



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО ФИЗИОЛОГИЯ НА РАСТЕНИЯТА И ГЕНЕТИКА
СЕКЦИЯ ПО МОЛЕКУЛЯРНА ГЕНЕТИКА

СТЕФАН СИМЕОНОВ БОЖАНОВ

**ГЕНЕТИЧНИ И ЕПИГЕНЕТИЧНИ ПРОМЕНИ В ТУМОРНО СУПРЕСОРНИТЕ
ГЕНИ *TP53* И *BRCA1* И ПРОТО-ОНКОГЕНА *PIK3CA* И ТЯХНОТО ВЛИЯНИЕ
ВЪРХУ ПРЕЖИВЯЕМОСТТА, КЛИНИКО-ПАТОЛОГИЧНИТЕ И
МОЛЕКУЛЯРНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА БЪЛГАРСКИ ПАЦИЕНТИ С РАК
НА МЛЕЧНАТА ЖЛЕЗА**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за присъждане на образователна и научна степен „доктор”

Професионално направление: 4.3. „Биологични науки“

Научна специалност: шифър 01.06.06 „Генетика“

Научен ръководител:

Проф. д-р Елена Георгиева

Рецензенти:

Чл.-кор. проф. д-р Георги Русев

Проф. д-р Иво Кременски

София, 2014

Дисертацията е написана на 145 страници и включва 20 фигури и 10 таблици. Списъкът на цитираната литература включва 279 източници, един от които на кирилица. Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на заседание на разширения Научен съвет на секция „Молекулярна генетика” към Института по физиология на растенията и генетика - БАН, проведено на 20/11/2013.г.

Докторантът към момента е асистент в секция „Молекулярна генетика” към Института по физиология на растенията и генетика” – БАН.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на на открито заседание на жури, избрано от Научния съвет на Института по физиология на растенията и генетика – БАН с Протокол №11/29.11.2013 и утвърдено със Заповед 1067/06.12.2013 на Директора на Института по физиология на растенията и генетика – БАН.

Научното жури е в състав:

- Вътрешни членове:

Проф. д-р Любомир Стоилов – председател

Проф. д-р Елена Георгиева (научен ръководител)

- Външни членове:

Чл.-кор. проф. д-р Георги Русев

Проф. д-р Иво Кременски

Доц. д-р Радка Кънева

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в библиотеката на Института по физиология на растенията и генетика - БАН, бл. 21, ет. 2, ст. 225. и на Web- страницата на Института по физиология на растенията и генетика – БАН.

СЪДЪРЖАНИЕ

СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ

I. УВОД	1
II. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ	1
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	2
1. Материали	2
1.1. Пациентки с РМЖ	2
1.2. Клинично здрави лица	3
1.3. Клетъчни линии	3
2. Методи	3
2.1. Екстракция на ДНК	3
2.1.1. Изолиране на ДНК от туморен материал	3
2.1.2. Изолиране на ДНК от венозна кръв	3
2.2. Мутационен анализ	3
2.2.1. Полимеразна верижна реакция (PCR)	3
2.2.1.1. <i>BRCA1</i>	3
2.2.1.2. <i>TP53</i>	3
2.2.1.3. <i>PIK3CA</i>	4
2.2.2. Агарозна ДНК електрофореза	4
2.2.3. Полиакриламидна гел електрофореза на ДНК в неденатуриращи условия	4
2.2.4. Анализ на конформациите на едноверижните нуклеинови киселини (SSCP)	4
2.2.5. Пречистване на амплификационни продукти	5
2.2.6. Секвенционен анализ	5
2.3. Метилационен анализ	5
2.4. Статистически анализ	5
2.5. Функционален анализ	6
2.5.1. Култивиране на клетъчни линии	6
2.5.2. Място-насочен мутагенезис	6
2.5.3. Трансформация	6
2.5.4. Изолиране на плазмидна ДНК	6
2.5.5. Трансфекция на клетъчни линии	6
2.5.6. Western blotting	6
2.5.7. Анализ на пролиферацията чрез растежни криви	7
IV. РЕЗУЛТАТИ	7
1. Мутационен анализ	7
1.1. <i>TP53</i>	7
1.2. <i>BRCA1</i>	9
1.3. <i>PIK3CA</i>	9
2. Връзка между мутационния статус на изследваните гени и клинично-патологичните и молекулярни характеристики на пациентите	10
2.1. <i>TP53</i>	10

2.2. <i>BRCA1</i>	11
2.3. <i>PIK3CA</i>	12
3. Връзка между мутационния статус на изследваните гени и общата преживяемост на пациентите.....	13
4. Метилационен анализ на <i>BRCA1</i>	16
4.1. Връзка между промоторното хиперметиране на <i>BRCA1</i> и клиничко-патологичните и молекулярни характеристики на пациентите.....	16
4.2. Връзка между промоторното хиперметиране на <i>BRCA1</i> и общата преживяемост на пациентите.....	18
5. Функционален анализ на полиморфизма в <i>PIK3CA</i> 1173 A>G.....	19
5.1. Анализ на фосфорилирането (активирането) на АКТ.....	20
5.2. Анализ на пролиферацията чрез растежни криви.....	21
6. Резюме на резултатите.....	22
6.1. Мутационен анализ.....	22
6.2. Връзка между мутационния статус на изследваните гени и клиничко-патологичните и молекулярни характеристики на пациентите.....	23
6.3. Връзка между мутационния статус на изследваните гени и общата преживяемост на пациентите.....	23
6.4. Метилационен анализ на <i>BRCA1</i>	24
6.5. Функционален анализ на полиморфизма в <i>PIK3CA</i> 1173 A>G.....	24
V. ДИСКУСИЯ	24
VI. ИЗВОДИ И ПРИНОСИ	31
СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ.....	32
СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА.....	33
СПИСЪК НА УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА.....	34
СПИСЪК НА ЦИТИРАНИЯТА В МЕЖДУНАРОДНИ НАУЧНИ ИЗДАНИЯ.....	35
БЛАГОДАРНОСТИ.....	36

СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ

АК – Аминокиселина

ЕР – Естроген Рецептор

ОП – Обща Преживяемост

ПР – Прогестерон Рецептор

РМЖ – Рак на Млечната Жлеза

CI – Confidence Interval (доверителен интервал)

HR – Hazard Ratio (коефициент на риска)

PCR – Polymerase Chain Reaction (полимеразна верижна реакция)

SNP – Single Nucleotide Polymorphism (единичен нуклеотиден полиморфизъм)

SSCP – Single-Strand Conformation Polymorphism (полиморфизъм в конформациите на едновеижни нуклеинови киселини)

I. УВОД

Ракът на млечната жлеза (РМЖ) е най-често срещаното злокачествено заболяване при жените в световен мащаб като регистрираните нови случаи се увеличават всяка година с 2%. По последни данни (2012 г.) на Националния раков регистър в България около 26% от всички женски тумори са на гърдата, като в страната ежегодно се диагностицират над 3600 жени и около 1100 умират от РМЖ.

Злокачествените заболявания, независимо дали са спорадични или наследствени, са считани за генетични, тъй като произлизат от една единствена клетка, която в резултат от натрупването на генетични изменения е преодоляла естествените прегради за нормален растеж. Тази клетка се дели неконтролируемо, като образува клон от увредени клетки, който в крайна сметка се превръща в тумор. Възникването на рака е многостъпален процес, при който за трансформацията на нормалната клетка в ракова се изискват няколко генетични събития. Тези събития най-често представляват изменения в двата основни класа гени свързани с рака – или прото-онкоген е придобил функция и така е иницирал растежа на клетката, или туморно супресорен ген е загубил способността си да предотвратява неограничения растеж.

Добре известно е, че туморно супресорните гени *TP53* и *BRCA1*, както и прото-онкогенът *PIK3CA* участват в канцерогенезата на РМЖ. Въпреки това, литературните данни за ролята на тези гени, както и за влиянието на техния статус върху клиничните характеристики и прогнозата на пациентите са доста разнопосочни. По тази причина в настоящото изследване, бяха анализирани честотата и типа на соматичните мутации в *TP53*, *BRCA1* и *PIK3CA* гените в туморни проби от български пациенти със спорадичен РМЖ. Изследвани бяха и някои епигенетични промени (промоторното хиперметиране) в *BRCA1* гена. Чрез статистически анализи беше направена оценка на влиянието на откритите измененията върху преживяемостта и клинично-патологичните и молекулярни характеристики на болните.

II. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

Основните цели на настоящата дисертация бяха:

1. Да бъдат изследвани соматичните генетични и епигенетични промени в туморно супресорните гени *TP53* и *BRCA1* и прото-онкогена *PIK3CA* в туморни проби от български пациенти със спорадичен РМЖ.

2. Да се установи дали откритите промени повлияват преживяемостта, клиничко-патологичните и молекулярни характеристики в изследваната група болни.

3. Да се изследва влиянието на единствения несинонимен полиморфизъм 1173 A>G, в прото-онкогена *PIK3CA*, върху функционалната активност на *PIK3CA* протеина.

За постигането на тези цели бяха поставени следните по-важни задачи:

1. Да се определи честотата и типът на генетичните изменения в *BRCAl*, *TP53* и *PIK3CA* гените в туморни проби от български пациенти със спорадичен РМЖ.

2. Да се изследва връзката между аберантния статус на *BRCAl*, *TP53* и *PIK3CA* гените и клиничко-патологичните и молекулярно-генетични показатели на пациентите.

3. Да се установи влиянието на генетичните изменения в *BRCAl*, *TP53* и *PIK3CA* върху преживяемостта на пациентите.

4. Да се изследва статуса на метилиране в промотора на *BRCAl* и потенциалното му влияние върху клиничко-патологичните и молекулярни показатели на пациентите, както и върху тяхната обща преживяемост.

5. Да се изследва потенциалния ефект на полиморфизма 1173 A>G върху функционалната активност на *PIK3CA* протеина.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Материали

1.1. Пациентки с РМЖ

В изследването беше използван туморен материал от 145 пациентки с първичен инвазивен РМЖ, провели хирургично лечение в Специализирана Болница за Активно Лечение по Онкология (СБАЛО), гр. София, за периода 2000 – 2003 г. Всички пациентки бяха от български етнос, на възраст между 29 и 88 години. Туморните проби ни бяха предоставени от доц. д-р Иван Гаврилов, началник на Мамологично отделение към Торакална клиника при СБАЛО, след предварително подписано съгласие за провеждане на изследванията. Информацията за клиничния статус на болните ни беше предоставена от д-р Мария Начева – СБАЛО, гр. София.

1.2. Клинично здрави лица

Кръвни проби от 10 клинично здрави лица – жени от контингент кръводарители, на възраст от 25 до 62 г. бяха използвани като отрицателни контроли при някои от изследванията.

1.3. Клетъчни линии

Използвана беше безсмъртната клетъчна линия MCF-10A (ATCC, Manassas, VA), която притежава характеристиките на нормалната гърдна епител.

2. Методи

2.1. Екстракция на ДНК

2.1.1. Изолиране на ДНК от туморен материал

ДНК от туморна тъкан беше изолирана с *DNeasy[®] Blood & Tissue kit* (Qiagen), както и по стандартна процедура.

2.1.2. Изолиране на ДНК от венозна кръв

Геномна ДНК от венозна кръв беше изолирана по стандартна фенол-хлороформ методика или посредством *DNeasy[®] Blood & Tissue kit* (Qiagen).

2.2. Мутационен анализ

2.2.1. Полимеразна верижна реакция (PCR)

Използваните праймери и получените продукти са описани в Таблица 1. Амплификацията беше извършена с: *PCR Core kit* (Boehringer, Mannheim), *STS PCR kit* (STS Ltd.) и *HotStar Taq Master Mix* (Qiagen, Valencia, CA).

2.2.1.1. BRCA1

Изследвани бяха 10 участъка от *BRCA1* гена, покриващи 17-те най-често срещани мутации в него според базата данни на NHGRI (National Human Genome Research Institute). Праймерите за екзони 2, 5, 11A, 11B, 13 и 20 бяха заимствани от *Friedman и съавт. (1994)*, а дизайна на останалите беше извършен от нас.

2.2.1.2. TP53

Проведена беше PCR амплификация на екзони от 4 до 9 с олигонуклеотидни праймери (*Deng и съавт., 1994*).

2.2.1.3. PIK3CA

Двата изследвани екзона бяха амплифицирани чрез специфични праймери (Samuels и съавт., 2004).

Таблица 1. Последователностите на 18-те двойки праймери използвани при мутационния анализ. T_a представлява температурата на анилинг.

Ген	Екзон	Праймер - forward (5' - 3')	Праймер - reverse (5' - 3')	T_a (°C)	Размер на продукта (б.дв.)
BRCA1	2	GAAGTTGTCATTTTATAAACCTTT	TGCTTTTCTTCCCTAGTATGT	60	250
	5	CTCTTAAGGGCAGTTGTGAG	TTCCTACTGTGGTTGCTTCC	60	200
	11A	AACACCACTGAGAAGCGTGACAG	CTCACACAGGGGATCAGCATTC	55	309
	11B	CAACATAACAGATGGGCTGGAAG	ACGTCCAATACATCAGCTACTTTGG	55	300
	11C	GTATCCATTGGGACATGAAG	GCCTGCAGTGATATTAAGT	54	295
	11C2	TACCACCACTTTTTCCCATC	ACCCCTAATCTAAGCATAGC	55	325
	11D	GCTTGTTTTCTTCACAGTGCAGTG	GGGCAAAACACAAAAACCTGGTTC	63	291
	13	AATGGAAAGCTTCTCAAAGTA	ATGTTGGAGCTAGGTCCTTAC	60	280
	16	TCTGATCCTTCTGAAGACAGAG	CTCACAAATCTTCTGGGGTCAG	60	263
	20	ATATGACGTGTCTGCTCCAC	GGGAATCCAAATTACACAGC	60	220
TP53	4	TGCACCAGCAGCTCCTACAC	CATGGAAGCCAGCCCCTCAG	64	181
	5	GTGCCCTGACTTCAACTCTG	GGGCAACCAGCCCTGTCTG	59	266
	6	CGTCTAGAATTCCTCACTGATTGCTC	CGGTCGACAGTTGCAAACCAGA	63	166
	7	CGTCTAGAGGCCTGTGTTGTCTCC	CGGTCGACGGTGGCAAGTGGCTCC	63	205
	8	ATTTCTTACTGCCTCTTGCTTC	CTTGGTCTCTCCACCGC	63	218
	9	GCCTCAGATTCACCTTTTATCACC	GACTGGAAACTTCCACTTGATAAG	63	161
PIK3CA	9	GATTGGTTCTTCTGTCTCTG	CCACAAATATCAATTTACAACCATTG	61	486
	20	TGGGGTAAAGGGAATCAAAAAG	CCTATGCAATCGGGTCTTTGC	61	525

2.2.2. Агарозна ДНК електрофореза

Чрез агарозна електрофореза беше анализирана както геномна ДНК, така и PCR продукти. За геномната ДНК беше използван 0.8%, а за PCR продуктите – 2% агарозен гел съдържащ 0.5µg/ml етидиев бромид.

2.2.3. Полиакриламидна гел електрофореза на ДНК в неденатуриращи условия

Аликвота от 5µl PCR продукт беше анализирана на 12% нативен полиакриламиден гел (акриламид:бисакриламид – 29:1).

2.2.4. Анализ на конформациите на едноверижните нуклеинови киселини (SSCP)

Към аликуоти от 7µl PCR продукт бяха добавени по 10µl буфер (95% формамид, 0.01N NaOH, бромфенолово синьо). Пробите бяха денатурирани и нанасяни

на нативен полиакриламиден гел. Оптималната концентрация на акриламида в гела (8–18%) варираше в зависимост от дължината на изследвания PCR продукт. PCR продуктите бяха визуализирани чрез оцветяване на полиакриламидните гелове със сребърен нитрат.

2.2.5. Пречистване на амплификационни продукти

За пречистване на PCR продуктите беше използван *GFX PCR DNA And Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences), като бяха следвани предписанията на производителите.

2.2.6. Секвенционен анализ

Пречистените амплификационни продукти бяха секвенирани на автоматичен флуоресцентен капиларен секвенатор *ABI Prism™ 310 Automated Sequencer* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), с помощта на *DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing Kit* (Amersham Biosciences). Всички мутации бяха потвърдени чрез секвениране и на втората верига ДНК.

2.3. Метилационен анализ

Метилационният статус на *BRCA1* промотора беше определен чрез метилационно специфичен PCR (MSP) на бисулфитно-конвертирана ДНК. За конвертирането на ДНК беше използван *EZ DNA Methylation Kit™* (Zymo Research Corporation) като бяха следвани инструкциите на производителя. За положителна контрола беше използвана *in vitro* метилирана ДНК (*Universal Methylated Human DNA Standard* – Zymo Research), а за отрицателна – ДНК изолирана от кръв на здрави кръводарители. PCR продуктите бяха подложени на електрофореза в 2% агарозен гел и визуализирани под УВ светлина.

2.4. Статистически анализ

Статистическата значимост на измененията в *TP53*, *BRCA1* и *PIK3CA* беше определена чрез *теста на Фишер* и *Chi-квадрат теста*. Оценката на ОП беше извършена на базата на 5-годишен период от оперативното лечение, като беше определена по метода на *Каплан-Майер* и разликите между кривите за преживяемост бяха изчислени за статистическа достоверност чрез *log-rank* тест. Чрез пропорционалния регресионен модел на Кокс беше пресметнат коефициентът на риска (HR), с 95% доверителен интервал за всяка променлива в уни- и мултивариантен

анализ. Всички P стойности са считани за статистически достоверни при $P < 0.05$. Анализите бяха извършени със софтуерния пакет *SPSS* (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

2.5. Функционален анализ

2.5.1. Култивиране на клетъчни линии

Клетъчната линия MCF10A беше култивирана в DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) среда, съдържаща 5% фетален телешки серум (FBS), 1% натриев пируват, 20ng/ml човешки епидермален растежен фактор (hEGF), 10μg/ml инсулин и 0.05mM хидрокортизон. Клетъчните култури бяха отглеждани в CO₂ инкубатор при 37°C и 5% CO₂.

2.5.2. Място-насочен мутагенезис

Чрез място-насочен мутагенезис *PIK3CA* полиморфизмът 1173 A>G беше въведен в експресионния вектор pCMV-Tag2A. Анализът беше проведен с *QuickChange site-directed mutagenesis kit* (Stratagene, La Jolla, CA) по протокол на производителя.

2.5.3. Трансформация

Получените в резултат от място-насочения мутагенезис комбинации бяха намножени и поддържани чрез клетъчна трансформация. За целта бяха използвани компетентни клетки (*XLI-Blue supercompetent cells*) съдържащи се в гореспоменатия кит (*QuickChange site-directed mutagenesis kit*).

2.5.4. Изолиране на плазмидна ДНК

Плазмидна ДНК, получена в резултат от трансформацията, беше изолирана по стандартна методика.

2.5.5. Трансфекция на клетъчни линии

Трансфекцията беше извършена чрез нелипозомния трансфекционен реагент *FuGENE6* (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) според инструкциите на производителя.

2.5.6. Western blotting

Следван беше стандартния протокол за Western blotting. Използвани бяха анти-фосфо-АКТ (Ser-473) антитела (Cell Signaling Technology, Beverly, MA). Като контрола за нормализация на количеството на нанесения протеин беше използван α-тубулин.

Визуализацията беше осъществена хемилуминисцентно чрез *Wb Chemi Detection Sys Mouse* (Invitrogen) върху рентгенов филм.

2.5.7. Анализ на пролиферацията чрез растежни криви

За определяне скоростта на пролиферация, в хранителна среда бяха засети еднакъв брой (4×10^4) клетки от 6-те трансфекционни линии. В продължение на три дни, през равни интервали от време (на всеки 12 часа) клетките бяха трипсинизирани и преброявани. Експериментът беше повторен трикратно. Резултатите бяха обработени с Microsoft Office Excel и представени под формата на растежни криви със стандартни отклонения. Статистическата достоверност беше определена чрез t-тест.

IV РЕЗУЛТАТИ

1. Мутационен анализ

През първия етап от изследването беше изолирана ДНК от 145 туморни проби на пациенти болни от спорадичен РМЖ. Количеството и качеството на изолираните ДНК-и бяха определени чрез спектрофотометричен и електрофоретичен анализи и напълно удовлетворяваха изискванията за PCR. Всички експерименти при мутационния и метилационен анализи (с изключение на някои контроли) бяха проведени с ДНК изолирана от туморна тъкан. Скринингът за мутации беше извършен чрез PCR-SSCP-секвенционен анализ. Условието на PCR реакцията, както и на SSCP анализа бяха оптимизирани по отношение на концентрациите на матричната ДНК, $MgCl_2$, дНТФ-ите, Таq-полимеразата и праймерите, броя на циклите, температурата на анилинг на праймерите, както и по отношение на концентрацията на акриламида в гела, силата и напрежението на тока и времето за електрофореза.

1.1. TP53

От всичките налични 145 туморни проби на пациенти с РМЖ, 95 бяха скринирани за наличие на мутации в *TP53*. Останалите 50 бяха изследвани за честота и тип на мутации в този ген на предходен етап в дисертационен труд (*Кръстева, 2006*). Анализирани бяха шест от екзоните (4–9), покриващи основните функционални домени на протеина. Генетични изменения в *TP53* бяха намерени в туморите на деветнадесет от болните (Таблица 2), което представлява 20%. Седем от тези изменения (7.4%) представляваха мутации, променящи структурата на p53 протеина, а именно – четири бяха смислени (водещи до замяна на една аминокиселина (АК) с друга), две бяха с изместване рамката на четене, от които една инсерция и една делеция и последната

мутация беше сплайсинг. Останалите 12 изменения бяха неутрални варианти, които не водеха до промяна в структурата на p53 – 2 тихи мутации, 3 полиморфизми в кодиращите райони и 7 интронни полиморфизми.

Делецията delGTTTCCG (12247-12253), съдържаше последователността GTTT (12247-12250), за която беше установено, че е делетирана и при още три случая на РМЖ. От 5-те полиморфизми открити в кодиращите райони, три бяха в кодон 213 (A>G – Arg213Arg) и два в кодон 268 (C>T – Asn268Asn). Всичките седем интронни полиморфизми бяха 14766 T>C замени, разположени на 12 б.дв. даунстрийм от 3' края на екзон 9.

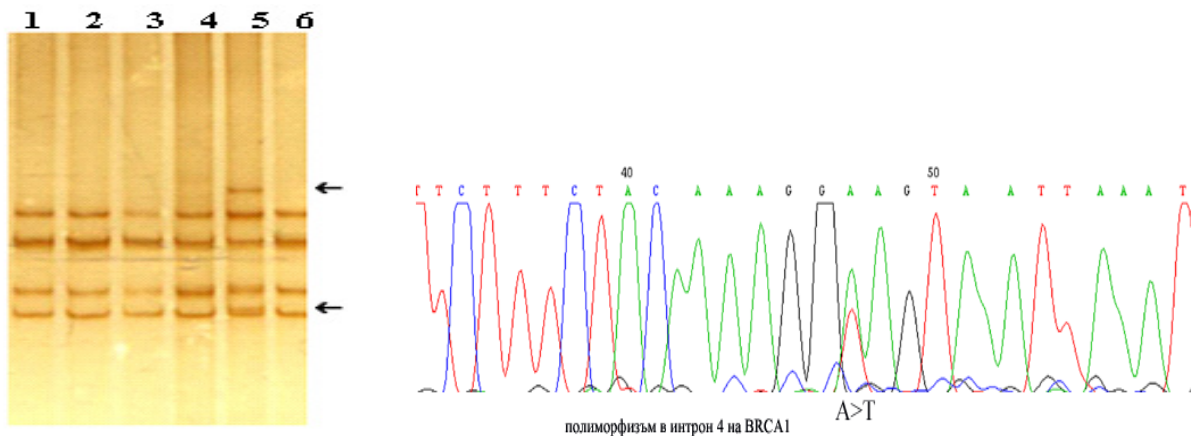
Две от TP53 мутациите, открити в това изследване, а именно delGTTTCCG и insGC бяха нови, несъобщавани до този момент. Други две от установените мутации бяха разположени в известни „горещи точки“ на мутиране: в кодони 220 и 273. Кодон 273 е „гореща точка“ в почти всички видове рак, докато кодон 220 е специфичен за РМЖ.

Таблица 2. Характеристика на мутациите и полиморфизмите, намерени при български пациенти с РМЖ. С ***n*** е означен броят на пациентите със съответното генетично изменение.

Ген	<i>n</i>	Позиция	Нуклеотидна позиция /Базова замяна	Промяна в кодона	Кодон/ АК замяна	АК замяна	Тип изменение
TP53	1	екзон 4	12247-12253 delGTTTCCG	-	108-110	-	Изместване рамката на четене
	1	екзон 4	12299 G>A	ACG-ACA	125	Thr-Thr	Сплайсинг мутация
	1	екзон 5	13104-13105 insGC	-	142	-	Изместване рамката на четене
	1	екзон 6	13374 A>G	TAT-TGT	Y205C	Tyr-Cys	Смислена мутация
	3	екзон 6	13399 A>G	CGA-CGG	213	Arg-Arg	Полиморфизъм
	1	екзон 6	13419 A>G	TAT-TGT	Y220C	Tyr-Cys	Смислена мутация
	2	екзон 8	14473 C>T	AAC-AAT	268	Asn-Asn	Полиморфизъм
	1	екзон 8	14487 G>A	CGT-CAT	R273H	Arg-His	Смислена мутация
	1	екзон 9	14750 T>C	CTT-CCT	L330P	Leu-Pro	Смислена мутация
	7	интрон 9	14766 T>C	-	-	-	Интр. полиморфизъм
BRCA1	1	интрон 4	19479 A>T	-	-	-	Интр. полиморфизъм
PIK3CA	6	екзон 9	1624 G>A	GAA-AAA	E542K	Glu-Lys	Смислена мутация
	9	екзон 9	1633 G>A	GAG-AAG	E545K	Glu-Lys	Смислена мутация
	2	екзон 9	1636 C>A	CAG-AAG	Q546K	Gln-Lys	Смислена мутация
	1	екзон 9	1637 A>G	CAG-CGG	Q546R	Gln-Arg	Смислена мутация
	25	екзон 20	3140 A>G	CAT-CGT	H1047R	His-Arg	Смислена мутация
	1	екзон 20	3140 A>T	CAT-CTT	H1047L	His-Leu	Смислена мутация
	2	екзон 20	3145 G>C	GGT-CGT	G1049R	Gly-Arg	Смислена мутация

1.2. *BRCA1*

За установяване на мутации в *BRCA1* всичките 145 туморни проби бяха изследвани чрез PCR-SSCP. Анализирани бяха 10 екзона (2, 5, 11A, 11B, 11C, 11C2, 11D, 13, 16, и 20) на *BRCA1* гена, покриващи 17-те най-често срещани мутации в него според базата данни на NHGRI (National Human Genome Research Institute). Аберантен SSCP профил беше намерен само при един или 0.69% от пациентите (Фигура 1). Секвенционният анализ показа, че този профил съответства на субституция от типа A>T в позиция 19479 на интрон 4 (Таблица 2).



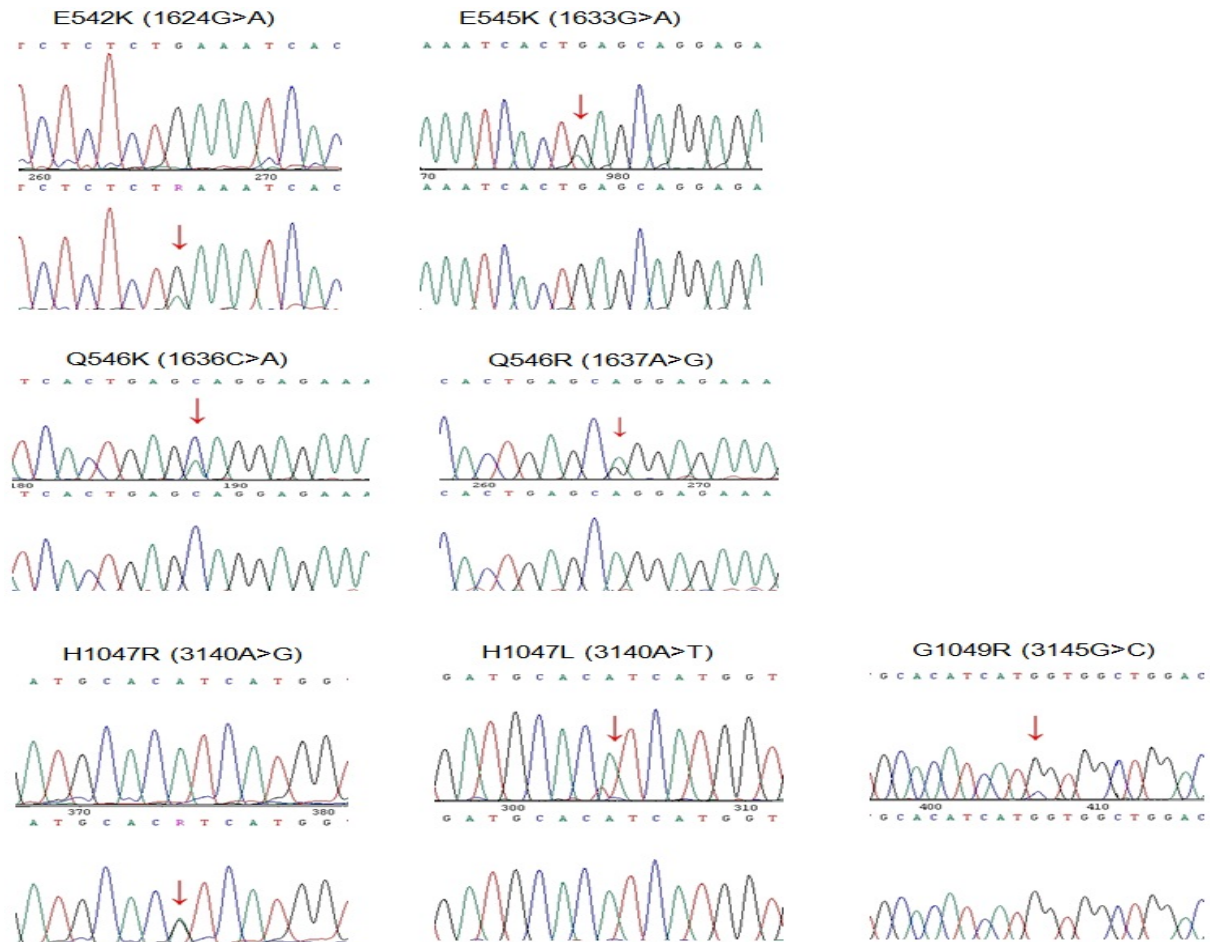
Фигура 1. Интронен полиморфизъм A>T в *BRCA1* гена. Аберантния SSCP профил на старт 5 (ляво) съответства на интронния полиморфизъм A>T (дясно).

1.3. *PIK3CA*

Мутационният профил на *PIK3CA* беше анализиран чрез директно секвениране на най-мутабилните участъци от гена, а именно екзони 9 и 20, кодиращи съответно хеликалния и каталитичния домен на протеина. Анализът показва, че 45 (или 31%) от изследваните 144 туморни проби носят мутация в този онкоген (Таблица 2). Установени бяха общо седем различни мутации, всички от които водеха до промяна в аминокиселинната последователност (Фигура 2). Четири от седемте вида мутации, представени на Фигура 2, бяха открити в екзон 9, а останалите три вида мутации бяха разположени в 20-ти екзон.

Осемнадесет (или 39%) от общия брой регистрирани мутации в *PIK3CA* бяха локализирани в екзон 9, а 28 (61%) – в екзон 20 (при един от пациентите бяха намерени мутации едновременно и в двата екзона). Трите „горещите точки“ на мутиране, а

именно E542K, E545K и H1047R, бяха отговорни за общо 40 (87%) от установените мутации в *PIK3CA*.



Фигура 2. Секвенционен анализ на *PIK3CA*. Показана е по една секвенция от откритите седем различни смислени мутации. Мястото на базовата замяна е обозначено с червена стрелка.

2. Връзка между мутационния статус на изследваните гени и клинично-патологичните и молекулярни характеристики на пациентите

За оценка на клиничното значение на откритите изменения, мутационният статус на изследваните гени беше съпоставен, както с някои стандартни клинично-патологични показатели така и с няколко молекулярни характеристики на туморите.

2.1. *TP53*

При статистическия анализ бяха включени резултатите за мутантния статус на *TP53* за 50 от пациентите анализирани на предишен етап (Кръстева, 2006). Под внимание бяха взети единствено измененията (16 на брой), променящи структурата на p53 протеина, а именно делециите, инсерциите, смислените, безсмислените и сплайсинг мутациите.

Таблица 3. Връзка между мутациите в *TP53* и клинично-патологичните и молекулярни характеристики на пациентите. *S* и *n* е означен броят на пациентите от съответната група, *T* – размерът на тумора, *N* – лимфният статус, *G* – степента на малигненост, *ER* – естроген рецепторният статус и *PR* – прогестерон рецепторният статус. Статистически достоверните стойности са удебелени.

Характеристики на пациента	Статус	Общо <i>n</i> = 145	Мутантен <i>TP53</i> <i>n</i> = 16 (%)	Див тип <i>TP53</i> <i>n</i> = 129 (%)	<i>P</i>
Възраст	Средна (години)	54.4	57.3	54	0.052
	<50	52	2 (4)	50 (96)	
	>=50	93	14 (15)	79 (85)	
<i>T</i>	T1	65	3 (5)	62 (95)	0.033
	T2-T4	80	13 (16)	67 (84)	
<i>N</i>	N0	92	11 (12)	81 (88)	0.786
	N+	53	5 (9)	48 (81)	
<i>G</i>	G1	6	0 (0)	6 (100)	0.001
	G2	103	6 (6)	97 (94)	
	G3	36	10 (28)	26 (72)	
Хистологичен тип	Лобуларен	15	1 (7)	14 (93)	1
	Дуктален	130	15 (12)	115 (88)	
<i>ER</i>	Положителен	81	10 (12)	71 (88)	0.610
	Отрицателен	64	6 (9)	58 (11)	
<i>PR</i>	Положителен	81	9 (11)	72 (89)	1
	Отрицателен	64	7 (11)	57 (89)	
<i>ATM</i>	Мутантен	11	2 (18)	9 (82)	0.350
	Див тип	134	14 (11)	120 (89)	
<i>PIK3CA</i>	Мутантен	45	4 (9)	41 (91)	0.780
	Див тип	99	12 (12)	87 (88)	
HER2 свръхекспресия	Положителен	21	3 (14)	18 (86)	1
	Отрицателен	78	11 (14)	67 (86)	
	Неизвестен	46	2	44	

Резултатите показаха статистически достоверна корелация между статуса на *TP53* и размера на тумора ($P = 0.033$), както и степента на малигненост ($P = 0.001$) (Таблица 3). Туморите с мутация в *TP53* бяха по-големи (предимно T2–T4) и по-слабо диференцирани (G3) в сравнение с тези с див тип *TP53*. Беше наблюдавана и тенденция за по-късна изява на *TP53* мутациите ($P = 0.052$), тъй като по-голямата част от жените, чиито тумори носеха мутация в този ген (87.5%) бяха над 50 годишна възраст.

2.2. *BRCA1*

Поради факта, че в *BRCA1* беше установено само едно изменение, статистически анализ за този ген не беше провеждан. Туморът, съдържащ аберацията в

BRC1 беше със следните характеристики – T3, N⁺, G2, EP⁺, PP⁻, *PIK3CA*⁺, *ATM* и *HER2*⁺. Пациентката беше на възраст 59 години и почина 19 месеца след операцията.

2.3. *PIK3CA*

Честотата на *PIK3CA* мутациите при PP⁺ тумори беше значително по-висока от тази при PP⁻ тумори, като резултатът беше статистически достоверен – $P = 0.047$ (Таблица 4). Установена беше също и тенденция за по-висока честота на *PIK3CA* мутациите в умерено диференцирани (G2) тумори ($P = 0.07$), както и в тумори съдържащи *ATM* мутация ($P = 0.098$).

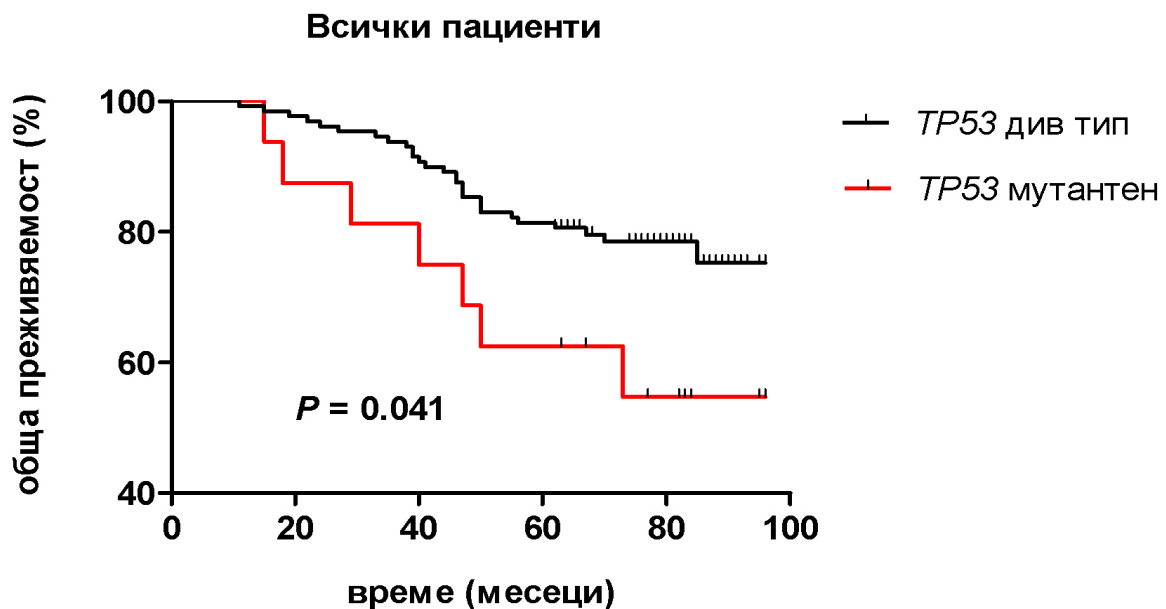
Таблица 4. Връзка между мутациите в *PIK3CA* и клинично-патологичните и молекулярни характеристики на пациентите. С *n* е означен броят на пациентите от съответната група, с *T* – размерът на тумора, с *N* – лимфният статус, с *G* – степента на малигненост, с *EP* – естроген рецепторният статус и с *PP* – прогестерон рецепторният статус. Статистически достоверните стойности са удебелени.

Характеристики на пациента	Статус	Общо n = 144	Мутантен <i>PIK3CA</i> n = 45 (%)	Див тип <i>PIK3CA</i> n = 99 (%)	<i>P</i>
Възраст	Средна (години)	54.4	54.7	54.2	0.580
	<50	52	18 (35)	34 (65)	
	>/=50	92	27 (29)	65 (71)	
T	T1	65	20 (31)	45 (69)	0.615
	T2-T4	79	25 (32)	54 (68)	
N	N0	91	31 (34)	60 (66)	0.360
	N+	53	14 (26)	39 (74)	
G	G1	6	0 (0)	6 (100)	0.070
	G2	102	37 (36)	65 (64)	
	G3	36	8 (22)	28 (78)	
Хистологичен тип	Лобуларен	14	6 (43)	8 (57)	0.370
	Дуктален	130	39 (30)	91 (70)	
EP	Положителен	80	24 (30)	56 (70)	0.720
	Отрицателен	64	21 (33)	43 (67)	
PP	Положителен	81	31 (38)	50 (62)	0.047
	Отрицателен	63	14 (22)	49 (78)	
TP53	Мутантен	16	4 (25)	12 (75)	0.780
	Див тип	128	41 (32)	87 (68)	
ATM	Мутантен	11	6 (55)	5 (45)	0.098
	Див тип	133	39 (42)	94 (58)	
HER2 свръхекспресия	Положителен	20	10 (50)	10 (50)	0.190
	Отрицателен	78	26 (33)	52 (67)	
	Неизвестен	46	9	37	

3. Връзка между мутационния статус на изследваните гени и общата преживяемост на пациентите

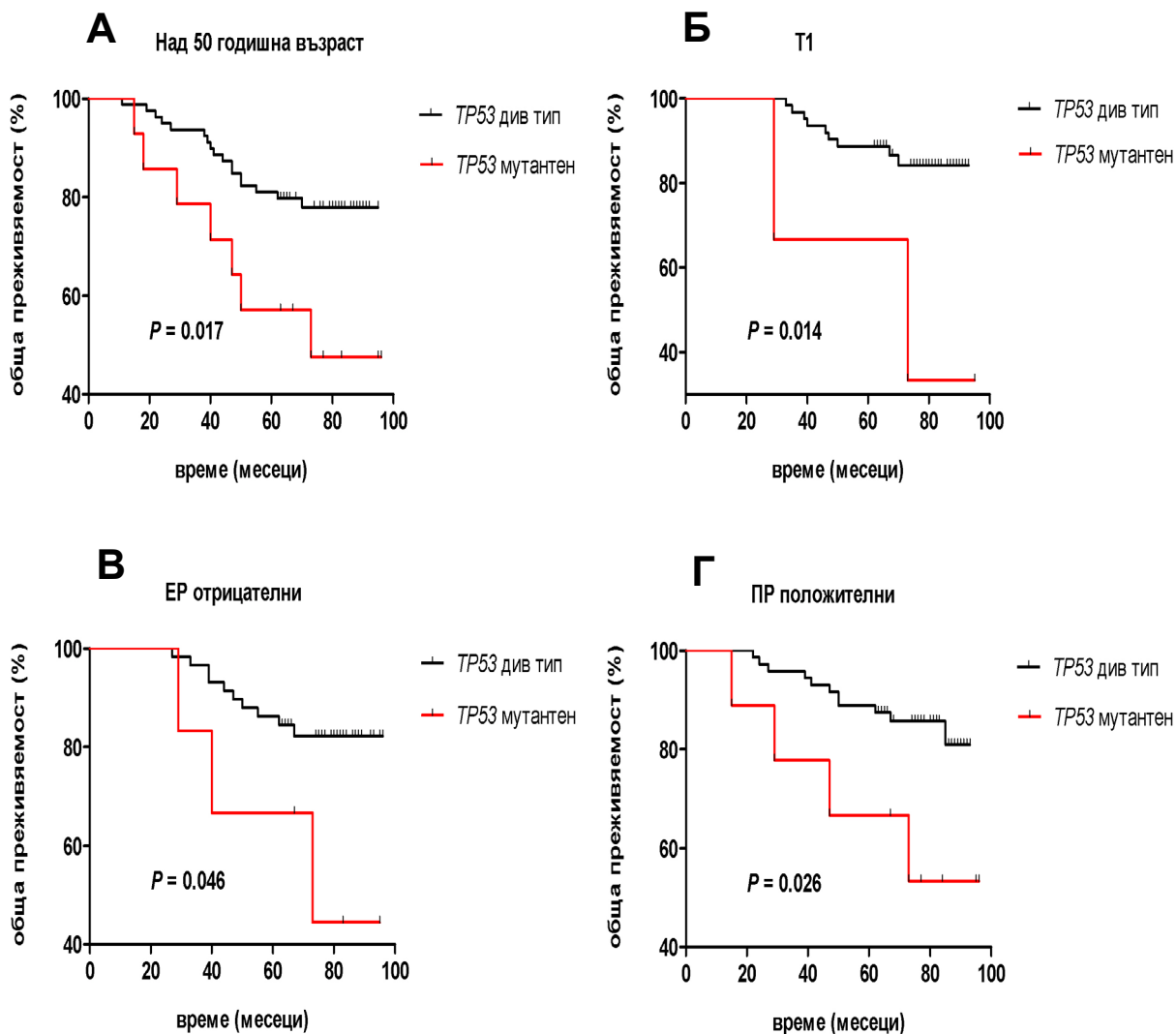
Общата преживяемост е индикатор за лечимостта на дадено заболяване и обикновено се изчислява 5 години след оперативното му лечение. В изследваната от нас група от 145 болни с РМЖ, 110 от пациентите бяха преживели 5-годишния период, или с други думи, ОП се равняваше на 75.86%.

За установяване на връзката между ОП на пациентите и статуса на *TP53* и *PIK3CA* гените в техните тумори беше проведен анализът за преживяемост на *Каплан-Майер*. Той показва, че пациентите, чиито тумори са с мутация в *TP53*, се характеризират с понижена ОП в сравнение с пациентите с див тип *TP53* тумори, като получената зависимост е статистически достоверна – $P = 0.041$ (Фигура 3).



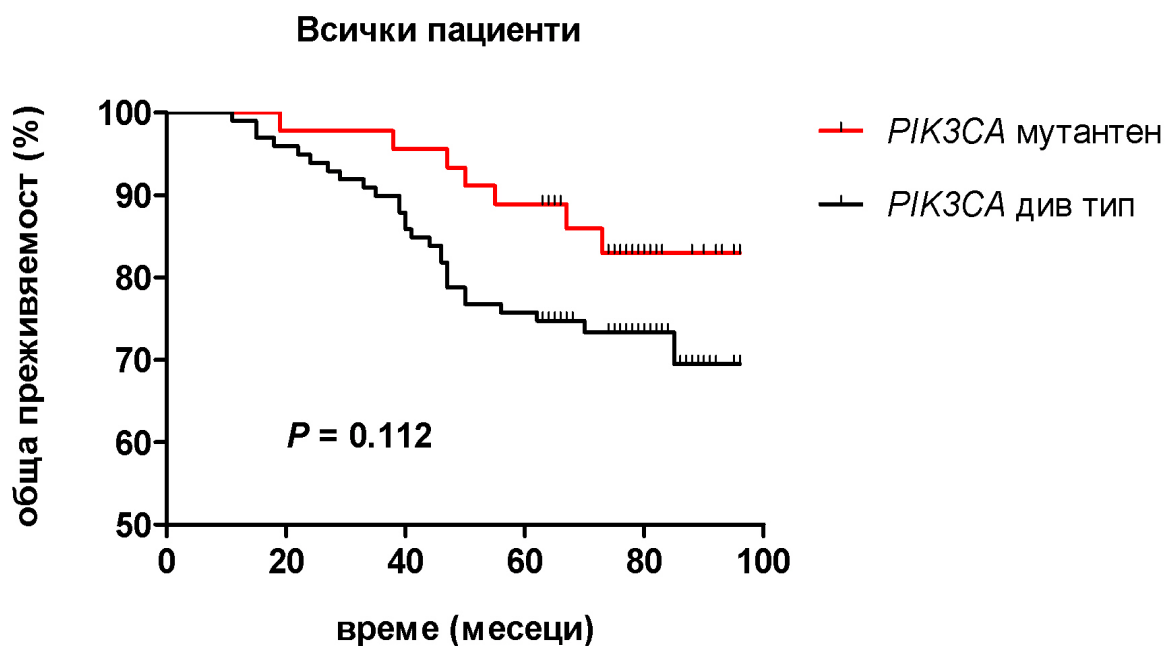
Фигура 3. Каплан-Майер анализ на общата преживяемост на пациентите в зависимост от *TP53* статуса на туморите им.

Тази зависимост беше още по-ясно изразена при пациентите над 50 годишна възраст ($P = 0.017$) (Фигура 4 – А), както и при тези с малки по размер (Т1) тумори ($P = 0.014$) (Фигура 4 – Б). Негативното влияние на мутацията *TP53* върху ОП беше наблюдавано и в подгрупите на ER-отрицателните ($P = 0.046$, Фигура 4 – В) и PR-положителните ($P = 0.026$) тумори (Фигура 4 – Г).



Фигура 4. Каплан-Майер анализ на общата преживяемост на пациентите в зависимост от TP53 статуса на туморите им в следните подгрупите от болни: **А** – над 50 годишна възраст, **Б** – малки размери на тумора (T1), **В** – ER-отрицателни, **Г** – PR-положителни.

При болните с мутирани *PIK3CA* тумори беше наблюдавана точно противоположната тенденция – те показаха по-висока ОП ($P = 0.112$) (Фигура 5), в сравнение с пациентите с див тип *PIK3CA* тумори.



Фигура 5. Каплан-Майер анализ на общата преживяемост на пациентите в зависимост от *PIK3CA* статуса на туморите им.

За изчисляване на коефициента на риска беше използван унивариантен и мултивариантен пропорционален регресионен модел на Кокс. С този модел бе съпоставен рискът от смърт за пациенти, чиито тумори носят мутации в *TP53* и *PIK3CA*, в сравнение с пациенти, чиито тумори са без мутации в тези гени. В анализа бяха включени и описаните вече традиционни прогностични фактори, както и някои молекулярни характеристики.

Унивариантният анализ, при който не се изключва влиянието на останалите параметри, показва, че болните с мутирани *TP53* тумори имат 2.31 пъти по-висок риск да починат от РМЖ (HR = 2.31, 95%CI 1.01-5.29, $P = 0.048$), отколкото пациентите с див тип *TP53* тумори (Таблица 5). В обратна посока беше действието на мутациите в *PIK3CA* – те имаха протективен ефект (HR = 0.5), макар и той да не бе статистически достоверен (95%CI 0.19-1.34, $P = 0.169$) (Таблица 5).

При мултивариантния модел на Кокс се изключва влиянието на другите фактори върху крайния резултат. При този анализ не беше постигнат статистически достоверен резултат за изследваните гени, въпреки че при пациентите с мутирани *PIK3CA* тумори, отново беше наблюдавана благоприятна тенденция (HR = 0.51, 95% CI 0.19-1.34, $P = 0.169$) (Таблица 5). Установено беше, че при мултивариантния модел, само по-големият размер на тумора представлява независим прогностичен фактор – той

увеличава 4.43 пъти риска от смъртност от РМЖ (HR = 4.43, 95%CI 1.47-13.38, P = 0.008) (Таблица 5).

Таблица 5. Унивариантен и мултивариантен Кокс анализи. С HR е означен коефициентът на риска, с CI 95%-ят доверителен интервал, с G – степента на малигненост, с T – размерът на тумора, с N – лимфният статус, с ER – естроген рецепторният статус и с PR – прогестерон рецепторният статус. Статистически достоверните стойности са удебелени.

Параметър	Унивариантен			Мултивариантен		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
TP53, мутантен / див тип	2.31	1.01-5.29	0.048	1.08	0.38-3.09	0.889
PIK3CA, мутантен / див тип	0.50	0.22-1.15	0.103	0.51	0.19-1.34	0.169
ATM, мутантен / див тип	1.08	0.33-3.54	0.894	1.85	0.39-8.83	0.439
HER2, свръхекспресиран / нормален	1.27	0.51-3.17	0.616	0.83	0.29-2.39	0.735
Възраст, <50 / >=50 години	0.99	0.97-1.02	0.692	0.98	0.94-1.01	0.220
G, G1 / G2 / G3	0.66	0.33-1.35	0.259	1.49	0.63-3.59	0.364
T, T2-T4 / T1	1.96	0.96-3.99	0.065	4.43	1.47-13.38	0.008
N, положителен / отрицателен	0.98	0.49-1.96	0.963	0.87	0.35-2.19	0.771
ER, положителен / отрицателен	1.44	0.73-2.86	0.297	1.03	0.42-2.55	0.943
PR, положителен / отрицателен	0.53	0.27-1.03	0.060	0.53	0.22-1.27	0.153

4. Метилационен анализ на *BRCA1*

Резултатите от мутационния анализ на *BRCA1* показаха липса на мутации в този ген при изследваната група от 145 болни със спорадичен РМЖ. Това предположи съществуването на алтернативни механизми за инактивиране функцията на *BRCA1* гена. По тази причина решихме да изследваме степента на метилиране в промоторната област на *BRCA1*. За целта беше използван метилационно специфичния PCR (MSP). Анализирани бяха 135 от туморните проби използвани и при мутационния анализ. Резултатите показаха хиперметилиране на *BRCA1* в 23 от пациентите, което съответства на 17.04%. За положителна контрола беше използвана тотално метилирана *in vitro* ДНК, а за отрицателна – ДНК изолирана от кръв на клинично здрави лица.

4.1. Връзка между промоторното хиперметилиране на *BRCA1* и клиничко-патологичните и молекулярни характеристики на пациентите

За оценка на значението на хиперметилирането на промотора на *BRCA1* гена като потенциален клиничен показател за РМЖ, статусът на метилиране беше съпоставен със стандартните прогностични фактори описани по-горе (Таблица 6).

Резултатите показаха една статистически достоверна зависимост, а именно, че туморите с хиперметиран *BRCA1* промотор, са значително по-често от лобуларен тип в сравнение с туморите с неметиран промотор ($P = 0.046$). Установени бяха и следните тенденции: при пациенти, чиито тумори са с хиперметиран *BRCA1* промотори заболяването се проявява по-рано (с 4 години) и размерът на туморите е по-малък ($P = 0.066$).

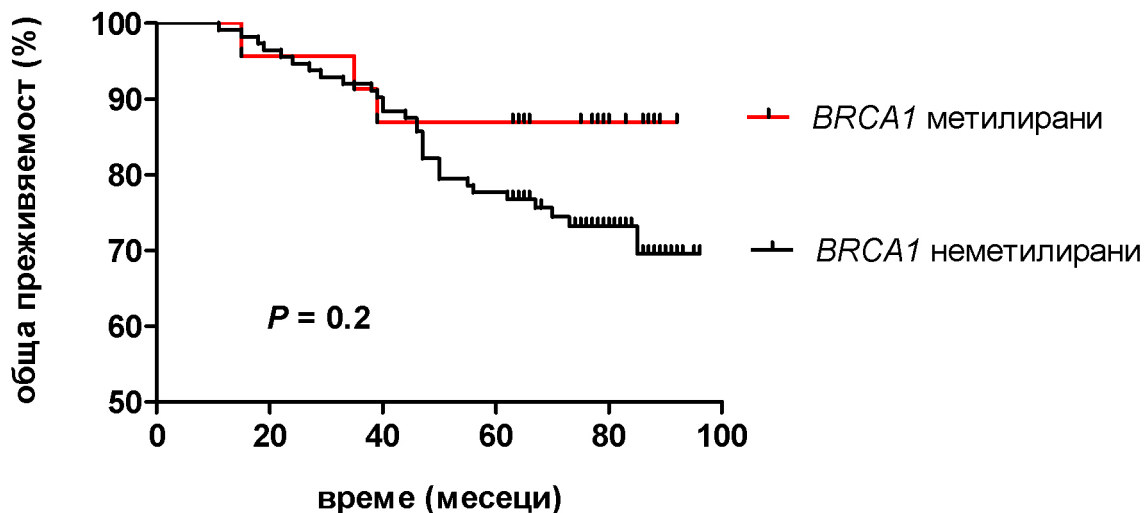
Таблица 6. Статус на метилиране на *BRCA1* промотора съпоставен с някои клинично-патологични и молекулярни характеристики. С *n* е означен броят на пациентите от съответната група, с *T* – размерът на тумора, с *N* – лимфният статус, с *G* – степента на малигненост, с *ER* – естроген рецепторният статус и с *PR* – прогестерон рецепторният статус. Статистически достоверните стойности са удебелени.

Характеристики на пациента	Статус	Общо случаи n = 135	Метиран n = 23 (%)	Неметиран n = 112 (%)	<i>P</i>
Възраст	Средна (години)	54,11	50,57	54,84	0.156
	<50	51	12 (24)	39 (76)	
	>=50	84	11 (13)	73 (87)	
T	T1	63	15 (24)	48 (76)	0.066
	T2-T4	72	8 (11)	64 (89)	
N	N0	85	13 (15)	72 (85)	0.487
	N+	50	10 (20)	40 (80)	
G	G1	5	0 (0)	5 (100)	0.832
	G2	97	17 (18)	80 (82)	
	G3	33	6 (18)	27 (82)	
Хистологичен тип	Лобуларен	13	5 (39)	8 (61)	0.046
	Дуктален	122	18 (15)	104 (85)	
ER	Положителен	76	12 (16)	64 (84)	0.818
	Отрицателен	59	11 (19)	48 (81)	
PR	Положителен	77	12 (16)	65 (84)	0.648
	Отрицателен	58	11 (19)	47 (81)	
TP53	Мутантен	16	0 (0)	16 (100)	0.073
	Див тип	119	23 (19)	96 (81)	
ATM	Мутантен	11	0 (0)	11 (100)	0.210
	Див тип	124	23 (19)	101 (81)	
PIK3CA	Мутантен	43	5 (12)	38 (88)	0.329
	Див тип	92	18 (20)	74 (80)	
HER2 свръхекспресия	Положителен	19	3 (16)	16 (84)	0.367
	Отрицателен	51	14 (27)	37 (73)	
	Неизвестен	65	6	59	

Метилационният статус на *BRCA1* беше съпоставен и с няколко молекулярни характеристики на туморите, като мутантния статус на *TP53*, *ATM* и *PIK3CA* гените, както и експресията на HER2 рецептора (Таблица 6). Интерес предизвика фактът, че всички тумори с хиперметирирани *BRCA1* промотори бяха без мутация в *TP53*, въпреки че тази зависимост не беше статистически достоверна ($P = 0.073$).

4.2. Връзка между промоторното хиперметириране на *BRCA1* и общата преживяемост на пациентите

В изследваната от нас група 103 от общо 135 пациенти бяха преживели 5-годишния период от оперативното лечение, което се равняваше на ОП от 75.55%. Анализът на ОП беше извършен по метода *Каплан-Майер* и разликите между кривите бяха изчислени за статистическа достоверност чрез *log-rank* тест (Фигура 6).



Фигура 6. Каплан-Майер анализ на общата преживяемост на пациентите в зависимост от статуса на промоторно *BRCA1* метилиране в туморите им.

Изследването показва, че пациентите, чиито тумори са с хиперметирирани *BRCA1* промотори, имат по-висока ОП от тези, чиито тумори са с нормално метилирани *BRCA1* промотори, въпреки че резултатът не беше статистически достоверен (Фигура 6).

Чрез пропорционалния регресионен модел на Кокс беше съпоставен рискът от смърт за пациенти с тумори с хиперметирирани *BRCA1* промотори с този на пациенти с тумори с нормално метилирани *BRCA1* промотори (Таблица 7). Анализът отново включваше както традиционните показатели, така и някои молекулярни характеристики. Унивариантният анализ показва протективен (но не статистически

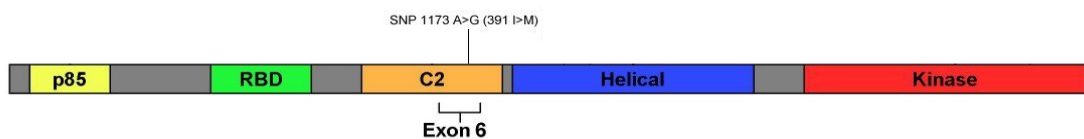
достоверен) ефект на промоторното *BRCA1* хиперметиране (HR 0.47). И при това изследване беше потвърден негативния ефект на мутациите в *TP53* и големия размер на тумора. При мултивариантния анализ отново, единствения независим прогностичен фактор беше размерът на тумора – той значително допринасяше за намаляването на ОП, повишавайки повече от 4 пъти риска от смърт (HR = 4.51, 95% CI 1.43–14.17, *P* = 0.01) (Таблица 7).

Таблица 7. Коефициент на риска (HR) определен по пропорционалния регресионен модел на Кокс. С CI е означен 95%-ят доверителен интервал, с G – степента на малигненост, с T – размерът на тумора, с N – лимфният статус, с ER – естроген рецепторният статус и с PR – прогестерон рецепторният статус. Статистически достоверните стойности са удебелени.

Параметър	Унивариантен			Мултивариантен		
	HR	95% CI	<i>P</i>	HR	95% CI	<i>P</i>
<i>BRCA1</i> , метилиран / неметиран	0.47	0.14-1.54	0.213	0.91	0.24-3.41	0.891
<i>TP53</i> , мутантен / див тип	2.29	0.99-5.27	0.052	1.04	0.34-3.15	0.945
<i>PIK3CA</i> , мутантен / див тип	0.52	0.22-1.19	0.124	0.48	0.17-1.34	0.160
<i>ATM</i> , мутантен / див тип	1.07	0.33-3.51	0.912	1.71	0.35-8.41	0.508
HER2, свръхекспресиран / нормален	1.16	0.43-3.12	0.775	0.86	0.26-2.89	0.810
Възраст, <50 / >=50 години	0.99	0.97-1.02	0.707	0.98	0.95-1.02	0.400
G, G1 / G2 / G3	1.38	0.69-2.74	0.357	1.43	0.55-3.72	0.459
T, T2-T4 / T1	1.93	0.94-3.99	0.074	4.51	1.43-14.17	0.010
N, положителен / отрицателен	0.91	0.45-1.86	0.799	0.86	0.33-2.28	0.766
ER, положителен / отрицателен	1.28	0.64-2.57	0.493	0.86	0.33-2.26	0.764
PR, положителен / отрицателен	0.49	0.24-0.97	0.042	0.5	0.21-1.23	0.133

5. Функционален анализ на полиморфизма в *PIK3CA* 1173 A>G

В изследване, проведено в нашата лаборатория, беше установено, че честотата на полиморфизма 1173 A>G при болни от фамилен РМЖ е около два пъти по-висока от тази в здрави контроли. Изхождайки от този факт беше проверено дали този Единичен нуклеотиден полиморфизъм (SNP) притежава функционален ефект върху *PIK3CA* протеина. Както беше описано по-горе, 1173 A>G е единствения несинонимен единичен нуклеотиден полиморфизъм в *PIK3CA*. Той е локализиран в екзон 6 и води до аминокиселинна замяна на изолевцин с метионин (Фигура 7).



Фигура 7. Схематично представяне на разположението на полиморфизма 1173 A>G в *PIK3CA* гена.

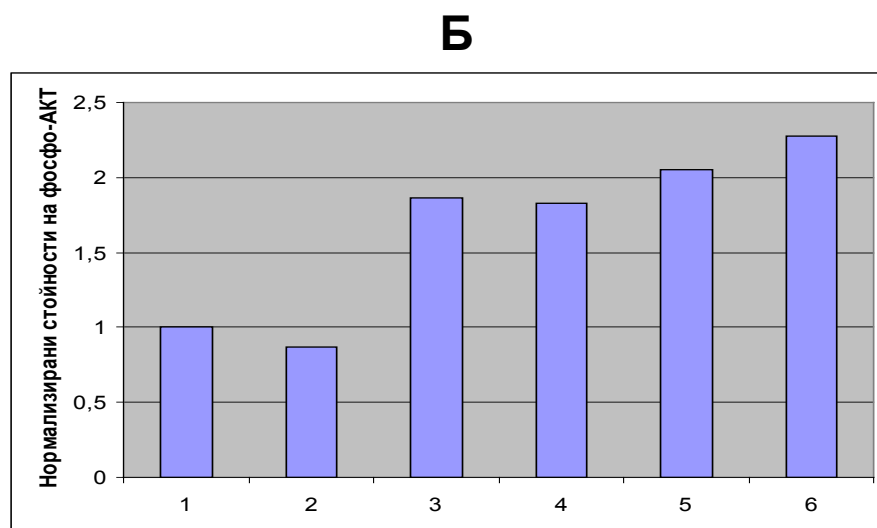
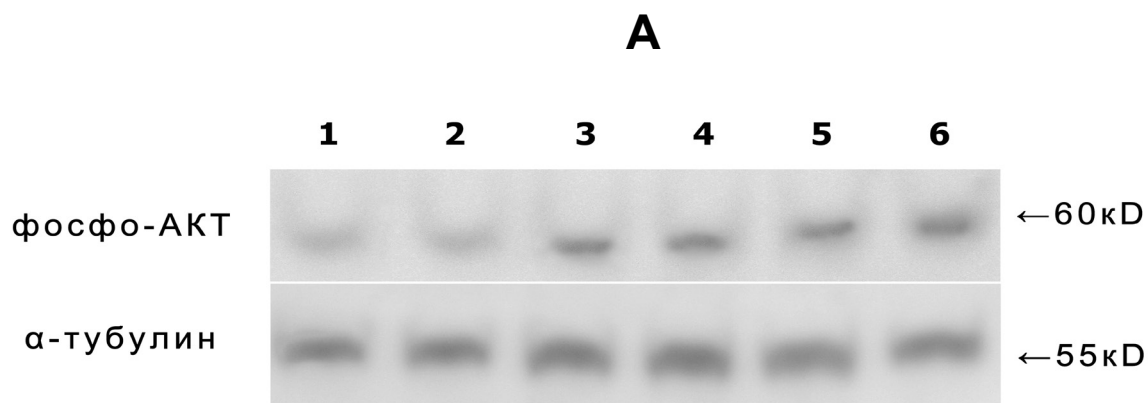
Приложена беше моделна система, при която чрез място-насочен мутагенезис и последваща временна трансфекция на клетъчната линия MCF10A бяха получени шест трансфекционни линии съдържащи различните варианти на *PIK3CA* гена:

- див тип *PIK3CA*
- *PIK3CA* с полиморфизма 1173 A>G
- *PIK3CA* с мутация в екзон 9
- *PIK3CA* с мутация в екзон 9 + 1173 A>G
- *PIK3CA* с мутация в екзон 20
- *PIK3CA* с мутация в екзон 20 + 1173 A>G

5.1. Анализ на фосфорилирането (активирането) на АКТ

За установяване наличието на потенциален ефект на полиморфизма 1173 A>G върху функционалната активност на *PIK3CA* протеина беше проведен Western blot анализ. Използвани бяха анти-фосфо-АКТ (Сер-473) антитела, които се свързват с АКТ протеина, само когато той е фосфорилиран. По този начин, беше отчетена активността на шестте описани по-горе варианти на *PIK3CA*. Като контрола за нормализация на беше използван непрекъснато експресиращият се ген α -тубулин (Фигура 8А). Проведена беше и денситометрична обработка на филмите с програмата *ImageQuant TL* (GE Healthcare), като нормализираните резултати от нея са представени на Фигура 8Б.

От фигурата ясно се вижда, че за разлика от онкогенните мутации в екзони 9 и 20 на *PIK3CA* (Фигура 8 – № 3–6), полиморфизмът 1173 A>G сам по себе си не повишава степента на фосфорилиране на протеина АКТ (Фигура 8 – № 2) – тя е същата като при дивия тип *PIK3CA* (Фигура 8 – № 1). Изследваният полиморфизъм не показва ефект и при комбинирането му с онкогенните мутации (Фигура 8 – № 3≈№ 4 и № 5≈№ 6).

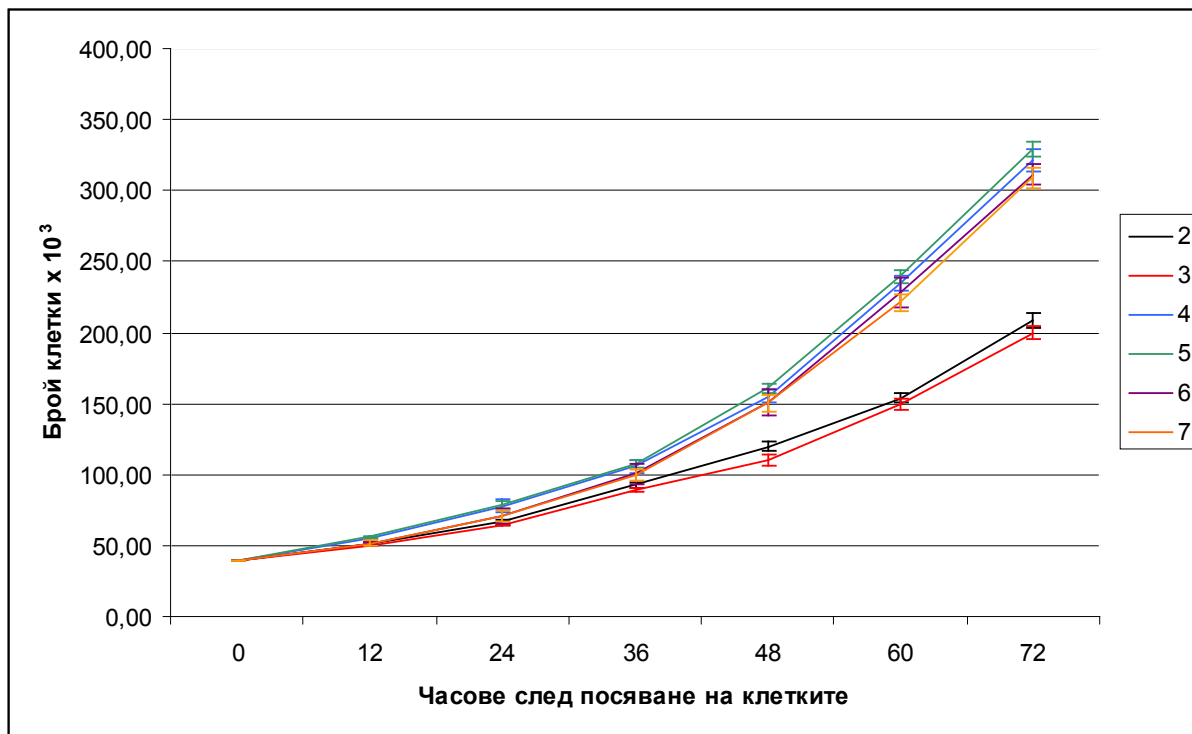


Фигура 8. Анализ на активирането на АКТ. На **А** са представени профилите на α-тубулина и фосфорилирания АКТ след хемилуминисцентно оцветяване, а на **Б** – денситометрично обработените данни. И на двете, с **1** е означена трансфекционната линия съдържаща див тип *PIK3CA*, с **2** – тази с полиморфизма 1173 A>G; **3** – с мутация в екзон 9; **4** – с мутация в екзон 9 + 1173 A>G; **5** – с мутация в екзон 20; **6** – с мутация в екзон 20 + 1173 A>G. Степента на фосфорилиране на АКТ при дивия тип *PIK3CA* (№1) е приета условно за единица.

5.2. Анализ на пролиферацията чрез растежни криви

Потенциалният ефект на полиморфизма 1173 A>G върху функционалната активност на *PIK3CA* протеина беше изследван и чрез анализ на въздействието му върху пролиферацията на клетките. За целта бяха използвани шестте трансфекционни линии MCF10A, съдържащи описаните по-горе варианти на *PIK3CA* гена. За определяне на скоростта на пролиферация бяха посетени еднакво количество клетки (4×10^4) от всяка линия и в продължение на три дни клетките бяха преброявани на всеки 12 часа. Анализът показва, че присъствието на полиморфизма 1173 A>G не оказва влияние върху степента на пролиферация на клетките. На 72-ия час от посяването им, броят на клетките съдържащи този SNP (Фигура 9 – № 3) беше приблизително равен

на този с див тип *PIK3CA* (Фигура 9 – № 2). И при четирите линии, съдържащи онкогенните мутации в екзони 9 и 20 (Фигура 9 – № 4,5,6,7), пролиферацията на клетките бе значително по-висока, като резултатът беше статистически достоверен ($P < 0.0001$).



Фигура 9. Растежни криви. Представена е пролиферацията на клетките от шестте изследвани комбинации на *PIK3CA* гена: **2** – див тип *PIK3CA* (контрола); **3** – *PIK3CA* с полиморфизма 1173 A>G; **4** – *PIK3CA* с мутация в екзон 9; **5** – *PIK3CA* с мутация в екзон 9 + 1173 A>G; **6** – *PIK3CA* с мутация в екзон 20; **7** – *PIK3CA* с мутация в екзон 20 + 1173 A>G. Показани са и стандартните отклонения (SD).

6. Резюме на резултатите

6.1. Мутационен анализ

- Генетични изменения в *TP53* бяха намерени при 20% от туморните проби (Таблица 2). Седем от тези изменения (7.4%) бяха мутации, променящи структурата на p53 протеина – четири смислени мутации, две мутации водещи до изместване рамката на четене (1 инсерция и 1 делеция) и последната мутация беше сплайсинг. Останалите 12 изменения бяха неутрални варианти – 2 тихи мутации, 3 полиморфизми в кодиращите райони и 7 интронни полиморфизми.
- В *BRCAl* гена беше установена само една интронна замяна – A>T в позиция 19479 на интрон 4 (Таблица 2).

- Анализът на *PIK3CA* показва, че 45 (31%) от изследваните 144 туморни проби носят мутация в този онкоген (Таблица 2). Установени бяха общо седем различни мутации, всички от които водеха до промяна в аминокиселинната последователност (Фигура 2). 39% от общия брой регистрирани мутации в *PIK3CA* бяха локализирани в екзон 9, а 61% – в екзон 20.

6.2. Връзка между мутационния статус на изследваните гени и клинично-патологичните и молекулярни характеристики на пациентите

- Резултатите показаха, че туморите с мутация в *TP53* са по-големи по размер и по-слабо диференцирани в сравнение с тези с див тип *TP53*, като тези зависимости бяха статистически достоверни (Таблица 3). Беше наблюдавана и тенденция за по-късна изява на *TP53* мутациите.
- Установено беше, че туморите с мутирал *PIK3CA* ген са предимно ПР⁺ (Таблица 4). Намерена беше и тенденция за по-висока честота на *PIK3CA* мутациите в умерено диференцирани тумори, както и в тумори съдържащи *ATM* мутация.

6.3. Връзка между мутационния статус на изследваните гени и общата преживяемост на пациентите

- Общата преживяемост в изследваната група от 145 болни беше 75.86%.
- Анализът показва, че пациентите, чиито тумори са с мутация в *TP53*, се характеризират с понижена ОП в сравнение с пациентите с див тип *TP53* тумори, като получената зависимост е статистически достоверна (Фигура 3). Тази зависимост беше още по-ясно изразена при пациентите над 50 годишна възраст (Фигура 4 – А), както и при тези с малки по размер тумори (Фигура 4 – Б).
- При болните с мутирали *PIK3CA* тумори беше наблюдавана точно противоположната тенденция – те показаха по-висока ОП ($P = 0.112$) (Фигура 5), в сравнение с пациентите с див тип *PIK3CA* тумори.
- Унивариантният анализ на Кокс показва, че болните, чиито тумори носят мутация в *TP53*, имат 2.31 пъти по-висок риск да починат от РМЖ отколкото пациентите чиито тумори са с див тип *TP53* (Таблица 5). В обратна посока беше действието на мутациите в *PIK3CA* – те имаха протективен ефект, макар и той да не бе статистически достоверен (Таблица 5).

- При мултивариантния модел на Кокс беше установено, че единствено по-големият размер на тумора представлява независим прогностичен фактор – той увеличава 4.43 пъти риска от смърт (Таблица 5).

6.4. Метилационен анализ на *BRCA1*

- Хиперметиране в промотора на *BRCA1* беше установено при 17.04% от пациентите.
- Открита беше една статистически достоверна зависимост, а именно, че туморите с хиперметиран *BRCA1* промотор, са по-често от лобуларен тип в сравнение с туморите с неметиран промотор (Таблица 6). Наблюдавани бяха и 2 интересни тенденции, въпреки че не бяха статистически достоверни – тези тумори са по-малки по размер и при тях отсъства мутация в *TP53* (Таблица 6).
- Изследването показва, че пациентите, чиито тумори са с хиперметиран *BRCA1* промотор, имат по-висока ОП от пациентите, чиито тумори са с нормално метиран *BRCA1* промотор, въпреки че резултатът не беше статистически достоверен (Фигура 6).
- Според унивариантния анализ на Кокс хиперметирането на *BRCA1* промотора притежава благоприятен, макар и не статистически достоверен ефект (Таблица 7).

6.5. Функционален анализ на полиморфизма в *PIK3CA* 1173 A>G

- Установено беше, че полиморфизмът 1173 A>G не повишава степента на фосфорилиране на таргетния му протеин АКТ (Фигура 8).
- Изследването показва, че присъствието на полиморфизма 1173 A>G не оказва влияние върху степента на пролиферация на клетките (Фигура 9).

V. ДИСКУСИЯ

Генетични изменения в туморно супресорния ген *TP53* са често срещани при повечето видове злокачествени заболявания при човека. При болни от рак на гърдата, соматичните мутации в този ген се срещат с висока честота, достигаща до 40% в зависимост от размера на тумора и стадия на заболяването (*Børresen-Dale, 2003*) и обикновено се свързват с по-агресивен канцерогенезис и по-лоша обща преживяемост (*Petitjean и съавт., 2007; Olivier и съавт., 2006; Langerød и съавт., 2007*). В настоящото изследване туморни проби от 95 пациенти със спорадичен РМЖ бяха анализирани за

наличие на соматични мутации в *TP53*. Покрити бяха екзони от 4-ти до 9-ти, обхващащи целия ДНК-свързващ домен (в който са установени повече от 90% от мутациите в *TP53*), по-голямата част от богатия на пролин домен, необходим за индукцията на апоптозата и част от С-крайния регулаторен домен. Резултатите показаха относително ниска честота на *TP53* мутациите в българската популация (Таблица 2). Спектърът на мутации в този ген варира значително при пациенти с РМЖ принадлежащи към различни в географско и етническо отношение популации. Подобни честоти са отчетени и от други автори (*Buzin и съавт., 2001; Elledge и съавт., 1993*).

Мутационният спектър на *TP53* беше хетерогенен – открити бяха мутации водещи до изместване рамката на четене (предизвикани както от делеция, така и от инсерция), смислени мутации, както и такива в местата за сплайсинг (Таблица 2). Освен това бяха установени и различни полиморфизми, разположени както в екзоните, така и в интроните на гена. Две от откритите в *TP53* мутации бяха нови, несъобщавани дотогава при нито един вид рак, докато други две бяха разположени във вече известни мутационни „горещи точки”. Интерес представлява фактът, че една от новооткритите мутации (делецията delGTTTCCG) съдържа участък GTTT (12247-12250), за който беше установено, че сам или заедно с други вариращи по размер фланкиращи последователности е делетирал в три отделни случая с РМЖ. Това ни дава основание да приемем, че GTTT (12247-12250) представлява мутабилен район при рака на гърдата. Прави впечатление и високата честота (7.4%) на интронния полиморфизъм 14766 T>C при българските пациенти с РМЖ. Същия полиморфен вариант беше открит по-рано при трима българи с Балканска ендемична нефропатия (БЕН) (*Krasteva и Georgieva, 2006*) и един с колоректален карцином (*Georgieva и съавт., 2008*).

Въпреки че някои изследвания определят мутационния статус на *TP53* като силен и независим прогностичен фактор при РМЖ (*Langerød и съавт., 2007*), други не намират подобна зависимост (*Bianchi и съавт., 1997*). Анализирайки клиничко-патологичните характеристики на пациентите от изследваната група, ние можем да твърдим, че мутациите в *TP53* водят до по-агресивно развитие на рака на гърдата. Това заключение произлиза от факта, че туморите съдържащи такива мутации са по-големи и едновременно с това по-слабо диференцирани от туморите с див тип *TP53* (Таблица 3). Резултатите, показващи че туморите с *TP53* мутация са предимно в стадий G3, предполагат, че това мутационно събитие играе основна роля в процеса на диференциацията на тези тумори.

Общата преживяемост е индикатор за степента на лечимост на дадено заболяване и дава насоки за неговата прогноза. Обикновено оценката на ОП се извършва след 5-годишен период от оперативното лечение, като се счита, че тези от пациентите, които са преживели този период са излекувани. В нашето изследване беше установено, че мутациите в *TP53* намаляват ОП на жените болни от РМЖ (Фигура 3). Това беше потвърдено чрез унивариантния регресионен анализ, който показва, че болните чиито тумори носят мутация в *TP53* имат 2.31 пъти по-висок риск да починат от РМЖ, в сравнение с пациентите с див тип *TP53* тумори (Таблица 5).

Тази негативна зависимост беше още по-ясно изразена в групата от пациенти с *TP53* мутирани тумори и едновременно над 50 годишна възраст (Фигура 4А). Това е индикация, че негативният ефект на *TP53* мутациите върху ОП е по-силен при по-възрастните пациенти. Анализът показва също, че този негативен ефект се проявява и в подгрупата пациенти с ER-отрицателни тумори (Фигура 4В). Клиничното значение на показателя ER е свързано с факта, че неговото присъствие е знак за хормонално чувствителни тумори. Около 60% от пациентите с ER-положителни тумори се повлияват благоприятно от хормонална терапия. При отсъствие на такава терапия обаче е известно, че ER⁺ статусът е лош прогностичен маркер. Така, можем да спекулираме, че отрицателният ефект на *TP53* мутациите върху ОП е по-силен при ER⁻ пациентите, вероятно защото при тези с ER⁺, този ефект е маскиран вследствие на хормоналната терапия.

Добре известно е, че наследственият рак на гърдата често се предизвиква от герминативни мутации в *BRCA1* (Ford и съавт., 1998). В спорадичната форма на болестта обаче, мутациите в този ген са изключително редки. Нашите резултати от мутационния анализ също показаха много ниска честота на генетични изменения – само един интронен полиморфизъм (19479 A > T) в групата от 145 болни (Таблица 2), въпреки че анализът обхващаше по-голямата и мутабилна част от гена. Тази липса на мутации в *BRCA1* предполагаше, че този ген може да бъде инактивиран и по други, епигенетични механизми. В подкрепа на това предположение бяха и данните от няколко изследвания, които демонстрираха, че активността на *BRCA1* се потиска чрез хиперметиране в промоторния му участък (Esteller и съавт., 2000; Wei и съавт., 2005). Именно на базата на тези наблюдения, ние проведохме метилационно-специфичния анализ на *BRCA1* промотора, като оценихме и влиянието на неговото хиперметиране върху клиничните показатели и преживяемостта на пациентите.

В опит да се установи дали промотора на *BRCA1* е хиперметиран при РМЖ, както и дали съществува връзка между това хиперметиране и фенотипната проява на болестта са провеждани редица изследвания. Данните от тези изследвания обаче са твърде разнопосочни и дори противоречиви. Така например, отчетената честота на хиперметиране на промотора на *BRCA1* варира в доста голям диапазон – от 9 до 59% (*Esteller и съавт., 2000; Matros и съавт., 2005; Wei и съавт., 2005; Birgisdottir и съавт., 2006; Li и съавт., 2006-б; Jing и съавт., 2007; Bagadi и съавт., 2008; Chen и съавт., 2009; Karray-Chouayekh и съавт., 2009; Xu и съавт., 2009*). Установената в нашите изследвания честота на хиперметиране на *BRCA1* промотора от 17.04% е първата публикувана за български пациенти болни от РМЖ (*Krasteva и съавт., 2012*) и е малко под средната в световен мащаб. Получените от нас резултати потвърждават тезата, че *BRCA1* генът е ангажиран и в етиологията на спорадичния РМЖ, но при тази форма на болестта той се инактивира основно чрез епигенетични механизми.

Въпреки че туморите с хиперметиранни *BRCA1* промотори са с доста разнородни фенотипни изяви, все пак могат да бъдат очертани някои тенденции. Така например, болшинството от изследванията показват, че *BRCA1* метилирането се среща по-често в тумори, при които липсва експресия на ЕР и ПР (*Wei и съавт., 2005; Birgisdottir и съавт., 2006; Mirza и съавт., 2007; Bagadi и съавт., 2008*), както и при пациенти под 50-годишна възраст (*Wei и съавт., 2005; Birgisdottir и съавт., 2006; Xu и съавт., 2009*). Установено е, че тези характеристики съответстват на туморите с герминативна мутация в *BRCA1*, което води до предположението, че спорадичните тумори с хиперметиранни *BRCA1* промотори, по фенотипна изява са идентични на наследствените *BRCA1* тумори (*Turner и съавт., 2004*). В нашето изследване не беше открита връзка между статуса на метилиране на *BRCA1* и експресията на хормоналните рецептори (Таблица 6), като това не е изключение – подобни резултати бяха представени и от други автори (*Xu и съавт., 2009*). Според *Matros и съавт. (2005)*, връзката е дори противоположна – по-висока честота на *BRCA1* хиперметиране при туморите със силна експресия на ЕР. Подобно на други публикации (*Wei и съавт., 2005; Birgisdottir и съавт., 2006; Xu и съавт., 2009*), ние установихме, че аномалното метилиране на *BRCA1* е по-често срещано в тумори на по-млади жени (под 50-годишна възраст) (Таблица 6).

Пациентите, чиито тумори бяха с хиперметиранни *BRCA1* промотори, показаха по-благоприятни клинични характеристики. Така например беше установено,

че метилирането корелира с лобуларния тип тумори (Таблица 6), за който се счита, че е хистологичният тип с по-добра прогноза и по-висока преживяемост на болните (*Dian и съавт., 2009*). Освен това хиперметиране беше наблюдавано предимно в по-малките тумори, а е добре известно, че големите по размер тумори са едни от най-категоричните индикатори за лоша прогноза. Трета благоприятна характеристика на метилираните тумори беше, че в нито един от тях не присъстваше мутация в гена *TP53* (Таблица 6). Доказано е, че мутациите в този ген значително повишават агресивността на канцерогенезата и понижават преживяемостта на пациентите с РМЖ (*Bozhanov и съавт., 2010; Petitjean и съавт., 2007; Olivier и съавт., 2006; Langerød и съавт., 2007*). Липсата на *TP53* мутации в туморите с хиперметираните *BRCA1* промотори може да бъде обяснена с предположението, че понеже тези два гена участват в един и същ туморно супресорен път, за инактивирането на този път е достатъчно увреждането само на единия от тях.

Ние установихме и лека тенденция за по-висока преживяемост на пациентите, чиито тумори са с хиперметираните *BRCA1* промотори, въпреки че резултатът не беше статистически достоверен (Фигура 6). Подобна връзка е показана и от *Li и съавт. (2006-б)*, но болшинството от изследванията демонстрират обратната асоциация, а именно, че пациентите носещи тумори с хиперметираните *BRCA1* промотори имат понижена преживяемост (*Xu и съавт., 2009; Karray-Chouayekh и съавт., 2009; Chen и съавт., 2009*). Отчетената от нас, чрез *Каплан-Майер* метода, по-висока преживяемост беше подкрепена и от протективния ефект на *BRCA1* метилирането демонстриран от унивариантния пропорционален модел на Кокс (Таблица 7). Тези, донякъде неочаквани резултати, могат да бъдат обяснени, с по-благоприятните клиничко-патологични характеристики на туморите с хиперметираните *BRCA1* промотори обсъдени по-горе.

Известно е, че като участник в „PI3K-АКТ” сигналния път, *PIK3CA* генът играе важна роля в канцерогенезата (*Bader и съавт., 2006; Vogt и съавт., 2007; Samuels и съавт., 2004*). Неотдавна беше съобщено, че активиращи мутации в „горещи точки” (в екзони 9 и 20) на този ген предизвикват повишаване на фосфорилирането на протеина АКТ, което от своя страна води до трансформация на нормални клетки от гръден епител в туморни клетки (*Ikenoue и съавт., 2005; Samuels и съавт., 2005*). В изследваната от нас група от 144 български пациенти болни от РМЖ, ние отчетохме честотата на мутациите в *PIK3CA* от 31% (Таблица 2), която е подобна на други изучавани популации (*Campbell и съавт., 2004; Saal и съавт., 2005; Maruyama и*

съавт., 2007; *Barbareschi и съавт., 2007*). Тази висока честота на мутации в *PIK3CA* е ясно потвърждение за участието на „PI3K-АКТ” сигналния път в развитието на рака на гърдата. Противоречиви са данните относно разпределението на мутациите в горещите точки на *PIK3CA*. Някои автори откриват по-голям брой мутации в 9-ти екзон на гена (*Campbell и съавт., 2004; Barbareschi и съавт., 2007; Liedtke и съавт., 2008*). За разлика от тях, ние установихме по-висока честота на мутации в екзон 20 на *PIK3CA*, като подобни резултати са регистрирани от *Saal и съавт. (2005)* и от *Li и съавт. (2006)*.

Съпоставени бяха множество клинично-патологични и молекулярни характеристики на пациентите с мутационния статус на *PIK3CA* гена. От всички тях само състоянието на прогестероновия рецептор показва статистически достоверни различия, а именно – туморите носещи мутация в *PIK3CA* бяха предимно ПР⁺ (Таблица 4). Литературните данни, засягащи връзката между мутациите в *PIK3CA* и статуса на стероидните рецептори, са доста разнопосочни. Някои изследвания показват силна корелация с единия (*Mariyama и съавт., 2007*) или и с двата рецептора (*Saal и съавт., 2005* и от *Li и съавт., 2006*), докато други не отчитат подобна зависимост. Като обяснение за връзката между стероидните рецептори и *PIK3CA* може да бъде използван фактът, че те участват в един и същ сигнален път на клетката. В подкрепа на това е и една публикация, демонстрираща директна функционална връзка между таргетната за *PIK3CA* киназа АКТ и естрогеновия рецептор (*Yamashita и съавт., 2005*). Установихме също, че туморите с мутация в *PIK3CA* са основно в стадий G2 и няма нито един такъв в стадий G1 (Таблица 4). Вземайки предвид тази тенденция, можем да предположим, че мутациите в *PIK3CA* възникват на по-късен етап в процеса на канцерогенеза.

Що се отнася до влиянието на мутациите в *PIK3CA* върху изхода от заболяването, резултатите в литературата са доста разнопосочни. Някои публикации (*Mariyama и съавт., 2007; Kalinsky и съавт., 2009; Dumont и съавт., 2012; Cizkova и съавт., 2012*) сочат, че пациентите с тумори, носещи такава мутация, имат по-добра прогноза от тези с див тип *PIK3CA*. Възможни обяснения за тези неочаквани резултати са, че например мутациите в *PIK3CA* пречат на метастазирането или пък че помагат за по-ранното диагностициране на туморите, модифицирайки цитоскелета на туморните клетки (*Dumont и съавт., 2012*). Според други автори (*Li и съавт., 2006*), зависимостта е напълно обратна – мутациите в *PIK3CA* са индикация за по-ниска преживяемост. Резултатите от нашия анализ показваха, че съществува тенденция за по-висока преживяемост сред пациентите, чиито тумори съдържат *PIK3CA* мутация (Фигура 5).

Потенциален протективен ефект на тези мутации беше отчетен както при уни-, така и при мултивариантния анализ. Този благоприятен ефект беше още по-силно изразен в подгрупата с ER⁺ тумори. Това може да бъде обяснено с факта, че туморните клетки с мутация в *PIK3CA* притежават повишена експресия на ER (*Whyte u Holbeck, 2006*). Добре известно е, пациентите с ER⁺ тумори се поддават на лечение с тамоксифен и така имат по-висок шанс за оцеляване. Основавайки се на казаното дотук, можем да предположим, че благоприятния ефект на *PIK3CA* мутациите върху преживяемостта на пациентите се дължи не на самите мутации, а по-скоро на ползотворното действие на тамоксифеновата терапия при болните с ER⁺ статус.

Единственият идентифициран несинонимен SNP в прото-онкогена *PIK3CA* е 1173 A>G. Той води до аминокиселинна замяна на изолевцин с метионин в позиция 391 (391 I>M) на *PIK3CA* протеина. Резултатите от предварително изследване, проведено в нашата лаборатория, показаха, че честотата на полиморфизма 1173 A>G при болни от фамилен РМЖ е около два пъти по-висока от тази в здрави контроли. На базата на тези резултати, целта на анализа ни беше да установим дали този SNP има свойства, подобни на онкогенните мутации в 9-ти и 20-ти екзон, а именно дали води до повишаване активността на *PIK3CA* протеина. Известно е, че мутантният *PIK3CA* е много по-активен от нормалния и предизвиква засилено фосфорилиране (и съответно активиране) на протеин киназата АКТ. Посредством различни механизми активираният АКТ стимулира клетъчната пролиферация и потиска апоптозата, което от своя страна индуцира туморогенезата.

На базата на казаното дотук, беше изследвано влиянието на полиморфизма 1173 A>G върху функцията на *PIK3CA* протеина. Проведени бяха два експеримента за оценка на ефекта на този SNP – първо върху фосфорилиращата активност на *PIK3CA* (Фигура 8) и второ върху скоростта на клетъчната пролиферация (Фигура 9). Резултатите обаче не потвърдиха първоначалната хипотеза за функционална значимост на 1173 A>G.

Така, от направените анализи можем да обобщим, че полиморфизмът 1173 A>G не влияе върху функцията на *PIK3CA* протеина.

VI. ИЗВОДИ И ПРИНОСИ

ИЗВОДИ:

Анализирайки получените резултати могат да бъдат направени следните изводи:

1. Мутациите в *TP53* водят до по-агресивно развитие на рака на гърдата, тъй като туморите носещи такива мутации са по-големи по размер и едновременно с това по-слабо диференцирани.

2. Мутациите в *TP53* намаляват преживяемостта на болните. Рискът от смърт за пациенти, чиито тумори носят мутация в *TP53* е 2.31 пъти по-висок от този при пациенти, чиито тумори са с див тип *TP53*.

3. *BRCAl* участва в канцерогенезата на РМЖ, но при спорадичната форма на болестта, той се инактивира основно чрез епигенетични механизми, а именно, чрез хиперметиране на промоторния участък от гена.

4. Пациентите, чиито тумори са с хиперметиран *BRCAl* промотори, притежават благоприятен клиничен статус, тъй като техните тумори са по-малки, не съдържат мутация в *TP53* и са от лобуларен тип.

5. От изследваните гени *PIK3CA* демонстрира най-висока честотата на мутациите – 31%. Доказано беше, че съществува тенденция за по-висока преживяемост на пациентите, чиито тумори съдържат *PIK3CA* мутация.

6. Единственият несинонимен полиморфизъм (1173 A>G) в прото-онкогена *PIK3CA* не влияе върху функцията на *PIK3CA* протеина.

ПРИНОСИ:

1. Открити бяха две нови мутации в туморно супресорния ген *TP53* в проби от солидни тумори на български пациенти с РМЖ.

2. Статистически беше доказано, че при пациенти от български етнос болни от спорадичен РМЖ, чийто тумори са носители на мутирал *TP53* ген, заболяването протича по-агресивно и преживяемостта е по-ниска. Тези данни могат да допринесат за по-прецизното определяне прогнозата на заболяването.

3. Установено беше, че при български пациенти със спорадичен РМЖ хиперметирането на *BRCA1* промоторите в туморите им е индикатор за по-благоприятна клинична картина.

4. За първи път беше установена мутационната честота на *PIK3CA*, при български пациенти със спорадичен РМЖ. Изследването допринася за потенциалното приложение на този прото-онкоген като клиничен и прогностичен показател на заболяването.

СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ

1. Кръстева М (2006). Сравнителен анализ на мутациите в p53 и експресията на HER2 при пациенти с балканска ендемична нефропатия и рак на млечната жлеза. Докторска дисертация.
2. Bader AG, Kang S and Vogt PK (2006). Cancer-specific mutations in PIK3CA are oncogenic in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 1475–1479.
3. Bagadi SA, Prasad CP, Kaur J et al. (2008). Clinical significance of promoter hypermethylation of RASSF1A, RARbeta2, BRCA1 and HOXA5 in breast cancers of Indian patients. *Life Sci* 82(25-26), 1288–1292.
4. Barbareschi M, Buttitta F, Felicioni L et al. (2007). Different prognostic roles of mutations in the helical and kinase domains of the PIK3CA gene in breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 13, 6064–6069.
5. Bianchi S, Calzolari A, Vezzosi V et al. (1997). Lack of prognostic value of p53 protein expression in node-negative breast cancer. *Tumori* 83(3), 669–672.
6. Birgisdottir V, Stefansson OA, Bodvarsdottir SK et al. (2006). Epigenetic silencing and deletion of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. *Breast Cancer Res* 8(4), R38.
7. Børresen-Dale AL (2003). TP53 and breast cancer. *Hum Mutat* 21, 292–300.
8. Bozhanov SS, Angelova SG, Krasteva ME et al. (2010). Alterations in p53, BRCA1, ATM, PIK3CA, and HER2 genes and their effect in modifying clinicopathological characteristics and overall survival of Bulgarian patients with breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 136, 1657–1669.
9. Buzan CH, Tang SH, Cunningham JM et al. (2001). Low frequency of p53 gene mutations in breast cancers of Japanese-American women. *Nutr Cancer* 39, 72–77.
10. Campbell IG, Russell SE, Choong DY et al. (2004). Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. *Cancer Res* 64(21), 7678–7681.
11. Chen Y, Zhou J, Xu Y et al. (2009). BRCA1 promoter methylation associated with poor survival in Chinese patients with sporadic breast cancer. *Cancer Sci* 100(9), 1663–1667.
12. Cizkova M, Susini A, Vacher S et al. (2012). PIK3CA mutation impact on survival in breast cancer patients and in ERalpha, PR and ERBB2-based subgroups. *Breast Cancer Res* 14, R28.
13. Deng G, Chen LC, Schott DR et al. (1994). Loss of heterozygosity and p53 gene mutations in breast cancer. *Cancer Res* 54, 499–505.
14. Dian D, Herold H, Mylonas I et al. (2009). Survival analysis between patients with invasive ductal and invasive lobular breast cancer. *Arch Gynecol Obstet* 279(1), 23–28.
15. Dumont AG, Dumont SN, Trent JC (2012). The favorable impact of PIK3CA mutations on survival: an analysis of 2587 patients with breast cancer. *Chin J Cancer* 31(7), 327–334.
16. Elledge RM, Fuqua SAW, Clark GM et al. (1993). Prognostic significance of p53 gene alterations in node negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 26, 225–235.
17. Esteller M, Silva JM, Dominguez G et al. (2000). Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst* 92(7), 564–569.
18. Ford D, Easton DF, Stratton M et al. (1998). Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet* 62, 676–689.
19. Friedman LS, Ostermeyer EA, Szabo CI et al. (1994). Confirmation of BRCA1 by analysis of germline mutations linked to breast and ovarian cancer in ten families. *Nat Genet* 8, 399–404.
20. Georgieva M, Krasteva M, Angelova E et al. (2008). Analysis of the K-ras/B-raf/Erk signal cascade, p53 and CMAP as markers for tumor progression in colorectal cancer patients. *Oncology Report* 20(1), 3–11.

21. Ikenoue T, Kanai F, Hikiba Y et al. (2005). Functional analysis of PIK3CA gene mutations in human colorectal cancer. *Cancer Res* 65, 4562–4567.
22. Jing F, Zhang J, Tao J et al. (2007). Hypermethylation of tumor suppressor genes BRCA1, p16 and 14-3-3sigma in serum of sporadic breast cancer patients. *Onkologie* 30(1-2), 14–19.
23. Kalinsky K, Jacks LM, Heguy A et al. (2009). PIK3CA mutation associates with improved outcome in breast cancer. *Clin Cancer Res* 15, 5049–5059.
24. Karray-Chouayekh S, Trifa F, Khabir A et al. (2009). Clinical significance of epigenetic inactivation of hMLH1 and BRCA1 in Tunisian patients with invasive breast carcinoma. *J Biomed Biotechnol* 2009:369129.
25. Krasteva ME and Georgieva EI (2006). Germline p53 single-base changes associated with Balkan endemic nephropathy. *Biochem Biophys Res Commun* 342, 562–567.
26. Krasteva ME, Bozhanov SS, Antov GG et al. (2012). Breast cancer patients with hypermethylation in the promoter of BRCA1 gene exhibit favorable clinical status. *Neoplasma* 59, 85–91.
27. Langerød A, Zhao H, Borgan Ø et al. (2007). TP53 mutation status and gene expression profiles are powerful prognostic markers of breast cancer. *Breast Cancer Res* 9(3), R30.
28. Li SY, Rong M, Grieru F and Iacopetta B (2006). PIK3CA mutations in breast cancer are associated with poor outcome. *Breast Cancer Res Treat* 96, 91–95.
29. Li S, Rong M, Iacopetta B (2006-6). DNA hypermethylation in breast cancer and its association with clinicopathological features. *Cancer Lett* 237(2), 272–280.
30. Liedtke C, Cardone L, Tordai A et al. (2008). PIK3CA-activating mutations and chemotherapy sensitivity in stage II–III breast cancer. *Breast Cancer Res* 10, R27.
31. Maruyama N, Miyoshi Y, Taguchi T et al. (2007). Clinicopathologic analysis of breast cancers with PIK3CA mutations in Japanese women. *Clin Cancer Res* 13, 408–414.
32. Matros E, Wang ZC, Lodeiro G et al. (2005). BRCA1 promoter methylation in sporadic breast tumors: relationship to gene expression profiles. *Breast Cancer Res Treat* 91(2), 179–186.
33. Mirza S, Sharma G, Prasad CP et al. (2007). Promoter hypermethylation of TMS1, BRCA1, ERalpha and PRB in serum and tumor DNA of invasive ductal breast carcinoma patients. *Life Sci* 81, 280–287.
34. Olivier M, Langerød A, Carrieri P et al. (2006). The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. *Clin Cancer Res* 12, 1157–1167.
35. Petitjean A, Achatz MI, Børresen-Dale AL et al. (2007). TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene* 26, 2157–2165.
36. Saal LH, Holm K, Maurer M et al. (2005). PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer Res* 65, 2554–2559.
37. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A et al. (2004). High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* 304, 554.
38. Samuels Y, Diaz LA Jr, Schmidt-Kittler O et al. (2005). Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. *Cancer Cell* 7, 561–573.
39. Turner N, Tutt A, Ashworth A (2004). Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancers. *Nat Rev Cancer* 4(10), 814–819.
40. Vogt PK, Kang S, Elsliger MA, Gymnopoulos M (2007). Cancer-specific mutations in phosphatidylinositol 3-kinase. *Trends Biochem Sci* 32, 342–349.
41. Wei M, Grushko TA, Dignam J et al. (2005). BRCA1 promoter methylation in sporadic breast cancer is associated with reduced BRCA1 copy number and chromosome 17 aneusomy. *Cancer Res* 65(23), 10692–10699.
42. Whyte DB and Holbeck SL (2006). Correlation of PIK3CA mutations with gene expression and drug sensitivity in NCI-60 cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 340, 469–475.
43. Xu X, Gammon MD, Zhang Y et al. (2009). BRCA1 promoter methylation is associated with increased mortality among women with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 14, 397–404.
44. Yamashita H, Nishio M, Kobayashi S et al. (2005). Phosphorylation of estrogen receptor a serine167 is predictive of response to endocrine therapy and increases post relapse survival in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res* 7, 753–764.

СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

Bozhanov SS, Krasteva ME, Angelova SG, Bozhimirov SD and Georgieva EI (2007). PCR-SSCP pattern alone is highly predictive of a specific mutation within a DNA sequence. *Comptes Rendus De L'academie Bulgare Des Sciences* 60 (12), 1323–1328. I. F. – 0,211.

Bozhanov SS, Angelova SG, Krasteva ME, Markov TL, Christova SL, Gavrilov IG and Georgieva EI (2010). Alterations in p53, BRCA1, ATM, PIK3CA and HER2 genes and their effect in modifying clinicopathological characteristics and overall survival of Bulgarian patients with breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 136, 1657–1669. I. F. – 2,914.

Krasteva ME, **Bozhanov SS**, Antov GG, Gospodinova ZI, Angelova SG and Georgieva EI (2012). Breast cancer patients with hypermethylation in the promoter of BRCA1 gene exhibit favorable clinical status. *Neoplasma* 59 (1), 85–91. I. F. – 1,574.

СПИСЪК НА УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

Две устни съобщения и осем постера:

1. Angelova S, **Bozhanov S**, Gavrilov I, Nacheva M and Georgieva E (2003). Clinical-pathological research of the influence of mutations in tumor suppressor gene p53. *Journal of International Scientific Research Publications*, Vol. 4, Book 1, TECHNOMAT & INFOTEL, 9-11 September, Slanchev Bryag, Burgas, p. 162-171. Oral presentation.
2. **Bozhanov S**, Angelova S, Gavrilov I, Nacheva M and Georgieva E (2003). Studies on BRCA1 mutations in Bulgarian breast cancer patients with familial predisposition. X Scientific session, 20-21 November, Sofia, p.126 (Book of Abstracts). Poster presentation.
3. Krasteva M, Nikolov I, Angelova S, **Bozhanov S**, Markov T, Hristova S, Nacheva M, Gavrilov I and Georgieva E (2004). Correlation between p53 mutations and HER2 overexpression and their clinical significance in Breast Cancer. National Oncology Conference “National standards for cancer treatment”, 20-21 November, Sofia, p.18 (Book of Abstracts). Poster presentation.
4. Angelova S, **Bozhanov S**, Markov T, Krasteva M, Nikolov I, Nacheva M, Gavrilov I and Georgieva E (2004). Mutations in tumor suppressor genes ATM, BRCA1 and p53 as molecular genetic markers for Breast Cancer. National Oncology Conference “National standards for cancer treatment”, 19-21 November, Sofia, p.17 (Book of Abstracts). Poster presentation.
5. Nikolov I, Krasteva M, Angelova S, **Bozhanov S**, Markov T, Hristova S, Nacheva M, Gavrilov I and Georgieva E (2005). Molecular genetic methods for analysis of tumor suppressor genes and proto-oncogenes in breast cancer. Scientific session – 60 years Medical University Plovdiv, 10-11 November, p. 170. Poster presentation.
6. **Bozhanov S** and Georgieva E (2008). PIK3CA mutations in Bulgarian breast cancer patients. Scientific session on molecular biology in memoriam of Acad. Rumen Tsanev, Sofia, pp. 53 (Book of Abstracts). Poster presentation.
7. Antov G, Krasteva M, Gospodinova Z, **Bozhanov S**, Angelova S, Markov T, Nikolov I and Georgieva E (2008). Analysis of p53, BRCA1, ATM and VHL gene methylation in Bulgarian breast cancer patients. Scientific session on molecular biology in memoriam of Acad. Rumen Tsanev, Sofia, pp. 29 (Book of Abstracts). Oral presentation.
8. **Bozhanov S**, Markov T and Georgieva E (2009). Correlation between the mutational status of PIK3CA oncogene and clinicopathological characteristics in breast cancer patients. National scientific conference on genetics in memoriam of Acad. Doncho Kostoff, 28-30 October, Sofia. Poster presentation.

9. Krasteva M, **Bozhanov S**, Markov T, Antov G and Georgieva E (2009). Genetic and epigenetic mechanisms of BRCA1 inactivation in breast cancer. National scientific conference on genetics in memoriam of Acad. Doncho Kostoff, 28-30 October, Sofia. Poster presentation.

10. Dodova R, **Bozhanov S**, Nikolov I, Garanina Z, Mitkova A, Kaneva R, Mitev V and Georgieva E (2012). PIK3CA mutation screening in Bulgarian breast cancer patients. International Conference on Bioinformatics and Computational Biology – BIOCOMP BG, September 20-21, Varna. Poster presentation.

СПИСЪК НА ЦИТИРАНИЯТА В МЕЖДУНАРОДНИ НАУЧНИ ИЗДАНИЯ

На статия – **Bozhanov SS**, Angelova SG, Krasteva ME, Markov TL, Christova SL, Gavrillov IG and Georgieva EI (2010). **Alterations in p53, BRCA1, ATM, PIK3CA and HER2 genes and their effect in modifying clinicopathological characteristics and overall survival of Bulgarian patients with breast cancer.** *J Cancer Res Clin Oncol* 136, 1657–1669:

1. Banerjee D (2010). Reinventing diagnostics for personalized therapy in oncology. *Cancers* 2, 1066–1091.

2. Castaneda CA, Cortes-Funes H, Gomez HL, Ciruelos EM (2010). The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev* 29(4), 751–759. I.F. 10,6.

3. Maciel ME (2011). Análise da expressão dos genes BRCA1 e FHIT em carcinomas mamários. Universidade Federal do Paraná (Dissertation).

4. Zhang M, Jin M, Yu Y, Zhang S, Wu Y, Liu H, Liu H, Chen B, Li Q, Ma X and Chen K (2011). Associations of miRNA polymorphisms and female physiological characteristics with breast cancer risk in Chinese population. *Eur J Cancer Care* 21, 274–280. I.F. 1,2.

5. Troxell ML (2012). PIK3CA/AKT1 mutations in breast carcinoma: a comprehensive review of experimental and clinical studies. *J Clinic Experiment Pathol* S1-002.

6. Khani H, Hosseinpourefeizi M, Pouladi N, Chaparzadeh N, Montazeri V, Azarfam P (2012). Detection of p53 gene exons 5 and 6 mutations among East Azerbaijani women with breast cancer. *Journal of Zanjan University of Medical Sciences and Health Services* 20(78), 36–46.

7. Tikoo A, Roh V, Montgomery KG, Ivetac I, Waring P, Pelzer R, Hare L, Shackleton M, Humbert P, Phillips WA (2012). Physiological levels of Pik3ca^{h1047r} mutation in the mouse mammary gland results in ductal hyperplasia and formation of ER α -positive tumors. *PLoS One* 7(5), e36924. I.F. 4,1.

8. Troxell ML, Brunner AL, Neff T, Warrick A, Beadling C, Montgomery K, Zhu S, Corless CL, West RB (2012). Phosphatidylinositol-3-kinase pathway mutations are common in breast columnar cell lesions. *Mod Pathol* 25, 930–937. I.F. 5,3.

9. Bhattacharya N, Mukherjee N, Singh RK, Sinha S, Alam N, Roy A, Roychoudhury S, Panda CK (2012). Frequent alterations of MCPH1 and ATM are associated with primary breast carcinoma. *Ann Surg Oncol* DOI 10.1245/s10434-012-2715-6. I.F. 4,2.

10. Christgen M, Noskowicz M, Schipper E, Christgen H, Heil C, Krech T, Länger F, Kreipe H, Lehmann U (2013). Oncogenic PIK3CA mutations in lobular breast cancer progression. *Genes Chromosomes Cancer* 52(1), 69–80. I.F. 3,3.

11. Rosa FE, Santos RM, Rogatto SR, Domingues MA (2013). Chromogenic in situ hybridization compared with other approaches to evaluate HER2/neu status in breast carcinomas. *Braz J Med Biol Res* 46(3), 207–216. I.F. 1,1

На статия – Krasteva ME, **Bozhanov SS**, Antov GG, Gospodinova ZI, Angelova SG and Georgieva EI (2012). **Breast cancer patients with hypermethylation in the promoter of BRCA1 gene exhibit favorable clinical status**. *Neoplasma* 59 (1), 85-91:

1. Hsu NC, Huang Y-F, Yokoyama KK, Chu P-Y, Chen F-M, Hou M-F (2013). Methylation of BRCA1 promoter region is associated with unfavorable prognosis in women with early-stage breast cancer. *PLoS One* 8(2), e56256. I.F. 4,1.

2. Jacot W, Thezenas S, Senal R, Viglianti C, Laberrenne AC, Lopez-Crapez E, Bibeau F, Bleuse JP, Romieu G and Lamy PJ (2013). BRCA1 promoter hypermethylation, 53BP1 protein expression and PARP-1 activity as biomarkers of DNA repair deficit in breast cancer. *BMC Cancer* 13, 523. I.F. 3,3.

БЛАГОДАРНОСТИ

Благодаря на научния ми ръководител проф. д-р Елена Георгиева за безценните идеи и съвети, които ми е давала през всички етапи от изработването и написването на дисертацията ми. Благодарен съм и на колегите ми от секция "Молекулярна генетика" с ръководител проф. д-р Любомир Стоилов, както и на доц. д-р Иван Гаврилов и неговия екип от СБАЛЮ, за оказаната помощ.

Финансовите средства за изследването са осигурени по проекти Г-1-04/04, ДО-02-310/08, както и от програмата EU Marie Curie Fellowship и от проф. Хилтруд Браух от Института по Клинична Фармакология, Щутгарт.