

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

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

РУМЯНА ИВАНОВА ДОДОВА

ДИСЕРТАЦИЯ ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА
СТЕПЕН ДОКТОР

НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ – 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



"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.

Съдържание:

I. Въведение	11
II. Литературен обзор	12
2.1. Демографска характеристика на рака на гърдата	12
2.2. Анатомия и хистология на млечната жлеза	14
2.3. Карцином на гърдата, определение и видове	17
2.4. Рискови фактори за развитието на рак на гърдата	20
2.4.1. Рискови фактори, които не могат да бъдат променени	21
2.4.2. Рискови фактори свързани с начина на живот	23
2.4.3. Рискови фактори с несигурен, противоречив или недоказан ефект	24
2.5. Гени свързани с предразположение за развитие на рак на гърдата	25
2.5.1. Високо пенетрантни гени, свързани с предразположение за развитие на рак на гърдата	26
2.5.2. Гени със средна (междинна) пенетрантност, свързани с предразположение за развитие на рак на гърдата	30
2.5.3. Нископенетрантни гени свързани с предразположение за развитие на рака на гърдата	36
2.6. Роля на <i>BRCA</i> гените при рака на гърдата	40
2.6.1. Участие на <i>BRCA1</i> и <i>BRCA2</i> гените в поправката на ДНК	40
2.6.2. Мутационен спектър на <i>BRCA</i> гените	46
2.6.2.1. Спектър и честота на мутациите в <i>BRCA1</i> и <i>BRCA2</i> гените Европейските популации	46
2.6.2.2. Фенотипна изява на рака на гърдата при носителство на мутации в <i>BRCA</i> гените	51
2.7. Модели за предикция на мутации в <i>BRCA1</i> и <i>BRCA2</i> гените и оценка на риска за развитие на рак на гърдата	52
2.7.1. Модели за предикция на мутации в <i>BRCA1</i> и <i>BRCA2</i> гените	52
2.7.2. Молекулно-генетични тестове и интерпретация на получените резултати	53
2.7.3. Оценка на варианти с неясно клинично значение (<i>VUS- variants of unknown clinical significance</i>)	55
2.7.4. Категории и определяне на получените резултати	56
III. Цел и задачи	58
3.1. Цел	58
3.2. Задачи	58
3.2.1 Създаване на биобанка от пациенти с фамилен рак на гърдата	58
3.2.2. Мутационен скрининг чрез директно секвениране на <i>BRCA1</i> и <i>BRCA2</i> гените при пациенти с фамилен рак на гърдата и яйчниците	58

3.2.3. Използване на откритите мутации в <i>BRCA1</i> и <i>BRCA2</i> гените като положителни контроли при въвеждане на скрининг със секвениране от нов поколение	59
3.2.4. Анализ за големи делеции и дупликации в <i>BRCA1</i> и <i>BRCA2</i> гените с MLPA (мултиплексен анализ на лигирани проби)	59
3.2.5. Секвенционен анализ на най-често докладваните по литературни данни мутации в гени с междинна пенетрантност <i>PALB2</i> и <i>BRIP1</i> , свързани с развитие на рак на гърдата при <i>BRCA</i> негативни пациентки	59
3.2.6. Асоциативно проучване от тип случай-контроли на полиморфни варианти в гени с ниска пенетрантност (<i>MAP3K1</i> , <i>FGFR2</i> , <i>RNF146</i> , <i>TOX3</i> , <i>C6orf97</i> , <i>SLC4A7</i> и <i>CYP11B1</i>)	60
3.2.7. Анализ и статистическа обработка на получените резултати	60
IV. Материали и методи	61
4.1. Клиничен материал	61
4.1.1. Подбор на пациентите с фамилен рак на гърдата	61
4.1.2. Подбор на клинично здрави контроли	62
4.2. Преданалитична обработка на биологичния материал	63
4.2.1. Изолиране на високомолекулна ДНК от кръв	63
4.2.2. Оценка на качеството и количеството на изолираната ДНК.....	66
4.3. Генетични изследвания	66
4.3.1. Намножаване на фрагменти ДНК чрез полимеразна верижна реакция (PCR – P olymerase C hain R eaction)	66
4.3.2. Качествен контрол на PCR реакцията	68
4.3.3. Хоризонтална агарозна електрофореза	68
4.3.4. Директно секвениране	69
4.3.5. Секвениране от второ поколение посредством Ion Torrent PGM (P ersonal G enome M achine)	70
4.3. 6. Мултиплексен амплификационен анализ на лигирани проби (MLPA)	75
4.3.7. TaqMan [®] Real Time PCR	79
4. 4. Биоинформатичен анализ на получените резултати	81
4.4.1.Биоинформатичен анализ на резултатите, получени от директното секвениране	81
4.4.2. Биоинформатичен анализ на резултатите, получени от секвенирането от ново поколение	82
4.4.3. Биоинформатичен анализ на резултатите, получени от MPLA	82
4.5. Статистически методи	83
4.5.1. Изчисляване на хетерозиготността и на алелните и генотипни честоти в извадката	83
4.5.2. Нулева хипотеза (H_0)	83

4.5.3. Метод χ^2	84
4.5.4. Закон на Харди-Вайнберг	85
4.5.5. Проверка на статистически хипотези	85
4.6. Използвана апаратура	86
V. Резултати	88
5.1. Подбор на пациентите с рак на гърдата и създаване на ДНК банка и клинична база данни	88
5.2. Оптимизация на условията за амплификация на <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> , <i>PALB2</i> и <i>BRIP1</i> гените	88
5.2.1. Подбор на праймерите, необходими за амплификацията на <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> , <i>PALB2</i> и <i>BRIP1</i> гените	89
5.2.2. Температура на амплификация	89
5.2.3. Оптимизация на концентрацията на $MgCl_2$	93
5.2.4. Оптимизация на концентрацията на матричната ДНК	93
5.2.5. Електрофоретичен анализ на PCR продуктите	94
5.2.6. Оптимизация на условията за директното секвениране	95
5.2.7. Оптимизация на условията на MLPA анализа	95
5.3. Молекулярно-генетичен анализ за наличието на мутации в <i>BRCA1</i> и <i>BRCA2</i> гените посредством директно секвениране	98
5.3.1. Докладвани в литературните и електронните източници мутации, които са с доказан патогенен ефект за развитието на рак на гърдата	102
5.3.1.1. Патогенни мутации в <i>BRCA1</i> гена	102
5.3.1.2. Патогенни мутации в <i>BRCA2</i> гена	104
5.3.2. Нови варианти, които не са докладвани в литературните и електронните източници	105
5.3.3 Варианти с неясен клиничен ефект (VUS – variants with uncertain significance)	108
5.3.3.1. Варианти с неясно клинично значение от тип промяна на смисъла в <i>BRCA1</i> гена	109
5.3.3.2. Варианти с неясно клинично значение от тип промяна на смисъла в <i>BRCA2</i> гена	110
5.3.4. Варианти, които са с честота по-висока от 2% в изследваната извадка и вероятно не оказват ефект за развитието на рак на гърдата	112
5.3.5. Варианти, които са с неутрален ефект за развитието на заболяването	115
5.4. Използване на откритите мутации в <i>BRCA1</i> и <i>BRCA2</i> гените като положителни контроли при въвеждане на скрининг със секвениране от ново поколение	118

5.5. Изследване за наличието на големи делеции, дупликации и пренареждания в <i>BRCA1</i> и <i>BRCA2</i> гените посредством MLPA анализ (мултиплексен анализ на лигирани проби)	120
5.6. Генетичният анализ за наличието на мутациите в гени с междинна пенетрантност	122
5.7. Анализ на полиморфни варианти с ниска пенетрантност, асоциирани с предразположение за развитие на рак на гърдата	123
5.7.1. Генетичен анализ на полиморфни варианти rs2981579 и rs2981582 във <i>FGFR2</i> гена	124
5.7.2. Генетичен анализ на полиморфен вариант rs 889312 в <i>MAP3K1</i> гена	127
5.7.3. Генетичен анализ на полиморфен вариант rs1056836 в <i>CYP1B1</i> гена	128
5.7.4. Генетичен анализ на полиморфен вариант rs 3757318 в хромозомен локус <i>C6orf9</i>	129
5.7.5. Генетичен анализ на полиморфен вариант rs2180341 в <i>RNF146</i>	130
5.7.6. Генетичен анализ на полиморфен вариант rs3803662 в <i>TOX 3</i> гена ...	132
5.7.7. Генетичен анализ на полиморфен вариант в <i>SLC4A7</i> гена	133
VI. Обсъждане на получените резултати	134
6.1. Мутационен скрининг на <i>BRCA1</i> и <i>BRCA2</i> гените при пациенти с фамилен рак на гърдата и яйчниците	136
6.1.1. Мутации с доказан патогенен ефект за развитието на рак на гърдата	137
6.1.2. Варианти с неясен клиничен ефект (VUS – variants with uncertain clinical effect)	148
6.1.3. Варианти с неутрален за развитието на рак на гърдата	150
6.2. Секвенционен анализ на най-честите по литературни данни мутации, в гени с междинна пенетрантност при рака на гърдата	152
6.3. Асоциативно проучване на полиморфни варианти в гени с ниска пенетрантност	154
6.3.1. Генетичен анализ на полиморфни варианти rs2981579 и rs2981582 в <i>FGFR2</i> гена	154
6.3.2. Генетичен анализ на полиморфен вариант rs 889312 в <i>MAP3K1</i> гена	155
6.3.3. Генетичен анализ на полиморфен вариант rs1056836 в <i>CYP1B1</i> гена	156
6.3.4. Генетичен анализ на полиморфен вариант rs 3757318 в хромозомен локус <i>C6orf9</i>	157
6.3.5. Генетичен анализ на полиморфен вариант rs2180341 в <i>RNF146</i>	157
6.3.6. Генетичен анализ на полиморфен вариант rs3803662 в <i>TOX 3</i> гена	158
6.3.7. Генетичен анализ на полиморфен вариант в <i>SLC4A7</i> гена	158

Съдържание

6.4. Разработване на системен ход за скрининг на мутации в <i>BRCA1</i> и <i>BRCA2</i> гените	160
VII.Изводи	163
VIII. Приноси	164
IX.Приложения.....	165
Приложение 1.....	165
Приложение 2	169
Приложение 3	173
Приложение 4	174
Приложение 5	176
Приложение 6	183
Приложение 7	186
Приложение 8	189
X. Публикации и участия в конгреси и проекти	196
Публикувани във връзка с дисертационния труд статии	196
Участия в конгреси	197
Участия в проекти свързани с рака на гърдата	198
XI. Използвани източници	199
Използвани литературни източници	199
Използвани електронни източници	207

Използвани съкращения:

ЦММ – Център по Молекулна Медицина

ДНК - Дезоксирибонуклеиновата киселина

РНК - Рибонуклеинова киселина

TE буфер - разтвор на 1М Трис-НСl, рН 8, с 0,1М Na₂EDTA; стандартно използван при изолиране, обработка и съхранение на ДНК и РНК

AJ -източноевропейски еврей ашкенази

ADH - атипичната дуктална хиперплазия

ALH - атипичната лобуларна хиперплазия

ASCO (American Society of Clinical Oncology) - Американско дружество по клинична онкология

ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics) - Американски колеж по медицинска генетика и геномика

BMI (Body Mass Index) - индекс на телесна маса

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

bp - нуклеотидни бази

CK5/6 - цитокератини 5 и 6

CK8/18 – цитокератини 8 и 18

CI (confidence interval) – доверителен интервал

CtIP транскрипционен фактор, участващ в регулацията на BRCA1

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

DSB (Double Strand Breaks) - двойноверижни увреждания на ДНК

DDR (DNA Damage Response) - отговор при ДНК увреждания

DBD (DNA-binding domain) - ДНК свързващ домен

dsDNA (Double-stranded) - двойноверижна ДНК

ddNTP (Dideoxynucleotide triphosphates) - дидезоксинуклеотиди

dNTP – дезокси нуклеотид трифосфат

dGTP - дезокси гуанин трифосфат

dATP - дезокси аденин трифосфат

dTTP - дезокси тимин трифосфат

dCTP - дезокси цитозин трифосфат

ER – естрогенов рецептор

ES - ембрионални стволови

EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) - етилендиаминотетраоцетна киселина

GWAS (genome-wide association study) - целогеномно асоциативно проучване

HBOC (Hereditary Breast Ovarian Cancer) - наследствен рак на гърдата и яйчниците

HER2 (human epidermal growth factor receptor (HER/EGFR/ERBB) – рецептор за човешки епидермален растежен фактор

HDL липопротеини с висока плътност

Използвани съкращения

HR (Homologous Recombination) – хомоложна рекомбинация
H₃BO₃ – борна киселина
IARC (International Agency for Research of Cancer) – международна агенция за изследване на рака
IDC (Invasive Ductal Carcinoma) – инвазивен дуктален карцином
ILD (Invasive Lobular Carcinoma) – инвазивен лобуларен карцином
IGF I (Insulin-like growth factor-I) – инсулинов фактор на растежа I
IGF II (Insulin-like growth factor-II) – инсулинов фактор на растежа II
Ki-67 – нуклеарен антиген, нехистонов ДНК свързващ белтък
kDa – килодалтона
LCIS (Lobular carcinoma in situ) – лобуларен карцином in situ
LDL – липопротеини с ниска плътност
LDLR – рецептор за липопротеини с ниска плътност
MK167 – маркер за пролиферация на Ki-67
MRN – комплекс от белтъците MRE11, RAD50 и NBS1
MIRN125B – ген експресиращ miRNA 125b
MLPA (Multiplex Ligation Probe Amplification) – мултиплексен анализ на лигирани проби
mg – микрограм
μl – микролитър
mM – милимол
MgCl₂ – магнезиев хлорид
NHEJ – нехомоложно присъединяване на крайщата на ДНК веригата при репарацията
NLS (*nuclear localization signal*) – ядрено локализиращ сигнал
NCCN (National Comprehensive Cancer Network) – национална ракова мрежа
NGS (Next generation sequencing) – секвениране от ново поколение
NaCl – натриев хлорид
NH₄Cl – амониев хлорид
KHCO₃ – калиев бикарбонат
nmol – наномол
OR (Odds Ratio) – съотношение на вероятност
PINA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) – пролиферативен клетъчен ядрен антиген
PR – прогестеронов рецептор
pM – пикомол
QPCR (quantitative PCR) – количествен quantitative PCR
Rpm – центрофужни обороти за една минута
SHBG (Sex Hormone-Binding Globulin) – хормон свързващ глобулин
SSA (single-strand annealing) – едноверижна хибридизация по време на хомоложната рекомбинация
SDC клъстер – SQ секвенции – клъстери от серинови и треонинови последователности, известни като SQ клъстер (SDC).
SNPs (Single nucleotide polymorphism) – еднуклеотидни полиморфизм

Използвани съкращения

ssDNA (single-stranded DNA) едноверижна ДНК верига

SDS – натриев додецил сулфат

TDLU (Terminal Duct Lobular Unit) - крайна дукто-лобуларна единица,

TNBC – (triple negative breast cancer) - тройно негативен рак на гърдата

TNFSF4 - , tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4

VUS (variants of unknown clinical significance) вариант с неясно клинично значение

TBE - трис боратен буфер

WCRF (World Cancer Research Fund) – международен фонд за ракови изследвания

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.

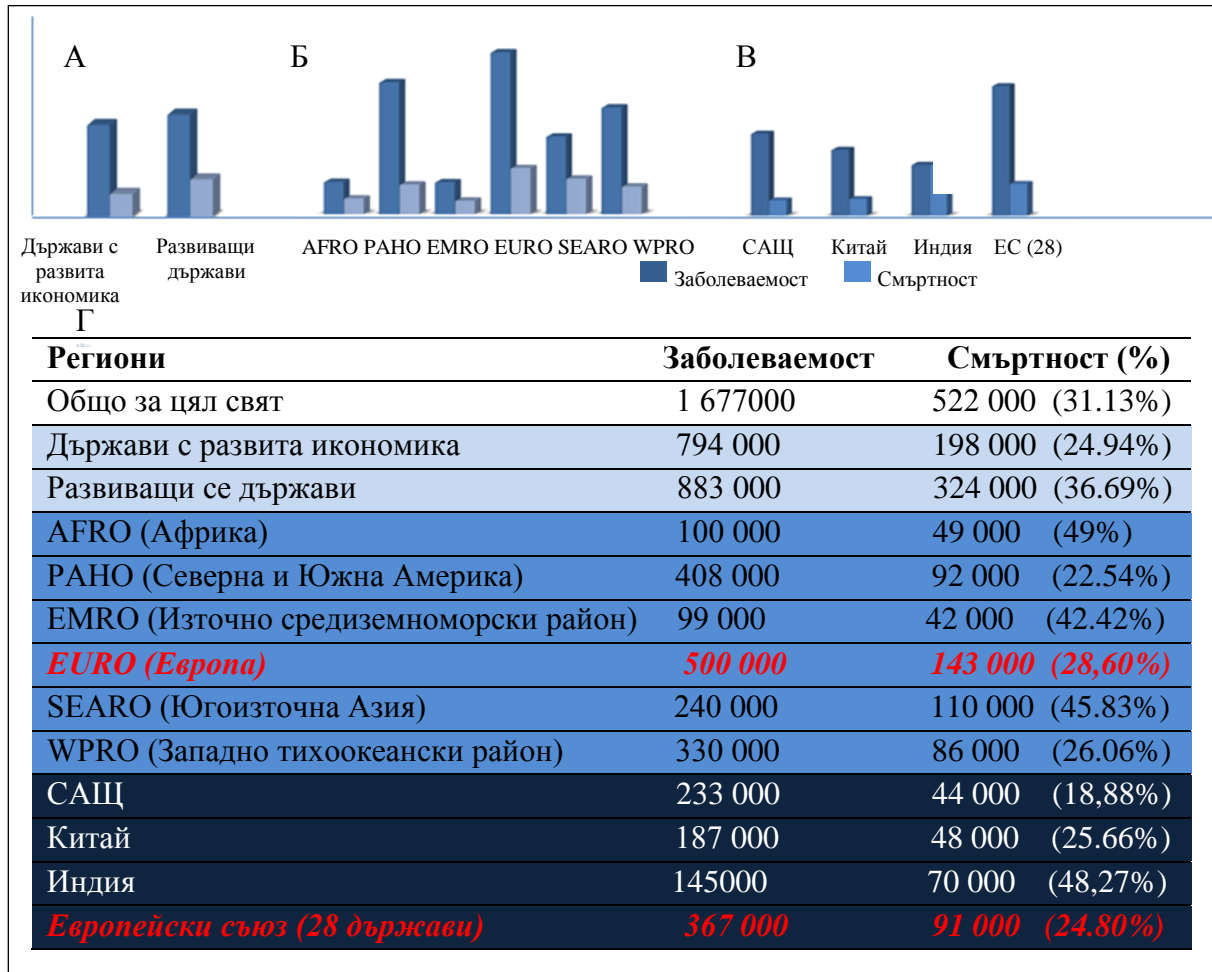
За развитието на рака на гърдата важна роля имат генетичното предразположение, начинът на живот и влиянието на околната среда. По литературни данни повече от 20% от случаите на фамилен рак на гърдата и по-малко от 5% от рака на гърдата като цяло са дължат на герминативни мутации в *BRCA1* или *BRCA2* 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 фамилен и тройно негативен рак на гърдата в България.

II. Литературен обзор

2.1. Демографска характеристика на рака на гърдата

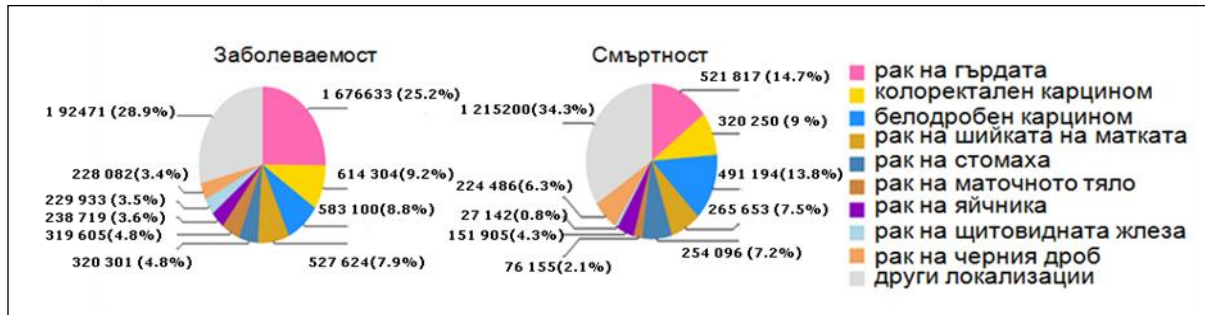
Ракът на гърдата е първото по честота злокачествено заболяване сред жените в световен мащаб, като през 2012 година са диагностицирани 167 милиона нови случая (www.globocan, L1). Честотата на заболяването варира при различните популации като разликата между отделните региони е около четири пъти, съответно от 27 на 100 000 души в Средна Африка и Източна Азия до 96 на 100 000 души в Западна Европа (фигура 1).



Фигура 1. Прогнозна заболеваемост и смъртност от рак на гърдата в световен мащаб за 2012 година. А. Съотношение на заболеваемост и смъртност между развитите в икономическо отношение държави и развиващите се държави. Б. Съотношение на заболеваемост и смъртност между различните региони в световен мащаб. В. Съотношение на заболеваемост и смъртност между четирите най-многобройни популации. Г. Съотношение на заболеваемост и смъртност между различните популации, като в скоби е показан процентът на смъртност (www.globocan, L1)

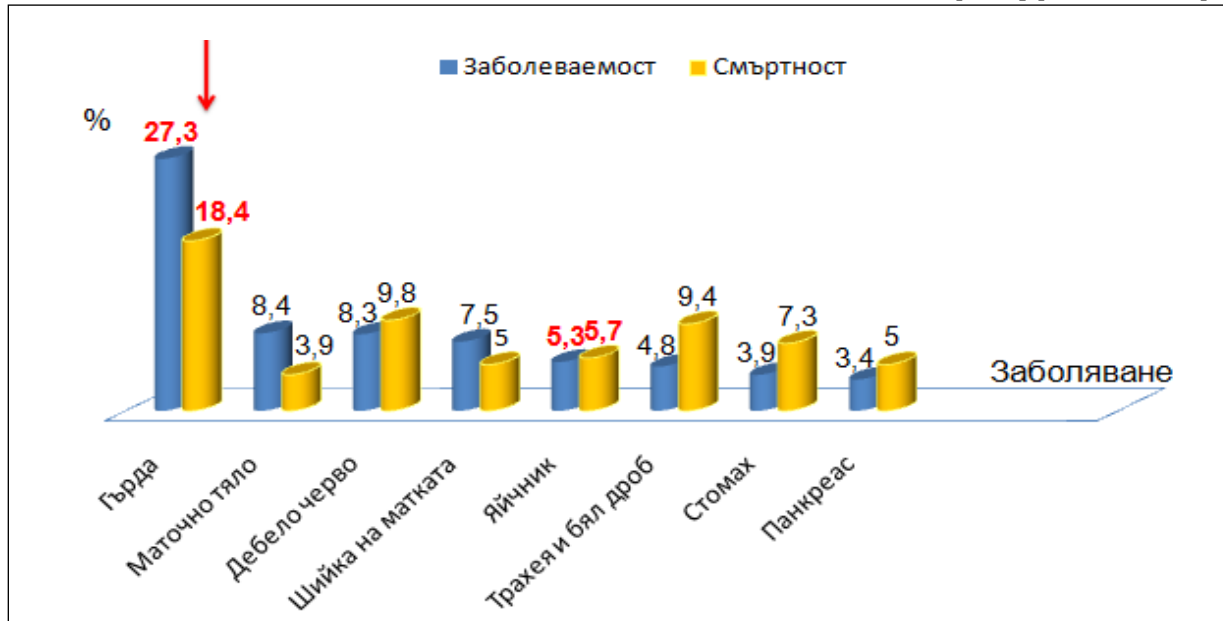
Литературен обзор

По данни на IARC (International Agency for Research of Cancer) при жените с най-висока честота са следните злокачествени заболявания: рак на гърдата (25.2%), колоректален карцином (9.2%), белодробен карцином (8.8%), рак на маточната шийка (7.9%), рак на стомаха (4.8%), рак на маточното тяло (4.8 %) и рак на яйчниците (3,6%). За същия отчетен период 14.7% от починалите са били диагностицирани с рак на гърдата (*фигура 2*) (www.globocan, L2).



Фигура 2. Честота на заболяемост и смъртност от злокачествени заболявания при жените по данни на IARC (www.globocan, L2)

По данни на Националния раков регистър през 2011 година в България злокачествено заболяване са развили 34 864 души, съответно 18 659 (53.5%) мъже и 16 205 (46.5%) жени. По прогнозните данни за 2014 година се очаква 37 623 (95% CI: 35 600 - 39 647) души да развият злокачествени заболявания (Dimitrova N, et al. 2013). При жените на първо място по честота на заболяемост е рактът на гърдата (27.3%), следван от рака на маточното тяло (18.4%), дебелото черво (8.3%), маточната шийка (7.5%) и яйчниците (5.3%) (*фигура 3*) (Dimitrova N, et al. 2013). През 2011 г. в България са регистрирани 3885 нови случаи на рак на гърдата, а броя на смъртните случаи от това заболяване е 1284. Прогнозните данни за 2014 г. сочат 4011 (95%, CI: 3783-4238) новодиагностицирани случаи с рак на гърдата (Dimitrova N, et al. 2013). Заболеваемостта от това онкологично заболяване се повишава с 1.8% средногодишно, докато при смъртността не е отчетена статистически значима промяна за отчетения период (Dimitrova N, et al. 2013). Най-голям брой случаи на заболяването са отчетени в областите София град, Пловдив, Велико Търново, Варна и Русе, над 60 на 100 000 души, докато смъртността е била най-висока в областите Перник, Велико Търново и Габрово, над 20 на 100 000 души (Dimitrova N, et al. 2013). Стандартизираната заболеваемост от рак на гърдата в България е 76.3 на 100 000 жени и е по-ниска от средната за Европа където тя е 94.2 на 100 000 жени (www.eco.iarc.fr, L3) докато стандартизираната смъртност от рак гърдата в България е 24.1 на 100 000 и е малко по-висока от средната за Европа където тя е 23.1 на 100 000 жени (www.eco.iarc.fr, L3). Относителната петгодишна преживяемост от рак на гърдата в България е 71.7 % и е по-ниска от средната за Европа, където тя е 81.8 % (www.eco.iarc.fr, L3).



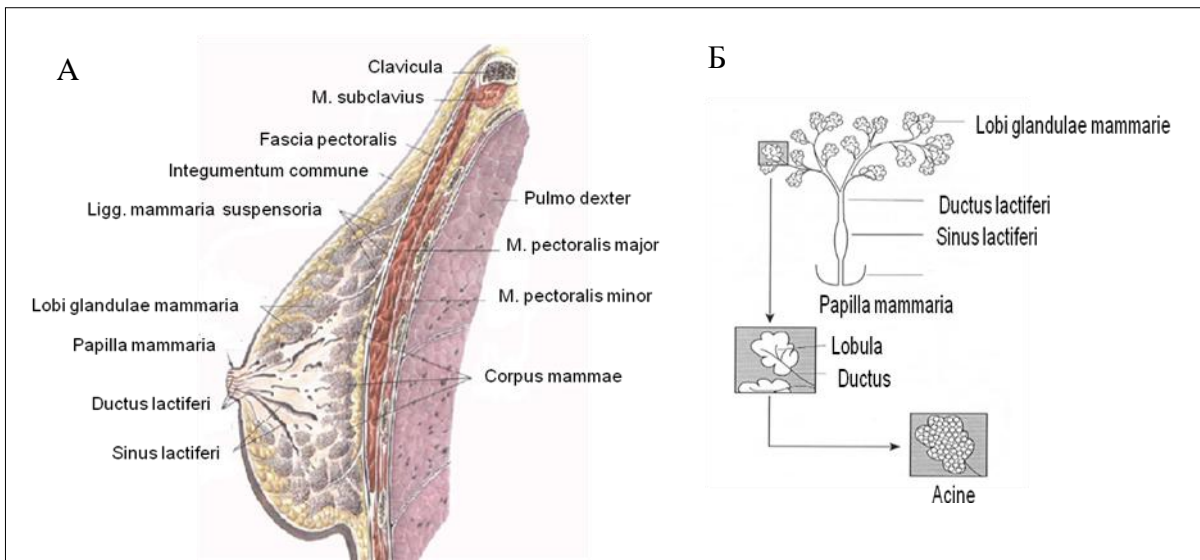
Фигура 3. Честота на заболяемост и смъртност от злокачествени заболявания при жените в България за 2011 година по данни на Националния Раков Регистър (Dimitrova N, et al. 2013)

2.2. Анатомия и хистология на млечната жлеза

Млечната жлеза (*glandula mammaria*) е чифтен орган от кожен произход изграден от 15-20 сложни тубуло-алвеоларни жлези и е разположен върху големия гръден мускул (*m. pectoralis major*) и отчасти върху предния зъбчат мускул (*m. serratus anterior*) в пространството между предната част на гръдния кош и края на подмишничната линия, като се простира на нивото от второ до шесто ребро. Млечната жлеза е покрита с мастна тъкан, която ѝ придава форма и опора (Синельников РД, 1996). Теглото и размера на жлезата се различава през отделните периоди от живота, както и при различните индивиди (Синельников РД, 1996; Gray Н, 2000). В средата на млечната жлеза се намира ареолата (*areola mammae*) в центъра на която се разполага зърно (*papilla mammaria*) с цилиндрична или конична форма (**фигура 4**) (Gray Н, 2000).

Млечната жлеза има мезодермален произход с изключение на кръвоносните съдове и съединителната тъкан, които са с ектодермален произход. Започва развитието си през третия месец на ембрионалното развитие, под формата на редица малки издатини навътре в ектодермата, в която навлиза мезодерма от която по-късно се формира епитела на жлезистите фоликули и каналите. развитието на фоликулите претърпява окончателно развитие само при раждали жени.

Млечната жлеза при жените е изградена от паренхим и строма (Гълъбов Г и Ванков В. 1974). Паренхимът или тялото на млечната жлеза (*corpus mammae*) се състои от 15-20 радиално разположени дялове, лоба (*lobi glandulae mammae*), изолирани един от друг посредством мастна тъкан. По своя строеж лобовите представляват алвеоларни жлези. Всеки дял се състои от отделни млечни жлези, лобули (*lobuli glandulae mammae*) (Синельников РД, 1996).

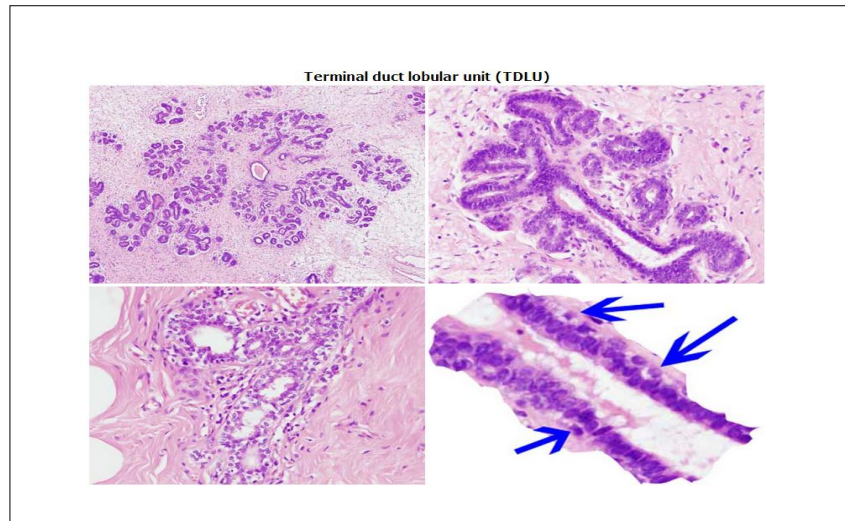


Фигура 4. Анатомично устройство на млечна жлеза.

А. Напречен разрез на млечна жлеза; Б. Схема на делче на млечна жлеза
(Синельников РД, 1996; Gray Н, 2000)

Всеки лоб е със собствен млечен канал (*ductus lactiferus*), насочващ се към мамилата. Преди да навлезе в последната, той образува млечна пазуха с вретеновидна форма (*sinus lactiferus*). Всеки канал пронизва зърното (*papilla mammarie*) и се отваря на неговия връх посредством фуниевидно разширение. Каналите формират крайна дукто-лобуларна единица, TDLU (Terminal Duct Lobular Unit) (Фигура 5). Броят на отворите варира от 8 до 15, като някои канали се сливат (Синельников РД, 1996). Жлезистата част на канала показва структурни вариации в зависимост от функционалното състояние. Извън периоди на бременност и лактация, жлезистият дял се състои от рехаво разположени тубули, групирани в делчета. По време на бременност и лактация жлезистите тубули се трансформират в алвеоли, покрити с еднореден кубичен епител, разположен направо върху базалната мембрана (Гълъбов Г и Ванков В. 1974). Стромата на млечната жлеза е изградена от съединителна, главно мастна тъкан. Дебел слой мастна тъкан се разполага под кожата. Този слой се прекосява от плътни фиброзни повлекла, водещи началото си от дермата и насочващи се към паренхимата. Повлеклата имат поддържаща функция и се наричат Куперови връзки (Гълъбов Г и Ванков В. 1974). Съотношението между фиброзната тъкан и мастната тъкан е различно, но като цяло стромата е по-голяма част от обема на гърдата при възрастни жени (Гълъбов Г и Ванков В. 1974).

Оттокът на лимфата от млечната жлеза става по лимфни съдове, започващи от интерлобуларните пространства и от стените на каналчетата, и се оттича към две сплетения - повърхностно, субалвеоларно и дълбоко, фасциално (Гълъбов Г и Ванков В, 1974).



Фигура 5. Крайна дукто-лобуларна единица, TDLU
(www.breastpathology.info, L4)

Лимфните съдове от дълбокото сплетение прекосяват гръдните мускули и достигат разположените под тях лимфни възли (възли на Rotter) и от там се насочват към подключичните лимфни възли (лимфен път на Grossman). Другите съдове от дълбокото сплетение се оттичат към медиастеналните лимфни възли (Гълъбов Г и Ванков В. 1974). От долно-медиалната част на жлезата лимфните съдове могат да достигнат чернодробните и субдиафрагмалните лимфни възли (лимфен път на Gerota). Повърхностните лимфни сплетения на двете млечни жлези са свързани помежду си и лимфата от едната жлеза може да се отправи към другата и от там към срещуположните аксиални лимфни възли. Пътищата на отток на лимфата имат голямо значение в онкологията, като пътища за разпространение на раковите клетки при рак на гърдата (Гълъбов Г и Ванков В. 1974).

При мъжете млечната жлеза (*mamma masculina*) е рудиментарен орган (Гълъбов, Г и Ванков, В, 1974). Тя се състои от неголямо количество съединителна тъкан и малко не достигнали крайна диференциация жлези.

Кръвоснабдяването на гърдата се осъществява от артерии, чиито разклонения образуват богата мрежа от анастомози. Около жлезистите алвеоли и каналчета се образува гъста капилярна мрежа. Капилярите от своя страна се оттичат към венозни съдове, следващи пътя на артериите (Синельников РД, 1996).

Инервацията на жлезистия паренхим на гърдата се осъществява от симпатикови и сетивни нервни влакна. Каналите и жлезите на млечната жлеза са покрити с епителна тъкан. Повечето от заболяванията на гърдата водят началото си от епителната тъкан. (Гълъбов Г и Ванков В. 1974; www.cancer.org, L5).

2.3. Карцином на гърдата, определение и видове

До този момент няма точно определение, описващо всички ракови заболявания. Те са голямо семейство, над 100 различни заболявания, засягащи всички органи на тялото. Трябва да се отбележи, че дори и един вид раково заболяване се проявява различно при различните индивиди. На клетъчно ниво ракът може да се приеме като нарушение на биохимичните и сигналните пътища, участващи в регулацията на нормалната клетка (Levitzki A et al, 2010). С течение на времето в клетката се натрупват хромозомни аномалии, мутации и епигенетични промени, оказващи влияние върху тези пътища, които в някои случаи могат да доведат до трансформация на нормалната клетка в ракова, проявяваща следните характериски, общи за болшинството онкологични заболявания (Levitzki A et al, 2010):

- ускорен растеж и пролиферация;
- подтискане на апоптозата и обезсмъртяване на клетката;
- индуциране на ангиогенезата;
- активиране на инвазията и метастазитането

При карцинома на гърдата заболяването води началото си от епителните клетки, изграждащи жлезата и като цяло е много хетерогенно в морфологично и генетично отношение. Заболяването се среща почти изцяло при жените, но в редки случаи мъжете също могат да развият рак на гърдата (www.cancer.org, L5).

Развитието на рака на гърдата включва прогресия, състояща се от няколко етапа - карцином *in situ*, инвазивен карцином и метастатично заболяване (Gautam K et al, 2010). В зависимост на инвазията на раковите клетки туморите на гърдата могат да бъдат разделени на две групи: карциноми *in situ* и инвазивни. Термина *in situ* се използва за означаване на ранните стадии на рака, когато той е ограничен до клетките, от които произлиза. При инвазивния рак на гърдата раковите клетки се разпространяват извън слоя от който произхождат (Gautam K et al, 2010).

В зависимост от локализацията им в гърдата, туморите могат да бъдат класифицирани хистологично на дуктални карциноми *in situ* (DCIS - Ductal carcinoma *in situ*), инвазивни дуктални карциноми (IDC - Invasive Ductal Carcinoma), лобуларни карциноми *in situ* (LCIS - Lobular carcinoma *in situ*) и лобиларни инвазивни карциноми (ILD - Invasive Lobular Carcinoma). От всички хистологични типове до 80% са дуктални, между 10 и 15% са лобуларни и до 10% - други видове, например папиларни, тубуларни, муцинозни, медуларни и др. (Gautam K et al, 2010; Fattaneh A et al, 2003, Welch PL et al, 2000).

През последното десетилетие микрочиповите технологии позволиха да се разработи нова класификация на карциномите на гърдата, базирана на техните генно-експресионни профили, с основна разлика в пролиферативната им активност (**фигура б**) (Fan C et al, 2006). На базата на това бяха обособени пет основни подтипа рак на гърдата: *луминална А група*, *луминална В група*; *HER2 (+) група*, *Claudin-low* (група с ниски нива на експресия на клодин) и *базална група* (Zepeda-Castilla EJ et al, 2008; Prat A, 2010; Creighton et al, 2012). Към тях се прибавя и нормоподобната група тумори, които експресират гени, характерни за базалните епителни и адипозни клетки и имат

понижени нива на експресия на луминалния генен клъстер. Доказано е, че молекулните различия между отделните подтипове корелират както с клинични характеристики, като преживяемост, прогноза и чувствителност към лечението, така и с класическите хистопатологични параметри (Creighton et al, 2012).

ER (+) тумори, луминални подгрупи А и В. Към тази група се отнасят между 60 и 70% от карциномите на гърдата (Levitzki A et al, 2010). За тях е характерна висока експресия на гени от *ERα* клъстер, като *ERα*, *GATA3* (GATA свързващ белтък 3), *TFF3* (трефоил фактор 3), *XBP* (Х-бокс свързващ белтък) и *HNF3α* (Levitzki A et al, 2010). И двата подтипа са сходни с луминалния епител на млечната жлеза и експресират хормонални рецептори и луминални цитокератини СК8/18, ER и свързаните с активирането му гени *LIVI* и *CCND1*. Луминална подгрупа В показва значително по-високи нива на експресия на гени, свързани с клетъчната пролиферация като *MK167*, кодиращ белтъка Ki-67 и *Cyclin B1*, които определят и по-големия риск от рецидив на злокачественото заболяване (Fan C. et al, 2006; Cheang M. et al, 2009). Туморите от луминален подтип А са най-често срещаните карциноми на гърдата, до 67%, като при 13% от тях се откриват мутации в *TP53* генът (Fan C. et al, 2006; Creighton et al, 2012). Направената молекулярна характеристика на туморите показва, че луминална подгрупа А е с по-добър отговор към лечение, докато туморите от луминална подгрупа В са с лоша прогноза (Schnitt SJ, 2010).

ER (-)HER2 (+) подтип тумори. Туморите в тази група се свързват с повишена експресия на онкогена HER2, който кодира трансмембранен тирозин киназен рецептор. HER2 се свръхекспресира в 20 до 25% от случаите на рак на гърдата (Diaz LK et al, 2007). HER2 (+) туморите свръхекспресират гени от ERBB2 ампликона, като например *GRB7*. Не е открита асоциация между HER2 (+) туморите и възрастта, расата или друг рисков фактор (Turner NC et al, 2007). Свръхекспресията на HER2 в туморните клетки се свързва с агресивен туморен растеж и метастазна активност, водещи до лоша прогноза на заболяването (Turner NC et al, 2007). Тези тумори показват и висока чувствителност към неoadjuвантната химиотерапия базирана на антрациклини и таксани. Подобно на базалния подтип, лошата прогноза произлиза от ранното развитие на рецидиви. За разлика от базалния подтип, за лечение на HER2 (+) туморите има разработени прицелни молекулни агенти като моноклоналните антитела Херцептин (Трастузумаб) (Levitzki A et al, 2010). Голяма част от карциномите от този подтип показват устойчивост към терапия с Трастузумаб, което вероятно се дължи на действието на PTEN и CXCR4 (Turner NC et al, 2007).

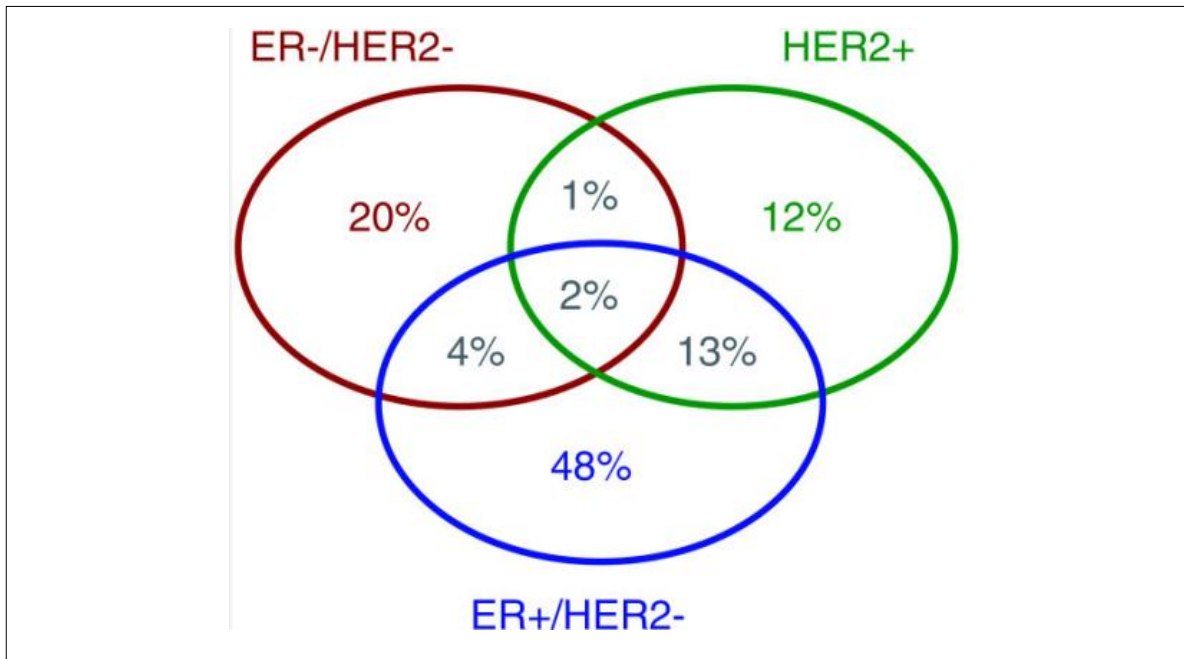
Базален подтип карциноми. Този тип карциноми започва развитието си от базални епителни клетки и получава наименованието си поради сходството с базалните епителни и миоепителните клетки на жлезата по отношение на генната им експресия (Prat A et al. 2010; Schnitt S. J, 2010). За тях е характерна понижена експресия на PR, ER и свързаните с него гени, много ниска експресия на HER2, както и висока експресия на СК 5/6 и 17, FABP7, ламинин и свързващия висши мастни киселини белтък 7, кавеолин 1 и 2, циклин-D1, виментин и е-кадхерин. Тези тумори са с базален фенотип (BP) както в морфологично, така и в имунофенотипно отношение (Fan C. et al, 2006; Turner NC et al 2007; Prat A et al. 2010).

По-голямата част от базалната подгрупа карциноми се причисляват към групата на тройно негативните карциноми на гърдата – TNBCs (*фигура 6*). Известно, че TNBCs обикновено експресират високи нива на мутирал *TP53*, който е използван като маркер за лоша прогноза и е асоцииран с мутации и ненаследствени дефекти в *BRCA1* (Diaz LK et al, 2007). TNBCs, които са с положителна експресия на EGFR, или цитокератин 5/6 показват по-голяма резистентност към терапията с антрациклини и по-лоша прогноза, отколкото групата карциноми, негативни по отношение на всичките пет маркера (Prat, A et al. 2010).

Между 12 и 24% от всички туморите на гърдата са тройно негативни (Bosch A et al, 2010). Асоциират се основно *BRCA1*-изключващ механизъм, което включва наличие на *BRCA1* мутации или промоторно хиперметиране на гена. Тези тумори са биологично агресивни и трудно податливи на терапия поради липсата на ефективни терапевтични мишени, но за сметка на това са чувствителни към химиотерапия, особено към терапията с Цисплатина (Bosch A et al, 2010). Някои ранни изследвания са съсредоточени върху насочена терапия срещу епидермалния растежен фактор (Prat A et al. 2010). Открито е, че нормалните луминални клетки експресиращи CK5/6 действат като стволови клетки и търпят малигнени трансформации, водещи до развитието на базалния фенотип (Bosch A et al, 2010). При нормални условия *BRCA1* регулира пролиферацията им, но при липсата на функционален белтък се стимулира експресията на p53, което от своя страна води до неконтролируемо клетъчно делене. Туморите, които произлизат от тези CK5/6 (+) клетки са много агресивни, с висок стадий на диференциация. Молекулното профилиране с помощта на микрочипове показва, че между 80 и 90% от тройнонегативните карциноми на гърдата се причисляват към базалния подтип (Bosch A et al, 2010).

Claudin-low подтип. По-голямата част от туморите, принадлежащи към този подтип, са тройнонегативни дуктални карциноми *in situ* (DCIS), които се характеризират с висока степен на метапластичност и медуларна диференциация (Prat A, 2010). Отличават се с наличието на характеристики, присъщи както за мезенхимните, така и за стволовите клетки. При този подтип се наблюдават ниска експресия на адхезионни гени, включително и на три различни клодинови гени (Prat A, 2010). При *Claudin-low* подтипа са установени два генни клъстера. Първата група обединява около 20 гена с ниско ниво на експресия, към които се отнасят клодин 3, 4 и 7, цингулин и оклудин, които участват във формирането на плътни клетъчни контакти (tight junction) и E-кадхерин, отговорен за Ca^{2+} зависимата клетъчна адхезия (Prat A, 2010). Във втория генен клъстер влизат около 40 гена с високо ниво на експресия, част от които участват в имунния отговор и експресията на Т и В лимфоцити (Prat A, 2010). Йерархично този подтип е сходен с базалния, поради общите им експресионни свойства, ниска експресия на HER2 и луминалния генен клъстер, *ESR1*, *GATA3* и луминалните CK8 и 18 (Joseph H et al, 2010). Индуцирането на мезенхимни характеристики при епителни клетки от млечната жлеза (т.нар. epithelial-to-mesenchymal transition - EMT) е свързано с придобиването на свойства, присъщи на стволовите клетки на млечната жлеза (Joseph H. et al, 2010). Клинично по-голяма част от *Claudin-low* подтип туморите са с лоша прогноза и с висок индекс на метапластична и медуларна диференциация (Prat A, 2010).

Нормоподобната група карциноми. Тази група карциноми на гърдата показват високо ниво на експресия на гени, характерни за адипозна тъкан, както и за неепителни клетъчни типове (Jeffrey M et al, 2009). Те също имат високи експресионни нива на гени, характерни за базалните епителни профили и понижени нива на експресия на луминални епителни гени. Този подтип тумори експресират гените на колагенов тип I рецептор за CD36 антиген, глутатион пероксидаза 3, глицерол-3-фосфат дехидрогеназа, липопротеин липаза, интегрин алфа 7, ретинол свързващ белтък 4 и други (Jeffrey M. et al, 2009).



Фигура 6. Дял на различните подтипове първични тумори на гърдата. Диаграма на Venn отразяваща съотношението между три молекулни подтипа тумори на гърдата, базирана на 3537 пациенти с рак на гърдата (Haibe-Kains B. et al, 2010)

2.4. Рискови фактори за развитието на рак на гърдата

Към факторите, които имат отношение за развитие на заболяването се отнасят генетичното предразположение, начинът на живот и влиянието на околната среда. Освен фамилното предразположение, определящо се от генетични фактори, важна роля за развитието на рак на гърдата имат: възраст, репродуктивна история, хормонална терапия, излагане на радиационни лъчи, мамографската плътност, прием на алкохол, физическата активност и други (Cook, NR et al, 2009). Най-общо тези фактори могат да бъдат разделени на три групи: рискови фактори, които не могат да бъдат променени; (www.cancer.org, L5; www.breastcancer.org, L6) рискови фактори, които са свързани с начина на живот и рискови фактори с несигурен, противоречив или недоказан ефект.

2.4.1. Рискови фактори, които не могат да бъдат променени

Пол. Жените развиват рак на гърдата около 100 пъти по-често отколкото мъжете. Това вероятно се дължи на действието на женските полови хормони, естроген и прогестерон, които стимулират растежа на раковите клетки. Развитието на млечната жлеза отнема между 3 и 4 години през пубертета (www.cancer.org, L5). След като бъдат развити, млечните жлези претърпяват окончателната си диференциация след първата бременност на жената. Докато не претърпят окончателното си развитие млечните жлези са много чувствителни към хормони, например естроген, както и към други фактори на околната среда (www.cancer.org, L5; www.breastcancer.org, L6). При мъжете обаче това не така – обичайно мъжките млечни жлези са изградени от мастна тъкан и при тях жлезите не са развити. Също така при повечето мъже, нормално нивото на естрогена е ниско, което е една от причината за ниската заболяемост сред тях (www.cancer.org, L5; www.breastcancer.org, L6).

Възраст. Рискът за развитие на рак на гърдата нараства с възрастта (Първанова В. и съав. 2006). Установено е, че честотата на заболяването се повишава драстично след 4-то десетилетие. Най-често рак на гърдата развиват жени между 50 и 70 години, но и по-младите не са застраховани, въпреки че процентът на заболяемост при тях не е толкова висок (Първанова В. и съав. 2006).

Генетични рискови фактори. До 20% (Balman J et al, 2010; Гаврилов И и съав, 2013; www.breastcancer.org, L6) от случаите на наследствен рак на гърдата се предполага, че се дължат на генетични дефекти, унаследени от един от родителите. Най-често това са мутации в *BRCA1* или *BRCA2* гените. В нормални клетки двата гена кодират белтъци, имащи туморсупресорна функция (www.cancer.org, L5; www.breastcancer.org, L6). В случаите, когато бъде унаследена мутация от един от родителите рискът за развитие на рак на гърдата се повишава многократно. В този случай заболяването има вероятност да се прояви по-рано (при по-млади жени), да се развие и в двете гърди, а също така да се развие и онкологично заболяване с друга локализация, например в яйчниците (www.cancer.org, L5; www.breastcancer.org, L6). Мутации в други гени също могат да доведат до предразположение за развитие на рак на гърдата (www.cancer.org, L5; www.breastcancer.org, L6). Тези мутации са редки и често не повишават риска за развитието на заболяването до степен, съизмерима със степента на риска при носителство на мутации в *BRCA1* или *BRCA2* гените. Някои от гените, водещи до предразположение за развитие на рак на гърдата са *ATM*, *TP53*, *CHEK2*, *PTEN*, *CDH1*, *RAD50*, *MRE11* и *NBN* (9, 27, Гаврилов И и съав, 2013; www.breastcancer.org, L6).

Фамилна история и персонална история за рак на гърдата. Рискът за развитие на рак на гърдата е повишен при жени, чиито близки имат това заболяване. Например при заболяване на родственик от първа линия (майка, сестра или дъщеря) една жена има приблизително два пъти по-висок риск за развитие на заболяването, докато при две засегнати родственици от първа линия рискът се повишава около 3 пъти (www.cancer.org, L5; www.breastcancer.org, L6). Като цяло най-малко 15% от развилите рак на гърдата имат в рода си и други членове с това заболяване. Жени, които са

развили рак на гърдата са с 3 до 4 пъти по-висок риск за развитие на рак и на другата гърдата (www.cancer.org, L5; www.breastcancer.org, L6).

Раса и етническа принадлежност. Като цяло при жените от кавказката раса има малко по-голяма вероятност за развитие на рак на гърдата в сравнение с афроамериканки, азиатки и латиноамериканки, но афроамериканките са по-склонни да развият по-агресивен и по-напреднал карцином на гърдата, който се диагностицира в по-ранна възраст (www.cancer.org, L5; www.breastcancer.org, L6). Някои от тези разлики вероятно се дължат на различия в качеството на медицинските услуги, както и на някои различия в начина на живот, като например хранителните навици, характерни за различните етнически групи. Все пак е установено, че тройно негативния карцином на гърдата, който е по-агресивен в сравнение с другите типове рак на гърдата е по-често срещан при афроамериканки (www.cancer.org, L5; www.breastcancer.org, L6).

Повишена плътност и доброкачествени състояния на гърдата. Жените с по-плътна тъкан имат повече жлезиста и по-малко мастна тъкан и съответно малко по-висок риск за развитие на рак на гърдата (www.breastcancer.org, L6). Някои доброкачествени състояния също се свързват с повишен риск за развитие на рак на гърдата (www.breastcancer.org, L6). В зависимост от това как влияят на риска за развитие на заболяването, доброкачествените образувания на гърдата се делят на три групи:

а. Непролифериращи лезии, които не се свързват със свръхрастеж на тъкани в гърдата и не повлияват риска за развитие на заболяването. В тази група се отнасят кисти (фибрози), някои хиперплазии, некроза на мастната тъкан, перидуктална фиброза, плоскоклетъчна апокринна метаплазия, епително свързани калцификати (www.cancer.org, L5; www.breastcancer.org, L6).

б. Пропролифериращи лезии без атипизъм, които показват растеж на каналите и лобулитите на гръдната тъкан. Те могат да повишат риска за развитие на рак на гърдата между 1.5 и 2 пъти. В тази група се отнасят фиброаденоми, склерозираща адемоза и полиматоза (www.cancer.org, L5; www.breastcancer.org, L6).

в. Пропролифериращи лезии с атипизъм - в този случай е налице свръхрастеж на клетките на гърдата, като някои от тях проявяват атипизъм. Към тази група се отнасят атипичната дуктална хиперплазия (ADH) и атипичната лобуларна хиперплазия (ALH) (www.cancer.org, L27).

г. Лобуларен карцином *in situ* (LCIS) - в някои случаи това състояние се нарича лобуларна неоплазия. При него някои клетки на лобулитите на жлезата проявяват атипизъм. Жени с това заболяване имат между 7 и 11 пъти повишен риск за развитие на рак на гърдата (www.cancer.org, L5; www.breastcancer.org, L6).

Менструален период. При жените, които са имали по-голям брой менструални цикли с начало по-рано от 12 годишна възраст или при такива, при които менопаузата е настъпила след 55 годишна възраст е отчетен повишен риск за развитието на рак на гърдата (www.cancer.org, L5; www.breastcancer.org, L6). Също така трябва да се отчете времето между настъпване на първата менструация, и времето на настъпване на първата бременност, през което гърдата не е претърпяла окончателната си диференциация и е свръхактивирана и чувствителна към хормони по-дълго време. Това най-вероятно се дължи на по-дългото излагане на действието на половите хормони

също имат повишен риск. При тях развитието на гърдата започва преди началото на менструацията, което вероятно се дължи на затлъстяването или широката експозиция на хормални смущения (екзоестроген). Веднъж формирана гърдата е готова да взаимодейства с хормони като естроген и прогестерон, както синтезирани вътре в тялото, така и внесени отвън (www.cancer.org, L5; www.breastcancer.org, L6).

2.4.2. Рискови фактори свързани с начина на живот

Индекс на телесна маса (BMI) и физическа активност. Установено е, че жените страдащи от наднормено телесно тегло са с по-висок риск за развитие на заболяването, рецидиви, билатерален рак на гърдата и метастазирание (Kulie T. et al, 2011). Проучване, проведено през 2006 година е установило, че повишаване на телесното тегло с 10 килограма, след настъпването на менопаузата, повишава риска от развитие на заболяването с 18%. Хормоналните промени в постменопаузата водят до физическа и метаболитна промяна, която повишава риска за развитие на рак на гърдата (Macciò A et al, 2011). Повишеният индекс на телесна маса се свързва с високи нива на естроген и повишаване на висцералната мастна тъкан, което от своя страна води до хиперинсулинемия, инсулинова резистентност и дислипидемия. Клиничната изява на диабет тип 2 и метаболитния синдром се характеризира с невъзможност за ефективно поемане, съхранение и метаболизиране на глюкозата от клетката. Ето защо, за да предотврати повишената концентрация на глюкоза в кръвта, панкреасът отделя повече инсулин, който оказва пряк митогенен ефект върху раковите клетки в гърдата (Arcidiacono B et al. 2012). Хиперинсулинемията косвено повлиява туморогенезата, като допринася за синтеза и активността на IGF I (*Insulin-like growth factor-I*) и IGF II (*Insulin-like growth factor-II*). IGFs участват в регулацията на растежа, оцеляването и диференциацията на клетките (Arcidiacono B et al. 2012). Естрадиолът в присъствието на IGF I е в състояние да предизвика транскрипционно активиране на естрогеновия рецептор, което води до потискане на сигнализацията на IGF I в митогенната активност. Повишените нива на циркулиращия в кръвта инсулин и IGF I водят до повишаване на нивата на SHBG (*Sex Hormone-Binding Globulin*) SHBG оказва директно действие върху раковите клетки в гърдата, като инхибира естрадиола (Shafika A et al, 2012). По този начин SHBG се явява регулатор на естрадиола, действа като антипролиферативен фактор и отсъствието му при жени с наднормено тегло може да допринесе за туморогенезата (Macciò A et al, 2011). Нивото на SHBG се повишава при физическа активност. Редовната физическа активност има ясни ползи за сърдечно-съдовите заболявания и може да повлияе риска от развитие на рак на гърдата. Физическата активност намалява инсулиновата резистентност и хиперинсулинемията. При проведени големи асоциативни проучвания от типа кохортни и случаи-контроли е установено, че редовната физическа активност снижава риска за развитие на заболяването с около 20% при жени в постменопауза (Arcidiacono, B et al. 2012). Няма убедителни доказателства за протективния ефект на физическата активност при жени, преди менопаузата (OR = 0.99; CI 95% = 0.91-1.05) (Romieu I et al, 2009).

Консумация на алкохол. Според доклада на WCRF (World Cancer Reseach Fund) консумацията на алкохол е убедителен рисков фактор за развитието на рак на гърдата. Според някои автори канцерогенният ефект на алкохола се дължи на действието на ацеталдехида и индукцията на цитохром P450 (CYP2E1) (Poschl G et al, 2004) Според други автори повишената консумация на алкохол може да доведе до повишаване нивата на естроген, подобряване пропускливостта на мембраните за канцерогени и инхибиране на тяхната детоксикация, което води до образуването на реактивни кислородни радикали (ROS) и засилена преканцерогенеза чрез активиране и моделиране на клетъчната регенерация и хранителен дефицит (Poschl G et al, 2004; Brennan SF et al, 2010).

Според WCRF по-голяма част от изследванията са фокусирани върху ефекта на отделните храни и хранителни вещества, в това число на консумацията на алкохол, тъй като ефектите от тяхната консумация вероятно си взаимодействат. Това доведе до по-цялостен подход за анализ на хранителните навици, така че да се проследи сложното взаимодействие между хранителните вещества и да се избегнат ефекти, които биха замъглили истинската асоциация (Brennan SF et al, 2010).

Множество проведени мета-анализи показват, че рискът за развитие на рак на гърдата се увеличава линейно с увеличаване приема на алкохол, като за всеки 10 грама етанол дневно над нормата относителния риск нараства между 7 и 10% (Nagata C et al, 2007).

Тютюнопушене. До днес няма консенсус за вредата от пушенето и риска за рак на гърдата, въпреки 20 годишния дебат и проведените повече от 53 епидемиологични проучвания върху 83 000 пациенти (Terry PD, 2011). Експериментални проучвания показват, че съединенията в тютюневия дим, като полициклени въглеводороди, ароматни амини и N-нитрозамини, могат да предизвикат тумори в млечната жлеза (Luo J. et al, 2011). Канцерогенните вещества в тютюна преминават през алвеоларната мембрана, навлизат в кръвния ток и се транспортират до тъканите на млечната жлеза чрез плазмените липопротеини (Bottorff JL et al, 2010). В два отделни мета-анализа, базирани на резултати, публикувани след 2002 година, резултатите отчитат 10-30% повишен риск от развитие на заболяването при жени, при които не е настъпила менопауза, вследствие излагане на тютюнев дим (Terry PD, 2011). Въпреки, че причинно-следствените механизми не са изяснени, епидемиологичните и токсикологичните проучвания показват, че тъканта на гърдата по време на пролиферацията на клетките през пубертета и през първата бременност са много чувствителни към излагането на канцерогени (Terry PD, 2011; Luo J et al, 2011).

2.4.3. Рискови фактори с несигурен, противоречив или недоказан ефект

В тази група са включени фактори, като определен диетичен режим и прием на витамини, употребата на препарати против изпотяване, носене на сутиени, гръдни импланти, индуцирани аборти и нощен труд. Няма доказана връзка между консумацията на определен вид храни и тяхното количество и качество, която да показва статистически значима асоциация с рака на гърдата (Първанова В. и съав.

2006). Различните видове диети, като например консумацията на определени плодове и зеленчуци, показват незначителна редуция на риска от заболяването. От друга страна се предполага, че системната консумация на алкохол, както и голямото количество липиди, повишават риска за развитие на рак на гърдата (Първанова В. и съав. 2006). По отношение консумацията на мазнини в храната епидемиологичните проучвания дават противоречиви резултати за риска от развитие на рак на гърдата. Получените на този етап резултати показват слаба асоциация между приема на мазнини и заболяването (Sieri S et al, 2008). През 1990 г. Бойд и Макгуайър, изказват хипотезата, че жените с високи нива на HDL-холестерол са с повишен риск от рак на гърдата (Sieri S et al, 2008). Доказано е, че пациенти с рак имат отклонения от стойности на липопротеините с висока плътност (HDL) и с ниска плътност (LDL) (McGrowder D, 2011). В трансформирани туморни клетки е установено отклонение от експресията на гени, участващи в контрола на холестероловия метаболизъм. Продуктите на тези гени - LDLR (рецептор), хидрометил-глутарил-коензим А (HMG-CoA) редуктазата и техните регулатори, участват в контрола на нивата на стеролите (McGrowder D, 2011).

Тези гени са дерегулирани на транскрипционно ниво по време на туморогенезата. Това показва, че трансформираните клетки могат да изискват или да използват повече холестерол отколкото нормалните клетки, което води до повишаване на пролиферацията. Важен аспект, който трябва да се отбележи при разглеждането на корелацията между плазмения холестерол и рака на гърдата е факта, че концентрациите на естрогена също са свързани с плазмения HDL. Въпреки това точната им функция при туморогенезата не е изяснена и понастоящем връзката между рака на гърдата и плазмения холестерол е спорна (Laverias G, 2010).

2.5. Гени свързани с предразположение за развитие на рак на гърдата

Пенетрантност по генетично определение е делът индивиди, при които определен вариант на ген/алел или генотип се експресира, т.е. с каква честота се проявява фенотипно. В медицинската генетика под пенетрантност на мутация водеща до заболяване, се отчита делът на проява на клиничния симптом (www.wikipedia.org, L7). В зависимост от това тя може да бъде: пълна - алелът е с пълна пенетрантност ако всички индивиди, носещи мутацията, са с клинични симптоми на заболяването; висока – при, която симптомът се проявява почти винаги; непълна/намалена – алелът не се проявява с висока честота; ниска – алелът е с ниско засягане на клиничния симптом и в този случай е трудно да се направи разграничение на факторите на околната среда и генетичните фактори (www.wikipedia.org, L7).

Пенетрантността трудно може да се определи надеждно, дори за генетични заболявания. При много наследствени заболявания проявата на симптоми се свързва с възрастта и се влияе от факторите на околната среда, като хранене, пушене, както и генетични кофактори и епигенетично регулиране на експресията (www.wikipedia.org, L7).

Предполага се, че 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 (Easton D, 1997).

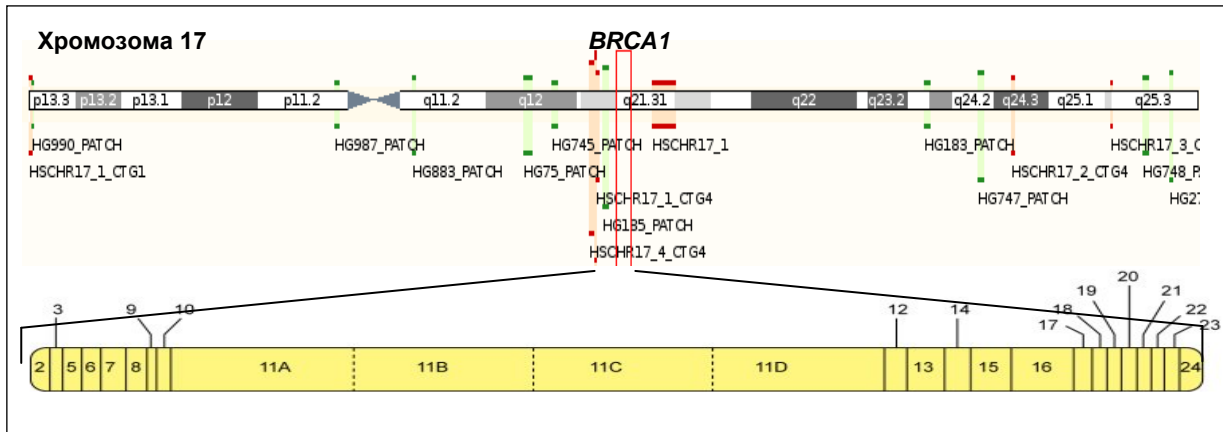
Наличието мутация в един от двата гена се свързва с висока степен на риск, между 60-85% за развитие на заболяването до края на живота, както и с повишен риск за развитие на рак на яйчниците (Ellis NA et al, 2007). В допълнение към тази висока степен на риск за развитие на наследствен рак на гърдата и рак на яйчниците, някои наследствени синдроми също се свързват с повишен риск за развитие на болестта. Въпреки това, повече от 50% от генетично предразположение за развитието на рак на гърдата остава неизяснено (Balman J et al, 2010; Easton D, 1997; Ellis NA et al, 2007; Rosman DS et al, 2007). Поради тази причина усилията на изследователските екипи са насочени в търсене мутации в гените със средна пенетрантност като функционални партньори на *BRCA1* и *BRCA2* в ДНК репарацията. В тази група влизат гени като *BRIP1*, *PALB2*, *CHEK2*, *ATM*, *NBS1*, *RAD50*, *TOPBP1*, *RAD51C*, *RAP80*, които имат предразполагащ ефект за развитието на рак на гърдата (**фигура 11**) (Ellis NA et al, 2007; Rosman DS et al, 2007; Sharon B et al, 2007).

2.5.1. Високо пенетрантни гени, свързани с предразположение за развитие на рак на гърдата

Повечето от гените, които се отнасят към тази група са тумор супресорни гени, участващи в контрола на пролиферацията, репарацията, клетъчната диференциация и апоптозата. При мутация се променя тяхната функция, което определя участието им в канцерогенезата (Nathanson KL et al, 2001). Част от гените включени към тази група са *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53* и *PTEN*. Пенетрантността на герминативни мутации в *BRCA1* и *BRCA2* гените остава активна област на изследвания. Оценката на пенетрантност на двата гена варира значително в зависимост от контекста, в който е получена. Доказателство за променливия риск идва от изследването на множество семейства с една и съща мутация в рамките на една етническа група (www.ncbi.nlm.nih.gov, L8). Изследванията показват, че някои индивиди, носители на мутация доживяват до напреднала възраст без да се разболеят, докато други развиват заболяването в ранна възраст (www.ncbi.nlm.nih.gov, L8). Наблюдават се също вариации в типа на рак на гърдата (www.ncbi.nlm.nih.gov, L8). В допълнение е установено, че някои носители на герминативни мутации в *BRCA1* и *BRCA2* гените могат да развият множество първични ракови заболявания преди да навършат 50 годишна възраст, а други пациенти със същата мутация развиват рак на гърдата след 70 годишна възраст или не развиват заболяването (Antoniou AC et al, 2008).

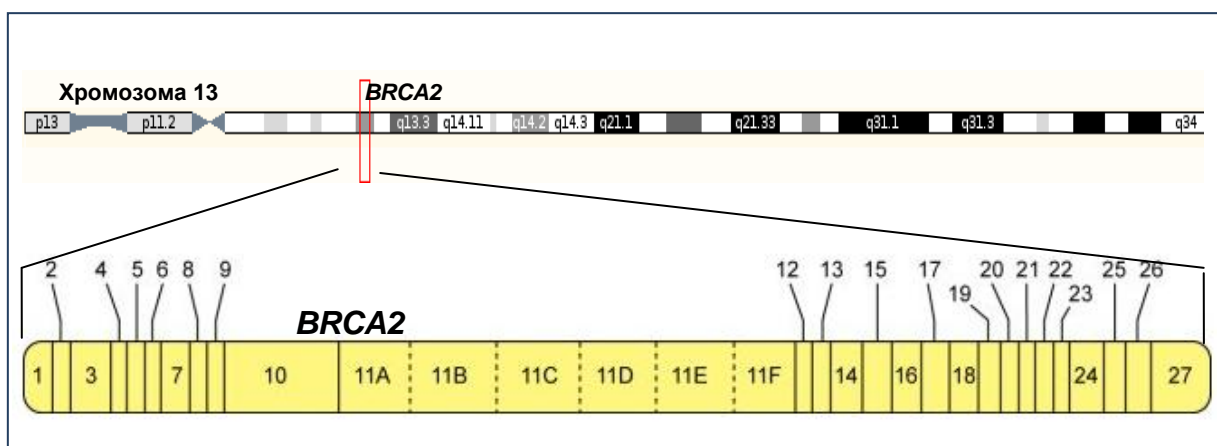
BRCA1 и *BRCA2* гените са открити през 90-те години на миналия век. Първите сведения за съществуването на *BRCA1* гена са предоставени от лабораторията на King в Berkeley през 1990 г. (Narod SA et al, 2011). Четири години по-късно, през 1994 година генът е картиран на хромозома 17 (17q12.21), като дължината му е 101.19 kb (**фигура 7**) (Narod SA et al, 2011). *BRCA2* генът е картиран през 1995 г. на дългото рамо хромозома

13 (13q12.3) и е изграден от 27 екзона (Narod SA et al, 2011). Дължината му достига 107.79 kb (фигура 8).



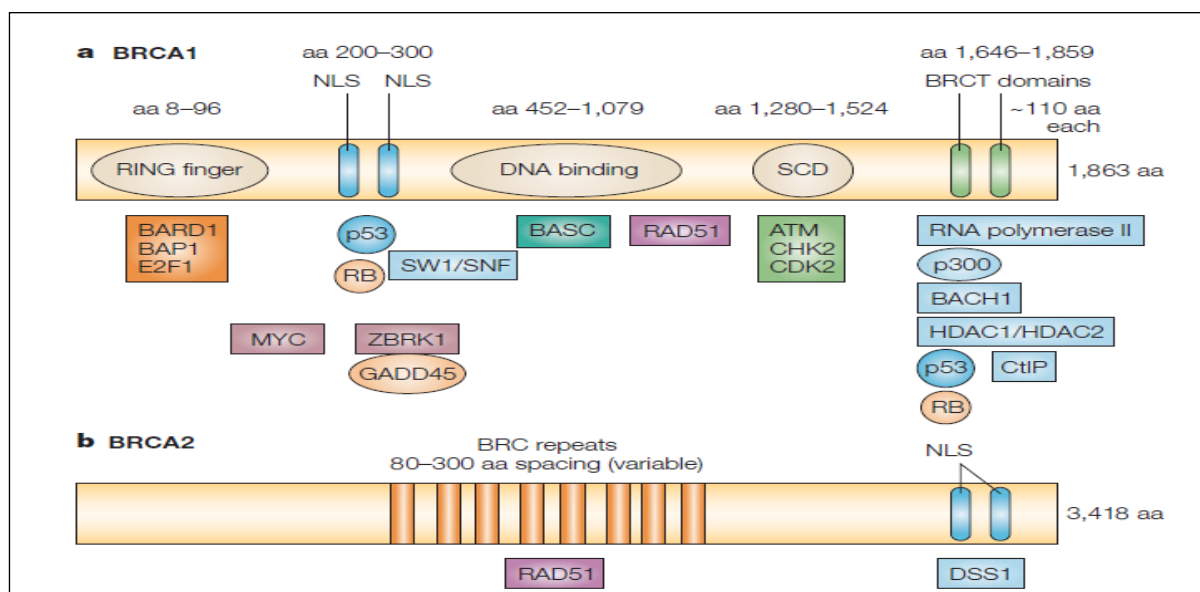
Фигура 7. Хромозомна локализация и структура на *BRCA1* гена (www.ncbi.nlm.nih.gov, L8; www.ensembl.org, L9)

BRCA1 и *BRCA2* са тумор супресорни гени, които не показват хомоложност с други белтъци. Установено е, че ако едно от копията на *BRCA1* или *BRCA2* носи герминативна мутация, резултатът е наличието на синдром на наследствен рак на гърдата и яйчниците (Hereditary Breast Ovarian Cancer - HBOC), който се унаследява по автозомно доминантен механизъм (Roy R et al, 2012). HBOC синдромът се свързва с ранно начало на развитие на рак на гърдата и с повишен риск за развитие на карциноми на яйчниците, панкреаса, стомаха, ларинкса, фалопиевите тръби и простатата (Roy R et al, 2012). Двата белтъка вземат участие при поправката на двойноверижните скъсвания в ДНК чрез хомоложна рекомбинация (Homologous Recombination - HR) при която сестринската хроматида се използва като матрица за ДНК поправка (Roy R et al, 2012)



Фигура 8. Хромозомна локализация и структура на *BRCA2* гена (www.ncbi.nlm.nih.gov, L11; www.ensembl.org, L12)

Доменна организация на *BRCA1* и *BRCA2* белтъците. Двата гена кодират белтъци, които не показват сходство в първичните си последователности (фигура 9).



Фигура 9. Структурна организация на *BRCA1* и *BRCA2* белтъците (Narod SA et al, 2010)

BRCA1 генът кодира 1863 аминокиселинен белтък с няколко функционални домена. *BRCA2* генът е изграден от 27 екзона, кодира един от най-големите в човешкия протеом белтък от 3418 аминокиселини и има само две известни функционални области (Roy R et al, 2012; Futreal PA et al. 2004; Narod SA et al, 2010).

BRCA1 взаимодейства с тумор супресорни белтъци и регулатори на клетъчния цикъл чрез различни свои функционални домени и по този начин играе важна роля в множество пътища на ДНК репарация, особено при HR, NHEJ и SSA, а също така участва и в регулацията на “Checkpoint” контрола (Roy R et al, 2012; Deng C et al, 2000). В посока от азотния към карбоксилния край на *BRCA1* са идентифицирани „RING finger” домен, NLS (ядрено локализиращ сигнал), SDC клъстер и два BRCT домена (фигура 9) (Narod SA et al, 2010). RING finger доменът е ангажиран в няколко протеин-протеинови взаимодействия, например с BARD1. Предполага се, че взаимодействието между RING домена и BARD1 подобрява убиквитин лигазната функция на *BRCA1*. RING доменът притежава E3 убиквитин лигазна активност, която катализира протеин убиквитиниране. Много от унаследените мутации в *BRCA1* са открити в RING и BRCT домовете, което показва, че и двете области вземат участие в супресията на туморите при гърдата и яйчниците (Roy R et al, 2012). *BRCA1* убиквитинираща функция има и CtIP, известен още и като CtBP- RBBP8. Този белтък взема участие в поправката на ДНК при DSB като формира връзка с комплекса MRN като подпомага HR и инхибира NHEJ (Yun M H et al, 2009). Като ядрен белтък *BRCA1* притежава ядрено локализиращ

сигнал (NLS). В тази област е установено взаимодействие с p53, MYC, RB и ZBRK1 (Roy R et al, 2012). ZBRK1 притежава „Zn finger” мотив, който потиска транскрипцията

чрез взаимодействие с GADD45. Необходимо условие за тази репресия е свързването на ZBRK1 с BRCA1 (Roy R et al, 2012). ДНК свързващият домен е разположен между аминокиселинни остатъци 452 и 1079. Този регион участва в поправката на ДНК, като функцията отчасти е медирана от BASC комплекса (BRCA1-associated surveillance complex). С централния район на белтъка се свързват MRE11, RAD50, NBS1, MDC, ATM, CHEK2 и CDK2. На местата, където се извършва фосфорилирането на белтъка от ATM има SQ секвенции - клъстери от серинови и треонинови последователности, известни като SQ клъстер (SDC). Между аминокиселини 1280 и 1524 има няколко SDC, но като цяло те са редки в другите региони на BRCA1 (Narod SA et al, 2010). BRCT домените на карбоксилния край съдържат по 110 аминокиселинни остатъка всеки и са разположени между аминокиселинни остатъци 1646 и 1859. BRCT домени са открити при много белтъци, участващи в ДНК поправката и в регулацията на клетъчния цикъл. Те участват във взаимодействието с РНК полимеразата II, p300, BACH1, HDAC1, HDAC2, p53, CtIP и RB и др. (Narod SA et al, 2010). BRCT фосфопептид-свързващият мотив, който се запазва в множествена DDR белтъци, е отговорен за асоциацията на BRCA1 с протеини фосфорилирани при серин в SXXF мотиви от ATM. BRCA1-образува комплекс и с ABRAXAS, BRIP1 и CtIP. Свързването в макрокомплекс позволява различните функции на тези белтъци да се препокрият в DDR. Друг комплекс, който образува BRCA1 е този с PALB2, който е ангажиран специално в поправката на DSB от HR (Narod SA et al, 2010). Как тези многобройни BRCA1 комплекси работят по координиран начин, все още не е напълно изяснено. DDR включва и активирането на “Checkpoint” контрола, което забавя клетъчния цикъл преди или по време на репликация (G1/S или в рамките на S-фаза) или преди клетъчно делене (G2/M), за да се гарантира, че генерираните грешки не се предават в следващите поколения, като позволява да се даде време за възстановяване на ДНК (Roy R et al, 2012).

BRCA2 не проявява сходство с други известни белтъци (Cole DJ et al, 2011). Той има осем BRC мотива от по 30 до 40 аминокиселини всеки, кодирани от екзон 11 на BRCA2 гена (*фигура 9*). BRC мотивите проявяват консервативност при различните бозайници, което води до предположението, че те имат съществена функция (Cole DJ et al, 2011). В действителност е доказано, че BRC повторите се свързват с белтъка RAD51, който при бозайниците е от значение за ДНК поправката и генетичната рекомбинация (Venkitaraman AR et al. 2001). BRC мотивите са дивергирани в известна степен, като BRC1, BRC3, BRC4, BRC7 и BRC8 имат най-голямо сходство помежду си. ДНК репариращата активност на BRCA2 се регулира от DSS1, малък кисел белтък, който изглежда, че функционира като кофактор. DSS1 се свързва с карбоксилния терминален край на BRCA2, в който се намира и NLS мотив (Narod SA et al, 2010). За разлика от многофункционалната дейност на BRCA1, основната функция на BRCA2 се свързва с HR (Roy R et al, 2012). BRCA2 посредничи за ангажирането на рекомбиназата RAD51 в DSBs. Ангажирането на RAD51 не е от съществено значение само за HR, но също така и за тумор-супресорната функция на този процес на поправка. В структурата на BRCA2, освен BRC повторите, има няколко важни домена: DBD (ДНК свързващ

домен), който се свързва с едноверижна (ssDNA) и двойноверижна ДНК (dsDNA), DBD - изграден от 190-аминокиселинен, α -спираловиден домен, три OB олигонуклеотидни гънки и TD домен (tower domain). α -спираловидния домена, OB1 и OB2 се свързват с DSS1, като по този начин стабилизират BRCA2 белтъка (Roy R et al, 2012). При изследвания на Brh2, хомолог на BRCA2 в *Ustilago maydis* (царевична главня) е установено, че белтъкът се свързва при краищата на DSBs, където са dsDNA и ssDNA и вероятно улеснява формирането на филаментите на RAD51 на мястото на увреждането. Това води до предположението, че BRCA2 посредничи за формирането на едноверижен филамент на RAD51 и го предпазва от образуването на двойноверижни структури (Roy R et al, 2012).

При индивиди с HBOC синдром са открити точкови мутации в рамките на BRC повторите, които компрометират взаимодействието с RAD51 (Roy R et al, 2012). BRC повторите имат едва доловими разлики в последователностите си и се свързват с RAD51 с различен афинитет.

Въпреки очевидните несходства в аминокиселинните последователности и структура, BRCA1 и BRCA2 имат сходни модели на експресия и субклетъчна локализация. Установено е, че нивата на двата белтъка са най-високи по време на S фазата на клетъчния цикъл. BRCA1 и BRCA2 се колокализират в ядрото на соматични клетки, в местата на ДНК увреждане (Roy R et al, 2012). В мейотичните клетки те се локализират заедно със синептонемалния комплекс. Този модел на експресия и локализация се споделя от RAD51, хомолог на дрождевия RecA, който е от съществено значение при поправката на двойно-верижните скъсвания в ДНК при *E.coli*. RAD51 играе важна роля в поправка на двойноверижните ДНК скъсвания чрез хомоложна рекомбинация (Roy R et al, 2012).

Установено е, че BRCA1 и BRCA2 белтъците имат сходен механизъм на функциониране, който отговаря за поддържане целостта на генома и геномната стабилност (Venkitaraman AR et al. 2001).

2.5.2. Гени със средна (междинна) пенетрантност, свързани с предразположение за развитие на рак на гърдата

Гените от тази група участват в поправката на ДНК и се свързват с два пъти повишен риск за развитие на рак на гърдата (Matsuoka S et al, 1998). Пример за мутация, водеща до предразположение към развитието на заболяването е делецията 1100delC в *CHEK2* гена. Тя е установена в северните и източните Европейски популации и се асоциира с 2 до 3 пъти повишен риск за развитие на рак на гърдата (OR=3.3; 95% CI 2.3 - 4.7) (Matsuoka S et al, 1998; Meijers-Heijboer H et al, 2002; Cybulski C et al, 2011).

При проведения скрининг на гени, функционално свързани с *BRCA1* и *BRCA2* са открити мутации в гените *CHEK2*, *PALB2*, *BRIP1* и *ATM*, които са по-редки и са с междинен риск за развитие на рак на гърдата (**фигура 11**). Част от тези гени се свързват с редица синдроми, при които се развиват ракови заболявания. Така, например синдромите на Li-Fraumeni, Peutz-Jeghers и Cowden се обясняват с мутации в *TP53*, *STK11* и *PTEN* гените (Balman J et al, 2010, Groep P et al, 2011).

ЧЕК2. Клетъчният отговор при увреждане на ДНК включва процесите на активиране на „Checkpoint“ контрола на клетъчния цикъл и активиране на ДНК репарационните системи, които са тясно свързани едни с други (Wang B, 2012). Ключов посредник в отговора на увреждането на ДНК и участник в регулацията на клетъчния цикъл е ЧЕК2 киназата (checkpoint киназа 2). При човека тя се кодира от *ЧЕК2* ген, локализиран в късото рамо на 22 хромозома (22q12.1) и е хомолог на *Rad53* при *Saccharomyces cerevisiae* и *Cds1* при *Schizosaccharomyces pombe* (www.research.nhgri.nih.gov, L13; www.ghr.nlm.nih.gov, 14).

Белтъкът регулира клетъчното делене, като предпазва клетките от бързо и неконтролируемо делене (Desrichard A, et al, 2011). Следва бързо фосфорилиране и репликативен блок. Такова активиране е известно, че инхибира CDC25C фосфатазата, като по този начин се предотвратява навлизането на клетката в митоза и стабилизира туморсупресорния белтък p53, което води до блокиране на клетъчния цикъл в G1 фазата и, не на последно място, взаимодейства и фосфорилира BRCA1, което позволява на BRCA1 да възстанови ДНК увреждането. Известно е, че BRCA1 е от решаващо значение за Chk1 киназното активиране, а тази активация е от съществено значение за „Checkpoint“ контрола през G2-M фазите при ДНК увреждане (Desrichard A, et al, 2011). В допълнение, BRCA1 регулира експресията и клетъчното локализиране на „Checkpoint“ протеини при G2-M фазите, включително на Cdc25C, като по този начин предотвратява непредвидено спиране на преход в митоза. Оцеляването на много ракови клетки зависи от техния G2-M „Checkpoint“ контрол, особено след появата на ДНК увреждане, тъй като при тях G1-S „Checkpoint“ контролът е дефектен, поради онкогенна трансформация (Ronit I et al, 2006).

Мутации в *ЧЕК2* гена водят до потискане на ДНК-поправката, неспособност на клетката да се подложи на апоптоза и повишена склонност към развитието на рак. Първоначално се е смятало, че мутациите в *ЧЕК2* гена водят до развитието на синдрома на Li-Fraumeni (Yang Y et al, 2012). По-скорошни проучвания поставят под въпрос тази асоциация, след като герминативните мутации с.1100delC и I157T в *ЧЕК2* са открити при пациенти с рак на гърдата, които не показват никакви признаци на Li-Fraumeni синдром (Yang Y et al, 2012). Мутацията с.1100delC води до синтеза на по-къс, нефункционален белтъчен продукт. Това, от своя страна, води до невъзможност да се регулира правилно клетъчното делене. В резултат на увреждането на ДНК клетките започват да се делят неконтролируемо, което е предпоставка за развитието на тумори. Тази мутация се свързва с повишен риск за развитието на рак на гърдата в Европейските популации (Yang Y et al, 2012). Установено, е че жени в Източна и Северна Европа са с 2,5 пъти повишен риск за развитието на рак на гърдата, което се равнява на 37% риск за развитие на заболяването до навършване на 70 годишна възраст (Meijers-Heijboer H et al, 2002, Desrichard A, et al, 2011, Yang Y et al, 2012).

PALB2. Основният път за поправка на двойноверижните скъсвания в ДНК (Double Strand Breaks – DBSs) посредством хомоложна рекомбинация (Homologous Recombination - HR) се осъществява по време на късната S фаза и прехода към G2 фазата на клетъчния цикъл. Основна роля в този процес играе RAD51. Вътреклетъчният транспорт на RAD51 се контролира от BRCA2 (Adelina A et al, 2001). При BRCA2 дефицитни клетки RAD51 не се транспортира ефективно в ядрото. Това води до

предположението, че една от функциите на BRCA2, е да транспортира RAD51 от мястото му на синтез до мястото му на функциониране. В допълнение изглежда, че BRCA2 контролира ензимната активност на RAD51 (Adelina A et al, 2001, Liu J et al, 2010). Друг партньор на BRCA2 е PALB2, известен още и като FANCN. Установено е, че той е от критично значение за правилното функциониране на BRCA2. *PALB2* генът е локализиран в хромозома 16p12.2 (www.wikipedia.org, L15, Casadei et al, 2011). Той кодира белтък, който участва в поддържането на геномната стабилност и поправката на двойноверижните ДНК скъсвания. Този белтък се свързва и колокализира с BRCA2 в клетъчното ядро и вероятно стабилизира вътреядрената локализация на BRCA2. След свързването си с BRCA2, PALB2 директно взаимодейства с RAD51, като по този начин стимулира напредъка на хомоложната рекомбинация (Buisson et al, 2012). Установено е, че при отсъствието на PALB2, RAD51 не може да се свърже с BRCA2 и това води до невъзможност да се иницира репарацията на двойноверижните скъсвания. В белтъка са идентифицирани три домена, чрез които той формира комплекси с BRCA1, BRCA2 и RAD51 (www.wikipedia.org, L16).

Наскоро беше доказано, че PALB2, както и BRCA2 пряко взаимодейства с RAD51 (Buisson et al, 2012). PALB2 стимулира RAD51 към формиране на едновежни фрагменти (Single Stranded DNA - ssDNA) и образуване на D-loop структура. Това откритие показва, че PALB2 не е само колокализатор на BRCA2, но също така е и важен регулатор на активността на RAD51 (Buisson et al, 2012). PALB2 дефицитни клетки, които експресират дефектен PALB2, при свързването на RAD51 проявяват висока чувствителност към ДНК увреждащи агенти, като митомицин С, който причинява блокиране на репликативната вилка и формирането на двойноверижни структури (Buisson et al, 2012).

BRIP1. Хомозиготни мутации в част от гените, кодиращи белтъци, участващи в ДНК репарационната система, се свързват с развитието на рядко наследствено рецесивно заболяване, наречено анемия на Fanconi (FA). Заболяването се проявява с вродени костномозъчни аномалии и/или левкемия и предразположение към развитието на онкологични заболявания. Честотата на FA е приблизително 1:350 000 раждания и обхваща различни етнически групи (Cantor et al, 2012; Casadei et al, 2011). Към днешна дата, са идентифицирани най-малко 13 подгрупи на заболяването, причинени от дефекти в различни гени. Така, например FA подтипове FANCD1, FANCI и FANCN се причинява от носителството на биалелни мутации в *BRCA2*, *BRIP1* и *PALB2* [49, Casadei et al, 2011).

Хетерозиготни мутации в *PALB2* гена се свързват с предразположение към развитието на рак на гърдата и рак на панкреаса (Buisson et al, 2012). 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 (Casadei et al, 2011). При проучване на колектив от университета в Сиатъл, САЩ са открити общо 13 мутации в *PALB2*, от които пет са установени за първи път (Casadei et al, 2011). Проведеният анализ на родословията на пациентите, носители на мутациите показва, че част от тях са с немски, британски и френски произход. От общия брой открити мутации, с.3113G>A, с.509_510delGA и с.196C>T показват по-висока честота в

изследваната група. Мутацията с.509_510delGA е открита при седем пациента с немско потекло (Casadei et al, 2011). По-нататъшно изследване установява, че тези пациенти са с общ прародител, мигрирал в САЩ през 19 век. 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). Голяма група от генетични заболявания, характеризирани 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 (Cantor et al, 2012). Към това семейство се отнася и BRIP1 (BACH1/FANCF) хеликазата (Cantor et al, 2012). *BRIP1* генът е картиран на 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 (Cantor et al, 2012). *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. BRCA1-FANCF взаимодействието е от съществено значение за насърчаване на репарацията, „Checkpoint“ контрола и лимитирането на толеранса спрямо ДНК увреждане. Идеята, че FANCF функционира като туморсупресорен ген при рака на гърдата, произлиза от факта, че той пряко взаимодейства с BRCA1 и проявява хомология с *XPD* гена, които участва в ДНК поправката (Cantor et al, 2012).

Мутационен анализ на *BRIP1* гена, проведен в кохорта на 49 италиански пациента е довело до идентифицирането на четири герминативни мутации и един интронен вариант (Cantor et al, 2012). Три от вариантите, съответно с.2637G>A, с.2755C>T, с.3411C>T са класифицирани като неутрални полиморфизми. Идентифицирана е също с.2992-2995delAAGA делеция в екзон 20 на гена (Cantor et al, 2012). Мутацията с.2992-2995delAAGA води до изместване рамката на четене, появата на преждевременен стоп кодон на 1057 позиция и синтез на скъсен белтъчен продукт. Важно е да се отбележи, че мутацията обхваща BRCA1 свързващия домен и се очаква това да се отрази на взаимодействието между BRCA1 и BRIP1 (Cantor et al, 2012).

ATM. ATM генът кодира 350 kDa белтък съставен от 3056 аминокиселини (www.wikipedia.org, L17, Lee JH et al, 2011). ATM е серин/треонин протеин киназа, която се активира при ДНК скъсвания. Белтъкът принадлежи към семейството на фосфатидилинозитол 3-киназа свързаните кинази (PIKKs Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases). PIK суперсемейството включва шест серин/треонин протеин кинази които показват сходство с фосфатидилинозитол 3-киназата (PI3Ks - Phosphoinositide 3-kinase). Семейството включва още ATR и mTOR. ATM фосфорилира няколко ключови белтъка, инициращи „Checkpoint“ контрола при ДНК увреждане, като води до клетъчен арест или апоптоза. Някои от тези белтъци са p53, CHEK2, H2AX (Lee JH et al, 2011). В клетката има две основни места за активиране на „Checkpoint“ контрол - на границите G1/S и G2/M от клетъчния цикъл. ATM забавя клетъчния цикъл при наличието на ДНК увреждания (Lee JH et al, 2011).

Неактивният ATM присъства в клетките, в които няма DSBs, под формата на димери и мономери. При наличие на DSBs ATM се автофосфорилира, което

предизвиква дисоциация на димерите и освобождаване на активни мономерни (Lee JH et al, 2011). Установено е, че в този случай ATM формира комплекс с MRE11, RAD50 и NBS1, наречен MRN, който транспортира ATM до мястото на DSBs. ATM директно взаимодейства със субединицата на NBS1 и фосфорилира серина в позиция 139 (S139) на хистоновия вариант H2AX (Huang X et al, 2004). Това фосфорилиране генерира свързващи места с адапторни молекули, имащи BRCT домен.

ATM медираният отговор при ДНК увреждане може да бъде от забавен или бърз тип. За да се активира CHEK2 киназата тя трябва да бъде фосфорилирана от ATM (Lee JH et al, 2007). При бавния отговор активираната CHEK2 киназа разгражда CDC25A, който от своя страна не може да дефосфорилира циклин CDK2. Това води до арест на клетъчния цикъл и ако DSBs не могат да бъдат отстранени, клетката бива подложена на апоптоза (Lee JH et al, 2007). При бързия отговор ATM допълнително фосфорилира MDM2 и p53. Това води до стабилизиране и активиране на p53 и следваща транскрипция на гени като *CDK* и *p21*, които водят до продължителен арест на клетъчния цикъл и до апоптоза (Lee JH et al, 2007, www.ncbi.nlm.nih.gov, L18).

ATM протеин киназата се включва и в митохондриалната хомеостаза, като регулатор на митохондриалната автофагия при стари и дисфункционални митохондрии (Valentin-Vega YA et al, 2012).

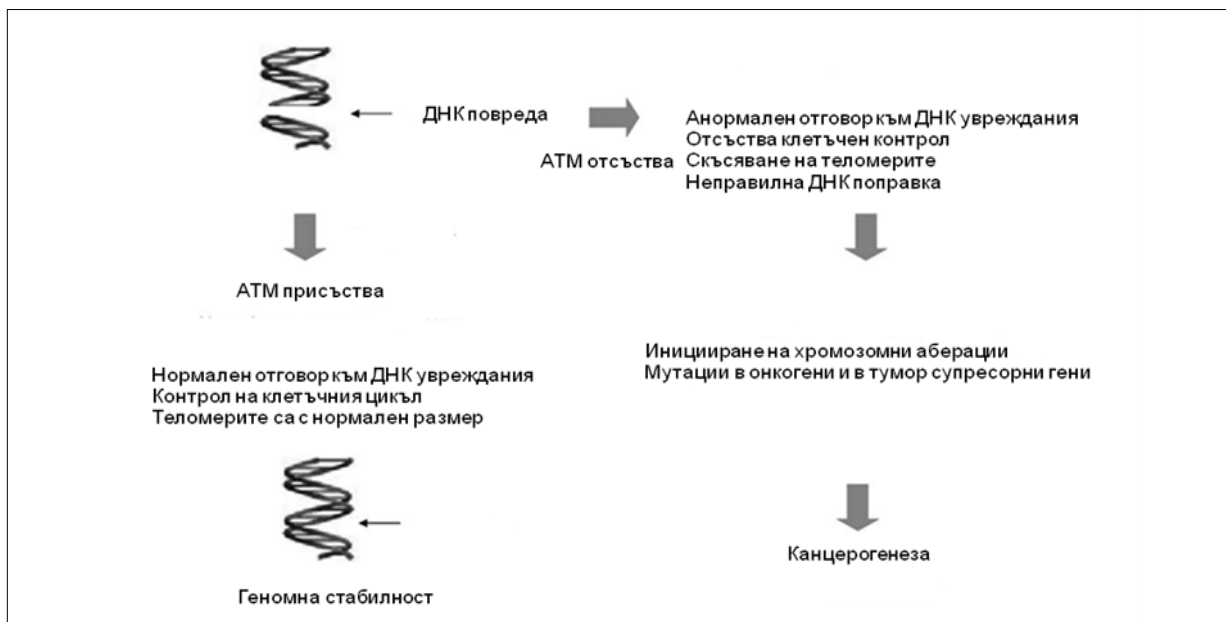
Мутации в *ATM* гена предизвикват рядко заболяване, наречено атаксия телангиектазия (АТ), характеризиращо се с церебрална дегенерация, свръх чувствителност към йонизиращи лъчения и предразположение към рак (Mavrou A et al, 2008). При по-голяма част от пациентите с АТ се откриват мутации в *ATM* гена. При друга част от пациентите с АТ-подобни нарушения са установени дефекти в гените, кодиращи протеини от MRN комплекса (Mavrou A et al, 2008). Тъй като рактът е свързан с геномна нестабилност, лица които страдат от синдроми, характеризиращи се с дефекти в ДНК обикновено са склонни към развитието на рак (*фигура 10*).

Приблизително една трета от пациентите с АТ развиват рак, главно левкемии и лимфоми, които се развиват в детството и са честа причина за смърт (Mavrou A et al, 2008; Ball LG et al, 2005; Yu G et al, 2004). От тези случаи 40% са неходжкинов лимфом, 25% левкемии и 10% ходжкинов лимфом (Lavin M et al, 1998; Levitzki A et al, 2010). Солидните тумори при АТ пациенти обикновено са аденокарцином на стомаха, дисгермином (герминативноклетъчен тумор на яйчниците), гонадобластом (тумор на яйчниците) и медулобластом (Gumu-Pause F et al, 2004). Смята се, че обхватът и честотата на туморите се дължи на геномна нестабилност, предизвикана от дефекти при поправката на двойноверижните скъсвания в ДНК, както и на дефекти в „Checkpoint“ контрола (Levitzki A et al, 2010).

Епидемиологични проучвания категорично показват, че жени носители на мутация в *ATM* имат повишен риск от развитие на неоплазия, особено рак на гърдата (Geoffroy-Perez B et al, 2001). Комбинираният анализ оценява риска от развитие на рак на гърдата при жени, носителки на *ATM* мутация на 3.9% (Mavrou A et al, 2008, Geoffroy-Perez B et al, 2001).

Статутът и експресията на гена *ATM* в карциноми на гърдата е изследван с помощта на различни подходи. Загуба на хетерозиготност в района на *ATM* гена в хромозома 11q22-23 е докладвана в до 40% от спорадичните тумори на гърдата (Hall J

et al, 2005). В тези случаи, експресията на *ATM* е намалена при тумори в сравнение с нивата на протеина, открити в нормалните тъкани и изглежда, че тази загуба на експресия е ранно събитие в туморогенезата на гърдата (**фигура 10**) (Hall J et al, 2005).



Фигура 10. Участие на *ATM* белтъка в поддържане на геномна стабилност (Mavrou A et al, 2008).

Cortez и съавтори доказват с помощта на тандем масспектрометрия, че „Checkpoint“ киназата *ATM* се изисква за фосфорилиране на *BRCA1* в отговор на ДНК увреждане, предизвикано от йонизиращо лъчение (Hall J et al, 2005). *ATM* формира комплекс, в който взема участие и *BRCA1* с регион, богат на серин/глутаминови остатъци (Cortez D et al, 1999). Установени са четири серинови области в *BRCA1*, които се фосфорилират от *ATM* – S1189, S1457, S1524 и S1542 (Cortez D et al, 1999). Изследванията показват, че мутантни *BRCA1* белтъци, при които липсват две от тези места за фосфорилиране - S1524 и S1457 проявяват повишена чувствителност към радиация, което води до заключението, че фосфорилирането на *BRCA1* от *ATM* може да бъде от решаващо значение за правилния отговор към двойноверижни ДНК скъсвания и може да обясни молекулярната роля на *ATM* при предразположението за развитие на рак на гърдата (Cortez D et al, 1999).

При експресионен анализ на носители на *ATM* мутация с определена фенотипна изява и здрави контроли е открит регулаторен път, в който *ATM* регулира *TNFSF4* чрез *MIRN125B* (Smirnov DA et al, 2008). При носители на мутация в *ATM* този път е прекъснат, в резултат на което нивата на *MIRN125B* са по-ниски, а на *TNFSF4* се повишават. Ниските нива на *MIRN125B* се свързват с риск за развитие на рак на гърдата (Smirnov DA et al, 2008).

Епидемиологичните проучвания подкрепят данните за повишен риск от развитие на рак на гърдата при хетерозиготни носители на мутации в *ATM* гена (Scott SP et al,

2002). Въпреки че някои проучвания успяват да докажат ефекта на ATM мутации върху развитието на заболяването, в този ген са открити голям брой полиморфизми и „missense“ варианти с неясно клинично значение, чиято роля за патогенезата на рака на гърдата е трудно да бъде определена при асоциативни изследвания от типа случай-контроли (Scott SP et al, 2002). Функционалният ефект на „missense“ ATM варианти с неясно клинично значение, установени при пациенти с АТ и рак на гърдата, е изследван в клетъчни линии (Scott SP et al, 2002). Патогенните „missense“ варианти и тези с неутрален ефект първоначално са разграничени спрямо способността им да корелират с радиочувствителен фенотип в някои клетки (Smirnov DA et al, 2008). В допълнение е установено, че някои „missense“ варианти премахват киназната активност в облъчвани клетки в сравнение с нормални контролни клетки, причинявайки хромозомна нестабилност, докато това не се наблюдава при неутралните варианти (Scott SP et al, 2002). Подходът на Scott и съавтори е средство за идентифициране на истински мутации в *ATM* гена при различни видове рак, в това число и рак на гърдата (Scott SP et al, 2002).

Проучвания на семейства с АТ показват, че индивиди, хетерозиготни по мутации в *ATM* гена, имат 2,5 пъти повишен риск за развитието на рак на гърдата (Thompson D et al, 2005; Laake K et al, 2000; Bernstein JL et al, 2006). По-често срещани мутации в *ATM* гена, свързани с предразположение за развитието на рак на гърдата са rs28904921 (Val424Gly), rs1800054 (S49C), 3245delATCinsTGAT (Laake K et al, 2000; Bernstein JL et al, 2006; Stredrick DL et al, 2006). Така например рискът за развитие на рак на гърдата при наличието на rs1800054 (S49C) е изчислен на 1.69 пъти (OR = 1.69, 95% CI 1.19-2.40, p = 0.004) (Maillet P et al, 2002; Buchholz TA et al, 2004; www.omim.org, L19).

2.5.3. Нископенетрантни гени свързани с предразположение за развитие на рака на гърдата

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 (*фигура 11*). 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).

FGFR2. 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 et al, 2011).

При проведеното целогеномно асоциативно проучване (GWAS) на 697 пациентки с рак на гърдата и 1394 контроли е намерена асоциация с повишен риск за развитието на заболяването при носителство на един А алел при полиморфния вариант rs2981579 (OR = 1.20; P= 0.011) (Levitzki A et al, 2010).

В съответствие с предишни резултати при проведени целогеномни проучвания от типа случаи - контроли, е установена значителна асоциация за развитието на рак на гърдата на полиморфен вариант rs2981582 в интрон 2 на *FGFR2* гена (Turnbull et al, 2010, Peng et al, 2011). При носителството на този полиморфизъм е установена амплификация и свръхекспресия на *FGFR2* при пациентки със спорадичен карцином на гърдата. Предполага се, че този полиморфен вариант променя афинитета на свързване с транскрипционни фактори и по този начин повишава експресията на *FGFR2* (Ripperger et al, 2009). По-високи нива на транскрипция на *FGFR2* са установени при пациентки, хомозиготи по редкия за rs2981582 алел. В независимо проучване на пациентки от японската популация е установена корелация между носителството на полиморфния вариант и експресията на естрогеновия рецептор (Kawase et al, 2009).

MAP3K1. Митоген активираната протеин киназа киназа 1 е ензим, който при хората се кодира от *MAP3K1* гена. MAP3K1 (МЕК) е серин/треонинова киназа, имаща основна роля при фосфорилирането на ензими, свързани с клетъчния отговор, растежни фактори, митогенни и метаболитни стимули. Установено е, че в миши модели MAP3K1 играе важна роля по време на ембриогенезата, кератоцитната миграция и при синтеза на Т-клетъчните цитокини и В антителата (www.omim.org, L21). При около 25% от пациентките с карцином на гърдата се наблюдава свръхекспресия на HER2, която се асоциира с агресивен туморен растеж, метастазирание и лоша прогноза. HER2 притежава тирозин киназен домен, показващ активност дори и когато не се е формирал хетеродомен. Свръхекспресията води до образуване на повече HER2 хетеродимери, 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 (Karr AV et al, 2006).

Полиморфният вариант, rs889312 в *MAP3K1* се асоциира с рака на гърдата. Рискът за развитие на заболяването при носителството на А/С генотип е изчислен на 1.22 пъти (OR 1.22 (95%CI 1.14-1.30; P= 4.6×10^{-9}) (Peng et al, 2011).

CYP1B1. При човека се експресират три вида на CYP1 ензими: CYP1A1, CYP1A2, и CYP1B1. Членовете на това семейство са под транскрипционно регулиране на рецептора на арил- хидрокарбоновия рецептор (AhR). AhR свързва разнообразен набор от екзогенни молекули, включително канцерогенни вещества като полициклични ароматни хидрокарбони и полихалогенни въглеродороди, които се намират в замърсения въздух и цигарения дим. *CYP1B1* е свръхекспресиран в много видове тумори (Robert D et al, 2007). Доказателство за ролята на CYP1B1 в туморогенезата се поддържа не само от свръхекспресията, но и от способността му да активира някои канцерогени в определени класове химични вещества, като например повърхностно

активни вещества, хетероциклични амини и ароматни амини. Полиморфизмите в *CYP1B1* показват асоциация с развитието на определени карциноми (Robert D et al, 2007).

CYP1B1, заедно с *CYP1A1*, играе роля в туморната прогресия и участва в метаболизма на химиотерапевтични средства, което помага да се избегне химиотерапевтична индуцирана цитотоксичност. 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 (Bosland MC et al, 2000). Естрогените се метаболизират главно в черния дроб, но също и в други тъкани от цитохром P450 ензими. 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 (Bosland MC 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 (Jordan VC et al, 2000).

Асоциация с повишен риск за развитие на рак на гърдата е открита при еднонуклеотидни полиморфизми (SNPs - Single nucleotide polymorphism) rs1800440, rs162555 и rs1056836 в *CYP1B1* гена (Diergaarde B et al, 2008, Crandall CJ et al, 2009). Полиморфният вариант rs1056836 представлява аминокиселинна замяна на Leu с Val кодон 432 (L432V) е от типа missense (Huang Y et al, 2009).

RNF146. Установено е, че *RNF146* участва в WNT β -катенин сигналния път. WNT β -катенин сигналният 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. Концентрацията и стабилността на β -катенин зависи от белтъците аксин и танкираза. Аксини 1 и 2 са цитоплазмени белтъци, с регулаторна функция в WNT сигналния път, и могат да индуцират апоптоза (Marinella G et al, 2011). Мутации в *AXIN1* гена, който кодира аксин 1 белтъка се свързват с хепатоцелуларен карцином, аденокарцином на яйчниците, ендометриоза и медулобластома. Аксин 2 участва в стабилизирането на β -катенин (www.ncbi.nlm.nih.gov, L22). Третият белтък е танкираза, която участва в контрола на теломерите. Танкиразата е подложена на активация от MAPK. Регулаторната активност на MAPK се проявява в много вътреклетъчни структури, които са свързани с танкиразата по време на митозата. С течение на много клетъчни цикли се наблюдава изменение на теломерите, следователно не е важно общото разпределение на танкиразата, което оказва влияние върху генната експресия, а характерното ѝ разпределение в клетката, което оказва влияние върху центрозомата и клетъчните структури, свързани с последната (Чичинадзе КН et al, 2008).

Молекулните механизми, по които Poly (ADP-ribosylation), наречена още PARsylation зависимата танкираза се прикачва и води до убиквитинирането на актина все още не са напълно изяснени. Наскоро в *RNF146* беше идентифициран „finger” домен с E3 убиквитин лигазна функция. Предполага се, че *RNF146* оказва влияние в

регулацията на WNT β -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). Проведената епидемиологична и функционална характеристика при носителството на rs2180341 показва, че този полиморфен вариант вероятно се асоциира с ER положителните тумори на гърдата (Kirchhoff T et al, 2009; Gold B et al, 2008).

TOX3. *TOX3/TNRC9* участва в регулацията на ДНК-зависими процеси, като транскрипция, репликация, поправката и ремоделирането на хроматиновата структура (O'Flaherty E et al, 2003). Генът експресира високо подвижен белтък. 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).



Фигура 11. Степен на пенетрантност на гените, свързани с предразположение за развитието на рак на гърдата

Полиморфният вариант rs3803662 се асоциира с развитието на рак на гърдата. При проведените от групата на Easton големи асоциативни проучвания от типа случай-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).

SLC4A7. *SLC4A7* генът за бикарбонатния котранспортер е локализиран в трета хромозома. Кодира NBC котранспортер на натриев бикарбонат през плазмената мембрана и е свързан с дейността на натриевите канали. Регулира вътреклетъчното рН и играе роля при транспорта на натриев бикарбонат при секреторните епителни клетки. 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, цервикс, простата, дебело черво (www.phosphosite.org, L23). До този момент, по литературни данни, SNP rs4973768 в *SLC4A7* гена се асоциира с рака на гърдата.

2.6. Роля на BRCA гените при рака на гърдата

2.6.1. Участие на BRCA1 и BRCA2 гените в поправката на ДНК

Известно е, че еукариотните клетки притежават най-малко три различни механизма за поправка на двойноверижните скъсвания: нехомоложно свързване на повредените крайща (Non-Homologous End Joining - NHEJ), хомоложна рекомбинация при поправката на двойноверижни скъсвания между две повтарящи се секвенции (едноверижна хибридизация, Single-Strand Annealing - SSA) и HR. NHEJ включва директно лигиране на повредените крайща на ДНК и може да доведе до грешки, ако терминалните бази бъдат отстранени преди блокирането (Wang B, 2012). SSA използва кратки хомоложни последователности, съпътстващи увреждането след резекция на двойноверижното скъсване, в резултат на което се получава делеция на последователности и загуба на генетична информация (Wang B, 2012).

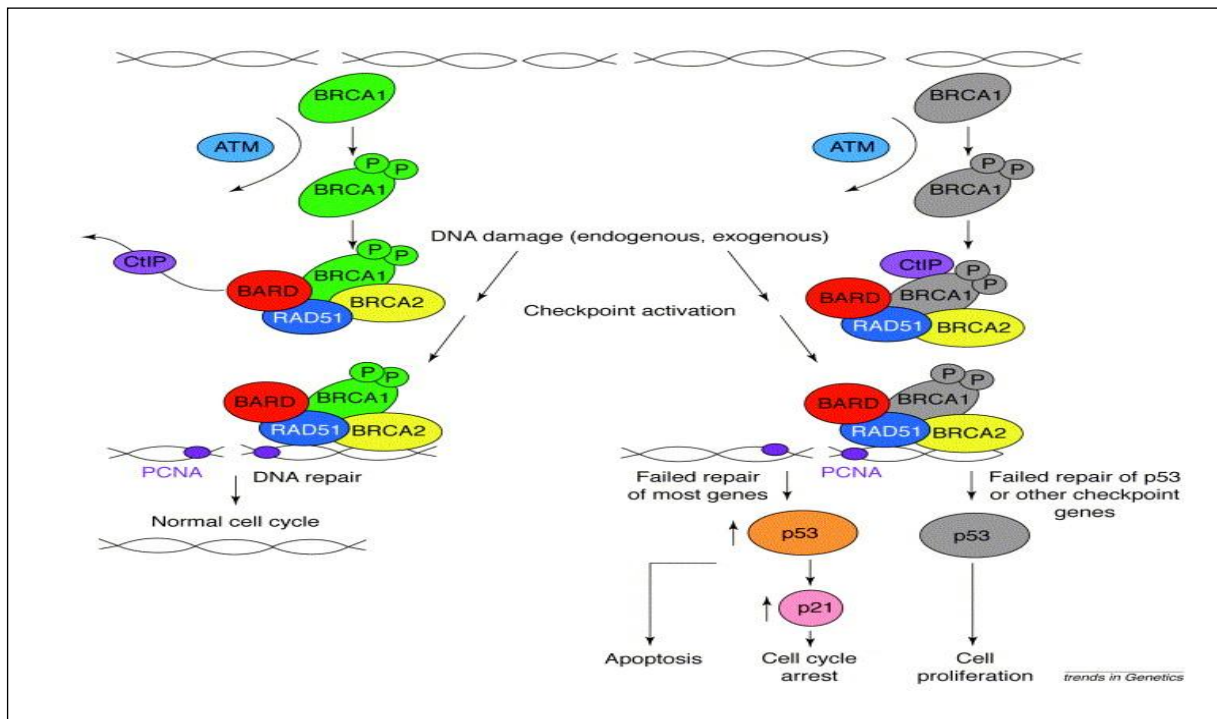
Репарацията чрез хомоложна рекомбинация включва взаимодействие между три едноверижни ДНК молекули - двете от скъсаните крайща на ДНК и една от запазената сестринска хроматида и вероятно е основния механизъм за защита на генома в пролифериращи клетки, т.к. другите пътища за поправка на ДНК са застрашени от натрупване на грешки и водят до генериране на хромозомни делеции или транслокации (Lodish H et al, 2000). При фамилния рак на гърдата, при който не е установена мутация в *BRCA1* и *BRCA2*, промени в други гени като например в *ATM* и *CHEK2* могат да обяснят предразположението за развитието на заболяването (Lodish H et al, 2000). Допълнително предразположението може да се обясни с наличието на мутации в други членове на BRCA1-BRCA2 пътя, например в *PALB2* и *BRIP1* (Roy R et al, 2012, Futreal PA et al. 2004)

Един аспект на поддържане на геномната цялостност е мрежата на клетъчната сигнализация (DDR – DNA Damage Response), която се задейства в отговор на генотоксичен стрес (Wang B, 2012; Roy R et al, 2012). DDR включва сензори, които откриват DSBs ДНК повреди - ефектори, които извършват поправката и медиатори, които улесняват взаимодействията между сензори и ефектори (*фигура 12*). *BRCA1*, формира макро-комплекси (на схемата означени в тъмно синьо) които са изключително важни медиатори при отговора на ДНК увреждането (Roy R et al, 2012). Такъв комплекс е *BRCA1 – ABRAXAS - RAP80*, участващ в убиквитинирането на хистони, в

близост до места на увреждане на ДНК, зависещо от фосфорилирането на хистон H2AX (γ H2AX), който е медиатор на MDC1 и RNF8. От друга страна CtIP (комплекс който се формира между белтъците BRCA1-CtIP) взаимодейства с MRN белтъчния комплекс, който от своя страна разпознава DSBs и е отговорен за тяхната резекция.

Друг партньор на BRCA1 и BRCA2 е PALB2 (Roy R et al, 2012). PALB2-BRCA2 комплексът е важен при медиране на RAD51-зависимата HR. От друга страна CHEK2-зависимото фосфорилиране на серина на позиция 988 (S988) в BRCA1 вероятно иницира формирането на BRCA1-PALB2-BRCA2 ефекторен комплекс, който е важен в RAD51-медираната HR (Roy R et al, 2012).

BRCA1 участва пряко в HR-медираната поправка на DSBs, формирайки няколко функционални комплекса - Abraxas-RAP80, BRCA1-CtIP и MRN (Wang B, 2012). Abraxas-RAP80 се асоциира с убиквитинирането на хистони при DSBs, докато BRCA1-CtIP насърчава CtIP медираната 5'-резекция на DSBs. Установено е, че при мутации в областта на BRCT доменът на BRCA1, CtIP медираната 5'-резекция не е активна (Roy R et al, 2012; Yu X et al, 1998, Chen L et al, 2008)



Фигура 12. Участие на BRCA1 и BRCA2 белтъците в „checkpoint“ контрола на клетъчния цикъл (Welch PL et al, 2000)

BRCA1 е необходим за транспортиране на RAD51 до местата на увреждане на ДНК чрез взаимодействие с PALB2 и BRCA2 (фигура 13). Това взаимодействие изисква на фосфорилиране от CHEK2 на серин в позиция 988 (S988) на BRCA1. При експерименти, проведени върху “knock-in” мишки, експресиращи S971A мутант (при мишките, S971 съответства на човешкия S988) е установено, че те развиват тумори на млечните жлези и на ендометриума след третиране с ДНК увреждащи агенти (Chang S

et al, 2009). BRCA1-дефицитни човешки клетки, експресиращи BRCA1-S988A показват дефекти в HR, но запазват нормалната функция на „Checkpoint“ контрола и устойчивост на йонизиращо лъчение, което предполага че функцията BRCA1 в HR е различна от другите участници в DDR (Chang S et al, 2009). В допълнение е установено, че BRCA1-нулеви ембрионални стволони (ES) клетки от мишки, експресиращи човешки BRCA1-S988A мутант, също не показва разлика в профила на клетъчния цикъл или чувствителността към ДНК увреждащите агенти в сравнение с тези, експресиращи див тип човешки *BRCA1* (Chang S et al, 2009).

Редица изследвания показват, че BRCA1 би могъл да има функционална роля и в други ДНК пътища на поправка, включително NHEJ и SSA (Chang S et al, 2009). Ролята на BRCA1 в NHEJ е спорна, тъй като при унаследяване на BRCA1 мутация се наблюдава, че NHEJ или е потиснат или няма ефект (Chang S et al, 2009). Тези наблюдения може да се дължат на разликите в анализите, използвани за измерване на NHEJ, а също и на вероятността BRCA1 да има различни роли в различните подтипове на NHEJ. BRCA1 вероятно участва в HR, NHEJ и SSA чрез взаимодействието си с комплекса MRN, който е необходим за поправката на ДНК резекции и при трите вида ДНК репарация (Chang S et al, 2009). Ангажирането на BRCA1 в DSBs при NHEJ е улеснено от взаимодействие на N-края на BRCA1 с KU80 белтъка, като по този начин се осигурява друг механизъм за натрупване BRCA1 при DSBs. Скорошно проучване показва, че вероятно една от функциите на BRCA1 е да отстранява NHEJ белтъци като 53BP1 (p53-свързващ протеин 1) от DSBs, за да се предотврати аномално свързване на повредените краища и да се регулира изборът между HR и NHEJ (Roy R et al, 2012).

Множество данни показват, че основна функция на BRCA2 е да подпомогне HR. Установено е, че BRCA2-дефицитни клетки имат намалена способност да взаимодействат с RAD51 на местата на DSBs. Наскоро е установено, че хамстери, с дефицит по BRCA2 и лекувани с хидроксиурея, която причинява колапс на репликативната вилка, имат дефекти в поддържането на дължината на изграждащата се ДНК (Roy R et al, 2012). Тези резултати показват, че BRCA2 взема участие и в поддържането на репликативната вилка. При експресия на BRCA2 мутанти S3291A, поправката на DSB-индуцирана HR е нормална, но се наблюдават дефекти в репликативната вилка (Roy R et al, 2012).

Въпреки, че герминативни мутации в *BRCA1* и *BRCA2* гените в хетерозиготно състояние не показват определена фенотипна изява при мишки, хомозиготните мутации в двата гена са летални по време на ембрионалното развитие (Roy R et al, 2012). Хомозиготите са свръхчувствителни към йонизиращо лечение и при тях се откриват хромозомни и хроматидни аберации, които са следствие от NHEJ. Интересно е, че фенотипът на BRCA1 дефицитни миши ембриони имитира фенотипа на мишки с мутации, които водят до инактивиране на RAD51. Тези миши модели са доказателство, че BRCA1 и BRCA2 функционират в общ път на хомоложна рекомбинация, заедно с RAD51 (Roy R et al, 2012), (*приложение 1*). В допълнение BRCA1, BRCA2 и RAD51 се колокализират в ядрото, което подкрепя предположението, че участват съвместно в клетъчния отговор при увреждане на ДНК (Venkitaraman AR et al. 2001). Директно доказателство за тази функция идва от изследванията на BRCA1 и BRCA2 мутантни клетки (Venkitaraman AR et al. 2001).

Ролята на BRCA1 и BRCA2 в поправката на двойноверижните скъсвания вероятно е различна. Доказателствата сочат по-пряка роля на BRCA2 в този механизъм (Liu J et al, 2010). Всъщност последните резултати показват, че BRCA2 контролира вътреклетъчния транспорт на RAD51 (Liu J et al, 2010). При BRCA2 дефицитни клетки RAD51 не се транспортира ефективно в ядрото. Това води до предположението, че една от функциите на BRCA2 е да транспортира RAD51 от мястото му на синтез до мястото му на функциониране (Liu J et al, 2010). В допълнение изглежда, че BRCA2 контролира ензимната активност на RAD51. RAD51 ефективно покрива ДНК субстрата като формира нуклеопротеинови филаменти, ключови междинни продукти при хомоложната рекомбинация. Добавянето на пептиди, съдържащи RAD51 към BRC повтори BRC3, BRC4 или BRC7 потиска образуването на нуклеопротеинови филаменти в *in vitro* условия. Мутациите в BRC пептидните повтори, които се свързват с рак, елиминират тази инхибираща активност (Liu J et al, 2010). Едно от обясненията е, че в комплекса BRCA2-RAD51 съществуват поне две места *in vivo* - неактивно място, което е предпазено от безразборно свързване на едноверижни ДНК фрагменти и активно място, където се образуват нуклеопротеинови филаменти и се транспортират до местата на ДНК увреждането. Необходимостта от неактивен комплекс BRCA2-RAD51 вероятно се дължи на обмяната на нормалната ДНК (Liu J et al, 2010, Davies AA et al, 2001).

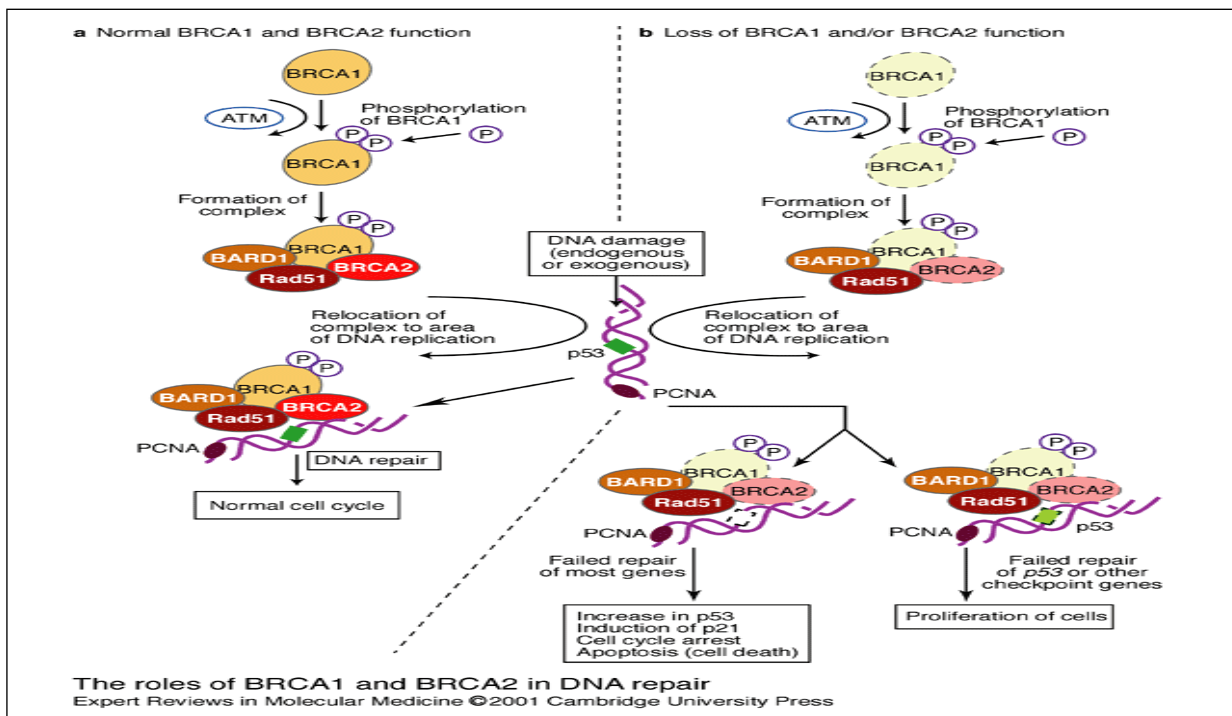
Активирането включва освобождаване на RAD51 от BRCA2 чрез постранслационни модификации, като фосфорилиране от ATM и ATR. Механизмът на това активиране в местата на ДНК увреждане не е изяснен напълно (Liu J et al, 2010). Въпреки това BRCA2 съдържа най-малко шест BRC повтора, които могат да се свържат с RAD51. При мутации, свързани с рак, които засягат един повтор от BRC, трудно може да бъде засегната функцията на RAD51 *in vitro*. Тези ограничения не са фатални, но подкрепят нуждата от по-нататъшни проучвания за взаимодействието на комплекса BRCA2-RAD51 (Liu J et al, 2010, Davies AA et al, 2001).

BRCA1 също има съществено значение за поправката на двойноверижните скъсвания чрез хомоложна рекомбинация, но начинът му на действие не е много добре изяснен (Davies AA et al, 2001). По всяка вероятност той непряко контролира функцията на RAD51. BRCA1 взаимодейства и с различни от RAD51 белтъци, за които се знае, че участват в рекомбинацията (*фигура 13*).

Установено е, че RAD51, заедно с MRE11 и NBS1 се колокализират с BRCA1 в мястото на ДНК увреждането (Bougie1 O et al, 2011). Предполага се, че BRCA1 регулира дейността на RAD50-MRE11-NBS1 комплекса. Мутации в *ATM* гена се свързват със заболяването атаксия телеангиектазия. Генът кодира белтък, който е фосфатидилинозитол-3-фосфат киназа. Дефицитите, характерни за увреждане на ATM са подобни, на тези при увреждане на BRCA1. Хетерозиготни мутанти по *ATM* гена са предразположени към рак, включително и рак на гърдата (Bougie1 O et al, 2011). ATM дефицитни клетки показват хромозомна нестабилност и нарушена способност да отговарят на генотоксични агенти. Дефекти във фосфорилирането обясняват сходните клинични прояви, причинени от дисфункция на един от двата белтъка. Процесът на канцерогенеза често е индуциран от епизоди на ДНК повреди, които могат да бъдат следствие на различен брой повтарящи се стресови фактори, като реактивни

кислородни радикали, цитотоксична химиотерапия, йонизиращи лъчения и др. (Bougie1 O et al, 2011).

Белтъците BRCA1 и BRCA2 вземат участие в „Checkpoint“ контрола на клетъчния цикъл (Welcsh PL et al, 2000). „Checkpoint“ контролът е клетъчен механизъм, при който клетката спира хода на цикъла си с цел проверка на процесите, протекли в нея по време на съответната фаза на клетъчния цикъл. Тази проверка представлява качествен и количествен контрол на отделните етапи от клетъчния цикъл, преди да започне следващият. Процесът се контролира от „Checkpoint“ кинази (CDKs), активни в присъствието на поне един белтък - циклин. „Checkpoint“ контролът се включва на границите G₁/S и G₂/M. През S фазата на клетъчния цикъл също се активира „Checkpoint“ контрол. Това активиране става с участието на ATM и ATR киназите. Предполага се, че BRCA1 и p53 се припокриват по отношение на ролите си в „Checkpoint“ контрола и поддържането на геномната стабилност (*фигура 13*) (Yun M H e al, 2009, Welcsh PL et al, 2000).



Фигура 13. Роля на BRCA1 и BRCA2 в поправката на ДНК. А. При нормално функциониране на BRCA1 и BRCA2 белтъците се формира макромолекулен комплекс от BRCA1, BRCA2, BARD1 и Rad51. Образуването на комплекса започва с фосфорилиране на BRCA1 от ATM. В отговор на ДНК повреда комплексът се премества към хромозомен участък, подложен на ДНК репарация, който е маркиран от PINA (Proliferating Cell Nuclear Antigen)., Б. Загуба на функция на BRCA1 и BRCA2 (на схемата обозначени с пунктирна линия) води до невъзможност да се поправят ДНК повреди. В този случай се нарушава експресията на гени, участващи в „Checkpoint“ контрола, като p53 и p21, което води до активиране на клетъчната пролиферация ([www. users.rcn.com](http://www.users.rcn.com), L24)

От изключително важно значение за поддържане на геномната стабилност в клетката е убиквитиниращата функция на BRCA1 (Wu W et al, 2008). Убиквитинирането е широко разпространена посттранскрипционна модификация, при която има ковалентно свързване между глицинови остатъци, разположени в С-края на убиквитина, с лизиновите остатъци в белтъците (Wu W et al, 2008). Понякога към лизиновия остатък се свързват най-малко четири молекули убиквитин, процес познат като полиубиквитиниране, осъществяващо се в протеозомата. Убиквитинирането протича на няколко етапа и се катализира от три ензима, E1, E2 и E3 убиквитин протеин лигази. BRCA1 участва в процесите на убиквитиниране, като формира хетеродимерен комплекс BRCA1-BARD1 с убиквитин лигазна активност. Това е един от примерите за RING - зависима лигазна активност (Wu W et al, 2008).

Съществуват няколко типа убиквитинови модификации, от които моноубиквитинирането е свързано с регулаторни модификации. Подобно на други хистонови посттранслационни модификации, моноубиквитинирането на хроматиновата структура засяга транскрипционния контрол, генната експресия и възстановяването на ДНК (Wang B, 2012, Chen A et al, 2002)

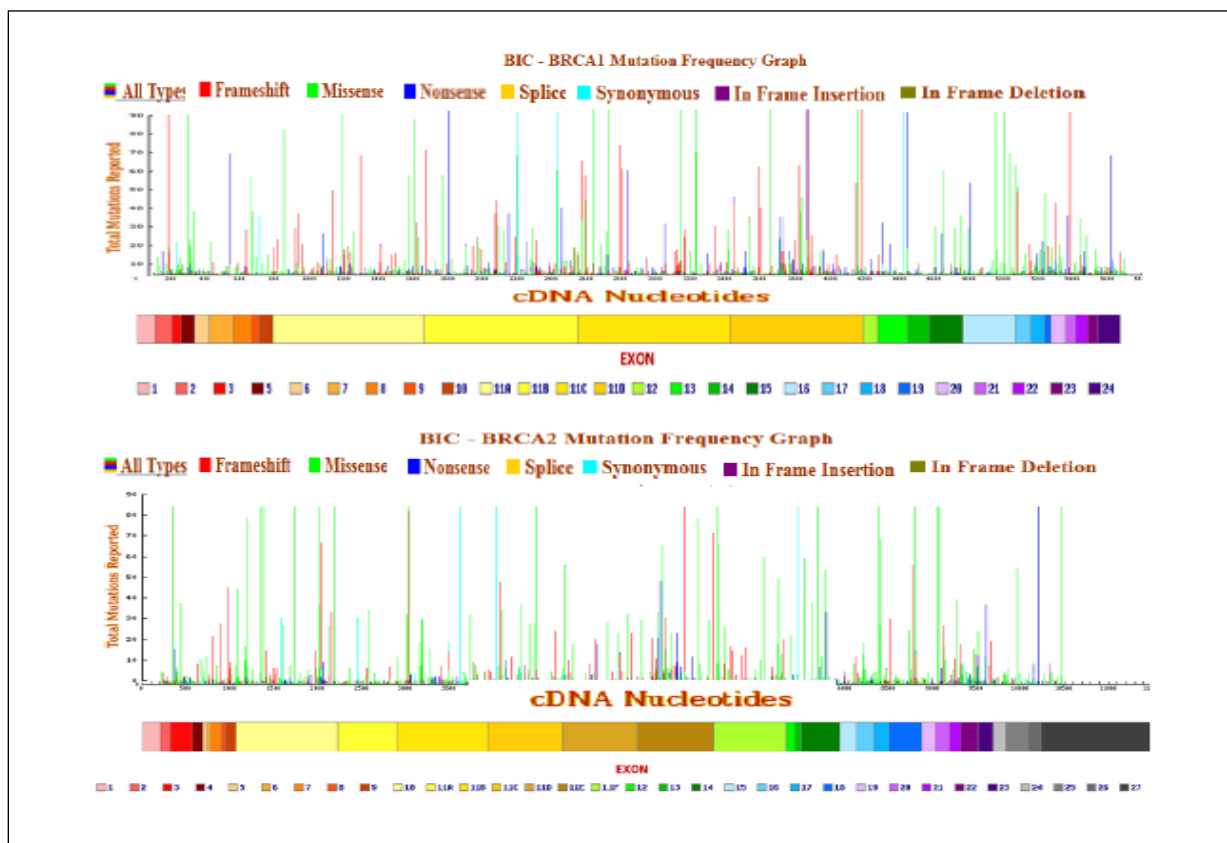
Известно е, че BRCA1 катализира моноубиквитинирането на много субстрати. Около 10% от H2A и около 1% от H2B при бозайниците са моноубиквитинирани, което оказва влияние върху транскрипционната активност (Chen A et al, 2002). Например, коровите хистони H2A, H2B, H3, H4 и хистоновият вариант H2AX са подложени на моноубиквитиниране. Това доказва, че BRCA1 участва в регулацията на хроматиновата структура. Въпреки, че биологичното значение на моноубиквитинирането не е много добре проучено, има предположения, че то спомага за хроматиновото ремоделиране по BRCA1-зависим репариращ път (Wang B, 2012, Chen A et al, 2002).

Хроматиновото ремоделиране се случва около двойноверижните повреди и се предполага, че улеснява репарацията на ДНК. В този процес са въввлечени няколко мултимерни комплекса, които взаимодействат пряко с BRCA1, включително BASC и хроматин ремоделиращите SW1 и SNF (Narod SA et al, 2010). Това показва, че тези белтъци функционират като единици за хроматиново ремоделиране и се откриват в местата около ДНК повредите (Narod SA et al, 2010). Резултатът от това взаимодействие е активирането на други гени, замесени в отговор на ДНК увреждания, като KU70 и GADD45. Мутации, които засягат други компоненти от комплекса SW1/SNF, като например SNF5 са открити при редки тумори, характерни за детската възраст (Narod SA et al, 2010). Фактът, че BRCA1 може да функционира като хистонова деацетилаза и да взаимодейства с белтъци, замесени в хроматиновото ремоделиране, като BACH1, подчертава неговото значение в процесите, които регулират репарацията на ДНК. Интересно е, че BRCA2 взаимодейства с EMSY и също има репарираща функция. Мутации, които засягат EMSY могат да се окажат в основата на спорадичния рак на гърдата и яйчниците (Narod SA et al, 2010).

2.6.2. Мутационен спектър на *BRCA* гените

2.6.2.1. Спектър и честота на мутациите в *BRCA1* и *BRCA2* гените сред Европейските популации.

Около 25% от случаите на рак гърдата са с фамилна анамнеза (Balman J et al, 2010). За фамилния рак на гърдата, според установените международни критерии, е характерно ранно начало, под 50 годишна възраст и два или повече случаи на рак на гърдата, яйчниците, фалопиевите тръби или перитонеума при родственици от първо, второ или трето поколение. Мутации в *BRCA1* и *BRCA2* гените обясняват около 15 до 20% от фамилните случаи на рак на гърдата (Balman J et al, 2010), а при около 1% от семействата, свързани с редки синдроми като Li Fraumeni, Cawden и Peutz-Jeghers са установени герминативни мутации в *TP53*, *PTEN* и *STK11* гените (Ripperger et al, 2009). 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).



Фигура 14. Разпределение на мутациите по кодиращата последователност на *BRCA1* и *BRCA2* гени (www.research.nhgri.nih.gov, L25; www.research.nhgri.nih.gov, L26)

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 („nonsense“) мутации, предизвикващи появата на преждевременен стоп кодон и синтез на скъсен белтъчен продукт (*фигура 14*). Този тип мутации са около 70% при *BRCA1* гена и 90% при *BRCA2* гена. Една част от мутациите са големи пренареждания – инсерции, делеции или дупликации на повече от 500 кило бази от ДНК, засягащи един или повече екзони (Narod SA et al, 2010).

В общата популация рискът за развитие на рак на гърдата е средно 1 на 8, а рискът за развитие на рак на яйчниците е 1 на 70 жени (Bougie1 O et al, 2011). В зависимост от популацията честотата на мутациите варира от 1 на 800 (Antoniou AC et al, 2003; Antoniou AC et al, 2004). Смята се, че носителството на мутации в *BRCA1* и *BRCA2* гените се среща съответно при 2 и 6 % от пациентите с рак на гърдата и при 10 и 15 % от пациентите с овариален карцином (Bougie1 O et al, 2011). Разпространението на герминативните мутации в *BRCA1* и *BRCA2* гените варира значително сред различните етнически групи и географски области.

Мутации с ефект на основателя (founder) са открити в много европейски популации. Популационно специфични мутации са описани при източноевропейското еврейско семейство Ашкенази, в исландската, холандската, швейцарската, норвежката, германската, испанската, канадската, източноевропейските и южноевропейските популации (Balman J et al, 2010, Janavičius R et al, 2010). В някои изолатни популации или етнически групи мутациите се срещат много по-често, поради ефекта на основателя. Например в Исландия най-честата мутация с ефект на основателя е с.771_775delTCAAA (999del5) в *BRCA2* гена (Janavičius R et al, 2010, Friedman LS et al, 1995). Тя се среща при около 0,4% от исландската популация и се открива при 8,5% от пациентите с рак на гърдата и в 7,9% от пациентите с рак на яйчниците, но изглежда, че не допринася за развитието на друг тип злокачествени заболявания (Arcidiacono B et al, 2012). Друга мутация с ефект на основателя в тази популация е с.1472A>A (Q491R; G5193A) в *BRCA1* гена, въпреки, че тя е изключително рядка и се наблюдава само при 1% от случаите с рак на гърдата и яйчниците. В Норвегия при наследствените форми на рак на гърдата и яйчниците се откриват основно четири мутации с.1556delA (1675delA), с.697_698delGT (816delGT), с.3228_3229delAG (3347delAG) и с.902insC (1135insC). Като цяло тези мутации са до 68% от всички открити в *BRCA1* гена при тази популация (Janavičius R et al, 2010).

Мутацията с.902insC (1135insC) е открита и в други етнически групи (Phelan CM et al, 2002; Frank TS et al, 2002). Независимо от това, проведенният хаплотипен анализ при норвежки, френско-канадски, италиански и немски пациенти показва, че най-вероятно тя има независим произход при изследваните популации (Phelan CM et al, 2002; Frank TS et al, 2002).

Във ирландската популация са установени 11 мутации с ефект на основателя, които представляват до 84% от откритите мутации в *BRCA1* и *BRCA2* гените (Antoniou AC et al, 2005). Останалите мутации се откриват и в други популации, въпреки, че хаплотипният анализ на с.4213C>T (C4446T) и с.3371_3372delTT (3604delTT) в *BRCA2* гена показва техния независим произход (Satagopan JM et al, 2002). Най-честата *BRCA1* мутация в Швеция е с.3052_3053insTGAGA (3171ins5). Тя е характерна за западната

част на страната и представлява около 75% от всички открити мутации в *BRCA1/2* гените (Janavičius R et al, 2010). Носителите на тази мутация имат 59% увеличен риск за развитие на рак на гърдата и до 93% увеличен риск за развитието на рак на яйчниците до навършване на 70 годишна възраст (Janavičius R et al, 2010).

През 2004 година едно френско проучване показва висока честота на две *BRCA1* мутации във френската популация - с.3481_3491delGAAGATACTAG (3600del11) и G1710X, които представляват съответно 37% и 15% от всички идентифицирани мутации (Gorski B et al, 2004). Въпреки че мутацията с.3481_3491delGAAGATACTAG (3600del11) се открива и в други географски области, нейната честота е най-висока във Франция (Berman DB et al, 1996; Gorski B et al, 2004). Голям брой мутации с ефект са на основателя са открити и в Квебек, Канада (Berman DB et al, 1996). Част от тях са с.4327C>T (R1443X) в *BRCA1* и с.8537_8538delAG (8765delAG) и с.3170_3174delAGAAA (3398del5) в *BRCA2* гена. Мутацията 3398delAAAAG се открива при 1.7% от жените с поставена диагноза рак на гърдата преди 41 годишна възраст и при 1.3% от пациентките с овариален карцином. В тази популация е открит и един „nonsense” вариант, с.4327C>T (R1443X), който е с патогенен ефект за развитието на заболяването (www.research.nhgri.nih.gov,L26).

Направеният хаплотипен анализ на 18 семейства показва, че мутацията с.4327C>T (R1443X) има ефект на основателя при коренното население на Квебек (Krajc M et al, 2008; Couch FJ et al, 2002; Ladropoulou A et al, 2002).

В Германия са идентифицирани голям брой повтарящи се мутации с общ хаплотип, но делецията на 17 екзон в *BRCA1* се открива при 3% от високо рисковите семейства и при 6% от семействата, в които не са установени точкови мутации или малки инсерции/ делеции в *BRCA1/2* гените (Janavičius R et al, 2010). В Холандия и Белгия също са установени популационно специфични мутации. Например, в Белгия с най-висока честота, до 24% от всички установени мутации в *BRCA1/2* гените, е делецията с.2685_2686delAA (2804delAA) (Janavičius R et al, 2010). Тази мутация е възникнала преди 200 години, но нейната честота се е повишила в холандската и белгийската популации, вероятно поради изолирането на двете страни непосредствено след Втората световна война. Мутациите с.4186-1643_4357+2020del12_1643 (IVS12-1643del3835) в *BRCA1* и с.5351_5352insA (5579insA) в *BRCA2* се откриват в семейства от две различни географски области на Югозападна Холандия (Janavičius R et al, 2010). Друга типична за Холандската популация мутация е с.6275_6276delTT (6503delTT), която заедно с с.5351_5352insA (5579insA) в *BRCA2* представлява до 62% от мутациите, открити при пациенти с рак на гърдата или яйчниците (Janavičius R et al, 2010).

В Австрия съотношението на мутациите в *BRCA1* към тези в *BRCA2* е 2:1. Най-честите мутации в тази популация са с.181T>G (C61G), с.5263_5364insC (5382insC) и с.1687C>T (Q563X). Изброените мутации са общи и за други европейски популации (Janavičius R et al, 2010). В Австрия тяхната честота е 15%, 10% и 6%, съответно. Мутацията с.1687C>T (Q563X) е с висока честота и в Словения и Швеция (Janavičius R et al, 2010). Хаплотипният анализ показва, че тази мутация, характерна за австрийската, словенската и шведската популации е с общ прародител, но най-вероятно има австрийски произход, въпреки, че честотата ѝ при словенската популация е 26% от всички открити *BRCA1* мутации. Друга честа мутация в австрийската популация е

c.3016_3019delCATA (3135del4) в *BRCA1*, която е установена и в Италия, където е с честота 8% (Janavičius R et al, 2010).

Две от най-често срещаните мутации в *BRCA1* гена сред европейските популации са c.68_69delAG (185delAG) и c.5263_5364insC (5382insC), с честота около 0.9% при източноевропейското еврейско семейство Ашкенази (Janavičius R et al, 2010). Най-честата мутация сред тази етническа група е c.68_69delAG (185delAG). Мутацията води до изместване на рамката на четене и до появата на стоп кодон в позиция 39. Това води до синтеза на по-къс белтъчен продукт. Втората мутация, c.5263_5364insC (5382insC) води до промяна в рамката на четене и преждевременно термилиране на трансляцията с появата на стоп кодон в позиция 1829. В резултат се получава скъсен белтъчен продукт с липсващ втори BRCT мотива в С края на веригата. Тази мутация е с най-висока честота сред славянските популации (Name N et al, 2003). Оценка на възрастта на мутацията c.5263_5364insC (5382insC) е направена чрез определяне на размера на общия споделен хаплотип около нея (Name N et al, 2003). Принципът на този хаплотипен анализ е, че при новопоявила се мутация изследваните алели ще са идентични на относително голям регион от ДНК около мутацията и ще се срещат при голям брой от носителите ѝ. С течение на времето рекомбинантните събития ще създадат в този регион различни хромозомни промени в определени индивиди и хомологията ще става все по-малка.

При проведения хаплотипен анализ за оценка на възрастта на мутацията c.5263_5364insC (5382insC) е установено, че тя вероятно произхожда от Северна Европа, Русия или Дания и е на възраст между 1800 – 1500 години, което е между 61 и 72 поколения, всяко средно от по 25 години (95% CI 46-107; 40-89) (Name N et al, 2003). Оказва се, че нейната възраст сред източноевропейското еврейско семейство Ашкенази е около 400-500 години, 27 поколения, което води до предположението, че разпространението ѝ в тази етническа група е станало по-късно, вероятно от полската популация (Name N et al, 2003). Няма убедителни доказателства за това как мутацията се е разпространила сред европейските популации. В първите години на новата ера границите в северна Европа са зле дефинирани. Скандинавия обхваща рядко населените североизточни райони на днешна Норвегия, Дания, Швеция, Финландия и Исландия, а регионите, които днес са част от Русия и Украйна, са били населявани от скитски племена в продължение на няколко века (Name N et al, 2003). Около 600-та година скитските племена били завладени и оставили оцелелите славяни да се разпространят из цяла централна и източна Европа. Това е позволило на мутацията c.5263_5364insC (5382insC) бавно да се разпространи на запад и юг от останалата част на Европа, от руските равнини, заедно със славянската миграция и обяснява високата ѝ честота в много от източните популации (Name N et al, 2003).

Преобладаващата част от герминативните мутации и в двата гена са предимно редки мутации, уникални за всяко семейство с фамилна история. Примерите за редки мутации в различните популации са много. Например в холандската популация около 30% от *BRCA1* - свързания рак на гърдата се дължи на големи геномни пренареждания (Large Genomic Rearrangements - LGR) (Janavičius R et al, 2010). При тях има промяна на броя копия на един или повече екзони на *BRCA1* гена. Две от тях, делеция на 13 екзон и делеция на екзон 22 имат ефект на основателя (Janavičius R et al, 2010). В полската

популация 90% от откритите до този момент мутации са с.181T>G (С61G), с.5263_5364insC (5382insC) и с.4035delA (4154delA). Като друг пример за рядка мутация може да се посочи с.771_775delTCAAA (999del5) в *BRCA2*, уникална за Исландската популация (www.humgen.nl , L27). Тази мутация е установена при 64% от жените с диагностициран карцином на гърдата и с фамилна предистория за това заболяване (www.humgen.nl, L27).

При европейските представители на американската популация 36% от мутациите са малки инсерции или делеции, предизвикващи изместване на рамката на четене (frameshift), 14% са еднонуклеотидни замени, променящи кодона и съответно кодираната аминокиселина (missense) (Bougie1 O et al, 2011). Други 29% са еднонуклеотидни замени, променящи кодона за определена аминокиселина в терминаращ кодон, предизвикващ спиране на транслацията на иРНК и синтез на скъсен белтък (nonsense). Част от мутациите, установени в Европейските популации, са представени в **приложение 8**.

Изчислено е, че средният популационен риск при носителство на мутации в *BRCA1* до навършване на 70 годишна възраст е 65% (CI 44%-78%) за рак на гърдата и между 33 и 39% (CI 18-54%) за овариален карцином (Bougie1 O et al, 2011). Съответно за *BRCA2* оценката е: 45% (CI 31-56%) за карцином на гърдата и 11% (CI 2,4 - 19%) за овариален карцином (Bougie1 O et al, 2011). Редица изследвания показват по-нисък риск за развитие на рак на гърдата при носителството на мутации в *BRCA2* гена, в сравнение с носителството на мутации в *BRCA1* (Bougie1 O et al, 2011). Въпреки това, поради високата алелна хетерогенност в тези гени, действителният риск вероятно се различава от така определения. Направената оценка за риска от развитие на рак на гърдата при носителството на една от трите най-често срещани мутации в европейската популация - 5382insC и 185delAG в *BRCA1* гена или 6174delT в *BRCA2*, гена е показана на **таблица 1** (Balman J et al, 2010).

Носителите на мутация в *BRCA1* и *BRCA2* гените имат увеличен риск за развитие и на други злокачествени заболявания. При приблизително 30% от жените с рак на маточните тръби е установена *BRCA* мутация. В допълнение, унаследяването на мутации в *BRCA1* и *BRCA2* гените води до предразположение за развитието на карциноми на ендометриума, панкреаса и простатата при мъжете (Bougie1 O et al,2011).

Таблица 1. Оценка на риска за развитие на рак на гърдата при носителството на 5382insC и 185delAG в *BRCA1* гена и 6174delT в *BRCA2* гена (Antonίου AC et al, 2005)

Оценка на кумулативния риск (%) (95% CI) за развитието на рак на гърдата или яйчниците при носителството на 185delAG, 5382insC и 6174delT мутации						
Възраст (години)	185delAG		5382insC		6174delT	
	Карцином на гърдата	Карцином на яйчниците	Карцином на гърдата	Карцином на яйчниците	Карцином на гърдата	Карцином на яйчниците
40	10 (3-18)	3 (0 до 7)	14 (5-23)	2 (0 - 5)	7 (0- 14)	
50	27 (13-38)	11 (2-19)	46 (29-59)	17 (4-28)	8 (0 - 16)	2 (0 - 7)
60	47 (2 -62)	14 (2-24)	57 (35-72)	32 (8-50)	16 (1-28)	15 (1-28)
70	64 (34-80)	14 (2-24)	67 (36-83)	33 (8-50)	43 (14-62)	20 (2-35)

2.6.2.2. Фенотипна изява на рака на гърдата при носителство на мутации в *BRCA* гените

Има няколко клинични характеристики при рак на гърдата, свързани с мутации в *BRCA* гените, които го отличават от останалите подтипове на този вид карциноми (Groer P et al, 2011). Голям процент от *BRCA1*-асоцираните тумори са негативни по отношение експресията на ER, PR и HER2, сравнени със спорадичните тумори. За разлика от тях туморите, свързани с дефекти в *BRCA2*, са по-често естроген положителни, докато експресията на прогестеронови рецептор и HER2 не се различава от тази при спорадичните случаи. Хистологията на *BRCA1*-асоцираните тумори на гърдата се различава от хистологията, характерна за спорадичните карциноми (Sunil R et al, 1999; Groer P et al, 2011). В някои случаи те са с по-агресивна фенотипна изява. По-голяма част от *BRCA1*-свързаните тумори са инвазивни дуктални аденокарциноми (74%), често са зле диференцирани (G₃), с голям брой митози и висока степен на плеоморфизъм. Туморите са добре разграничени и показват по-висока степен на лимфоцитна инфилтрация и висока честота на лимфоваскуларна инфилтрация. Подобно на *BRCA1*-свързания рак на гърдата най-честият хистологичен тип при *BRCA2*-асоцираните тумори е инвазивният карцином (76%). Докладвана е и висока честота на тумори, отнасящи се към инвазивните лобуларни и тубуларни карциноми в сравнение със спорадичните (Prat A, 2010; Groer P et al, 2011). *BRCA2*-асоцираните тумори са с умерена или ниска диференциация, висока степен на ядрен плеоморфизъм и по-висок процент на митози в сравнение със спорадични тумори (Prat A, 2010).

Молекулното профилиране показва значителни разлики в експресионните профили на *BRCA1*- и *BRCA2*-асоцираните тумори на гърдата. *BRCA1*-асоцираният рак на гърдата се характеризира с ниска степен на експресия на ER α , PR и на *cyclin D1* (*CCND1*) (Prat A, 2010). Като цяло експресията на HER2 е по-ниска, в сравнение със спорадичните случаи. За разлика от HER2 се наблюдава свръхекспресия на EGFR, *cyclin E* и на клетъчния туморен маркер ALDH1. При около 30-70% от *BRCA1*-свързаните тумори се наблюдават и мутации в *TP53*, като се отчита, че последните са около 20% от спорадичните случаи. Освен това разпределението на мутации в *TP53* може да бъде повлияно от *BRCA1* и *BRCA2* гените. Експресионната оценка показва, че по-голяма част от *BRCA1*-асоцираните тумори са позитивни за CK5, CK6 и CK14, кавеолин, виментин, ламинин и р-кадхерин. Експресията на белтъци, свързани с апоптозата, като BAX, BCL2 и *BRCA1* е по-ниска, в сравнение със спорадичните тумори на гърдата (Prat A, 2010; Groer P et al, 2011).

Повечето *BRCA2*-свързани тумори показват различен имунофенотип от този при *BRCA1*-асоцираните тумори (Prat A, 2010). По имунофенотипна изява те са по-близко до спорадичните карциноми. *BRCA2*-асоцираните тумори са позитивни по отношение експресията на ER и PR и в много редки случаи свръхекспресират HER2. Освен това, според наскоро проведени проучвания, за тях е характерна по-висока експресия на FGF1 (растежен фибробластен фактор 1) и FGFR2 (рецептор за растежен фибробластен фактор 2) в сравнение с *BRCA1*-асоцираните тумори (Prat A, 2010; Groer P et al, 2011). При *BRCA2*-асоцираните тумори обикновено се наблюдава експресия на луминални цитокератини CK8 и CK18, *cyclin D1*, BAX, BCL2, р-кадхерин и виментин, но не и на

СК5/6 и СК14, кавеолин 1 и ALDH1. Това води до предположението, че BRCA2-асоциираните туморите са с различен произход и вероятно водят началото си от луминални клетки на гърдата, за разлика от BRCA1-свързания рак на гърдата, който произхожда от прогениторните клетки (Groep P et al, 2011).

2.7. Модели за предикция на мутации в *BRCA1* и *BRCA2* гените и оценка на риска за развитие на рак на гърдата

Критериите за търсене на вероятно носителство на мутациите в *BRCA1* и *BRCA2* гените се различават в различните страни, но като цяло са базирани на разпространението на мутациите и специфичните популационни характеристики (Balman J et al, 2010, www.ncbi.nlm.nih.gov, L28).

Общоприети са международните критерии за генетичен анализ на мутации в *BRCA* гените, утвърдени от Breast Cancer Linkage Consortium (BCLC), 1999 г. и National Comprehensive Cancer Network (NCCN), 2010 (www.humgen.nl, L27- www.nccn.org, L29). Критериите, използвани в настоящата дисертационна разработка са представени в **приложение 3**.

В някои страни се използват прогностични методи за оценка за вероятно носителство на мутация. В допълнение, отчитането на патологичните характеристики на рака на гърдата, като например медуларен карцином, тройно негативен карцином, ранно начало, под 50 години, се оценяват като ефективна стратегия за откриване на *BRCA* мутации (Balman J et al, 2010). Различните методи за скрининг, които се използват при различните мутационни проучвания, водят до различия в оценката на рисковите фактори при носителството на мутация в *BRCA* гените.

2.7.1. Модели за предикция на мутации в *BRCA1* и *BRCA2* гените

Групата на Easton и съавтори оценява риска за развитието на рак на гърдата при носителство на *BRCA* мутация до 80% (Easton DF et al, 2007). Тази оценка може да е много надценена и не може да се прилага при семейства с малко случаи на рак или при спорадичен рак на гърдата (**таблица 2**). В допълнение към тази широка оценка е установено, че има промени и вътре в семейството, което води до предположението, че точната оценка за риска за развитието на онкологични заболявания трудно може да се приложи за всички лица с определен вид мутация в *BRCA* гените (www.ncbi.nlm.nih.gov, L28; Antoniou AC et al, 2003), **приложение 2**.

До този момент са разработени множество модели за оценка на вероятното носителство на мутация в *BRCA1/2* гените при даден индивид. Всеки модел има уникални характеристики, определящи се от използваните методики, размера на извадката и специфичните особености на съответната популация, при която се използва. Моделите използват логистична регресия, оценка на генетичните рискове, „Bayesian analysis” и емпирични данни, като например множествени таблици (www.ncbi.nlm.nih.gov, L8).

Таблица 2. Оценка на риска за развитие на онкологично заболяване при наличието на *BRCA* мутация (www.ncbi.nlm.nih.gov, L8)

Вид злокачествено заболяване	Риск в общата популация	Мутационен риск	
		BRCA1	BRCA2
Рак на гърдата	12%	50-80%	40-70%
Втори първичен рак на гърдата	3.5% в рамките на пет години и след това до 11%	27% в рамките на 5 години	12% в рамките на 5 години и до 20-40% в рамките на 20 години
Овариален карцином	1-2%	24-40%	11-18%
Рак на гърдата при мъже	0.1%	1-2%	5-10%
Рак на простатата	15% при кавказката раса и 18% при афроамериканци	<30%	<35%
Рак на панкреаса	0.5%	1-3%	2-7%

Според ASCO (American Society of Clinical Oncology/ Американско дружество по клинична онкология) тези модели дават сравнително добра оценка при семейства с типична анамнеза за рак на гърдата и/или яйчниците (<http://www.asco.org>, L30). Повечето от тях, обаче, не включват други *BRCA*-свързани ракови заболявания, например рак простатата и рак панкреаса. Друг недостатък на програмите за предикция е, че интервенции, които намаляват риска на индивида да развие рак на гърдата или яйчниците, като например мастектомия и/или ооферектомия, могат да повлияят на способността на програмата да направи коректна оценка на вероятността за носителство на мутация в *BRCA* гените.

2.7.2. Молекулно-генетични тестове и интерпретация на получените резултати

Една примерна тестова стратегия за търсене на мутации в *BRCA1* и *BRCA2* гените би могла да има следния системен ход (www.ncbi.nlm.nih.gov, L8).

- *Таргетен мутационен анализ*. Включва изследване за носителство на популационно или етнически специфични мутации чрез директно секвениране. Добър пример в това отношение е изследването за носителство на мутации в двата гена при Източно-Европейското семейство Ашкенази (www.ncbi.nlm.nih.gov, L28). При тази етническа група са установени три мутации с ефект на основателя, с. 68_69delAG, с.5263_5264insC в *BRCA1* и с.5946delT в *BRCA2*, като всяка една от трите мутации се открива в 1 на 40 души (Janavičius R et al, 2010). Получените резултати от таргетния анализ 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. Мутацията отсъства, т.е. налице е отрицателен резултат, който не може да изключи възможността за наличие на мутация в други участъци на *BRCA1/2* гените

(www.ncbi.nlm.nih.gov, L28). 3. Резултатът е неубедителен, т.е. в участък, близо до мястото, където се очаква да бъде открита таргетната мутация, се открива друг вариант с неясен клиничен ефект. 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.

- *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). Получените резултати могат да бъдат интерпретирани по следния начин: 1. Не се открива мутация. 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). 2. Установява се мутация с патогенен характер. 3. Резултатът е неубедителен. Секвенирането може да установи ДНК варианти с неясно клинично значение (VUS). В такъв случай се препоръчва в семейството да бъдат изследвани членове с поставена диагноза, за да се установи дали откритият вариант косегрегира със заболяването.

- *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 интерпретирани по следния начин: 1. 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. 2. 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).

- *Анализ с мултигенни панели, свързани с предразположението за развитие на рак на гърдата и яйчниците.* Разчитането на гените, респективно на 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 (Next generation sequencing - 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).

Някои от панелите, които се използват в клиничната практика за изследване на генетичната предразположеност при рака на гърдата и яйчниците са изброени по-долу:

Breast Cancer (Gendia), включва *BRCA1* и *BRCA2* гените, в комбинация с още 15 - 30 онкогени и тумор супресорни гени, между които *BARD1*, *BRIP1*, *ATM*, *CDH1*, *HEK2*, *ERCC4*, *PALB2*, *PTEN*, *RAD51C*, *RAD51D*, *STK11*, *TP53* и *XRCC2* (www.gendia.net, L31).

BreastNext (AmbryGenetics) представлява панел от 16 гени - *ATM*, *BARD1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *CDH1*, *CHEK2*, *MRE11A*, *MUTYH*, *NBN*, *PALB2*, *PTEN*, *RAD50*, *RAD51C*, *STK11* and *TP53* (www.ambrygen.com, L32).

BRACanalysis (Myriad Genetics) *BRCA1&BRCA2* - включва мутационен анализ на *BRCA1* *BRCA2* гените със секвениране от ново поколение (www.myriad.com, L33).

AmpliSeq® BRCA1/2 Community panel (Life Technologies) също е разработен за скрининг на мутации в *BRCA1/2* гените с помощта на секвенатор от ново поколение Ion Torrent PGM (Life Technologies) <https://www.lifetechnologies.com>, L34.

TruSight Cancer (Illumina) е панел от 94 гена и 284 SNPs, разработен от професор Nazneen Rahman и неговия екип от Institute of Cancer Research (ICR), Лондон, за изследване на фамилните ракови заболявания (<http://www.illumina.com>, L35). Гените, включени в панела са основно онкогени и тумор супресорни, участващи в ДНК поправката, транскрипционни фактори и такива, имащи киназна активност. От белтъчните фактори, формиращи комплекс с *BRCA1* при поправката на двойноверижните скъсвания в ДНК чрез хомоложна рекомбинация, в *TruSight Cancer* панела са включени гените, кодиращи *PALB2*, *ATM*, *CHEK2*, *BRCA2*, *RAD51*, *MLH1*, *MSH6*, *BRIP1*, *NBN* (член на *MRE11/RAD50* ДНК репарация комплекс), *NBS1* (белтък, чиято активност се регулира на *ATM*) и *RAD50* (<http://www.illumina.com>, L35).

2.7.3. Оценка на варианти с неясно клинично значение (VUS- variants of unknown clinical significance)

Скринингът за мутации в *BRCA1* и *BRCA2* гените се превръща все повече във важна част от клиничната практика. Класификацията на редките „missense” варианти с неясно клинично значение или на такива, които не водят до синтеза на скъсен белтъчен продукт е проблематично, т.к. е трудно да се предскаже дали те имат патогенен ефект, т.е. дали променят функцията на белтъка до такава степен, че да се предизвика развитието на рак (Easton DF et al, 2007; Ricgarsd CS et al, 2008). При определяне на клиничния ефект на VUS могат да бъдат използвани няколко независими метода за тяхната оценка:

- *Едновременно възникване на транс варианти в близост до патогенната мутация.* В този случай трябва да се има предвид, че при *BRCA1* комбинирани хетерозоготи по две патогенни мутации са изключително редки и се срещат с честота 1 на 10000. Също така е доказано, че хомозиготи или хетерозиготи с две патогенни мутации са летални по време на ембрионалното развитие. При *BRCA2* тези варианти са с честота 1 на 1000 и комбинацията от два патогенни хетерозиготни вариантът е наблюдаван при анемията на Фанкони (Ricgarsd CS et al, 2008).

- *Подробен анализ за личната и фамилната анамнеза за рак на гърдата.* Друг подход е разработването на вероятностен модел въз основа на семейната история. Методът се основава на разликата в личната и фамилната история и позволява предсказването на истински вредни патогенни мутации в *BRCA1/2* гените. Обосновката на метода е, че разпространението на мутацията силно зависи от няколко ключови фактора, например статус на заболяването при пробанда, възраст на диагностициране и брой и възраст на роднини с рак на гърдата и/или яйчниците. Комбинацията от всички характеристики би могла да предскаже вероятността от носителство на „missense” вариант с патогенен характер (Ricgarsd CS et al, 2008).

- *Косегрегация на варианта с болестта в изследваните семейства.* Косегрегацията е друг вероятностен метод за определяне на патогенността на даден вариант, също базиращ се на данни от родословието. Оценката може да бъде направена по следната схема: използва се опростен модел на *BRCA1/2* засягане, със седем класа: (1) незасегнати индивиди, жени на възраст под 20 години и мъже; (2) незасегнати индивиди, жени на възраст между 21 и 49 години; (3) незасегнати индивиди, жени над 50 година възраст; (4) носители на *BRCA* мутация на възраст под 50 години; (5) носители на *BRCA* мутация на възраст над 50 години; (6) носители на *BRCA* мутация на възраст под 50 години, но с овариален карцином; и (7) носители на *BRCA* мутация на възраст над 50 години, но с овариален карцином. Тези родословия след това се анализират чрез използване на модификация на LINKAGE package, според препоръките на Thompson, за да се получи необходимата LR (Ricgarsd CS et al, 2008)

2.7.4. Категории и определяне на получените резултати

Все по-често в молекулярно генетичните лаборатории се установяват нови варианти в гените, свързани с предположение към рак. Сигурността на интерпретацията на получените резултати варира от варианти с почти сигурен клиничен ефект до такива без клинично значение. Поради тази причина през 2007 година указанията на ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics) препоръчват следното тълкуване на получените резултати (Ricgarsd CS et al, 2008).

- *Варианти, които вече са докладвани и са с доказан ефект за развитието на заболяването.* Установеният вариант се проучва в литературните източници и база данните за откритите при човека мутации и в специализираните бази данни за определени гени и заболявания (Ricgarsd CS et al, 2008).

- *Варианти, които не са докладвани по-рано в литературните и електронните източници.* Установеният вариант не е докладван, но е от тип, който се очаква да доведе до заболяване. В тази група влизат варианти, които могат да доведат до изместване на рамката на четене, като например появата на стоп кодон, „missense” мутация, трансформираща нормален в стоп кодон, мутация в инициращият кодон (ATG), промяна на последователността в „splice” място, особена ако тази промяна е от типа AG/GT, делеции или инсерции на един или повече нуклеотиди (Ricgarsd CS et al, 2008).

- *Варианти, които не са докладвани в литературните и електронните източници, но са с неясен клиничен ефект.* Примерите включват комбинации, които са локализирани на „splice” местата, най-вероятно засягащи транскрипцията, „missense” мутации, IFD (In-Frame Deletions – делеции не променящи рамката на четене) мутации, при които е налице делеция или инсерцията в рамките на кодона. В този случай трябва да се има предвид дали мутацията е в рамките на консервативен регион, който е запазен в еволюцията, т.к. в този случай е по-вероятно да бъде причинител на заболяването, отколкото от „missense” мутация, която води до консервативна замяна или променя аминокиселина, в участък, който не е еволюционно запазен. Последващи функционални и структурни анализи на белтъка биха могли да изяснят дали установената мутация е с патологичен или неутрален ефект (Ricgarsd CS et al, 2008).

- *Варианти, които не са докладвани в литературните и електронните източници, но вероятно не са причинител на заболяването.* Примерите включват варианти в секвенцията, които не водят до промяна на аминокиселината, разположени са в интронни области, далеч от границите интрон/екзон и с малка вероятност могат да засегнат „splice” място.

- *Варианти, които вече са докладвани и са с доказан неутрален ефект за развитието на заболяването.* Установеният вариант се проучва в литературните източници и база данните за откритите при човека мутации (Ricgarsd CS et al, 2008).

-*Варианти, които не е известно, но се очаква да бъдат причинител на заболяването.* В този случай трябва да се вземе предвид дали има значителни доказателства в литературата, (функционални анализи или множество публикувани резултати) за ефекта на тези варианти. В тази категория попадат редки алели, кодиращи „мълчалив полиморфизъм”, например варианти от типа Ala45Ala, Leu769Leu, за които е докладвано, че са свързани със заболяването. Редките алела на тази позиция биха могли да предразполагат за развитието на заболяване, т.к. могат да доведат до промяна на експресията. Трябва да се уточни, че това са мутации за които съществуват доказателства за техния ефект от предходни популационни проучвания, но медицински решения не могат да бъдат направени въз основа на тях. Степента, до която такъв тип варианти се считат за причинител на заболяване би могла да бъде повлияна от редица други параметри, например клинична картина, риск за развитие на заболяване при отделния индивид, фамилна анамнеза, фактори на околната среда, както и позицията на заместване на аминокиселината, дали е еволюционно консервативен и др. Поради тази причина тези варианти трябва да се тълкуват внимателно. Примерен вариант за определяне на клиничното значение на VUS е представен на *приложение 3* (Richards CS et al, 2008).

III. Цел и задачи

3.1. Цел

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

3.2. Задачи

3.2.1 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 молекулярна медицина, МУ – София;
- Създаване на плазмена биобанка от пациенти и контроли към Центъра по молекулярна медицина, МУ – София
- Създаване на клинична информационна база данни за пациенти с рак на гърдата към Центъра по молекулярна медицина, МУ – София.

3.2.2. 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 на *BRCA1* гена разделена на 33 участъка;
- Оптимизиране на условията на амплификация на кодиращата последователност на *BRCA2* гена разделена на 48 участъка;
- 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.

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

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

Цел и задачи

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

-Биоинформатичен анализ на получените резултати.

3.2.4. 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.

3.2.5. Секвенционен анализ на най-често докладваните по литературни данни мутации в гени с междинна пенетрантност в *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 на *PALB2* и *BRIP1* гените;

- Генетичен анализ за наличието на мутациите с.509_510delGA и с.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.

3.2.6. 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.

3.2.7. Анализ и статистическа обработка на получените резултати

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

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

Цел и задачи

- Анализ на получените от MLPA анализа резултати с софтуерни програми GeneMapper (Applied Biosystems) и CoffalyerNet (MRC-Holland).
- Оценка на клиничния ефект на вариантите с неясно клинично значение с SIFT, PolyPhen2 и PROVEAN програми за изчисление на predispoziciyata.
- Статистическа обработка на получените резултати с VassarStat и Plink v1.07

IV. Материали и методи

4.1. Клиничен материал

4.1.1. Подбор на пациентите с фамилен рак на гърдата

В настоящето изследване бяха включени 200 пациентки с фамилен рак на гърдата, стриктно отговарящи на установените международни критерии за генетичен анализ на мутации в *BRCA* гените, утвърдени от Breast Cancer Linkage Consortium (BCLC), 1999 и National Comprehensive Cancer Network (NCCN), 2010 (www.ncbi.nlm.nih.gov, L28; www.nccn.org, L29).

Breast Cancer Linkage Consortium (BCLC) критерии, базиращи се на фамилната анамнеза на онкологични заболявания (www.ncbi.nlm.nih.gov, L28):

- 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 (www.nccn.org, L29):

- 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 (RPC); два отделни добре разграничени първични тумора в едната гърда;

Материали и методи

- 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 (*приложение 4*).

4.1.2. Подбор на клинично здрави контроли

В настоящето изследване бяха включени 240 здрави контроли, отговарящи на следните критерии:

- 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 етническа група с пациентите;

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;

Материали и методи

- Клиника по онкология МБАЛ „Надежда” с насочващ екип: проф. д-р К. Тимчева, д-р С. Вълев и д-р М. Таушанова;

- II хирургична клиника „УМБАЛ „Царица Йоана – ИСУЛ” с насочващ лекар д-р Т. Седлоев;

- Клиника по обща и чернодробно-панкреатична хирургия, УМБАЛ „Александровска“ с насочващ лекар д-р М. Василева.

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

4.2. Преданалитична обработка на биологичния материал

Необходимият биологичен материал, за целите на генетичния анализ беше високомолекулна ДНК, изолирана от периферна венозна кръв. Реактивите, използвани при изолирането на ДНК са представени на **таблица 3**.

4.2.1. Изолиране на високомолекулна ДНК от кръв.

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

Изолиране на високомолекулна ДНК по солевия метод на Miller (Miller SA et al, 1988). Най-широко приложение в практиката намира солевият метод за изолиране на ДНК от незамразена кръв, при което се работи с наситен разтвор на NaCl, за преципитация на белтъците. При този метод на изолиране е необходимо кръвта да бъде с обем между 3 и 10 ml, да не е съсирена и да е прясна. За целта, кръвта се взема в епруветка с Na₂EDTA (C₁₀H₁₆N₂O₂), като антикоагулант (Miller SA et al, 1988). Изолирането трябва да започне не по-късно от 36 часа от момента на вземането ѝ. До тогава се съхранява в хладилник на 4°C. Техниката на изолиране се състои в следните етапи:

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

Материали и методи

- *Разграждане на белтъците и РНК в лизатите.* Към получената утайка се добавят: нуклеолизиращ буфер (SE буфер), 35-40 µl протеиназа К и 400 µl 10% SDS (NaC₁₂H₂₅SO₄). Разбърква се и се оставя на 37°C за 12 часа или на 55° C за 5 часа. При добър лизис разтворът се избистря и не опалесцира (Miller SA et al, 1988).

- *Преципитация на изчистената ДНК.* След протеолизата се добавят 2 ml 6 M NaCl, разбърква се на Vortex за около 15 секунди и се центрофугира за 15 минути на 3000 rpm на стайна температура. ДНК остава в супернатанта, а примесите се утаяват. Супернатантата с ДНК се прехвърля в нова епруветка и се прибавят два обема студен абсолютен алкохол. ДНК видимо преципитира. Преципитиралата ДНК се изважда с пастърова пипета и след промиване с 80% етанол се оставя да изсъхне на въздуха. Изсушената ДНК се разтваря в TE буфер с обем между 300 µl и 1500 µl. Епруветката се запечатва много добре, надписва се и се оставя на клатачна машина за една нощ, за да се разтвори изолираната ДНК. Ако екстрахираната ДНК ще бъде съхранявана в ДНК банка, се прехвърля в епруветка с 96% етанол. Очакваният добив от 10 ml кръв е 300-800 ng/ml ДНК (Miller SA et al, 1988).

Таблица 3. Реактиви, използвани при изолиране на ДНК

Използвани реактиви	Състав	Количество	dH ₂ O
Еритроцитлизиращ буфер pH 7.4	155 mM NH ₄ Cl	82,9 g	до 1000 ml
	10 mM KHCO ₃	10 g	
	0,1 mM Na ₂ EDTA	0.34 g	
Нуклеолизиращ буфер pH 8.0*	75 mM NaCl	4,39 g	до 1000 ml
	25 mM Na ₂ EDTA	8.41 g	
Преситен NaCl	6 M NaCl	360 g	до 1000 ml
10% SDS	SDS	10 g	до 100 ml
Протеиназа К	10 mg/ml	0.1 g	1 ml
100% етилов алкохол	-	-	-
80% етилов алкохол	абсолютен алкохол	800 ml	200 ml
Стерилен TE буфер pH 7.4*	10 mM Tris 0.1	1.21 g	до 1000 ml
	125 mM EDTA	0.04 g	
kit за изолиране на ДНК chemagenic DNA Blood 7k V070601.che			
kit за изолиране на ДНК chemagenicDNA Blood 10k V070601.che			

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

Ако кръвта е с малък обем, стара, съхранявана при отрицателни температури или съсирена, се прави допълнително пречистване. Към разтвора с ДНК се добавя равен обем фенол:хлороформ:изоамилов алкохол (25:25:1) и се разбърква на Vortex. Центрофугира се за 15 минути/10000 rpm на 22°C. Горният слой внимателно се прехвърля в нова епруветка. Добавя се 1/10 (1 част натриев ацетат/10 части проба) 3 M натриев ацетат с pH 5.9 и 2 обема леден абсолютен алкохол. Вместо натриев ацетат, може да се добави амониев ацетат до крайна концентрация 2.5 M и 2 обема леден

абсолютен алкохол или 2 обема изопропилов алкохол. Остава се между 2 и 3 часа или цяла нощ на минус 20°C, след което се центрофугира за 15 минути/3000 rpm на 22°C. Промива се с 200 µl 80% етанол и се оставя да изсъхне.

Екстрахираната ДНК се разтваря в ТЕ буфер или се прехвърля в 96% етанол за съхранение в ДНК банка. Недостатък на фенолната екстракция е нейната токсичност и трудоемкост.

Изолиране на високомолекулна ДНК чрез CHEMAGEN® Magnetic Separation Station (ParkinElmer) (www.chemagen.com, L36). Изолирането на ДНК от кръв с Chemagen полуавтоматичната сепарираща система е базирано на използването на магнитни частици в присъствието на електромагнитно поле (**фигура 15**). Техниката на изолирането се състои в следните етапи (www.chemagen.com, L36):

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

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



Фигура 15. Chemagen® magnetic separation station (ParkinElmer) система за изолиране на ДНК (www.chemagen.com, L36)

- *Активиране на магнитното поле и миене на ДНК пробите.* В присъствието на активно електромагнитно поле частиците заедно с ДНК се привличат към металните накрайници (типове) на магнитната глава. Така захванати за металните накрайници

пробите биват пренесени в миеш буфер. Следва деактивиране на електромагнитното поле и ротация на крайниците с цел максимално хомогенизиране на пробите, ново спиране на ротацията, активиране на магнитното поле и прехвърляне на пробите в следващия миеш буфер. Активирането на магнитното поле и миенето се повтаря общо пет пъти в различни по състав миеш буфери (www.chemagen.com, L36).

- *Елуиране на ДНК*. Елуирацията буфер деактивира взаимодействието между магнитните частици и ДНК. Елуирацията буфер съдържа 10 mM Трис–HCl с pH=8.0, аналогичен на TE буфер. Вместо елуиращ буфер може да се използва и dH₂O, но крайния добив ще бъде по-нисък.

4.2.2. 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.

4.3. Генетични изследвания

4.3.1. Намножаване на фрагменти ДНК чрез полимеразна верижна реакция (PCR – Polymerase Chain Reaction)

Полимеразната верижната реакция е метод, разработен от Kary Mullis през 1985 година (Saik RK et al, 1987). Представява *in vitro* ензимно намножаване (амплифициране) на определени нуклеотидни последователности в 5' → 3' посока. ДНК фрагментът, който ще се намножава е ограничен в двата си края от къси нуклеотиди – праймери, комплементарни на 3' краищата на ДНК матрицата.

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

Денатурация – термична денатурация, при температура между 90-97°C за пълно разделяне на двойноверижната ДНК на едновержни ДНК матрици за амплификация.

Хибридизация – хибридизация между праймерите и комплементарните едновержни участъци от матричната ДНК. Температурата на хибридизацията е строго специфична и се изчислява в зависимост от базовия състав и дължината на праймерите по следната формула:

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

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

Материали и методи

За всяка PCR реакция са необходими:

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

Тaq полимеразата, осъществява процеса на размножаване на определена ДНК последователност. Оптималната температура за синтез на Таq полимеразата е 72°C, а необходимата концентрация на ензима за амплификационната реакция е 1 до 5U.

Праймери, синтетични олигонуклеотиди с дължина около 18 - 24 bp, комплементарни на ограничаващите размножаваната последователност участъци;

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

10x реакционен буфер, осигурява рН на средата от 8.3 до 9.0 и необходимите йони за работа на полимеразата. Съставен е от 10-50 mM Tris- HCl с рН 8.3 – 9.0; до 50 mM KCl, в някои случаи може съдържа от 0.5 до 5.0 mM MgCl₂. Използваните при PCR реакцията реактиви и условия са представени в **таблицы 4 и 5**

Таблица 4. PCR реактиви, използвани в хода на изследването

PCR реактиви при използване на Таq полимеразата (Invitrogen)		PCR реактиви при използване на Таq полимеразата (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 nmol)	0,2 µl	Праймер F (20 nmol)	0,2 µl
Праймер R (20 nmol)	0,2 µl	Праймер R (20 nmol)	0,2 µl
Таq ДНК полимеразата (500U/µl)	0,05 µl	Таq ДНК полимеразата (500U/µl)	0,04 µl
dH ₂ O	5,45 µl	dH ₂ O	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

Таблица 5. Условия на PCR реакцията

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

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

4.3.2. Качествен контрол на PCR реакцията

Качественият контрол се осъществява, като се залагат положителна и отрицателна контрола. Като положителна контрола за всяка PCR реакция се използва ДНК, за която е известно, че се амплифицира за интересувания ни участък. Липсата на продукт в положителната контрола показва, че амплификационната реакция не е протекла. Като отрицателна контрола се залага проба с всички компоненти на реакцията, с изключение на матрична ДНК, която се замества с dH₂O. Липсата на продукт в отрицателната контрола доказва, че реакционната смес не е замърсена с чужда ДНК матрица.

4.3.3. Хоризонтална агарозна електрофореза

Качеството на PCR продуктите се оценява на 2% хоризонтална агарозна електрофореза. Идентифицирането на фрагментите се извършва спрямо подходящ познат молекулен маркер с известна концентрация. Нанесените в агарозния гел ДНК проби се разделят в електрично поле. При слабо алкално рН, фрагментите са заредени отрицателно и се предвижват към положителния полюс, анода. Електрофоретичната подвижност на ДНК фрагментите се влияе силно от състава и йонната сила на използвания буфер. При ниска концентрация на йоните, електричното напрежение е минимално и ДНК фрагментите се придвижват по-бавно. За анализ и разделяне на PCR продукти, най-често се използва трис боратен буфер (ТВЕ). Фрагментите се визуализират с помощта на UV трансилюминатор при 315 nm. Резултатите се документират чрез фотодокументацинна система. Реактивите, използвани при агарозната електрофореза са представени в **таблица 6**.

Таблица 6. Използвани при агарозната електрофореза реактиви

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

4.3.4. Директно секвениране

Секвенирането на PCR продуктите по Сангер е референтен метод за директен ДНК анализ. При него, определянето на нуклеотидната последователност на ДНК фрагмент става с помощта на автоматични секвенатори. Методът се основава на свойството на дидезоксирибонуклеотидите (ddNTP) да прекъсват синтеза на ДНК на мястото на включването им. По този начин те маркират позицията на определена нуклеотидна база. При използването на ddNTP, комбинирано с PCR амплификация, се образуват голям брой фрагменти, които се анализират чрез електрофоретично разделяне. Характерно е, че при ddNTP в трета позиция на рибозата липсва хидроксилната група, което не позволява ДНК полимеразата да продължи синтезата на ДНК от мястото на тяхното включване. Получават се много различни по дължина PCR продукти, всеки завършващ с ddNTP. Получените PCR продукти се разделят чрез капиларна електрофореза и се визуализират. Разделянето от старта до мястото, на което се фиксира терминаторът с дадено ddNTP, определя мястото на съответния нуклеотид в ДНК секвенцията. Този метод има следните етапи:

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. За да се премине към секвениране, получените продукти трябва да са чисти, без неспецифични допълнителни продукти.

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. Екзонуклеазата разгражда неизползваните едноверижни ДНК фрагменти и праймери, получени по време на PCR реакцията. Алкалната фосфатаза хидролизира излишъка от дезоксинуклеотиди. Пречистването с ExoSAP се извършва чрез смесването му в съотношение 1:1 с дейониизирана вода (0,4µl ExoSap + 0,4 µl dH₂O) и директното му добавяне към PCR продукта. Използваните при пречистването реактиви и условия са представени на **таблица 7**.

Таблица 7. Условия за пречистване на PCR продуктите посредством ExoSap

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

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

Материали и методи

един от четирите дидезоксинуклеотиди – ddG, ddA, ddT, ddC е свързано различно флуоресцентно багрило. Използваната за секвенирането реакция съдържа Big Dye реакционна смес, пречистен PCR продукт и един от използваните при амплификацията праймери (*таблица 11*). Секвенционната реакция включва денатурация, хибридизация и елонгация. Използваните при секвенционната реакция реактиви са представени на *таблица 8*

Таблица 8. Условия на секвенционната реакция

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

Преутаяване на продукта. Прави се с цел отстраняване на несвързаните нуклеотиди. В зависимост от броя проби, преутаяването може да се направи в епруветки или на плака. 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 формаид.

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

4.3.5. Секвениране от второ поколение посредством Ion Torrent PGM (Personal Genome Machine)

Към днешна дата има множество молекулярно-генетични тестове за откриване на мутации в *BRCA* гените (Grada A et al, 2013; Karl V et al, 2009). При скрининга за мутации на *BRCA* гените се използват методи, целящи да установят промени с патогенен характер в кодиращата последователност, като например измествания в рамката на четене, водещи до синтеза на скъсен белтъчен продукт или „missence“

мутации в домени с важно функционално значение. NGS технологиите значително промениха мащаба, ефективността и времето на секвенирането и доведоха до формирането на нова дефиниция за обхвата на това какво може да се изследва от практическа и клинична гледна точка.

Най-общо технологиите на секвениране от ново поколение споделят възможността да се секвенират масово и паралелно милиони ДНК матрици. Секвенирането от ново поколение при използването на платформата PGM на Life Technologies притежава множество предимства. Едно от тези предимства 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). Това е причината секвенирането с тази платформа драстично да намалява времето за получаване на данни за голям брой проби. Personal Genome Machine (PGM) е първата по рода си платформа за секвениране от ново поколение, 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). За разлика от другите платформи базирани на пиросеквениране, при които се измерва светлината отделена при хемилуминисцентни реагенти, при Ion Torrent директно се измерват освободените протони (H^+) от реакцията. Когато нуклеотид се включи в ДНК веригата, водородните йони (протони) се освобождават. Зарядът от тези протони променя рН на разтвора, разпознава се от сензора за йони и след това директно се превръща от химически сигнал в цифров формат (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).

Този метод има следните етапи:

А. Конструирание на ДНК библиотека имаща следният системен ход:

Оценка на качеството на изходния ДНК материал. Като изходен генетичен материал се използва ДНК изолирана от периферна венозна кръв. Преди началото на конструирането на библиотеката от фрагментите на кодиращите последователности на *BRCA1* и *BRCA2* гените на изходния материал се прави качествен и количествен анализ с помощта на 0.8% агарозна електрофореза (виж точка 4.2.2) и последващо измерване на ДНК концентрацията на спектрофотометър NanoDrop1000.

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

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

Измерване на концентрацията на пуловете посредством Qubit флуориметър.

Фрагментиране и пречистване на пуловете с дългите ампликони. Фрагментирането на ампликоните е първата стъпка в изграждането на библиотеката. Има две възможности за фрагментиране на ДНК (ампликоните) до еднакъв размер, Ion Shear™ Plus Reagents и BioRuptor Sonication System за накъсване на ампликоните с размери между 200 и 400 bp и след това добавяне на адапторните последователности. Ion Shear™ Plus Reagents е ензимен метод, подходящ за конструиране на 100, 200 и 300 bp библиотеки, към които непосредствено след това могат да бъдат добавени адапторните последователности. При фрагментирането на ампликоните бяха използвани следните реагенти, показани на **таблица 9**.

Таблица 9. Използвани при фрагментирането на пуловете реагенти

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

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

За максилна производителност на методиката е необходимо фрагментите да бъдат пречистени с AGENCOURT® AMPURE® XP на Beckman Coulter Company с цел отстраняване на замърсители. AGENCOURT® AMPURE® XP е кит за пречистване на ампликони посредством магнитни частици (www.beckmancoulter.com, L40).

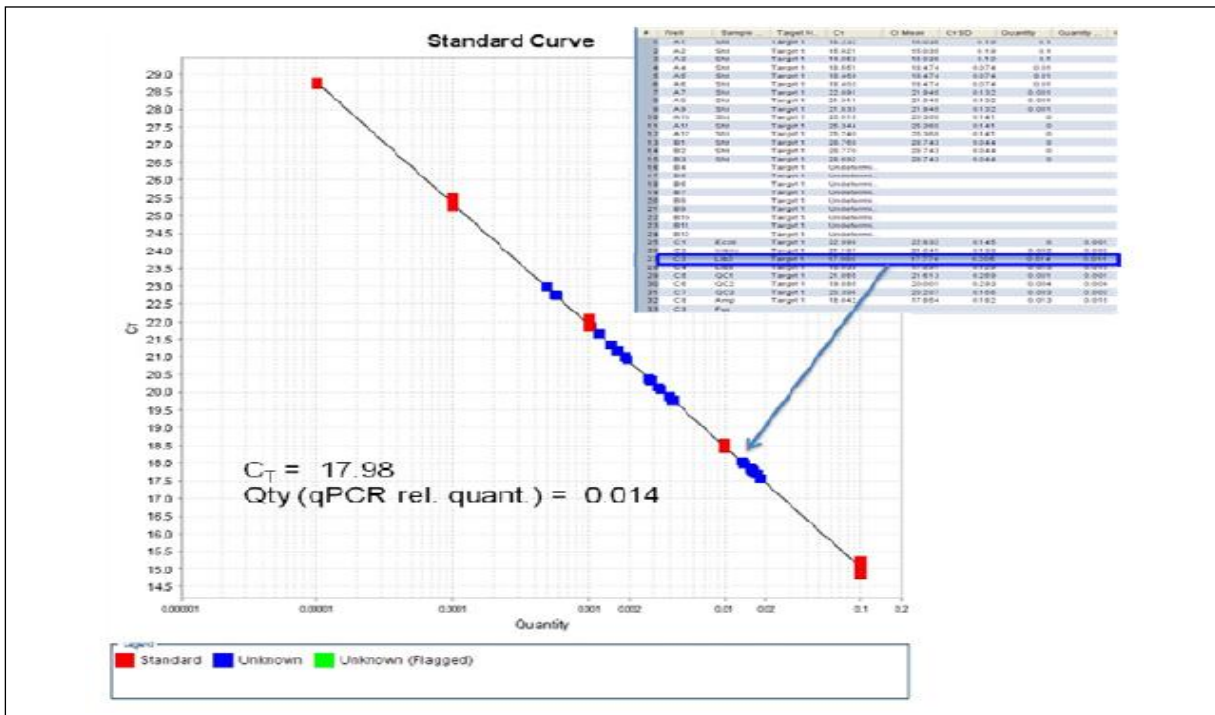
- *Определяне на размера на фрагментите чрез Bioanalyzer High Sensitivity Kit.* Успехът на NGS силно зависи от качеството на библиотеката. Определянето на размера на ДНК фрагментите може да бъде направено чрез електрофореза с агарозен гел, Chip-базирана електрофореза и капилярна електрофореза (www.arboretum.harvard.edu, L41). При Agilent 2100 Bioanalyzer системата се използва Chip-базирана електрофореза за осъразмеряване и количествено определяне на ДНК фрагментите при подготовката на NGS библиотеките.

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

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

Количествено определяне и амплификация на библиотеката. Необходимо е за да се определи дали библиотеката е с необходимата концентрация. Библиотеки с концентрация под 100 ng е необходимо да бъдат допълнително амплифицирани. Количествената оценка на неамплифицираните проби беше направена с помощта на qPCR в реално време с помощта на Ion Library Quantitation Kit. Този метод позволява в реално време да се определи разреждането на библиотеката, така, че да се получи пул с концентрация ~ 26 pM.

Като резултат се получава стандартна крива, която софтуерът на QPCR изчислява на базата на относителното количество разреждана библиотека сравнена с неразредената контролна библиотека (фигура 16).



Фигура 16. Стандартна крива за количествена оценка на библиотеката получена чрез QPCR

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

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

например при разреждане 20 000 пъти:

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

Измерване на концентрацията на библиотеките след амплификацията с Bioanalyzer

Б. Емулсионен PCR (emPCR).

Емулсионният PCR е ефективен при амплификацията на геномни библиотеки, кДНК, къси фрагменти, както и фрагменти, между които могат да се образуват комплекси (да протекат рекомбинантни събития между фрагментите и хомоложни региони в ДНК). Емулсиите са двуфазни системи, състоящи се от две несмесващи се фази, едната от които служи като среда за дисперсия в която капчиците се диспергират. Съществуват две основни типа емулсии – вода с масло или масло с вода (Shao K et al, 2011; Sergeant M et al, 2012). При emPCR формата е PCR в Raindance масло, при която маслото служи като дисперсна среда, а PCR е дисперсна фаза. При PGM, NGS платформите към emPCR са добавени частици хидрогел покрити с праймери, комплементарни на адапторите, които са лигирани по време на конструиране на библиотеката (Shao K et al, 2011; Sergeant M et al, 2012). Частиците хидрогел съдържат хиляди копия на една ДНК молекула, ISP (Ion Sphere particles) с размер на фрагментите в библиотеката до 200 bp. При PGM на Ion Torrent платформата emPCR се осъществява с помощта на Ion One Touch системата. Ion One Touch е автоматизирана система за генериране на ISP за полупроводниково секвениране от второ поколение. За постигане на оптимален резултат от 10 до 30% ISP е необходимо библиотеката да бъде разрежена в оказаната по-горе концентрация.

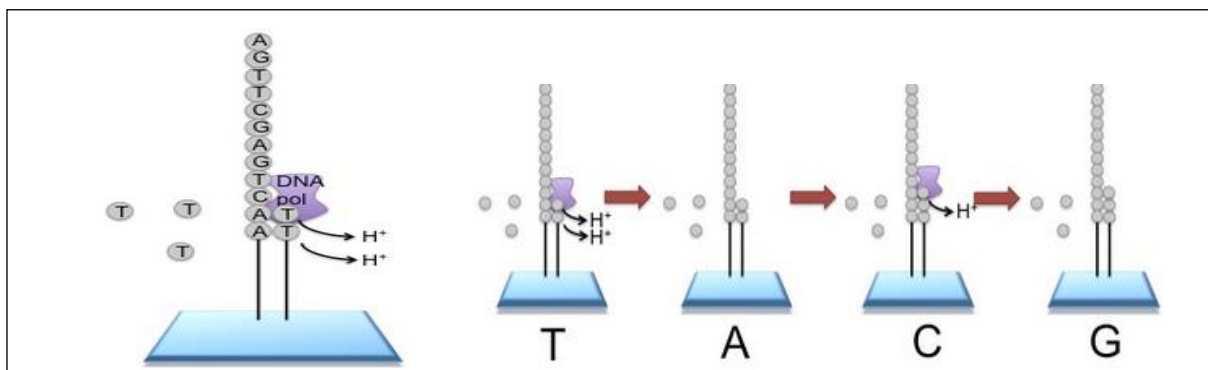
Обогатяване на ISP (Ion Sphere particles). Обогащването се осъществява с помощта на свързани със стрептавидин Dynabeads[®]. Обогащването на ISP със стрептавидин свързани Dynabeads осигурява голяма площ, по-голям капацитет и по-бавна скорост на утаяване по време на инкубация.

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

В. Секвениране

При Ion Torrent секвенирането, за разлика от други платформи за новогенерационно секвениране, като Illumina, не се използват оптични сигнали. Вместо това тук се детектират освободените от ДНК полимеразата H^+ йони. Както и при другите NGS платформи входящата ДНК или РНК е фрагментирана до около 200 bp. След емулсионният PCR всяка капчица попада в отделна ямка на чипа от където се освобождават H^+ йони. Промените в рН позволяват да се регистрират базите и да се добавят към последователността която се прочита (*фигура 17*).

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



Фигура 17. Принцип на NGS секвениране с Ion PGM

4.3. 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), с дължина между 130 и 500, които хибридизират в непосредствена близост до таргетната последователност и по време на PCR реакцията всички лигирани последователности се амплифицират посредством една двойка праймери. Двете сонди са подбрани така, че да хибридизират с прицелната геномна секвенция в близост една до друга. Веднъж хибридизирани, те могат да бъдат последователно лигирани и амплифицирани чрез PCR. Нехибридизиралите проби не трябва да бъдат отстранявани, тъй като те не могат да бъдат лигирани и намножени. При използване на голям брой проби, чиито амплификационни продукти са с различна дължина, те могат да бъдат амплифицирани в една единствена реакция и подложени на анализ след разделяне на капилярна електрофореза (www.mlpa.com, L42). PCR праймерите са флуоресцентно белязани, което позволява визуализацията и количествения анализ на разделените фрагменти. Освен проби за съответните екзони на анализирани гени, MLPA китовете включват и референтни проби, съдържащи сонди за други участъци от генома. За референтните проби стандартното отклонение за всяка сонда трябва да бъде < 0.10.

При количествения анализ за наличие на делеции/дупликации на гените се извършва сравнение между площта на пиковете, представляващи отделните екзони, тази на съседните референтни проби, както и площта на пиковете на референтни контроли, които са подложени на MLPA анализ и електрофоретично разделяне при еднакви условия, успоредно със съответната проба. 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. Референтните контроли трябва да са разпределени на случаен принцип сред останалите проби и трябва да отговарят на следните условия: да не са мутантни, да са от изолирани от здрави индивиди - от същия биологичен материал, от който е

изолирана и пробата (в случая ДНК от кръв) и да бъдат с качество и количество, максимално близко до изследваните проби. Примерно разпределение на референтните проби е представено на **фигура 18**.

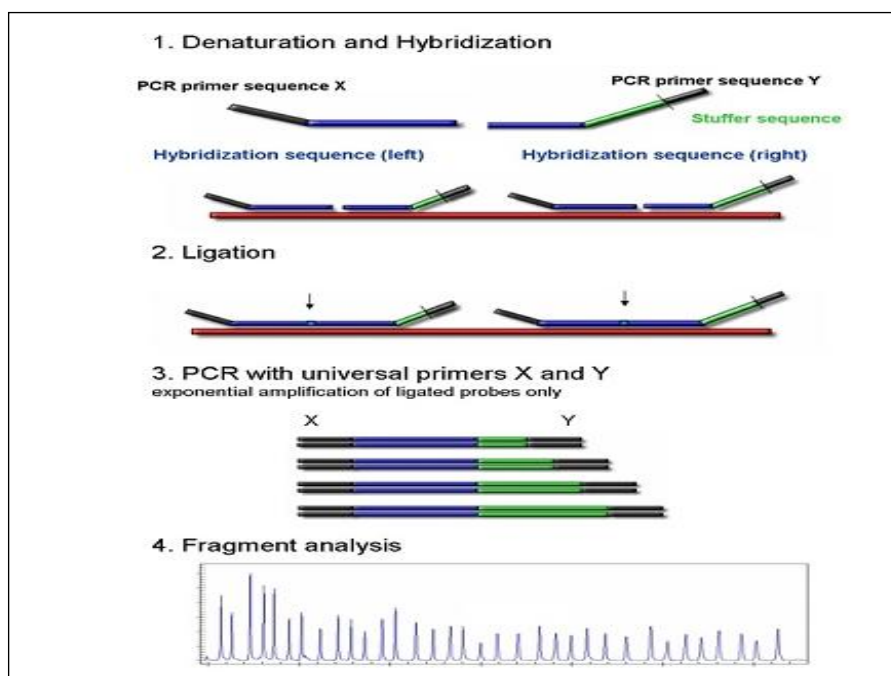
Откритите делеции или дупликации е желателно да бъдат потвърдени с друга независима техника, включително други MLPA сонди за същия участък от генома, особено ако дефектът се отнася за една MLPA сонда.

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

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

Фигура 18. Разпределение на референтните проби на случаен принцип при MLPA анализа (www.mlpa.com, L42).

MLPA анализът е показан схематично на **фигура 19**. Той може да бъде разделен на пет основни етапа: ДНК денатурация и хибризация, лигиране, PCR реакция, разделяне на амплификацията чрез капиларна електрофореза и анализ на данните.



Фигура 19. Схематично представяне на MLPA (www.mlpa.com, L42).

Материали и методи

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). Ако е необходимо пробите могат да се концентрират чрез преутаяване с етанол. ДНК беше разреждана в TE буфер (10mM Tris HCl/0.1mM EDTA) с pH 8.2.

Накратко, 50-200 ng геномна ДНК се денатурира и охлажда в 5 µl Tris-EDTA буфер и в последствие се инкубира със смес от проби (сонди), съдържаща по една проба, специфична за всеки един от екзоните на *BRCA1* или *BRCA2* и няколко контролни проби, хибридиращи за секвенции извън гените. След протичане на хибридизацията се извършва лигиране на пробите с лигаза за 15 мин на 65 °C (www.mlpa.com, L42). Продуктите на лигазната реакция се амплифицират с помощта на PCR при използване на флуоресцентно белязани праймери. Компонентите на мултиплексния MLPA PCR са представени на **таблица 10**.

Таблица 10. Компоненти на MLPA мултиплексен PCR

Реагенти на MLPA	Състав на реагентите
SALSA Probemix	Специфичен за <i>BRCA1</i> или <i>BRCA2</i>
SALSA MLPA буфер	KCl, Tris HCl, EDTA, PEG-6000, олигонуклеотиди
SALSA Ligase – 65	Глицерол, EDTA, β-меркаптоетанол, KCl, Tris HCl, детергент, бактериална лигаза
SALSA буфер А	NAD бактериален коензим
SALSA буфер В	Tris HCl, MgCl ₂ , детергенти
SALSA PCR праймери	Олигонуклеотиди, белязани с флуоресцентно багрило (FAM или Cy5), dNTP, Tris HCl, KCl, EDTA, детергенти
SALSA полимераза	Глицерол, детергенти, EDTA, DTT, Tris HCl, KCl, бактериална полимераза

След протичане на PCR реакциите, 1-2 µl от всяка проба се смесват 0.5 µl флуоресцентно белязан стандарт (GeneScan 600 *LIZ*) и обемът се довежда до 12 µl с дейонизиран формамид. Пробите се денатурират се и се разделят на капилярна електрофореза с помощта на секвенатор.

В настоящото изследване капилярните електрофорези бяха провеждани с помощта на секвенатор ABI Prism 3130 xl (Applied Biosystems), а електрофореграмите визуализирани чрез GeneMapper Software. Като референтни контролни проби при MLPA анализа бяха използвани ДНКи, изолирани от периферна кръв на здрави жени, съответстващи на болните по възраст и етническа принадлежност, без фамилна история на рак на гърдата и/или яйчника. Количественият анализ на резултатите извършихме с помощта на специализиран софтуер (Coffalyser software, MLPA Holland). За потвърждение на откритите аберации в *BRCA1* и *BRCA2* бяха използвани съответните

Материали и методи

китове на MLPA Holland: SALSA MLPA P087-B1 BRCA1 и SALSA MLPA P045- B2 BRCA2/CHEK2 (www.mlpa.com, L42).

Използваните при MLPA анализа консумативи и условия са представени в **таблица 11**.

Таблица 11. Използвани при MLPA анализа консумативи и условия

Условия на MLPA анализа					
Компоненти на реакционната смес		Параметри на работните условия			
1 ден		PCR програми без нагряване на капака на апарата			
Денатурация		Етап	Температура	Време	
ДНК (10 ng/ µl)	5 µl	Денатурация	98 °C	5 min.	
Парафин	10 µl	Съхранение в апарата	25 °C	∞	
Хибридизация		Етап	Температура	Време	
SALSA Probemix	1 µl	Денатурация	95 °C	1 min.	
SALSA MLPA буфер	1 µl	Хибридизация	60 °C	18 h.	
Общ обем	2 µl	Съхранение в апарата	54 °C	∞	
2 ден		PCR програми без нагряване на капака на апарата			
Лигазна реакция		Етап	Температура	Време	
SALSA буфер А	2 µl	Лигиране	58 °C	15 min.	
SALSA буфер Б	2 µl	Деактивиране на ензима	98 °C	5 min.	
SALSA Ligase – 65	0,66 µl	Денатурация			
dH ₂ O	16,66 µl	Съхранение в апарата	20 °C	∞	
Общ обем	21,32 µl				
PCR реакция		PCR програми с нагряване на капака на апарата			
SALSA PCR праймери	1,32 µl	Етап	Температура	Време	
SALSA полимераза	0,32 µl	Брой цикли: 35	Денатурация	95 °C	30 sec.
dH ₂ O	5 µl		Хибридизация	60 °C	30 sec.
Общ обем	6,64 µl		Синтез на нова верига	72 °C	60 sec.
Краен обем	34,96 µl	Краен синтез	72 °C	20 min	
		Съхранение в апарата	15 °C	∞	
Условия на капилярната електрофорезата					
Апарат	ABI Prism 3130 xl	Микс за електрофорезата			
		компонент	Количество		
Флуоресцентно багрило за белязане на праймерите	FAM	PCR	1 µl		
		LIZ	0,5 µl		
		HI DI Formamide	10,5 µl		
		Общ обем	12 µl		

MLPA методиката е специфично разработена за откриване на големи делеции или дупликации и не може да установи точкови мутации и малки делеции/ инсерции, които засягат един или няколко нуклеотида, балансирани транслокации и промени в броя на копията, които се покриват частично от сондите или са извън таргетната последователност. Ако не бъдат спазени стриктно препоръките на производителя могат да се получат фалшиво позитивни или негативни резултати. Някои от факторите, водещи до грешни резултати се дадени по-долу:

- Използването на ДНК е високи примеси на NaCl, KCl с концентрация >50 mM, фенол, етанол, хепарин, EDTA с концентрация > 1,5mM и Fe;

- Използване на нискокачествена пластмаса, която при нагряване може да отдели компоненти в MLPA реакцията;

- Недостатъчен буферен капацитет, който може да се получи ако се използва dH₂O вместо TE буфер, т.к. за нормалното протичане на реакциите е необходима концентрация на Tris-HCl минимум 5 mM с pH 8.2.

- Някои методики за изолиране на ДНК, които могат да доведат до повишаване на солите в пробата, например такава методика е Qiagen EZ1.

4.3.7. TaqMan[®] Real Time PCR

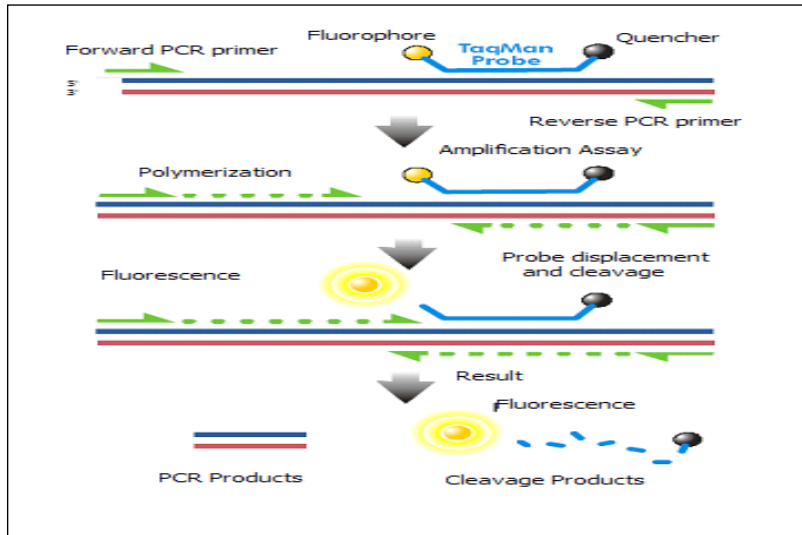
TaqMan[®] Real Time PCR (Life Technologies) е един от методите за количествен PCR. Принципът му се основава на използването на флуоресцентно белязана TaqMan проба (сонда), комплементарна на интересуващата ни ДНК последователност и освобождаването на флуоресцентен сигнал от 5'→3' екзонуклеазната активност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

Всяка една TaqMan[®] проба съдържа флуоресцентна репортерна боя (reporter), ковалентно свързана за нейния 5' край и нефлуоресцентен гасител (quencher - NFQ), прикачен към 3' края. Има няколко типа флуорофори, например FAM (6-карбоксифлуоресцин) и TET (тетрохлорфлуоресцин) и няколко различни типа гасители, например TAMRA (тетраметилродамин) и MGB (дихидроксипиролоиндол).

TaqMan сондите/пробите са проектирани, така че да хибридизират с конкретни ДНК последователности и да се амплифицират посредством специфични праймери. TaqMan[®] пробата се свързва с едноверижна ДНК. Когато сондата е интактна, близостта на гасителя до репортера действа така, че подтиска флуоресценцията на репортера. Таq полимеразата удължава праймера и синтезира нова верига в посока, обратна на комплементарната верига, т.е. в посока 3'→5', като измества сондата. 5'→3' екзонуклеазната активност на Таq полимеразата разгражда сондата по време на амплификацията, при което от нея се освобождава флуорофора. Освободеният флуорофор, вече разделен от гасителя, излъчва флуоресценция, която може да бъде детектирана и да послужи като основа за количествено определяне на продуктите при

PCR реакцията (*фигура 20*). Флуоресценцията на репортера се отчита с лазер, след което се отчитат резултатите.

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



Фигура 20. Принцип на TaqMan[®] Real Time PCR (www.en.wikipedia.org, L43)

Необходимите за генотипирането праймери, алел-специфични проби, реактиви и условията на qPCR са представени на *таблицы 12 и 13*

Таблица 12. Използвани при генотипирането праймери

Ген	SNP	Секвенция на праймера [VIC/FAM]
CYP1B1	rs1056836	AAGTTCTCCGGGTTAGGCCACTTCA[C/G] TGGGTCATGATTCACAGACCACTGG
SLC4A7	rs 4973768	TCACTTAAAACAAGCAGTTAATTAC[C/T] TAAACATGAGTTACCTTTGCTCTTA
MAP3K1	rs 889312	CTGAGATGCCCTGCTGGAGAAAGG[A/C] ATGTGCAAATTAAGAGACTACAAAT
C6orf9	rs3757318	TATTACCACATATGGGTCAGAGTCC[A/G] TGCTCCGTTCCATGCTCTCTGCAAA
RNF146	rs2180341	TTSTATATCATTTGGTGTATTTATCT[A/G] TCSTATGCCAGCACCAAACTGTCTT
FGFR2	rs 2981579	GAGGAAATACATAACCTGGATGTCT[A/G] CAGAGGTCGTATCCAAAACAAGCAA
FGFR2	rs2981582	CAGGCAGGCACCAGGTGGACTCTCC[A/G] CAAACAGGTTCAATTAAGTGGCGATG
TOX 3 (TNRC9)	rs3803662	GTCCACAGTTTTATTCTTCGCTAAG[A/G] GACAGCTATAGAGGCATTAAGGAGA

Таблица 13. Условия на TaqMan генотипирането

Компоненти на реакционната смес		Програма на секвенционната реакция			
PCR mix	2,5 µl	Етап	Температура	Време	Брой цикли
SNP mix	0.125 µl	Инициация	50 °C	2 мин	1
dH ₂ O	1,37 µl	Начална денатурация	95 °C	10 min	1
		Денатурация	95 °C	15 s	40
DNA	1 µl	Хибридизация	60 °C	20 s	
		Елонгация	60 °C	1 min	

4. 4. Биоинформатичен анализ на получените резултати

4.4.1. Биоинформатичен анализ на резултатите, получени от директното секвениране

При анализа на получените резултати бяха използвани следните софтуерни програми:

FinchTV. FinchTV е лесен за използване инструмент за първична обработка и анализ на малък обем ДНК секвенции. Той се използва за прочитане на файлове с хроматограми с едни от най-често използваните формати, като например AB1, SCF или FASTA. FinchTV е най-популярният софтуер за анализ на ДНК последователности, съвместим за Linux, Mac OSX, Windows и Solaris операционни системи (www.en.bio-soft.net, L44; www.cambridgesoft.com, L45). Програмата позволява да се направи анализ на суровите данни за оценка на качеството на получените секвенции, да се направи BLAST за съвпадения на получения резултат с референтната за съответния ген последователност (en.bio-soft.net, L44).

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

4.4.2. Биоинформатичен анализ на резултатите, получени от секвенирането от ново поколение

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

4.4.3. Биоинформатичен анализ на резултатите получени от MPLA

При анализа на резултатите, получени от MPLA бяха използвани две програми – GeneMapper и Coffalyr.Net.

GeneMapper. GeneMapper е софтуерна програма, разработена за автоматично определяне на генотипа и за анализ на данни получени при различни приложения на фрагментен анализ от ABI PRISM® 310, 3100, 3100-Avant™, Applied Biosystems® 3130, 3130xl, 3500, 3500xL Applied Biosystems® 3730 секвенатори. За работа с GeneMapper софтуер се изисква операционна система Windows XP или 7, при параметри на твърдия диск Intel Pentium processor и минимум 512 MB RAM, оптимална 1GB RAM (www.imbi.bio.indiana.edu, L48; www.lifetechnologies.com, L49).

CoffalyserNet. CoffalyserNet е програма за MLPA анализ, съвместима с файлове, получени директно от капилярни електрофорезни системи, включително ABI файлове като FSA, ABI и ABI. Програмната библиотека съдържа всички налични до момента MLPA анализи за различни заболявания, разработени от MRC-Holland, а новите приложения могат да се изтеглят директно от сайта на производителя (www.mlpa.com, L50). MLPA анализът протича на два етапа: а) ДНК фрагментен анализ и б) Сравнителен анализ на пробите и оценка на качеството. За оптимална работа на програмата се изисква операционна система Windows 7 или по-висока версия и поне 2GB RAM (www.mlpa.com, L51; www.coffalyser.wordpress.com, L52).

4.5. 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.

4.5.1. Изчисляване на хетерозиготността и на алелните и генотипни честоти в извадката

Хетерозиготността (H) е мярка за степента на полиморфност на изследвания автозомен локус. Тя изразява вероятността, случайно избран индивид от популацията да е хетерозиготен по отношение на даден локус. Очакваната хетерозиготност (H) се изчислява при предположение, че популацията е в равновесие със закона на Харди-Вайнберг. Използва се следната формула:

$$H = 1 - \sum(p_i)^2,$$

където p_i е честотата на i -тия алел.

Алелните честоти (f) се определят от наблюдаваните генотипи в извадката и получения резултат се представя в десетичен вид или в проценти. Алелните и генотипните честоти се изчислява по следните формули:

$$f = \frac{\text{брой пъти наблюдаван алел}}{\text{общ брой изследвани алели}}$$

или

$$f = \frac{\text{брой срещан генотип}}{\text{брой изследвани индивиди}}$$

4.5.2. Нулева хипотеза (H_0)

Нулевата хипотеза се използва при сравняване на групи данни. Приема се, че според нея не съществува статистически значима разлика между сравняваните групи.

Първо, трябва да бъде определено първоначално нивото на значимост (α), (Significance Level) което представлява вероятността за отхвърляне на нулевата хипотеза. Най-често използваното ниво на значимост е $\alpha=0,05$ или 5% вероятност нулевата хипотеза да се отхвърли. Изчислява се и вероятността (P) за получаване на наблюдаваните данни при положение, че нулевата хипотеза е вярна. За да може да се

приеме или отхвърли нулевата хипотеза с определена достоверност се сравняват стойностите на нивото на значимост (α) и вероятността (P). Възможни са следните положения:

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

Нулевата хипотеза, може да бъде проверена с различни статистически методи, един, от които е методът χ^2 . При приемане на нулевата хипотеза по метода χ^2 , съществуват таблици, които дават взаимовръзката между граничните стойности на χ^2 и стойностите на вероятността P, при различни степени на свобода и нива на значимост.

4.5.3. Метод χ^2

Методът χ^2 се използва за сравняване на получените опитни данни с очакваните данни или с предварително приета хипотеза. Изчислява се критерия χ^2 по следната формула:

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

където n е брой сравнявани класове;

O_i са наблюдаваните вследствие на провеждане на експеримент стойности на i-тия клас;

E_i са очакваните стойности на i-тия клас.

Стойностите на χ^2 зависят от величините степен на свобода и ниво на значимост, които са били възприети при провеждането на експеримента. Степента на свобода (degree of freedom) се изчислява по следната формула:

$$df = n - 1,$$

където n е броя на сравняваните класове.

Когато стойността на χ^2 е по-голяма от граничната при съответните стойности на ниво на значимост (α) и степен на свобода (df), първоначалната нулева хипотеза се отхвърля като невярна.

Методът χ^2 е приблизителен метод и поради тази причина е подходящ, само ако общият размер на извадката и очакваните стойности са достатъчно големи.

При провеждането на асоциативни изследвания при мултифакторните полигенни заболявания, се прави сравняване на честотите на срещаните алели и генотипи за група от засегнати и за контролна група. Ако наблюдаваната честота се различава значително от очакваната, нулевата хипотеза се отхвърля.

Този статистически метод за сравнение изчислява стойностите на χ^2 и P при степен на свобода $df=1$.

4.5.4. Закон на Харди-Вайнберг

Основното положение, залегнало в закона на Харди-Вайнберг е, че в една голяма, свободно кръстосваща се популация, алелните и генотипните честоти в даден локус са постоянни. Математическият израз на закона може да се представи чрез следната формула:

$$(p + q)^2 = p^2 + 2 p \cdot q + q^2,$$

където p е честотата на алела [A],

q е честотата на алела [a], като [A] и [a] са двата алела срещащи се в изследвания локус и $p+q=1$.

Когато това съотношение между алелните честоти е спазено в популацията и съответно в представителната извадка, която се изследва, то това означава, че съществува генетично равновесие за изследвания локус.

Могат да бъдат наблюдавани отклонения от закона на Харди-Вайнберг, които най-често се изразяват в повишена хомозитотност. Това може да се дължи на следните причини:

- Извадката не е подбрана добре и може да съдържа родствено свързани индивиди;
- В популацията липсва свободно кръстосване и в нея могат да съществуват отделни субпопулации, в които алелните честоти да се различават значително от тези характерни за общата популация;
- Върху популацията могат да действат селективни фактори;
- Методът на изследване на генотипните честоти в извадката не е достатъчно прецизен и това води до грешки при отчитането.

Проверката за съответствие със закона на Харди-Вайнберг се състои в сравняване на установените в извадката генотипни честоти с очакваните, които са изчислени по съответния закон. Сравняването се извършва чрез метода χ^2 и тестване на нулевата хипотеза.

4.5.5. Проверка на статистически хипотези

Хипотезите могат да бъдат научнообосновани предположения, касаещи различни аспекти на явленията, процесите или обектите. За потвърждаване или отхвърляне на хипотезата могат да бъдат използвани теоретически или експериментални доказателства, както и статистически аргументи. Статистическите хипотези са обосновани предположения за формата и параметрите на популационните

разпределения, респективно за състоянието, свойството и взаимодействията на масовите явления. Този тип хипотези се делят на прости (еднозначно дефинирани) и сложни (многозначно дефинирани), като в зависимост от това дали са негативни или позитивни, те могат да бъдат нулеви или алтернативни.

Най-често на проверка се подлага нулевата хипотеза (H_0) и в тази връзка тя се нарича работна хипотеза. Трябва да се има предвид, че при приемане или отхвърляне на нулевата хипотеза е възможно да бъдат допуснати грешки от I и II род породени от ограничения обем информация и вероятностния характер на методите. При вземането на решения има четири възможности (*таблица 14*).

Таблица 14. Проверка на нулевата хипотеза

Статистическо заключение	Хипотеза	
	Нулева хипотеза (H_0)	Алтернативна хипотеза (H_1)
Приема се H_0	Решението е правилно	Решението е неправилно (грешка от II род, β грешка)
Отхвърля се H_0 (приема се H_1)	Решението е неправилно (грешка от II род, α грешка)	Решението е правилно

Рискът за грешка от I род се контролира и определя чрез нивото на значимост, докато рискът за грешка от II род зависи от начина, по който е дефинирана алтернативната хипотеза. С ниво на значимост (α) се определя вероятността при анализирания критерии да бъде допусната грешка от I род, т.е. H_0 неправилно да бъде отхвърлена. Колкото по-ниска е стойността на α , толкова по-малка е вероятността да бъде допусната грешка от I род. Конвенционалното значение на α е 0.05, но може да бъде 0.01 или 0.001, например $\alpha = 0,01$ означава, че само една от 100 проверки на една нулева хипотеза (H_0) е възможно да бъде с грешка (Ранчов, 2008).

4.6. Използвана апаратура

За изработването на дисертационната работа беше използвана следната апаратура:

- Автоматизирана система за изолиране и пречистване на ДНК и РНК - Модел: Chemagen, Magnetic Separation Module I;
- ABI PRISM® Автоматичен ДНК секвенатор- модел 3130xl;
- Ion Torrent Personal Genome Machine за секвениране от ново поколение;
- Апарат за PCR в реално време, Модел: 7900 HT Fast Real-time PCR, блок за 384 проби;
- Biomek FXP Автоматична лабораторна станция, Модел: Biomek FX за накапване на голям брой проби;

Материали и методи

- Апарати за PCR амплификация: градиентен PCR апарат- Модел: QB-96 на QUANTA BIOTECH; Bioer XP-F Cycler модел TC XP-A; AB Veriti Thermal Cycler;
- Вана за хоризонтална електрофореза (Science-Plus-UK);
- Токоизправител (Science-Plus-UK);
- Фотодокументационна система и UV-транслюминатор с дължина на вълната 312 nm (MiniBisPro-Bio Imaging Systems);
- Спектрофотометър ND 1000 (NanoDrop);
- Ion One Touch System;
- Agilent 2100 Bioanalyzer;
- Хладилна центрофуга 5810R – модел Eppendorf за целите на ДНК изолирането
- Универсална центрофуга - модел: Eppendorf 5810 за преутаяране на пробите за секвениране
- Универсална центрофуга Micro 200 – модел Hettich;
- Универсална центрофуга - модел: HERMLE Z383, 5000rpm
- Микроцентрофуга >15500 x g за 1,5 и 2,0 ml епруветки;
- Микроцентрофуга за чипове MiniStar Silverline;
- Сух стерелизатор MMM (Exocell);
- Микровълнова фурна за разтопяване на агароза;
- Нивелирна маса за изливане на гела;
- Стартови гребени за гелове за електрофореза с размер на зъбците 5x1mm;
- Устройство за разбъркване за NGS
- Вортекс за разбъркване Press-to-mix (Snijders);
- pH метър (InLab);
- Магнитна бъркалка (Fisher Scientific);
- Магнитен статив за пречистване на пробите при ДНК изолирането;
- Магнитен статив DynaMaga™- за пречистване на пробите при NGS;
- pH Meter;
- Едноканални пипети с обем: 0.5 – 10 µl, 2 – 20 µl, 20 – 200 µl и 100- 1000µl;
- Многоканални пипети с обем: 0.5 – 10 µl, 2 – 20 µl и 20 – 200 µl;

V. Резултати

5.1. 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 от Катедра по Обща и клинична патология/Клиника по обща и клинична патология, УМБАЛ „Александровска”, МУ - София; Клиника по медицинска онкология (химиотерапия), СБАЛО, София; Клиника по обща и чернодробно-панкреатична хирургия, УМБАЛ „Александровска“; II хирургична клиника „УМБАЛ „Царица Йоана – ИСУЛ”, и Център по молекулярна медицина (ЦММ), Катедра „Медицинска химия и биохимия”, МУ - София за периода от 2007-2012 г. беше събрана група от 200 пациентки с фамилен рак на гърдата и фамилна история на рак на гърдата и/или яйчника. 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. 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.

С всички участници бяха проведени персонални интервюта, при които те бяха уведомени за целите и същността на настоящото изследване и подписаха информирани съгласия за участие.

След подписване на информирано съгласие, от пациентите и контролите беше взета венозна кръв, от която бяха изолирани плазма и ДНК с помощта на техника, описана в раздел 4 на глава „Материали и методи”. С цел дълготрайно съхранение, плазмите и част от ДНК материалите бяха замразени на $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, с което се създаде плазмена и ДНК биобанка от пациенти с фамилен рак на гърдата в ЦММ, МУ – София. Останалата част от ДНК пробите беше използвана за генетичен анализ. Всички данни за пациентите бяха оформени в електронен вид и съхранени под формата на клинична база данни.

5.2. 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 общо 51 участъка и амплифицирани с помощта на 81 двойки праймери (*таблица 15*). Допълнително беше проведен и анализ за носителство на най-

честите мутации с.509_510delGA в *PALB2* гена и с.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.

5.2.1. Подбор на праймерите, необходими за амплификацията на *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2* и *BRIP1* гените

В настоящото проучване беше проведен молекулярно-генетичен анализ за носителството на мутации в *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2* и *BRIP1* гените посредством директно секвениране. За изпълнението на тази задача беше необходимо получаването на високо специфичен PCR продукт. За целта беше направен дизайн на праймерите (олигонуклеодина последователности), отговарящи на следните условия:

- Дължината на нуклеотидната верига за всеки един праймер, поотделно, да е между 18 и 24 bp (нуклеотидни двойки);
- Праймерите да са комплементарни на 3'-края на двете матрични вериги и с антипаралелен ход в дефинирания участък на ДНК матрицата;
- Температурата на хибридизация на двата праймера да е близка и с разлика не по-висока от 5°C;
- Съдържанието на базите G (гуанин) и C (цитозин) да е между 40 и 75%;
- Двата праймера да не са комплементарни помежду си, за да не образуват димери.

При дизайна на праймерите бяха използвани следните интернет сайтове: Primer3web, UCSC; DINAMelt Web Server Genome browser; NCBI nucleotide blast; Ensemble Genome Browser и Breast Cancer Information Core (www.primer3plus.com, L53; www.genome.ucsc.edu, L54; www.mfold.rna.albany.edu, L55; www.mfold.rna.albany.edu, L56; www.blast.ncbi.nlm.nih.gov, L57). Нуклеотидната последователност на олигонуклеотидите е представена на **таблица 15**.

Концентрацията на праймерите, необходима за протичането на амплификацията, варирахме между 2.5nmol и 25nmol/10µl реакционен обем. Много високата концентрация на праймерите води до образуването на неспецифични продукти и обратно - при ниска концентрация на праймерите амплификация не протича. Резултатите от така направените оптимизации показаха, че качеството на получените PCR продукти е най-добро при концентрация на праймерите 20nmol/10µl реакционен обем.

5.2.2. Температура на амплификация

От изследваните параметри на полимеразната верижна реакция с най-голямо влияние е температурата на хибридизация. При температури на хибридизация по-ниски от оптималните, праймерите хибридизират неспецифично в участъци от ДНК, различни от таргетната последователност. Това от своя страна води до амплифициране на грешен продукт. С повишаване на температурата над оптималната ѝ стойност, количеството на

амплифицирания продукт намалява и при много високи стойности амплификацията спира. Установените от нас оптимални температури за амплификацията на изследваните участъци, както и дължините на продуктите, са представени в **таблица 15**.

Таблица 15. Последователности на праймерите, необходими за амплификация на BRCA1, BRCA2, PALB2 и BALP1 гените и оптимални температури на хибридизация

BRCA1				
Екзон	F/R	Нуклеотидна последователност на праймерите	Размер PCR продуктите	Температура на хибридизация
2	F	5'-GGACGTTGTCATTAGTTCTTTGG-3'	339bp	56 °C
	R	5'-GTCTTTTCTTCCCTAGTATGT-3'		
3	F	5'-AACGAACCTTGAGGCCTTATG-3'	308bp	51°C
	R	5'-TTGGATTTTCGTTCCTCACTT-3'		
5	F	5'-CTCTAAGGGCAGTTGTGAG-3'	278bp	56 °C
	R	5'-ATGGTTTTATAGGAACGCTATG-3'		
6	F	5'-TTTCTACTGTTGCTGCATCT-3'	273bp	58 °C
	R	5'-TAATGTGCAAACCTTCCTGAG-3'		
7	F	5'-GGTTTCTCTTGGTTCTTTG-3'	250bp	57 °C
	R	5'-CCCAGCTACTAAGGGGGCTA-3'		
8	F	5'-TGTTAGCTGACTGATGATGGT-3'	268bp	54 °C
	R	5'-AACCCAGCAATTATTATTAATAC-3'		
9	F	5'-CCACAGTAGATGCTCAGTAAATA-3'	211bp	57 °C
	R	5'-TAGGAAAATACCAGCTTCATAGA-3'		
10	F	5'-GATCTTGGTCATTTGACAGTTC-3'	240bp	53 °C
	R	5'-CCCAAATGGTCTTCAGAATA-3'		
11a	F	5'-CCACCTCCAAGGTGTATGA-3'	370bp	59 °C
	R	5'-TGTTATGTTGGCTCCTTGCT-3'		
11b	F	5'-TACTCACTAAAGACAGAATGA-3'	401bp	58 °C
	R	5'-CCAGAATATTCATCTACCTCA-3'		
11c	F	5'-CACATGATGGGGAGTCTGA-3'	366bp	58 °C
	R	5'-TCTTGATAAAATCCTCAGGATG-3'		
11d	F	5'-CAAGAGCGTCCCCTCACA-3'	388bp	63 °C
	R	5'-GCGCATGAATATGCCTGGT-3'		
11e	F	5'-GTATAAGCAATATGGAACCTCGA-3'	388bp	59 °C
	R	5'-TTAAGTTCAGTGGTATTTGAACA-3'		
11f	F	5'-GACAGCGATACTTTCCCAGA-3'	704bp	60 °C
	R	5'-TGGAACAACCATGGATTAGTC-3'		
11g	F	5'-GGAAGTTAGCACTCTAGGGA-3'	423bp	57 °C
	R	5'-GCAGTGATATTAAGTGTCTGTA-3'		
11h	F	5'-GCAACATTCTCTGCCCCACTC-3'	436bp	58 °C
	R	5'-GGCTAATTGTGCTCACTGT-3'		
11i	F	5'-CTACTTTTCCCATCAAGTCA-3'	377bp	59 °C
	R	5'-TCAGGATGCTTACAATTAAGTTC-3'		
11j	F	5'-CAAAATTGAATGCTATGCTTAGA-3'	377bp	61 °C
	R	5'-TCGGTAACCTGAGCCAAAT-3'		
11k	F	5'-GCAAAAGCGTCCAGAAAGGA-3'	396bp	61 °C
	R	5'-TATTTGCAGTCAAGTCTTCCAA-3'		
11l	F	5'-GTAATATTGGCAAAGGCATCT-3'	360bp	63 °C
	R	5'-TAAAATGTGCTCCCCAAAAGCA-3'		
12	F	5'-GCGTTTATAGTCTGCTTTTACA-3'	227bp	54 °C
	R	5'-TGTCAGCAAACCTAAGAATGT-3'		

Резултати

13	F	5'-AATGGAAAGCTTCTCAAAGTA-3'	320bp	54 °C
	R	5'-ATGTTGGAGCTAGGTCCTTAC-3'		
14	F	5'-CTAACCTGAATTATCACTATCA-3'	312bp	54 °C
	R	5'-GTGTATAAATGCCTGTATGCA-3'		
15	F	5'-CAGACTTCTAGGCTGTCTTGC-3'	378bp	59 °C
	R	5'-GTGTTTGTCCAATACAGCAG-3'		
16	F	5'-AATTCTTAACAGAGACCAGAAC-3'	450bp	56 °C
	R	5'-AAAACCTTTTCCAGAATGTTGT-3'		
17	F	5'-AGCTGTGTGCTAGAGGTAAGTC-3'	190bp	60 °C
	R	5'-GTGGTTTTATGCAGCAGATG-3'		
18	F	5'-AGCCTCCCCTAGACTTCCAA-3'	319bp	60 °C
	R	5'-TAAAGGGAGGAGGGGAGAAA-3'		
19	F	5'-TGTGGCTTTAGAGGGAAGGA-3'	261bp	60 °C
	R	5'-GGTGCATTGATGGAAGGAAG-3'		
20	F	5'-ATATGACGTGTCTGCTCCAC-3'	259bp	54 °C
	R	5'-AGTCTTACAAAATGAAGCGG-3'		
21	F	5'-AAGCTCTTCCTTTTGAAGTC-3'	298bp	58 °C
	R	5'-GTAGAGAAATAGAATAGCCTCT-3'		
22	F	5'-TCCCATTGAGAGGTCTTGCT-3'	298bp	58 °C
	R	5'-GAGAAGACTTCTGAGGCTAC-3'		
23	F	5'-TGAAGTGACAGTTCAGTAGT-3'	258bp	58 °C
	R	5'-CATTTTAGCCATTCATCAACAA-3'		
24	F	5'-ATGAATTGACACTAATCTCTGC-3'	280bp	58 °C
	R	5'-GTAGCCAGGACAGTAGAAGGA-3'		

BRCA2

Exon	F/R	Нуклеотидна последователност на праймерите	Размер PCR продуктите	Температура на хибридизация
2	F	5'-CCAGGAGATGGGACTGAATTAG-3'	311bp	60 °C
	R	5'-CTGTGACGTAAGGTTTTCAGC-3'		
3	F	5'-GATCTTTAACTGTTCTGGGTCACA-3'	424bp	59 °C
	R	5'-CCCAGCATGACACAATTAATGA-3'		
4	F	5'-AAACACTTCCAAAGAATGCAAA-3'	399bp	54 °C
	R	5'-CCAGCCAATTCAACATCACA-3'		
5/6	F	5'-TGTGTTGGCATTTTAAACATCA-3'	453bp	54 °C
	R	5'-CAGGGCAAAGGTATAACGCT-3'		
7	F	5'-CCTTAATGATCAGGGCATTTC-3'	215bp	59 °C
	R	5'-CAACCTCATCTGCTCTTCTTG-3'		
8	F	5'-GCCATATCTTACCACCTTGTGA-3'	406bp	60 °C
	R	5'-AGGTTTAGAGACTTTCTCAAAGGC-3'		
9	F	5'-ATAACTGAAATCACCAAAAAGTG-3'	243bp	62 °C
	R	5'-CTGTAGTTCAACTAAACAGAGG-3'		
10a	F	5'-CAGGAGAAGGGGTGACTGAC-3'	575bp	61 °C
	R	5'-AGACCATTACAGGCCAAAG-3'		
10b	F	5'-ATTTTCCATGAAGCAAACGC-3'	720bp	57 °C
	R	5'-AGAATTCTGTGTGGTGGTGG-3'		
10c	F	5'-TGGAGAAAATACCCCTATTGC-3'	491bp	58 °C
	R	5'-AGAATTCTGTGTGGTGGTGG-3'		
10d	F	5'-TCACCTAAAGAGACTTTCAATGC-3'	442bp	61 °C
	R	5'-CAGAAGGAATCGTCATCTATAAAAC-3'		
11a	F	5'-CACTGTGCCCAAACACTACC-3'	462bp	56 °C
	R	5'-CTTTTCTGGGATTGAAAGTCAG-3'		
11b	F	5'-CCTGCAGGAAGGACAGTGTG-3'	410bp	61 °C
	R	5'-TTCTGAAGGTGATGCTACTCTC-3'		
11c	F	5'-CCCATGGAAAAGAATCAAGATG-3'	390bp	61 °C
	R	5'-AATTGACACTTGGGTTGCTTG-3'		

Резултати

11d	F	5'-CGAACCCATTTTCAAGAACTC-3'	432bp	58 °C
	R	5'-GGCTTGCTCAGTTTCTTTTGA-3'		
11e	F	5'-CAATTTCAAATCACAGTTTTGG-3'	452bp	56 °C
	R	5'-CATCTGGTTTTTCAGGCACTTC-3'		
11f	F	5'-AACACCTAGCCAAAAGGCAG-3'	396bp	56 °C
	R	5'-TGCAGAGCTTCAGTAGAAACATTC-3'		
11g	F	5'-TTAAACGGAAGTTTGCTGGC-3'	427bp	55 °C
	R	5'-TTTCTACTGGCAGCAGTATATTTG-3'		
11h	F	5'-AAATAATATTGAAATGACTACTGGCAC-3'	451bp	60 °C
	R	5'-TTTATTAAATGACTCTTTGGCGAC-3'		
11i	F	5'-TTTTTGGAAGTTGCGAAAGC-3'	455bp	54 °C
	R	5'-TCCAAAGATTCCTTTGCAATTT-3'		
11j	F	5'-TGAAAGAAAGTGTCCAGTTG-3'	419bp	55 °C
	R	5'-TGATGTTTTGAGATTTTCAGTTTG-3'		
11k	F	5'-AGCTGCCCAAAGTGTAAG-3'	506bp	59 °C
	R	5'-CATCAGAATGGTAGGAATAGCTG-3'		
11l	F	5'-TCATTGAAAATTCAGCCTTAGC-3'	458bp	55 °C
	R	5'-AGTCACAAGTTCCTCAACGC-3'		
11m	F	5'-ATGCAAATGCATACCCACAA-3'	442bp	56 °C
	R	5'-GAAACTTTCTCCAATCCAGACA-3'		
11n	F	5'-CAAAAATTTGCCAAACGAAA-3'	432bp	58 °C
	R	5'-TGAGCTGGTCTGAATGTTTCG-3'		
11o	F	5'-TCATCTGCAAATACTTGTGGG-3'	440bp	54 °C
	R	5'-TGCTCTGGGTTTCTCTTATCAAC-3'		
11p	F	5'-CAAGTTTCCATTTTAGAAAGTTC-3'	408bp	56 °C
	R	5'-AAAAGTTTCAGTTTTACCAATTTCC-3'		
11q	F	5'-TCAATTTCAACAAGACAAACAACA-3'	521bp	62 °C
	R	5'-TCAAACCATACTCCCCCAA-3'		
12	F	5'-AGTGGTGTTTTTAAAGTGGTCAAAA-3'	388bp	55 °C
	R	5'-GGATCCACCTGAGGTCAGAATA-3'		
13	F	5'-TGCTGATTTCTGTTGTATGCTTG-3'	546bp	61 °C
	R	5'-TCCTCTCAACCTTAGTACTTCATCC-3'		
14	F	5'-ACCATGTAGCAAATGAGGGTCT-3'	557bp	62 °C
	R	5'-GCAAAAATTCATCACACAAATGTC-3'		
15	F	5'-GGCCAGGGGTTGTGCTTTTT-3'	314bp	54 °C
	R	5'-AGGATACTAGTTAATGAAATA-3'		
16	F	5'-TTTGGTAAATTCAGTTTTGGTTTG-3'	350bp	59 °C
	R	5'-GAGAAGAAAGAGGGATGAGGG-3'		
17	F	5'-CACCATGCTCAGCAATGAAG-3'	485bp	57 °C
	R	5'-CACTGACAACCTGGCTTGTGC-3'		
18a	F	5'-TGATCCACTATTTGGGGATTG-3'	466bp	56 °C
	R	5'-GAGGGGAGGATCTAACTGGG-3'		
18b	F	5'-ATGGAAAGGGATGACACAGC-3'	502bp	62 °C
	R	5'-CTCAAGAAAGATCTCTGGACCTC-3'		
19	F	5'-AAGTGAATATTTTTAAGGCAGTT-3'	296bp	56 °C
	R	5'-TATATGGTAAGTTTCAAGAAT-3'		
20	F	5'-CAAGTAGCTGAGCCACCACA-3'	623bp	56 °C
	R	5'-ACAAAAATGCAAAAAGCCACA-3'		
21	F	5'-TGCTTGGTCTTTAGTTTTAGTTGC-3'	261bp	60 °C
	R	5'-GAGTCTAAAACAGCTTCTCACCTTG-3'		
22	F	5'-AACCACACCCTTAAGATGAGC-3'	455bp	61 °C
	R	5'-GGGCATTAGTAGTGGATTTTG-3'		
23	F	5'-GCAAAATCCACTACTAATGCC-3'	350bp	57 °C
	R	5'-TGGAGATTCCATAAACTAACAAGC-3'		
24	F	5'-CCGGTACAAACCTTTCATTG-3'	329bp	58 °C
	R	5'-TGCCAACCTGGTAGCTCCAAC-3'		

Резултати

25	F	5'-TGCATCTTAAAATTCATCTAACACATC-3'	383bp	62 °C
	R	5'-AAGCTATTTCCCTTGATACTGGACTG-3'		
26	F	5'-TGACAATTGGTATCACATTTAGGG-3'	421bp	59 °C
	R	5'-CAGGAGCCACATAACAACCA-3'		
27a	F	5'-TAGGGGAGGGAGACTGTGTG-3'	383bp	59 °C
	R	5'-ACTCCTTGGTGGCTGAAATG-3'		
27b	F	5'-GAAAGAGATTGATGACCAAAGAA-3'	401bp	61 °C
	R	5'-GAGATGTAGTACAACGTCGTTTCAG-3'		
27c	F	5'-CTGAATTCTCCTCAGATGACTCC-3'	447bp	61 °C
	R	5'-AAACGCTGAGGTAAATTTGAAAC-3'		
27d	F	5'-GGCCAGTACGGAAGAATGTG-3'	556bp	62 °C
	R	5'-CCTCATTCATTTAATGACACAA-3'		
PALB2				
4	F	5'-TGACCCTAGTGGTGAGCAAA-3'	296 bp	59 °C
	R	5'-CTTTTCTGGTTGGGCAGTT-3'		
BRIP1				
20	F	5'-GCAATTATGTTAGCTAGGAGCAGA -3'	280 bp	58 °C
	R	5'-ACTTCCATCTTCTCTGTTTTGA -3'		

5.2.3 Оптимизация на концентрацията на MgCl₂

Mg²⁺ е необходим като кофактор за ензимната активност на много Taq полимеризи, както и при хибридизацията на праймерите, включването на dNTPs и стабилизирането на матричната ДНК. Известно е, че много високите концентрации на Mg²⁺ стабилизират двойноверижната ДНК, предотвратявайки по този начин денатурацията на продукта. Освен това е установено, че Mg²⁺ стабилизира некоректната хибридизация на праймерите с матричната ДНК и понижава специфичността на амплификацията. Много ниските концентрации на Mg²⁺, от друга страна, понижават ефективността на удължаване на праймерите. Теоретично, оптималната концентрация на MgCl₂ варира от 0,5 до 5mM. Ние направихме поредица от PCR реакции с увеличаващи се концентрации на MgCl₂: 1.25mM, 1.5mM, 1.75mM и 2mM. Въз основа на получените резултати установихме, че оптималната концентрация на MgCl₂ при амплификация на всички екзони и екзон/ интронни връзки на *BRCA1/2* гените 1.5mM за 10 µl реакционен обем.

5.2.4. Оптимизация на концентрацията на матричната ДНК

Концентрацията на матричната ДНК има голямо значение за прецизността и добива на амплификация. При направената серия от PCR реакции с увеличаване на концентрацията на матричната ДНК, съответно: 25 ng, 50 ng, 100 ng, 150 ng и стоков разтвор за 10µl реакционен обем, беше установено, че оптималната концентрация на ДНК е 50 ng. На базата на получените резултати от оптимизацията на PCR реакцията като оптимални бяха определени условията, представени в **таблица 16**.

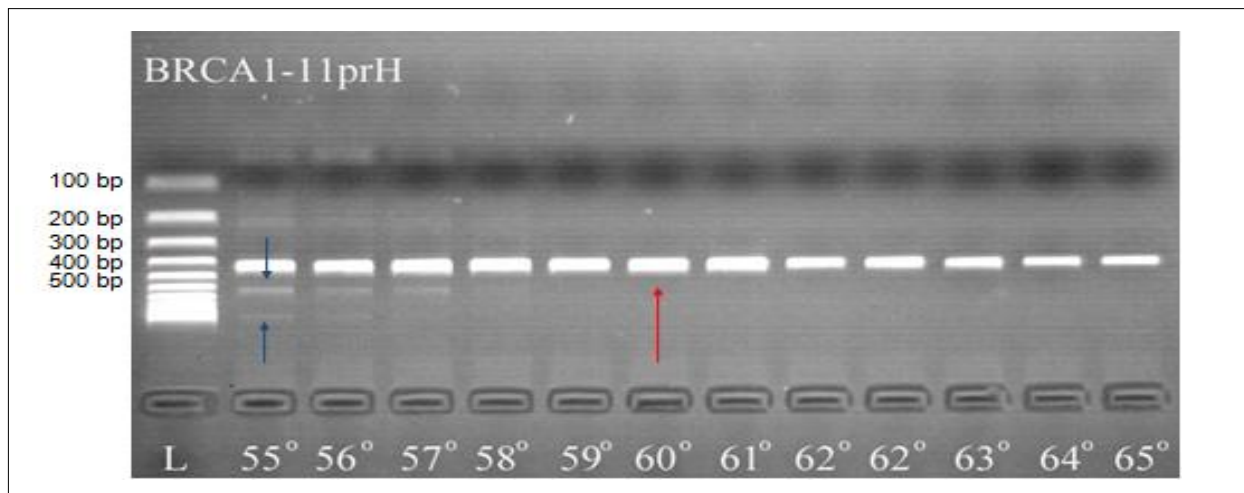
Таблица 16. Оптимални условия на амплификация, определени при оптимизацията на целите кодиращи последователности на *BRCA1*, *BRCA2*, екзон 4 на *PALB2* и екзон 20 на *BRIP1*.

Компоненти на реакционната смес		Програма за протичане на PCR реакцията			
			Температура	Време	Брой цикли
10 x PCR буфер	1 x				
10 mM dNTP	0.4 mM	Начална денатурация	95 °C	5 min.	1
Праймер F (20nmol)	2 nM	Денатурация	94 °C	45 sec.	35
Праймер R (20 nmol)	2 nM	Хибризация	58 °C – 59 °C*	35 sec.	
Таq полимераза (500U/μl)	2U	Елонгация	72 °C	50 sec.	
ДНК	50 ng	Елонгация	72 °C	10 min.	1
dH ₂ O	-	Съхранение в апарата	10 °C	∞	
Общ обем	10 μl				

*температурите на хибризация са отбелязани в таблица 15

5.2.5. 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 21** е представен резултатът от оптимизация на екзон 11, участък Н на *BRCA1* гена.

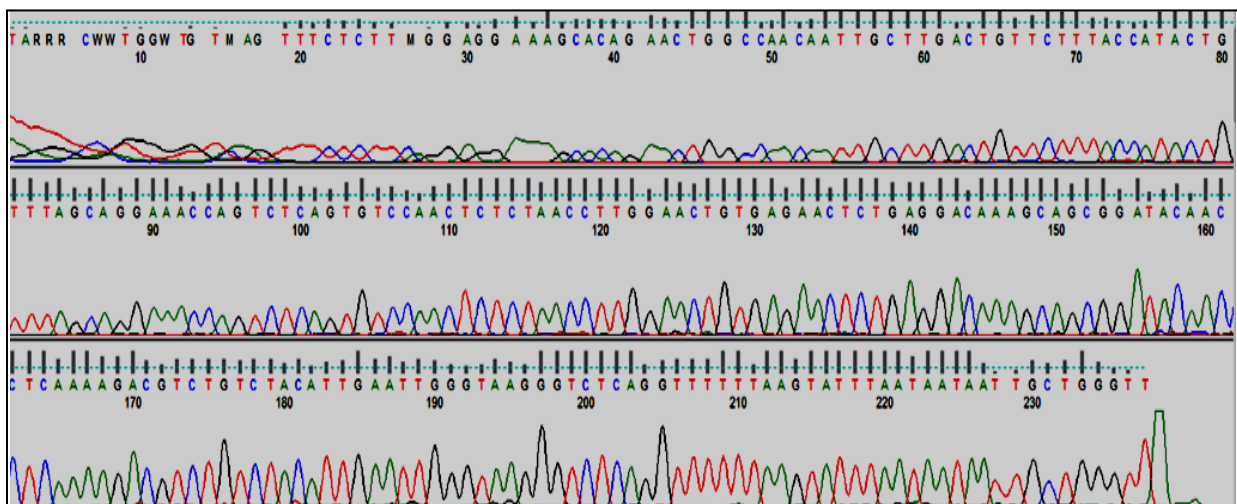


Фигура 21. Електрофоретичен профил в 2%-ен агарозен гел на PCR продукти, след амплификация на екзон 11Н на *BRCA1* гена при използване на температурен градиент (със сини стрелки на фигурата са означени неспецифичните продукти, а с червена стрелка е означена оптималната температура на хибризация на екзон 11Н)

5.2.6. 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 нехибридизирани праймери, направихме с помощта на ExoSap (ExoSapIT, Affymetrix) както е описано в раздел 4, “Материали и Методи”. При направената поредица от реакции на пречистване с различни количества PCR продукт (1 μ l, 1.5 μ l и 2 μ l) и различни количества на използваната ензимна смес (0.4 μ l, 0.5 μ l, 0.75 μ l и 1 μ l) се установи, че за получаване на оптимални резултати от директното секвениране е необходимо да използваме 1 μ l PCR продукт и 0.4 μ l ExoSap.

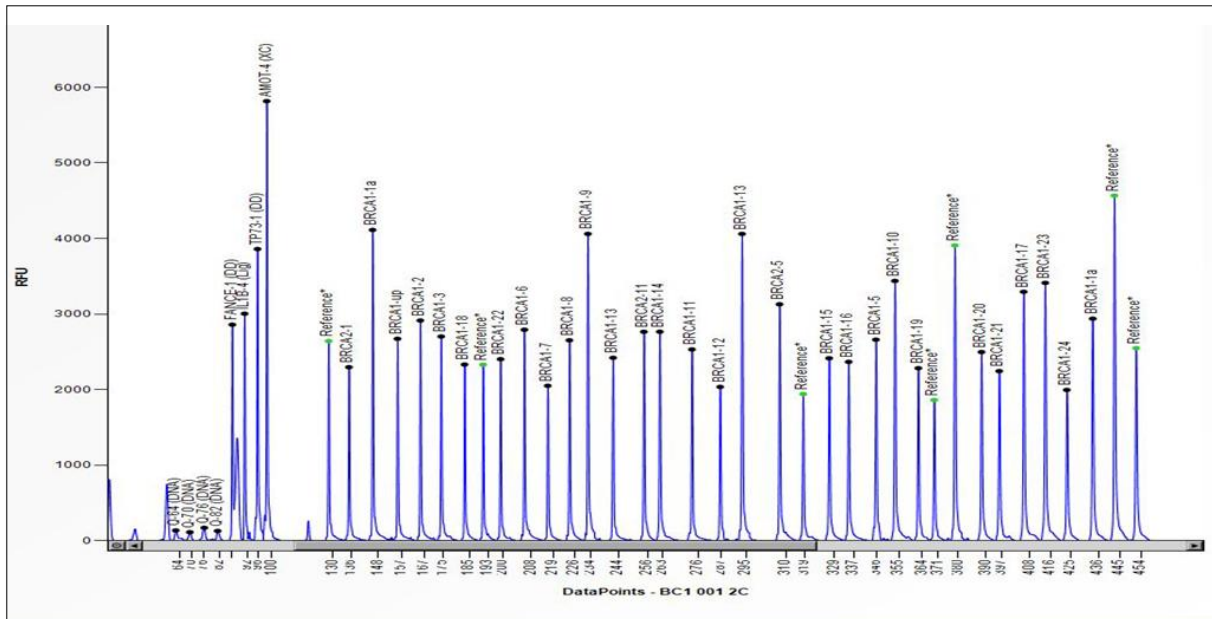
След пречистването PCR продуктите бяха подложени на секвенционна реакция. Продуктите на секвенционната реакция бяха преуаени, разтворени в денатуриращ агент формамид и анализирани с помощта на капилярна електрофореза на автоматичен секвенатор (ABI Prism 3130 xl, Applied Biosystems). На **фигура 22** е показана една произволно избрана електрофореграма на продукти на секвенционна реакция, получена при оптимални условия на анализа.



Фигура 22. *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*

5.2.7. 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* (**фигура 23**).

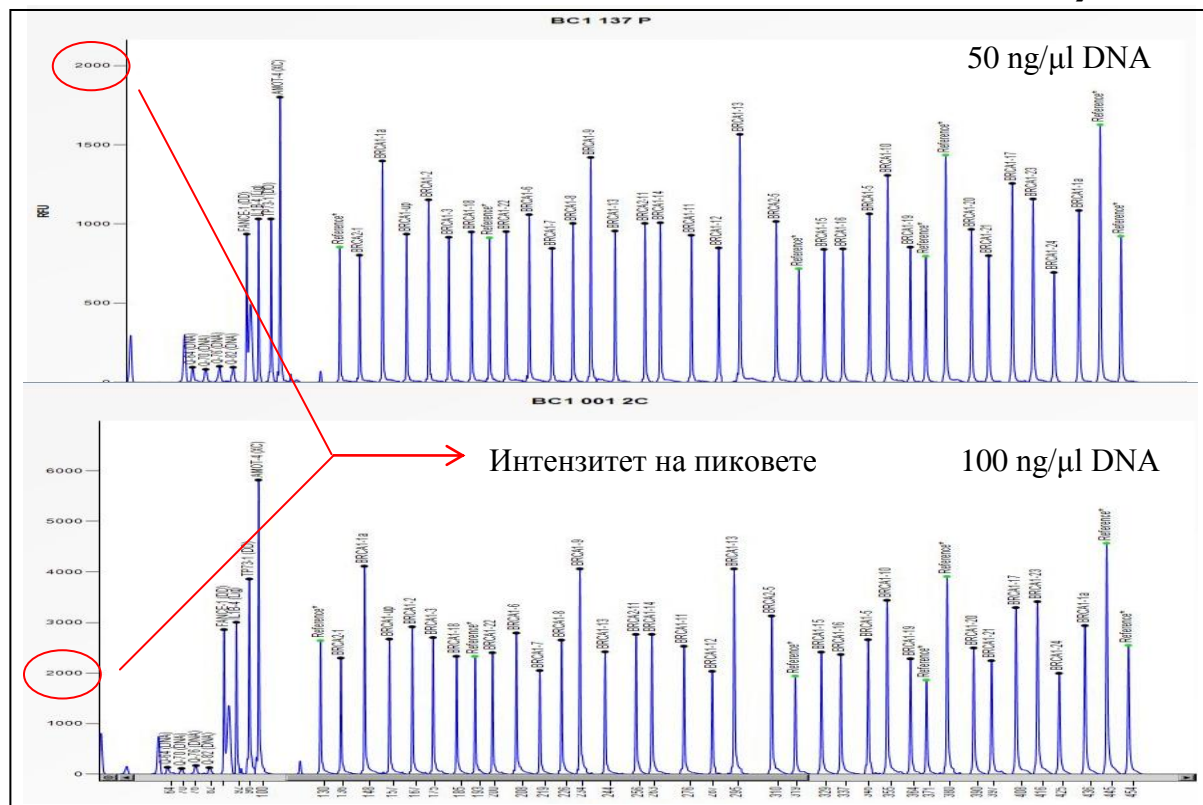


Фигура 23. Локализация на референтните и вътрегенните хибридационни сонди при използването на кит P087-B1BRCA1 за MLPA анализ на BRCA1 гена, визуализирани посредством Coffalyser.net софтуер

С цел определяне на работните условия на MLPA анализа бяха проведени оптимизации на следните параметри: концентрация на изходната геномна ДНК, времето на хибридация 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 24**).

Оптимизация на времето за хибридация. Според препоръките на производителя продължителността на хибридацията на сондите трябва да бъде между 16 и 20 часа, с цел оптимално свързване на всички хибридационни сонди. Оптималното време на хибридация при настоящия MLPA анализ беше определено експериментално на 18 часа. На **фигура 25** са сравнени електрофореграми след 16 часова (**фигура А**) и 18 часова (**фигура Б**) хибридация. Ясно се вижда, че при по-малкото време на хибридация се забелязват участъци, които не са хибридазирали напълно и съответстващите им пикове имат по-нисък интензитет.

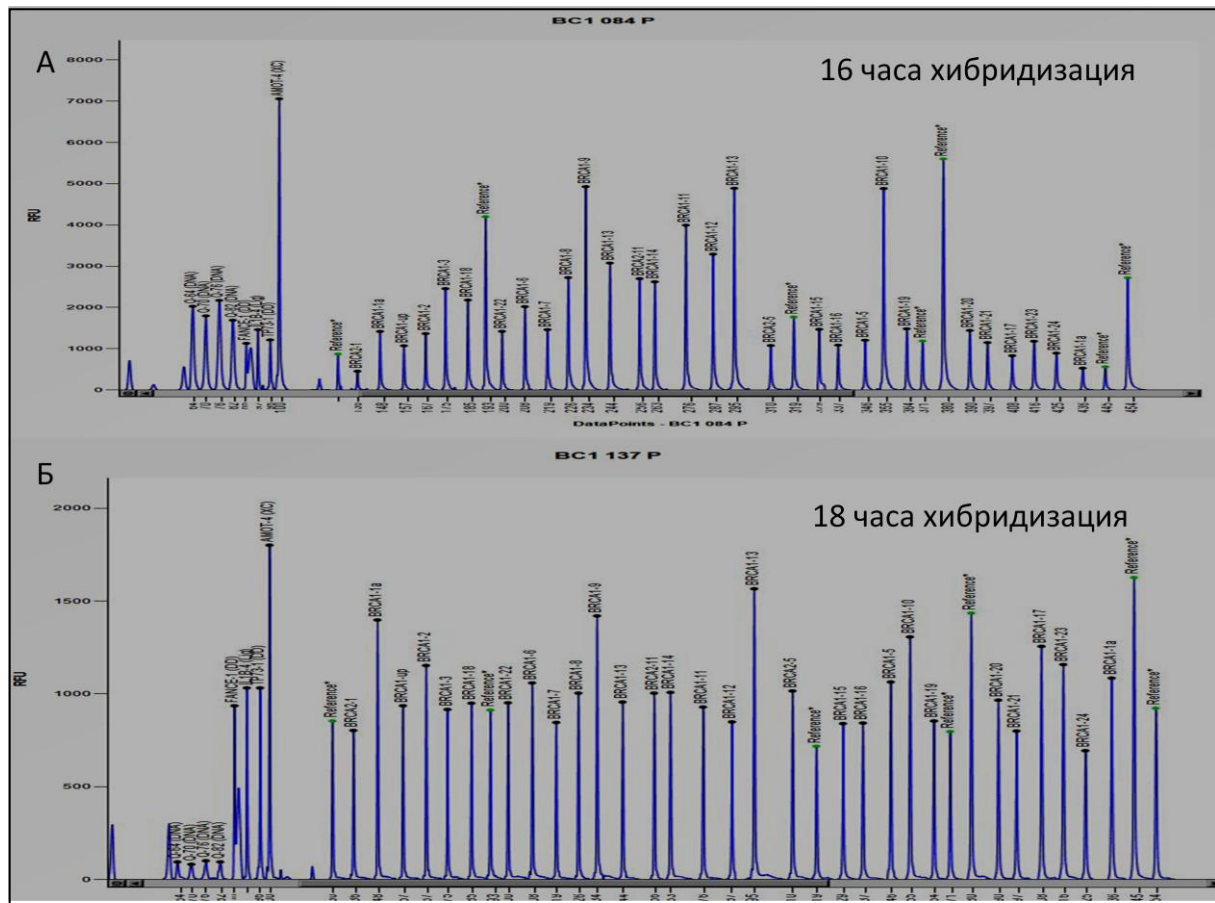


Фигура 24. Оптимизация на концентрацията на матричната ДНК и интензитета на пиковите при 50ng/μl и 100ng/μl ДНК за 30 μl общ обем на реакционната смес

Оптимизиране на условията на капилярната електрофореза. С цел предотвратяване разцепване на пиковите на отделните фрагменти бяха варирани параметрите на капилярната електрофореза и количествата на използваните реагенти (*таблица 17*). 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. За оптимално количество в настоящия анализ беше определен 1 μl PCR продукт, при използване на реагентите, показани в *таблица 17*.

Таблица 17. Настройка на параметрите на капилярната електрофореза и оптимизиране на количествата на използваните реагенти.

Използвани реагенти	PCR реакция Молекулен стандарт LIZ Формаид	1 μl 0,5 μl 10,5 μl
Настройки на капилярната електрофореза	Волтаж на инжектиране на пробата Време на разделяне	10 kV 19 sec



Фигура 25. Оптимизация на времето на хибризационната реакция при MLPA анализа. А. Електрофореграма след 16 ч. хибризация на сондите. Б. Електрофореграма след 18 ч. хибризация на сондите.

5.3. 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 фамилените случаи на рак на гърдата (Balman J et al, 2010). Честотата на *BRCA1/2* мутациите при пациентите с рак на гърдата без фамилен анамнез 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 (“nonsense”), предизвикващи появата на преждевременен стоп кодон и синтез на скъсен белтъчен продукт. Този тип мутации са около 70% при *BRCA1* гена и 90% при *BRCA2* гена (Narod SA et al, 2010). Друга част от докладваните мутации 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, избрани 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 18).

Таблица 18. 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
IFD		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 електронните източници по отношение на заболяването. Ефектът на откритите мутации е показан на **таблицы 19, 20 и 21.**

Таблица 19. 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	ВIC * номенклатура	HGVS* номенклатура	Протеинова номенклатура	Протеиновд омен
FS*	rs80357609	3819del5	c.3700_3704delGTAAA	p.Val1234Glnfs	-
FS	rs80357862	5149del4	c.5030_5033delCTAA	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

Резултати

FS	rs80359530	5946delCT	c.5718_5719delCT	p.Leu1908Argfs	-
FS	rs80359686	8138del5	c.7910_7914delCCCTTT	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_5403delCCCTTGG	p.Thr1799delins	BRCT2
FS	-	8760delAA	c.8532_8533delAA	p.Glu 2844Alafs	Tower
FS	-	9908delA	c.9982delA	p.Gln3227fs	-

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

Таблица 20. 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	ВIC 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

Резултати

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	-

Таблица 21. 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 insGTATTCCAATCC
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

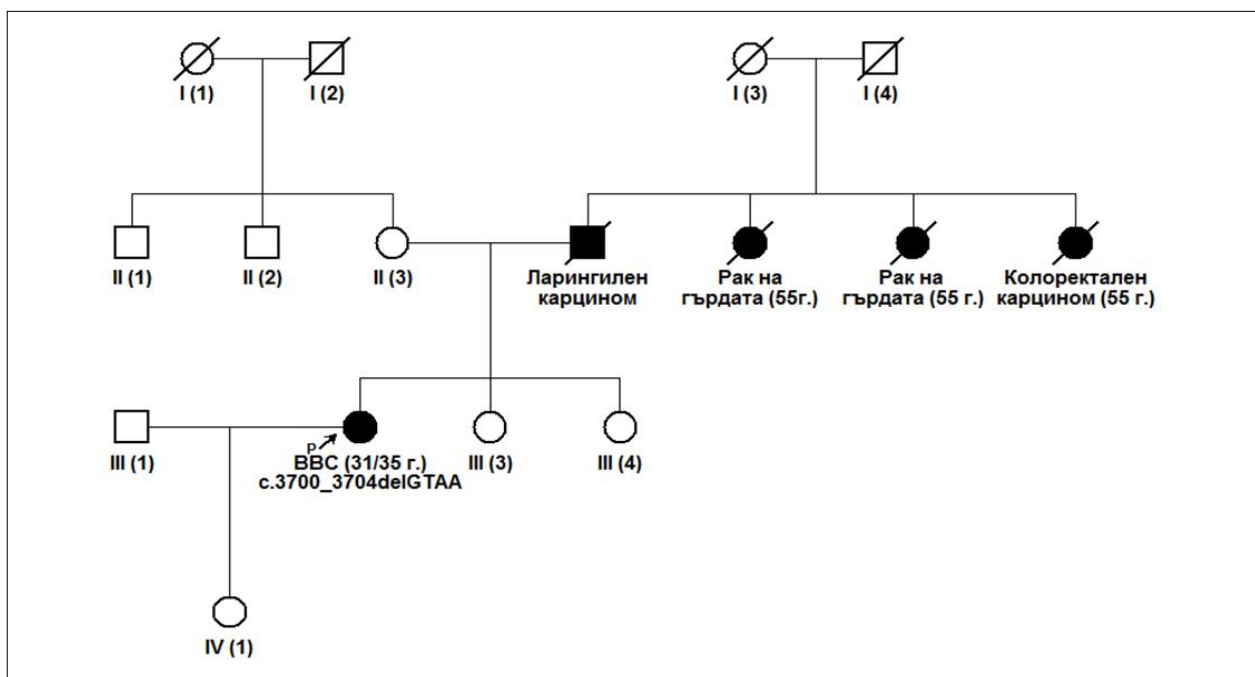
* IVS – интронен вариант

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

5.3.1.1. Патогенни мутации в *BRCA1* гена

От общия брой открити варианти 5 (с.3700_3704delGTAAA, с.5030_5033delCTAA, с.5263_5264insC, с.4603G>T и с.181T>G) в *BRCA1* гена и 5 (с.5851_5854delAGTT, с.5946delT, с.5718_5719delCT, с.7910_7914delCCTTT и с.9098_9099insA) *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) пациенти от изследваната група, съответно 13% (26/200) в *BRCA1* гена и 4.5% (9/200) в *BRCA2* гена. От установените патогенни мутации 8 бяха от типа изместване рамката на четене (frameshift), една безмислена (nonsense/stop gain) и една от тип промяна на смисъла (missense) (**таблица 19**).

-с.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. Пациентката е направила рецидив на заболяването, две години след поставяне на диагнозата. По отношение на фамилната анамнеза, по бащина линия четирима родственика са развили онкологични заболявания: баща, починал от ларингиален карцином, две лели, развили рак на гърдата и една - на колона, **фигура 26**.



Фигура 26. Родословие на пациентка BC176

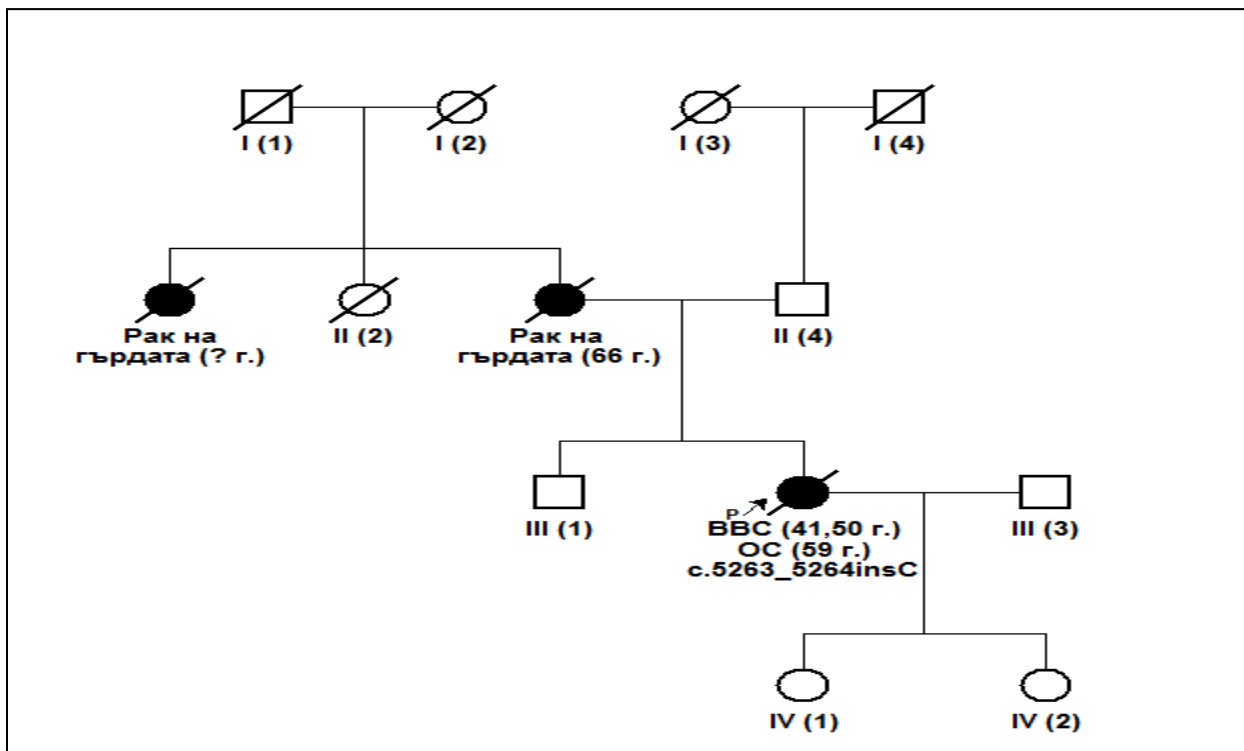
Резултати

- с. 5030_5033delCTAA (5149del4), rs80357862. Мутацията е локализирана в екзон 17 на *BRCA1* гена и е причинена от делеция на четири нуклеотида на позиции между 5030 и 5033 в кодиращата последователност на ДНК, съответно кодони 1677 и 1678 (ACT, AAT/AXT) (таблица 19). 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.

- с.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) (таблица 19). Така установеният вариант води до появата на стоп кодон в позиция 1829 и до синтеза на по-къс белтъчен продукт.

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).

От пациентките с фамилна история за рак на гърдата, носителки на - с.5263_5264insC, една е с диагноза билатерален карцином, като един от туморите е показал тройно негативен рецепторен профил; три от пациентките имат тройно негативен карцином и три - ранно начало. От пациентките с ранно начало четири са тройно негативни и една в последствие е развила и овариален карцином *фигура 27*.



Фигура 27. Родословие на пациентка BC152

От пациентките носителки на с.5263_5264insC с билатерален карцином на гърдата, една е показала тройно негативен рецепторен профил, една е развила заболяването на 36 годишна възраст и няма фамилна история и три са само с по един родственик, диагностициран с онкологично заболяване, съответно майка с рак на гърдата (BC164), баба с рак на гърдата (BC003) или вуйчо с рак на панкреаса (BC039). При две от пациентките с тройно негативен карцином, майките им също са развили рак на гърдата, а в последствие са развили и второ онкологично заболяване - на яйчника (BC171) и на дебелото черво (BC161), съответно.

От общата група пациенти с установена мутация с.5263_5264insC, 13 са показали тройно негативен рецепторен профил, седем са развили и овариален карцином за период от 1 до 6 години, а при една пациентка с ранно начало са наблюдавани две независими онкологични събития в гърдите и едно в яйчниците за период от 18 години.

- с.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 (**таблица 19**). Мутацията беше установена при една пациентка (0.5%, 1/200) с тройно негативен карцином на гърдата и ранно начало. В семейството на пациентката по бащина линия има три случая на онкологични заболявания, дядо с белодробен карцином, баба с рак червата и чичо с рак на костите, всичките развили се след 60 годишна възраст.

- с.181T>G (*C61G*), *rs28897672*. Мутацията е локализирана в 5-ти екзон на *BRCA1* гена и води до замяна на тимин с гуанин (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 „missense” е локализиран в Ring Finger домена и води до нарушение на убиквитин лигазната активност на белтъка (**таблица 19**).

Мутацията беше установена при две пациентки (1%, 2/200): една с билатерален рак на гърдата и развил се на по-късен етап овариален карцином и друга с ранно начало на фамилен рак на гърдата и тройно негативен рецепторен профил.

5.3.1.2. Патогенни мутации в *BRCA2* гена

- с.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 19**). 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. Едната носителка на с.5851_5854delAGTT има множество случаи на онкологични заболявания по майчина линия, а втората е с тройно негативен рак на гърдата.

- с.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 (**таблица 19**). Така установеният

Резултати

вариант води до появата на стоп кодон в позиция 2003 и до синтеза на по-къс белтъчен продукт. Мутацията беше установена при една пациентка (0.5%, 1/200) с еврейски произход и фамилен рак на гърдата по майчина линия, развила в следствие и овариален карцином.

- *c.5718_5719delCT (5946delCT), rs80359530*. Тази мутация, подобно на двете, описаните по-горе *BRCA2* делеции, е локализирана в екзон 11 (участък N) (**таблица 19**). 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.

Мутацията *c.5718_5719delCT* беше установена при една пациентка (0.5%, 1/200) с хормон позитивен карцином на гърдата и два случая на онкологични заболявания по майчина линия - дядо с ларингиален карцином и баба, вероятно починала от меланом.

- *c.7910_7914delCCTTT (8138del5), rs80359686*. Тази мутация е локализирана в екзон 17 на *BRCA2* и е причинена от делеция на пет нуклеотида между позиции 7910 и 7914 в кодиращата последователност, кодон 2638 (**таблица 19**). Така установената мутация води до появата на стоп кодон в позиция 2639 и до синтеза на по-къс белтъчен продукт. Мутацията беше установена при едно семейство (0.5%, 1/200), в което носителки са две първи братовчедки с билатерален карцином и ранно начало (**приложение 5**).

- *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 (**таблица 19**). Тя води до появата на стоп кодон в позиция 3034 и до синтеза на по-къс белтъчен продукт. Този патогенен вариант беше установен при общо четири пациентки (2%, 4/200) с хормон зависим фамилен карцином на гърдата с двама или повече родственици, диагностицирани с онкологични заболявания (**приложение 5**).

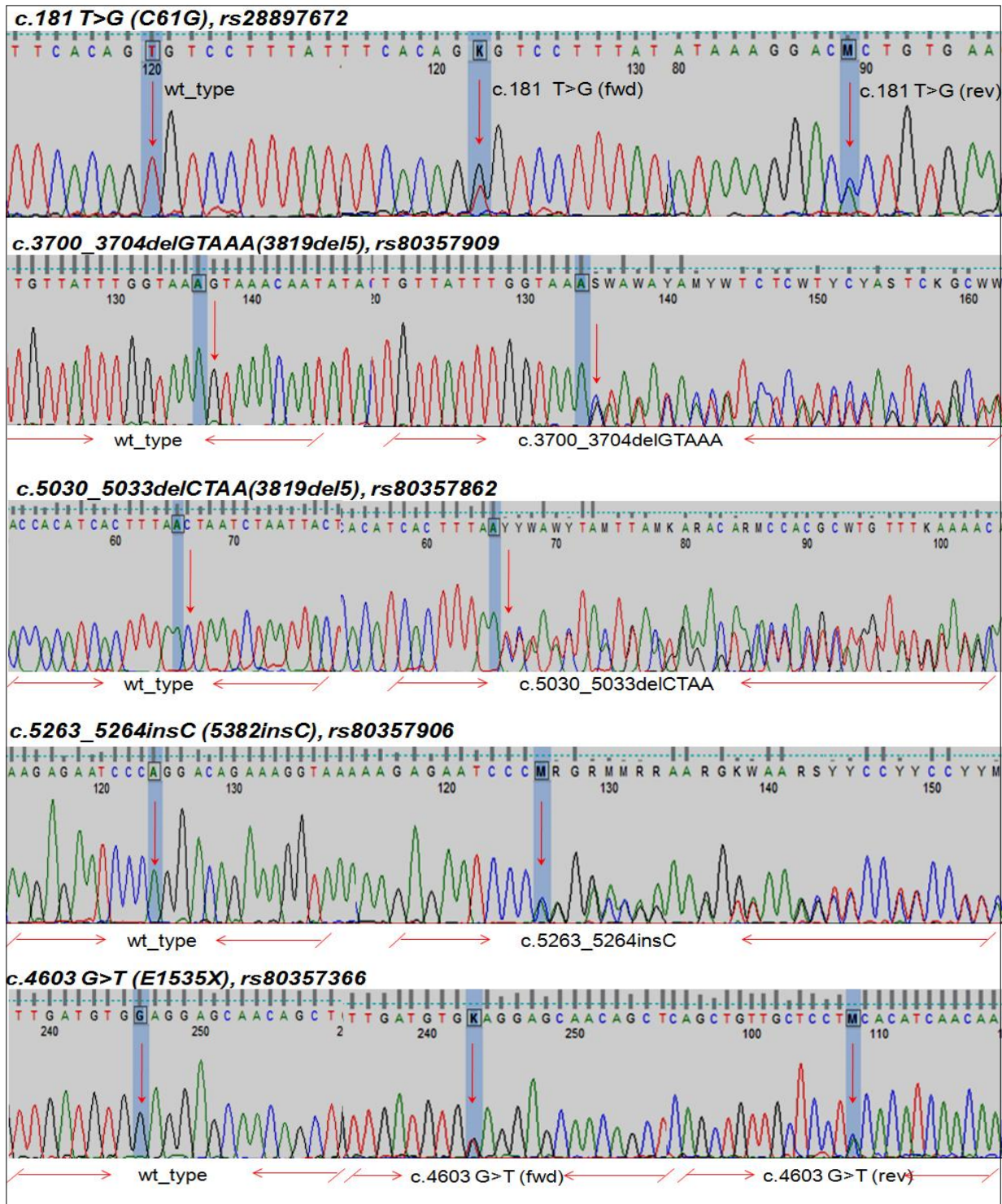
5.3.2. Нови варианти, които не са докладвани в литературните и електронните източници, но са от тип, който се очаква да доведе до заболяване

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 (**таблица 19**).

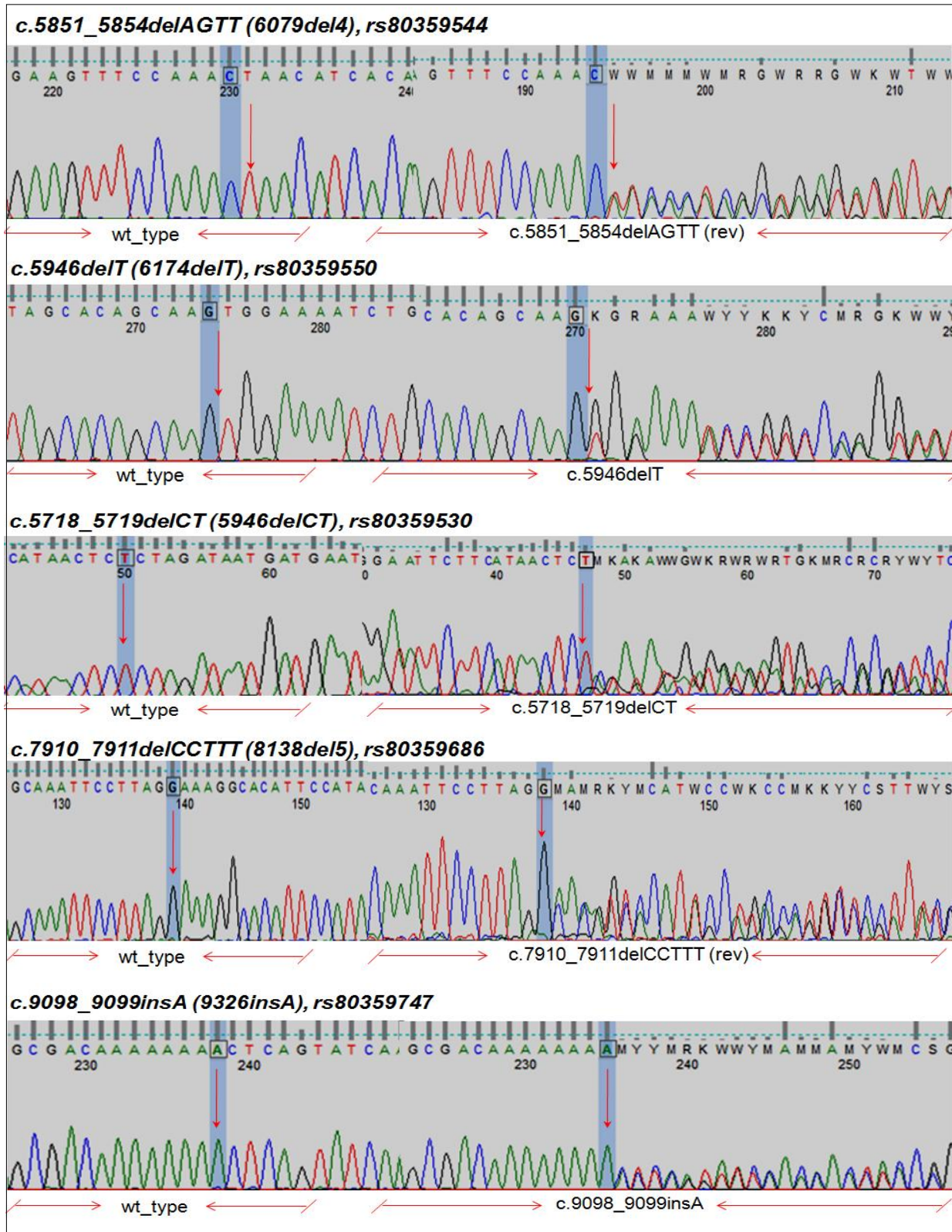
- *c.464delA (583delA)*. Установената мутация е локализирана в 8 екзон на *BRCA1* гена и се дължи на делеция на аденин (CA/A/CA-) в позиция 464 в кодиращата последователност на ДНК, кодон 155 (p.Glu155Fs). Тя води до появата на стоп кодон в позиция 162 и синтеза на скъсен белтъчен продукт без NLS сигнал, SQ клъстер и BRCT домени, което определя нейния патогенен характер (**фигура 28**).

Вариантът беше установен при пациентка с ранно начало на тройно негативен карцином на гърдата, фамилна история за рак на гърдата 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 белодробен карцином, леля с рак на гърдата (54 години), баба по бащина линия с рак на гърдата (45 години) и сестра на бабата също с рак на гърдата (54 години) (**приложение 6**).

При последвалия анализ за носителство на мутацията в семейството, установеният от нас вариант беше открит и при четири здрави родственици - сестрата и двамата синове на пробанда.



Фигура 28. Електрофореграми на пациенти, носители на патогенни мутации в BRCA1 гена. Анализът е извършен с помощта на секвенатор ABI Prism 3130 xl (Applied Biosystems).



Фигура 29. Електрофореграми на пациенти, носители на патогенни мутации в BRCA2 гена. Анализът е извършен с помощта на секвенатор ABI Prism 3130 xl (Applied Biosystems).

- *c.5397_5403delCCCTTGG (5517del7)*. Тази делеция е локализирана в 22-ри екзон на *BRCA1* гена и е следствие от загуба на 7 нуклеотида между позиции 5397 и 5403 в кодиращата последователност на ДНК, кодон 1799 (*таблица 19*). 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.

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 новообразуване, и до този момент не е докладвана в специализираните литературни и електронни източници.

- *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. Мутацията беше открита при пациентка с билатерален карцином на гърдата, развил се на 37 годишна възраст. Тя беше установена и при майката на пациентката, която също е диагностицирана с билатерален карцином на гърдата на 37 и 48 годишна възраст (*приложение 6*).

- *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. Вариантът беше установен при пациентка с билатерален карцином на гърдата, за която няма налична клинична и информация за фамилната история. Това не позволи да бъде направен сегрегационен анализ в семейството.

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

Примери за варианти с неясен клиничен ефект са варианти, локализирани в “splice” места, най-вероятно засягащи транскрипцията, варианти от типа промяна на смисъла (missense) и инсерции/делеции в рамката на четене (IFD/IFI – in frame deletions/ insertions), но за които връзката с патогенезата на заболяването не е изяснена. Наблюдаваните варианти от тази група в настоящото проучване бяха основно от типа промяна на смисъла (missense) и делеции/ инсерции в рамката на четене (IFD/IFI – in frame deletions/ insertions).

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 20*).

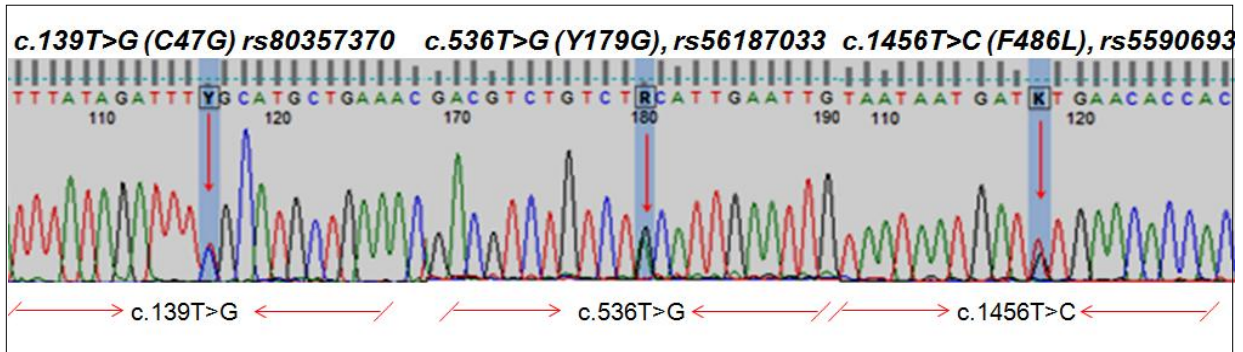
5.3.3.1. Варианти с неясно клинично значение от тип промяна на смисъла в *BRCA1* гена

- *c.139T>G (C47G), rs80357370*. Вариантът е от тип промяна на смисъла и е локализиран в 5 екзон на *BRCA1* гена. Води до замяна на тимин с гуанин (TGT/GGT) в позиция 139 от кодиращата последователност, което води до синтеза на аминокиселината глутамин вместо на цистеин (p.Cys47Gly) в 47-ви кодон. Установеният вариант е локализиран в Ring Finger домена на белтъка и води до нарушение на убиквитин лигазната му активност, което е доказано с функционален анализ в клетъчни култури. Той вероятно е с патогенен ефект за развитието на заболяването. Хетерозиготните носители (T/G) на варианта C47G са 0.02% в световен мащаб, съответно 99.8% са носителите на А алел и 0.01% са носителите на G алел. Вариантът беше установен при една пациентка с ранно начало на заболяването (33 години) и тройно негативен рецепторен профил (**таблица 20**).

- *c.536A>G (Y179C), rs56187033; c.1456T>C (F486L), rs55906931 и c.1648A>C (N550H), rs56012641*. И трите варианта са от тип промяна на смисъла. Y179C е локализиран в 8-ми екзон *BRCA1* гена и е причинен от замяна на аденин с гуанин (TAC/TGC) в позиция 536 на кодиращата последователност, което води до синтеза на аминокиселината цистеин вместо тирозин в кодон 179 (p.Tyr179Cys). Другите два варианта F486L и N550H са локализирани в екзон 11 на *BRCA1* гена, съответно при F486L е налице замяна на тимин с цитозин, и синтеза на левцин вместо фенилаланин в кодон 486 (p.Phe486Leu), докато при N550H има замяна на аденин с цитозин и синтез на хистидин вместо аспаргин в кодон 550 (p.Asn550His). И трите замени бяха установени при една пациентка (0.5%, 1/200) с рак на гърдата, развил се на 49 годишна възраст с фамилна история на заболяването – сестра, починала от рак на гърдата на 42 годишна възраст. При проведения анализ за наличието на установените варианти с неясно клинично значение е родственици на пациентката, те бяха открити при една от дъщерите на пациентката и при нейната племенница.

- *c.736T>G (L246V), rs28897675*. Установеният вариант е от тип промяна на смисъла и е локализиран в екзон 11 на *BRCA1* гена. Той е следствие от замяна на тимин с гуанин (TTG/GTG) в позиция 736 на кодиращата последователност, което води до синтеза на аминокиселината левцин вместо валин в кодон 246 (p.Leu246Val). Замяната беше установена при една пациентка с билатерален карцином на гърдата, диагностициран на 43 годишна възраст и фамилна история за онкологични заболявания. В семейството на пациентката по бащина линия леля, сестра на бащата, е развила рак на гърдата на 45 годишна възраст.

- *c.3999T>C (V1333A)*. Така установеният вариант до този момент не е съобщен в специализираните литературни и електронни източници. Причинен е от замяна на тимин с цитозин (GTT/GCT) в позиция 3999 на кодиращата последователност в екзон 11 на *BRCA1* гена. 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 по бащина линия (61 години), майка (48 години) и две лели са развили рак на гърдата.



Фигура 30. Електрофореграми на „missense”варианти c.139T>G, c.536T>G и c.1456T>C в BRCA1 гена. Анализът е извършен с помощта на секвенатор ABI Prism 3130 xl (Applied Biosystems)

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 22*).

Таблица 22. Оценка на патогенния ефект на установените VUS от типа „missense” в BRCA1 гена с помощта на програми Sift, Polyphen2 и Provean

Вариант с неясно клинично значение	Оценка на predispoziciata		
	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

5.3.3.2. Варианти с неясно клинично значение от тип промяна на смисъла в *BRCA2* гена

- c.978C>A(S326R), rs28897706. Установеният вариант е от тип промяна на смисъла. Локализиран е в екзон 10 на *BRCA2* гена и е причинен от замяна на цитозин с аденин (AGC/AGA) в позиция 978 на кодиращата последователност, което води до синтеза на аминокиселината аргинин вместо на серин в кодон 326 (p.Ser326Arg). Тази замяна е установена в азиатски популации с честота на редкия алел 12.5%, а на хетерозиготните носители са 25% (www.ncbi.nlm.nih.gov, L58). В изследваната група от български пациентки с рак на гърдата и контроли, честота на редкия алел (A) беше 1% (4/370), а хетерозиготните също бяха 1% (2/200). Вариантът беше установена при три пациентки от изследваната група: две хетерозиготни носителки (C/A) и една хомозиготен носител на редкия алел. Хетерозиготните носителки бяха с билатерален

карцином на гърдата и фамилна история за онкологични заболявания, докато за хомозиготната носителка на редкия алел нямаше данни за клиничната характеристика и фамилността (**таблица 20**).

- *c.3515C>T (S1172L), rs80358600*. Установеният вариант е от тип промяна на смисъла и е локализиран в екзон 11 на *BRCA2*. Той е причинен от замяна на цитозин с тимин (CG/TTG) в позиция 3515 от кодиращата последователност и води до синтеза на аминокиселината серин вместо левцин в кодон 1172 (p.Ser1172Leu). Вариантът беше установен при носителка на патогенна мутация в *BRCA1* гена, *c.5263_5264insC (5382insC)*. По отношение на клиничните характеристики пациентката е развила билатерален карцином на гърдата на 42 годишна възраст, като един от карциномите е с тройно негативен рецепторен профил. По отношение на фамилната анамнеза в семейството на пациентката бабата и сестрата на бабата по бащина линия са диагностицирани с рак на гърдата на възраст 76 години и 81 години, съответно.

- *c.6100C>T (R2034C), rs1799954*. Установеният вариант е от тип промяна на смисъла и е локализиран в екзон 11 на *BRCA2* (**таблица 20**). Причинен е от замяна на цитозин с тимин (CGT/TGT) в позиция 2034 на кодиращата последователност и води до синтеза на аминокиселината цистеин вместо аргинин в кодон 2034 (p.Arg2034Cys). В европейските популации хетерозиготните носители (C/T) са с честота 3.6%, а честотата на минорния алел (T) е 1.8% (www.ncbi.nlm.nih.gov, L59). Вариантът беше открит при пациентка с ранно начало на рак на гърдата, развил се на 34 годишна възраст и с установена патогенна мутация в *BRCA1* гена - *c.5263_5264insC (5382insC)*.

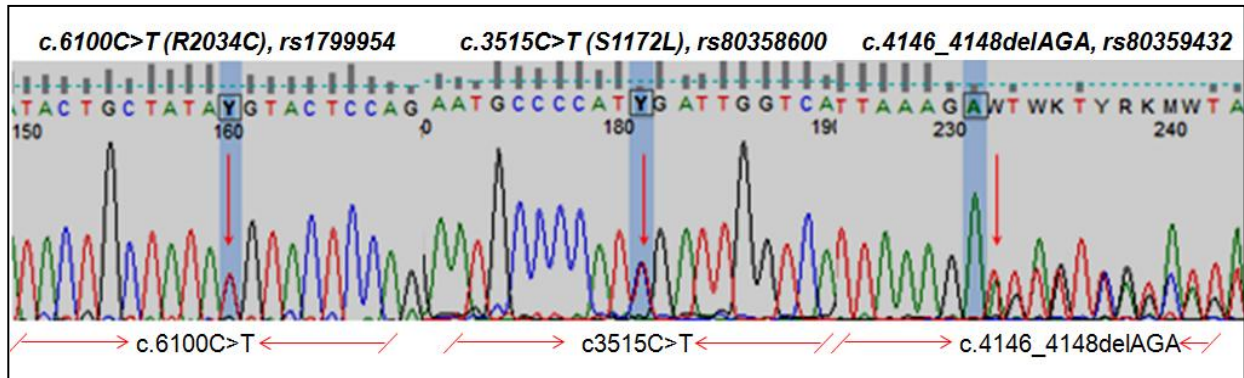
- *c.6322C>T (R2108C), rs55794205*. Този вариант е от тип промяна на смисъла и е локализиран в екзон 11 на *BRCA2*. Той е причинен от замяна на цитозин с тимин (CGT/TGT) в позиция 6322 на кодиращата последователност и води до синтеза на аминокиселината цистеин вместо аргинин в кодон 2108 (p.Arg2108Cys). В европейските популации хетерозиготните носители (C/T) са с честота 0.2 %, а честотата на минорния алел (T) е 0.1% (www.ncbi.nlm.nih.gov, L60). Вариантът беше установен при тройно негативна пациентка, чиято сестра е починала от колоректален карцином на 26 годишна възраст (**таблица 20**).

- *c.7469T>C (I2490T), rs11571707*. Установеният вариант е от тип промяна на смисъла. Локализиран е в екзон 15 на *BRCA2* гена и е причинен от замяна на тимин с цитозин (ATA/ACA) в позиция 7469 на кодиращата последователност, което води до синтеза на аминокиселината треонин вместо изолевцин в кодон 2490 (p.Leu2490Thr). Той беше установен при пациентка с ранно начало на хормон-зависим карцином на гърдата.

- *c.9104A>C (Y3035S), rs80359165*. Установеният вариант е от типът промяна на смисъла и е локализиран в екзон 23 на *BRCA2*. Причинен е от замяна на аденин с цитозин (TAT/TCT) в позиция 9104 на кодиращата последователност и води до синтеза на аминокиселината серин вместо тирозин в кодон 3035 (p.Tyr3035Ser). *c.9104A>C* беше установен при две пациентки, една с ранно начало на рак на гърдата, развил се на 34 години и втора с билатерален карцином на гърдата, диагностициран на 43 годишна възраст.

-*c.4146_4148delAGA (E1382del3), rs80359432*. Установеният вариант представлява делеция на три нуклеотида (GAA_GAT/GAXXXT) в позиции от 4146 до

4148 на кодиращата последователност и се класифицира като делеция в рамката на четене, кодон 1382 (p.Glu1382del). Вариантът вероятно не води до промяна на дължината и функцията на белтъка, поради което не може категорично да се свърже с предразположение към развитие на заболяването. Той беше установен при пациентка с тройно негативен карцином на гърдата.



Фигура 30. Електрофореграми на „missense”варианти c.6100C>T, c.3515C>T и c.4146_4148delAGA в BRCA2 гена. Анализът е извършен с помощта на секвенатор ABI Prism 3130 xl (Applied Biosystems)

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 23).

Таблица 23. 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 predisпозицията		
	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

5.3.4. Варианти, които са с честота по-висока от 2% в изследваната извадка и вероятно не оказват ефект за развитието на рак на гърдата.

Откритите варианти от тази група се причисляват към клас 2: *Варианти, които вероятно не са с патогенен ефект според класификацията на VIC* (www.research.nhgri.nih.gov, L61). В изследваната група пациенти бяха установени 12 (8

в *BRCA1* и 4 в *BRCA2* гена) варианта от тип промяна на смисъла („missense”) с честота по-висока от 2% (**таблица 20**).

- *c.1067A>G (Q356R), rs1799950*. Установеният вариант е локализиран в екзон 11 на *BRCA1* гена и е причинен от замяна на аденин с гуанин (CAG/CGG) в позиция 1067 на кодиращата последователност, което води до синтеза на аминокиселината аргинин вместо на глутамин в кодон 356 (p.Gln356Arg). Честотата на редкия G алел в изследваната група пациенти беше 7.2% и с 2.3% по-висока от отчетената в европейските популации, където докладваната честота е 4.9% (www.ncbi.nlm.nih.gov, L62). При направения анализ за носителство на варианта в здрави контроли честота на G алела беше 5.6%.

- *c.2077G>A (D693N), rs4986850*. Този вариант е локализиран в екзон 11 на *BRCA1* гена и е причинен от замяна на гуанин с аденин (GAC/AAC) в позиция 2077 на кодиращата последователност, което води до синтеза на аминокиселината аргинин вместо на аспарат в кодон 693 (p.Asp693Asn). Честотата на редкия алел в изследваната група пациенти беше 6.5% - с 3.2% по-ниска от тази отчетена в европейските популации, където докладваната честота е 9.7% (www.ncbi.nlm.nih.gov, L63). При направения анализ за носителство на варианта в здрави контроли честота на A алела беше 8.5% (**таблица 20**).

- *c.2612C>T (P871L), rs799917*. Вариантът е локализиран в екзон 11 на *BRCA1* гена и е причинен от замяна на цитозин с тирозин (CCG/CTG) в позиция 2612 на кодиращата последователност, което води до синтеза на аминокиселината левцин вместо на пролин в кодон 871 (p.Pro871Leu). Честотата на мутантния C алел в изследваната група пациенти беше 35% и е почти еднаква с отчетената в европейските популации, където докладваната честота е 33.6% (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, L64). При направения анализ за носителство на варианта в здрави контроли честота на C алела беше 41.2%.

- *c.3113A>G (E1038G), rs16941*. Установеният вариант е локализиран в екзон 11 на *BRCA1* гена и е причинен от замяна на аденин с гуанин (GAA/GGA) в позиция 3113 на кодиращата последователност, което води до синтеза на аминокиселината глицин вместо на глутамат в кодон 1038 (p.Glu1038Gly). Честотата на редкия G алел в изследваната група пациенти беше 33.5% и е почти еднаква с отчетената в европейските популации, където докладваната честота е 35.8%. При направения анализ за носителство на мутацията в здрави контроли честота на G алела беше 36% (www.ncbi.nlm.nih.gov, L65).

- *c.3119G>A (S1040N), rs4986852*. Този вариант е локализиран в екзон 11 на *BRCA1* гена и е причинен от замяна на гуанин с аденин (AGC/AAC) в позиция 3119 на кодиращата последователност, което води до синтеза на аминокиселината аспаргин вместо серин в кодон 1040 (p.Ser1040Asn). Честотата на редкия A алел в изследваната група пациенти беше 2.3% и е с 3.5% по-ниска от отчетената в европейските популации, където докладваната честота е 5.8% (www.ncbi.nlm.nih.gov, L66). При направения анализ за носителство на варианта в здрави контроли честота на A алела беше 2.8%.

- *c.3548A>G (K1183R), rs16942*. Установеният вариант е локализиран в екзон 11 на *BRCA1* гена и е причинен от замяна на аденин с гуанин (AAA/AGA) в позиция 3548

Резултати

на кодиращата последователност, което води до синтеза на аминокиселината аргинин вместо на лизин в кодон 1183 (p.Lys1183Arg). Честотата на редкия А алел в изследваната група пациенти беше 33.9% и е почти еднаква с отчетената в европейските популации, където докладваната честота е 33.2%. При направения анализ за носителство на мутацията в здрави контроли честота на А алела беше 35.5% (www.ncbi.nlm.nih.gov, L67).

- c.4837A>G(S1613G), rs1799966. Този вариант е локализиран в екзон 16 на *BRCA1* гена и е причинен от замяна на аденин с гуанин (AGT/GGT) в позиция 4837 на кодиращата последователност, което води до синтеза на аминокиселината глицин вместо на серин в кодон 1613 (p.Ser1613Gly). Честотата на редкия А алел в изследваната група пациенти беше 32.2% и е почти еднаква с отчетената в европейските популации, където докладваната честота е 31.4%. При направения анализ за носителство на мутацията в здрави контроли честота на А алела беше 33,90% (www.ncbi.nlm.nih.gov, L68).

- c.4956G>A (M1652I), rs1799967. Вариантът е локализиран в екзон 16 на *BRCA1* гена и е причинен от замяна на аденин с гуанин (ATG/ATA) в позиция 4956 на кодиращата последователност, което води до синтеза на аминокиселината изолевцин вместо на метионин в кодон 1652 (p.Met1652Ile). Честотата на редкия G алел в изследваната група пациенти беше 3.6% и е с 3.1% по-висока от отчетената в европейските популации, където докладваната честота е 0.5% (www.ncbi.nlm.nih.gov, L69). При направения анализ за носителство на варианта в здрави контроли честота на G алела беше 1.72%.

- c.1114A>C (N372H), rs144848. Установеният вариант е локализиран в екзон 10 на *BRCA2* гена и е причинен от замяна на аденин с цитозин (AAT/CAT) в позиция 1114 на кодиращата последователност, което води до синтеза на аминокиселината хистидин вместо на аспаргин в кодон 1652 (p.Asn372His). Честотата на мутантния С алел в изследваната група пациенти беше 28.3% и е почти еднаква с отчетената в европейските популации, където докладваната честота е 29.3% (www.ncbi.nlm.nih.gov, L70)

- c.865A>C(N289H), rs766173. Установената мутация е локализирана в екзон 10 на *BRCA2* гена и е причинена от замяна на аденин с цитозин (AAT/CAT) в позиция 865 на кодиращата последователност, което води до синтеза на аминокиселината хистидин вместо на аспаргин в кодон 289 (p.Asn289His). Честотата на редкия С алел в изследваната група пациенти беше 5% и с 1,9% по-висока от отчетената в европейските популации където докладваната честота е 3,1% (www.ncbi.nlm.nih.gov, L71).

- c.2971A>G(N991D), rs1799944. Установеният вариант е локализиран в екзон 11 на *BRCA2* гена и е причинен от замяна на аденин с гуанин (AAC/GAC) в позиция 2971 на кодиращата последователност, което води до синтеза на аминокиселината аспаргат вместо на аспаргин в кодон 991 (p.Asn991Asp). Честотата на редкия G алел в изследваната група пациенти беше 5% и е с 1.9% по-висока от отчетената в европейските популации, където докладваната честота е 3.1% (www.ncbi.nlm.nih.gov, L72).

- c.5744C>T (T1915M), rs4987117. Вариантът е локализиран в екзон 11 на *BRCA2* гена и е причинен от замяна на цитозин с тимин (ACG/ATG) в позиция 5744 на кодиращата последователност, което води до синтеза на аминокиселината метионин

Резултати

вместо треонин в кодон 1915 (p.Thr1915Met). Честотата на редкия С алел в изследваната група пациенти беше 1.7% и е с 3.17% по-ниска от отчетената в европейските популации, където докладваната честота е 3,4% (www.ncbi.nlm.nih.gov, L73). При направения анализ за носителство на варианта в здрави контроли честота на С алела беше 1.6%.

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 24**.

Таблица 24. 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

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

Установените варианти от тази група се причисляват към клас 1: *Варианти, които не са с патогенен ефект според класификацията на VIC* (www.research.nhgri.nih.gov, L61). В изследваната група пациенти бяха установени 26 (10 в *BRCA1* и 16 в *BRCA2* гена). В групата изследвани пациентни установихме 10 различни вида синонимни замени със средна честота 17.25% (между 0.3% и 34,5%) (**таблица 21**).

- c.591C>T (C197C), rs1799965. Установеният вариант е локализиран в екзон 9 на *BRCA1* гена и е причинен от замяна на цитозин с тимин (TGC/TGT) в позиция 591 на кодиращата последователност, кодон 197 (p.Cys197=). Честотата на редкия алел Т в изследваната група пациенти беше 0.6% и е почти еднаква с отчетената в европейските популации, където докладваната честота е 0.2% (www.ncbi.nlm.nih.gov, L74).

- c.2082C>T (S694S), rs1799949. Вариантът е локализиран в екзон 11 на *BRCA1* гена и е причинен от замяна на цитозин с тимин (AGC/AGT) в позиция 2082 на кодиращата последователност, кодон 694 (p.Ser694=). Честотата на редкия алел Т в изследваната група пациенти беше 32.3% и с 4.3% по-висока от отчетената в европейските популации, където докладваната честота е 28% (**таблица 21**).

- c.2311T>C (L7771L), rs16940. Този вариант е локализиран в екзон 11 на *BRCA1* гена и е причинен от замяна на тимин с цитозин (TTG/CTG) в позиция 2311 на кодиращата последователност, кодон 771 (p.Leu771=). Честотата на редкия алел С в изследваната група пациенти беше 23.3% и е с 9.3% по-ниска от отчетената в

Резултати

европейските популации, където докладваната честота е 33.2% (www.ncbi.nlm.nih.gov, L75).

- *c.4308T>A (S1436S), rs1060915*. Установеният вариант е локализиран в екзон 13 на *BRCA1* гена и е причинен от замяна на тимин с аденин (ТСТ/ТСА) в позиция 4308 на кодиращата последователност, кодон 1436 (p.Ser1436=). Честотата на редкия алел А в изследваната група пациенти беше 33.7% и е почти еднаква с отчетената в европейските популации, където докладваната честота е 33.2% (www.ncbi.nlm.nih.gov, L76).

- *c.1365A>G (S455S), rs1801439*. Установеният вариант е локализиран в екзон 10 на *BRCA2* гена и е причинен от замяна на аденин с гуанин (ТГА/ТСГ) в позиция 1365 на кодиращата последователност, кодон 455 (p.Ser455=). Честотата на редкия алел G в изследваната група пациенти беше 3% и е еднаква с отчетената в европейските популации, където докладваната честота е 3.1% (www.ncbi.nlm.nih.gov, L77).

- *c.2229T>C (H743H), rs1801499*. Този вариант е локализиран в екзон 11 на *BRCA2* гена и е причинен от замяна на тимин с цитозин (САТ/САС) в позиция 2229 на кодиращата последователност, кодон 743 (p.His743=). Честотата на редкия алел С в изследваната група пациенти беше 3.5% и е еднаква с отчетената в европейските популации, където докладваната честота е 3.1% (www.ncbi.nlm.nih.gov, L78).

- *c.3396A>G (K1132K), rs1801406*. Вариантът е локализиран в екзон 11 на *BRCA2* гена и е причинен от замяна на аденин с гуанин (ААА/ААГ) в позиция 3396 на кодиращата последователност, кодон 1132 (p.Lys1132=). Честотата на редкия алел С в изследваната група пациенти беше 28.5% и е еднаква с отчетената в европейските популации, където докладваната честота е 25% (www.ncbi.nlm.nih.gov, L79).

- *c.3807T>C (V1269V), rs543304*. Установеният вариант е локализиран в екзон 11 на *BRCA2* гена и е причинен от замяна на тимин с цитозин (ГТТ/ГТС) в позиция 3807 на кодиращата последователност, кодон 1269 (p.Val1269=). Честотата на редкия алел С в изследваната група пациенти беше 18.9% и е със 7.1% по-ниска от отчетената в европейските популации, където докладваната честота е 26% (www.ncbi.nlm.nih.gov, L80).

- *c.5199C>T (S1733S), rs28897734*. Вариантът е локализиран в екзон 11 на *BRCA2* гена и е причинен от замяна на цитозин с тимин (ТСС/ТСТ) в позиция 5199 на кодиращата последователност, кодон 1733 (p.Ser1733=). Честотата на редкия алел Т в изследваната група пациенти беше 0.8% и с 0.4% по-висока от отчетената в европейските популации, където докладваната честота е 0.4% (www.ncbi.nlm.nih.gov, L81).

- *c.7242A>G (S2411S), rs1799955*. Този вариант е локализиран в екзон 14 на *BRCA2* гена и е причинен от замяна на аденин с гуанин (ТСА/ТСГ) в позиция 7242 на кодиращата последователност, кодон 2411 (p.Ser2414=). Честотата на редкия алел G в изследваната група пациенти беше 18.4% и е еднаква с отчетената в европейските популации, където докладваната честота е 19% (www.ncbi.nlm.nih.gov, L82).

При пациентите бяха установени 14 интронни варианти и два варианта в UTR регионите (*таблица 21*).

- *c.-26G>A, rs1799943*. Вариантът е локализиран в UTR-5' на *BRCA2* гена. Честотата на редкия алел А в изследваната група пациенти беше 24.7% и е с 4.8% по-висока от отчетената в европейските популации, където докладваната честота е 19.9% (www.ncbi.nlm.nih.gov, L83).

Резултати

- c.*105A>C, rs15869. Установеният вариант е локализиран в UTR-3' на *BRCA2* гена. Честотата на редкия алел С в изследваната група пациенти беше 18.3% и е с 9.1% по-ниска от отчетената в европейските популации, където докладваната честота е 27.4% (www.ncbi.nlm.nih.gov, L84).

- c.441+36_441+38delCTT(*IVS7+36delCTT*), rs147856441. Вариантът е локализиран на разстояние 36 нуклеотидни бази след края на 7 екзон на *BRCA1* гена. Честотата на хетерозиготните носители на интронния вариант в изследваната група пациенти беше 38.9%.

- c.442-34C>T (*IVS7-34 C>T*), rs799923. Установеният вариант е локализиран на разстояние 34 нуклеотидни бази преди началото на 8 екзон на *BRCA1* гена. Честотата на редкия алел Т в изследваната група пациенти беше 23% и е почти еднаква с отчетената в европейските популации, където докладваната честота е 25.7% (www.ncbi.nlm.nih.gov, L85).

- c.548-58delT(*IVS8-58delT*), rs8176144. Този вариант е локализиран на разстояние 58 нуклеотидни бази преди началото на 9-ти екзон на *BRCA1* гена. Честотата на хетерозиготните носители на интронния вариант в изследваната група пациенти беше 39.3% и е със 7.9% по-висока от отчетената в европейските популации, където докладваната честота е 31.4% (www.ncbi.nlm.nih.gov, L86).

- c.4485-63C>G(*IVS14-63C>G*),rs273900734. Установеният вариант е локализиран на разстояние 63 нуклеотидни бази преди началото на 15 екзон на *BRCA1* гена (**таблица 21**). Честотата на редкия алел G в изследваната група пациенти беше 33% и е почти еднаква с отчетената в европейските популации, където докладваната честота е 32.1% (www.ncbi.nlm.nih.gov, L87).

- c.5075-53C>T(*IVS17-53 C>T*), rs8176258. Този вариант е локализиран на разстояние 53 нуклеотидни бази преди началото на 18-ти екзон на *BRCA1* гена. Честотата на редкия алел G в изследваната група пациенти беше 1% и е с 2.4% по-ниска от отчетената в европейските популации, където докладваната честота е 3,4% (www.ncbi.nlm.nih.gov, L88).

- c.5277+60_5277+61insGTATTCCACTCC(*IVS20+60/61ins12*), rs273901757. Установеният вариант е локализиран на разстояние 60 нуклеотидни бази след края на 20-ти екзон на *BRCA1* гена. Честотата на хетерозиготните носители на интронния вариант в изследваната група пациенти беше 0.5% и до този момент няма информация в базите данни за честота на установения вариант в други европейски популации (www.ncbi.nlm.nih.gov, L89).

- c.425+67A>C (*IVS4+67A>C*), rs11571610. Този вариант е локализиран на разстояние 63 нуклеотидни бази след края на 4 екзон на *BRCA2* гена. Честотата на редкия алел С в изследваната група пациенти беше 4% и е с 1.4% по-висока от отчетената в европейските популации,където тя е 3.1% (www.ncbi.nlm.nih.gov, L90).

- c.425+147G>T (*IVS4+147G>T*), rs4942423. Установеният вариант е локализиран на 147 нуклеотидни бази след края на 4 екзон на *BRCA2* гена. Честотата на редкия алел Т в изследваната група пациенти беше 5% и е с 1.2% по-ниска от отчетената в европейските популации, където докладваната честота е 6.2% (www.ncbi.nlm.nih.gov, L91).

Резултати

- *c.426-89T>C (IVS4-89T>C), rs3783265*. Установеният вариантът е локализиран на разстояние 89 нуклеотидни бази преди началото на 5-ти екзон на *BRCA2* гена. Честотата на редкия алел С в изследваната група пациенти беше 4% и е почти равна на отчетената в европейските популации, където докладваната честота е 3.1% (www.ncbi.nlm.nih.gov, L92).

- *c.681+56C>G (IVS8+56C>T), rs2126042*. Установеният вариант е локализиран на 56 нуклеотидни бази след края на 8 екзон на *BRCA2* гена. Честотата на редкия алел С в изследваната група пациенти беше 18,3% и е с 5% по-висока от отчетената в европейските популации, където тя е 13.5% (www.ncbi.nlm.nih.gov, L93).

- *c.6841+80_6841+83delTTAA (IVS11+80delTTAA), rs11571661*. Този вариант е локализиран на разстояние 83 нуклеотидни бази след края на 11-ти екзон на *BRCA2* гена. Честотата на хетерозиготните носители на интронния вариант в изследваната група пациенти беше 45.9% и е с 16.5% по-висока от отчетената в европейските популации, където тя е 29.4% (www.ncbi.nlm.nih.gov, L94).

- *c.7007+134_7007+135insTTATAAAAAT (IVS13+164 delTTATAAAAAT), rs11571680*. Установеният вариант е локализиран на разстояние 134 нуклеотидни бази след края на 13-ти екзон на *BRCA2* гена. Честотата на хетерозиготните носители на интронния вариант в изследваната група пациенти беше 6.5% и е с 2.1% по-ниска от отчетената в европейските популации, където тя е 8.6% (www.ncbi.nlm.nih.gov, L95).

- *c.7617+28C>A (IVS15+28 C >A)*. Вариантът е локализиран на разстояние 28 нуклеотидни бази след края на 15-ти екзон на *BRCA2* гена и до този момент не е докладван в специализираните литературни и електронни източници (*таблица 21*). Честотата на редкия алел А в изследваната група пациенти беше 10.5%

- *c.7806-14T>C (IVS16-14 T>C), rs9534262*. Този вариант е локализиран на разстояние 14 нуклеотидни бази преди началото на 17 екзон на *BRCA2* гена. Честотата на редкия алел Т в изследваната група пациенти беше 32% и е с 21.5% по-ниска от отчетената в европейските популации, където тя е 53.5% (www.ncbi.nlm.nih.gov, L96).

5.4. 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 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, 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.

Резултати

- 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 (frameshift), 10 варианта от тип промяна на смисъла (missense), 8 синонимни замени (syn), 2 варианта в UTR регионите и 8 интронни варианта (IVS) (*таблица 25*).

Таблица 25. Подбрани варианти в *BRCA1/2* гените за потвърждение с NGS метод

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

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

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 26*).

Таблица 26. Съвпадение на избрани мутации с двата вида секвениране

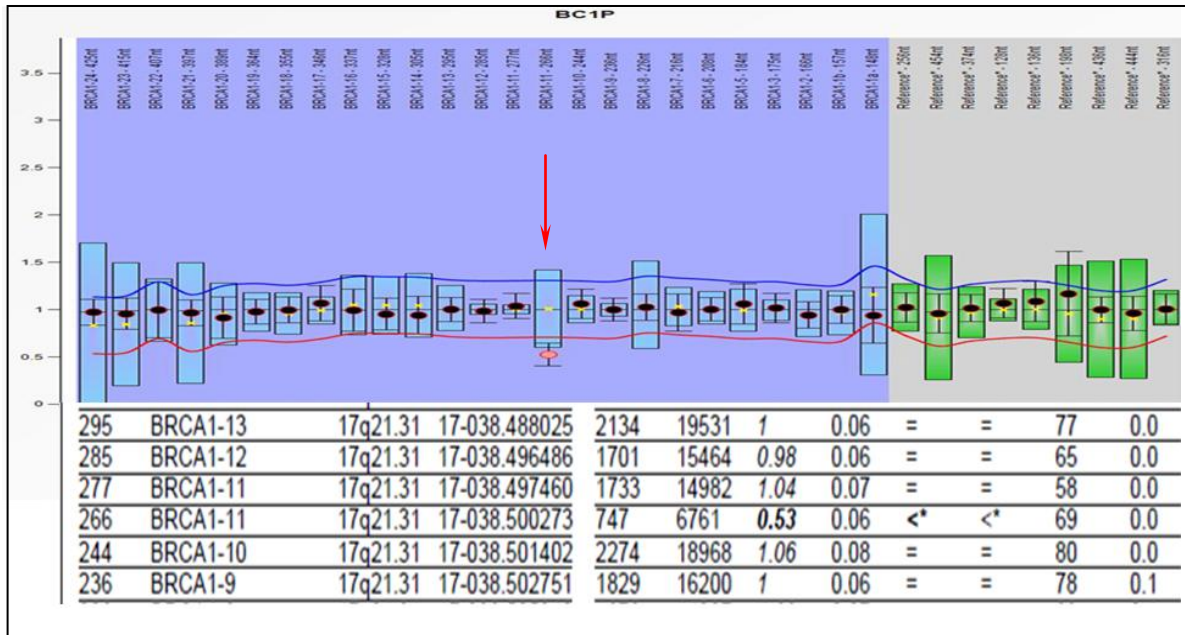
Ген	Мутация	Директно секвениране	NGS
BRCA1	c. 464delA	√	√
BRCA1	c.5263_5264insC	√	√
BRCA2	c.5851_5854delAGTT	√	√
BRCA2	c.5946delT	√	√
BRCA2	c.5718delCT	√	√
BRCA2	c.7910_7914delCCTTT	√	√
BRCA2	c.9908delA	√	√

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

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

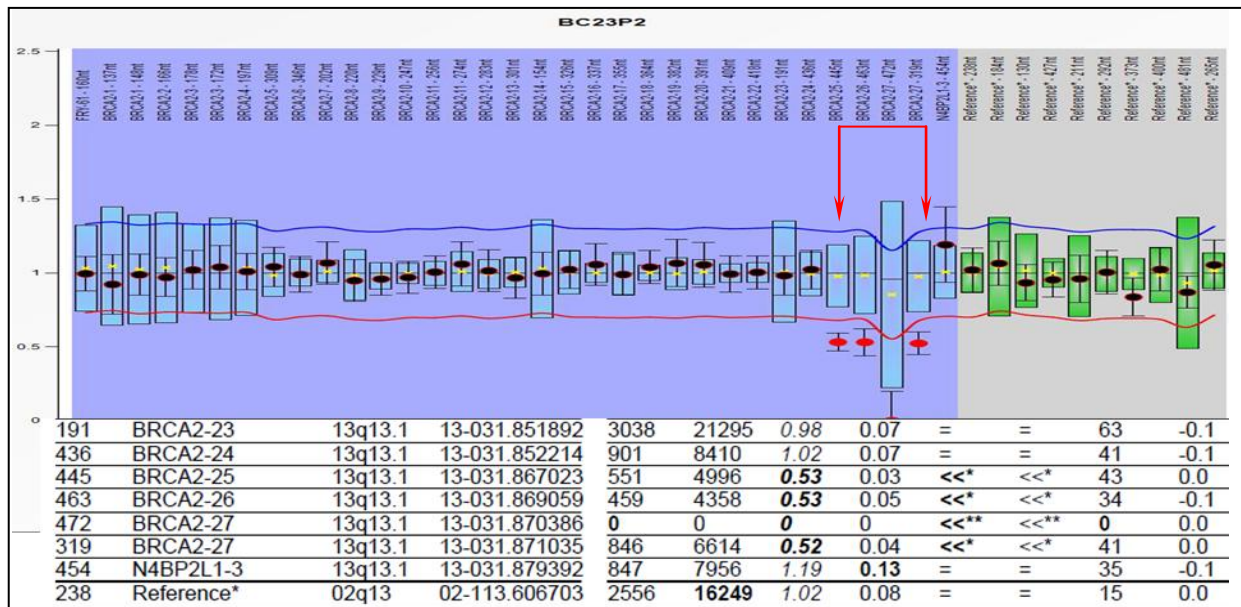
В настоящото изследване за големи делеции и инсерции в *BRCA1/2* гените бяха включени 70 пациентки с рак на гърдата и фамилна история на рак на гърдата и яйчника, при които не бяха установени патогенни мутации чрез директно секвениране. В резултат на проведения MLPA анализ в изследваната от група от 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*.

- *BRCA1 deletion exon 11A*. Делецията на екзон 11A 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 32*.



Фигура. 32: Съотношение между височината на пиковите от електрофореграмата на пациентка BC001. Анализът е проведен с помощта на софтуер Coffalyser.Net

BRCA2 deletion exons 25, 26 and 27. 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 фамилен анамнез по бащина линия – бабата на пробанда по бащина линия също е развила на рак на гърдата на възраст под 50 години, **фигура 33**.



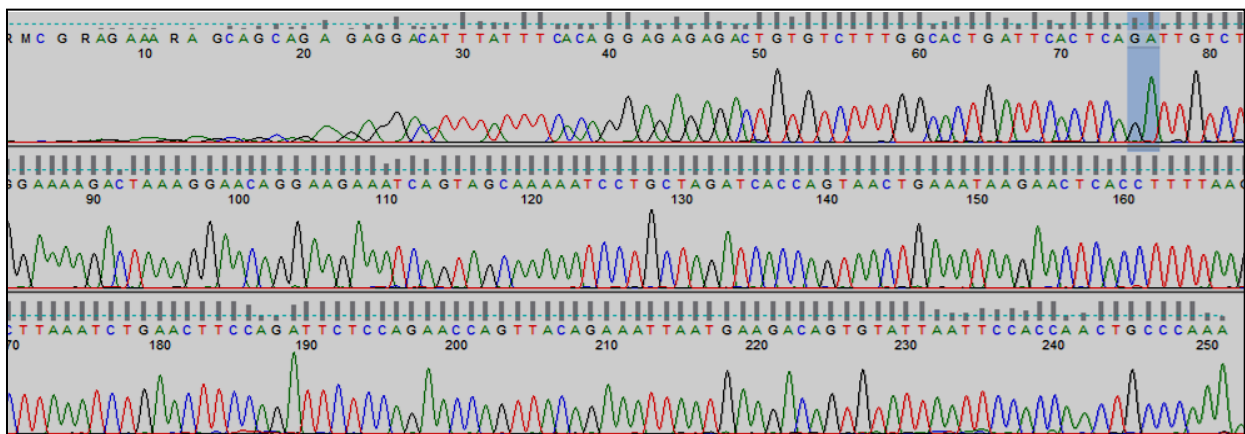
Фигура 33: Съотношение между височините на пиковите от електрофореграмата на пациентка BC023. Анализът е проведен с помощта на софтуер Coffalyser.Net

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

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

-Молекулно-генетичен анализ за носителство на мутацията с.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. Свързването на PALB2 с BRCA2 води до стабилизиране и поддържане хомоложната рекомбинация и до инициране на „Checkpoint“ контрола (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 с.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).

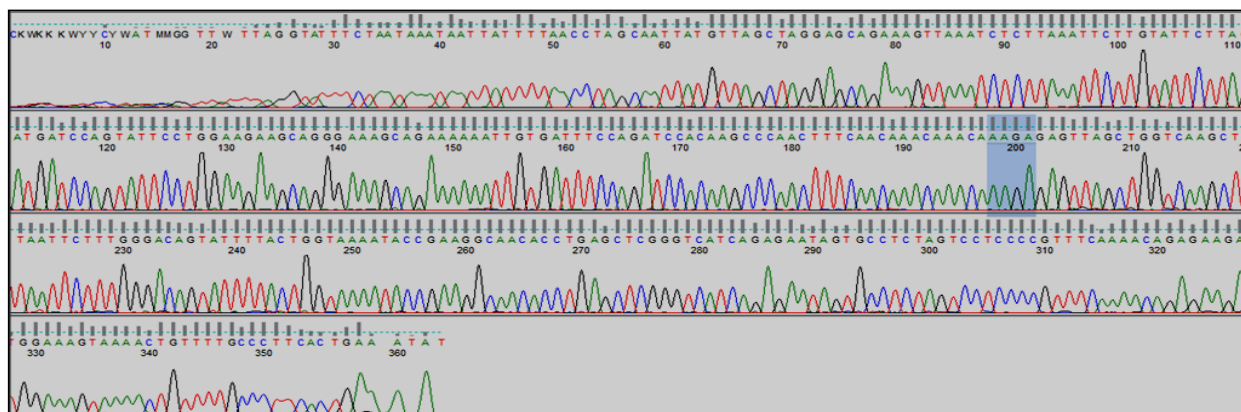
При проведененият молекулярно-генетичен анализ при *BRCA1/2* негативни пациентки с фамилен рак на гърдата не беше установена мутацията с.509_510delGA в *PALB2* гена (*фигура 34*).



Фигура 34. Електрофореграма на нуклеотидна секвенция на екзон 4 на *PALB2* гена, изработена на автоматичен секвенатор ABI Prism 3130 xl Applied Biosystems при оптимални условия на анализа. Със синьо на електрофореграмата е отбелязано мястото на търсената мутация

- Молекулно-генетичен анализ за носителство на мутацията с.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 формираният 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 с.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. Важно е да се отбележи, че мутацията обхваща BRCA1 свързващия домен и се очаква това да се отрази на взаимодействието между BRCA1 и BRIP1 (Cantor SB et al, 2011).

При проведения молекулярно-генетичен анализ при *BRCA1/2* негативни пациентки с фамилен рак на гърдата не беше установена мутацията с.2992-2995delAAGA в *BRIP1* гена, **фигура 35**.



Фигура 35. Електрофореграма на нуклеотидна секвенция на екзон 20 на *BRIP1* гена, изработена на автоматичен секвенатор *ABI Prism 3130 xl Applied Biosystems* при оптимални условия на анализа. Със синьо на електрофореграмата е отбелязано мястото на търсената мутация.

5.7. 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 с предразположение за развитието на рак на гърдата.

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

Генът *FGFR2* кодира рецептор на фибрибластния 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).

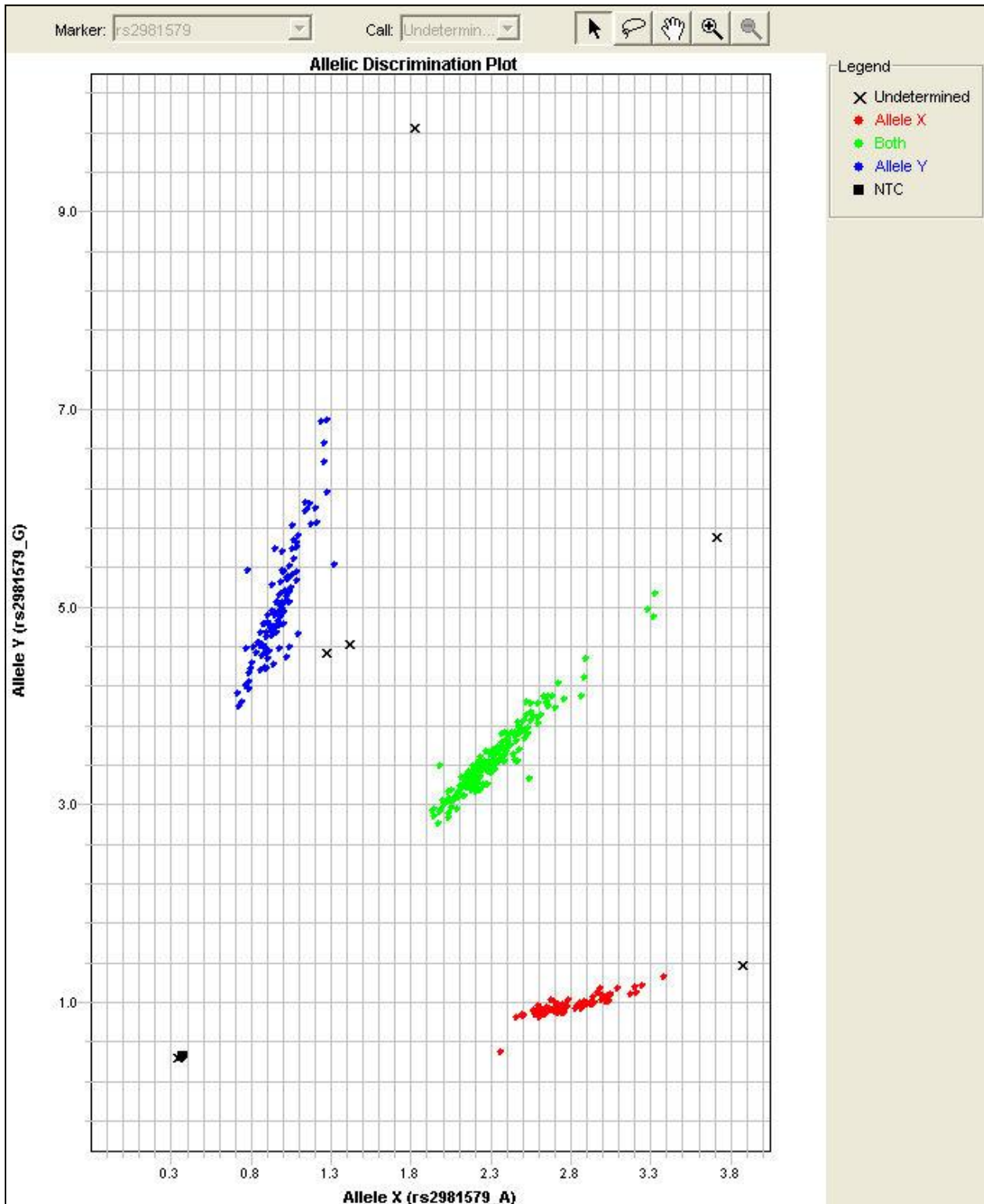
Асоциативното проучване на полиморфните варианти rs2981579 и rs2981582 във *FGFR2* гена при изследваната група от български пациентки с рака на гърдата и контроли потвърди тяхната асоциация с риска от развитие на рак на гърдата (**фигура 36**).

Статистическият анализ на този полиморфизъм показва 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 показва 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 А/А 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 27, фигура 37**).

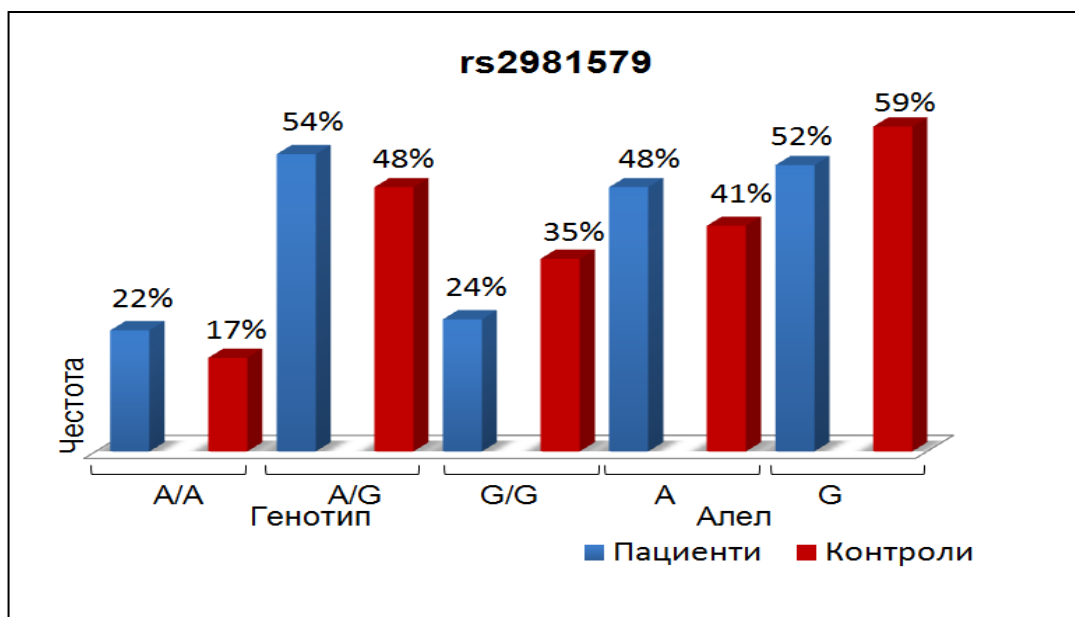
Таблица 27. Статистически анализ за асоциация на полиморфизъм rs2981579 с рака на гърдата в изследваната извадка пациенти-контроли от Българската популация

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

Статистическият анализ показва, 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; $p = 0.01$)



Фигура 36: Резултат от Real time PCR. Разпределение на генотипните варианти за полиморфизъм rs2981579 във FGFR2 гена

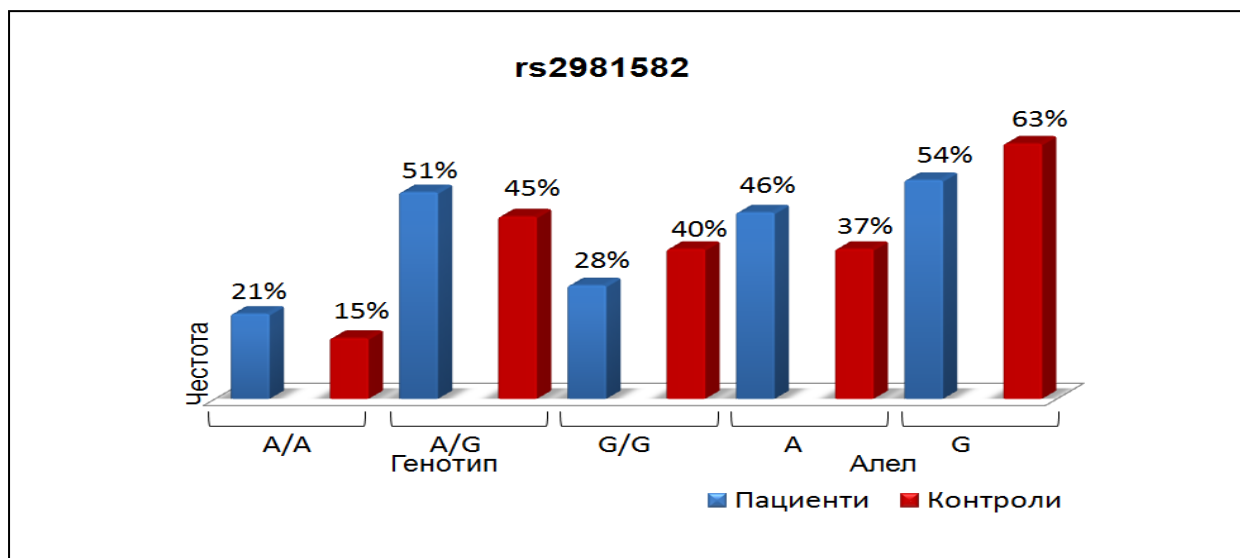


Фигура 37. Процентно разпределение на получените генотипни варианти в изследваната извадка пациенти-контроли

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 показва 2.084 (95% CI 1.250 – 3.474) пъти повишен риск за развитие на рак на гърдата при носителството на два A алела (OR=2.084, p=0.003) и 1.464 (95% CI 1.111 – 1.930) пъти повишен риск при носителство на един A алел (OR=1.464, p=0.007) (таблица 28, фигури 38)

Таблица 38. 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 _(Pearson)
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 38. Процентно разпределение на получените генотипни варианти в изследваната извадка пациенти-контроли

5.7.2. Генетичен анализ на полиморфен вариант rs 889312 в MAP3K1 гена

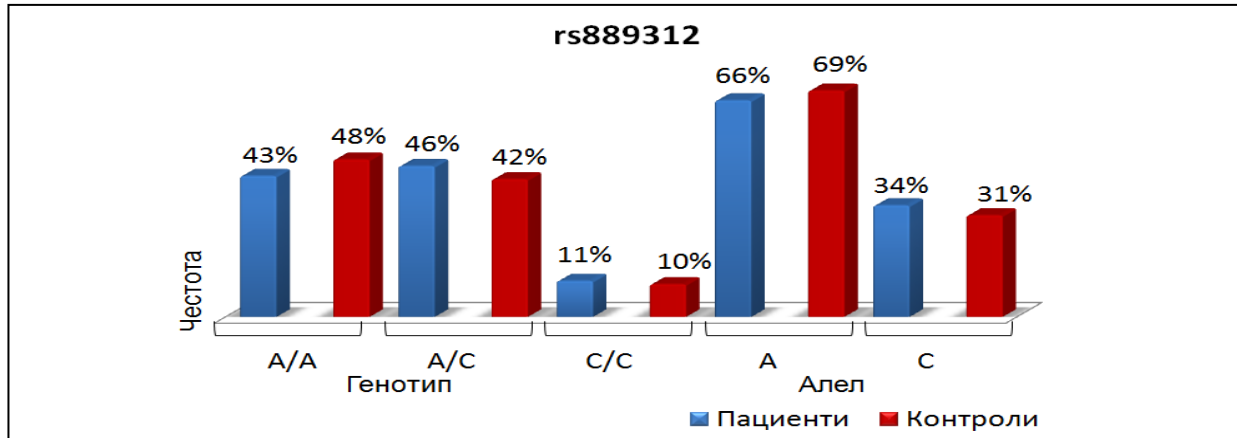
Митоген активираната протеин киназа киназа 1 е ензим, който при хората се кодира от MAP3K1 гена. MAP3K1 (МЕК) е серин/треонинова киназа, имаща основна роля при фосфорилирането на ензими, свързани с клетъчния отговор, растежни фактори, митогенни и метаболитни стимули. До този момент асоциация с предразположение 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; $P=4.6 \times 10^{-9}$) (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 29*).

Таблица 29. 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

Резултати

В изследваната от нас извадка носителство на A/C генотип показва 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 показва 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 39*).



Фигура 39. Процентно разпределение на получените генотипни варианти в изследваната извадка пациенти-контроли

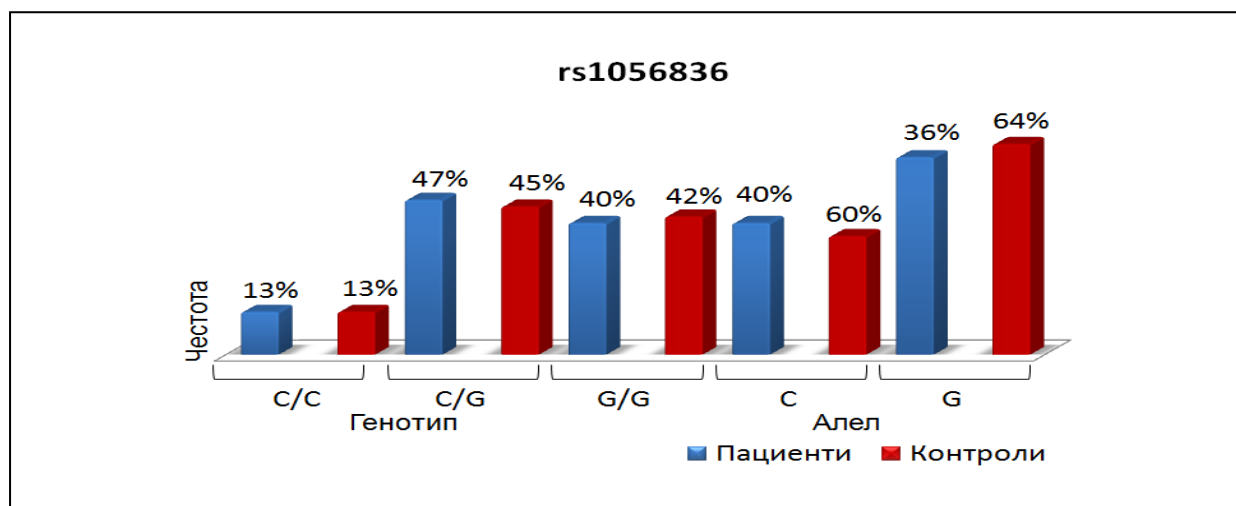
5.7.3. Генетичен анализ на полиморфен вариант rs1056836 в CYP1B1 гена

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 Leu с Val 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 40*).

При проведеният асоциативен анализ не беше установена статистически значима асоциация rs1056836 с развитие на заболяването (*таблица 30*)

Таблица 30. 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 _(Pearson)
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 40. Процентно разпределение на получените генотипни варианти в изследваната извадка пациенти-контроли

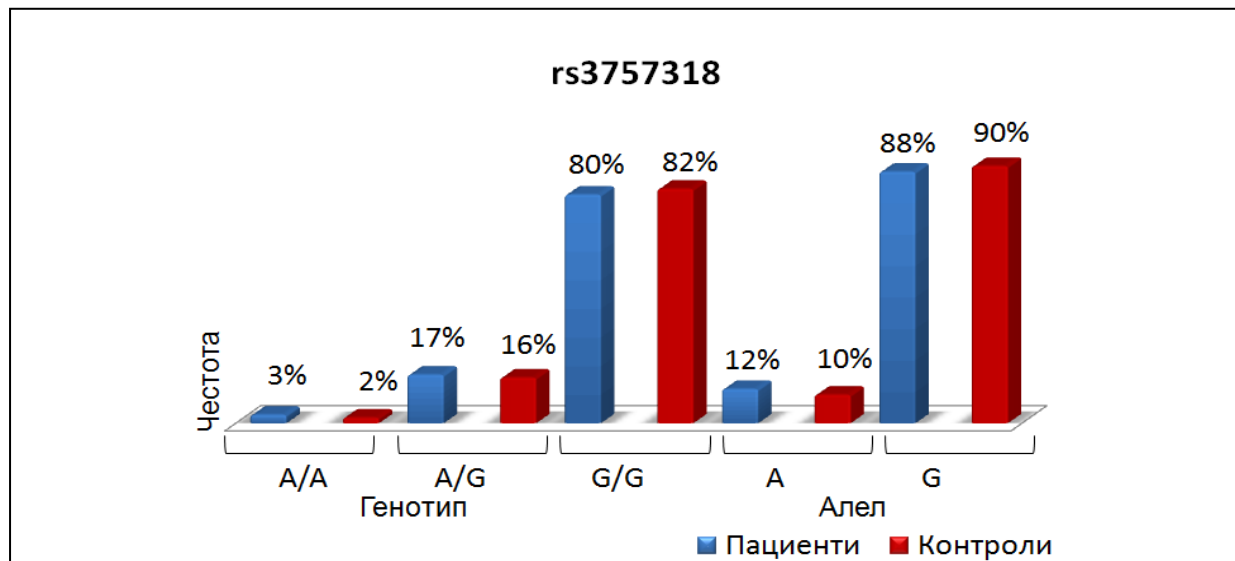
5.7.4. Генетичен анализ на полиморфен вариант rs 3757318 в хромозомен локус C6orf9

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

Резултати

установено, че 3% от пациентите и 2% от контролите са хомозиготи по отношение на алела А, което е изключително рядко срещано в европейската популация (*фигура 41*).



Фигура 41. Процентно разпределение на получените генотипни варианти в изследваната извадка пациенти-контроли

Носителството на два А 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 31*).

Таблица 31. Статистически анализ за асоциация на полиморфизма rs3757318 с рака на гърдата в изследваната извадка пациенти-контроли от Българската популация

Генотип/ Алел	Пациенти	Контроли	OR	$P_{(one_tailed)}$	$P_{(two_tailed)}$	$P_{(Pearson)}$
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

5.7.5. Генетичен анализ на полиморфен вариант rs2180341 в RNF146

Установено е че RNF146 участва в WNT β -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

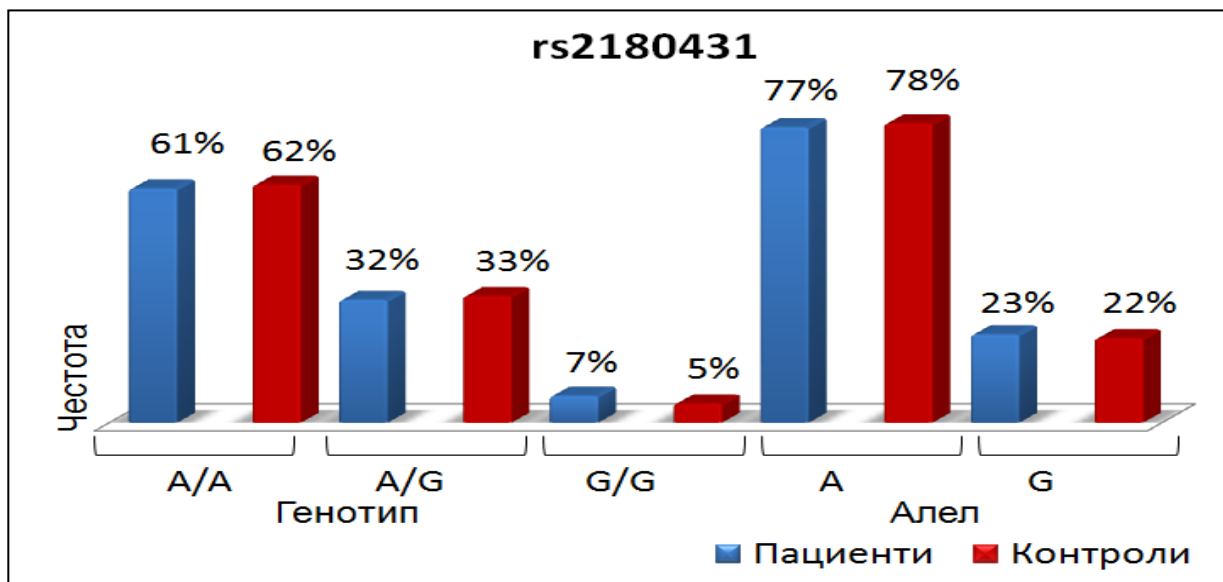
заболявания (Чичинадзе КН и съавт.) Предполага се, че RNF146 оказва влияние в регулацията на WNT β -катенин сигналния път.

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 показва статистически значима асоциация със заболяването (*таблица 32, фигура 42*).

Таблица 32. Статистически анализ за асоциация на полиморфизма rs2180341 с рака на гърдата в изследваната извадка пациенти-контроли от Българската популация

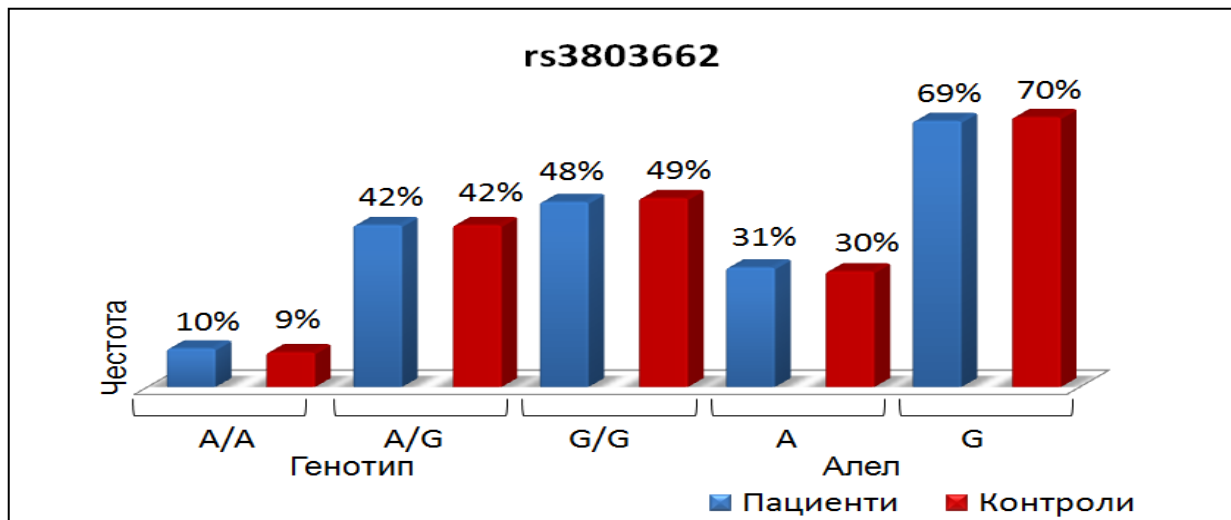
Генотип/ Алел	Пациенти	Контроли	OR	P _(one_tailed)	P _(two_tailed)	P _(Pearson)
A/A	117 (61%)	137 (62%)	0.992	0.525	1	1
A/G	61 (32%)	74 (33%)	0.994	0.435	0.833	0.791
G/G	13 (7%)	12(5%)	1.284	0.343	0.679	0.543
A алел	295 (77%)	646 (78%)	0.960	0.436	0.867	0.806
G алел	87 (23%)	69 (22%)	1.041	0.436	0.867	0.806



Фигура 42. Процентно разпределение на получените генотипни варианти в изследваната извадка пациенти-контроли

5.7.6. 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 случай-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 33, фигура 43*). Направеният статистически анализ на полиморфизма rs3803662 не показва статистически значима асоциация със заболяването.



Фигура 43. Процентно разпределение на получените генотипни варианти в изследваната извадка пациенти-контрол

Таблица 33. 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

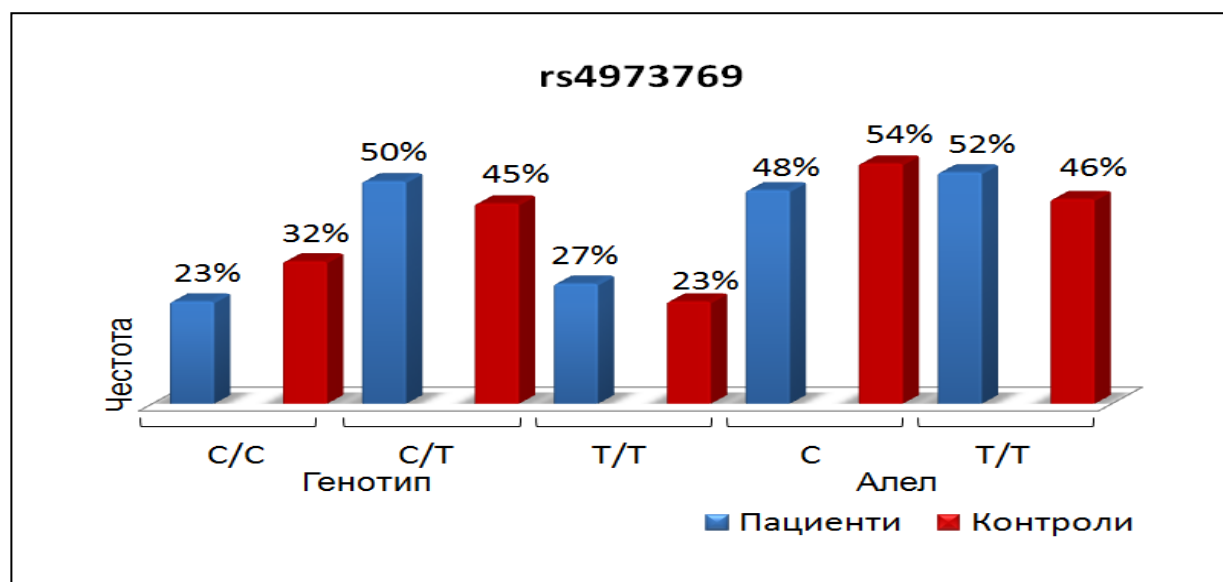
5.7.7. Генетичен анализ на полиморфен вариант в SLC4A7 гена

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

Проведеният статистически анализ показва, че С/С 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 34, фигура 44).

Таблица 34. Статистически анализ за асоциация на полиморфизма rs3803662 с рака на гърдата в изследваната извадка пациенти-контроли от Българската популация

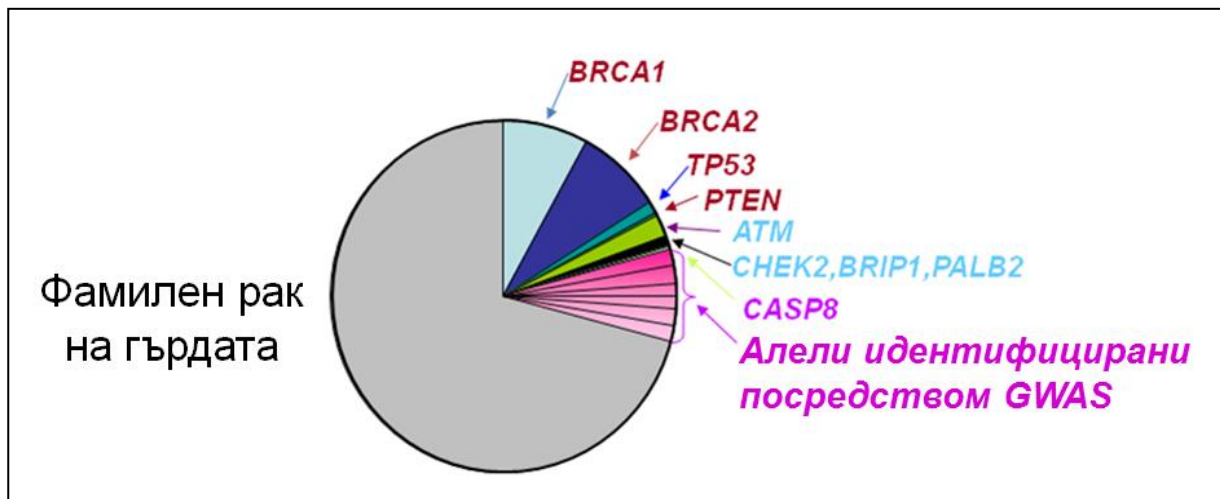
Генотип/ Алел	Пациенти	Контроли	OR	P _(one_tailed)	P _(two_tailed)	P _(Pearsan)
С/С	43 (23%)	75 (32%)	0.642	0.02	0.04	0.04
С/Т	93 (50%)	105 (45%)	1.241	0.158	0.280	0.271
Т/Т	49 (27%)	54(23%)	1.201	0.244	0.426	0.420
С алел	179 (48%)	255 (54%)	0.782	0.04	0.08	0.07
Т алел	191 (52%)	213 (46%)	1.277	0.04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



Фигура 44. Процентно разпределение на получените генотипни варианти в изследваната извадка пациенти-контроли

VI. 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 яйчиците. 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 45*) (Balman J et al, 2010; Easton D, 1997; Ellis NA et al, 2007; Rosman DS et al, 2007).



Фигура 45. Гени свързани с предразположението за развитие на рак на гърдата (www.crcl.fr, L99)

На базата на ефекта, които оказват върху предразположението за развитието на заболяването, гените могат да бъдат разделени на три основни групи:

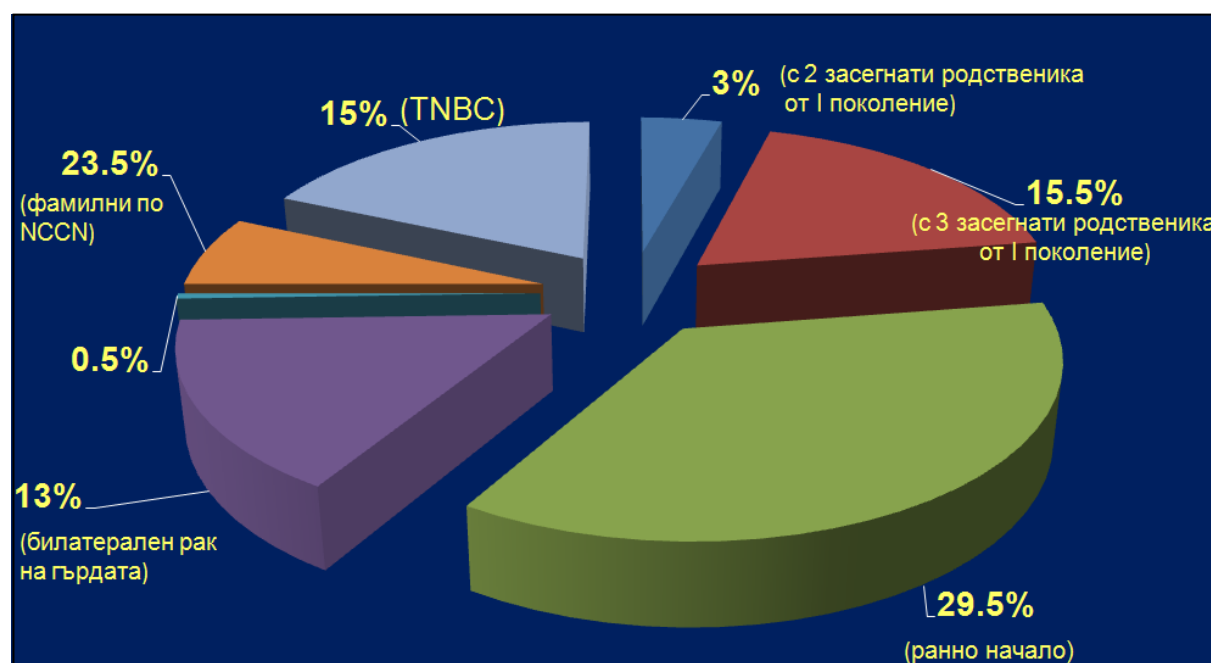
- *Високо пенетрантни* - клиничният симптом почти винаги се проявява. Повечето от гените в тази група са тумор супресори, участващи в контрола на пролиферацията, репарацията, клетъчната диференциация и апоптозата и мутации в тях определят участието им в канцерогенезата (Nathanson KL et al, 2001). Част от гените включени към тази група са *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53* и *PTEN*.

- *Гени със средна (междинна) пенетрантност*-участват в поправката на ДНК и се свързват с два пъти повишен риск за развитие на рак на гърдата. При проведения скрининг на гени, функционално свързани с *BRCA1* и *BRCA2* са открити мутации в

гените *CHEK2*, *PALB2*, *BRIP1* и *ATM*, които са по-редки и са с междинен риск за развитие на рак на гърдата. Част от тези гени се свързват с редица синдроми, при които се развиват ракови заболявания. Така, например синдромите на Li-Fraumeni, Peutz-Jeghers и Cowden се обясняват с мутации в *TP53*, *STK11* и *PTEN* гените (Balman J et al, 2010, Groep P et al, 2011).

- *Нископенетрантни гени* - 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 във *FGFR2*, *TNRC9*, *MAP3K1*, *CYP1B1* гените, както и в хромозомните локуси 3p24 и 8q24 (Ellis NA et al, 2007; Rosman DS et al, 2007).

В настоящето изследване беше проведен анализ на гени от трите основни групи с цел изясняване на молекулярно-генетичните механизми на фамиления 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 46*).



Фигура 46. Разпределение на болните спрямо BCLC и NCCN критериите

За изясняване на молекулярно-генетичните механизми на фамилен 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.

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

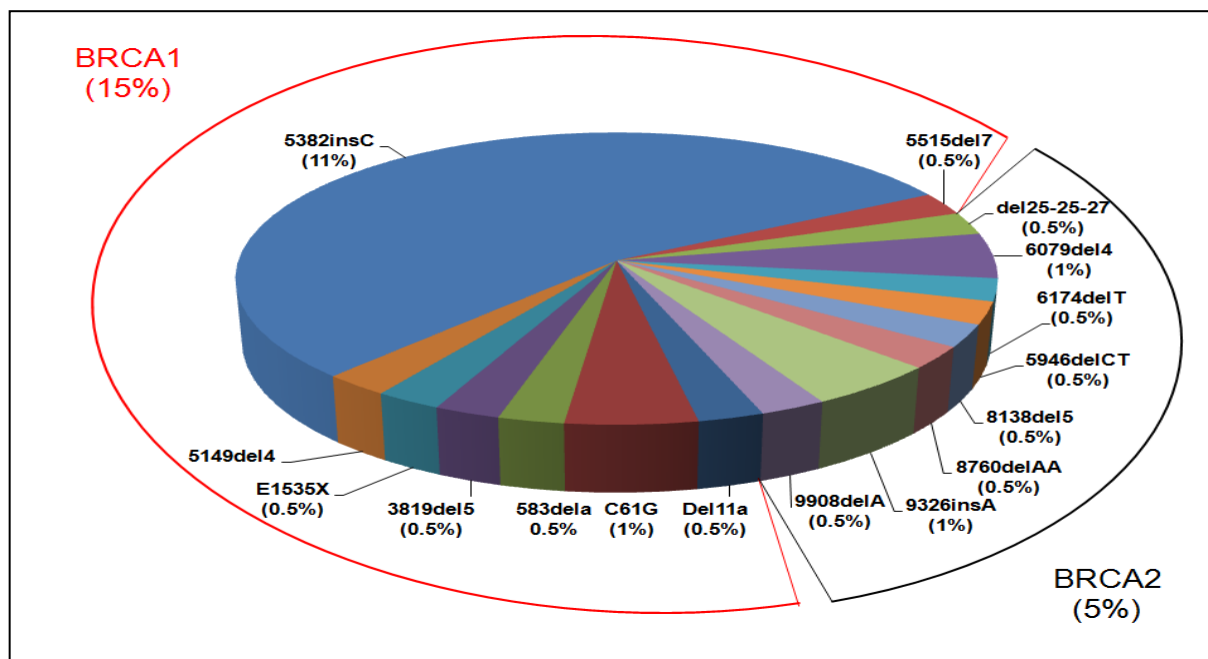
Мутации в *BRCA1* и *BRCA2* гените обясняват около 15 до 20% от фамилените случаи на рак на гърдата. Честотата на *BRCA* мутациите при пациентите с рак на гърдата без фамилен анамнез са съответно 1-7% за *BRCA1* и 1-3% за *BRCA2* (Balman J et al, 2010).

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 („nonsense“), 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.

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

В ВИС 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 47). 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 бяха със средна възраст на диагностициране на заболяването 46 години (29 - 63) при мутациите в *BRCA1* гена, 45.5 години (30 – 61) при мутациите в *BRCA2* гена, докато средна възраст на пациентите без установена мутация беше 49.6 години (24 – 74).

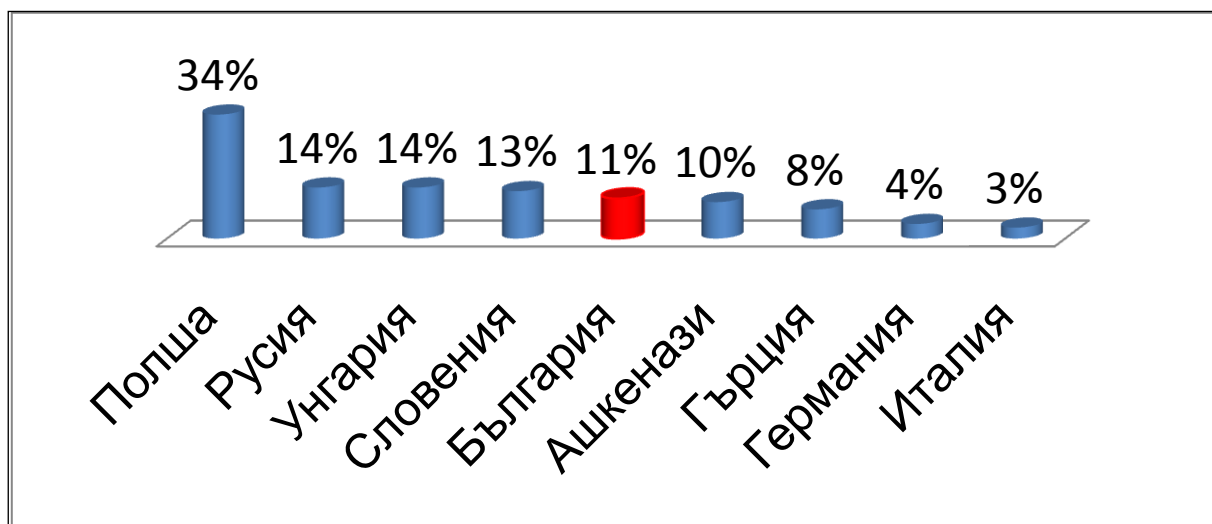


Фигура 47. Процентно разпределение на мутациите с патогенен ефект при Български пациентки с фамилен рак на гърдата

С най-висока честота, при 11% (22/200) от пациентите беше наблюдавана мутацията *c.5263_5264insC* (5382insC) в екзон 20 на *BRCA1* гена (фигура 47). Тя е с

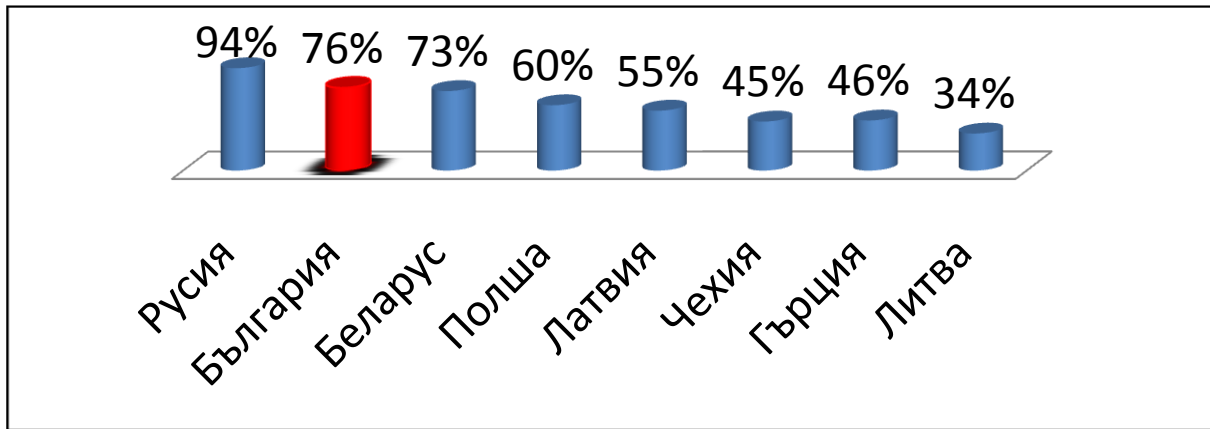
ефект на основателя в някои популации на Източна и Централна Европа и е втората по честота при източноевропейското еврейско семейство Ашкенази (AJ). Установява се с високи честоти в рискови за развитието на рак на гърдата/яйчника семейства в Полша (34%), Русия (14%), Унгария (14%), Словения (13%), AJ (10%), Гърция (8%), Германия (4%) и Италия (3%) (Janavičius R et al, 2010) (*фигура 48*).

Честотата на с.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 с.5263_5264insC има ефект на основателя и е 76% (22/29) от всички установени мутации в *BRCA1* гена и 11% от всички открити и мутации в двата гена (*фигура 49*).



Фигура 48. Процентно съотношение на с.5263_5264insC (5382insC) в Българската популация спрямо всички установени *BRCA1/2* мутации, сравнено с други европейски популации

В началото с.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 следствие 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 (Name N et al, 2003). Ние предполагаме, че в Българската популация тя също има славянски произход.



Фигура 49. Процентно съотношение на с.5263_5264insC (5382insC) спрямо останалите BRCA1 мутации в българската популация, сравнено с други европейски популации

В изследваната група с.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 50**



Фигура 50. Разпределение на мутацията с.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. Честота на тези две мутации в полската популация е между 70 и 90% от всички мутации в *BRCA1* гена. (Janavičius R et al, 2010). Относителният ѝ 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 35**).

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_3704delGТААА (3819del5), c.5030_5033delCTAA (5149del4), c.4603G>T (E1535X), c.464delA (583delA), c.5396_5402 delCCCTTGG (5515del7) и *BRCA1*deletion ехон 11а. Локализацията на установените в *BRCA1* мутации е показана на **фигура 51**. Клиничните данни на пациентите с установена мутация в *BRCA1* гена са представени на **таблица 35**.

Таблица 35. Клинични данни на пациентите с мутация в *BRCA1* гена

BC №	Mutation (HGVS)	DG	ER	PR	HER2	TNM	Grade	Други видове рак при пациента	Родственици с онкологични заболявания
28	c.181 T>G	BBC (52/60)	NA	NA	NA	NA	NA	OC (52)	Брат - рак на костите (47)
132	c.181 T>G	IDC (39)	-	-	-	pT1pN0M0	G2		Баба- BC (60), майка - BBC (32/40)
134	c.464delA	IDC (54)	-	-	-	pT1N1M0	G3		Леля - BC (47), баба и сестра на - BC(NA), баща - LC (NA)
37	c.4603G>T	IDC (37)	-	-	-	pT1cN1M0	G2	FtC (41)	Дядо - PC (76), дядо - LC (69), баба - CRC (60)
194	c.5030_5033 delCTAA	IDC (63)	-	-	-	pT1N0M0	G2		No
6	c.5263_5264 insC	IDC (43)	-	1+	NA	pT2N0Mx	NA	OC (45)	Майка- BC (50), сестра - BBC (42/53), баба - BC and OC (50)
7	c.5263_5264 insC	BBC (42)	3+/-	3+/-	1+/1+	pT1N0M0/ pT1bpN1M0	G2/G2		Баба - BC (76), леля - BC(81), баща - семином (NA), братовчед с рак на устата (NA)
21	c.5263_5264 insC	IDC (48)	NA	NA	NA	NA	NA	OC (48)	Дядо - GC (70), дядо - BT (NA), PC (NA), леля - CGO (50), братовчедка - BC (54)
140	c.5263_5264 insC	IDC (32)	1+	2+	2+	pT2pN0M0	G2		Майка- BBC (31/37), баба - EC, CRC (50/53), дядо - LC (59), баба- BC (NA)
143	c.5263_5264 insC	IDC (51)	-	-	-	pT2N0M0	G3	OC (51)	Чичо - PC (68), бабаLC (44), братовчедка - OC (37)
155	c.5263_5264 insC	BC (29)	-	-	-	NA	NA		Баба - BC, ThC (50/70), братовчедка - BC (50), братовчедка - OC (48)
190	c.5263_5264 insC	IDC (33)	-	-	-	pT1bpN0M0	G2		Баба - BC (47), майка - OC (52), дядо - CRC (62)

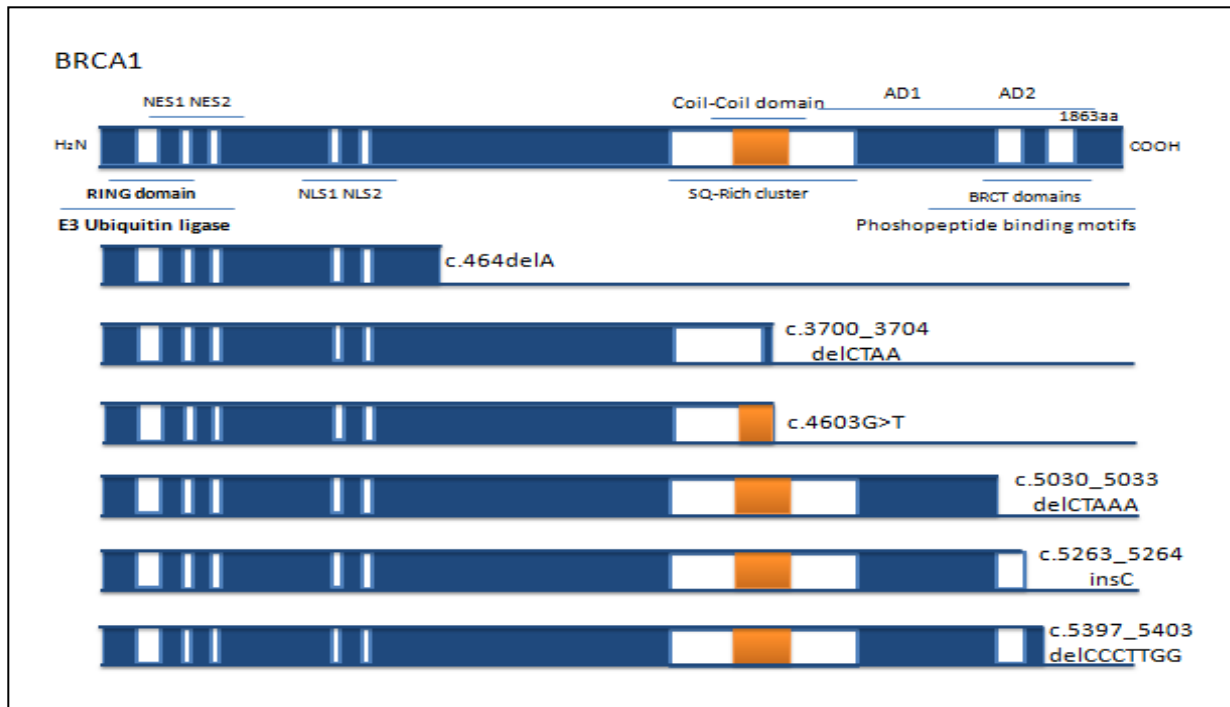
3	c.5263_5264 insC	BC (36)	NA	NA	NA	NA	NA	DC (41)	Баба - BC (NA)
17	c.5263_5264 insC	IDC (34)	2+	2+	NA	NA	G2		No
99	c.5263_5264 insC	IDC (40)	NA	NA	NA	pT1N0M0	G2	OC (46)	Баба – неизвестно онкологично заболяване (> 80), майка-CrC (NA), сестра на майката – Тумор на Paget (на зърното на гърдата) (NA)
111	c.5263_5264 insC	ACC (36)	-	-	-	NA	G1		No
121	c.5263_5264 insC	IDC (34)	-	-	-	pT1N0M0	G3		Баща – тумор в областта на таза (NA), братовчедка - BC (30)
175	c.5263_5264 insC	MBC (33)	-	-	-	pT1cN2M0	G2		No
39	c.5263_5264 insC	BBC (37/55)	NA/ -	NA /-	NA/-	NA	NA		Чичо - PrC (66)
79	c.5263_5264 insC	IDC (42)			1+	NA	NA		Баба - GC(70), Майка – BBC (27/30), Чичо –левкемия (67), баба- CLv (75)
142	c.5263_5264 insC	IDC (31)	-	-	-	pT1pN0M0	G2-3		No
152	c.5263_5264 insC	BBC (41)	NA	NA	NA	NA	NA	OC (58)	Майка- BBC (NA)
164	c.5263_5264 insC	IDC (45)	-	-	-	NA	NA		Майка - BC (NA)
204	c.5263_5264 insC	BBC (35/48)	NA	NA	NA	NA	NA		Майка с рак на пикочния мехур под съмнение
73	c.5263_5264 insC	IDLC (53)	-	-	-	pT2pN0M0	G3		Майка - BC (47) и CRC (71)
161	c.5263_5264 insC	IDC (43)	-	-	-	NA	NA		Майка– OC (62)
171	c.5263_5264 insC	BC (53)	-	-	-	NA	NA	OC (NA)	Баба- BC (43), майка- BC (53) и OC (63)
205	c.5396_5402 delCCCTTG G	IDC (51)	-	-	-	pT1pN1M0	G3		Баба - BC (30), баща – PC (NA)

DG – диагноза, 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

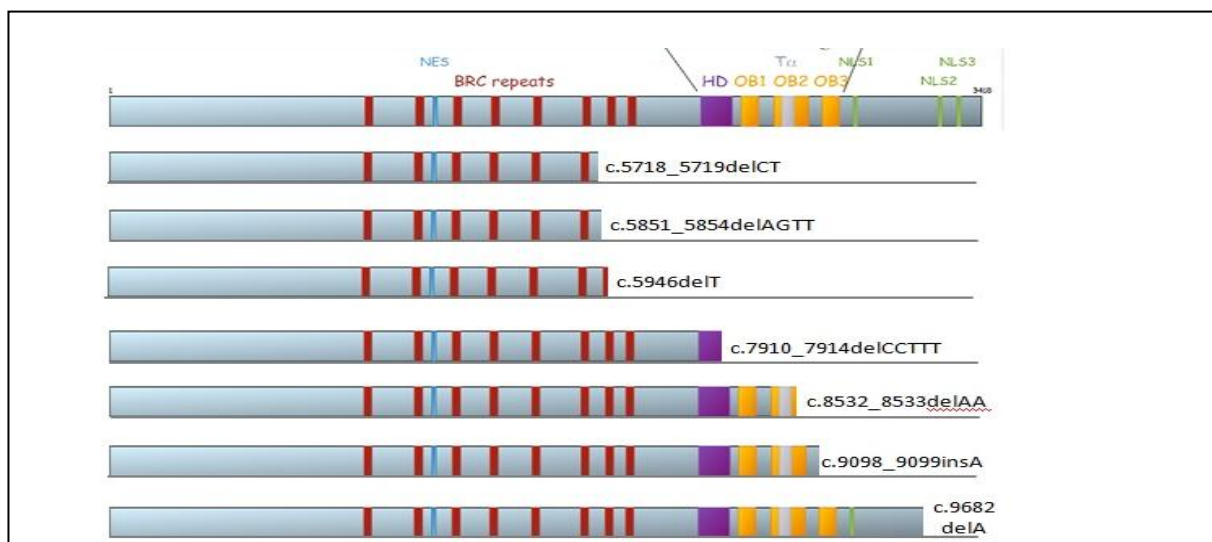
В *BRCA2* гена също бяха установени 8 мутации с патогенен ефект, отговорни за развитието на рак на гърдата, с обща честота 5%. Локализацията на установените в *BRCA2* мутации е показана на **фигура 52**.

От тях с най-голяма тежест и втората по честота в изследваната група пациенти беше мутацията c. 9098_9099insA в екзон 23. Тя се съобщава като една от най-често срещаните *BRCA1/2* мутации в Германия, където е с ефект на основателя (Janavičius R et al, 2010). Заедно с мутацията c.5964delT, тя представлява около 50% от всички открити мутации в Унгария (Janavičius R et al, 2010). На молекулно ниво, c.9098_9099insA води до появата на преждевременен стоп кодон и загубата на COOH края на белтъка, където са локализиран OB3 и NLS мотивите на белтъка (**фигура 52**). В нашето проучване мутацията беше установена с честотата 2% (4/200) при пациентки с

фамилен рак на гърдата, диагностицирани на възраст между 50 и 61 години. В допълнение една от пациентите беше с тройно негативен рецепторен профил.



Фигура 51. Доменна локализация на мутациите с патогенен ефект в BRCA1 белтъка.



Фигура 52. Доменна локализация на мутациите с патогенен ефект в BRCA2 белтъка.

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 при една пациентка с фамилна история за рак на гърдата.

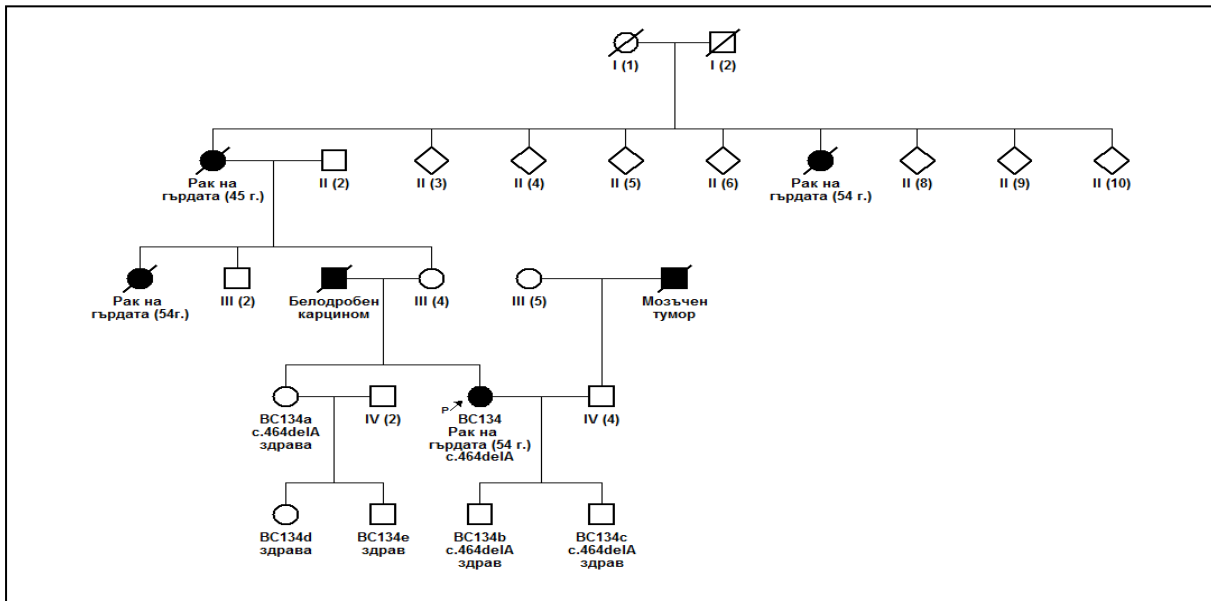
Мутацията c.5946delT беше открита при пациентка с еврейски произход и фамилна история за онкологично заболяване. Пациентката е развила билатерален рак на гърдата и овариален карцином. При направеното изследване за наличието на мутацията в преките родственици на пациентката, мутацията беше установена и при здравата ѝ 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 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)

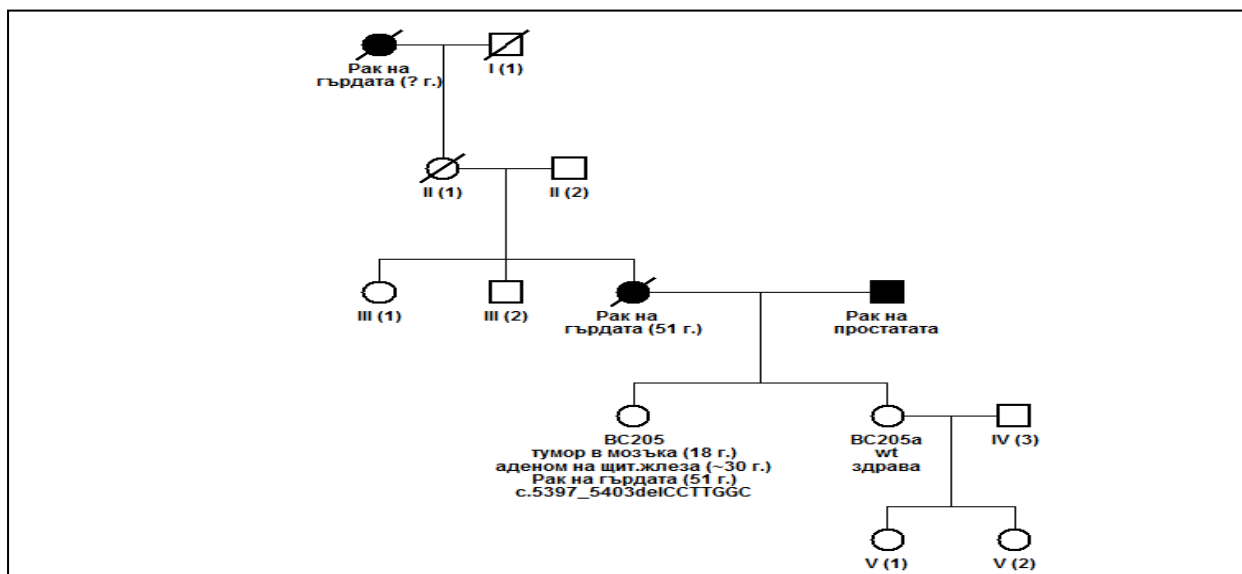
От общия брой установени патогенни мутации четири до този момент не са докладвани в международните източници. Това са c.464delA (583delA), c.5397_5403delCCTTGGC (5517del7), c.8532_8533delAA (8760delAA) и c.9682delA (9908delA).

Мутацията c.464delA (583delA) е локализирана в екзон 8 на *BRCA1* гена и води 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 53).



Фигура 53. Родословие на BC134, носителка на мутация c.464delA (583delA) в екзон 8 на BRCA1 гена.

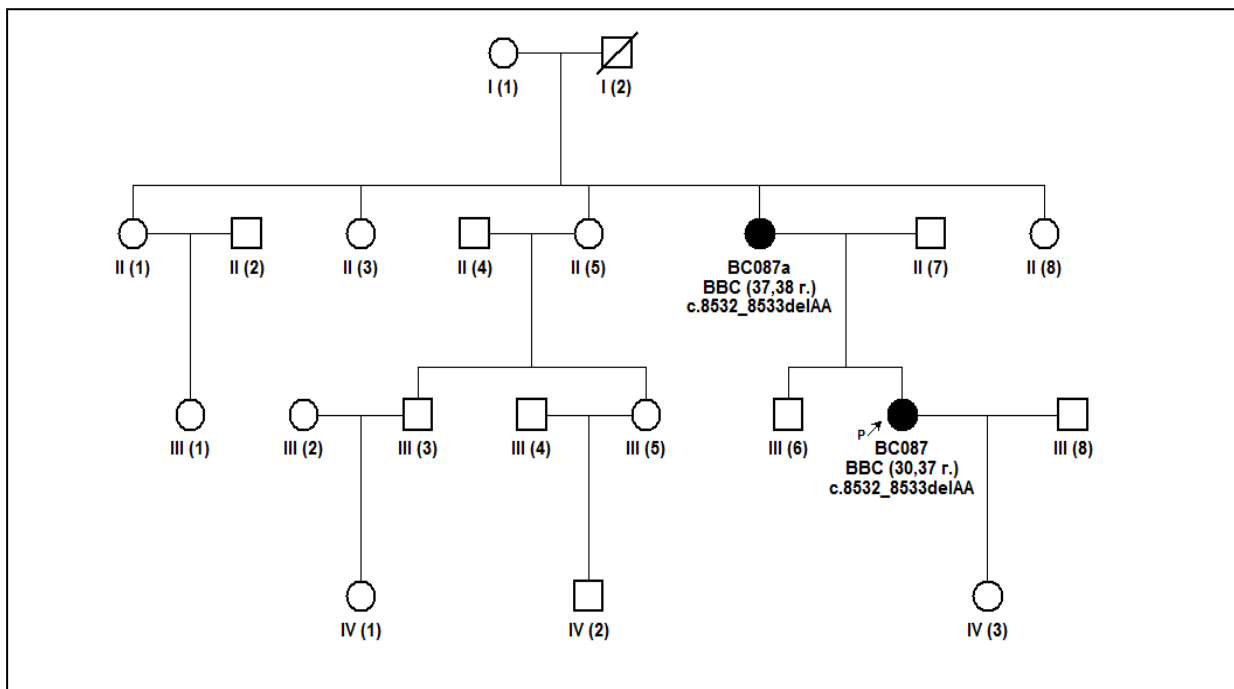
Втората нова мутация в *BRCA1* гена беше c.5397_5403delCCTTGGC (5517del7). Мутацията е локализирана в екзон 22 на *BRCA1* гена и е следствие от делеция на 7 нуклеотида на позиции между 5397 и 5403 в кодиращата последователност на ДНК, кодон 1799. Мутацията беше установена при тройно негативна пациентка с фамилен рак на гърдата, която на 18 годишна възраст е претърпяла мозъчна операция вследствие на доброкачествено новообразувание, и до този момент не е докладвана в специализираните литературни и електронни източници (фигура 54).



Фигура 54. Родословие на BC205, носителка на мутация c.5397_5403delCCTTGGC c.464delA (583delA) в екзон 22 на BRCA1 гена.

В *BRCA2* също бяха открити две недокладвани до този момент мутации с патогенен ефект, с.8532_8533delAA (8760delAA) и с.9682delA (9908delA). Мутацията с.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 55*).

Втората нова мутация в *BRCA2* е с.9682delA (9908delA). Тя е локализирана в екзон 27 на *BRCA2* гена. Известно е, че *BRCA2* белтъка има общо три NLS сигнала локализирани на СООН 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. Клиничните данни на пациентките с мутация в *BRCA2* гена да представени на *таблица 36*.



Фигура 55. Родословие на BC087, носителка на мутация с.85328533 в екзон 20 на *BRCA2* гена.

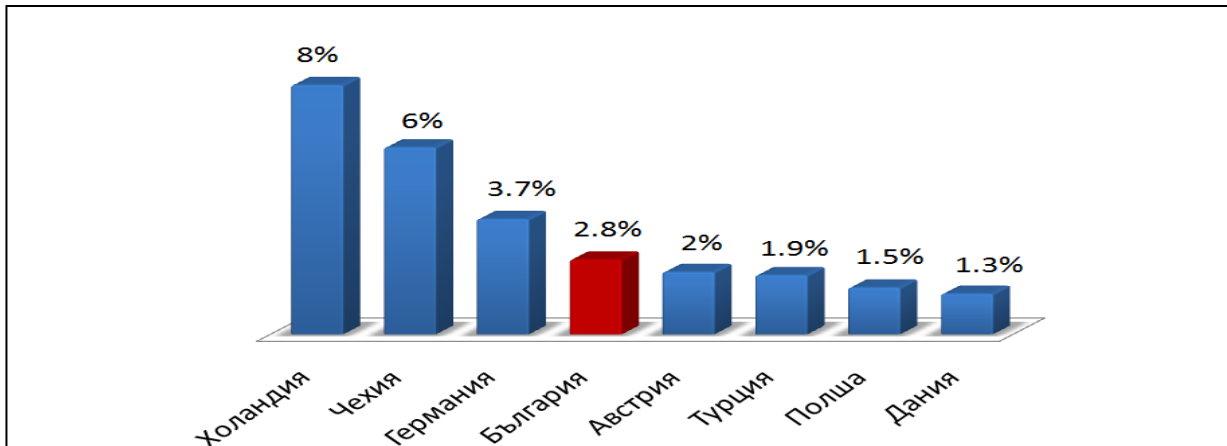
Таблица 36. Клинични данни на пациентите с мутация в *BRCA2* гена

BC №	Мутация	DG	ER	PR	HER 2	TNM	Grade	Други видове рак при пациента	Родственици с онкологични заболявания
90	c.5718_5719 delCT	IDC (35)	2+	3+	3+	pT2pN2M0	G2		Дядо - LyC (NA), баба – неизвестно злокачествено заболяване, вероятно меланом (NA)
76	c.5851_5854 delAGTT	IDLC (53)	-	-	-	pT1pN0M0	G2		Братовчедка - BC (65), баща - StC (54)
58	c.5851_5854 delAGTT	IDC (48)	3+	3+	2+	pT1N0Mx	G3		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)	NA/3+	NA/3+	NA/NA	NA/NA	NA/NA	OC (59)	Майка - BC (36) сестра - BC (46) и CRC (65), баща - LC
19	c.7910_7914 delCCTTT	BBC (31/37)	NA/NA	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/pT1bpN0M0	G2/NA		Майка BBC (NA)
32	c.9098_9099 insA	IDC (50)	-	-	3+	NA	G3		Леля – BC (NA)
88	c.9098_9099 insA	IDLC (61)	-	-	-	pT2pN0M0	G2-3		Дядо - ThC (48), майка - BC (60), два братовчедки - BC (34/47),
81	c.9098_9099 insA	BC (59)	NA	NA	NA	NA	NA		Сестра - BC (52), леля - BC (67)
85	c.9098_9099 insA	IDC (52)	3+	-	-	pT1pN2pMx	G3		Леля - BC (42), дядо – злокачествено образуване в областта на шията или главата (NA)
24	c.9680delA	BBC (52)	NA	NA	NA	NA	NA		

DG – диагноза, 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

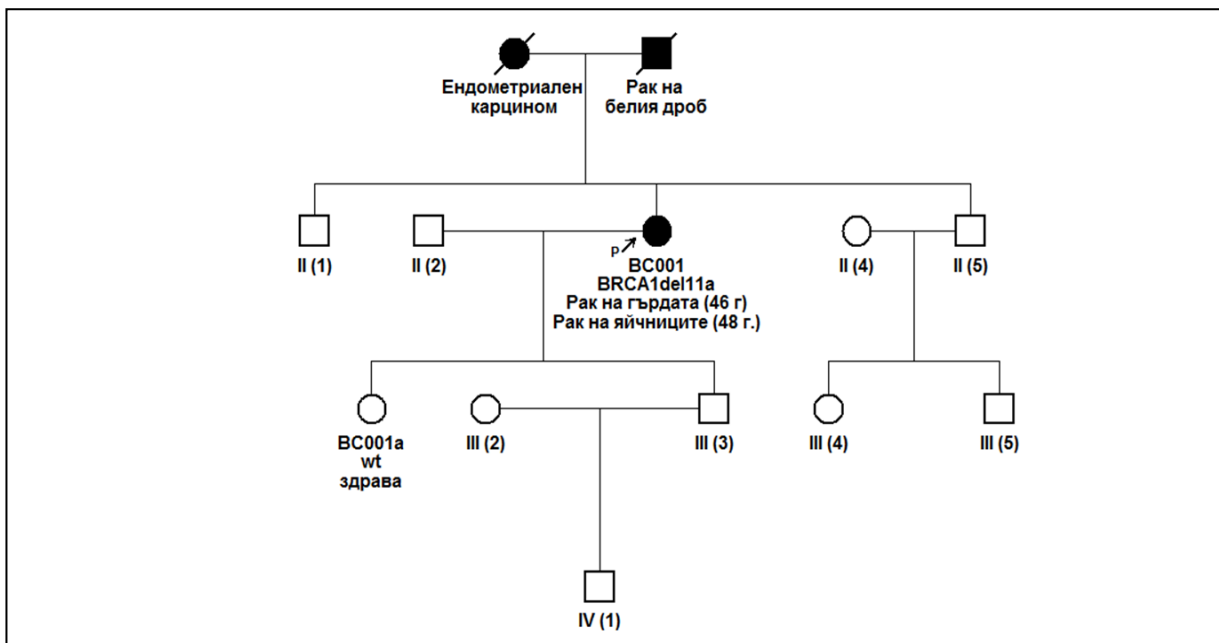
Друга част от установените в *BRCA1/2* гените мутации са големи геномни пренареждания –LGRs (Large Genomic Rearrangements). Този тип мутации са отчетени с различни честоти при част от високо рисковите за развитието на рак на гърдата и/или яйчника семейства в редица популации (*приложение 8*). LGRs винаги са патогенни защото големите делеции или дупликаците в кодиращата последователност водят до измествания 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 56. Процентно разпределение на LGRs мутациите в BRCA гените в някои европейски и близко източни популации.

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. 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 57**) и делеция, обхващаща екзони 25, 26 и 27 на *BRCA2* гена при млада жена с ранно начало и фамилна история на рак на гърдата.



Фигура 57. Родословие на BC001, носителка на мутация BRCA1del11a в BRCA1 гена.

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: с.5263_5264insC, с.181T>G и с.5030_5033delCTAA в *BRCA1* гена и с.9098_9099insA, с.5718_5719delCT и с.7910_7914delCCTTT в *BRCA2* гена. Общо четири мутации: с.181T>G, с.5263_5264insC и с.3700_3704delGTAAA в *BRCA1* гена и с.7910_7914delCCTTT в *BRCA2* гена са общи с чешката популация. С унгарската популация също споделяме четири общи мутации: с.5263_5264insC и с.181T>G в *BRCA1* гена и с.9098_9099insA и с.5946T в *BRCA2* гена (*приложение 8*).

6.1.2. 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%.

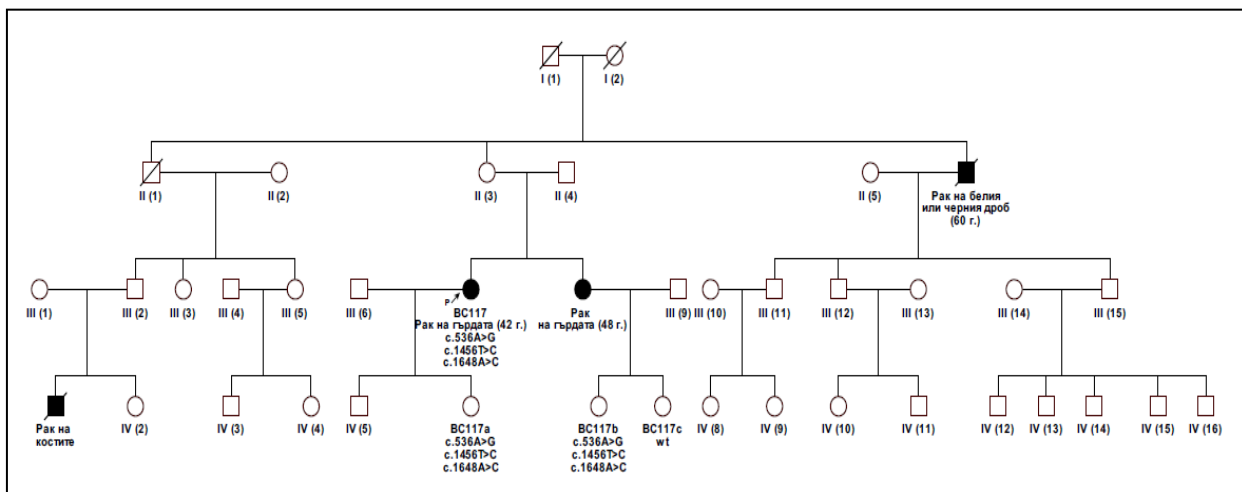
В изследваната група от български пациенти с фамилен рак на гърдата и/или яйчника, ние установихме 11 „missense” замени с ниска честота (< 0,5%): с.139T>G, с.536A>G, с.736T>G, с.1456T>C, с.1648A>C, с.3999T>C, с.3515C>T, с.6100C>T, с.6322C>T, с.7469T>C и с.9104A>C. Варианти с неясен клиничен ефект бяха 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 (*приложение 7*).

С най-голяма тежест в тази група беше вариантът с.139T>G. Той е локализиран в екзон 5 на *BRCA1* гена и води до замяна на аминокиселината цистеин с глицин в позиция 47 (р.Cys47Gly). Тази замяна, подобно на мутацията с.181T>G е локализирана в „RING finger” домена на *BRCA1* и засяга аминикиселинни остатъците, които са отговорни за координативното свързване на Zn^{2+} йони. Няколко функционални анализи

показват, че с.139T>G води до нарушение на убиквитин лигазната активност на белтъка, както и участието му в хомоложната рекомбинация и контрола на броя на центрозоите 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 - с.536A>G, с.1456T>C и с.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 (с.1648A>C) беше класифицирана, като увреждаща, за разлика от другите две, които бяха класифицирани като неутрални (с.536A>G и с.1456T>C) (**таблица 22, т. 5 Резултати**). Според ВИС базата данни с.536A>G и с.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 58**). Аналогичен случай е наблюдаван в семейство от Сицилия, където пациентка, с ранно начало на рак на гърдата, здравата ѝ сестра и тяхната майка, с ранно начало на ендометриален карцином, са носители на хаплотипа с.536A>G, с.1456T>C и с.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 стоихиометрията на *BRCA1* белтъка, а следователно и на неговата функция (Augello C et al. 2006).



Фигура 58. Родословие на BC117, носителка на полиморфни варианти с.536A>G, с.1456T>C и с.1648A>C в *BRCA1* гена.

В групата на редките „missense” варианти само с.3999T>C не беше докладван до този момент в литературните източници. Вариантът води до синтеза на аминокиселината аланин вместо на валин в позиция 1333 (р. 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 доказва патогенния ефект на с.3999T>C. (**таблица 22, т.5 Резултати**).

Анализът за предикция показва, че само два от установените редки варианти, с.1648A>G в *BRCA1* и с.3515C>T в *BRCA2* бяха оценени като патогенни и с трите програми за оценка на риска - SIFT PolyPhen2, и Provean (**таблица 23, т.5 Резултати**). Подобно на другите варианти в групата, с.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 с.536A>G, с.1648A>C в *BRCA1* и 3515C>T в *BRCA2* показват, че с.536A>G, но не и с.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 да 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 е 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 „Zn²⁺ finger” домена на *BRCA1*. (<http://www.kconfab.org>, L101).

6.1.3. 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

Дискусия

BRCA2. Дванадесет от тях бяха класифицирани като полиморфизми (SNPs) с честота по-висока от 1%. Това са варианти с.1067A>G, с.2077G>A, с.2612C>T, с.3113A>G, с.3119G>A, с.3548A>G, с.4837A>G, с.4956G>A, с.1114A>C, с.865A>C, с.2971A>G и с.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 с.1067A>G беше оценен като патогенен и с трите предиктивни програми (**таблица 24, т.5 Резултати**).

В таблица 37 са показани 40-те най-често срещани според ВИС 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 (**приложение 8**).

Таблица 37. Най-често докладвани в ВИС базата данни мутации в *BRCA1* и *BRCA2* гените

BRCA1			BRCA2		
HGVS номенклатура	ВИС номенклатура	Брой на докладвания в ВИС	HGVS номенклатура	ВИС номенклатура	Брой на докладвания в ВИС
с.66_67delAG	185delAG	2038	с.5946_5946delT*	6174delT	1093
с.5263_5264insC	5382insC	1093	с.1114C>A	H372N	996
с.4308T>C	4427T>C	251	с.10362A>C	10590A>C	346
с.4837A>G	S1613G	248	с.1796T>C	F599S	345
с.181T>G	C61G	239	с.7806-14T>C	IVS16-14T>C	332
с.2311T>C	2430T>C	229	с.8755-66T>C	IVS21-66T>C	319
с.5152+66G>A	IVS18+66G>A	222	с.9976A>T	K3326X	301
с.2082C>T	2201C>T	216	с.7469T>C	I2490T	240
с.4987-92A>G	IVS16-92A>G	216	с.3396A>G	3624A>G	234
с.4987-68A>G	IVS16-68A>G	216	с.6841+80_6841+83delTTAA	IVS11+80delTTAA	221
с.548-58_548-58delT	IVS8-58delT	214	с.-26G>A	203G>A	206
с.2612C>T	P871L	211	с.4258G>T	D1420Y	200
с.442-34C>T	IVS7-34C>T	207	с.8567A>C	E2856A	186
с.3113A>G	E1038G	182	с.7242A>G	7470A>G	183
с.3548A>G	K1183R	164	с.3807T>C	4035T>C	161
с.4039A>G	R1347G	161	с.125A>G	Y42C	144
с.1067A>G	Q356R	155	с.1151C>T	S384F	143
с.4065_4068delTCAA	4184del4	143	с.681+56C>T	IVS8+56C>T	143
с.3024G>A	M1008I	139	с.1964C>G	P655R	142
с.4327C>T	R1443X	136	с.1514T>C	I505T	128

* (отбелязани с червено) установени в българката популация мутации

Дискусия

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

С цел въвеждане на скрининг за мутации в *BRCA1* и *BRCA2* гените със секвениране от второ поколение, мутациите с.464delA, с.5263_5264insC, с.5851_5854delAGTT, с.5946delT, с.5718delCT, с.7910_7914delCCTTT и с.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. За разлика от другите платформи, базирани на пиросеквениране, при които се измерва светлината, отделена при хемилуминисцентни реагенти, 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 рН 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.

6.2. 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*. След свързването си с *BRCA2*, *PALB2* директно взаимодейства с *RAD51*, като по този начин стимулира напредъка на хомоложната рекомбинация и иницирането на „Checkpoint“ контрола (Casadei S et al, 201). Установено е, че при отсъствието на *PALB2*, *RAD51* не може да се свърже с *BRCA2* и това води до невъзможност да се иницира репарацията на двойноверижните

скъсвания. В белтъка са идентифицирани три домена, чрез които той формира комплекси с BRCA1, BRCA2 и RAD51 (Casadei S et al, 201).

Наскоро беше доказано, че PALB2, както и BRCA2 пряко взаимодейства с RAD51. PALB2 стимулира RAD51 към формиране на едноверижни фрагменти (ssDNA) и образуване на D-loop структура. Това откритие показва, че PALB2 не е само локализатор на BRCA2, но също така е и важен регулатор на активността на RAD51 (Buisson et al, 2012). PALB2-дефицитни клетки, които експресират PALB2 с дефект при свързването на RAD51, проявяват висока чувствителност към ДНК увреждащи агенти, като митоминин С, който причинява блокиране на репликативната вилка и формирането на двойноверижни структури (Buisson et al, 2012).

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*, с.3113G>A, с.509_510delGA и с.196C>T показват най-висока честота в изследваните групи. Мутацията с.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. При проучване на колектив от университета в Сиатъл, САЩ са открили 13 мутации, пет от които са нови. По-нататъшно изследване установява, че тези пациенти имат общ прародител, мигрирал в САЩ през 19 век. 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). Заболяването се проявява с вродени костно-мозъчни аномалии и/или левкемия и предразположение към развитието на онкологични заболявания. Честотата на FA е приблизително 1:350 000 раждания и обхваща различни етнически групи. Към днешна дата, са идентифицирани най-малко 13 подгрупи на заболяването, причинени от дефекти в различни гени. Така, например FA подтипове FANCD1, FANCI и FANCF се причинява от носителството на биалелни мутации в BRCA2, BRIP1 и PALB2 (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/FANCI) хеликазата (Cantor et al, 2012). *BRIP1* генът е картиран на 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. BRCA1-FANCI взаимодействието е от съществено значение за насърчаване на репарацията, „Checkpoint“ контрола и лимитирането на толеранса спрямо ДНК увреждане. Идеята, че FANCI функционира като туморсупресорен ген при рака на гърдата, произлиза от факта, че той пряко взаимодейства с BRCA1 и проявява хомология с XPD гена, който участва в ДНК поправката (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 с.2637G>A, с.2755C>T, с.3411C>T са класифицирани като неутрални полиморфизми. Идентифицирана е също с.2992-2995delAAGA делеция в екзон 20 на гена. Това води до изместване рамката на четене и появата на преждевременен стоп кодон на 1057 позиция, съответно синтез на скъсен белтъчен продукт. Важно е да се отбележи, че мутацията обхваща BRCA1 свързващия домен и се очаква това да се отрази на взаимодействието между BRCA1 и BRIP1 (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 с.2992-2995delAAGA и с.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.

6.3. 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).

6.3.1. 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 молекулярно 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⁻

³¹и 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 et al, 2011). В съответствие с предишни резултати, при проведени целогеномни проучвания от типа случаи-контроли, с голяма асоциация за развитието на рак на гърдата е установен полиморфен вариант rs2981582 в интрон 2 на *FGFR2* гена (Turnbull et al, 2010, Peng et al, 2011). При носителството на този полиморфизъм е установена амплификация и свръхекспресия на *FGFR2* при пациентки със спорадичен карцином на гърдата. Предполага се, че този полиморфен вариант променя афинитета на свързване с транскрипционни 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 показва 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 показва 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 37**). Обратно, носителството на един G алел (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 А/А генотип на rs2981582 беше установено при 21% от пациентките и 15% от здравите жени, докато хетерозиготните А/G носители бяха наблюдавани с честота 51% при пациентки и при 45% от контролите. Носителството на два А 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 А алел - с 1.464 (95% CI 1.111 – 1.930) пъти повишен риск (OR=1.464, p=0.007) (**таблица 28, фигури 38**)

6.3.2. 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* (МЕК) е серин/треонинова киназа, имаща основна роля при фосфорилирането на ензими, свързани с клетъчния отговор, растежни фактори, митогенни и метаболитни стимули. Установено е, че в миши модели *MAP3K1* играе важна роля по време на ембриогенезата, кератоцитната миграция и при синтеза на Т-клетъчните цитокини и В антителата (www.omim.org, L21). При около 25% от пациентките с карцином на гърдата се наблюдава свръхекспресия на *HER2*, която се асоциира с агресивен туморен растеж, метастазирание и лоша прогноза. *HER2* притежава тирозин киназен домен, показващ активност дори и когато не се е формирал хетеродомен. Свръхекспресията води до образуване на повече *HER2* хетеродимери, 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 активизираната протеин киназа – MAPK. Полиморфният вариант, rs889312 в *MAP3K1* се асоциира с рака на гърдата. Рискът за развитие на заболяването при носителството на А/С генотип е изчислен на 1.22 пъти (OR 1.22 (95% CI 1.14-1.30; $P=4.6 \times 10^{-9}$) (Peng et al, 2011).

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

6.3.3. 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). AhR свързва разнообразен набор от екзогенни молекули, включително канцерогенни вещества като полициклични ароматни хидрокарбони и полихалогенни въглеводороди, които се намират в замърсения въздух и цигарения дим. CYP1B1 е свръхекспресиран в много видове тумори (Bosland MC et al, 2000). Доказателство за ролята на CYP1B1 в туморогенезата се поддържа не само от свръхекспресията, но и от способността му да активира някои канцерогени в определени класове химични вещества, като например повърхностно активни вещества, хетероциклични амини и ароматни амини. 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 цитотоксичност (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). Естрогените се метаболизират главно в черния дроб, но също и в други тъкани от цитохром P450 ензими. 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 Leu 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).

6.3.4. 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 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, 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 А, което е изключително рядко срещано в европейските популации. Носителството на два А 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.

6.3.5. Генетичен анализ на полиморфен вариант rs2180341 в RNF146

Установено ече RNF146 участва в WNT β -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. Концентрацията и стабилността на β -катенин зависи от белтъците аксин и танкираза (Marinella G et al, 2011). Аксини 1 и 2 са цитоплазмени белтъци, с регулаторна функция в Wnt сигналния път, и могат да индуцират апоптоза (Marinella G et al, 2011). Мутации в *AXIN1* гена, който кодира акин 1 белтъка се свързват с хепатоцелуларен карцином, аденокарцином на яйчниците, ендометриоза и медулобластома. Аксин 2 участва в стабилизирането на β -катенин (www.ncbi.nlm.nih.gov, L22). Третият белтък е танкираза, която участва в контрола на теломерите. Танкиразата е подложена на активация от MAPK (Чичинадзе КН et al, 2008). Регулаторната активност на MAPK се проявява в много вътреклетъчни структури, които са свързани с танкиразата по време на митозата. С течение на много клетъчни цикли се наблюдава изменение на теломерите, следователно не е важно общото разпределение на танкиразата, което оказва влияние върху генната експресия, а характерното ѝ разпределение в клетката, което оказва влияние върху центрозомата и клетъчните структури, свързани с последната (Чичинадзе КН et al, 2008). Молекулните

механизми, по които Poly(ADP-ribosil)ation, наречена още PARsylation зависимата танкираза се прикачва и води до убиквитинирането на актина все още не са напълно изяснени (Marinella G et al, 2011). Наскоро в RNF146 беше идентифициран „finger” домен E3 с убиквитин лигазна функция. Предполага се, че RNF146 оказва влияние в регулацията на WNT β -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 [26,27]. Асоциативният анализ на полиморфизма rs2180341 в групата от български пациентки с рак на гърдата и контроли не показва статистически значима асоциация със заболяването.

6.3.6. 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). *TOX3* се причислява към групата на 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 случай-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 значима асоциация.

6.3.7. 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 рН 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 показва, че C/C генотипа има протективен статистически значим ефект 0.642 (95% CI 0.414-0.994) по отношение на заболяването (OR = 0.642; p=0.04).

При направения хаплотипен анализ на включващи комбинации на полиморфни варианти на 6 и 10 хромозома, някои варианти в *FGFR2*, rs2981579 и rs2981582, достигнаха статистически зависима асоциация (**таблица 38**). 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).

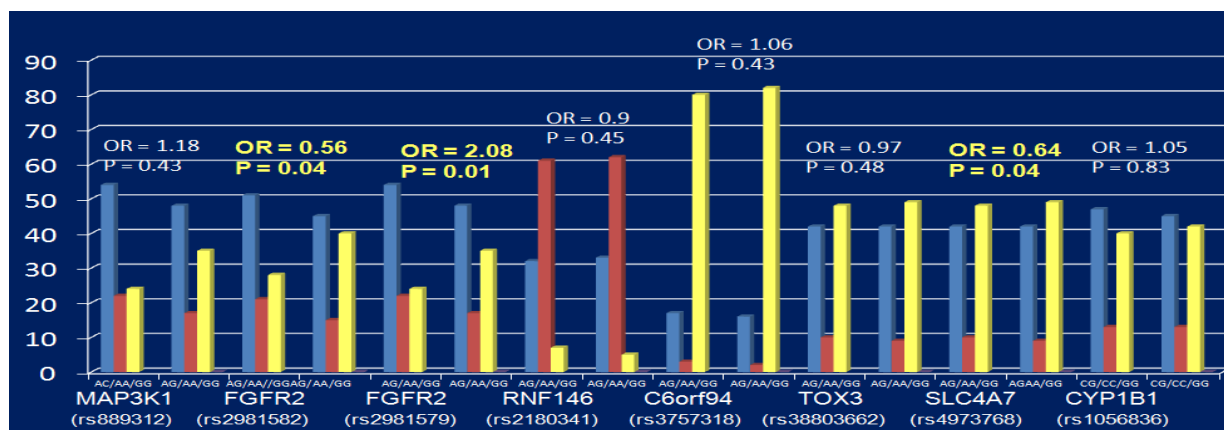
Хаплотипният анализ на трите полиморфни варианта rs2981579 и rs2981582 показва статистическа значима асоциация със заболяването (**фигура 59**).

Таблица 38. Хаплотипен 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

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 59**).



Фигура 59. Асоциативно проучване от тип случаи-контроли на полиморфни варианти rs889312, rs2981582, rs2981579, rs3757318, rs38803666, rs4973768 и rs1056836 в гени с ниска пенетрантност

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

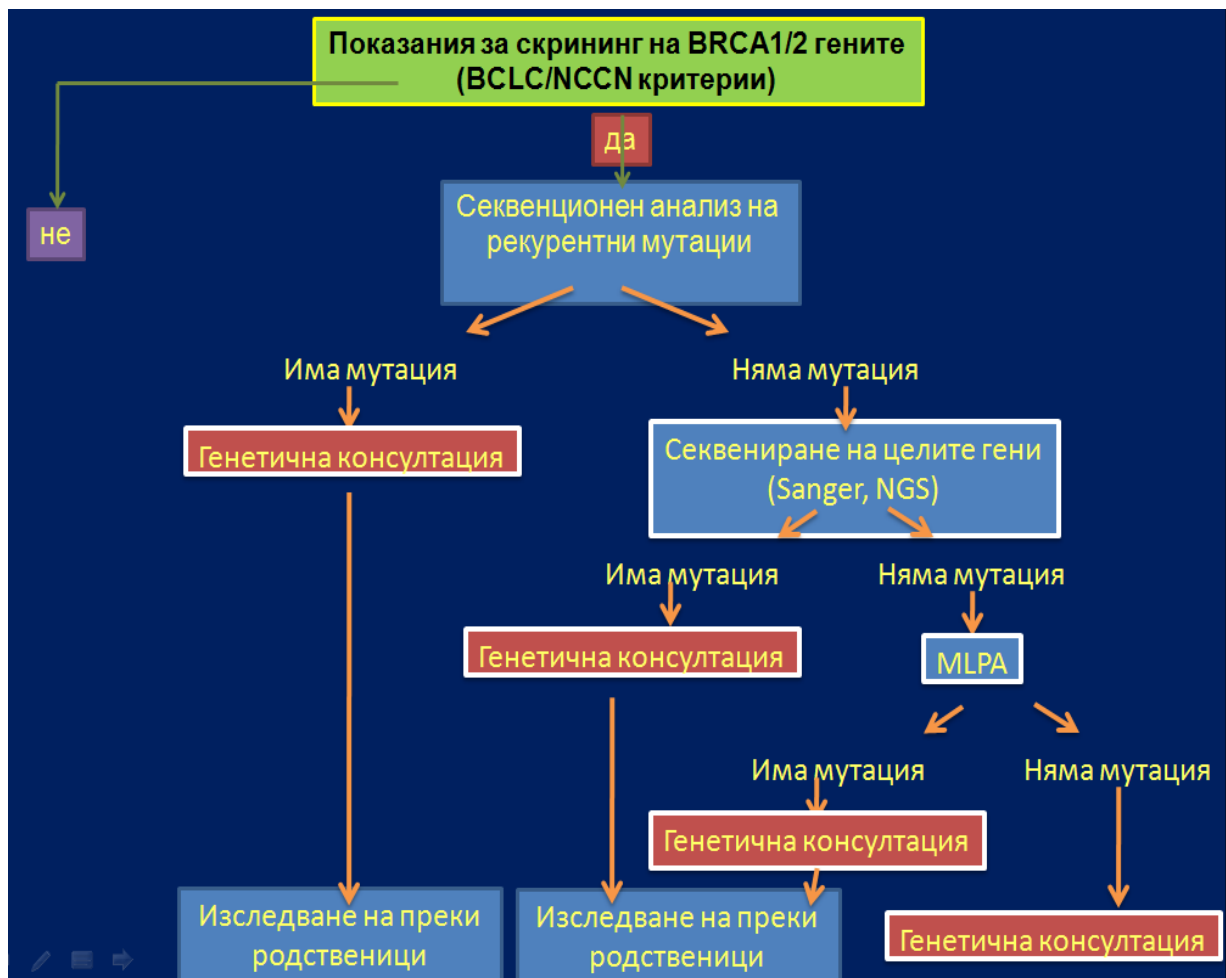
На базата на получените резултати беше разработен системен ход за скрининг на мутации в *BRCA1* и *BRCA2* гените при български пациенти с фамилен рак на гърдата и/или яйчниците. На **фигура 60** е представен примерен системен ход за скрининг на мутации в *BRCA* гените.

- **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 таргетния 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).



Фигура 60. Примерен системен ход за скрининг на мутации в *BRCA* гените.

- 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 интерпретирани по следният 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).

VII. Изводи:

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

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

3. Рекурентните патогенни мутации в двата гена (с.5263_5264insC, с.181T>G в *BRCA1* и с.5851_5854delAGTT, с.9098_9099insA, с.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 (с.464_465delA, с.5396_5402delCCCTTGG, с.8532_8533delAA, 9908delA и с.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.

VIII. 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 (с.5263_5264insC, с.181T>G, с.5851_5854-delAGTT, с.9098_9099insA и с.9908delA), отговорни за развитието на фамилен и тройно негативен рак на гърдата при български пациентки;

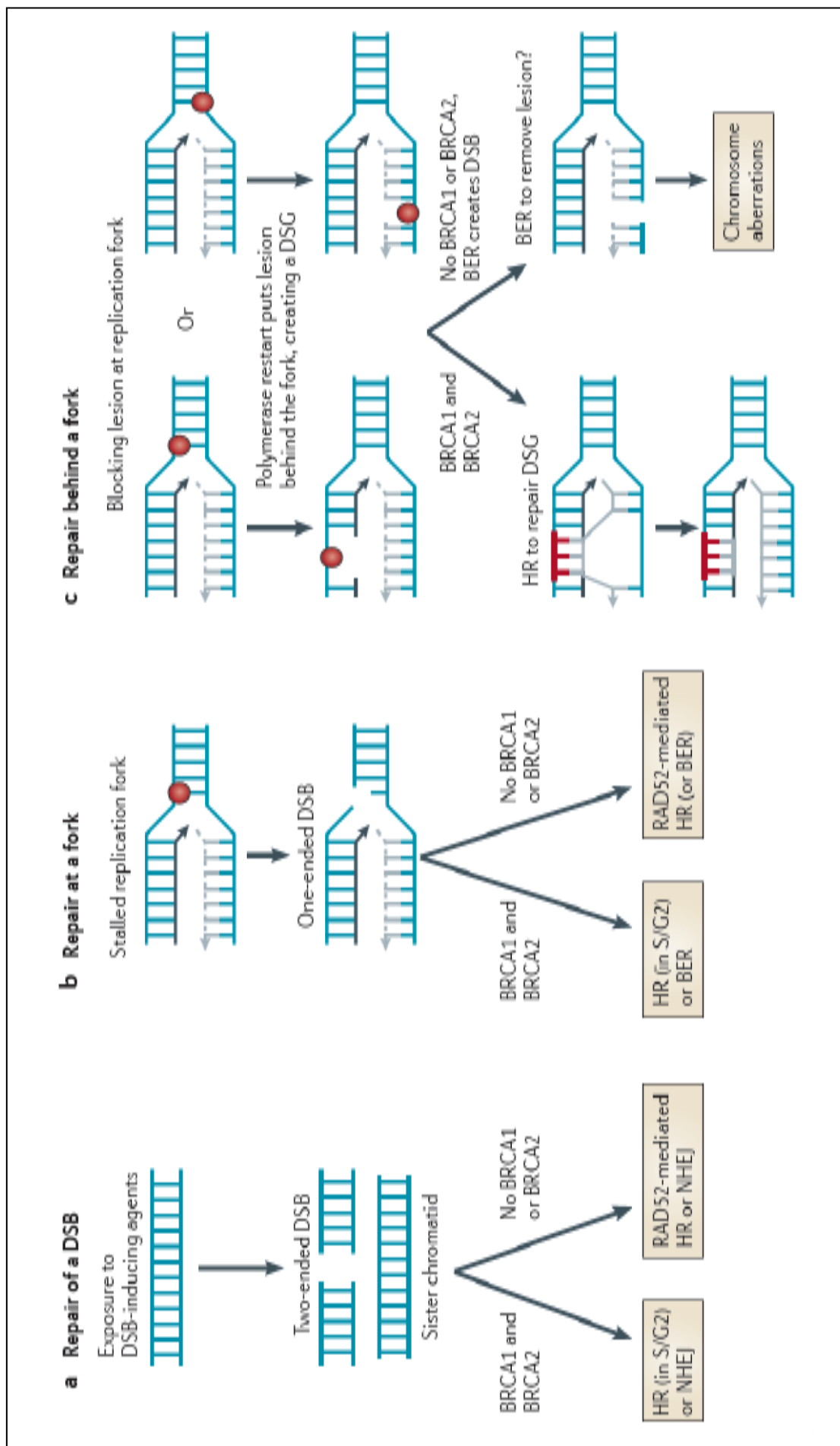
3. Бяха установени 5 нови, несъобщавани до сега варианти, от които четири патогенни мутации (с.8532_8533delAA, с.464_465delA, 9908delA, с.5396_5402delCCCTTG) и един “missense” вариант с неясно клинично значение (с.3999T>C), което позволи да се обогатят международните бази данни;

Приноси с научно-приложен характер:

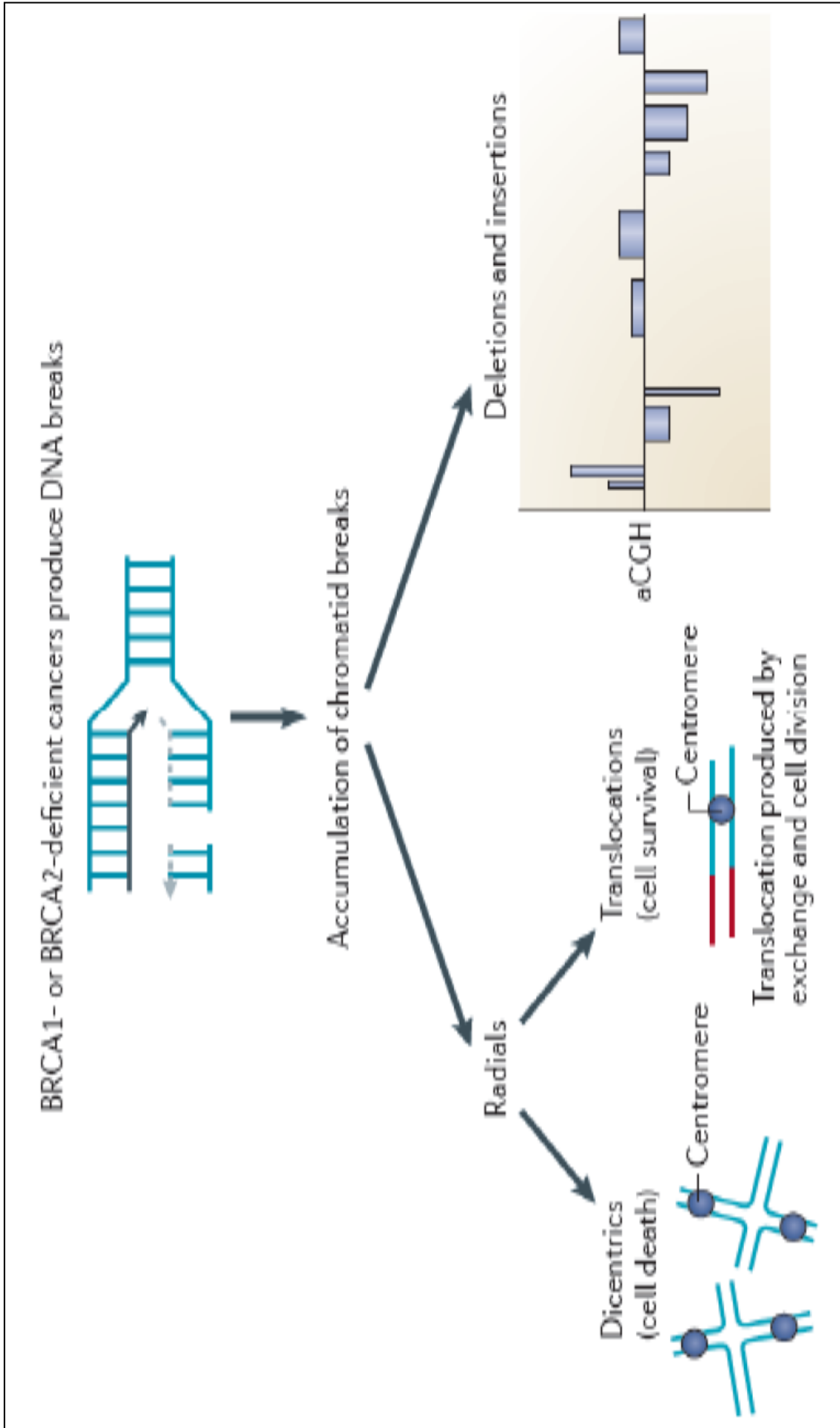
1. Беше разработен системен ход за анализ на мутации в *BRCA1* и *BRCA2*, при български пациенти, което ще подпомогне генетичния скрининг, съпътстващ диагностиката, профилактиката и избора на терапия при жени с фамилен и тройно негативен рак на гърдата в България.

Приноси с потвърдителен характер:

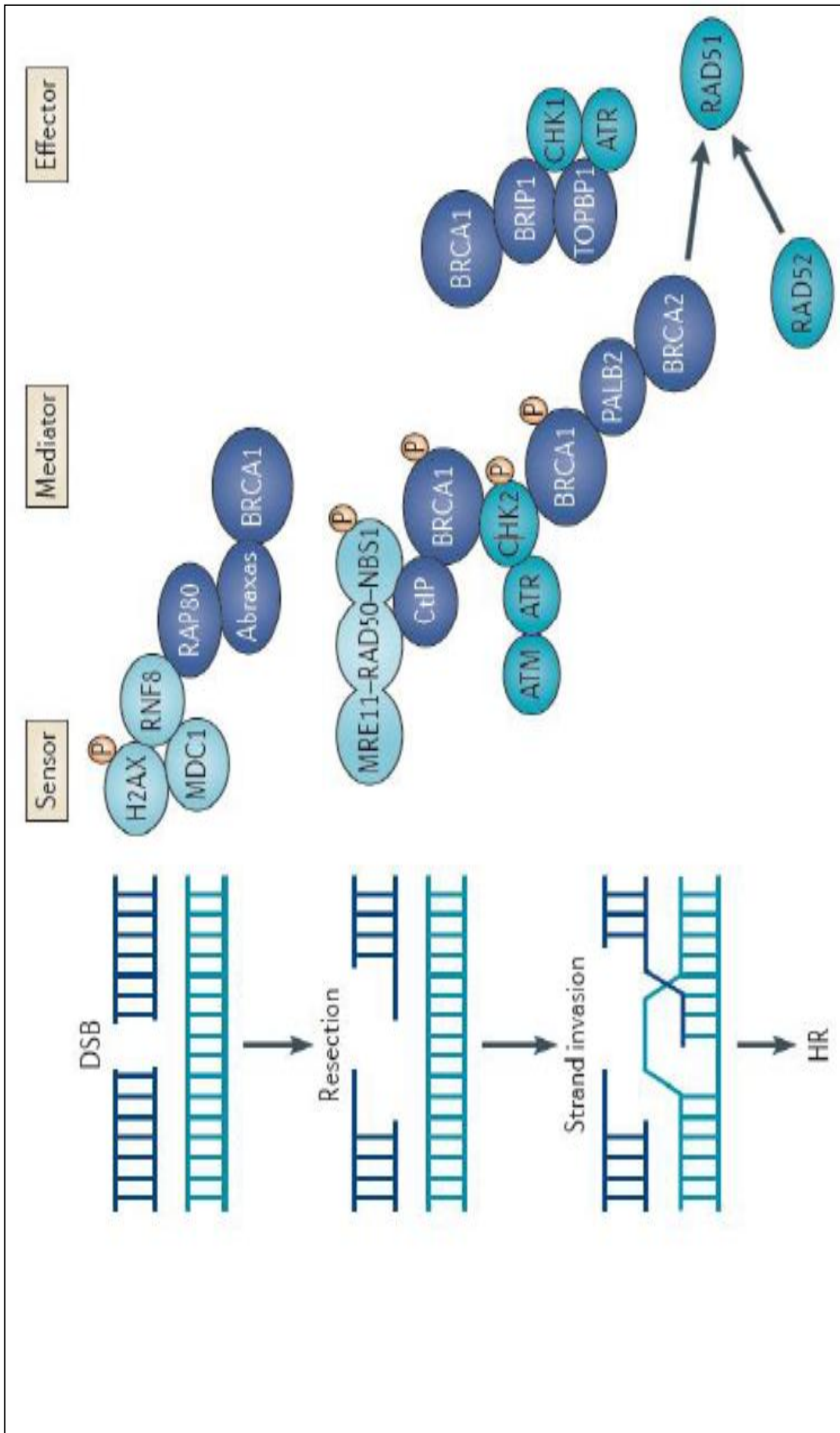
1. Потвърдена беше установената в предишни проучвания асоциация на полиморфизми в *FGFR2* и *SLC4A7* гените с риска от развитие на рак на гърдата и и определен ефекта им върху риска от заболяването при български пациенти.



Фигура 1. Хомоложна рекомбинация при различни видове увреждане на ДНК



Фигура 2. Механизъм на нарушаване на хромозомни дефекти в BRCA дефицитни клетки



Фигура 3. Молекулни механизми в отговор на увреждането на ДНК

Фигура 1. Хомоложна рекомбинация при различни видове увреждане на ДНК. Различни екзогенни агенти могат да доведат до появата на двойноверижни скъсвания на ДНК (DSBs) по време на репликацията. Тези лезии на матричната верига могат да доведат до формирането на DSBs или до „пропуски” в ново синтезираната верига (daughter-strand gaps (DSGs)). И в двата случая преференциално поправката се осъществява по време на S и G2 фазите на клетъчния цикъл от BRCA1 и BRCA2-медирана хомоложна рекомбинация (HR). По време на репликацията лезиите в матричната верига могат да бъдат поправени или зад или на разклонението на репликативната вилка. Пропуски, свързани с лезии на матричната верига зад репликативната вилка обаче не могат да бъдат отстранени чрез ексцизия на бази (base excision repair – BER), тъй като е необходима непроменена матрица за репарацията, следователно, HR е единственият механизъм за поправка на DSGs. Ако в клетките липсва функционален BRCA1 или BRCA2 това води до формирането на хроматидни повреди, което показва опит за поправка на DSGs, но в отсъствието на медираната от функционален BRCA белтък HR. DSBs, които остават непоправени зад репликативната вилка могат да доведат до формирането на хроматидни повреди. Следователно BRCA1 и BRCA2 имат решаваща роля в поправката по време на репликацията (Roy R et al, 2012).

Фигура 2. Механизъм на натрупване на хромозомни дефекти в BRCA дефицитни клетки В BRCA-дефицитни клетки се натрупват хроматидни повреди, което води до формирането на аномални хроматиди замени или на други процеси, свързани с некоректно присъединяване на скъсаните краища. Ако две хроматидни повреди са се свързали към хромозома структура, съдържаща два центромера се формира дицентрична центрозома, което води до клетъчна смърт. Ако замяната се появи в хроматида без центромер е възможно да се формира транслокация. Всички отличителни характеристики на BRCA-дефицитният рак може да се обяснят с формирането на хроматиди увреждания и последваща некоректна репарация (Roy R et al, 2012).

Фигура 3. Молекулни механизми в отговор на увреждането на ДНК. В отговор на ДНК двойноверижни увреждания (DSBs) или колапс на репликативната вилка (не е показан), сензорите (на схемата означени в светлосиньо) откриват уврежданията, след което медиаторите осигуряват необходимата сигнализация или активират ефекторите така, че се поправят щетите и да се активира Checkpoint контрола на клетъчния цикъл. BRCA1 формира макрокомплекси (на схемата означени в тъмно синьо) които са изключително важни медиатори при отговора на ДНК увреждането (Roy R et al, 2012).


Таблица. Модели за оценка на риска за развитието на рак на гърдата
(www.ncbi.nlm.nih.gov, L28)

Метод	Характеристика	Ограничения
Myriad Prevalence Tables	<ul style="list-style-type: none"> - Работи с емперични данни, посочени във форми на Myriad Genetics и основаващи се на личната и фамилната анамнеза; - Пробандът може да има или да няма поставена диагноза рак на гърдата или яйчниците; - Отчита възраст на поставяне на диагнозата преди или след 50 годишна възраст; - Отчита ≥ 1 засегнати родственици, само ако са с поставена диагноза по-рано от 50 годишна възраст; - Отчита ≥ 1 засегнати родственици, с рак на яйчниците, на каквато и да е възраст; - Включва AJ¹ потекло; - Лесен за употреба. 	<ul style="list-style-type: none"> - Ограничено разглеждане на родствениците на пробанда в семейството; - Отчита само ранна възраст на появата на заболяването.
BRCAPRO	<ul style="list-style-type: none"> - Статистически модел; - Пробандът може да има или да няма поставена диагноза рак на гърдата или яйчниците; - Отчита точната възраст на поставяне на диагноза рак на гърдата или яйчниците; - Отчита направени по-рано генетични изследвания, например BRCA-негативни родственици; - Отчита оофоректомия; - Включва всички FDR² и SDR³ родственици с или без онкологични заболявания; - Включва AJ потекло. 	<ul style="list-style-type: none"> - Изисква компютърен софтуер и отнема време за въвеждане на данните; - Включва само FDR и SDR родственици и може да се наложи промяна на пробанда, за по-добро определяне на риска и отчитане на заболеваемостта по бащина линия; - Може да надцени риска за развитие на билатерален рак на гърдата; - Моделът е по-достоверен при отчитане на риска при индивиди от северна европа, отколкото при малцинствени групи.
BOADICEA	<ul style="list-style-type: none"> - Статистически модел; - Включва всички FDR и SDR родственици с или без онкологични заболявания; - Пробандът може да има или да няма поставена диагноза рак на гърдата или яйчниците; - Включва AJ потекло. 	<ul style="list-style-type: none"> - Изисква компютърен софтуер и отнема време за въвеждане на данните; - Включва само FDR и SDR родственици и може да се наложи промяна на пробанда за по-добро определяне на риска.
Tyrer-Cuzick (IBIS)	<ul style="list-style-type: none"> - Статистически модел - Пробандът трябва да бъде незасегнат; - Включва репродуктивни данни, индекс на телесна маса и др. за оценка на риска за развитие на рак на гърдата 	<ul style="list-style-type: none"> - Предназначен е за индивиди, незасегнати от болестта.

¹ AJ - представители от източно европейското еврейско семейство ашкенази

² FDR – родственици от първа линия (first-degree relatives)

³ SDR – родственици от втора линия (second-degree relatives)



HEREDITARY
CANCER QUIZ
by MYRIAD GENETICS

[Home](#) | [About Myriad Genetics](#) | [Contact Us](#)

Take this quiz to find out your cancer risk

This brief questionnaire will help you determine whether you should be further evaluated for either Hereditary Breast and Ovarian Cancer syndrome or Lynch syndrome. **On average, the quiz takes less than 1 minute to complete.**

Start Now!

Don't forget to include BOTH your mother's and father's side of the family when answering questions. You will be assessed for the following hereditary cancers:

- breast cancer
- ovarian cancer
- colon cancer
- uterine cancer
- pancreatic cancer

These questions are based on the clinical guidelines doctors use to determine whether you should be tested for one of the above syndromes. This is not a test, but rather a questionnaire to help determine risk so you can be prepared to talk to your doctor about further evaluation of your personal and family history of cancer.

By using the Quiz, you agree to be bound by the following [Terms](#).

Question 1

Are you female or male?

Question 2

Are you of Ashkenazi Jewish Heritage?

Question 3

Have you ever had one of the following cancers?

Question 4

Do you have a close relative who has had any of the following cancers?

Question 5

In order to determine your risk we need additional information about this breast cancer diagnoses.
(Please check all that apply)

At least one person in your family was diagnosed with breast cancer at age 50 or younger.

There has been two or more breast cancers on the same side of your family.

There has been male breast cancer in your family.

None of the above apply.

Breast Cancer
 Colon Cancer
 Ovarian Cancer
 Pancreatic Cancer
 Stomach Cancer
 Uterine Cancer
 No Cancer

Your Results

Based on your answers, you may have an increased risk for

Hereditary Breast and Ovarian Cancer (HBOC)

The following red flags were identified in your personal/family cancer history:

You or a family member were diagnosed with two breast cancers

Next Steps

- [Save Your Results](#)
- [Print Your Results](#)
- [Find a Healthcare Provider](#)
- [Restart Quiz](#)

Фигура 1. Myriad Prevalence Tables модел за оценка на риска за развитие на рак на гърдата

UNIVERSITY OF CAMBRIDGE Centre for Cancer Genetic Epidemiology

BOADICEA Pedigree number

Enter a unique number/id for your new pedigree...

Pedigree number

Logout Reset Continue

© 2013 Centre for Cancer Genetic Epidemiology
Department of Public Health and Primary Care, University of Cambridge

Consultand Enter details of the consultand...

Clinical history Breast cancer pathology

First name/ID

Personal details
Sex and status Male Female
Age or Age at death Exact
Year of birth Exact

Breast cancer Age at diagnosis Exact
Contralateral BC Age at diagnosis Exact
Ovarian cancer Age at diagnosis Exact
Prostate cancer Age at diagnosis Exact
Pancreatic cancer Age at diagnosis Exact

Genetic testing
Genetic test type Mutation Untested None
 Alive Dead
 Approx Age range
 Approx Year range
 Approx Age range
 Approx Age range
 Approx Age range
 Approx Age range
 Mutation search
 BRCA1
 BRCA2

Logout Reset Go Back Continue

Consultand Enter details of the consultand...

Clinical history Breast cancer pathology

Estrogen Receptor (ER) Unknown Positive Negative
 Progesterone Receptor (PR) Unknown Positive Negative
 Human Epidermal Growth Factor Receptor Two (HER2) Unknown Positive Negative
 Cytokeratin Fourteen (CK14) Unknown Positive Negative
 Cytokeratin Five/Six (CK5/6) Unknown Positive Negative

Mother of Consultand Enter details of this individual...

Clinical history Breast cancer pathology

First name/ID

Personal details
Sex and status Male Female
Age or Age at death Exact
Year of birth Exact

Breast cancer Age at diagnosis Exact
Contralateral BC Age at diagnosis Exact
Ovarian cancer Age at diagnosis Exact
Prostate cancer Age at diagnosis Exact
Pancreatic cancer Age at diagnosis Exact

Genetic testing
Genetic test type Mutation Untested None
 Alive Dead
 Approx Age range
 Approx Year range
 Approx Age range
 Approx Age range
 Approx Age range
 Mutation search
 BRCA1
 BRCA2

Logout Reset Go Back Continue

Father of Consultand Enter details of this individual...

Clinical history Breast cancer pathology

First name/ID

Personal details
Sex and status Male Female
Age or Age at death Exact
 Alive Dead
 Approx Age range

BOADICEA Pedigree table view

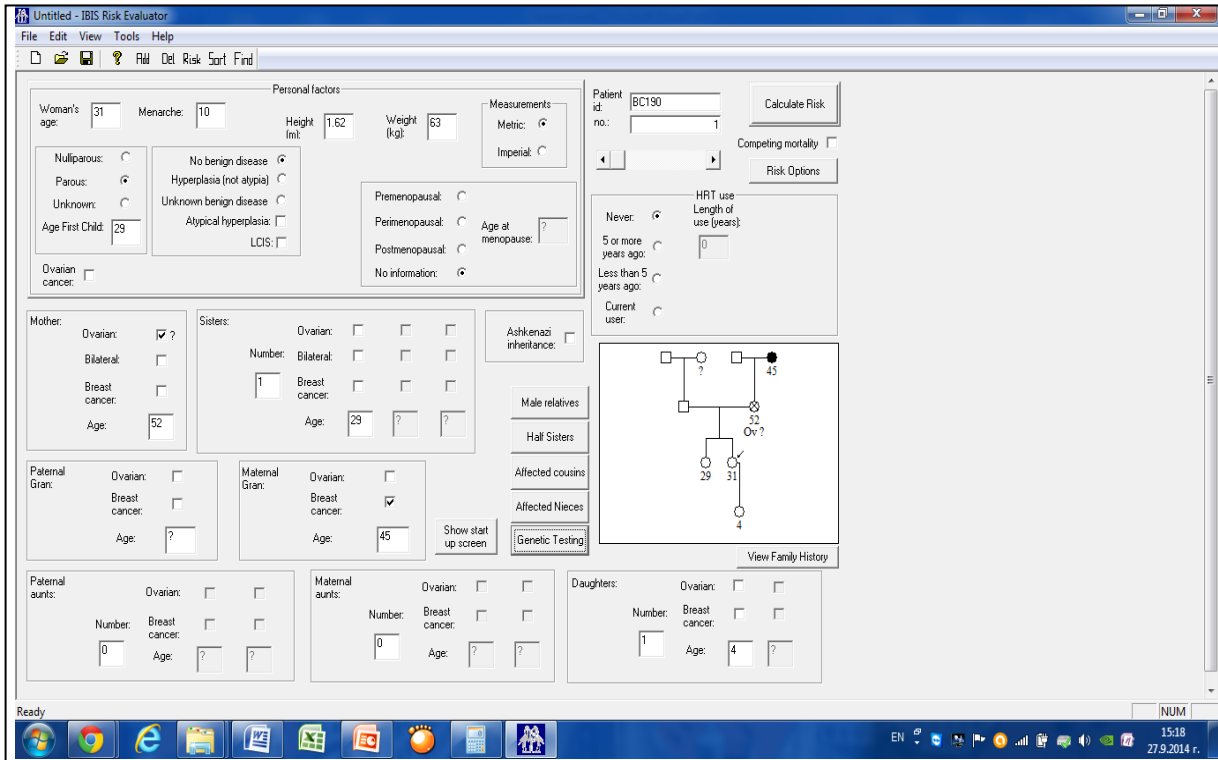
Your input pedigree is listed below...

Name	Tgt	IndivID	FathID	MothID	Sex	Twin	Status	Age	Yob	1BrCa	2BrCa	OvCa	ProCa	PanCa	Gstch	Mutn	Ashkn	Er	Pr	Her2	Ck14	Ck56
1	190	T	1	2	3	F	alive	31	1978	31					srch	brca1&2		-ve	-ve	-ve		
2	Anon		3		F		alive	55	1955			52			srch	brca1&2						
3	Anon		2		M		alive	unsp	unsp													

Model: UK BRCA frequencies / Default BRCA sensitivities / UK cancer incidence rates / Percent format

Page Up Page Down Edit Add Delete MZ Twin
Logout Reset Model Draw Switch Compute

Фигура 2. BOADICEA модел за оценка на риска за развитие на рак на гърдата.

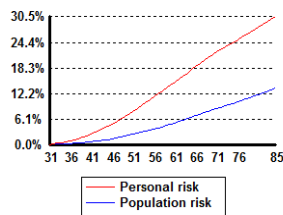
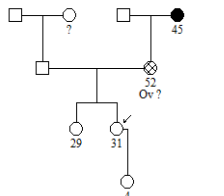


Оценка на риска за развитието на рак на гърдата без мутация в *BRCA1* гена в семейството

ID: BC190

Woman's age is 31 years.
Age at menarche was 10 years.
Age at first birth was 29 years.
Menopause status is unknown.
Height is 1.62 m.
Weight is 63 kg.
Woman has never used HRT.

Risk after 10 years is 2.4%.
10 year population risk is 0.6%.
Lifetime risk is 30.4%.
Lifetime population risk is 13.3%.
Probability of a *BRCA1* gene is 7.79%.
Probability of a *BRCA2* gene is 5.99%.



Copy to Clipboard

Print

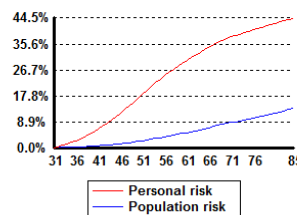
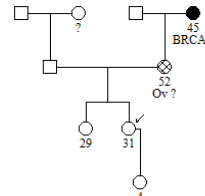
Close

Оценка на риска за развитието на рак на гърдата с мутация в *BRCA1* гена в семейството

ID: BC190

Woman's age is 31 years.
Age at menarche was 10 years.
Age at first birth was 29 years.
Menopause status is unknown.
Height is 1.62 m.
Weight is 63 kg.
Woman has never used HRT.

Risk after 10 years is 6.3%.
10 year population risk is 0.6%.
Lifetime risk is 44.2%.
Lifetime population risk is 13.3%.
Probability of a *BRCA1* gene is 47.59%.
Probability of a *BRCA2* gene is 0.14%.

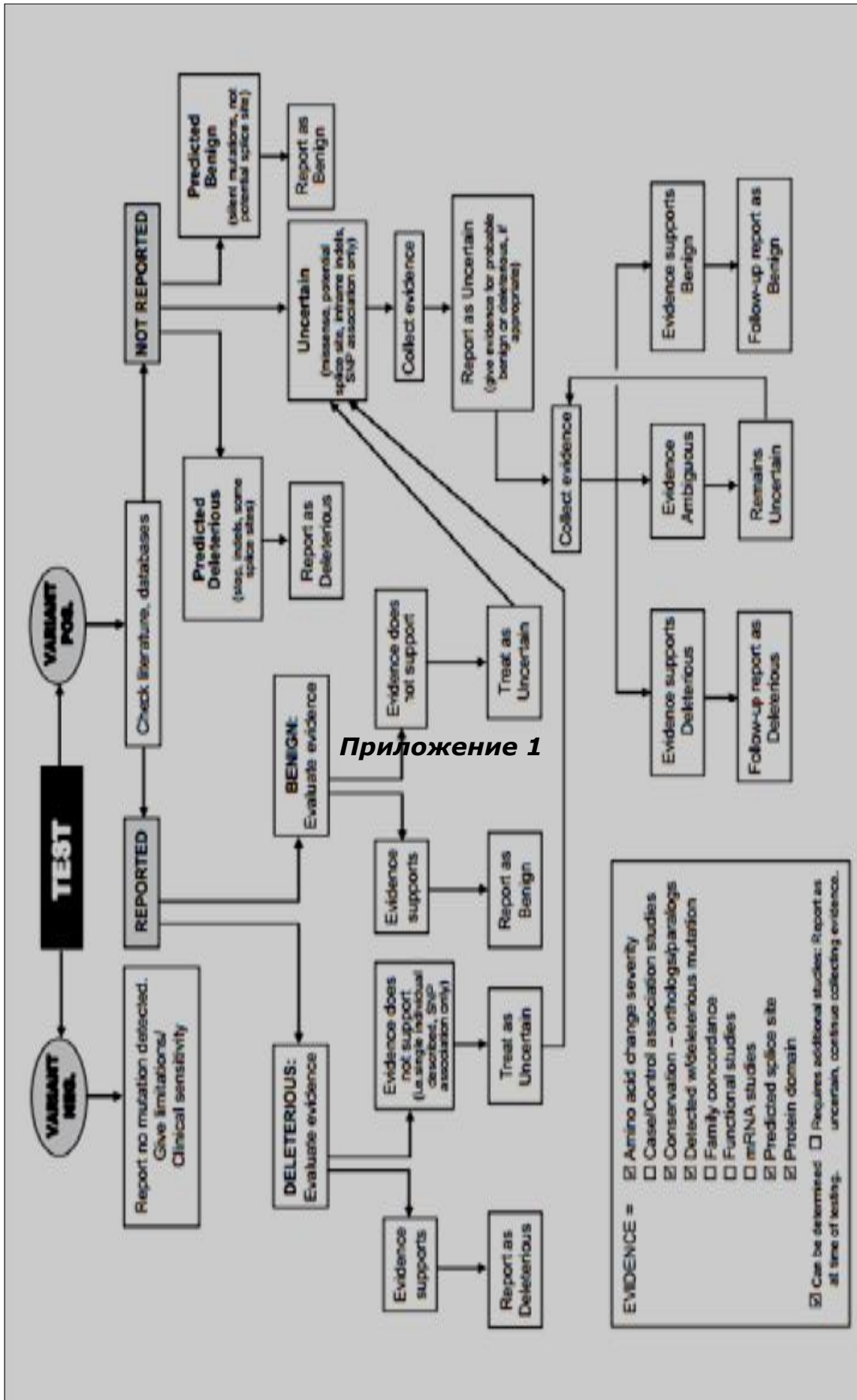


Copy to Clipboard

Print

Close

Фигура 3. IBIS (Tyrer-Cuzick) модел за оценка на риска за развитие на рак на гърдата



Фигура. Примерна схема за определяне на клиничното значение на VUS (Richards CS et al. 2008)

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 [L22-L23].

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;

Приложение 4

- 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

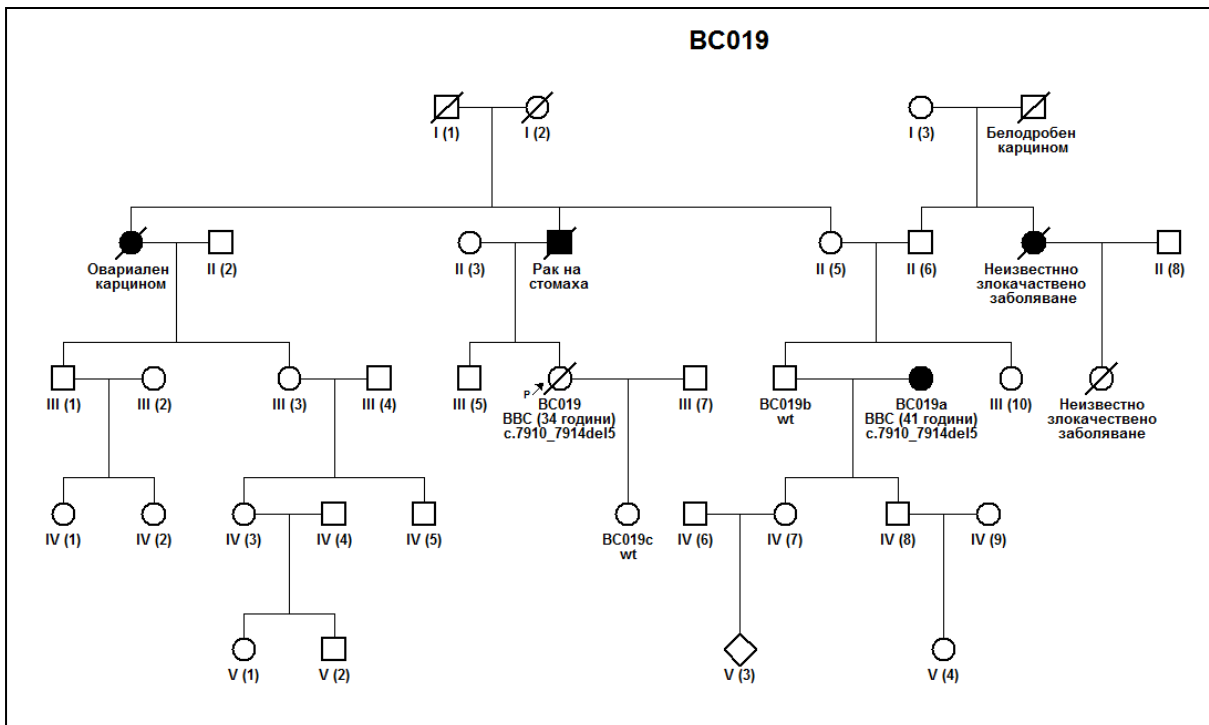
- Еднаква възраст и пол с изследваната група пациенти;

- Да нямат родствена връзка с пациенти, включени в изследването;

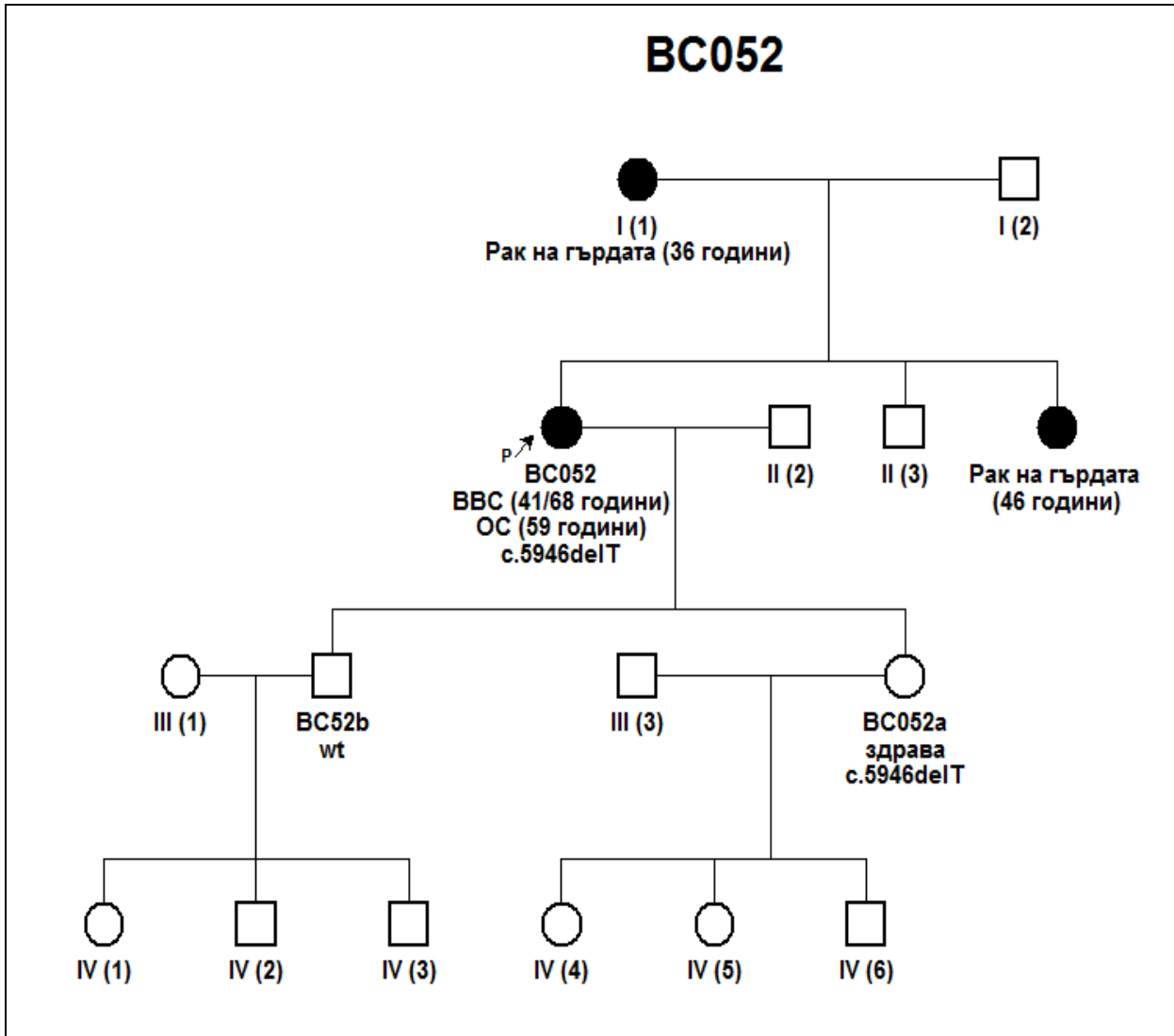
- Да нямат преки родственици, майка, баща, сестри, братя или деца с рак на гърдата, яйчника или простатата;

- Да са от една и съща етническа група с пациентите;

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

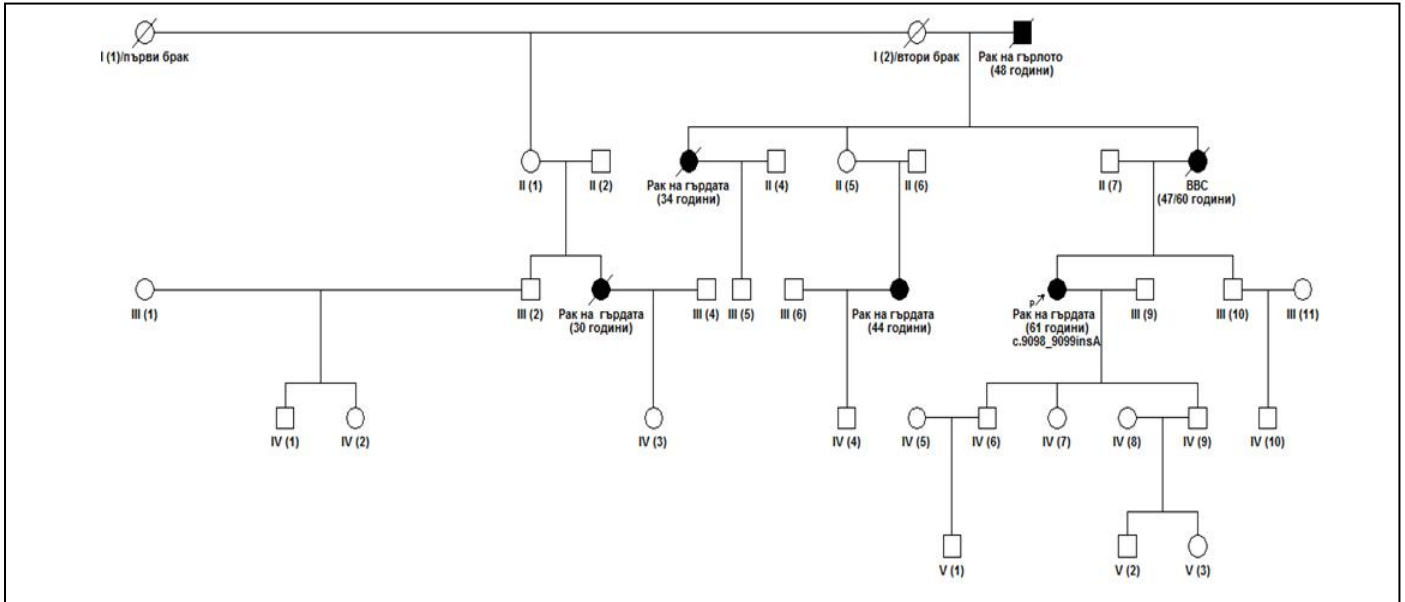


Фигура 1. Родословие на пациентка BC019

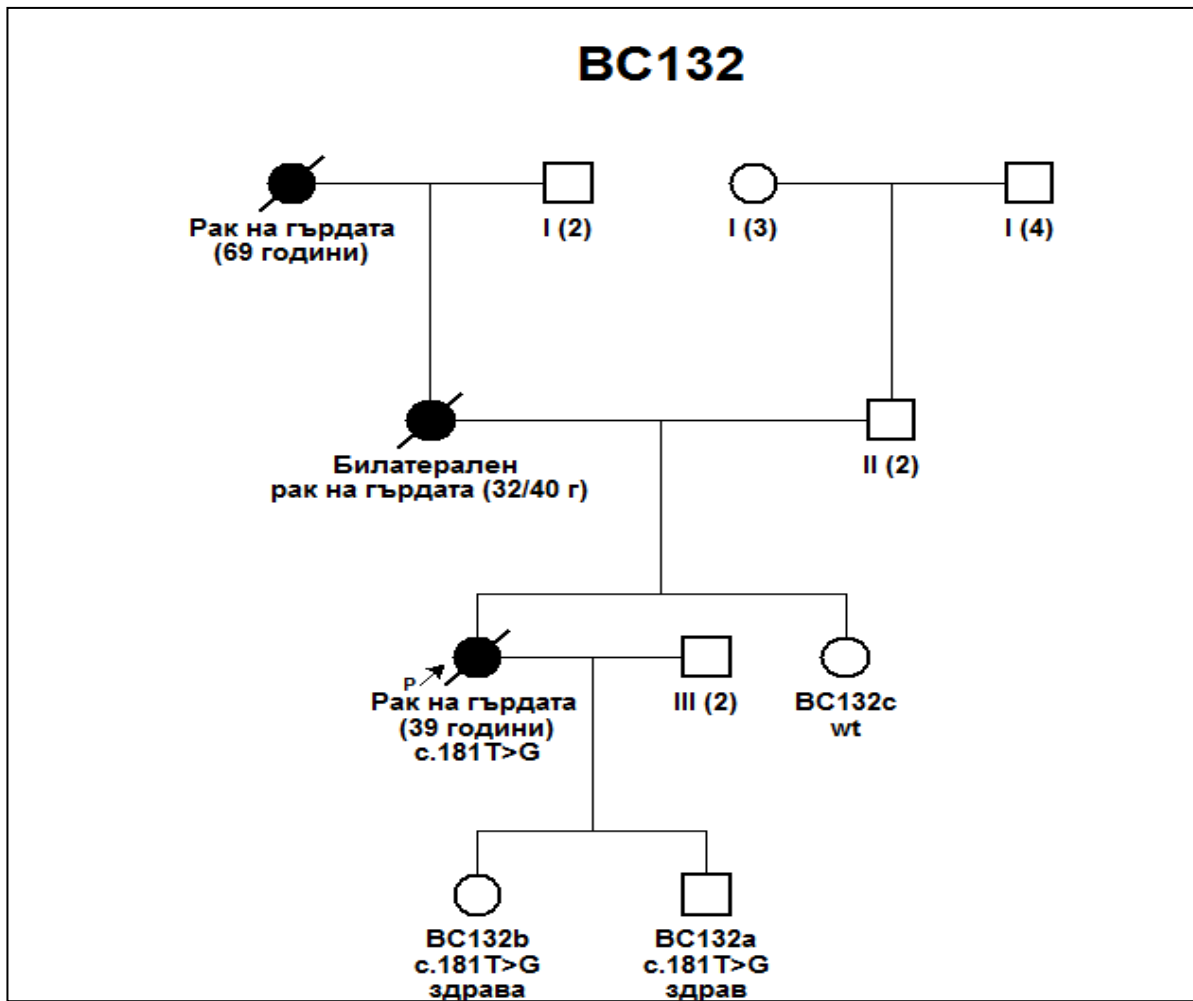


Фигура 1. Родословие на пациентка BC052

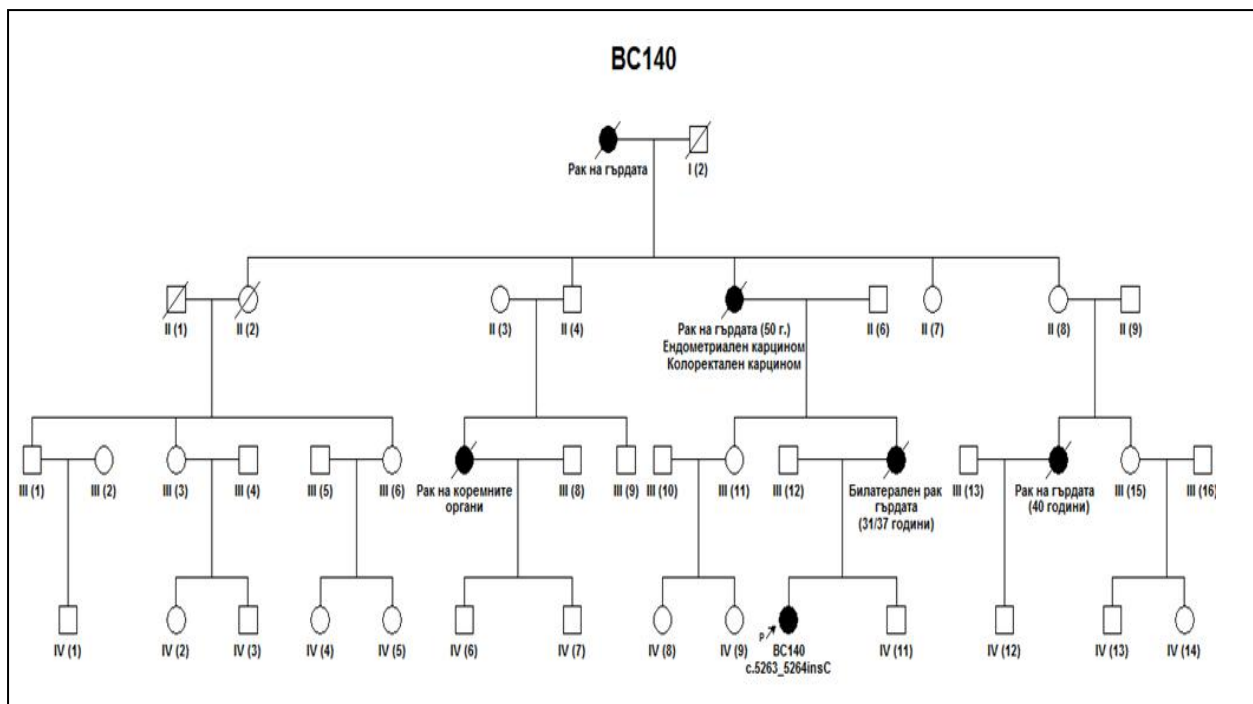
BC088



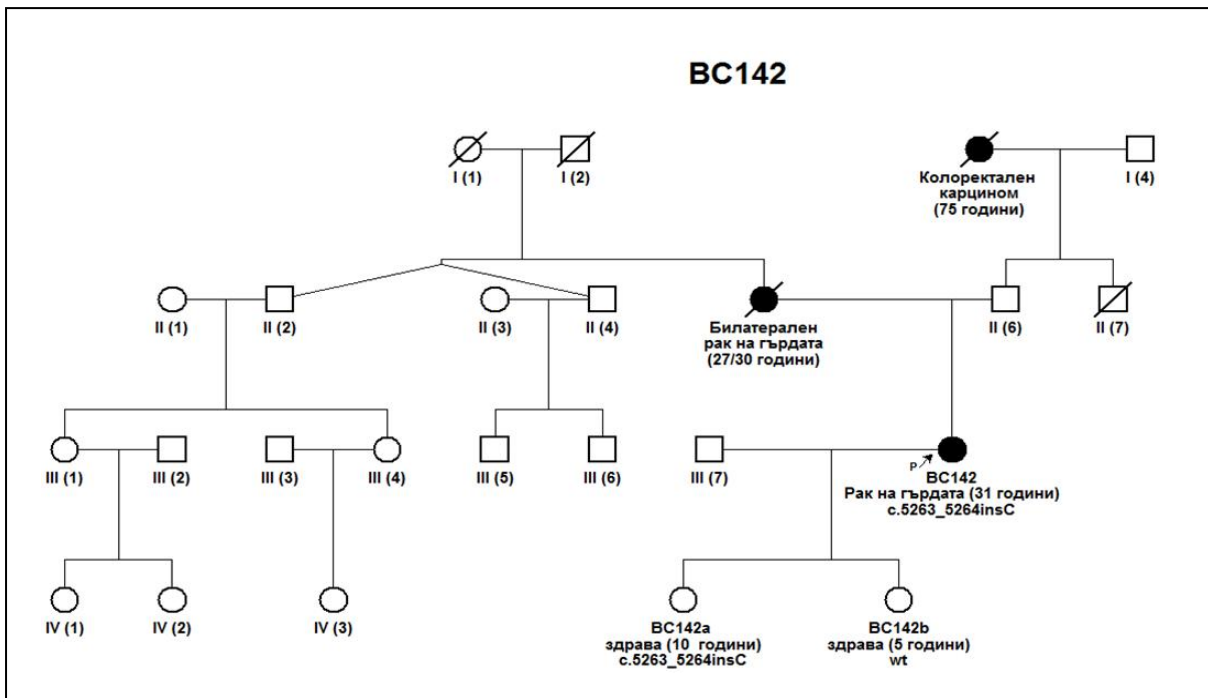
Фигура 1. Родословие на пациентка BC088



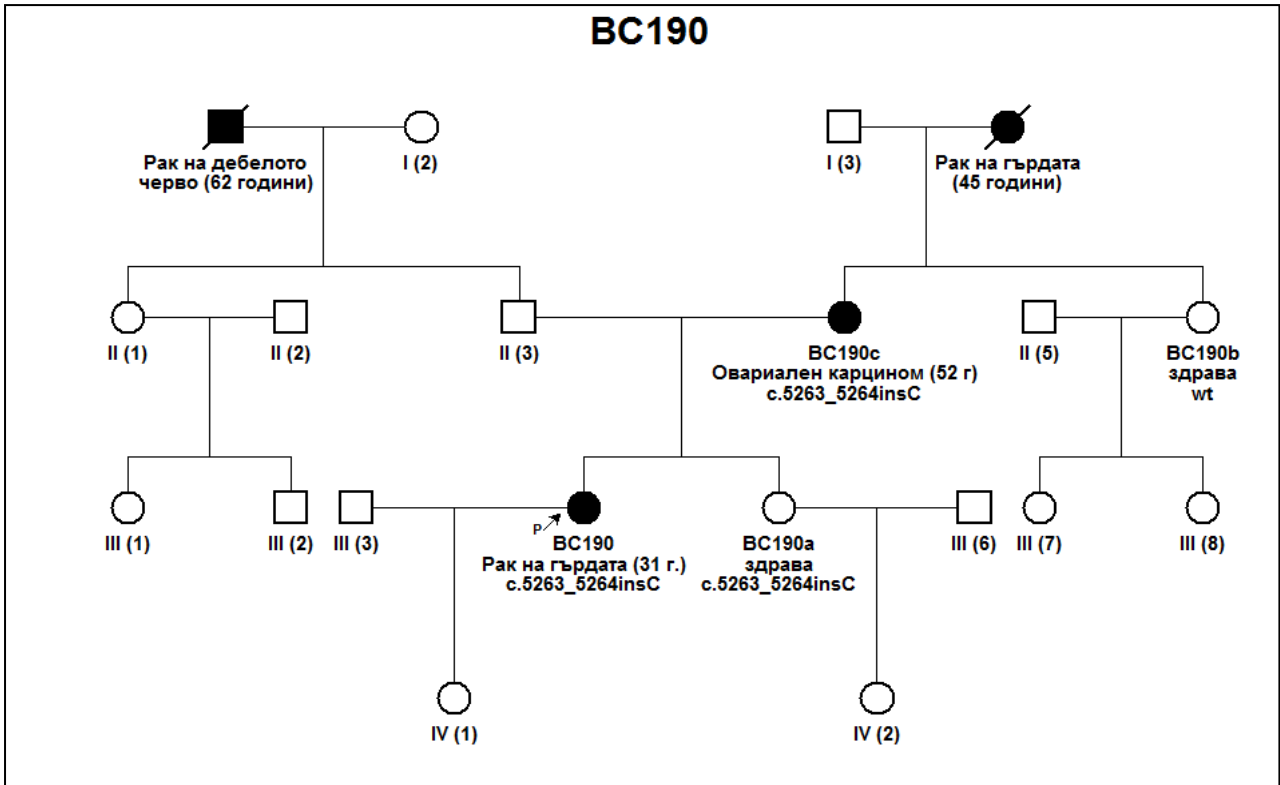
Фигура 1. Родословие на пациентка BC132



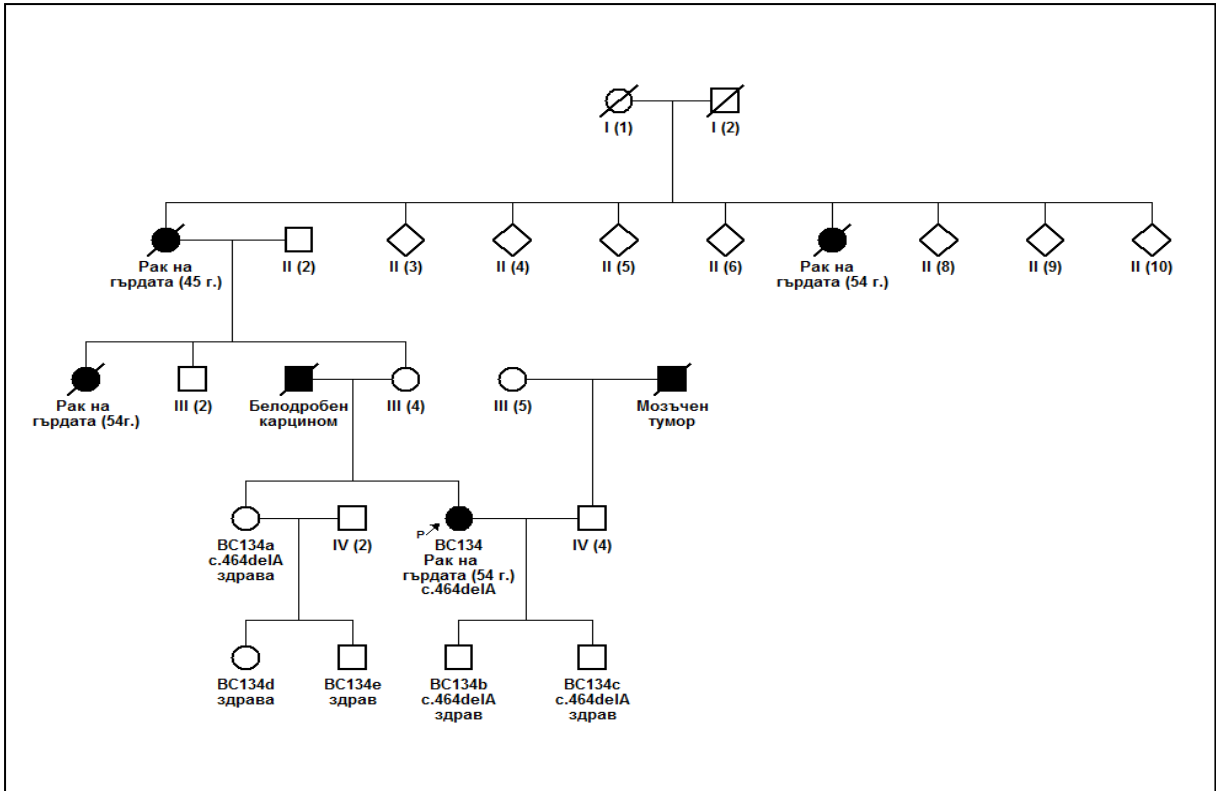
Фигура 1. Родословие на пациентка BC140



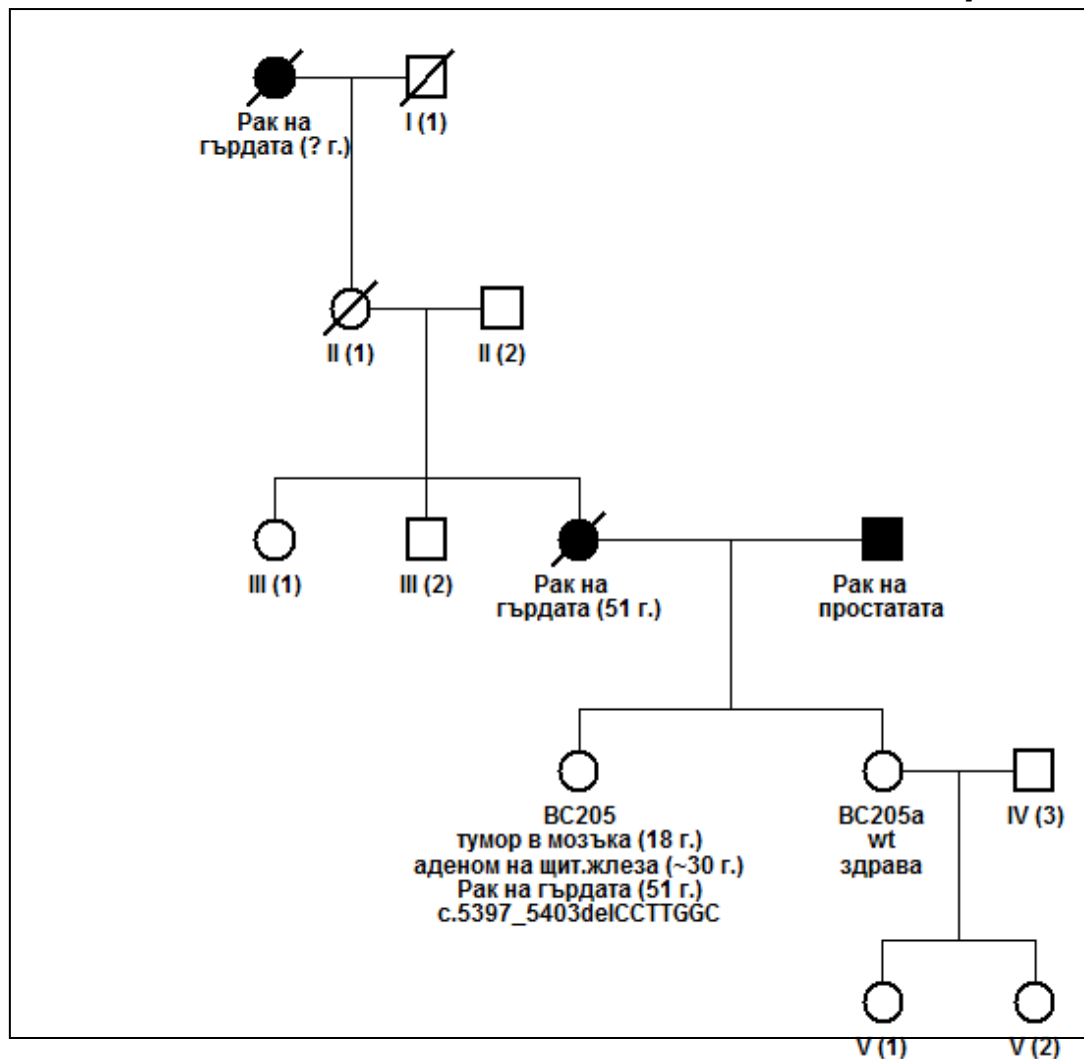
Фигура 1. Родословие на пациентка BC142



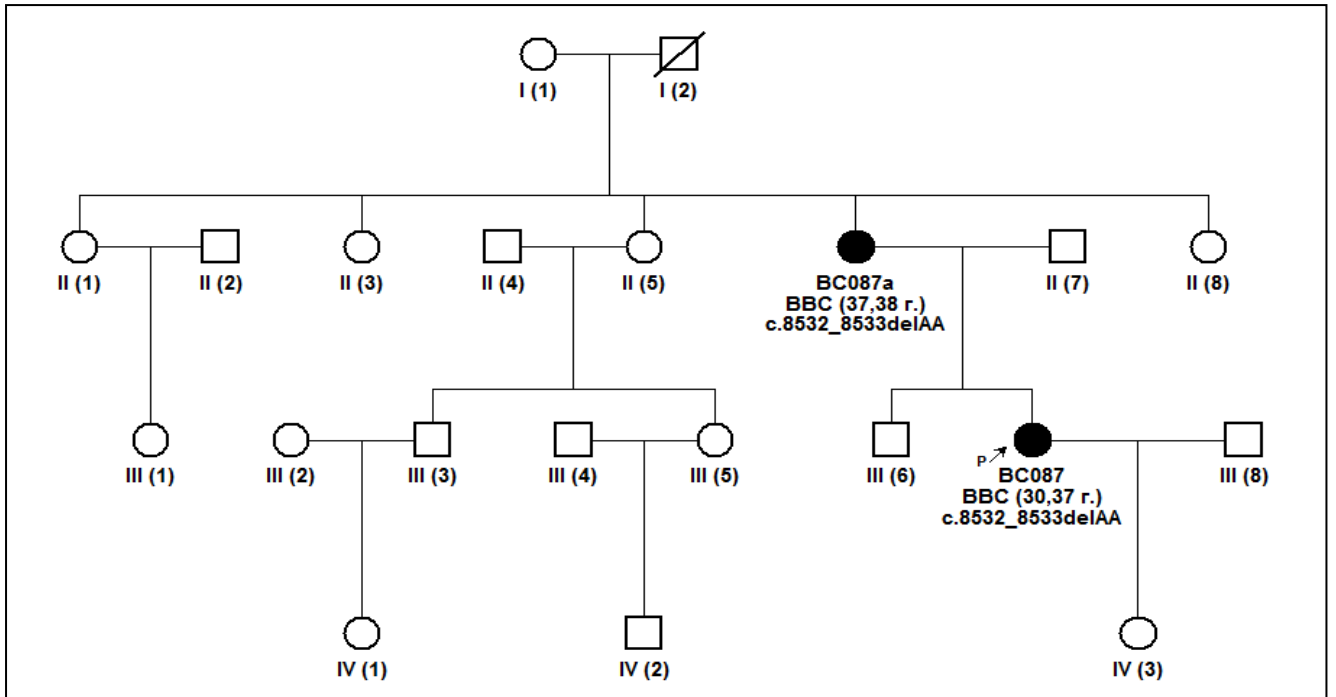
Фигура 1. Родословие на пациентка BC190



Фигура 1. Родословие на пациентка BC134



Фигура 1. Родословие на пациентка BC205



Фигура 1. Родословие на пациентка BC087

BRCA1/2 мутации с патогенен ефект

Exon	Номенклатура BIC	Номенклатура HGVS	Белтъчна номенклатура	Функционален домен	Тип мутация	Брой пациенти
BRCA1						
8	583delA	c.464delA	p.Gln155fs	-	Frameshift	1
17	5149del4	c.5030_5033delCTAA	p.Thr1677_Asn1678delinsIlefs	BRCT1/AD2	Frameshift	1
20	5382insC	c.5263_5264insC	p.Ser1755delinsSerProfs	linker	Frameshift	22
22	5515del7	c.5396_5402delCCCCTGG	p.Thr1799delins	BRCT2/AD2	Frameshift	1
15	E1535X	c.4603G>T	p.Glu1535Ter	AD1	Nonsense	1
5	C61G	c.181 T>G	p.Cys61Gly	ring finger	Missense	2
BRCA2						
11	5946delCT	c.5718_5719delCT	p.Asn1906_Ser1907=fs	-	Frameshift	1
11	6079del4	c.5851_5854delAGTT	p.Ser1951_Leu1952delinsTrpfs	-	Frameshift	2
11	6174delT	c.5946delT	p.Ser1982Argfs	BRC repeat7	Frameshift	1
17	8138del5	c.7910_7914delCCTTT	p.Ala2637_Phe2638delinsAlafs	Helical Domain	Frameshift	1
20	8760delAA	c.8532_8533delAA	p.Glu2844fs	Tower	Frameshift	1
23	9326insA	c.9098_9099insA	p.Thr3033delinsThrSerfs	OB2	Frameshift	4
27	9908delA	c.9682delA	p.Gln3227fs	-	Frameshift	1

Приложение 7

Варианти с неясно клинично значение при пациентите с фамилен рак на гърдата

Ек.	dbSNP	Номенклатура (VIC)	cDNA номенклатура	Белтъчна номенклатура	Домен	Тип мутация	MAF при български пациенти (%)	MAF при здрави индивиди (%)	MAF в Европа (%)
BRCA1									
5	rs80357370	C47G	c.139T>G	p.Cys47Gly	ring finger	missense	0.25	0.00	NA
8	rs56187033	Y179C	c.536A>G	p.Tyr179Cys	-	missense	0.25	0.00	1.00
11	rs28897675	L246V	c.736T>G	p.Leu246Val	-	missense	0.25	-	0.20
11	rs1799950	Q356R	c.1067 A>G	p. Gln356Arg	-	missense	7.40	5.60	4.90
11	rs55906931	F486L	c.1456T>C	p.Phe486Leu	-	missense	0.25	-	0.10
11	rs56012641	N550H	c.1648A>C	p.Asn550His	-	missense	0.25	0.00	0.10
11	rs4986850	D693H	c.2077G>A	p.Asp693Asn	-	missense	6.00	8.50	9.70
11	rs799917	P871L	c.2612C>T	p.Pro871Leu	-	missense	35.00	41.20	33.60
11	rs16941	E1038G	c.3113A>G	p.Glu1038Gly	-	missense	34.00	36.00	35.80
11	rs4986852	S1040N	c.3119G>A	p.Ser1040Asn	-	missense	2.80	2.83	5.80
11	rs16942	K1183R	c.3548A>G	p.Lys1183Arg	-	missense	33.00	31.50	35.20
11	-	V1333A	c.3999T>C	p. Val1333Ala	AD1	missense	0.25	0.00	-
16	rs1799966	S1613C	c.4837A>G	p.Ser1613Gly	AD2	missense	32.00	33.90	31.40
16	rs1799967	M1652I	c.4956G>A	p.Met1652Ile	BRCT1/A D2	missense	3.30	1.72	0.50
9	rs1799965	C197C	c.591C>T	p.Cys197=	-	cds-synon	0.90	0.00	0.10
11	rs1799949	S694S	c.2082C>T	p.Ser694=	-	cds-synon	33.20	36.90	28.00
11	rs16940	L771L	c.2311T>C	p.Leu771=	-	cds-synon	24.00	-	33.20
13	rs1060915	S1436S	c.4308T>C	p.Ser1436=	AD1	cds-synon	33.90	-	33.20
7	rs14785644 1	IVS7+36delCTT	c.441+36_441+ 38 delCTT	-	-	IVS	19.70	37.89	NA
8	rs799923	IVS7-34 C>T	c.442-34C>T	-	-	IVS	22.90	23.91	25.70
9	rs8176144	IVS8-58delT	c.548-58delT	-	-	IVS	19.40	38.55	33.10
15	rs8176212	IVS14-63C>G	c.4485-63C>G	-	-	IVS	33.30	-	32.10
18	rs8176258	IVS17-53 C>T	c.5075-53C>T	-	-	IVS	1.30	-	3.40
20	-	IVS20+56 insGTA	c.5277+56delG TA	-	-	IVS	0.50	0.00	-

Приложение 7

BRCA2									
10	rs766173	N289H	c.865A>C	p.Asn289His	-	missense	4.57	-	3.10
10	rs28897706	S326R	c.978C>A	p.Ser326Arg	-	missense	1.35	-	0.10
10	rs144848	H372N	c.1114A>C	p.Asn372His	-	missense	28.50	-	32.30
11	rs1799944	N991D	c.2971A>G	p.Asn991Asp	-	missense	4.86	-	3.10
11	rs80358600	S1172L	c.3515C>T	p.Ser1172Leu	-	missense	0.25	0.00	0.10
11	rs4987117	T1915M	c.5744C>T	p.Thr1915Met	-	missense	1.72	1.67	3.20
11	rs1799954	R2034C	c.6100C>T	p.Arg2034Cys	-	missense	0.25	-	1.8
11	rs55794205	R2108C	c.6322C>T	p.Arg2108Cys	-	missense	0.25	-	0.10
15	rs11571707	I2490T	c.7469T>C	p.Ile2490Thr	Helical Domain	missense	0.50	-	0.00
23	rs80359165	Y3035S	c.9104A>C	p.Tyr3035Cys	OB2	missense	0.50	0.25	NA
11	rs80359432	E1382del	c.4146_4148delAGA	delinsAsp	-	Cds_indel	0.25	-	NA
10	rs1801439	S455S	c.1365A>G	p.Ser455=	-	Cds-synon	2.96	-	3.10
11	rs1801499	H743H	c.2229T>C	p.His743=	-	Cds-synon	3.51	-	3.10
11	rs1801406	K1132K	c.3396A>C	p.Lys1132=	-	Cds-synon	28.26	-	25.00
11	rs543304	V1269V	c.3807T>C	p.Val1269=	-	Cds-synon	18.82	-	22.6
14	rs1799955	S2414S	c.7242A>G	p.Ser2414=	-	Cds-synon	18.33	-	19.00
2	rs1799943	203 G>A	c.-26G>A	-	-	UTR-5	25.00	-	19.90
27	rs15869	IVS27+104A>C	c.*105A>C	-	-	UTR-3	18.65	-	27.40
4	rs11571610	IVS4+67A>C	c.425+67A>C	-	-	IVS	4.05	-	3.10
4	rs4942423	IVS4+147G>T	c.425+147G>T	-	-	IVS	5.40	-	6.20
5_6	rs3783265	IVS4-89T>C	c.426-89T>C	-	-	IVS	3.61	-	3.10
8	rs2126042	IVS8+56C>T	c.681+56C>T	-	-	IVS	18.55	-	13.30
11	rs11571661	IVS11+80 delTTAA	c.6841+80_6841+83 delTTAA	-	-	IVS	24.28	-	29.40
13	rs11571680	IVS13+164 delTTATAAAAT	c.7007+134_7007+135 insTTATAAAAT	-	-	IVS	3.21	-	4.30
15		IVS15+28 C >A	c.7617+28C>A	-	-	IVS	10.48	-	-
17	rs9534262	IVS16-14 T>C	c.7806-14T>C	-	-	IVS	31.91	49.27	46.50

Приложение 8

Докладвани в европейските популации мутации в BRCA1 гена (С червено са отбелязани общите за българската популация мутации)

Популация	Мутации в BRCA1				
		HGVS	BIC		
Ашкенази		c.66_67delAG	185delAG	p.Leu22_Glu23LeuValfs	rs80357713
		c.5263_5264insC	5382insC	p.Ser1755?fs	rs80357906
Австрия		c.181T>G	C61G	p.Cys61Gly	rs28897672
		c.5263_5264insC	5382insC	p.Ser1755?fs	rs80357906
		c.1687C>T	Q563X	p.Gln563Ter	rs80356898
		c.3016_3019del4	3135del4	p.His1006_Ser1007?fs	rs80357994
		c.2676_2679del4	2795del4	p.Leu892_Lys893?fs	rs80357891
Словения		c.1687C>T	Q563X	p.Gln563Ter	rs80356898
		c.181T>G	C61G	p.Cys61Gly	rs28897672
		c.5263_5264insC	5382insC	p.Ser1755?fs	rs80357906
		c.181T>A	C61S	p.Cys61Ser	rs28897672
Германия		exon 17 deletion			
		c.5263_5264insC	5382insC	p.Ser1755?fs	rs80357906
		c.181T>G	C61G	p.Cys61Gly	rs28897672
		c.4065_4068delTCAA	4184del4	p.Asn1355_Gln1356?fs	rs80357508
		c.2338C>T	Q780X	p.Gln780Ter	rs80356945
Чехия		c.5030_5033delCTAA	5149del4	p.Thr1677_Asn1678?fs	rs80357862
		c.181T>G	C61G	p.Cys61Gly	rs28897672
		c.5263_5264insC	5382insC	p.Ser1755?fs	rs80357906
		c.3700_3704delGTAAA	3819del5	p.Val1234_Asn1235?fs	rs80357609
		exons 1–17 deletion			
Унгария		exons 5–14 deletion			
		c.5263_5264insC	5382insC	p.Ser1755?fs	rs80357906
		c.181T>G	C61G	p.Cys61Gly	rs28897672
		c.66_67delAG	185delAG	p.Leu22_Glu23LeuValfs	rs80357713

Приложение 8

Гърция		c.5263_5264insC	5382insC	p.Ser1755?fs	rs80357906
		c.5212G>A	G1738R	p.Gly1738Arg	rs80356937
		c.5251C>T	R1751X	p.Arg1751Ter	rs80357123
		c.5467G>A	A1823T	p.Ala1823Thr	rs80357212
Дания		c.2475_2475delC	2594delC	p.Asp825Glu fs	rs80357970
		c.3319G>T	E1107X	p.Glu1107Ter	rs80357106
		c.5263_5264insC	5382insC	p.Ser1755?fs	rs80357906
		c.3710delT	3829delT		
Полша		exons 3-16 deletion			
		c.5263_5264insC	5382insC	p.Ser1755?fs	rs80357906
		c.181T>G	C61G	p.Cys61Gly	rs28897672
Латвия		c.4035_4035delA	4154delA	p.Glu1345=fs	rs80357711
		c.4035_4035delA	4154delA	p.Glu1345=fs	rs80357711
Литва		c.5263_5264insC	5382insC	p.Ser1755?fs	rs80357906
		c.4035_4035delA	4154delA	p.Glu1345=fs	rs80357711
Беларус		c.5263_5264insC	5382insC	p.Ser1755?fs	rs80357906
		c.181T>G	C61G	p.Cys61Gly	rs28897672
Русия		c.5263_5264insC	5382insC	p.Ser1755?fs	rs80357906
Италия		c.3228_3229delAG	3347delAG	p.Arg1076_Gly1077ArgAla fs	rs80357635
		c.3285delA	3404delA	p.Lys1095Asn fs	rs397509051
		c.1380_1381insA	1499insA	p.Ile460_Phe461?fs	rs80357714
		c.5062_5064delGTT	V1688del	p.Val1688delVal	rs80358344
		c.4964_4982delTCTTCTGGGGTCAGGCCAG	5083del19	p.Ser1655_Glu1661?fs	rs80359876
		c.5062_5064delGTT	V1688del	p.Val1688delVal	rs80358344
Франция		c.5030_5033delCTAA	5149del4	p.Thr1677_Asn1678?fs	rs80357862
		c.3481_3491delGAAGATACTAG	3600del11	p.Glu1161_Ser1164?fs	rs80357877
		c.5128G>T	5247G>T	p.Gly1710Ter	rs397509229
	c.5030_5033delCTAA	5149del4	p.Thr1677_Asn1678?fs	rs80357862	

Приложение 8

Испания		c.66_67delAG	185delAG	p.Leu22_Glu23LeuValfs	rs80357713
		c.211A>G (Galicia)	R71G	p.Arg71Gly	rs80357382
		c.5117G>A	G1706E	p.Gly1706Glu	rs80356860
		c.5123C>A	A1708E	p.Ala1708Glu	rs28897696
		c.470_471delCT	589delCT	p.Ser157Terfs	rs80357887
		c.5153-1G>A	IVS18-1G>A		rs80358137
Белгия		c.212+3A>G	IVS5+3A>G		rs80358083
		c.2359_2360insG	2478insG	p.Glu787?fs	rs80357739
		c.3661G>T	E1221X	p.Glu1221Ter	rs80357310
Холандия		c.2685_2686delAA	2804delAA	p.Gln895_Ser896=fs	rs80357636
		c.2193_2197delAGAAG	2312del5	p.Lys731_Glu733?fs	rs80357507
		c.1292_1293insT	1411insT	p.Leu431?fs	rs80357528
		exon 13 deletion (3,8-kb)			
		exon 22 deletion (510-bp)			
Швеция		c.3052_3053insTGAGA	3171ins5	p.Asn1018?fs	rs80357856
		c.2475_2475delC	2594delC	p.Asp825Glu fs	rs80357970
		c.1082_1092delAGGATTCTCTG	1201del11	p.Ser361_Pro364?fs	rs80359880
		c.1687C>T	Q563X	p.Gln563Ter	rs80356898
		c.3626_3626delT (Northern)	3745delT	p.Leu1209Terfs	rs80357571
		c.1016_1017insA	1135insA	p.Lys339?fs	rs80357569
		exon 13 duplication (ins6kbEx13)			
Норвегия		c.1556_1556delA	1675delA	p.Lys519Argfs	rs80357662
		c.3228_3229delAG	3347delAG	p.Arg1076_Gly1077ArgAlafs	rs80357635
		c.697_698delGT	816delGT	p.Val233Asnfs	rs80357747
		c.1016_1017insA	1135insA	p.Lys339?fs	rs80357569
		c.3178G>T	E1060X	p.Glu1060Ter	rs80357424
		c.4745_4745delA	4864delA	p.Asp1582Alafs	rs80357907
		c.2351_2357delCGT TACT	2470del7	p.Ser784_Leu786?fs	rs80357820
		c.3084_3094delTAATAACATTA	3203del11	p.Arg1028_Arg1032?fs	rs80357647

Приложение 8

Норвегия		c.1A>C	M1L	p.Met1Leu	rs80357287
		c.5075-2A>C	IVS17-2A>C		rs80358066
		exons 1-13 deletion			
		exon 13 duplication (ins6kbEx13)			
Финландия		c.4097-2A>G	IVS11-2A>G		rs80358019
		c.3485_3485delA	3604delA	p.Asp1162Valfs	rs80357509
		c.3626_3626delT	3745delT	p.Leu1209Terfs	rs80357571
		c.4327C>T	R1443X	p.Arg1443Ter	rs41293455
		c.2684del2	2803delAA	p.Q895R	
		c.5251C>T	R1751X	p.Arg1751Ter	rs80357123
Англия		c.4096+3A>G	IVS11+3A>G		rs80358015
		c.2681_2682delAA (Scotland)	2800delAA	p.Lys894Thrfs	rs80357971
		c.4065_4068delTCAA (North-West)	4184del4	p.Asn1355_Gln1356?fs	rs80357508
Ирландия		exon 13 duplication (ins6kbEx13)			
		c.427G>T	E143X	p.Glu143Ter	rs80356991
Неевропейски популации					
Афроамериканци		c.4603G>T	E1535X	p.Glu1535Ter	rs80357366
Близък Изток		c.4603G>T	E1535X	p.Glu1535Ter	rs80357366
Венецуела		c.4603G>T	E1535X	p.Glu1535Ter	rs80357366

Приложение 8

Докладвани в европейските популации мутации в BRCA2 гена (С червено са отбелязани общите за българската популация мутации)

Популация	Мутации в BRCA2			
	HGVS	BIC		
Ашкенази	c.5946T	6174delT	p.Ser1982Argfs	rs80359550
Австрия	c.8363G>A	W2788X	p.Trp2788Leu	rs80359080
	c.8755-1G>A	IVS21-1G>A		rs81002812
	c.3860delA	4088delA	p.Asn1287Ilefs	rs80359411
	c.7910_7914delCCTTT	8138del5	p.Ala2637_Phe2638?fs	rs80359686
Италия	c.8537_8538delAG(Sardinia)	8765delAG	p.Glu2846Glyfs	rs80359716
	c.5851_5854delAGTT	6079del4	p.Ser1951_Leu1952?fs	rs80359544
Испания	c.2808_2811del4 (Castilla-Leon)	3036_3039del4	p.Lys936_Gln937?fs	rs80359352
	c.6629_6630delAA	c.6857delAA	p.Glu2210Glyfs	rs80359611
	c.9026_9030delATCAT	9254del5	p.Tyr3009_His3010?fs	rs80359741
	c.9310_9311delAA	9538delAA	p.Lys3104Valfs	rs80359756
	c.5146_5149delTATG	5374delTATG	p.Tyr1716Lysfs	rs397507761
	c.5718_5719delCT	5946delCT	p.Asn1906_Ser1907=fs	rs80359530
Германия	c.1813_1814insA	2041insA	p.Ile605?fs	rs80359308
	c.4478_4481delAAAG	4706del4	p.Glu1493_Ser1494?fs	rs80359455
	c.9098_9099insA	9326insA	p.Thr3033?fs	rs80359747
	c.5718_5719delCT	5946delCT	p.Asn1906_Ser1907=fs	rs80359530
	c.7910_7914delCCTTT	8138del5	p.Ala2637_Phe2638?fs	rs80359686
Чехия	c.7913_7917delTTCCCT	8141del5	p.Phe2638_Pro2639?fs	rs80359687
	c.8537_8538delAG	8765delAG	p.Glu2846Glyfs	rs80359716
	c.7910_7914delCCTTT	8138del5	p.Ala2637_Phe2638?fs	rs80359686
Унгария	c.9098_9099insA	9326insA	p.Thr3033?fs	rs80359747
	c.5946T	6174delT	p.Ser1982Argfs	rs80359550
Дания	c.6373delA	6601delA	p.Thr2125Profs	rs80359578
	c.1310_1313delAAGA	1538del4	p.Lys437_Asp438?fs	rs80359280

Приложение 8

	c.6486_6489delACAA	6714del4	p.Lys2162_Gln2163?fs	rs80359598
	c.3847_3848delGT	4075delGT	p.Val1283Lysfs	rs80359405
	c.7910_7914delCCTTT	8138del5	p.Ala2637_Phe2638?fs	rs80359686
Швеция	c.4258delG	4486delG	p.Asp1420Ilefs	rs80359436
Норвегия	c.2808_2811delACAA	3036del4	p.Lys936_Gln937?fs	rs80359352
	c.3847_3848delGT	4075delGT	p.Val1283Lysfs	rs80359405
Финландия	c.771_775delTCAAA	999del5	p.Asn257_Arg259?fs	rs80359675
	c.7480C>T	R2494X	p.Arg2494Ter	rs80358972
	c.8327T>G	L2776X	p.Leu2776Ter	rs397507977
	c.9118-2A>G	IVS23-2A>G		rs81002815
	c.9117+1G>A	IVS23+1G>A		rs81002802
Исландия	c.771_775delTCAAA	999del5	p.Asn257_Arg259?fs	rs80359675
Шотландия	c.6275_6276delTT	6503delTT	p.Leu2092Profs	rs11571658
Англия	c.1929delG	2157delG	p.Val643=fs	rs80359316
Словения	c.7806-2A>G	IVS16-2A>G		
Белгия	c.6275_6276delTT	6503delTT	p.Leu2092Profs	rs11571658
	c.8904delC	9132delC	p.Thr2968=fs	rs80359730
Холандия	c.5351_5352insA	5579insA	p.Asn1784?fs	rs80359508
	c.6275_6276delTT	6503delTT	p.Leu2092Profs	rs11571658
Кипър	c.8756delG	8984delG	p.Gly2919Valfs	rs80359728

Големи геномни пренареждания в BRCA1 и BRCA2 гените в някои популации

Популация	Ген	Честота	Мутация
Австрия	BRCA1	2%	BRCA1 Del.ex3; ex 5; ex21-23
	BRCA2		BRCA2 Del. ex 1-2; ex 14-16
Канада	BRCA1/2	0%	
Чехия	BRCA1	6%	BRCA1 Del.ex1A/1B-2; ex5-14; ex11-12; ex18-19; ex20; ex21-22
Дания	BRCA1/2	1.3%	BRCA1 Del.ex 3-16; ex 13-15
Финландия	BRCA1/2	0%	
Германия	BRCA1/2	1.7%-5.7%	BRCA1 Del.ex1A/1B-2; ex5; ex5-7; ex17; Dupl. exon 13
Италия	BRCA1	23%	BRCA1 Del.ex1A/1B-2; ex 9-19; ex18-19; ex20
	BRCA2	2.5%	BRCA2 Del. ex17-18; ex8-11; ex20
Нидерландия	BRCA1	7 - 9.1%	BRCA1 Del.ex8;ex13; ex20-22; ex22; Dupl. ex 13; ex21-23; Tripl. ex17-19
Полша	BRCA1/2	4.7%	BRCA1 Del.ex1A/1B-2; ex17-19
Португалия	BRCA1	9.6%	BRCA1 Del.ex1-22; ex8-13; ex15-16; Dupl. ex3-8; ex18-20
Португалия	BRCA1/2	1.1%	BRCA1 Del.ex11-15
Португалия	BRCA2	8%	BRCA2 Dupl. ex3
Португалия	BRCA1	1.1%	BRCA1 Del.ex11-15
Сунгапур	BRCA1/2	3%	BRCA1 Del.ex13-15; Dupl.ex13; BRCA2 Dupl.ex4-11
Испания	BRCA2	1.5%	BRCA1 Del.ex2; ex10-12; ex 15-16; Dupl.ex20
САЩ	BRCA1	12.7%	BRCA1 Del.ex17-20; ex22; ex 13 Dupl.ex13
САЩ	BRCA1	12%	BRCA1 Del.ex1A/1B-2;ex3; ex8-9; ex17; ex20; Dupl ex. 13
САЩ/Hispanic	BRCA1	3.8%	BRCA1 Del.ex9-12

Х. Публикации и участия в конгреси и проекти

10.1. Публикации свързани с дисертационния труд

1. Romyana 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, Romyana 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

10.2. 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 23rd 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. Romyana 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. Romyana 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. Romyana 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. The European Human Genetics Conference, 28-31 May 2011, Amsterdam, The Netherlands
6. Romyana Dodova, Atanaska Mitkova, Daniela Dacheva, Marija Caulevska, Aleksandrina Vlahova, Tihomir Dikov, Spartak Valev, Margarita Taushanova, Constanta Timcheva, Vanio Mitev, Radka Kaneva and Svetlana Christova. BRCA mutation screening in Bulgarian breast cancer patients. European Congress of Pathology (ECP) 27 August - 01 September 2011, Helsinki, Finland.
7. Romyana 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

Публикации и участия в конгреси и проекти

10.3. 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 Тъкани 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

Използвани литературни източници

Използвани литературни източници:

1. Гаврилов И и съавт. Фамилен рак на млечната жлеза. Издателство „Захари Стоянов” (ISBN 978-954-09-0788-8)
2. Гълъбов Г, Ванков В. Анатомия на човека. Издателство „Медицина и физкултура”, 1974
3. Dimitrova N et al. Cancer incidence in Bulgaria 2011, Volume XXII, 2013; (ISSN: 1314-7315)
4. Първанова В, Тимева К. Рак на млечната жлеза – ранно откриване и съвременно лечение. Център за изследвания и политики за жените, Асоциация за мониторинг на равнопоставеността на половете, 2006; (ISSN-10: 954-9361-13-1)
5. Ранчов Г. Биостатистика и биоинформатика – концепции, методи и приложения. Издателства „Еко Принт”, 2008; (ISBN 978-954-91084-9-1)
6. Синельников, Р.Д и Я.Д. Синельников, Я.Д. Атлас анатомии человека; Учение о внутренностях и эндокринных железах. Том 2 Медицина 1996 (ISBN 5-225-02724-5)
7. Чичинадзе КН и съавт. ЦЕНТРОСОМНАЯ ГИПОТЕЗА КЛЕТОЧНОГО СТАРЕНИЯ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ Институт физиологии И. Бериташвили, Грузия, 0160 Тбилиси, ул. Готуа, 14; 2 Тбилисский государственный университет, Грузия,
8. 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)
9. Adelina A. et al. Role of BRCA2 in Control of the RAD51 Recombination and DNA Repair Protein *Molecular Cell*, Vol. 7, 273–282, February, 2001, (doi:10.1016/S1097-2765(01)00175-7)
10. 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)
11. 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)
- Antoniou A et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 222 studies. *Am J Hum Genet.* 2003;72:1117–30
12. Arcidiacono B et al. Insulin Resistance and Cancer Risk: An Overview of the Pathogenetic Mechanisms, Hindawi Publishing Corporation *Experimental Diabetes Research Article*, 2012 Volume 2012, Article ID 789174, 12 pages (doi:10.1155/2012/789174)
13. Augello C et al. Y179C, F486L and N550H are BRCA1 607 variants that may be associated with breast cancer in a Sicilian family: results of a 5-year GOIM (Gruppo 608 Oncologico dell'Italia Meridionale) prospective study. *Ann Oncol.* 2006;17(Suppl 7):vii30-v.
14. 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)
- Bosch A et al. Triple-negative breast cancer: molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research. *Cancer Treat Rev.* Volume 36, Issue 3, May 2010, Pages 206–215

Използвани литературни източници

15. Berman DB et al. Two distinct origins of a common BRCA1 mutation in breast-ovarian cancer families: a genetic study of 15185delAG-mutation kindreds. *Am J Hum Genet.* 1996 Jun; 58(6): 1166–1176.
16. Bernstein JL et al. Population-based estimates of breast cancer risks associated with ATM gene variants c.7271T-G and c.1066-6T-G (IVS10-6T-G) from the breast cancer family registry. *Hum. Mutat.* 27: 1122-1128, 2006; (DOI: 10.1002/humu.20415)
17. Bottorff, JL. et al Young women's responses to smoking and breast cancer risk information HEALTH EDUCATION RESEARCH, 2010(doi:10.1093/her/cyp067)
18. Bougie O et al. Clinical Considerations of BRCA1- and BRCA2-Mutation Carriers: A Review Hindawi Publishing Corporation International Journal of Spectroscopy Volume, Article ID 374012, 11 pages, 2011 (doi:10.1155/2011/374012)
19. Bosland MC. The role of steroid hormones in prostate carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst Monogr* 27: 39-66, 2000; ISSN:1052-6773
- 20 Brennan SF et al. Dietary patterns and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr*, 2010;91:1294–302 (doi: 10.3945/ajcn.2009.28796)
21. Buchholz TA et al. A ser49cys variant in the ataxia telangiectasia, mutated, gene that is more common in patients with breast carcinoma compared with population controls. *Cancer* Vol. 100: 1345-1351, 2004. (DOI: 10.1002/cncr.20133)
22. Buisson R et al. PALB2 self-interaction controls homologous Recombination 10312–10323 *Nucleic Acids Research*, 2012, Vol. 40, No. 20 (doi:10.1093/nar/gks807)
23. Cantor SB et al. Hereditary breast cancer and the BRCA1-associated FANCD1/BACH1/BRIP1 *Future Oncol.* 2011 February ; 7(2): 253–261. (doi:10.221/fon.10.19)
24. 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)
25. Callow MG et al. Ubiquitin Ligase RNF146 Regulates Tankyrase and Axin to Promote Wnt Signaling *PLoS ONE* | www.plosone.org 1 July 2011 | Volume 6 | Issue 7 | e22595; (DOI: 10.1371/journal.pone.0022595)
26. 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
27. Chen A et al. Autoubiquitination of the BRCA1_BARD1 RING Ubiquitin Ligase *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* Vol. 277, No. 24, Issue of June 14, pp. 22085–22092, 2002; (doi:10.1074/jbc.M201252200)
28. Chang S et al. Expression of human BRCA1 variants in mouse ES cells allows functional analysis of BRCA1 mutations. *J. Clin. Invest.* 2009 119, 3160–3171 (doi: 10.1172/JCI39836)
29. Chen L et al. Cell cycle-dependent complex formation of BRCA1.CtIP.MRN is important for DNA double-strand break repair. *J. Biol. Chem.* 283, 7713–7720 - 2008; (doi:10.1074/jbc.M710245200)
30. Clare T et al. Genome-wide association study identifies five new breast cancer susceptibility loci. *Nature Genetics*, 2010; (doi:10.1038/ng.586)
31. Cook NR et al. Mammographic Screening and Risk Factors for Breast Cancer, *American Journal of Epidemiology* Vol 170 No 11, 2009 (doi: 10.1093/aje/kwp304)

Исползвани литературни източници

32. Cole DJ et al. Interrogation of the Protein-Protein Interactions between Human BRCA2 BRC Repeats and RAD51 Reveals Atomistic Determinants of Affinity PLoS Computational Biology | www.ploscompbiol.org | Volume 7 | Issue 7 | e1002096 July 2011;(DOI: 10.1371/journal.pcbi.1002096)
33. Couch FJ et al. Mutations and polymorphisms in the familial early-onset breast cancer (BRCA1) gene. Breast Cancer Information Core. Hum Mutat. 1996;8:8–18.45; (DOI: 10.1002/humu.1380080102)
34. Cortez D et al. Requirement of ATM-dependent phosphorylation of Brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. Science 286: 1162-1166, 1999; (DOI: 10.1126/science.286.5442.1162)
35. Creighton et al. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. The Cancer Genome Atlas Network Nature 2012
36. 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)
37. Cybulski C et al. Risk of breast cancer in women with a CHEK2 mutation with and without a family history of breast cancer. J Clin Oncol. 2011; (29(28):3747-52)
38. Davies AA et al. Role of BRCA2 in Control of the RAD51 Recombination and DNA Repair Protein Molecular Cell, Vol. 7, 273–282, Copyright ©2001 by Cell Press, 2001; (doi:10.1016/S1097-2765(01)00175-7)
39. Deng CX et al. Roles of BRCA1 and its interacting proteins. Bioessays; 2000 (DOI: 10.1002/1521-1878(200008)22:8<728::AID-BIES6>3.0.CO;2-B)
40. Desrichard A et al. CHEK2 contribution to hereditary breast cancer in non-BRCA families. Breast Cancer Research, 2011, 13:R119 (doi:10.1186/bcr3062)
41. De Vivo I et al. Association of CYP1B1 Polymorphisms and Breast Cancer Risk Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2002;11:489-492;
42. 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)
43. Diaz LK et al. Triple negative breast carcinoma and the basal phenotype: from expression profiling to clinical practice. Adv Anat Pathol. 2007 (14:419–430, 2007)
44. Easton D et al. Breast cancer genes-what are the real risks? Nat Genet; 1997 16(3): 210-1
45. Ellis NA et al. Localization of breast cancer susceptibility loci by genome-wide SNP linkage disequilibrium mapping. Genet Epidemiol, 2007; 30:48-61
46. Easton DF et al. A Systematic Genetic Assessment of 1,433 Sequence Variants of Unknown Clinical Significance in the BRCA1 and BRCA2 Breast Cancer–Predisposition Genes Am. J. Hum. Genet. 2007;81:873–883; (doi:10.1086/521032)
47. Ewalt IP et al. Genomic rearrangements in BRCA1 and BRCA2: A literature review. Genetics and Molecular Biology. 32,3,437-446; 2009 (doi: 10.1007/s12041-009-9111-1)
48. Fattaneh A et al. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs, World Health Organization Classification of Tumours, 2003, (86:116-119)
49. Fan C et al. Concordance among Gene-Expression– Based Predictors for Breast Cancer. The new england journal of medicine, 2006 (DOI: 10.1056/NEJMoa052933)

Използвани литературни източници

49. Frank TS et al. Clinical characteristics of individuals withgermline mutations in BRCA1 and BRCA2: analysis of 10,000 individuals. *J Clin Oncol.* 2002;20:1480–90. (doi: 10.1200/JCO.20.6.1480)
50. Friedman LS et al. Novel inherited mutations and variableexpressivity of BRCA1 alleles, including the founder mutation185delAG in Ashkenazi Jewish families. *Am J Hum Genet.*1995;57:1284–97
51. Futreal P et al. A census of human cancer genes. *Nature Reviews Cancer* **4**, 177-183, March 2004; (doi:10.1038/nrc1299)
52. Gautam K, et al. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biology & Therapy.* November 15, 2010 (DOI: 10.4161/cbt.10.10.13879)
53. Geoffroy-Perez B et al. Cancer risk in heterozygotes forAtaxia-Telangiectasia. *Int J Cancer* 93: 288-293, 2001; (DOI: 10.1002/ijc.1329)
54. Gorski B et al. A high proportion of founder *BRCA1* mutations in Polish breast cancer families. *Int J Cancer.* 2004;110:683; (DOI: 10.1002/ijc.20162)
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)
56. Gray H. *Anatomy of the Human Body.* Philadelphia:Lea & Fibiger, New York: Bartleby.com, 2000
57. Groep P et al. Pathology of hereditary breast cancer *Cell Oncol.*, 2011; (DOI 10.1007/s13402-011-0010-3)
58. Grada A et al. Next-Generation Sequencing: Methodology and Application *Journal of Investigative Dermatology* (2013) 133, e1; (doi:10.1038/jid.2013.248)
59. Gummy-Pause F et al. ATM gene andlymphoid malignancies. *Leukemia* 18: 238-242, 2004; (doi:10.1038/sj.leu.2403221)
60. Haibe-Kains B et al. A fuzzy gene expression-based computational approach improves breast cancer prognostication. *Genome Biology* 2010 (doi: 10.1186/gb-2010-11-2-r18)
63. Hame N et al. On the origin and diffusion of BRCA1 c.5266dupC (5382insC) in European populations *European Journal of Human Genetics* 19, 300–306, 2011; (doi:10.1038/ejhg.2010.203)
64. Hall J. The Ataxia-telangiectasia mutated gene and breastcancer: gene expression profiles and sequence variants. *CancerLetters* 227: 105-114, 2005; (doi:10.1016/j.canlet.2004.12.001)
65. Howlett NG et al.Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science*, 297(5581): p. 606-9, 2002; (DOI: 10.1126/science.1073834)
66. 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)
67. Huen MS et al. BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **11**, 138-148.February 2010; (doi:10.1038/nrm2831)
68. 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)
69. 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)

Използвани литературни източници

70. Jordan VC et al. Antiestrogens: clinical applications of pharmacology. *J Soc Gynecol Investig* 7:S47-8, 2000; (doi: 10.1177/107155760000700112)
- К
71. Kawase Tet al. FGFR2 intronic polymorphisms interact with reproductive risk factors of breastcancer: Results of a case control study in Japan *Int. J. Cancer*, 2009: 125, 1946–1952; (DOI: 10.1002/ijc.24505)
72. Kapp AV et al. Discovery and validation of breast cancer subtypes *BMC Genomics*, 2006. 7:231; (doi:10.1186/1471-2164-7-231)
73. Kirchoff 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)
74. Krajc M et al. Five recurrent BRCA1/2 mutations are responsible for cancer predisposition in the majority of Slovenian breast cancer families. *BMC Med Genet.* 2008;9:83.44; (doi:10.1186/1471-2350-9-83)
75. Kulie T. et al. Obesity and Women's Health: An Evidence-Based Review. *Obesity and Women's Health*, 2011 (doi: 10.3122/jabfm)
76. Laverias G et al. Role of Cholesterol in the Development and Progression of Breast Cancer *The American Journal of Pathology*, Vol. 178, No. 1, 2011; (doi: 10.1016/j.ajpath.2010.11.005)
77. Langston AA et al. BRCA1 mutations in a population-based sample of young women with breast cancer. *N Engl J Med*, 1996. 334(3): p. 137-42 (DOI: 10.1056/NEJM199601183340301)
78. Lakhani SR. The pathology of familial breast cancer Morphological aspects. *Breast-cancer-research.com/vol1no1/27oct99/review/2*, 1999;
79. Ladopoulou A et al. Germ line BRCA1 & BRCA2 mutations in Greek breast/ovarian cancer families: 5382insC is the most frequent mutation observed. *Cancer Lett.* 2002;185:61–70; (doi:10.1016/S0304-3835(01)00845-X)
80. Laake K et al. Identical mutation in 55% of the ATM alleles in 11 Norwegian AT families: evidence for a founder effect. *Europ. J. Hum. Genet.* 6: 235-244, 1998; (DOI: 10.1038/sj.ejhg.5200181)
81. Lavin M. Role of the ataxia-telangiectasia gene (ATM) in breast cancer. *BMJ* 317: 486-487, 1998; (doi.org/10.1136/bmj.317.7157.486)
82. Levitzki A et al. Signal transduction therapy of cancer. *Molecular Aspects of Medicine*, Volume 31, Issue 4, Pages 287-330, 2010
83. Lee JH et al. Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks *Oncogene*, 2007: 26, 7741–7748; (doi:10.1038/sj.onc.1210872)
84. Liu L et al. Human BRCA2 protein promotes RAD51 filament formation on RPA-covered ssDNA. *Struct Mol Biol.* 2010 October; 17(10): 1260–1262. (doi:10.1038/nsmb.1904)
85. Liu J et al. Human BRCA2 protein promotes RAD51 filament formation on RPA-covered ssDNA *Nat Struct Mol Biol.* October ; 17(10): 1260–1262, 2010; (doi:10.1038/nsmb.1904)
86. Lodish H et al. *Molecular Cell Biology*, 4th edition, New York: W. H. Freeman; 2000
87. Luo J. et al. Association of active and passive smoking with risk of breast cancer among postmenopausal women: a prospective cohort study *BMJ*, 2011;342:d1016 (doi:10.1136/bmj.d1016)

Използвани литературни източници

88. Maggie C et al. Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients With Luminal B Breast Cancer JNCI Vol. 101, Issue 10 | May 20, 2009 DOI: 10.1093/jnci/djp082
89. Macciò A et al. Obesity, Inflammation, and Postmenopausal Breast Cancer: Therapeutic Implications The Scientific World Journal, 2011 (doi:10.1100/2011/806787)
90. Matsuoka S et al. Linkage of ATM to Cell Cycle Regulation by the Chk2 Protein Kinase *Science* Vol. 282 no. 5395 pp. 1893-1897, 1998; (DOI: 10.1126/science.282.5395.1893)
91. Maillet P et al. Constitutional alterations of the ATM gene in early onset sporadic breast cancer. *J. Med. Genet.* 39: 751-753, 2002 et al., 2002; Maillet P et al, 2002; (doi:10.1136/jmg.39.10.751)
92. Mavrou A et al. The ATM Gene and Ataxia Telangiectasia ANTICANCER RESEARCH 28: 401-406 (2008)
93. Meijers-Heijboer HM et al. Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to *CHEK2**1100delC in noncarriers of *BRCA1* or *BRCA2* mutations nature genetics. volume 31 may 2002 Published online: 22 April 2002; (DOI: 10.1038/ng879)
94. Miller SA et al. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells, *Nucleic Acids Res.* 1988 Feb 11; 16(3): 1215.
95. McGrowder D. The Role of High-Density Lipoproteins in Reducing the Risk of Vascular Diseases, Neurogenerative Disorders, and Cancer Hindawi Publishing Corporation Cholesterol Volume 2011, Article ID 496925, 9 pages (doi:10.1155/2011/496925)
96. Nagata C. et al. Alcohol Drinking and Breast Cancer Risk: An Evaluation Based on a Systematic Review of Epidemiologic Evidence among the Japanese Population *Jpn J Clin Oncol* 2007;37(8)568–574 (doi:10.1093/jjco/hym062)
97. Nathanson KL et al. Other breast cancer susceptibility genes: searching for mare holy grail. *Human Molecular Genetics* Vol. 10 No 7, 2001 (715- 720)
98. Narod SA et al. BRCA1 AND BRCA2: 1994 AND BEYOND. *Nature Reviews Cancer* 4, 665-676, September 2004; (doi:10.1038/nrc1431)
99. Narod SA et al. BRCA1 and BRCA2 Mutations and Breast Cancer. *Discovery Medicine*, 2011; (12(66):445-453)
100. Nicholas J et al. High-throughput bacterial genome sequencing: an embarrassment of choice, a world of opportunity. *NATURE REVIEWS | MICROBIOLOGY*, 2012 Sergeant M et al, 2012; (doi:10.1038/nrmicro2850)
101. 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)
103. Peng S et al. Genetic polymorphisms and breast cancer risk: evidence from meta-analyses, pooled analyses, and genome-wide association studies *Breast Cancer Res Treat* 127:309–324;
104. Peng S et al. Genetic polymorphisms and breast cancer risk: evidence from meta-analyses, pooled analyses, and genome-wide association studies. *Breast Cancer Res Treat*, 2011; 127:309–324; (DOI 10.1007/s10549-011-1459-5)

Използвани литературни източници

105. Phelan CM et al. A low frequency of non-founder BRCA1 mutations in Ashkenazi Jewish breast-ovarian cancer families. *HumMutat.* 2002;20:352–7; (DOI: 10.1002/humu.10123)
106. Prat A et al. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Molecular oncology*, 2010 (doi:10.1016/j.molonc.2010.11.003)
107. Prat A et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer, *Breast Cancer Research* 2010 (doi:10.1186/bcr2635)
108. Pöschl G et al. ALCOHOL AND CANCER. *Alcohol Alcohol & Alcoholism* Vol. 39, No. 3, pp. 155–165, 2004 (doi:10.1093/alcalc/agh057)
109. 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.
110. Rahman N et al. The genetics of breast cancer susceptibility. *Annu. Rev. Genet.* 1998, DOI: 10.1146/annurev.genet.32.1.95
111. Ripperger T et al. Breast cancer susceptibility: current knowledge and implications for genetic counselling. *European Journal of Human Genetics*, 2009; 17, 722 – 731; (doi:10.1038/ejhg.2008.212)
112. Richards CS et al. ACMG recommendations for standards for interpretation and reporting of sequence variations: Revisions 2007 *Genetics in Medicine* (2008) 10, 294–300; (doi:10.1097/GIM.0b013e31816b5cae)
113. Rosen JM et al. The Increasing Complexity of the Cancer Stem Cell Paradigm. *Science*, 2009 Vol. 324 no. 5935 pp. 1670-1673; DOI: 10.1126/science.1171837
114. Romieu I et al. The role of obesity, physical activity and dietary factors on the risk for breast cancer: Mexican experience. *Salud Publica Mex* 2009;51 suppl 2:S172-S180 (ISSN 0036-3634)
115. Rosman DS et al. New Insights into Breast Cancer Genetics and Impact on Patient Management. *Curr. Treat. Opt. Onc*, 2007; (1007:11864-11877)
116. Rohini R et al. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection *Nature Reviews Cancer* 12, 68-78; January 2012 (doi:10.1038/nrc3181)
- Ronit I et al. BRCA1 at the crossroad of multiple cellular pathways: approaches for therapeutic interventions *Mol Cancer Ther* 2006;5(6). June 2006 (doi:10.1158/1535-7163.MCT-05-0471)
117. Rothberg JM et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* 475(7356):348-5, 2011; (doi:10.1038/nature10242)
118. Robert D et al. Targeting Cytochrome P450 Enzymes: A New Approach in Anticancer Drug Development *Bioorg Med Chem.* August 1, 2007; 15(15): 5047–5060; (doi:10.1016/j.bmc.2007.05.046)
119. 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.
120. Satagopan JM et al. Ovarian cancer risk in Ashkenazi Jewish carriers of BRCA1 and BRCA2 mutations. *Clin Cancer Res* 2002;8:3776-3781

Използвани литературни източници

121. 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)
122. Scott SP et al. Missense mutations but not allelic variants alter the function of ATM by dominant interference in patients with breast cancer. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 99: 925-930, 2002; (doi: 10.1073/pnas.012329699)
123. Sieri S et al. Prospective Investigation into Cancer and Nutrition *Am J Clin Nutr* 2008; Printed in USA. © American Society for Nutrition; 88:1304–12
124. Shafika A et al. Associations of adipokines & insulin resistance with sex steroids in patients with breast cancer. *Indian J Med Res.* 2012 Apr; 135(4): 500–505.
125. 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)
126. Sorlie T et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *PNAS*, 2003; 100: 8418–8423; (doi: 10.1073/pnas.0932692100)
127. Smirnov DA et al. ATM gene mutations result in both recessive and dominant expression phenotypes of genes and microRNAs. *Am. J. Hum. Genet.* 83: 243-253, 2008. Note: Erratum: *Am. J. Hum. Genet.* 83: 657 only, 2008; (doi:10.1016/j.ajhg.2008.07.003)
128. Stuart J et al. Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy *Modern Pathology*, 2010 (doi:10.1038/modpathol.2010.33)
129. Stredrick DL et al. The ATM missense mutation p.ser49cys (c.146C-G) and the risk of breast cancer. *Hum. Mutat.* 27: 538-544, 2006; (DOI: 10.1002/humu.20323)
130. Taube JH et al. Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *PNAS* 2010 doi/10.1073/pnas.1004900107
131. Terry PD. Does tobacco smoke cause breast cancer? *Women's Health* 7, 2011(4), 405–408 (doi:10.2217/whe.11.39)
132. Turner NC et al. BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer. *Oncogene*, 2007 (26, 2126–2132)
133. 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);
134. Thompson et al. Cancer risks and mortality in heterozygous ATM mutation carriers. *J. Nat. Cancer Inst.* 97: 813-822, 2005; (doi: 10.1093/jnci/dji141)
135. Valentin-Vega YA et al. Mitochondrial dysfunction in ataxia-telangiectasia. *Blood* 119 (6): 1490–500, 2012;. (doi:10.1182/blood-2011-08-373639)
136. Venkitaraman AR. Functions of BRCA1 and BRCA2 in the biological response to DNA damage *Journal of Cell Science*, 2001; (114, 3591-3598)
137. Venkitaraman AR et al. A growing network of cancer-susceptibility genes. *N Engl J Med*, 348(19): p. 1917-9, 2003]. Hame N et al, 2003
138. Voelkerding KV et al. Next-Generation Sequencing: From Basic Research to Diagnostics *Clinical Chemistry* 55:4 641–658, 2009; (doi: 10.1373/clinchem.2008.112789)
139. Welcsh PL et al. Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2 *Trends in Genetics*, Volume 16, Issue 2, 1 February 2000, Pages 69–74 (doi:10.1016/S0168-9525(99)01930-7)

Използвани литературни източници

140. Wang B. BRCA1 tumor suppressor network: focusing on its tail Cell & Bioscience 2012; (doi:10.1186/PREACCEPT-1109880912645841 2012).
141. Wooster R et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. Science, 1994. 265(5181): p. 2088-90; (DOI: 10.1126/science.8091231)
142. Wu W et al. The ubiquitin E3 ligase activity of BRCA1 and its biological functions Cell Division 3:1, 2008; (doi:10.1186/1747-1028-3-1, 2008)
143. Welch PL et al. Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2 Trends in Genetics Volume 16, Issue 2, , Pages 69–74, 2000; (doi:10.1016/S0168-9525(99)01930-7)
- 144. Yang Y et al. CHEK2 1100delC Variant and Breast Cancer Risk in Caucasians: A Meta-analysis Based on 25 Studies with 29,154 Cases and 37,064 Controls Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2012; (doi.org/10.7314/APJCP.2012.13.7.3501)**
145. Yun MH et al. CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand-break repair pathway throughout the cell cycle. Nature 459, 2009; (doi:10.1038/nature07955)
146. Yu X et al. The C-terminal (BRCT) domains of BRCA1 interact *in vivo* with CtIP, a protein implicated in the CtBP pathway of transcriptional repression. J. Biol. Chem. 273, 25388–25392 (1998); (doi:10.1074/jbc.273.39.25388)
147. Yu G et al. Expression of ATM protein and its relationship with p53 in pancreatic carcinoma with tissue array. Pancreas 28: 421-426, 2004;
148. Zepeda-Castilla et al. Molecular classification of breast cancer. Cir Ciruj, 2008 (76:87-93)

Използвани интернет източници:

1. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx?cancer=breast (www.globocan, L1)
2. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx (www.globocan, L2)
3. <http://eco.iarc.fr/EUCAN/> (www.eco.iarc.fr, L3)
4. <http://www.breastpathology.info/Normal%20Structure.html> (www.breastpathology.info, L4)
5. <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/> (www.cancer.org, L5)
6. <http://www.breastcancer.org/risk/factors/woman> (www.breastcancer.org, L6)
7. <http://en.wikipedia.org/wiki/Penetrance> ((www.wikipedia.org, L7)
8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1247/>. (www.ncbi.nlm.nih.gov, L8)
9. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG0000012048;r=17:41196312-41322290 (www.ensembl.org, L9)
10. http://research.nhgri.nih.gov/projects/bic/Member/brca1_mutation_database.shtml (www.research.nhgri.nih.gov, L10)
11. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000139618;r=13:32889611-32973805 (www.ensembl.org, L11)
12. http://research.nhgri.nih.gov/projects/bic/Member/brca2_mutation_database.shtml (www.research.nhgri.nih.gov, L12)
13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=11200> (www.research.nhgri.nih.gov, L13)
- 14 (Genetics Home Reference)
14. <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/CHEK2> (www.ghr.nlm.nih.gov, 14)
15. <http://en.wikipedia.org/wiki/PALB2> (www.wikipedia.org, L15)
16. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/7/7a/PALB2_en.svg/2000px_PALB2_en.svg.png (www.wikipedia.org, L16)
17. http://en.wikipedia.org/wiki/Ataxia_telangiectasia_mutated; (www.wikipedia.org, L17)

Използвани интернет източници

18. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/472> (www.ncbi.nlm.nih.gov, L18)
19. <http://omim.org/entry/607585> (www.omim.org, L19)
20. http://omim.org/search?index=entry&start=1&limit=10&search=FGFR2&sort=score+desc%2C+prefix_sort+desc (www.omim.org, L20)
21. <http://omim.org/entry/600982?search=map3k1&highlight=map3k> (www.omim.org, L21)
22. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=832> (www.ncbi.nlm.nih.gov, L22)
23. <http://www.phosphosite.org/proteinAction.do?id=5475> (www.phosphosite.org, L23)
24. <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/C/CellCycle.html> (www.users.rcn.com, L24)
25. http://research.nhgri.nih.gov/projects/bic/Member/mutation_draw/mutationCharts.cgi?mode=mutation_freque ncy&gene=brca1 (www.research.nhgri.nih.gov, L25)
26. http://research.nhgri.nih.gov/projects/bic/Member/mutation_draw/mutationCharts.cgi?mode=mutation_freque ncy&gene=brca2 (www.research.nhgri.nih.gov, L26)
27. <http://www.humgen.nl/lab-devilee/bclchome.htm> (www.humgen.nl, L27)
28. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1247/> (www.ncbi.nlm.nih.gov, L28)
29. <http://www.nccn.org/about/news/newsinfo.asp?NewsID=289> (www.nccn.org, L29)
30. <http://www.asco.org/> (www.asco.org, L30)
31. http://www.gendia.net/tests_tab20.html (www.gendia.net, L31)
32. <http://www.ambrygen.com/tests/breastnext> (www.ambrygen.com, L32)
33. <http://www.myriad.com/products-services/hereditary-cancers/braanalysis/> (www.myriad.com, L33)
34. <https://www.lifetechnologies.com> (www.lifetechnologies.com, L34)
35. http://www.illumina.com/products/trusight_cancer.ilmn (www.illumina.com, L35)
36. http://www.chemagen.com/fileadmin/downloads/Eurogentest_validation_report.pdf (www.chemagen.com, L36)
37. <http://www.allseq.com/knowledgebank/sequencing-platforms/life-technologies-ion-torrent> (www.allseq.com, L37)
38. <http://ioncommunity.iontorrent.com/> (www.ioncommunity.iontorrent.com, L38)
39. <http://allseq.com/knowledgebank/sequencing-platforms/life-technologies-ion-torrent> (www.allseq.com, L39)
40. https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/bibliography?docname=Protocol_000387v001.pdf (www.beckmancoulter.com, L40)
41. <http://arboretum.harvard.edu/wp-content/uploads/Agilent-2100-Bioanalyzer-Software-Guide.pdf>
42. <https://mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=zjCZBtdOUyAt3KF3EwRZhNWLtcfv9pVI/tHJIM%5Cfa9FWO8KMqctOGIoqYwxaGF9Y> (www.mlpa.com, L42)
43. <http://en.wikipedia.org/wiki/TaqMan#mediaviewer/File:Taqman.png> (www.en.wikipedia.org, L43)
44. <http://en.bio-soft.net/dna/FinchTV.html> (www.en.bio-soft.net, L44)
45. http://www.cambridgesoft.com/Ensemble_for_Biology/FinchTV/ (www.cambridgesoft.com, L45)
46. <http://www.codoncode.com/aligner/> (www.codoncode.com, L46)
47. <http://www.softgenetics.com/NextGENe.html> (www.softgenetics.com, L47)
48. <http://imbi.bio.indiana.edu/includes/content/documents/Genemapper%20Usage/GeneMapper%20Software%20v3.7%20User%20Guide.pdf> (www.imbi.bio.indiana.edu, L48)
49. <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/4479710> (www.lifetechnologies.com, L49)
50. <http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag= fNPBLedDVp38p-CxU2h0mQ> (www.mlpa.com, L50)
52. http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag= 6MeHxYlkoncoMKK1IyFiVx6SeQwU9OOS N3VQziV_30Q (www.mlpa.com, L51)
52. <https://coffalyser.wordpress.com/> (www.coffalyser.wordpress.com, L52)
53. http://primer3plus.com/web_3.0.0/primer3web_input.htm (www.primers3plus.com, L53)
54. <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?command=start> (www.genome.ucsc.edu, L54)
55. <http://mfold.rna.albany.edu/?q=DINAMelt/Two-state-folding> (www.mfold.rna.albany.edu, L55)
56. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov, L56)
57. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index (www.ensembl.org, L57)
58. <https://research.nhgri.nih.gov/projects/bic/Member/index.shtml> (www.ncbi.nlm.nih.gov, L58)

Исползвани интернет източници

59. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?searchType=adhoc_search&type=rs&rs=rs1799954
(www.ncbi.nlm.nih.gov, L59)
60. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?searchType=adhoc_search&type=rs&rs=rs55794205
www.ncbi.nlm.nih.gov, L60
61. https://research.nhgri.nih.gov/projects/bic/Member/clinical_class.shtml (www.research.nhgri.nih.gov, L61)
62. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1799950 (www.ncbi.nlm.nih.gov, L62)
63. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?searchType=adhoc_search&type=rs&rs=rs4986850
(www.ncbi.nlm.nih.gov, L63)
64. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?searchType=adhoc_search&type=rs&rs=rs799917
(www.ncbi.nlm.nih.gov, L64)
65. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?searchType=adhoc_search&type=rs&rs=rs16941
(www.ncbi.nlm.nih.gov, L65)
66. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?searchType=adhoc_search&type=rs&rs=rs4986852
(www.ncbi.nlm.nih.gov, L66)
67. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?searchType=adhoc_search&type=rs&rs=rs16942
(www.ncbi.nlm.nih.gov, L67)
68. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?searchType=adhoc_search&type=rs&rs=rs1799966
(www.ncbi.nlm.nih.gov, L68)
69. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?searchType=adhoc_search&type=rs&rs=rs1799967
(www.ncbi.nlm.nih.gov, L69)
70. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?searchType=adhoc_search&type=rs&rs=rs144848
(www.ncbi.nlm.nih.gov, L70)
71. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?searchType=adhoc_search&type=rs&rs=rs766173
(www.ncbi.nlm.nih.gov, L71)
72. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?searchType=adhoc_search&type=rs&rs=rs1799944
(www.ncbi.nlm.nih.gov, L72)
73. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?searchType=adhoc_search&type=rs&rs=rs4987117
(www.ncbi.nlm.nih.gov, L73)
74. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?searchType=adhoc_search&type=rs&rs=rs1799965
(www.ncbi.nlm.nih.gov, L74)
75. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?searchType=adhoc_search&type=rs&rs=rs16940
(www.ncbi.nlm.nih.gov, L75)
76. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?searchType=adhoc_search&type=rs&rs=rs1060915
(www.ncbi.nlm.nih.gov, L76)
77. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?searchType=adhoc_search&type=rs&rs=rs1801439
(www.ncbi.nlm.nih.gov, L77)
78. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?searchType=adhoc_search&type=rs&rs=rs1801499
(www.ncbi.nlm.nih.gov, L78)
79. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?searchType=adhoc_search&type=rs&rs=%20rs1801406 (www.ncbi.nlm.nih.gov, L79)
80. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?searchType=adhoc_search&type=rs&rs=rs543304
(www.ncbi.nlm.nih.gov, L80)
81. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?searchType=adhoc_search&type=rs&rs=rs28897734
(www.ncbi.nlm.nih.gov, L81)
82. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?searchType=adhoc_search&type=rs&rs=rs1799955
(www.ncbi.nlm.nih.gov, L82)
83. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?searchType=adhoc_search&type=rs&rs=rs1799943
(www.ncbi.nlm.nih.gov, L83)
84. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?searchType=adhoc_search&type=rs&rs=rs15869
(www.ncbi.nlm.nih.gov, L84)
85. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?searchType=adhoc_search&type=rs&rs=rs799923
(www.ncbi.nlm.nih.gov, L85)

Исползвани интернет източници

86. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?searchType=adhoc_search&type=rs&rs=rs8176144
(www.ncbi.nlm.nih.gov, L86)
87. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?searchType=adhoc_search&type=rs&rs=rs273900734
(www.ncbi.nlm.nih.gov, L87)
88. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?searchType=adhoc_search&type=rs&rs=rs8176258
(www.ncbi.nlm.nih.gov, L88)
89. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?searchType=adhoc_search&type=rs&rs=rs273901757
(www.ncbi.nlm.nih.gov, L89)
90. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?searchType=adhoc_search&type=rs&rs=rs11571610
(www.ncbi.nlm.nih.gov, L90)
91. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?searchType=adhoc_search&type=rs&rs=rs4942423(w
(www.ncbi.nlm.nih.gov, L91)
92. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?searchType=adhoc_search&type=rs&rs=rs3783265(w
(www.ncbi.nlm.nih.gov, L92)
93. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?searchType=adhoc_search&type=rs&rs=rs2126042(w
(www.ncbi.nlm.nih.gov, L93)
94. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?searchType=adhoc_search&type=rs&rs=rs11571661(
(www.ncbi.nlm.nih.gov, L94)
95. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?searchType=adhoc_search&type=rs&rs=rs11571680(
(www.ncbi.nlm.nih.gov, L95)
96. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?searchType=adhoc_search&type=rs&rs=rs9534262(w
(www.ncbi.nlm.nih.gov, L96)
97. <http://omim.org/entry/17694> (www.omim.org, L97)
98. <http://www.phosphosite.org/proteinAction.do?id=5475> (www.phosphosite.org, L98)
99. <http://www.crcl.fr/299-Projects.crcl.aspx?language=en-GB>
(www.crcl.fr, L99)
100.
https://research.nhgri.nih.gov/projects/bic/Member/cgibin/mutation_frequency.cgi?table=brca1_exons&by=type
(www.research.nhgri.nih.gov, L100)
101. (<http://www.kconfab.org/Progress/Classification.shtml>).
(http://www.kconfab.org, L101)

Дисертационният труд е написан на 204 машинописни страници и включва 60 фигури, 38 таблици и 8 приложения.

Библиографският списък съдържа 249 източника

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита от Катедрен съвет на катедра „Медицинска химия и биохимия“ към Медицински факултет съгласно правилника за условията и реда на придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Медицински Университет, София на 19.12.2014 г.

Дисертационният труд е изработен в Център по молекулярна медицина/Катедра „Медицинска химия и биохимия“ към Медицински Университет, София