

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
“ИНСТИТУТ ПО ФИЗИОЛОГИЯ НА РАСТЕНИЯТА И ГЕНЕТИКА”
ЛАБОРАТОРИЯ “ГЕНОМНА ДИНАМИКА И СТАБИЛНОСТ”

ГЕОРГИ ГЕОРГИЕВ АНТОВ

**Мутационен скрининг на гените *BRCA1*, *BRCA2* и *STK11* при
пациенти от българска популация с рак на млечната жлеза**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за присъждане на образователна и научна степен “Доктор”

Професионално направление “Биологически науки“, Шифър: 4.3.

Научна специалност: “Генетика“

Научни консултанти:

Чл. кор. Проф. Д-р Драга Тончева, дм, дбн;

Проф. д-р Любомир Стоилов

Рецензенти:

Проф. дбн Севдалин Георгиев

Доц. д-р Леонид Пенков



СОФИЯ, 2017



Дисертационният труд е с обем от 233 страници и съдържа 67 фигури и 36 таблици. Списъкът на цитираната литература обхваща 218 литературни източника и 63 уеб-базирани източници и софтуерни приложения.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на заседание на разширен Научен съвет на Лаборатория „Геномна динамика и стабилност“ към Институт по физиология на растенията и генетика - БАН, проведено на 04.10.2017 г.

Изследванията по дисертационния труд са кофинансирани по проект BG051PO001-3.3.06-0025 по Оперативна програма „Развитие на човешките ресурси“, съфинансирана от Европейския социален фонд на Европейския съюз.

Публичната защита ще се състои на12.2017 г., от часа в залата на ИФРГ-БАН, ул. „Акад. Г. Бончев“, бл. 21, ет. 2, гр. София.

Членове на научното жури:

Вътрешни членове:

Проф. д-р Любомир Стоилов - ИФРГ, БАН

Доц. д-р Леонид Пенков - ИФРГ, БАН

Външни членове:

Чл. кор. проф. Д-р Драга Тончева - МФ, МУ

Проф. д-р Стоян Лалчев - МФ, МУ

Проф. д-р Севдалин Георгиев - БФ, СУ

Материалите по защитата са на разположение в библиотеката на „Институт по физиология на растенията и генетика“ – БАН, ул. „Акад. Георги Бончев“, бл. 21, ет. 2, ст. 225 и на уеб страницата на ИФРГ – БАН (<http://www.bio21.bas.bg/ippg/bg/>).

Благодаря на научните ми консултанти проф. д-р Драга Тончева и проф. д-р Любомир Стоилов за подбора на тематика, за съветите и за подготовката на дисертацията. Благодаря на колегите от лаборатория "Геномна динамика и стабилност" с ръководител доц. д-р Леонид Пенков за приятната работна атмосфера и на гл. ас. д-р Мария Кръстева и гл. ас. д-р Василиса Манова за оказаната подкрепа.

Изказвам своята признателност на проф. д-р Иван Гаврилов и д-р Мария Начева за предоставените туморни и кръвни проби от пациентите със спорадичен РМЖ, за клиничните данни и за информираното съгласие за всеки пациент. На проф. Петр Полраих, проф. Зденек Клейбл и д-р Петра Клейбова, лаборатория „Онкогенетика“ към Институт по Биохимия и Експериментална Онкология, Чарлз Университет, Първи Факултет по Медицина, Прага, Чехия за техническата подкрепа.

Изказвам своята благодарност и на проф. д-р Снежанка Дончева, директор на Института по Физиология на растенията и Генетика за оказаната подкрепа и дадената възможност да работя и развивя потенциала си.

Искрено благодаря на семейството и на съпругата ми за обичта, търпението и подкрепата.

Настоящата разработка е ко-финансирана по проекти: G-1-04/04, DO-02-310/08 и №BG051PO001-3.3.06-0025.

Съкращения:

BRCA1 — BReast CAncer susceptibility gene 1 (*BRCA1* ген)

BRCA2 — BReast CAncer susceptibility gene 2 (*BRCA2* ген)

ESE — Exonic Splicing Enhancer (екзон сплайс енхансер)

ESS — Exonic Splicing Silencer (екзон сплайс репресор)

GRAVY — Grand average of hydropathicity (Хидропатичен индекс)

HRM — High Resolution Melting (метод на топене с висока разрешителна способност)

ISE — Intronic Splicing Enhancer (интрон сплайс енхансер)

ISS — Intronic Splicing Silencer (интрон сплайс репресор)

kD — килодалтон

LOH — загуба на хетерозиготност

miRNAs — microRNAs (микроРНКи)

NGS — Next-generation sequencing (секвениране от ново поколение)

NLS — Nuclear Localisation Signal (специфична сигнална последователност за насочване към ядрото)

PCR — Полимеразна верижна реакция

RefSNP ID number (rs) — Референтен идентификационен номер на единичен нуклеотиден полиморфизъм

SBS — sequencing by synthesis (секвениране чрез синтез)

STK11 — Serine/threonine kinase 11 (Серин/треонин киназа 11)

TNM — tumor-node-metastasis (система за стадиране на малигнени тумори спрямо размера, нодален (лимфни възли) статус и наличие на отдалечени метастази)

UTR — Untranslated region (нетранслируем регион)

ДНК — Дезоксирибонуклеинова киселина

РМЖ — Рак на млечната жлеза

I. ВЪВЕДЕНИЕ.

Ракът на млечната жлеза (РМЖ) е най-честата форма на злокачествено заболяване и е водеща причина за смъртност сред жените, както в световен мащаб, така и в България. В глобален мащаб, през 2012 година, броят на новодиагностицираните случаи на РМЖ надхвърля 1.67 милиона (25.2% от всички случаи на рак), а на смъртните – 522,000. Данните за България по извадка на “Националния раков регистър“ за 2013 година, показват че броя на новодиагностицираните пациенти с РМЖ възлиза на 3997, а на смъртните – 1274.

Известно е, че 15% до 20% от случаите на рак на млечната жлеза (РМЖ) се дължат на наследствени фактори, като само 5% до 10% са строго наследствено обусловени, свързани с наличие на герминативни патологични мутации във високо пенетрантните гени *BRCA1/2*. Въпреки това, не всички *BRCA1/2* мутации са патологични, като техния ефект варира в зависимост от функционалната компрометираност на кодираните от тях белтъци. Нещо повече, типа и честотата на мутациите варират между отделните популации.

В групата на високо пенетрантните гени и с участие в патогенезата на рак на млечната жлеза се причислява и гена *STK11*. Загубата на хетерозиготно състояние и наличието на деактивиращи герминативни мутации, засягащи *STK11*, се асоциират предимно със синдрома на Пютц-Йегерс (Peutz-Jeghers syndrome), характеризиращ се с полипи в гастро-интестиналния тракт, пигментация на кожата и устата, и повишен риск за развитие на различни ракови образувания, включително и на наследствения тип РМЖ ($\approx 32 - 50\%$). Въпреки, че в световен мащаб са докладвани и соматични изменения, засягащи *STK11* при различни карциноми, като карцином на бял дроб, карцином на шийката на матката, панкреаса, тестиси и др., в световен мащаб, данните относно участието на този ген във фамилен и спорадичните случаи на рака на млечната жлеза са оскъдни, а за България такива липсват. В тази връзка дисертационната разработка е насочена към определяне на типа, честотата и вероятно функционален ефект на генетичните изменения в три тумор супресорни гена: *BRCA1* и *BRCA2*, чрез “Illumina” таргетно секвениране от ново поколение (Next-generation sequencing – NGS) при пациенти с фамилен РМЖ и гена *STK11*, чрез метода на топене с висока разрешителна способност (High Resolution Melting – HRM) при пациенти с фамилен и спорадичен рак на млечната жлеза от българска популация.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.

1. Цел.

Основната цел на тази дисертационна разработка е да се характеризират типа и функционалната значимост на генетичните нарушения в гените *BRCA1*, *BRCA2* и *STK11* при пациенти с рак на млечната жлеза от българска популация.

2. За постигането на тази цел бяха формулирани следните задачи:

2.1. Да се проучи генетичната хетерогенност на гените *BRCA1* и *BRCA2* при пациенти с фамилен рак на млечната жлеза и клинично здрави лица без фамилна обремененост от българска популация посредством метода на таргетно секвениране от ново поколение (Next-Generation Sequencing).

2.2. Да се характеризират и категоризират генетичните изменения в *BRCA1* и *BRCA2* гените при пациенти с фамилен рак на млечната жлеза и контроли.

2.3. Да се определи типа и честотите на полиморфните варианти в *BRCA1* и *BRCA2* гените в здрава българска популация.

2.4. Да се определят и диференцират вариантите в *STK11* гена при пациенти със спорадичен и фамилен РМЖ и контроли посредством метода на топене с висока разрешителна способност (HRM).

2.5. Да се създаде алгоритъм за определяне на функционалната значимост на структурните варианти в *BRCA1*, *BRCA2* и *STK11* във връзка с онкогенезата.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.

1. Клиничен подбор на пациенти с рак на млечната жлеза и здрави контроли.

В настоящото изследване бяха включени пациенти от българска популация, диагностицирани с фамилен и спорадичен РМЖ, отговарящи на международните критерии, утвърдени от “The Breast Cancer Linkage Consortium” (BCLC) и “National Comprehensive Cancer Network” (NCCN).

➤ В изследването са включени и 24 пациентки (средна възраст 35 ± 10 години) с фамилен РМЖ, провели лечение в Специализирана Болница за Активно Лечение по Онкология (СБАЛО), гр. София. Кръвни проби от 71 клинично здрави лица без фамилна обремененост са използвани, като отрицателни контроли.

➤ 73 жени със спорадичен рак на млечната жлеза, на възраст между 29 и 78 години (средна възраст 53,2 години) провели хирургично лечение в Мамологично

отделение към Специализирана Болница за Активно Лечение по Онкология (СБАЛО), гр.София, за периода 2000–2003 г. Кръвни проби от 22 пациента със спорадичен РМЖ са използвани, като контроли.

От всички участници е получено информирано съгласие относно целите на настоящото изследване. Клиничната информация на пациентите е представена по начин, така че те да не бъдат директно или индиректно идентифицирани.

2. Преданалитична обработка на биологичния материал.

2.1. Изолиране на ДНК от туморен материал.

От туморна тъкан на изследваните пациенти беше изолирана високомолекулна ДНК посредством стандартна Proteinase K/Phenol методика и чрез DNeasy® Blood & Tissue kit (Qiagen).

2.2. Изолиране на ДНК от венозна кръв.

Посредством стандартна методика с DNeasy® Blood & Tissue kit (Qiagen) бе изолирана геномна ДНК от венозна кръв (Ahmad et al., 1995).

За оценка на чистотата и количеството на ДНК във всеки изолат бе проведен спектрофотометричен анализ на BioSpec–nano Spectrophotometer (Shimadzu Biotech, Japan) и NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Inc., USA).

3. Екзомно секвениране на *BRCA1* и *BRCA2* от ново поколение.

Секвенирането от ново поколение (NGS) на *BRCA1* и *BRCA2* на Illumina MiSeq платформа е проведено под ръководството на проф. д-р Драга Тончева (Геномна Лаборатория, СБАХЛ „Д-р Малинов“ ООД) и най-общо следваше етапите:

3.1. Дизайн на олиго–сонди, посредством програмата DesignStudio Sequencing Assay Design Tool;

3.2. Изготвяне на библиотека, чрез Illumina Design Studio (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA);

За нейното проектиране бе приложен TruSeq Custom Amplicon Kit, следвайки протокола – “TruSeq Custom Amplicon Library Preparation Guide“.

3.3. Хибридизация на олиго–сонди;

3.4. Елонгация и съшиване (лигиране);

3.5. PCR амплификация;

3.6. Пречистване на PCR продукти;

3.7. Нормализиране на библиотеки;

3.8. NGS секвениране за *BRCA1* и *BRCA2*;

За NGS секвениране на общата библиотека беше използван MiSeq Reagent Kit v2. Процесът беше проведен по протоколни изискванията на MiSeq System User Guide (<http://www.illumina.com/>, S1).

9. Анализ на секвенции на MiSeq Reporter програма.

4. Полимеразна верижна реакция (ПВР) за *STK11*.

За амплификация на цялата кодираща част на *STK11* бяха използвани дванадесет двойки праймери (Таблица 1), седем от които бяха подбрани по литературни данни (Dong et al., 1998; Bignell et al., 1998; Connolly et al., 2000) и пет двойки бяха проектирани с помощта на програмата “AnnHyb“ (<http://bioinformatics.org/annhyb/>, S2).

Таблица 1. Нуклеотидна последователност на праймери за PCR амплификация и температура на анийлинг за *STK11* гена.

STK11 екзони	Праймер	5' → 3'	Дължина на продукт (bp)	Ta (°C)
1U	F	GGAAGTCGGAACACAAGGAA	240	66
	R	CAGGTCCCCCATCAGGTACT		
1D	F	TTCATCCACCGCATCGACTC	280	67
	R	GACAGAACCATCAGCACCGTGACTG		
2	F	GGCCCTTTCCCACAGCACT	271	66
	R	AGGCCCGCGGGTCCCAACA		
3	F	CCCCCGTGCTCCCTGGGCCTGT	173	70
	R	CCCTGCCCCGCGCACGCA		
4	F	CGGCCCCAGGACGGGTGT	218	69
	R	CTCAGGGAGTGCCCGGGAGG		
5	F	CCCTCCCGGGCACTCCCTGAG	254	71
	R	GCCGGCAGCTGCCAAGACG		
6A	F	TCAACCACCTTGACTGACCA	251	66
	R	ACACCCCCAACCCTACATTT		
6B	F	GACCACGCCTTTCTTCCCTCCC	236	66
	R	ACACCCCCAACCCTACATTT		
7	F	CAGCTGACAGGCTCCTCGC	159	66
	R	CTCAACCAGCTGCCACAT		
8	F	CCTGACAGGCGCCACTGCTTC	271	70
	R	CATCCTGGCCGAGTCAGCAGAGC		
9U	F	CTCAGGCCACACTTGCCG	137	64
	R	CCTGGATTTGGTGCTCAGCTGC		
9D	F	AAGGCCGTGTGTATGAACGG	206	67
	R	ATCCAGGCGTTGTCCCCAC		

“Ta“ – температура на анийлинг; “F“ – прав праймер; “R“ – обратен праймер; “bp“ – базови двойки.

5. Метод на топене с висока разрешителна способност (HRM).

Методът на топене с висока разрешителна способност беше извършен посредством кит “5× HOT FIREPol® EvaGreen® HRM Mix – no ROX“ (Solis BioDyne, Estonia) и проведен на “LightCycler®480“ (F. Hoffmann–La Roche Ltd., Switzerland) и “PikoReal™ Real–Time PCR System“ (Thermo Fisher Scientific, Inc., USA).

6. Секвениране по Сангер за *STK11*.

Установените за *STK11* гена PCR продукти с изменен HRM профил на топене бяха двупосочно секвенирани по Сангер на ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) в Национална генетична лаборатория, (Лаборатория по Клинична генетика, СБАЛАГ “Майчин дом” ЕАД) под ръководството на доц. Алексей Савов.

Секвенирането по Сангер следваше етапите:

1. ЕхoSAP пречистване на PCR продукти;
2. Секвениране;
3. Преутаяване на PCR продукт;
4. Електрофоретично разделяне и отчитане на секвенционни реакции.

7. Биоинформатичен (*In silico*) анализ.

За да се определи дали даден вариант е разположен в кодиращ или в не кодиращ регион, посредством NCBI базата данни (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, S3) бяха анализирани референтните последователности: *BRCA1* (NG_005905.2; изоформа – NM_007294.3; белтък – NP_009225.1), *BRCA2* (NG_012772.3; изоформа – NM_000059.3; белтък – NP_000050.2) и *STK11* (NG_007460.2; изоформа – NM_000455.4; белтък – NP_000446.1). Приложена беше кръстосана проверка посредством геномните браузъри UCSC (University of California, Santa Cruz) (<http://genome.ucsc.edu/>, S4) и Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>, S5).

Вариантите бяха проверени в няколко бази от данни: dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>, S6); BIC (Breast Cancer Information Core) (<https://research.nhgri.nih.gov/bic/>, S7); UniProt (<http://www.uniprot.org/>, S8); ALFRED (Allele Frequency Database) (<https://alfred.med.yale.edu/>, S9); LOVD (Leiden Open source Variation Database) (<http://www.lovd.nl/3.0/home>, S10); ClinVar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>, S11); COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>, S12) и други.

Измененията бяха номенклатурно описани спрямо препоръките на HGVS (Human Genome Variation Society) (<http://varnomen.hgvs.org/>, S13), като честотата за всяка наблюдавана мутация беше упомената в съответствие с данните в HarMap (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/index.html.en>, S14) и 1000 Genomes (<http://www.1000genomes.org>, S15).

Във връзка с теоретичната оценка на ефекта на вариантите бяха приложени пет прогнозни софтуерни програми: Provean (<http://provean.jcvi.org>, S16); Sift (<http://sift.jcvi.org>, S17); PolyPhen-2 (Adzhubei et al., 2010); LoFtool (<http://www.ensembl.info/ecode/loftool/>, S18); RegulomeDB (<http://regulomedb.org>, S19). За анализ на измененията в екзон-интрон сплайс участъците бяха използвани програмите MaxEntScan (Yeo и Burge, 2004) и Human Splicing Finder v3.0 (Desmet et al., 2009).

Аминокиселинните замени в мутантните белтъци бяха анализирани, чрез 3D хомоложно моделиране посредством програмата Swiss-model (<http://swissmodel.expasy.org>, S20). Биофизичните и биохимичните параметри на евентуално синтезираните мутантни форми бяха оценени посредством ProtParam програмата (<http://web.expasy.org/protparam/>, S21). За установяване на киназно-субстратните места за фосфорилиране беше приложена NetworKIN v3.0 програмата (<http://networkin.info/index.shtml>, S22).

За визуализация на ефекта на измененията върху вторичната структура на 5'UTR/3'UTR областите беше приложен RNAfold анализа (Lorenz et al., 2011). В оценката на ефекта на вариантите върху регулаторните области за свързване на транскрипционни фактори (TFBS) и микроРНКи (miRNAs) в 5'UTR/3'UTR не кодиращите участъци беше използвана програмата FuncPred (<https://snpinfo.niehs.nih.gov/snpinfo/index.html>, S23).

IV. РЕЗУЛТАТИ.

1. Молекулярно–генетичен анализ за наличие на мутационни изменения в *BRCA1* и *BRCA2* гените.

С цел получаване на изходни данни, относно броя, вида и честотата на генетичните варианти при лица с фамилен рак на млечната жлеза и клинично здрави лица без фамилна обремененост от българска популация, беше приложен метода за таргетно секвениране от ново поколение (NGS).

Анализът показва висока възпроизводимост по отношение на обем и качество на генерирани секвенции. Установени бяха 104 *BRCA1/2* варианта с различна клинична

значимост и ефект. От тях 47 варианта бяха установени в *BRCA1* гена (29.8% екзонни, 53.2% интронни и 17.02% - 3' и 5' UTR варианти) и 57 в *BRCA2* (40.35% екзонни, 22.8% интронни, 31.6% 3' и 5' UTR варианти, както и 5.3% изменения, позиционирани извън рамките на гена).

2. Биоинформатичен (*In silico*) анализ и класификация на варианти в *BRCA1* и *BRCA2* при пациенти с фамилен РМЖ и контроли.

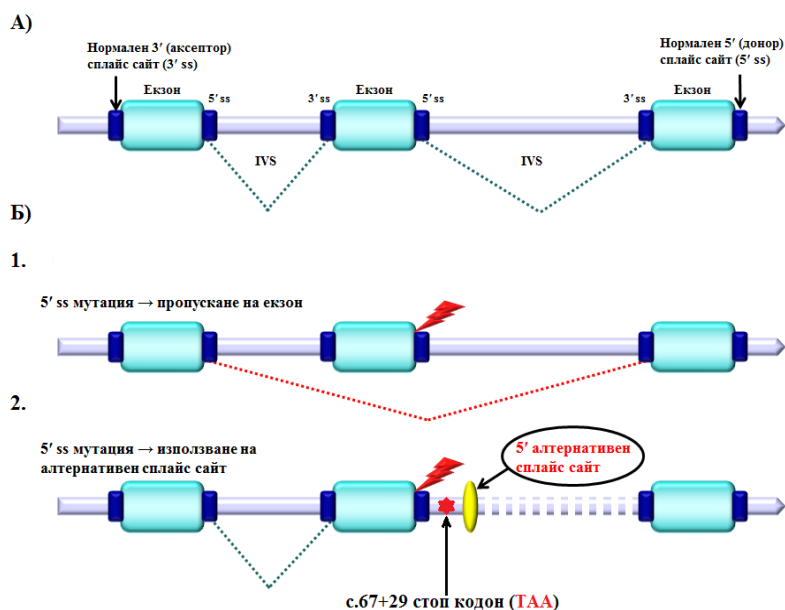
➤ Клас 5 – Патологични варианти.

След проведените анализи бяха установени три варианта с патологичен ефект: един при пациент с фамилен РМЖ (4.2%) и два варианта в ДНК проби на клинично здрави лица (2.8%).

Идентифицираната, при пациент с фамилен РМЖ, патологична транзиция гуанин към аденин (G>A) беше установена в интрон две на *BRCA2* гена и засягаше първата нуклеотидна база след екзон 2 (chr13:32890665). За да се уточни дали замаяната засяга консервативна база, *BRCA2* последователността беше анализирана, чрез интегрирания Biodalliance браузър към PDB базата данни, позоваващ се на Human Genome Assembly GRCh37 след подравняване на геномните последователности на 45 гръбначни вида (<http://www.rcsb.org/pdb/gene/BRCA2>, S24). Беше установено, че аминокислотата гуанин (G) в първа позиция от 5' сплайс региона след екзон 2 на *BRCA2* гена (GRCh37.p13: chr13:32890665) е високо еволюционно консервативна (PhastCons показател – 1).

С цел да се изясни евентуалната роля на c.67+1G>A (rs81002796) върху нормалния *BRCA2* сплайсинг, варианта беше подложен на биоинформатичен анализ посредством Human Splicing Finder (HSFv.3.0) софтуера. HSF прогнозира: разрушаване на нормалната 5' сплайс-донорна последователност (CAGgtattg) след екзон 2 и формиране на мутантен *upstream* сплайс-акцепторен сайт (gcaacaagcagAT), водещ до изместване на рамката на четене и пропускане на екзон 2 (Фигура 1 — А, Б.1.); нарушаване на ДНК последователността (AGgtat), свързана с формиране на Fas-ESS (флуоресцентно-активиран сигнал за екзон сплайс репресор) хексамерната структура; нарушение на ДНК последователността (AGCAGgt) за включване на SF2/ASF белтъка, участващ в конститутивния и алтернативния сплайсинг на прекурсорната мРНК (пре-мРНК), трансляцията и сумоилацията.

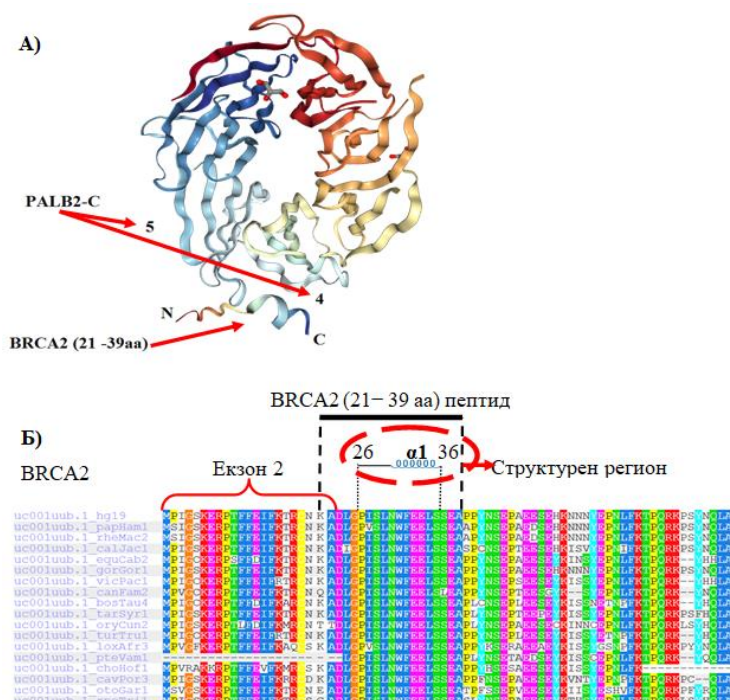
От друга страна, HSF прогнозира и възможност за формиране на *downstream* алтернативен (*cryptic*) сплайс-донорен мотив (**CAGg**ttaac), разположен в интрон 2 (с.67+157), водещ до добавяне на 157 нуклеотидни двойки от интрон 2 към 5' края на екзон 2 в BRCA2 пре-мРНК и вмъкване на преждевременен стоп кодон (PTC) в позиция с.67+29 (Фигура 1 — Б.2.).



Фигура 1. Ефект на с.67+1G>A фреймшифт мутация в BRCA2: А) Сплайсинг на BRCA2 в норма. Б): 1. Сплайсинг на BRCA2 с пропускане на екзон 2; 2. Активиране на 5' алтернативен сплайс-донорен мотив и вмъкване на преждевременен стоп кодон (с.67+29) към 5' края на екзон 2.

Посредством NCBI базата от данни беше установено, че пропускането на екзон 2 от BRCA2, ще доведе до загуба на стартовия (ATG) кодон за транскрипцията на BRCA2 мРНК. За да се изясни дали въпреки загубата на стартовия (ATG) кодон в екзон 2 на BRCA2 гена е възможно евентуално протичане на транскрипцията и транслацията от друг *downstream* разположен стартов кодон, посредством NCBI и UniProt базите от данни беше установено, че следващия потенциален стартов кодон за BRCA2 транскрипция се локализира в нуклеотидната последователност chr13:32899266–32899268 в гена, отговорна за синтезата на втория метионинов остатък, заемащ 124-та позиция в белтъка (NP_000050.2). Това от своя страна води до скъсяване на N-терминалния край на BRCA2 с 123 аминокиселинен участък, в които се разполага пептидната последователност (21 –

39aa), участваща в установяване на връзката на BRCA2 с PALB2 (партньор и локализатор на BRCA2) протеина (Фигура 2).



Фигура 2. Аmino-терминален PALB2-свързващ мотив от BRCA2. А) 3D кристалографска структура на PALB2/BRCA2 комплекс (PDB ID: 3EU7); Б) PolyPhen-2 множествено подравняване на BRCA2 последователността (21 – 39aa), съдържаща място за свързване с PALB2 (26 – 36 aa) с минимален PALB2-C–BRCA2 “ $\alpha 1$ спирален” мотив (31 – 36aa). (no Oliver et al., 2009).

В допълнение към загубата на PALB2-C–BRCA2 “ $\alpha 1$ спиралния мотив“, делецията на аминокиселинния участък (1 – 123aa) от amino-терминалния край на BRCA2 води и до загуба на няколко места, участващи във фосфорилирането на BRCA2 белтъка: Tyr57 (относително консервативна), Ser70 (неконсервативна), както и на високо еволюционно консервативните аминокиселинни остатъци Tyr71 Ser76, Thr77 и Ser93, от които Ser76 и Thr77 влизат във формирането на Plk1 PBD свързващия мотив (Ser76-Thr77-Pro78) в BRCA2 (<http://www.phosphosite.org>, S25).

В случай на евентуален белтъчен синтез, с помощта на ProtParam програмата беше извършен сравнителен анализ за установяване на промените в някои биофизични и биохимични параметри на мутантния BRCA2 протеин. ProtParam установи изграждане на 3295 аминокиселинен мутантен BRCA2 белтък с 14191.11 Da по-ниско молекулно тегло, с

0.09 pH единици понижена изоелектрична точка, без промяна във времето за дезактивация в ретикулоцитна клетъчна култура, в дрожди и в бактериална култура от Ешерихия коли (*E. coli*), с 0.41 единици повишена белтъчна стабилност, с 0.37 единици повишена термостабилност и с 0.011 kcal/mol повишена белтъчна хидрофобност (Таблица 2).

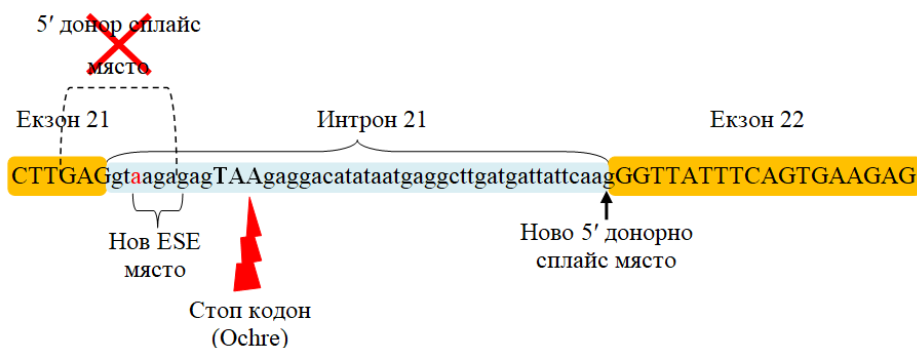
Таблица 2. ProtParam-базиран структурен анализ на първична и мутантна *BRCA2* форма.

Физико-химични параметри	BRCA2 – див тип	BRCA2 – мутант
Брой аминокиселинни остатъка (aa)	3418 aa	3295 aa
Молекулно тегло (Mw)	384202.23 Da	370011.12 Da
Изоелектрична точка (pI)	6.29	6.20
Оценка за полуживот:	Ретикулоцити – 30 часа	Ретикулоцити – 30 часа
	Дрожди – >20 часа	Дрожди – >20 часа
	<i>E. coli</i> – >10 часа	<i>E. coli</i> – >10 часа
Индекс за нестабилност (II)	нестабилен (47.77)	нестабилен (47.36)
Алифатен индекс	74.13	74.50
Хидропатичен индекс (GRAVY)	-0.643	-0.632

В групата на измененията с патогенен ефект (Клас 5) попада и варианта chr13:32950931G>A, локализиран в интрон 21 на *BRCA2* гена. Наблюдаваната нова за базите от данни интронна транзиция гуанин към аденин (G>A) е установена в една контролна ДНК проба (1.4%) и засяга третата нуклеотидна база след 5' сплайс края на екзон 21 (с.8754+3G>A). Тъй като *BRCA2* изменението не влияе директно върху високо еволюционно консервативната 5' екзон–интрон (AG/GT) сплайс граница, но попада в 5' сплайс мотива (екзон 21/интрон 21 – -3 -2 -1 +1 +2 +3 +4 +5 +6), беше използван интегрирания Biodalliance браузър към PDB за анализ на нуклеотидната последователност. Установено беше че регистрираното изменение в позиция chr13:32950931, засяга относително високо еволюционно консервативна база гуанин (PhastCons показател – 0.99) от 5' сплайс мотива на *BRCA2*.

За да се изясни евентуалния функционален ефект върху нормалния сплайсинг, *BRCA2* варианта (с.8754+3G>A) беше подложен на *in silico* анализ посредством Human Splicing Finder (HSFv.3.0). HSF прогнозира изграждане на интронен ESE мотив (Aagag), нарушаващ нормалната 5' сплайс-донорна последователност (GAGgtgaga) и използване на

downstream разположен алтернативен сплайс-донорен мотив (AAGgtgaga), водещ до задържане на 46 нуклеотиди (с.8754+46) от интрон 21 в BRCA2 пре-мРНК. С помощта на NCBI базата от данни беше анализирана вмъкнатата четиридесет и шест нуклеотидна последователност. Установено беше, че фреймшифт мутацията (с.8754+3G>A) води до преждевременно формиране на стоп кодон (PTC) в позиция chr13:32950938–32950940 (Фигура 3).



Фигура 3. Схема на с.8754+3G>A фреймшифт мутация в BRCA2. Активиране на *downstream* алтернативен (*cryptic*) 5'сплайс-донорен мотив (с.8754+46), водещ до задържане на 46 нуклеотиди от интрон 21 и вмъкване на PTC (TAA) към 5' сплайс края на екзон 21. PTC е обозначен с главни букви, с удебелен шрифт.

Таргетното секвениране от ново поколение доведе до установяване и на варианта chr13:32936732G>A в BRCA2 гена (с.7878G>A; rs80359013). Наблюдаваният нонсенс вариант води до формиране на преждевременен стоп кодон (TGA [Opal]) в 17-ти екзон, вследствие на транзиция на високо консервативната нуклеотидна база гуанин с аденин в кодон 2626, кодиращ еволюционно консервативния аминокиселинен остатък триптофан (p.Trp2626Ter). Независимо от изграждането на по-къс белтъчен продукт (2625 aa), BRCA2 ще бъде с отсъстващи: BRCA2 хеликазен регион (2481–2667 aa), три олигонуклеотидни/олигозахаридни BRCA2 свързващи гънки (2670–3186 aa), ядрен експортиращ сигнал (2682–2698 aa), както и област за взаимодействие на BRCA2 с SEM1/DSS1 (2481–2832 aa).

Класифициран, като патологичен и без определена честота на минорния алел (A) в световен мащаб (www.ncbi.nlm.nih.gov, S26), BRCA2 варианта (с.7878G>A) е установен единствено в групата на изследваните клинично здрави лица с честота от 1.4% (1/71).

➤ Клас 4 – Вероятно патологични варианти.

Класът включва варианти с висока вероятност да допринесат за възникване на конкретно тип заболяване. Въпреки, че такива варианти са идентифицирани при пациенти, липсват ясни доказателства за пряката им връзка със заболяването.

Таблица 3. Вероятно патологични варианти в гените *BRCA1* и *BRCA2*.

Геномна позиция	Екзон / Инtron	refSNP ID / cDNA / белтък	Честота при пациенти (%)	Честота в контроли (%)
<i>BRCA1</i>				
chr17:41219635_41219637delAAC	Екзон 17	rs80358344 / c.5062_5064delGTT / p.Val1688del	4.2	—
<i>chr17:41256307T>C</i>	Инtron 6	c.302-29A>G	4.2	—
<i>BRCA2</i>				
<i>chr13:32890644A>T</i>	Екзон 2	rs876660440 / c.47A>T / p.Lys16Met	4.2	—
<i>chr13:32971041G>T</i>	Екзон 26	c.9508G>T / p.Asp3170Tyr	4.2	—

Вариант в италик шрифт — нов за базите от данни; RefSNP ID number (rs) – Референтен идентификационен номер; cDNA – копи-ДНК (кДНК).

Подобна тип вероятно патологична мутация беше установена при пациент с фамилен РМЖ (4.16%). Изменението представлява ин-фрейм тройна нуклеотидна хетерозиготна делеция (AAC/---), локализирана в екзон 17 от *BRCA1* гена в позиция chr17:41219635, водеща до загуба на алифатния с изопропилова странична верига, хидрофобен и неполярен аминокиселинен остатък валин (p.Val1688del) от BRCA1-BRCT 1 (1650-1724aa) функционалния домен.

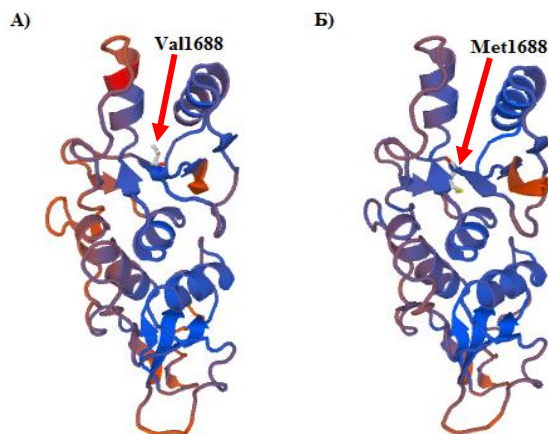
Интерпретацията на ефекта на g.41219635_41219637delAAC в *BRCA1* е изключително противоречива. Докато в dbSNP базата данни c.5062_5064delGTT (rs80358344) е описан като патогенен, в BIC е определен с неясен ефект, а в UniProt е класифициран, като не асоцииран с РМЖ вариант. Получените резултатите от проведените *in silico* анализи също бяха незадоволителни. Provean индикира неутрален ефект (-2.26), а Sift програмата не детектира резултат.

Във връзка с доизясняване на противоречивите данни относно това до каква степен загубата на Val1688 оказва влияние върху биофизичните и биохимичните параметри на BRCA1 и вторичната структура на BRCA1-BRCT домена, бяха приложени и ProtParam и Swiss-model програмите. В случай на синтез, ProtParam анализа установи, че BRCA1-

BRCT мутанта ще е с по-ниска стабилност и най-вероятно ще е по-лесно протеолитично разградим (Таблица 4). Извършеният анализът, посредством Swiss-model програмата, индикира синтез на изменена BRCA1-BRCT 1/2 структура, близка с тази за осъществяване на връзка с ABRAXAS (PDB Id: 4Y18) (Фигура 4).

Таблица 4. ProtParam-базиран структурен анализ на първична и мутантна форма на BRCA1 белтък.

Физико-химични параметри	BRCA1 – див тип	BRCA1 – мутант
Брой аминокиселинни остатъка (aa)	1863aa	1862aa
Молекулно тегло (Mw)	207720.85 Da	207621.72 Da
Изоелектрична точка (pI)	5.29	5.29
Оценка за полуживот:	Ретикулоцити – 30 часа	Ретикулоцити – 30 часа
	Дрожди – >20 часа	Дрожди – >20 часа
	E. coli – >10 часа	E. coli – >10 часа
Индекс за нестабилност (II)	нестабилен (54.68)	нестабилен (54.70)
Алифатен индекс	69.01	68.89
Хидропатичен индекс (GRAVY)	-0.785	-0.788

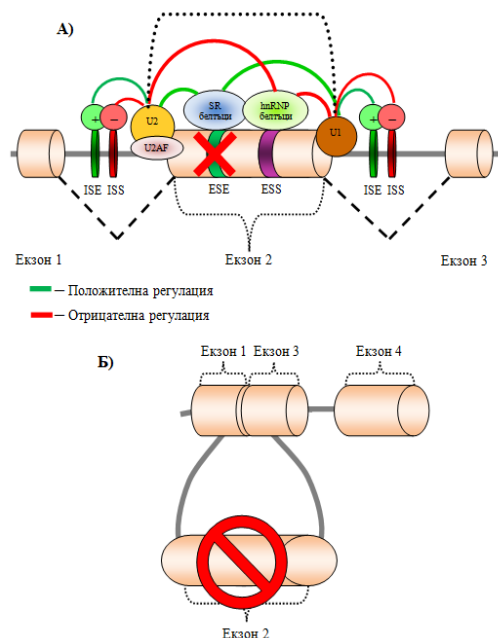


Фигура 4. Swiss-model 3D хомоложно моделиране на вторична кристалографска структура на BRCA1-BRCT 1/2 домен: А) BRCA1-BRCT 1/2 див тип (PDB Id: 3COJ.1.A); Б) BRCA1-BRCT 1/2 мутантна форма (PDB Id: 4Y18.1.A).

— *chr13:32890644A>T, c.47A>T (rs876660440)*. Нова за базите от данни трансверзия на относително консервативна аминокиселина аденин (PhastCons: 0.779) с тимидин в екзон 2 на BRCA2 гена, попадаща към номенклатурно обявения вариант в dbSNP базата от данни

— rs876660440. Мутацията е установена единствено в групата на пациентите с фамилен РМЖ (4.2%), води до миссенс замяна на положително заредения, полярен и хидрофилен аминокиселинен остатък лизин (AAG — Lys/K) с алифатен, неполярен, хидрофобен и сяра-съдържащ аминокиселинен остатък метионин (ATG — Met/M) в позиция 16 в кодиращия BRCA2 белтък (p.Lys16Met).

Извършените биоинформатични анализи определиха BRCA2 варианта (c.47A>T), като вероятно патологичен (Provean: -1.43, Sift: 0.000, PolyPhen-2 HumDiv: 0.998 и PolyPhen-2 HumVar: 0.879). С цел получаване на по-ясна представа относно евентуалния ефект на c.47A>T върху сплайсинга на BRCA2 пре-мРНК, беше приложен HSF 3.0 софтуера. Анализът определи евентуално разрушаване на *cis*-действащата ESE последователност (5'-AAGAC-3') за свързване на SR-подобния Tra2-β протеин (Фигура 5 — А) и изграждане на мутантен ESS сайт (5'-TTTATG-3'), водещ до нарушение на нормалния BRCA2 пре-мРНК сплайсинг с пропускане на екзон 2 (Фигура 5 — Б).



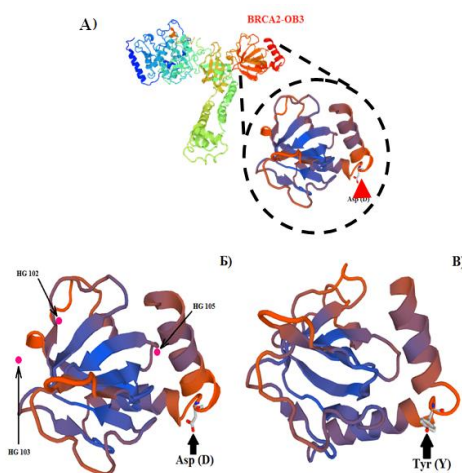
Фигура 5. Ефект на BRCA2 варианта c.47A>T върху нормалния пре-мРНК сплайсинг: А) Разрушаване на ESE сайт в екзон 2; Б) Алтернативен сплайсинг с пропускане на екзон 2 от BRCA2 пре-мРНК.

В случай на евентуално пропускане на екзон 2 от BRCA2 мРНК, посредством NCBI базата от данни беше установено, че следващия стартов кодон за BRCA2 транскрипцията се разполага в екзон 4. Като резултат, N-терминално скъсения мутантен BRCA2 белтък

(3295 aa) ще е с 14191.11 Da по-ниско молекулно тегло, с 0.09 pH единици понижена изоелектрична точка, без промяна във времето за дезактивация в ретикулоцитна клетъчна култура, в дрожди и в бактериална култура от *Ешерихия коли* (*E. coli*), с 0.41 единици повишена белтъчна стабилност, с 0.37 единици повишена термостабилност и с 0.011 kcal/mol повишена белтъчна хидрофилност спрямо дивия тип. Освен до промяна във физико-химичните характеристики, *BRCA2* варианта (с.47A>T) води и до загуба на аминокиселинни остатъци, участващи във фосфорилирането и активирането на *BRCA2* белтъка.

— ***chr13:32971041G>T, c.9508G>T***. Нов за базите данни кодиращ вариант, разположен в екзон 26 на *BRCA2* гена. Вариантът беше наблюдаван единствено в групата на пациентите с фамилен рак на млечната жлеза с честота от 4.2% (1/24).

Установената трансверзия гуанин към тимин води до миссенс замяна на нормално кодираната аспарагинова киселина (**GAC**) с тирозин (**TAC**) в позиция 3170 от *BRCA2* белтъка (p.Asp3170Tyr). След проведен анализ посредством Swiss-model програмата, беше наблюдавано, че p.D3170Y структурно засяга *BRCA2* областта, известна под наименованието „олигонуклеотидна/олигозахаридна свързваща гънка 3“ (*BRCA-2_OB3*: 3057—3186 aa), която е съставна част от *BRCA2-DSS1* комплекса (Фигура 6).



Фигура 6. Swiss-model анализ на ефекта на p.Asp3170Tyr върху вторичната структура на *BRCA2-DSS1* комплекса: А) 3D вторична кристалографска структура на *BRCA2-DSS1* комплекс и пространствена организация на „Олигонуклеотидна/олигозахаридна *BRCA2* свързваща гънка 3“ (*BRCA-2_OB3*); Б) Разположение на Asp (D) и живачните (Hg^{2+}) катиони във вторичната структура на „*BRCA-2_OB3*“ — див тип; B) Разположение на Tyr (Y) във вторичната структура на „*BRCA-2_OB3*“ — мутантен тип (p.Asp3170Tyr).

В резултат на структурната промяна на BRCA-2_OB3 областта, може да се предположи, че p.D3170Y ще доведе и до нарушение в пространствената организация на сайта за свързване на BRCA2 белтъка с едноверижни ДНК вериги, BRCA2 свързващата повърхност II (generic binding surface II – GBS-II), както и на аминокиселинните остатъци, формиращи три от петте лигандни джоба с живачните (Hg^{2+}) катиони в BRCA2-DSS1 комплекса.

➤ Клас 3 – Варианти с неизвестно клинично значение.

Таблица 5. Установени BRCA1 и BRCA2 варианти с неизвестно клинично значение при пациенти с фамилен РМЖ и клинично здрави лица.

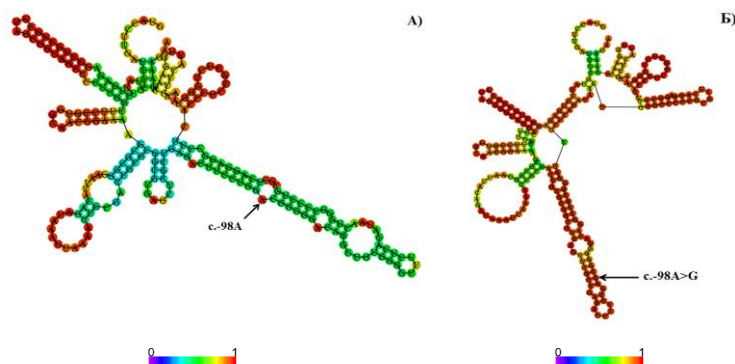
Геномна позиция	Екзон / Интрон	refSNP ID / cDNA / белтък	Честота при пациенти (%)	Честота в контроли (%)
BRCA1				
chr17:41242965G>A	Екзон 12	rs397507226) / c.4181C>T / p.Thr1394Ile	—	1.4
chr17:41246718T>A	Екзон 11	c.830A>T / p.Asn277Ile	—	1.4
chr17:41249263G>A	Екзон 9	rs1799965 / c.591C>T / p.Cys197=	4.2	—
chr17:41276140A>G	Интрон 1	rs398122626 / c.- 19-8T>C	4.2	—
chr17:41277448A>G	Екзон 1	c.-180T>C	—	1.4
chr17:41277450C>T	Екзон 1	c.-182G>A	—	1.4
chr17:41234509G>C	Екзон 13	c.4269C>G / p.Ser1423Arg	—	1.4
chr17:41277366T>C	Екзон 1	c.-98A>G	—	1.4
BRCA2				
chr13:32890632T>C	Екзон 2	(rs587782872) / c.35T>C / p.Phe12Ser	4.2	—
chr13:32930581T>A	Екзон 15	c.7452T>A / p.L2484=	4.2	—
chr13:32945126T>C	Екзон 20	c.8521T>C / p.Phe2841Leu	—	1.4
chr13:32930673C>T	Екзон 15	rs28897744 / c.7544C>T / p.Thr2515Ile	—	1.4
chr13:32973560A>T	3'UTR	c.*653A>T	4.2	—
chr13:32973746T>C	3'UTR	rs76358429 / c.*839T>C	—	1.4
chr13:32973748A>G	3'UTR	rs186619625 / c.*841A>G	—	1.4
chr13:32930601A>T	Екзон 15	rs185012573 / c.7472A>T / p.Gln2491Leu	—	1.4
chr13:32930743A>C	Екзон 15	c.7614A>C / p.Lys2538Asn	—	1.4

<i>chr13:32972542T>C</i>	Екзон 27	c.9892T>C / p.Phe3298Leu	—	1.4
<i>chr13:32973378T>A</i>	3'UTR	c.*471T>A	—	1.4

Вариант в италиански шрифт — нов за базите от данни; RefSNP ID number (rs) — Референтен идентификационен номер; cDNA — копи-ДНК (кДНК).

— *chr17:41277366T>C*, *c.-98A>G*. Посредством NGS технологията беше установен 5'UTR варианта — *g.41277366T>C*, разположен в некодиращия екзон 1 на *BRCA1*. Новата за базите от данни замяна на тимин (T) с цитозин (C) в късната верига на гена води до A>G транзиция във водещата верига и се разполага в промоторната област на *BRCA1* (17:41276400-41278001) на отстояние 98 нуклеотидни бази *upstream* от старт кодона за транскрипцията.

С цел изясняване на евентуалния ефект на *chr17:41277366T>C* върху формирането на вторичната структура и стабилността на 5'UTR областта беше извършен RNAfold анализ. В резултат на изменението беше установена пълна промяна във вторичната структура на мутантната 5'UTR *BRCA1* мРНК форма. RNAfold анализа определи и формиране на по-високо стабилна мутантна структура, за чието изграждане минималната свободна енергия е по-ниска, спрямо MFE на дивия тип (Фигура 7).



Фигура 7. RNAfold анализ на ефекта на полиморфния *c.-98A>G* вариант върху вторичната структура и стабилността на 5'UTR областта на *BRCA1* мРНК: А) Вторична структура на див тип 5'UTR *BRCA1* мРНК (MFE: -84.40 Kcal/mol); Б) Вторична структура на мутантна 5'UTR *BRCA1* мРНК форма (MFE: -91.50 Kcal/mol). Интензитетът на цвета от син (0) до червен (1) обозначава вероятността за съвояване на бази.

След проведените *in silico* анализи беше установено, че *BRCA1* варианта (*c.-98A>G*) води до формиране на консервативния при еукариотни организми „GC-бокс“ консенсусен

мотив (5'-GGGCGG-3'), функциониращ като ехансерна последователност за свързване на транскрипционния фактор Sp1 и стабилизиране на преинициаторния комплекс (ПИК). Този факт предполага евентуално положителния ефект на с.-98A>G върху транскрипцията на *BRCA1* гена.

Имайки предвид разположението на варианта (с.-98A>G) беше приложен и *in silico* анализ посредством софтуерната TFBIND програма. Установено беше, че с.-98A>G притежава способността да окаже влияние върху *cis*-регулаторната последователност за свързване на редица транскрипционни фактори към промоторната област на гена (Таблица 6).

Таблица 6. TFBIND-базирана прогноза за ефект на с.-98A>G (*BRCA1*) върху предполагаеми *cis*-последователности за свързване на транскрипционни фактори.

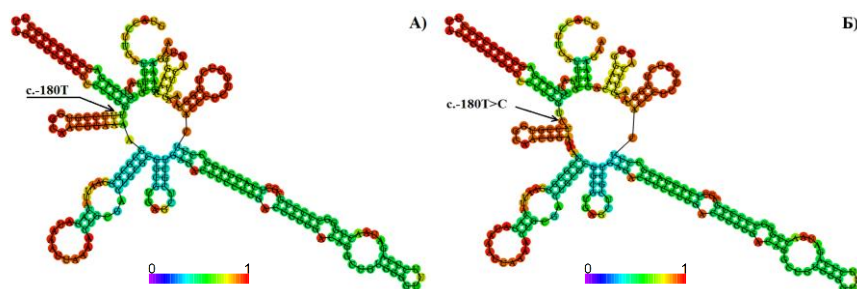
Еукариотни транскрипционни фактори	Алел	Показател	Последователност
V\$STAT1_01	A	0.796312	TGAGACTTCCTGGACGGGGGA
V\$STAT3_01	A	0.739464	TGAGACTTCCTGGACGGGGGA
V\$OLF1_01	A	0.786870	TGAGACTTCCTGGACGGGGGAC
V\$COMP1_01	A	0.779880	AGACTTCCTGGACGGGGGACAGGC
V\$AP2_Q6	A	0.830882	TGGACGGGGGAC
V\$MZF1_02	A	0.824544	GGACGGGGGACAG
V\$STAT1_01	G	0.720237	TGAGACTTCCTGGCGGGGGA
V\$OLF1_01	G	0.793396	TGAGACTTCCTGGCGGGGGAC
V\$COMP1_01	G	0.771737	AGACTTCCTGGCGGGGGACAGGC
V\$SP1_Q6	G	0.868490	CCTGGCGGGGGA
V\$GC_01	G	0.827046	CCTGGCGGGGGAC
V\$CP2_01	G	0.795455	CTGGCGGGGG
V\$CAAT_C	G	0.717394	CTGGCGGGGGACAGGCTGTGGGGT
V\$SP1_01	G	0.856172	TGGCGGGGGG
V\$AP2_Q6	G	0.830882	TGGCGGGGGAC
V\$MZF1_02	G	0.841540	GGCGGGGGACAG
V\$MZF1_01	G	0.846997	GCGGGGGG

Установеният транзиционен *BRCA1* вариант (NM_007294.3: с.-98A>G) беше наблюдаван единствено в контролната група с честота от 1.4% (1/71).

— *chr17:41277448A>G, с.-180T>C*. Нов за базите от данни 5'UTR вариант, разположен в некодиращия екзон 1 на *BRCA1* гена. Присъстващ единствено в контролната група, вариантът (*chr17:41277448A>G*) е с честота от 1.4% (1/71).

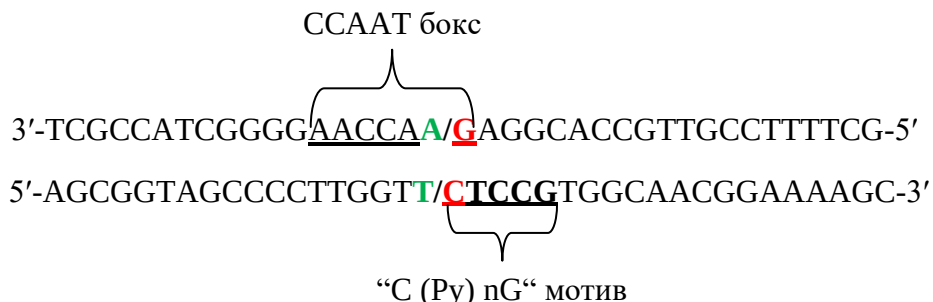
В хода на проведения RNAfold анализ, беше установено, че с.-180T>C води до частична промяна във вторичната структура на мутантната 5'UTR *BRCA1* мРНК форма,

минимално понижение в стабилността на мутантната молекулата и по-висока минимална свободна енергия за изграждане на структурата спрямо дивия тип (Фигура 8).



Фигура 8. RNAfold анализ на ефекта на полиморфния c.-180T>C вариант върху вторичната структура и стабилността на 5'UTR областта на BRCA1 мРНК: А) Вторична структура на див тип 5'UTR BRCA1 мРНК (MFE: -84.40 Kcal/mol); Б) Вторична структура на мутантна 5'UTR BRCA1 мРНК форма (MFE: -82.80 Kcal/mol). Интензитетът на цвета от син (0) до червен (1) обозначава вероятността за съвояване на бази.

След обследване на мутантната 5'UTR BRCA1 мРНК последователност, беше наблюдавано изграждане на допълнителна 5' консенсусна последователност [C (Py) nG] във водещата верига, известна още под наименованието „терминален олигопиримидинов тракт“ (Фигура 9), участващ във включването на R0011 рибозомалния белтък и опосредстващ координираното потискане на процеса трансляция. В същото време, изменението води до евентуално формиране на промоторен проксимален елемент “ССААТ” подобен бокс в не кодиращата верига на BRCA1 гена, подпомагащ включването и стабилизацията на ДНК-зависимата РНК полимераза II и инициацията на транскрипцията (Фигура 9).



Фигура 9. Схема на ефект на chr17:41277448A>G във формирането на “C (Py) nG” мотив във водещата верига и изграждане на “ССААТ” бокс в късната верига на BRCA1.

— *chr13:32930581T>A*, *c.7452T>A*. Нова за базите от данни T>A трансверзия, разположена в екзон 15 на *BRCA2* гена, водеща до синонимна субституция на аминокиселинния остатък левцин (CT**T**) с левцин (CT**A**) в позиция 2484 в кодиращия *BRCA2* продукт (p.L2484=).

Независимо от резултатите, получени от Provean и Sift анализите, определящи *c.7452T>A* варианта, като неутрален, HSF 3.0 програмата установи нарушение в нормалния сплайсинг. В резултат на *c.7452T>A*, HSF определи разрушаване на ESE последователност в екзон 15 (5'-GTCT**T**CAG-3') и създаване на ESS област (5'-CT**A**CAGAA-3'), към която в участъка 5'-T**A**CAGA-3' преференциално се свързва сплайс факторът hnRNP A1 (хетерогенен ядрен рибонуклеопротеин A1), възпрепятстващ стабилизирането на 3' акцепторния U2snRNP-U2AF65-U2AF35 сплайс комплекс и блокиращ обособяването на екзон 15 (2479—2539 aa).

Евентуалното отпадане на екзон 15 от *BRCA2* мРНК, ще доведе до синтез на мутантен *BRCA2* продукт (3357 aa) със скъсени: *BRCA2* хеликазен регион (*BRCA2_helical*: 2481—2667 aa); *BRCA2* област за взаимодействие с FANCD2 белтъка (2350—2545 aa) и на *BRCA2* област за взаимодействие с SEM1/DSS1 (2481—2832 aa).

С помощта на ProtParam софтуера беше извършен сравнителен анализ за установяване на евентуалните промени в някои биофизични и биохимични параметри на мутантния *BRCA2* белтък спрямо дивият тип. Анализът установи изграждане на 3357 аминокиселинен мутантен *BRCA2* белтък, характеризиращ се с: 6757.88 Da по-ниско молекулно тегло, 0.14 pH единици понижена изоелектрична точка, без промяна във времето за дезактивация в ретикулоцитна клетъчна култура, в дрожди и в бактериална култура от *Ешерихия коли* (*E. coli*), 0.11 единици по-висока стабилност, 0.22 единици намалена термостабилност и с 0.002 kcal/mol понижена хидрофобност (Таблица 7).

Таблица 7. ProtParam-базиран структурен анализ на първична и мутантна BRCA2 форма.

Физико-химични параметри	BRCA2 – див тип	BRCA2 – мутант
Брой аминокиселинни остатъка (aa)	3418 aa	3357 aa
Молекулно тегло (Mw)	384202.23 Da	377444.35 Da
Изоелектрична точка (pI)	6.29	6.15
Оценка за полуживот:	Ретикулоцити – 30 часа	Ретикулоцити – 30 часа
	Дрожди – >20 часа	Дрожди – >20 часа
	E. coli – >10 часа	E. coli – >10 часа
Индекс за нестабилност (II)	нестабилен (47.77)	нестабилен (47.66)
Алифатен индекс	74.13	73.91
Хидропатичен индекс (GRAVY)	-0.643	-0.645

Определеният в настоящото проучване вариант chr13:32930581T>A с неизвестно клинично значение беше установен единствено в групата на пациентите с фамилен РМЖ с честота от 4.2% (1/24).

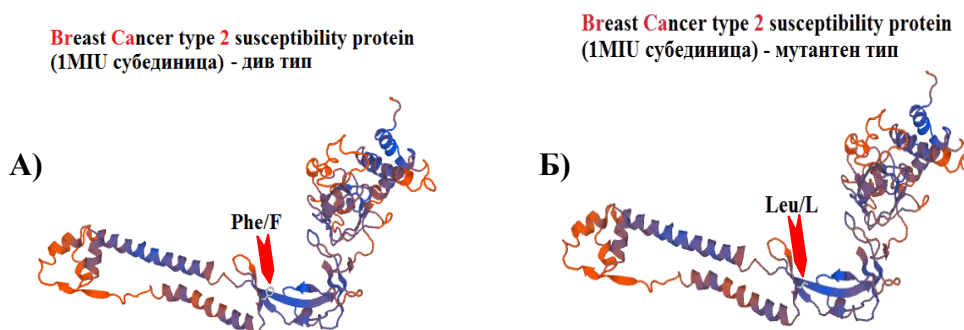
– **chr13:32945126T>C, c.8521T>C**. Нов за базите от данни BRCA2 кодиращ вариант, разположен в екзон 20. Установената транзиция на високо еволюционно консервативната аминокиселинна база тимин (PhastCons: 1) с цитозин (c.8521T>C) води до миссенс субституция на високо консервативния аминокиселинен остатък фенилаланин (**T**TT) с левцин (**C**TT) в 2841 позиция в кодиращия белтък (p.Phe2841Leu).

Новоустановеният вариант (p.Phe2841Leu) се разполага в олигонуклеотидната/олигозахаридна свързваща гънка 2 (OB2 – oligonucleotide/oligosaccharide binding fold 2) на ДНК-свързващия домен (DBD – DNA-binding domain) от BRCA2 белтъка (2804–3054aa). След проведен анализ на последователност на BRCA2 белтъка беше установено, че нормално кодиращия остатък фенилаланин (Phe/F) участва във формирането на областта, свързваща BRCA2 белтъка с едноверижни ДНК участъци и в BRCA2 интерфейсната област – “OB2/OB3”, които са част от “BRCA2DBD_OB2” региона.

Получените недостатъчно информативни резултати от проведените *in silico* анализи посредством интернет базираните Provean, Sift и PolyPhen-2 програми, наложи прилагането на Swiss-model софтуера за обследване на евентуалния ефект на

p.Phe2841Leu върху вторичната структура на BRCA2DBD–OB2 областта от BRCA2 белтъка.

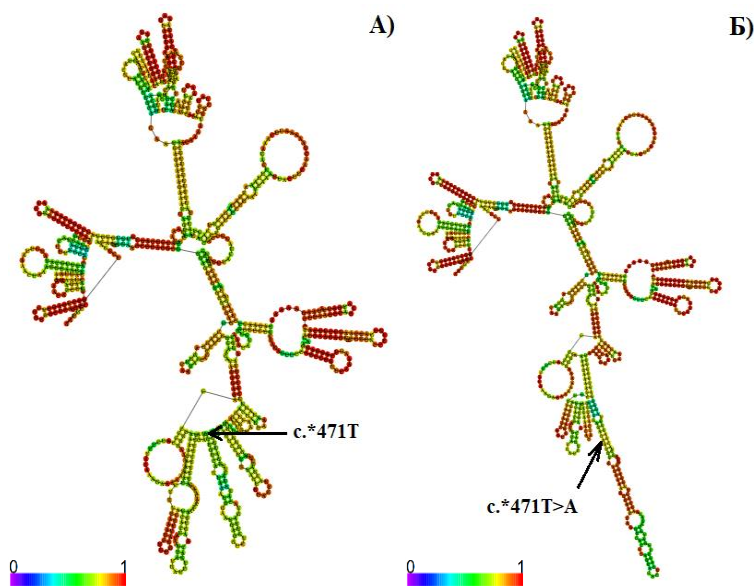
Независимо, че Phe2841Leu не променя вторичната кристалографска структура (Фигура 10), замяната на неполярния, хидрофобен с ароматен R остатък фенилаланинов аминокиселинен остатък ($pI = 5.48$) с неполярен, хидрофобен с алифатен R остатък левцин ($pI = 5.98$) води до повишение на изоелектрична точка на мутантната BRCA2DBD–OB2 форма, което най-вероятно може да компрометира свързването на BRCA2 с едноверижни ДНК участъци.



Фигура 10. Swiss-model 3D хомоложно моделиране на кристалографска структура на BRCA2DBD–OB2 домен: А) Разположение на фенилаланин (Phe/F) в състава на „BRCA2DBD–OB2“ в BRCA2 – див тип; Б) Разположение на левцин (Leu/L) в „BRCA2DBD–OB2“ в BRCA2 – мутантна форма.

Установеният, посредством NGS технологията, BRCA2 вариант (chr13:32945126T>C) беше наблюдаван единствено в групата на изследваните клинично здрави лица с честота от 1.4% (1/71).

— **chr13:32973378T>A, с.*471T>A.** Новият за базите от данни трансверзионен вариант (T→A) с неизвестно клинично значение се разполага в 3'UTR областта на BRCA2 гена, 471 базови чифта *downstream* от екзон 27. Установена единствено при клинично здрави лица (1.4%), трансверзията води до промяна на вторичната структура на 3'UTR BRCA2 мРНК областта, както и до понижение на минималната свободна енергия за изграждане на молекулата (Фигура 11).



Фигура 11. RNAfold анализ на ефекта на BRCA2 варианта *c.*471T>A* върху вторичната структура и стабилността на 3'UTR областта на BRCA2 мРНК: А) Оптимална вторична структура на див тип 3'UTR BRCA2 мРНК (-202.80 Kcal/mol); Б) Вторична структура на мутантна 3'UTR BRCA2 мРНК форма (-204.80 Kcal/mol). Интензитетът на цвета от син (0) до червен (1) обозначава вероятността за базово съвояване.

Наред с проведения RNAfold анализ, в оценката на ефекта на варианта върху евентуални *cis*-регулаторни области и предполагаеми *trans*-действащи фактори беше приложен уеб-базирания RegRNA сървър. Анализът докладва за евентуално негативно влияние на BRCA2 варианта (*c.*471T>A*) върху разположения в 3'UTR областта *cis*-действащ РНК мотив (450 — 475bp), а именно загуба на GAIT елемента (гама интерферон инхибитор на транслацията) и разрушаване на транскрипционния регулаторен мотив (5'-TGTGTC-3') за свързване на A2UG (алфа-2и глобулин, клон RAO 01) фактора. RegRNA анализа установи и понижение в афинитета за свързване на hsa-miR-425 и изграждане на мутантни *cis*-последователности за свързване на hsa-miR-183 и hsa-miR-514 (Таблица 8).

chr17:41246812A>C	Екзон 11	rs28897675 / c.736T>G / p.Leu246Val	—	1.4
chr17:41197625G>A	3'UTR	c.*70C>T	—	1.4
chr17:41197676T>A	3'UTR	c.*19A>T	—	1.4
chr17:41249364delA (хетерозигот)	Интрон 8	rs8176144 / c.548- 58delT	29.2	33.8
chr17:41249364delA (хомозигот)			8.33	11.3
BRCA2				
chr13:32889542C>T	5'UTR	c.-302C>T	4.2	—
chr13:32889548C>T	5'UTR	rs563971900 / c.- 296C>T	4.2	1.4
chr13:32889593G>A	5'UTR	c.-251G>A	—	1.4
chr13:32889665A>G	5'UTR (екзон 1)	rs956587906 / c.- 179A>G	4.16	—
chr13:32973660C>T	3'UTR	rs190094748 / c.*753C>T	—	1.4
chr13:32899388A>C	Интрон 4	rs11571610 / c.425+67A>C	—	5.6
chr13:32900318A>T	Интрон 5	c.475+31A>T	4.2	—
chr13:32900487T>C	Интрон 6	c.516+68T>C	—	1.4
chr13:32900521T>C	Интрон 6	rs56251699 / c.516+102T>C	—	1.4
chr13:32900764A>C	Интрон 7	c.631+14A>C	4.2	—
chr13:32929223A>G	Екзон 14	c.7233A>G / p.K2411=	—	1.4
chr13:32929303A>T	Екзон 14	rs80358957 / c.7313A>T / p.Asp2438Val	4.2	—
chr13:32972280G>A	Интрон 26	rs11571830 / c.9649-19G>A	—	1.4
chr13:32972900A>G	Екзон 27	rs730881600 / c.10250A>G / p.Tyr3417Cys	4.2	—
chr13:32973271T>C	3'UTR	c.*364T>C	—	1.4
chr13:32973309A>T	3'UTR	c.*402A>T	—	1.4
chr13:32973323G>A	3'UTR	rs886050116 / c.*416G>A	—	1.4
chr13:32973618A>T	3'UTR	c.*711A>T	—	1.4
chr13:32973674A>T	3'UTR	c.*767A>T	—	1.4

Вариант в италик шрифт — нов за базите от данни; RefSNP ID number (rs) – референтен идентификационен номер; cDNA – копи-ДНК (кДНК).

— *chr17:41246812A>C, c.736T>G (rs28897675)*. Вариантът представлява замяна на еволюционно консервативна аминокислотина аденин (PhastCons: ~0.64) с цитозин в изоставащата верига на *BRCA1* в позиция chr17:41246812. Разположената в екзон 11 на

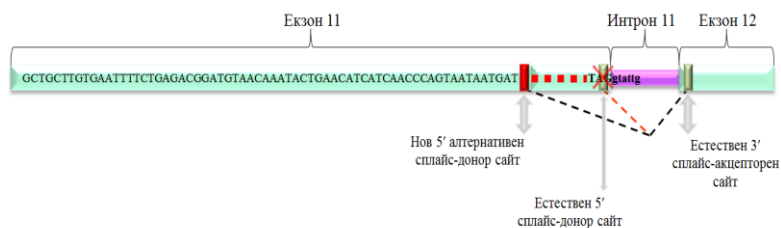
гена (ENSG00000012048) мутация води до миссенс промяна на сходни алифатни, неполярни с R остатък и хидрофобни аминокиселинни остатъци в BRCA1 (NP_009225.1), а именно левцин (TTG) с валин (GTG) в 246-та позиция от белтъчния продукт (p.Leu246Val).

За оценка на евентуалния функционален ефект, вариантът chr17:41246812A>C беше подложен на биоинформатичен анализ посредством програмите: Provean, Sift, PolyPhen-2 HDIV, PolyPhen-2 HVAR, Human Splicing Finder 3.0 (HSF 3.0), SNP FuncPred, Swiss-model и ProtParam. С изключение на Provean, Sift и на Swiss-model хомоложното моделиране, изключващи варианта, като патогенен и не засягащ активни сайтове и функционални региони в BRCA1, PolyPhen-2, HSF 3.0 и SNP FuncPred определиха c.736T>G (p.L246V), като вариант с висока вероятност за патогенност.

HumDiv (Polyphen-2) анализа, приложим за оценка на заболявания по закона на Мендел и разграничаващ вариантите с драстичен ефект от всички останали, определи изменението (L246V), като вероятно увреждащо с висока оценка за патогенност (1.000), с чувствителност – 0.00 и с висока специфичност – 1.00. HumVar (Polyphen-2) и потвърди полученения резултат от HumDiv, а именно с висока оценка за патогенност (0.981) (чувствителност – 0.57; специфичност – 0.94). Извършеното множествоно подравняване на BRCA1 последователността при различни организми, установи, че миссенс варианта в позиция 246 засяга високо еволюционно консервативна аминокиселинна позиция, което е в съгласие с HumDiv/HumVar прогнозата за вероятно патогенен ефект на Leu246Val.

След прилагане на биоинформатичния HSF 3.0 анализ, беше установено, че трансверзионната базова субституция (c.736T>G) може да доведе до формиране на *upstream* алтернативен екзон сплайс-донор сайт (GATgtgaac) в екзон 11. В случай, че бъде използван, поради високия коефициент на надеждност, алтернативният донорен сайт би могъл да доведе до загуба на 3361 bp област от екзон 11 (Фигура 12), в която се разполагат нуклеотидните последователности за двата ядрено локализационни сигнала (NLS1 и NLS2), както и за BRCA1 домениите: BRCT_assoc (IPR025994) и EIN3 (PF04873).

chr17: 41246812A>C, c.736T>G (rs28897675)



Фигура 12. Схема на c.736T>G фреймшифт мутация в BRCA1. Активиране на алтернативен сплайс-донорен мотив upstream от 5' края на екзон 11, водещ до сплайсинг нарушение на екзон 11 със загуба на 3361 bp от екзона.

В случай на използване на алтернативния донорен мотив, ще бъде синтезиран към мутантен BRCA1 продукт с характеристики описани в Таблица 10.

Таблица 10. ProtParam-базиран структурен анализ на първична и мутантна BRCA1 белтъчна форма.

Физико-химични параметри	BRCA1 – див тип	BRCA1 – мутант
Брой аминокиселинни остатъка (aa)	1863 aa	743 aa
Молекулно тегло (Mw)	207720.85 Da	83018.78 Da
Изоелектрична точка (pI)	5.29	4.93
Оценка за полуживот:	Ретикулоцити – 30 часа	Ретикулоцити – 30 часа
	Дрожди – >20 часа	Дрожди – >20 часа
	E. coli – >10 часа	E. coli – >10 часа
Индекс за нестабилност (II)	нестабилен (54.68)	нестабилен (54.43)
Алифатен индекс	69.01	74.76
Хидропатичен индекс (GRAVY)	-0.785	-0.576

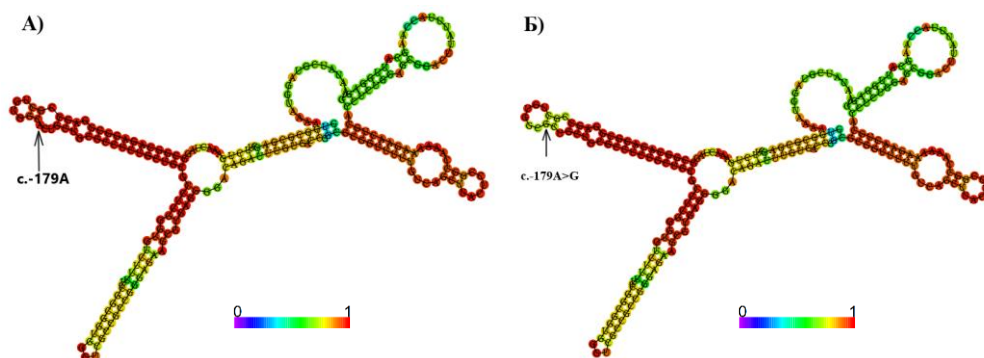
Посредством SNP FuncPred бе определено, че chr17:41246812A>C евентуално може да окаже влияние върху свързването на три сплайс фактора (SRp55, SF2/ASF2 и SRp40) към специфични екзон сплайс-енхансерни мотиви, обхващащи мутацията — rs28897675 (Таблица 11).

Таблица 11. SNP FuncPred-базирана прогноза за ефект на rs28897675 (BRCA1) върху предполагаеми ESE последователности за свързване на фактори за снаждане на пре-мРНК.

Вариант	Алел	Последователност	Сплайс фактор	Метод
rs28897675	C	CACATC	SRp55	ESEfind
rs28897675	C	CACATCA	SF2ASF2	ESEfind
rs28897675	C	TCAATC	SRp40	ESEfind

Вариантът - chr17:41246812A>C (rs28897675) в BRCA1 беше наблюдаван единствено в групата на клинично здрави лица без фамилна обремененост с честота от 1.4% (1/71), която е с 1.3% по-висока от отчетената в европейската популация, където тя е 0.1% (www.ncbi.nlm.nih.gov, S27).

— *chr13:32889665A>G, c.-179A>G (rs956587906)*. Нов за базите от данни 5'UTR транзиционен вариант, разположен в некодирания екзон 1 на BRCA2. В хода на проведения RNAfold анализ беше установено, че chr13:32889665A>G води до частична промяна във вторичната структура на мутантната 5'UTR BRCA2 мРНК форма, понижение в минималната свободна енергия за изграждането и, както и до понижение в стабилността на мутантната 5'UTR област (Фигура 13).



Фигура 13. RNAfold анализ на ефекта на варианта c.-179A>G върху вторичната структура и стабилността на 5'UTR областта на BRCA2 мРНК: А) Вторична структура на див тип 5'UTR BRCA2 мРНК (MFE: -92.40 Kcal/mol); Б) Вторична структура на мутантна 5'UTR BRCA2 мРНК форма (MFE: -94.80 Kcal/mol). Интензитетът на цвета от син (0) до червен (1) обозначава вероятността за сдвояване на бази.

Новоустановеният вариант chr13:32889665A>G беше наблюдаван единствено в групата на пациентите, диагностицирани с фамилен рак на млечната жлеза, с честота от 4.16% (1/24).

— *chr13:32973660C>T, c.*753C>T (rs190094748)*. Транзицията на цитозин към тимин е разположена в ниско консервативна позиция в 3'UTR областта на *BRCA2* и е с нисък риск за дестабилизация на *BRCA2* транскрипта. Вариантът е наблюдаван единствено в изследваната контролна група с честота от 1.4% (1/71) и е без упомената честота в европейските популации.

➤ Клас 1 – Полиморфни варианти в *BRCA1/BRCA2* гените.

В тази група се включват варианти в ДНК последователността, които не водят до промяна на аминокиселината последователност (синонимни замени), дълбоки интронни изменения, разположени далече от екзон/интрон границата с малка вероятност да засегнат сплайсинга, както и миссенс варианти с неутрален ефект.

В изследваните от нас групи бяха установени 46 полиморфни варианта в *BRCA* гените, 24 в *BRCA1* и 22 в *BRCA2* (Таблица 12).

Таблица 12. Полиморфни варианти в *BRCA1* и *BRCA2* гените.

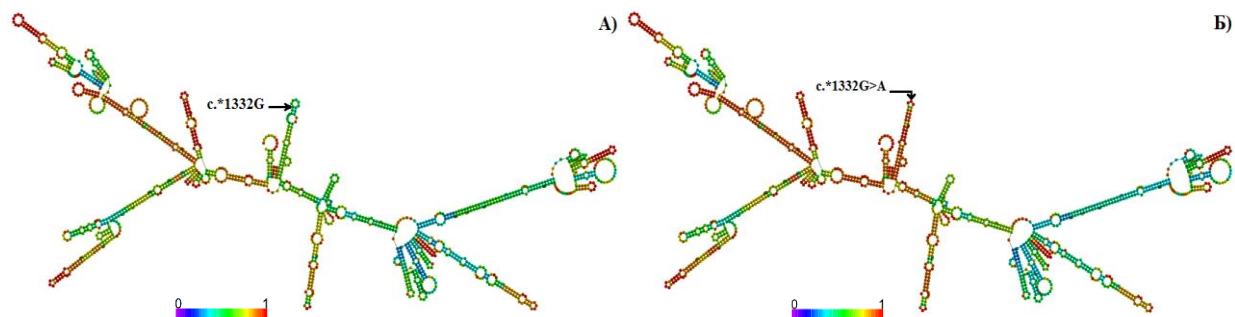
Геномна позиция	Екзон / Интрон / UTR област	refSNP ID / κДНК / белтък	Честота при пациенти (%)	Честота в контроли (%)
<i>BRCA1</i>				
chr17:41196408G>A	3'UTR	rs12516 / c.*1287C>T	37.5	45.07
chr17:41197274C>A	3'UTR	rs8176318 / c.*421G>T	37.5	45.07
chr17:41234470A>G	Екзон 13	rs1060915 / c.4308T>C / p.Ser1436=	37.5	45.07
<i>chr17:41231473delT</i>	Интрон 13	c.4358-2842delA	100	95.8
chr17:41215538G>T	Интрон 18	rs45518438 / c.5153- 148C>A	—	1.4
<i>chr17:41231362T>C</i>	Интрон 13	c.4358-2731A>G	4.2	—
<i>chr17:41231401C>T</i>	Интрон 13	c.4358-2770G>A	—	1.4
chr17:41231417C>T	Интрон 13	rs374435098 / c.4358- 2786G>A	4.2	—
<i>chr17:41246747T>C</i>	Екзон 11	c.801A>G, p.Ser267Ser	—	1.4
<i>chr17:41256253T>C</i>	Екзон 7	c.327A>G, p.K109K	4.2	—
chr17:41219804T>C	Интрон 16	rs8176233 / c.4987- 92A>G	37.5	46.5
chr17:41231516C>T	Интрон 13	rs8176193 / c.4358- 2885G>A	37.5	46.5
<i>chr17:41246786A>G</i>	Екзон 11	c.762T>C, p.Ala254Ala	—	1.4

chr17:41249364A>T	Инtron 8	rs201664159 / c.548-58T>A	4.2	1.4
<i>chr17:41215913T>C</i>	Екзон 18	c.5130A>G, p.Gly1710Gly	—	1.4
chr17:41216021G>A	Инtron 17	rs8176258 / c.5075-53C>T	—	2.82
chr17:41277187G>C	Инtron 1	rs799905 / c.-20+101C>G	33.33	45.1
<i>chr17:41231352T>C</i>	Инtron 13	c.4358-2721A>G	—	5.6
chr17:41231356A>G	Инtron 13	rs374519494 / c.4358-2725T>C	4.2	—
chr17:41196363C>T	3'UTR	rs8176320 / c.*1332G>A	—	1.4
chr17:41219750C>G	Инtron 16	rs759950362 / c.4987-38G>C	4.2	—
chr17:41219780T>C	Инtron 16	rs8176234 / c.4987-68A>G	37.5	46.5
<i>chr17:41197398A>T</i>	3'UTR	c.*297T>A	4.2	—
<i>chr17:41196373T>C</i>	3'UTR	c.*1322A>G	—	1.4
BRCA2				
chr13:32889792A>G	5'UTR	rs206118 / c.-52A>G	20.83	22.54
chr13:32890572G>A	5'UTR	rs1799943 / c.-26G>A	50	38.07
chr13:32893198delT	Инtron 2	rs755556921 / c.68-16delT	54.2	42.25
chr13:32893344A>G	Екзон 3	rs28897700 / c.198A>G / p.Gln66=	—	1.4
chr13:32903685C>T	Инtron 8	rs2126042 / c.681+56C>T	45.83	25.35
chr13:32905220delT	Инtron 9	rs751977993 / c.793+53delT	87.5	91.55
chr13:32929232A>G	Екзон 14	rs1799955 / c.7242A>G / p.S2414S	33.33	35.21
chr13:32929387T>C	Екзон 14	rs169547 / c.7397T>C / p.Val2466Ala	91.67	100
chr13:32930634G>A	Екзон 15	rs56070345 / c.7505G>A / p.Arg2502His	—	1.4
<i>chr13:32930639T>C</i>	Екзон 15	c.7510T>C / p.Phe2504Leu	4.2	—
chr13:32936646T>C	Инtron 16	rs9534262 / c.7806-14T>C	75	70.42
<i>chr13:32936678A>G</i>	Екзон 17	c.7824A>G / p.Pro2608=	—	1.4
chr13:32971070G>A	Екзон 26	rs756185318 / c.9537G>A / p.Lys3179=	4.2	—
chr13:32972207G>A	Инtron 26	rs538696265 / c.9649-92G>A	—	1.4
<i>chr13:32972400A>G</i>	Екзон 27	rs377730276 / c.9750A>G / p.Ser3250=	4.2	—

chr13:32973276A>G	3'UTR	rs7334543 / c.*369A>G	50	19.72
chr13:32973439A>G	3'UTR	rs11571836 / c.*532A>G	33.33	33.8
chr13:32973280A/-	3'UTR	rs200528973 / c.*373delA	83.33	92.96
chr13:32973737T/-	3'UTR	rs139813105 / c.*830delT	95.83	73.24
chr13:32973884A>G	downstream от <i>BRCA2</i>	rs117366711 / c.*977A>G	4.16	—
<i>chr13:32973924T/-</i>	downstream от <i>BRCA2</i>	c.*1017delT	16.67	22.54
chr13:32973923_3297392 4insT	downstream от <i>BRCA2</i>	rs35930474 / c.*1016_*1017insT	70.83	46.48

Вариант в италик шрифт — нов за базите от данни; RefSNP ID number (rs) — референтен идентификационен номер; cDNA — копи-ДНК (кДНК).

— *chr17:41196363C>T, c.*1332G>A (rs8176320)*. Установеният вариант в 3'UTR областта на *BRCA1*, без функционален ефект, представлява замяна на ниско консервативна нуклеотидна база цитозин (PhyloP показател: 0.029) с тимин, водещ до G→A транзция във водещата верига на гена (c.*1332G>A). След извършен анализ, посредством RNAfold сървър, беше установено, че c.*1332G>A води до частична промяна в структурата и в стабилността на вторичната мутантна 3'UTR структура на *BRCA1* мРНК (Фигура 14), което подкрепя определеността на *BRCA1* варианта (rs8176320), като изменение най-вероятно асоциирано с развитие на доброкачествени образувания.



Фигура 14. Потенциален ефект на c.*1332G>A върху вторичната 3'UTR структура на *BRCA1* мРНК: А) Вторична структура на див тип 3'UTR *BRCA1* мРНК (MFE: -400.00 Kcal/mol); Б) Вторична структура на мутантна 3'UTR *BRCA1* мРНК форма (MFE: -399.90 Kcal/mol). Цетовият интензитет от син (0) до червен (1) обозначава вероятността и стабилността за сдвояване на бази.

За да се изясни дали rs8176320 засяга специфични *cis*-регулаторни области, разположени в 3'UTR-ната област на гена, беше извършена кръстосана *in silico* проверка посредством програмата SNP FuncPred. Установено беше, че rs8176320 в позиция chr17:41196363 притежава потенциал да повлияе свързването на девет микроРНК (hsa-miR-101, hsa-miR-15a, hsa-miR-15b, hsa-miR-16, hsa-miR-194, hsa-miR-195, hsa-miR-424, hsa-miR-450b-5p, hsa-miR-545) към 3'UTR областта на BRCA1 мРНК (Таблица 13).

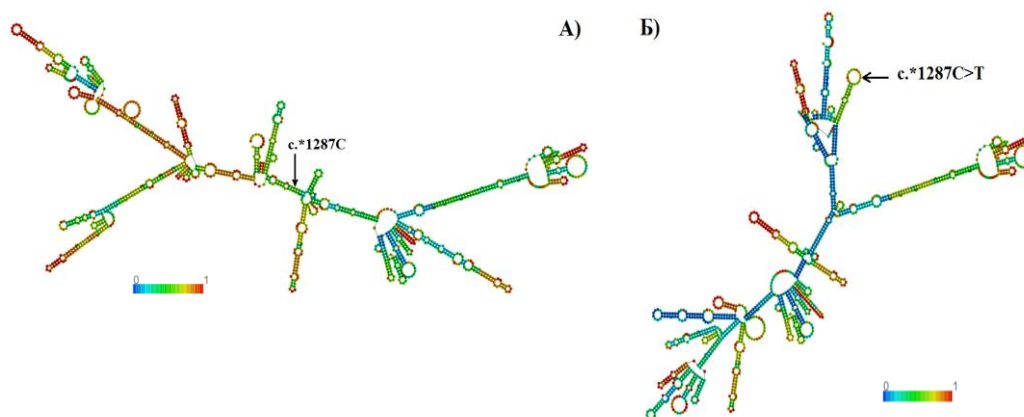
Таблица 13. Ефект на chr17:41196363C>T (rs8176320) върху предполагаеми места за свързване на микроРНК към 3'UTR областта на BRCA1 мРНК.

SNP	Алел	Последователност	микроРНК	Необходима енергия за свързване
rs8176320	C	aACAGCACAACATTTTCAAAAA	hsa-miR-101	-8.41
rs8176320	T	TAACAGCACAACATTTATA	hsa-miR-15a	-16.98
rs8176320	C	TAACAGCACAACATTTacaaaa	hsa-miR-15a	-15.25
rs8176320	T	TAACAGCACAACATTTATAAA	hsa-miR-15b	-17.48
rs8176320	C	TAACAGCACAACATTTACA	hsa-miR-15b	-19.26
rs8176320	T	TAACAGCACAACATTTata	hsa-miR-16	-16.07
rs8176320	C	TAACAGCACAACATTTACA	hsa-miR-16	-17.53
rs8176320	T	gtTAACAGCACAACATTTATA	hsa-miR-194	-13.06
rs8176320	C	gtTAACAGCACAACATTTACA	hsa-miR-194	-13.05
rs8176320	T	TAACAGCACAACATTTATAAa	hsa-miR-195	-16.26
rs8176320	C	TAACAGCACAACATTTAC	hsa-miR-195	-16.26
rs8176320	T	tAACAGCACAACATTTATAAA	hsa-miR-424	-10.83
rs8176320	C	tAACAGCACAACATTTACAAA	hsa-miR-424	-10.76
rs8176320	C	aTTTACAAAACGTATTTTGTACA	hsa-miR-450b-5p	-9.12
rs8176320	T	aCAGCACAACATTTATAAAAACGt	hsa-miR-545	-18.10

След анализ на данните от NGS беше установено, че BRCA1 варианта (chr17:41196363C>T) присъства единствено в изследваната контролна група от българска популация с честота от 1.4% (1/71), която е с 0.41% по-висока спрямо докладваната в европейските популации — 0.99 % (www.ncbi.nlm.nih.gov, S28).

— **chr17:41196408G>A, c.*1287C>T (rs12516)**. След анализ на данните от NGS беше установено изменението — g.41196408G>A, локализирано в 3'UTR областта на BRCA1. Вариантът е представен с честота от 37.5% (9/24) в групата на пациентите с фамилен РМЖ и с честота от 45.07% (32/71) в контролната група.

Въпреки, че с.*1287C>T се причислява към полиморфните варианти с висока честота и е описан в dbSNP, като вариант с вероятност за развитие на доброкачествени образувания, изменението (rs12516) води до промяна на вторичната структура на 3'UTR областта на BRCA1 мРНК (Фигура 15).



Фигура 15. RNAfold анализ на ефекта на полиморфния с.*1287C>T вариант върху вторичната структура и стабилността на 3'UTR областта на BRCA1 мРНК: А) Оптимална вторична структура на див тип 3'UTR BRCA1 мРНК (MFE: -400.00 Kcal/mol); Б) Вторична структура на мутантна 3'UTR BRCA1 мРНК форма (MFE: -399.50 Kcal/mol). Интензитетът на цвета от син (0) до червен (1) обозначава вероятността за съвояване на бази.

За да бъде изяснено дали BRCA1 варианта chr17:41196408G>A засяга евентуални *cis*-действащи елементи (или регулаторни последователности), разположени в 3'UTR областта, беше извършен *in silico* анализ посредством SNP FuncPred програмата. Установено беше, че C>T транзицията в позиция chr17:41196408 (rs12516) повлиява потенциални места за свързване на шест микроРНК (hsa-miR-188-5p, hsa-miR-502-5p, hsa-miR-557, hsa-miR-623, hsa-miR-637 и hsa-miR-639) към 3'UTR областта на BRCA1 мРНК (Таблица 14).

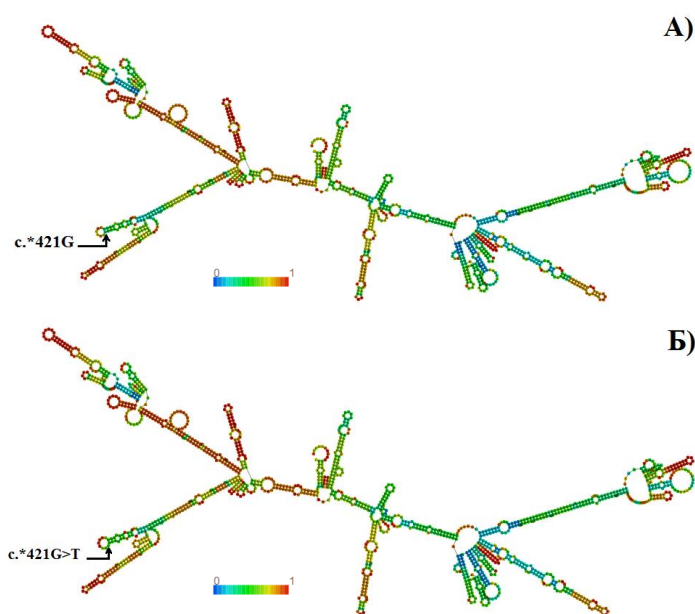
Таблица 14. Ефект на rs12516 върху предполагаеми места за свързване на микроРНК в 3'UTR областта на BRCA1 мРНК.

Вариант	Алел	Последователност	микроРНК
rs12516	G	ctgCCCTTGCACACTGGGGGG	hsa-miR-188-5p
rs12516	A	gCCCTTGCACACTAGGGGGGCTA	hsa-miR-502-5p
rs12516	G	gCCCTTGCACACTGGGGGGGCTA	hsa-miR-502-5p
rs12516	G	cCTTGCACACTGGGGGGGCTAGgga	hsa-miR-557
rs12516	A	tgCCCTTGCACACTAGGGGGGCTAGGg	hsa-miR-623
rs12516	G	tgCCCTTGCACACTGGGGGGGCTAGGg	hsa-miR-623
rs12516	A	ACTAGGGGGGCTAGGgGaaccta	hsa-miR-637
rs12516	G	ACTGGGGGGGCTAGGgGaaccta	hsa-miR-637
rs12516	A	tTCACTGCCCTTGCACACTAg	hsa-miR-639
rs12516	G	tTCACTGCCCTTGCACACTGg	hsa-miR-639

Установената честота за rs12516 (37.5%) в групата на пациентите е с 1.63% по-висока от докладваната в европейските популации, където тя е 35.87% (www.ncbi.nlm.nih.gov, S29).

— **chr17:41197274C>A, c.*421G>T (rs8176318)**. В групата на полиморфните изменения (Клас 1) попада и варианта g.41197274C>A, локализиран в 3'UTR областта на *BRCA1* гена. Единичната нуклеотидна замяна в некодиращата верига на *BRCA1* е наблюдавана с честота от 37.5% (9/24) в групата на пациентите с фамилен РМЖ и с честота от 45.07% (32/71) в контролната.

В резултат на базовата субституция (с.*421G>T), RNAfold анализа установи минимална деформация в една от фуркетните структури в мутантна *BRCA1* мРНК (Фигура 16), за чисто формиране минималната свободна енергия е леко понижена (-400.10 Kcal/mol) в сравнение с дивия тип.



Фигура 16. Потенциален ефект на rs8176318 върху вторичната 3'UTR структура на *BRCA1* мРНК: А) Вторична структура на див тип 3'UTR *BRCA1* мРНК (MFE: -400.00 Kcal/mol); Б) Вторична структура на мутантна 3'UTR *BRCA1* мРНК (MFE: -400.10 Kcal/mol).

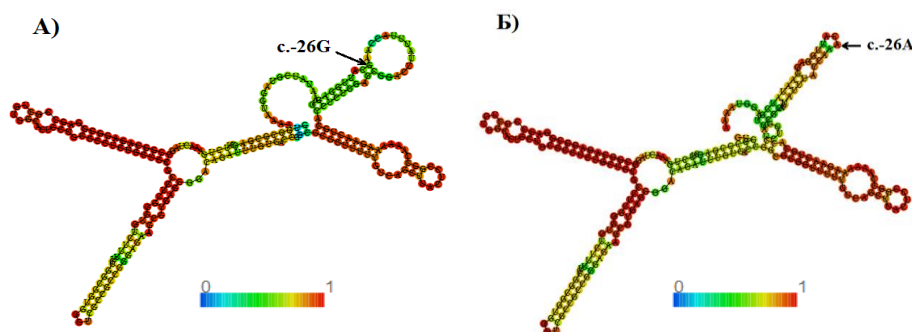
Тъй като с.*421G>T е разположен в 3'UTR областта на гена, след извършен анализ посредством SNP Function Prediction базата от данни, беше установено, че трансверзията гуанин (G) към тимин (T) засяга няколко потенциални местата за свързване на шест микроРНК (miRNA) към *BRCA1* мРНК (Таблица 15).

Таблица 15. Ефект на rs8176318 върху предполагаеми места за свързване на микроРНКи в 3'UTR областта на BRCA1 мРНК.

Вариант	Алел	Последователност	микроРНКи
rs8176318	A	AAGGGTCTgactctctgcattg	hsa-miR-1182
rs8176318	C	AAGGGTCTgactctctgcccttg	hsa-miR-1182
rs8176318	A	TCTGACTCTCTGCATTtgtgaac	hsa-miR-149
rs8176318	C	TCTGACTCTCTGCCCTTtgtgaac	hsa-miR-149
rs8176318	A	tCTGACTCTCTGCattgtgaa	hsa-miR-345
rs8176318	C	tCTGACTCTCTGCCtttgtgaa	hsa-miR-345
rs8176318	A	tCTCTGCATTTGTGAACACAGggt	hsa-miR-544
rs8176318	A	cTCTCTGCATTTGTGAACACAGg	hsa-miR-639
rs8176318	C	gAAGGGTCTGACTCTCTGCCCTTTGT	mmu-miR-540-5p
rs8176318	A	gAAGGGTCTGACTCTCTGCATTTGT	mmu-miR-540-5p

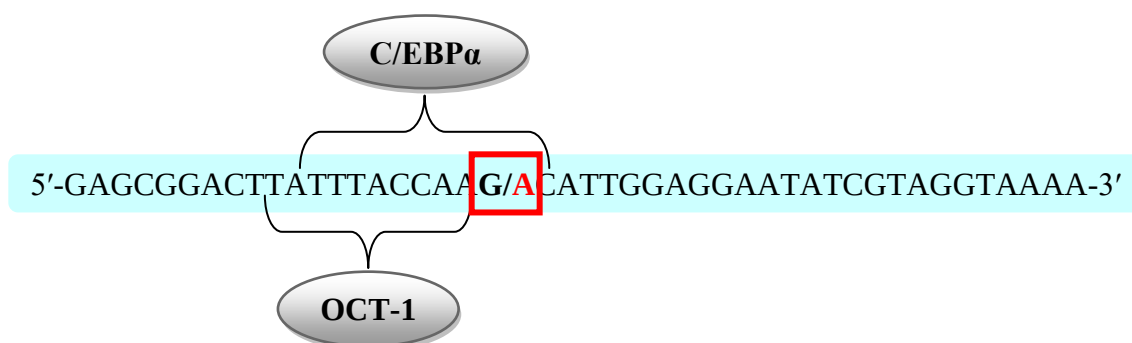
ДНК секвенционния анализ от ново поколение доведе до установяване и на друг често срещан полиморфен вариант - chr13:32890572G>A (rs1799943), разположен в 5'UTR областта на промоторния регион на BRCA2 гена. Некодиращата транзиция (с.-26G>A) в екзон 2 е наблюдавана с висока честота, както в групата на пациентите (50%), така и в контролната група (38.07%).

За да се проучи евентуалния ефект на chr13:32890572G>A върху вторичната структура и стабилността на BRCA2 мРНК беше използвана биоинформатичната RNAfold програма. В резултат на базовата субституция, RNAfold установи промяна във вторичната структурата и падеж на минималната свободна енергия за изграждане на мутантната BRCA2 мРНК форма, обхващаща 5'UTR областта (Фигура 17).



Фигура 17. RNAfold анализ на ефекта на полиморфния с.-26G>A вариант върху вторичната структура и стабилността на 5'UTR областта на BRCA2 мРНК: А) Оптимална вторична структура на див тип 5'UTR BRCA2 мРНК (-92.40 Kcal/mol); Б) Вторична структура на мутантна 5'UTR BRCA2 мРНК форма (-92.10 Kcal/mol). Интензитетът на цвета от син (0) до червен (1) обозначава вероятността за сдвояване на бази.

За установяване на предполагаеми последователности за свързване на транскрибционни фактори към полиморфния *BRCA2* участък, успоредно бяха приложени предикторните програми FuncPred и AliBaba2.1 (<http://gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/index.html>, S30). AliBaba2.1 анализа установи създаване на участък (TTTACCAAGC > TTTACCAAAC) за свързване на транскрипционния фактор C/EBP α (ССААТ-енхансер-свързващ белтък алфа), който частично препокрива, но не засяга директно *cis*-действащия транскрипционен регулаторен мотив (5'TATTTACCAA3') за свързване на OCT-1 (октамер-свързващ протеин-1) белтъка с промотора на *BRCA2* (Фигура 18).



Фигура 18. Ефект на с.-26G>A полиморфен вариант, разположен в 5'UTR областта на *BRCA2*.

3. Молекулярно-генетичен анализ за наличие на мутационни изменения в *STK11* гена.

За носителство на мутации в *STK11* гена, посредством метода на топене с висока разрешителна способност (HRM) и метода на секвениране по Сангер, бяха анализирани:

- 73 туморни проби на пациенти от българска популация със спорадичен първичен инвазивен РМЖ и 22 кореспондиращи кръвни проби, използвани като контроли;
- 22 туморни проби на пациенти диагностицирани с фамилен РМЖ и 10 кръвни проби от клинично здрави лица без фамилна обремененост от българска популация.

Проведените молекулярно-генетични изследвания доведоха до установяване на четири точкови мутации (с.322A>T, с.440G>A, с.290+36G>T, с.*16+18C>A) при 7 пациента (Таблица 16) със спорадичен РМЖ ($\approx 9.59\%$). Генетични изменения, засягащи кодиращите области на гена *STK11*, бяха установени при два пациента (2.74%), един нонсенс патологичен вариант (с.322A>T, р.K108X) и един миссенс (с.440G>A,

p.Arg147His) с неизвестно клинично значение за заболяването. Нито един от екзонните варианти не беше установен в изследваната контролна група. Данни за наличие на генетични изменения в *STK11* в изследваната група на пациенти с фамилен рак на млечната жлеза не бяха регистрирани.

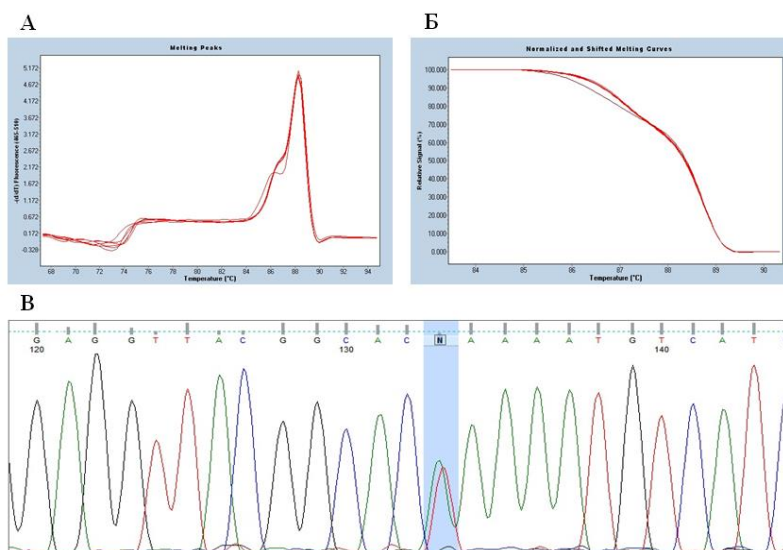
Таблица 16. Установени генетични изменения в *STK11* гена при пациенти със спорадичен РМЖ.

Пациент №	Геномна позиция	Екзон/Инtron позиция	refSNP ID / кДНК / белтък
39	chr19:1218448A>T	Екзон 2	c.322A>T / p.K108X
72	chr19:1219389G>A	Екзон 3	rs587780717 / c.440G>A / p.R147H
7	chr19:1207239G>T	Инtron 1	rs3764640 / c.290+36G>T
6,24,49,63	chr19:1226681C>A	Инtron 9	c.*16+18C>A

4. Биоинформатичен (*In silico*) анализ и класификация на варианти в *STK11* при пациенти с РМЖ и контроли.

➤ Клас 5 – Патологични варианти в *STK11* гена.

След проведен HRM-секвенционен анализ беше установен един единствен патологичен вариант (1.37%) в *STK11* при пациент със спорадичен рак на млечната жлеза (Фигура 19).

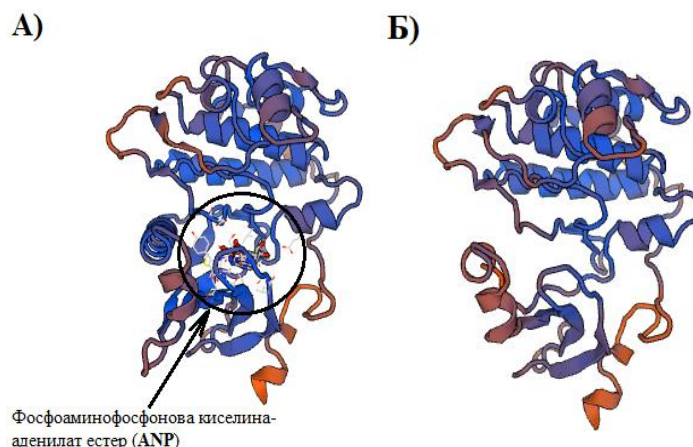


Фигура 19. HRM-секвенционен профил на *STK11* вариант *c.322A>T* в екзон 2 при пациент №39: А – Криви на топене на PCR продукти за екзон 2 от пациенти и контроли спрямо установения в *STK11* вариант *c.322A>T* при пациент №39; Б – Нормализирани криви на топене на PCR продукти за екзон 2 от пациенти и контроли спрямо установения в *STK11* гена вариант *c.322A>T* при пациент №39; В – ДНК секвенционен профил на *STK11* варианта *c.322A>T* в PCR продукт за екзон 2 от пациент №39. Мястото на базовата замяна е обозначена в син фон.

Наблюдаваната аденин към тимин трансверзия (chr19:1218448A>T) се разполага в екзон две на *STK11* и е установена в туморна проба на 74 годишна пациентка със спорадичен РМЖ с размер на първичния тумор около 2 см (T1); негативен лимфен статус (N0); умерено диференциран тумор (G2); смесен хистологичен тип (L+D); положителен статус по отношение на ER, *PIK3CA* и *ATM*; отрицателен статус по отношение на PR и *p53* гена, отрицателен статус за метилиране в промотора на *BRCA1* гена и без известен статус за свръхекспресия на HER2 рецептора. Присъствие на *STK11* варианта (chr19:1218448A>T) в периферна кръв от същия пациент не беше установено.

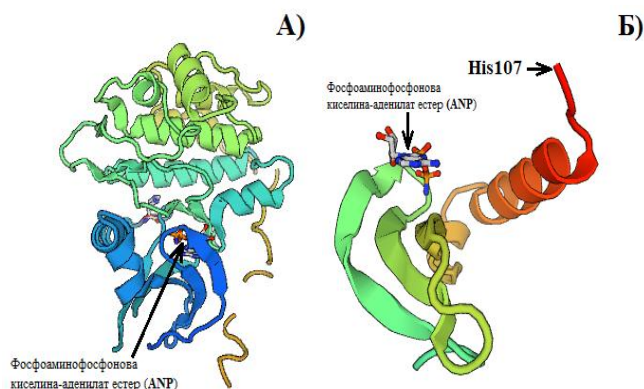
Наблюдаваната геномна трансверзия (c.322A>T, COSM6083778) нарушава слайс-енхансерния мотив (5'-AAAAA-3') в екзон 2, което възпрепятства нормалния *STK11* сплайсинг и води до изпускане на екзон 2 (c.291_374del) от *STK11* мРНК. Евентуалната загуба на екзон 2, кодиращ 28 аминокиселинни остатъка, дови до синтез на 405 аминокиселинна мутантна *STK11* изоформа (Фигура 20) със скъсена последователност, участваща, както във формирането на интерфейсната гънка за връзка между *STK11* с

адапторите MO25 и STRAD α , така и в изграждането на аденозин трифосфатната (АТР) свързващата точка и полипептид-субстрат свързващото място.



Фигура 20. Swiss-model 3D хомоложно моделиране на вторична кристалографска структура на STK11 белтък: А) STK11 div тип (PDB Id: 2WTK); Б) Мутантна STK11 форма (с.291_374del).

В случай, че не настъпи промяна в нормалния STK11 сплайсинг, на белтъчно ниво, трансверзията (с.322A>T) води до изменение на нормалния кодон (AAA), кодиращ консервативния при бозайници аминокиселинен остатък лизин с нонсенс кодон (TAA: Охра) в 108 позиция в синтезирания мутантен STK11 белтък (NP_000446.1: p.K108*). Проведеният Swiss-model анализ оредели изграждане на 107 аминокиселинна мутантна STK11 форма (Фигура 21), характеризираща се с по-ниско молекулно тегло, със значително по-висока реактивоспособност, с по-висока термостабилност и по-висока хидрофилност (Таблица 17).



Фигура 21. Swiss-model 3D хомоложно моделиране на вторична кристалографска структура на STK11 белтък: А) STK11 div тип (PDB Id: 2WTK); Б) STK11 мутантна форма (p.K108*).

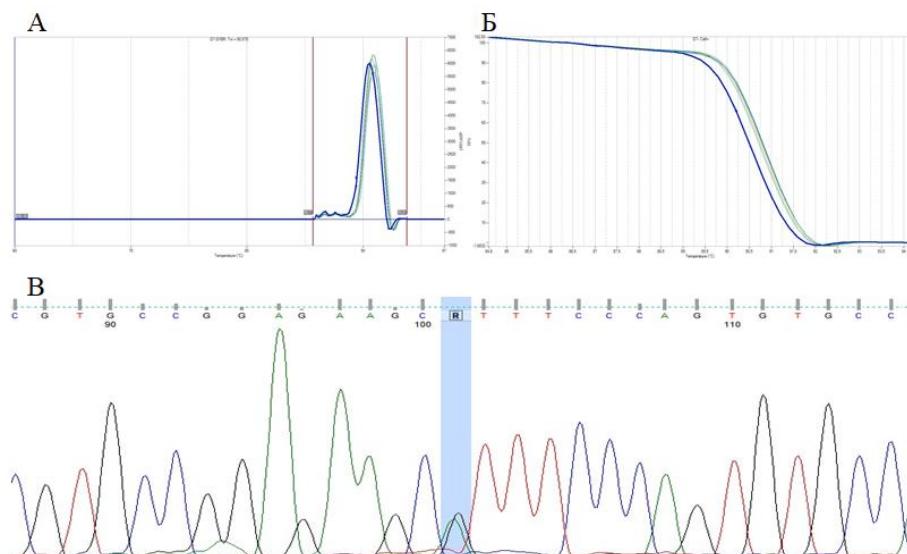
Таблица 17. ProtParam-базиран анализ на първична и мутантна STK11 форма.

Физико-химични параметри	STK11 – див тип	STK11 – мутант
Брой аминокиселинни остатъка (aa)	433 aa	107 aa
Молекулно тегло (Mw)	48635.82 Da	12396.68 Da
Изоелектрична точка (pI)	7.12	9.94
Оценка за полуживот:	Ретикулоцити – 30 часа	Ретикулоцити – 30 часа
	Дрожди – >20 часа	Дрожди – >20 часа
	E. coli – >10 часа	E. coli – >10 часа
Индекс за нестабилност (II)	нестабилен (51.89)	нестабилен (50.73)
Алифатен индекс	80.95	97.38
Хидропатичен индекс (GRAVY)	-0.441	-0.500

С изключение на незасегнатия N-терминален край, нонсенс варианта (p.K108*) води до скъсяване на киназения домен и до загуба на: интерфейлната гънка за връзка между STK11 с адапторните белтъци MO25 и STRAD α , аденозин трифосфатната (ATP) свързващата точка и на полипептид-субстрат свързващото място.

➤ Клас 3 – Варианти с неизвестно клинично значение в *STK11* гена.

Методът на топене с висока разрешителна способност с последващ секвенционен анализ доведоха до установяване на транзиционния гуанин към аденин вариант (c.440G>A, rs587780717), разположен в позиция chr19:1219389 от екзон 3 на *STK11* (Фигура 22).



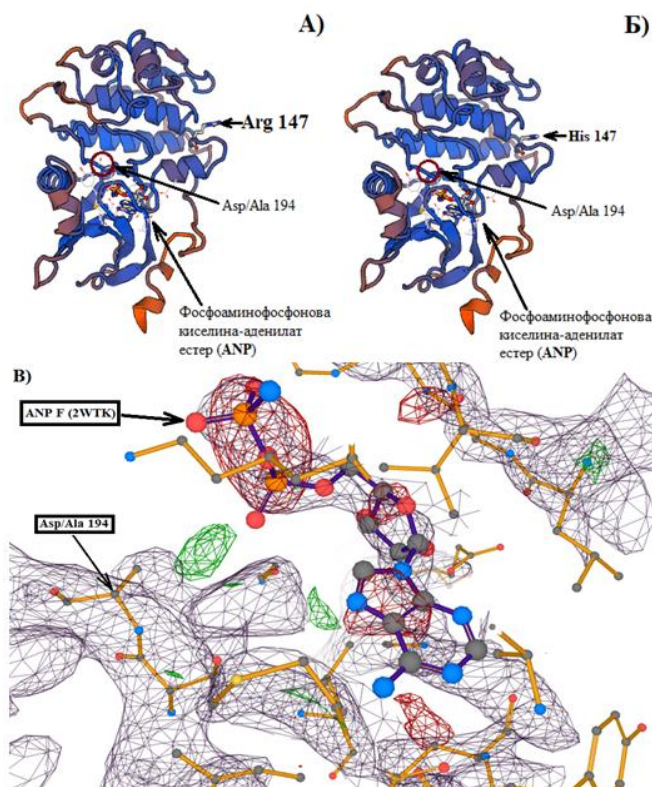
Фигура 22. HRM-секвенционен профил на *STK11* вариант с.440G>A в екзон 3 при пациент №72: А – Криви на топене на PCR продукти за екзон 3 от пациенти и контроли спрямо установения в *STK11* гена вариант с.440G>A при пациент №72; Б – Нормализирани криви на топене на PCR продукти за екзон 3 от пациенти и контроли спрямо установения *STK11* вариант с.440G>A при пациент №72; В – ДНК секвенционен профил на *STK11* варианта с.440G>A в PCR продукт за екзон 3 от пациент №72. Мястото на базовата замяна е обозначена в син фон.

Изменението води до миссенс замяна на еволюционно консервативния основен, полярен и хидрофилен аминокиселинен остатък аргинин (C**G**T) с сходния по характеристика остатък хистидин (C**A**T) в 147 позиция на *STK11* белтъка (NP_000446.1: p.Arg147His).

За оценка на евентуалния ефект на *STK11* варианта — chr19:1219389G>A (с.440G>A, p.Arg147His), бяха приложени уеб-базираните биоинформатични програми Proven, Sift, PolyPhen-2, LoFtool и Swiss-model. Независимо от факта, че Proven и Sift определят изменението (chr19:1219389G>A), като патогенно (-3.51 и 0.036, съответно), LoFtool дифинира варианта, като вероятно увреждащ. С цел яснота относно ефекта, приложеният високо чувствителен и специфичен PolyPhen-2 анализ оцени миссенс варианта (p.Arg147His), като изменение асоциирано с развитие на доброкачествени образувания.

Фактът, че Swiss-model анализа не установи значителна промяна в общата структура на мутантната *STK11* форма (идентичност на аминокиселинна последователност — 99.34%) в сравнение с дивия тип (Фигура 23 — А, Б), миссенс замяната на аргининия

остатък ($pK=12.5$) с хистидинов ($pK=6.0$) води до промяна на общия заряд на STK11 белтъка. В резултат на електростатичната промяна, аминокиселинните остатъци, формиращи фосфоаминофосфоновата киселина-аденилат естерния (ANP) джоб, са редуцирани с един, а именно претърпяващия декарбоксилиране L-аспартат (Asp/D) в β -аланин (Ala/A) в 194 позиция на STK11 (Фигура 23 — В).



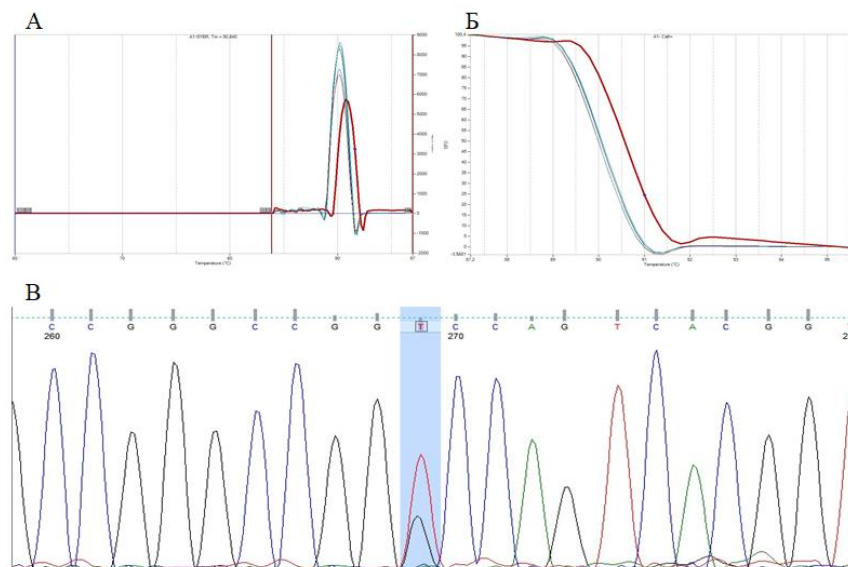
Фигура 23. Swiss-model хомоложно моделиране на вторична кристалографска структура на STK11 белтък: А) STK11 див тип (PDB Id: 2WTK); Б) STK11 мутантна форма (p.Arg147His); В) Разположение на аспартат/аланин в 194 позиция за изграждане на фосфоаминофосфоновата киселина-аденилат естерния джоб в STK11.

Установено беше, че честотата на STK11 варианта (rs587780717) в групата на пациентите със спорадичен РМЖ е с 1.369% по-висока от докладваната в европейската (не финландска) популация, където тя е 3.631e-05% (<http://exac.broadinstitute.org>, S31).

➤ Клас 2 – Вероятно полиморфни варианти в STK11 гена.

— **chr19:1207239G>T, c.290+36G>T (IVS1+36G>T; rs3764640).** Вероятно полиморфен вариант — g.1207239G>T (NC_000019.10) е разположен в интрон 1 на STK11

(ENSG00000118046) и е установен в една туморна проба (1.37%) и кореспондираща кръвна проба на пациент със спорадичен РМЖ (Фигура 24).



Фигура 24. HRM-секвенционен профил на *STK11* вариант с.290+36G>T в интрон 1: А – Криви на топене на PCR продукти за интрон 1 на пациенти и контроли спрямо установения в *STK11* вариант с.290+36G>T при пациент №7; В – Нормализирани криви на топене на PCR продукти за интрон 1 от пациенти и контроли спрямо установения в *STK11* вариант с.290+36G>T при пациент №7; В – ДНК секвенционен профил на *STK11* варианта с.290+36G>T в PCR продукт за интрон 1 от пациент №7. Мястото на базовата замяна е обозначена в син фон.

Независимо, че трансверзията (G>T) не оказва директно влияние върху консенсусната 5' сплайс-донорна последователност (5'-GAAGtaagt-3'), HSF анализа установи предполагаем негативен ефект на *STK11* варианта (с.290+36G>T) върху препокриващите се ISE (5'-ggccagtc-3') и ISS (5'-ggccgggc-3') мотиви, което евентуално може да възпрепятства свързването на сплайс фактора SC35. Наред с евентуалното си негативно влияние върху *STK11* сплайсинга, посредством RegulomeDB базата от данни беше установено, че варианта (с.290+36G>T) оказва и негативно влияние върху свързването на няколко транскрипционни фактора към промотора на гена (Таблица 18).

Таблица 18. Влияние на *STK11* варианта *chr19:1207239G>T* (*rs3764640*) върху регулаторни участъци за свързване на транскрипционни фактори (<https://www.broadinstitute.org/>, S32).

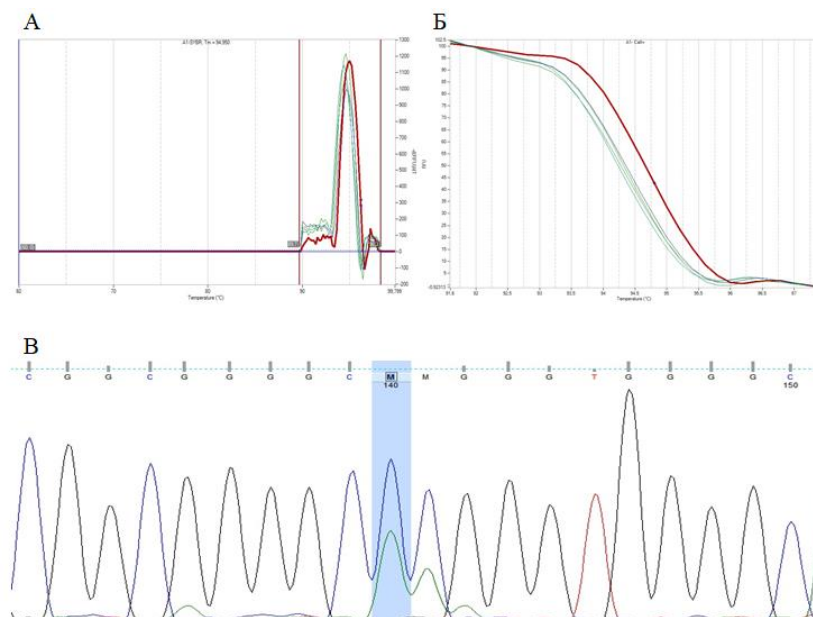
Транскрипционен фактор ID:	Верига	Референтна стойност (Kcal/mol)	Мутантна стойност (Kcal/mol)
BHLHE40_disc2	+	10.6	11
ELF1_disc3	+	10.3	8.3
HEY1_disc2	+	10.9	9.9
SRF_disc2	-	10.6	7.5
Sin3Ak-20_disc7	+	11.3	8.3
YY1_disc4	-	10.7	8.5

“+“ — водеща верига; “-“ — късна верига.

Установеният в групата на пациентите със спорадичен рак на млечната жлеза *STK11* вариант (*rs3764640*) е наблюдаван с по-ниска честота от докладваната в европейските популации, където тя е 21.97% (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>, S33).

➤ Клас 1 – Полиморфни варианти в гена *STK11*.

Скринингът за наличие на генетични изменения в *STK11*, осъществен посредством метода на топене с висока разрешителна способност с последващ секвенционен анализ, доведе до установяване на базова трансверзия цитозин към аденин (с.*16+18C>A) в интрон 9 на *STK11*, 34 базови чифта *downstream* от 5' сплайс-донорния участък, обхващащ “екзон 9/интрон 9“ (Фигура 25).



Фигура 25. HRM-секвенционен профил на *STK11* вариант с.*16+18C>A в интрон 9 при пациент със спорадичен РМЖ: А – Криви на топене на PCR продукти за интрон 9 на пациенти и контроли спрямо установения в *STK11* гена вариант с.*16+18C>A; Б – Нормализирани криви на топене на PCR продукти за интрон 9 на пациенти и контроли спрямо установения в *STK11* вариант с.*16+18C>A; В – ДНК секвенционен профил на *STK11* варианта с.*16+18C>A в PCR продукт за интрон 9. Мястото на базовата замяна е обозначена в син фон.

Извършеният *in silico* анализ, посредством HSF 3.0 софтуера, определи евентуално индиректно влияние на с.*16+18C>A върху пре-мРНК сплайсинг на *STK11*. Трансверзията на консервативната нуклеотидна база цитозин при бозайници с аденин води до разрушаване на *cis*-последователността (5'-ggggc**cc**g-3'), изграждаща интрон сплайс-репресорния мотив в интрон 9, както и води до изграждане на нова мутантна интрон сплайс-енхансерна последователност (5'-gggc**A**c-3').

Новият за базите от данни полиморфен вариант (g.1226681C>A), попадащ под номенклатурно обявявания в dbSNP базата от данни вариант — rs1057522995, беше наблюдаван в туморни проби на четири пациента със спорадичен РМЖ (5.48%), в кръвна проба на един от пациентите и в три проби на клинично здрави лица (30%).

V. ОБСЪЖДАНЕ.

1. Мутационен скрининг на пациенти с фамилен РМЖ и контролни индивиди, посредством Illumina таргетно секвениране от ново поколение на гените *BRCA1/2*.

Генетичните изменения в гените *BRCA1* и *BRCA2* обясняват приблизително 15 до 20% от фамилните случаи на рак на млечната жлеза (Balmaña et al, 2011). Повечето от генетичните варианти, около 70% при *BRCA1* и 90% при *BRCA2*, са представени от еднонуклеотидни инсерции, делеции, безсмислени (нонсенс) и погрешно-смислени (миссенс) варианти разпръснати по цялата нуклеотидна последователност без да се наблюдават обособени горещи точки, както и големи пренареждания, делеции и дупликации на повече от 500 килобази от ДНК, които обхващат един или повече кодиращи участъци (Narod и Salmena. 2011).

Проведеният мутационен скрининг на пациенти с фамилен РМЖ и контролни индивиди, чрез Illumina таргетно екзомно секвениране от ново поколение на гените *BRCA1/2*, показва висока възпроизводимост на резултатите, по отношение на обем и качество на генерирани секвенции. Мутационният спектър в гените *BRCA1/2* беше хетерогенен. Открити бяха мутации, водещи до изместване на рамката на четене, синонимни, несинонимни, както и мутации, засягащи сплайсинг местата. Наблюдавани са различни полиморфни варианти, разположени, както в екзонни, така и в интронни участъци.

1.1. Мутации с патогенен и предполагаемо патогенен ефект в гените *BRCA1/2*.

Една от установените патологични мутации с доказан ефект (4.2 %, 1/24) беше разположена в интрон две на *BRCA2* в позиция chr13:32890665 и засягаше първата позиция от 5' сплайс-донорния район след екзон 2 (c.67+1G>A ; rs81002796).

Проведеният *in silico* анализ прогнозира разрушаване на 5' сплайс-донорната последователност след екзон 2 и формиране на *upstream* мутантен сплайс-акцепторно място, което води до изместване на рамката на четене (frameshift) с пропускане на екзон 2 от транскрипта на *BRCA2*. Полученият резултат е в съгласие с функционално доказания frameshift ефект на *BRCA2* варианта (c.67+1G>A) в *in vitro* условия върху пре-мРНК сплайсинг на *BRCA2* от Bonatti и съавт. (Bonatti et al., 2006).

Интересно е да се отбележи, че в изследване проведено върху 177 сефарадски пациенти с рак на гърдата и яйчниците (потомци на евреи от Иберийския полуостров), Sagi и колеги установяват високо присъствие на *BRCA2* варианта (c.67+1G>A) в конкретната извадка. След проведен хаплотипен анализ, авторите определят *BRCA2*

варианта, като изменение с ефект на основателя, характерен за сефарадските евреи (Sagi et al., 2011).

От гледна точка на функционалното си изражение, освен до загуба на 123 аминокиселинна последователност, включваща N-крайно разположения BRCA2 участък (21–39aa), участващ в установяване на връзката между BRCA2 с PALB2 (Oliver et al., 2009), трансактивационния BRCA2 домен (18–105aa) (Milner et al, 1997; Milner et al, 2000), както и N-терминално разположения PBD-свързващ мотив „S-[pT/pS]-P“ (72–81aa), участващ в осъществяване на връзката между BRCA2 с Plk1 (Yata et al, 2014), BRCA2 фреймшифт мутацията води до изграждане на по-леплива мутантна BRCA2 молекула, което се асоциира с формиране и натрупване на по-трудно разградими белтъчни конгломерати в клетъчното съдържимо.

Друг регистриран от нас патогенен вариант в BRCA2, представляващ транзиция на гуанин към аденин (G>A), засяга третата нуклеотидна база след 5' сплайс края на екзон 21 (chr13:32950931G>A; c.8754+3G>A). Въпреки че, варианта (c.8754+3G>A) е нов за базите от данни, изменението попада под номенклатурно обявления за патогенен в dbSNP базата от данни - rs397508007 (c.8754+3G>C). Извършеният *in silico* анализ прогнозира разрушаване на нативната 5' сплайс-донорна последователност и използване на *downstream* алтернативен сплайс-донорен мотив. В резултат на което ще бъдат задържани на 46 нуклеотидни чифта от интрон 21 към пре-мРНК транскрипт и преждевременно ще бъде интродуциран стоп кодон, предизвикващ отпадане на 499 аминокиселинни остатъка от BRCA2, участващи в изграждането на част от олигонуклеотидната/олигозахаридна свързваща гънка 2 (BRCA2DBD_OB2) и на цялата олигонуклеотидната/олигозахаридна свързваща гънка 3 (BRCA-2_OB3) от C-крайно разположения сайт за свързване на BRCA2 белтъка с едноверижни ДНК вериги (BRCA2DBD).

Установеният от нас резултат е в съгласие с докладваните данни от няколко изследователски групи, основавайки се на проведени RT-PCR, секвенционен, *in vitro* и *in silico* анализи, характеризиращи ефекта на сходния BRCA2 вариант - c.8754+3G>C, като патологичен (Brandão et al., 2011; Thomassen et al., 2012; Colombo et al., 2013).

В настоящия дисертационен труд бяха установени и четири вероятно патологични изменения в гените BRCA1/2 (c.5062_5064delGTT, c.302-29A>G в BRCA1 и c.47A>T, c.9508G>T в BRCA2), от които три са нови.

Вероятно патологичния *BRCA1* вариант — c.5062_5064delGTT (rs80358344) е разположен в екзон 17 на гена и води до загуба на аминокиселинния остатък валин (p.Val1688del) от *BRCA1*-BRCT 1 (1650-1724aa) домена. Независимо, че проведените Swiss-model анализ установи минимално отклонение спрямо дивия тип, делецията на валина води до структурно компрометиране в една от двете *BRCA1* повърхностни гънки (Ser1655 и Lys1702), участващи във формиране на връзката между *BRCA1*-BRCT 1 с pSer990 от BACH1 (Shiozaki et al., 2004), което може да възпрепятства формирането на *BRCA1*/BACH1 комплекса, необходим за осъществяване на поправката на възникнали в ДНК повреди.

В литературата съществуват няколко изследвания в подкрепа на описания в дисертационния труд резултат за евентуалния ефект на *BRCA1* варианта (p.Val1688del). В изследване за носителство на изменението с ефект на основателя (p.Val1688del) при 12 семейства с рак на млечната жлеза и яйчниците от Североизточна Италия, проведено Malacrida през 2008 година и в серии от функционални анализи, проведени година по-късно от De Nicolo и колеги, върху способността на мутантния белтък (Δ Val*BRCA1*) да сформира комплекси с BRIP1, CtIP и Rap80 белтъците е обобщен патологичния ефект на *BRCA1* делецията (Malacrida et al., 2008; De Nicolo et al., 2009).

Независимо от тези факти, в литературата липсват данни за ефекта на варианта (p.Val1688del) върху формирането на комплекси между *BRCA1*-BRCT домена с други функционални партньори, като ABRAXAS, ATRIP и Ацетил-КоА карбоксилаза 1, участващи в поправката на възникнали в ДНК повреди, в поддържането на геномната стабилност и в метаболизма на мастните киселини. Именно тази липса на доказателства определя *BRCA1* варианта (p.Val1688del), като вероятно патологичен.

В проучването беше установен и определен, като вероятно патологичен, *BRCA2* варианта — chr13:32890644A>T (c.47A>T). Новата за базите от данни екзонна трансверзия попада в позиция, в която преди това е установен и определен, като изменение с неизвестно клинично значение сходния *BRCA2* вариант — rs876660440 (c.47A>G). Разликата в интерпретацията на измененията идва от факта, че за новоустановения *BRCA2* вариант (c.47A>T) е извършена биоинформатична оценка. Допуснахме възможността, трансверзията да доведе до нарушение на нормалния *BRCA2* пре-мРНК сплайсинг с пропускане на екзон 2. Наред с пропускане на стартовия кодон за транскрипцията,

разположен в екзон 2 на гена, мутацията може да доведе до N-терминално скъсяване на BRCA2 белтъка с 123 аминокиселинни остатъка, част от които участват в реализирането на връзка между BRCA2 с PALB2 (PDBe: 3eu7). Загубата на N-крайно разположения център от BRCA2, необходим за взаимодействие на BRCA2 с C-крайния WD-40 домен от PALB2 (партньор и локализатор на BRCA2), ще възпрепятства генерирането на комплекса “BRCA1/PALB2/BRCA2/RAD51“, играещ основна роля в поддържането на геномния интегритет (Gudmundsdottir и Ashworth, 2006; Hartford et al., 2016) и в поправката на възникнали повреди в ДНК, посредством механизма хомоложна рекомбинация (Sy et al., 2009).

Класифициран в групата на вероятно патологичните изменения беше и новия за базите от данни BRCA2 вариант — chr13:32971041G>T (c.9508G>T). Трансверзионното изменение беше установено единствено в групата на пациентите с фамилен РМЖ с честота от 4.2% (1/24) и води до миссенс замяна на аминокиселинния остатък аспартат с тирозин в областта “олигонуклеотид/олигозахарид свързваща гънка 3“ (BRCA-2_OB3: 3057–3186 aa) на BRCA2 белтъка (p.Asp3170Tyr). Независимо от факта, че миссенс варианта няма директно влияние върху активните региони, разположени в BRCA-2_OB3 (сайт за свързване на BRCA2 белтъка с едноверижни ДНК участъци и BRCA2 свързващата повърхност II — GBS-II), несинонимната замяна води до пространствена реорганизация на BRCA-2_OB3 областта, до загуба на три от петте Hg^{2+} лиганда от BRCA2-DSS1 комплекса, както и до нарушаване на целостта на “BRCA2DBD_OB2 — Tower — BRCA-2_OB3“ областта за свързване на BRCA2DBD-DSS1 с едноверижни ДНК вериги.

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

Посредством NGS анализа бяха установени деветнадесет *BRCA1/2* варианта с неизвестно клинично значение, от които ≈63% (12/19) са нови.

В настоящото проучване беше установен и определен, като вариант с неизвестно клинично значение изменението chr17:41249263G>A (rs1799965) в *BRCA1*, присъстващо единствено в групата на пациентите с честота от 4.2% (1/24). Наблюдаваната C→T транзиция в копи-ДНК (c.591C>T) нарушава 5' сплайс-донорния сайт в „екзон 9/интрон 9“ участъка и активира *upstream* алтернативен такъв. Като ефект, фреймшифт мутацията

(p.Gly183Valfs) дови до загуба на не функционално значимия екзон 9 от BRCA1 белтъка и до възникване на преждевременен стоп кодон в екзон 11.

Подобен резултат е наблюдаван от Santos и колеги в изследване за носителство на BRCA1 варианта (c.591C>T) при семейства с рак на млечната жлеза и яйчниците от португалска популация (Santos et al., 2014). В следствие на изменението, посредством RT-PCR-секвенционен анализ, авторите идентифицират два отделни PCR продукта: един в норма и един скъсен в следствие на *out-of-frame* делеция на екзон 9, водещ до изместване на рамката на четене и формиране на *downstream* стоп кодон (p.Gly183ValfsTer36). Независимо, че в няколко изследвания (Durocher et al., 1996; Dosil et al., 2010) се споменава за изграждане на алтернативна $\Delta(9,10)$ изоформа (NM_007302.2) в литературата отсъстват функционални данни за евентуалния ефект на BRCA1 варианта (c.591C>T) в случай на активиране на стоп кодон в екзон 11 (p.Gly183ValfsTer36) и делеция на нуклеотидните последователности за: двата ядрено локализационни сигнала (NLS1 и NLS2), С-крайно разположените BRCT1/2 области, областта на взаимодействие на BRCA1 с PALB2, BRCT_assoc и EIN3 домените, както и на двата полипептидни домена за свързване на BRCA1 с ДНК.

Особен представител на измененията с неизвестно клинично значение е установения BRCA2 вариант - chr13:32930673C>T (c.7544C>T), водещ до миссенс замяна на разположения в хеликазния регион на BRCA2 и в областите за взаимодействие на BRCA2 с FANCD2 и с SEM1/DSS1 аминокиселинния остатък треонин с изолевцин (Thr2515Ile).

Независимо, че е получен потвърдителен резултат по *in silico* анализ за загуба на сплайс-енхансерна последователност, след проведено секвениране на копи-ДНК проби на пациенти с рак на млечната жлеза и яйчниците от испанска популация, Campros и колеги установяват, че BRCA2 варианта (c.7544C>T) не се асоциира с аберантен транскрипт (Campros et al. 2003). Няколко години по-късно, след провеждане *in vitro* изследвания, Wu и съавт. (2005) установяват присъствието на флуоресцентно белязания мутантен BRCA2 белтък (T2515I), както в ядра (58%), така и в цитоплазма (26%) на клетки от линия 293T (човешка ембрионална бъбречна клетъчна линия - 293, съдържаща SV40 Т-антиген) (Wu et al., 2005). С тези данни, авторите доказват, че T2515I не води до делеция на екзон 15 с формиране на стоп кодон в екзон 16 (p.Asp2479AlafsTer8) и пропускане на последователността, кодираща ядрено локализационния сигнал (2682–2698 aa). От друга

страна, Wu и колеги установяват, че присъствието на мутантния BRCA2 белтък (T2515I) определя по-ниска ефективност в поправката на индуцирани, чрез ендонуклеаза I-SceI, двойноверижни скъсвания в ДНК, ниска ефективност в регулацията на центрозомиите амплификации и намалена клетъчната преживяемост (Wu et al., 2005).

Представителен за съответния клас е новоустановения BRCA2 вариант - chr13:32945126T>C (с.8521T>C). Транзицията води до миссенс замяна на фенилаланин, участващ във формирането на областта за свързване на BRCA2 белтъка с едноверижни ДНК участъци и в BRCA2 интерфейсната област — “OB2/OB3”, с аминокиселинния остатък левцин (p.Phe2841Leu). Независимо от факта, че Phe2841Leu не се асоциира със структурна промяна на BRCA2DBD–OB2 участъка, миссенс замяната на високо еволюционно консервативния остатък фенилаланин (Phe) и промяната на изоелектричния потенциал на областта за свързване на BRCA2 белтъка с едноверижни ДНК участъци и на BRCA2 интерфейсната област — “OB2/OB3”, предполага, че BRCA2 варианта е с функционално значение.

В конкретния клас попада и BRCA1 варианта - chr17:41242965G>A (с.4181C>T; rs397507226), разположен в екзон 12. Базирайки се на данните от множественото подравняване беше установено, че транзицията C>T (с.4181C>T) води до миссенс замяна на високо еволюционно консервативния аминокиселинен остатък треонин с изолевцин в 1394 позиция в кодиращия белтък (p.Thr1394Ile). Независимо, че Thr1394 попада в структурната област "усукана спирала" (1364-1437 aa) на BRCA1 и не участва във функционалния регион (1397–1424 aa), свързан с взаимодействие на BRCA1 с PALB2, аминокиселинният остатък треонин представлява, както ATM-киназна фосфорилационна точка (Horn et al., 2014), така и фосфорилационна точка на ATR киназата в отговор на индуциран генотоксичен стрес (Tibbetts et al., 2000).

Секвенирането от ново поколение доведе до установяване на нов BRCA2 вариант с неизвестно функционално значение в екзон 15 — chr13:32930601A>T (rs185012573; с.7472A>T). Трансверзията е наблюдавана единствено в групата на клинично здрави лица (1.4%) и води до миссенс замяна на еволюционно консервативния аминокиселинен остатък глутамин (Gln/Q) с левцин (Leu/L) в BRCA2 белтъка (p.Gln2491Leu).

Независимо, че варианта (Q2491L) засяга директно високо консервативния хеликазен домен на BRCA2 и областите за взаимодействие на BRCA2 белтъка с FANCD2

и SEM1/DSS1, проведеният Swiss-model анализ не установи пространствена реконструкция в хеликазния участък. Вероятно поради N-крайното си разположение в първата α -спирална намотка, BRCA2 варианта (Q2491L) има щадящ ефект върху областите за взаимодействие на BRCA2 с FANCD2 и SEM1/DSS1. Евентуалният функционален ефект на BRCA2 изменението (p.Q2491L) върху стабилизацията и активирането на BRCA2-DSS1-ssDNA комплекса може да бъде изяснен, посредством подробна функционална и клинична оценка.

1.3. Вероятно полиморфни и полиморфни варианти.

До момента, изследванията на раковите заболявания са фокусирани предимно върху мутации, които променят кодиращите последователности. Въпреки това, тази фракция от изменения представлява около 2% от човешкия геном (Weinhold et al, 2014). По-голямата част от човешкия геном се състои от последователности с регулаторна функция, както и включва участъци, водещи до транскрипцията на некодиращи РНК молекули (Alexander et al., 2010). Независимо от това, тези участъци са пренебрегвани в продължение на десетилетия, въпреки множеството примери за функционалното им значение.

Мутации в различни регулаторни области, като промотори и енхансери, притежават потенциала да създадат или да доведат до разрушаване на специфични нуклеотидни последователности за свързване на един или повече транскрипционни фактори (TF). В зависимост от това дали са засегнати, присъствието на мутации в тях могат да доведат до повишаване или редуциране на генната транскрипция.

Нетранслируемите 5'- и 3'- региони (5'- и 3'- UTRs), фланкиращи кодиращия участък в зрялата информационна РНК (иРНК), регулират транслацията, ядрения износ, локализацията, както и стабилността на иРНК в цитоплазмата, посредством разнообразни механизми, осъществявани, чрез взаимодействие между *cis*-регулаторни участъци и *trans*-действащи фактори (Pesole et al., 2000).

В настоящото проучване NGS анализа доведе до установяване на полиморфния вариант (chr13:32890572G>A), разположен в 5'UTR областта, обхващаща промоторния регион на BRCA2. Некодиращата транзиция в екзон 2 (с.-26G>A) е с високо присъствие, както при пациенти (50%), така и при клинично здрави лица (38.07%) от българска популация.

Потвърдителни данни по отношение на ефекта на *BRCA2* варианта (rs1799943) са получени в изследване проведено от Gochhait и съавт. (Gochhait et al., 2007). Наред с наблюдаваната частична реконструкция на 5'UTR областта и понижение в минималната свободна енергия (MFE) за изграждане на структурата, авторите установяват, че присъствието на минорния алел корелира с значително по-високи нива на експресия на мутантната 5'UTR *BRCA2* мРНК форма. Проведеният от Gochhait и колеги биоинформатичен анализ корелира с получените от нас данни за изграждане на *cis*-регулаторен мотив за свързване на транскрипционния фактор C/EBP α (ССААТ-енхансер-свързващ белтък алфа) в 5'UTR областта.

Сходство в данните относно ефекта на *BRCA2* варианта (rs1799943), създаващ *cis*-регулаторна последователност за скачване на транскрипционния фактор C/EBP α към 5'UTR областта на *BRCA2* мРНК, е наблюдавано от Maia и съавт. след проведени *in silico*, *in vitro* и *in vivo* анализи (Maia et al. 2012).

В настоящото изследване беше установен и *BRCA2* полиморфния вариант — chr13:32889792A>G (rs206118), наблюдаван с висока честота, както в групата на пациенти с фамилен РМЖ, така и при клинично здрави лица.

В литературата присъстват изследвания, анализиращи евентуалната роля на *BRCA2* варианта (rs206118) при пациенти, диагностицирани с контралатерален рак на млечната жлеза (Figueiredo et al., 2011). В конкретното изследване за уточняване на риска за развитие на контралатерален рак на млечната жлеза (CBC), Figueiredo и съавт. не установяват значима връзка между полиморфния вариант (rs206118) и риска за възникване на CBC. Сходни данни са наблюдавани и в изследване проведено от Baynes и съавт., в което след провеждане на хаплотип-асоциативно проучване на 4474 пациента с РМЖ и 4560 контролни проби се установява, че полиморфния *BRCA2* вариант (rs206118) не се асоциира с повишен риск за развитие на рак на млечната жлеза (Baynes et al., 2007).

Резултатът относно ефекта на *BRCA2* варианта (chr13:32889792A>G), водещ до реконструкция на вторичната структура на 5'UTR *BRCA2* мРНК и евентуално засягащ *cis*-регулаторни области за свързване на транскрипционни фактори и/или специфични фактори на снаждане на *BRCA2* пре-мРНК, е в съгласие с данните получени от Edwin Dovigi (Dovigi, 2013). След проведен Illumina секвенционен анализ на пациенти с фамилен РМЖ и *in silico* обработка на резултатите, Dovigi установява, че *BRCA2* варианта води до

значителна промяна във вторичната структура на BRCA2 пре-мРНК и оказва влияние върху нормалния сплайсинг на BRCA2 пре-мРНК, като разрушава *cis*-последователността за свързване на сплайсозомния SNRPA фактор (U1 малък ядрен рибонуклеопротеин А).

Както 5'UTR участъците, така и нетранслируемите 3' региони (3'UTR) оказват влияние върху стабилността и транслацията на информационната РНК (иРНК), посредством взаимодействие на *cis*-регулаторни места с малки *trans*-действащи РНК молекули, наречени още микроРНКи (microRNAs, miRNAs).

От установените изменения в 3'UTR областта в *BRCA1* с най-висока честота при пациенти и контроли са вариантите: rs12516 (37.5% и 45.07%, съответно) и rs8176318 (37.5% и 45.07%, съответно).

В литературата присъстват данни, определящи функционалната значимост на 3'UTR вариантите във връзка с рака на млечната жлеза. След проведен хетеродуплексен и ДНК секвенционен анализ на 46 пациентки с фамилен РМЖ и 103 контролни проби, Pongsavee и съавт. установяват положителна корелация между *BRCA1* вариантите (rs12516 и rs8176318) и РМЖ (Pongsavee et al., 2009).

Потвърдителни данни относно евентуално негативния ефекти на вариантите (rs12516 и rs8176318) върху *cis*-регулаторни последователности за свързване на *trans*-действащи РНК молекули са получени и в изследване, проведено от Yang и съавт. (Yang et al., 2016). В същото проучване, след проведен *in silico* корелационен анализ по отношение на генотипа за rs12516 и rs8176318 и нивото на експресия на гена в 270 лимфобластоидни клетъчни линии, авторите установяват, че присъствието и на двата 3'UTR варианта корелира с по-ниски нива на експресия.

2. Мутационен скрининг на гена *STK11* при пациенти с фамилен и спорадичен РМЖ и контроли, посредством метода на топене с висока разрешителна способност (HRM).

Ракът на млечната жлеза се определя като сложно, многостъпално заболяване, характеризиращо се със значителна хетерогенност по отношение на фенотипните, генетичните и клиничните си характеристики. Възникването и развитието на болестта корелират с натрупване, както на генетични, така и на епигенетични изменения в редица ключови тумор супресорни гени и прото-онкогени, като *BRCA1/2*, *TP53*, *STK11*, *PTEN*, *PIK3CA*, *HER2*, *ATM*, *CHEK2* и други.

Инактивирането на тумор супресорните гени *STK11* (*LKB1*), *PTEN*, *NF1*, *TSC1* и *TSC2*, участващи в *LKB1/AMPK/mTORC1* сигналния път, води до възникване на група от редки, автозомно-доминантно унаследяеми хамартомни тип синдроми, включително и на синдрома на Пьотц–Йегерс (Peutz–Jeghers syndrome; PJS). Независимо, че хамартомно-полипозните образувания представляват ограничени със собствена капсула доброкачествени туморо-подобни възли те могат да причинят обструкция на червата, кръвоизливи и други симптоми, както и да доведат до тежки усложнения и смърт. В допълнение към развитието на хамартоми, често полипозно-синдромните състояния са свързани и с развитие на различни видове рак (Calva и Howe, 2008).

По отношение на наследственото предразположение за развитие на рак на млечната жлеза, хетерозиготните герминативни изменения, засягащи гена *STK11*, са основно изследвани при пациенти със синдром на PJS (Giardiello et al., 1987; Giardiello et al., 2000; Spigelman et al., 1989). До този момент, данните относно ангажираността на *STK11* във фамилната и спорадичната форма на РМЖ са ограничени в световен мащаб, а за България такива липсват.

Посредством HRM-секвенционен анализ, приложен върху две групи от пациенти с РМЖ (фамилен и спорадичен) от българската популация, беше установено присъствие на 4 варианта в *STK11*. Обследвана беше цялата кодираща област на гена. В изследваната група от пациенти със спорадичен РМЖ беше установена приблизително 9.6% (7/73) мутационна честота, която е по-висока спрямо установената до този момент (Sanchez-Cespedes, 2007).

Резултатите от проведения молекулярно-генетичен скрининг определят мутационния спектър на *STK11*, като относително хетерогенен. Две от установените изменения в групата на пациентите със спорадичен РМЖ се разполагат в екзони 2 и 3 (2.74%) и са от типа базова субституция, едната водеща до възникване на преждевременен стоп кодон (нонсенс) — p.K108Stop, а другата до аминокиселинна замяна в *STK11* белтъка (миссенс) — p.Arg147His.

Намерената в изследването A>T субституция (c.322A>T), водеща до възникване стоп кодон в *STK11* белтъка (p.K108*) не е публикувана до момента в литературата, но е установена след проведено изследване на Националния раков институт (NCI) върху пациенти с аденокарцином на белите дробове (<https://portal.gdc.cancer.gov>, S34) и

присъства, като вариант със соматичен произход в COSMIC базата от данни (ID: COSM6083778). Независимо, че не е извършен генеалогичен (родословен) анализ, нонсенс варианта (chr19:1218448A>T) е определен, като соматичен, тъй като не беше установен в периферна кръв от същия пациент. Въпреки, че в базите от данни (COSMIC, VarSome и ECGene) *STK11* изменението (с.322A>T) е прието за патологично, то е без функционална обосновка.

Другата регистрирана от нас *STK11* базова субституция в кодон 440 (с.440G>A, rs587780717) е установена при пациентка със спорадичен РМЖ и води до възникване на миссенс варианта — p.Arg147His. Данни относно типа на миссенс варианта не могат да бъдат предоставени, тъй като съответната кръвна проба на пациента не бе налична.

За първи път миссенс изменението (Arg147His) е установено в кръвна проба на пациентка с рак на матката (<https://portal.gdc.cancer.gov>, S35) и е описано, като герминативен тип изменение с неясно клинично значение. Въпреки че, все още не е публикуван в литературните източници, миссенс варианта (p.Arg147His) присъства в няколко бази от данни с честота от 0.19% и 0.06% (GDC data portal и ExAC, съответно).

По отношение на ефекта, данните от проведените биоинформатични анализи са противоречиви. Извършените анализи посредством веб-базираните програми PolyPhen-2 и Swiss-model, предположиха, че промяната (p.Arg147His) е с ниска вероятност да наруши функцията на *STK11* и го класифицират, като доброкачествен тип изменение. Въпреки това, Sift, Provean и LoFtool прогнозираха вероятно увреждащ ефект за миссенс варианта.

Тъй като аминокиселинните остатъци аргинин и хистидин имат сходни биофизични и биохимични свойства, посредством BLOSUM62 матрицата беше отчетено, че замяната на аргинин с хистидин е консервативна тип замяна. Въз основа на горе споменатото, както и на разположението на аминокиселинния остатък (Arg147) в *STK11* белтъка, все още не е ясно дали миссенс варианта (Arg147His) е с патогенен ефект или се причислява към вариантите, водещи до развитие на доброкачествени образувания.

Понастоящем наличните доказателствата са недостатъчни, което налага прилагане на функционални анализи с цел оценка на ефекта на *STK11* варианта (Arg147His).

Мутационният скрининг на гена *STK11* доведе до установяване и на интронния, вероятно полиморфен вариант — с.290+36G>T (IVS1+36G>T), описан в dbSNP базата от

данни (rs3764640), като изменение, свързано с развитие на доброкачествени образувания с алелна честота между 0.32% – 0.35% (ExAC, 1000 Genomes) в зависимост от популацията.

Вариантът (с.290+36G>T) в *STK11* е установен в няколко независими изследвания, едно от които, посредством PCR-SSCP-секвенционен анализ, установява присъствието на варианта в ЛОН-положителни туморни проби на пациенти, диагностицирани със спорадичен колоректален аденокарцином (Avizienyte et al., 1998). Също така, е наблюдаван и в проучвания проведени върху ксенографти (ксеноприсадки) от пациенти със спорадичен карцином на панкреаса (Su et al., 1999), при пациенти със синдром на Пьотц–Йегерс (Westerman et al., 1999; Olschwang et al, 2001) и други.

Въпреки, че интронния вариант (с.290+36G>T) в *STK11* присъства при различни типове карциноми, в обобщените по-горе изследвания прави впечатление отсъствие на биоинформатична и/или функционална оценка. Независимо от факта, че в настоящия труд беше приложена уеб-базирана оценка, определяща интронния вариант, като вероятно увреждащ, все още не можем да заключим, че промяната има патологичен ефект. Докато не бъде извършен задълбочен функционален анализ и не се обследва евентуалната връзката с патологията на заболяването, вариантът остава принадлежащ, към вероятно полиморфните изменения.

Спектърът на измененията в гена *STK11* беше допълнен с установяване на новия за базите от данни полиморфен вариант — с.*16+18C>A в интрон 9 (chr19:1226681C>A). Базовата субституция е наблюдавана с относително висока честота в изследваната група от пациенти със спорадичен рак на млечната жлеза (5.48%). Имайки в предвид присъствието на интронния вариант в ДНК проби на клинично здрави лица може да се допусне, че изменението е най-вероятно полиморфно.

Интересно е да се отбележи, че според извършената прогнозна оценка, *STK11* варианта (chr19:1226681C>A) води до разрушаване на евентуален интрон сплайс-репресорен мотив и изграждане на интрон сплайс-енхансерен, което макар и с ниска вероятност може да повлияе нормалния *STK11* сплайсинг. За да бъдат потвърдени или отхвърлени конкретните твърдения е необходимо да бъдат приложени допълнителни функционални проучвания.

Тъй като пациентите, с установени изменения в *STK11*, са част от по-голяма група от български пациенти с РМЖ са характеризирани за носителство на генетични и

епигенетични изменения в други тумор супресорни гени и прото-онкогени. (Bozhanov et al., 2010; Angelova et al., 2012; Krasteva et al., 2012; Krasteva et al., 2014).

В ДНК пробата на пациента със спорадичен РМЖ, положителна по STK11 варианта — K108X беше установено присъствие на по-рано установената онкогенна мутация в *PIK3CA* (rs121913273) и на *ATM* мутацията — rs4986761, свързвана с развитие на доброкачествени образувания.

Множество изследвания установяват, че *PIK3CA* (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha), като част от сигналния клетъчен път „PI3K-Akt-mTOR“, играе важна роля в развитието и в прогресията на различни типове карциноми, като рак на мозъка, рак на млечната жлеза, рак на стомаха и други (Bachman et al. 2004, Broderick et al., 2004, Samuels et al. 2004)

Един от най-често срещаните, активиращи изменения в *PIK3CA* протеина е варианта p.Glu542Lys, който е и установен в пробата на пациента с нонсенс варианта в *STK11*. От функционална гледна точка, Kang и колеги доказват, че *PIK3CA* варианта (E542K) индуцира трансформация в клетъчна култура от пилешки ембрионални фибробласти (CEF) и установяват корелационна зависимост между повишената ензимна активност на *PIK3CA* и активирането на Akt сигналния път (Kang et al., 2005). Сходни резултати са наблюдавани и в изследване проведено от Ikenoue и колеги, определящи функционалната значимост на *PIK3CA* варианта — p.Glu542Lys (Ikenoue et al., 2005).

Съчетание на мутационни събития се наблюдава и при пациента с установения миссенс вариант (с.440G>A) в екзон три на *STK11*. В предишни проучвания на колектива беше разкрито присъствието на широко разпространения при различни карциноми онкогенен вариант в гена *PIK3CA* (с.3140A>G; p.His1047Arg).

През 2006, Bader и колеги определят тумор-индуциращия потенциал на *PIK3CA* варианта (H1047R) в *in vivo* изследване проведено върху хориоалантоична мембрана на пилешки ембриони (Bader et al., 2006). Авторите установяват, че миссенс изменението в *PIK3CA* белтъка води до развитие на малигнени хемангиосаркоми, характеризиращи се с висока активност на Akt сигналния път и с повишен ангиогенен потенциал.

Подобна картина е и наблюдавана след проведен функционален анализ от Ikenoue и колеги върху клетъчна култура от миши ембрионални фибробласти (NIH 3T3) (Ikenoue et al., 2005). В резултат на изменението (p.His1047Arg) в *PIK3CA* белтъка, авторите

регистрират повишени нива на фосфорилиране на Akt и p70S6K протеин киназите и наблюдават изменение в клетъчната морфология.

Относно ефекта на PIK3CA варианта (H1047R), в *in vitro* изследване проведено върху човешки клетъчни линии от рак на млечната жлеза, Yamaguchi и колеги установяват повишени нива на фосфорилиране на Akt протеин киназата, наблюдават тенденция за образуване на ламелиподии, формиране на екстрацелуларни матрикс-деградиращи издатини, както и наблюдават висока инвазивна способност на експресиращите p.His1047Arg клетки от линия MDA-MB-231 (Yamaguchi et al., 2011).

Добре известно е, че тумор супресорния STK11 белтък индиректно участва в контрола на клетъчния цикъл, в клетъчния метаболизъм, апоптозата, автофогията, туморната прогресия и в други процеси посредством AMPK и PI3K/AKT/mTOR клетъчните сигнални пътища (Shackelford и Shaw, 2009; Mihaylova и Shaw, 2011).

Имайки в предвид наличната до този момент информация, можем да заключим, че възникването и развитието на спорадичната форма на РМЖ може да бъде обяснено с присъствието на деактивиращи изменения в *STK11* и активиращи мутации в *PIK3CA*, което е в съгласие с общо приетото твърдение, че спорадичните карциноми се характеризират с натрупване на придобити и некоригирани генетични и/или епигенетични дефекти в множество соматични гени.

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

През последните години се наблюдава значително обогатяване на информацията относно спектъра и честотата на генетичните и епигенетичните изменения в различни тумор супресорни и прото-онкогени гени, свързани с развитието на рака на млечната жлеза. Независимо от този прогрес, голяма част от генетичния принос към етиологията на заболяването остава неизяснен.

В настоящото проучване, чрез метода на таргетно секвениране от ново поколение е установено присъствие на значително количество генетични варианти с различна клинична значимост и ефект в гените *BRCA1* и *BRCA2* при пациенти с фамилен РМЖ и клинично здрави лица. Посредством метода на топене с висока разрешителна способност за първи път се установява присъствие на генетични изменения в гена *STK11* при пациенти със спорадичен рак на млечната жлеза от българска популация. Въведени и приложени са разнообразни биоинформатични техники за характеризиране и

класифициране на установените варианти в гените *BRCA1*, *BRCA2* и *STK11*. Разгледани са евентуалните механизми, посредством които генетичните изменения водят до структурни и съответно до функционални нарушения.

Високата информативност на използвания в настоящия дисертационен труд алгоритъм за оценка, би могъл да послужи за подобряване на диагнозата, прогноза и персонализиране на терапията на раковите заболявания. Независимо от успеваемостта на интродуцираните в разработката биоинформатични анализи за оценка на евентуалния ефект на установените генетични варианти в гените *BRCA1/BRCA2* и *STK11*, с оглед доказуемост на резултатите е необходимо привеждане на допълнителни и обстойни функционални анализи.

В тази насока, бъдещите изследвания биха могли да се фокусират по отношение на:

- Разширяване обхвата на изследваните групи от пациенти с рак на млечната жлеза и на клинично здрави лица от българска популация;
- Провеждане на комплексни функционални анализи за новоустановените, вероятно патологичните и за вариантите с неизвестно клинично значение в гените *BRCA1*, *BRCA2* и *STK11*.

VII. ИЗВОДИ И ПРИНОСИ.

Въз основа на получените резултати могат да бъдат направени следните изводи:

1. Честотата на установените мутации с патогенен/вероятно патогенен ефект в *BRCA1/2* гените (20.83%) при български пациенти с фамилен РМЖ е съизмерима с данните, получени при други популационни проучвания.

2. От наблюдаваните варианти с неясно клинично значение в *BRCA1* и *BRCA2* гените ($\approx 18.3\%$), 5 са с относително ниска честота (4.2%) в изследваната група пациенти с фамилен РМЖ и не са установени в контролната.

3. В гените *BRCA1* и *BRCA2* са установени два често срещани полиморфни варианта (chr17:41231473delT и chr13:32973924T/-, съответно), присъщи за българското население и неописани в базите от данни.

4. В изследваната популация на български пациенти със спорадичен РМЖ, честотата на генетичните изменения за *STK11* възлиза на $\approx 9.59\%$ (7/73), като спектъра на установените варианти е хетерогенен.

5. Ниският процент на патологични мутации в гена *STK11* (1.37%) и отсъствието на корелационни зависимости между мутационния му статус и клинико-патологичните характеристики на пациентите със спорадичен РМЖ, както и липсата на генетични изменения при пациенти с фамилен РМЖ предполага слаба ангажираност на *STK11* в патогенезата на това заболяване.

Формулирани са следните приноси:

1. Приноси с научно-фундаментален характер:

— Определен е мутационният спектър и предполагаемият функционален ефект на генетичните изменения в *BRCA1* и *BRCA2* гените при български пациентки с фамилен РМЖ.

— Приблизително 51% от установените варианти в *BRCA1* и *BRCA2* гените не са описани до момента в литературата и не са докладвани в международните бази от данни.

— За първи път е анализиран генетичният статус и е установена мутационната честота на *STK11* гена при пациенти с фамилен и спорадичен РМЖ от българска популация.

2. Приноси с научно-методологичен характер:

— Успешно е приложена технологията за секвениране от ново поколение “Illumina MiSeq” за анализ на генетичното разнообразие в *BRCA1* и *BRCA2* гените при пациенти с фамилен РМЖ и контроли от българска популация.

— За първи път в лабораторната практика на ИФРГ, БАН е въведен и успешно приложен метода на топене с висока разрешителна способност (HRM) за установяване на генетичните изменения в *STK11* гена при пациенти с рак на млечната жлеза.

— Успешно е въведен и приложен системен биоинформатичен подход за характеризиране и класифициране на установените варианти в *BRCA1*, *BRCA2* и *STK11* гените, при български пациенти с фамилен и спорадичен РМЖ.

VIII. БИБЛИОГРАФИЯ, УЕБ-БАЗИРАНИ ИЗТОЧНИЦИ И СОФТУЕРНИ ПРИЛОЖЕНИЯ:

Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 7(4): 248–249.

Ahmad NN, Cu-Unjieng AB, Donoso LA (1995). Modification of standard proteinase K/phenol method for DNA isolation to improve yield and purity from frozen blood. *J Med Genet.*; 32(2): 129–130.

Alexander RP, Fang G, Rozowsky J, Snyder M, Gerstein MB (2010). Annotating non-coding regions of the genome. *Nat Rev Genet.*; 11(8): 559–571.

Angelova SG, Krasteva ME, Gospodinova ZI, Georgieva EI (2012). CHEK2 gene alterations independently increase the risk of death from breast cancer in Bulgarian patients. *Neoplasma.*; 59(6): 622–630.

Avizienyte E, Roth S, Loukola A, Hemminki A, Lothe RA, Stenwig AE, Fosså SD, Salovaara R, Aaltonen LA (1998). Somatic mutations in LKB1 are rare in sporadic colorectal and testicular tumors. *Cancer Res.*; 58(10): 2087–2090.

Bachman KE, Argani P, Samuels Y, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Konishi H, Karakas B, Blair BG, Lin C, Peters BA, Velculescu VE, Park BH (2004). The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers. *Cancer Biol Ther.*; 3(8): 772–775.

Bader AG, Kang S, Vogt PK (2006). Cancer-specific mutations in PIK3CA are oncogenic in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 103(5): 1475–1479.

Balmaña J, Díez O, Rubio IT, Cardoso F; ESMO Guidelines Working Group (2011). BRCA in breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol.*; 22 (Suppl 6): vi31–vi34.

Baynes C, Healey CS, Pooley KA, Scollen S, Luben RN, Thompson DJ, Pharoah PD, Easton DF, Ponder BA, Dunning AM; SEARCH breast cancer study (2007). Common variants in the ATM, BRCA1, BRCA2, CHEK2 and TP53 cancer susceptibility genes are unlikely to increase breast cancer risk. *Breast Cancer Res.*; 9(2): R27.

Bignell GR, Barfoot R, Seal S, Collins N, Warren W, Stratton MR (1998). Low frequency of somatic mutations in the LKB1/Peutz-Jeghers syndrome gene in sporadic breast cancer. *Cancer Res.*; 58(7): 1384–1386.

Bonatti F, Pepe C, Tancredi M, Lombardi G, Aretini P, Sensi E, Falaschi E, Cipollini G, Bevilacqua G, Caligo MA (2006). RNA-based analysis of BRCA1 and BRCA2 gene alterations. *Cancer Genet Cytogenet.*; 170(2): 93–101.

Bozhanov SS, Angelova SG, Krasteva ME, Markov TL, Christova SL, Gavrilo IG, 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(11): 1657–1669.

Brandão RD, van Roozendaal K, Tserpelis D, Gómez García E, Blok MJ (2011). Characterisation of unclassified variants in the BRCA1/2 genes with a putative effect on splicing. *Breast Cancer Res Treat.*; 129(3): 971–982.

Broderick DK, Di C, Parrett TJ, Samuels YR, Cummins JM, McLendon RE, Fuhs DW, Velculescu VE, Bigner DD, Yan H (2004). Mutations of PIK3CA in anaplastic oligodendrogliomas, high-grade astrocytomas, and medulloblastomas. *Cancer Res.*; 64(15): 5048–5050.

Calva D, Howe JR (2008). Hamartomatous polyposis syndromes. *Surg Clin North Am.*; 88(4): 779-817; vii; doi: 10.1016/j.suc.2008.05.002.

Campos B, Díez O, Domènech M, Baena M, Balmaña J, Sanz J, Ramírez A, Alonso C, Baiget M (2003). RNA analysis of eight BRCA1 and BRCA2 unclassified variants identified in breast/ovarian cancer families from Spain. *Hum Mutat.*; 22(4): 337.

Colombo M, De Vecchi G, Caleca L, Foglia C, Ripamonti CB, Ficarazzi F, Barile M, Varesco L, Peissel B, Manoukian S, Radice P (2013). Comparative in vitro and in silico analyses of variants in splicing regions of BRCA1 and BRCA2 genes and characterization of novel pathogenic mutations. *PLoS One.*; 8(2): e57173.

Connolly DC, Katabuchi H, Cliby WA, Cho KR (2000). Somatic mutations in the STK11/LKB1 gene are uncommon in rare gynecological tumor types associated with Peutz-Jegher's syndrome. *Am J Pathol.*; 156(1): 339–345.

De Nicolo A, Parisini E, Zhong Q, Dalla Palma M, Stoeckert KA, Domchek SM, Nathanson KL, Caligo MA, Vidal M, Cusick ME, Garber JE (2009). Multimodal assessment of protein functional deficiency supports pathogenicity of BRCA1 p.V1688del. *Cancer Res.*; 69(17): 7030–7037.

Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Bérout G, Claustres M, Bérout C (2009). Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res.*; 37(9): e67.

- Dong SM, Kim KM, Kim SY, Shin MS, Na EY, Lee SH, Park WS, Yoo NJ, Jang JJ, Yoon CY, Kim JW, Kim SY, Yang YM, Kim SH, Kim CS, Lee JY (1998). Frequent somatic mutations in serine/threonine kinase 11/Peutz-Jeghers syndrome gene in left-sided colon cancer. *Cancer Res.*; 58(17): 3787–3790.
- Dosil V, Tosar A, Cañadas C, Pérez-Segura P, Díaz-Rubio E, Caldés T, de la Hoya M (2010). Alternative splicing and molecular characterization of splice site variants: BRCA1 c.591C>T as a case study. *Clin Chem.*; 56(1): 53–61.
- Dovigi EA. (2013). Detection, prioritization and analysis of variants of unknown significance in familial breast cancer genes. Electronic Thesis and Dissertation Repository. 1633. <http://ir.lib.uwo.ca/etd/1633>. (Master Of Science Thesis).
- Durocher F, Shattuck-Eidens D, McClure M, Labrie F, Skolnick MH, Goldgar DE, Simard J (1996). Comparison of BRCA1 polymorphisms, rare sequence variants and/or missense mutations in unaffected and breast/ovarian cancer populations. *Hum Mol Genet.*; 5(6): 835–842.
- Figueiredo JC, Brooks JD, Conti DV, Poynter JN, Teraoka SN, Malone KE, Bernstein L, Lee WD, Duggan DJ, Siniard A, Concannon P, Capanu M, Lynch CF, Olsen JH, Haile RW, Bernstein JL (2011). Risk of contralateral breast cancer associated with common variants in BRCA1 and BRCA2: potential modifying effect of BRCA1/BRCA2 mutation carrier status. *Breast Cancer Res Treat.*; 127(3): 819–829.
- Giardiello FM, Brensinger JD, Tersmette AC, Goodman SN, Petersen GM, Booker SV, Cruz-Correa M, Offerhaus JA (2000). Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome. *Gastroenterology.*; 119(6): 1447–1453.
- Giardiello FM, Welsh SB, Hamilton SR, Offerhaus GJ, Gittelsohn AM, Booker SV, Krush AJ, Yardley JH, Luk GD (1987). Increased risk of cancer in the Peutz-Jeghers syndrome. *N Engl J Med.*; 316(24): 1511–1514.
- Gochhait S, Bukhari SI, Bairwa N, Vadhera S, Darvishi K, Raish M, Gupta P, Husain SA, Bamezai RN (2007). Implication of BRCA2 -26G>A 5' untranslated region polymorphism in susceptibility to sporadic breast cancer and its modulation by p53 codon 72 Arg>Pro polymorphism. *Breast Cancer Res.*; 9(5): R71.
- Gudmundsdottir K, Ashworth A (2006). The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. *Oncogene.*; 25(43): 5864–5874.
- Hartford SA, Chittella R, Ding X, Vyas A, Martin B, Burkett S, Haines DC, Southon E, Tessarollo L, Sharan SK (2016). Interaction with PALB2 Is Essential for Maintenance of Genomic Integrity by BRCA2. *PLoS Genet.*; 12(8): e1006236.
- Horn H, Schoof EM, Kim J, Robin X, Miller ML, Diella F, Palma A, Cesareni G, Jensen LJ, Linding R (2014). KinomeXplorer: an integrated platform for kinome biology studies. *Nat Methods.*; 11(6): 603–604.
- Ikenoue T, Kanai F, Hikiba Y, Obata T, Tanaka Y, Imamura J, Ohta M, Jazag A, Guleng B, Tateishi K, Asaoka Y, Matsumura M, Kawabe T, Omata M (2005). Functional analysis of PIK3CA gene mutations in human colorectal cancer. *Cancer Res.*; 65(11): 4562–4567.
- Kang S, Bader AG, Vogt PK (2005). Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 102 (3): 802–807.
- Krasteva ME, Antov GG, Gospodinova ZI, Angelov SG, Nacheva MB, Georgieva EI, Gavrilo IG (2014). Aberrant promoter methylation in p53 and ATM genes was not associated with sporadic breast carcinogenesis in Bulgarian patients. *J BioSci Biotech.* 3(2): 105–109.
- Krasteva ME, Bozhanov SS, Antov GG, Gospodinova ZI, Angelov SG, Georgieva EI (2012). Breast cancer patients with hypermethylation in the promoter of BRCA1 gene exhibit favorable clinical status. *Neoplasma.*; 59(1): 85–91.
- Lorenz R, Bernhart SH, Höner Zu Siederdisen C, Tafer H, Flamm C, Stadler PF, Hofacker IL (2011). ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms Mol Biol.*; 6: 26.
- Maia AT, Antoniou AC, O'Reilly M, Samarajiwa S, Dunning M, Kartsonaki C, Chin SF, Curtis CN, McGuffog L, Domchek SM; EMBRACE, Easton DF, Peock S, Frost D, Evans DG, Eeles R, Izatt L, Adlard J, Eccles D; GEMO Study Collaborators, Sinilnikova OM, Mazoyer S, Stoppa-Lyonnet D, Gauthier-Villars M, Faivre L, Venat-Bouvet L, Delnatte C, Nevanlinna H, Couch FJ, Godwin AK, Caligo MA; SWE-BRCA, Barkardottir RB; kConFab Investigators, Chen X, Beesley J, Healey S, Caldas C, Chenevix-Trench G, Ponder BA (2012). Effects of

BRCA2 cis-regulation in normal breast and cancer risk amongst BRCA2 mutation carriers. *Breast Cancer Res.*; 14(2): R63.

Malacrida S, Agata S, Callegaro M, Casella C, Barana D, Scaini MC, Manoukian S, Oliani C, Radice P, Barile M, Menin C, D'Andrea E, Montagna M (2008). BRCA1 p.Val1688del is a deleterious mutation that recurs in breast and ovarian cancer families from Northeast Italy. *J Clin Oncol.*; 26(1): 26–31.

Mihaylova MM, Shaw RJ. (2011). The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol.*; 13(9): 1016–1023.

Milner J, Fuks F, Hughes-Davies L, Kouzarides T (2000). The BRCA2 activation domain associates with and is phosphorylated by a cellular protein kinase. *Oncogene.*; 19(38): 4441–4445.

Milner J, Ponder B, Hughes-Davies L, Seltsmann M, Kouzarides T (1997). Transcriptional activation functions in BRCA2. *Nature.*; 386(6627): 772–773.

Narod SA, Salmena L (2011). BRCA1 and BRCA2 mutations and breast cancer. *Discov Med.*; 12(66): 445–453.

Oliver AW, Swift S, Lord CJ, Ashworth A, Pearl LH (2009). Structural basis for recruitment of BRCA2 by PALB2. *EMBO Rep.*; 10(9): 990–996.

Olschwang S, Boisson C, Thomas G (2001). Peutz-Jeghers families unlinked to STK11/LKB1 gene mutations are highly predisposed to primitive biliary adenocarcinoma. *J Med Genet.*; 38(6): 356–360.

Pesole G, Grillo G, Larizza A, Liuni S (2000). The untranslated regions of eukaryotic mRNAs: structure, function, evolution and bioinformatic tools for their analysis. *Brief Bioinform.*; 1(3): 236–249.

Pongsavet M, Yamkamon V, Dakeng S, O-charoenrat P, Smith DR, Saunders GF, Patmasiriwat P (2009). The BRCA1 3'-UTR: 5711+421T/T_5711+1286T/T genotype is a possible breast and ovarian cancer risk factor. *Genet Test Mol Biomarkers.*; 13(3): 307–317.

Sagi M, Eilat A, Ben Avi L, Goldberg Y, Bercovich D, Hamburger T, Peretz T, Lerer I (2011). Two BRCA1/2 founder mutations in Jews of Sephardic origin. *Fam Cancer.*; 10(1): 59–63.

Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Yan H, Gazdar A, Powell SM, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz S, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE (2004). High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science.*; 304(5670): 554.

Sanchez-Cespedes M (2007). A role for LKB1 gene in human cancer beyond the Peutz-Jeghers syndrome. *Oncogene.*; 26(57): 7825–7832.

Santos C, Peixoto A, Rocha P, Pinto P, Bizarro S, Pinheiro M, Pinto C, Henrique R, Teixeira MR (2014). Pathogenicity evaluation of BRCA1 and BRCA2 unclassified variants identified in Portuguese breast/ovarian cancer families. *J Mol Diagn.*; 16(3): 324–334.

Shackelford DB, Shaw RJ (2009). The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. *Nat Rev Cancer.*; 9(8): 563–575.

Shiozaki EN, Gu L, Yan N, Shi Y (2004). Structure of the BRCT repeats of BRCA1 bound to a BACH1 phosphopeptide: implications for signaling. *Mol Cell.*; 14(3): 405–412.

Spigelman AD, Murday V, Phillips RK (1989). Cancer and the Peutz-Jeghers syndrome. *Gut.*; 30(11): 1588–1590.

Su GH, Hruban RH, Bansal RK, Bova GS, Tang DJ, Shekher MC, Westerman AM, Entius MM, Goggins M, Yeo CJ, Kern SE (1999). Germline and somatic mutations of the STK11/LKB1 Peutz-Jeghers gene in pancreatic and biliary cancers. *Am J Pathol.*; 154(6): 1835–1840.

Sy SM, Huen MS, Chen J (2009). PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 106(17): 7155–7160.

Thomassen M, Blanco A, Montagna M, Hansen TV, Pedersen IS, Gutiérrez-Enríquez S, Menéndez M, Fachal L, Santamariña M, Steffensen AY, Jønson L, Agata S, Whiley P, Tognazzo S, Tornero E, Jensen UB, Balmaña J, Kruse TA, Goldgar DE, Lázaro C, Diez O, Spurdle AB, Vega A (2012). Characterization of BRCA1 and BRCA2 splicing variants: a collaborative report by ENIGMA consortium members. *Breast Cancer Res Treat.*; 132(3): 1009–1023.

Tibbetts RS, Cortez D, Brumbaugh KM, Scully R, Livingston D, Elledge SJ, Abraham RT (2000). Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress. *Genes Dev.*; 14(23): 2989–3002.

Weinhold N, Jacobsen A, Schultz N, Sander C, Lee W (2014). Genome-wide analysis of noncoding regulatory mutations in cancer. *Nat Genet.*; 46(11):1160–1165.

Westerman AM, Entius MM, Boor PP, Koole R, de Baar E, Offerhaus GJ, Lubinski J, Lindhout D, Halley DJ, de Rooij FW, Wilson JH (1999). Novel mutations in the LKB1/STK11 gene in Dutch Peutz-Jeghers families. *Hum Mutat.*; 13(6): 476–481.

Wu K, Hinson SR, Ohashi A, Farrugia D, Wendt P, Tavtigian SV, Deffenbaugh A, Goldgar D, Couch FJ (2005). Functional evaluation and cancer risk assessment of BRCA2 unclassified variants. *Cancer Res.*; 65(2): 417–426.

Yamaguchi H, Yoshida S, Muroi E, Yoshida N, Kawamura M, Kouchi Z, Nakamura Y, Sakai R, Fukami K (2011). Phosphoinositide 3-kinase signaling pathway mediated by p110 α regulates invadopodia formation. *J Cell Biol.*; 193(7): 1275–1288.

Yang F, Chen F, Xu J, Guan X (2016). Identification and frequency of the rs12516 and rs8176318 BRCA1 gene polymorphisms among different populations. *Oncol Lett.*; 11(4): 2481–2486.

Yata K, Bleuyard JY, Nakato R, Ralf C, Katou Y, Schwab RA, Niedzwiedz W, Shirahige K, Esashi F (2014). BRCA2 coordinates the activities of cell-cycle kinases to promote genome stability. *Cell Rep.*; 7(5): 1547–1559.

Yeo G, Burge CB (2004). Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals. *J Comput Biol.*; 11(2-3): 377–394.

1. http://support.illumina.com/downloads/miseq_system_user_guide_15027617.html (<http://www.illumina.com/>, S1).
2. <http://bioinformatics.org/annhyb/>, S2.
3. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, S3.
4. <http://genome.ucsc.edu/>, S4.
5. <http://www.ensembl.org/index.html>, S5.
6. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>, S6.
7. <https://research.nhgri.nih.gov/bic/>, S7.
8. <http://www.uniprot.org/>, S8.
9. <https://alfred.med.yale.edu/>, S9.
10. <http://www.lovd.nl/3.0/home>, S10.
11. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>, S11.
12. http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/browse/tissue#sn=breast&ss=all&hn=all&sh=all&in=t&src=tissue&all_data=n (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>, S12).
13. <http://varnomen.hgvs.org/>, S13.
14. <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/index.html.en>, S14.
15. <http://www.1000genomes.org>, S15.
16. <http://provean.jcvi.org>, S16.
17. <http://sift.jcvi.org>, S17.
18. <http://www.ensembl.info/ecode/loftool/>, S18.
19. <http://regulomedb.org>, S19.
20. <http://swissmodel.expasy.org>, S20.
21. <http://web.expasy.org/protparam/>, S21.
22. <http://networkin.info/index.shtml>, S22.
23. <https://snpinfo.niehs.nih.gov/snpinfo/index.html>, S23.
24. <http://www.rcsb.org/pdb/gene/BRCA2>, S24.
25. <http://www.phosphosite.org/proteinAction.action?id=7393&showAllSites=true> (<http://www.phosphosite.org>, S25).
26. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=80359013 (www.ncbi.nlm.nih.gov, S26).

27. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=28897675 (www.ncbi.nlm.nih.gov, S27).
28. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=8176320 (www.ncbi.nlm.nih.gov, S28).
29. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=12516#Diversity (www.ncbi.nlm.nih.gov, S29).
30. <http://gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/index.html>, S30.
31. <http://exac.broadinstitute.org/variant/19-1219388-G-A> (<http://exac.broadinstitute.org>, S31).
32. http://archive.broadinstitute.org/mammals/haploreg/detail_v4.1.php?query=&id=rs3764640
(<https://www.broadinstitute.org/>, S32).
33. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=3764640 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>, S33).
34. <https://portal.gdc.cancer.gov/ssms/a7187d1a-e2be-5eb0-9ad0-e38251263270>
(<https://portal.gdc.cancer.gov>, S34).
35. <https://portal.gdc.cancer.gov/ssms/010f0bb6-0dc1-5f8a-beeb-838086844991>
(<https://portal.gdc.cancer.gov>, S35).

IX. ПУБЛИКАЦИИ, ЦИТАТИ В НАУЧНИ ИЗДАНИЯ, УЧАСТИЯ В ПРОЕКТИ И НАУЧНИ ПРОЯВИ И СПЕЦИАЛИЗАЦИИ.

1. Публикации:

➤ Balabanski L*, Antov G*, Dimova I, Ivanov S, Nacheva M, Gavrilov I, Nesheva D, Rukova B, Hadjidekova S, Malinov M, Toncheva D (2014). Next-generation sequencing of BRCA1 and BRCA2 in breast cancer patients and control subjects. *Mol Clin Oncol.*, 2 (3): 435—439.

* – споделено първо авторство

➤ Antov G, M. Krasteva, S. Andonova, A. Savov, S. Angelova, L. Stoilov, D.Toncheva (2017). *STK11* gene mutations among patients with sporadic breast cancer. *Genetika*, 49 (2): 399—413.

2. Цитати в научни издания:

Balabanski L*, Antov G*, Dimova I, Ivanov S, Nacheva M, Gavrilov I, Nesheva D, Rukova B, Hadjidekova S, Malinov M, Toncheva D (2014). Next-generation sequencing of BRCA1 and BRCA2 in breast cancer patients and control subjects. *Mol Clin Oncol.*, 2 (3): 435—439.

— Dotter C (2014). Imprinted expression of known and novel transcripts in multiple tissues of the mouse. Дипломна работа, Химически факултет, Виенски университет, Австрия.

— Precone V, Del Monaco V, Esposito MV, De Palma FD, Ruocco A, Salvatore F, D'Argenio V (2015). Cracking the Code of Human Diseases Using Next-Generation Sequencing: Applications, Challenges, and Perspectives. *Biomed Res Int.*; 2015: 161648. doi: 10.1155/2015/161648.

— Minucci A, Scambia G, Santonocito C, Concolino P, Canu G, Mignone F, Saggese I, Guarino D, Costella A, Molinario R, De Bonis M, Ferrandina G, Petrillo M, Scaglione GL, Capoluongo E (2015). Clinical impact on ovarian cancer patients of massive parallel sequencing for BRCA mutation detection: the experience at Gemelli hospital and a literature review. *Expert Rev Mol Diagn.*; 15(10): 1383-403.

— Mukherjee N, Islam MS, Roychowdhury A, Bhattacharya R, Chunder N, Bhattacharya N, Sinha S, Alam N, Roy A, Roychoudhury S, Panda CK (2016). The stem cell renewal and DNA damage response pathways are frequently altered in fibroepithelial tumors of breast in Indian patients. *Pathol Res Pract.*; 212(3): 196-203.

— Gardiner AR (2016). A Genetic Investigation of the Muscle and Neuronal Channelopathies: From Sanger to Next – Generation Sequencing. Дисертация, UCL (University College London).

— Schenk D, Song G, Ke Y, Wang Z (2017). Amplification of overlapping DNA amplicons in a single-tube multiplex PCR for targeted next-generation sequencing of BRCA1 and BRCA2. *PLoS One.*; 12(7), doi: 10.1371/journal.pone.0181062.

— Petrillo M, Marchetti C, De Leo R, Musella A, Capoluongo E, Paris I, Benedetti Panici P, Scambia G, Fagotti A (2017). BRCA mutational status, initial disease presentation, and clinical outcome in high-grade serous advanced ovarian cancer: a multicenter study. *Am J Obstet Gynecol.*; 217(3):334.e1-334.e9. doi: 10.1016/j.ajog.2017.05.036.

3. Участия в научни прояви:

➤ Toncheva D, Balabanski L, **Antov G**, Dimova I, Ivanov S, Nacheva M, Gavrilo I, Nesheva D, Rukova B, Hadzhidekova S, Malinov M. Next-generation sequencing of *BRCA1* and *BRCA2* in Bulgarian breast cancer patients and controls. “The 63rd Annual Meeting of the American Society of Human Genetics”, Бостън, САЩ, 22–26 Октомври 2013. (*Постер*)

➤ **Antov G**, Kleiblová P, Krasteva M, Gospodinova Z, Angelova S, Toncheva D. *STK11* gene mutation status in Bulgarian patients with sporadic and familial breast cancer. “Plant Physiology and Genetics – Achievements and Challenges”, 24–26 Септември 2014, София, България, pp. 49. (*Постер*)

➤ **Georgi G. Antov**, Petra Kleiblová, Maria E. Krasteva, Svetla G. Angelova, Draga I. Toncheva. A missense mutation c.440G>A (Arg147Hif) in *STK11* gene found in Bulgarian patient with sporadic breast cancer. „9th International conference of anticancer research“, 6–10

Октомври 2014, Порто Карас, Ситония, Гърция (International Journal of Cancer Research and Treatment (ISSN:1791–7530); Vol. 34; № 10; 41P; p. 5811–5812). (*Постер*)

➤ S. K. Karachanak-Yankova, Z. Hammoudeh, **G. Antov**, S. Ivanov, L. Balabanski, R. Vazharova, M. Malinov, D. Toncheva. Germline alterations in cancer patients and unaffected individuals with family history. “European Society of Human Genetics“, 21–24 Май 2016, Барселона, Испания (Vol. 24; E-Supplement 1; P12.044; p. 267). (*Постер*)

➤ “Мутационен скрининг на гените *BRCA1*, *BRCA2* и *STK11* при пациенти от българска популация с рак на млечната жлеза“. Интердисциплинарен докторантски форум“, организиран от Център за обучение – БАН, Кариерен център към ЦО-БАН, Единен център за иновации – БАН и Фондация „Еврика“, 6–7 Април 2016, София, България. (*Презентация*)

➤ **Georgi Antov**, Lubomir Balabanski, Maja Atanasoska, Radoslava Vazharova, Savina Hadjidekova, Lubomir Stoilov, Draga Toncheva. *In silico* assessment of the pathogenicity of NGS established *BRCA1/2* variants in Bulgarian patients with breast cancer. Първа Балканска Конференция по Персонализирана Медицина, 26–27 Октомври 2017, София, България. (*Постер*)

4. Участия в проекти:

”Подкрепа за изграждане и развитие на млад конкурентноспособен научен потенциал в областта на физиологията, фитохимията, геномиката, протеомиката и биоразнообразието на еукариотните организми” - BG051PO001-3.3.06-0025”, Ръководител доц. д-р Леонид Пенков.

5. Специализации:

Триседмична специализация при проф. Зденек Клейбл, Лаборатория „Онкогенетика“, Чарлз Университет, Прага, Чехия, по време на която бе проведен обучителен курс в прилагането на HRM метода. Специализацията бе финансирана по проект „Подкрепа за изграждане и развитие на млад конкурентноспособен научен потенциал в областта на физиологията, фитохимията, геномиката, протеомиката и биоразнообразието на еукариотните организми» (BG051PO001-3.3.06-0025) с ръководител доц. д-р Леонид Пенков по оперативна програма „Развитие на човешките ресурси”, съфинансирана от Европейския социален фонд на Европейския съюз.