МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ, СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА „МЕДИЦИНСКА ХИМИЯ И БИОХИМИЯ”
ЦЕНТЪР ПО МОЛЕКУЛНА МЕДИЦИНА

ВЛИЯНИЕ НА ГЕНЕТИЧНИ И ГЕНОМНИ ПРОМЕНИ ВЪРХУ РАЗВИТИЕТО НА РАК НА ГЪРДАТА В БЪЛГАРСКАТА ПОПУЛАЦИЯ

РУМЯНА ИВАНОВА ДОДОВА

АВТОРЕФЕРАТ

НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН ДОКТОР

ОБЛАСТ НА ВИСШЕ ОБРАЗОВАНИЕ: 4 „ПРИРОДНИ НАУКИ, МАТЕМАТИКА И ИНФОРМАТИКА”
ПРОФЕСИОНАЛНО НАПРАВЛЕНИЕ: 4.3 „БИОЛОГИЧЕСКИ НАУКИ”
НАУЧНА ПРОГРАМА „МОЛЕКУЛЯРНА БИОЛОГИЯ”

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ:
ЧЛ. КОР. ПРОФ. Д-Р ВАНЬО МИТЕВ, ДМ, ДБН
НАУЧНИ КОНСУЛТАНТИ:
ДОЦ. Д-Р РАДКА КЪНЕВА, ДБ
ГЛ. АСИСТ. Д-Р АТАНАСКА МИТКОВА, ДБ

СОФИЯ, 2015 Г.

Докторантът е зачислен за редовна докторантура към катедра „Медицинкска химия и биохимия". Медицински факултет, Медицински университет – София със заповед № Р – 1623/9.19.2009 г.

Изследователската работа по дисертацията е изработена в Център по Молекулна Медицина, Катедра „Медицинска химия и биохимия" към Медицински Университет – София. Изследванията частично са финансирани от СМН – Медицински Университет – София.

Дисертационният труд е написан на 210 машинописни страници и включва 60 фигури, 38 таблици и 8 приложения. Литературната справка съдържа 249 източника.

Дисертационният труд е обсъден, одобрен и насочен за публична защита на заседание на катедрен съвет на Катедра „Медицинска химия и биохимия", Медицински Факултет, Медицински Университет – София на 19.12.2014 г. Материалите по защитата са на разположение в Катедра „Медицинска химия и биохимия"/Център по Молекулна Медицина, Медицински Университет – София, СБАЛАГ „Майчин дом" ет. 14, ул. „Здраве" № 2, София 1431.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състой на 14.05.2015 г. от 13 часа във II аудитория на Предклиничен учебен център, Медицински Университет – София, ул. „Здраве" № 2, съгласно чл. 76 и 77 от Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Медицински Университет – София и въз основа на заповед № РК 36 – 156/4.20.2015 г. на ректора на Медицински Университет – София при научно жури в състав:

Председател: чл. кор. проф. д-р Ваньо Митев, дм, дбн; становище
Членове: проф. Татяна Влайкова, дб; рецензия
доц. д-р Иванка Димова, дм; рецензия
проф. Бойка Аначкова-Русева, дб; становище
доц. д-р Венета Георгиева-Абаджиева, дм; становище

Номерацията на фигурите и таблиците не отговаря на тази в дисертационния труд.

Съдържание:

I. Въведение 7
II. Цел и задачи 8
2.1. Цел 8
2.2. Задачи 8
2.2.1. Създаване на биобанка от пациенти с фамилен рак на гърдата 8
2.2.2. Мутационен скрининг чрез директно секвениране на *BRCA1* и *BRCA2* гените при пациенти с фамилен рак на гърдата и яйчниците 8
2.2.3. Използване на откритите мутации в *BRCA1* и *BRCA2* гените като положителни контроли при въвеждане на скрининг със секениране от ново поколение 9
2.2.4. Анализ за големи делеции и дупликации в *BRCA1* и *BRCA2* гените с MLPA (мултиплексен анализ на лигирани проби) 9
2.2.5. Секвенционен анализ на най-често докладваните по литературни данни мутации в гени с междинна пенетрантност *PALB2* и *BRIP1*, свързани с развитие на рак на гърдата при BRCA негативни пациентки..... 9
2.2.6. Асоциативно проучване от тип случаи-контроли на полиморфни варианти в гени с ниска пенетрантност (*MAP3K1, FGFR2, RNF146, TOX3,C6orf97, SLC4A7* и *CYP1B1*) 9
2.2.7. Анализ и статистическа обработка на получените резултати 10
III. Материали и методи 11
3.1. Клиничен материал 11
3.1.1. Подбор на пациентите с фамилен рак на гърдата 11
3.1.2. Подбор на клинично здрави контроли 11
3.2. Преданалитична обработка на биологичния материал 12
3.2.1. Изолиране на високомолекулна ДНК от кръв 12
3.2.2. Оценка на качеството и количеството на изолираната ДНК 12
3.3. Генетични изследвания 12
3.3.1. Намножаване на фрагменти ДНК чрез полимеразна верижна реакция (PCR – **P**olymerase **C**hain **R**eaction) 12
3.3.2. Качествен контрол на PCR реакцията 13
3.3.3. Хоризонтална агарозна електрофореза 13
3.3.4. Директно секвениране 14
3.3.5. Секвениране от второ поколение посредством Ion Torrent PGM(**P**ersonal **G**enome **M**achine) 15
3.3.6.Мултиплексен амплификационен анализ на лигирани проби (MLPA) 16
3.3.7. TaqMan® Real Time PCR 16
3. 4. Биоинформатичен анализ на получените резултати 17
3.5. Статистически методи 17
IV. Резултати 18
4.1. Подбор на пациентите с рак на гърдата и създаване на ДНК банка

и клинична база данни 18
4.2. Оптимизация на условията за амплификация на *BRCA1, BRCA2* , *PALB2* и *BRIP1* гените 18
4.2.1. Електрофоретичен анализ на PCR продуктите 19
4.2.2. Оптимизация на условията за директното секвениране 19
4.2.3. Оптимизация на условията на MLPA анализа 20
4.3. Молекулярно-генетичен анализ за наличието на мутации в *BRCA1* и *BRCA2* гените посредством директно секвениране 21
4.3.1. Докладвани в литературните и електронните източници мутации, които са с доказан патогенен ефект за развитието на рак на гърдата 23
4.3.1.1. Патогенни мутации в *BRCA1* гена 23
4.3.1.2. Патогенни мутации в *BRCA1* гена 25
4.3.2. Нови варианти, които не са докладвани в литературните и електронните източници, но са от тип, който се очаква да доведе до заболяване 26
4.3.3. Варианти с неясен клиничен ефект (VUS – variants with uncertain significance) 27
4.3.4. Варианти, които са с неутрален ефект за развитието на заболяването..... 29
4.4. Използване на откритите мутации в *BRCA1* и *BRCA2* гените като положителни контроли при въвеждане на скрининг със секвениране от ново поколение..... 30
4.5. Изследване за наличието на големи делеции, дупликации и пренареждания в *BRCA1* и *BRCA2* гените посредством MLPA анализ (мултиплексен анализ на лигирани проби) 31
4.6. Генетичният анализ за наличието на мутациите в гени с междинна пенетрантност 32
4.7. Анализ на полиморфни варианти с ниска пенетрантност, асоциирани с предразположение за развитие на рак на гърдата 33
4.7.1. Генетичен анализ на полиморфни варианти rs2981579 и rs2981582 във *FGFR2* гена 33
4.7.2. Генетичен анализ на полиморфен вариант rs 889312 в *MAP3K1* гена 35
4.7.3. Генетичен анализ на полиморфен вариант rs1056836 в *CYP1B1* гена 36
4.7.4. Генетичен анализ на полиморфен вариант rs 3757318 в хромозомен локус C6orf9 37
4.7.5. Генетичен анализ на полиморфен вариант rs2180341 в RNF146 38
4.7.6. Генетичен анализ на полиморфен вариант rs3803662 в *TOX 3* гена 39
4.7.7. Генетичен анализ на полиморфен вариант в SLC4A7 гена 40

V. Обсъждане на получените резултати 41
5.1. Мутационен скрининг на BRCA1 и BRCA2 гените при пациенти с фамилен рак на гърдата и яйчниците 43
5.1.1. Мутации с доказан патогенен ефект за развитието на рак на гърдата 44
5.1.2. Варианти с неясен клиничен ефект (VUS – variants with uncertain clinical effect) 57
5.1.3. Варианти с неутрален за развитието на рак на гърдата 60
5.2. Секвенционен анализ на най-честите по литературни данни мутации, в гени с междинна пенетрантност при рака на гърдата 62
5.3. Асоциативно проучване на полиморфни варианти в гени с ниска пенетрантност 63
5.3.1. Генетичен анализ на полиморфни варианти rs2981579 и rs2981582 в *FGFR2* гена 64
5.3.2. Генетичен анализ на полиморфен вариант rs 889312 в *MAP3K1* гена 65
5.3.3. Генетичен анализ на полиморфен вариант rs1056836 в *CYP1B1* гена 65
5.3.4. Генетичен анализ на полиморфен вариант rs3757318 в хромозомен локус C6orf9 66
5.3.5. Генетичен анализ на полиморфен вариант rs2180341 в RNF146 67
5.3.6. Генетичен анализ на полиморфен вариант rs3803662 в *TOX 3* гена 67
5.3.7. Генетичен анализ на полиморфен вариант в SLC4A7 гена 68
5.4. Разработване на системен ход за скрининг на мутации в BRCA1 и BRCA2 гените 70
VI. Изводи 72
VII. Приноси 73
VIII. Публикации и участия в конгреси и проекти 74
8.1. Публикации свързани с дисертационния труд 74
8.2. Участия в конгреси 75
8.3. Участия в проекти 76
IX. Приложения 77
Приложение 1 79
X. Използвани литературни източници 81

Използвани съкращения:

ЦММ - Центъра по молекулна медицина
МУ – Медицински университет
BCLC (Breast Cancer Linkage Consortium) – консорциум за рак на гърдата
CI (confidence interval) – доверителен интервал
ddNTP (Dideoxynucleotide triphosphates) - *дидезоксинуклеотиди*
dNTP – дезокси нуклеотид трифосфат
dGTP - дезокси гуанин трифосфат
dATP - дезокси аденин трифосфат
dTTP - дезокси тимин трифосфат
dCTP - дезокси цитозин трифосфат
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) - етилендиаминотетраоцетна киселина
FS - Frameshift; - изместване рамката на четене
GWAS (genome-wide association study) - целогеномно асоциативно проучване
HBOC (Hereditary Breast Ovarian Cancer) - наследствен рак на гърдата и яйчниците
NCCN (National Comprehensive Cancer Network) – национална ракова мрежа
РНК - Рибонуклеинова киселина
ТЕ буфер - разтвор на 1М Трис-HCl, pH 8, с 0,1М Na_2EDTA; стандартно използван при изолиране, обработка и съхранение на ДНК и РНК
µg/ml – микрограм на мililитър
$KHCO_3$ – калиев бикарбонат
nmol - наномол
pmol (pM) – пикомол
U/µl - единици на микрилитър
ng/ µl - нанограма на микролитър
µl - микрилитър
SNP (Single nucleodide polymorphism) - единични нуклеотидни замени
LGRs (Large Genomic Rearrangements) – големи геномни пренареждания
$MgCl_2$ – магнезиев хлорид
M - Missense
NLS (*nuclear localization signal*) – ядрено локализиращ сигнал
NCCN (National Comprehensive Cancer Network) – нациоанална ракова мрежа
NGS (Next generation sequencing) - секвениране от ново поколение
NaCl – натриев хлорид
NH_4Cl – амониев хлорид
N – Nonsense
qPCR QPCR (quantitative PCR) – количествен РС
PCR (PCR – **P**olymerase **C**hain **R**eaction) - полимеразна верижна реакция
MLPA (Multiplex Ligation Probe Amplification) – мултиплексен анализ на лигирани проби
SDC клъстер - SQ секвенции - клъстери от серинови и треонинови последователности, известни като SQ клъстер (SDC)
неясен клиничен ефект (VUS – variants with uncertain significance)

I. Въведение

Ракът на гърдата е първото по честота злокачествено заболяване сред жените в световен мащаб. Честотата на заболяването варира при различните популации, като разликата между отделните региони е около четири пъти, съответно от 27 на 100 000 души в Средна Африка и Източна Азия до 96 на 100 000 души в Западна Европа.

По данни на „Националния раков регистър" през 2011 година в България са регистрирани 3885 нови случая и 1284 души са починали от заболяването. Заболеваемостта от рак на гърдата се повишава с 1.8% годишно, като по прогнозни данни за 2014 г. се очаква новодиагностицираните случаи да бъдат 4011. Въпреки този факт българската здравна система не разполага с генетична скринингова програма за ранна диагностика и превенция на това социално значимо заболяване.

Ракът на гърдата се среща основно при жените, но в редки случаи мъжете също могат да бъдат засегнати. Като цяло той е много хетерогенен в морфологично и генетично отношение, но през последното десетилетие развитието на технологиите за цялостно геномно и транскриптомно изследване позволиха да се разработи класификация, базирана на генно-експресионният профил. На базата на това бяха обособени пет основни подтипа рак на гърдата: луминална А група, луминална В група, HER2(+) група, Claudin-low и базална група.

За развитието на рака на гърдата важна роля имат генетичното предразположение, начинът на живот и влиянието на околната среда. По литературни данни повече от 20% от случаите на фамилен рак на гърдата и по-малко от 5% от рака на гърдата като цяло са дължат на герминативни мутации в *BRCA1* или *BRCA2* гените. Наличието на мутация в един от двата гена се свързва с 60 до 85% риск за развитието на заболяването до навършване на 70 годишна възраст. Останалата част от генетичното предразположение, определящо риска от развитие на рак на гърдата все още остава неизяснена. Поради тази причина усилията на изследователските екипи са насочени в търсене на мутации в други гени, като тези със средна пенетрантност, кодиращи функционални партньори на BRCA1 и BRCA2 в ДНК репарацията. 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.

Настоящата разработка е първото системно изследване на спектъра и честотата на мутациите в *BRCA1* и *BRCA2* гените при български пациенти с рак на гърдата, отговарящи на международните критерии за вероятно носителство. Въз основа на получените резултати бе разработен системен ход за мутационен скрининг на тези гени, който ще подпомогне подобряването на диагностиката, профилактиката и правилния избор на терапия при лечението на фамилния и тройно негативен рак на гърдата в България.

II. Цел и задачи

2.1. Цел

Да се определят молекулярно-генетичните характеристики на фамилния рак на гърдата при български пациенти.

2.2. Задачи

2.2.1. Създаване на биобанка от пациенти с фамилен рак на гърдата

- Подбор на 200 пациенти с фамилен рак на гърдата, отговарящи на установените международните критерии за вероятно носителство на мутации;

- Подбор на контролна група от 240 здрави индивида, без фамилна анамнеза за онкологични заболявания, които да съответстват на болните по пол, възраст и етническа принадлежност;

- Създаване на ДНК биобанка от пациенти и контроли към Центъра по молекулна медицина, МУ – София;

- Създаване на плазмена биобанка от пациенти и контроли към Центъра по молекулна медицина, МУ – София;

- Създаване на клинична информационна база данни за пациенти с рак на гърдата към Центъра по молекулна медицина, МУ – София.

2.2.2. Мутационен скрининг чрез директно секвениране на *BRCA1* и *BRCA2* гените при пациенти с фамилен рак на гърдата и яйчниците

- Оптимизиране на условията на амплификация на кодиращата последователност, разделена 33 участъка на *BRCA1* гена;

- Оптимизиране на условията на амплификация на кодиращата последователност, разделена 48 участъка на *BRCA2* гена;

- Мутационен скрининг за мутации и полиморфни варианти в *BRCA1* и *BRCA2* гените чрез амплификация и директно секвениране на получените PCR продукти при 200 пациентки с фамилен рак на гърдата.

2.2.3. Използване на откритите мутации в *BRCA1* и *BRCA2* гените като положителни контроли при въвеждане на скрининг със секениране от ново поколение

- Подбор от наличната ДНК биобанка в Център по Молекулна медицина на общо 10 пациенти с фамилен рак на гърдата с известен профил на *BRCA1* и *BRCA2* гените;

- Секвениране на пациентите с известен генетичен профил на *BRCA1* и *BRCA2* гените на IonTorrent PGM платформата;

- Биоинформатичен анализ на получените резултати.

2.2.4. Анализ за големи делеции и дупликации в *BRCA1* и *BRCA2* гените с MLPA (мултиплексен анализ на лигирани проби)

- Оптимизиране на времето на хибридизация и на капилярната електрофореза на MLPA анализа;

- Генетичен анализ за наличието на мутации в *BRCA1* и *BRCA2* гените чрез фрагментен анализ.

2.2.5. Секвенционен анализ на най-често докладваните по литературни данни мутации в гени с междинна пенетрантност *PALB2* и *BRIP1*, свързани с развитие на рак на гърдата при BRCA негативни пациентки.

- Оптимизиране на условията на амплификация на кодиращата последователност на екзони 4 и 20 *PALB2* и *BRIP1* гените;

- Генетичен анализ за наличието на мутациите c.509_510delGA и c.2992_2995delAAGA в *PALB2* и *BRIP1* гените чрез амплификация и директно секвениране на получените PCR продукти при 200 BRCA негативни пациенти с фамилен рак на гърдата.

2.2.6. Асоциативно проучване от тип случаи-контроли на полиморфни варианти в гени с ниска пенетрантност (*MAP3K1, FGFR2, RNF146, TOX3,C6orf97, SLC4A7* и *CYP1B1*)

- Провеждане на асоциативно проучване на полиморфни варианти в *FGFR2, TNRC9, MAP3K1,* и *CYP1B1* гените и хромозомни локуси 3p24 и 8q24, на 150 пациентки с рак на гърдата и на 240 здрави контроли посредством TaqMan технологията

2.2.7. Анализ и статистическа обработка на получените резултати

- Анализ на получените от директното секвениране резултати със софтуерни програми Sequencing analisis, SeqScape v2.5 (Applied Biosystems), FinchTV v1.4.0 (Geospiza) и CodonCodeAligner v4.1.1 (CodonCode Corporation).

- Анализ на получените от секвенирането от ново поколение резултати със софтуерни програми Torrent Suite (TS) (Life Technologies) и NextGENe (SoftGenetics);

- Анализ на получените от MLPA резултати със софтуерни програми GeneMapper (Applied Biosystems) и Coffalyer.Net (MRC-Holland)

- Оценка на клиничния ефект на вариантите с неясно клинично значение със SIFT, PolyPhen2 и PROVEAN програми за изчисление на предиспозицията;

- Статистическа обработка на получените резултати с VassarStat и Plink v1.07.

III. Материали и методи

3.1. Клиничен материал

3.1.1. Подбор на пациентите с фамилен рак на гърдата

В настоящето изследване бяха включени 200 пациентки е фамилен рак на гърдата и 240 здрави контроли, 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 (www.ncbi.nlm.nih.gov, L28; www.nccn.org, L29) ***(приложение 1)***.

Пациентите бяха насочвани в ЦММ 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;
- Клиника по хирургия УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ" с насочващ лекар д-р Т. Седлоев;
- Клиника по хирургия УМБАЛ „Александровска" с насочващ лекар д-р М. Василева.

3.1.2. Подбор на клинично здрави контроли

3.2. Преданалитична обработка на биологичния материал

Необходимият биологичен материал, за целите на генетичния анализ беше високомолекулна ДНК, изолирана от периферна венозна кръв.

3.2.1. Изолиране на високомолекулна ДНК от кръв

Целта на изолирането е да се получи високомолекулна ДНК с минимални примеси на белтъци, РНК и гликопротеини. 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. В настоящата разработка ДНК беше изолирана посредством солевия метод на Miller и чрез CHEMAGEN® Magnetic Separation Station (автоматична магнитна сепарация).

3.2.2. Оценка на качеството и количеството на изолираната ДНК

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

3.3. Генетични изследвания

3.3.1. 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 (Saik RK et al, 1987). Представлява in vitro ензимно намножаване (амплифициране) на 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 интересуващият 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:

$$t°C_{annealing} = (A+T)x2 + (G+C)x4$$

Таблица 1. PCR реактиви, използвани в хода на изследването

PCR реактиви при използване на Taq полимераза (Invitrogen)		PCR реактиви при използване на Taq полимераза (Prime)	
10 x PCR буфер	1 μl	10 x PCR буфер	1 μl
5 mM dNTP	0,8 μl	10 mM dNTP	0,4 μl
50 mM $MgCl_2$	0,3 μl	-	
Праймер F (20 pmol)	0,2 μl	Праймер F (20 pmol)	0,2 μl
Праймер R (20 pmol)	0,2 μl	Праймер R (20 pmol)	0,2 μl
Taq ДНК полимераза (500U/μl)	0,05 μl	Taq ДНК полимераза (500U/μl)	0,04 μl
dH_2O	5,45 μl	dH_2O	6,16 μl
ДНК (25 ng/ μl)	2 μl	ДНК (25 ng/ μl)	2 μl
Общ реакционен обем	10 μl	Общ реакционен обем	10 μl

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.

Използваните при PCR реакцията реактиви и условия са представени в ***таблици 1 и 2.***

Таблица 2. Условия на PCR реакцията

Етап	Температура	Време	Брой цикли
Начална денатурация	95 ºC	5 min	1
Денатурация	94 ºC	45 sec.	35
Хибридизация	52 ºC – 63 ºC*	30 sec.	
Елонгация	72 ºC	50 sec	
Елонгация	72 ºC	10 min	1
Съхранение в апарата	10 ºC	∞	-

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

3.3.2. 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 интересуващия 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_2O. Липсата на продукт в отрицателната контрола доказва, че реакционната смес не е замърсена с чужда ДНК матрица.

3.3.3. Хоризонтална агарозна електрофореза

Качеството на PCR продуктите се оценява на 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 pH, фрагментите са заредени отрицателно и се предвижват към анода. За анализ и разделяне на PCR продукти, най-често се използва трис боратен буфер (TBE). Фрагментите се визуализират с помощта на UV трансилюминатор при 315 nm.

3.3.4. Директно секвениране

Секвенирането на PCR продуктите по Сангер е референтен метод за директен ДНК анализ. Методът се основава на свойството на дидезоксирибонуклеотидите (ddNTP) да прекъсват синтеза на ДНК на мястото на включването им. По този начин те маркира позицията на определена нуклеотидна база. Този метод има следните етапи:

Намножаване (амплификация) на ДНК фрагмента чрез PCR. PCR реакцията се извършва при оптималните условия за съответните праймери. Получените PCR продукти се оценяват на 2% агарозен гел.

Пречистване на продукта с ExoSAP. 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. Пречистването с ExoSAP се извършва чрез смесването му в съотношение 1:1 с дейонизирана вода (0,4µl ExoSap + 0,4 µl dH_2O) и директното му добавяне към PCR продукта. Използваните при пречистването реактиви и условия са представени на ***таблица 3***.

Таблица 3. 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_2O	0,4 µl	Пречистване на PCR продукта	37 ºC	30 min
PCR продукт	1 µl	Инактивиране на ензима	80 ºC	15 min
Общ обем	1,8 µl	Съхранение в апарата	4 ºC	∞

Секвенционна реакция. Китът за провеждане на секвенционната реакция Big Dye® 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.

Преутаяване на продукта. Прави се с цел отстраняване на несвързаните нуклеотиди. Пречистването на продукта включва два етапа. Към пробите се добавя натриев ацетат, EDTA 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 Biosistems).

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

NGS технологиите значително промениха мащаба, ефективността и времето на секвенирато и доведоха до формирането на нова дефиниция за обхвата на това какво може да се изследва от практична и клинична гледна точка.

Най-общо технологиите на секвениране от ново поколение споделят възможността да секвенират масово и паралелно милиони ДНК матрици. Едно от предимствата на технологията е възможността за мултиплексиране на различен брой ДНК проби в рамките на един-единствен експеримент (Grada A et al, 2013; Karl V et al, 2009). Personal Genome Machine (PGM) е първата по рода си платформа, която използва метод за определяне на ДНК последователностите на полупроводников принцип, без използването на оптичната технология за детекция на нуклеотидите (Rothberg JM et al, 2011), при което се измерват директно освободените протони (H^+) от реакцията. Когато нуклеотид се включи в ДНК веригата, водородните йони (протони) се освобождават. Зарядът от тези протони променя pH на разтвора, разпознава се от сензора за йони и след това директно се превръща от химически сигнал в цифров формат (Rothberg JM et al, 2011). Липсата на оптика спестява бавното сканиране на изображението така, че секвенирането е сравнително бързо, а процентът 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 регион при някои заболявания в това число и ракови (www.allseq.com, L37; www.ioncommunity.iontorrent.com, L38). Методиката има следните етапи:

А. Конструиране на ДНК библиотека имаща следният системен ход:

Оценка на качеството на изходния ДНК материал.

Намножаване на фрагментите (ампликоните) с кодиращите последователности на BRCA1 и BRCA2 гените чрез PCR.

Пречистване и нормализация на PCR ампликоните.

Измерване на концентрацията на пуловете посредством Qubit флуориметър.

Фрагментиране и пречистване на пуловете с дългите ампликони.

Определяне на размера на фрагментите чрез Bioanalyzer High Sensitivity Kit. (www.arboretum.harvard.edu, L41).

Лигиране на адапторите, поправка на участъците "nick repair" и пречистване.

Определяне на размерите на фрагментите и пречистване на селектираната по размер библиотека.

Количествено определяне и амплификация на библиотеката.

Измерване на концентрацията на библиотеките след амплификацията с Bioanalyzer.

Б. Емулсионен PCR (emPCR) този етап има следният системен ход.

Обогатяване на ISP (Ion Sphere particles).

Качествен контрол на ISP обогатяването.

В. Секвениране

3.3.6. Мултиплексен амплификационен анализ на лигирани проби (MLPA)

Multiplex Ligation Probe Amplification (MLPA) е полу-количествен метод за определяне на броя копия в до 60 ДНК последователности с един мултиплексно базиран PCR. Методиката се използва за откриване на големи делеции, дупликации и геномни пренареждания. Всяка проба от кита се състои от два олигонуклеотида (сонди), подбрани така, че да хибридизират с прицелната геномна секвенция в близост една до друга. (www.mlpa.com, L42).

Според препоръките на производителя за всеки експеримент е препоръчително да се използват най-малко 3 референтни контролни проби или на всеки 7 проби една трябва да е референтна контрола. Примерно разпределение на референтните проби е представено на ***фигура 1.***

Анализът за търсене на големи делеции, инсерции и пренареждания в *BRCA1* и *BRCA2* гените беше проведен с помощта на китове, разработени от фирмата MRC-Holland (Amsterdam, Holland): SALSA MLPA KIT P002-C1 BRCA1 и SALSA MLPA KIT P090-A2 BRCA2, следвайки инструкциите на производителя. Използваната ДНК трябва да бъде с високо качество и концентрация между 50 и 250 ng в 5 µl обем за всяка реакция (www.mlpa.com, L42). ДНК се разредена в TE буфер (10мМ Tris HCl/0.1mM EDTA) с pH 8.2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	s.	s.	s.	s.	s.	s.	s.	ref	s.	s.	s.	s.
B	s.	s.	s.	s.	s.	ref	s.	s.	s.	s.	s.	s.
C	s.	s.	ref	s.	s.	s.	s.	s.	s.	s.	s.	ref
D	ref	s.	s.	s.	s.	s.	s.	s.	s.	ref	s.	s.
E	s.	ref	s.	s.	s.	s.	s.	s.	s.	s.	ref	s.
F	s.	s.	s.	ref	s.	s.	s.	s.	s.	s.	s.	s.
G	s.	s.	s.	s.	ref	s.	s.	s.	s.	s.	s.	s.
H	s.	s.	s.	s.	s.	s.	ref	s.	s.	s.	s.	s.
I	s.	s.	s.	s.	s.	s.	s.	s.	ref	s.	s.	s.

*Recommended Nr of Reference (Ref) runs: Samples (s.) = 1:7 with a minimum of 3 reference runs

Фигура 1. Разпределение на референтните проби на случаен принцип при MLPA анализа (www.mlpa.com, L42).

За потвърждение на откритите аберации в *BRCA1* и *BRCA2* бяха използвани съответните китове на MRC-Holland: SALSA MLPA P087-B1 BRCA1 и SALSA MLPA P045- B*2* BRCA2/CHEK2 (www.mlpa.com, L42).

3.3.7. TaqMan® Real Time PCR

TaqMan® Real Time PCR (Life Technologies) е един от методите за количествен PCR. Принципът му се основава на използването на флуоресцентно белязана TaqMan проба (сонда), комплементарна на интересуващата ни ДНК последователност и освобождаването на флуоресцентен сигнал от 5′→3′

екзонуклеазната активност на ДНК полимеразата по време на амплификацията. Както и при други количествени PCR методики, отделеният флуоресцентен сигнал позволява количествено измерване на получения продукт, а TaqMan пробата значително повишава специфичността на детекцията.

Тъй като е много специфичен TaqMan®методът е много подходящ за анализ на единични нуклеотидни замени (SNPs). При анализа се използват специфични праймерите, хибридизиращи към район, фланкиращ мястото на съответния полиморфизъм и флуоресцентно белязани алел-специфични проби.

3. 4. Биоинформатичен анализ на получените резултати

При анализа на получените резултати бяха използвани следните софтуерни програми:

- *Анализ на директното секвениране - FinchTV, SeqScape, CodonCodeAligner и Sequncing Analysis;*
- *Анализ на резултатите получени от NGS* - NextGene софтуерна програма за обработка на голям обем данни.
- Анализ на резултатите получени от MLPA анализа - GeneMapper и Coffalyr.Net.

3.5. Статистически методи

Резултатите от асоциативните проучвания съдържащи генотипите на контролната и клинична група, бяха подложени на статистически анализ с програмите PLINK и VassarStats, за определяне на алелната асоциация в групите и нейната статистическа значимост. За определяне на асоциацията на получените резултати с рака на гърдата бяха използвани следните статистически параметри:

- Изчисляване на хетерозиготността и на алелните и генотипни честоти в извадката;
- Нулева хипотеза (H_0);
- χ^2 метод;
- Закон на Харди-Вайнберг;
- Проверка на статистически хипотези.

IV. Резултати

4.1. Подбор на пациентите с рак на гърдата и създаване на ДНК банка и клинична база данни

В резултат на колаборацията между екипи от патолози, химиотерапевти, хирурзи и молекулярни биолози беше събрана група от 200 пациентки с фамилен рак на гърдата. Пациентките бяха 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 ***(приложение 1).*** Успоредно с болните беше събрана и контролна група от 240 здрави индивиди, без фамилна история на ракови заболявания, съответстващи на пациентите по възраст, пол и етническа принадлежност.

Всички участници бяха уведомени за целите и същността на настоящото изследване и подписаха информирано съгласие за участие в изследването.

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 3 на глава „Материали и методи".

4.2. Оптимизация на условията за амплификация на *BRCA1, BRCA2,PALB2* и *BRIP1* гените

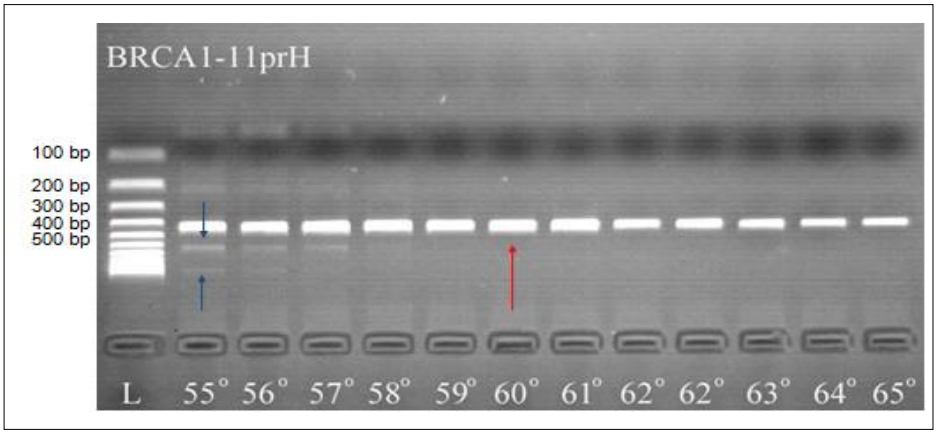
Тъй като мутациите са разпръснати по цялата кодираща последователност на двата гена, мутационният скрининг на *BRCA1/2* гените изисква директно секвениране на всички екзони и прилежащите им екзон-интронни връзки. За целта *BRCA1* и *BRCA2* гените бяха разделени на 51 участъка и амплифицирани с помощта на 81 двойки праймери. Допълнително беше проведен и анализ за носителство на мутациите c.509_510delGA в *PALB2* гена и c.2992_2995delAAGA в *BRIP1* гена при 200 *BRCA1/2* негативни пациентки с фамилен рак на гърдата. За всички двойки праймери бяха оптимизирани условията на амплификация с цел получаване на високо специфични PCR продукти и определени оптималните параметри на реакцията. За тази цел беше направен подбор на олигонуклеотидите и бяха оптимизирани следните параметри на PCR реакцията:

- Температура на амплификация;
- Оптимизация на концентрацията на $MgCl_2$;
- Оптимизация на концентрацията на матричната ДНК.

След провеждане на оптимизациите бяха определени условията на реакциите показани на ***таблици 2 и 3*** в материали и методи.

4.2.1. Електрофоретичен анализ на PCR продуктите

Оценката на молекулната маса, качеството и специфичността на получените амплификационни продукти на всички изследвани участъци от *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2* и *BRIP1* гените беше направена с помощта на 2% агарозна електрофореза. За определяне на молекулните маси използвахме стандартни ДНК маркери за молекулна маса (TriDye 100 bp Ladder, на New England Bio Labs). Получените резултати отговориха на теоретично зададените стойности. На ***фигура 2*** е представен резултатът от оптимизация на екзон 11, участък Н на *BRCA1* гена.



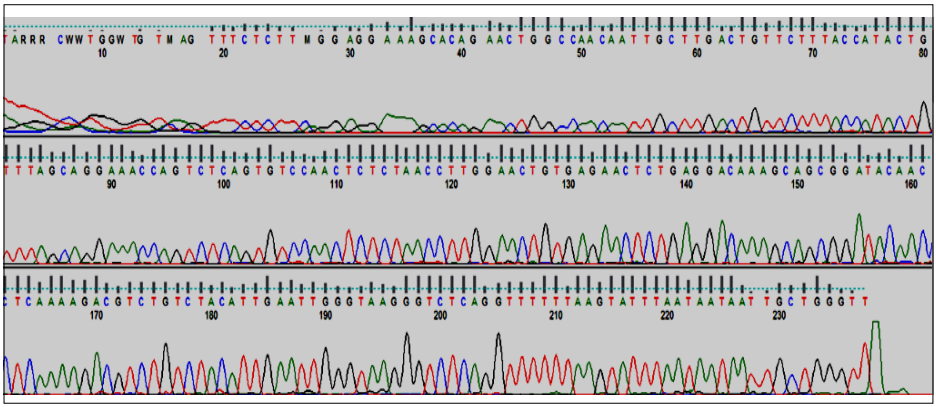
Фигура 2. Електрофоретичен профил в 2%-ен агарозен гел на PCR продукти, след амплификация на екзон 11Н на BRCA1 гена при използване на температурен градиент (със сини стрелки на фигурата са означени неспецифичните продукти, а с червена стрелка е означена оптималната температура на хибридизация на екзон 11Н)

4.2.2. Оптимизация на условията за директното секвениране

След като оптимизирахме условията на PCR реакциите, беше необходимо да оптимизираме условията за директно секвениране на всички изследвани участъци. Пречистването на PCR продуктите от остатъци на нуклеотиди и нехибридизирали праймери, направихме с помощта на ExoSap (ExoSapIT, Affymetrix) както е описано в раздел 3, "Материали и Методи". При направената поредица от реакции на пречистване с различни количества PCR продукт (1 µl, 1.5 µl и 2 µl) и различни количества на използваната ензимна смес (0.4µl, 0.5 µl, 0.75 µl и 1 µl) се установи, че за получаване на оптимални резултати от

директното секвениране е необходимо да използваме 1 µl PCR продукт и 0.4 µl ExoSap.

След пречистването PCR продуктите бяха подложени на секвенционна реакция. Продуктите на секвенционната реакция бяха преутаени, разтворени в денатуриращ агент формамид и анализирани с помощта на капилярна електрофореза на автоматичен секвенатор (ABI Prism 3130 xl, Applied Biosystems). На ***фигура 3*** е показана една произволно избрана електрофореграма на продукти на секвенционна реакция, получена при оптимални условия на анализа.



Фигура 3. Електрофореграма на продукт на секвенционна реакция, разделен на капилярна електрофореза с помощта на автоматичен секвенатор ABI Prism 3130 xl, Applied Biosystems, при оптимални условия на анализа

4.2.3. Оптимизация на условията на MLPA анализа

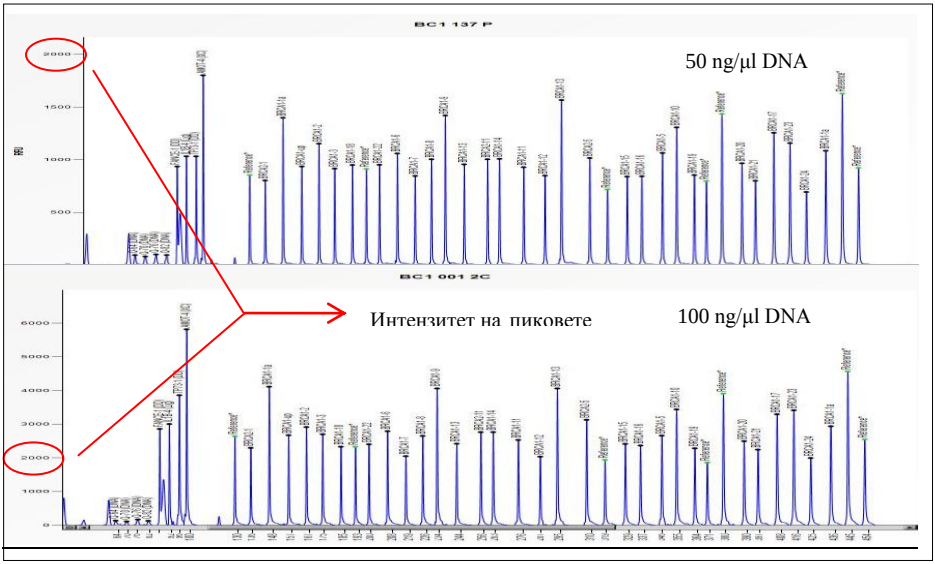
За първоначалния анализ за откриване на големи делеции, инсерции и пренареждания в *BRCA1/2* гените бяха избрани китове SALSA MLPA KIT P002-C1 BRCA1 и SALSA MLPA KIT P090-A2 BRCA2, разработени от фирмата MRC-Holland (Amsterdam, Holland). За потвърждение на откритите аберации използвахме съответните китове за потвърждение: P087-B1/BRCA1, и P045/BRCA2_CHEK2 (MRC-Holland) при които се използват различни сонди за екзоните на *BRCA1/2*.

С цел определяне на работните условия на MLPA анализа бяха проведени оптимизации на следните параметри: концентрация на изходната геномна ДНК, времето на хибридизация на сондите и условията на капилярната електрофореза.

Оптимизация на изходната концентрация на използваната геномна ДНК. Концентрацията на първоначалните копия матрична ДНК е от голямо значение за прецизността на MLPA анализа и за амплификацията. При направената серия от MLPA анализи беше установено, че оптималната концентрация на ДНК при

мутационния скрининг на *BRCA1/2* гените е 50ng/µl за 30 µl общ обем на реакционната смес ***(фигура 4).***

Оптимизация на времето за хибридизация. Според препоръките на производителя продължителността на хибридизацията на сондите трябва да бъде между 16 и 20 часа, с цел оптимално свързване на всички хибридизационни сонди. Оптималното време на хибридизация при настоящия MLPA анализ беше определено експериментално на 18 часа.



Фигура 4. Оптимизация на концентрацията на матричната ДНК и интензитета на пиковете при 50ng/µl и 100ng/µl ДНК за 30 µl общ обем на реакционната смес

Оптимизиране на условията на капилярната електрофореза. С цел предотвратяване разцепване на пиковете на отделните фрагменти бяха варирани параметрите на капилярната електрофореза и количествата на използваните реагенти. Беше направена и оценка на количеството необходим PCR продукт, като за целта бяха проведени капилярни електрофорези с 1 µl,1.5 µl, 2 µl, 2.5 µl, 3 µl, 3.5 µl и 4 µl от PCR реакционната смес.

4.3. Молекулярно-генетичен анализ за наличието на мутации в *BRCA1* и *BRCA2* гените посредством директно секвениране

Мутации в *BRCA1* и *BRCA2* гените обясняват около 15 до 20% от фамилните случаи на рак на гърдата (Balman J et al, 2010). Честотата на *BRCA1/2*

мутациите при пациентите с рак на гърдата без фамилна анамнеза са съответно 1-7% за *BRCA1* и 1-3% за *BRCA2* (Balman J et al, 2010).

До 70% от мутациите в *BRCA1* гена и 90% от мутациите в *BRCA2* гена са малки инсерции, делеции и безсмислени (“nonsence”), предизвикващи появата на преждевременен стоп кодон и синтез на скъсен белтъчен продукт (Narod SA et al, 2010). Друга част от докладваните мутациите са големи пренареждания – инсерции, делеции или дупликации на повече от 500 килобази от ДНК засягащи един или повече екзони (Narod SA et al, 2010).

В настоящото изследване беше проведен молекулярно–генетичен анализ за носителство на мутации в BRCA1 и BRCA2 гените при 200 пациентки с рак на гърдата и фамилна история на рак на гърдата и/или яйчника, подбрани съгласно утвърдените международни критерии за генетичен скрининг (BCLC, 1999; NCCN, 2010) . Анализът доведе до откриването на общо 65 варианта от, които 31 в BRCA1 гена и 34 в BRCA2 гена ***(таблица 4)***.

Таблица 4. Брой установени варианти в BRCA1/2 гените в хода на молекулярно-генетичния анализ чрез директно секвениране.

Тип вариант	BRCA1	BRCA2	Общ брой
Frameshift	5	7	12
Nonsense	1		1
Missense	15	10	25
UTR		2	2
CDS_indel		1	1
CDS-synon	4	6	10
IVS	6	8	14
Общ брой	**31**	**34**	**65**

От общия брой варианти при 30% (60/200) от пациентите бяха открити редки варианти, с честота под 2% за всеки от тях по отделно. От така установените промени 19.5% (39/200), съответно 14% (28/200) в *BRCA1* гена и 5.5% (11/200) в *BRCA2* гена бяха с доказан патогенен ефект според литературните и електроните източници по отношение на заболяването ***(таблица 5).***

Таблица 5. Мутации с патогенен ефект, отговорни за развитието на рак на гърдата при български пациенти

Докладвани в литературните и електронните източници мутации, с доказан патогенен ефект за развитието на рак на гърдата.					
BRCA1					
Тип мутация	dbSNP	BIC * номенклатура	HGVS* номенклатура	Протеинова номенклатура	Протеинов домен
FS*	rs80357609	3819del5	c.3700_3704 delGTAAA	p.Val1234Glnfs	-

FS	rs80357862	5149del4	c.5030_5033 delCTAA	p.Thr1677Ilefs	BRCT1
FS	rs80357906	5382insC	c.5263_5264insC	p.Gln1756Profs	BRCT1
N**	rs80357366	E1535X	c.4603G>T	p.Glu1535Ter	AD1
M***	rs28897672	C61G	c.181T>G	p.Cys61Gly	Ring Finger
BRCA2					
FS	rs80359544	6079del4	c.5851_5854delAGTT	p.Ser1951Trpfs	-
FS	rs80359550	6174delT	c.5946delT	p.Ser1982Argfs	BRC repeat7
FS	rs80359530	5946delCT	c.5718_5719delCT	p.Leu1908Argfs	-
FS	rs80359686	8138del5	c.7910_7914delCCTT T	p.Phe2638Terfs	Helical Domain
FS	rs80359747	9326insA	c.9098_9099insA	p.Gln3034Serfs	OB2
Недокладвани в литературните и електронните източници мутации, но от тип, който се очаква да доведе до заболяване					
BRCA1/2					
FS	-	583delA	c.464delA	p.Gln155Fs	-
FS	-	5515del7	c.5397_5403delCCCT TGG	p.Thr1799delins	BRCT 2
FS	-	8760delAA	c.8532_8533delAA	p.Glu 2844Alafs	Tower
FS	-	9908delA	c.9982delA	p.Gln3227fs	-

*FS - Frameshift; **N – Nonsense; *** Missense

4.3.1. Докладвани в литературните и електронните източници мутации, които са с доказан патогенен ефект за развитието на рак на гърдата

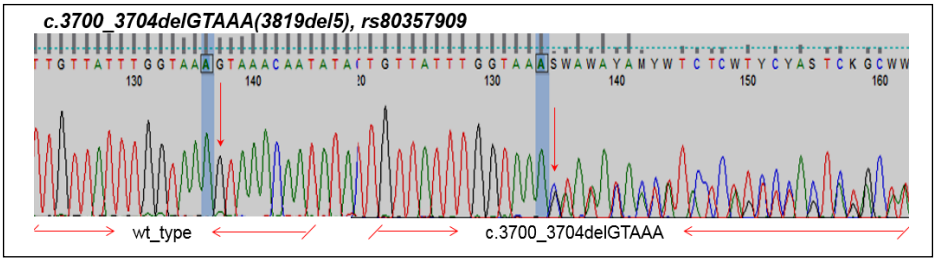
4.3.1.1. Патогенни мутации в *BRCA1* гена

От общия брой открити варианти 5 (c.3700_3704delGTAAA, c.5030_5033delCTAA, c.5263_5264insC, c.4603G>T и c.181T>G) в *BRCA1* гена и 5 (c.5851_5854delAGTT, c.5946delT, c.5718_5719delCT, c.7910_7914delCCTTT и c.9098_9099insA) в *BRCA2* гена бяха докладвани в литературните и електронните източници като патогенни, с доказан ефект за развитието на рак на гърдата. Така установените мутации бяха открити при 17.5% (35/200) от пациенти в изследваната група, съответно 13% (26/200) в *BRCA1* гена и 4.5% (9/200) в *BRCA2* гена ***(таблица 5)***.

- *c.3700_3704delGTAAA (3819del5), rs80357609.* Мутацията е локализирана в екзон 11 на *BRCA1* гена и е причинена от делеция на пет нуклеотида на позиции между 3700 и 3704 в кодиращата последователност на ДНК, съответно кодони 1234 и 1235 (GTA,AAC/XXXXXC). Вариантът води до появата на стоп кодон на позиция 1242 и синтеза на скъсен белтъчен продукт. Той беше установен при пациентка (0.5%, 1/200) с ранно начало на фамилен рак на гърдата и тройно негативен рецепторен профил.

- *c. 5030_5033delCTAA (5149del4), rs80357862*. Мутацията е локализирана в екзон 17 на *BRCA1* гена и е причинена от делция на четири нуклеотида на позиции между 5030 и 5033 в кодиращата последователност на ДНК, съответно кодони 1677 и 1678 (ACT,AAT/AXT) ***(таблица 5, фигура 5).*** Тя води до появата

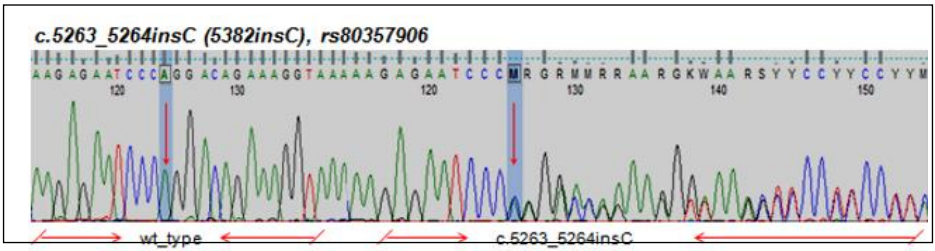
на стоп кодон на позиция 1678 и синтеза на скъсен белтъчен продукт и беше установена при пациентка (0.5% 1/200) с тройно негативен рецепторен профил, без фамилна анамнеза за онкологични заболявания.



Фигура 5. c.3700_3700delGTAAA (3819del5) frameshift мутация при пациент ВС№176

- *c.5263_5264insC (5382insC), rs80357906*. Мутацията е локализирана в 20 екзон на *BRCA1* гена и е следствие от инсерция на цитозин в позиция 5263 в кодиращата последователност на ДНК, кодон 1756 (CCA/XCA). Така установеният вариант води до появата на стоп кодон в позиция 1829 и до синтеза на по-къс белтъчен продукт ***(фигура 6).***

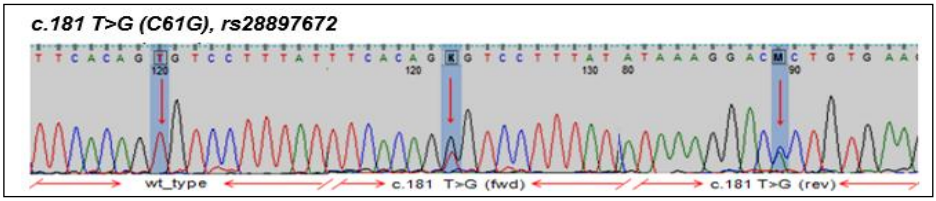
Мутацията беше установена при 11% (22/200) от пациентите, отговарящи на следните критерии за вероятно носителство на мутация в *BRCA1/2* гените: наличие на фамилна история - 36.3% (8/22), ранно начало на заболяването - 31.8% (7/22), двустранен рак на гърдата - 18.2% (4/22) или тройно негативен рак на гърдата - 13.6% (3/22).



Фигура 6. c.5263_5264insC (5382insC) frameshift мутация при пациент ВС№ 152

- *c.4603G>T (E1535Tre), rs80357366.* Така установената мутация от типа „nonsense" е локализирана в екзон 15 на *BRCA1* гена и е причинена от замяна на гуанин с тимин (GAT/TAG) на позиция 4603 в кодиращата последователност, което води до появата на стоп кодон (p.Glu1535Tre) и синтеза на скъсен белтъчен белтък.

- *c.181T>G (C61G), rs28897672.* Мутацията е локализирана е 5-ти екзон на *BRCA1* гена и води до замяна на тимин с гуани (TGT/GGT) на позиция 181 в кодиращата последователност, което води до синтеза на аминокиселината глицин вместо цистеин (p.Cys61Gly) в 61-ви кодон. Установеният вариант от типа „missence" е локализиран в Ring Finger домена и води до нарушение на убиквитин лигазната активност на белтъка. Мутацията беше установена в 1% (2/200) от пациентите с фамилен рак на гърдата ***(фигура 7).***



Фигура 7. c.181T>G (C61G) missense мутация при пациент №132

4.3.1.2. Патогенни мутации в *BRCA2* гена

- *c.5851_5854delAGTT (6079del4), rs80359544.* Мутацията е локализирана в екзон 11 (участък N) на *BRCA2* гена и се дължи на делеция на четири нуклеотида в позиция 6069 (AGT_TGG/XXXXGG), кодон 1951 ***(таблица 5)***. Така установеният вариант води до появата на стоп кодон в позиция 1961 и до синтеза на по-къс белтъчен продукт.

Мутацията беше установена при 1% (2/200) от пациентките с фамилен рак на гърдата.

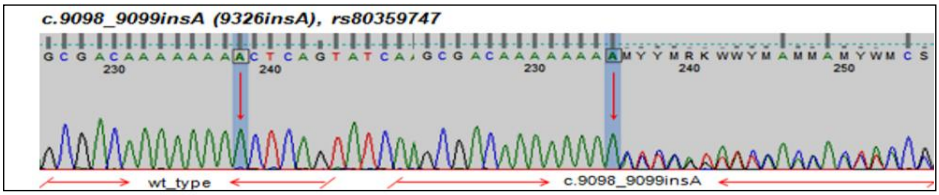
- *c.5946delT (6174delT), rs80359550.* Мутацията е локализирана в екзон 11 (участък N) на *BRCA2* гена и е следствие от делеция на тимин в позиция 6174 на кодиращата последователност на ДНК, кодон 1982. Така установеният вариант води до появата на стоп кодон в позиция 2003 и до синтеза на по-къс белтъчен продукт.

- *c.5718_5719delCT (5946delCT), rs80359530.* Тази мутация, подобно на двете, описаните по-горе, *BRCA2* делеции, е локализирана в екзон 11 (участък N). Тя е причинена от делеция на два нуклеотида в позиция 5718 и 5719 в кодиращата последователност, кодон 1908, и води до появата на стоп кодон в позиция 1909 и синтеза на по-къс белтъчен продукт.

- *c.7910_7914delCCTTT (8138del5), rs80359686.* Тази мутация е локализирана в екзон 17 на *BRCA2* и е причинена от делеция на пет нулеотида между позиции 7910 и 7914 в кодиращата последователност, кодон 2638. Така установената мутация води до появата на стоп кодон в позиция 2639 и до синтеза на по-къс белтъчен продукт.

- *c.9098_9099insA (9326insA), rs80359747*. Мутацията е локализирана в екзон 23 на *BRCA2* и е причинена от инсерция на аденин в позиция 9098 на

кодиращата последователност. Тя води до появата на стоп кодон в позиция 3034 и до синтеза на по-къс белтъчен продукт. Този патогенен вариант беше с установен при общо четири пациентки (2%, 4/200) с хормон зависим фамилен карцином на гърдата с двама или повече родственици, диагностицирани с онкологични заболявания ***(фигура 8).***



Фигура 8. c.9098_9099insA (9326insA) frameshift мутация при пациент № 152

4.3.2. Нови варианти, които не са докладвани в литературните и електронните източници, но са от тип, който се очаква да доведе до заболяване

В настоящото проучване бяха установени четири нови делеции - две в *BRCA1* (c. 464delA и c.5397_5403delCCCTTGG) и две в BRCA2 (c.8532_8533delAA и c.9682delA), които до този момент не са съобщавани в специализираните литературни и електронни източници.

- *c. 464delA (583delA).* Установената мутация е локализирана в 8 екзон на *BRCA1* гена и се дължи на делеция на аденин (CAA/CA-) в позиция 464 на кодиращата последователност на ДНК, кодон 155 (p.Glu155Fs). Тя води до появата на стоп кодон в позиция 162 и синтеза на скъсен белтъчен продукт без NLS сигнал, SQ клъстер и BRCT домени, което определя нейния патогенен характер**.**

- *5397_5403delCCCTTGG (5517del7).* Тази делеция е локализирана в 22-ри екзон на *BRCA1* гена и е следствие от загуба на 7 нуклеотида между позиции 5396 и 5402 в кодиращата последователност на ДНК, кодон 1799**.** Мутацията е с патогенен характер, тъй като води до появата на стоп кодон в позиция 1831 и до синтеза на по-къс белтъчен продукт без BRCT2 домен.

- *c.8532_8533delAA (8760delAA).* Мутацията е локализирана в 20 екзон на *BRCA2* гена и е резултат от делеция на два аденинови нуклеотида между позиции 8532 и 8533 в кодиращата последователност, кодон 2844. Тя е с патогенен характер, т.к. води до появата на преждевременен стоп кодон на позиция 2864 и до синтеза на скъсен белтъчен продукт без OB и NLS мотиви.

- *c.9682delA (9908delA).* Делецията е локализирана в екзон 27а на *BRCA2* гена, води до загуба на аденин в позиция 9680 на кодиращата последователност и съответно до появата на стоп кодон на 3248 позиция и до синтеза на по-къс белтъчен продукт с липсващ NLS3 домен.

4.3.3. Варианти с неясен клиничен ефект (VUS – variants with uncertain significance)

При проведения анализ посредством директно секвениране установихме 13 варианта с неясно клинично значение - 6 в *BRCA1* и 7 в *BRCA2* гена, които бяха с честота под 2% в изследваната група пациенти. VUS бяха открити при 12 пациента с фамилен рак на гърдата, което е 6% (12/200) в извадката, съответно 3% (6/200) в *BRCA1* и 4% (8/200) в *BRCA2* гена ***(таблица 6)***.

Таблица 6. Варианти с неясен клиничен ефект (Variants of Uncertain Significance) и висока честота, които вероятно не оказват ефект за развитие на рак на гърдата

Варианти с неясен клиничен ефект – VUS (Variants of Uncertain Significance)					
BRCA1					
Тип вариант	dbSNP	BIC номенклатура	HGVS номенклатура	Протеинова номенклатура	Протеинов домен
M	rs80357370	C47G	c.139T>G	p.Cys47Gly	Ring Finger
M	rs56187033	Y179C	c.536A>G	p.Tyr179Cys	-
M	rs28897675	L246V	c.736T>G	p.Leu246Val	-
M	rs55906931	F486L	c.1456T>C	p.Phe486Leu	-
M	rs56012641	N550H	c.1648A>C	p.Asn550His	-
M	—	V1333A	c. 3999T>C	p. Val1333Ala	AD1
BRCA2					
M	rs28897706	S326R	c.978C>A	p.Ser326Arg	-
M	rs80358600	S1172L	c.3515C>T	p.Ser1172Leu	-
M	rs1799954	R2034C	c.6100C>T	p.Arg2034Cys	-
M	rs55794205	R2108C	c.6322C>T	p.Arg2108Cys	-
M	rs11571707	I2490T	c.7469T>C	p.Ile2490Thr	Helical Domain
M	rs80359165	Y3035S	c.9104A>C	p.Tyr3035Ser	OB2
IFD	rs80359432	E1383del c.4146_4148delAGA		-	
Варианти, които са с висока честота и вероятно не оказват ефект за развитие на рак на гърдата					
BRCA1					
M	rs1799950	Q356R	c.1067A>G	p.Gln356Arg	-
M	rs4986850	D693N	c.2077G>A	p.Asp693Asn	-
M	rs799917	P871L	c.2612C>T	Pro871Leu	-
M	rs16941	E1038G	c.3113A>G	p.Glu1038Gly	-
M	rs4986852	S1040N	c.3119G>A	p.Ser1040Asn	-
M	rs16942	K1183R	c.3548A>G	p.Lys1183Arg	-
M	rs1799966	S1613G	c.4837A>G	p.Ser1613Gly	AD2
M	rs1799967	M1652I	c.4956G>A	p.Met1652Ile	BRCT1
BRCA2					
M	rs144848	N372H	c.1114A>C	p.Asn372His	-
M	rs766173	N289H	c.865A>C	p.Asn289His	-
M	rs1799944	N991D	c.2971A>G	p.Asn991Asp	-
M	rs4987117	T1915M	c.5744C>T	p.Thr1915Met	-

При направената оценка на патогенния ефект на установените в *BRCA1* гена VUS от типа „missense" с програми за предикция Sift, Polyphen2 и Provean само един от тях - c.1648A>C беше оценен като вероятно патогенен и с трите програми (***таблица 7)***.

Таблица 7. Оценка на патогенния ефект на установените VUS от типа „missense" в BRCA1 гена с помощта на програми Sift, Polyphen2 и Prevean

Вариант с неясно клинично значение	Оценка на предиспозицията		
	Sift	Polyphen	Provean
c.139 T>G (C47G), p.Cys47Gly	damaging	probably damaging	neutral
c.536A>G (Y179C), p.Tyr179Cys	tolerated	damaging	neutral
c.736T>G, (L246V), p.Leu246Val	tolerated	probably damaging	neutral
c.1456T>C, (F486L), p.Phe486Leu	tolerated	benign	neutral
c.1648A>C, (N550), p.Asn550His	**damaging**	**probably damaging**	**deleterious**
c.3999T>C, (V133A), p.Val1333Ala	tolerated	probably damaging	neutral

При направената оценка на патогенния ефект на установените в *BRCA2* гена VUS от типа „missense" с Sift, Polyphen2 и Provean предиктивни програми, само един - c.3515C>T, беше оценен като вероятно патогенен и с трите програми ***(таблица 8)***.

Таблица 8. Оценка на патогенния ефект на установените „missense" варианти с неясно клинично значение в BRCA2 гена с помощта на програми Sift, Polyphen2 и Prevean

Вариант с неясно клинично значение	Оценка на предиспозицията		
	Sift	Polyphen	Provean
c.978C>A (S326R), p.Ser326Arg	tolerated	benign	neutral
c.3515C>T (S1172L), p.Ser1172Leu	**damaging**	**probably damaging**	**deleterious**
c.6100C>T (R2034C), p.Arg2034Cys	tolerated	probably damaging	deleterious
c.6322C>T (R2108C), p.Arg2108Cys	tolerated	benign	neutral
c.7469T>C (I2490T), p.Ile2490Thr	tolerated	benign	neutral
c.9104A>C(Y3035S),p.Tyr3035Ser	damaging	benign	neutral

При направената оценка на патогенността на установените в *BRCA1* и *BRCA2* варианти с честота над 2% в изследваната извадка, с Sift, Polyphen и Provean2 програми за предикция, само един - c.1067A>G беше оценен като вероятно асоцииран със заболяването и с трите програми ***(таблица 9)***.

Таблица 9. Оценка на патогенността на установените чести „missense" варианти в BRCA1/2 гените с помощта на предиктивни програми Sift, Polyphen2 и Prevean

Вариант	Оценка на патогенността		
	Sift	Polyphen2	Provean
c.1067A>G (Q356R), p.Gln356Arg	**damaging**	**probably damaging**	**deleterious**
c.2077G>A (D693N), p.Asp693Asn	tolerated	benign	deleterious
c.2612C>T (P871L), p.Pro871Leu	tolerated	benign	neutral
c.3113A>G (E1038G), p.Glu1038Gly	damaging	probably damaging	neutral
c.3119G>A (S1040N), p.Ser1040Asn	damaging	probably damaging	neutral
c.3548A>G (K1183R), p.Lys1183Arg	tolerated	benign	neutral
c.4837A>G (S1613G), p.Ser1613Gly	damaging	benign	neutral
c.4956G>A (M1652I), p.Met1652Ile	tolerated	benign	neutral
c.1114A>C (N372H), p.Asn372His	tolerated	benign	neutral
c.865A>C (N289H), p.Asn289His	tolerated	benign	neutral
c.2971A>G (N991D), p.Asn991Asp	tolerated	benign	neutral
c.5744C>T(T1915M),p.Thr1915Met	tolerated	benign	neutral

4.3.4. Варианти, които са с неутрален ефект за развитието на заболяването

В изследваната група пациенти бяха установени 26 (10 в *BRCA1* и 16 в *BRCA2* гена) варианта с неутрален ефект за развитието на заболяването. В групата изследвани пациенти установихме 10 различни вида синонимни замени със средна честота 17.25% (между 0.3% и 34,5%) ***(таблица 10)***.

Таблица 10. Варианти с доказан неутрален ефект за развитието на рак на гърдата

Варианти с доказан неутрален ефект за развитието на рак на гърдата			
BRCA2			
Тип вариант	dbSNP	BIC номенклатура	HGVS номенклатура
UTR3'	rs1799943	203 G>A	c.-26G>A
UTR5'	rs15869	IVS27+104 A>C	c.*105A>C
BRCA1			
Syn	rs1799965	C197C	c.591C>T
Syn	rs1799949	S694S	c.2082C>T
Syn	rs16940	L7771L	c.2311T>C
Syn	rs1060915	S1436S	c.4308T>A
BRCA2			
Syn	rs1801439	S455S	c.1365A>G
Syn	rs1801499	H743H	c.2229T>C
Syn	rs1801406	K1132K	c.3396A>G
Syn	rs543304	V1269V	c.3807T>C
Syn	rs28897734	S1733S	c.5199C>T
Syn	rs1799955	S2411S	c.7242A>G
BRCA1			
IVS	rs147856441	IVS7+36delCTT	c.441+36_441+38delCTT
IVS	rs799923	IVS7-34 C>T	c.442-34C>T

IVS	rs8176144	IVS8-58delT	c.548-58delT
IVS	rs273900734	IVS14-63C>G	c.4485-63C>G
IVS	rs8176258	IVS17-53 C>T	c.5075-53C>T
IVS	rs273901757	IVS20+60/61ins12	c.5277+60_5277+61 insGTATTCCACTCC
		BRCA2	
IVS	rs11571610	IVS4+67A>C	c.425+67A>C
IVS	rs4942423	IVS4+147G>T	c.425+147G>T
IVS	rs3783265	IVS4-89T>C	c.426-89T>C
IVS	rs2126042	VS8+56C>T	c.681+56C>G
IVS	rs11571661	IVS11+80 delTTAA	c.6841+80_6841+83delTTAA
IVS	rs11571680	IVS13+164 delTTATAAAAT	c.7007+134_7007+135 insTTATAAAAT
IVS	—	IVS15+28 C >A	c.7617+28C>A
IVS	rs9534262	IVS16-14 T>C	c.7806-14T>C

* IVS – интронен вариант

4.4. Използване на откритите мутации в *BRCA1* и *BRCA2* гените като положителни контроли при въвеждане на скрининг със секвениране от ново поколение.

Най-общо технологиите на секвениране от ново поколение споделят възможността да секвенират масово и паралелно милиони ДНК матрици. Personal Genome Machine (PGM) е първата по рода си, която използва метод за определяне на ДНК последователностите на полупроводников принцип, без използването на оптичната технология за детекция на нуклеотидите (Rothberg JM et al, 201).

Като положителни контроли бяха избрани 10 пациентки от общата група пациентки с рак на гърдата, отговарящи на следните условия:

- *Избраната геномна ДНК да бъде изолирана по различни методи*. Използваната в експеримента геномна ДНК беше изолирана по два различни метода – солево по метода на Miller и посредством полуавтоматична система на Chemagen. Резултатите от секвенирането не показаха разлика в качеството и отчитането на резултатите в двете групи пациенти по отношение на този показател.

- *Всички пациенти в изследваната група да имат установени варианти в BRCA1/2 гените.* В анализа бяха включени само пациентки, при които е направен мутационен скрининг чрез директно секвениране на всички кодиращи последователности на *BRCA1/2* гените.

- В подбраната група пациентки бяха наблюдавани общо 35 различни вида варианти: 7 патогенни мутации от типа изместване на рамката на четене (frameshitf), 10 варианта от тип промяна на смисъла (missense), 8 синонимни замени (syn), 2 варианта в UTR регионите и 8 интронни варианта (IVS)

Всички избрани „frameshift" мутации с доказан патогенен ефект за развитието на заболяването бяха делеции или инсерции на различен брой

нуклеотиди, но не кратни на три и бяха отчетени при NGS секвенирането ***(таблица 11)***.

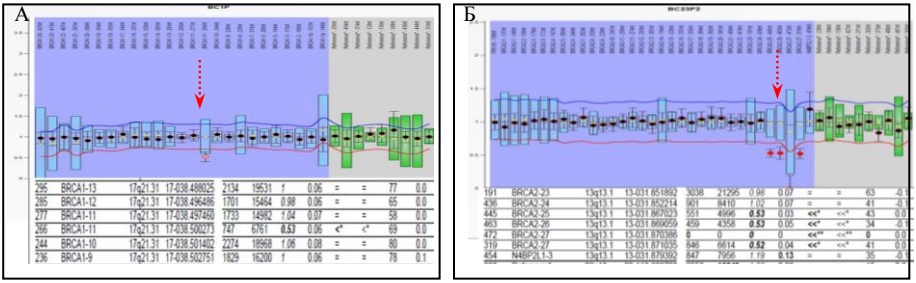
Това позволи въвеждането на бърз и надежден метод за мутационен скрининг на *BRCA1/2* гените чрез новогенерационно секвениране.

Таблица 11. Съвпадение на избрани мутации с двата вида секвениране

Ген	Мутация	Директно секвениране	NGS
BRCA1	c. 464delA	√	√
BRCA1	c.5263_5264insC	√	√
BRCA2	c.5851_5854delAGTT	√	√
BRCA2	c.5946delT	√	√
BRCA2	c.5718delCT	√	√
BRCA2	c.7910_7914delCCTTT	√	√
BRCA2	c.9908delA	√	√

4.5. Изследване за наличието на големи делеции, дупликации и пренареждания в *BRCA1* и *BRCA2* гените посредством MLPA анализ (мултиплексен анализ на лигирани проби)

В настоящото изследване за големи делеции и инсерции в *BRCA1/2* гените бяха включени 70 пациентки с рак на гърдата и фамилна история на рак на гърдата и яйчника, при които не бяха установени патогенни мутации чрез директно секвениране. В резултат на проведения MLPA анализ в изследваната група от пациенти с фамилен рак на гърдата бяха открити 2 големи делеции - делеция на част от екзон 11 (11A) на *BRCA1* гена и делеция, обхващаща екзони 25, 26 и 27 на *BRCA2* ***(фигура 9).***



Фигура 9: Съотношение между височините на пиковете от електрофореграматите при пациенти с установени делеции в BRCA1 (фигура 9а) и е BRCA2 (фигура 9б). Анализът е проведен с помощта на софтуер Coffalyser.Net

- *BRCA1 deletion exon 11A.* Делецията на екзон 11А в *BRCA1* беше установена при пациентка с фамилна история за онкологични заболявания,

майка с ендометриален карцином (49 години) и баща с белодробен карцином (58 години). Пациентката е развила рак на десния яйчник на 44 годишна възраст и след двугодишен период, свободен от заболяване, развила и тройно негативен карцином на гърдата ***(фигура 9а).***

BRCA2 deletion exons 25, 26 and27. Голяма делеция, обхващаща екзони 25-27 на *BRCA2* беше открита при пациентка BC23, развила карцином на дясната гърда на възраст 25 години. Освен с ранно начало, делецията корелира и с фамилна анамнеза по бащина линия – бабата на пробанда по бащина линия също е развила на рак на гърдата на възраст под 50 години ***(фигура 9б)***.

4.6. Генетичният анализ за наличието на мутациите в гени с междинна пенетрантност

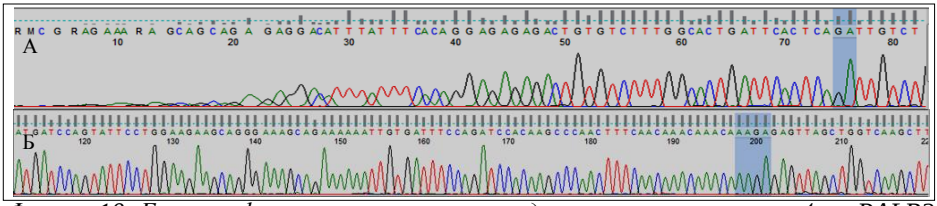
Генетичният анализ за наличието на мутациите c.509_510delGA в *PALB2* и c.2992_2995delAAGA в *BRIP1* беше направен с помощта на директно секвениране при използването на автоматичен секвенатор ABI Prism 3130 xl (AppliedBiosystems) и последващ анализ на получените резултати с SeqScape, Sequencing analysis и FinchTV софтуерни програми.

- *Молекулно-генетичен анализ за носителство на мутацията c.509_510delGA в PALB2 гена.* PALB2 (partner and localizer of BRCA2) е туморсупресорен ген, кодиращ белтък, който се колокализира и свързва с BRCA2 в клетъчното ядро и вероятно стабилизира вътренулкеарната локализация на BRCA2 белтъка (Park JY et al, 2014). Хетерозиготни мутации в *PALB2* гена се свързват с предразположение към развитието на рак на гърдата и рак на панкреаса (Casadei S et al, 201). Относителният кумулативен риск за развитие на рак на гърдата при носителство на герминативна мутация в *PALB2* генът е изчислен на 2.3 пъти (95% CI [1.5 4,2) до навършване на 55 годишна възраст и 3.4 пъти (95%CI [2.4-5.9]) до навършване на 85 годишна възраст, респективно (Casadei S et al, 2011). Една от най-често срещаните мутации в *PALB2* гена е c.509_510delGA. Тази мутация също така е открита в немската, полската, руската и чешката популации, което води до предположението, че вероятно е с произход от Централна Европа (Casadei S et al, 201).

При проведеният молекулярно-генетичен анализ при *BRCA1/2* негативни пациентки с фамилен рак на гърдата не беше установена мутацията c.509_510delGA в *PALB2* гена ***(фигура 10а)***.

- *Молекулно-генетичен анализ за носителство на мутацията c.2992-2995delAAGA в екзон 20 на BRIP1 гена*. BRIP1 (BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1) генът кодира белтък, който се отнася към RecQ DEAH хеликазното семейство. Белтъкът взаимодейства с BRCT домена на BRCA1 като така формиралият се комплекс е важен за нормалното функциониране на BRCA1 по време на поправката на двойноверижни скъсвания в ДНК. Една от установените чести мутации в *BRIP1* е делецията c.2992-2995delAAGA в екзон 20 на гена (Cantor SB et al, 2011). Тя е установена за пръв път в италианската

популация и води до изместване рамката на четене и появата на преждевременен стоп кодон в позиция 1057, съответно синтез на скъсен белтъчен продукт. (Cantor SB et al, 2011).



Фигура 10. Електрофореограма на нуклеотидна секвенция на екзон 4 на PALB2 гена (А) и екзон 20 на BRIP1 гена (Б), изработени на автоматичен секвенатор ABI Prism 3130 xl Applied Biosystems при оптимални условия на анализа. Със синьо на електофореграмата е отбелязано мястото на търсената мутация.

При проведения молекулярно-генетичен анализ при *BRCA1/2* негативни пациентки с фамилен рак на гърдата не беше установена мутацията c.2992-2995delAAGA в *BRIP1* гена ***(фигура 10б)***.

4.7. Анализ на полиморфни варианти с ниска пенетрантност, асоциирани с предразположение за развитие на рак на гърдата

В изследването бяха включени 150 пациенти с фамилен рак на гърдата и 240 здрави контролни индивида. В избраната група беше проведено асоциативно проучване на осем полиморфни варианта (rs2981579, rs2981582, rs 889312, 1056836, rs3757318, rs2180341, rs3803662 и rs 4973768) в гени с ниска пенетрантност, които по литературни данни се свързват са предразположение за развитието на рак на гърдата.

4.7.1. Генетичен анализ на полиморфни варианти rs2981579 и rs2981582 във *FGFR2* гена

Генът *FGFR2* кодира рецептор на фибробластния фактор на растежа (www.omim.org, L97)

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, $P= 10^{-13}$), във *FGFR2* гена се асоциират с риска за развитие на рак на гърдата (Turnbull C et al, 2010; Peng S et al, 2011).

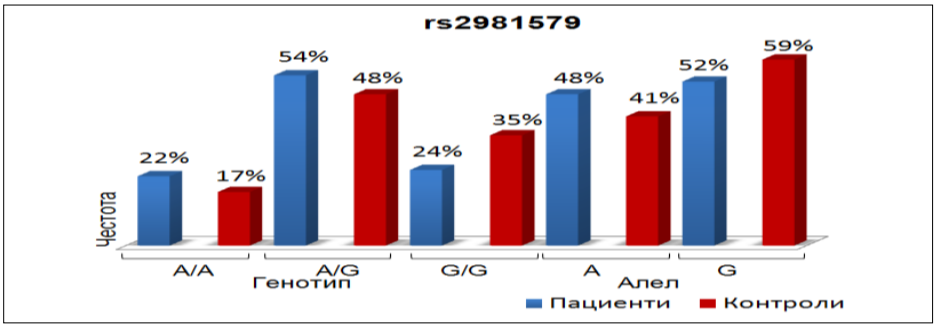
Асоциативното проучване на полиморфните варианти rs2981579 и rs2981582 във *FGFR2* гена при изследваната група от български пациентки с рака на гърдата и контроли потвърди тяхната асоциация с риска от развитие на рак на гърдата ***(фигура 11).***

Статистическият анализ на този полиморфизъм показа значима асоциация на алела А с риска от развитие на рак на гърдата в изследваната от нас група пациенти-контроли. Носителство на един А алел беше отчетено в 48% от пациентките и в 40.5% от контролната група и показа 1.398 (95% CI.1.064 – 1.836) пъти повишен риск за развитие на рак на гърдата (OR=1.39, p=0.01), докато генотипът A/A се среща при 22% от болните и 17% от здравите жени и се асоциира с аналогичен риск (OR=1.369; p=0.216), който не достигна статистическа значимост ***(таблица 12, фигура 11).***

Статистическият анализ показа, че носителството на един или два алела G има протективен ефект по отношение на заболяването, съответно наличието на един G показва риск 0.715 (95% CI 0.544 –0.939) за развитието на заболяването (OR = 0.71; p = 0.01), а наличието на генетип G/G показва риск 0.568 (95% CI 0.371 – 0.871) пъти за развитието на заболяването (OR = 0.56; p = 0.01).

Таблица 12. Статистически анализ за асоциация на полиморфизъм rs2981579 с рака на гърдата в изследваната извадка пациенти/контроли от Българската популация

Генотип/ Алел	Пациенти	Контроли	OR	$P_{(one_tailed)}$	$P_{(two_tailed)}$	$P_{(Pearsan)}$
A/A	42 (22%)	39 (17%)	1.369	0.125	0.216	0.203
A/G	105 (54%)	110 (48%)	1.312	0.09	0.173	0.167
G/G	46 (24%)	82 (35%)	0.568	0.006	0.01	0.009
A алел	189(48%)	188 (40.5%)	1.398	0.009	0.01	0.01
G алел	197 (52%)	274(59.5%)	0.715	0.009	0.01	0.01



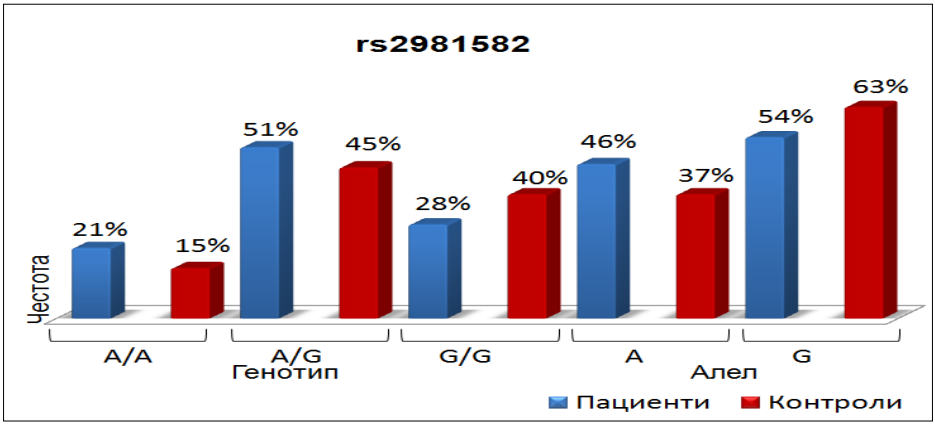
Фигура 11. Процентно разпределение на получените генотипни варианти в изследваната извадка пациенти/контроли

В изследваната от нас извадка носителство на по-редкия A/A генотип на rs2981582 беше установено при 21% от пациентките и 15% от здравите жени, докато хетерозиготните A/G носители бяха наблюдавани с честота 51% при пациентки и при 45% от контролите. Статистическият анализ показа 2.084(95% CI 1.250 – 3.474) пъти повишен риск за развитие на рак на гърдата

при носителството на два А алела (OR=2.084, p=0.003), и 1.464 ((95% CI 1.111 – 1.930) пъти повишен риск при носителство на един А алел (OR=1.464, p=0.007) ***(таблица 13, фигури 12)***

Таблица 13. Статистически анализ за асоциация на полиморфизъм rs2981582 с рака на гърдата в изследваната извадка пациенти/контроли от Българската популация

Генотип/ Алел	Пациенти	Контроли	OR	$P_{(one_tailed)}$	$P_{(two_tailed)}$	$P_{(Pearsan)}$
A/A	40 (21.%)	35 (15%)	2.084	0.004	0.007	0.007
A/G	96 (51%)	102 (45%)	0.885	0.106	0.202	0.178
G/G	54 (28%)	95 (40%)	0.572	0.003	0.007	0.007
A алел	176 (46%)	172 (37%)	1.464	0.004	0.007	0.006
G алел	204 (54%)	292(63%)	0.682	0.004	0.007	0.006



Фигура 12. Процентно разпределение на получените генотипни варианти в изследваната извадка пациенти/контроли

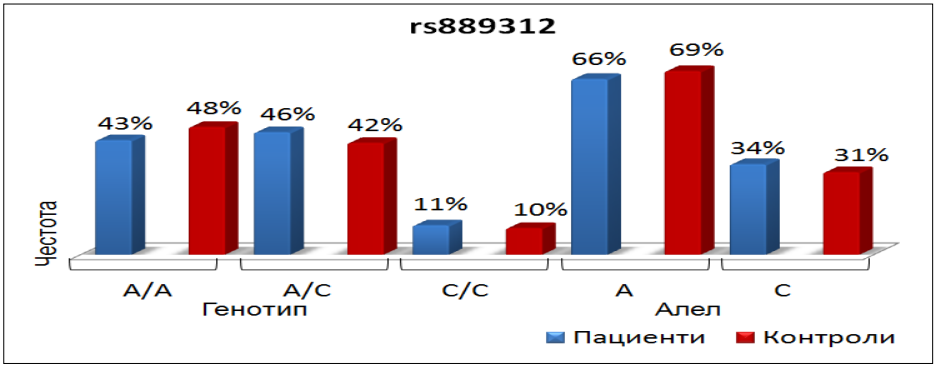
4.7.2. Генетичен анализ на полиморфен вариант rs 889312 в *MAP3K1* гена

Митоген активираната протеин киназа киназа 1 е ензим, който при хората се кодира от *MAP3K1* гена. MAP3K1 (MEK) е серин/треонинова киназа, имаща основна роля при фосфорилирането на ензими, свързани с клетъчния отговор, растежни фактори, митогенни и метаболитни стимули. До този момент асоциация с предразположение за развитие на рак на гърдата е установена при полиморфен вариант rs889312, като е изчислено, че рискът за развитие на заболяването при носителството на A/C генотип е 1.22 пъти (OR 1.22 (95%CI 1.14-1.30; $P=4.6x10^{-9}$) (Turnbull C et al, 2010). При асоциативния анализ на този полиморфизъм в изследваната от нас група от пациентки с рак на гърдата и

контроли вариантът A/C беше установен при 46% от пациентките и 42% от контролната група, а носителството на два C алела при 11% от пациентите и 10% от контролната група ***(таблица 14, фигура 13)***.

Таблица 14. Статистически анализ за асоциация на полиморфизма rs889312 с рака на гърдата в изследваната извадка пациенти/контроли от Българската популация

Генотип/ Алел	Пациенти	Контроли	OR	$P_{(one_tailed)}$	$P_{(two_tailed)}$	$P_{(Pearsan)}$
A/A	83 (43%)	113(48%)	0.822	0.184	0.329	0.319
A/C	88 (46.%)	98 (42%)	1.185	0.221	0.431	0.386
C/C	20 (11%)	23 (10%)	1.073	0.475	0.872	0.832
A алел	254(66%)	324 (69%)	0.881	0,218	0,416	0,396
C алел	128 (34%)	144 (31%)	1.133	0.218	0.416	0.396



Фигура 13. Процентно разпределение на получените генотипни варианти в изследваната извадка пациенти/контроли

В изследваната от нас извадка носителство на A/C генотип показа риск за развитие на заболяването 1.185 (95% CI 0.806 – 1.742), но резултатът не достигна статистическа значимост (OR=1.185, p=0.431). Статистическият анализ показа и 1.133 (95% CI 0.849 – 1.541) повишен риск за развитие на заболяването и при носителство на C алел, но резултатът също не достигна статистическа значимост (OR=1.133, p=0.416) ***(фигура 14).***

4.7.3. Генетичен анализ на полиморфен вариант rs1056836 в *CYP1B1* гена

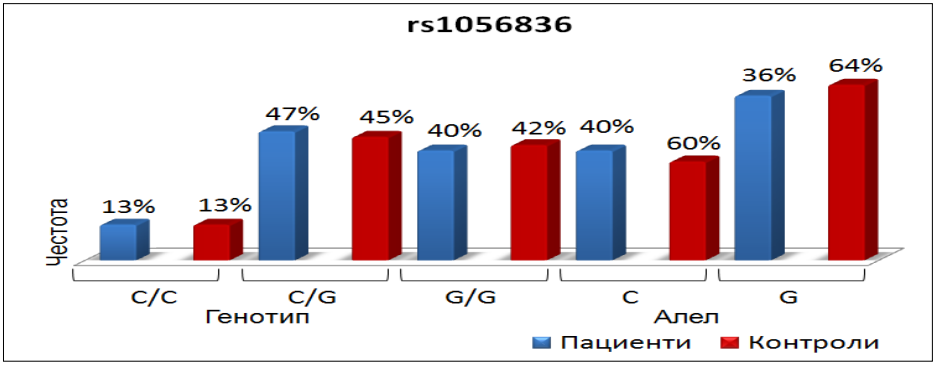
При човека се експресират три вида на CYP1 ензими: CYP1A1, CYP1A2, и CYP1B1. Полиморфизмите в *CYP1B1* според редица проучвания са показали асоциация с развитието на определени типове карциноми. При човека, в млечната жлеза, CYP1A1 и CYP1B1 превръщат естрадиола главно в 2-

хидроксиестрадиол (2-OHE2) и 4-хидроксиестрадиол (4-OHE2). Въпреки, че той е активен и в нормални тъкани, неговата експресия в туморни клетки е много по-висока и за това полиморфизмите в *CYP1B1* вероятно са рисков фактор за възникване на естроген зависим рак, което се дължи на ролята на ензима в генотоксичния метаболизъм на естрогените (Jordan VC et al, 2000). Полиморфният вариант rs1056836 представлява аминокиселинна замяна на Lev с Val в кодон 432 (L432V) е от типа missense (Huang Y et al, 2009). В настоящото проучване вариантът L432V беше установен в 53.4% от пациентките с рак на гърдата и при 44.2% от контролната група ***(фигура 14).***

При проведеният асоциативен анализ не беше установена статистически значима асоциация rs1056836 с развитие на заболяването ***(таблица 15)***.

Таблица 15. Статистически анализ за асоциация на полиморфизъм rs1056836 с рака на гърдата в изследваната извадка пациенти/контроли от Българската популация

Генотип/ Алел	Пациенти	Контроли	OR	$P_{(one_tailed)}$	$P_{(two_tailed)}$	$P_{(Pearsan)}$
C/C	24 (13%)	29(13%)	1.034	0.512	1	0.920
C/G	82 (47%)	99(45%)	1.057	0.431	0.839	0.777
G/G	70 (40%)	91(42%)	0.820	0.191	0.361	0.329
C алел	130 (40%)	157(36%)	1.020	0.474	0.940	0.887
G алел	228 (60%)	281(64%)	0.979	0.474	0.940	0.887



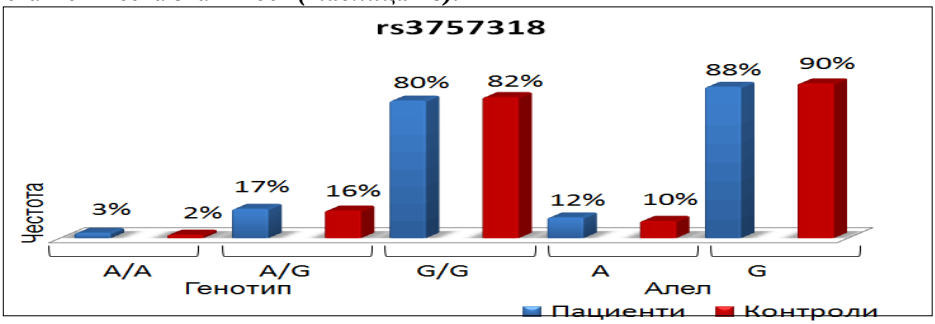
Фигура 14. Процентно разпределение на получените генотипни варианти в изследваната извадка пациенти/контроли

4.7.4. Генетичен анализ на полиморфен вариант rs 3757318 в хромозомен локус C6orf9

Целогеномните асоциативни проучвания идентифицираха SNPs в три локуса, показали значима асоциация с предразположението към рак на гърдата:

6q25.1, LSP1 и 8q24 (Thomas G et al, 2009). От тези полиморфни варианти, най-висока асоциация със заболяването показва rs3757318, ($P = 2.9 \times 10^{-6}$), който е разположен на около 200 кв „upstream" от *ESR1* в хромозомен локус C6orf97. При европейци rs3757318 показва слаба корелация с предразположението за развитие на заболяването (Thomas G et al, 2009).

В настоящото проучване полиморфизмът rs3757318 беше установен при 29% от българските пациентки с рак на гърдата и 16% от здравите жени, също така беше установено, че 3% от пациентите и 2% от контролите са хомозиготи по отношение на алела A, което е изключително рядко срещано в европейската популация ***(фигура 15).*** Носителството на два A алела показва 2.056 (95% CI 0.571 – 7.403) пъти повишен риск за развитие на рак на гърдата (OR = 2.056; p= 0.336), докато носителството на G алел вероятно има протективен ефект (OR = 0.795 (95% CI 0.508 – 1.244); p= 0.356), но резултатите не достигнаха статистическа значимост ***(таблица 16).***



Фигура 15. Процентно разпределение на получените генотипни варианти в изследваната извадка пациенти/контроли

Таблица 16. Статистически анализ за асоциация на полиморфизма rs3757318 с рака на гърдата в изследваната извадка пациенти/контроли от Българската популация

Генотип/ Алел	Пациенти	Контроли	OR	$P_{(one_tailed)}$	$P_{(two_tailed)}$	$P_{(Pearsan)}$
A/A	6 (3%)	4 (2%)	2.056	0.210	0.333	-
A/G	29 (17%)	37 (16%)	1.066	0.457	0.891	0.806
G/G	138 (80%)	192 (82%)	0.842	0.292	0.521	0.502
A алел	41 (12%)	45(10%)	1.257	0.186	0.356	0.314
G алел	305 (88.%)	421(90%)	0.795	0.186	0.356	0.314

4.7.5. Генетичен анализ на полиморфен вариант rs2180341 в RNF146

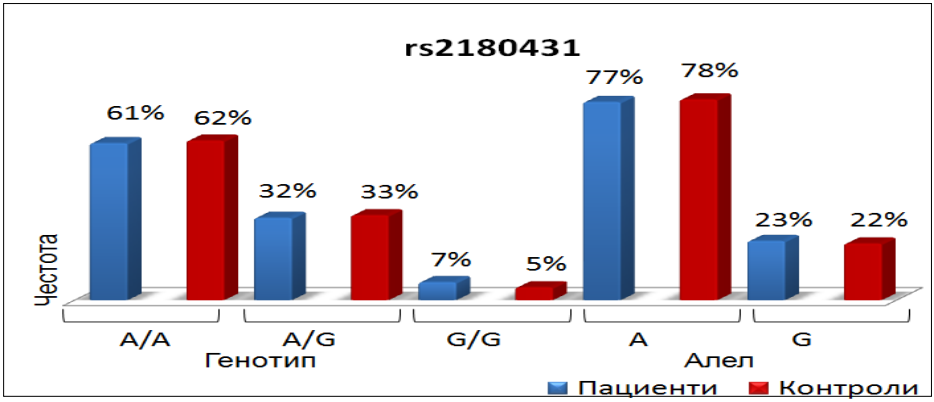
Установено е че RNF146 участва в WNTβ-катенин сигналния път. Wnt сигналния път има основна роля в ембрионалното развитие и хомеостазата в тъканите. Поради тази причина дерегулацията на този път много често се асоциира с ракови заболявания (Чичинадзе КН и съавт.)

При проведения генетичен анализ за rs2180341 в група от пациентки с еврейски произход е намерена статистически значима асоциация с рака на гърдата (OR=1.19 95% CI 1.04-1.35; p=0.01).

В настоящото проучване полиморфизмът rs2180341 беше установен при 32% от българските пациентки с рак на гърдата и 33% от здравите жени, също така беше установено, че 7% от пациентите и 5% от контролите са хомозиготи по отношение на G алела. Асоциативният анализ на полиморфизма rs2180341 в групата от български пациентки с рак на гърдата и контроли не показа статистически значима асоциация със заболяването ***(таблица 17, фигура 16*)**.

Таблица 17. Статистически анализ за асоциация на полиморфизма rs2180341 с рака на гърдата в изследваната извадка пациенти/контроли от Българската популация

Генотип/ Алел	Пациенти	Контроли	OR	$P_{(one_tailed)}$	$P_{(two_tailed)}$	$P_{(Pearsan)}$
A/A	117 (61%)	137 (62%)	0.992	0.525	1	1
A/G	61 (32%)	74 (33%)	0,994	0.435	0.833	0.791
G/G	13 (7%)	12(5%)	1.284	0.343	0.679	0.543
A алел	295 (77%)	646 (78%)	0.960	0.436	0.867	0.806
G алел	87 (23%)	69 (22%)	1.041	0.436	0.867	0.806



Фигура 16. Процентно разпределение на получените генотипни варианти в изследваната извадка пациенти/контр

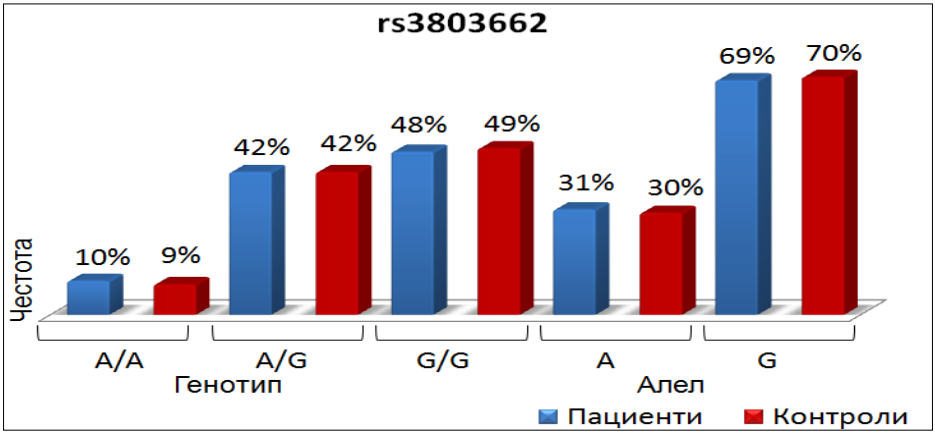
4.7.6. Генетичен анализ на полиморфен вариант rs3803662 в *TOX 3* гена

TOX3/TNRC9 участва в регулацията на ДНК-зависими процеси, като транскрипция, репликация, поправката и ремоделирането на хроматиновата структура (O'Flaherty E et al, 2003). Полиморфният вариант rs3803662 се асоциира с развитието на рак на гърдата. При проведените от групата на Easton големи асоциативни проучвания от типа случаи-контроли (GWAS) рискът за

развитие на рак на гърдата при носителство на варианта G/A е 1.30 пъти (OR = 1.30; p=3.10^{-15}) (Turnbull C et al, 2010; Antotiou A et al, 2010). В изследваната от нас извадка вариантът G/A се среща с приблизително еднаква честота както при пациентките с рак на гърдата, 42%, така и при здравите жени, 42%,***(таблица 18, фигура 17).*** Направеният статистически анализ на полиморфизма rs3803662 не показа статистически значима асоциация със заболяването.

Таблица 18. Статистически анализ за асоциация на полиморфизма rs3803662 с рака на гърдата в изследваната извадка пациенти/контроли от Българската популация

Генотип/ алел	Пациенти	Контроли	OR	$P_{(one_tailed)}$	$P_{(two_tailed)}$	$P_{(Pearsan)}$
A/A	20 (10.%)	21 (9%)	1.190	0.355	0.623	0.596
A/G	80 (42%)	100 (42%)	0.971	0.480	0.921	0.887
G/G	92 (48%)	115 (30%)	0.968	0.472	0.922	0.867
A алел	120 (31%)	142 (30%)	1,056	0.384	0.765	0.708
G алел	264 (69%)	330 (70%)	0.946	0.384	0.765	0.708



Фигура 17. Процентно разпределение на получените генотипни варианти в изследваната извадка пациенти/контрол

4.7.7. Генетичен анализ на полиморфен вариант в SLC4A7 гена

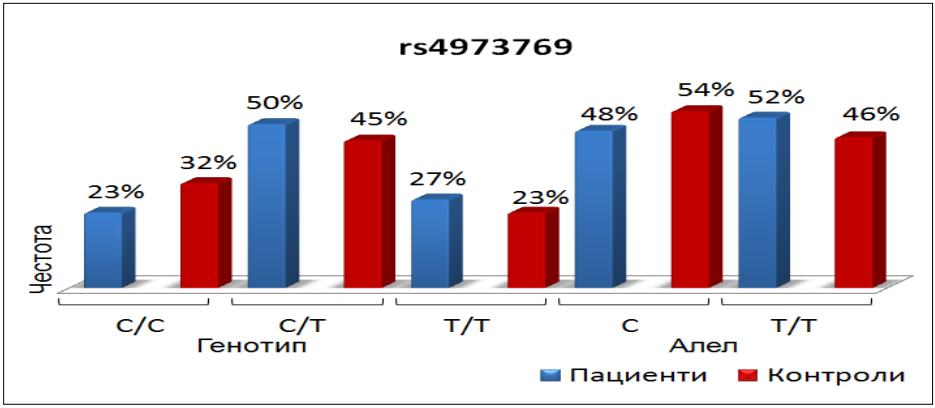
SLC4A7 гена за бикарбонатния котранспортер е локализиран в трета хромозома. Регулира вътреклетъчното pH и играе роля при транспорта на натриев бикарбонат при секреторните епителни клетки.

Проведеният статистически анализ показа, че C/C генотипа вероятно е с протективен ефект 0.642 (95% CI 0.414-0.994) за развитието на заболяването (OR = 0.642; p=0.04) ***(таблица 19, фигура 18).***

Таблица 18. Статистически анализ за асоциация на полиморфизма rs3803662 с рака на гърдата в изследваната извадка пациенти/контроли от Българската популация

Генотип/ Алел	Пациенти	Контроли	OR	$P_{(one_tailed)}$	$P_{(two_tailed)}$	$P_{(Pearsan)}$
C/C	43 (23%)	75 (32%)	0.642	0.02	0.04	0.04
C/T	93 (50%)	105 (45%)	1.241	0.158	0.280	0.271
T/T	49 (27%)	54(23%)	1.201	0.244	0.426	0.420
C алел	179 (48%)	255 (54%)	0.782	0.04	0.08	0.07
T алел	191 (52%)	213 (46%)	1.277	0.04	0.08	0.07

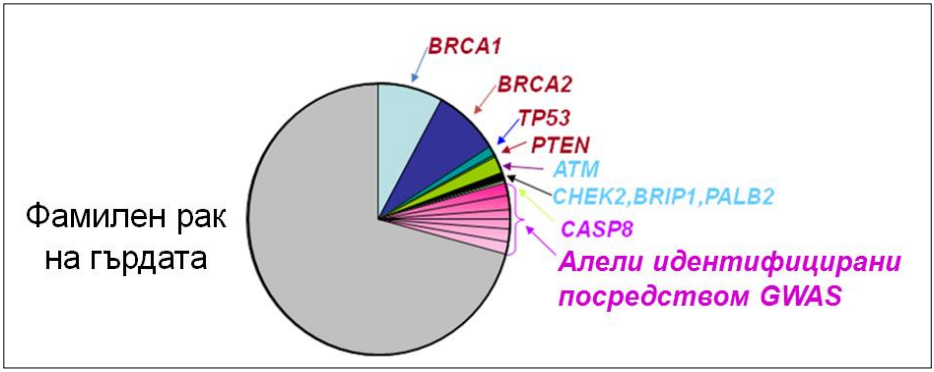
Протеинът се експресира в значителен брой нормални и туморни тъкани, като например: мастна тъкан, мозък, кръв, маточна шийка, ембрионална тъкан, сърце, бъбреци, тумори на гърдата, белия дроб, цервикса, простатата, дебелото черво (www.phosphosite.org, L98). До този момент, по литературни данни, rs4973768 в *SLC4A7* гена се асоциира с рака на гърдата.



Фигура 18. Процентно разпределение на получените генотипни варианти в изследваната извадка пациенти/контроли

V. Обсъждане на получените резултати

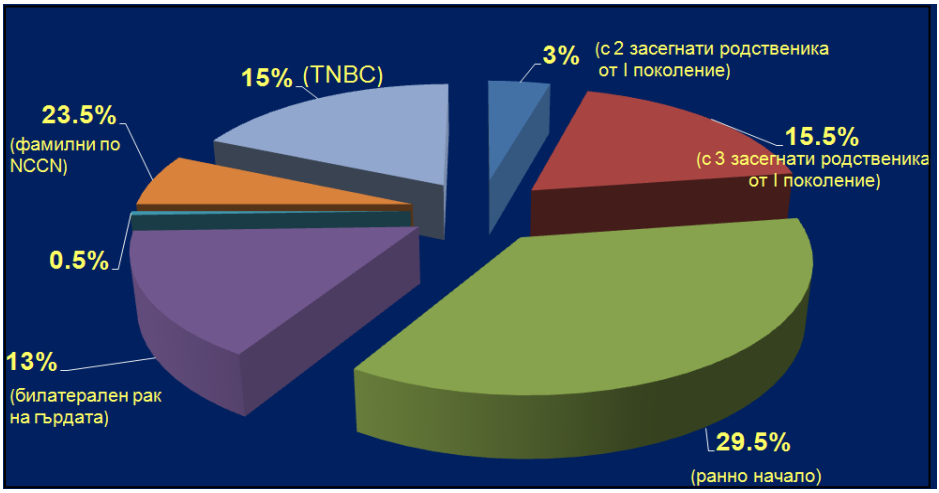
Наследственият компонент при предразположението за развитието на рак на гърдата е обект на интензивни изследвания повече от 20 години. Това доведе до установяването на три отделни категории алели, свързани с предразположението за развитието на заболяването (www.crcl.fr, L99). Повече от 20% от случаите на фамилен рак на гърдата и до 5% от рака на гърдата като цяло са дължат на герминативни мутации в *BRCA1* или *BRCA2* гените. Откритието на тези гени през 90-те години на XX век доведе до разработването на диагностични тестове за скрининг при индивиди с фамилна история за рак на гърдата и/или яйчниците. В допълнение са идентифицирани и други гени/алели, имащи отношение за предразположение за развитие на рак на гърдата, което ще позволи да се изяснят биологичните механизми на туморогенезата при това заболяване. Въпреки големия напредък и многобройните усилия до 50% от генетично предразположение за развитието на рак на гърдата остава неизяснено ***(фигура 19)*** (Balman J et al, 2010; Easton D, 1997; Ellis NA et al, 2007; Rosman DS et al, 2007).



Фигура 19. Гени свързани с предразположението за развитие на рак на гърдата (www.crcl.fr, L99)

В настоящето изследване беше проведен анализ на гени от трите основни групи с цел изясняване на молекулярно-генетичните механизми на фамилния рак на гърдата при български пациенти. За изпълнението на тази цел бяха изследвани 200 пациенти с фамилен рак на гърдата, отговарящи на установените международни критерии и 240 клинично здрави индивиди, без фамилна история на онкологични заболявания, отговарящи на пациентите по пол, възраст и етническа принадлежност. От общия брой пациенти 18.5% бяха с фамилна история за рак на гърдата според BCLC критериите - с два или три засегнати родственика от първо поколение, 29.5% бяха с ранно начало, под 40 годишна

възраст, 13% - с билатерален рак на гърдата, 23.5% с фамилна история за онкологични заболявания, но според NCCN критериите и 15% бяха с тройно негативен карцином на гърдата, без фамилна история ***(фигура 20).***



Фигура 20. Разпределение на болните спрямо BCLC и NCCN критериите

За изясняване на молекулярно-генетичните механизми на фамилния рак на гърдата при български пациентки беше проведен мутационен скрининг чрез директно секвениране на *BRCA1* и *BRCA2* гените, анализ за големи делеции и дупликации в *BRCA1* и *BRCA2* гените с MLPA (мултиплексен анализ на лигирани проби), потвърждение на мутации с патогенен ефект със секвениране от ново поколение, с цел въвеждането му в клиничната практика, секвенционен анализ на най-често докладваните по литературни данни мутации в гени с междинна пенетрантност *PALB2* и *BRIP1* и асоциативно проучване от тип случаи-контроли на полиморфни варианти в гени с ниска пенетрантност.

5.1. Мутационен скрининг на BRCA1 и BRCA2 гените при пациенти с фамилен рак на гърдата и яйчниците

Мутации в *BRCA1* и *BRCA2* гените обясняват около 15 до 20% от фамилните случаи на рак на гърдата. Честотата на *BRCA* мутациите при пациентите с рак на гърдата без фамилна анамнеза са съответно 1-7% за *BRCA1* и 1-3% за *BRCA2* (Balman J et al, 2010).

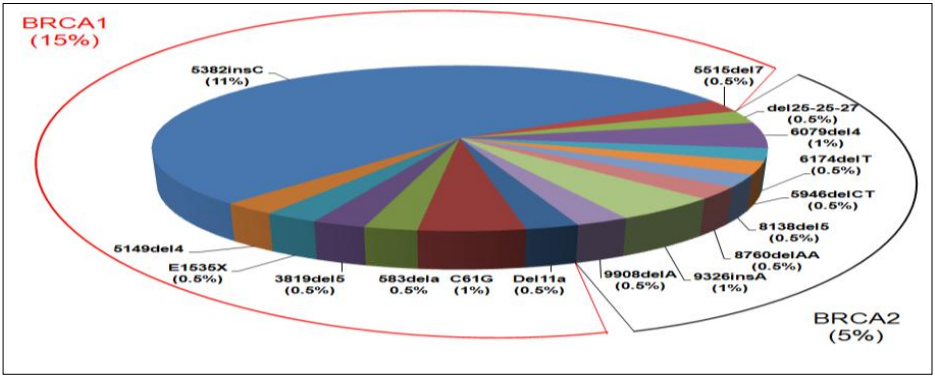
Докладваните мутации са разпръснати по цялата кодираща последователност на двата гена, без очевидни горещи точки (hot spots). Повечето от тях са малки инсерции, делеции и безсмислени (“nonsence”), предизвикващи

появата на преждевременен стоп кодон и синтез на скъсен белтъчен продукт (Narod SA et al, 2010). Този тип мутации са около 70% при *BRCA1* гена и 90% при *BRCA2* гена. Друга част от докладваните мутации са големи пренареждания – делеции и дупликации на повече от 500 килобази от ДНК засягащи един или повече екзони (Narod SA et al, 2010).

В зависимост от популацията честотата на мутациите варира в двата гена, но средно е 1/800. Изчислено е, че популационен риск при наличието на мутация в *BRCA1* гена до навършване на 70 годишна възраст е средно 65% за развитието на рак на гърдата и до 36% за развитието на овариален карцином (Antoniou AC et al, 2003; Antoniou AC et al, 2004). Редица автори посочват по-нисък риск за развитието на рак на гърдата или яйчника при носителство на мутация в *BRCA2* гена (Bougie1 O et al, 2011). Направеният молекулярно-генетичен анализ за наличието на мутации при български пациентки с фамилен рак на гърдата доведе до откриването на 32 различни варианта в *BRCA1* гена и 35 различни варианта в *BRCA2* гена: 12 от типа изместване рамката на четена (frameshift), 1 безсмислена (nonsense), 25 от типа промяна на смисъла (missense), 2 в нетранслиращи се региони на гените (UTR), 1 IFD, 10 синонимни замени и 14 интронни варианта. В допълнение бяха установени и две големи делеции – една в екзон 11 на *BRCA1* гена и друга, обхващаща езони 25, 26 и 27 на *BRCA2* гена. Установените варианти в зависимост от ефекта, който оказват върху заболяването бяха класифицирани в три групи: патогенни, с неясен клиничен ефект и непатогенни.

5.1.1. Мутации с доказан патогенен ефект за развитието на рак на гърдата

В BIC базата данни до този момент са докладвани 15 311 варианта в *BRCA1* гена и 14 914 варианта в *BRCA2* гена (www. research.nhgri.nih.gov, L100). В настоящото проучване бяха установени 16 мутации с патогенен ефект, отговорни за развитието на рак на гърдата: 8 в *BRCA1* гена ***(c.3700_3704delGTAAA, c.5030_5033delCTAA, c.5263_5264insC, c.464delA, c.5397_5403delCCCTTGG, c.4603G>T, c.181T>G и BRCA1 del exon 11A)*** и 8 в *BRCA2* гена ***(c.5851_5854delAGTT, c.5946delT, c.5718_5719delCT, c.8532_8533delAA, c.7910_7914delCCTTT, c.9098_9099insA, c.9682delA и BRCA2 del exons 25- 27 (фигура 21).*** От изследваните 200 пациенти при 20% (40/200) бяха установени патогенни мутации, съответно 70% в *BRCA1* и 30% в *BRCA2* гена, което е в съответствие с литературните данни за други популации. По-голяма част от мутации в тази група, 18% (36/200) бяха класифицирани като мутации, водещи до изместване рамката на четене (frameshift), водещи до преждевременно появяване на стоп кодон и синтез на скъсен белтъчен продукт с нарушена функция. Пациентките, при които установихме патогенни мутации в *BRCA1* и *BRCA2* гена бяха със средна възраст на диагностициране на заболяването 46 (29 - 63), 45.5 години (30 – 61), съответно, а средната възраст на пациентите без установена мутация беше 49.6 (24 – 74).

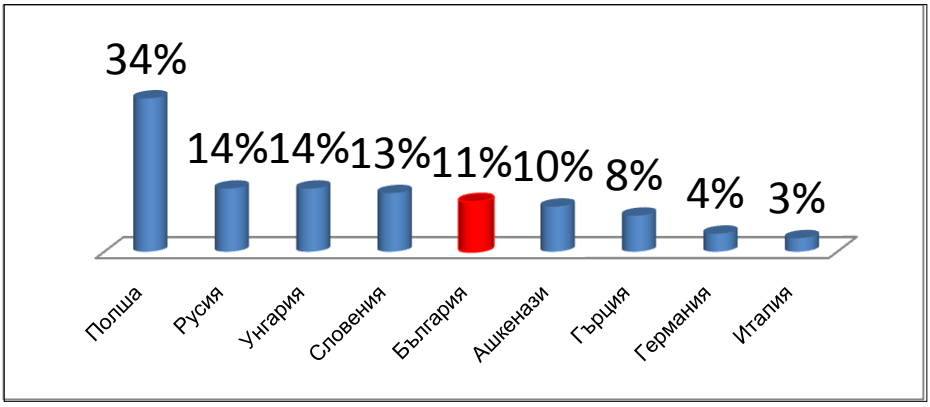


Фигура 21. Процентно разпределение на мутациите с патогенен ефект при Български пациентки с фамилен рак на гърдата

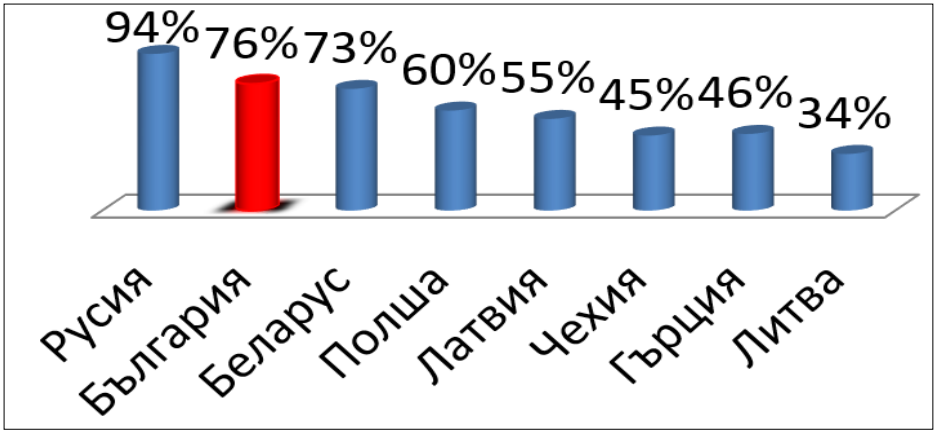
С най-висока честота, при 11% (22/200) от пациентите беше наблюдавана мутацията c.5263_5264insC (5382insC) в екзон 20 на *BRCA1* гена ***(фигура 22).*** Тя е с ефект на основателя в някои популации на Източна и Централна Европа и е втората по честота при източноевропейското еврейско семейство Ашкенази (AJ). Установява се с високи честоти в рискови за развитието на рак на гърдата/яйчника семейства в Полша (34%), Русия (14%), Унгария (14%), Словения (13%), AJ (10%), Гърция (8%), Германия (4%) и Италия (3%) (Janavičius R et al, 2010***) (фигура 22)***.

Честота на c.5263_5264insC, спрямо всички останали мутации в *BRCA1* гена, е различно висока в европейските копулации, като в Русия тя е 94%, в Беларус 73%, Полша 60%, Латвия 55%, Чехия 42%, Гърция 46% и Литва 34% (Janavičius R et al, 2010). Мутацията е установена с по-ниски честоти сред другите балкански популации като Румъния, Турция, Сърбия и Македония, но без да проявява ефект на основателя. Нашите резултати показват, че България е втората балканска държава, след Гърция, в която c.5263_5264insC има ефект на основателя и представлява 76% (22/29) от всички установени мутации в *BRCA1* гена и 11% от всички открити и мутации в двата гена ***(фигура 23)***.

В началото c.5263_5264insC е била установена при AJ, но направеният неотдавна хаплотипен анализ показва, че тя най-вероятно произхожда от Северна Русия или Скандинавия, на възраст е между 1800 и 1500 години и в последствие се е разпространила от изток на запад в почти целия свят. Общ прародител на тази мутация е установен в семейства от Европа, Бразилия, Северна Америка и Индия (Hame N et al, 2003). Ние предполагаме, че в Българската популация тя също има славянски произход.



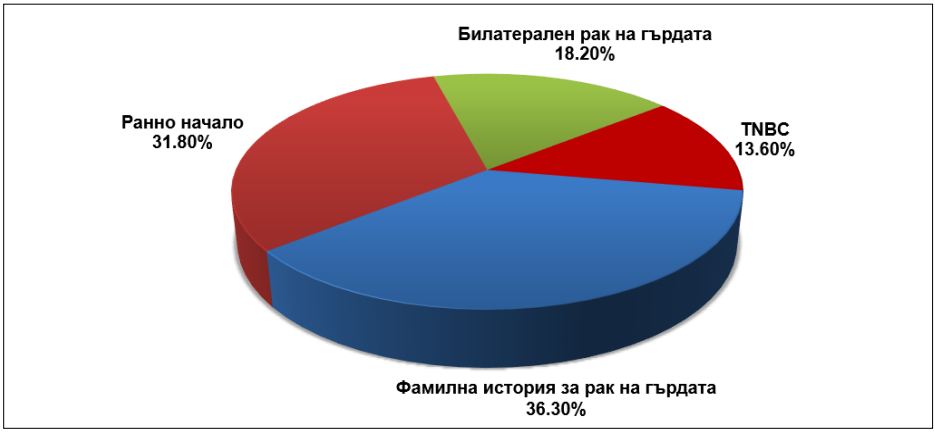
Фигура 22. Процентно съотношение на c.5263_5264insC (5382insC) в Българската популация спрямо всички установени BRCA1/2 мутации, сравнено с други европейски популации



Фигура 23. Процентно съотношение на c.5263_5264insC (5382insC) спрямо останалите BRCA1 мутации в българската популация, сравнено с други европейски популации

В изследваната група c.5263_5264insC (5382insC) беше установена при 11% (22/200) от пациентите с рак на гърдата, разпределени както следва: 36.3% (8/22) с фамилна история, 31.8% (7/22) с ранно начало, 18.2% (4/22) с билатерален карцином и 13.6% (3/22) с тройно негативен карцином. Мутацията беше установена при две родственици с овариален карцином и седем здрави

родственика. Разпределението на мутацията по отношение на клиничните показатели е представено на ***фигура 24***



Фигура 24. Разпределение на мутацията c.5263_5264insC (5382insC) при пациентите с рак на гърдата по клинични показатели

След c.5263_5264insC (5382insC), мутацията c.181T>G (C61G) е втората по честота в Полша, където двете мутации са с честота 70 - 90% от всички мутации в *BRCA1* гена, установени в тази популация (Janavičius R et al, 2010). Относителният й дял спрямо всички установени мутации в *BRCA1* гена варира в различните Европейски страни, - Австрия (15%), Словения (18%), Германия (38%), Чехия (9%), Унгария (48%) (Janavičius R et al, 2010). Мутацията се среща с висока честота в страни като Русия, Беларус и Латвия (Janavičius R et al, 2010). Мутацията е локализирана в екзон 5 на *BRCA1* гена и води до нарушение на убиквитин лигазната функция на белтъка. В настоящото проучване тя беше установена при 1% от българските пациенти (2/200) - при пациентка с тройно негативен карцином и при пациентка с фамилна анамнеза за онкологични заболявания и ранно начало ***(таблица 20)***.

В допълнение на тези две мутациите в *BRCA1* бяха установени още 6 мутации с патогенен ефект, с индивидуална честота 0.5% (1/200). Това бяха мутациите c.3700_3704delGTAAA (3819del5), c.5030_5033delCTAA (5149del4), c.4603G>T (E1535X), c.464delA (583delA), c.5396_5402 delCCCTTGG (5515del7) и BRCA1deletion exon 11a. Локализацията на установените в BRCA1 мутации е показана на ***фигура 24.***

Таблица 20. Клинични данни на пациентите с мутация в BRCA1 гена

ВС №	Mutation (HGVS)	Диагноза		ER	PR	HER2	TNM	Родственици с онкологични заболявания
		ВС	II Ca					
28	c.181 T>G	BBC (52/60)	OC (52)	NA	NA	NA	NA	Брат - рак на костите (47)
132	c.181 T>G	IDC (39)		-	-	-	pT1pN0M0	Баба- ВС (60), майка - ВВС (32/40)
134	c.464delA	IDC (54)		-	-	-	pT1N1M0	Леля - ВС (47), баба и сестра на - ВС(NA), баща - LC (NA)
37	c.4603G>T	IDC (37)	FtC (41)	-	-	-	pT1cN1M0	Дядо - РС (76), дядо - LC (69), баба - CRC (60)
194	c.5030_5033 delCTAA	IDC (63)		-	-	-	pT1N0M0	-
6	c.5263_5264 insC	IDC (43)	OC (45)	-	1+	NA	pT2N0Mx	Майка– ВС (50), сестра - ВВС (42/53), баба – ВС and ОС (50)
7	c.5263_5264 insC	BBC (42)		3+ /-	3+/-	1+/1+	pT1N0M0/ pT1bpN1M0	Баба - ВС (76), леля - ВС(81), баща - семином (NA), братовчед с рак на устата (NA)
21	c.5263_5264 insC	IDC (48)	OC (48)	NA	NA	NA	NA	Дядо - GC (70), дядо – ВТ (NA), РС (NA), леля - CGO (50), братовчедка - ВС (54)
140	c.5263_5264 insC	IDC (32)		1+	2+	2+	pT2pN0M0	Майка- ВВС (31/37), баба - ЕС, CRC (50/53), дядо - LC (59), баба- ВС (NA)
143	c.5263_5264 insC	IDC (51)	OC (51)	-	-	-	pT2N0M0	Чичо - РС (68), бабаLC (44),

								братовчедка - ОС (37)
155	c.5263_5264 insC	BC (29)		-	-	-	NA	Баба - BC, ThC (50/70), братовчедка - BC (50), братовчедка - ОС (48)
190	c.5263_5264 insC	IDC (33)		-	-	-	pT1bpN0M0	Баба - BC (47), майка - ОС (52), дядо - CRC (62)
3	c.5263_5264 insC	BC (36)	DC (41)	NA	NA	NA	NA	Баба - BC (NA)
17	c.5263_5264 insC	IDC (34)		2+	2+	NA	NA	-
99	c.5263_5264 insC	IDC (40)	OC (46)	NA	NA	NA	pT1N0M0	Баба – неизвестно онкологично заболяване (> 80), майка- CrC (NA), сестра на майката – Тумор на Paget (на зърното на гърдата) (NA)
111	c.5263_5264 insC	ACC (36)		-	-	-	NA	-
121	c.5263_5264 insC	IDC (34)		-	-	-	pT1N0M0	Баща – тумор в областта на таза (NA), братовчедка - BC (30)
175	c.5263_5264 insC	MBC (33)		-	-	-	pT1cN2M0	-
39	c.5263_5264 insC	BBC (37/55)		NA/-	NA/-	NA/-	NA	Чичо - PrC (66)
79	c.5263_5264 insC	IDC (42)				1+	NA	Баба - GC(70), Майка – BBC (27/30), Чичо –левкемия (67), баба-

								CLv (75)
142	c.5263_5264 insC	IDC (31)		-	-	-	pT1pN0M0	No
152	c.5263_5264 insC	BBC (41)	OC (58)	NA	NA	NA	NA	Майка- BBC (NA)
164	c.5263_5264 insC	IDC (45)		-	-	-	NA	Майка - BC (NA)
204	c.5263_5264 insC	BBC (35/48)		NA	NA	NA	NA	Майка с рак на пикочния мехур под съмнение
73	c.5263_5264 insC	IDLC (53)		-	-	-	pT2pN0M0	Майка - BC (47) и CRC (71)
161	c.5263_5264 insC	IDC (43)		-	-	-	NA	Майка– OC (62)
171	c.5263_5264 insC	BC (53)	OC (NA)	-	-	-	NA	Баба- BC (43), майка- BC (53) и OC (63)
205	c.5396_5402 delCCCTTGG	IDC (51)		-	-	-	pT1pN1M0	Баба - BC (30), баща – PC (NA)

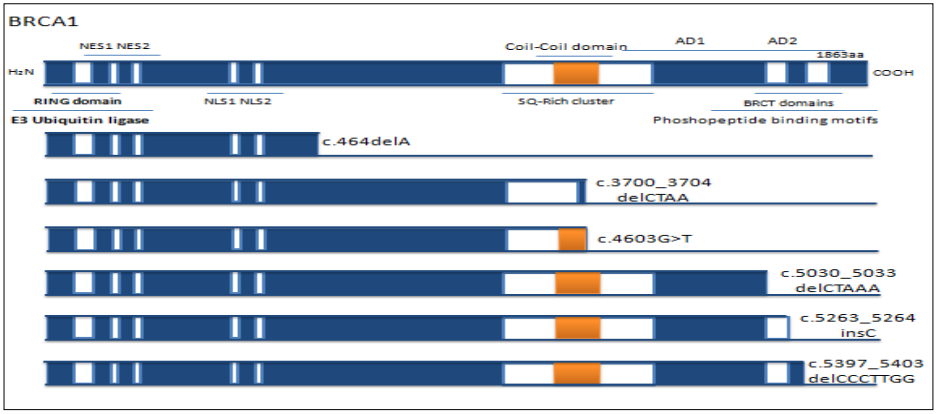
BC№ пореден номер на пациент, DG – диагноза, II Ca – второ онкологично събитие при пациента, BC – рак на гърдата, BBC – билатерален рак на гърдата, IDC – инвазивен дуктален карцином, ILC – инвазивен лобуларен карцином, IDLC – инфилтративен дукто/лобуларен карцином, MBC - медуларен рак на гърдата, ACC – аденоид цистичен карцином, ThC – рак на гърлото, LyC – ларингиален карцином, PC – карцином на простатата, LC – белодробен карцином, CRC – колоректален карцином, PrC – рак на панкреаса, CLv – рак на черния дроб GC – рак на стомаха, OC – овариален карцином, BT – мозъчен тумор, EC – ендометриален карцином, CGO – карцином на половите органи, DC – дисплазия на маточната шийка FtC – карцином на фалопиевите тръби, NA – не е налично, "-" отрицателен за ER, PR and HER2

В *BRCA2* гена също бяха установени 8 мутации с патогенен ефект, отговорни за развитието на рак на гърдата, с обща честота 5%. Локализацията на установените в BRCA2 мутации е показана на ***фигура 25.***

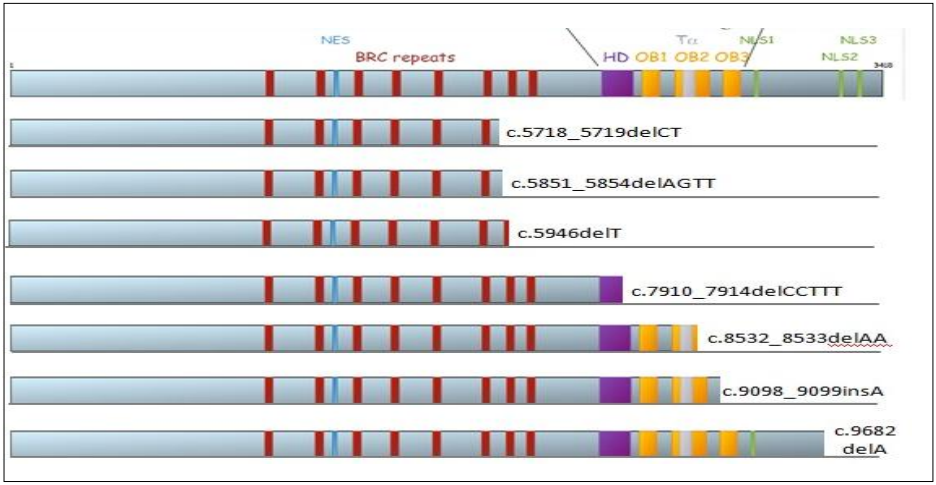
От тях с най-голяма тежест и втората по честота в изследваната група пациенти беше мутацията с. 9098_9099insA в екзон 23. Тя се съобщава като една от най-често срещаните *BRCA1/2* мутации в Германия, където има ефект на основателя (Janavičius R et al, 2010). Заедно с мутацията с.5964delT, тя представлява около 50% от всички открити мутации в Унгария (Janavičius R et al, 2010). На молекулно ниво, с. 9098_9099insA води до появата на преждевремен стоп кодон и загубата на COOH края на белтъка, където са локализиран OB3 и NLS мотивите на белтъка ***(фигура 25).***

В нашето проучване мутацията беше установена с честотата 2% (4/200) при пациентки с фамилен рак на гърдата, диагностицирани на възраст 50 и 61 години, съответно. В допълнение една от пациентите беше с тройно негативен рецепторен профил.

Три от мутациите, c.5851_5854delAGTT, c.5946delT и c.5718_5719delCT бяха установени в екзон 11 на *BRCA2* гена. Делецията c.5851_5854delAGTT се открива в ниски честоти в кохорти от Италия, Индия и азиатски американци (Janavičius R et al, 2010). Ние установихме мутацията при две пациентки - при една пациентка с фамилен рак на гърдата и тройно негативен рецепторен профил и друга с фамилна история за рак на гърдата.



Фигура 24. Доменна локализация на мутациите с патогенен ефект в BRCA1 белтъка



Фигура 25. Доменна локализация на мутациите с патогенен ефект в BRCA2 белтъка

Мутацията c.5946delT беше открита при пациентка с еврейски произход и фамилна история за онкологично заболяване. Пациентката е развила

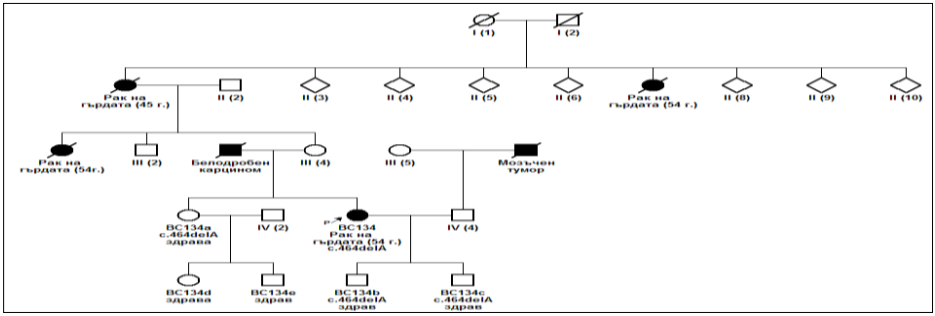
билатерален рак на гърдата и овариален карцином. При направеното изследване за наличието на мутацията в преките родственици на пациентката, мутацията беше установена и при здравата й дъщеря. Тази делеция е често срещана при източноевропейското семейство Ашкенази, а също и в нееврейски популации, например като унгарската (Janavičius R et al, 2010).

Третата мутация в *BRCA2* екзон 11 - c.5718_5719delCT е установена с ниски честоти във високо рискови за рак на гърдата и яйчника семейства от Германия, Великобритания, Северна Америка (Janavičius R et al, 2010). При нас тя беше наблюдавана при пациентка с ранно начало и с фамилна история за рак на гърдата по майчина линия - дядо с рак на ларинкса и баба с меланом. Мутацията беше с честота 0.5% (1/200) в изследваната група пациенти.

В допълнение бяха установени още четири мутации в *BRCA2* гена (c.9982delA (9908delA), c.7910_7914delCCTTT (8138del5), c.8532_8533delAA (8760delAA), и BRCA2 deletion exon 25- 27) бяха с индивидуална честота 0.5% (1/200) (фигура XXX)

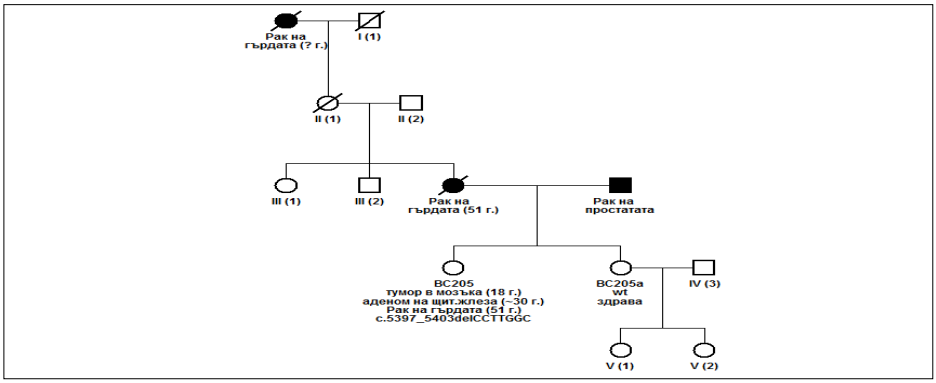
От общия брой установени патогенни мутации четири до този момент не са докладвани в международните източници. Това са c.464delA (583delA), c.5397_5403delCCTTGGC (5517del7), c.8532_8533delAA (8760delAA) и c.9682delA (9908delA).

Мутацията c.464delA (583delA) е локализирана в екзон 8 на *BRCA1* гена и води до преждевременна поява на стоп кодон на позиция 162 и до скъсен белтък с липсата на BRCT домени. Те беше установена при пациентка с тройно негативен карцином на гърдата развил се на 54 годишна възраст и рецидив на заболяването, четири години след поставяне на диагнозата. В семейството бащата и три негови сестри са починали от онкологични заболявания, както следва: баща от лариангиален карцином, две лели от рак на гърдата и една от колоректален карцином. При проведения сегрегационен анализ мутацията беше установена и при здравите синове и сестра на пациентката ***(фигура 26).***



Фигура 26. Родословие на BC134, носителка на мутация c.464delA (583delA) в екзон 8 на BRCA1 гена.

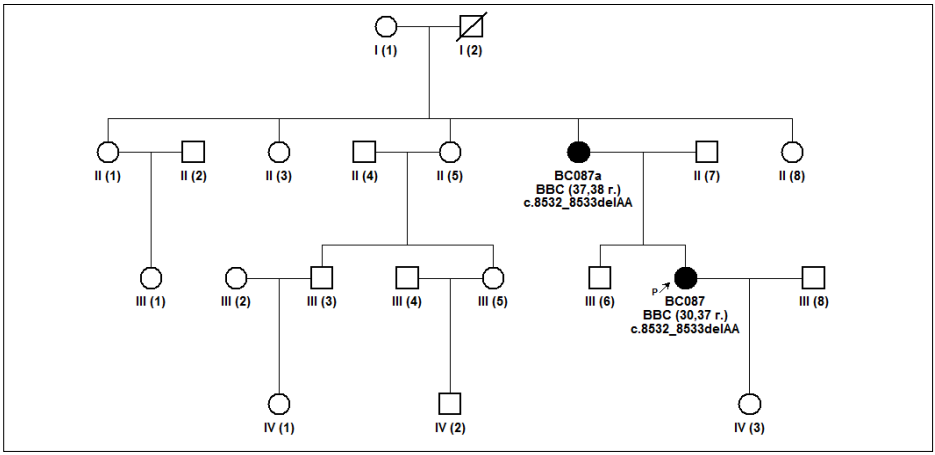
Втората нова мутация в *BRCA1* гена беше c.5397_5403delCCTTGGC (5517del7). Мутацията е локализирана в екзон 22 на *BRCA1* гена и е следствие от делеция на 7 нуклеотида на позиции между 5397 и 5403 в кодиращата последователност на ДНК, кодон 1799. Мутацията беше установена при тройно негативна пациентка с фамилен рак на гърдата, която на 18 годишна възраст е претърпяла мозъчна операция вследствие на доброкачествено мозъчно новообразувание, и до този момент не е докладвана в специализираните литературни и електронни източници ***(фигура 27).***



Фигура 27. Родословие на BC205, носителка.на мутация c.5397_5403delCCTTGGCв екзон 22 на BRCA1 гена.

В *BRCA2* също бяха открити две недокладвани до този момент мутации с патогенен ефект, c.8532_8533delAA (8760delAA) и c.9682delA (9908delA). Мутацията c.8532_8533delAA е локализирана в екзон 20 на *BRCA2* гена и беше установена при пациентка с билатерален карцином на гърдата, развил се на 37 годишна възраст. Откритият вариант беше установен и при майката на пациентката, която също е диагностицирана с билатерален карцином на гърдата, развил се на 37 и 48 годишна възраст ***(фигура 28).***

Втората мутация нова *BRCA2* мутация е c. 9682delA (9908delA). Тя е локализирана в екзон 27 на *BRCA2* гена. Известно е, че BRCA2 белтъка има общо три NLS сигнала локализирани на COOH края на белтъка, които осигуряват транспорта на белтъка от цитоплазмата до ядрото. Вследствие на мутацията се синтезира по-къс белтъчен продукт с липсващ NLS3 домен. Вариантът беше установен при пациентка с билатерален карцином на гърдата, за която няма налична клинична и фамилна информация, което не позволи да бъде определена фенотипната изява на заболяването и при други преки родственици. Клининчните данни на пациентките с мутация в BRCA2 гена да представени на ***таблица 21***.



Фигура 28. Родословие на BC087, носителка.на мутация c.8532_8533 в екзон 20 на BRCA2 гена.

Таблица 21. Клинични данни на пациентите с мутация в BRCA2 гена

BC №	Мутация	Диагноза		ER	PR	HER2	TNM	Родственици с онкологични заболявания
		BC	II Ca					
90	c.5718_5719 delCT	IDC (35)		2+	3+	3+	pT2pN2M0	Дядо - LyC (NA), баба – неизвестно злокачествно заболяване,вер о- ятно меланома (NA)
76	c.5851_5854 delAGTT	IDLC (53)		-	-	-	pT1pN0M0	Братовчедка - BC (65), баща - StC (54)
58	c.5851_5854 delAGTT	IDC (48)		3+	3+	2+	pT1N0Mx	Майка – BC (NA), брат и сестра на майката – CRC (NA), дядо, баща на майката – LC (NA),братовчед – CRC (NA), брат на бащата – CLv (NA) сестра - BC (35) и - LC (50)

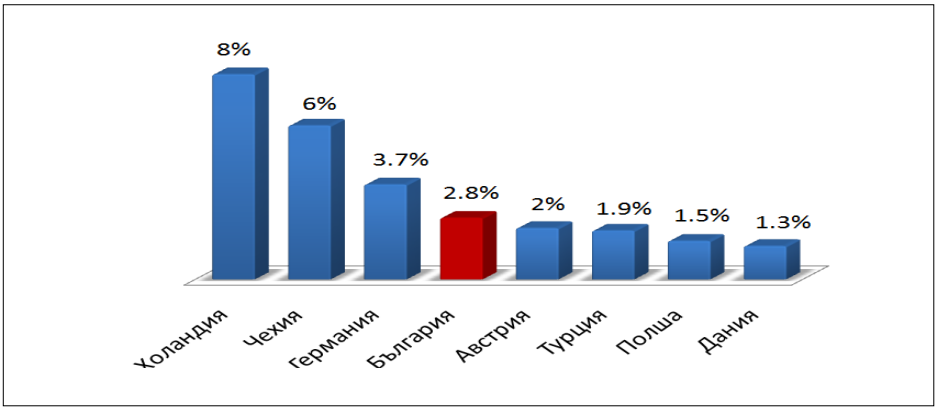
52	c.5946delT	BBC (41/68)	OC (59)	NA/ 3+	NA/ 3+	NA/ NA	NA/ NA	Майка – BC (36) сестра - BC (46) и CRC (65), баща с LC
19	c.7910_7914 delCCTTT	BBC (31/37)		NA/ NA	NA/ NA	NA/ NA	NA/ NA	Братовчедка - BBC (41/49), баща - GC (NA), леля - OC (NA),
87	c.8532_8534 delAA	BBC (30/37)		3/3+	-/3+	NA /1+	pT1bpN0M0 /pT1bpN0M 0	Майка BBC (NA)
32	c.9098_9099 insA	IDC (50)		-	-	3+	NA	Леля – BC (NA)
88	c.9098_9099 insA	IDLC (61)		-	-	-	pT2pN0M0	Дядо - ThC (48), майка - BC (60), два братовчедки - BC (34/47),
81	c.9098_9099 insA	BC (59)		NA	NA	NA	NA	Сестра - BC (52), леля - BC (67)
85	c.9098_9099 insA	IDC (52)		3+	-	-	pT1pN2pMx	Леля - BC (42), дядо – злокачес-твено образуване в областта на шията или главата (NA)
24	c.9680delA	BBC (52)		NA	NA	NA	NA	-

BC№ пореден номер на пациент, DG – диагноза, II Ca – второ онкологично събитие при пациента, BC – рак на гърдата, BBC – билатерален рак на гърдата, IDC – инвазивен дуктален карцином, ILC – инвазивен лобуларен карцином, IDLC – инфилтративен дукто/лобуларен карцином, MBC - медуларен рак на гърдата, ACC – аденоид цистичен карцином, ThC – рак на гърлото, LyC – ларингиален карцином, PC – карцином на простатата, LC – белодробен карцином, CRC – колоректален карцином, PrC – рак на панкреаса, CLv – рак на черния дроб GC – рак на стомаха, OC – овариален карцином, BT – мозъчен тумор, EC – ендометриален карцином, CGO – карцином на половите органи, DC – дисплазия на маточната шийка FtC – карцином на фалопиевите тръби, NA – не е налично, "-" отрицателен за ER, PR and HER2

Друга част от установените в *BRCA1/2* гените мутации са големи геномни пренареждания –LGRs (Large Genomic Rearrangements). Този тип мутации са отчетени с различни честоти при част от високо рисковите за развитието на рак на гърдата и/или яйчника семейства в редица популации. LGRs винаги са патогенни, защото големите делеции или дупликаците в кодиращата последователност водят до изместванията в рамката на четене и до синтеза на белтък с променена функция. Така например честотата на установените LGRs при пациенти в северна Италия е 23% от всички установени мутации в *BRCA1/2* гените, което е 1 от всеки 3 патогенни мутации (Ewalt IP et al, 2009). Висока

честота е установена и в Нидерландия, където честотата на големи делции в *BRCA1* гена е между 7 и 9% (Ewalt IP et al, 2009). В Холандската популация относителният дял на LGRs е между 27 и 36% от всички установени мутации с патогенен ефект в *BRCA1* гена (Ewalt IP et al, 2009). За разлика от изброените по-горе страни, в Дания честотата на този тип мутации е едва 3.8%, в Чехия е 6% и между 1.7 и 5.7% в Германия (Ewalt IP et al, 2009). При по-нови изследвания за големи мутации в полската и турската популация честота им също е показала ниски стойности, съответно 1.5% и 1.9% (Rudnicka H et al, 2013; Cecener G et al, 2014) ***(фигура 28).***

В настоящото изследване за големи делеции и дупликации в *BRCA1* и *BRCA2* гените бяха включени 70 пациентки, при които не бяха установени мутации чрез директно секвениране.

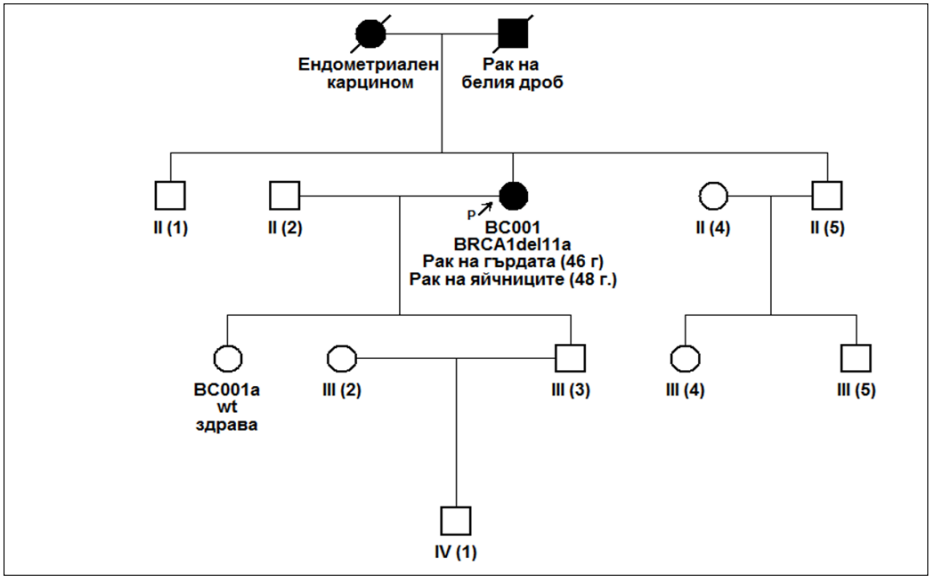


Фигура 28. Процентно разпределение на LGRs мутациите в BRCA гените в някои европейски и близко източни популации.

В резултат на проведения MLPA анализ в изследваната група от пациенти с фамилен рак на гърдата бяха открити 2 големи делеции с обща честота 2.8% (2/70). Установените мутации бяха делеция на част от екзон 11 (11A) на *BRCA1* гена при пациентка с фамилна история, развила рак на яйчниците и гърдата за двугодишен период от време ***(фигура 29)*** и делеция, обхващаща екзони 25, 26 и 27 на *BRCA2* гена при млада жена с ранно начало и фамилна история на рак на гърдата.

При направеният от нас сравнителен анализ на установените варианти в българската популация, с тези, открити в други европейските популации беше установено, че с 15 държави в Европа България споделя общи мутации с патогенен ефект. Така, например с популации като австрийската, словенската, германската, чешката, унгарската, датската и източноевропейското еврейско семейство Ашкенази, споделяме общи мутации и в двата гена (Janavičius R et al, 2010; www. research.nhgri.nih.gov, L100), докато с популации като гръцката,

полската, латвийската, литвийската, беларуската, италианската, френската и руската популация споделяме обща мутация в *BRCA1* гена, а с испанската популация споделяме една обща мутация в *BRCA2* (Janavičius R et al, 2010; www. research.nhgri.nih.gov, L100). Прави впечатление, че най-голям брой мутации споделяме с германската популация. Това са мутациите: c.5263_5264insC, c.181T>G и c.5030_5033delCTAA в *BRCA1* гена и c.9098_9099insA, c.5718_5719delCT и c.7910_7914delCCTTT в *BRCA2* гена. Общо четири мутации: c.181T>G, c.5263_5264insC и c.3700_3704delGTAAA в *BRCA1* гена и c.7910_7914delCCTTT в *BRCA2* гена са общи с чешката популация. С унгарската популация също споделяме четири общи мутации: c.5263_5264insC и c.181T>G в BRCA1 гена и c.9098_9099insA и c.5946T в BRCA2 гена.



Фигура 29. Родословие на BC001, носителка на мутация BRCA1del11a в BRCA1 гена.

5.1.2. Варианти с неясен клиничен ефект (VUS – variants with uncertain clinical effect)

Скринингът за мутации в *BRCA1* и *BRCA2* гените се превръща все по-често във важна част от клиничната практика и оценката на редица редки варианти или такива, които не водят до синтеза на по-къс белтъчен продукт в много случаи е проблемна. Това е така, защото не е ясно доколко такъв тип мутации водят до промяна на функцията на белтъка до степен, че това да доведе до предразположение за развитие на рак на гърдата.

Мутациите в тази група са основно от типа промяна на смисъла (missense) и IFD. Примерите за варианти с неясен клиничен ефект включват варианти, които са локализирани на местата за сплайсинг, най-вероятно засягащи транскрипцията, мутации от типа промяна на смисъла, IFD варианти, при които е налице делеция или инсерция в рамките на кодона и са с честота под 1%.

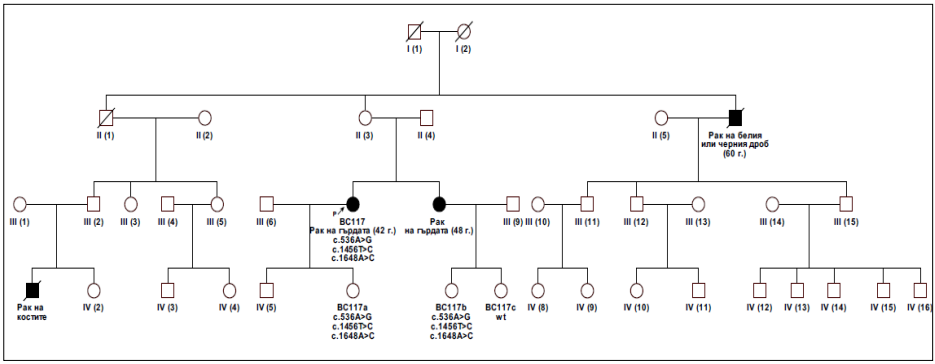
В изследваната група от български пациенти с фамилен рак на гърдата и/или яйчника, ние установихме 11 „missense" замени с ниска честота (< 0,5%): c.139T>G, c.536A>G, c.736T>G, c.1456T>C, c.1648A>C, c.3999T>C,c.3515C>T, c.6100C>T, c.6322C>T, c.7469T>C и c.9104A>C. Варианти с неясен клиничен ефект бяха установени при 10 пациента с фамилен рак на гърдата, което е 5% (4/200) в извадката, съответно 2% (4/200) в *BRCA1* гена и 3% (6/200) в *BRCA2* гена.

С най-голяма тежест в тази група беше вариантът c.139T>G. Той е локализиран в екзон 5 на *BRCA1* гена и води до замяна на аминокиселината цистеин с глицин в позиция 47 (p.Cys47Gly). Тази замяна, подобно на мутацията c.181T>G е локализирана в RING finger домена на BRCA1 и засяга един от остатъците, които са отговорни за координативното свързване на Zn^{2+} йони. Няколко функционални анализи показват, че c.139T>G води до нарушение на убиквитин лигазната активност на белтъка, както и участието му в хомоложната рекомбинация и контрола на броя на центрозомите в клетъчни култури (Ransburgh DJ et al, 2010). Тези експерименти показват, че вариантът най-вероятно има патогенен ефект по отношение на заболяването. Той беше установен при една пациентка с тройно негативен рак на гърдата, развил се на 33 годишна възраст и фамилна история за онкологични заболявания. За да потвърдим неговия патогенен ефект, беше необходимо да проведем сегрегационен анализ в семейството, но не разполагахме с ДНК материал от родствениците на пробанда.

Три от редките варианти от типа промяна на смисъла - c.536A>G, c.1456T>C и c.1648A>C в *BRCA1* гена, бяха установени при една пациентка с рак на гърдата, развил се на 49 годишна възраст и фамилна история (сестра починала от рак на гърдата на 42 годишна възраст). След in silico анализа за предикция, една от тези замени (c.1456T>C) беше класифицирана, като неутрална, за разлика от другите две, които бяха класифицирани като увреждащи (c.536A>G, c.1648A>C) ***(таблица 7).*** Според BIC базата данни c.536A>G и c.1456T>C са открити в Централна, Източна и Западна Европа, както и в популации от Средния и Близкия изток.

При проведения анализ за наличието на установените мутации в семейството, трите варианта бяха открити при една от дъщерите на пробанда и при една от нейните племенници ***(фигура 30)***. Аналогичен случай е наблюдаван в семейство от Сицилия, в което пациентка, с ранно начало на рак на гърдата, здравата ѝ сестра и тяхната майка, с ранно начало на ендометриален карцином, са носители на хаплотипа c.536A>G, c.1456T>C и c.1648A>C, в отсъствие на *BRCA1/2* мутации (Augello C et al.,2006). Предполага се, че тези три

аминокиселинни промени могат да повлияят на заряда и стойхиометрията на *BRCA1* белтъка, а следователно и на неговата функция (Augello C et al. 2006).



Фигура 30. Родословие на BC117, носителка на полиморфни варианти c.536A>G, c.1456T>C I c.1648A>C в BRCA1 гена.

В групата на редките „missense" варианти само c.3999T>C не беше докладван до този момент в литературните източници. Вариантът води до синтеза на аминокиселината аланин вместо на валин в позиция 1333 (p. Val1333Ala). Той беше установен при пациентка с билатерален карцином на гърдата и фамилна история на заболяването, баба, майка и две лели са били е рак на гърдата, в отсъствие на други патогенни *BRCA1/2* варианти. При разширяване на изследването мутацията беше установена и при здравия брат на пациентката. Проведеният in silico анализ с три предиктивни програми за оценка на риска, не доказа патогенния ефект на c.3999T>C. ***(таблица 7).***

Анализът за предикция показа, че само два от установените редки варианти, c.1648A>G в *BRCA1* и c.3515C>T в *BRCA2* бяха оценени като патогенни и с трите програми за оценка на риска - SIFT PolyPhen2, и Provean ***(таблица 8)..*** Подобно на другите варианти в групата, c.3515C>T се среща в популации от Западна, Източна и Централна Европа (www. research.nhgri.nih.gov, L100).

Ролята на установените „missense" варианти с неясно клинично значение за развитието на заболяването е спорна, т.к. някои проучвания установяват, че те нямат връзка със заболяването, а други, че имат такава. Например функционалните изследвания на c.536A>G, c.1648A>C в *BRCA1* и 3515C>T в *BRCA2* показват, че c.536A>G, но не и c.1648A>C вероятно има ефект върху развитието на рак на гърдата, т.к се засяга функцията на *BRCA1* белтъка в нехомоложната рекомбинация (NHEJ) (Ransburgh DJ, 2010).

За да се оцени функцията на установените варианти с неясно клинично значение, лабораторията, в която е направен анализът, може изиска изследване и на други членове от семейството с поставена диагноза или на родителите на пробанда, за да се определи дали вариантът косегрегира със заболяването в това семейство. При оценката на такива варианти трябва да се вземат предвид редица фактори, като например: вариантът да се свързва с предразположение за развитието на заболяването в семейството на базата на проучвания на много поколения; да има следните характеристики – да отсъства в здрави контролни индивиди, да води до замяна на аминокиселина, която не консервативна, да се среща във функционален домен, да се асоциира със специфичен хистологичен профил при *BRCA1* мутациите, да бъде с ниска честота. Например такива са всички варианти, които засягат „Zn^{2+} finger" домена на *BRCA1*. (http://www.kconfab.org, L101).

5.1.3. Варианти с неутрален за развитието на рак на гърдата

В тази група се включват варианти в ДНК последователността, които не водят до промяна на аминокиселината (синонимни еднонуклеотидни замени), разположени са в интронни области, далече от границата интрон/екзон и е малко вероятно да засегнат „splice" място. Към тази група могат да бъдат причислени и „missense" варианти, които са с висока честота както при пациентите, така и при контролите и са с доказано неутрален ефект за развитието на заболяването. В изследваната от нас група бяха установени 29 варианта с неутрален клиничен ефект, съответно 9 в *BRCA1* и 17 в *BRCA2*. Дванадесет от тях бяха класифицирани като полиморфизми (SNPs) с честота по-висока от 1%. Това са варианти c.1067A>G, c.2077G>A, c.2612C>T, c.3113A>G, c.3119G>A, c.3548A>G, c.4837A>G, c.4956G>A, c.1114A>C, c.865A>C, c.2971A>G и c.5744C>T. На всички SNPs беше направен in silico анализ за оценка на ефекта им по отношение на рака на гърдата при, който само вариантът c.1067A>G беше оценен като патогенен и с трите предиктивни програми ***(таблица 9).***

В допълнение бяха установени и 10 синонимни замени: c.591C>T, c.2082C>T, c.2311T>C, c.4308T>A, c.1365A>G, c.2229T>C, c.3396A>G, c.3807T>C, c.5199C> и c.7242A>G; 2 варианта в UTR: c.-26G>A и c.*105A>C; 1 IFD c.4146_4148delAGA; и 13 интронни замени: c.441+36_441+38delCTT, c.442-34C>T, c.548-58delT, c.4485-63C>G, c.426-89T>C, c.425+67A>C c.5075-53C>T, c.5277+60_5277+61insGTATTCCACTCC, c.7617+28C>A, c.425+147G>T, c.7806-14T>C, c.681+56C>G,c.7007+134_7007+135insTTATAAAAT, и c.6841+80_6841+83delTTAA.

В таблица 22 са показани 40-те най-често срещани според BIC база данни варианти в *BRCA1* и *BRCA2* гените. От общия брой варианти 19 варианта (показани на таблицата в червено) бяха установени при български пациентки с фамилен рак на гърдата.

Таблица 22. Най-често докладвани в BIC базата данни мутации в BRCA1 и BRCA2 гените

BRCA1			BRCA2		
HGVS	BIC	Брой на докладвания в BIC	HGVS	BIC	Брой на докладвания в BIC
c.66_67delAG	185delAG	2038	c.5946_5946 delT*	6174delT	1093
c.5263_5264insC	5382insC	1093	c.1114C>A	H372N	996
c.4308T>C	4427T>C	251	c.10362A>C	10590A>C	346
c.4837A>G	S1613G	248	c.1796T>C	F599S	345
c.181T>G	C61G	239	c.7806-14T>C	IVS16-14T>C	332
c.2311T>C	2430T>C	229	c.8755-66T>C	IVS21-66T>C	319
c.5152+66G>A	IVS18+66 G>A	222	c.9976A>T	K3326X	301
c.2082C>T	2201C>T	216	c.7469T>C	I2490T	240
c.4987-92A>G	IVS16-92A>G	216	c.3396A>G	3624A>G	234
c.4987-68A>G	IVS16-68A>G	216	c.6841+80_6841+83delTTAA	IVS11+80delTTAA	221
c.548-58_548-58delT	IVS8-58delT	214	c.-26G>A	203G>A	206
c.2612C>T	P871L	211	c.4258G>T	D1420Y	200
c.442-34C>T	IVS7-34C>T	207	c.8567A>C	E2856A	186
c.3113A>G	E1038G	182	c.7242A>G	7470A>G	183

c.4039A>G	R1347G	161	c.125A>G	Y42C	144
c.1067A>G	Q356R	155	c.1151C>T	S384F	143
c.4065_4068delTCAA	4184del4	143	c.681+56C>T	IVS8+56C>T	143
c.3024G>A	M1008I	139	c.1964C>G	P655R	142
c.4327C>T	R1443X	136	c.1514T>C	I505T	128

* установени в българката популация мутации

С цел въвеждане на скрининг за мутации в *BRCA1* и *BRCA2* гените със секвениране от второ поколение, мутациите c.464delA, c.5263_5264insC, c.5851_5854delAGTT, c.5946delT, c.5718delCT, c.7910_7914delCCTTT и c.9908delA бяха използвани като положителни контроли. NGS секвенирането беше проведено с помощта на Ion Torrent PGM (Life Technologies) секвенатор от ново поколение. При тази платформа се използва първата в света PostLight технология за секвениране посредством полупроводников чип с висока плътност и множество микроямки, в които протича биохимичната реакция. Под ямките е разположен чувствителни към йони слой и патентован от IonTorrent сензор. При IonTorrent директно се измерват освободените протони (H^+), отделени от полимеразата при протичане на реакцията. Когато нуклеотидът се включи в ДНК веригата, водородните йони (протони) се освобождават. Зарядът от тези протони променя pH на разтвора, разпознава се от сензора за йони и след това директно се превръща от химически сигнал в цифров формат. Липсата на оптика спестява бавното сканиране на изображението така, че секвенирането е сравнително бързо, а процента на грешките е в порядъка на 1-2 %.

Всички установени мутации с директно секвениране бяха потвърдени при анализа със секвенатор от ново поколение Ion Torrent PGM, което ще послужи за въвеждането му в клиничната практика у нас. Секвенирането от ново поколение значително намалява времето и цената на мутационния скрининг на *BRCA1/2* гените.

5.2. Секвенционен анализ на най-честите по литературни данни мутации, в гени с междинна пенетрантност при рака на гърдата

PALB2 (partner and localizer of BRCA2) е туморсупресорен ген, локализиран на хромозома 16p12.2 и кодира белтък, който участва в поддържането на геномната стабилност и поправката на двойноверижните ДНК скъсвания (Park JY et al, 2014). Този белтък се свързва и колокализира с BRCA2

в клетъчното ядро и вероятно стабилизира вътреядрената локализация на BRCA2. (Casadei S et al, 201).

Хетерозиготни мутации в *PALB2* гена се свързват с предразположение към развитието на рак на гърдата и рак на панкреаса (Casadei et al, 2011). 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 [1.5-4.2]) до навършване на 55 годишна възраст и 3.4 пъти (95%CI [2.4-5.9]) до навършване на 85 годишна възраст, респективно (Casadei et al, 2011). От общия брой открити мутации в *PALB2*, c.3113G>A, c.509_510delGA и c.196C>T показват най-висока честота в изследваните групи. Мутацията c.509_510delGA е открита при седем пациента с немско потекло (Casadei et al, 2011). Проведеният анализ на родословията на пациентите, носители на мутациите показва, че част от тях били с немски, британски и френски произход (Casadei et al, 2011). Тази мутация също така е открита и в полската, руската и чешката популации, което води до предположението, че вероятно е с произход от Централна Европа (Casadei et al, 2011).

BRIP1. Хомозиготни мутации в част от гените, кодирщи белтъци участващи в ДНК репариращата система се свързват с развитието на рядко наследствено рецесивно заболяване, наречено анемия на Fanconi (FA). Честотата на FA е приблизително 1:350 000 раждания и обхваща различни етнически групи. Така, например FA подтипове FANCD1, FANCJ и FANCN се причинява от носителството на биалелни мутации в BRCA2, BRIP1 и PALB2 респективно (Cantor et al, 2012; (Casadei et al, 2011).

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. 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. Към това семейство се отнася и BRIP1 (BACH1/FANCJ) хеликазата (Cantor et al, 2012). *BRIP1* генът е картиранна хромозома 17q22 в близост до BRCA1 локуса. Кодира BRIP1 белтък, който взаимодейства с BRCT домените на BRCA1. Локализира се заедно с BRCA1 на мястото на ДНК увреждането и подпомага неговата функция. 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 (Cantor et al, 2012).

Мутационен анализ на *BRIP1* гена, проведен в кохорта от 49 италиански пациента доведе до идентифицирането на четири герминативни мутации и един интронен вариант (Cantor et al, 2012). Три от вариантите, съответно c.2637G>A, c.2755C>T, c.3411C>T са класифицирани като неутрални полиморфизми. Идентифицирана е също c.2992-2995delAAGA делеция в екзон 20 на гена. (Cantor et al, 2012).

Направеният молекулярно – генетичен анализ на 200 BRCA негативни пациентки с фамилен рак на гърдата чрез директно секвениране не доведе до

установяването на мутациите c.2992-2995delAAGA и c.509_510delGA. Полученият резултат показва, че най-често откриваните мутации в гените с междинна пенетраност *PALB2* и *BRIP1* вероятно са рядка причина за развитие на заболяването при български пациентки.

5.3. Асоциативно проучване на полиморфни варианти в гени с ниска пенетрантност

При голяма част от пациентите с фамилен рак на гърдата не се откриват мутации в основните локуси, асоциирани с развитието на заболяването. Това доведе до хипотезата, че предразположението към този тип рак се определя от голям брой локуси, всеки с индивидуален малък ефект върху риска за развитието на болестта. Проведените неотдавна целогеномни-асоциативни проучвания (GWAS – Genome Wide Association Studies) доведоха до откриването на нови рискови алели, свързани с рака на гърдата в *FGFR2, TNRC9, MAP3K1, CYP1B1* гените, както и в хромозомните локуси 3p24 и 8q24 (Ellis NA et al, 2007; Rosman DS et al, 2007).

5.3.1. Генетичен анализ на полиморфни варианти rs2981579 и rs2981582 в *FGFR2* гена

Генът *FGFR2* 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 (www.omim.org, L20). 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 (Turnbull et al, 2010, Peng te al, 2011). В съответствие с предишни резултати при проведени целогеномни проучвания от типа случаи-контроли, с голяма асоциация за развитието рак на гърдата е установен полиморфен вариант rs2981582 в интрон 2 на *FGFR2* гена (Turnbull et al, 2010, Peng te al, 2011). Предполага се, че този полиморфен вариант променя афинитета на свързване с транскрипциони фактори, и по този начин повишава експресията на *FGFR2* (Kawase et al, 2009). По-високи нива на транскрипция на FGFR2 са установени при пациентки, хомозиготи по-редкия за rs2981582 алел.

Асоциативното проучване на полиморфните варианти rs2981579 и rs2981582 в *FGFR2* гена при изследваната група от български пациентки с рака на гърдата и контроли потвърди тяхната асоциация с риска от развитие на рак на гърдата.

Статистическият анализ на rs2981579 показа значима асоциация на алела A с риска от развитие на рак на гърдата в изследваната от нас група пациенти-контроли. Носителство на един A алел беше отчетено в 48% от пациентките и в

40.5% от контролната група и показа 1.398 (95% CI.1.064 – 1.836) пъти повишен риск за развитие на рак на гърдата (OR=1.39, p=0.01), ***(таблица 27, фигура 31).*** Обратно, носителството на един (OR = 0.71; p = 0.01) или два G алела (OR = 0.56; p = 0.01) има протективен ефект по отношение на заболяването.

В изследваната от нас извадка носителство на по-редкия A/A генотип на rs2981582 беше установено при 21% от пациентките и 15% от здравите жени, докато хетерозиготните A/G носители бяха наблюдавани с честота 51% при пациентки и при 45% от контролите. Носителството на два A алела се асоциира с два пъти - 2.084 (95% CI 1.250 – 3.474) повишен риск за развитие на рак на гърдата (OR=2.084, p=0.003), а носителство на един A алел - с 1.464 (95% CI 1.111 – 1.930) пъти повишен риск (OR=1.464, p=0.007).

5.3.2. Генетичен анализ на полиморфен вариант rs 889312 в *MAP3K1* гена

Митоген активираната протеин киназа киназа 1 е ензим, който при хората се кодира от *MAP3K1* гена. MAP3K1 (MEK) е серин/треонинова киназа, имаща основна роля при фосфорилирането на ензими, свързани с клетъчния отговор, растежни фактори, митогенни и метаболитни стимули. При около 25% от пациентките с карцином на гърдата се наблюдава свръхекспресия на HER2, която се асоциира с агресивен туморен растеж, метастазиране и лоша прогноза. HER2 притежава тирозин киназен домен, показващ активност дори и когато не се е формирал хетеродомен. Свъхекспресията води до образуване на повече HER2 хередимери, до повишена сигнализация и отговор на растежни фактори (Sorlie T et al. 2003). Онкогенното действие на HER2 се дължи на нарушения в регулацията на клетъчния цикъл, където той е основен медиатор в клетъчната пролиферация по пътя на митоген активираната протеин киназа – MAPK. Полиморфният вариант, rs889312 в *MAP3K1* се асоциира с рака на гърдата. Рискът за развитие на заболяването при носителството на A/C генотип е изчислен на 1.22 пъти (OR 1.22 (95%CI 1.14-1.30; P=$4.6x10^{-9}$) (Peng et al, 2011).

В изследваната от нас извадка носителство на A/C генотип показа риск за развитие на заболяването 1.185 (95% CI 0.806 – 1.742), но резултатът не достигна статистическа значимост (OR=1.185, p=0.431). Статистическият анализ показа и 1.133 повишен (95% CI 0.849 – 1.541) риск за развитие на заболяването и при носителство на C алел, но резултатът също не достигна статистическо значение (OR=1.133, p=0.416).

5.3.3. Генетичен анализ на полиморфен вариант rs1056836 в *CYP1B1* гена

При човека се експресират три вида на CYP1 ензими: CYP1A1, CYP1A2, и CYP1B1 (Bosland MC et al, 2000). Членовете на това семейство, са под транскрипционните регулиране на арил- хидрокарбоновия рецептор (AhR). CYP1B1 е свръхекспресиран в много видове тумори (Bosland MC et al, 2000). Полиморфизмите в *CYP1B1* показват асоциация с развитието на определени

карциноми. CYP1B1, заедно с CYP1A1 играе роля в туморната прогресия и участва в метаболизма на химиотерапевтични средства, което помага да се избегне химиотерапевтична индуцирана цититиксичност (Jordan VC et al, 2000). При туморите на гърдата често се наблюдава свръхекспресия на *CYP1B1*.

Установено е, че развитието на рака на гърдата се влияе до голяма степен от естрогените (Diergaarde B et al, 2008, Crandall CJ et al, 2009). При човека, в млечната жлеза, CYP1A1 и CYP1B1 превръщат естрадиола главно в 2-хидроксиестрадиол (2-OHE2) и 4-хидроксиестрадиол (4-OHE2). В животински модели единствено 4-OHE2 е способен да предизвика рак (Jordan VC et al, 2000). *CYP1B1* води до повишаване нивата на 4-OHE2. Въпреки че той е активен и в нормални тъкани, неговата експресия в туморни клетки е много по-висока и за това полиморфизмите в *CYP1B1* вероятно са рисков фактор за възникване на естроген зависим рак, което се дължи на ролята на ензима в генотоксичния метаболизъм на естрогените. Асоциация с повишен риск за развитие на рак на гърдата е открита при SNPs rs1800440, rs162555 и rs1056836 в *CYP1B1* гена (Diergaarde B et al, 2008, Crandall CJ et al, 2009). Полиморфният вариант rs1056836 представлява аминокиселинна замяна на Lev с Val кодон 432 (L432V) е от типа „missense". В настоящото проучване вариантът L432V беше установен в 53.4% от пациентките с рак на гърдата и при 44.2% от контролната група**.** При проведеният асоциативен анализ не беше установена статистически значима асоциация rs1056836 с развитие на заболяването (Huang Y et al, 2009).

5.3.4. Генетичен анализ на полиморфен вариант rs3757318 в хромозомен локус C6orf9

Целогеномните асоциативни проучвания идентифицираха SNPs в три локуса, показали значима асоциация с предразположението към рак на гърдата: 6q25.1, LSP1 и 8q24(Thomas G et al, 2009). От тези полиморфни варианти, най-висока асоциация със заболяването има rs3757318, ($P = 2.9 \times 10^{-6}$), който е разположен на около 200 кв „upstream" от *ESR1* в хромозомен локус C6orf97. При европейци rs3757318 показва слаба корелация с rs2046210, аналогично на проведено преди това проучване в Шанхай ($r2 = 0{,}008$), което показва, че тези два полиморфни варианта са характерни за населението на Източна Азия (Thomas G et al, 2009; Kirchhoff T et al, 2009; Gold B et al, 2008).).

В настоящото проучване на полиморфизма rs3757318 беше установено, че 4.6% от българските пациентки с рак на гърдата и 2.8% от здравите жени са хомозиготи по отношение на алела A, което е изключително рядко срещано в европейските популации. Носителството на два A алела показва 2.056 (95% CI 0.571 – 7.403) пъти повишен риск за развитие на рак на гърдата (OR = 2.056; p= 0.336), докато носителството на G алел вероятно има протективен ефект (OR = 0.795 (95% CI 0.508 – 1.244); p= 0.356), но резултатите не достигнаха статистическа значимост.

5.3.5. Генетичен анализ на полиморфен вариант rs2180341 в RNF146

Установено е, че RNF146 участва в WNTβ-катенин сигналния път. Wnt сигналния път има основна роля в ембрионалното развитие и хомеостазата в тъканите (Marinella G et al, 2011). Поради тази причина дерегулацията на този път много често се асоциира с ракови заболявания. Наскоро в RNF146 беше идентифициран „finger" домен с E3 убиквитин лигазна функция. Предполага се, че RNF146 оказва влияние в регулацията на WNTβ-катенин сигналния път. RNF146 активира WNT сигнализацията чрез посредничеството на PARsylation (Marinella G et al, 2011).

При проведеният генетичен анализ за rs2180341 в група от пациентки с еврейски произход е намерена статистически значима асоциация с рака на гърдата (OR=1.19 95%CI 1.04-1.35; p=0.01). Значима асоциация е открита при всички модели на анализ на алелите (OR=1,81 95%CI 1.04-1.33;p=0.008) (Kirchhoff T et al, 2009; Gold B et al, 2008). Проведената епидемиологична и функционална характеристика при носителството на rs2180341 показва, че този полиморфен вариант вероятно се асоциира с ER положителните тумори на гърдата. Асоциативният анализ на полиморфизма rs2180341 в групата от български пациентки с рак на гърдата и контроли не показа статистически значима асоциация със заболяването.

5.3.6. Генетичен анализ на полиморфен вариант rs3803662 в *TOX 3* гена

TOX3/TNRC9 участва в регулацията на ДНК-зависими процеси, като транскрипция, репликация, поправката и ремоделирането на хроматиновата структура (O'Flaherty E et al, 2003). Високо подвижните белтъци (HMG) съдържат ДНК-свързващ домен, които им позволяват да предизвикват структурни промени в ДНК. Представителите на HMG-семейството често се подразделят на базата на ДНК свързващите им свойства. HMG- белтъци са открити в различни еукариотни организми и повечето са известни или заподозрени като регулатори на генната експресия (www.omim.org, L22).

Полиморфният вариант rs3803662 се асоциира с развитието на рак на гърдата. При проведените от групата на Easton големи асоциативни проучвания от типа случаи-контроли (GWAS) рискът за развитие на рак на гърдата при носителство на варианта G/A е 1.30 пъти (OR = 1.30; $p=3.10^{-15}$) (Turnbull et al, 2010, Antoniou AC et al, 2010). В изследваната от нас извадка вариантът G/A се среща с приблизително еднаква честота както при пациентките с рак на гърдата (41.6%), така и при здравите жени(42%), но резултатите не достигнаха статистически заничима асоциация.

5.3.7. Генетичен анализ на полиморфен вариант в SLC4A7 гена

SLC4A7 гена за бикарбонатния котранспортер е локализиран на трета хромозома. Кодира NBC котранспортер на натриев бикарбонат през плазмената мембрана и е свързан с дейността на натриевите канали. Регулира вътреклетъчното pH и играе роля при транспорта на натриев бикарбонат при секреторните епителни клетки (www.phosphosite.org, L23). Протеинът се експресира в значителен брой нормални и туморни тъкани, като например: мастна тъкан, мозък, кръв, маточна шийка, ембрионална тъкан, сърце, бъбреци, тумори на гърдата, белия дроб, цервикса, простатата, дебелото черво (Antoniou AC et al, 2010). До този момент, по литературни данни, SNP rs4973768 в *SLC4A7* гена се асоциира с рака на гърдата (Antoniou AC et al, 2010).

Проведеният статистически анализ при изследваната група български пациенти с рака на гърдата и контроли показа, че C/C генотипа има протективен сефект 0.642 (95%CI0.414-0.994) по отношение на заболяването (OR = 0.642; p=0.04), като резултатът достигна статистическа значимост.

Таблица 32. Хапотипен анализ на rs2981579|rs2981582 и rs2180341|rs3757318 на 6 и 10 хромозома

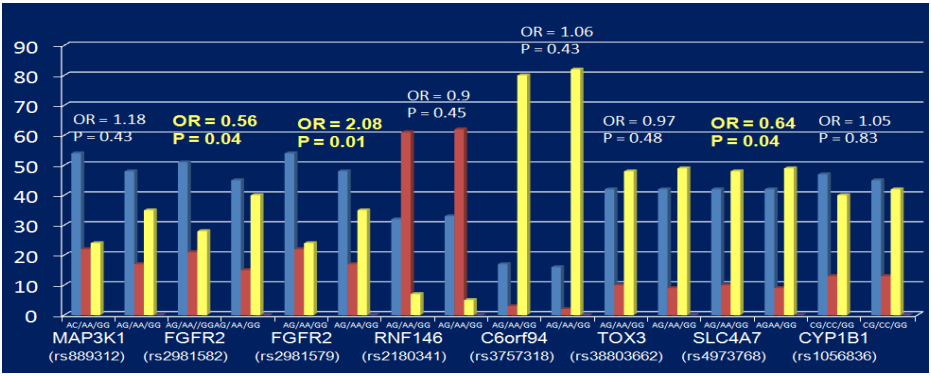
Locus	HAplotype	F_A	F_U	CHISQ	P	SNPS
Chr10	OMNIBUS	NA	NA	9.243	0.02623	rs2981579|rs2981582
Chr10	AA	0.4514	0.3489	8.919	0.002822	rs2981579|rs2981582
Chr10	GA	0.01351	0.02	0.5091	0.4755	rs2981579|rs2981582
Chr10	AG	0.04324	0.05778	0.8827	0.3475	rs2981579|rs2981582
Chr10	GG	0.4919	0.5733	5.416	0.01995	rs2981579|rs2981582
Chr6	OMNIBUS	NA	NA	1.363	0.7142	rs2180341|rs3757318
Chr6	GA	0.02443	0.01574	0.7487	0.3869	rs2180341|rs3757318
Chr6	AA	0.09391	0.08103	0.3982	0.528	rs2180341|rs3757318
Chr6	GG	0.2123	0.2055	0.0532	0.8175	rs2180341|rs3757318
Chr6	AG	0.6694	0.6978	0.7091	0.3998	rs2180341|rs3757318

При направения хаплотипен анализ на хаплотипни комбинации включващи полиморфни варианти на 6 и 10 хромозома, някои варианти в *FGFR2*, rs2981579 и rs2981582, достигнаха статистически зависима асоциация (***таблица 31).*** Така, например наличието на два А алела от полиморфизми rs2981579 и rs2981582 се свързва с повишен риск за развитие на заболяването (OR = 8.19; p = 0.002), същото така беше установено, че носителството на два G алела има протективен ефект (OR = 5.41; p = 0.01).

Хаплотипният анализ на трите полиморфни варианта rs2981579 и rs2981582 показа статистическа значима асоциация със заболяването ***(фигура 31).***

Беше установено, че наличието на генотип G/G при rs2981579 във *FGFR2* е с протективен ефект за развитието на заболяването (OR = 0.568 p = 0.01), докато носителството на един А алел се свързва с 1.4 пъти риск за развитието на рак на гърдата (OR = 1.4 p = 0.01). При втория полиморфизъм във *FGFR2* също беше установена асоциация с рак на гърдата. Така, например носителите на A/A генотип са с 2.08 пъти повишен риск за развитие на заболяването ((OR = 2.08; p = 0.004), докато наличието на два G алела е с протективен ефект (OR = 0.68; p = 0.004).

При полиморфен вариант rs3803662 в SLC4A7 гена също беше установена асоциация с протективен ефект за развитието на заболяването при носителството на генотип C/C (OR = 0.64; p = 0.02) ***(фигура 31).***



Фигура 31. Асоциативно проучване от тип случаи-контроли на полиморфни варианти в гени с ниска пенетрантност

5.4. Разработване на системен ход за скрининг на мутации в BRCA1 и BRCA2 гените

На базата на получените резултати беше разработен системен ход за скрининг на мутации в *BRCA1* и *BRCA2* гените при български пациенти с

фамилен рак на гърдата и /или яйчниците. На ***фигура 32*** е представен примерен системен ход за скрининг на мутации в BRCA гените.

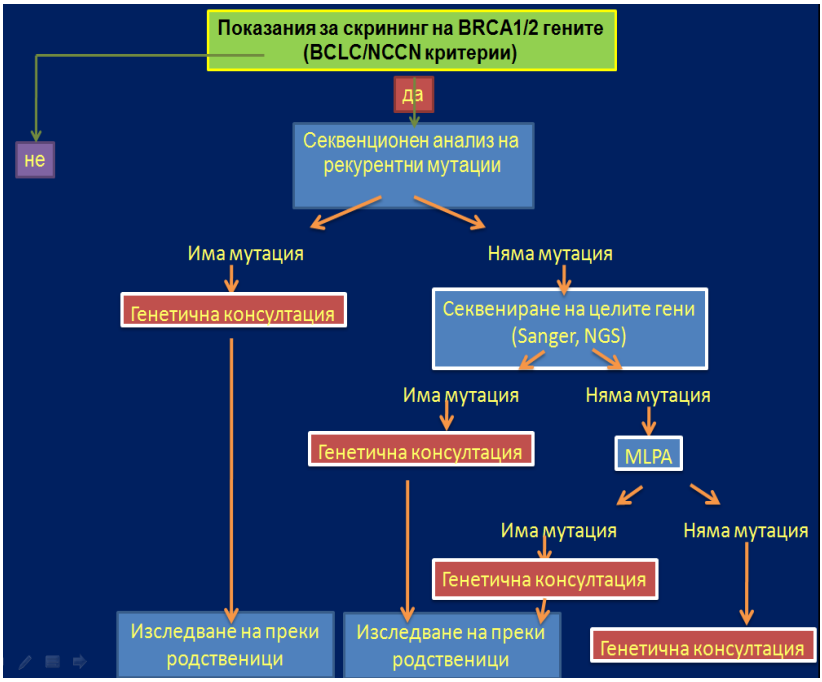
- *Таргетен мутационен анализ*. Включва изследване за носителство на популационно или етнически специфични мутации чрез директно секвениране. При български пациентки с фамилен рак на гърдата и яйчниците бяха установени пет рекурентни мутации: c.181T>G, c.5263_5264insC, c.5851_5854delAGTT, c.9982delA и c.9098_9099ins. Установените мутации бяха открити в 15% от изследваните пациенти.

- *Секвениране на целите кодиращи последователности на BRCA1 и BRCA2 гените.* Методът се препоръчва, когато изследваното семейство е с неизвестен *BRCA1/2* мутационен статус и не принадлежи към етническа група с характерни мутации. При секвенционния анализ се откриват малки делеции, инсерции, ”missense”, “nonsense” и “splice site” мутации (www.ncbi.nlm.nih.gov, L28). В изследваната от нас група пациенти установените, редки мутации бяха с честота 5%. Получените резултати от таргения анализ и секвенирането на целите кодиращи последователности могат да бъдат интерпретирани по следния начин: 1. Мутацията присъства, т.е. резултатът е положителен и е налице повишен риск за развитието на BRCA-свързан рак; 2. Резултатът е неубедителен, т.е. тя е в участък, близо до мястото, където се очаква да бъде открита таргетната мутация или се открива при секвенирането на целите кодиращи последователности на гените. За да се оцени функцията на установения вариант лабораторията може да изиска изследване и на други членове от семейството, с поставена диагноза или на родителите на пробанда, за да се определи дали той косегрегира със заболяването в това семейство; 3. Мутацията отсъства, т.е. налице е отрицателен резултат. Този резултат трябва да се тълкува много внимателно, т.к. не се открива причината за развитието на рак в семейството. В този случай етиологията на заболяването би могла да се дължи на големи инсерции, делеции или пренареждания в *BRCA1/2* гените, както и на мутации в други гени или епигенетични промени. Следователно семейството трябва да бъде информирано, че отсъствието на мутация в *BRCA1/2* гените не елиминира възможността за наследствено предразположение за развитието на рак в семейството (www.ncbi.nlm.nih.gov, L28).

- *Анализ на големи геномни пренареждания.* Извършва се, за да се установят големи делеции, дупликации и пренареждания, които не могат да бъдат открити посредством директно секвениране(www.ncbi.nlm.nih.gov, L28). При търсене на големи геномни пренареждания най-често се използват методи като Multiplex Ligation Probe Amplification(MLPA), Long Range PCR или микрочипов анализ на гени или части от хромозоми чрез сравнителна геномна хибридизация. Получените резултати могат да бъдат интерпертирани по следния начин: 1. Установява се мутация. Наличието на големи делеции или дупликации водят до повишен риск за развитието на *BRCA*-свързани ракови заболявания (www.ncbi.nlm.nih.gov, L28); 2. Не се установява мутация. Така полученият

резултат трябва да се тълкува внимателно, т.к. основната причина за развитието на рак в това семейство не е установена.

- *Анализ с мултигенни панели, свързани с предразположението за развитие на рак на гърдата и яйчниците.* Разчитането на гените в човешкия геном, през последното десетилетие, доведе до бързо еволюиране на технологиите за секвениране (www.ncbi.nlm.nih.gov, L28). Класическият метод за секвениране по Сангер бе заменен от технологии за секвениране от ново поколение (NGS), които позволяват едновременното прочитане на голям брой ДНК секвенции и значително намаляват времето за секвениране и цената на една отделна анализирана проба. Тези платформи дадоха възможност за разработване на панели от гени, които се свързват с предразположение за развитие на онкологични заболявания (www.ncbi.nlm.nih.gov, L28).



Фигура 23. Примерен системен ход за скрининг на мутации в BRCA гените

VI. Изводи:

1. Честотата на мутациите с патогенен ефект (20%) при български пациенти с фамилен рак на гърдата и яйчниците не показа разлика от установените честоти при други популационни проучвания.

2. Една от най-често срещаните мутации в Европа c.5263_5264insC в екзон 20 на *BRCA1* гена беше установена с честота от 11% при изследваната извадка от български пациентки с рак на гърдата и яйчниците и вероятно има „ефект на основателя" за българската популация.

3. Рекурентните патогенни мутации в двата гена (c.5263_5264insC, c.181T>G в *BRCA1* и c.5851_5854delAGTT, c.9098_9099insA, c.9908delA в *BRCA2*) са отговорни за 68.7% от всички открити мутации, а 31.3% са единични мутации, разпръснати в целите гени.

4. От откритите варианти пет (c.464_465delA, c.5396_5402delCCCTTGG, c.8532_8533delAA, 9908delA и c.3999T>C) са нови, неописани досега в литературата и базите данни. От тях четири водят до изместване рамката на четене и са с патогенен ефект.

5. От установените варианти с неясно клинично значение 12 са със сравнително ниска честота (< 1%) в изследваната група пациенти и не бяха установени в контролна група от здрави индивиди. Необходими са допълнителни проучвания за оценка на техния ефект за развитие на рак на гърдата и яйчниците.

6. Големи делеции, инсерции и пренареждания са рядка причина (2.8%) за фамилен рак на гърдата при български пациенти, подобно на други славянски популации.

7. Най-често срещаните при други популации мутации в гените с междинна пенетрантност *PALB2* и *BRIP1* не се откриват в изследваната група болни и най-вероятно са рядка причина за заболяването в българската популация.

8. Полиморфизми във *FGFR2* гена се асоциират с повишен риск за развитие на рак на гърдата при български пациентки: rs2981579 (OR = 1.41; p = 0.01) и rs2981582 (OR = 1.417; p = 0.005), аналогично на други предходни проучвания.

VII. Приноси

Приноси с научно-фундаментален характер:

1. Беше определен мутационният спектър и приносът на мутации в *BRCA1* и *BRCA2* гените при български пациентки с фамилен рак на гърдата, подбрани стриктно според международните критерии за вероятно носителство;

2. Бяха установени най-честите *BRCA1* и *BRCA2* мутации (c.5263_5264insC, c.181T>G, c.5851_5854-delAGTT, c.9098_9099insA и c.9908delA), отговорни за развитието на фамилен и тройно негативен рак на гърдата при български пациентки;

3. Бяха установени 5 нови, несъобщавани до сега варианти, от които четири патогенни мутации (c.8532_8533delAA, c.464_465delA, 9908delA, c.5396_5402delCCCTTG) и един "missense" вариант с неясно клинично значение (c.3999T>C), което позволи да се обогатят международните бази данни;

Приноси с научно-приложен характер:

1. Беше разработен системен ход за анализ на мутации в *BRCA1* и *BRCA2*, при български пациенти, което ще подпомогне генетичния скрининг, съпътстващ диагностиката, профилактиката и избора на терапия при жени с фамилен и тройно негативен рак на гърдата в България.

Приноси с потвърдителен характер:

1. Потвърдена беше установената в предишни проучвания асоциация на полиморфизми в *FGFR2* и *SLC4A7* гените с риска от развитие на рак на гърдата и определен ефекта им върху риска от заболяването при български пациенти.

VIII. Публикации и участия в конгреси и проекти

8.1. Публикации свързани с дисертационния труд

1. Rumyana Ivanova Dodova, Atanaska Velichkova Mitkova, Daniela Rosenova Dacheva, Lina Basam Hadjo, Alexandrina Ivanova Vlahova3 Margarita Stoyanova Taushanova - Hadjieva Spartak Stoyanov Valev, Marija Mitko Caulevska, Stanislava Dimitrova Popova, Ivan Emilov Popov, Tihomir Iliichev 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

2. 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

3. Румяна Додова, Атанаска Миткова. Радка Кънева и Ваньо Митев "Генетично предразположение и начин на живот – рискови фактори за развитието на рак на гърдата". 2013, Обзори по онкология

8.2. Участия в конгреси

1. 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. The 23nd Meeting of European Association for Cancer Research 5-8 July 2014, Munich, Germany

2. 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

3. Rumyana Dododva, 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 The 22nd Meeting of European Association for Cancer Research 7-10 July 2012, Barcelona, Spain

4. Rumyana Dododva, Darina Kachakova, Aleksandrina Vlahova, Tihomir Dikov, Svetlana Christova, Spartak Valev, Margarita Taushanova, Constanta Timcheva, Vanio Mitev, Radka Kaneva and Atanaska Mitkova. Association of polymorphisms in low-penetrance genes with breast cancer risk in Bulgarian cohort of familial cases and controls. The European Human Genetics Conference, 22-26 June 2012,Nuremberg, Germany

5. Rumyana Dodova, Daniela Dancheva, Aleksandrina Vlahova, Tihomir Dikov, Svetlana Hristova, Spartak Valev, Constanta Timcheva, Vanio Mitev, Radka Kaneva, and Atanaska Mitkova. Largegenomic aberrations in BRCA1 and BRCA 2 genes in Bulgarian breast cancer patients. TheEuropean Human Genetics Conference, 28-31 May 2011, Amsterdam, The Netherlands

6. Rumyana 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. European Congress of Pathology (ECP) 27 August - 01 September 2011, Helsinki, Finland.

7. Rumyana Dodova, Atanaska Mitkova, Mariya Caulevska, Aleksandrina Vlahova, Tihomir Dikov, Theophil Sedloev, Atanas Jonkov, Svetlana Christova, Vanio Mitev and Radka Kaneva, Association of polymorphisms in BRCA1 gene with breast cancer risk in Bulgarian familial cases. The 21st Meeting of European Association for Cancer Research 26-29 June 2010, Oslo, Norway

8. Dodova R, Mitkova A, Vlahova A, Dikov T, Sedloev T, Jonkov A, Kremensky I, Christova S, Mitev V and Kaneva R. Association of polymorphisms in BRCA1 exon 11 with breast cancer risk in Bulgaria. 8th Balkan Meeting on Human Genetics, Dubrovnik 2009

8.3. Участия в проекти:

2012-2013

Анализ на големи геномни делции, индерции и пренареждания в BRCA1 и BRCA2 гените при български пациентки с тройно негативен карцином на гърдата, ръководител

2011-2012

Генетичен анализ за носителство на мутации в екзон 11 на BRCA2 гена при пациентки с фамилен рак на гърдата в Българската популация, ръководител

2010-2011

Анализ на полиморфни варианти в гени с ниска пенетрантност, свързани с повишен риск за развитие на рак на гърдата, ръководител

2013-2014

Молекулярно-генетичен анализ на гени с междинна пенетрантност при BRCA негативни пациентки с фамилен рак на гърдата, участник

2011-2012

Анализ на мутации в BRCA1 гена при български пациентки с тройно негативен карцином на гърдата, участник

2010-2012

Анализ на клиничните и молекулните характеристики на плоскоклетъчния карцином на ларинкса и приложимостта им за определяне на прогнозата и ефикасността на лечението,
участник

2010-2012

Проследяване нивата на циркулиращи туморни клетки (ЦТК) при болни с метастазирал карцином на гърдата - прогностично и предиктивно значение, участник

2009-2012

Национален Университетски Комплекс за Биомедицински и Приложни Изследвания, инфраструктурен проект, участник

2010-2011

Доизграждане на звена Клетъчни и Тъканни Култури и Микрочипове и Лазерна Микродисекция към ЦММ, МУ - София, инфраструктурен проект, участник

2009-2011

Клинични и молекулни маркери с прогностична стойност за преживяемостта, качеството на живот и ефекта от лечението при малигнени глиални тумори, участник

IX. Приложения

Критериите за вероятно носителство на мутациите в *BRCA1* и *BRCA2* гените

До този момент са утвърдени две групи международни критерии за генетичен анализ на мутации в *BRCA* гените, Breast Cancer Linkage Consortium (BCLC), 1999 и NCCN (National Comprehensive Cancer Network), 2010..

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.

Критерии за подбор на клинично здрави контроли

- Еднаква възраст и пол с изследваната група пациенти;
- Да нямат родствена връзка с пациенти, включени в изследването;
- Да нямат преки родственици, майка, баща, сестри, братя или деца с рак на гърдата, яйчника или простатата;
- Да се от една и съща ентическа група с пациентите;

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

X. Използвани литературни източници:

1. Antoniou AC et al. Common breast cancer-predisposition alleles are associated with breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. Am J Hum Genet. 2008; (DOI 10.1016/j.ajhg.2008.02.008)
2. Antoniou AC et al. Common breast cancer susceptibility alleles and the risk of breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: implications for risk prediction UKPMC Funders Group Cancer Res. 2010 December 1; 70(23): 9742–9754; (doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1907)
3. Antoniou AC et .al. Breast and ovarian cancer risks to carriers of the BRCA1 5382insC and 185delAG and BRCA2 6174delT mutations: a combined analysis of 22 population based studies J Med Genet; 42:602–603, 2005; (doi: 10.1136/jmg.2004.024133)
4. Balman J et al. BRCA in breast cancer: ESMO ESMO Clinical Practice Guidelines Annals of Oncology 22 (Supplement 6): vi31–vi34 (doi:10.1093/annonc/mdr373)
5. Bougie O et al. Clinical Considerations of BRCA1- andBRCA2-Mutation Carriers: A Review Hindawi Publishing Corporation International Journal of Spectroscopy Volume, Article ID 374012, 11 pages, 2011 (doi:10.1155/2011/374012)
6. Bosland MC. The role of steroid hormones in prostate carcinogenesis. J Natl Cancer Inst Monogr 27: 39-66, 2000; ISSN:1052-6773
7. Cantor SB et al.Hereditary breast cancer and the BRCA1-associated FANCJ/BACH1/BRIP1 Future Oncol. 2011 February ; 7(2): 253–261. (doi:10.221/fon.10.19)
8. Casadei S et al. CONTRIBUTION TO FAMILIAL BREAST CANCER OF INHERITED MUTATIONS IN THE BRCA2-INTERACTING PROTEIN PALB2 Cancer Res. 2011 March 15; 71(6): 2222–2229; (doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-3958)
9. Cecener G et al. BRCA1/2 germline mutations and their clinical importance in Turkish breast cancer patients Cancer Invest. 2014 Oct;32(8):375-87. doi: 10.3109/07357907.2014.919302
10.Crandall CJ et al. Sex steroid metabolism polymorphisms and mammography density in pre- and perimenopausal women. Breast Cancer Research 2009, 11:R51 (doi:10.1186/bcr2340)
11. Diergaarde B et al.Polymorphisms in genes involved in sex hormone metabolism estrogen plus progestin hormone therapy use, and risk of postmenopausal breast cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2008 July; 17(7): 1751-1759 (doi: 10.1158/1055-9965. EPI-08-0168)
12. Easton D et al. Breast cancer genes-what are the real risks? Nat Genet; 1997 16(3): 210-1
Ellis NA et al. Localization of breast cancer susceptibly loci by genome-wite SNP linkage disequilibrium mapping. Genet Epidemiol, 2007; 30:48-61
13. Easton DF et al. A Systematic Genetic Assessment of 1,433 Sequence Variantsof Unknown Clinical Significance in the BRCA1 and BRCA2 BreastCancer–Predisposition Genes Am. J. Hum. Genet. 2007;81:873–883; (doi:10.1086/521032)
14. Ewalt IP et al. Genomic rearrangements in BRCA1 and BRCA2: A literature review. Genetics and Molecular Biology. 32,3,437-446; 2009 (doi:
55. Gold B et al. Genome-wide association study provides evidence fora breast cancer risk locus at 6q22.33; Pnas, 2008; (doi_10.1073_pnas.0800441105)
15. Grada A et al. Next-Generation Sequencing: Methodology and Application Journal of Investigative Dermatology (2013) 133, e1; (doi:10.1038/jid.2013.248)
16. Huang X et al. Detection of histone H2AX phosphorylation on Ser-139 as an indicator of DNA damage (DNA double-strand breaks)".Curr Protoc Cytom. Chapter 7: Unit 7.27, 2004. (doi:10.1002/0471142956.cy0727s30)

17. Huang Y et al. Association of CYP1B1 haplotypes and breast cancer risk in Caucasian women Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2009 April;18(4):1321–1323. (doi:10.1158/1055-9965.EPI-08-0853)
18. Janavičius R. Founder BRCA1/2 mutations in the Europe: implications for hereditary breast-ovarian cancer prevention and control EPMA Journal, 2010; (DOI 10.1007/s13167-010-0037-y)
19. Jordan VC et al. Antiestrogens: clinical applications of pharmacology. J Soc Gynecol Investig 7:S47-8, 2000; (doi: 10.1177/107155760000700112)
K
20. Kirchhoff et al. The 6q22.33 Locus and Breast Cancer Susceptibility Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2009;18(9). September 2009; (doi: 10.1158/1055-9965.EPI-09-0151)
21. Narod SA et al. BRCA1 AND BRCA2: 1994 AND BEYOND. Nature Reviews Cancer 4, 665-676, September 2004; (doi:10.1038/nrc1431)
22. Narod SA et al. BRCA1 and BRCA2 Mutations and Breast Cancer. Discovery Medicine, 2011; (12(66):445-453)
Sergeant M et al, 2012; (doi:10.1038/nrmicro2850)
23. O'Flaherty E et al. TOX defines a conserved subfamily of HMG-box proteins BMC Genomics 2003; (doi:10.1186/1471-2164-4-13)
102. Park JY et al. Zhang F, Andreassen PR. PALB2: the hub of a network of tumor suppressors involved in DNA damage responses Biochim Biophys Acta. 2014 Aug;1846(1):263-75; (doi: 10.1016/j.bbcan.2014.06.003)
24. Peng S et al. Genetic polymorphisms and breast cancer risk: evidencefrom meta-analyses, pooled analyses, and genome-wide association studies Breast Cancer Res Treat 127:309–324;
25. Peng S et al. Genetic polymorphisms and breast cancer risk: evidencefrom meta-analyses, pooled analyses, and genome-wide association studies. Breast Cancer Res Treat, 2011; 127:309–324; (DOI 10.1007/s10549-011-1459-5)
25. Ransburgh DJ, Chiba N, Ishioka C, Toland AE, Parvin JD. Identification of breast tumour mutations in BRCA1 that abolish its function in homologous DNA recombination. Cancer Res. 2010;70(3):988-995.
115. Rosman DS et al. New Insights into Breast Cancer Genetics and Impact on Patient Management. Curr. Treat. Opt. Onc, 2007; (1007:11864-11877)
117. Rothberg JM et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. Nature 475(7356):348-5, 2011; (doi:10.1038/nature10242)
27. Rudnicka H et al. Large BRCA1 and BRCA2 genomic rearrangements in Polish high-risk breast and ovarian cancer families. Mol Biol Rep. 2013 Dec;40(12):6619-23. doi: 10.1007/s11033-013-2775-0.
28. Saik RK et al. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase 28 September 1987; accepted 7 December 1988 SCIENCE, VOL. 239 (DOI: 10.1126/science.2448875)
29. Shao K et al. Emulsion PCR: A High Efficient Way of PCR Amplification of Random DNA Libraries in Aptamer Selection PLoS ONE, www.plosone.org September 2011, Volume 6, Issue 9, e24910; (DOI: 10.1371/journal.pone.0024910)
30. Thomas G et al. A multistage genome-wide association study in breast cancer identifies two new risk alleles at 1p11.2 and 14q24.1 (RAD51L1) Nature Genetics volume 41/number 5/may 2009 (doi:10.1038/ng353);

Използвани интернет източници:

1.http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=832 (www.ncbi.nlm.nih.gov, L22)
2. http://www.phosphosite.org/proteinAction.do?id=5475 (www.phosphosite.org, L23)
3, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1247/. (www.ncbi.nlm.nih.gov, L28)
4.http://www.allseq.com/knowledgebank/sequencing-platforms/life-technologies-ion-torrent (www.allseq.com, L37)
5.http://ioncommunity.iontorrent.com/ (www.ioncommunity.iontorrent.com, L38)
6. http://arboretum.harvard.edu/wp-content/uploads/Agilent-2100-Bioanalyzer-Software-Guide.pdf
7.https://mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=zjCZBtdOUyAt3KF3EwRZhNWLtcfv9pVl/tHJIM%5Cfa9FWO8KMqctOGIoqYwxaGF9Y (www.mlpa.com, L42)
8.http://omim.org/entry/17694 (www.omim.org, L97)
9. http://www.crcl.fr/299-Projects.crcl.aspx?language=en-GB (www.crcl.fr, L99)
10.https://research.nhgri.nih.gov/projects/bic/Member/cgibin/mutation_frequency.cgi?table=brca1_exons&by=type
(www. research.nhgri.nih.gov, L100)
11.(http://www.kconfab.org/Progress/Classification.shtml).
(http://www.kconfab.org, L101)

"Един закон гласи: не можеш да предадеш на другите хора това, което нямаш. Не можеш да убедиш хората в нещо, ако ти сам не вярваш в него. Не можеш да събудиш доброто в човека, ако ти нямаш доброто в себе си. Същото се отнася до знанието и до любовта."

Беинса Дуно

Благодаря на всички, които ми дадоха необходимото знание. Не ми позволиха да загубя вяра и да забравя с каква любов и хъс започна и продължава реализацията на проекта за рака на гърдата.

SF/RD,2015