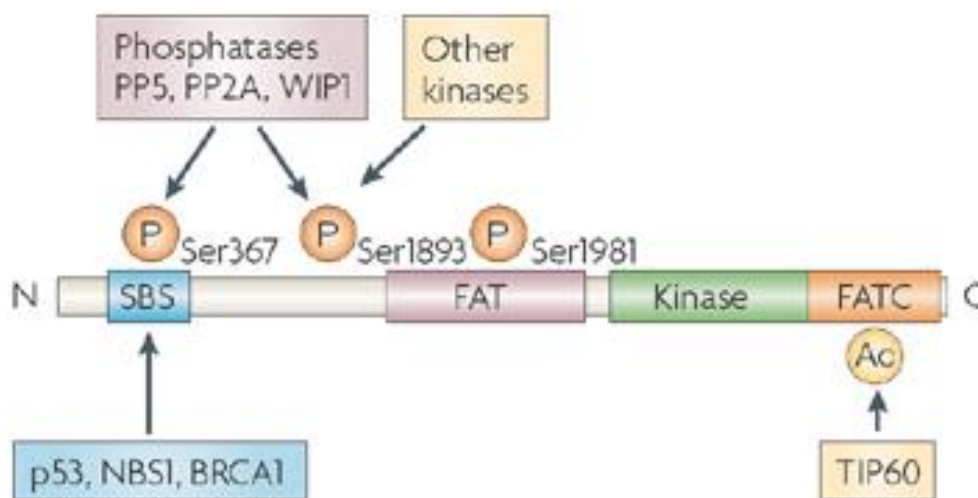
След направеното разпределение на мутациите по пациенти и по подтипове тумори се установи, че най-срещаната комбинация от мутационни събития е тази, включваща гените ATM, ERBB2 и PIK3CA (Таблица 48). Резултатите показват, че има прилика между отделните подгрупи по отношение на откритите в тях соматични мутации и отдиференцирането им само на база на хистологичния резултат за рецепторите ER, PR и HER2 не показва категорично разделяне на подтиповете според мутациите в тях.

### 6.3.6 ATM

ATM е активна серин/треонин киназа, която има C-краен FAT с много консервативен 35 аминокиселинен участък - FATC домен, който регулира киназната активност и отговаря за свързването с белтъчни партньори (272). N-краят на белтъка включва няколко HEAT домена и място за свързване със субстартите (фиг 67). ATM има основна роля в ДНК поправката на двуверижни скъсвания, процес който включва разпознаване на мястото на скъсване, привличане на други белтъци, сигнализация за преминаване в различните фази на клетъчния цикъл, регулация на транскрипцията или активиране на апоптозата (272). В нормалните клетки ATM е под формата на инертни димери или мултимери. В отговор на двуверижните скъсвания той дисоциира в силно активни мономери, автофосфорилира се в мястото на Серин1981 и се привлича към мястото на скъсване, където иницира каскада с фосфорилиране на ключови за поправката белтъци като TP53, BRCA1 и CHEK2 (272). Swift и колеги първи предполагат, че родственици на пациенти с атаксия телангиектазия са с повишен риск от

развитие на рака на гърдата (98). Техният анализ показва, че родствениците имат 2.3 пъти повишен риск за мъжете и 3.1 за жените. Около 1% от представителите на общата популация може би са носители на мутации в ATM, водещи до атаксия телангиектазия (275). Няколко епидемиологични проучвания на заболяемостта от рак при родствениците потвърждават повишения риск от рак на гърдата - риск от 3.9 пъти и 2.23 (275).

Спрямо профила на установените мутации, при две от групите пациенти, които се откриват, се наблюдава една и съща frameshift мутация в ATM гена (Таблица 48). Може да се предположи, че frameshift мутацията в ATM на първата и втората група е инициращата патогенезата мутация, а останалите са т.нар съпътстващи мутации. Мутацията p.Thr1743LysfsTer13 в ATM е нова за базите данни и се среща при 11 от изследваните пациенти (12%). Мутацията води до отпадането на най-важните домени на гена- FATC, FAT и киназния домен, чрез който осъществява функциите си (Фиг 67).



**Фигура 67. Доменна структура на ATM гена (276).**

Има изследвания за Българската популация за статуса на мутации в ключови гени при пациенти с рак на гърдата (112) Божанов и съавтори изследват мутационния спектър в свежи туморни тъкани от спорадичен рак на гърдата за мутации в гените p53, BRCA1, ATM и PIK3CA и експресията на HER2 (259). Те откриват, че TP53 мутациите се срещат с честота 20-40%, в зависимост от размера на тумора и стадия на заболяването и често се асоциират с по-агресивна туморогенеза и по-лоша прогноза. Различните мутации се асоциират с устойчивост на радиотерапия и химиотерапевтични агенти (259). При сравнението на честотата на срещане на мутации в тези гени с получените в дисертационния труд резултати се установява, че нашите пациенти имат честота на срещане на мутациите при 91 пациентки за гените p53, ATM и PIK3CA съответно 9.9%, 13.2% и 29.7%.

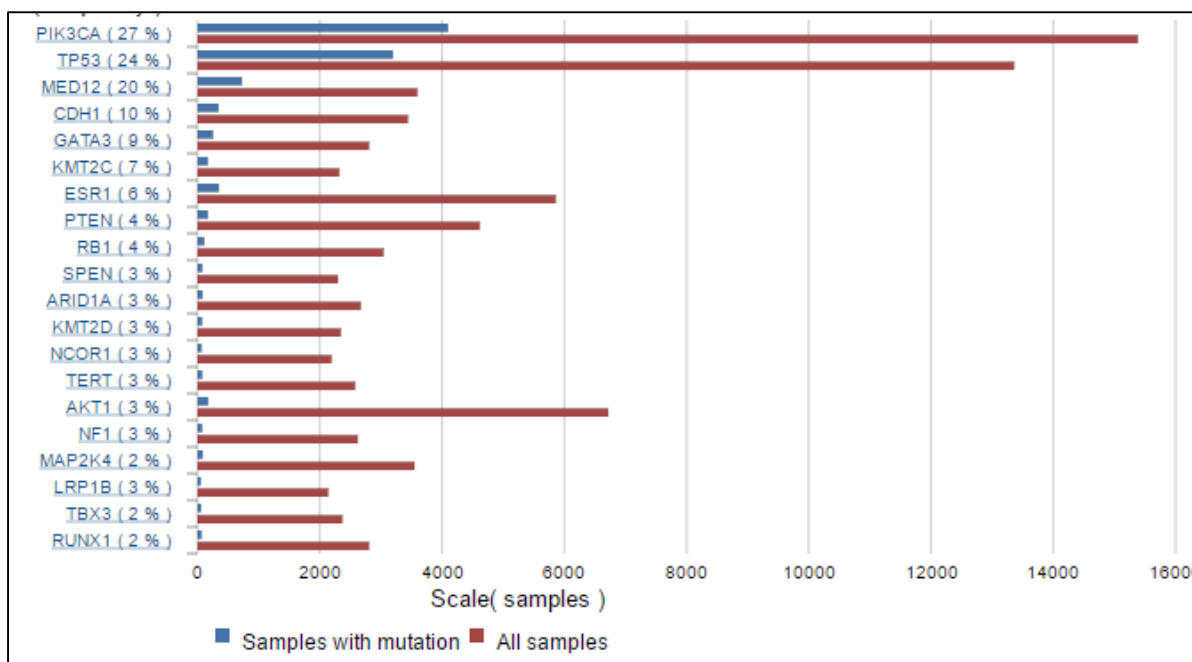
Сравнявайки клиничните параметри авторите показват, че носителите на мутации в TP53 имат по-големи и по-слабо диференцирани тумори като същото се наблюдава и при нашите пациенти, срещат се предимно в туморите с G3 стадий, в сравнение с ATM и PIK3CA ( $P < 0.0001$ ), което показва, че мутациите в TP53 са тясно свързани с дедиференциацията (259). Мутираният TP53 намалява общата преживяемост при пациентите с рак на гърдата, но не се показва като независим фактор. TP53 мутираният

пациенти са над 50 годишни и имат по-лоша прогноза от тези над 50 години без мутации (259) .

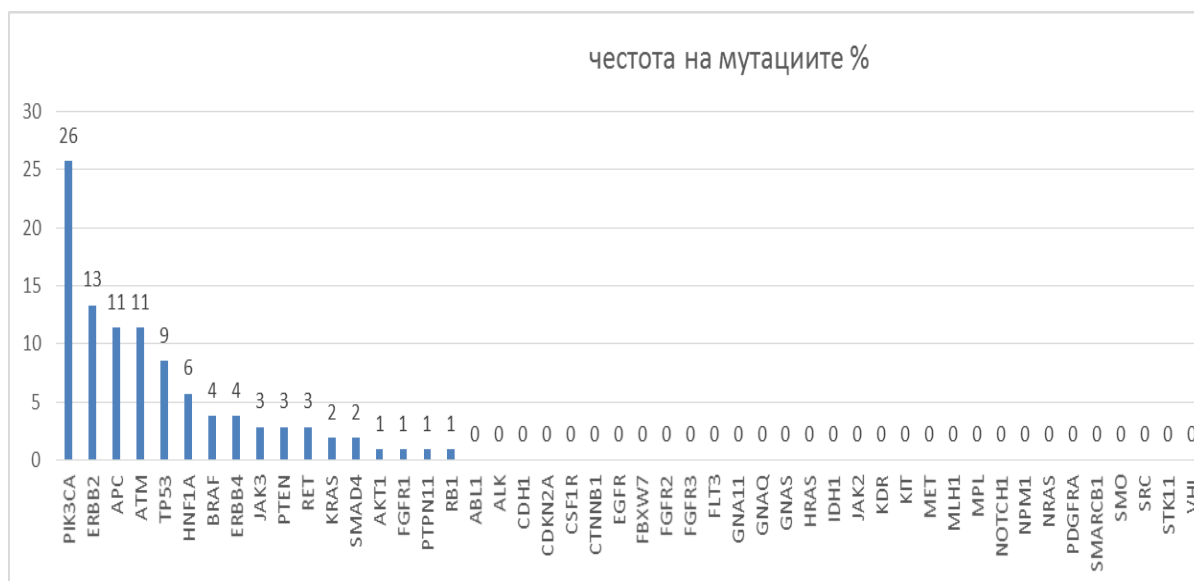
COSMIC е базата данни, в която се намира информация за откритите соматични мутации в различни видове туморни проби (277). На Фиг 68 са показани най-честите 20 гена със соматични мутации при рака на гърдата. Сравнителния анализ с нашите резултати показва, че 70% от всички мутационни събития се откриват в гените PIK3CA, ERBB2, APC, ATM и TP53 (Таблица59). Гените с най-чести соматични мутации в изследваната група тумори на български пациенти са PIK3CA, ERBB2, APC, ATM и TP53 (Фиг 69). Установеният профил на най-чести соматични мутации в PIK3CA, ERBB2, APC, ATM и TP53 се различава от този в базите данни, което потвърждава необходимостта от повече проучвания в тази насока.

**Таблица 59. Сравнение между данните за соматични мутации в гени свързани с рак на гърдата в COSMIC базата данни и получените резултати.**

ген	COSMIC честота	честота в изследваните пациенти
PIK3CA	27%	26%
TP53	24%	9%
CDH1	10%	0%
PTEN	4%	3%
RB1	4%	1%
AKT1	3%	1%



**Фигура 68. Топ 20 тумор-асоциирани гена показани по честота на срещане на мутации в тях при пациенти с рак на гърдата (277).**



**Фигура 69. Честота на откритите патогенни и вероятно патогенни мутации в панела от 48 тумор-асоциирани гена при пациентите с рак на гърдата.**

На базата на анализирания спектър от соматични мутации могат да се отграничат няколко подгрупи със сходни молекулни профили в рамките на основните хистологични подтипове тумори, което може да се използва за прецизиране на терапията- Първата група е в част от Луминален А тип и се характеризира с наличието на една и съща frameshift мутация в ATM, и струпване на миссенс муации в гените PIK3CA, ERBB2 и APC, но липсват мутации в TP53; Втората група е в групата на Луминален Б тип и се характеризира със същата frameshift мутация в ATM гена, но има струпване на мутации в гените PIK3CA, ERBB2, но липсва както TP53 така и APC гена;

Третата група се открива в останалите пациенти от Луминален А и се характеризира с липсата на frameshift мутацията в ATM гена и наличие на мутации в PIK3CA, ERBB2, ERBB4, APC и имат мутации в TP53 и BRAF и четвъртата група се открива в останалите пациенти на Луминален Б тип и се характеризира с предимно миссенс мутации в PIK3CA, единични мутации в APC, TP53, PTEN и RET, но липсват мутации в ATM и BRAF (Таблица 48).

#### **6.4 Анализ на резултатите получени при изследването на циркулиращи туморни клетки при пациенти с метастазирал рак на гърдата.**

За изследването на циркулиращи туморни клетки в периферна кръв беше използван готов кит AdnaGen Breast Cancer, който е валидиран за анализ на циркулиращи туморни клетки при рака на гърдата. Съгласно инструкциите на производителя AdnaGen една пациентка се смята за позитивна спрямо наличието на циркулиращи туморни клетки ако показва експресия на поне един от трите маркера с позитивен резултат. Някои автори показват, че ЦТК могат да се използват като прогностичен маркер не само при метастазирало заболяване, но и при ранен рак на гърдата (278). Нивата на детекция на ЦТК варират между 9-40% за ранен рак на гърдата (132,279) и между 17-61% при метастатичен рак на гърдата (109,140,280). Няколко проучвания показват, че наличието на 5 или над 5 клетки на 7.5 мл кръв по време на терапия оказва влияние върху

свободната от заболяване преживяемост, общата преживяемост и при ранното откриване на пациентки, които не отговарят добре на терапията (141,281,282).

ЦТК с характеристики на епителни клетки са рядко явление в периферната кръв на раково болните пациенти като общ брой (<10 клетки/мл кръв) и в сравнение с кръвните клетки (една ЦТК на  $10^6$ - $10^7$  левкоцити) (283). Съществуват много методи за изолиране и обогатяване на ЦТК, които се различават по начините за обогатяване, намножаване, белязане и определяне (284), както и по чувствителност, специфичност и възпроизводимост (285). В момента техниките за изолиране на ЦТК от другите клетки в циркулацията, като еритроцитите и левкоцитите, използват разликите в техните физически характеристики (филтриране или градиент) или имуномагнитна сепарация (сортиране посредством магнитен афинитет, с магнитни частици или ферофлуид-базирани системи) (286). Идентифицирането на ЦТК се основава на директни цитометрични подходи с антитела (имуноцитохимични, имунофлуоресцентни и флуоцитометрични или индиректни методи като иРНК базиран RT PCR (102,103).

Голямото предимство на анализите с ЦТК от периферна кръв е липсата на инвазивност, висока цена и времеемкост в сравнение с биопсиите. ЦТК се изследват с т.нар. „течна биопсия“, която представлява еднократно взимане на кръв и по нататъшно характеризиране на клетките с всички – „омикс“ технологии. Използваният кит Adna Test Breast Cancer изолира и обогатява ЦТК на базата на имуномагнитна селекция на клетките с повърхностно клетъчни и туморспецифични антигени. Определянето на положителни резултати се прави на база експресията на поне един от трите маркера GA733-2, MUC1 или HER2. В допълнение към маркерите за качествен анализ, беше изследвана и експресията на няколко други маркера - SK19, hMAM, CD24 и CD44 с RT-PCR

При анализа на резултатите, направени за изходното изследване на пациентките с качествения анализ посредством AdnaTest се установи, че 10 от тях (23.3 %) са позитивни за ЦТК, като всички те са позитивни за маркера GA733-2 (23%), 8 пациентки (18.6%) са позитивни за маркера MUC-1, а 4 от тях са позитивни за маркера Her-2 (9.3%).

При анализа на резултатите с количествения анализ посредством RT-PCR се установи, че при нито една от пациентките или здравите контроли не беше налице експресия на маркера CD44 (Таблица 53, „Резултати“).

Експресия на другия маркер CD24 беше детектирана както при болните, така и при здравите контроли, но в различна степен - при 69.8 % (30/43) от пациентите на базисно ниво; 44 % (11/25) от пациентите, за които има налична проба на второ посещение след III курс терапия; 31.3 % (5/16) от пациентите, за които имат налична проба на трето посещение след IV курс терапия; при 75% (9/12) от здравите контроли също беше наблюдавана експресия на маркера (Таблица 53, „Резултати“).

Експресия на маркер hMAM беше открита само при болните. При 16.3 % (7/43) от пациентите на базисно ниво; 4 % (1/25) от пациентите, за които има налична проба на второ посещение след III курс терапия; 18.8 % (3/16) от пациентите, за които имат налична проба на трето посещение след IV курс терапия (Таблица 53, „Резултати“).

Експресия на маркер SK19 беше детектирана както само при болните. При 20.9 % (9/43) от пациентите на базисно ниво; 12 % (3/25) от пациентите, за които има налична проба на второ посещение след III курс терапия; 12.5 % (2/16) от пациентите, за които имат налична проба на трето посещение след IV курс терапия (Таблица 53, „Резултати“).

**6.4.1 GA733-2 2** е синоним на епителния клетъчно адхезионната молекула EpCAM. EpCAM е трансмембранен гликопротеин опосредстващ  $Ca^{2+}$  - независима клетъчна адхезия в епитела (287). Участва в клетъчната сигнализация (288), миграция

(289), пролиферация и диференциация (290). Има онкогенен потенциал с възможността си да регулира c-myc, e-fabp и циклини A и E (291). EpCAM се експресира изключително в епителните клетки и епителните карциномни клетки и се използва за диагностичен маркер при много тумори. Играе роля в туморогенезата и метастазирането на карциномите и може да се използва като потенциален прогностичен маркер и потенциална мишена за имунотерапевтични стратегии (292).

**6.4.2 MUC1** е муцин- гликопротеин (293), който лежи в апикалната повърхност на епителните клетки на белия дроб, стомаха, червата, очите и други органи (294). Муцините предпазват тялото от инфекции и патогени (295). Свърхекспресия на муцин 1 често се асоциира с рак на дебелото черво, гърдата, яйчниците, белия дроб и панкреаса (296). Учени идентифицират и характеризират антигена именно по време на изследване на рак на гърдата и яйчника (294).

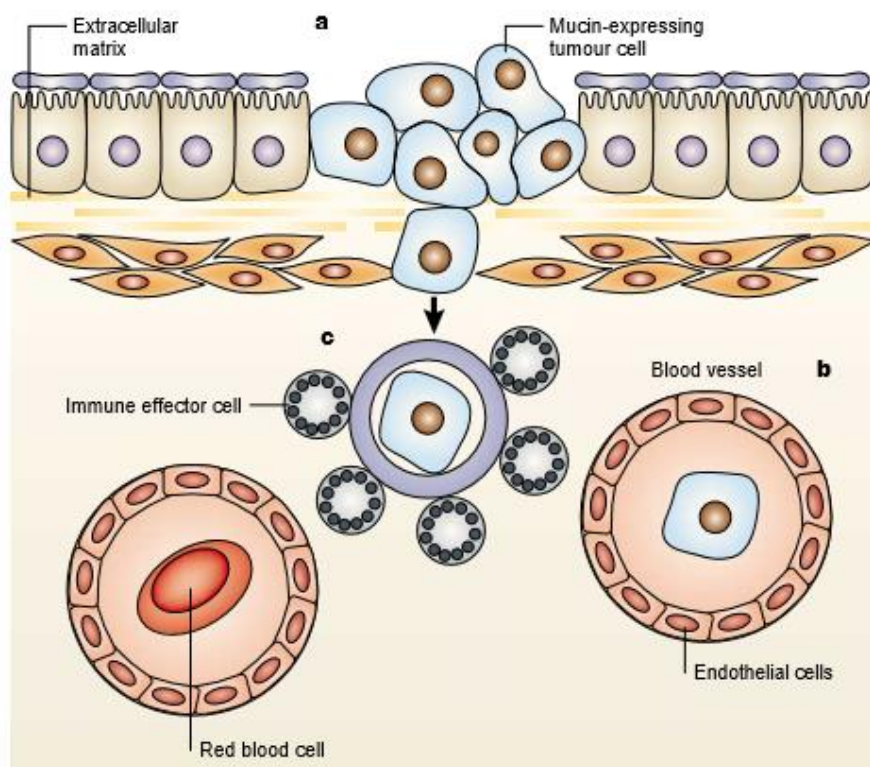
Раковите клетки, особено аденокарциномните, експресират аномални количества или форми на муцини в сравнение с нормалните клетки. Тези форми на муцините се получават в следствие на дерегулация на експресията на муциновите белтъци и ензимите, които ги модифицират по време на трансформацията на туморните клетки. Експресията на различни олигозахаридни структури заедно с различно гликозилиране на муцините увеличава възможностите им да се свързват с голям брой лиганди за взаимодействие с други клетки. Предполага се, че с процес на естествен подбор в нарастващите туморно-клетъчни популации се създават клетки, които експресират нови комбинации и форми на муцини и спомагат за оцеляването на тези клетки по време на навлизането в тъканите и метастазирането (294). Муцините могат да подпомогнат биологичните свойства на туморите по няколко начина (Фиг 70).

Контрол на околната микросреда-съществува хипотезата, че раковите клетки ползват муцините както нормалните клетки за защита и за контрол на микросредата. Туморите използват муцините за да контролират локалната микросреда по време на инвазията и метастатичното нарастване в различните органи и тъкани, което позволява те да оцелеят и да пролиферират в иначе неблагоприятната за тях нова среда. Муциновия слой от клетки поема и задържа биологично активни молекули като при туморните клетки се задържат растежни фактори и цитокини, които спомагат растежа на туморните клетки. Тези фактори също регулират възможностите на имунните, възпалителните и стромните клетки да взаимодействат с тумора (294).

Регулация на диференциацията и пролиферацията - муцините участват в регулацията на диференциацията и пролиферацията на туморните клетки чрез лиганд-рецепторни връзки и морфогенетична сигнална трансдукция. MUC1 асоцииран с мембраната е свърхекспесиран и неправилно гликозилиран при няколко вида тумори включителна на гърдата. Цитоплазмената му опашка може да свързва бета катенин и да сигнализира посредством MAPK сигналната каскада (297,298).

Инвазия и метастазиране - Тези процеси са тясно свързани с разрушаване и създаване на нови адхезивни връзки където муцините участват активно. Муцините като например MUC1 осигуряват сигнали на клетките, които ги информират за адхезионния статус на тумора (294).

Влияние върху възпалението и имунния отговор - Туморите, които произвеждат високи нива на разтворими муцини ги насочват към заобикалящата тумора среда или метастатични лезии, създават бариера за левкоцитите и се предпазват от навлизането им в тумора и възможността им да се борят с него (294).



**Фигура 70. Механизъм на инвазия на туморните клетки използвайки муцини. Туморните клетки използват муцините за инвазия, метастазиране и защита от имунната система (294).**

**6.4.3 HER2** кодира член на рецепторите за епидермалните растежни фактори. Той е тирозин киназа, но няма собствен лиганд като растежен фактор, а се свързва силно с другите рецептори от семейството в хетеродимер като стабилизира и засилва киназната им активност. Амплификацията и/или свръхексперсията на гена е докладвана при редица туморни заболявания, най-често при тези на гърдата и яйчниците (264,299,300). Амплификацията или свръхексперсията на този онкоген играе важна роля в развитието и прогресията на определени агресивни видове рак на гърдата. В последните години той е важен биомаркер и цел на терапите за около 30% от пациентите с рак на гърдата (260).

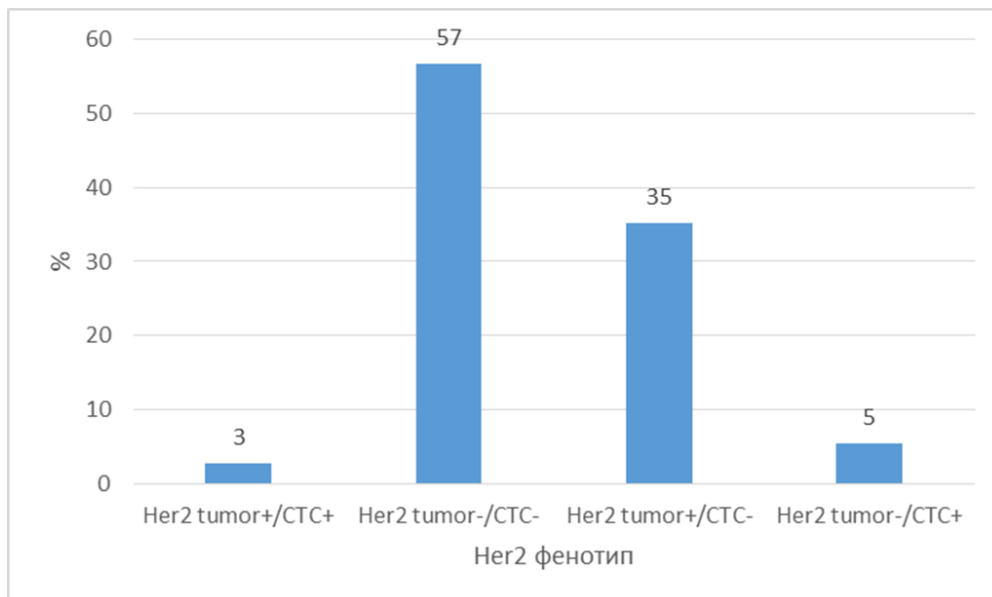
HER2 е свръхекспресиран и амплифициран в около 15% от пациентите с рака на гърдата и е маркер за лоша прогноза. Терапията на този вид тумори включва използването на антитела срещу него-трастузумаб. Не всички пациенти се повлияват от трастузумаб. Съществуват механизми на резистентност на туморите, които все още са неясни, но са разработени и друг вид терапии при рака на гърдата, които да повишат свободната от заболяване преживяемост и общата преживяемост. Новите изследвания на метастатичен рак на гърдата доведоха до одобряването на няколко нови анти-HER2 терапии, използващи малки молекули тирозин киназни инхибитори като лапатиниб, пертузумаб и адо-трастузумаб емтанзин (301).

Циркулиращи туморни клетки при пациентки с напреднал ER позитивен/HER2 негативен рак на гърдата придобиват HER2 позитивен статус след няколко курса терапия (302,303). За разлика от HER2 амплифицираният първичен тумор на рака на гърдата, който е силно чувствителен към анти-HER2 терапия, клиничната картина при придобитата HER2 хетерогенност на циркулиращите клетки по време на

метастазирането е неясна. Изследователи откриват, че при изследвани от тях 19 жени с ER+/HER2- първични тумори, 84% имат ЦТК експресиращи HER2 (304). Култивирани ЦТК поддържат субпопулации от HER2 + и HER2 – клетки. Установено е, че HER2+ клетките са по-пролиферативни, и не зависят изцяло от свързаната с него сигнализация, а от активиране на други сигнални пътища, докато HER2- ЦТК показват активиране на Notch сигналния път и показват устойчивост на цитотоксична химиотерапия поради активирането и на сигнали за ДНК поправката, но са чувствителни към инхибиране на Notch сигналната трансдукция(304). HER2+ и HER2- ЦТК се преобразуват едни в други като клетките с един фенотип дават като дъщерни клетки с другия (127). И двата вида клетки имат сходен тумор инициращ потенциал, по-пролиферативни са тези с HER2+ фенотип, докато оксидативния стрес или цитотоксичната химиотерапия усилва появата на клетките с HER2- фенотип. Тези изследвания показват, че динамичните промени в статуса на ЦТК имат отношение към прогресията на рака на гърдата и придобиването на резистентност към терапевтични агенти(304).

В настоящото проучване, при направения анализ на статуса на Her2 в първичния тумор и този на ЦТК на пациентките, за които има информация за първичния тумор (37 от 43, 86 %) се установи следното (Фиг 71):

- Две пациентки (5%)- СТС\_009 и СТС\_032 имат Her-2 негативен хистологичен резултат на първичния тумор, но имат Her-2 позитивен статус на ЦТК;
- Тринадесет пациентки (35%) имат Her-2 позитивен хистологичен резултат на първичния тумор, но имат Her-2 негативен статус на ЦТК;
- Двадесет и една пациентки (57%) имат Her-2 негативен хистологичен резултат на първичния тумор и имат Her-2 негативен статус на ЦТК;
- Една пациентка (3%) има Her-2 позитивен хистологичен резултат на първичния тумор и Her-2 позитивен статус на ЦТК;
- Шест пациентки нямат данни за Her-2 на първичния тумор и са изключени от анализа.



**Фигура 71. Процентно разпределение на пациентите с различни профили на първичния тумор и циркулиращите туморни клетки спрямо маркера HER2.**

В подкрепа на данните за туморната хетерогенност е динамиката на експресия на маркера при 15 пациентки (40%), които показват различия в двата статуса. След започване на първа линия химиотерапия, след 3 курса, се наблюдава промяна на статуса на ЦТК при някои от пациентките:

- При 2 от пациентките (СТС\_018 и СТС\_32), показали положителен резултат на рецептора HER2 при ЦТК преди започване на терапията експресията на маркера изчезва след провеждане на три курса химиотерапия. Едната от тях няма данни за първичния тумор, но все пак се вижда динамиката в статуса дори само на ЦТК.

- Две от пациентките (СТС\_009 и СТС\_025) с разминаване на статуса и които са позитивни за HER2 на изходното изследване не бяха проследени поради смъртта на едната и липсата на данни за другата

- При една от пациентките, позитивна за експресия на рецептора в първичния тумор и показала липса на експресия при ЦТК преди терапия, след три курса на лечение изолираните от нея ЦТК са вече позитивни за HER2

След започване на втора линия химиотерапия, след 6 курса, не се наблюдава промяна на статуса на ЦТК при пациентките СТС\_018 и СТС\_32, които остават негативни по HER2 статуса на ЦТК, а СТС\_020 не може да бъде проследена поради липса на данни.

При направените статистически анализи за връзката между наличието на ЦТК според експресията на маркерите GA733-2, MUC1 и HER2 беше установено, че наличието на ЦТК при болни с метастазирал рака на гърдата показва статистически значима разлика от тези без ЦТК при анализа за общата преживяемост и е свързано с лоша прогноза за пациента ( $p=0,04$ ) (Фиг 36, „Резултати“). При направения статистически анализ за свободната от заболяване преживяемост не беше открита статистически значима разлика ( $p=0,808$ ) между групите с и без (Фиг 36, „Резултати“).

**6.4.4. CD44** е антиген, гликопротеин от клетъчната повърхност, участващ в междуклетъчните контакти, клетъчната адхезия и миграция. Заедно със CD25 той се използва за проследяване на производството на Т клетки от тимуса и е индикация за ефекторните Т клетки на паметта. Открива се при стволови клетки на рак на гърдата и простата. Този маркер не беше открит в нито една от 20 избрани пациентки нито в здравите контроли.

**6.4.5 CD24** е гликопротеин, експресиращ се на клетъчната повърхност на повечето В лимфоцити и диференциращи се невробласти. Според няколко научни групи при рака на гърдата, фенотип който се характеризира с CD44+CD24-/lowALDH1+ се асоциира с наличие на субпопулация от туморни клетки сред изолираните ЦТК, които имат потенциал на стволови клетки. Наличието на такива клетки може да обясни агресивността на някои тумори и повишения туморогенен потенциал на такива клетки. Theodoropoulos и съавтори анализират експресията на CD44, CD24 и ALDH1 в ЦТК от кръв на пациенти с метастатичен рак на гърдата и откриват, че 35.2% от изследваните ЦТК имат фенотипа включващ CD44+/CD24-/low, а 17.7% били с фенотип ALDH1high/CD24-/low. По този начин потвърждават наличието на клетки със стволово-клетъчни характеристики сред ЦТК на пациентите (305). В литературата се срещат много данни за наличието на голямо фенотипно разнообразие сред клетките отделени от първичния тумор в циркулацията, което показва хетерогенността не само сред клетъчните популации на първичната туморна маса, но и сред тези в кръвта, в метастатичните ниши и между самите пациенти.

Нашите резултати показват различен фенотип, тъй като при нито един от пациентите или здравите контроли не беше налице експресия на маркера CD44. Експресия на другия маркер CD24 беше детектирана както при болните, така и при

здравите контроли, но в различна степен - при първо посещение 16.3% (7/43) от пациентите не показват отклонения в нивата на експресия спрямо здравите контроли; 9.3% (4/43) от пациентките имат повишена, в сравнение със здравите контроли, експресия или т.нар. „fold upregulation“ на гена; при 48.8% (21/43) тя е „fold downregulated“ или понижена в сравнение с контролите, а при останалите 25.6% (11/43) липсва експресия на гена CD24 (Таблица 55, „Резултати“). Общо пациентите с фенотип CD24-/low (74.4%) надвишават тези с непроменена или повишена експресия (25.6%), което е в съответствие с литературните данни.

Маркерите CD44+/CD24- се свързват с резистентност към лечението в някои публикации, но механизмите са неясни (306). Едно от изследванията изучава потенциалната роля на CD24 в резистентността към терапия с доцетаксел или доксорубицин при тройно негативни пациентки с рак на гърдата. Анализират и промяната в експресията и различното повлияване на пациентите от лекарството след проведената химиотерапия. Резултатите показват, че пациентите с CD24 позитивна експресия имат значително по-ниска обща преживяемост и свободна от заболяване преживяемост след лечение с таксани. CD44+/CD24+ са по-чувствителни към доцетаксел, а CD44+/CD24-/low към доксорубицин. Както *in vitro* така и *in vivo* изследванията показват, че клетки с фенотип CD24- са по-чувствителни към доцетаксел, а свърхекспресиращите CD24 са по-чувствителни към доксорубицин(306).

**6.4.6 Цитокератин 19 (СК-19)** е член на семейството на клетъчните кератини - интермедиерни клетъчни филаменти, отговарящи за поддържането на структурния интегритет на епителните клетки. Поради високата си чувствителност той е най-използваният маркер при PCR в реално време за детекция на туморни клетки, отделили се от първичната туморна маса и разпространени в лимфните съдове, кръвоносната система и костния мозък при пациенти с метастазирал рак на гърдата (86,115–117).

**6.4.7 Човешкият мамаглобин (hMAM)** е хомоложен на утероглобиновото семейство белтъци и се експресираща в ниски нива при нормалния епител на млечната жлеза. Експресията му е много висока в тъканта при рак на гърдата. hMAM нормално не се експресираща в кръв от здрави индивиди и в костен мозък (115). Ignatiadis и съавтори откриват, че наличието на СК-19 и мамаглобин А позитивни ЦТК преди инициране на адювантна терапия е свързано с намалена преживяемост (307). Xenidis и съавтори откриват, че наличието на СК-19(+) ЦТК се асоциира с ранен клиничен релапс и смърт вследствие на заболяването (132), Strati и съавтори показват, че при 26 случая на пациенти с доказани метастази, СК-19 е детектиран при 53.8% от пациентите, а hMAM при 30.8% и, че позитивните по експресия на СК-19, HER2 и hMAM пациенти имат по-кратък период на време до прогресия на заболяването (135).

Нашите резултати показват наличие на експресия на СК19 в 20.9 % (9/43) от пациентите на базисно ниво; 12 % (3/25) от пациентите, за които има налична проба на второ посещение след III курс терапия; 12.5 % (2/16) от пациентите, за които имат налична проба на трето посещение след IV курс терапия и за hMAM в 16.3 % (7/43) от пациентите на базисно ниво; 4 % (1/25) от пациентите, за които има налична проба на второ посещение след III курс терапия; 18.8 % (3/16) от пациентите, за които имат налична проба на трето посещение след IV курс терапия.

При СТС\_004, преди започване на химиотерапия, са детектирани и двата маркера от количествения анализ, както и два от маркерите от качествения анализ, които при следващите посещения на пациентката не се наблюдават. СТС\_017 също показва експресия на двата маркера, които изчезват в последствие. Това показва евентуален успех на проведената терапия и елиминирането на ЦТК. При СТС\_005 на първо посещение е налична експресия на hMAM, но не и на СК19. След 3 курса химиотерапия

маркера изчезва, но след 6-ти курс химиотерапия, той отново се детектира заедно с другия маркер SK19. И двете пациентки са починали. Следователно, повторната поява на биомаркерите hMAM и SK19 в циркулацията при тези две пациентки е показател за неуспеха на прилаганото лечение и се свързва с лоша прогноза. При друга пациентка, която бързо прогресира и е починала (СТС\_008) двата маркера SK19 и hMAM показват експресия и при трите ѝ посещения, което е показател за лоша прогноза. Аналогични са нейните показатели и от качествения анализ. Останалите пациентки СТС\_009 и СТС\_010 са починали в хода на терапия и не могат да бъдат проследени за динамика по отношение на експресията на тези маркери.

Ако се вземат предвид данните от качествения анализ и данните от експресионния анализ на останалите 3 маркера, може да се предположи, че при пациентите, при които не се наблюдава експресия на CD24, всъщност няма и ЦТК. При проследяването на пациентите на следващите две посещения се наблюдава динамика в нивата на маркера. Интересна е пациентка СТС\_008, коментирана по-горе, при която качественият анализ показва повторна поява на два маркера в течение на терапията, както и наличие на други два маркера (SK19, hMAM) в хода на терапия, а така също и динамика на CD24. При нея CD24 е с повишена концентрация преди започване на терапията и след 6 курса значително се повишава. Пациентки номер 18 и 20 показват положителен резултат за наличие на ЦТК от качествения анализ, а по отношение на CD24 запазват силно понижени нива на експресия на гена.

Най-голямото проучване за клиничната стойност на изследванията с ЦТК използва CellSearch® технологията за определяне нивата на ЦТК при онкоболни. Включват се данни от 1944 пациента с метастатичен рак на гърдата от 20 европейски проучвания (308). В това проучване 46.9% от пациентите имат  $\geq 5$  СТС/7.5 ml кръв на изходното изследване преди започване на терапия. Тези пациенти имали ниска свободна от прогресия преживяемост (hazard ratio [HR] 1.92,  $p < 0.0001$ ) и ниска обща преживяемост (HR 2.78,  $p < 0.0001$ ) в сравнение с пациентите с нисък брой ЦТК ( $< 5$  СТС/7.5 ml) (129). Тяхната клинична стойност като независим прогностичен фактор е показана и при рака на дебелото черво (309), простата (310) и белия дроб (311,312). Много изследвания за рака на гърдата показват, че жените с високи нива на ЦТК преди терапия, но ниски нива след един курс терапия имат по-добра прогноза от тези с непроменени нива при лечението (СПП 9.6 months, 95% CI 8.2–11.1 срещу 4.8 (3.7–6.5),  $p < 0.0001$  и обща преживяемост 27 месеца 95% CI 21.7–31.5 срещу 13.1, 95% CI 9.4–16.4,  $p < 0.0001$  (313).

ЦТК могат да се използват за мониториране на терапията при метастатичен рак на гърдата, дебелото черво и простатата. Много са малко проучванията за лечение, основаващо се на експресията на биомаркери в ЦТК. Изследвано е лечението с лапатиниб, който се свързва с експресията на HER2 и EGFR, при HER2 негативни тумори от рак на гърдата, с HER2 позитивни ЦТК (314). Не са получени стойностни резултати, което се дължи вероятно на ограничената ефикасност на лапатиниба като монотерапия. В неoadювантен аспект друго проучване на 75 жени с неметастазирал HER2 негативен рак на гърдата, но с HER2 позитивни ЦТК установени с RT-PCR използва трастузумаб или наблюдение само (315).

Беше направен корелационен анализ за общата преживяемост и свободната от заболяване преживяемост на пациентките според експресията на маркерите GA733-2, Muc1, Her2 и SK19, hMAM, CD24. При анализа за общата преживяемост, резултатите показват, че наличието на циркулиращи туморни клетки при болни с метастазирал рак на гърдата е свързано с по-лоша прогноза. Има статистически значима разлика между пациентки с ЦТК и тези без ЦТК по отношение на ОП ( $p=0,04$ ). При направения

статистически анализ за свободната от заболяване преживяемост не беше открита статистически значима разлика ( $p=0,808$ ) между групите с и без ЦТК. Открито беше, че експресията на GA733-2 и Muc1 ( $p=0,04$  за двете) в ЦТК преди инициране на адювантна терапия са статистически значими и са показателни за по-ниска преживяемост. Резултатите показват, че експресията на hMAM ( $p=0,012$ ) в ЦТК преди инициране на адювантна терапия е показателна за по-ниска преживяемост и е статистически значима. За маркерите Her2 и SK19 не беше открита статистически значима ( $p= 0,995$  и  $p= 0,349$  съотв.) разлика между групите с и без маркера.

Bölke и съавтори (316) изследват пациенти с метастазирал рак на гърдата за няколко биомаркера в ЦТК и откриват, че GA733-2 свръхекспресия се наблюдава при 12.7% от случаите, MUC1- в 15.9% от случаите, hMAM- 9.1% и *spdef* в 12.1% (последните 2 са изследвани за експресията с RT-PCR). В това проучване експресията на HER2 няма статистическа значимост при болните с рак на гърдата. Значима корелация е установена за GA733-2 и за MUC1, а при мултимаркерния анализ е установена корелация с рака на гърдата със следните комбинациите - GA733-2/ MUC1 и GA733-2/ MUC1/ hMAM/ *spdef* които могат да служат като маркери за определяне на наличието на циркулиращи туморни клетки при болни с рак на гърдата, като използването на мултимаркерни тестове повишава специфичността на метода .

GA733-2, гликопротеин отговорен за епителните клетъчно-повърхностни взаимодействия, се установява изключително и само в епителните клетки (317). Неговото използване като туморен маркер все още се дискутира (317). Rao и съавтори показват намалена експресия на маркера в ЦТК в сравнение с първичните тумори (138). Това показва, че понижените нива на белтъка са важни за загубата на клетъчните връзки, което позволява на туморни клетки да се отделят от тумора и да навлязат в циркулацията. Watson и съавтори документират свръхекспресия на hMAM (126,318). Мамаглобиновата (hMAM) експресия определена с RT-PCR в периферна кръв се обсъжда като допълнение към серумните туморни маркери от Lin и съавтори тъй като изследванията за връзката му със заболяването не е убедителна (319). Други изследвания показват разликите в експресията на маркера в периферна кръв и в свежа туморна тъкан (320). Открита е корелация между експресията на мамаглобин в периферната кръв и туморния стадий (321). Lin и съавтори откриват, че при пациентите експресията е много по-висока (36.6%) в сравнение с тази при здравите контроли (319).

На базата на получените от нас резултати, може да се направя заключение, че наличието на циркулиращи туморни клетки при болни с метастазирал рак на гърдата, експресията на Muc1 ( $p=0,04$ ) и hMAM ( $p=0,012$ ) в ЦТК преди инициране на адювантна терапия са статистически значими предиктивни биомаркери за лоша прогноза. Мултивариационният регресионен анализ на клиничните показатели показва, че единствено възрастта има статистическа значимост като независим прогностичен фактор, свързан с лоша прогноза ( $HR=1.060$ ).

Общо 40% от пациентките с метастатичен рак на гърдата показват различие в експресионния статус на Her2 рецептора при първичния тумор и този на произлизащите от него циркулиращи туморни клетки, което показва необходимостта от молекулно профилиране на ЦТК преди терапията. Наличието на данни за промяна на експресионните профили на ЦТК в хода на терапията може да бъде използвано за прецизиране на схемата за лечение на пациентки с метастатичен рак на гърдата. Изследването на циркулиращи туморни клетки при болни с метастазирал рак на гърдата е първото, което се прави в България. Недостатъци на този вид анализи е трудното проследяване на пациентките в няколко етапа от терапията и осигуряването на кръвни проби за всеки от тях, за да се гарантира ефективност на подхода за проследяване на

терапията за конкретния пациент. Друг неотстаък е агресивното протичане на заболяването тъй като пациентките са вече с диагнози метастазирал рак на гърдата и много от тях са авансирани и смъртността преди завършване на всички курсове терапия е висока, което затруднява още повече събирането на кръвните проби.

Диагностичните подходи, които определят прогнозата за пациентите с рак на гърдата имат нужда от подобрения. Нови техники за изследването като генното профилиране и генната експресия на тумор асоциирани гени могат да спомогнат за установяването на нови прогностични маркери в клиничните проучвания. Освен това моделите на генна експресия в ЦТК могат да дадат информация за механизмите на метастазиране на туморите в организма.

## VII. Изводи:

1. Секвенирането с платформата Ion Torrent PGM при използване на Ion AmpliSeq™ BRCA1/2 Community Panel е бърз и надежден метод за генетичен анализ на BRCA гените с 98% специфичност, 100% чувствителност;
2. Разработеният алгоритъм за откриване на мутации в BRCA гените със секвениране от ново поколение е по-бърз и високопродуктивен алтернативен метод на класическото секвениране по Sanger за диагностика на фамилния рак на гърдата и яйчниците;
3. Анализът на панел от тумор-асоциирани гени (TruSight Cancer) с платформа MiSeq позволи откриването на вероятна генетичната причина за възникване на заболяването при 35.5% от изследваните пациентки с негативен BRCA1/2 мутационен статус, което показва необходимостта от използването на панелно секвениране в диагностичната практика на тези заболявания;
4. При част от пациентите с фамилен рак на гърдата и яйчниците (27.3% от изследваните пациентки с мутации), се откриват патогенни варианти в два различни тумор-асоциирани гени (двойна хетерозиготност), което допълнително потвърждава необходимостта от изследването на панели от гени за диагностика и оценка на риска;
5. Установеният профил на най-чести соматични мутации в PIK3CA, ERBB2, APC, ATM и TP53 в изследваната група тумори на български пациенти с рак на гърдата се различава от този в базите данни, което потвърждава необходимостта от повече проучвания в тази насока;
6. На базата на анализирания спектър от соматични мутации могат да се отграничат няколко подгрупи със сходни молекулни профили в рамките на основните хистологични подтипове тумори, което може да се използва за прецизиране на терапията;
7. Наличието на циркулиращи туморни клетки при болни с метастазирал рак на гърдата, експресията на Muc1 ( $p=0,04$ ) и hMAM ( $p=0,012$ ) в ЦТК преди инициране на адювантна терапия са статистически значими предиктивни биомаркери за лоша прогноза;
8. Мултивариационният регресионен анализ на клиничните показатели показва, че единствено възрастта има статистическа значимост като независим прогностичен фактор, свързан с лоша прогноза ( $HR=1.060$ );
9. Общо 40% от пациентките с метастатичен рак на гърдата показват различие в експресионния статус на Her2 рецептора при първичния тумор и този на произлизащите от него циркулиращи туморни клетки, което показва необходимостта от молекулно профилиране на ЦТК преди терапията;
10. Наличието на данни за промяна на експресионните профили на ЦТК в хода на терапията може да бъде използвано за прецизиране на схемата за лечение на пациентки с метастатичен рак на гърдата.

## VIII. Приноси

### Методични приноси

- ✓ Валидиран беше метод за новогенерационно секвениране с Ion Torrent™ PGM платформата и AmpliSeq™ BRCA1/2 Community Panel и беше разработен бърз и ефективен биоинформатичен алгоритъм за надеждно определяне на всички варианти;
- ✓ За първи път в България беше използван метод за новогенерационно секвениране на панел от 94 тумор-асоциирани гени при BRCA негативни пациенти с рак на гърдата;
- ✓ За първи път в България беше използван метод за новогенерационно секвениране за търсене на соматични мутации в тумори на пациенти с рак на гърдата;
- ✓ За първи път в България беше въведен метода на изолиране и качествен анализ на циркулиращи туморни клетки Adna Test за проследяването на лечението на пациентки с метастазирал рак на гърдата.

### Научно-фундаментални приноси

- ✓ Открити бяха 3 нови мутации, неописани в литературата - два frameshift варианта- с.9909delA в екзон 27a на BRCA2 и с.5697delCCAAGGG в екзон 22 на BRCA1, една миссенс- замяна с. 285T>C в екзон 2 на BRCA1;
- ✓ Бяха открити 1 нова frameshift мутация в гена ATM и 6 нови вероятно патогенни герминативни миссенс мутации в гените PTCH1, RAD51C, MET, MUTYH, ATM и CHEK2;
- ✓ Бяха открити 11 нови за базите данни потенциално патогенни соматични мутации в гените PIK3CA, ERBB2, APC, ATM, TP53, ERBB4, PTEN, KRAS, FGFR1, RB1;

### Научно-приложен принос

- ✓ Беше създадена тъканна банка от 91 туморни проби получени чрез ексцизионна биопсия на пациенти с рак на гърдата и ДНК банка в Център по Молекулна Медицина.

## IX. Публикации и участия в конгреси и проекти

### 9.1. Публикации свързани с дисертационния труд

1. **Daniela Dacheva**, Rumyana Dodova, Ivan Popov, Teodora Goranova, Atanaska Mitkova, Vanio Mitev and Radka Kaneva Validation of an NGS approach for diagnostic BRCA1/BRCA2 mutation testing Molecular diagnosis and therapy **IF 2.589 Цитирания-Scopus:8**
2. Rumyana Ivanova Dodova, Atanaska Velichkova Mitkova, **Daniela Rosenova Dacheva**, Lina Basam Hadjo, Alexandrina Ivanova Vlahova<sup>3</sup> Margarita Stoyanova Taushanova - Hadjieva Spartak Stoyanov Valev, Marija Mitko Caulevska, Stanislava Dimitrova Popova, Ivan Emilov Popov, Tihomir Ilichev Dikov, Theophil Angelov Sedloev, Atanas Stefanov Ionkov, Konstanta Velinova Timcheva, Svetlana LiubomirovaChristova, Ivo Marinov Kremensky, Vanio Ivanov Mitev and Radka Petrova Kaneva Spectrum and frequencies of BRCA1/2 mutations in Bulgarian high risk breast cancer patients. BMC cancer; **IF 3.32 Цитирания- Scopus:1**
3. С. Вълев, Д. Дачева, А. Миткова, М. Таушанова, В. Митев, К. Тимчева. Циркулиращи туморни клетки при рак на млечната жлеза. Приложение на молекулярните методи в клиничната практика. Обзори по онкология 2013; Брой 1, студия 2, стр. 39-60

## 9.2. Участия в конгреси

- **Dacheva D**, Dodova R, Mitkova A, Kamenarova K, Tzveova R, Popov I, Vlahova A, Taushanova-Hadjieva M, Valev S, Dikov T, Timcheva K, Christova S, Mitev V, Kaneva R. Exploration of the diagnostic utility of next-generation sequencing with TruSight cancer panel for BRCA negative hereditary breast and ovarian cancer patients. “ San Antonio Breast Cancer Symposium“, San Antonio, Texas, USA, December 8th-12th. Poster presentation.
- **Dacheva Daniela**, Vasileva Mariela, Sedloev Theophil, Kamenarova Kunka, Tzveova Reni, Mitkova Atanaska, Kaneva Radka, Mitev Vanio. Exploring the somatic mutation spectrum through next-generation sequencing in Bulgarian breast cancer patients. 11th Balkan Congress of Human Genetics, 17th-20th September 2015, Belgrade, Serbia, oral presentation, abstract on page 20;
- **D. Dacheva**, S. Valev, M. Taushanova, K. Timcheva, V. Mitev, R. Kaneva, A. Mitkova. Gene expression analysis of five tumor-associated markers in CTC isolated from Bulgarian metastatic breast cancer patients. EACR-AACR-SIC Special Conference, 20-23 June 2015, Florence, Italy, Abstract № 646, p.169  
Atanaska Mitkova, Rумыана Dodova, **Daniela Pencheva**, Alexandrina Vlahova, Margarita Taushanova - Hadjieva, Spartak Valev, Konstanta Timcheva, Svetlana Christova, Vanio Mitev, Radka Kaneva. Mutation screening of Bulgarian Hereditary Breast and Ovarian Cancer patients with multi-gene cancer panel. 24th Biennial Congress of the European Association for Cancer Research, 9-12 July 2016, Manchester, UK. Poster presentation. European Journal of Cancer, Volume 61, Supplement 1, July 2016, P206, p.S37
- Rумыана Dodova, Atanaska Mitkova, **Daniela Pencheva**, Spartak Valev, Margarita Taushanova Alan Nachev, Konstanta Timcheva, Roumen Dimitrov, Vanio Mitev and Radka Kaneva. Molecular-genetic analysis of BRCA1 and BRCA2 mutations in Bulgarian patients with Hereditary Breast Ovarian Cancer (HBOC) syndrome. 24th Biennial Congress of the European Association for Cancer Research, 9-12 July 2016, Manchester, UK. Poster presentation. European Journal of Cancer, Volume 61, Supplement 1, July 2016, P282, p.S53
- Vasileva M., T. Sedloev, K. Angelov, **D. Dacheva**, R. Dodova, A. Mitkova, A. Vlahova, T. Dikov, G. Velev, S. Masliankov, R. Kaneva, S. Hristova, V. Pavlov, G. Todorov. Annual report of Medical University of Sofia Breast Cancer Biobank. 5th Turkish-Bulgarian Breast & Endocrine surgery club meeting; 27-28 May 2015, Varna, Bulgaria; p.22-26
- **Д. Дачева**; Циркулиращи туморни клетки при рак на гърдата; Молекулярна диагностика, геномика и епигенетика в медицинската онкология; регионална среща на сдружение „Млад Онколог“; 28 март 2015; София; устна презентация
- **D. Dacheva**, I. Popov, R. Dodova, T. Goranova, A. Mitkova, R. Kaneva, V. Mitev; Comparison of two library construction strategies for targeted resequencing of BRCA1/2 genes in Bulgarian breast cancer patients on NGS platform; Poster presentation; EUROPEAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH; 5-8 July 2014; Munich, Germany, European Journal of Cancer, Volume 50, Supplement 5, July 2014, P432, p.S103
- R. Dodova, A. Mitkova, **D. Dacheva**, M. Taushanova, S. Valev, A. Vlahova, T. Dikov, C. Timcheva, S. Christova, R. Kaneva; Recurrent BRCA1/2 mutations in Bulgarian patients with hereditary breast and ovarian cancer; Poster presentation; EUROPEAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH; 5-8 July 2014; Munich, Germany, European Journal of Cancer, Volume 50, Supplement 5, July 2014, P583, p.S140

- **Д. Дачева**; Циркулиращи туморни клетки и ДНК. Приложение за проследяване на ефекта от терапия на онкологични заболявания; Първа национална конференция „Молекулярна патология в онкологията“; 6-7 Юни 2014; устна презентация
- **D. Dacheva**, S. Valev, M. Taushanova, V. Mitev, K. Timcheva, R. Kaneva, A. Mitkova; Monitoring circulating tumour cells in the course of therapy of Bulgarian patients with metastatic breast cancer. European Breast Cancer Conferences, 19- 21 March 2014, Glasgow, Scotland. European Journal of Cancer, Volume 50, Supplement 2 (electronic publication only), March 2014, P252, page S116
- R. Dodova, **D. Dacheva**, M. Taushanova, S. Valev, Z. Kamburova, K. Kovacheva, C. Timcheva, S. Christova, A. Mitkova, R. Kaneva; BRCA1/2 mutation screening in Bulgarian patients with triple negative breast cancer. European Breast Cancer Conferences, 19- 21 March 2014, Glasgow, Scotland. European Journal of Cancer, Volume 50, Supplement 2 (electronic publication only), March 2014, P243, page S114
- **D. Dacheva**, S. Valev, M. Taushanova, V. Mitev, K. Timcheva, R. Kaneva, A. Mitkova; Qualitative analysis of the CTC levels in patients with metastatic breast cancer. The European Human Genetics Conference, 08-11 June 2013, Paris, France. /Eur J Hum Genet, Volume 21, Supplement 2, June 2013, P11.041, page 274.
- I. Popov, **D. Dacheva**, R. Dodova, T. Goranova, A. Mitkova, R. Kaneva, V. Mitev; Variant discovery in BRCA1 and BRCA2: Comparison of the efficiency of NextGENe software and the Torrent Suite Variant Caller plugin. The European Human Genetics Conference, 08-11 June 2013, Paris, France. /Eur J Hum Genet, Volume 21, Supplement 2, June 2013, P16.001, page 365.
- **Daniela Dacheva**, Romyana Dodova, Atanaska Mitkova, Aleksandrina Vlahova, Tihomir Dikov, Spartak Valev, Constanta Timcheva, Svetlana Christova, Vanio Mitev, and Radka Kaneva. Mutation screening of BRCA2 exon 11 and exon 17 in Bulgarian breast cancer patients. Poster presentation. The European Association for Cancer Research, 7-10 July 2012, Barcelona, Spain.
- Romyana Dodova, **Daniela Dacheva**, Aleksandrina Vlahova, Tihomir Dikov, Svetlana Christova, Spartak Valev, Margarita Taushanova, Constanta Timcheva, Radka Kaneva and Atanaska Mitkova. Mutation screening of BRCA1 gene in Bulgarian breast cancer patients. Poster presentation. The European Association for Cancer Research, 7-10 July 2012, Barcelona, Spain.
- **Daniela Dacheva**, Romyana Dodova, Aleksandrina Vlahova, Tihomir Dikov, Svetlana Christova, Spartak Valev, Constanta Timcheva, Vanio Mitev, Radka Kaneva and Atanaska Mitkova. Mutation screening of BRCA2 exons 11 in Bulgarian breast cancer patients. Poster presentation. The European Human Genetics Conference, 28-31 May 2011, Amsterdam, The Netherlands.
- Romyana Dodova, **Daniela Dacheva**, Aleksandrina Vlahova, Tihomir Dikov, Svetlana Christova, Spartak Valev, Constanta Timcheva, Vanio Mitev, Radka Kaneva, and Atanaska Mitkova. Large genomic aberrations in BRCA1 and BRCA2 genes in Bulgarian breast cancer patients. Poster presentation. The European Human Genetics Conference, 28-31 May 2011, Amsterdam, The Netherlands.
- Romyana Dodova, Atanaska Mitkova, **Daniela Dacheva**, Marija Caulevska, Aleksandrina Vlahova, Tihomir Dikov, Spartak Valev, Margarita Taushanova, Constanta Timcheva, Vanio Mitev, Radka Kaneva and Svetlana Christova. BRCA mutation screening in

Bulgarian breast cancer patients. Poster presentation European Congress of Pathology (ECP)  
27 August - 01 September 2011, Helsinki, Finland

### **9.3. Участия с проекти:**

- 2013-2014 Експресионен анализ на молекулни маркери в циркулиращи туморни клетки (ЦТК) от периферна кръв при български пациентки с метастазирал карцином на гърдата. Ръководител на проекта
- 2014-2015 Анализ на спектъра от соматични мутации в тумори от български пациенти с рак на гърдата чрез секвениране от ново поколение. Ръководител на проекта
- 2015-2016 Анализ за наличие на герминативни мутации в панел от 94 тумор-асоцирани гени чрез новогенерационно секвениране при български пациенти с фамилен рак на гърдата. Ръководител на проекта
- 2016-2017 Анализ на соматични мутации при български пациенти с колоректални и стомашни карциноми чрез секвениране от ново поколение на панел от тумор-асоцирани гени
- 2016-2017 Съхранение на тъкани за доразширяване на тъканна, плазмена и ДНК банка от пациенти с рак на гърдата
- 2014-2015 Валидиране на протокол за секвениране от следващо поколение със секвенатор IonTorrent PGM за откриване на мутации в BRCA1 и BRCA2 гените.
- 2014-2015 Молекулярно-генетичен анализ за носителство на мутации в BRCA1 и BRCA2 гените при пациентки с овариален карцином;
- 2013-2014 Молекулярно-генетичен анализ на гени с междинна пенетрантност при BRCA негативни пациентки с фамилен карцином на гърдата;
- 2013-2014 Проучване върху честотата на големи геномни пренареждания в BRCA1 и BRCA2 гените сред пациентки с фамилен рак на млечната жлеза ;
- 2012-2013 Проучване върху честотата на носителство на генетични дефекти в BRCA1 и BRCA2 гените при фамилни случаи на рак на млечната жлеза
- 2011-2012 Анализ на мутациите в BRCA1 гена при български пациенти с тройнонегативен карцином на гърдата;
- 2010-2013 Проследяване на нивата на циркулиращи туморни клетки (ЦТК) при болни с метастазирал карцином на гърдата- прогностично и предиктивно значение

## **X Библиография:**

1. Rakov\_Register\_2014.pdf [Internet]. [cited 2017 Feb 8]. Available from: [https://www.sbaloncology.bg/assets/files/rakov\\_registar/Rakov\\_Register\\_2014.pdf](https://www.sbaloncology.bg/assets/files/rakov_registar/Rakov_Register_2014.pdf)
2. NEW European Cancer Observatory [Internet]. [cited 2017 May 5]. Available from: <http://eco.iarc.fr/>
3. Globocan 2012 - Home [Internet]. [cited 2017 May 5]. Available from: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>
4. Mammary Gland Anatomy, Function & Diagram | Body Maps [Internet]. [cited 2017 Mar 6]. Available from: <http://www.healthline.com/human-body-maps/mammary-gland>
5. Hofstra RMW, Spurdle AB, Eccles D, Foulkes WD, de Wind N, Hoogerbrugge N, et al. Tumor characteristics as an analytic tool for classifying genetic variants of uncertain clinical significance. *Hum Mutat.* 2008 Nov;29(11):1292–303.
6. Nakshatri H, Srour EF, Badve S. Breast cancer stem cells and intrinsic subtypes: controversies rage on. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2009 Jan;4(1):50–60.
7. Bosch A, Eroles P, Zaragoza R, Viña JR, Lluch A. Triple-negative breast cancer: molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research. *Cancer Treat Rev.* 2010 May;36(3):206–15.
8. Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol.* 2011 Feb;5(1):5–23.
9. Siadati S, Sharbatdaran M, Nikbakhsh N, Ghaemian N. Correlation of ER, PR and HER-2/Neu with other Prognostic Factors in Infiltrating Ductal Carcinoma of Breast. *Iran J Pathol.* 2015;10(3):221–6.
10. Malone JL, Nelson AC, Lieberman R, Anderson S, Holt JT. Oestrogen-mediated phosphorylation and stabilization of BRCA2 protein in breast. *J Pathol.* 2009 Feb;217(3):380–8.
11. Gazinska P, Grigoriadis A, Brown JP, Millis RR, Mera A, Gillett CE, et al. Comparison of basal-like triple-negative breast cancer defined by morphology, immunohistochemistry and transcriptional profiles. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* 2013 Jul;26(7):955–66.
12. Sherr CJ. Principles of tumor suppression. *Cell.* 2004 Jan 23;116(2):235–46.
13. Feuer EJ, Wun LM, Boring CC, Flanders WD, Timmel MJ, Tong T. The lifetime risk of developing breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1993 Jun 2;85(11):892–7.
14. Genetic Modifiers of Cancer Risk for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers [Internet]. PubMed Journals. [cited 2017 Apr 4]. Available from: <https://ncbi.nlm.nih.gov/labs/articles/21285145/>

15. Cook NR, Rosner BA, Hankinson SE, Colditz GA. Mammographic screening and risk factors for breast cancer. *Am J Epidemiol*. 2009 Dec 1;170(11):1422–32.
16. Larsen MJ, Thomassen M, Gerdes A-M, Kruse TA. Hereditary Breast Cancer: Clinical, Pathological and Molecular Characteristics. *Breast Cancer Basic Clin Res*. 2014 Oct 15;8:145–55.
17. Smith KL, Isaacs C. BRCA Mutation Testing in Determining Breast Cancer Therapy. *Cancer J Sudbury Mass*. 2011 Nov;17(6):492–9.
18. Janavičius R. Founder BRCA1/2 mutations in the Europe: implications for hereditary breast-ovarian cancer prevention and control. *EPMA J*. 2010 Sep;1(3):397–412.
19. Ripperger T, Gadzicki D, Meindl A, Schlegelberger B. Breast cancer susceptibility: current knowledge and implications for genetic counselling. *Eur J Hum Genet EJHG*. 2009 Jun;17(6):722–31.
20. Narod SA, Foulkes WD. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nat Rev Cancer*. 2004 Sep;4(9):665–76.
21. Narod SA, Salmena L. BRCA1 and BRCA2 Mutations and Breast Cancer. *Discov Med*. 2011 Nov 25;12(66):445–53.
22. van der Groep P, van der Wall E, van Diest PJ. Pathology of hereditary breast cancer. *Cell Oncol Dordr*. 2011 Apr;34(2):71–88.
23. Silver DP, Livingston DM. Mechanisms of BRCA1 tumor suppression. *Cancer Discov*. 2012 Aug;2(8):679–84.
24. Venkitaraman AR. Functions of BRCA1 and BRCA2 in the biological response to DNA damage. *J Cell Sci*. 2001 Oct 15;114(20):3591–8.
25. Yoshida K, Miki Y. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci*. 2004 Nov;95(11):866–71.
26. Nathanson KL, Weber BL. “Other” breast cancer susceptibility genes: searching for more holy grail. *Hum Mol Genet*. 2001 Apr;10(7):715–20.
27. Cantor SB, Guillemette S. Hereditary breast cancer and the BRCA1-associated FANCI/BACH1/BRIP1. *Future Oncol Lond Engl*. 2011 Feb;7(2):253–61.
28. Liu J, Doty T, Gibson B, Heyer W-D. Human BRCA2 protein promotes RAD51 filament formation on RPA-covered single-stranded DNA. *Nat Struct Mol Biol*. 2010 Oct;17(10):1260–2.
29. Daly MB, Axilbund JE, Buys S, Crawford B, Farrell CD, Friedman S, et al. Genetic/familial high-risk assessment: breast and ovarian. *J Natl Compr Cancer Netw JNCCN*. 2010 May;8(5):562–94.

30. Cybulski C, Wokołorczyk D, Jakubowska A, Huzarski T, Byrski T, Gronwald J, et al. Risk of breast cancer in women with a CHEK2 mutation with and without a family history of breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2011 Oct 1;29(28):3747–52.
31. Turnbull C, Ahmed S, Morrison J, Pernet D, Renwick A, Maranian M, et al. Genome-wide association study identifies five new breast cancer susceptibility loci. *Nat Genet*. 2010 Jun;42(6):504–7.
32. Peng S, Lü B, Ruan W, Zhu Y, Sheng H, Lai M. Genetic polymorphisms and breast cancer risk: evidence from meta-analyses, pooled analyses, and genome-wide association studies. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 Jun;127(2):309–24.
33. Meldrum C, Doyle MA, Tohill RW. Next-Generation Sequencing for Cancer Diagnostics: a Practical Perspective. *Clin Biochem Rev*. 2011 Nov;32(4):177–95.
34. Gullapalli RR, Desai KV, Santana-Santos L, Kant JA, Becich MJ. Next generation sequencing in clinical medicine: Challenges and lessons for pathology and biomedical informatics. *J Pathol Inform [Internet]*. 2012 Oct 31 [cited 2017 Apr 4];3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3519097/>
35. illumina\_sequencing\_introduction.pdf [Internet]. [cited 2017 Feb 20]. Available from: [https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina\\_sequencing\\_introduction.pdf](https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf)
36. Grada A, Weinbrecht K. Next-generation sequencing: methodology and application. *J Invest Dermatol*. 2013 Aug;133(8):e11.
37. Voelkerding KV, Dames SA, Durtschi JD. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clin Chem*. 2009 Apr;55(4):641–58.
38. Ion PGM sequencer for target genome sequencing technology | Theragen Etx Bio Institute [Internet]. [cited 2017 Apr 4]. Available from: <http://www.theragenetex.com/bio/technology/sequencing-platforms/ion-pgm-sequencer/>
39. Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*. 2011 Jul 20;475(7356):348–52.
40. Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, et al. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *J Biomed Biotechnol [Internet]*. 2012 [cited 2017 Apr 4];2012. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3398667/>
41. Bragg LM, Stone G, Butler MK, Hugenholtz P, Tyson GW. Shining a Light on Dark Sequencing: Characterising Errors in Ion Torrent PGM Data. *PLOS Comput Biol*. 2013 Apr 11;9(4):e1003031.
42. Ion Torrent (ThermoFisher) [Internet]. AllSeq. [cited 2017 Feb 9]. Available from: <http://allseq.com/knowledge-bank/sequencing-platforms/ion-torrent/>

43. De Leeneer K, Hellemans J, De Schrijver J, Baetens M, Poppe B, Van Criekinge W, et al. Massive parallel amplicon sequencing of the breast cancer genes BRCA1 and BRCA2: opportunities, challenges, and limitations. *Hum Mutat.* 2011 Mar;32(3):335–44.
44. Morgan JE, Carr IM, Sheridan E, Chu CE, Hayward B, Camm N, et al. Genetic diagnosis of familial breast cancer using clonal sequencing. *Hum Mutat.* 2010 Apr;31(4):484–91.
45. Ozcelik H, Shi X, Chang MC, Tram E, Vlasschaert M, Di Nicola N, et al. Long-range PCR and next-generation sequencing of BRCA1 and BRCA2 in breast cancer. *J Mol Diagn JMD.* 2012 Sep;14(5):467–75.
46. Vaca-Paniagua F, Alvarez-Gomez RM, Fragoso-Ontiveros V, Vidal-Millan S, Herrera LA, Cantú D, et al. Full-Exon Pyrosequencing Screening of BRCA Germline Mutations in Mexican Women with Inherited Breast and Ovarian Cancer. *PLoS ONE [Internet].* 2012 May 24 [cited 2017 Feb 9];7(5). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3360054/>
47. Walsh T, Lee MK, Casadei S, Thornton AM, Stray SM, Pennil C, et al. Detection of inherited mutations for breast and ovarian cancer using genomic capture and massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Jul 13;107(28):12629–33.
48. Costa JL, Sousa S, Justino A, Kay T, Fernandes S, Cirnes L, et al. Nonoptical massive parallel DNA sequencing of BRCA1 and BRCA2 genes in a diagnostic setting. *Hum Mutat.* 2013 Apr;34(4):629–35.
49. Tarabeux J, Zeitouni B, Moncoutier V, Tenreiro H, Abidallah K, Lair S, et al. Streamlined ion torrent PGM-based diagnostics: BRCA1 and BRCA2 genes as a model. *Eur J Hum Genet.* 2014 Apr;22(4):535–41.
50. Bosdet IE, Docking TR, Butterfield YS, Mungall AJ, Zeng T, Coope RJ, et al. A clinically validated diagnostic second-generation sequencing assay for detection of hereditary BRCA1 and BRCA2 mutations. *J Mol Diagn JMD.* 2013 Nov;15(6):796–809.
51. Ross MG, Russ C, Costello M, Hollinger A, Lennon NJ, Hegarty R, et al. Characterizing and measuring bias in sequence data. *Genome Biol.* 2013 May 29;14(5):R51.
52. Hilbers FSM, Vreeswijk MPG, van Asperen CJ, Devilee P. The impact of next generation sequencing on the analysis of breast cancer susceptibility: a role for extremely rare genetic variation? *Clin Genet.* 2013 Nov;84(5):407–14.
53. Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CG, et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature.* 2008 Nov 6;456(7218):53–9.
54. [datasheet\\_trusight\\_cancer.pdf](https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/datasheet_trusight_cancer.pdf) [Internet]. [cited 2017 Feb 20]. Available from: [https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/datasheet\\_trusight\\_cancer.pdf](https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/datasheet_trusight_cancer.pdf)
55. About - New Diagnosis - Breast Cancer - Cancer - Ambry Genetics [Internet]. [cited 2017 Feb 20]. Available from: <http://patients.ambrygen.com/cancer/breast-cancer/new-diagnosis/what-do-i-need-to-know-about-breast-cancer>

56. Filippini SE, Vega A. Breast cancer genes: beyond BRCA1 and BRCA2. *Front Biosci Landmark Ed.* 2013 Jun 1;18:1358–72.
57. Kobayashi H, Ohno S, Sasaki Y, Matsuura M. Hereditary breast and ovarian cancer susceptibility genes (review). *Oncol Rep.* 2013 Sep;30(3):1019–29.
58. Casado JA, Callén E, Jacome A, Río P, Castella M, Lobitz S, et al. A comprehensive strategy for the subtyping of patients with Fanconi anaemia: conclusions from the Spanish Fanconi Anemia Research Network. *J Med Genet.* 2007 Apr;44(4):241–9.
59. Casadei S, Norquist BM, Walsh T, Stray S, Mandell JB, Lee MK, et al. Contribution of inherited mutations in the BRCA2-interacting protein PALB2 to familial breast cancer. *Cancer Res.* 2011 Mar 15;71(6):2222–9.
60. Buisson R, Masson J-Y. PALB2 self-interaction controls homologous recombination. *Nucleic Acids Res.* 2012 Nov 1;40(20):10312–23.
61. Cell Division, Cancer | Learn Science at Scitable [Internet]. [cited 2017 Apr 4]. Available from: <http://www.nature.com/scitable/topicpage/cell-division-and-cancer-14046590>
62. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis.* 2010 Jan;31(1):27–36.
63. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature.* 2009 Apr 9;458(7239):719–24.
64. Kennedy RD, D'Andrea AD. DNA repair pathways in clinical practice: lessons from pediatric cancer susceptibility syndromes. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2006 Aug 10;24(23):3799–808.
65. Hanks S, Rahman N. Aneuploidy-cancer predisposition syndromes: a new link between the mitotic spindle checkpoint and cancer. *Cell Cycle Georget Tex.* 2005 Feb;4(2):225–7.
66. Roche-Lestienne C, Soenen-Cornu V, Grardel-Duflos N, Laï J-L, Philippe N, Facon T, et al. Several types of mutations of the Abl gene can be found in chronic myeloid leukemia patients resistant to STI571, and they can pre-exist to the onset of treatment. *Blood.* 2002 Aug 1;100(3):1014–8.
67. Mullighan CG, Phillips LA, Su X, Ma J, Miller CB, Downing JR. Genomic Analysis of the Clonal Origins of Relapsed Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood.* 2008 Nov 16;112(11):429–429.
68. Futreal PA, Coin L, Marshall M, Down T, Hubbard T, Wooster R, et al. A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer.* 2004 Mar;4(3):177–83.
69. Touw IP, Erkeland SJ. Retroviral insertion mutagenesis in mice as a comparative oncogenomics tool to identify disease genes in human leukemia. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* 2007 Jan;15(1):13–9.
70. Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science.* 2002 Dec 6;298(5600):1911–2.

71. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*. 2008 Oct 23;455(7216):1061–8.
72. International Cancer Genome Consortium, Hudson TJ, Anderson W, Artez A, Barker AD, Bell C, et al. International network of cancer genome projects. *Nature*. 2010 Apr 15;464(7291):993–8.
73. Stephens PJ, Tarpey PS, Davies H, Van Loo P, Greenman C, Wedge DC, et al. The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. *Nature*. 2012 Jun 21;486(7403):400–4.
74. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Sep 11;98(19):10869–74.
75. Stephens PJ, McBride DJ, Lin M-L, Varela I, Pleasance ED, Simpson JT, et al. Complex landscapes of somatic rearrangement in human breast cancer genomes. *Nature*. 2009 Dec 24;462(7276):1005–10.
76. Next Generation Sequencing in Breast Cancer: First Take Home Messages [Internet]. PubMed Journals. [cited 2017 Feb 20]. Available from: <https://ncbi.nlm.nih.gov/labs/articles/23014189/>
77. Nik-Zainal S, Alexandrov LB, Wedge DC, Van Loo P, Greenman CD, Raine K, et al. Mutational processes molding the genomes of 21 breast cancers. *Cell*. 2012 May 25;149(5):979–93.
78. Nik-Zainal S, Van Loo P, Wedge DC, Alexandrov LB, Greenman CD, Lau KW, et al. The life history of 21 breast cancers. *Cell*. 2012 May 25;149(5):994–1007.
79. Chang KC, Zhao Y, Kang J, Pant S, Qiu P, Wei B, et al. Validation of Next Generation Sequencing Cancer Panels for Clinical Somatic Mutation Profiling-- Identification of Source of Variations and Artifacts using FFPE Tissues. *J Gener Seq Appl* [Internet]. 2014 Aug 24 [cited 2017 Apr 4];1(1). Available from: <https://www.omicsonline.org/open-access/validation-of-next-generation-sequencing-cancer-panels-for-clinical-somatic-mutation-profiling-identification-of-source-of-variations-and-artifacts-using-ffpe-tissues-jngsa.1000109.php?aid=32889>
80. datasheet\_truseq\_amplicon\_cancer\_panel.pdf [Internet]. [cited 2017 Feb 20]. Available from: [https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/datasheet\\_truseq\\_amplicon\\_cancer\\_panel.pdf](https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/datasheet_truseq_amplicon_cancer_panel.pdf)
81. Николова В., Б.Г. Микрометастази в костния мозък и кръвта при карцином на млечната жлеза - разпространение и клинично значение. *Списание На Българското Онкологично Дружество*. 2005 43-44;15–22.
82. Braun S, Harbeck N. Recent advances in technologies for the detection of occult metastatic cells in bone marrow of breast cancer patients. *Breast Cancer Res BCR*. 2001;3(5):285–8.

83. Braun S, Pantel K, Müller P, Janni W, Hepp F, Kentenich CR, et al. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med*. 2000 Feb 24;342(8):525–33.
84. Mansi JL, Gogas H, Bliss JM, Gazet JC, Berger U, Coombes RC. Outcome of primary-breast-cancer patients with micrometastases: a long-term follow-up study. *Lancet Lond Engl*. 1999 Jul 17;354(9174):197–202.
85. Diel IJ, Kaufmann M, Costa SD, Holle R, von Minckwitz G, Solomayer EF, et al. Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status. *J Natl Cancer Inst*. 1996 Nov 20;88(22):1652–8.
86. Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2004 Oct 15;10(20):6897–904.
87. Graves H, Czerniecki BJ. Circulating tumor cells in breast cancer patients: an evolving role in patient prognosis and disease progression. *Pathol Res Int*. 2011 Jan 3;2011:621090.
88. Bissell MJ, Hines WC. Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nat Med*. 2011 Mar;17(3):320–9.
89. Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009 Nov 25;139(5):871–90.
90. Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, Bell DW, Irimia D, Ulkus L, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature*. 2007 Dec 20;450(7173):1235–9.
91. Al-Mehdi AB, Tozawa K, Fisher AB, Shientag L, Lee A, Muschel RJ. Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. *Nat Med*. 2000 Jan;6(1):100–2.
92. Gupta GP, Massagué J. Cancer metastasis: building a framework. *Cell*. 2006 Nov 17;127(4):679–95.
93. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*. 2002 Aug;2(8):563–72.
94. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(6):453–8.
95. Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*. 2011 Oct 14;147(2):275–92.
96. Erler JT, Bennewith KL, Cox TR, Lang G, Bird D, Koong A, et al. Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche. *Cancer Cell*. 2009 Jan 6;15(1):35–44.

97. Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2007 Nov 20;25(33):5287–312.
98. Gilbey AM, Burnett D, Coleman RE, Holen I. The detection of circulating breast cancer cells in blood. *J Clin Pathol*. 2004 Sep;57(9):903–11.
99. Danova M, Torchio M, Mazzini G. Isolation of rare circulating tumor cells in cancer patients: technical aspects and clinical implications. *Expert Rev Mol Diagn*. 2011 Jun;11(5):473–85.
100. Ring AE, Zabaglo L, Ormerod MG, Smith IE, Dowsett M. Detection of circulating epithelial cells in the blood of patients with breast cancer: comparison of three techniques. *Br J Cancer*. 2005 Mar 14;92(5):906–12.
101. Stathopoulou A, Vlachonikolis I, Mavroudis D, Perraki M, Kouroussis C, Apostolaki S, et al. Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2002 Aug 15;20(16):3404–12.
102. Ignatiadis M, Xenidis N, Perraki M, Apostolaki S, Politaki E, Kafousi M, et al. Different prognostic value of cytokeratin-19 mRNA positive circulating tumor cells according to estrogen receptor and HER2 status in early-stage breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2007 Nov 20;25(33):5194–202.
103. Xenidis N, Perraki M, Kafousi M, Apostolaki S, Bolonaki I, Stathopoulou A, et al. Predictive and prognostic value of peripheral blood cytokeratin-19 mRNA-positive cells detected by real-time polymerase chain reaction in node-negative breast cancer patients. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2006 Aug 10;24(23):3756–62.
104. de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, Parker C, Miller MC, Tissing H, et al. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2008 Oct 1;14(19):6302–9.
105. Scher HI, Jia X, de Bono JS, Fleisher M, Pienta KJ, Raghavan D, et al. Circulating tumour cells as prognostic markers in progressive, castration-resistant prostate cancer: a reanalysis of IMMC38 trial data. *Lancet Oncol*. 2009 Mar;10(3):233–9.
106. Balic M, Lin H, Young L, Hawes D, Giuliano A, McNamara G, et al. Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2006 Oct 1;12(19):5615–21.
107. Aktas B, Tewes M, Fehm T, Hauch S, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res BCR*. 2009;11(4):R46.
108. Beitsch PD, Clifford E. Detection of carcinoma cells in the blood of breast cancer patients. *Am J Surg*. 2000 Dec 1;180(6):446–9.

109. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2004 Aug 19;351(8):781–91.
110. Demel U, Tilz GP, Foeldes-Papp Z, Gutierrez B, Albert WH, Böcher O. Detection of tumour cells in the peripheral blood of patients with breast cancer. Development of a new sensitive and specific immunomolecular assay. *J Exp Clin Cancer Res CR*. 2004 Sep;23(3):465–8.
111. AlunniFabbroni-Sandri-The-ongoing-evolution-of-qPCR-Methods-2010.pdf [Internet]. [cited 2017 Mar 6]. Available from: <http://www.qpcrupdate.de/AlunniFabbroni-Sandri-The-ongoing-evolution-of-qPCR-Methods-2010.pdf>
112. 37.\_Stathopoulou\_et\_al\_\_Anticancer\_research\_2003.pdf [Internet]. [cited 2017 Mar 6]. Available from: [http://www.actc-lab.chem.uoa.gr/fileadmin/actc-lab.chem.uoa.gr/uploads/papers/37.\\_Stathopoulou\\_et\\_al\\_\\_Anticancer\\_research\\_2003.pdf](http://www.actc-lab.chem.uoa.gr/fileadmin/actc-lab.chem.uoa.gr/uploads/papers/37._Stathopoulou_et_al__Anticancer_research_2003.pdf)
113. A S, D M, M P, S A, I V, E L, et al. Molecular detection of cancer cells in the peripheral blood of patients with breast cancer: comparison of CK-19, CEA and maspin as detection markers. *Anticancer Res*. 2003;23(2C):1883–90.
114. López-Guerrero JA, Gilabert PB, González EB, Sanz Alonso MA, Pérez JP, Talens AS, et al. Use of reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) for carcinoembryonic antigen, cytokeratin 19, and maspin in the detection of tumor cells in leukapheresis products from patients with breast cancer: comparison with immunocytochemistry. *J Hematother*. 1999 Feb;8(1):53–61.
115. Schweizer J, Bowden PE, Coulombe PA, Langbein L, Lane EB, Magin TM, et al. New consensus nomenclature for mammalian keratins. *J Cell Biol*. 2006 Jul 17;174(2):169–74.
116. Lacroix M. Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer*. 2006 Dec;13(4):1033–67.
117. Shi J, Sugrue SP. Dissection of protein linkage between keratins and pinin, a protein with dual location at desmosome-intermediate filament complex and in the nucleus. *J Biol Chem*. 2000 May 19;275(20):14910–5.
118. Pantel K, Cote RJ, Fodstad O. Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J Natl Cancer Inst*. 1999 Jul 7;91(13):1113–24.
119. Sensitive Detection of Micrometastases in Bone Marrow From Patients With Breast Cancer Using Immunomagnetic Isolation of Tumor Cells in Combination With Reverse Transcriptase/Polymerase Chain Reaction for Cytokeratin-19 [Internet]. *PubMed Journals*. [cited 2017 Mar 6]. Available from: <https://ncbi.nlm.nih.gov/labs/articles/10782894/>

120. Datta YH, Adams PT, Drobyski WR, Ethier SP, Terry VH, Roth MS. Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1994 Mar;12(3):475–82.
121. Kahn HJ, Yang L-Y, Blondal J, Lickley L, Holloway C, Hanna W, et al. RT-PCR amplification of CK19 mRNA in the blood of breast cancer patients: correlation with established prognostic parameters. *Breast Cancer Res Treat*. 2000 Mar 1;60(2):143–51.
122. Slade MJ, Smith BM, Sinnott HD, Cross NC, Coombes RC. Quantitative polymerase chain reaction for the detection of micrometastases in patients with breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1999 Mar;17(3):870–9.
123. Stathopoulou A, Gizi A, Perraki M, Apostolaki S, Malamos N, Mavroudis D, et al. Real-time quantification of CK-19 mRNA-positive cells in peripheral blood of breast cancer patients using the lightcycler system. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2003 Nov 1;9(14):5145–51.
124. Cote RJ, Peterson HF, Chaiwun B, Gelber RD, Goldhirsch A, Castiglione-Gertsch M, et al. Role of immunohistochemical detection of lymph-node metastases in management of breast cancer. International Breast Cancer Study Group. *Lancet Lond Engl*. 1999 Sep 11;354(9182):896–900.
125. Grünwald K, Haun M, Fiegl M, Urbanek M, Müller-Holzner E, Massoner A, et al. Mammaglobin expression in gynecologic malignancies and malignant effusions detected by nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Lab Invest J Tech Methods Pathol*. 2002 Sep;82(9):1147–53.
126. Watson MA, Fleming TP. Mammaglobin, a mammary-specific member of the uteroglobin gene family, is overexpressed in human breast cancer. *Cancer Res*. 1996 Feb 15;56(4):860–5.
127. Taback B, Chan AD, Kuo CT, Bostick PJ, Wang HJ, Giuliano AE, et al. Detection of occult metastatic breast cancer cells in blood by a multimolecular marker assay: correlation with clinical stage of disease. *Cancer Res*. 2001 Dec 15;61(24):8845–50.
128. Pestrin M, Bessi S, Galardi F, Truglia M, Biggeri A, Biagioni C, et al. Correlation of HER2 status between primary tumors and corresponding circulating tumor cells in advanced breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2009 Dec;118(3):523–30.
129. Meng S, Tripathy D, Shete S, Ashfaq R, Haley B, Perkins S, et al. HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jun 22;101(25):9393–8.
130. Bozionellou V, Mavroudis D, Perraki M, Papadopoulos S, Apostolaki S, Stathopoulos E, et al. Trastuzumab administration can effectively target chemotherapy-resistant cytokeratin-19 messenger RNA-positive tumor cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with breast cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2004 Dec 15;10(24):8185–94.

131. Ignatiadis M, Perraki M, Apostolaki S, Politaki E, Xenidis N, Kafousi M, et al. Molecular detection and prognostic value of circulating cytokeratin-19 messenger RNA-positive and HER2 messenger RNA-positive cells in the peripheral blood of women with early-stage breast cancer. *Clin Breast Cancer*. 2007 Dec;7(11):883–9.
132. Xenidis N, Ignatiadis M, Apostolaki S, Perraki M, Kalbakis K, Agelaki S, et al. Cytokeratin-19 mRNA-positive circulating tumor cells after adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2009 May 1;27(13):2177–84.
133. Ntoulia M, Stathopoulou A, Ignatiadis M, Malamos N, Mavroudis D, Georgoulas V, et al. Detection of Mammaglobin A-mRNA-positive circulating tumor cells in peripheral blood of patients with operable breast cancer with nested RT-PCR. *Clin Biochem*. 2006 Sep;39(9):879–87.
134. Ferro P, Franceschini MC, Bacigalupo B, Dessanti P, Falco E, Fontana V, et al. Detection of circulating tumour cells in breast cancer patients using human mammaglobin RT-PCR: association with clinical prognostic factors. *Anticancer Res*. 2010 Jun;30(6):2377–82.
135. Strati A, Markou A, Parisi C, Politaki E, Mavroudis D, Georgoulas V, et al. Gene expression profile of circulating tumor cells in breast cancer by RT-qPCR. *BMC Cancer*. 2011 Oct 4;11:422.
136. Saloustros E, Perraki M, Apostolaki S, Kallergi G, Xyrafas A, Kalbakis K, et al. Cytokeratin-19 mRNA-positive circulating tumor cells during follow-up of patients with operable breast cancer: prognostic relevance for late relapse. *Breast Cancer Res BCR*. 2011 Jun 10;13(3):R60.
137. Imanishi T, Itoh T, Suzuki Y, O'Donovan C, Fukuchi S, Koyanagi KO, et al. Integrative annotation of 21,037 human genes validated by full-length cDNA clones. *PLoS Biol*. 2004 Jun;2(6):e162.
138. Gaforio J-J, Serrano M-J, Sanchez-Rovira P, Sirvent A, Delgado-Rodriguez M, Campos M, et al. Detection of breast cancer cells in the peripheral blood is positively correlated with estrogen-receptor status and predicts for poor prognosis. *Int J Cancer*. 2003 Dec 20;107(6):984–90.
139. Weigelt B, Bosma AJ, Hart A a. M, Rodenhuis S, van 't Veer LJ. Marker genes for circulating tumour cells predict survival in metastasized breast cancer patients. *Br J Cancer*. 2003 Apr 7;88(7):1091–4.
140. Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Reuben JM, et al. Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2005 Mar 1;23(7):1420–30.
141. Budd GT, Cristofanilli M, Ellis MJ, Stopeck A, Borden E, Miller MC, et al. Circulating tumor cells versus imaging--predicting overall survival in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2006 Nov 1;12(21):6403–9.

142. Nolé F, Munzone E, Zorzino L, Minchella I, Salvatici M, Botteri E, et al. Variation of circulating tumor cell levels during treatment of metastatic breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2008 May;19(5):891–7.
143. Smith BM, Slade MJ, English J, Graham H, Lüchtenborg M, Sinnett HD, et al. Response of circulating tumor cells to systemic therapy in patients with metastatic breast cancer: comparison of quantitative polymerase chain reaction and immunocytochemical techniques. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2000 Apr;18(7):1432–9.
144. Krag DN, Ashikaga T, Moss TJ, Kusminsky RE, Feldman S, Carp NZ, et al. Breast Cancer Cells in the Blood: A Pilot Study. *Breast J*. 1999 Nov;5(6):354–8.
145. Brugger W, Bross KJ, Glatt M, Weber F, Mertelsmann R, Kanz L. Mobilization of tumor cells and hematopoietic progenitor cells into peripheral blood of patients with solid tumors. *Blood*. 1994 Feb 1;83(3):636–40.
146. Hu X-C, Loo WTY, Chow LWC. Surgery-related shedding of breast cancer cells as determined by RT-PCR assay. *J Surg Oncol*. 2003 Apr;82(4):228–232; discussion 233.
147. Piccart-Gebhart MJ, Sotiriou C. Adjuvant chemotherapy--yes or no? Prognostic markers in early breast cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2007 Dec;18 Suppl 12:xii2-7.
148. Miller MC, Doyle GV, Terstappen LWMM. Significance of Circulating Tumor Cells Detected by the CellSearch System in Patients with Metastatic Breast Colorectal and Prostate Cancer. *J Oncol*. 2010;2010:617421.
149. Antoniou A, Pharoah PDP, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, et al. Average Risks of Breast and Ovarian Cancer Associated with BRCA1 or BRCA2 Mutations Detected in Case Series Unselected for Family History: A Combined Analysis of 22 Studies. *Am J Hum Genet*. 2003 May 1;72(5):1117–30.
150. Chen S, Parmigiani G. Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2007 Apr 10;25(11):1329–33.
151. Claus EB, Schildkraut JM, Thompson WD, Risch NJ. The genetic attributable risk of breast and ovarian cancer. *Cancer*. 1996 Jun 1;77(11):2318–24.
152. Pal T, Permuth-Wey J, Betts JA, Krischer JP, Fiorica J, Arango H, et al. BRCA1 and BRCA2 mutations account for a large proportion of ovarian carcinoma cases. *Cancer*. 2005 Dec 15;104(12):2807–16.
153. Ford D, Easton DF, Bishop DT, Narod SA, Goldgar DE. Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Lancet Lond Engl*. 1994 Mar 19;343(8899):692–5.
154. Narod SA, Salmena L. BRCA1 and BRCA2 mutations and breast cancer. *Discov Med*. 2011 Nov;12(66):445–53.
155. Orr KS, Savage KI. The BRCA1 and BRCA2 Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Genes — Implications for DNA Damage Response, DNA Repair and Cancer Therapy.

- 2015 [cited 2017 May 5]; Available from: <http://www.intechopen.com/books/advances-in-dna-repair/the-brca1-and-brca2-breast-and-ovarian-cancer-susceptibility-genes-implications-for-dna-damage-respo>
156. Aleskandarany M, Caracappa D, Nolan CC, Macmillan RD, Ellis IO, Rakha EA, et al. DNA damage response markers are differentially expressed in BRCA-mutated breast cancers. *Breast Cancer Res Treat.* 2015 Feb;150(1):81–90.
  157. Welcsh PL, Owens KN, King MC. Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2. *Trends Genet TIG.* 2000 Feb;16(2):69–74.
  158. Nathanson KL, Weber BL. “Other” breast cancer susceptibility genes: searching for more holy grail. *Hum Mol Genet.* 2001 Apr 1;10(7):715–20.
  159. Quail MA, Smith M, Coupland P, Otto TD, Harris SR, Connor TR, et al. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics.* 2012 Jul 24;13:341.
  160. *AmpliSeq-Community-Panels-Flyer.pdf* [Internet]. [cited 2017 May 2]. Available from: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/AmpliSeq-Community-Panels-Flyer.pdf>
  161. Liu J, Doty T, Gibson B, Heyer W-D. Human BRCA2 protein promotes RAD51 filament formation on RPA-covered ssDNA. *Nat Struct Mol Biol.* 2010 Oct;17(10):1260–2.
  162. What’s New in Genetic Testing for Cancer Susceptibility? | Cancer Network [Internet]. 2016 [cited 2017 May 2]. Available from: <http://www.cancernetwork.com/oncology-journal/whats-new-genetic-testing-cancer-susceptibility>
  163. Trapp O, Seeliger K, Puchta H. Homologs of breast cancer genes in plants. *Front Plant Sci.* 2011;2:19.
  164. ATM function and telomere stability. *Publ Online* 24 January 2002 Doi101038sjonc1205060 [Internet]. 2002 Jan 24 [cited 2017 May 2];21(4). Available from: <http://www.nature.com/onc/journal/v21/n4/full/1205060a.html>
  165. Stracker TH, Roig I, Knobel PA, Marjanović M. The ATM signaling network in development and disease. *Front Genet.* 2013;4:37.
  166. Hu H, Du L, Nagabayashi G, Seeger RC, Gatti RA. ATM is down-regulated by N-Myc-regulated microRNA-421. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Jan 26;107(4):1506–11.
  167. Stagni V, Oropallo V, Fianco G, Antonelli M, Cinà I, Barilà D. Tug of war between survival and death: exploring ATM function in cancer. *Int J Mol Sci.* 2014 Mar 27;15(4):5388–409.
  168. Thompson D, Duedal S, Kirner J, McGuffog L, Last J, Reiman A, et al. Cancer risks and mortality in heterozygous ATM mutation carriers. *J Natl Cancer Inst.* 2005 Jun 1;97(11):813–22.

169. Mangone FR, Miracca EC, Feilotter HE, Mulligan LM, Nagai MA. ATM gene mutations in sporadic breast cancer patients from Brazil. SpringerPlus [Internet]. 2015 Jan 15 [cited 2017 Apr 11];4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4298590/>
170. Khalil HS, Tummala H, Chakarov S, Zhelev N, Lane DP. Targeting ATM pathway for therapeutic intervention in cancer. BioDiscovery BioDiscovery [Internet]. 2012 Jul 29 [cited 2017 Apr 11];Volume 1. Available from: <http://www.biodiscoveryjournal.co.uk/Archive/A4.htm>
171. Khalil HS, Tummala H, Zhelev N. ATM in focus: a damage sensor and cancer target. 2012 Nov 30 [cited 2017 Apr 11]; Available from: <https://repository.abertay.ac.uk/jspui/handle/10373/1625>
172. Tavera-Tapia A, Pérez-Cabornero L, Macías JA, Ceballos MI, Roncador G, de la Hoya M, et al. Almost 2% of Spanish breast cancer families are associated to germline pathogenic mutations in the ATM gene. Breast Cancer Res Treat. 2017 Feb;161(3):597–604.
173. Renwick A, Thompson D, Seal S, Kelly P, Chagtai T, Ahmed M, et al. ATM mutations that cause ataxia-telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles. Nat Genet. 2006 Aug;38(8):873–5.
174. Out AA, Wasielewski M, Huijts PEA, van Minderhout IJHM, Houwing-Duistermaat JJ, Tops CMJ, et al. MUTYH gene variants and breast cancer in a Dutch case–control study. Breast Cancer Res Treat. 2012 Jul;134(1):219–27.
175. Osorio A, Milne RL, Kuchenbaecker K, Vaclová T, Pita G, Alonso R, et al. DNA Glycosylases Involved in Base Excision Repair May Be Associated with Cancer Risk in BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. PLOS Genet. 2014 Apr 3;10(4):e1004256.
176. Maxwell KN, Wubbenhorst B, D’Andrea K, Garman B, Long JM, Powers J, et al. Prevalence of mutations in a panel of breast cancer susceptibility genes in BRCA1/2-negative patients with early-onset breast cancer. Genet Med Off J Am Coll Med Genet. 2015 Aug;17(8):630–8.
177. Half E, Bercovich D, Rozen P. Familial adenomatous polyposis. Orphanet J Rare Dis. 2009 Oct 12;4:22.
178. Nevanlinna H, Bartek J. The CHEK2 gene and inherited breast cancer susceptibility. Oncogene. 2006 Sep 25;25(43):5912–9.
179. Ahn J, Urist M, Prives C. The Chk2 protein kinase. DNA Repair. 2004 Sep;3(8–9):1039–47.
180. Bell DW, Kim SH, Godwin AK, Schiripo TA, Harris PL, Haserlat SM, et al. Genetic and functional analysis of CHEK2 (CHK2) variants in multiethnic cohorts. Int J Cancer J Int Cancer. 2007 Dec 15;121(12):2661–7.
181. Offit K, Garber JE. Time to Check CHEK2 in Families With Breast Cancer? J Clin Oncol. 2008 Feb 1;26(4):519–20.

182. Bartek J, Falck J, Lukas J. Chk2 kinase — a busy messenger. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001 Dec;2(12):877–86.
183. Johnson RL, Rothman AL, Xie J, Goodrich LV, Bare JW, Bonifas JM, et al. Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science*. 1996 Jun 14;272(5268):1668–71.
184. Naylor TL, Greshock J, Wang Y, Colligon T, Yu Q, Clemmer V, et al. High resolution genomic analysis of sporadic breast cancer using array-based comparative genomic hybridization. *Breast Cancer Res*. 2005;7(6):R1186–98.
185. Sjöblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD, et al. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science*. 2006 Oct 13;314(5797):268–74.
186. Kasper M, Jaks V, Fiaschi M, Toftgård R. Hedgehog signalling in breast cancer. *Carcinogenesis*. 2009 Jun;30(6):903–11.
187. Huang YS, Bu DF, Li XY, Ma ZH, Yang Y, Lin ZM, et al. Unique features of PTCH1 mutation spectrum in Chinese sporadic basal cell carcinoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*. 2013 Feb;27(2):235–41.
188. Lu W, Wang X, Lin H, Lindor NM, Couch FJ. Mutation screening of RAD51C in high-risk breast and ovarian cancer families. *Fam Cancer*. 2012 Sep;11(3):381–5.
189. Stevens KN, Vachon CM, Lee AM, Slager S, Lesnick T, Olswold C, et al. Common breast cancer susceptibility loci are associated with triple-negative breast cancer. *Cancer Res*. 2011 Oct 1;71(19):6240–9.
190. Somyajit K, Subramanya S, Nagaraju G. Distinct roles of FANCO/RAD51C protein in DNA damage signaling and repair: implications for Fanconi anemia and breast cancer susceptibility. *J Biol Chem*. 2012 Jan 27;287(5):3366–80.
191. Sierra JR, Tsao M-S. c-MET as a potential therapeutic target and biomarker in cancer. *Ther Adv Med Oncol*. 2011 Nov;3(1 Suppl):S21–35.
192. Ho-Yen CM, Jones JL, Kermorgant S. The clinical and functional significance of c-Met in breast cancer: a review. *Breast Cancer Res BCR* [Internet]. 2015 [cited 2017 Apr 11];17(1). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4389345/>
193. Lengyel E, Prechtel D, Resau JH, Gauger K, Welk A, Lindemann K, et al. C-Met overexpression in node-positive breast cancer identifies patients with poor clinical outcome independent of Her2/neu. *Int J Cancer*. 2005 Feb 10;113(4):678–82.
194. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science*. 2007 May 18;316(5827):1039–43.
195. Salgia R. Role of c-Met in Cancer: Emphasis on Lung Cancer. *Semin Oncol*. 2009 Apr;36(2 Suppl 1):S52–8.

196. Gelsomino F, Rossi G, Tiseo M. MET and Small-Cell Lung Cancer. *Cancers*. 2014 Oct 13;6(4):2100–15.
197. Fukuchi K, Martin GM, Monnat RJ. Mutator phenotype of Werner syndrome is characterized by extensive deletions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Aug;86(15):5893–7.
198. Sugimoto M. A cascade leading to premature aging phenotypes including abnormal tumor profiles in Werner syndrome (review). *Int J Mol Med*. 2014 Feb;33(2):247–53.
199. Goto M, Miller RW, Ishikawa Y, Sugano H. Excess of rare cancers in Werner syndrome (adult progeria). *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. 1996 Apr;5(4):239–46.
200. Ciccia A, McDonald N, West SC. Structural and functional relationships of the XPF/MUS81 family of proteins. *Annu Rev Biochem*. 2008;77:259–87.
201. Bogliolo M, Schuster B, Stoepker C, Derkunt B, Su Y, Raams A, et al. Mutations in ERCC4, encoding the DNA-repair endonuclease XPF, cause Fanconi anemia. *Am J Hum Genet*. 2013 May 2;92(5):800–6.
202. Kashiyama K, Nakazawa Y, Pilz DT, Guo C, Shimada M, Sasaki K, et al. Malfunction of nuclease ERCC1-XPF results in diverse clinical manifestations and causes Cockayne syndrome, xeroderma pigmentosum, and Fanconi anemia. *Am J Hum Genet*. 2013 May 2;92(5):807–19.
203. Ghossaini M, Pharoah PDP, Easton DF. Inherited genetic susceptibility to breast cancer: the beginning of the end or the end of the beginning? *Am J Pathol*. 2013 Oct;183(4):1038–51.
204. Hofstatter EW, Domchek SM, Miron A, Garber J, Wang M, Componeschi K, et al. PALB2 mutations in familial breast and pancreatic cancer. *Fam Cancer [Internet]*. 2011 Jun [cited 2017 May 3];10(2). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3836668/>
205. Sy SM-H, Huen MSY, Zhu Y, Chen J. PALB2 regulates recombinational repair through chromatin association and oligomerization. *J Biol Chem*. 2009 Jul 3;284(27):18302–10.
206. Tischkowitz M, Xia B. PALB2/FANCN: recombining cancer and Fanconi anemia. *Cancer Res*. 2010 Oct 1;70(19):7353–9.
207. Antoniou AC, Casadei S, Heikkinen T, Barrowdale D, Pylkäs K, Roberts J, et al. Breast-Cancer Risk in Families with Mutations in PALB2. *N Engl J Med*. 2014 Aug 7;371(6):497–506.
208. Ma J, Cai H, Wu T, Sobhian B, Huo Y, Alcivar A, et al. PALB2 Interacts with KEAP1 To Promote NRF2 Nuclear Accumulation and Function [Internet]. [cited 2017 May 5]. Available from: <http://mcb.asm.org>

209. Trapani JA. Target cell apoptosis induced by cytotoxic T cells and natural killer cells involves synergy between the pore-forming protein, perforin, and the serine protease, granzyme B. *Aust N Z J Med*. 1995 Dec;25(6):793–9.
210. Tschopp J, Masson D, Stanley KK. Structural/functional similarity between proteins involved in complement- and cytotoxic T-lymphocyte-mediated cytolysis. *Nature*. 1986 Sep 28;322(6082):831–4.
211. Pipkin ME, Rao A, Lichtenheld MG. The transcriptional control of the perforin locus. *Immunol Rev*. 2010 May;235(1):55–72.
212. Xiao F, Lu M, Li J, Zhao T, Yi SY, Thara VK, et al. Pto Mutants Differentially Activate Prf-Dependent, avrPto-Independent Resistance and Gene-for-Gene Resistance. *Plant Physiol*. 2003 Mar;131(3):1239–49.
213. Martínez-Pomar N, Lanio N, Romo N, Lopez-Botet M, Matamoros N. Functional impact of A91V mutation of the PRF1 perforin gene. *Hum Immunol*. 2013 Jan;74(1):14–7.
214. Voskoboinik I, Whisstock JC, Trapani JA. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat Rev Immunol*. 2015 Jun;15(6):388–400.
215. Baloh RH, Enomoto H, Johnson EM, Milbrandt J. The GDNF family ligands and receptors - implications for neural development. *Curr Opin Neurobiol*. 2000 Feb;10(1):103–10.
216. Qi X-P, Ma J-M, Du Z-F, Ying R-B, Fei J, Jin H-Y, et al. RET germline mutations identified by exome sequencing in a Chinese multiple endocrine neoplasia type 2A/familial medullary thyroid carcinoma family. *PloS One*. 2011;6(5):e20353.
217. Rett Syndrome: What Are the Symptoms and How is it Treated? [Internet]. WebMD. [cited 2017 May 3]. Available from: <http://www.webmd.com/brain/autism/rett-syndrome>
218. Morandi A, Martin L-A, Gao Q, Pancholi S, Mackay A, Robertson D, et al. GDNF-RET signaling in ER-positive breast cancers is a key determinant of response and resistance to aromatase inhibitors. *Cancer Res*. 2013 Jun 15;73(12):3783–95.
219. Spanheimer PM, Park J-M, Askeland RW, Kulak MV, Woodfield GW, De Andrade JP, et al. Inhibition of RET increases the efficacy of antiestrogen and is a novel treatment strategy for luminal breast cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2014 Apr 15;20(8):2115–25.
220. Gattelli A, Nalvarte I, Boulay A, Roloff TC, Schreiber M, Carragher N, et al. Ret inhibition decreases growth and metastatic potential of estrogen receptor positive breast cancer cells. *EMBO Mol Med*. 2013 Sep;5(9):1335–50.
221. Manié S, Santoro M, Fusco A, Billaud M. The RET receptor: function in development and dysfunction in congenital malformation. *Trends Genet TIG*. 2001 Oct;17(10):580–9.

222. Neumann HPH, Pawlu C, Peczkowska M, Bausch B, McWhinney SR, Muresan M, et al. Distinct clinical features of paraganglioma syndromes associated with SDHB and SDHD gene mutations. *JAMA*. 2004 Aug 25;292(8):943–51.
223. Kim S, Kim DH, Jung W-H, Koo JS. Succinate dehydrogenase expression in breast cancer. *SpringerPlus*. 2013 Dec;2(1):299.
224. Cornejo KM, Lu M, Yang P, Wu S, Cai C, Zhong W, et al. Succinate Dehydrogenase B (SDHB): A New Prognostic Biomarker in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Hum Pathol*. 2015 Jun;46(6):820–6.
225. Chen L, Liu T, Zhang S, Zhou J, Wang Y, Di W. Succinate dehydrogenase subunit B inhibits the AMPK-HIF-1 $\alpha$  pathway in human ovarian cancer in vitro. *J Ovarian Res*. 2014 Dec 10;7:115.
226. Ricketts CJ, Shuch B, Vocke CD, Metwalli AR, Bratslavsky G, Middleton L, et al. Succinate Dehydrogenase Kidney Cancer (SDH-RCC): An Aggressive Example of the Warburg Effect in Cancer. *J Urol [Internet]*. 2012 Dec [cited 2017 Apr 11];188(6). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3856891/>
227. Georgitsi M, Karhu A, Winqvist R, Visakorpi T, Waltering K, Vahteristo P, et al. Mutation analysis of aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) gene in colorectal, breast, and prostate cancers. *Br J Cancer*. 2007 Jan 29;96(2):352–6.
228. Nord KH, Magnusson L, Isaksson M, Nilsson J, Lilljebjörn H, Domanski HA, et al. Concomitant deletions of tumor suppressor genes MEN1 and AIP are essential for the pathogenesis of the brown fat tumor hibernoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Dec 7;107(49):21122–7.
229. Igreja S, Chahal HS, King P, Bolger GB, Srirangalingam U, Guasti L, et al. Characterization of aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) mutations in familial isolated pituitary adenoma families. *Hum Mutat*. 2010 Aug;31(8):950–60.
230. Characteristics of Familial Isolated Pituitary Adenomas [Internet]. *Medscape*. [cited 2017 Apr 11]. Available from: <http://www.medscape.com/viewarticle/565829>
231. Couch FJ, Hart SN, Sharma P, Toland AE, Wang X, Miron P, et al. Inherited mutations in 17 breast cancer susceptibility genes among a large triple-negative breast cancer cohort unselected for family history of breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2015 Feb 1;33(4):304–11.
232. Buys SS, Sandbach JF, Gammon A, Patel G, Kidd J, Brown KL, et al. A study of over 35,000 women with breast cancer tested with a 25-gene panel of hereditary cancer genes. *Cancer*. 2017 Jan 13;
233. Tung N, Lin NU, Kidd J, Allen BA, Singh N, Wenstrup RJ, et al. Frequency of Germline Mutations in 25 Cancer Susceptibility Genes in a Sequential Series of Patients With Breast Cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2016 May 1;34(13):1460–8.

234. Lin P-H, Kuo W-H, Huang A-C, Lu Y-S, Lin C-H, Kuo S-H, et al. Multiple gene sequencing for risk assessment in patients with early-onset or familial breast cancer. *Oncotarget*. 2016 Feb 16;7(7):8310–20.
235. Yang X, Wu J, Lu J, Liu G, Di G, Chen C, et al. Identification of a comprehensive spectrum of genetic factors for hereditary breast cancer in a Chinese population by next-generation sequencing. *PloS One*. 2015;10(4):e0125571.
236. Tedaldi G, Tebaldi M, Zampiga V, Danesi R, Arcangeli V, Ravegnani M, et al. Multiple-gene panel analysis in a case series of 255 women with hereditary breast and ovarian cancer. *Oncotarget*. 2017 Apr 3;
237. Li J, Meeks H, Feng B-J, Healey S, Thorne H, Makunin I, et al. Targeted massively parallel sequencing of a panel of putative breast cancer susceptibility genes in a large cohort of multiple-case breast and ovarian cancer families. *J Med Genet*. 2016 Jan;53(1):34–42.
238. Bernards SS, Norquist BM, Harrell MI, Agnew KJ, Lee MK, Walsh T, et al. Genetic characterization of early onset ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2016 Feb;140(2):221–5.
239. Dai X, Li T, Bai Z, Yang Y, Liu X, Zhan J, et al. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am J Cancer Res*. 2015 Sep 15;5(10):2929–43.
240. Dai X, Xiang L, Li T, Bai Z. Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. *J Cancer*. 2016;7(10):1281–94.
241. Pon JR, Marra MA. Driver and passenger mutations in cancer. *Annu Rev Pathol*. 2015;10:25–50.
242. Pereira B, Chin S-F, Rueda OM, Vollan H-KM, Provenzano E, Bardwell HA, et al. The somatic mutation profiles of 2,433 breast cancers refines their genomic and transcriptomic landscapes. *Nat Commun*. 2016 May 10;7:11479.
243. Kim J-Y, Lee E, Park K, Park W-Y, Jung HH, Ahn JS, et al. Clinical implications of genomic profiles in metastatic breast cancer with a focus on TP53 and PIK3CA, the most frequently mutated genes. *Oncotarget*. 2017 Mar 3;
244. Dam V, Morgan BT, Mazanek P, Hogarty MD. Mutations in PIK3CA are infrequent in neuroblastoma. *BMC Cancer*. 2006 Jul 5;6:177.
245. Sharma VR, Gupta GK, Sharma AK, Batra N, Sharma DK, Joshi A, et al. PI3K/Akt/mTOR Intracellular Pathway and Breast Cancer: Factors, Mechanism and Regulation. *Curr Pharm Des*. 2016 Nov 16;
246. Cascón A, Robledo M. MAX and MYC: A Heritable Breakup. *Cancer Res*. 2012 Jul 1;72(13):3119–24.
247. Mukohara T. PI3K mutations in breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *Breast Cancer Targets Ther*. 2015 May 15;7:111–23.

248. Arsenic R, Lehmann A, Budczies J, Koch I, Prinzler J, Kleine-Tebbe A, et al. Analysis of PIK3CA mutations in breast cancer subtypes. *Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM*. 2014 Jan;22(1):50–6.
249. Zardavas D, Phillips WA, Loi S. PIK3CA mutations in breast cancer: reconciling findings from preclinical and clinical data. *Breast Cancer Res*. 2014;16:201.
250. Cizkova M, Susini A, Vacher S, Cizeron-Clairac G, Andrieu C, Driouch K, et al. PIK3CA mutation impact on survival in breast cancer patients and in ER $\alpha$ , PR and ERBB2-based subgroups. *Breast Cancer Res*. 2012;14:R28.
251. Ma CX. The PI3K Pathway as a Therapeutic Target in Breast Cancer. *Am J Hematol Oncol* [Internet]. 2015 Mar 20 [cited 2017 Apr 12];11(3). Available from: <http://www.gotoper.com/publications/ajho/2015/2015mar/the-pi3k-pathway-as-a-therapeutic-target-in-breast-cancer>
252. Papaxoinis G, Kotoula V, Alexopoulou Z, Kalogeras KT, Zagouri F, Timotheadou E, et al. Significance of PIK3CA Mutations in Patients with Early Breast Cancer Treated with Adjuvant Chemotherapy: A Hellenic Cooperative Oncology Group (HeCOG) Study. *PLOS ONE*. 2015 Oct 9;10(10):e0140293.
253. Luo Z, Li Y, Wang H, Fleming J, Li M, Kang Y, et al. Hepatocyte Nuclear Factor 1A (HNF1A) as a Possible Tumor Suppressor in Pancreatic Cancer. *PLOS ONE*. 2015 Mar 20;10(3):e0121082.
254. Courtois G, Morgan JG, Campbell LA, Fourel G, Crabtree GR. Interaction of a liver-specific nuclear factor with the fibrinogen and alpha 1-antitrypsin promoters. *Science*. 1987 Oct 30;238(4827):688–92.
255. Tan M, Yu D. Molecular Mechanisms of ErbB2-Mediated Breast Cancer Chemoresistance [Internet]. Landes Bioscience; 2013 [cited 2017 May 3]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6194/>
256. Padhy LC, Shih C, Cowing D, Finkelstein R, Weinberg RA. Identification of a phosphoprotein specifically induced by the transforming DNA of rat neuroblastomas. *Cell*. 1982 Apr;28(4):865–71.
257. Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RA. Multiple independent activations of the neu oncogene by a point mutation altering the transmembrane domain of p185. *Cell*. 1986 Jun 6;45(5):649–57.
258. Breast Cancer HER2 Status [Internet]. [cited 2017 May 3]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/breast-cancer-her2-status.html>
259. Bozhanov SS, Angelova SG, Krasteva ME, Markov TL, Christova SL, Gavrilov IG, et al. Alterations in p53, BRCA1, ATM, PIK3CA, and HER2 genes and their effect in modifying clinicopathological characteristics and overall survival of Bulgarian patients with breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010 Nov;136(11):1657–69.

260. Mitri Z, Constantine T, O'Regan R. The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy. *Chemother Res Pract*. 2012;2012:743193.
261. Prat A, Baselga J. The role of hormonal therapy in the management of hormonal-receptor-positive breast cancer with co-expression of HER2. *Nat Clin Pract Oncol*. 2008 Sep;5(9):531–42.
262. Herter-Sprue GS, Greulich H, Wong K-K. Activating Mutations in ERBB2 and Their Impact on Diagnostics and Treatment. *Front Oncol* [Internet]. 2013 Apr 23 [cited 2017 Apr 12];3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3632856/>
263. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2005 Oct 20;353(16):1659–72.
264. Sun Z, Shi Y, Shen Y, Cao L, Zhang W, Guan X. Analysis of different HER-2 mutations in breast cancer progression and drug resistance. *J Cell Mol Med*. 2015 Dec;19(12):2691–701.
265. Sundvall M, Iljin K, Kilpinen S, Sara H, Kallioniemi O-P, Elenius K. Role of ErbB4 in Breast Cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2008 Jun 1;13(2):259–68.
266. HUMAN MELANOMA CELL LINES WITH ERBB4 MUTATIONS | Flintbox [Internet]. [cited 2017 Apr 13]. Available from: <http://www.flintbox.com/public/project/9256>
267. Iwakura Y, Nawa H. ErbB1-4-dependent EGF/neuregulin signals and their cross talk in the central nervous system: pathological implications in schizophrenia and Parkinson's disease. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2013 [cited 2017 Apr 13];7. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2013.00004/abstract>
268. Wnt Pathway-Independent Activities of the APC Tumor Suppressor pp. 105-132 [Internet]. [cited 2017 Apr 13]. Available from: [https://www.novapublishers.com/catalog/product\\_info.php?products\\_id=24188](https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=24188)
269. Aoki K, Taketo MM. Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene. *J Cell Sci*. 2007 Oct 1;120(19):3327–35.
270. Prasad CP, Mirza S, Sharma G, Prashad R, DattaGupta S, Rath G, et al. Epigenetic alterations of CDH1 and APC genes: relationship with activation of Wnt/beta-catenin pathway in invasive ductal carcinoma of breast. *Life Sci*. 2008 Aug 29;83(9–10):318–25.
271. Mukherjee N, Bhattacharya N, Alam N, Roy A, Roychoudhury S, Panda CK. Subtype-specific alterations of the Wnt signaling pathway in breast cancer: clinical and prognostic significance. *Cancer Sci*. 2012 Feb;103(2):210–20.
272. Ahmed M, Rahman N. ATM and breast cancer susceptibility. *Oncogene*. 2006 Sep 25;25(43):5906–11.

273. Yardley DA. Drug resistance and the role of combination chemotherapy in improving patient outcomes. *Int J Breast Cancer*. 2013;2013:137414.
274. VanKlompbergen MK, Bedalov CO, Soto KF, Prosperi JR. APC selectively mediates response to chemotherapeutic agents in breast cancer. *BMC Cancer* [Internet]. 2015 Jun 7 [cited 2017 Apr 13];15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4458029/>
275. Swift M, Reitnauer PJ, Morrell D, Chase CL. Breast and other cancers in families with ataxia-telangiectasia. *N Engl J Med*. 1987 May 21;316(21):1289–94.
276. Lavin MF. Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Oct;9(10):759–69.
277. COSMIC: Cancer Browser [Internet]. [cited 2017 May 4]. Available from: [http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/browse/tissue#sn=breast&ss=all&hn=all&sh=all&in=t&src=tissue&all\\_data=n&wgs=off](http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/browse/tissue#sn=breast&ss=all&hn=all&sh=all&in=t&src=tissue&all_data=n&wgs=off)
278. Jaeger BAS, Jueckstock J, Andergassen U, Salmen J, Schochter F, Fink V, et al. Evaluation of Two Different Analytical Methods for Circulating Tumor Cell Detection in Peripheral Blood of Patients with Primary Breast Cancer. *BioMed Res Int* [Internet]. 2014 [cited 2017 Apr 18];2014. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3997081/>
279. Rack BK, Schindlbeck C, Andergassen U, Schneeweiss A, Zwingers T, Lichtenegger W, et al. Use of circulating tumor cells (CTC) in peripheral blood of breast cancer patients before and after adjuvant chemotherapy to predict risk for relapse: The SUCCESS trial. *J Clin Oncol* [Internet]. 2010 [cited 2017 Apr 18];28:15s(suppl; abstr 1003). Available from: <http://meetinglibrary.asco.org/content/53775-74>
280. Pierga J-Y, Bonneton C, Vincent-Salomon A, de Cremoux P, Nos C, Blin N, et al. Clinical significance of immunocytochemical detection of tumor cells using digital microscopy in peripheral blood and bone marrow of breast cancer patients. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2004 Feb 15;10(4):1392–400.
281. Cristofanilli M, Broglio KR, Guarneri V, Jackson S, Fritsche HA, Islam R, et al. Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: biologic staging beyond tumor burden. *Clin Breast Cancer*. 2007 Feb;7(6):471–9.
282. Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Miller MC, et al. Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2006 Jul 15;12(14 Pt 1):4218–24.
283. Ross AA, Cooper BW, Lazarus HM, Mackay W, Moss TJ, Ciobanu N, et al. Detection and viability of tumor cells in peripheral blood stem cell collections from breast cancer patients using immunocytochemical and clonogenic assay techniques. *Blood*. 1993 Nov 1;82(9):2605–10.

284. Riethdorf S, Pantel K. Disseminated tumor cells in bone marrow and circulating tumor cells in blood of breast cancer patients: current state of detection and characterization. *Pathobiol J Immunopathol Mol Cell Biol.* 2008;75(2):140–8.
285. Andreopoulou E, Yang L-Y, Rangel KM, Reuben JM, Hsu L, Krishnamurthy S, et al. Comparison of assay methods for detection of circulating tumor cells in metastatic breast cancer: AdnaGen AdnaTest BreastCancer Select/Detect™ versus Veridex CellSearch™ system. *Int J Cancer.* 2012 Apr 1;130(7):1590–7.
286. Aurilio G, Sciandivasci A, Munzone E, Sandri MT, Zorzino L, Cassatella MC, et al. Prognostic value of circulating tumor cells in primary and metastatic breast cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2012 Feb;12(2):203–14.
287. Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol.* 1994 Apr 2;125(2):437–46.
288. Maetzel D, Denzel S, Mack B, Canis M, Went P, Benk M, et al. Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. *Nat Cell Biol.* 2009 Feb;11(2):162–71.
289. Osta WA, Chen Y, Mikhitarian K, Mitas M, Salem M, Hannun YA, et al. EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy. *Cancer Res.* 2004 Aug 15;64(16):5818–24.
290. Litvinov SV, van Driel W, van Rhijn CM, Bakker HA, van Krieken H, Fleuren GJ, et al. Expression of Ep-CAM in cervical squamous epithelia correlates with an increased proliferation and the disappearance of markers for terminal differentiation. *Am J Pathol.* 1996 Mar;148(3):865–75.
291. Münz M, Kieu C, Mack B, Schmitt B, Zeidler R, Gires O. The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation. *Oncogene.* 2004 Jul 29;23(34):5748–58.
292. Armstrong A, Eck SL. EpCAM: A new therapeutic target for an old cancer antigen. *Cancer Biol Ther.* 2003 Aug;2(4):320–6.
293. Gendler SJ, Lancaster CA, Taylor-Papadimitriou J, Duhig T, Peat N, Burchell J, et al. Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin. *J Biol Chem.* 1990 Sep 5;265(25):15286–93.
294. Hollingsworth MA, Swanson BJ. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat Rev Cancer.* 2004 Jan;4(1):45–60.
295. Moncada DM, Kammanadiminti SJ, Chadee K. Mucin and Toll-like receptors in host defense against intestinal parasites. *Trends Parasitol.* 2003 Jul;19(7):305–11.
296. Gendler SJ. MUC1, the renaissance molecule. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2001 Jul;6(3):339–53.
297. Quin RJ, McGuckin MA. Phosphorylation of the cytoplasmic domain of the MUC1 mucin correlates with changes in cell-cell adhesion. *Int J Cancer.* 2000 Aug 15;87(4):499–506.

298. Yamamoto M, Bharti A, Li Y, Kufe D. Interaction of the DF3/MUC1 breast carcinoma-associated antigen and beta-catenin in cell adhesion. *J Biol Chem*. 1997 May 9;272(19):12492–4.
299. Kim Y-S, Won YS, Park KS, Song BJ, Kim JS, Oh SJ, et al. Prognostic Significance of HER2 Gene Amplification According to Stage of Breast Cancer. *J Korean Med Sci*. 2008 Jun;23(3):414–20.
300. Gajria D, Chandarlapaty S. HER2-amplified breast cancer: mechanisms of trastuzumab resistance and novel targeted therapies. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2011 Feb;11(2):263–75.
301. Figueroa-Magalhães MC, Jelovac D, Connolly R, Wolff AC. Treatment of HER2-positive Breast Cancer. *Breast Edinb Scotl*. 2014 Apr;23(2):128–36.
302. Arteaga CL, Engelman JA. ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. *Cancer Cell*. 2014 Mar 17;25(3):282–303.
303. Houssami N, Macaskill P, Balleine RL, Bilous M, Pegram MD. HER2 discordance between primary breast cancer and its paired metastasis: tumor biology or test artefact? Insights through meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 Oct;129(3):659–74.
304. Jordan NV, Bardia A, Wittner BS, Benes C, Ligorio M, Zheng Y, et al. HER2 expression identifies dynamic functional states within circulating breast cancer cells. *Nature*. 2016 Sep 1;537(7618):102–6.
305. Theodoropoulos PA, Polioudaki H, Agelaki S, Kallergi G, Saridaki Z, Mavroudis D, et al. Circulating tumor cells with a putative stem cell phenotype in peripheral blood of patients with breast cancer. *Cancer Lett*. 2010 Feb 1;288(1):99–106.
306. Deng X, Apple S, Zhao H, Song J, Lee M, Luo W, et al. CD24 expression and differential resistance to chemotherapy in triple-negative breast cancer. *Oncotarget*. 2017 Mar 15;
307. Ignatiadis M, Kallergi G, Ntoulia M, Perraki M, Apostolaki S, Kafousi M, et al. Prognostic value of the molecular detection of circulating tumor cells using a multimarker reverse transcription-PCR assay for cytokeratin 19, mammaglobin A, and HER2 in early breast cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2008 May 1;14(9):2593–600.
308. Bidard F-C, Peeters DJ, Fehm T, Nolé F, Gisbert-Criado R, Mavroudis D, et al. Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*. 2014 Apr;15(4):406–14.
309. Huang X, Gao P, Song Y, Sun J, Chen X, Zhao J, et al. Meta-analysis of the prognostic value of circulating tumor cells detected with the CellSearch System in colorectal cancer. *BMC Cancer [Internet]*. 2015 Mar 30 [cited 2017 Apr 27];15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4389311/>
310. Vlaeminck-Guillem V. When Prostate Cancer Circulates in the Bloodstream. *Diagnostics*. 2015 Oct 29;5(4):428–74.

311. Punnoose EA, Atwal S, Liu W, Raja R, Fine BM, Hughes BGM, et al. Evaluation of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in non-small cell lung cancer: association with clinical endpoints in a phase II clinical trial of pertuzumab and erlotinib. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2012 Apr 15;18(8):2391–401.
312. Hou J-M, Krebs MG, Lancashire L, Sloane R, Backen A, Swain RK, et al. Clinical significance and molecular characteristics of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in patients with small-cell lung cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2012 Feb 10;30(5):525–32.
313. Cabel L, Proudhon C, Gortais H, Loirat D, Coussy F, Pierga J-Y, et al. Circulating tumor cells: clinical validity and utility. *Int J Clin Oncol*. 2017 Feb 25;
314. Agelaki S, Kalykaki A, Markomanolaki H, Papadaki MA, Kallergi G, Hatzidaki D, et al. Efficacy of Lapatinib in Therapy-Resistant HER2-Positive Circulating Tumor Cells in Metastatic Breast Cancer. *PLoS ONE [Internet]*. 2015 Jun 17 [cited 2017 Apr 27];10(6). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4471111/>
315. Georgoulas V, Bozionelou V, Agelaki S, Perraki M, Apostolaki S, Kallergi G, et al. Trastuzumab decreases the incidence of clinical relapses in patients with early breast cancer presenting chemotherapy-resistant CK-19mRNA-positive circulating tumor cells: results of a randomized phase II study. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2012 Jul;23(7):1744–50.
316. Bölke E, Orth K, Gerber P, Lammering G, Mota R, Peiper M, et al. Gene expression of circulating tumour cells in breast cancer patients. *Eur J Med Res*. 2009 Sep 28;14(10):426–32.
317. Zhong XY, Kaul S, Eichler A, Bastert G. Evaluating GA733-2 mRNA as a marker for the detection of micrometastatic breast cancer in peripheral blood and bone marrow. *Arch Gynecol Obstet*. 1999 Nov;263(1–2):2–6.
318. Watson MA, Darrow C, Zimonjic DB, Popescu NC, Fleming TP. Structure and transcriptional regulation of the human mammaglobin gene, a breast cancer associated member of the uteroglobin gene family localized to chromosome 11q13. *Oncogene*. 1998 Feb 12;16(6):817–24.
319. Lin Y-C, Chen S-C, Hsueh S, Lo Y-F, Chow-Wu Y-H, Liaw I-C, et al. Lack of correlation between expression of human mammaglobin mRNA in peripheral blood and known prognostic factors for breast cancer patients. *Cancer Sci*. 2003 Jan;94(1):99–102.
320. Roncella S, Ferro P, Bacigalupo B, Pronzato P, Tognoni A, Falco E, et al. Human mammaglobin mRNA is a reliable molecular marker for detecting occult breast cancer cells in peripheral blood. *J Exp Clin Cancer Res CR*. 2005 Jun;24(2):265–71.
321. Cerveira N, Torres L, Rocha P, Bizarro S, Pereira D, Abreu J, et al. Highly sensitive detection of the MGB1 transcript (mammaglobin) in the peripheral blood of breast cancer patients. *Int J Cancer*. 2004 Feb 10;108(4):592–5.

Праймери използвани за амплификация на BRCA1

Exon	Forward	Reverse	Fragment length
2	GGACGTTGTCATTAGTTCTTTGG	GTCTTTTCTTCCCTAGTATGT	339bp
3	AACGAACTTGAGGCCTTATG	TTGGATTTTCGTTCTCACTT	308bp
5	CTCTTAAGGGCAGTTGTGAG	ATGGTTTTATAGGAACGCTATG	278bp
6	TTTCTACTGTTGCTGCATCT	TAATGTGCAAACCTCCTGAG	273bp
7	GGTTTCTCTTGGTTTCTTTG	CCCAGCTACTAAGGGGGCTA	250bp
8	TGTTAGCTGACTGATGATGGT	AACCCAGCAATTATTATTAATAAC	268bp
9	CCACAGTAGATGCTCAGTAAATA	TAGGAAAATACCAGCTTCATAGA	211bp
10	GATCTTGGTCATTTGACAGTTC	CCCAAATGGTCTTCAGAATA	240bp
11a	CCACCTCCAAGGTGTATGA	TGTTATGTTGGCTCCTTGCT	370bp
11b	TTACTCACTAAAGACAGAATGA	CCAGAATATTCATCTACCTCA	401bp
11c	CACATGATGGGGAGTCTGA	TCTTGATAAAATCCTCAGGATG	366bp
11d	CAAGAGCGTCCCTCACA	GCGCATGAATATGCCTGGT	388bp
11e	GTATAAGCAATATGGAACCTCGA	TTAAGTTCACTGGTATTTGAACA	388bp
11f	GACAGCGATACTTCCCAAGA	TGGAACAACCATGGATTAGTC	704bp
11g	GGAAGTTAGCACTCTAGGGA	GCAGTGATATTAAGTGTCTGTA	423bp
11h	GCAACATTCTCTGCCACTC	GGCTAATTGTGCTCACTGT	436bp
11i	CTACTTTTTCCCATCAAGTCA	TCAGGATGCTTACAATTACTTC	377bp
11j	CAAAATGAATGCTATGCTTAGA	TCGGTAACCCTGAGCCAAAT	377bp
11k	GCAAAAGCGTCCAGAAAGGA	TATTTGCAGTCAAGTCTTCCAA	396bp
11l	GTAATATTGGCAAAGGCATCT	TAAAATGTGCTCCCCAAAAGCA	360bp
12	GCGTTTATAGTCTGCTTTTACA	TGTCAGCAAACCTAAGAATGT	227bp
13	AATGGAAAGCTTCTCAAAGTA	ATGTTGGAGCTAGGTCCTTAC	320bp
14	CTAACCTGAATTATCACTATCA	GTGTATAAATGCCTGTATGCA	312bp
15	CAGACTTCTAGGCTGTCTTGC	GTGTTTGTTCGAATACAGCAG	378bp
16	AATTCTTAACAGAGACCAGAAC	AAAACCTCTTCCAGAATGTTGT	450bp
17	AGCTGTGTGCTAGAGGTAACCTC	GTGGTTTTATGCAGCAGATG	190bp
18	AGCCTCCCCTAGACTTCCAA	TAAAGGGAGGAGGGGAGAAA	319bp
19	TGTGGCTTTAGAGGGAAGGA	GGTGCATTGATGGAAGGAAG	261bp
20	ATATGACGTGTCTGCTCCAC	AGTCTTACAAAATGAAGCGG	259bp
21	AAGCTCTCCTTTTTGAAAGTC	GTAGAGAAATAGAATAGCCTCT	298bp
22	TCCCATTGAGAGGTCTTGCT	GAGAAGACTTCTGAGGCTAC	298bp
23	TGAAGTGACAGTCCAGTAGT	CATTTTAGCCATTCAACAACAA	258bp
24	ATGAATTGACACTAATCTCTGC	GTAGCCAGGACAGTAGAAGGA	280bp

Приложение 2

Праимери използвани за амплификация на BRCA2

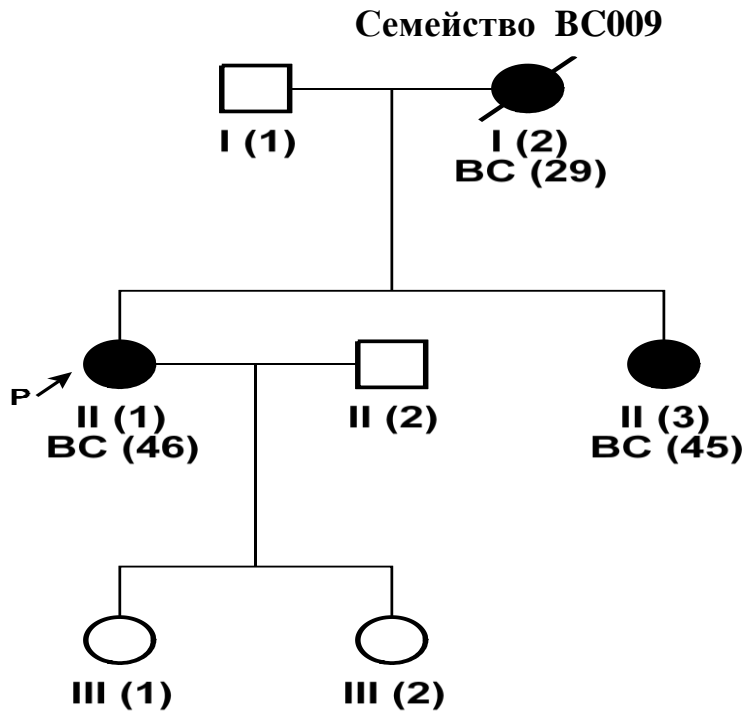
Exon	Forward	Reverse	Fragment length
2	CCAGGAGATGGGACTGAATTAG	CTGTGACGTA CTGGGTTTTTAGC	311bp
3	GATCTTTAACTGTTCTGGGTCACA	CCCAGCATGACACAATTAATGA	424bp
4	AAACACTTCCAAAGAATGCAAA	CCAGCCAATTC AACATCACA	399bp
5/6	TGTGTTGGCATT TTTAAACATCA	CAGGGCAAAGGTATAACGCT	453bp
7	CCTTAATGATCAGGGCATTTC	CAACCTCATCTGCTCTTTCTTG	215bp
8	GCCATATCTTACCACCTTGTGA	AGGTTTAGAGACTTTCTCAAAGGC	406bp
9	ATAACTGAAATCACCAAAAAGTG	CTGTAGTTCAACTAAACAGAGG	243bp
10a	CAGGAGAAGGGGTGACTGAC	AGACCATTACAGGCCAAAG	575bp
10b	ATTTTCCATGAAGCAAACGC	AGAATTCTGTGTGGTGGTGG	720bp
10c	TGGAGAAAATACCCCTATTGC	AGAATTCTGTGTGGTGGTGG	491bp
10d	TCACCTAAAGAGACTTTCAATGC	CAGAAGGAATCGTCATCTATAAAAC	442bp
11a	CACTGTGCCCAAACACTACC	CTTTTCTGGGATTGAAAGTCAG	462bp
11b	CCTGCAGGAAGGACAGTGTG	TTCTTGAAGGTGATGCTACTCTC	410bp
11c	CCCATGGAAAAGAATCAAGATG	AATTGACACTTGGGTTGCTTG	390bp
11d	CGAACCCATTTTCAAGAACTC	GGCTTGCTCAGTTTCTTTTGA	432bp
11e	CAATTTCAAATCACAGTTTTGG	CATCTGGTTTTTCAGGCACTTC	452bp
11f	AACACCTAGCCAAAAGGCAG	TGCAGAGCTTCAGTAGAAACATTC	396bp
11g	TTAAACGGAAGTTTGCTGGC	TTTCTACTGGCAGCAGTATATTTG	427bp
11h	AAATAATATTGAAATGACTACTGGCAC	TTTATTAATGACTCTTTGGCGAC	451bp
11i	TTTTTGGAAGTTGCGAAAGC	TCCAAAGATTCCTTTGCAATTT	455bp
11j	TGAAAGAAAGTGTCCCAGTTG	TGATGTTTTGAGATTTTCAGTTTG	419bp
11k	AGCTGCCCCAAAGTGTAAG	CATCAGAATGGTAGGAATAGCTG	506bp
11l	TCATTGAAAATTCAGCCTTAGC	AGTCACAAGTTCCTCAACGC	458bp
11m	ATGCAAATGCATACCCACAA	GAAACTTTCTCCAATCCAGACA	442bp
11n	CAAAAATTTGCCAAAACGAAA	TGAGCTGGTCTGAATGTTTCG	432bp
11o	TCATCTGCAAATACTTGTGGG	TGCTCTGGGTTTCTCTTATCAAC	440bp
11p	CAAGTTTCCATTTTAGAAAGTTCC	AAAAGTTTCAGTTTTACCAATTTCC	408bp
11q	TCAATTTCAACAAGACAAACAACA	TCAAACCATACTCCCCCAA	521bp
12	AGTGGTGT TTTAAAGTGGTCAAAA	GGATCCACCTGAGGTCAGAATA	388bp
13	TGCTGATTTCTGTTGTATGCTTG	TCCTCTCAACCTTAGTACTTCATCC	546bp
14	ACCATGTAGCAAATGAGGGTCT	GCAAAAATTCATCACACAAATGTC	557bp
15	GGCCAGGGGTTGTGCTTTTT	AGGATACTAGTTAATGAAATA	314bp
16	TTTGGTAAATTCAGTTTTGGTTTG	GAGAAGAAAGAGGGATGAGGG	350bp
17	CACCATGCTCAGCAATGAAG	CACTGACAACCTGGCTTGTGC	485bp
18a	TGATCCACTATTTGGGGATTG	GAGGGGAGGATCTAACTGGG	466bp
18b	ATGGAAGGGATGACACAGC	CTCAAGAAAGATCTCTGGACCTC	502bp
19	AAGTGAATATTTTAAAGGCAGTT	TATATGGTAAGTTTCAAGAAT	296bp
20	CAAGTAGCTGAGCCACCACA	ACAAAAATGCAAAAAGCCACA	623bp
21	TGCTTGGTTCTTTAGTTTTAGTTGC	GAGTCTAAAACAGCTTCTCACCTTG	261bp
22	AACCACACCCTTAAAGATGAGC	GGGCATTAGTAGTGGATTTTGC	455bp
23	GCAAAATCCACTACTAATGCC	TGGAGATTCCATAAACTAACAAGC	350bp
24	CCGGTACAAACCTTTCATTG	TGCCAACTGGTAGCTCCAAC	329bp
25	TGCATCTTAAAATTCATCTAACACATC	AAGCTATTTCTTGATACTGGACTG	383bp
26	TGACAATTGGTATCACATTTAGGG	CAGGAGCCACATAACAACCA	421bp
27a	TAGGGGAGGGAGACTGTGTG	ACTCCTTGGTGGCTGAAATG	383bp
27b	GAAAGAGATTGATGACCAAAAGAA	GAGATGTAGTACAACGTCGTTTCAG	401bp
27c	CTGAATTCTCCTCAGATGACTCC	AAACGCTGAGGTAAATTTGAAAC	447bp
27d	GGCCAGTACGGAAGAATGTG	CCTCATTCCATTTAATGACACAA	556bp

### Приложение 3

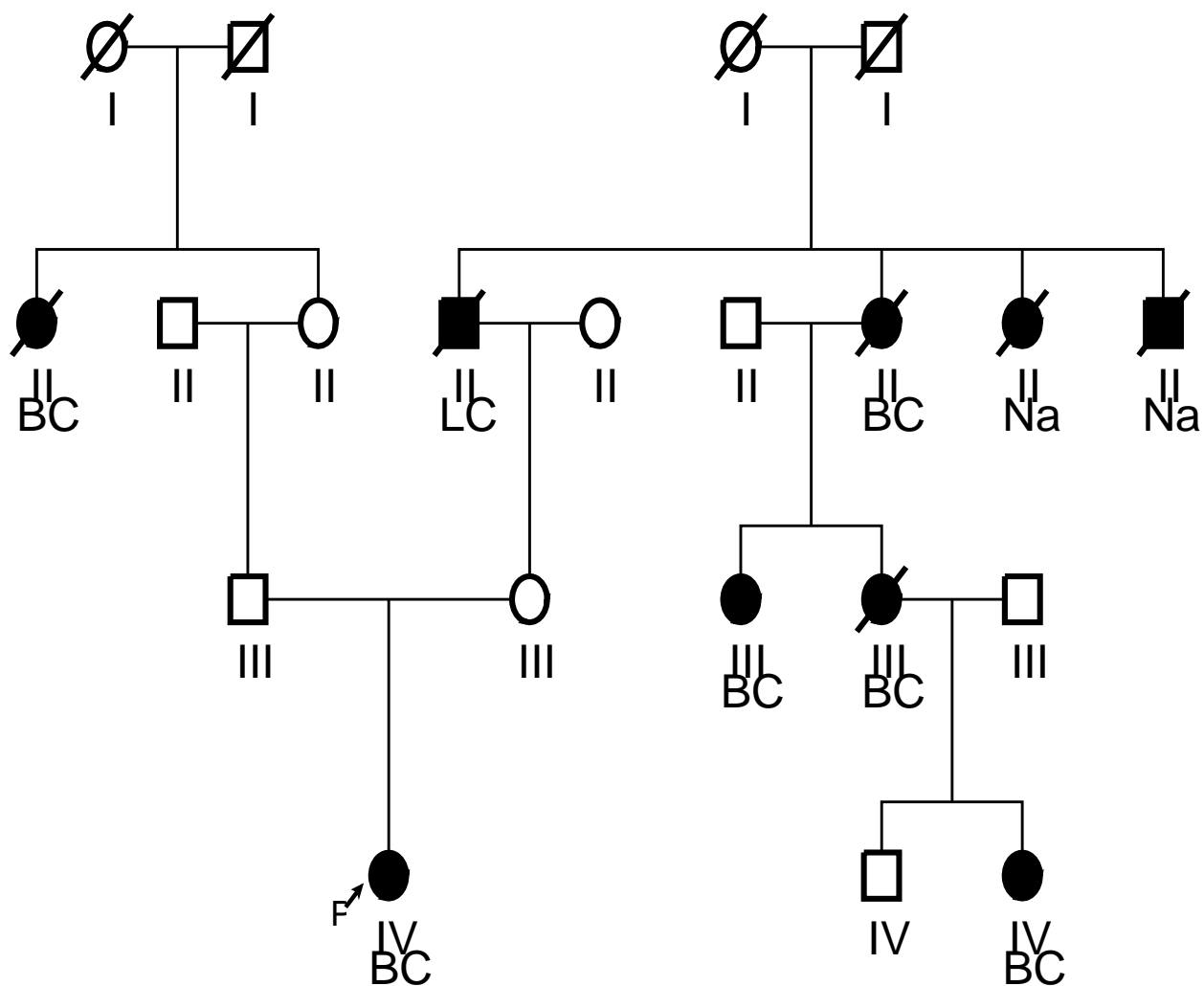
#### Списък на вариантите премахнати от сметките за специфичност и чувствителност поради ниско покритие на пробите в съответната група

Ген	Екзон	Позиция	dbSNP ID	HGVS	Група
<b>BRCA2</b>	2	32890726	rs11571574	c.67+62T>G	Тренировъчна
	5	32900149	rs3783265	c.426-89T>C	Тренировъчна /Валидационна
	8	32903685	rs2126042	c.681+56C>T	Тренировъчна
	10a	32906593	rs28897706	c.978C>A	Тренировъчна
	11e	32911888	rs1801406	c.3396A>G	Тренировъчна
	11n	32914438	rs80359550	c.5946delT	Тренировъчна
	11q	32915413	rs11571661	c.6841+80_6841+83delTTAA	Тренировъчна
20	32945385		c.8632+148delT	Тренировъчна	
<b>BRCA1</b>	16	41223094	rs1799966	c.4837A>C	Тренировъчна
	11l	41243550		c.3998A>G	Тренировъчна
	11i	41244429	rs4986852	c.3119G>A	Тренировъчна
	11g	41244936	rs799917	c.2612C>T	Тренировъчна
	11f	41245237	rs16940	c.2311T>C	Тренировъчна
	11e	41245466	rs1799949	c.2082C>T	Тренировъчна
	11e	41245471	rs4986850	c.2077G>A	Тренировъчна
	11b	41246481	rs1799950	c.1067A>G	Тренировъчна
	9	41249364	rs8176144	c.548-58delT	Тренировъчна
	8	41251873		c.465_466delA	Тренировъчна
	7	41256101	rs147856441	c.441+36_441+38delCTT	Тренировъчна
	2	41276247	rs3765640	c.-19-115T>C	Валидационна

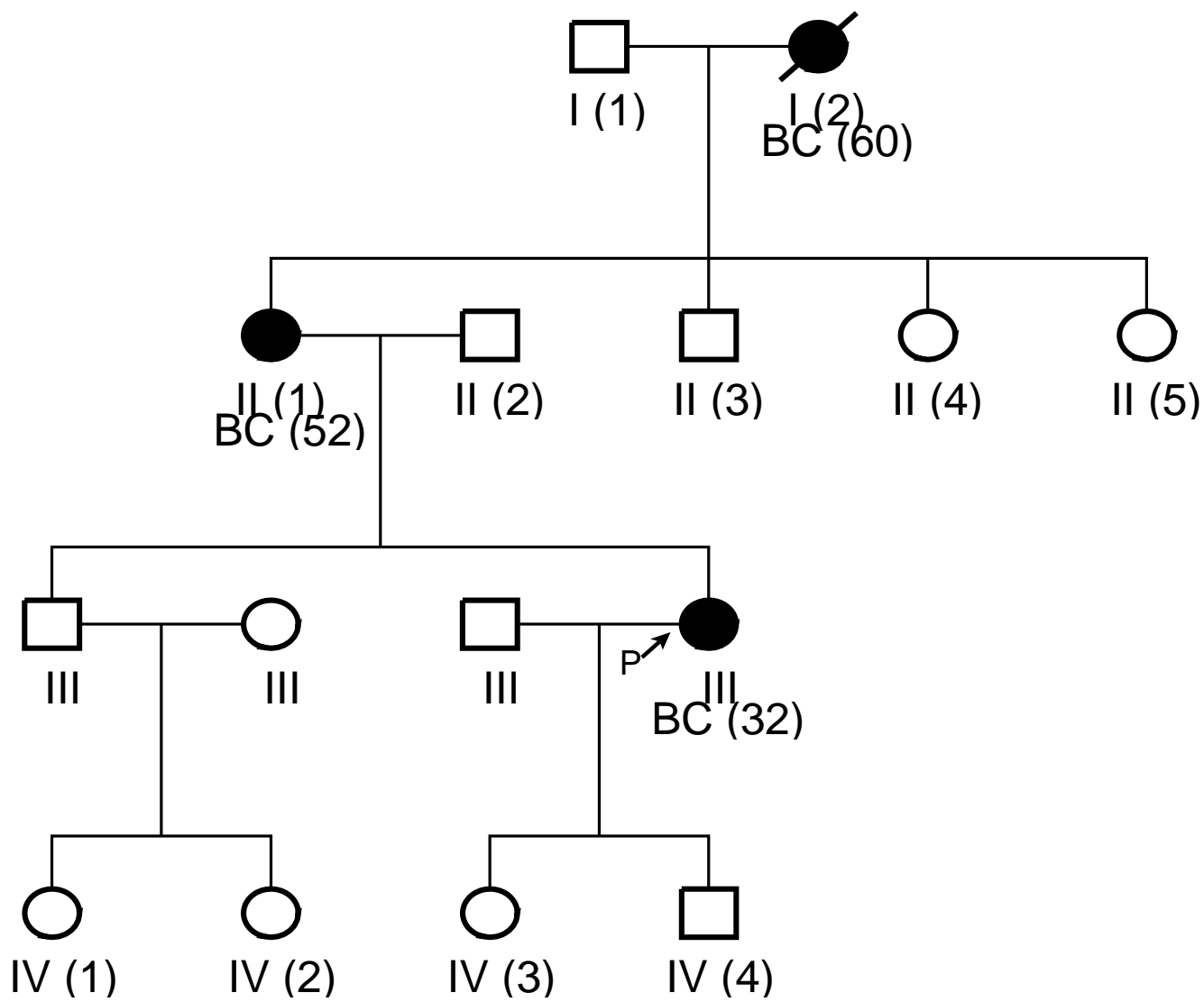
Родословни дървета на пациентките с открити патогенни и вероятно патогенни мутации при анализа на герминативни мутации в панел от 94 гена с MiSeq



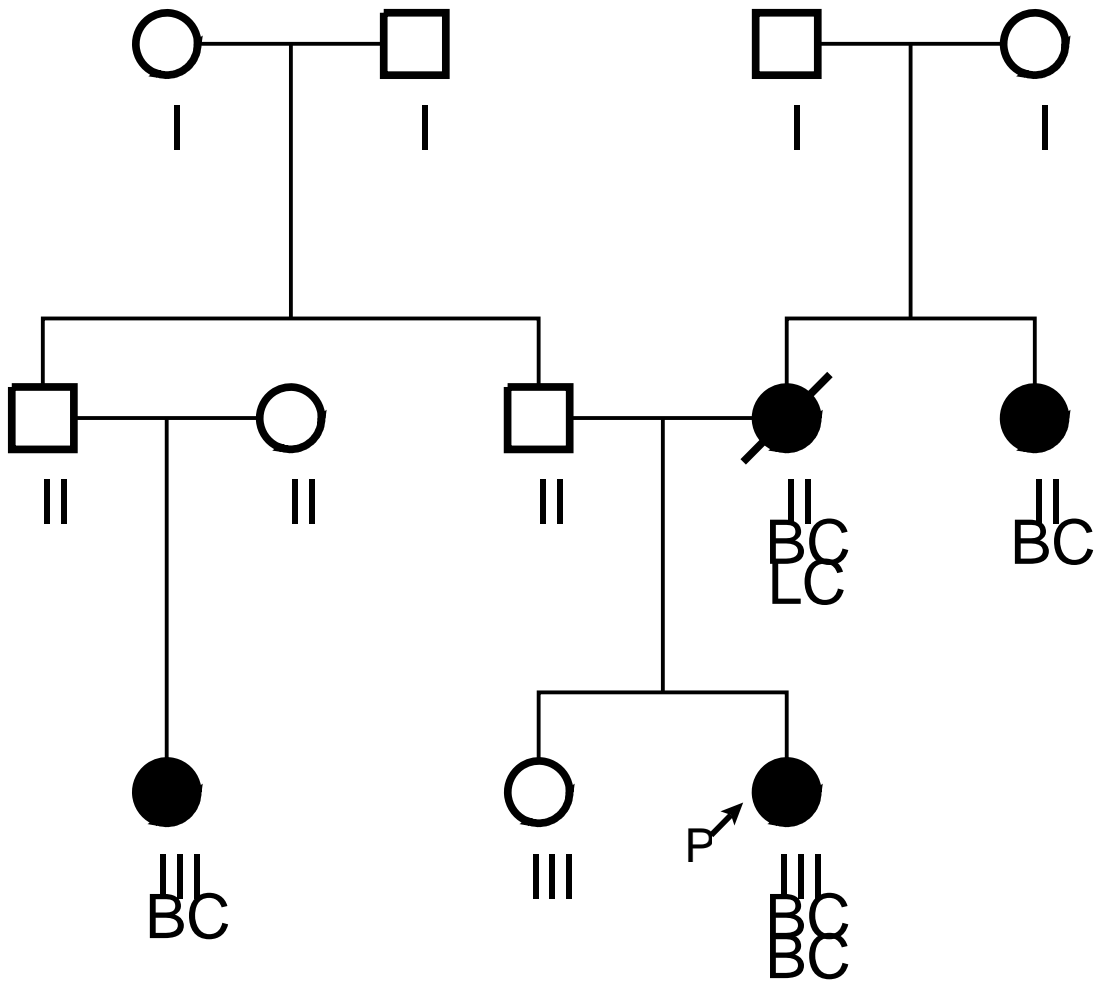
Семейство BC016



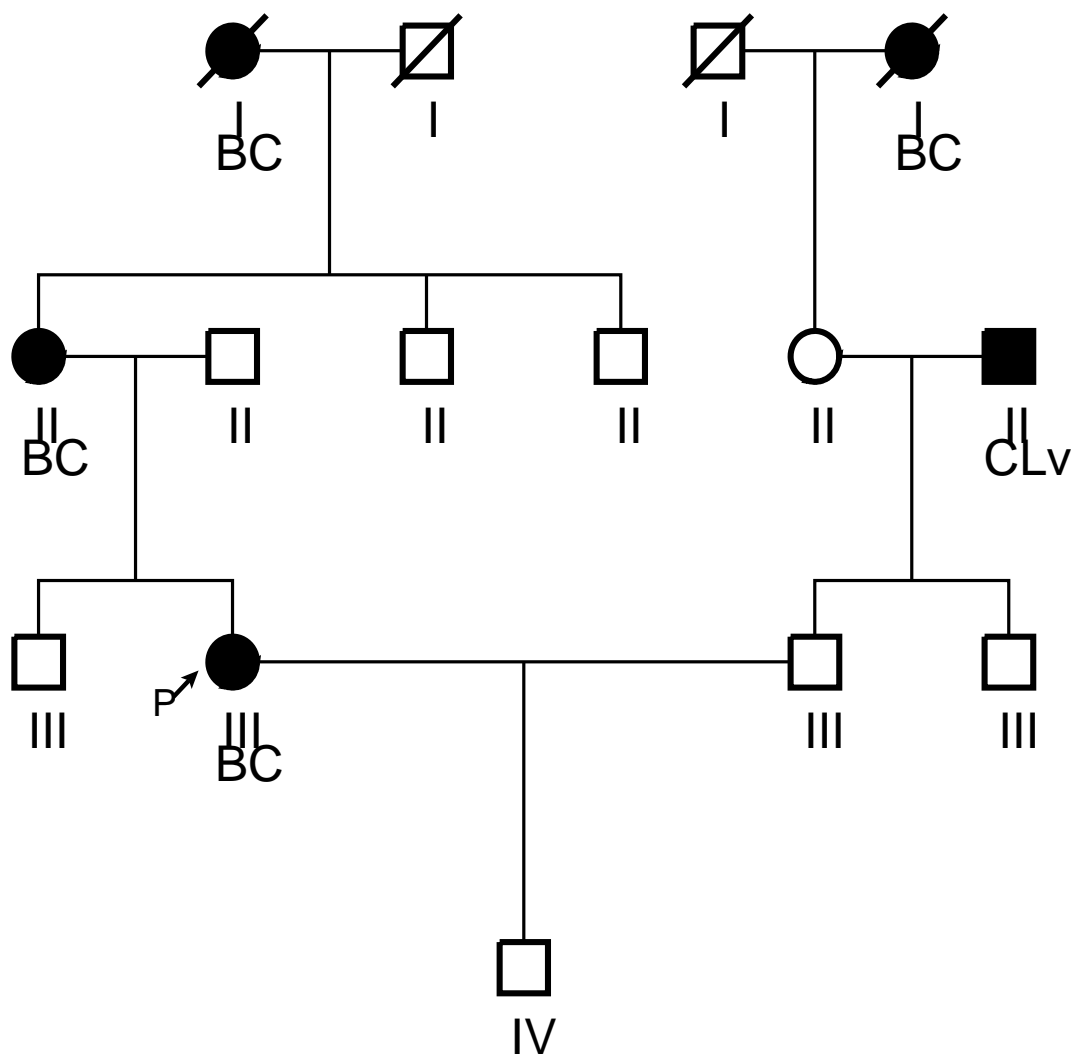
Семейство BC047



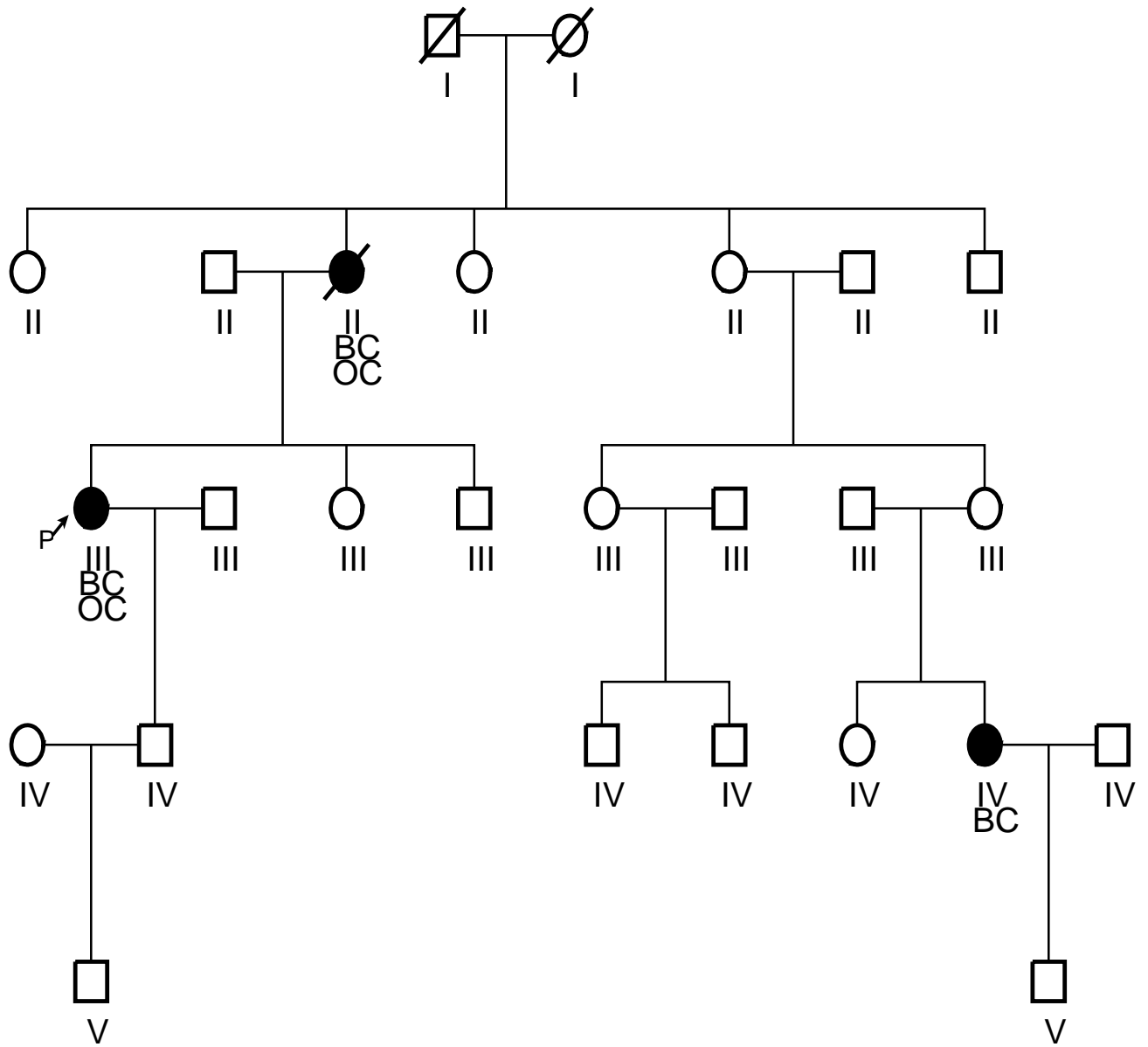
Семейство BC056



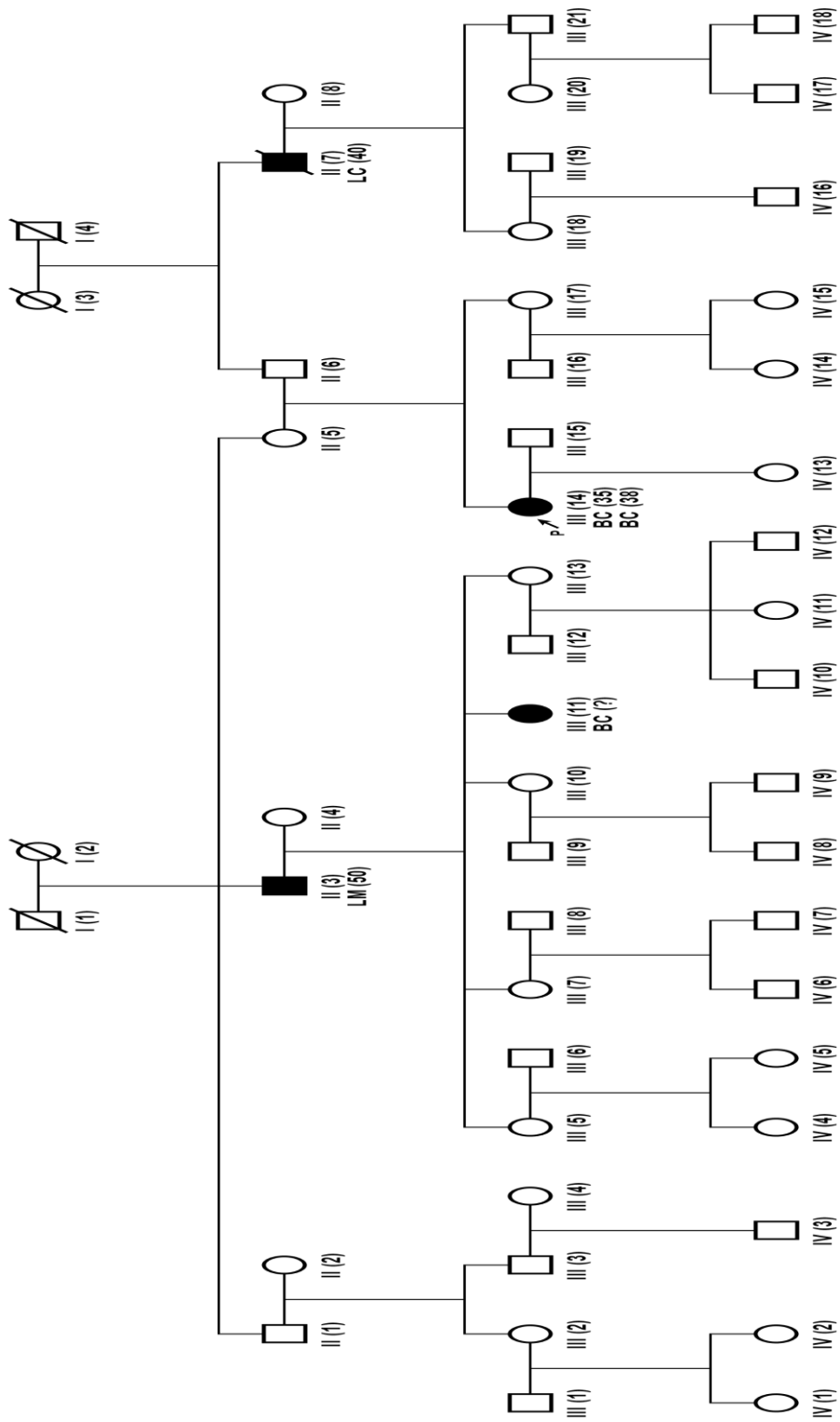
Семейство BC067



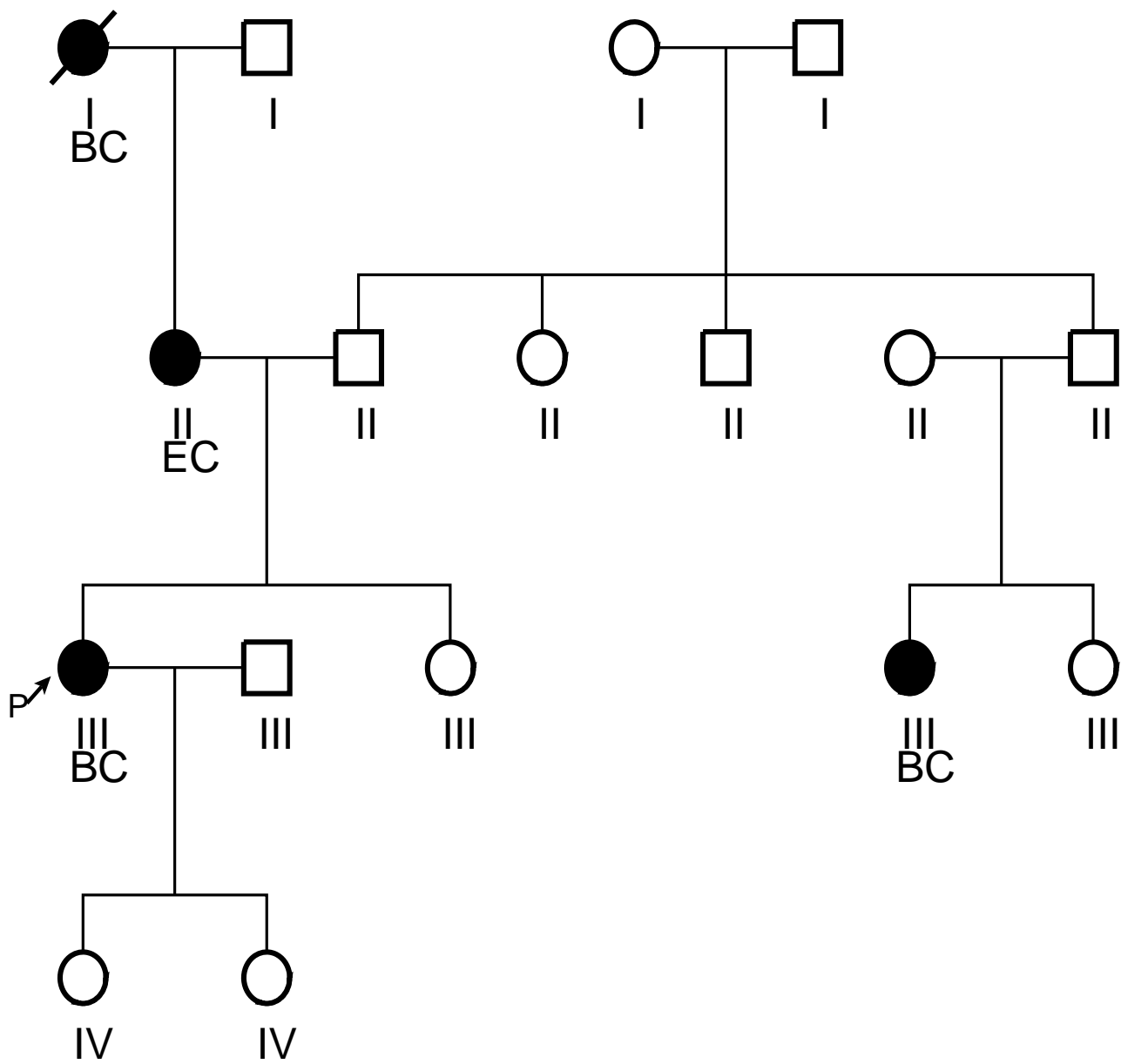
Семейство BC075



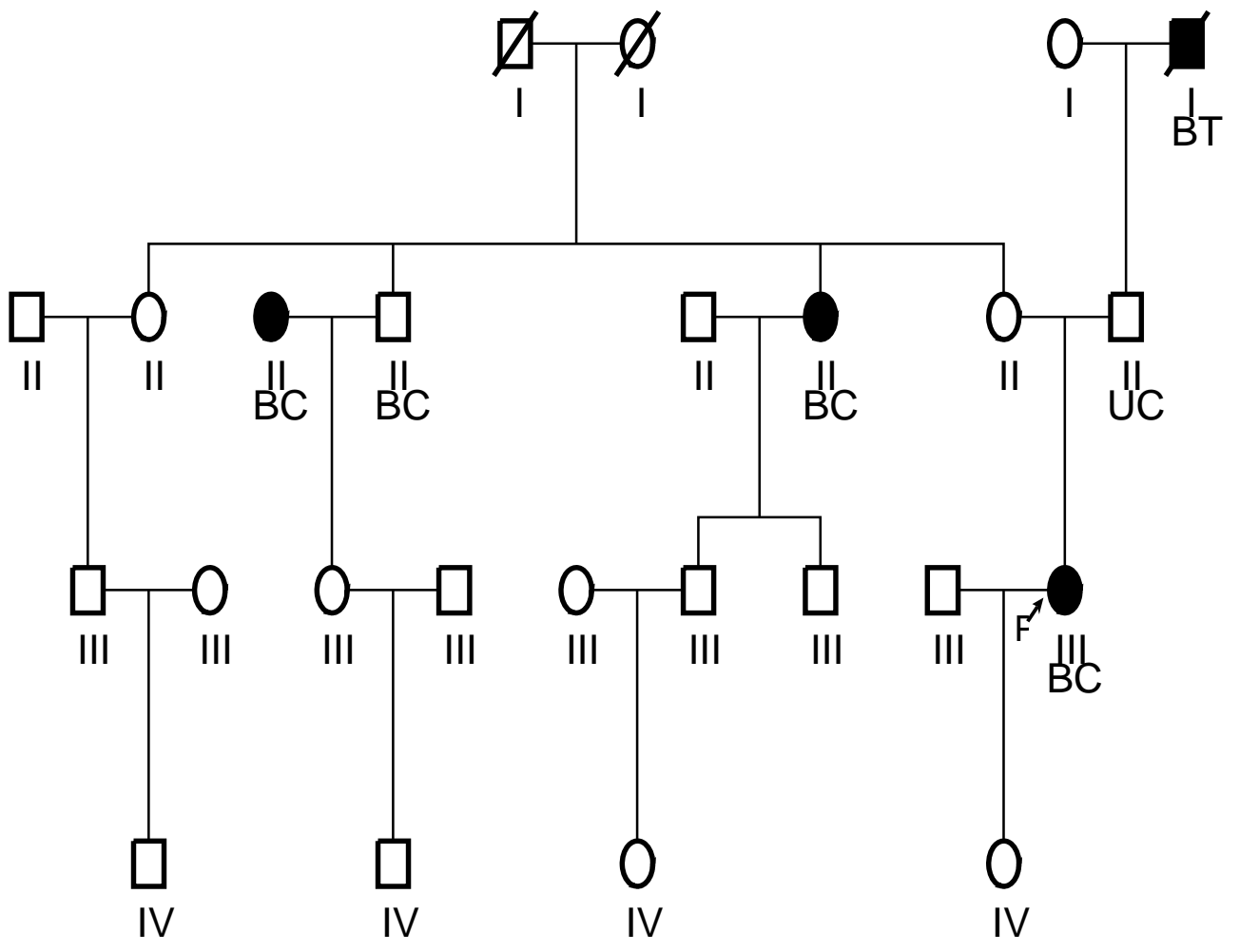
## Семейство 094



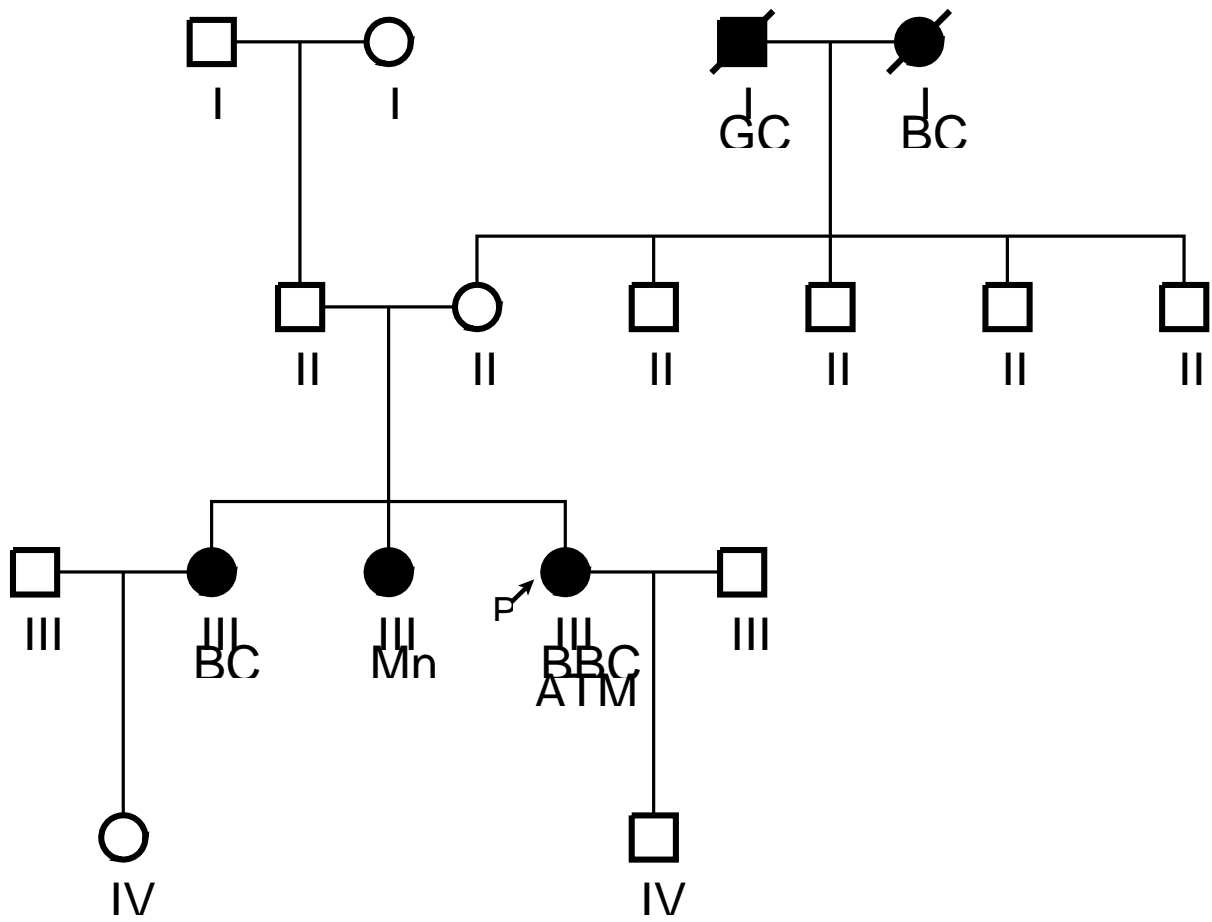
Семейство BC124



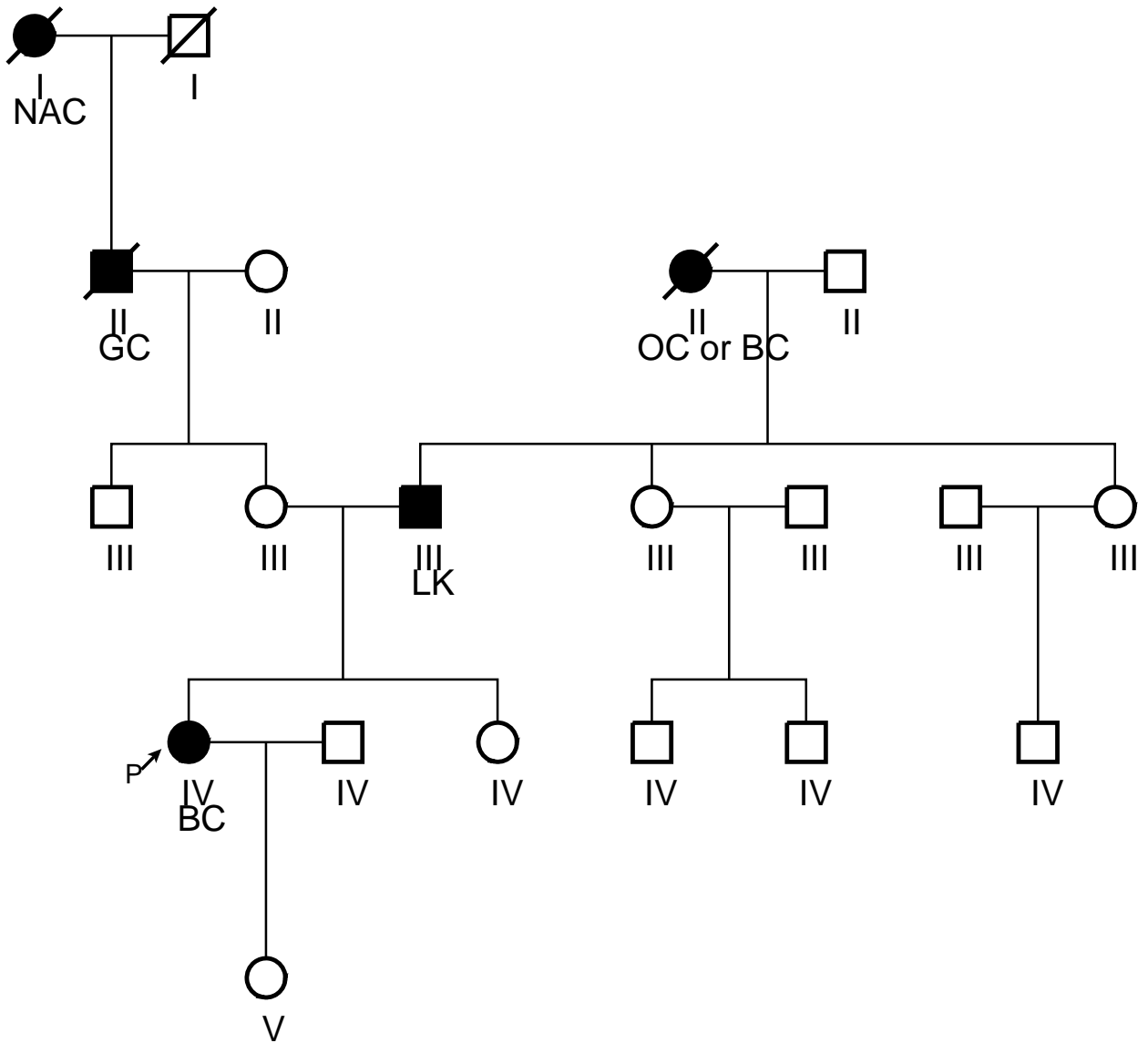
Семейство BC125



Семейство BC181



Семейство BC209



## Приложение 5

### Открити патогенни и вероятно патогенни мутации при анализа на пациентки с рак на гърдата за соматични мутации в 48 тумор-асоциирани гени с MiSeq

ген	тип мутация	HGVSc	HGVSp	честота на срещане	rs №	COSMIC №	COSMIC локализация
PIK3CA	missense	NM_006218.2:c.270T>G	NP_006209.2:p.Cys90Trp	7	няма	няма	няма
		NM_006218.2:c.3140A>G	NP_006209.2:p.His1047Arg	7	rs121913279	COSM775;COSM776;COSM94986;COSM94987	breast
		NM_006218.2:c.1624G>A	NP_006209.2:p.Glu542Lys	3	rs121913273	COSM125369;COSM17442;COSM760	breast
		NM_006218.2:c.1633G>A	NP_006209.2:p.Glu545Lys	3	rs104886003	COSM125370;COSM27133;COSM763	breast
		NM_006218.2:c.2102A>C	NP_006209.2:p.His701Pro	3	rs121913282	COSM778	breast
		NM_006218.2:c.331A>G	NP_006209.2:p.Lys111Glu	1	няма	COSM1041463;COSM13570	breast
		NM_006218.2:c.1634A>G	NP_006209.2:p.Glu545Gly	1	rs121913274	COSM12458;COSM297145;COSM764	breast
		NM_006218.2:c.3129G>A	NP_006209.2:p.Met1043Ile	1	rs121913283	COSM446027;COSM94984;COSM94985	breast
		NM_006218.2:c.3132T>A	NP_006209.2:p.Asn1044Lys	1	няма	COSM12592	breast
ERBB2	missense	NM_004448.2:c.2275A>C	NP_004439.2:p.Thr759Pro	11	няма	няма	няма
		няма	няма	2	rs121913470	COSM14060	breast
		NM_004448.2:c.2423A>C	NP_004439.2:p.Asp808Ala	1	няма	няма	няма
APC	missense	NM_000038.5:c.3854A>T	NP_000029.2:p.Asp1285Val	7	няма	няма	няма
		NM_000038.5:c.4266T>A	NP_000029.2:p.Asp1422Glu	5	няма	COSM1432384	other
ATM	frameshift	NM_000051.3:c.5228delC	NP_000042.3:p.Thr1743LysfsTer13	11	няма	няма	няма
	missense	NM_000051.3:c.2572T>C	NP_000042.3:p.Phe858Leu	1	rs1800056	COSM21826	other
TP53	missense	NM_000546.5:c.818G>T	NP_000537.3:p.Arg273Leu	2	rs28934576	COSM10660;COSM10779;COSM165077;COSM43896;COSM99729	breast
		NM_000546.5:c.419C>A	NP_000537.3:p.Thr140Asn	1	няма	няма	няма

		NM_000546.5:c .581T>G	NP_000537.3:p. Leu194Arg	1	няма	COSM117647;COS M117648;COSM117 649;COSM117650;;; COSM43827;COSM 44571	breast
		NM_000546.5:c .847C>T	NP_000537.3:p. Arg283Cys	1	rs149633775	COSM10911	breast
		NM_000546.5:c .839G>C	NP_000537.3:p. Arg280Thr	1	rs121912660, rs193920853	COSM10724;COSM 10728;COSM11287; COSM129830;COS M254987;	breast
		NM_000546.5:c .19G>C	NP_000537.3:p. Asp7His	1	няма	COSM45800	other
		NM_000546.5:c .395A>G	NP_000537.3:p. Lys132Arg	1	няма	COSM11582;COSM 179831;COSM1798 32;COSM179833;;C OSM43912	breast
	stop_gai ned	NM_000546.5:c .637C>T	NP_000537.3:p. Arg213Ter	1	няма	COSM10654;;COSM 99615;COSM99616; COSM99617;COSM 99618	breast
HNF1A	frameshif t	NM_000545.5:c .862delG	NP_000536.5:p. Pro291GlnfsTer 51	4	няма	COSM935974	other
		NM_000545.5:c .863_864insC	NP_000536.5:p. Pro289AlafsTer2 8	1	няма	COSM1476243	breast
		NM_000545.5:c .865delC	NP_000536.5:p. Pro291GlnfsTer 51	1	няма	COSM1359417	other
BRAF	missense	NM_004333.4:c .1399T>C	NP_004324.2:p. Ser467Pro	4	няма	COSM1448613	other
ERBB4	missense	NM_005235.2:c .2792A>T	NP_005226.1:p. Asp931Val	4	няма	няма	няма
	missense	NM_000215.3:c .2164G>A	NP_000206.2:p. Val722Ile	3	rs3213409	COSM34213	other
PTEN	frameshif t	NM_000314.4:c .950_953delTA CT	NP_000305.3:p. Thr319Ter	1	няма	COSM39615	breast
	frameshif t	NM_000314.4:c .934_935insAC	NP_000305.3:p. Lys313ThrfsTer5	1	няма	няма	няма
	missense	NM_000314.4:c .610C>G	NP_000305.3:p. Pro204Ala	1	няма	COSM5100;COSM5 279	other
RET	missense	NM_020975.4:c .2372A>T	NP_066124.1:p. Tyr791Phe	2	rs77724903	COSM1159820	other
	missense	NM_020975.4:c .1946C>T	NP_066124.1:p. Ser649Leu	1	rs148935214	няма	няма
KRAS	missense	NM_033360.2:c .51T>G	NP_203524.1:p. Ser17Arg	1	няма	няма	няма
	missense	NM_033360.2:c .34G>A	NP_203524.1:p. Gly12Ser	1	rs121913530	COSM1140136;COS M518	breast
SMAD4	missense	NM_005359.5:c .1082G>A	NP_005350.1:p. Arg361His	1	rs377767347	COSM14122	other

	missense	NM_005359.5:c.1528G>A	NP_005350.1:p.Gly510Arg	1	няма	COSM189742	other
AKT1	missense_splice	NM_001014431.1:c.49G>A	NP_001014431.1:p.Glu17Lys	1	rs121434592	COSM33765	breast
FGFR1	missense	NM_001174067.1:c.469T>C	NP_001167538.1:p.Ser157Pro	1	няма	няма	няма
PTPN11	missense	NM_002834.3:c.205G>A	NP_002825.3:p.Glu69Lys	1	rs397507511	COSM13013	other
RB1	missense	NM_000321.2:c.2163C>G	NP_000312.2:p.Phe721Leu	1	няма	няма	няма