

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.469>

<https://orcid.org/0000-0003-0101-8555>

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Ieva Sadzevičienė

Genetinių ir epigenetinių biožymenų tyrimai krūties vėžio diagnostikai ir ligos eigos prognozavimui

DAKTARO DISERTACIJA

Gamtos mokslai,
Biologija (N 010)

VILNIUS 2023

Disertacija rengta 2007–2019 metais Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biomokslų institute, Žmogaus genomo tyrimų laboratorijoje.

Disertacija ginama eksternu.

Mokslinė konsultantė – prof. dr. Sonata Jarmalaitė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010).

Gynimo taryba:

Pirmininkė – prof. dr. Rūta Navakauskienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010).

Nariai:

doc. dr. Dalia Baršytė-Lovejoy (Toronto universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010),

dr. Arvydas Kanopka (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004),

prof. dr. habil. dr. Juozas Rimantas Lazutka (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010),

prof. dr. Kęstutis Sužiedėlis (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2023 m. birželio mėn. 23 d. 13.00 val. Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centre R-401 auditorijoje.

Adresas: Saulėtekio al. 7, Vilnius, Lietuva, tel. +37068827769; el. paštas: sadzeviciene.ieva@gmail.com

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir VU interneto svetainėje adresu:

www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.469>

<https://orcid.org/0000-0003-0101-8555>

VILNIUS UNIVERSITY

Ieva Sadzevičienė

Analysis of Genetic and Epigenetic Biomarkers for Breast Cancer Diagnosis and Prognosis

DOCTORAL DISSERTATION

Natural Sciences,
Biology (N 010)

VILNIUS 2023

The dissertation was prepared between 2007 and 2019 in institute of Biosciences, Life Sciences Center, Vilnius University, Vilnius, Lithuania, Saulėtekio Ave. 7, Vilnius, Lithuania.

The dissertation is defended externally.

Academic consultant – Prof. Dr. Sonata Jarmalaitė (Vilnius University, Natural Sciences, Biology – N 010).

This doctoral dissertation will be defended in a public meeting of the Dissertation Defence Panel:

Chairman – Prof. Dr. Rūta Navakauskienė (Vilnius University, Natural sciences, Biology – N 010).

Members:

Assoc. Prof. Dr. Dalia Baršytė-Lovejoy (University of Toronto, Natural Sciences, Biology – N 010),

Dr. Arvydas Kanopka (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry – N 004),

Prof. Habil. Dr. Juozas Rimantas Lazutka (Vilnius University, Natural Sciences, Biology – N 010),

Prof. Dr. Kęstutis Sužiedėlis (Vilnius University, Natural Sciences, Biology – N 010).

The doctoral dissertation will be defended in the open session of the Council of the Institute of Biosciences on 23 th of June, 2023 at 13.00 p.m. in auditorium R-401 of the Life Sciences Center, Vilnius University.

Address: Saulėtekio Ave. 7, Vilnius, Lithuania.

Mobile phone: +37068827769, e-mail: sadzeviciene.ieva@gmail.com

The text of this dissertation can be accessed at the libraries of Vilnius University, as well as on the website of Vilnius University:

www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

SANTRUMPOS

- ADAMTS12* – disintegrino ir metalopeptidazės su trombospondino 1 tipo 12 motyvų genas (angl. *a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 12*)
- APC* – adenomatozinės polipozės genas (angl. *adenomatous polyposis coli*)
- BRCA1/2* – krūties vėžio 1/2 genas (angl. *breast cancer 1/2 gene*)
- CI – pasikliautinis intervalas (angl. *confidence interval*)
- DAPK1* – nuo kalcio ir kalmodulino priklausomos serino/treonino kinazės, genas (angl. *death-associated protein kinase 1*)
- DCIS – ductalinė karcinoma *in situ* (angl. *ductal carcinoma in situ*)
- ER – estrogenų receptoriai
- ESR1* – estrogeno receptoriaus 1 genas (angl. *estrogen receptor 1*)
- HR – santykinė rizika (angl. *hazard ratio*)
- FILIP1L* – su filaminu A besijungiantį baltymą koduojantis genas (angl. *filamin A interacting protein 1 like*)
- GSTP1* – glutationo S transferazės π 1 genas (angl. *glutathione S-transferase π 1*)
- HER2 – žmogaus epidermio augimo faktorius 2 (angl. *human epidermal growth factor receptor 2*)
- HRR – homologinė rekombinacinė reparacija (angl. *homologous recombinational repair*)
- IDC – invazinė ductalinė karcinoma (angl. *infiltrating lobular carcinoma*)
- Ki-67 – ląstelės proliferacijos žymuo
- kPGR – kiekybinė PGR
- KV – krūties vėžys
- LA – luminalinis A
- LB – luminalinis B
- LCIS – lobulinė karcinoma *in situ* (angl. *lobular carcinoma in situ*)
- M – metastazės
- MGMT* – O-6-metilguanino DNR metiltransferazės genas (angl. *methylguanine methyltransferase*)
- MSP – metilnimui jautri PGR (angl. *methylation-specific PCR*)
- MT1* – metalotioneinų 1 genų šeima (angl. *metallothionein 1*)
- N – naviko stadija pagal artimųjų limfmazgių pažeidimą
- NAALAD2* – N-acetilintos su α susijusios rūgštinės dipeptidazės 2 genas (angl. *N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase 2*)
- NKS – naujos kartos sekoskaita (angl. *next-generation sequencing*)
- NHEJ – nehomologinių galų sujungimas (angl. *non-homologous end-joining*)

NSG – naviko supresoriaus genas

OS – išgyvenamumas (angl. *overall survival*)

P14 – *P14^{ARF}*, *CDKN2A* – nuo ciklinų priklausomos kinazės inhibitoriaus 2A genas (4 transkriptas), koduojantis p14arf baltymą (angl. *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*)

P16 – *P16^{INK4A}*, *CDKN2A* – nuo ciklinų priklausomos kinazės inhibitoriaus 2A genas (1 transkriptas), koduojantis p16ink4a baltymą (angl. *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*)

PR – progesteronų receptorius

PRKCB – proteinkinazės C β genas (angl. *protein kinase C β*)

RARB – retinoinės rūgšties receptoriaus β genas (angl. *retinoic acid receptor beta*)

RASSF1 – Ras sąveikos domeną turinčių baltymų šeimos genas 1 (angl. *Ras association domain-containing protein 1*)

RUNX3 – su Runt susijęs transkripcijos faktoriaus 3 genas (angl. *Runt-related transcription factor 3*)

T – naviko stadija pagal auglio dydį

TN – trigubai neigiamas

TNM – vėžio klasifikavimo sistema

TP53 – naviko baltymo 53 genas (angl. *tumor protein 53*)

TURINYS

SANTRUMPOS	5
ĮVADAS	9
1. LITERATŪROS APŽVALGA	13
1.1. Krūties vėžys	13
1.1.1. Krūčių anatomija ir patologija	13
1.1.2. Krūties vėžio epidemiologija	17
1.1.3. Krūties vėžio rizikos veiksniai	18
1.1.4. Krūties vėžio klasifikacija	20
1.1.5. Krūties vėžio molekuliniai potipiai	22
1.2. DNR mutacijų reikšmė vėžio vystymuisi	24
1.2.1. DNR mutacijų tipai	24
1.2.2. DNR pažeidimų taisymas ir vėžys	25
1.2.3. Paveldimas krūties vėžys	27
1.2.4. <i>BRCA1/2</i> genai ir krūties vėžys.....	27
1.2.5. <i>TP53</i> genas ir krūties vėžys.....	31
1.3. DNR metilinimas	33
1.3.1. DNR metilinimo mechanizmas	33
1.3.2. DNR metilinimo reikšmė karcinogenezei	34
1.3.3. DNR metilinimas ir krūties vėžys	36
2. METODAI IR MEDŽIAGOS	43
2.1. Pacientai ir mėginiai	43
2.1.1. Krūties vėžiu sergančios pacientės.....	43
2.1.2. Šeiminių krūties vėžiu sergančios pacientės	45
2.2. Metodai	45
2.2.1. DNR gryninimas	45
2.2.2. DNR mutacijų analizė	46
2.2.2.1. <i>BRCA1/2</i> genų mutacijų tyrimai	46
2.2.2.2. <i>TP53</i> mutacijų analizė.....	47

2.2.3. DNR modifikacija natrio bisulfitu.....	49
2.2.4. Metiliniui jautri PGR (MSP).....	50
2.2.5. Statistinė analizė.....	51
3. REZULTATAI.....	53
3.1. <i>BRCA</i> genų mutacijų analizė šeiminio krūties vėžio atveju	53
3.2. <i>TP53</i> mutacijų analizė krūties vėžio mėginiuose.....	55
3.2.1. <i>TP53</i> mutacijų dažnis ir įvairovė krūties vėžio audiniuose	55
3.2.2. <i>TP53</i> mutacijų sąsajos su klinikiniais-patologiniais krūties vėžio rodikliais	56
3.3. DNR metilinimo analizė krūties vėžio mėginiuose	58
3.3.1. Tirtų genų promotorių DNR metilinimo dažnis krūties vėžio audiniuose.....	58
3.3.2. DNR metilinimo sąsaja su klinikiniais-patologiniais krūties vėžio rodikliais	61
3.3.3. <i>TP53</i> mutacijų ir DNR metilinimo sąsajos	63
3.4. DNR metilinimo biožymenys bendrajam išgyvenamumui prognozuoti.....	64
4. REZULTATŲ APTARIMAS	67
4.1. Krūties vėžio genetiniai pokyčiai	67
4.1.1. <i>BRCA1/2</i> genų mutacijos ir jų reikšmė	67
4.1.2. <i>TP53</i> geno mutacijos ir jų reikšmė.....	68
4.2. Epigenetiniai krūties vėžio pokyčiai.....	69
4.3. Išgyvenamumo analizė	73
IŠVADOS.....	76
SUMMARY OF DOCTORAL DISSERTATION.....	77
<i>CURRICULUM VITAE</i>	97
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	98
PRIEDAI	123
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS	130
REZULTATŲ VIEŠINIMAS	131
FINANSINĖ PARAMA.....	132

ĮVADAS

Kasmet Lietuvoje krūties vėžiu suserga apie 1500, o nuo šios ligos per metus miršta apie 500 moterų [Lietuvos vėžio registro duomenys: Vėžys Lietuvoje 2017, elektroninis išteklius]. Nepaisant gerėjančių diagnostinių priemonių, krūties vėžys vis dar išlieka pirmaujančia moterų onkologine liga [Europos vėžio informacijos sistemos (ECIS) duomenys, 2019, elektroninis išteklius].

Krūties vėžys diagnozuojamas instrumentiniais tyrimais: ultragarsiniu, mamografiniu ar taikant magnetinį rezonansą. Diagnozė tikslinama atlikus biopsiją ir audinį ištyrus imunohistocheminiais metodais, nustatant hormonų ir HER2 receptorių būseną. Papildomai gali būti atliekama baltyminių vėžio žymenų (CEA ir CA 15–3) paieška kraujyje, leidžianti patikslinti diagnozę, tačiau šių baltyminių žymenų specifiskumas siekia atitinkamai 56 % ir 41 % ir labiau siejasi su metastazių atsiradimu [Stieber ir kt., 2015].

Nepaisant heterogeniškumo, krūties vėžys yra skirstomas į keturis pagrindinius potipius (luminalinį A ir B, HER2 teigiamą ir TN – trigubai neigiamą), kurie skiriasi piktybiškumu, ligos eiga ir gydymo galimybėmis [Zardavas ir kt., 2015]. Trigubai neigiamas krūties vėžio potipis yra agresyviausias, nėra jam pritaikytos taikinių terapijos, be to jis linkęs greitai metastazuoti. TN potipio krūties navikuose dažnai randamos mutacijos (*TP53*, *BRCA1/2*), tačiau jam būdingų hipermetilintų genų nėra daug nustatyta [Fang ir kt., 2011].

Įvairiose besikaupiančios mutacijos lemia jos piktybėjimą. Mutacijai įvykus lątinėse ląstelėse, vystosi paveldimas vėžys ir net apie 5–10 % visų krūties vėžio atvejų yra paveldimi. Sergant paveldimu krūties vėžiu, dažnai randamų mutavusių *BRCA1* ir *BRCA2* genų koduojami baltymai dalyvauja taisant DNR pažaidas ir yra labai svarbūs palaikant genomo stabilumą bei kontroliuojant ląstelės ciklą [Sadeghi ir kt., 2020], tad moterims, paveldėjusioms mutavusį *BRCA1* ar *BRCA2* geną, rizika susirgti krūties vėžiu padidėja apie 70 % [Matta ir kt., 2022]. Kitas svarbus genas – *TP53* – yra dažniausiai mutuojantis genas vėžinėse ląstelėse [Silwal-Pandit ir kt., 2017]. Krūties navikuose *TP53* mutacijų aptinkama 20–50 % visų krūties vėžio atvejų [Powell ir kt., 2000; Langerod ir kt., 2007], tai lemia DNR pažaidų taisymo, apoptozės, ląstelės ciklo valdymo pakitimus, todėl sutrikus šiems procesams, ląstelėje pradeda kauptis vis daugiau mutacijų ir ji ima piktybėti [Pitoli ir kt., 2019]. *TP53* geno mutacijos yra laikomos radioterapijos kontraindikacija, nes gali padidinti antrinių navikų atsiradimo tikimybę [Lazzari ir kt., 2021], todėl *BRCA1/2* ir *TP53* mutacijų tyrimas yra labai svarbus tiek ligos profilaktikai, tiek gydymo planavimui.

Daugiau nei pusė baltymus koduojančių genų greta savo promotorinių sekų turi mažiausiai vieną CpG salą, todėl tokių genų raiška gali būti valdoma dalyvaujant DNR metilinimo procesui [Baylin ir kt., 2000]. Vėžinėse ląstelėse, šios CpG salos, karcinogenezę slopinančių genų promotoriuose dažnai randamos hipermetilintos, o tai lemia geno funkcijos nutildymą – transkripcijos slopinimą [Baylin ir kt., 2000]. Metilinimo žymenys yra labai patrauklus tyrimo objektas, nes karcinogenezėje promotoriaus metilinimas yra dažnesnis įvykis nei mutacijų atsiradimas. Palyginti su mutacijomis, kurių atskiroje ląstelėje gali susikaupti apie 80, genų promotorių sekose esančių CpG salų hipermetilinimo dažnis gali siekti nuo kelių šimtų iki 1000 [Ushijima ir kt., 2010]. DNR hipermetilinimas dažnai priklauso nuo audinio tipo, tačiau labiausiai ląstelės piktybėjimui yra jautrūs genai, dalyvaujantys ląstelės ciklo reguliacijoje, signalo perdavimo keliuose, programuotos ląstelių žūties, ląstelių adhezijos, angiogenezės, genomo stabilumo palaikymo, ksenobiotikų metabolizmo, sunkiųjų metalų surišimo bei genų raiškos valdymo procesuose [Das ir kt., 200].

Krūties vėžio tyrimų skaičius nuolat auga, o mokslininkai atranda vis naujų diagnostinių ir prognostinių krūties vėžio žymenų, kurie galėtų palengvinti naviko nustatymą, biologinį tipavimą ir leistų ne tik prognozuoti ligos eigą, bet ir numatyti atsaką į gydymą bei kurti individualizuoto gydymo galimybes [Sher ir kt., 2022]. Genetiniai ir epigenetiniai krūties vėžio biožymenys gali padidinti diagnostikos testų tikslumą, todėl svarbu vykdyti modernius tyrimus, leidžiančius detalai išanalizuoti molekulinį navikų profilį, ir didelėse gerai charakterizuotose imtyse patikrinti atrinktų žymenų informatyvumą. Šiame darbe, taikant šiuolaikines technologijas, buvo tiriamos *TP53* ir *BRCA2* genų mutacijos ir genų, dalyvaujančių įvairiuose krūties karcinogenezės etapuose, kaip *P14*, *P16*, *DAPK1*, *MGMT*, *FILIP1L*, *RARB*, *NAALAD2*, *GSTP1*, *MT1G*, *MT1E*, *MT1F*, *RUNX3*, *RASSF1*, *PRKCB*, *ADAMTS12*, *ESR1* ir *APC*, promotoriaus DNR metilinimo pakitimai.

Darbo tikslas – krūties navikuose ištirti atrinktų genų mutacijas, DNR metilinimo pokyčius ir įvertinti šių pokyčių diagnostinę ir prognostinę vertę bei sąsajas su klinikiniais-patologiniais krūties vėžio rodikliais.

Uždaviniai:

1. Išanalizuoti paveldėtos *BRCA2* geno mutacijos *c.3847_3848delGT* įtaką krūties vėžio klinikiniam pasireiškimui ir ligos eigai.

2. Ištirti krūties navikų *TP53* mutacijų dažnį, tipą ir įvertinti mutacijų sąsajas su klinikiniais-patologiniais rodikliais.
3. Krūties navikuose ištirti DNR metilinimo pakitimus su karcinogenezės procesais susijusių genų promotoriuose ir įvertinti šių biožymenų diagnostinę vertę ir sąsajas su krūties vėžio potipiais.
4. Įvertinti DNR metilinimo biožymenų sąsajas su klinikiniais-patologiniais krūties vėžio rodikliais.
5. Išanalizuoti DNR metilinimo pokyčius *TP53* mutaciją turinčių navikų grupėje ir jų sąsajas su klinikiniais-patologiniais rodikliais bei bendruoju išgyvenamumu.
6. Įvertinti DNR hipermetilinimo žymenų sąsajas su bendruoju išgyvenamumu visoje krūties vėžio imtyje.

Mokslinis naujumas ir praktinė reikšmė

Lietuvoje iki šiol nebuvo analizuotos retos *BRCA2* geno mutacijos *c.3847_3848delGT* šeiminės anamnezės klinikinės pasekmės. Šiame disertaciniame darbe taip pat pirmąsyk atliktas išsamus ankstyvų stadijų (I ir II) krūties vėžiu sergančių moterų *TP53* geno mutacijų tyrimas, kuriam naudotas pažangus ir tikslus naujos kartos sekoskaitos (NKS) metodas. Disertaciniame darbe pirmą kartą Lietuvos populiacijoje atlikta detali DNR hipermetilinimo žymenų analizė, apimanti 116 navikų, ir atskirai išnagrinėtas *TP53* mutaciją turinčių navikų DNR metilinimo profilis. Nors krūties vėžys pasaulyje yra plačiai tyrinėjamas [Cho ir kt., 2022; Dugué ir kt., 2022], Lietuvoje iki šiol nebuvo atlikta plati biožymenų analizė, apimanti 17-os, skirtingas funkcijas ląstelėje atliekančių, genų hipermetilinimą.

Šio disertacinio tyrimo rezultatai parodė, kad, remiantis DNR hipermetilinimo biožymenų tyrimu, galima statistiškai reikšmingai atskirti ankstyvos stadijos krūties navikus nuo nevėžinių darinių ir diferencijuoti krūties vėžio potipius. Literatūroje rašoma, kad agresyviausio ir heterogeniškausio – trigubai neigiamo (TN) – potipio navikams nėra būdingas dažnas hipermetilinimas [Fang ir kt., 2011]. Disertaciniame darbe buvo nustatytas išskirtinai TN potypiui būdingas *MT1E* ir *FILIP1L* genų hipermetilinimas, taip pat didelis *TP53* mutacijų dažnis. *TP53* mutacijų analizė atskleidė sąsają su agresyvesnio fenotipo krūties vėžiu, taip pat pirmąsyk Lietuvoje buvo atliktas epigenetinis *TP53* mutaciją turinčių krūties navikų tyrimas, kurio metu buvo aptiktas būdingas *MT1E* geno hipermetilinimas bei nustatyta, kad *TP53* mutacija ir *FILIP1L* geno hipermetilinimas kartu prognozuoja blogą ligos baigtį. Kadangi TN krūties

vėžio potipio pacienčių išgyvenamumas trumpiausias, galima daryti prielaidą, jog šie epigenetiniai žymenys turi ne tik diagnostinį, bet ir prognostinį potencialą.

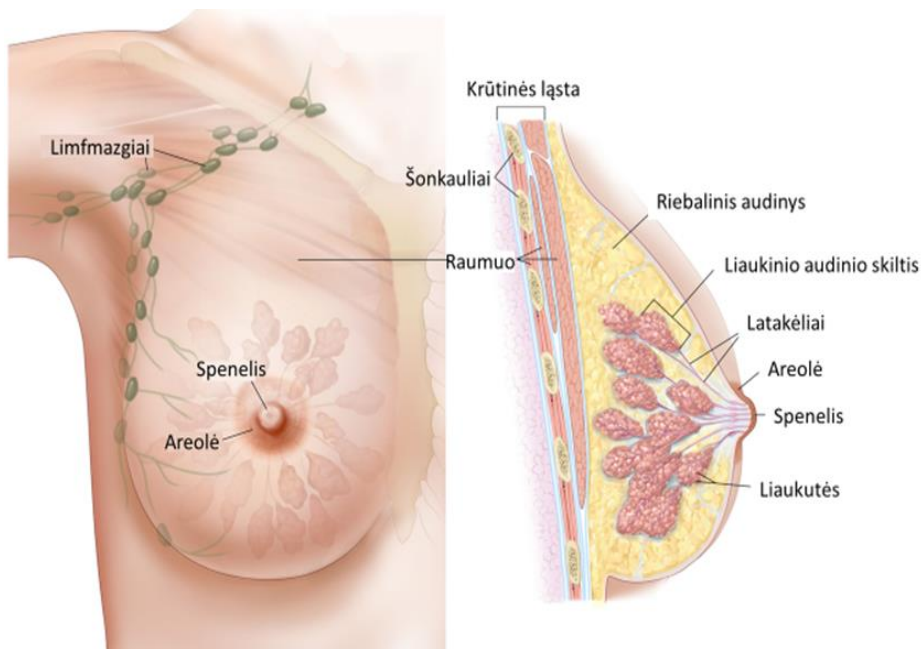
Rengiant disertaciją buvo atliktas krūties vėžio tyrimas, kuriame buvo analizuojami atskirų potipių genetiniai ir epigenetiniai skirtumai, o molekulinė informacija siejama su klinikiniais-patologiniais rodikliais bei išgyvenamumu. Tai leido dar detaliau panagrinėti didelį krūties vėžio heterogeniškumo laipsnį.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Krūties vėžys

1.1.1. Krūtų anatomija ir patologija

Krūtys – porinis organas, sudarytas iš riebalinio, jungiamojo ir liaukinio audinio skilčių. Liaukinį audinį sudaro 15–20 skiltelių (liaukučių) turinčios pieno liaukos, susijungusios pieno latakais ir atsiveriančios spenelyje. Kiekvienoje pieno liaukos skiltelėje yra smulkesnių struktūrų, vadinamų alveolėmis, kuriose gaminamas pienas. Išilginės jungiamojo audinio dalys formuoja pertvaras, prilaikančias liaukines skiltis, o riebalinis audinys užpildo tarpus tarp liaukų. Krūtyje taip pat gausu kraujagyslinio ir limfagyslių tinklo. Pagrindiniai limfagyslių mazgai išsidėstę pažastyse, poraktikaulinėse ir užkrūtinkaulinėse limfmazgių sankaupose (1.1 pav.) [NVI duomenys: Apie krūties vėžį, 2014, elektroninis išteklius; Bland ir kt., 2018].



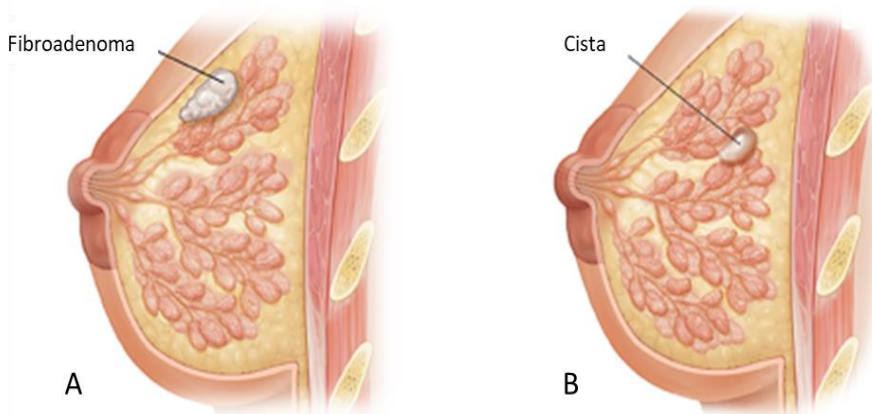
1.1 pav. Krūties sandara [pritaikyta pagal „The Web site of the National Cancer Institute“, Winslow ir kt., 2014, elektroninis išteklius].

Krūtys yra sudėtingos struktūros organas, kuris, veikiamas hormonų, per gyvenimą keičiasi: pradedant brendimu, kai krūtys ima vystytis, tęsiant kūdikio maitinimo periodu, kai organas, veikiamas hormonų, ima visiškai

funkcionuoti išskirdamas pieną, ir baigiant menopauze, kuri sukelia liaukinio audinio nykimą [Bland ir kt., 2018].

Gerybiniai krūtų navikai. Apie 70 % aptinkamų krūties darinių yra gerybiniai [Sasaki ir kt., 2018]. Gerybiniai dariniai apibūdinami kaip stabilūs ir bėgant laikui nesikeičiantys. Jiems nebūdinga padidėjusi proliferacija ir supiktybėjimo rizikos visai nėra arba ji nedidelė [Guray ir kt., 2006; Calhoun ir kt., 2018]. Gerybinius krūties navikus sukelia endokrininiai pakitimai organizme (pakitęs moters ciklo hormonų balansas), hormoninių preparatų vartojimas ir neendokrininiai veiksniai, tokie kaip metilksantinų perteklius (gaunamas su kava, kakava ar arbata), antsvoris, sukeliantis endogeninių hormonų lygį organizme, ir jodo trūkumas, didinantis liaukinio epitelio jautrumą estrogenų stimuliacijai [Ghent ir kt., 1993; Sasaki ir kt., 2018].

Daugiau kaip 50–60 % visų gerybinių darinių sudaro neproliferojančioms gerybinėms krūtų ligoms priskiriamos **fibroadenomos (FA)**, jos išsivysto 10 % visų moterų (1.2 A pav.) [Calhoun ir kt., 2018; Sasaki ir kt., 2018]. Tai aiškias ribas turintys, kapsuliuoti gerybiniai navikai, sudaryti iš stromos ir epitelio komponentų. Rizika iš FA išsivystyti karcinomai (ypač lobulinei) siekia 0,1–0,3 % [Sasaki ir kt., 2018].



1.2 pav. Krūtų gerybiniai dariniai: fibroadenoma (A) ir cista (B) [pritaikyta pagal „Spectrum Health Lakeland“, 2022, elektroninis išteklius].

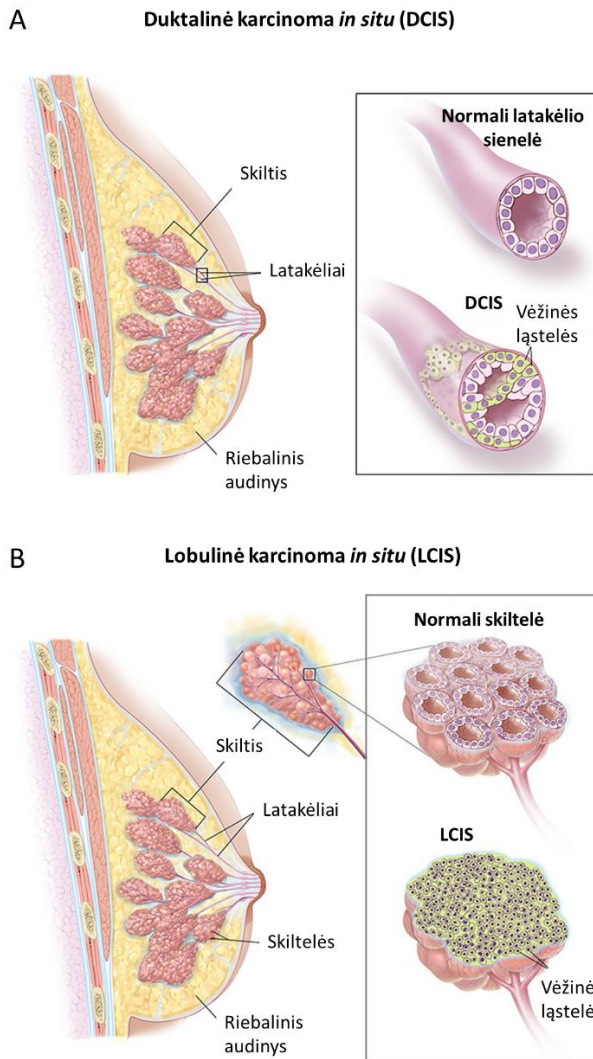
Cistos – nedideli, skysčio prisipildę pieno latakėlių išsiplėtimai, jų dydis yra nuo 1 mm iki kelių centimetrų (1.2 B pav.). Kai kurios cistos vadinamos apokrininėmis ir yra išklotos sekrecinėmis ląstelėmis, kuriose yra

mitochondrinių-lizosominių ir sekretinių granulių. Šis epitelis dažnai yra stulpelinis, su išreikštu apvaliu branduoliu, tačiau šio pobūdžio netipinė hiperplazija nėra linkusi piktybėti ir vėžiniais dariniais tampa tik 0,3 % cistų. Apokrininės cistos nuo paprastųjų skiriasi kalio ir tam tikrų steroidinių hormonų kiekiu [Calhoun ir kt., 2018].

Išskiriama keletas tipų gerybinių darinių, kurių supiktybėjimo tikimybė yra didesnė. Tai sklerozuojanti adenoza, nustatoma 28 % atvejų iš visų gerybinių darinių ir dvigubinanti riziką išsivystyti krūties vėžiui. Netipinės duktalinės hiperplazijos rizika tapti duktaline karcinoma *in situ* (DCIS) yra 13–31 %, kaip ir netipinės lobulinės hiperplazijos, dėl kurios vėžio išsivystymo rizika, palyginti su sveikomis moterimis, padidėja keturis kartus. Latakėlių papildomos taip pat yra gerybiniai dariniai, kurie didina krūties vėžio atsiradimo riziką nuo 2 iki 5 kartų [Sasaki ir kt., 2018].

Krūties vėžys – labai heterogeniška onkologinė liga, kurios atsiradimo, progresavimo ir metastazių plitimo procesą aktyvuoja pakitę ląstelės signaliniai keliai, reguliuojantys augimo, proliferacijos, diferenciacijos, atsako į stresą, DNR taisymo, metabolizmo ir apoptozės procesus. Šie pokyčiai vyksta palaipsniui, iki ląstelė supiktybėja [Joshi ir kt., 2018]. Paveldimas krūties vėžys sudaro iki 5–10 % visų krūčių vėžio atvejų, likusi dalis yra sporadiniai navikai, kurių atsiradimą nulemia genetiniai ir epigenetiniai pokyčiai [Poggio ir kt., 2018].

Neinvazinis krūties vėžys – tai neišplitęs vėžys, dažniausiai atsirandantis latakėliuose ir vadinamas duktaline karcinoma *in situ* (angl. *ductal carcinoma in situ*, DCIS; 1.3 A pav.) arba lobuline karcinoma *in situ* (angl. *lobular carcinoma in situ*, LCIS; 1.3 B pav.), kuri yra retesnio tipo ir atsiranda liaukiniame krūties audinyje. Nors netipinės ląstelės yra lokaliai ir neišplitusios į gretimus audinius, tačiau šio tipo vėžys gali progresuoti ir tapti invazinis [Akram ir kt., 2017].



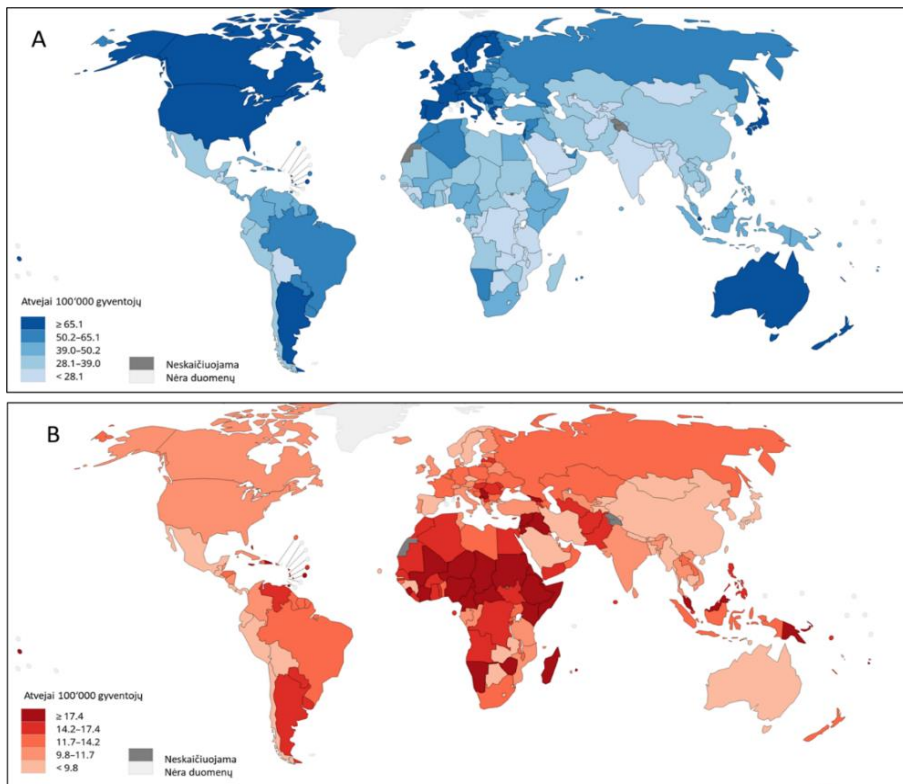
1.3 pav. Duktalinė (A) ir lobulinė (B) krūties karcinoma *in situ* [pritaikyta pagal „The Web site of the National Cancer Institute“, Winslow ir kt., 2014, elektroninis išteklius].

Invazinis krūties vėžys – greitai plintanti iš pirminės atsiradimo vietos liga. Šiam tipui būdingas vėžinių ląstelių plitimas jau ankstyvame vystymosi etape. Išplitęs invazinis krūties vėžys vadinamas metastazavusiu, o organai ir audiniai, į kuriuos krūties vėžio ląstelės dažniausiai metastazuoja, yra smegenys, kaulai, plaučiai, antinksčiai ir kepenys [Welch ir kt., 2019]. Dažniausiai nustatomas invazinio krūties vėžio tipas yra invazinė duktalinė

karcinoma (angl. *infiltrating ductal carcinoma*, IDC) – 75 % atvejų, rečiau pasitaiko invazinė lobulinė karcinoma (angl. *infiltrating lobular carcinoma*, ILC) – 15 % atvejų [American Cancer Society, 2019, elektroninis išteklius]. Prie invazinių krūties vėžio tipų taip pat priskiriamos retesnės formos: medulinė, koloidinė, tubulinė, metaplazinė, papiliarinė karcinomos, uždegiminis krūties vėžys ir Pedžeto liga [Akram ir kt., 2017].

1.1.2. Krūties vėžio epidemiologija

Krūties vėžys yra dažniausiai diagnozuojama moterų vėžinė liga pasaulyje. 2020 m. registruota daugiau nei 2,26 mln. naujų susirgimų ir apytiksliai 685 000 mirčių nuo krūties vėžio (1.4 A, B pav.). Krūties vėžys yra dažniausia moterų mirties nuo vėžio priežastis ir patenka tarp penkių dažniausių mirties priežasčių nuo vėžio pasaulyje [Ferlay ir kt., 2022]. Numanoma, kad Europoje iki 2040 m. krūties vėžio atvejų padaugės beveik 10 %, o mirtingumas bus 25 % didesnis nei 2020 m.



1.4 pav. Sergamumo krūties vėžiu (A) ir mirtingumo nuo krūties vėžio (B) rodikliai pasaulyje, standartizuoti pagal amžių ir skaičiuojami 100'000 gyventojų [pritaikyta pagal Ferlay ir kt., 2022].

Lietuvoje krūties vėžys sudaro 22 % visų nustatomų moterų piktybinių ligų, o mirtingumas nuo šios ligos pirmauja tarp visų vėžio tipų ir siekia 13 % [Ferlay ir kt., 2022]. Tikimybė susirgti krūties vėžiu Lietuvos moterims pradeda augti nuo 30 metų amžiaus ir piką pasiekia sulaukus 60–70 metų amžiaus, o toliau su amžiumi mažėja [Europos vėžio informacijos sistemos (ECIS) duomenys, 2019, elektroninis išteklius].

Lietuvoje kasmet diagnozuojama apie 1500 naujų krūties vėžio atvejų, kurių didžiąją dalį (~66 %) sudaro I ir II stadijų krūties vėžys, apie 15 % atvejų liga diagnozuojama III stadijoje ir apytiksliai 9 % – IV stadijoje. Nors mirtingumas nuo krūties vėžio visose amžiaus grupėse užima pirmą vietą (14 %), daugiau nei 1 metų išgyvenamumas siekia 93 %, apie 5 metus išgyvena 79 %, o virš 10 m. – apie 40 % susirgusiųjų [Lietuvos vėžio registro duomenys: Vėžys Lietuvoje 2017, elektroninis išteklius].

1.1.3. Krūties vėžio rizikos veiksniai

Hormonų įtaka. Krūties vėžio atsiradimą lemia daugelis aplinkos ir vidinių organizmo veiksnių. Vienas iš tokių veiksnių – menstruacijų pradžios amžius. Žinoma, kad kuo vėliau jos prasideda, tuo rizika susirgti yra mažesnė. Sisti ir kolegų atliktame tyrime teigiama, kad santykinė krūties vėžio rizika didėja 5 % su kiekvienais ankstyvų menarchių metais [Sisti ir kt., 2015], o mergaitėms, kurioms menstruacijos atsirado vyresniame nei 13 metų amžiuje, tikimybė ilgainiui susirgti krūties vėžiu buvo 18 % mažesnė nei toms, kurioms hormoninis ciklas prasidėjo 11 metų, ir tai buvo svarbesnis veiksnys nei menopauzės pradžios amžius [Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer 2012].

Šąsąją su krūties vėžio rizika turi ir palikuonių skaičius bei žindymo trukmė – didesnis palikuonių skaičius ir jaunesnis moters amžius gimdymo metu, kaip ir ilgesnis žindymo laikotarpis, reikšmingai mažina susirgimo tikimybę [Dall ir kt., 2017]. 2013 m. atliktoje 32 tyrimų apžvalgoje nurodoma, kad nors kartą žindžiusioms moterims, palyginti su niekada nežindžiusiomis, krūties vėžio rizika yra 14 % mažesnė, o žindžiusioms 12 mėnesių ir ilgiau – rizika sumažėja 28 % [Anothaisintawee ir kt., 2013].

Krūties vėžio rizikai svarbus moters amžius ne tik vaisingumo pradžioje, bet ir jo pabaigoje. Žinoma, kad vėlyvą menopauzę patyrusios moterys turi statistiškai didesnę tikimybę susirgti krūties vėžiu [Sisti ir kt., 2016]. Saxena ir kolegų atliktas tyrimas atskleidė, kaip menopauzės simptomams palengvinti skiriamas hormoninis gydymas (taikytas ne mažiau kaip 15 metų) veikia krūties vėžio riziką: estrogenų terapija šią riziką didina 19 %, o kombinuota estrogenų ir progesteronų terapija – net 83 % [Saxena ir

kt., 2010]. Šiuolaikinių kontraceptinių preparatų tyrimai rodo, kad moterims, vartojančioms kontraceptines tabletes, rizika susirgti krūties vėžiu padidėja 20 % ir išlieka iki 5 metų po vaisto vartojimo nutraukimo, jei vaisto vartojimo trukmė buvo daugiau nei 5 metai [White ir kt., 2018].

Amžius. Krūties vėžys jaunoms, iki 25 metų amžiaus moterims diagnozuojamas labai retai (< 10 atvejų 100 tūkst. moterų), bet iki 45 metų amžiaus ši tikimybė padidėja 100 kartų ir tolygiai didėja iki 75 metų amžiaus. Krūties vėžio diagnozavimas populiacijoje piką pasiekia 60–70 metų amžiaus grupėje ir nuo 80-ies metų pamažu mažėja [Dumitrescu ir kt., 2005].

Rasė. Krūties vėžys dažniausiai diagnozuojamas baltosios rasės moterims (130,8 atvejų 100 tūkst. moterų). Nuo jų nedaug atsilieka juodaodės – tarp jų krūties vėžiu serga 126,7 iš 100 tūkst. moterų. Juodaodžių moterų mirtingumas nuo krūties vėžio yra didžiausias tarp visų rasių (24,8 atvejų 100 tūkst. moterų) ir net dvigubai lenkia Azijos–Ramiojo vandenyno salų gyventojų rodiklius, kurių išgyvenamumo duomenys yra geriausi (11,5 atvejų iš 100 tūkst. moterų). Palyginti su kitų rasių moterimis, juodaodėms krūties vėžys dažniau diagnozuojamas iki 40 metų amžiaus, o mirties atvejų nustatoma įvairiose amžiaus grupėse. Nagrinėjant pagal krūties vėžio potipių pasiskirstymą tarp rasių, matyti, kad daugiau nei 30 % juodaodžių rasėje sudaro TN potipis, kuris kitose rasėse aptinkamas perpus rečiau [American cancer society, 2019].

Paveldimumas. Moterims, kurių šeimos istorijoje buvo krūties vėžio atvejų (ypač tarp pirmos eilės giminaičių), rizika susirgti yra 1,75 karto didesnė. Ši rizika tampa didesnė 2–5 kartus, jei sergančiųjų krūties vėžiu giminėje buvo daugiau nei vienas pirmos eilės giminaitis. Rizika taip pat didėja, jei diagnozės giminėje buvo nustatytos jauname amžiuje ar krūties vėžys išsivystė abiejose krūtyse [Sun ir kt., 2017].

Aplinkos poveikis. Veiksniams, susijusiems su aplinkos poveikiu, priskiriamas rūkymas, alkoholio vartojimas, atsvaris ir fizinio aktyvumo trūkumas [Baselga ir kt., 2002; Kim ir kt., 2014]. Daugiau nei 10 metų rūkančioms moterims, ypač pradėjusioms rūkyti prieš pirmojo vaiko gimimą, krūties vėžio išsivystymo rizika padidėja 18 % [Gaudet ir kt., 2013]. Alkoholio vartojimas irgi didina krūties vėžio išsivystymo riziką: moterims, per dieną suvartojančioms 2–3 alkoholinio gėrimo vienetus, rizika susirgti krūties vėžiu yra 20 % didesnė nei alkoholio nevartojančioms [Liu ir kt., 2015]. Didelis atsvaris po menopauzės beveik dvigubai didina krūties vėžio, kuriam būdinga hormonų receptorių raiška, išsivystymo lygį. Didelis kūno riebalų kiekis kelia estrogeno lygį ir sužadina kitų hormonų raišką, pvz., didina insulino kiekį organizme, tačiau fizinis aktyvumas hormonų balansą

sureguliuoja ir reguliariai sportuojančioms moterims krūties vėžio rizika sumažėja 10–20 % [Iyengar ir kt., 2019; Pizot ir kt., 2016].

1.1.4. Krūties vėžio klasifikacija

Žinoma, kad skirtingose krūties vėžio vystymosi stadijose ligos molekulinė, fiziologinė ar morfologinė būseną, atsakas į gydymą ir ligos eiga gali keistis. Nepaisant ligos heterogeniškumo, krūties vėžys gali būti klasifikuojamas remiantis imunohistocheminiais, histopatologiniais ir genetiniais metodais [Perou ir kt., 2000; Eliyatkin ir kt., 2015; Nascimento ir kt., 2020]. Šiuo metu patologai išskiria keturias pagrindines krūties vėžio grupes – potipius ir, remdamiesi nustatytu potipiu, skiria specifinį gydymą.

Krūties vėžys yra diagnozuojamas ir apibūdinamas pagal 5 kriterijus:

1. Histopatologinis tipas, nurodantis kokio tipo audinyje yra atsiradęs krūties vėžys:

- Invazinė duktalinė karcinoma (IDC) (~75%)
- Duktalinė karcinoma *in situ* (DCIS) (~15%)
- Invazinė lobulinė karcinoma (ILC) (~5%)

2. Diferenciacijos laipsnis (angl. *grade*, **G**), apibūdinantis gerai diferencijuotus navikus (G1) kaip mažiau piktybinius, palyginti su vidutinės diferenciacijos navikais (G2) ar piktybiškiausiais – blogai diferencijuotais (G3) navikais.

3. Ligos stadija pagal TNM sistemą, krūties navikus skirstant pagal dydį (angl. *tumor*, **T**), plitimą į sritinius limfmazgius (angl. *node*, **N**) ir metastazes (angl. *metastasis*, **M**). Pagal šią sistemą skiriamos I, II, III ir IV ligos stadijos (1.1 lentelė).

1.1 lentelė. Krūties vėžio klasifikavimas pagal TNM sistemą [UICC 2022, elektroninis išteklius].

TNM vertinimas	Apibūdinimas	Stadija	TNM kodas
Tis	Navikas <i>in situ</i>	0	TisN0M0
T1	Navikas ≤ 2 cm	I	T1N0M0
T2	Navikas > 2 cm, bet ≤ 5 cm	II A	T0N1M0
T3	Navikas ≥ 5 cm		T1N1M0
T4	Bet kokio dydžio, išplitęs per krūties sienelę, odos pažeidimai		T2N0M0
N0	Sritiniai limfmazgiai nepažeisti	II B	T2N1M0 T3N0M0
N1	Metastazės 1–3 pažastiniuose limfmazgiuose	III A	T0N2M0
N2	Metastazės 4–9 pažastiniuose limfmazgiuose		T1N2M0
N3	Metastazės ≥ 10 kaklo ir poraktikaulinių limfmazgių		T2N2M0 T3N1M0 T3N2M0
M0	Metastazių nėra	III B	T4N(visi)M0
M1	Vėžys randamas kituose organuose	III C	T(visi)N3M0
		IV	T(visi)N(visi)M1

4. Imunohistocheminė, receptorinė naviko būseną, apibūdinanti naviką pagal estrogeno (ER) ir progesterono (PR) receptorių bei žmogaus epidermio augimo veiksnio 2 (HER2), taip pat ląstelių proliferacijos žymens Ki-67 raiškos lygį (žr. 1.1.5 poskyrį „Krūties vėžio molekuliniai potipiai“).

5. Genetinė ir specifinių žymenų analizė, leidžianti grupuoti krūties vėžį į paveldimą (kai yra mutavęs *BRCA1* ar *BRCA2* genas), ar sporadinį naviką, taip pat tikslinti diagnozę ar gydymo efektyvumą, atliekant CA 15–3, CA125, CEA baltyminių žymenų tyrimą ir genetinius testus (PAM50, MammaPrint, Oncotype DX, Theros/MGI ir MapQuant DX [Colombo ir kt., 2011]).

Ištyrę krūties naviko histopatologinius ir imunohistocheminius parametrus, onkologai ir patologai priskiria krūties vėžį tam tikram tipui,

stadijai ir potipiui, kuriems yra būdingi ne tik tam tikri ligos parametrai, bet ir ligos eiga bei gydymo schema.

1.1.5. Krūties vėžio molekuliniai potipiai

Krūties vėžys yra skiriamas į keturis pagrindinius potipius:

- 1. Luminalinis A (LA)** potipis apibūdina naviką kaip teigiamą pagal abiejų receptorių – estrogeno (ER+) ir progesterono (PR+) – raišką, tačiau šiam potipiui nebūdinga HER2 receptoriaus geno amplifikacija, taip pat randama nedidelė proliferacijos žymens Ki-67 (< 14 %) raiška. Šio tipo navikai sudaro didžiausią procentą iš visų nustatomų krūties vėžio potipių. LA navikai yra lėtai augantys ir mažiausiai agresyvaus fenotipo [Zardavas ir kt., 2015].
- 2. Luminaliniam B (LB)** potipiui, kaip ir LA, būdinga ER receptorių raiška, o PR receptoriaus raiška gali būti padidėjusi arba jos gali nebūti. Be to, LB potipio navikuose randama HER2 receptoriaus geno amplifikacija, taip pat didelė (> 14 %) proliferacijos žymens Ki-67 raiška. Kadangi LB yra agresyvesnio tipo krūties vėžys nei LA, atsakas į gydymą yra prastesnis. Įprastai LA ir LB navikai yra gydomi skiriant hormonų terapiją, pvz., tamoksifeną, kuris blokuoja estrogeno sąveiką su receptoriumi. [Zardavas ir kt., 2015].
- 3. HER2** krūties vėžio potipiui nebūdinga estrogeno ir progesterono hormonų receptorių raiška, tačiau būdinga HER2 receptoriaus geno amplifikacija, lemianti greitą ir nekontroliuojamą ląstelių augimą ir dalijimąsi. Šis potipis yra agresyvesnis už luminalinius, tačiau sėkmingai gydomas monokloniniais antikūnais, pvz., trastuzumabu [Zardavas ir kt., 2015].
- 4. Trigubai neigiamas (TN)** potipis sudaro apie 15–20 % visų nustatomų krūties vėžio atvejų ir yra neigiamas pagal ER ir PR hormonų receptorių ir HER2 receptoriaus raišką. TN krūties vėžiui dažniau būdingas ligos atkrytis, didesnė metastazių išsivystymo tikimybė, o vidutinis išgyvenamumas, jei liga yra metastazavusi, siekia 13–18 mėnesių [Andre ir kt., 2012]. Šiam potipiui būdingos genų *BRCA1/2* ir *TP53* mutacijos, didelė proliferacijos žymens Ki-67 raiška ir padidėjusi citokeratinių, P-kadherino, kalveolinų, nestino, CD44, epidermio augimo veiksnio receptoriaus (EGFR), hepatocitų ir insulino augimo veiksnių raiška [Pourteimoor ir kt., 2016]. TN potipis

yra agresyviausias, jo prognozė blogiausia, o gydymas – konservatyvus, netaikoma specifinė taikinių terapija.

Lehman ir kolegos [Lehmann ir kt., 2011], remdamiesi genų raiškos tyrimais ir somatinėmis mutacijomis, išskyrė šiuos **TN** krūties vėžio potipius:

- a) **BL1** (angl. *basal-like 1*) potipiui būdingi pokyčiai genuose, susijusiuose su atsaku į DNR pažeidimus ir ląstelės ciklo reguliacija, taip pat itin didelis *TP53* mutacijų dažnis (92 %), didelis *MYC*, *CDK6* ar *CCNE1* genų amplifikacijos dažnis, *BRCA2*, *PTEN*, *MDM2* ir *RB* genų funkcijos praradimas [Bareche ir kt., 2018].
- b) **BL2** (angl. *basal-like 2*) potipiui būdingas aukštas augimo veiksmų raiškos lygis ir metabolizmas, greitos proliferacijos fenotipas, koreliuojantis su padidėjusiu pCR (angl. *pathological complete response*). Šiam potipiui būdingas teigiamas atsakas į vėžio gydymą, kai naudojami mitozės slopikliai, pvz., taksanai.
- c) **IM** (angl. *immunomodulatory*) potipiui būdinga antigenų raiška ir aktyvūs imuninių ląstelių bei citokinų (*JAK/STAT*, *TNF*, *NKκB*) signaliniai keliai.
- d) **MSL** (angl. *mesenchymal stem-like*) potipis panašus į mezenchiminį potipį, kuriam būdingas panašus genų raiškos profilis, susijęs su ląstelių invaziškumu ir diferenciacija. Taip pat MSL potipiui būdingas unikalus, su angiogeneze ir kamieninėmis ląstelėmis susijusių genų aktyvumas ir maža klaudinų, transmembraninių baltymų, atsakingų už tarpląstelinius ryšius, raiška.
- e) Nepaisant neigiamos ER raiškos, **LAR** (angl. *luminal androgen receptor*) potipis pasižymi jam būdingu, panašiu į luminalinių navikų genų raiškos profiliu (*FOXA1*, *GATA3*, *SPDEF* ir *XBPI*) ir padidėjusiu androgenų receptoriaus iRNR ir baltymų lygiu. LAR navikuose dažnai randama *PIK3CA* (55 %), *KMT2C* (19 %), *CDHI* (13 %), *NF1* (13 %) ir *AKT1* (13 %) genų mutacijų [Bareche ir kt., 2018].

1.2. DNR mutacijų reikšmė vėžio vystymuisi

1.2.1. DNR mutacijų tipai

Žmogaus genome yra daugiau nei 3,1 mlrd. nukleotidų porų ir tam, kad ląstelės ciklas vyktų be trikdžių, kiekvienas nukleotidas replikacijos metu turi būti atidžiai nukopijuojamas, o dėl aplinkos poveikio susidaranti pažeidimai – nuolat taisomos. Klaidos replikacijos metu yra retos (0,000165 %), tačiau įvyksta kas 10^{10} nukleotidų [Carlin ir kt., 2011]. Mutacijos – tai reti DNR sekos pokyčiai, kurie gali lemti transliuojamo baltymo pokyčius, pakeisti ar nutildyti geno raišką arba nepaveikti nei geno, nei baltymo funkcijos.

Pagal DNR struktūros pokyčius mutacijos yra skirstomos į šiuos tipus:

- 1) *Taškinės* mutacijos, kurių vienas nukleotidas yra pakeistas kitu. Šis mutacijų tipas toliau dar gali būti skirstomas į:
 - a. *missense* (keičiančias prasmę) mutacijas, kai transliuojamame baltyme yra pakeičiama aminorūgštis ir tai gali lemti baltymo funkcijos pokytį.
 - b. *nonsense* (neprasmingas) mutacijas, lemiančias ankstyvo STOP kodono atsiradimą sekoje ir nefunkcionalų baltymą.
 - c. *silent* (neutralias) mutacijas, kai nukleotido pakaita nekeičia transliuojamo baltymo aminorūgščių sekos.
- 2) Sukeliančios *rėmelio poslinkį*:
 - a. *insercijos*, kai į seką įsiterpia vienas ar du nukleotidai, galintys sukelti rėmelio poslinkio efektą ir taip paveikti transliuojamo baltymo funkciją.
 - b. *delecijos*, kai iš sekos pašalinamas vienas ar keli nukleotidai. Ši mutacija gali lemti nedidelius pokyčius, pvz., vienos aminorūgšties pasikeitimą, arba didelius baltymo pažeidimus dėl skaitymo rėmelio poslinkio. Iškritus didesniai chromosomos regionui, gali būti prarandamas didelis genų kiekis arba iš naujai susiliejusiu chromosomos regionų gali būti transliuojami nauji baltymai.
- 3) *Amplifikacijos* – tai chromosomos dalies pagausėjimas, dėl kurio daugėja genų kopijų skaičius ir išauga jų produktų kiekis.

- 4) *Inversijos* – „apsivertusios“ DNR sekos, galinčios paveikti baltymo funkcijas.
- 5) *Translokacijos* – nehomologinių chromosomų apskeitimas chromosomų dalimis.

Mutacijos gali paveikti tiek transkripcijos, tiek translacijos produktą, keisdamos jo funkciją, todėl pagal poveikį funkcijai, mutacijos yra skirstomos į:

1. *Dominuojančiai neigiamas* (angl. *dominant negative*), kai mutantinis baltymas veikia priešingai *wild-type* variantui.
2. *Padidėjusios funkcijos* (angl. *gain-of-function*, GOF), kai mutantinis baltymas įgauna naują, nenormalią funkciją
3. *Praradusios funkciją* (angl. *loss-of-function*, LOF), kai mutantinis baltymas neturi jokios funkcijos arba ji yra sumažėjusi [Kassem ir kt., 2012].

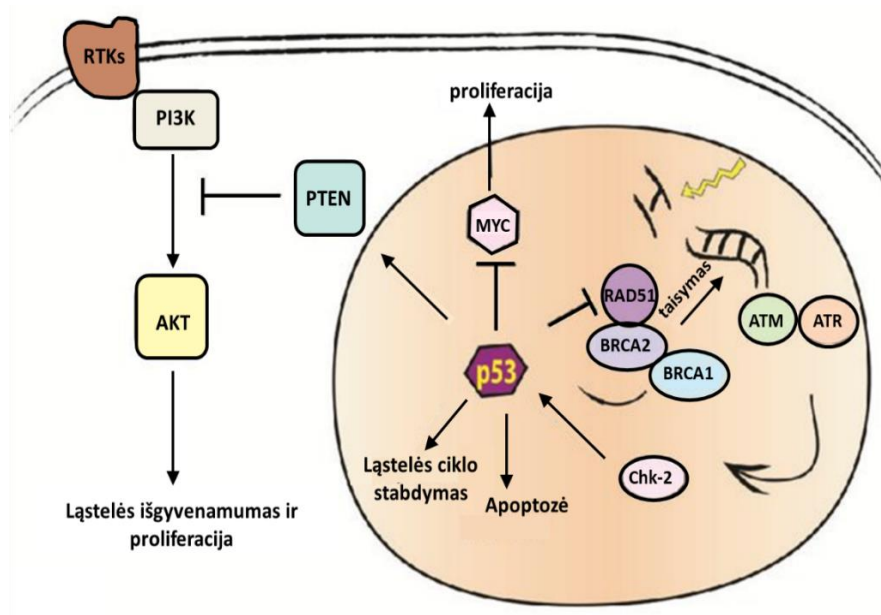
1.2.2. DNR pažeidimų taisymas ir vėžys

Ląstelę nuolat veikia ne tik išoriniai (UV, radioaktyvioji spinduliuotė, cheminės medžiagos, reaktyvusis deguonis ir tt.), bet ir vidiniai veiksniai, tokie kaip DNR sintezės metu neišvengiamos polimerazės klaidos, todėl susidaranti genetinė pažeidimas yra didelis iššūkis ląstelės genomo integralumui. Tam, kad būtų palaikomas genomis vientisumas, eukariotų ląstelėse yra įvairių pažeidimų taisymo mechanizmų, o juos aptinka sudėtingos DNR pažeidimų kontrolės sistemos, gebančios sustabdyti ląstelės ciklą, kad pakaktų laiko DNR pažeidimams taisyti. Aptikus ir ištaisius pažeidimą, ląstelės ciklas vykdomas toliau arba prasideda apoptozė. Mutavus svarbiems pažeidimų taisymo komponentams, pvz., *BRCA1/2* ar *TP53*, mutacijos ląstelėje kaupiasi ir tokia ląstelė ima piktybėti [Basu ir kt., 2018].

DNR taisymo mechanizmai užtikrina genomo stabilumą ir vientisumą. Sustabdžius ląstelės ciklą, aktyvuojamas pažeidimai specifinis DNR pažeidimų taisymo mechanizmas. Viengrandiniai trūkiausiai taisomi naudojant ekscizinę bazių reparaciją (angl. *base excision repair*, BER), dideli DNR aduktai ir DNR sąryšos (angl. *crosslink*) taisomos ekscizinės nukleotidų reparacijos (angl. *nucleotide excision repair*, NER) metodu, o dvigrandiniai trūkiausiai taisomi pasitelkiant nehomologinį galų sujungimą (angl. *non-homologous end-*

joining, NHEJ) ir homologinę rekombinacinę reparaciją (angl. *homologous recombination repair*, HRR) [Ahmad ir kt., 2015].

Taisant trūkius NHEJ metodu, nutrūkę DNR galai suartinami ir suliguojami, tačiau šis taisymo būdas nėra labai tikslus ir palieka klaidų, dėl to taisoma seka lieka pakitusi [Chang ir kt., 2017]. Jeigu kaip trūkio taisymo šablonas yra prieinama seserinė chromatidė, tuomet DNR replikacijos metu ar iš karto po jos inicijuojamas tikslesnis klaidų taisymo mechanizmas – HRR, kuriame dalyvauja *BRCA1* ir *BRCA2* genų koduojami baltymai [Venkitaraman ir kt., 2002]. *BRCA1/2* yra aktyvuojami ATM/ATR signalinių baltymų, kaip atsakas į genotoksinį stresą. Aktyvuoti *BRCA1/2* dalyvauja taisant pažaidas HRR metodu, o *p53* tuo metu saugo ląsteles nuo *BRCA1* klaidų taisymo metu, stabdydamas ląstelės ciklą ir, jei reikia, skatindamas ląstelės apoptozę. Krūties vėžiu sergančių ir *BRCA1/2* mutacijų turinčių moterų ląstelėse dažnai kartu randamas mutavęs *p53*, todėl šių DNR taisymui svarbių genų pažaidos lemia ląstelės piktybėjimą, veikdamos ir kitus kelius, pvz., padidėjusį *MYC* aktyvumą ar *AKT* kinazės atsako kelią [Kessler ir kt., 2013] (1.5 pav.).



1.5 pav. DNR taisymas, dalyvaujant *BRCA1/2* ir *p53* baltymams [pritaikyta pagal Kessler ir kt., 2013].

Dėl mutacijų *p53* baltymui praradus funkciją, sutrinka ir ląstelės ciklo kontrolė [Otto ir kt., 2017]. Teigiama, jog dauguma kontrolės taškų yra būtini, kad vėžinės ląstelės galėtų nekontroliuojamai dalintis. Vienas iš pakitusių

kontrolės taškų navikinėje ląstelėje yra DNR pažaidų kontrolės taškas, kuriam nebefunkcionuojant, ląstelės dalijimasis tęsiasi, o DNR mutacijos tokioje ląstelėje kaupiasi. Panašiai yra su mitozės kontrolės tašku: jis vėžinei ląstelei padeda išvengti letalaus chromosomų neatsiskyrimo [Matthews ir kt., 2022].

1.2.3. Paveldimas krūties vėžys

Kaip jau minėta, apie 5–10 % visų krūties vėžio atvejų yra paveldimi, o moterims, paveldėjusioms mutavusį *BRCA1* ar *BRCA2* geną, rizika susirgti krūties vėžiu smarkiai išauga [Matta ir kt., 2022]. Pirmoji sąsaja su krūties vėžiu ir paveldimumu buvo pastebėta dar XIX a. viduryje garsaus prancūzų gydytojo Pierre'o Paulo Broca'os. Gydytojas, išanalizavęs vienos šeimos ligos istoriją pastebėjo, jog per keturias kartas nuo šios ligos mirė 10 iš 24 šeimos moterų [Godet ir kt., 2017]. 1990 m. Hall ir kolegės nustatė, jog sergančiųjų krūties vėžiu 17q21 chromosomos srityje dažnos mutacijos, todėl imta atidžiau tirti potencialius genus, nulemiančius ligos atsiradimą [Hall ir kt., 1990]. Tolesni tyrimai patvirtino, kad 17 chromosomoje yra sritis, kurios pažaida nulemia ankstyvą krūties ir kiaušidžių vėžio vystymąsi [Easton ir kt., 1993]. Naudodamiesi pozicinio klonavimo metodu, Miki ir kolegės [Miki ir kt., 1994] nustatė, kad 17q21.3 regione yra *BRCA1* genas, o tuo pat metu kitos komandos tyrimais buvo nustatyta ir *BRCA2* geno lokalizacija (13q12-13) [Wooster ir kt., 1994].

Be dažniausiai mutuojančių *BRCA1* ir *BRCA2* genų, krūties navikuose aptinkama ir kitų mutacijų, galinčių sukelti krūties vėžį. Viena iš tokių mutacijų yra *ATM* geno mutacija, randama 40 % krūties vėžio atvejų, *STK11/LKB1*, sukelianti Peutz–Jegher sindromą, taip pat *PTEN* mutacija, sukelianti Cowden sindromą ir padidinti krūties vėžio riziką 20–30 %. Li-Fraumeni sindromą sukelianti *TP53* mutacija, padidina krūties vėžio atsiradimo riziką iki 80 %, o *PALB2* mutavusio geno paveldėtojams ligos išsivystymo rizika siekia 14–35 % [Godet ir kt., 2017; Penkert ir kt., 2018; Stucci ir kt., 2021].

1.2.4. *BRCA1/2* genai ir krūties vėžys

***BRCA1* genas.** *BRCA1* genas yra naviką slopinantis genas, sudarytas iš 24 egzonų ir koduojantis 220 kDa baltymą, sudarytą iš 1863 aminorūgščių (a.r.) [„Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology“, Banerjee, 2020, elektroninis išteklius]. *BRCA1* baltymo N galo RING domenas pasižymi E3 ligazės aktyvumu, koduojamu 2–7 egzonų ir turi fosfoproteinus prijungiantį C galą, koduojamą 16–24 egzonų. 11–13 egzoniai

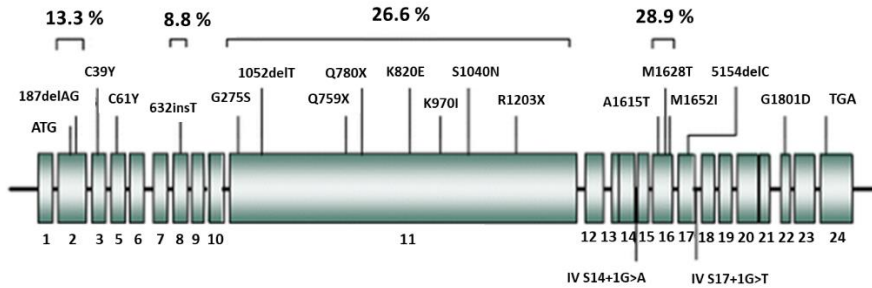
koduoja du NLS (angl. *nuclear localisation sequences*) ir baltymų prisijungimo regionus, svarbius sąveikai su baltymais, dalyvaujančiais įvairiuose ląstelės signaliniuose keliuose, įskaitant navikų augimą slopinančius genus, onkogenus ir su DNR taisymu susijusius baltymus [Hollis ir kt., 2017].

BRCA1 baltymas yra svarbus transkripcijos reguliacijos, chromatino remodeliavimo, apoptozės ir ubikvitino prijungimo procesuose, tačiau svarbiausia jo funkcija yra genomo stabilumo palaikymas – BRCA1 slopinamai veikia navikų augimą ir dalyvauja DNR taisymo procesuose, ląstelės ciklo kontrolės taškuose ir apoptozės kaskados paleidimo procese. Be to, neseniai nustatyta, kad BRCA1 dalyvauja palaikant genomo stabilumą, neleidamas susidaryti tandeminėms duplikacijoms [Willis ir kt., 2017] ir RNR-DNR hibridams (R kilpai) [Hatchi ir kt., 2015].

BRCA1 geno mutacijos laikomos pagrindine paveldimo krūties vėžio atsiradimo priežastimi ir yra susijusios su 40–45 % šeiminių krūties vėžio atvejų [Rosen ir kt., 2003]. Moterims, turinčioms paveldėtą *BRCA1* geno mutaciją, rizika susirgti krūties vėžiu yra apie 70–90 %, o kiaušidžių vėžiu – 37–62 % [Janavičius ir kt., 2010]. Dauguma navikų, kuriuose yra *BRCA1* mutacija, yra blogos diferenciacijos ir klasifikuojami kaip infiltracinės duktalinės karcinomos. Apie 80 % moterų, turinčių *BRCA1* mutaciją, išsivysto trigubai neigiamas krūties vėžio potipis [Turner ir kt., 2006; Bayraktar ir kt., 2012].

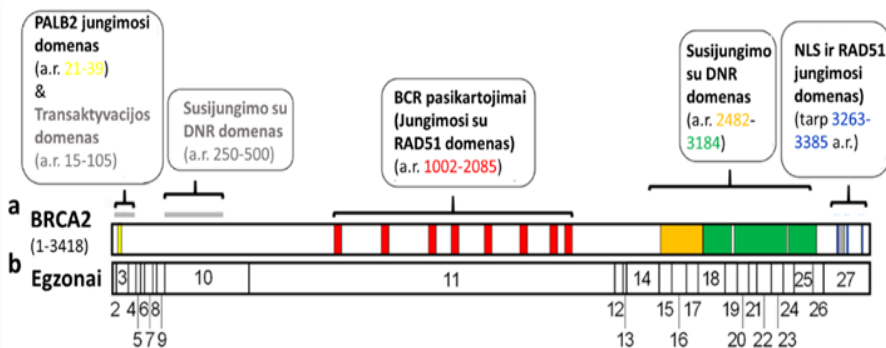
Šiuo metu nustatyta daugiau nei 1600 geno *BRCA1* mutacijų, kurios dažniausiai sukelia rėmelio poslinkį, lemiantį nefunkcionalaus baltymo susiformavimą [Rebbeck ir kt., 2018]. Daugiau nei pusė mutacijų randama 11 egzone, kuris sudaro apie 60 % geno koduojančio regiono [Wang ir kt., 2012] (1.6 pav.). Rebbeck ir kolegų atliktame beveik 30 tūkst. šeimų tyrime buvo analizuojamos dažniausiai pasitaikančios *BRCA1* mutacijos ir vertinamas jų paplitimas pasaulyje. Į šį tyrimą įtrauktose lietuvių šeimose dažniausiai randamos mutacijos buvo *c.181T>G*, *c.4035del*, *c.5266dup*, *c.1687C>T* ir *c.5177_5180del* [Rebbeck ir kt., 2018].

BRCA1 geno mutacijos



1.6 pav. *BRCA1* geno mutacijų procentinis pasiskirstymas tarp egzonų [pritaikyta pagal Juwle ir kt., 2012].

***BRCA2* genas.** Naviko augimą slopinantis *BRCA2* genas randamas 13q13.1 chromosomoje ir yra sudarytas iš 27 egzonų. *BRCA2* baltymas, kurio transliacija vyksta nuo antro geno egzono, yra 384 kDa (3418 a.r.) dydžio. Baltymas sudarytas iš transkripcijos aktyvacijos domeno N gale, sąveikaujančio su PALB2, ir C terminalinio regiono, kuriame yra dvi į branduolį nukreipiančios sekos (angl. *nuclear localization signals*, NLS). Taip pat baltyme yra su DNR sąveikaujantys domenai, trys oligonukleotidų ir oligosacharidų jungimosi vietos (angl. *oligonucleotide–oligosaccharide–binding*, OB) ir papildoma su RAD51 sąveikaujanti C galo sritis. Tarp N ir C galinių baltymo dalių yra 8 konservatyvūs BCR pasikartojimai, sudaryti iš 30 a.r. ir koduojami *BRCA2* geno 11 egzono. Prie šių BCR pasikartojimų besijungianti rekombinazė RAD51 dalyvauja DNR taisymo procese [Shahid, ir kt., 2014; Hollis ir kt., 2017] (1.7 pav.).



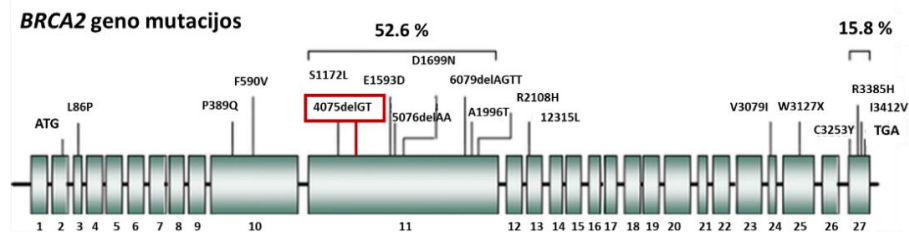
1.7 pav. *BRCA2* baltymo domenai (a) ir geno egzonai (b) [pritaikyta pagal Andreassen ir kt., 2021].

BRCA2 raiška priklauso nuo ląstelės ciklo, o daugiausia baltymo randama S fazės metu. Pagrindinė geno funkcija yra genomo vientisumo palaikymas ir atsakas į DNR pažeidas, kurias BRCA2 taiso HR būdu, būdamas komplekse su RAD51. Svarbi BRCA2 funkcija yra ląstelės kontrolės taškų reguliavimas, stabdant ląstelės ciklą G1 ir G2/M fazėse, ir chromosomų lokalizavimas mejozėje pirmos profazės metu [Guenard ir Durocher 2010]. Taip pat žinoma, kad BRCA2 dalyvauja papildomuose genomo stabilumo palaikymo procesuose, tokiuose kaip apoptozė, centrosomų dalijimasis ir replikacinės šakutės stabilizavimas [Venkitaraman ir kt., 2002; Fradet-Turcotte ir kt., 2016].

BRCA2 mutacijos yra susijusios su paveldimo krūties vėžio atsiradimu (apie 60–70 %) ir ne tik – jos lemia 3–19 % kiaušidžių vėžio riziką ir yra siejamos su 10 % kasos vėžio atvejų [Antoniou ir kt., 2003; Foulkes ir kt., 2008]. Skirtingai nei BRCA1 mutacijos atveju, navikai, kuriuose yra BRCA2 mutacija, patologiškai panašūs į sporadinius, jiems nėra būdingas TN krūties vėžio potipis, nes dažnai aptinkama hormonų receptorių raiška [Sadeghi ir kt., 2020].

Šiuo metu BRCA2 gene nustatyta daugiau nei 730 baltymą keičiančių mutacijų, o didžioji dalis jų įvyksta 10 ir 11 egzone, kurie sudaro apie 60 % geno koduojančios dalies [Shahid ir kt., 2014; Hollis ir kt., 2017] (1.8 pav.). Nors sergant krūties vėžiu BRCA2 mutacijos yra retesnės nei BRCA1, rėmelio poslinkio pokyčiai panašiu dažniu aptinkami abiejuose genuose (BRCA1 – 58 %, BRCA2 – 66 %). Dažniausiai Lietuvoje pasitaikančios BRCA2 mutacijos yra: *c.658_659del*, *c.6580dup*, *c.6410del* ir *c.7879A>T*.

BRCA2 *c.3847_3848delGT* mutacija paplitusi tarp baltosios rasės ir žydų ir yra viena iš penkių labiausiai tiriamų mutacijų Izraelio, Belgijos, Vokietijos, Lietuvos ir Švedijos populiacijose [Rebeck ir kt., 2018]. Patogeninė *c.3847_3848delGT* mutacija įvyksta 11 egzone, sukelia rėmelio poslinkį ir lemia mutantinio, funkciją praradusio baltymo p.V1283fs*2 susidarymą. Įdomu tai, kad įvykus *c.3847_3848delGT* (*4075delGT*) mutacijai ir po jos atsiradus antrinei geno mutacijai *c.3838_3864del27* (p.D1280_N1288del), BRCA2 baltymo struktūra ir funkcionalumas atkuriami, tačiau tokiu atveju tampa nebeveiksmingas gydymas PARP inhibitoriais [Gornstein ir kt., 2018].



1.8 pav. BRCA2 geno mutacijų procentinis pasiskirstymas tarp egzonų. Patogeninė *c.3847_3848delGT* mutacija (*4075delGT*) apibrėžta raudonu rėmeliu [pritaikyta pagal Juwle ir kt., 2012].

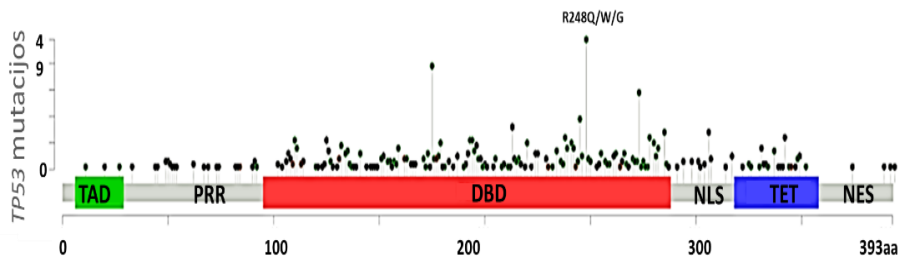
Kadangi *BRCA1* ir *BRCA2* navikų augimą slopinantys genai yra svarbūs HRR būdu taisant dvigrandinius DNR trūkius, šių mutacijų turinčios pacientės gydomos dvigrandinius DNR trūkius sukeliančiais vaistais, tokiais kaip platinos druskos ar antraciklinai, kurie inhibuoja topoizomerazes, inicijuoja DNR sąryšų atsiradimą (angl. *cross-links*) ir taip netiesiogiai sukelia dvigrandinius trūkius [Drooger ir kt., 2016].

1.2.5. TP53 genas ir krūties vėžys

TP53 genas, esantis 17p13.1 lokuse, koduoja 393 a.r. ilgio transkripcijos veiksnį p53, susijusį su ląstelės ciklo stabdymu, apoptoze, metabolizmu, angiogeneze, DNR pažeidimų taisymu ir ląsteliniu senėjimu bei atsaku į įvairius mutagenus, įskaitant radiaciją ir chemoterapiją [Monti ir kt., 2020; Shahbandi ir kt., 2020]. Baltymas p53 yra sudarytas iš N gale esančio transaktyvacijos domeno (TAD), greta esančio regiono, kuriame gausu prolyno a.r. (PRR), centrinės, su DNR sąveikaujančios baltymo dalies (DBD), tetramerizacijos domeno (TET) ir C galo (CT). NES ir NLS domenai atsakingi už transportavimą į branduolį ir branduolinių signalų lokalizavimą [Kastenhuber ir kt., 2017] (1.9 pav.).

Nustatyta, kad 86 % mutacijų įvyksta tarp 125 ir 300 kodonų, esančių jungimosi su DNR regione (DBD). Dažniausiai šiame regione pasitaiko keičiančios prasmę (*missense*) mutacijos (87,9 %), kitose geno srityse šios mutacijos sudaro apie 40 %, o didžioji dalis pakitimų yra neprasmingos (*nonsense*) ir rėmelio poslinkio mutacijos. Tarp vienos bazės pakitimų vyrauja C:G > T:A (25 %) tranzicijos CpG salose, kur mutacijų dažnis yra 10 kartų didesnis nei kitose geno vietose [Jones ir kt., 1992; Olivier ir kt., 2010]. Keičiančių prasmę mutacijų pasekmė – stabilus mutantinis p53 baltymas, kuris ne tik praranda naviko augimo slopinimo funkciją, bet ir įgauna GOF,

lemiantį greitesnį ląstelės vėžėjimą, metastazių atsiradimą, atsparumą gydymui ir trumpesnį pacienčių išgyvenamumą [Alexandrova ir kt., 2017].



1.9 pav. p53 baltymo sandara ir dažniausių mutacijų pasiskirstymas [pritaikyta pagal Li ir kt., 2020].

TP53 – dažniausiai vėžinėse ląstelėse randamas mutavęs genas [Silwal-Pandit ir kt., 2017]. Iki 50 % krūties navikų turi *TP53* geno mutacijas, kurių dažnis tarp krūties vėžio potipių skiriasi, o didžiausias mutacijų kiekis randamas pažengusios stadijos ar agresyvaus potipio, pvz., TN ar *HER2* amplifikaciją turinčiuose navikuose [Powell ir kt., 2000; Langerod ir kt., 2007; Olivier ir kt., 2010]. *TP53* geno mutacijos siejamos su agresyvesniu naviko fenotipu dėl genomino nestabilumo, didelio mitozinio indekso ir Ki-67 bei ciklino E raiškos, o navikas dažniausiai aptinkamas blogai diferencijuotas, be hormonų receptorių raiškos ir metastazavęs į sritinius limfmazgius [Lazzari ir kt., 2021]. Nepaisant besikaupiančių duomenų apie šio geno mutacijų prognostinę vertę, dėl per didelio geno mutabilumo *TP53* geno mutacijos nėra rutiniškai tiriamos. *TP53* yra labai polimorfinis tiek koduojančiuose, tiek nekoduojančiuose regionuose, o šie polimorfizmai didina jautrumą piktybėjimui ir sukuria platų *TP53* mutaciją turinčių navikų fenotipą [Olivier ir kt., 2010].

Dėl *TP53* mutacijų ląstelėje sutrinka pažaidų taisymo, apoptozės, ląstelės ciklo valdymo procesai, branduolyje pradeda kauptis vis daugiau mutacijų, todėl tokia ląstelė ima piktybėti [Pitollì ir kt., 2019]. Dėl *missense* mutacijos, įvykusios geno dalyje, koduojančioje prisijungimo prie DNR domeną (DBD), *TP53* ne tik praranda naviko augimą slopinančią funkciją, bet ir dažnai kaupiasi metastazavusių vėžinių ląstelių branduoliuose, veikdamas ląstelę onkogeniškai [Petitjean ir kt., 2007]. Mutacijos sukeltas p53 GOF efektas veikia Ras signalinio kelio ir steroidų metabolizmo reguliaciją bei histonų modifikaciją ir genų raišką [Zhu ir kt., 2015].

1.3. DNR metilinimas

Epigenetiniai veiksniai veikia genų raiškos valdymo mechanizmus, nekeisdami DNR sekos. Epigenetinius pokyčius galima apibrėžti kaip stabilius ląstelės fenotipo pokyčius, pvz., genų raišką, kuri gali būti perduodama ląstelių dalijimosi metu. Epigenetiniai pokyčiai – tai DNR hipo- ir hipermetilinimo santykio pasikeitimas, chromatinio struktūros ir histonų modifikacijos bei mažųjų nekoduojančių RNR reguliavimas [Jovanovic ir kt., 2010].

Vienas iš plačiausiai tyrinėjamų epigenetinių pokyčių, DNR metilinimas, yra grįžtamas procesas, tipiška vykstantis CpG dinukleotiduose. Normaliose ląstelėse yra metilinta apie 3–6 % citozinų, o maždaug pusė genų promotorių turi CpG salas, kurios dažniausiai randamos nemetiltos. Metilinimo žymenys yra susitelkę transpozonuose ir pasikartojančiose sekose, tačiau jų praktiškai nėra genų promotorių regionuose, išskyrus tam tikrus, moteriškų organizmų inaktyvuotos X chromosomos ar imprintingo pažymėtus genus. Tyrimų rezultatai rodo, kad DNR metilinimas veikia kaip organizmo gynybinis mechanizmas, kad būtų nutildytos organizmui svetimos DNR sekos, pvz., transpozonai, virusų genomai, kitos kartotinės sekos [Weinberg ir kt., 2014]. DNR metilinimas taip pat gali prisidėti prie histonų modifikacijų, pritraukdamas histonų deacetilazes ir taip paveikdamas chromatinio struktūrą, kuri savo ruožtu veikia genų raišką [Das ir kt., 2004].

1.3.1. DNR metilinimo mechanizmas

Žinduolių genomuose metilinimas vyksta CpG dinukleotide, prie citozino anglies 5 atomo kovalentiškai prijungiant metilo grupę. DNR metilinimo procesą vykdo grupė baltymų, vadinamų DNR metiltransferazėmis (DNMT). Šią fermentinę reakciją katalizuoja trys DNMT grupės. DNMT3A ir DNMT3B yra vienodai svarbios tiek hemimetilintoms, tiek nemetiltoms DNR molekulėms, vykdamas *de novo* metilinimą embrioninėse kamieninėse ląstelėse [Sharma ir kt., 2011]. Po DNR replikacijos naujai susintetinta grandinė būna nemetilinta, todėl DNMT1 katalizuoja metilo grupės prijungimą hemimetilintose DNR molekulės grandinėse. Ir nors DNMT1 atlieka pagrindinę metilinimo funkciją besidalijančioje ląstelėje, tačiau ir DNMT3A/3B dalyvauja modifikuojant tas vietas, kurias praleido DNMT1 [Jones ir kt., 2009; Sharma ir kt., 2011].

DNR metiltransferazėms metilinant DNR, o metil-citozino (mC) buvimui ar nebuvimui nulemiant genų raiškos lygį, logiška, kad egzistuoja ir DNR demetilinimo mechanizmas, kuris leidžia reaguoti į aplinkos poveikį,

išjungiant arba įjungiant genus. Ilgą laiką buvo manoma, kad DNR demetilinimas vyksta tik pasyviai, t.y., mC sumažėja dėl DNR replikacijos, kai naujai susintetinta DNR nėra metilinama. Vis dėlto buvo atskleista, kad DNR gali būti demetilinama ir aktyviai, t.y., nevykstant DNR replikacijai. DNR demetilavimo procese dalyvauja TET (angl. *ten-eleven translocation*) fermentai, kurie katalizuoja 5-metilcitozino (5mC) oksidaciją į 5-hidroksimetilcitozino (5hmC), 5-formilcitozino (5fC) ar 5-karboksilcitozino (5caC) bazines. Oksiduotos mC bazės atpažįstamos DNR taisymo mechanizmų ir yra iškerpamos ir pakeičiamos citoziniu [Rasmussen ir kt., 2016; Ravichandran ir kt., 2022]. DNR aktyviai demetilinama tėvinėje DNR prieš pirmą zigotos pasidalijimą, pirminėse lytinėse ląstelėse ankstyvoje embriogenezėje ir tam tikruose somatinių ląstelių lokusuose, kai aktyvinami signalinio atsako genai. Tuo tarpu kiaušialąstėse DNR yra demetilinama pasyviai, dalijantis ląstelėms. Nors demetilinimas tėvinėje ir motininėje DNR vyksta globaliai ir skirtingais mechanizmais, tam tikrų regionų imprintinti genai išlieka metilinti [Pastor ir kt., 2013; Kohli ir kt., 2014].

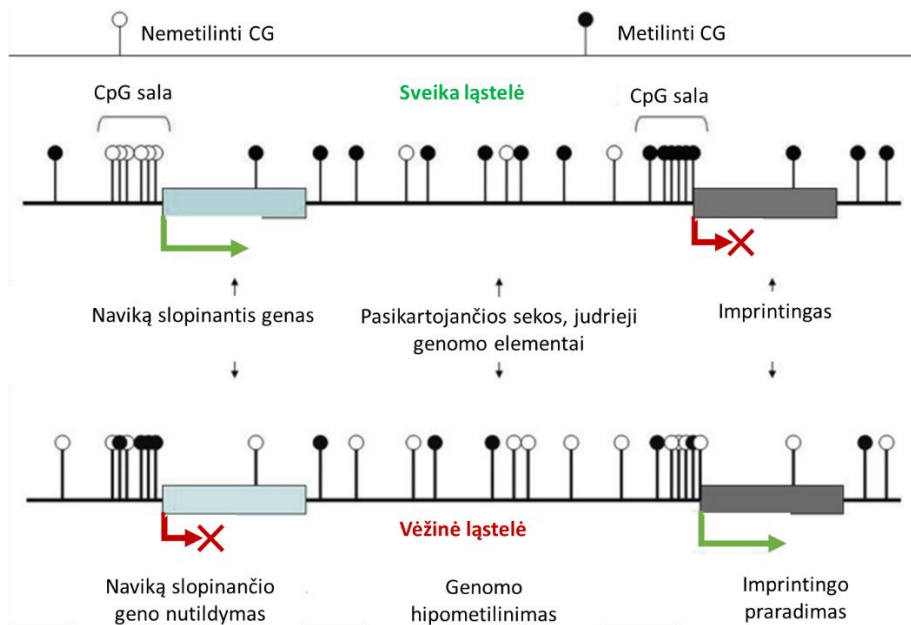
1.3.2. DNR metilinimo reikšmė karcinogenezei

Navikinėse ląstelėse randama daugybė DNR metilinimo sutrikimų, tad genominės DNR metilinimo pobūdis yra labai svarbus veiksnys naviko atsiradimui ir vystymuisi. DNR metilinimo lygis piktybinėse ir sveikose ląstelėse skiriasi. Navikinėse ląstelėse vyksta pasikartojančių sekų ir kai kurių specifinių augimą stimuliuojančių genų (protoonkogenų) hipometilinimas, o naviko augimą slopinančių genų hipermetilinimas yra vienas dažniausių įvykių ląstelės piktybėjimo procese [Lakshminarasimhan ir kt., 2016].

DNR hipometilinimas yra ankstyvas vėžio vystymosi įvykis, dažnai nustatomas esant gerybinei hiperplazijai. Navikui progresuojant, metilinimo praradimas vis ryškėja, o metastazių hipometilinimo lygis yra didesnis nei pirminių navikų [Li ir kt., 2014]. Didžioji dalis CpG demetilavimo vyksta tarpgeniniuose ir vidugeniniuose regionuose, kur gausu pasikartojančių sekų ir jautriųjų genomo elementų, kurie normaliose ląstelėse yra nutildyti metilinimo. Pavyzdžiui, *LINE1* (angl. *long interspersed nuclear element 1*) retrotranspozoni yra mobilūs genetiniai elementai, atsakingi už endogeninę mutagenę žmogaus genome. Jų įsiterpimas gali labai paveikti genų raišką, o DNR metilinimas yra būdas nutildyti *LINE1* [Wolff ir kt., 2010]. *LINE1* hipometilinimas yra naviko progresijos indikatorius, tad laikomas prostatos, melanomos, šlapimo pūslės ir inkstų navikų prognostiniu žymeniu [Yegnasubramanian ir kt., 2008; Ecsedi ir kt., 2013; Andreotti ir kt., 2014; Karami ir kt., 2015]. Globalus DNR hipometilinimas gali būti susijęs su

chromosomų nestabilumu ir genų reaktyvacija, padidėjusiu protoonkogenų aktyvumu ir rekombinacijos ar genų raiškos lygiu, X chromosomos inaktyvacijos bei imprintingo praradimu. Dažnai hipometilinimo metu aktyvuojami genai, skatinantys ląstelę metastazuoti, kaip, pvz., sinukleino- γ ar kiti genai, lemiantys atsparumą vaistams [Ehrlich ir kt., 2009].

Daug plačiau nei hipometilinimas tyrinėjamas epigenetinis pakitimas žmogaus navikuose – tai specifinių genų, taip pat ir navikų augimą slopinančių, hipermetilinimas CpG salose, nutildant jų raišką (1.10 pav.). Daugiau nei 50 % baltymus koduojančių genų greta savo promotorinių sekų turi mažiausiai vieną CpG salą, todėl tokie genai tampa jautrūs DNR metilinimui [Baylin ir kt., 2000]. Vėžinėse ląstelėse šios CpG salos dažnai randamos hipermetilintos. DNR hipermetilinimas susijęs su naviko augimą slopinančių genų nutildymu, genominiu nestabilumu, DNR taisymo genų funkcijos praradimu ir chromatinu pokyčiais, kurie gali paveikti ir gretimus genes [Baylin ir kt., 2000; Huang ir kt., 2011; You ir kt., 2012].



1.10 pav. DNR metilinimas sveikoje ir vėžinėje ląstelėse [pritaikyta pagal Paluszczak ir kt., 2014].

Navikuose aptinkama daugybė hipermetilintų genų, tačiau ląstelės piktybėjimui labiausiai svarbiausi genai, dalyvaujantys ląstelės ciklo reguliacijoje (*P16*, *P15*, *RB*, *P14*), susiję su DNR taisymo procesu (*BRCA1*, *MGMT*), apoptoze (*DAPK1*, *TMS1*), atsparumu vaistams, detoksifikacija, diferenciacija, angiogeneze ir metastazėmis. Nors kai kurie genai, pvz.,

RASSF1A ir *P16*, dažnai randami metilinti įvairių tipų navikuose, bet yra genų, kurių metilinimas būdingas tik tam tikro tipo navikams. Vienas iš pavyzdžių yra *GSTP1* genas, išskirtinai randamas hipermetilintas daugiau nei 90 % prostatos navikų [Das ir kt., 2004].

Nustatyta, kad DNR metilinimas turi diagnostinę vertę ir prognozuoja atsaką į gydymą [Mulero-Navarro ir kt., 2008; Suijkerbuijk ir kt., 2011]. DNR metilinimas yra grįžtamas procesas, todėl ši savybė daro jį patraukliu terapiniu vėžio gydymo taikiniu [Mulero-Navarro ir kt., 2008]. Į DNR metilinimą nukreiptas gydymas sėkmingai taikomas esant piktybiniais hematologiniams navikams, tačiau žinoma ir apie teigiamą poveikį solidiniams navikams [Sher ir kt., 2022].

1.3.3. DNR metilinimas ir krūties vėžys

Krūties vėžiui būdingi DNR metilinimo biožymenys tyrinėjami daugelį metų, tačiau iki šiol nė vienas iš šių žymenų nėra taikomas klinikinėje praktikoje. 2019 m. atliktoje krūties vėžio metaanalizėje buvo aprašyti 368 hipermetilinti genai, kurie leidžia atskirti krūties navikus nuo nenavikinių krūties audinių ir gali būti naudojami ankstyvajai krūties vėžio diagnostikai [de Almeida ir kt., 2019]. Ne mažiau svarbus metilinimo žymenų panaudojimas yra tiriant šalia naviko esančius audinius – Yan ir kolegos nustatė „metilinimo lauką“, siekiantį iki 4 cm nuo pirminio naviko, kuriame galima aptikti DNR metilinimo pakitimų. Analizė už pirminio naviko ribų gali būti svarbi vertinant naviko pažeidimo lygį ir pritaikant gydymą [Yan ir kt., 2006].

Hipermetilinimas lemia daugelio kritiškai svarbių genų raiškos nutildymą krūties navikuose. Tai steroidinių receptorių, ląstelių adhezijos ir matrikso metaloproteinazių inhibitorių genai. Tarp jų dažniausiai hipermetilinami *P16*, *ESR1*, *BRCA1*, *GSTP1*, *TIMP-3*, *CDH1* ir kt. genai [Yang ir kt., 2001]. Hormonų receptorių ER ir PR genai jau seniai siejami su krūties vėžiu, o jų metilinimo tyrimai atskleidė, kad *ESR1* genas turi CpG salų promotoriaus ir 1 egzono srityse. Sveikose ląstelėse *ESR1* genas yra nemetilintas, tačiau daugiau nei pusėje pirminių krūties navikų aptinkamas jo metilinimas [Yang ir kt., 2001; Das ir kt., 2004]. Literatūros duomenimis, hipermetilinti *APC*, *RARB*, *GSTP1*, *DAPK* ir *SFN* genai siejami su krūties vėžio atsiradimu [Tang ir kt., 2016], o genų *SEPTIN7*, *TRIM27*, *LIMD2* ir *LDHA* hipermetilinimas susijęs su krūties navikų metastazių formavimusi, invazijos ir proliferacijos procesais [Salas ir kt., 2020]. 2021 m. atlikta plati, 1538 krūties vėžio mėginių hipermetilinimo analizė parodė, jog didelis hipermetilinimo dažnis buvo susijęs su prastu išgyvenamumu, o 5 metų

išgyvenamumo rodiklis hipermetilintuose ER+ ir ER– navikuose reikšmingai sumažėjo [Batra ir kt., 2021]. Epigenetinis *SFRP1* ir *BRCA1* nutildymas prognozuoja blogą sergančiųjų krūties vėžiu ligos baigtį [Downs ir kt., 2015; Gyorffy ir kt., 2016]. Krūties vėžio atsparumo gydymui tyrimai atskleidė, kad *TGFBI*, *CXCL2* ir *SLC38A1* genų hipermetilinimas lemia atsparumą tamoksifenui, gydant HER2+ potipio navikus [Palomeras ir kt., 2019], o *SALL2* ir *MSH2* hipermetilinimas yra atitinkamai susijęs su atsparumu tamoksifeno ir doksorubicino terapija [Ponnusamy ir kt., 2018; Ye ir kt., 2019].

CDKN2A (*P14^{ARF}/P16^{INK4a}*) genas, esantis 9p21.3 chromosomoje, koduoja naviką slopinančius baltymus p14 ir p16, dalyvaujančius valdant ląstelės ciklą ir reguliuojančius Rb bei p53 signalinius kelius (tekste šiuos baltymus koduojantys genai atitinkamai vadinami ***P14*** ir ***P16***). Baltymas **p14** dalyvauja p53 signaliniame kelyje ir yra svarbus G1 ir G2 ląstelės ciklo fazių eigai. p14 baltymas palaiko naviko supresoriaus p53 stabilumą, inhibuodamas MDM2 baltymą, ir taip leidžia p53 stabdyti ląstelės ciklą ir inicijuoti apoptozę, todėl, jei ląstelėje trūksta aktyvaus p14, labai sumažėja ir p53 stabilumas [National Library of Medicine – NCBI 2022, elektroninis išteklius]. G1 ląstelės ciklo fazėje **p16** baltymas jungiasi prie Cdk4 ir Cdk6, stabdo fermentinio komplekso Cdk4-/Cdk6-ciklino D susidarymą ir inhibuoja jo katalitinį aktyvumą. Nesusidarius šiam kompleksui, nevyksta Rb fosforilinimas ir ląstelės ciklas sulaikomas G1 fazėje. Ląstelėse, kuriose aktyvaus p16 nėra, dalijimosi ciklas nėra stabdomas, todėl tampa nekontroliuojamas [Rivandi ir kt., 2018].

Askari ir kolegų atliktas tyrimas rodo, kad *P14* ir *P16* genų promotorių metilinimas padidina krūties vėžio riziką apie 12 kartų [Askari ir kt., 2013], o kitas krūties vėžio metilinimo tyrimas atskleidė, kad *P16* krūties vėžio audiniuose randamas metilintas 44 % dažniu [Shan ir kt., 2019]. Dar vienos tyrėjų grupės metilinimo žymenų analizė parodė, jog *CDKN2A* geno metilinimo jautrumas ir specifiskumas krūties vėžiui siekia atitinkamai 68 % ir 53 % [Li ir kt., 2015].

RARB genas (angl. *retinoic acid receptor beta*) yra retinoinės rūgšties receptoriaus β genas, esantis 3p24 chromosomoje ir priklausantis branduolio receptorių RAR klasei. Tai nuo ligando priklausomi baltymų receptoriai, veikiantys kaip transkripcijos iniciatoriai. *RARB* yra svarbus epitelinių ląstelių augimo reguliavimui ir hematopoezės procesui [Geoffroy ir kt., 2021]. RAR šeimos receptorių randama ląstelės citozolyje ir branduolyje. Šios šeimos

receptorių ligandas yra retinoinė rūgštis, biologiškai aktyvi vitamino A forma, atliekanti svarbų vaidmenį ląstelės dalijimosi, diferenciacijos procesuose ir signalo perdavimo keliuose [Ghyselinck ir kt., 2019]. Krūties vėžyje *RARβ* hipermetilinamas 37–46 % dažniu [Shan ir kt., 2019] ir siejasi su metastazėmis sritiniuose limfmazgiuose (N1–55 % vs. N0–10 %) [Marzese ir kt., 2012].

RASSF1 geno (angl. *Ras – associated domain family 1*) koduojamas baltymas priklauso RAS sąveikos domeną turinčių baltymų šeimai. *RASSF1* genas yra 3p21.3 chromosomoje, jo produktas RASSF1A baltymas dalyvauja ląstelės ciklo valdymo, apoptozės reguliacijos ir mikrovamzdelių stabilizacijos procesuose. RASSF1A yra mitozės inhibitorius, sustabdantis ląstelės ciklą metafazėje, o tai svarbu tam, kad chromosomos taisyklingai išsirikiotų metafazinėje plokštelėje. RASSF1A taip pat dalyvauja apoptozės reguliacijos procese, sąveikaudamas su vienu iš Ras (K–Ras) šeimos baltymų, kuris svarbus inicijuojant apoptozę [Dubois ir kt., 2019]. Epigenetinis geno *RASSF1* nuslopinimas yra vienas iš dažniausių molekulinų pakitimų krūties, plaučių, šlapimo pūslės, skrandžio ir kituose navikuose [Hesson ir kt., 2007]. Krūties navikuose *RASSF1* randamas hipermetilintas 65–85 % dažniu [Ahmed ir kt., 2010; Barrow ir kt., 2014; Moelans ir kt., 2015]. *RASSF1* yra ne tik ankstyvasis krūties vėžio žymuo, duomenys apie jį naudingi ir parenkant gydymą, nes *RASSF1* hipermetilinimo aptikimas serume po naviko pašalinimo ir adjuvantinės tamoksifeno terapijos reiškia, kad reikalinga tolesnė adjuvantinė terapija [Fiegl ir kt., 2005]. Be to, *RASSF1* hipermetilinimas yra susijęs su atsparumu docetakseliui, todėl *RASSF1* galėtų būti geras žymuo vertinant atsaką į gydymą [Barrow ir kt., 2014].

PRKCB (angl. *protein kinase C beta*) – proteinkinazę C beta koduojantis genas, kurio pakitusi raiška aptinkama esant krūties, storosios žarnos karcinomoms, įvairioms sarkomoms, limfomoms, leukemijoms ir koreliuoja su naviko agresyvumu per proliferacijos, diferenciacijos, ląstelių judrumo ir angiogenezės procesų reguliavimą bei NF-κB kelio aktyvavimą. *PRKCB* hipermetilinimo tyrimų krūties navikuose nėra žinoma, tačiau nustatyta, jog *PRKCB* hipermetilinimas plaučių adenokarcinomoje yra laikomas ankstyvuoju biožymeniu [Pradhan ir kt., 2013]. Kitas, nesmulkiąstelėlinis plaučių vėžio, tyrimas parodė, jog *PRKCB* hipermetilinamas apie 22 % dažniu, o TCGA duomenų bazėje šio geno hipermetilinimas plaučių navikuose siekia 58 % [Liu ir kt., 2017]. Lietuvoje atlikto prostatos vėžio tyrimuose *PRKCB* hipermetilinimas buvo

identifikuotas kaip diagnostinis ir prognostinis žymuo [Daniunaite ir kt., 2021].

ESR1 (angl. *estrogen receptor 1*) genas koduoja estrogeno receptorių ir ligando aktyvuojamą transkripcijos veiksnį, kuris sudaro homodimerą arba heterodimerą su estrogeno receptoriumi 2 (ESR2). ESR1 reguliuoja daugelio estrogenų indukuojamų genų, dalyvaujančių medžiagų apykaitos, lytinio vystymosi, augimo ir nėštumo procesuose, transkripciją. Dėl alternatyvaus splaisingo ir keletu promotorių *ESR1* genas turi daug transkriptų variantų, tačiau visų jų funkcijos dar nėra iki galo žinomos [Stelzer ir kt., 2016]. Išaugusi estrogenų receptorių raiška būdinga 70 % navikų, o pacientės, kurioms nustatytas teigiamas pagal hormonų receptorių raišką krūties vėžio potipis, dažnai gydomos taikant endokrininę terapiją [Jankowitz ir kt., 2017]. Nepaisant egzistuojančios taikinių terapijos, dalis pacienčių į gydymą nereaguoja, nes *ESR1* geno raiška yra pakitusi dėl mutacijų ar *ESR1* geno promotoriaus metilinio, dėl kurio naviko fenotipas tampa ER neigiamas, o navikas – atsparus endokrininei taikinių terapijai [Jankowitz ir kt., 2017; Tsuboi ir kt., 2017]. *ESR1* geno metilinimas krūties navikuose randamas 41–64 % dažniu ir koreliuoja su metastazėmis bei prastais išgyvenamumo rodikliais [Sharma ir kt., 2009; Ramos ir kt., 2010].

NAALAD2 (angl. *N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase 2*) koduoja specifinį prostatos membranos antigeną, prostatos vėžio žymenį, pasižymintį NAALAD-azės aktyvumu ir kerpančią N-acetil-L-aspartil-L-gliutamata (NAAG), kuris yra neuropeptidas ir veikia kaip neurotransmiteris. NAALAD2 yra II tipo į membraną įsiterpęs baltymas, kurio daug randama kiaušidžių, sėklidžių audiniuose ir tam tikrose smegenų vietose, o pagrindinė jo funkcija yra metabolizmo reguliacija [Stelzer ir kt., 2016]. Apie *NAALAD2* geno metilinio tyrimus krūties vėžio ląstelėse nėra žinoma, tik viename DNR metilinio tyrime prostatos navikuose buvo nustatyta didelė šio geno metilinio prognostinė vertė ligos atsinaujinimui [Daniunaite ir kt., 2021].

DAPK1 genas (angl. *death-associated protein kinase 1*) koduoja nuo kalcio ir kalmodulino priklausomą serino/treonino kinazę, kuri yra susijusi su ląstelės ciklo kontrole, autofagija, apoptoze, oksidaciniu stresu ir metastazavimo procesais. DAPK1 svarbi reguliuojant AKT kinazę, kuri dalyvauja daugelyje atsako kelių, indukuojančių metastazes: ląstelių plitimo, proliferacijos aktyvavimo, apoptozės slopinimo, p53 reguliacijos ir angiogenezės procesuose [Elbadawy ir kt., 2018]. *DAPK1* geno

hipermetilinimas koreliuoja su bloga prognoze ir agresyvesne ligos eiga esant smulkialąsteliniam plaučių, galvos ir kaklo, storosios žarnos, šlapimo pūslės ir krūties navikams [Soria ir kt., 2002; Gozuacik ir kt., 2006]. Literatūros duomenimis, krūties navikuose *DAPK1* hipermetilinimas aptinkamas nuo 14 iki 62 % dažniu [Cho ir kt., 2012; Tserga ir kt., 2012; Spitzwieser ir kt., 2015; Ghalkhani ir kt., 2021].

GSTP1 koduoja glutationo S transferazę $\pi 1$ (angl. *glutathione S-transferase $\pi 1$*), kuri yra svarbi elektrofilinių metabolitų ir reaktyvaus deguonies, susidariusių dėl kancerogenų poveikio, neutralizavimui [Schnekenburger ir kt., 2014]. Krūties navikuose *GSTP1* hipermetilinamas 21 % dažniu ir siejasi su naviko dydžiu, plitimu į sritinius limfmazgius ir prastu išgyvenamumu [Shinozaki ir kt., 2005]. Įdomu tai, kad Klajic ir kolegų atliktame tyrime buvo nustatyta *GSTP1* metilinimo sąsaja su ilgesniu sergančiųjų krūties vėžiu išgyvenamumu [Klajic ir kt., 2013], o kita mokslininkų grupė tokios sąsajos nerado, bet susiejo *GSTP1* metilinimą su krūties vėžio remisija [Sharma ir kt., 2010]. *GSTP1* promotoriaus metilinimas aptinkamas ir duktalinėje karcinomoje *in situ*, tad *GSTP1* promotoriaus metilinimo tyrimai galėtų būti reikšmingi papildant mamografijos rezultatus ir numatant krūties ląstelių pakitimus ir gydymą [Alnaes ir kt., 2015].

MGMT genas (angl. *O-6-methylguanine-DNA methyltransferase*) koduoja DNR taisymo fermentą O6-metilguanino DNR metiltransferazę. *MGMT* pašalina mutageninius ir citotoksinius aduktus nuo guanino nukleotido šeštoje pozicijoje esančio deguonies ir apsaugo ląstelę nuo mutacijų kaupimosi [Sharma ir kt., 2009; Jank ir kt., 2020]. *MGMT* raiška vyksta visuose nepakitusiuose žmogaus audiniuose, tačiau baltymo lygis skiriasi priklausomai nuo organų ir individų [Sharma ir kt., 2009]. Žmogaus navikuose *MGMT* geno mutacijos ar delecijos retos, genas dažniausiai nuslopinamas hipermetilinant promotoriaus regioną ar dimetilinant H3 histono 9 liziną. Be to, navikai, kuriuose *MGMT* yra metilintas, yra jautresni terapiniam alkilinančių vaistų nuo vėžio veikimui [Soejima ir kt., 2005]. Krūties navikuose *MGMT* hipermetilinamas 21–65 % dažniu [Alkam ir kt., 2013; Spitzwieser ir kt., 2015; Jank ir kt., 2020].

RUNX3 (angl. *runt-related transcription factor 3*) genas koduoja transkripcijos veiksnį, priklausantį *runt* domeną turinčių transkripcijos veiksmųjų šeimai. *RUNX3* reguliuoja ląstelės augimo, išgyvenimo, diferenciacijos, angiogenezės ir plitimo procesus [Lu ir kt., 2017]. *RUNX3*

destabilizuoja ir blokuoja ER α transkripcijos aktyvumą, taip reguliuodamas ER α lygį, o jo raiška ląstelėje koreliuoja su ER α geno raiška. *RUNX3* tyrimai parodė, kad jo metilinimas siejasi su estrogeno veikla krūties vėžio ląstelėse, nes *RUNX3* gerokai dažniau aptinkamas hipermetilintas ER teigiamuose krūties navikuose [Subramaniam ir kt., 2009]. Šis receptoriaus reguliacijos mechanizmas įrodo, kad *RUNX3* veikia kaip naviko augimą slopinantis veiksnys vėžio ląstelėse ir gali tapti svarbiu diagnostiniu krūties vėžio žymeniu [Huang ir kt., 2012]. *RUNX3* geno hipermetilinimo metaanalizėje susisteminti 10 tyrimų rezultatai rodo, jog geno hipermetilinimas krūties navikuose randamas 50–80 % dažniu [Lu ir kt., 2017].

MT1 (angl. *metallothionein 1*) – metalotioneino 1 genas – koduoja cisteino turinčius mažos molekulinės masės baltymus, kuriems būdingos įvairios funkcijos. Metalotionai skirstomi į 4 grupes (MT1, MT2, MT3 ir MT4), iš kurių MT1 ir MT2 sudaro skirtingų izoformų ir skirtingų funkcijų baltymai. MT saugo ląsteles surišdami tokius divalencius sunkiuosius metalus kaip kadmis, varis, cinkas, kurie yra toksiški ląstelei [Tai ir kt., 2003]. ***MT1E*** geno raiška ER teigiamuose ir neigiamuose navikuose skiriasi, o navikų transformacijos iš ER ir PR teigiamų į neigiamus metu, ***MT1E*** gali pakeisti estrogenų ir progesteronų funkciją [Jin ir kt., 2000]. Hipermetilinti ***MT1*** geno klasteriai krūties navikuose yra susiję su blogesne ligos eiga, trumpesniu išgyvenamumu ir invaziškumu kituose navikuose, o ***MT1G*** hipermetilinimas laikomas specifišku krūties vėžiui [Jadhav ir kt., 2015].

ADAMTS12 (angl. *a disintegrin and metalloprotease domain with thrombospondins motifs 12*) genas koduoja užląstelinę metaloproteazę, dalyvaujančią audinių persitvarkymo, ląstelių migracijos, angiogenezės ir adhezijos procesuose [Fontanil ir kt., 2014]. Nors literatūros duomenų apie ***ADAMTS12*** hipermetilinimą sergant krūties vėžiu nėra, tačiau žinoma, kad genas randamas hipermetilintas storosios žarnos, prostatos navikuose [Moncada-Pazos ir kt., 2009; Daniunaite ir kt., 2021]. ***ADAMTS12*** tyrimai krūties vėžio ląstelių linijose rodo, jog jis sąveikauja su fibuliniu-2 ir taip blokuoja ląstelių migracijos ir plitimo procesus [Fontanil ir kt., 2014].

FILIP1L (angl. *filamin A interacting protein 1-like*) genas koduoja svarbų ląstelių migracijos ir invaziškumo inhibitorių kiaušidžių vėžio ląstelėse. ***FILIP1L*** veikia kaip antiangiogeninis veiksnys, o didelė raiška endotelio ląstelėse stabdo ląstelės proliferaciją, migraciją ir sukelia apoptozę [Stelzer ir kt., 2016]. Nors krūties navikuose klinikinių ***FILIP1L*** geno

metilinimo tyrimų nėra žinoma, ląstelių linijų tyrimai rodo, jog *FILIPIL* geno metilinimas susijęs su jo raiškos sumažėjimu ir navikiniais procesais storosios žarnos, krūties, plaučių ir kasos audiniuose [Kwon ir kt., 2013; Kwon ir kt., 2021].

APC (angl. *adenomatous polyposis coli*) geno koduojamas baltymas yra labai svarbi Wnt signalo kelio dalis, dalyvaujanti ląstelės ciklo reguliacijos ir ląstelės diferenciacijos, proliferacijos bei adhezijos procesuose. *APC* funkcijos praradimas yra siejamas su šeimine adenomine polipoze [Han ir kt., 2018]. *APC* – plačiai tyrinėjamas genas, o jo raiškos praradimas nustatytas storosios žarnos, prostatos, skrandžio ir krūties navikuose [Tsuchiya ir kt., 2000; Jin ir kt., 2001; Richiardi ir kt., 2009; Saelee ir kt., 2014; Matthaios ir kt., 2016]. Krūties vėžio ląstelėse *APC* hipermetilinimas siekia apie 44–70 % dažnį [Saelee ir kt., 2020].

Šiame darbe tirta, kaip genetiniai (*BRCA2* ir *TP53*) ir epigenetiniai pokyčiai veikia krūties vėžio ligos fenotipą ir eigą. *BRCA2* geno mutacija yra viena iš dažniausiai paveldimų mutacijų, o *TP53* geno mutacijos nustatomos iki 50 % visų tiriamų krūties navikų. Sporadiniuose krūties navikuose, be genetinių pakitimų, gausiai randama ir DNR metilinimo pokyčių genuose, susijusiuose su įvairiais ląstelinio atsako keliais (ląstelės ciklo kontrole apoptoze, angiogeneze, ksenobiotikų metabolizmu ir kt.). Šiame darbe tirti genų *P14*, *P16*, *DAPK1*, *MGMT*, *FILIPIL*, *RARB*, *NAALAD2*, *GSTP1*, *MTIG*, *MTIE*, *MTIF*, *RUNX3*, *RASSF1*, *PRKCB*, *ADAMTS12*, *ESR1* ir *APC* promotoriaus DNR metilinimo pokyčiai. Kadangi epigenetiniai pokyčiai navikuose laikomi ankstyvuoju karcinogenezės įvykiu, šie biožymenys gali pagerinti ligos diagnozavimo tikslumą, patikslinti ligos prognozę ir padėti individualizuoti krūties vėžio gydymą.

2. METODAI IR MEDŽIAGOS

2.1. Pacientai ir mėginiai

2.1.1. Krūties vėžiu sergančios pacientės

2007–2009 m. pradėtam tyrimui, buvo atrinkti 116 krūties vėžiu (KV) sergančių ir 29 kontroliniai (turinčių fibroadenomas) pacienčių mėginiai. Pacientės buvo gydomos Nacionaliniame vėžio institute, o tyrimas atliktas pacientės informavus, joms pasirašius sutikimo formas ir gavus Bioetikos komisijos leidimą (2007-08-03 Nr.33). Analizei atrinktų pacienčių mėginiai buvo ištirti dėl paveldimų *BRCA1* geno mutacijų ir tolesnei analizei pasirinkti tik atvejai be *BRCA1* mutacijų. Tirtų KV pacienčių amžiaus vidurkis buvo 57 m. (27–84 m.), o kontrolinės grupės pacienčių – 42 m. (20–62 m.). Visi tirti krūties navikai buvo ankstyvosios stadijos T1 (N = 63) ir T2 (N = 53), jų histologinis tipas duktalinis (N = 101), lobulinis (N = 13) ir apokrininis (N = 2). Pagal potipius KV išskirstytas atlikus imunohistocheminę analizę, tiriant hormonų receptorių ER, PR būseną, taip pat HER2 ir Ki-67 statusą. Buvo išskirti 4 KV potipiai: 47 % sudarė luminalinis A (**LA**; N = 55), 21 % – luminalinis B (**LB**; N = 24), 18 % – **HER2+** (N = 21; sudarytas iš sujungtų luminalinio B HER2 ir HER2 potipių; N = 16 + 5) ir 14 % – trigubai neigiamas (**TN**; N = 16). Po operacijos pacienčių išgyvenamumo duomenys buvo renkami vidutiniškai 91 mėnesį (3–113 mėn.), informatyvių duomenų buvo surinkta 67% (78 iš 116). Per šį laikotarpį konstatuota 21 pacientės mirtis, 56 pacientėms patvirtinta ligos remisija ir 1 ligos progresavimo atvejis. Detalus pacienčių demografinių ir klinikinių-patologinių rodiklių pasiskirstymas pagal KV potipius nurodytas **2.1 lentelėje**.

2.1 lentelė. Demografinių ir klinikinių-patologinių krūties vėžiu sergančių pacienčių rodiklių pasiskirstymas pagal KV potipius

KV rodikliai		KV potipiai			
		LA	LB	HER2+*	TN
		(N = 55); %	(N = 24); %	(N = 21); %	(N = 16); %
Amžius diagnozės metu	Metai (IQR)	61 (19)	58 (22)	55 (23)	52 (26)
Histologinis tipas	Duktalinis; N (%)	45 (85)	22 (92)	18 (86)	16 (100)
	Lobulinis; N (%)	8 (15)	2 (8)	3 (14)	0 (0)
	Apokrininis; N (%)	2 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Naviko stadija	T1; N (%)	33 (60)	13 (54)	11 (52)	6 (38)
	T2; N (%)	22 (40)	11 (46)	10 (48)	10 (63)
Naviko plitimas į sritinius limfmazgius	N0; N (%)	33 (54)	13 (54)	11 (52)	10 (63)
	N1; N (%)	21 (61)	11 (46)	10 (48)	6 (38)
Diferenciacijos laipsnis	G1; N (%)	16 (29)	3 (13)	2 (10)	2 (13)
	G2; N (%)	35 (64)	7 (29)	9 (43)	1 (6)
	G3; N (%)	4 (7)	14 (58)	10 (48)	13 (81)
Ki-67 raiška	Ki-67 neig; N (%)	53 (98)	0 (0)	15 (75)	0 (0)
	Ki-67 teig; N (%)	2 (4)	24 (100)	6 (29)	16 (100)
Išgyvenamumas	Remisija; N (%)	25 (71)	13 (68)	12 (92)	6 (55)
	Mirtis; N (%)	10 (29)	5 (26)	1 (8)	5 (45)
	Atkrytis; N (%)	0 (0)	1 (5)	0 (0)	0 (0)
	5 m. išgyvenamumas; N (%)	25 (71)	16 (94)	11 (92)	6 (55)

* – HER2+ potipis, sudarytas iš LBHER2 ir HER2 potipių (N= 16+5)

Santurpmos: Ki-67 – naviko proliferacijos žymuo; G1 – geras, G2 – vidutinis ir G3 – blogas diferenciacijos laipsnis; HER2+ – LBHER2 ir HER2 teigiami navikai; IQR (angl. *interquartile range*) – intervalas tarp kvartilių; LA – luminalinis A, LB – luminalinis B; N0/1 – mikrometastazės į artimuosius limfmazgius; T1/2 – naviko stadija; TN – trigubai neigiamas KV.

2.1.2. Šeiminių krūties vėžiu sergančios pacientės

BRCA1/2 genų mutacijų tyrimas skirtas krūties ar kiaušidžių vėžiu sergančioms moterims, kurios atitinka LR sveikatos apsaugos ministro įsakyme (Nr. V–1458, 2014–12–31) nurodytas indikacijas. Radus patogeninį *BRCA1/2* geno variantą, mutacijų tyrimas siūlomas pirmos eilės giminaičiui (tėvui, motinai, broliui, seseriai ar vaikui).

Tiriamajoje šeimoje vienai pacientei (1-oji pacientė, 62 metų) aptikus *BRCA2* geno mutaciją ir turint duomenų apie krūties vėžio atvejus šeimoje, į konsultaciją buvo pakviestos dvi seserys (2-oji pacientė, 32 metų ir 3-ioji pacientė, 58 metų) bei 1-osios pacientės dukros (4-oji pacientė, 30 metų, apie antrąją dukterį tikslesnių duomenų nėra). Pacientės pasirašė sutikimą aprašyti šeiminių mutacija, taip pat buvo gautas Bioetikos komisijos sutikimas atlikti tolesnę šios šeimos analizę (158200–18–989–493).

2.2. Metodai

2.2.1. DNR gryninimas

DNR gryninimas iš krūties audinio. DNR išskirti iš šaldyto audinio gabalėlių (N = 79) ir parafininių mėginių (N = 45) po deparafinizacijos bei reakcijos su proteinaze K, buvo naudoti keli metodai: standartinis fenolio-chloroformo skyrimo ir etanolinis DNR išsodinimo metodas bei DNR skyrimas, naudojant *ZR Viral DNA/RNA Kit™* rinkinį (*Zymo Research*). Išskirtos DNR kokybiniai ir kiekybiniai parametrai matuoti *NanoDrop™ 2000* spektrofotometru (*Thermo Fisher Scientific*). DNR mėginiai buvo laikomi –20 °C, o saugoti ilgiau perkeliama į –80 °C temperatūrą.

DNR gryninimas iš kraujo (šeiminio KV analizei). *BRCA1/2* geno patogeniniai variantai buvo nustatomi PGR metodu, naudojant iš pacienčių kraujo leukocitų išskirtą DNR. Pacienčių kraujo mėginys buvo imamas į mėgintuvėlius su EDTA. Kraujo mėginio frakcionavimas atliktas 10 min. centrifuguojant mėgintuvėlius 2300 rpm/min greičiu kambario temperatūroje. Centrifuguotas kraujas išsifrakcionavo į viršutinį plazmos sluoksnį, apatinį sluoksnį, turintį raudonųjų kraujo ląstelių, ir baltųjų kraujo ląstelių turintį ploną tarpusluoksnį, kuris buvo perkeltas į naują mėgintuvėlį ir naudojamas DNR išskirti arba užšaldomas ir laikomas –20 °C temperatūroje. DNR išskyrimas buvo atliekamas automatizuota *QIAcube* sistema, naudojant „*QIAamp DNA Blood Mini Kit*“ reagentus (*Qiagen*). DNR koncentracija ir

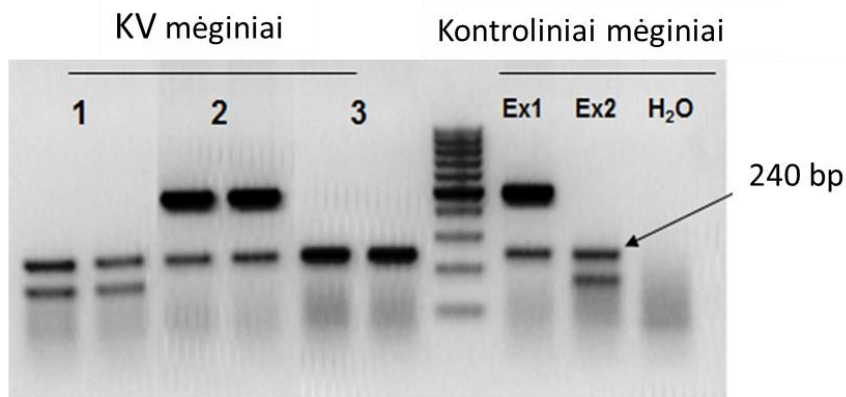
švarumas nustatyti *NanoDrop 1000* spektrofotometru (*Thermo Fisher Scientific*).

2.2.2. DNR mutacijų analizė

2.2.2.1. *BRCA1/2* genų mutacijų tyrimai

KV imties *BRCA1* mutacijų tikrinimas PGR metodu. Geno patogeniniai variantai buvo nustatomi atliekant PGR. 25 μ L reakcijos mišinys buvo sudarytas iš benukleazio H₂O, 10 \times *DreamTaq*TM *Green* buferinio tirpalo (*Thermo Fisher Scientific*), 100 mM dNTP mišinio, 10 μ M pradmenų (prasminių ir antiprasminių) mišinio, 5 U/ μ L *Dream Taq* DNR polimerazės (*Thermo Fisher Scientific*) ir genominės DNR. Kiekvienos PGR reakcijos metu naudotos taršos bei teigiamos kontrolės. Amplifikacija buvo atliekama *ProFlex*TM 3x32-well aparatu (*Thermo Fisher Scientific*). Termociklerio temperatūrinis režimas: 95 $^{\circ}$ C – 10 min, 35 ciklus kartojant 94 $^{\circ}$ C – 25 sek., 59 $^{\circ}$ C – 25 sek., 72 $^{\circ}$ C – 35 sek., o reakcijos pabaigoje 7 min inkubuojant 72 $^{\circ}$ C temperatūroje. Tyrime naudotų pradmenų sekos pateiktos S1 priedų lentelėje:

Gauti tyrimo duomenys buvo analizuojami 2 % agarozės gelyje. 2.1 paveiksle pateikiami *BRCA1* geno mutacijų po PGR aptikimo rezultatai, kur 1 ir 2 mėginys turi atitinkamai mutacijas 11 ir 20 egzonuose.



2.1 pav. PGR reakcijos elektroforeogramos vaizdas. 1, 2, 3 – analizuojami mėginiai; Ex1 ir Ex2 –atitinkamai *BRCA1* 11 ir 20 egzonų patogeninių variantų teigiamos kontrolės, H₂O – taršos kontrolė.

Šeiminio atvejo *BRCA1/2* genų mutacijų tyrimas kPGR metodu.

Pirmiausia buvo patikrintos 6 dažniausiai Lietuvos populiacijoje pasitaikančios *BRCA* genų mutacijos *BRCA1*: *c.4035delA*, *c.5266dupC*, *c.181T>G*, *c.1687C>T* ir *BRCA2*: *c.658_659delGT*, *c.8572C>T*. Mutacijos buvo identifikuotos atlikus realaus laiko PGR reakcijas su *TaqMan*TM *Universal Master Mix II, No UNG* (*Applied Biosystems part of Thermo Fisher Scientific*) ir *TaqMan*TM *SNP Genotyping Assays* (*Applied Biosystems part of Thermo Fisher Scientific*) reagentais, įskaitant neigiamą (*wt*) bei teigiamą kontroles. Visos kPGR reakcijos buvo atliekamos pagal gamintojo rekomenduojamą protokolą, naudojant *Applied Biosystems*TM 7500 realaus laiko PGR sistemą (*Applied Biosystems part of Thermo Fisher Scientific*).

Atmetus dažniausiai pasitaikančių *BRCA1* ir *BRCA2* mutacijų tikimybę, toliau mutacijų paieška buvo vykdoma naudojant naujos kartos sekoskaitos (NGS) metodą. DNR koncentracija patikrinta *Qubit*TM 2.0 fluorimetru, naudojant *Qubit*TM *dsDNA BR Assay Kit* reagentus (*Invitrogen*). Bibliotekai ruošti ir *BRCA1* bei *BRCA2* genų koduojančių regionų amplifikacijai naudoti reagentai iš *Ion AmpliSeq*TM *Library Kit 2.0* (*Life Technologies*) ir *Oncomine*TM *BRCA Research* (*Life Technologies*), reakcijas atliekant pagal gamintojo protokolą. Bibliotekos koncentracija buvo nustatyta, naudojant *Ion Library TaqMan*TM *Quantification Kit* (*Life Technologies*) reagentus. Bibliotekos vienodomis koncentracijomis įneštos į lustą 520 naudojant *Ion Torrent*TM *Ion Chef*TM aparatą ir *Ion 520*TM & *Ion 530*TM & *540*TM *KitChef* reagentus (*Life Technologies*). Sekoskaita atlikta *Ion Torrent*TM *Ion S5*TM platformoje (*Life Technologies*). Duomenų analizei naudota *Ion Reporter 5.8* programa (*Life Technologies*).

2.2.2.2. *TP53* mutacijų analizė

TP53 seka (4–9 egzoni) buvo analizuojama trimis metodais: *TP53* geno mutacijos buvo nustatytos vienos grandinės konformacijos polimorfizmo (angl. *single-strand conformation polymorphism*, SSCP; N = 84) metodu ir patvirtintos naudojant tiesioginės Sengerio sekoskaitos (SS; N = 29), vėliau – naujos kartos sekoskaitos (NGS; angl. *new generation sequencing*; N = 38) metodus. Mutacijų duomenų analizė parengta naudojantis IARC *TP53* [Bouaoun ir kt., 2016] ir *The Catalogue of Somatic Mutations in Cancer* [The Catalogue of Somatic Mutations in Cancer – COSMIC, 2004] duomenų bazėmis.

SSCP metodo esmė – dėl mutacijos atsiradę tretinės DNR struktūros pokyčiai, lemiantys DNR fragmentų mobilumą elektroforezės metu. Tiriama

TP53 geno egzoni buvo pagausinami PGR metodu, naudojant skirtingomis fluorescentinėmis žymėmis pažymėtus prasminius 6-FAM ir antiprasminius HEX pradmenis. Galutinis PGR reakcijos tūris (20 µl) buvo sudarytas iš 200 ng tiriamosios DNR, *GeneAmp 10× PCR* buferio, 25 nM MgCl₂, 4 mM dNTP mišinio, 5 U/µl *AmpliTaq Gold™* DNR polimerazės (*Thermo Fisher Scientific*), 20 µM kiekvieno iš 6-FAM ir HEX pradmenų, DMSO ir dejonizuoto H₂O. SSCP reakcijos mišinyje buvo 0,5 µl PGR produkto, 0,5 µl *GeneScan-500 LIZ* (*ABI, Thermo Fisher Scientific*) ilgio standarto (*ABI, Thermo Fisher Scientific*) ir 15 µl formamido (*Hi-Di™, Thermo Fisher Scientific*). Norint įvertinti pagausinto fragmento kokybę ir kiekybę, po pagausinimo PGR produktas analizuotas 7,5 % nedenatūruojančiame poliakrilamido gelyje. T24 ląstelių linijos DNR buvo naudojama kaip teigiama, o sveiko donoro leukocitų DNR – kaip neigiama kontrolė. Reakcijos mišinys buvo analizuojamas *ABI PRISM 3130®* genetiniu analizatoriumi (*ABI, Thermo Fisher Scientific*), o rezultatai vertinami naudojantis *GeneMapper™* (*ABI, Thermo Fisher Scientific*) programine įranga. Sekos, kuriose SSCP metodu nustatomas pakitęs elektroforezės pikas, buvo vertinamos kaip mutavusios ir toliau analizuojamos tiesioginiu Sengerio sekoskaitos metodu, leidžiančiu patvirtinti mutaciją.

Tiesioginis Sengerio sekoskaitos (SS) metodas buvo pasirinktas mutacijoms patvirtinti po analizės SSCP metodu. Išanalizuoti SSCP teigiami mėginiai buvo pagausinti PGR reakcijos metu, imant 200 ng genomines DNR ir tuos pačius reakcijos komponentus, naudotus SSCP analizei, kaip aprašyta pirmiau. Sekoskaitos reakcijos mišinys (20 µl) buvo sudarytas iš 5 µl PGR produkto, *BigDye Terminator v3.1* reakcijos mišinio (*ABI, Thermo Fisher Scientific*), 5× sekoskaitos buferio, prasminio ir antiprasminio pradmens bei dejonizuoto H₂O. Sekoskaitos reakcija atlikta naudojantis *ABI Prism 3130®* (*ABI, Thermo Fisher Scientific*) genetiniu analizatoriumi, rezultatai analizuoti naudojantis *SeqScape™* programine įranga (*ABI, Thermo Fisher Scientific*). Gauti analizės rezultatai buvo sulyginami su referentine *TP53* seka, paimta iš *GenBank®* duomenų bazės. SSCP ir SS metodai buvo pritaikyti pagal Holmila ir kt. [Holmila ir kt., 2006].

Naujos kartos sekoskaita (NKS) buvo atliekama *GS Junior sequencing 454* genetiniu analizatoriumi (*Roche*). Sveikų donorų leukocitai panaudoti kaip kontroliniai mėginiai. Visi analizuojami fragmentai buvo nuskaitomi abiem kryptimis. DNR amplifikuota 24 µl reakcijos mišinyje, sudarytame iš 1× *Phusion HF* buferio, 0,2 mM kiekvieno iš dNTP, 0,3 µM kiekvieno pradmens, 5 U/µl *HiFi Phusion* polimerazės ir 25 ng tiriamosios DNR (priedų S2 lentelė). Amplikonai buvo valomi *AMPure XP* magnetinėmis

dalelėmis (*Thermo Fisher Scientific*). Reakcijos produktai analizuoti fluorimetru, naudojant *Quant-It PicoGreen dsDNA Assay* (*Thermo Fisher Scientific*) ir *QuantiFluor system* (*Promega*). Standartinė koreliacijos koeficiento (R) reikšmė, pakelta kvadratu (R^2), didesnė nei 0,98. Emulsinio PGR reakcija atlikta naudojant *emPCR Kit* (*Roche*). Amplikonai sumaišyti su magnetinėmis dalelėmis, naudojant 10 μ l paruoštos prasminės ir antiprasminės bibliotekos DNR (po 1,33 molekulės, tenkančios kiekvienai magnetinei dalelei) ir po reakcijos surinkti naudojant *GS Junior Titanium emPCR Oil and Breaking Kit* rinkinį (*Roche*). Sekoskaitai naudotas *The GS Titanium Sequencing Kit* reagentų rinkinys ir *GS Junior Titanium series* protokolas (*Roche*). Sekoskaitos rezultatai paruošti naudojant *GS Amplicon Variant Analyzer* (AVA) (*Roche*). *TP53* referentinė seka NC_000017.10 naudota iš duomenų bazės NCBI (NCBI37/hg19, Chr17:7571720...7590868, atitinkamai transkripto ir baltymo sekų ID yra ENST00000269305.4 ir P04637).

2.2.3. DNR modifikacija natrio bisulfitu

Bisulfitinės modifikacijos esmė – DNR grandinėje esančius nemetilintus citozinas paversti uracilu, metilintiems citozinams liekant nepakitusiems. PGR reakcijos metu prie uracilo jungiasi adeninas, CG pora pavirsta į AT porą, tad epigenetinis skirtumas yra verčiamas genetiniu ir suteikia galimybę identifikuoti metilintas DNR sekas.

Bisulfitinei modifikacijai imta 400 ng DNR ir modifikuota, naudojant *EZ DNA Methylation TM Kit* rinkinį (*Zymo Research*). 5 μ l *M-Dilution* buferio sumaišyta su DNR, iki 50 μ l tūrio papildant benukleaziu vandeniu ir mėginiai inkubuoti 37 °C – 15 min. Po inkubacijos į mišinį pridėta paruošto *CT Conversation* reagento ir mėginiai 12–16 val. inkubuoti 50 °C temperatūroje, o vėliau 10 min. vėsinti ledo vonelėje. Į kolonėlę įpilta 400 μ l *M-Binding* buferio, mėginiai inkubuoti, tuomet kelis kartus pipetuoju išmaišyta ir 30 sek. centrifuguota $>10.000 \times g$. Supernatantas pašalintas, į kolonėlę įpilta 100 μ l *M-Wash* buferio ir vėl 30 sek. centrifuguota $>10.000 \times g$. Tuomet į kolonėlę įpilta 200 μ l *M-Desulphonation* buferio ir 15–20 min. inkubuota kambario temperatūroje, o po inkubacijos 30 sek. centrifuguota maksimaliu greičiu. Po inkubacijos kolonėlė dusyk praplauta 200 μ l *M-Wash* buferiu ir modifikuota DNR tirpinta su 10 μ l *M-Elution* buferiu. Modifikuota DNR buvo saugoma –20 °C, o saugoti ilgesniam padėta į šaldiklį, kuriame buvo palaikoma –80 °C temperatūra.

2.2.4. Metilnimui jautri PGR (MSP)

Bisulfitu modifikuota genomine DNR buvo pagausinama vykdamas metilnimui jautrią PGR (angl. *methylation specific PCR*, MSP). Tyrimui parinkta 17 genų, dalyvaujančių ląstelės ciklo reguliacijos procese (*P14*, *P16*), ląstelės signaliniuose keliuose (*ESR1* (tirti du šio geno regionai: promotoriaus sritis *ESR1-1* ir intrageninė sritis *ESR1-4*), *RARB*, *RASSF1*, *PRKCB*, *NAALAD2*), programuotoje ląstelės žūtyje (*DAPK1*), ląstelių adhezijos (*APC*), angiogenezės (*ADAMTS12*, *FILIP1L*), genomo stabilumo palaikymo (*MGMT*), ksenobiotikų metabolizmo (*GSTP1*), sunkiųjų metalų surišimo (*MT1E*, *MT1F*, *MT1G*) ir genų raiškos (*RUNX3*) procesuose. Kiekvieno mėginio MSP reakcija vykdyta dviejuose mėgintuvėliuose, kuriuose reakcijos mišiniai skyrėsi tik naudojamais pradmenimis: viename mėgintuvėlyje buvo naudojami M pradmenys, komplementarūs metilintai geno sekai, o kitame – U pradmenys, specifiški nemetilintai geno sekai.

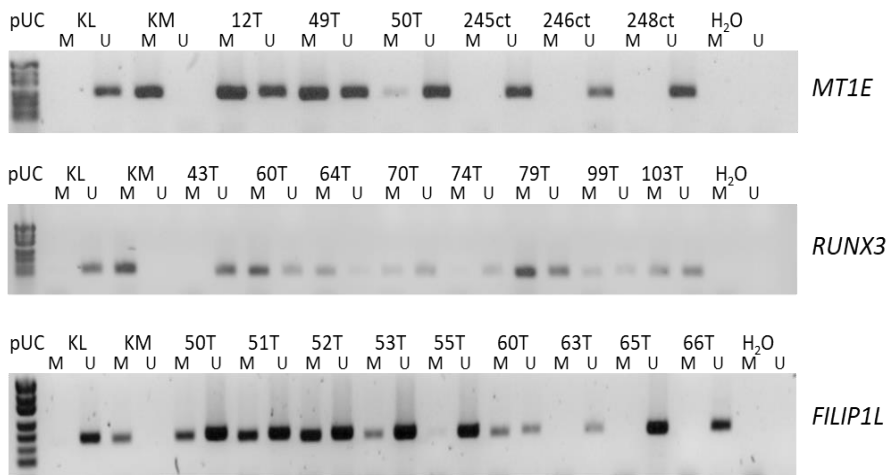
Pradmenų sekos buvo parinktos iš publikacijų (priedų S3 lentelė) arba sukonstruotos naudojant *Methyl Primer Express v1.0* programą (*ABI, Thermo Fisher Scientific*). Reakcijos mišinys (25 µl) buvo sudarytas iš 10 ng bisulfitu modifikuotos DNR, 10× PGR buferio, 2,5 mM MgCl₂, 1,6 mM dNTP mišinio, 1 µM kiekvieno pradmens, 360 GC *enhancer* reagento, 0,5 U *AmpliTaq Gold*® DNR polimerazės (*Thermo Fisher Scientific*). MSP reakcijos temperatūrinis režimas nurodytas 2.3 lentelėje. Kiekvienai reakcijai naudotos trys kontrolės: sveiko donoro leukocitų DNR, paveikta ir nepaveikta CpG metiltransferazės SssI (*New England BioLabs*), modifikuota bisulfitu, atitinkamai gaunant metilintą ar nemetilintą kontrolinį mėginį, ir taršos kontrolė – reakcijos mišinys be DNR.

2.3 lentelė. Metilnimui jautrios PGR (MSP) temperatūrinis režimas

Temperatūra, °C	Trukmė	Ciklai
95 °C	7 min.	1
95 °C	45 sek.	35–37
Priklausomai nuo geno*	45 sek.	
72 °C	45 sek.	
72 °C	10 min.	1
4 °C	∞	1

* *P14* – 66 °C; *P16* – 64 °C – 30 sek.; *MGMT* – 67 °C (M) ir 64 °C (U); *RARB* – 60 °C; *RASSF1* – 61 °C (M) ir 63 °C (U); *DAPK1* – 66 °C; *GSTP1* – 60 °C; *ESR1-1* – 60 °C; *ESR1-4* – 58 °C; *PRKCB* – 56 °C; *MT1E* – 56 °C; *MT1F* – 55 °C; *MT1G* – 58 °C; *APC* – 59 °C; *ADAMTS12* – 62 °C; *RUNX3* – 59 °C; *NAALAD2* – 58 °C.

Reakcijos produktai analizuoti 3 % agarozės gelyje, paruoštame naudojant $1\times$ TAE buferį (*Thermo Fisher Scientific*) ir paveiktame etidžio bromidu (*Carl Roth*). Rezultatai vizualizuoti naudojant UV sistemą *GelDoc–It 310 Imaging system* (*Fisher Scientific, part of Thermo Fisher Scientific*) ir vizualizacijos programą *VisionWorks®LS* (UVP) (*Informer Technologies*). Standartinis *MT1E*, *RUNX3* ir *FILIP1L* geno MSP vaizdas pateiktas 2.3 pav.



2.3 pav. *MT1E*, *RUNX3* ir *FILIP1L* geno MSP reakcijos elektroforeograma. pUC– DNR ilgio žymuo, KL – sveikų donorų leukocitų DNR, KM – *in vitro* metilinta sveikų donorų leukocitų DNR. T – KV pacientų mėginiai, ct – kontrolinių pacientų mėginiai. M – MSP reakcija su metilintai geno sekai būdingais pradmenimis, U – MSP reakcija su nemetilintai geno sekai būdingais pradmenimis. M ir MU vertinta kaip metilinta, o U – kaip nemetilinta reakcija.

2.2.5. Statistinė analizė

Kokybinei diskrečiųjų dvinarių metilino ir klinikinių parametru bei dviejų kategorinių grupių tarpusavio priklausomumo analizei buvo pasirinktas tikslusis Fišerio (angl. Fisher), o tolydiesiems duomenims naudotas Mano-Vitnio (angl. Mann-Whitney) testas. Statistinių hipotezių kriterijaus reikšmingumo lygmuo pasirinktas 0,05 ir visais atvejais skirtumai buvo laikyti statistiškai reikšmingais, kai $P \leq 0,05$.

Pacientės stebėtos vidutiniškai 91 mėnesį (nuo 3 iki 113 mėn.), įtraukiant duomenis skirtingu metu (2007–2009 m. laikotarpiu) ir stebėjimo pradžia laikant operacijos datą, o baigties įvykiu – pacientės mirties faktą. Didžioji dalis pacienčių išgyveno, todėl duomenys yra cenzūruoti, o stebėjimų

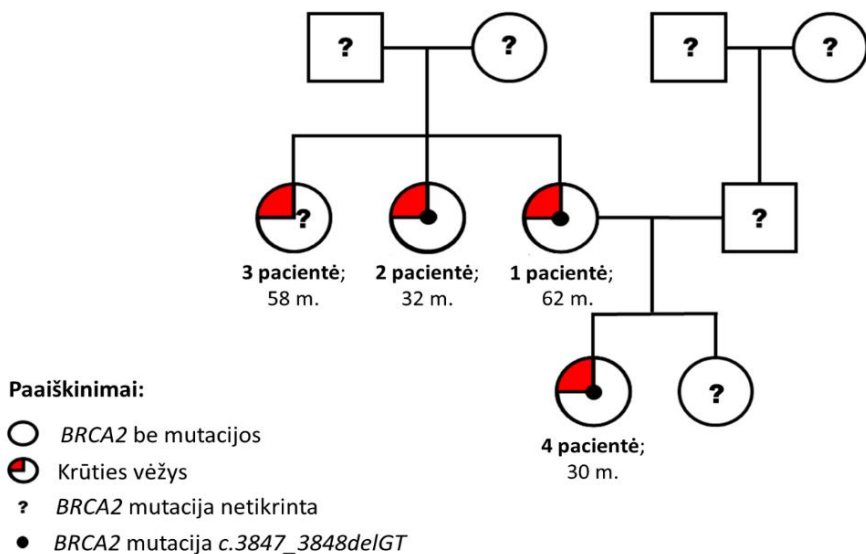
pabaigos data yra 2016–2017 m. Pacienčių išgyvenamumo analizė atlikta naudojant Kaplano–Mejerio (angl. *Kaplan-Meier*) testą ir taikant reikšmingumo lygmens korekciją dėl daugybinių palyginimų (koreguota P reikšmė, taikant Bonferonio testą). Nustatant prognostinę sąsają tarp išgyvenamumo ir klinikinių parametrų taikyta Kokso regresinė analizė (angl. *Cox regression*). Statistiniai skaičiavimai atlikti programa *GraphPad Prism 8.01* (*GraphPad Software, Inc.*) ir *MedCalc 12.7.0.0* (*MedCalc Software Ltd*).

Grafiniam vaizdavimui naudota programa *GraphPad Prism 8.01* (*GraphPad Software, Inc.*), o Veno diagramai – *Venn Diagram Plotter v1.5*.

3. REZULTATAI

3.1. *BRCA* genų mutacijų analizė šeiminio krūties vėžio atveju

Pacientei (1-oji pacientė, 62 metų) 2017 m. buvo nustatyta dešinės krūties III stadijos (cT2N3M0) duktalinė karcinoma, kuri buvo blogo diferenciacijos laipsnio ir trigubai neigiamo KV tipo. Iki 1-osios pacientės ligos, jos seserys (2-oji ir 3-ioji pacientės) taip pat sirgo krūties vėžiu, todėl remiantis 1-osios pacientės ligos istorija, pacientės kraujo giminaitėms buvo pasiūlyta atlikti *BRCA1/2* mutacijų testą. Atliekant genetinį tyrimą, pirmiausia buvo ieškoma dažniausiai pasitaikančių mutacijų (*BRCA1: c.4035delA, c.5266dupC, c.181T>G, c.1687C>T* ir *BRCA2: c.658_659delGT, c.8572C>T*) realaus laiko PGR metodu. Nepasitvirtinus dažniausioms *BRCA1/2* mutacijoms, toliau buvo atliekama naujos kartos sekoskaitos (NKS) analizė. NKS analizė patvirtino *BRCA2 c.3847_3848delGT* mutaciją 1-ajai pacientei, pacientės seseriai (2-ajai pacientei) ir dukrai (4-ajai pacientei), jau sirgusiai krūties vėžiu prieš mutacijos nustatymą. Antroji pacientės sesuo (3-ioji pacientė) taip pat sirgo krūties vėžiu, tačiau nebuvo tikrinta dėl paveldimos *BRCA2 c.3847_3848delGT* mutacijos (3.1 pav.).



3.1 pav. Paveldimos *BRCA2 c.3847_3848delGT* mutacijos paplitimas šeimoje. Paveiksle nurodytas pacienčių amžius ligos diagnozės metu.

Tirtoms pacientėms (1, 2 ir 4) buvo būdingas į skiltelę panašus naviko augimo modelis, be fibrozės ar liaukų formavimosi požymių, ląstelės

polimorfinės, turinčios didelį mitozijų skaičių. Detali šeiminė krūties vėžio ligos istorija pateikta 3.1 lentelėje.

3.1 lentelė. Šeiminio krūties vėžio pacienčių chronologinė ligos istorija.

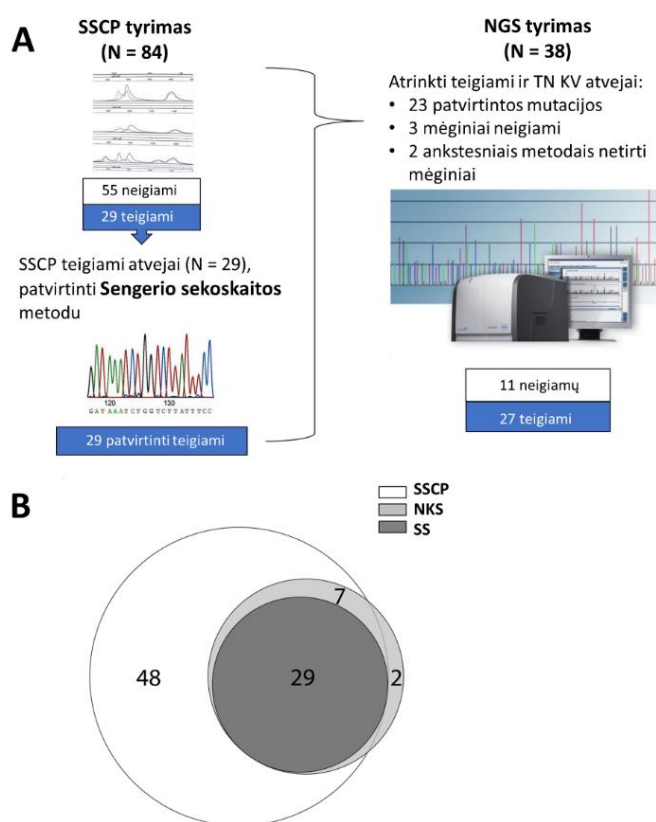
Pacientės	Ligos eiga
1 pacientė (62 m.) 2017 m.	III stadija (cT2N3M0) dešinės krūties duktalinė karcinoma, blogai diferencijuota, ER/PR/HER2 neigiama (TN). Po chemoterapinio gydymo visiškai atsakas pT0ypN0.
2 pacientė (32 m.) 2001 m.	III stadija (pT2N2M0), kairės krūties duktalinė karcinoma, mikrometastazės limfmazgiuose (8 iš 11), ER/PR neigiama, HER2 būsena nebuvo tikrinta.
2008 m.	Dešinės krūties duktalinė karcinoma, blogai diferencijuota, pT1N0M0, ER/PR/HER2 neigiama (TN).
2014 m.	Kairės krūties duktalinė karcinoma <i>in situ</i> , blogai diferencijuota, ER/PR neigiama.
2017 m.	Dešinės krūties lobulinė karcinoma, blogai diferencijuota, pT1N0M0. ER 100%, PR 90%, HER2 amplifikacija, Ki-67 – 50%.
3 pacientė (58 m.)	Invazinė krūties karcinoma, informacijos nei apie genetinę naviko būsena, nei klinikinę ligos eigą nėra.
4 pacientė (30 m.) 2007 m.	II stadija (pT2N1M0), kairiosios krūties duktalinė karcinoma, mikrometastazės limfmazgiuose, vidutinės diferenciacijos, ER/PR teigiama, HER2 neigiama.
2014 m.	Dešinės krūties duktalinė karcinoma. Informacijos apie imunohistocheminę naviko būsena nėra.

Apibendrinant galima pasakyti, kad šeimoje paveldėta *BRCA2 c.3847_3848delGT* mutacija nulėmė ankstyvą krūties vėžio atsiradimą trimis pirmos eilės giminaitėms, o ligos eiga ir klinikiniai-patologiniai ligos parametrai buvo skirtingi. Nepaisant to, pacientėms sėkmingai taikomas įprastas gydymas ir šiuo metu yra remisija. *BRCA2* mutacijos nulemta paveldimo susirgimo fenotipiniai bruožai nesiskyrė nuo sporadinių krūties navikų, todėl net ir esant hormonų receptorių raiškai, žinant šeiminio krūties vėžio istoriją, svarbu įvertinti paveldimų *BRCA1* ir *BRCA2* geno mutacijų riziką.

3.2. *TP53* mutacijų analizė krūties vėžio mėginiuose

3.2.1. *TP53* mutacijų dažnis ir įvairovė krūties vėžio audiniuose

TP53 mutacijų analizė atlikta 86 pacienčių mėginiuose, iš jų 33-iuose (38 %) buvo aptiktos *TP53* mutacijos (*TP53-mut*), o 53 mėginiuose mutacijų nenustatyta (62 %, *TP53-wt*). Išanalizavus 84 mėginius SSCP metodu, 29-iuose rastos *TP53* mutacijos, kurios patvirtintos atlikus Sengerio sekoskaitą (SS). Trisdešimt aštuoni mėginiai atrinkti detaliai analizei naujos kartos sekoskaitos (NKS) metodu, iš jų 2 nebuvo tirti nei SSCP, nei SS metodais (3.2 pav.). Trys mėginiai, prieš tai SSCP ir SS metodais nustatyti kaip *TP53 wild-type*, NKS analizės metu buvo identifikuoti kaip *TP53-mut*.



3.2 pav. *TP53* geno mutacijų analizės schema: skirtingų sekoskaitos metodų taikymo eiga (A) ir Veno diagrama (B), vaizduojanti mėginių persidengimą, tiriant juos skirtingais *TP53* mutacijų aptikimo metodais. SSCP metodu tirti 84 mėginiai, Sengerio sekoskaitos metodu (SS) – 29, o NKS – 38 mėginiai.

Atlikus detalią, 33 KV mėginių, kuriuose rastos *TP53* mutacijos, analizę, buvo nustatyti 27 *TP53* sekos patogeniniai pakitimai, kurių 78 % (21 / 27) įvyko srityje, koduojančioje su DNR besijungiantį domeną, o 22 % (6 / 27) – intronuose. Analizuojant *TP53* mutacijų pasiskirstymą tarp paveiktų geno sričių, nustatyta, jog dažniausiai mutavo 8, 6 ir 5 egzonų DNR sekos (26 %, 22 % ir 22 %). Daugiau nei pusė aptiktų mutacijų KV mėginiuose sudarė keičiančios prasmę (angl. *missense*) (52 %, 14 / 27), splaisingo pakitimai (19 %, 5 / 27), STOP kodoną sukuriančios (angl. *nonsense*) (15 %, 4 / 27), rėmelio poslinkio (11 %, 3 / 27) ir intronų pakaitos (4 %, 1 / 27).

Analizuojamo *TP53* geno nukleotidų (nt) delecijos sudarė 15 % visų pažaidų ir apėmė spektrą nuo 1 iki 23 nukleotidų. Didžiausia 23 nt delecija *g.7578546_7578568del* buvo rasta 4 introne, NKS metodu, ir paveikė geno splaisingą. Detali informacija apie *TP53* mutacijų tipus pateikta priedų S4 lentelėje.

3.2.2. *TP53* mutacijų sąsajos su klinikiniais-patologiniais krūties vėžio rodikliais

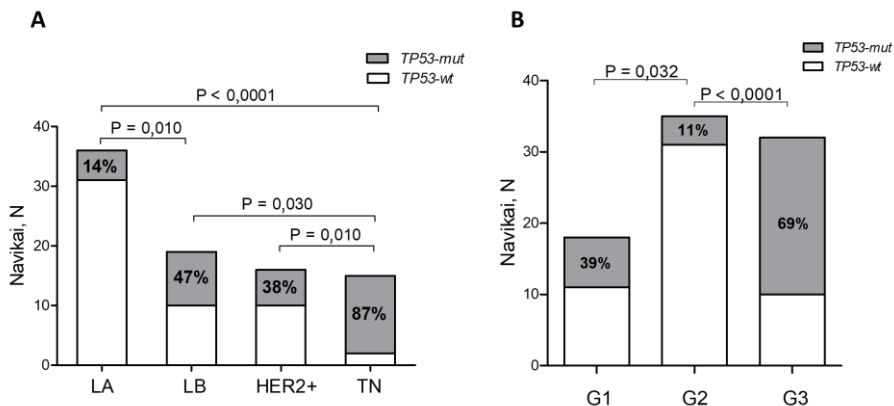
Navikai su *TP53* mutacija (*TP53-mut*) buvo dažniau randami ER ir (arba) PR neigiamuose KV mėginiuose (atitinkamai 79 %, $P < 0,0001$ ir 57 %, $P = 0,018$), todėl *TP53* mutacijos dominavo TN KV potipyje (87 %) ir gerokai rečiau pasitaikė HER2+ (38 %), LB (47 %) ar LA (14 %) KV potipiuose (visais atvejais $P < 0,05$; 3.3 A pav.). Taip pat *TP53-mut* navikuose dažniau buvo randama padidėjusi Ki-67 žymens raiška (63 %; $P < 0,0001$), tačiau sąsajų su HER2 receptoriumi nebuvo ($P > 0,05$). Išsami kitų klinikinių-patologinių rodiklių sąsaja su *TP53* mutacijomis pateikta 3.2 lentelėje.

3.2 lentelė. Klinikiniai-patologiniai parametrai mėginiuose su *TP53* mutacija (*TP53-mut*) ir be *TP53* mutacijos (*TP53-wt*).

Kintamieji	Kintamųjų charakteristikos	<i>TP53-mut</i> , N (%)	<i>TP53-wt</i> , N (%)	P-vertė
KV pacientai, N		33	53	
Amžiaus mediana KV diagnozės metu	Metai (IQR)	55 (24)	61 (19)	0,377
Histologinis tipas	Duktalinis; N (%)	32 (41)	46 (59)	0,396
	Lobulinis; N (%)	1 (17)	5 (83)	
Naviko stadija	T1; N (%)	15 (38)	24 (62)	1,0
	T2; N (%)	18 (38)	29 (62)	
Naviko plitimas į gretimus limfmazgius	Ne (N0); N (%)	21 (46)	25 (54)	0,186
	Taip (N1); N (%)	12 (31)	27 (69)	
Diferenciacijos laipsnis	G1; N (%)	7 (39)	11 (61)	(G1 vs. G2) 0,032
	G2; N (%)	4 (11)	31 (89)	(G1 vs. G3) 0,072
	G3; N (%)	22 (69)	10 (31)	(G2 vs. G3) < 0,0001
KV potipiai	LA; N (%)	5 (14)	31 (9)	(LA vs. LB) 0,010 ; (LA vs. TN) < 0,0001 (LA vs. HER2+) 0,073; (LB vs. HER2+) 0,734 (LB vs. TN) 0,030 ; (HER2+ vs. TN) 0,010
	LB; N (%)	9 (47)	10 (53)	
	HER2+; N (%)	6 (38)	10 (62)	
	TN; N (%)	13 (87)	2 (13)	
ER	Neigiamas; N (%)	15 (79)	4 (21)	< 0,0001
	Teigiamas; N (%)	18 (27)	48 (73)	
PR	Neigiamas; N (%)	16 (57)	12 (43)	0,018
	Teigiamas; N (%)	17 (29)	41 (71)	
HER2	Neigiamas; N (%)	28 (39)	43 (61)	0,775
	Teigiamas; N (%)	5 (33)	10 (67)	
Ki-67	Neigiamas; N (%)	8 (17)	39 (83)	< 0,0001
	Teigiamas; N (%)	24 (63)	14 (37)	
Išgyvenamumas	Remisija; N (%)	18 (43)	24 (57)	0,773
	Mirtis; N (%)	6 (38)	10 (63)	

Santrumpos: Ki-67 – naviko proliferacijos žymuo; G1 – geras, G2 – vidutinis, G3 – blogas diferenciacijos laipsnis; HER2+ – LBHER2 ir HER2 teigiami navikai; IQR (angl. *interquartile range*) – intervalas tarp kvartilių; LA – luminalinis A, LB – luminalinis B; N0/1 – mikrometastazės į artimuosius limfmazgius; T1/2 – naviko stadija; TN – trigubai neigiamas KV; *TP53-mut* – KV mėginiai su mutacija, o *TP53-wt* – *wild-type TP53*.

Vertinant klinikinius-patologinius rodiklius, išryškėjo blogo diferenciacijos laipsnio (G3) navikų grupė, kurioje net 69 % mėginių turėjo mutavusį *TP53*. Vidutinės diferenciacijos (G2) navikuose *TP53* mutacija pasitaikė šešis kartus rečiau nei G3 (11 %; $P < 0,0001$; 3.3 B pav.).



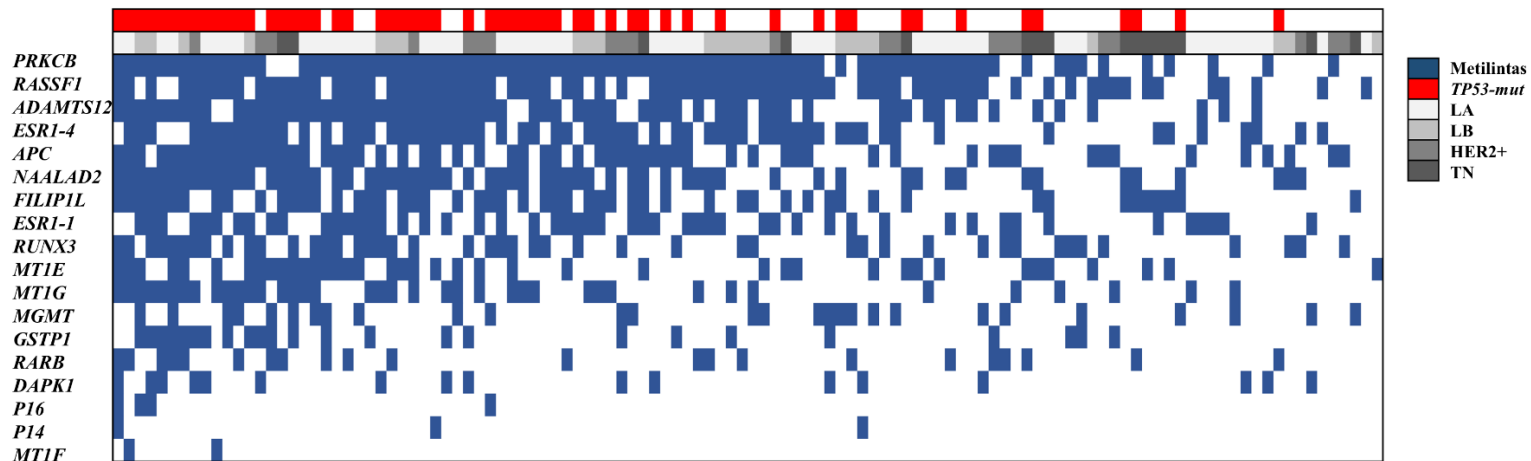
3.3 pav. *TP53* mutacijų pasiskirstymas tarp KV pacientų, sugrupuotų pagal (A) KV potipius ir (B) navikų diferenciacijos laipsnį. LA – luminalinis A, LB – luminalinis B, HER2+ – HER2 teigiamas ir luminalinis B HER2 teigiamas, TN KV – trigubai neigiamas KV. G1 – geras, G2 – vidutinis, G3 – blogas diferenciacijos laipsnis. *TP53-mut* – KV mėginiai su mutacija, o *TP53-wt* – KV mėginiai be mutacijos.

Tyrimas parodė, kad didžioji dalis *TP53* geno mutacijų yra būdingos agresyviausiam – trigubai neigiamam – KV potipiui. Nustatytos statistškai reikšmingos šių mutacijų sąsajos su agresyviu naviko fenotipu – blogu navikų diferenciacijos laipsniu ir didele proliferacijos žymens Ki-67 raiška.

3.3. DNR metilinimo analizė krūties vėžio mėginiuose

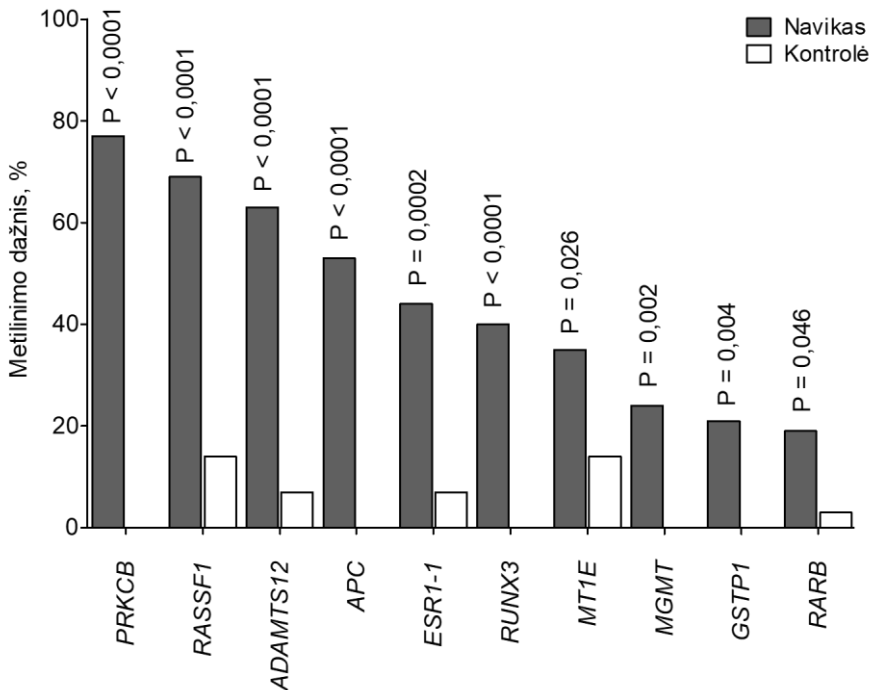
3.3.1. Tirtų genų promotorių DNR metilinimo dažnis krūties vėžio audiniuose

Iš 116 KV ir 29 kontrolinių mėginių išskirta DNR buvo analizuojama, atliekant 17-os genų (*P14*, *P16*, *ESR1*, *RARB*, *RASSF1*, *PRKCB*, *DAPK1*, *APC*, *MGMT*, *GSTP1*, *MT1E*, *MT1F*, *MT1G*, *RUNX3*, *ADAMTS12*, *FILIP1L*, *NAALAD2*) promotorių hipermetilinimo tyrimus. Gauti rezultatai parodė, kad bent vienas hipermetilintas genas buvo rastas visuose tirtuose KV mėginiuose (3.4 pav).



3.4 pav. 17 genų promotorių metilinimo krūties navikų mėginiuose profilis. LA – luminalinis A, LB – luminalinis B, HER2+ – HER2 teigiamas ir luminalinis B HER2 teigiamas, TN KV – trigubai neigiamas KV, *TP53-mut* – mutavęs *TP53*.

Krūties navikuose rasti hipermetilinti (10 / 17) *PRKCB*, *RASSF1*, *ADAMTS12*, *APC*, *ESR1*, *RUNX3*, *MT1E*, *MGMT*, *GSTP1* ir *RARB* genų promotoriai statistiškai reikšmingai atskyrė navikus nuo nevėžinių darinių ($P < 0,05$). Dažniausiai nustatytas ir statistiškai reikšmingiausiai ($P < 0,0001$) KV navikus nuo kontrolinių mėginių atskyrė *PRCKB* (77 %, 86 / 111), *RASSF1* (69 %, 79 / 115), *ADAMTS12* (63 %, 67 / 107), *APC* (53 %, 61 / 115) ir *RUNX3* (40 %, 46 / 114) genų promotorių hipermetilinimas. Šių genų specifiškumas taip pat buvo didžiausias (atitinkamai 100 %, 86 %, 93 %, 100 % ir 100 %). Genų *ESR-1*, *RARB*, *GSTP1*, *MGMT* ir *MT1E* promotorių hipermetilinimo dažnis buvo retesnis ir siekė 19–44 %, o specifiškumas atitinkamai buvo 86–100 % ($P < 0,05$) (3.5 pav.). Rečiausiai hipermetilinti buvo *MT1F*, *P14*, *P16*, *DAPK1*, *MT1G*, *FILIP1L*, *NAALAD2* ir *ESR1-4* (2–57 %) genų promotoriai ir, nors šių žymenų specifiškumas siekė 36–100 %, skirtumai tarp KV navikų ir kontrolinių mėginių metilinimo nebuvo statistiškai reikšmingi ($P > 0,05$).

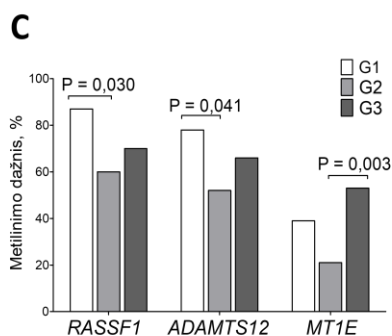
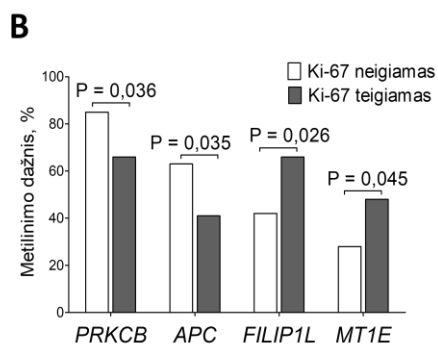
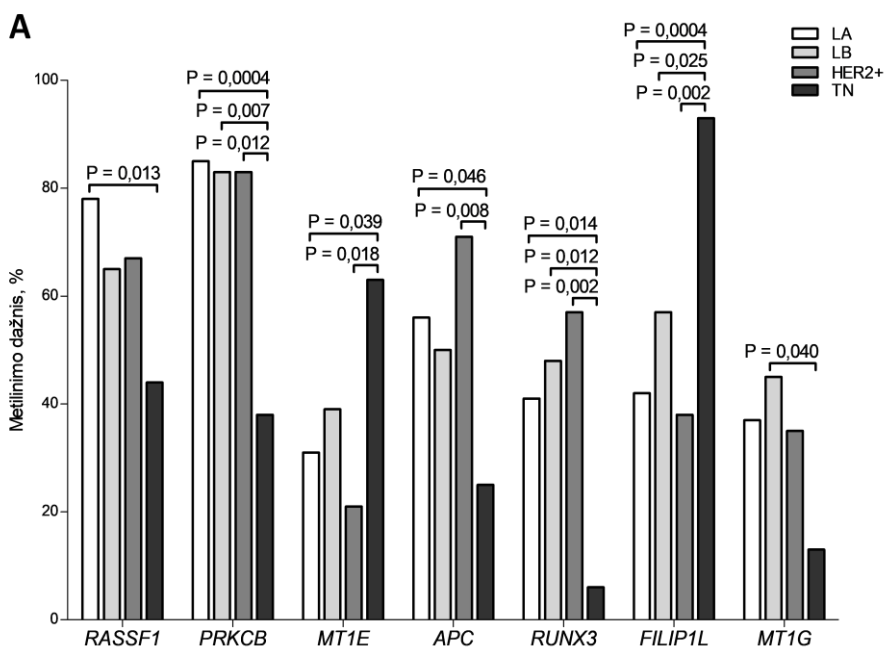


3.5 pav. Tirtų genų promotorių hipermetilinimo dažnių palyginimas krūties navikuose ir kontroliniuose mėginiuose. Kontroliniai mėginiai – iš krūties fibroadenomos audinio išskirta DNR. Metilinimo dažnis skaičiuotas n/N, kur n – mėginiai, kuriuose rastas hipermetilintas genas, o N – visi tirti mėginiai.

Šiame tyrime nustatyti 10 iš 17 specifinių KV biožymenų statistiškai reikšmingai atskiria naviko ir kontrolinių nevėžinių audinių mėginius dideliu specifiškumu ir jautrumu, todėl šie biožymenys kartu su kitais diagnostiniais metodais gali būti tinkami ankstyvai krūties vėžio diagnostikai.

3.3.2. DNR metilinimo sąsaja su klinikiniais-patologiniais krūties vėžio rodikliais

KV potipiai. Trigubai neigiamame KV potipyje vyravo *FILIPIL* (TN – 93 % vs. LA – 42 %, LB – 57 %, HER2+ – 38 %) ir *MTIE* (TN – 63 % vs. LA – 31 %, LB – 39 %, HER2+ – 21 %) genų DNR hipermetilinimas, o kitiems potipiams buvo būdingas didesnis *RASSF1*, *PRKCB*, *MTIG*, *APC* ir *RUNX3* hipermetilinimo dažnis (visų $P < 0,05$; 3.6 A pav.). Biožymenų analizė pagal naviko hormonų receptoriaus raišką parodė tą pačią tendenciją – hipermetilinti *PRKCB* (86 % vs. 40 %; $P < 0,0001$) ir *RUNX3* (46 % vs. 18 %; $P < 0,028$) buvo dažniau nustatyti ER+ nei ER– navikuose. Ir, priešingai, *FILIPIL* promotoriaus hipermetilinimas dominavo ER– ir PR– KV mėginiuose (atitinkamai 84 % vs. 45 % ir 76 % vs. 47 %; $P < 0,05$). HER2 potipyje genų *PRKCB*, *MTIE*, *APC*, *RUNX3* ir *FILIPIL* hipermetilinimas statistiškai reikšmingai atskyrė HER2+ ir TN potipius, tačiau statistiškai reikšmingų asociacijų tarp luminalinių ir HER2+ potipių nebuvo aptikta. Detalesnė biožymenų jautrumo, specifiškumo ir hipermetilinimo dažnių paplitimo tarp skirtingų potipių analizė yra pateikta priedų S5 lentelėje.



3.6 pav. Tirtų genų promotorių hipermetilavimo dažnių palyginimas tarp skirtingų krūties vėžio potipių (A); pagal Ki-67 būklę (B); tarp skirtingos diferenciacijos grupės navikų (C). LA – luminalinis A, LB – luminalinis B, HER2+ – HER2 teigiamas ir luminalinis B HER2 teigiamas, TN KV – trigubai neigiamas KV. G1 – geras, G2 – vidutinis, G3 – blogas diferenciacijos laipsnis, Ki-67 – navikų proliferacijos žymuo. Hipermetilavimo dažnis skaičiuotas n/N, kur n – mėginiai, kuriuose rastas hipermetilintas genas, o N – visi tirti mėginiai.

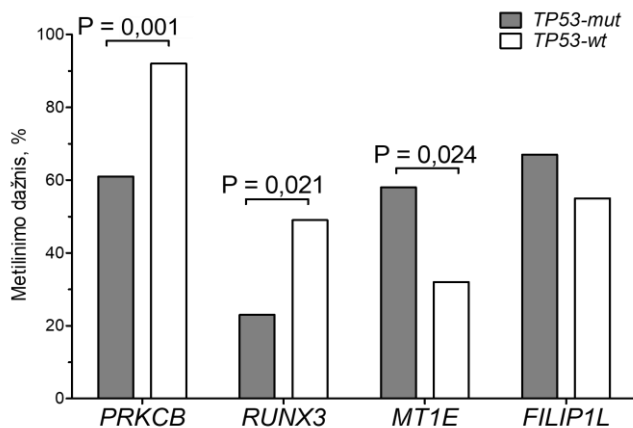
Kiti klinikiniai-patologiniai krūties vėžio rodikliai. Palyginus biožymenų hipermetilavimo dažnį tarp duktalinių ir lobulinių krūties navikų, nustatyta, kad *MT1E* genas duktaliniuose KV navikuose hipermetilintas

beveik šešis kartus dažniau (40 % vs. 7 %; $P = 0,018$). Analizuojant hipermetilinimo pasiskirstymą I ir II stadijų mėginiuose, rasta, kad *P16* hipermetilinimas būdingas tik II stadijos navikams (8 % vs. 0 %; $P = 0,041$), o *RUNX3* hipermetilinimas buvo reikšmingai didesnis KV paveiktų sritinių limfmazgių atveju (52 % vs. 31 %; $P = 0,032$). *MT1E* ir *FILIP1L* buvo dažniau hipermetilinti Ki-67 teigiamuose navikuose (48 % vs. 28 % ir 66 % vs. 42 %; atitinkamai $P = 0,045$ ir $P = 0,026$) (3.6 B pav.). Analizuojant DNR metilinimo pobūdį skirtingo diferenciacijos laipsnio KV navikuose, nustatyta, kad genų *ADAMTS12* ir *RASSF1* hipermetilinimo dažnis yra didesnis gerai diferencijuotuose (G1) nei vidutinės diferenciacijos (G2) navikuose (atitinkamai 78 % vs. 52 %; $P = 0,041$ ir 87 % vs. 60 %; $P = 0,030$), o *MT1E* hipermetilinimo dažnis dvigubai didesnis G3, palyginti su G2 (53% vs. 21 %; $P = 0,003$; 3.6 C pav.). Analizuojant hipermetilinimo ryšį su amžiumi ir ≤ 50 metų amžiaus grupę palyginus su > 50 metų pacientų duomenimis, pastebėtas dvigubai didesnis *FILIP1L* (33 % vs. 62%; $P = 0,007$) ir *NAALAD2* (36 % vs. 68 %; $P = 0,002$) hipermetilinimo dažnis vyresnio amžiaus (> 50 m.) pacientų mėginiuose.

Tyrimė identifikuoti *RASSF1*, *PRKCB*, *APC*, *RUNX3*, *MT1G*, *MT1E* ir *FILIP1L* metilinimo žymenys statistiškai reikšmingai atskiria hormonų receptorių raiška pasižyminčius ir TN KV potipius. *MT1E* ir *FILIP1L* genų epigenetiniai pokyčiai sergant KV iki šiol netirti. Nustatyta šių dviejų genų sąsaja su blogu diferenciacijos laipsniu ir didele Ki-67 raiška yra svarbus rezultatas, rodantis *MT1E* ir *FILIP1L* genų hipermetilinimo sąsają su agresyviu KV fenotipu.

3.3.3. *TP53* mutacijų ir DNR metilinimo sąsajos

Palyginus DNR metilinimo biožymenų dažnį *TP53-mut* ir *TP53-wt* KV grupėse, nustatyta, kad *MT1E* geno promotoriaus hipermetilinimas *TP53-mut* grupėje yra beveik dvigubai dažnesnis (58 % vs. 32 %, $P = 0,024$), o *FILIP1L* geno promotoriaus hipermetilinimas susijęs su krūties navikais, kuriuose yra *TP53* mutacija (67 % vs. 55 %, $P > 0,050$). Ir, priešingai, *PRKCB* bei *RUNX3* genai *TP53-mut* navikuose buvo hipermetilinami rečiau (atitinkamai 61 % vs. 92 %, $P = 0,001$ ir 23 % vs. 49 %, $P = 0,021$) (3.7 pav.).



3.7 pav. Genų *PRKCB*, *RUNX3*, *MT1E* ir *FILIP1L* hipermetilinimo dažnių skirtumai *TP53-mut* ir *TP53-wt* krūties navikų grupėse. *TP53-mut* – mutavęs *TP53*, *TP53-wt* – nepakitęs *TP53* genas. Hipermetilinimo dažnis skaičiuotas n/N, kur n – mėginiai, kuriuose rastas hipermetilintas genas, o N – visi tirti mėginiai.

Lietuvoje toks tyrimas, kuriame analizuojama *TP53* mutacijos ir DNR hipermetilinimo krūties navikuose sąsąją, atliktas pirmą kartą.

3.4. DNR metilinimo biožymenys bendrajam išgyvenamumui prognozuoti

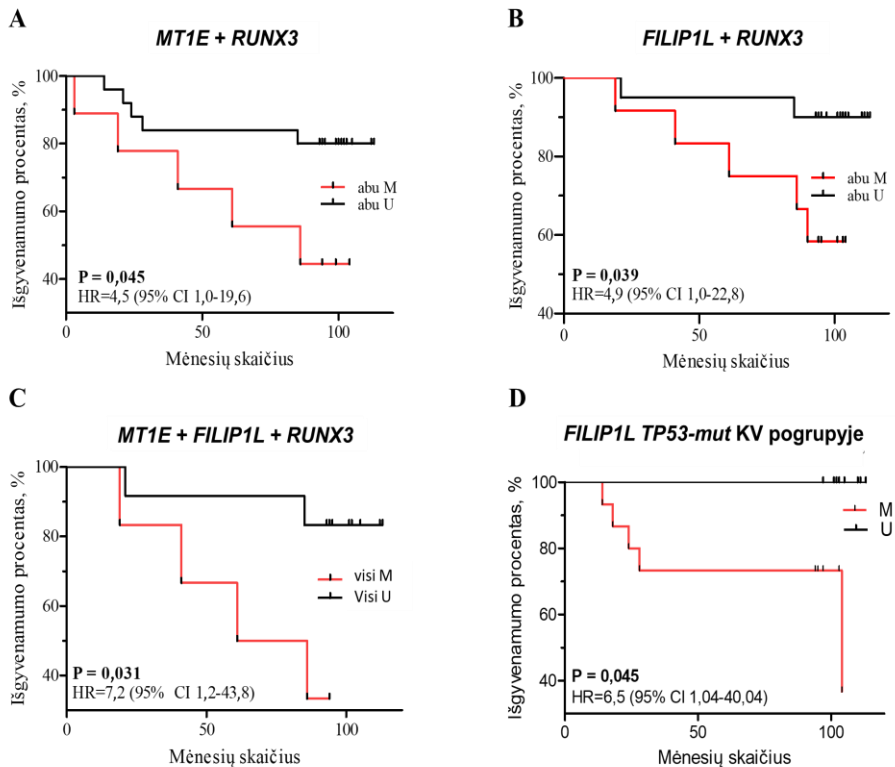
Norint įvertinti tirtų metilinimo žymenų sąsąjas su pacienčių bendruoju išgyvenamumu (angl. *overall survival*, OS), buvo atlikta vienmatė ir daugiamatė Kokso regresinė bei Kaplano-Mejerio išgyvenamumo kreivių analizės. Stebėjimo duomenys buvo surinkti iš 67 % visų KV imties tiriamųjų (78 / 116).

Vienmatė Kokso analizė parodė, jog TN KV potipis ir vyresnis pacienčių amžius buvo reikšmingai susiję su trumpesniu išgyvenamumu ($P < 0,05$). Analizuojant DNR metilinimo žymenis, trumpesnės OS prognozės tendenciją parodė tik *FILIP1L* geno hipermetilinimas, tačiau sąsąją nebuvo statistškai reikšminga (HR = 3,3; 95 % CI 0,9–12,0; $P = 0,067$) (priedų S6 lentelė).

Į daugiamates analizes buvo įtraukti tik tie kintamieji, kurių HR > 1,0, o P vertė < 0,2. Genetinius (*FILIP1L*, *P16*, *RUNX3*) ir klinikius-patologinius KV rodiklius (G, N statusas, TN potipis) bei amžių analizuojant kartu, nustatyta, kad trumpesnę OS nepriklausomai prognozuoja *RUNX3* hipermetilinimas (HR = 4,64; 95 % CI 1,14–18,75; $P = 0,032$), amžius (HR =

1,7; 95 % CI 1,02–1,12; P = 0,010) ir TN potipis (HR = 13,92; 95 % CI 2,97–65,20; P = 0,010) (priedų S6 lentelė).

Kaplano-Mejerio išgyvenamumo analizės atskleidė įvairias DNR metilinimo biožymenų kombinacijas, statistiškai reikšmingai susijusias su trumpesniu pacienčių OS. Su bloga pacientės ligos baigties prognoze siejosi hipermetilintų *MT1E* ir *RUNX3* arba *FILIP1L* ir *RUNX3* kombinacijos (atitinkamai P = 0,045 ir P = 0,039; 3.8 A-B pav.) arba visų trijų biožymenų junginys (P = 0,031; 3.8 C pav.). O *TP53-mut* KV grupėje su trumpesniu išgyvenamumu statistiškai reikšmingai siejosi *FILIP1L* hipermetilinimas (P = 0,045) (3.8 D pav.).



3.8 pav. Pacienčių bendroji išgyvenamumo analizė atsižvelgiant į *RUNX3* ir *MT1E* (koreguotas P = 0,180) bei *RUNX3* ir *FILIP1L* (koreguotas P = 0,156) žymenų hipermetilinimo būseną (A–B), trijų biožymenų metilinimą (koreguotas P = 0,124) (C) ir *FILIP1L* hipermetilinimą *TP53-mut* krūties vėžio pogrupyje (koreguotas P = 0,180) (D). M – hipermetilintas, U – nemetilintas genas, *TP53-mut* – mutavęs *TP53*, HR – rizikos santykis (angl. *hazard ratio*), 95 % CI – 95 % pasikliautinis intervalas (angl. *confidence interval*).

Analizuojant hipermetilintų genų poras ar visus tris žymenis kartu, į analizę buvo įtraukiami tik tie rezultatai, kai abu ar visi trys genai naviko audinyje buvo randami hipermetilinti. Nustatyta *RUNX3* ir *MT1E*, *RUNX3* ir *FILIP1L* bei visų trijų genų hipermetilinimo sąsaja su išgyvenamumu, taip pat *FILIP1L* hipermetilinimo ir *TP53* mutacijos sąsaja su šiuo rodikliu. Šie rezultatai rodo tirtų molekulinų biožymenų prognostinę vertę.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

4.1. Krūties vėžio genetiniai pokyčiai

4.1.1. *BRCA1/2* genų mutacijos ir jų reikšmė

Disertacijoje aprašyta šeima, kurioje trys pirmos eilės giminaitės turėjo paveldėtą *BRCA2 c.3847_3848delGT* mutaciją. Visoms 3 moterims, kurioms buvo nustatyta ši mutacija, jauname amžiuje (vidurkis 41 metai) buvo rasta vėlyvos stadijos duktalinė karcinoma. Moterims, turinčioms paveldėtą *BRCA2* geno mutaciją, krūties vėžys išsivysto apie 47 metus [Honrado ir kt., 2004; Godet ir kt., 2017], nors aprašytame šeiminiame atvejuje dviem pacientėms iš trijų krūties vėžys buvo nustatytas apie 30-uosius metus. Abiem ankstyvo krūties vėžio atvejais buvo diagnozuoti skirtingi histologiniai tipai, o ligos progresavimo metu aptikta įvairių pataloginių pokyčių.

Apie pusė visų *BRCA2* genų mutacijų randama 11-ame egzone, kuris kartu su 10-uoju egzonu sudaro apytikriai 60 % geno koduojančios dalies. *BRCA2 c.3847_3848delGT* (4075delGT, rs80359405) patogeninė mutacija, aptikta tirtoje šeimoje, yra įvykusi 11-ajame *BRCA2* geno egzone ir lemia dviejų nukleotidų deleciją, dėl to vyksta rėmelio poslinkis 1283 kodone ir taip sukuriamas pirmalaikis STOP kodonas. Valino aminorūgščiai pasikeitus į liziną, transliuojamas mutantinis, sutrumpėjęs baltymas p.V1283fs*2, kuris ląstelėje nebeatlieka savo funkcijos [Gornstein ir kt., 2018; ClinVar Miner, Henrie, 2022, duomenų bazė internete]. *BRCA2* mutacija *c.3847_3848delGT* paplitusi tarp baltųjų rasės ir yra viena iš penkių dažniausiai nustatomų mutacijų tarp žydų aškenazių (392 iš 500), Balkanų gyventojų (25 iš 500), ne žydų kilmės rusų (42 iš 500) ir maišytos etninės kilmės žmonių (41 iš 500) [Laitman ir kt., 2012; Rebbeck ir kt., 2018]. Wang ir kolegų atliktame tyrime nustatyta, jog *BRCA2 c.3847_3848delGT* mutacijos dažnis estų ir vokiečių populiacijoje siekia 0,02 (95 % CI 0,00–0,03) [Wang ir kt., 2012], o Danijoje šis *BRCA2* mutacijos variantas yra tarp dažniausiai nustatomų *BRCA2* pažaidų [Janavicius ir kt., 2010].

Navikams su *BRCA2* mutacijomis paprastai būdinga didelė ER (apie 65 %) ir PR (apie 50 %) raiška, skirtingai nuo navikų su *BRCA1* mutacijomis, kurie dažniausiai yra duktalinio tipo, panašūs į bazalinę karcinomą ir paprastai yra TN fenotipo [Lakhani ir kt., 1999; Honrado ir kt., 2004]. Disertaciniame darbe pateiktame tyrime dviem iš trijų tirtų pacienčių, turinčių *BRCA2 c.3847_3848delGT* mutaciją, buvo diagnozuotas TN krūties vėžio tipas, o vienai pacientei – navikas, kuriam būdinga padidėjusi hormonų receptorių

raiška. Honrado su kolegomis teigia, kad ER+ ir (arba) PR+ navikai, neturintys bazalinės karcinomos požymių, pirmiausia turėtų būti ištirti dėl *BRCA2* mutacijų šeimose, kuriose būdingi kartotiniai krūties ir kiaušidžių vėžio atvejai [Honrado ir kt., 2004]. Beveik visi disertaciniame darbe aprašytos šeimos atvejai buvo blogo diferenciacijos laipsnio navikai su ryškiai polimorfinėmis ląstelėmis ir dideliu mitozijų skaičiumi. Įdomu tai, kad visais aprašytos šeimos navikų atvejais vyravo į skiltelę panašus naviko augimo modelis be didelės fibrozės ar liaukų formavimosi požymių. Žinoma, kad vėžys, atsirandantis dėl *BRCA1* genų mutacijų, morfologiškai skiriasi nuo sporadinio krūties vėžio [Agnarsson ir kt., 1998; Armes ir kt., 1998; Lakhani ir kt., 1999; Honrado ir kt., 2004]. Šeiminiai krūties vėžio atvejai, susiję su *BRCA1* geno mutacijomis, paprastai apibūdinami blogu diferenciacijos laipsniu, jiems nebūdinga hormonų ir HER2 receptorių raiška, ląstelėje nėra aktyvaus p53 baltymo ir nustatomas išskirtinai didelis mitozijų skaičius bei susiliejanči nekrozė. Įdomu tai, kad iš tėvo pusės paveldėta *BRCA1* mutacija didina riziką moteriai susirgti krūties vėžiu, o *BRCA2* tokios paveldėjimo sąsajos neturi [Sensit ir kt., 2013]. Tarp navikų su *BRCA2* mutacija ir sporadinių navikų nenustatyta didelių morfologinių skirtumų [Armes ir kt., 1998; Phillips ir kt., 2000], o apie *BRCA2* navikams būdingas histologines savybes daug duomenų nėra, tačiau remiantis šiuo tyrimu būtų galima išvelgti *BRCA2* mutacijos nulemtų naviko histologinio fenotipo bruožų.

4.1.2. *TP53* geno mutacijos ir jų reikšmė

Atliktas tyrimas atskleidė, jog tirtoje imtyje 78 % rastų mutacijų buvo aptiktos srityje, koduojančioje su DNR besijungiantį domeną, o likusios pažaidos susidarė geno introninėse dalyse. Analizuojant *TP53* mutacijų pasiskirstymą tarp paveiktų geno sričių, nustatyta, jog dažniausiai mutavo 5, 6 ir 8 egzoni. Literatūros duomenimis, dažniausiai *TP53* mutacijos įvyksta 5 egzone, kiek mažiau jų randama 6–8 egzonuose [Bouaoun ir kt., 2016]. Taip pat žinoma, kad apie 80 % *TP53* mutacijų aptinkama 102–292 kodonuose (su DNR besijungiančioje geno srityje) ir apie 80 % jų yra *missense* tipo, dėl to susiformuoja stabilus p53 baltymas, kuris nebegali jungtis su DNR, kaupiasi naviko ląstelės branduolyje ir ten, sąveikaudamas su onkogenais, sukelia ląstelių transformacijas [Soussi ir kt., 2007; Zhou ir kt., 2009; Bouaoun ir kt., 2016]. Disertaciniame darbe 52 % mutacijų sudarė *missense* mutacijų tipas, kiek mažiau – splaisingo pakitimai, rėmelio poslinkio mutacijos ir *nonsense* mutacijos. Taip pat 4 introne buvo aptikta reta 23 nukleotidų delecija

g.7578546_7578568del, anksčiau aprašyta tik viename kanadiečių atliktame krūties vėžio tyrime [Pollett ir kt., 2000].

Trečdalyje krūties navikų aptinkamas mutavęs *TP53* genas, o apie 80 % mutacijų randama TN potipyje [Shahbandi ir kt., 2020]. Tirtoje imtyje mutavęs *TP53* genas rastas 38 % navikų: dažniausiai TN (87 %), o rečiausiai – LA (14 %) potipyje. Be to, šis tyrimas parodė, kad daugiau nei du trečdaliai *TP53* mutacijų aptikta blogai diferencijuotuose navikuose ir navikuose, kuriems būdinga padidėjusi Ki-67 raiška. Ki-67 prognostinis žymuo plačiai naudojamas krūties vėžio diagnostikoje ir yra susijęs su didesniu naviko tūriu, blogu diferenciacijos laipsniu, metastazėmis į sritinius limfmazgius ir trumpesniu išgyvenamumu [Petrelli ir kt., 2015]. Pan ir kolegų atliktoje Ki-67 ir TN potipio analizėje teigiama, kad *TP53* mutacijos ir Ki-67 žymens raiška koreliavo tarpusavyje bei su naviko diferenciacijos laipsniu [Pan ir kt., 2017]. Dėl dvejopų tyrimų rezultatų *TP53* mutacijų vertė kaip prognostinio žymens yra diskutuotina, tačiau *TP53* mutacijos yra naudingos prognozuojant atsaką į gydymą. Apie 3,5 tūkst. krūties navikų apimanti metaanalizė parodė ryšį tarp neoadjuvantinės antraciklinų terapijos ir *TP53* geno pokyčių [Chen ir kt., 2012; Shahbandi ir kt., 2020]. *TP53* mutacijos yra plačiai tiriamos, todėl atrandama vis daugiau galimų individualizuotos terapijos būdų [Duffy ir kt., 2022], o į pacientų diagnostiką diegiama sekoskaita.

4.2. Epigenetiniai krūties vėžio pokyčiai

Sporadiniams krūties vėžio dariniams būdinga ne tik genetinių, bet ir epigenetinių pokyčių gausa. DNR metilinimo pobūdis tarp krūties vėžio potipių skiriasi, tačiau sudėtingam ir heterogeniškam TN potipiui didelis hipermetilinimo dažnis nėra būdingas [Yu ir kt., 2019]. Todėl svarbu rasti potipiui specifinius diagnostinius ir prognostinius žymenis, kurie leistų tiksliau atskirti TN potipio vidinius pogrupius, reikšmingus prognozuojant ligos eigą ar atsaką į gydymą ir taikant individualizuotą taikinių terapiją.

Rengiant disertacinį darbą, visuose tirtuose krūties vėžio mėginiuose buvo nustatyta bent po vieną DNR hipermetilinimo pokytį, o 10 iš 17 tirtų genų hipermetilinimo pobūdis statistiškai reikšmingai atskyrė navikus nuo nevėžinių krūties darinių. Didžiausią specifiškumą ir jautrumą krūties vėžiui rodė *PRKCB*, *RASSF1*, *ADAMTS12*, *APC* ir *RUNX3*, o mažiausią – *P16*, *P14* ir *MTIF* biožymenys. Taip pat išryškėjo ir skirtingas krūties vėžio potipių hipermetilinimas: luminaliniuose krūties vėžio mėginiuose vyravo *RASSF1*, *PRKCB*, *RUNX3*, *APC* ir *MTIF* hipermetilinimas, o TN potipyje išsiskyrė didelis *MT1E* ir *FILIP1L* genų hipermetilinimo dažnis.

Specifinis atskirų krūties vėžio potipių DNR hipermetilinimas būdingas tiek šiame disertaciniame darbe, tiek kitų mokslininkų atliktuose tyrimuose [Holm ir kt., 2010; Titus ir kt., 2017], pvz., luminaliniuose ir HER2+ potipiuose dažnai randami hipermetilinti *RASSF1*, *GSTPI* ir *APC* genai [Sunami ir kt., 2008; Holm ir kt., 2010]. Krūties navikuose plačiai ištirtas žymuo, *RASSF1*, disertaciniame darbe rastas hipermetilintas 69 % dažniu. Literatūros duomenimis, *RASSF1* hipermetilinimo krūties navikuose dažnis siekia 65–85 % [Moelans ir kt., 2015; Park ir kt., 2016 ; Lu ir kt., 2017] ir yra susijęs su trumpesniu pacienčių išgyvenamumu [Saelee ir kt., 2020], nes metilinus *RASSF1* prarandama signalo perdavimo kelių, ląstelės ciklo valdymo ir mitozės kontrolė [Dubois ir kt., 2019]. Nors *GSTPI* hipermetilinimas yra specifinis prostatos navikams, tyrimai rodo, kad jis yra ir ankstyvasis krūties vėžio epigenetinis žymuo, koreliuojantis su klinikiniais-patologiniais krūties vėžio rodikliais ir randamas DCIS navikuose, kuriuose yra ankstyvųjų vėžinių pokyčių [Lee ir kt., 2007; Alnaes ir kt., 2015; Song ir kt., 2019]. Taip pat žinoma, kad *GSTPI* geno hipermetilinimas koreliuoja su agresyvesniu ER teigiamu krūties vėžio fenotipu [Miyake ir kt., 2013], tačiau disertacinio darbo tyrime LA ir LB potipiuose *GSTPI* hipermetilinimo dažniai nesiskyrė (atitinkamai 20 % ir 21 %). Nors tirtoje Lietuvos moterų ankstyvųjų stadijų krūties vėžio mėginių imtyje nustatytas *GSTPI* hipermetilinimas tesiekė 21 %, žymens specifiškumas buvo 100 %, tai patvirtina žymens sąsają su ankstyvaisiais piktybėjimo procesais krūties navikuose. Kito plačiai tyrinėjamo geno – *APC* – hipermetilinimas yra susijęs su metastazėmis ir dėl koreliacijos su chemoterapiniu gydymu, *APC* hipermetilinimas gali būti informatyvus gydymo eigos ir atsako į gydymą prognozės žymuo [Ryu ir kt., 2012; Liu ir kt., 2020; Shahbandi ir kt., 2020]. Disertaciniame tyrime daugiau nei pusėje tirtų navikų (53 %) rastas hipermetilintas *APC* genas, kurio specifiškumas siekė 100 %, o tai atitinka kitų mokslininkų gautus *APC* hipermetilinimo krūties navikuose rezultatus (44–70 %) [Saelee ir kt., 2020]. Didžiausią jautrumo ir specifiškumo krūties navikams rezultata (atitinkamai 77 % ir 100 %) parodė hipermetilintas *PRKCB*. *PRKCB* geno klinikinių hipermetilinimo krūties navikuose tyrimų nėra aprašyta, todėl disertaciniame darbe rastas didelis žymens specifiškumas ir jautrumas yra naujas ir perspektyvus, kuriant diagnostinius krūties vėžio žymenis. Klinikinių tyrimų informacijos apie dar vieno žymens, *ADAMTS12*, hipermetilinimą krūties navikuose taip pat nėra, tačiau disertaciniame tyrime *ADAMTS12* hipermetilinimas buvo būdingas luminaliniams navikams. Hipermetilinto *ADAMTS12* jautrumas ir specifiškumas krūties vėžiui, tirtoje Lietuvos moterų imtyje, buvo didelis (atitinkamai 63 % ir 93 %), todėl *ADAMTS12*, kaip ir

PRKCB, galima priskirti prie naujų specifinių žymenų, tinkamų ankstyvajai krūties vėžio diagnostikai.

Kaip jau minėta, agresyviausiam krūties vėžio potipiui, TN, būdingas mažesnis DNR metilinimo dažnis nei ER ir PR teigiamiems navikams [Fang ir kt., 2011]. TN yra laikomas heterogeniškiausiu krūties vėžio potipiu, pagal molekulinis žymenis detaliau skirstomu į mažesnius pogrupius [Yin ir kt., 2020]. Dėl didelio TN krūties vėžio heterogeniškumo šio potipio tyrimai yra sudėtingi, todėl kol kas nėra daug duomenų apie TN potipiui specifinius hipermetilinimo žymenis [Temian ir kt., 2018; Pineda ir kt., 2019]. Disertacinio darbo tyrime nustatytas *MTIE* ir *FILIP1L* hipermetilinimo dažnis TN potipyje buvo dvigubai didesnis nei luminaliniuose ir HER2+ potipiuose. Be to, tirtai krūties vėžio imties grupei, turinčiai *TP53* mutacijas, buvo būdingas didelis *MTIE* ir *FILIP1L* hipermetilinimo dažnis. Apie *MTIE* ir *FILIP1L* žymenų hipermetilinimą TN potipyje duomenų nėra, tačiau yra tyrimų, patvirtinančių jų specifiskumą krūties vėžiui [Tommasi ir kt., 2009; Kwon ir kt., 2013].

Nors klasifikuojant krūties vėžį yra išskiriamas HER2+ potipis, HER2 teigiamų navikų galima rasti visuose krūties vėžio potipiuose, tad jie laikomi labai heterogeniškais, o hipermetilinimas šiame potipyje neturi ryškių sąsajų su *HER2* geno amplifikacija [Holm ir kt., 2010], nors Terada ir kolegos teigia priešingai [Terada ir kt., 2009]. Disertaciniame darbe HER2+ potipis išsiskiria kiek didesniu *APC*, *RUNX3*, *ADAMTS12*, *MGMT*, *GSTP1* ir *ESR1-4* genų hipermetilinimu, tačiau palyginus LA ir HER2+ potipio hipermetilinimo pobūdį, šių žymenų hipermetilinimo skirtumai statistškai reikšmingai LA nuo HER2+ neatskyrė. Disertaciniame tyrime genų *APC*, *MTIE*, *RUNX3*, *FILIP1L* ir *PRKCB* hipermetilinimas statistškai reikšmingai atskyrė HER2+ ir TN potipius, bet literatūros duomenimis, *RUNX3* hipermetilinimas siejamas su ER teigiamais navikais [Liu ir kt., 2018], o duomenų apie *PRKCB* hipermetilinimą krūties navikuose nėra, ir tik *APC* geno promotoriaus hipermetilinimas Sunami mokslininkų grupės buvo rastas HER2 teigiamuose krūties vėžio mėginiuose [Sunami ir kt., 2008]. Kadangi itin heterogeniškais laikomi TN ir HER2+ krūties vėžio potipiai, todėl *APC*, *RUNX3* ir *PRKCB* metilinimo žymenų tyrimas būtų naudingas ankstyvajai diagnostikai ir potipių diferenciacijai, tačiau dėl didelio HER2+ potipio heterogeniškumo, reikėtų atlikti platesnius šių genų hipermetilinimo tyrimus.

Analizuojant genų hipermetilinimą pagal hormonų receptorių būseną, išryškėjo ER ir PR teigiamuose navikuose dažnai hipermetilinti *PRKCB* ir *RUNX3* genai. Duomenų apie *PRKCB* hipermetilinimą krūties navikuose ir (arba) sąsają su hormonų receptoriais nėra, tačiau *RUNX3* dažniausiai

randamas hipermetilintas būtent ER teigiamuose krūties vėžio atvejuose [Song ir kt., 2016; Liu ir kt., 2018]. Estrogenų receptorių signalinis kelias apima genus, dalyvaujančius ląstelės ciklo valdymo ir apoptozės procesuose ir yra svarbus normaliam krūties liaukų vystymuisi, bet, šiam procesui sutrikus, krūties ląstelės ima piktybėti. *RUNX3*, kontroliuodamas ER α transkripcinį aktyvumą, funkcionuoja kaip ER signalinio kelio inhibitorius, todėl *RUNX3* funkcijos praradimas lemia ER α raiškos padidėjimą, o tai susiję su krūties navikų vystymusi [Huang ir kt., 2012]. Palyginus krūties navikus pagal diferenciacijos laipsnį ir navikų proliferacijos žymens Ki-67 statusą, blogai diferencijuotuose navikuose išryškėjo *MTIE* hipermetilinimas, o geros diferenciacijos navikams buvo būdingas didelis *RASSF1* ir *ADAMTS12* hipermetilinimo dažnis. Literatūros duomenimis, *RASSF1* hipermetilinimas būdingas gero diferenciacijos laipsnio navikams [Karray-Chouayekh ir kt., 2010], nors yra duomenų, rodančių kad *RASSF1* hipermetilinimo skirtumų tarp skirtingo diferenciacijos laipsnio krūties navikų nėra [Hagrass ir kt., 2014]. Navikus suskirsčius pagal proliferacijos žymens raišką, Ki-67 teigiamuose navikuose buvo nustatytas didelis *MTIE* ir *FILIP1L*, o Ki-67 neigiamuose – *PRKCB* ir *APC* hipermetilinimo dažnis. Ki-67 raiška ER+ ir PR+ navikuose yra mažesnė nei pagal hormonų receptorių raišką neigiamuose navikuose [Soliman ir kt., 2016], todėl būtų galima kelti hipotezę, kad metilintų genų sąsaja su Ki-67 siejasi ir su navikų hormonų receptorių būseną. *APC* geno nutildymas krūties navikuose apibūdinamas kaip ankstyvas karcinogenezės įvykis, būdingas ER+ ir PR+ navikams, tačiau sąsajų su didele proliferacijos žymens Ki-67 raiška jis neturi [Tserga ir kt., 2011]. Lyginant genų hipermetilinimo skirtumus tarp T1 ir T2 krūties vėžio stadijų, išsiskyrė *PI6* hipermetilinimas, nustatytas tik T2 stadijos navikuose. Iš literatūros duomenų žinoma, kad *PI6* geno hipermetilinimas yra susijęs su 7 kartus didesne krūties vėžio išsivystymo rizika [Wang ir kt., 2012]. Nors disertaciniame darbe *PI6* hipermetilinimas nerodė specifiškumo krūties navikams, didesnis jo hipermetilinimo dažnis vėlesnėje stadijoje rodo, kad jis yra susijęs su krūties vėžio vystymosi procesu. *RUNX3* hipermetilinimas atliktame tyrime buvo statistiškai reikšmingai susijęs su mikrometastazėmis (paveiktais sritiniais limfmazgiais), kaip patvirtina ir literatūros duomenys [Chen ir kt., 2016]. Apie *MTIE*, *ADAMTS12*, *PRKCB* ir *FILIP1L* promotorių DNR hipermetilinimą krūties navikuose duomenų nėra, todėl disertaciniame darbe rastos šių žymenų sąsajos su klinikiniais-patologiniais krūties vėžio rodikliais leidžia vertinti šių genų hipermetilinimą kaip ankstyvą epigenetinių pokyčių atsiradimą, o žymenis – kaip tinkamus ankstyvajai krūties vėžio diagnostikai.

Tokie DNR metilinimo pobūdžio skirtumai tarp krūties vėžio potipių ir potipių viduje demonstruoja didelį šių navikų biologinį kintamumą ir poreikį juos klasifikuoti detaliau. Detali navikų epigenetinė analizė galėtų ne tik pateikti išsamų naviko epigenetinį profilį, bet ir patikslinti galimą ligos prognozę ar atsaką į gydymą ir sudaryti galimybes kurti personalizuotą ligos gydymą.

4.3. Išgyvenamumo analizė

Kol kas nėra bendros nuomonės, ar paveldėtos *BRCA1/2* mutacijos sergančiosioms krūties vėžiu lemia blogą išgyvenamumo prognozę. Yra duomenų, rodančių, jog *BRCA1/2* mutacijos yra susijusios su trumpesniu išgyvenamumu (OS) [Brekelmans ir kt., 2006; Moller ir kt., 2007], taip pat yra įrodymų, kad nėra žymaus OS skirtumo tarp krūties vėžio su *BRCA1/2* mutacijomis ir be šių mutacijų [Bonadona ir kt., 2007; Rennert ir kt., 2007], kaip ir yra tyrimų, teigiančių priešingai ir demonstruojančių net didesnę krūties vėžiu su *BRCA1/2* mutacijomis sergančių pacienčių išgyvenamumą [Veronesi ir kt., 2005; Gonzalez-Angulo ir kt., 2011]. 2018 m. atliktas tyrimas [Sporikova ir kt., 2018] atskleidė įdomią tendenciją tarp *BRCA1/2* teigiamos ir neigiamos krūties vėžio grupės išgyvenamumo – apibendrinus 10 metų stebėjimo duomenis, buvo nustatyta, kad *BRCA* mutaciją turinčių pacienčių išgyvenamumas siekia 78 %, o neturinčių – 69 %. Autoriai šį fenomeną aiškina didesniu jautrumu chemoterapijai, nulemtu homologinės rekombinacinės reparacijos ar imuninės sistemos aktyvinimo, nes žinoma, kad mutavę krūties navikai yra jautresni DNR ardantiems veiksniams, tokiems kaip platinos chemoterapiniai junginiai ar PARP inhibitoriai [Sporikova ir kt., 2018].

TP53 mutacijų randama maždaug 65–80 % TN krūties navikų [Duffy ir kt., 2018; Li ir kt., 2019], jos siejamos su bloga prognoze [Huszno ir kt., 2018; Sporikova ir kt., 2018]. Disertaciniame darbe buvo analizuojama *TP53* mutacijų sąsaja su išgyvenamumu, tačiau statistiškai reikšmingos sąsajos nerasta. Įdomu tai, kad nėra bendros nuomonės dėl *TP53* geno mutacijos įtakos pacienčių išgyvenamumui. Vienuose moksliniuose šaltiniuose teigiama, kad TN potipio krūties vėžio pacienčių, turinčių *TP53* geno mutaciją, lemiančią funkciją praradusio p53 baltymo transliaciją, išgyvenamumo rodikliai yra blogi, be to, joms padidėja metastazių atsiradimo rizika [Powell ir kt., 2016]. Kituose šaltiniuose tokie duomenis neigiami, tačiau nurodoma, kad TN potipyje mutavęs *TP53* gali būti potencialus prognostinis žymuo numatant atsparumą chemoterapijai [Aas ir kt., 1996;

Chae ir kt., 2009; Geisler ir kt., 2001]. Nors *TP53* mutacijos dominuoja TN potipyje, jos taip pat gali būti susijusios su ER+ pacienčių išgyvenamumu, nes mutacija veikia pakitusį atsaką į endokrininę terapiją [Hainaut ir kt., 2016]. Ir *TP53* mutacijos, ir TN potipis yra svarbūs veiksniai, lemiantys genetinį nestabilumą, citogenetinius pokyčius, taip pat didesnę heterozigotiškumo praradimo tikimybę [Mizuno ir kt., 2010; Olivier ir kt., 2011]. Todėl, nepaisant prieštarų rezultatų, *TP53* mutacijos TN potipyje galėtų būti ne tik potencialus prognostinis žymuo, bet ir navikų terapijos taikiny [Kim ir kt., 2016].

Šiame tyrime *TP53-mut* navikų grupėje išanalizuotas *FILIP1L* žymens hipermetilinimas statistiškai reikšmingai siejosi su trumpesniu išgyvenamumu. Tiek *FILIP1L*, tiek *TP53* yra atsakingi už apoptozės ir ląstelės ciklo valdymo procesus, o pavieniui jie siejasi su navikų invaziškumu [Kwon ir kt., 2013; Sporikova ir kt., 2018]. Kadangi apie *FILIP1L* funkciją ląstelėje, skirtingai nei apie *TP53*, labai daug duomenų nėra, šių dviejų žymenų pakitimų sąsają ir įtaką ląstelės piktybėjimo procesams reikėtų ištirti detaliau.

Sergančiųjų krūties vėžiu išgyvenamumo rodikliai sparčiai gerėja. 1960 m. 10 metų nuo diagnozės išgyvendavo tik apie 35 % krūties vėžiu sergančių moterų, o 1990 m. išgyvenamumas 10 metų jau siekė 77 %. Nepaisant to, nuo krūties vėžio kasmet miršta apie pusė milijono moterų [Grayson ir kt., 2012]. Ne visų krūties vėžio tipų atvejais bendrojo išgyvenamumo prognozė yra vienoda, blogiausias išgyvenamumo rodiklis nustatytas TN potipyje [Maxmen ir kt., 2012]. Kol kas nėra daug tyrimų, atskleidžiančių **epigenetinių veiksnių reikšmę** TN krūties vėžio potipio patogenezei [Liu ir kt., 2020]. Viena iš jų teigiama, kad hipometilinto profilio TN pacienčių išgyvenamumo rodiklis yra geresnis nei hipermetilinto, o vidutiniškai metilintos TN potipio grupės pacienčių išgyvenamumo rodiklis yra pats blogiausias [Stirzaker ir kt., 2015]. TN potipyje hipermetilinti genai dalyvauja įvairiuose ląstelių atsako keliuose ir gali būti pasitelkiami prognozuojant išgyvenamumą ir atsaką į gydymą [Temian ir kt., 2018; Pineda ir kt., 2019]. Disertacinio darbo tyrime buvo nustatyta kelių genų (*RUNX3*, *MT1E* ir *FILIP1L*) hipermetilinimo sąsaja su trumpesniu išgyvenamumu. Daugiamatė analizė parodė, kad *RUNX3* nepriklausomai prognozavo trumpesnį išgyvenamumą, o *RUNX3* deriniai su *MT1E* ir *FILIP1L* taip pat rodė statistiškai reikšmingą sąsają su bloga ligos baigtimi. *RUNX3* yra gana plačiai ištyrinėtas krūties vėžio populiacijoje [Huang ir kt., 2012; Lu ir kt., 2017], todėl žinoma, kad *RUNX3* hipermetilinimas koreliuoja su trumpesniu krūties vėžio pacienčių

išgyvenamumu [Jiang ir kt., 2008]. Duomenų apie *MTIE* reikšmę ligos eigai yra labai mažai, tačiau Jadhav su kolegomis nustatė, kad remiantis *MTIE* hipermetiliniu (kartu su kitais metalotioneiniais, tokiais kaip *MT1A*, *-B*, *-G*, *-H*, *-L* ir *-X*) galima prognozuoti blogą krūties vėžio pacienčių išgyvenamumą [Jadhav ir kt., 2015]. Trečiojo prognostinio žymens, *FILIP1L*, sąsają su išgyvenamumu kol kas nepublikuota, tačiau hipermetilinio tyrimas krūties ląstelių linijose [Kwon ir kt., 2013] parodė geno hipermetilinio sąsają su padidėjusiu naviko invaziškumu, nes buvo prarasta proliferacijos, migracijos ir apoptozės kontrolė ląstelėje [Stelzer ir kt., 2016].

Apibendrinant tyrimų rezultatus, galima daryti išvadą, jog išsamūs genetiniai ir epigenetiniai krūties vėžio tyrimai didina ligos diagnostinį potencialą, prisideda prie tikslesnio grupavimo į potipius ir padeda atskirti navikus pagal jų agresyvumą. *BRCA2* mutacijos analizė atskleidė genetinių tyrimų svarbą, vertinant šeimos ligos istoriją ir atsižvelgiant į tai, kad *BRCA2* mutacijos nulemtam krūties vėžiui gali būti būdinga hormonų receptorių raiška ir fenotipiškai jis gali būti panašus į sporadinius navikus. Iš tirtų 17 genų, dešimt atskyrė krūties vėžio mėginius nuo nenavikinių krūties audinių, todėl šie žymenys galėtų papildyti diagnostinius ligos nustatymo metodus. *TP53* geno mutacija ir TN potipiui specifiniai hipermetilinti *MTIE* ir *FILIP1L* genai buvo susiję su agresyvių navikų fenotipu, tad gali būti naudojami diagnostikoje diferencijuojant navikus pagal piktybiškumą. *FILIP1L* ir *TP53* mutacijos bei *RUNX3* hipermetilinimas kartu su *MTIE* ar *FILIP1L* ir pacienčių mėginiuose randami visi trys hipermetilinti genai prognozavo blogą ligos baigtį, todėl galima teigti, kad šie žymenys turi prognostinį potencialą.

IŠVADOS

1. Ankstyvas krūties vėžio pasireiškimas nustatytas trims pirmos linijos giminaitėms, paveldėjusioms *BRCA2 c.3847_3848delGT* geno mutaciją, dviem iš jų krūties vėžys nustatytas iki 35 m. Pacientėms, turinčioms identišką mutaciją, buvo būdingi skirtingi histologiniai parametrai ir klinikinė eiga.
2. Sporadiniuose krūties navikuose *TP53* mutacijos dominavo ER ir (arba) PR neigiamuose navikuose (TN potipyje 87 %) ir gerokai rečiau pasitaikė HER2+ (38 %), LB (47 %) ar LA (14 %) potipiuose (visų $P < 0,05$). Navikams su *TP53* mutacija būdinga bloga diferenciacija ir padidėjusi Ki-67 žymens raiška ($P < 0,0001$).
3. Krūties navikuose didžiausias promotoriaus DNR metilinimo dažnis būdingas *PRCKB*, *RASSF1*, *ADAMTS12*, *APC* ir *RUNX3* genų promotoriams (40–77 %). Šie biožymenys patikimai atskiria navikinį krūties audinį nuo nenavikinio (visų $P < 0,0001$). TN potipyje vyrauja *FILIPIL* (93 %) ir *MTIE* (63 %) hipermetilinimas (abiejų $P < 0,05$), o kitiems potipiams būdingas didesnis *RASSF1*, *PRCKB*, *MTIG*, *APC* ir *RUNX3* hipermetilinimo dažnis (visų $P < 0,05$).
4. DNR metilinimo žymenys turi diagnostinę vertę: *MTIE* genas dažniau hipermetilinamas duktalinio tipo (40 %; $P = 0,018$) ir blogos diferenciacijos navikuose (G3 – 53 %; $P = 0,003$), *MTIE* ir *FILIPIL* – Ki-67 teigiamuose navikuose (48 % ir 66 %; atitinkamai $P = 0,045$ ir $P = 0,026$), *RUNX3* – navikuose, kurių mikrometastazių yra atsiradę sritiniuose limfmazgiuose (N1 – 52 %; $P = 0,032$), o *P16* hipermetilinimas nustatomas tik T2 stadijos navikuose (T2 – 8 %; $P = 0,041$).
5. Navikų su mutavusiu *TP53* genu grupėje *MTIE* hipermetilinimas beveik dvigubai dažnesnis nei navikuose be *TP53* mutacijų (58 %; $P = 0,024$), o *PRCKB* ir *RUNX3* – retesnis (atitinkamai 61 %; $P = 0,001$ ir 23 %; $P = 0,021$). *FILIPIL* hipermetilinimas siejamas su blogesniu šios navikų grupės pacienčių bendroju išgyvenamumu ($P = 0,045$).
6. Sergant krūties vėžiu trumpesnę bendrąją išgyvenamumą nepriklausomai prognozuoja *RUNX3* hipermetilinimas (HR = 4,64; 95 % CI 1,14–18,75; $P = 0,032$), TN potipis (HR = 13,92; 95 % CI 2,97–65,20; $P = 0,010$) ir vyresnis amžius (HR = 1,7; 95 % CI 1,02–1,12; $P = 0,010$). Su trumpesniu bendroju išgyvenamumu taip pat siejasi hipermetilintų *MTIE* ir *RUNX3* ($P = 0,045$), *FILIPIL* ir *RUNX3* ($P = 0,039$) deriniai ir trijų biožymenų junginys ($P = 0,031$).

SUMMARY OF DOCTORAL DISSERTATION

INTRODUCTION

In Lithuania, about 1500 women get breast cancer (BC) annually, and about 500 of them die from this disease per year [Lithuanian cancer registry data: Cancer in Lithuania 2017, electronic resource]. Despite improving diagnostic tools, BC is still the leading malignancy type among women [European Cancer Information System (ECIS) data, 2019, electronic resource], usually diagnosed by instrumental tests: ultrasound, mammography, or magnetic resonance imaging. The diagnosis is confirmed after performing a biopsy and examining the tissue by immunohistochemical methods, determining the status of hormones and HER2 receptors.

Molecular profile of BC is highly heterogeneous and according to it four biological subtypes of BC are identified with the worst prognosis attributed to triple negative (TN) subtype of BC.

Inherited mutations have a major effect on BC development, and as many as 5-10% of all BC cases are hereditary. The proteins encoded by the mutated *BRCA1* and *BRCA2* genes, which are often found in the cases of BC, are involved in the repair of DNA damage and are very important for the maintenance of genome stability and cell cycle control [Sadeghi et al., 2020]. Another important gene - *TP53*, is the gene that mutates in cancer cells the most often [Silwal-Pandit et al., 2017]. Breast tumor *TP53* mutations are found in 20-50% of all BC cases [Powell et al., 2000; Langerod et al., 2007], these mutations lead to impaired processes of DNA damage repair, apoptosis, cell cycle control, thus when these processes are impaired, more and more mutations begin to accumulate in the cell and it starts becoming malignant [Pitoli et al., 2019]. Mutations in the *TP53* gene are considered as contraindication to radiotherapy, because it can increase the probability of secondary tumors [Lazzari et al., 2021], therefore the study of *BRCA1/2* and *TP53* mutations is very important for both disease prevention and treatment planning.

More than half of the protein-coding genes have at least one CpG island adjacent to their promoter sequences, therefore the expression of such genes can be controlled by the involvement of DNA methylation [Baylin et al., 2000]. In cancer cells, these CpG islands are often found hypermethylated in the promoters of tumor-suppressing genes, leading to silencing of gene function - blocking of the transcription [Baylin et al., 2000]. Methylation

markers are very attractive objects for research, since promoter methylation is a more frequent event than the occurrence of mutations in the process of carcinogenesis [Ushijima et al., 2010]. Genetic and epigenetic BC biomarkers can increase the accuracy of diagnostic tests, predict the course of the disease or response to treatment, and contribute to the individualization of treatment. For this reason, it is important to employ modern research that enables a detailed analysis of the molecular profile of tumors, and to check the informativeness of the selected markers in large well-characterized cohorts. In this study, genetic mutations in *BRCA2* and *TP53*, as well as DNA methylation change in genes *P14*, *P16*, *DAPK1*, *MGMT*, *FILIP1L*, *RARB*, *NAALAD2*, *GSTP1*, *MT1G*, *MT1E*, *MT1F*, *RUNX3*, *RASSF1*, *PRKCB*, *ADAMTS12*, *ESR1* and *APC* were studied.

The aim of the work is to study mutations of selected genes and changes in DNA methylation in breast tumors and to evaluate the diagnostic and prognostic value of these changes and their correlations with clinical-pathological indicators of breast cancer (BC).

Goals of the dissertation:

1. To analyze the influence of the inherited *BRCA2* gene mutation *c.3847_3848delGT* on the clinical manifestation of BC and the course of the disease.
2. To study the frequency and type of *TP53* mutations in breast tumors, and to evaluate the correlations between mutations and clinical-pathological BC indicators.
3. To study the DNA methylation frequencies of the promoter region of genes involved in breast carcinogenesis and associate results with BC subtypes.
4. Evaluate the links between DNA methylation biomarkers and clinical-pathological BC indicators.
5. Analyze DNA methylation changes in the group of tumors with *TP53* mutations and their correlations with clinical-pathological BC indicators and overall survival rate.
6. Assess the links between DNA hypermethylation biomarkers and overall survival rate in the entire BC cohort.

Scientific novelty and practical significance

The familial medical history clinical consequences of the rare *BRCA2* gene mutation *c.3847_3848delGT* have not been analyzed in Lithuania yet. This is also the first comprehensive study of *TP53* gene mutations in women with early stages (I and II) breast cancer, for which an advanced and accurate next-generation sequencing (NGS) method was used. In the dissertation, for the first time in the Lithuanian population, a detailed analysis of DNA hypermethylation markers was performed in 116 tumors and the DNA methylation profile of *TP53* mutated tumors was analyzed separately. Although BC is widely researched in the world [Cho et al., 2022; Dugue et al, 2022], no extensive analysis of biomarkers, including hypermethylation of 17 genes been performed in Lithuania until now.

The results of our study showed that DNA hypermethylation biomarkers are able to statistically significantly distinguish early BC tumors from non-cancerous tissues and differentiate BC subtypes. During the dissertation research a hypermethylation of the *MT1E* and *FILIP1L* genes unique to the triple negative (TN) subtype, as well as a high frequency of *TP53* mutations were found. Since the survival rate of patients with this subtype of BC is the lowest, it can be assumed that these epigenetic markers have not only diagnostic but also prognostic potential.

During the dissertation study genetic and epigenetic BC differences of individual subtypes were analyzed, and molecular information was linked to clinical-pathological indicators of BC and survival rate. This enabled a more detailed look at the high degree of BC heterogeneity.

MATERIALS AND METHODS

Patients and samples

Sporadic breast cancer patients

A study was initiated in 2007-2009 and included samples from 116 breast cancer (BC) and 29 control-fibroadenoma patients. The patients were treated at the National Cancer Institute, and the study was conducted after the patients signed an informed consent form and a permission was received from Bioethics committee (03-08-2007 No. 33). All collected patients' samples were tested for hereditary *BRCA1* gene mutations and only cases without *BRCA1* mutations were selected for further study. The average age of BC patients at the time of diagnosis was 57 years (27-84 years old) and for control patients - 42 years old (ages 20-62). All examined breast tumors were of early-stage T1 (N=63) and T2 (N=53), with ductal (N=101), lobular (N=13), and apocrine (N=2) histology. Immunohistochemical analysis of hormone receptor ER, PR, as well as HER2 and Ki-67 status distinguished BC into four subtypes: 47% Luminal A (**LA**; N=55), 21% Luminal B (**LB**; N=24), 18% **HER2+** (N=21; composed of a combination of Luminal B HER2 and HER2 subtypes; N=16 + 5) and 14% - Triple negative (**TN**; N = 16). Patient survival rate data were collected over a median of 91 months (range 3–113 months), with informative data collected in 67% of patients (78 of 116). During this period, 21 patients died, 56 patients were in remission, and 1 patient had confirmed disease progression. The detailed distribution of patient demographic and clinicopathological indicators by BC subtype can be found in previous paper [Sadzeviciene et al, 2022].

Hereditary breast cancer patients

BRCA1/2 gene mutation testing is suggested to women with breast or ovarian cancer who meet the indications specified in Decree of the Minister of Health of the Republic of Lithuania (No. V-1458, 31-12-2014). Mutation testing is offered to first-tier relatives if a pathogenic *BRCA1/2* gene variant is found.

In the studied family, one patient was diagnosed with a *BRCA2* gene mutation, therefore two sisters and the daughter of Patient 1 were invited for consultation. The patients signed an informed consent form and a permission was received from Bioethics committee (158200-18-989-493).

Methods

DNA purification

Total DNA from breast tissue was extracted by using *ZR Viral DNA /RNA Kit*[™] (Zymo Research) and DNA extraction from blood was performed on an automated QIAcube system using “*QIAamp DNA Blood Mini Kit reagents*” (*Qiagen*). DNA qualitative and quantitative parameters were measured with a spectrophotometer *NanoDrop*[™] 2000 (*TFS*) and stored at -80°C until use.

Analysis of DNA mutation

Detection of *BRCA1* mutations in whole BC cohort. Detection of pathogenic gene variants was carried out by PCR using *DreamTaq*[™] *Green PCR Master Mix* (*TFS*). Amplification was performed in a *ProFlex*[™] 3x32-well PCR system (*TFS*). The obtained test data are analyzed in a 2% agarose gel. The sequences of the primers used in the study are presented in Table S1.

The study of *BRCA1/2* gene mutations. The screening for 6 the most frequent *BRCA* gene mutations was performed by real-time PCR reactions using *TaqMan*[™] *Universal Master Mix II, No UNG* (*ABI, TFS*) and *TaqMan*[™] *SNP Genotyping Assays* (*ABI, TFS*) reagents, including negative (*wt*) and positive controls. All reactions were performed according to the manufacturer's recommended protocol using *Applied Biosystems*[™] 7500 *Real-Time PCR System* (*ABI, TFS*).

After the most common *BRCA1/2* mutations were excluded, the next step for mutation research was conducted using next-generation sequencing (NGS). Library preparation and amplification of the coding regions of *BRCA1/2* genes were performed using reagents from *Ion AmpliSeq*[™] *Library Kit 2.0* (*Life Technologies*) and *Oncomine*[™] *BRCA Research* (*Life Technologies*), according to the manufacturer's protocol. Library concentration was determined using *Ion Library TaqMan*[™] *Quantification Kit* (*Life Technologies*) reagents. Libraries with equal concentrations were loaded onto a 520-chip using *Ion Torrent*[™] *Ion Chef*[™] machine and *Ion 520*[™] & *Ion 530*[™] & *540*[™] *KitChef* (*Life Technologies*) reagents. Sequencing was performed on *Ion Torrent*[™] *Ion S5*[™] (*Life Technologies*) platform. *Ion Reporter 5.8* (*Life Technologies*) software was used for data analysis.

TP53 mutation analysis

The *TP53* sequence (exons 4–9) was analyzed by three methods. Mutation data analysis was prepared using databases of IARC *TP53* [Bouaoun et al., 2016] and The Catalog of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC) [COSMIC 2004].

Single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis was performed by using PCR method containing sense 6-FAM and antisense HEX primers marked with different fluorescent markers and was performed using *AmpliTaq Gold™ DNA Polymerase with Buffer II and MgCl2 Kit (ABI, TFS)*. T24 cell line DNA was used as a positive control and leukocyte DNA from a healthy donor was used as a negative control. The reaction mixture was analyzed on *ABI PRISM 3130® Genetic Analyzer (ABI, TFS)* and the results were evaluated using *GeneMapper™ (ABI, TFS)* software.

The direct Sanger sequencing (SS) method was chosen for confirmation of mutations after the analysis by the SSCP method using *AmpliTaq Gold™ DNA Polymerase with Buffer II and MgCl2 Kit (ABI, TFS)*. The sequencing reaction was prepared using *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI, TFS)* and analysed with *ABI Prism 3130® (ABI, TFS)* genetic analyzer. The results were analyzed using the *SeqScape™* software (*ABI, TFS*). The reference *TP53* sequence taken from the *GenBank®* database. The SSCP and SS methods were adapted from Holmila et al. [Holmila et al., 2006].

Next-generation sequencing (NGS) was performed with a genetic analyzer *GS Junior sequencing 454 (Roche)*. Leukocytes from healthy donors were used as control samples. All analyzed fragments were sequenced in both directions. DNA was amplified using *Phusion High-Fidelity PCR Master Mix Kit (TFS)* (Supplementary Table S2). Amplicons were purified with *AMPure XP* magnetic particles (*TFS*). Reaction products were analyzed fluorometrically using *Quant-It PicoGreen dsDNA Assay (TFS)* and *QuantiFluor system (Promega)*. The standard value of the correlation coefficient (R) squared R^2 is greater than 0.98. The emulsion PCR reaction was performed using the *emPCR Kit (Roche)*. Amplicons were mixed with magnetic particles using 10 μ L of prepared sense and antisense library DNA (1.33 molecules per magnetic particle) and collected after the reaction using the *GS Junior Titanium emPCR Oil and Breaking Kit (Roche)*. *GS Titanium Sequencing Kit reagent set* and *GS Junior Titanium series protocol (Roche)* were used for sequencing. Sequencing results were prepared using *GS Amplicon Variant Analyzer (AVA) (Roche)*. The *TP53* reference sequence NC_000017.10 was used from the database NCBI (NCBI37/hg19,

Chr17:7571720...7590868, transcript and protein sequence IDs are ENST00000269305.4 and P04637, respectively).

DNA Methylation assay

Isolated DNA (400 ng) was modified using *EZ DNA Methylation TM Kit* (Zymo Research) according to the manufacturer's recommendations.

Bisulfite-modified genomic DNA was amplified by methylation-specific PCR (MSP). Primer sequences were selected from publications (Supplementary Table S3) or designed using *Methyl Primer Express v1.0 program* (ABI, TFS). The MSP was performed using *AmpliTaq Gold™ 360 Master Mix Kit* (ABI, TFS). Three control samples were used for each reaction: healthy donor leukocyte DNA treated and untreated with *CpG methyltransferase SssI* (New England BioLabs) and modified with bisulfite to provide a methylated or unmethylated control, respectively, and a DNA-free reaction mixture as a contamination control. The reaction products were analyzed in a 3% agarose gel using the UV system *GelDoc-It 310 Imaging system* (Fisher Scientific, part of TFS) and the visualization program *VisionWorks®LS (UVP)* (Informer Technologies).

2.2.4. Statistical analysis

Fisher's exact test was chosen for the qualitative analysis of the interdependence of both - discrete binary methylation and clinical parameters, and the Mann-Whitney test was used for continuous data. Significance level of statistical hypotheses' criterion was chosen to be 0.05 and in all cases the differences were considered statistically significant when $P \leq 0.05$.

Patients were observed for an average of 91 months (from 3 to 113 months). Patient survival rate analysis was performed using the Kaplan-Meier test (with multiple testing correction (Bonferroni) and additionally corrected P-values). Cox regression analysis was used to determine the prognostic relationship between survival rate and clinical parameters. Statistical calculations were performed with *GraphPad Prism 8.01* (GraphPad Software, Inc.) and *MedCalc 12.7.0.0* (MedCalc Software Ltd). *GraphPad Prism 8.01* (GraphPad Software, Inc.) was used for graphic representation, and *Venn Diagram Plotter v1.5* was used for Venn diagram.

RESULTS

BRCA gene analysis of the familial BC case

In 2017, the Patient 1 (62 years old) was diagnosed with stage III (cT2N3M0) carcinoma of the right breast, which was of poor differentiation and triple negative BC subtype. Prior to Patient's 1 illness, her sisters (Patients 2 and 3) also had breast cancer, thus based on Patient's 1 medical history, a *BRCA1/2* mutation test was suggested for the patient's blood relatives. Genetic testing was first intended for the most common mutations of: *BRCA1: c.4035delA, c.5266dupC, c.181T>G, c.1687C>T*, and *BRCA2: c.658_659delGT, c.8572C>T* with the use of real-time PCR method. After negative results for the most common *BRCA1/2* mutations, next-generation sequencing (NGS) analysis was performed. NGS analysis confirmed the *BRCA2 c.3847_3848delGT* mutation in Patient 1, the patient's sister (Patient 2), and daughter (Patient 4), who already had BC before the mutation was detected. The patient's second sister (Patient 3) also had BC, but was not tested for the hereditary *BRCA2 c.3847_3848delGT* mutation (Figure 3.1).

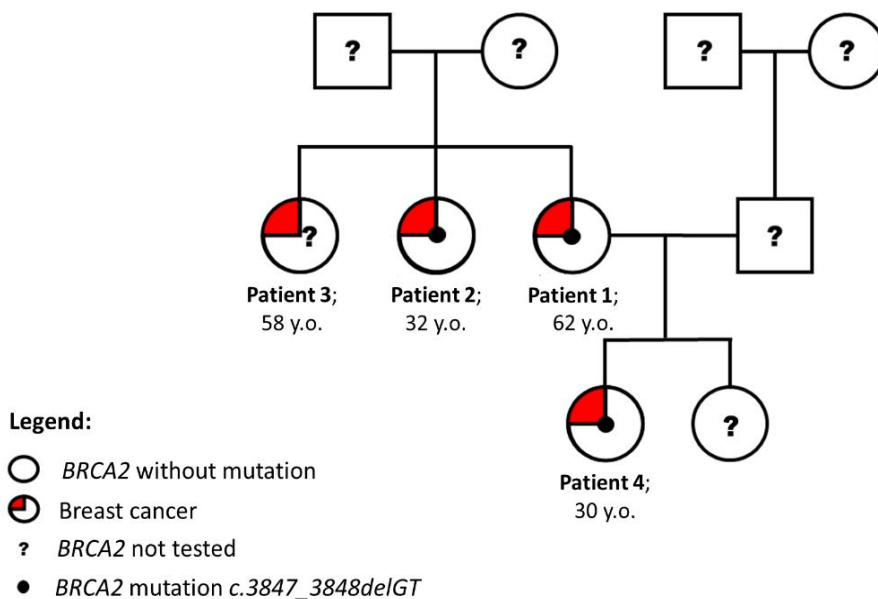


Figure 3.1 Familial prevalence of the hereditary *BRCA2 c.3847_3848delGT* mutation. Figure presents the age of patients at the time of the diagnosis of the disease.

A detailed family history of BC is provided in previous paper [Sadzeviciene et al., 2020]. Despite variable clinical presentation of tumors patients responded to conventional treatment strategies and are on remission.

Analysis of *TP53* mutation in BC samples Frequency and diversity of *TP53* mutations in BC tissues

Analysis of *TP53* mutations was performed for 86 patient samples, of which 33 (38%) had *TP53* mutations (*TP53-mut*), and 53 samples had no mutations (62%, *TP53-wt*). After analyzing 84 samples by SSCP, *TP53* mutations were found in 29, which were confirmed by Sanger sequencing (SS). Thirty-eight samples were selected for detailed analysis by the next-generation sequencing (NGS) method, of which 2 were not analyzed neither by SSCP nor SS methods. Three samples previously identified as *TP53 wild-type* by SSCP and SS methods were identified as *TP53-mut* during NGS analysis.

A detailed analysis of 33 BC samples with *TP53* mutations identified 27 pathogenic alterations in the *TP53* sequence, of which 78% (21/27) occurred in the DNA-binding region and 22% (6/27) - in introns. Analysis of *TP53* mutations distribution among the affected regions of the gene revealed that exons 8, 6, and 5 mutated the most frequently (26%, 22%, and 22%). More than half of detected mutations in BC samples consisted of *missense* (52%, 14/27), splicing alterations (19%, 5/27), STOP codon introducing (*nonsense*) (15%, 4/27), frameshift (11%, 3/27), and intron substitutions (4%, 1/27).

Nucleotide (nt) deletions of the analyzed *TP53* gene accounted for 15% of all DNA damage and covered the spectrum from 1 to 23 nt. The largest 23-nt deletion *g.7578546_7578568del* was found in the 4th intron by NGS and affected gene splicing. Details of *TP53* mutation types are provided in Supplementary Table S4.

Links of *TP53* mutations to clinical-pathological BC indicators

TP53-mutated tumors (*TP53-mut*) were more frequently found in ER- and/or PR-negative BC samples (79%, $P < 0.0001$ and 57%, $P = 0.018$, respectively), suggesting that *TP53* mutations predominated in the TN BC subtype (87%) and was significantly less common in HER2+ (38%), LB (47%), or LA (14%) BC subtypes (all $P < 0.05$). Also, increased expression of the Ki-67 marker was found more often in *TP53-mut* tumors (63%; $P < 0.0001$), but there was no link

to the HER2 receptor ($P>0.05$). When evaluating clinical-pathological indicators, a group of tumors with a poor degree of differentiation (G3) emerged, in which even 69% had *TP53* gene mutation. In moderately differentiated (G2) tumors, *TP53* mutation was found six times less frequently than in G3 (11%; $P<0.0001$). The detailed link of other clinical-pathological indicators with *TP53* mutations is presented in previous paper [Sadzeviciene et al., 2022].

DNA methylation analysis in BC samples

The frequency of DNA methylation of the studied genes in BC tissues

DNA extracted from 116 BC and 29 control samples was analyzed performing testing of promoter methylation of 17 genes (*P14*, *P16*, *ESR1*, *RARB*, *RASSF1*, *PRKCB*, *DAPK1*, *APC*, *MGMT*, *GSTP1*, *MT1E*, *MT1F*, *MT1G*, *RUNX3*, *ADAMTS12*, *FILIP1L*, *NAALAD2*). The obtained results showed that at least one methylated gene was presented in all of the tested BC samples.

Hypermethylated (10/17) *PRKCB*, *RASSF1*, *ADAMTS12*, *APC*, *ESR1*, *RUNX3*, *MT1E*, *MGMT*, *GSTP1*, and *RARB* gene promoters found in breast tumors distinguished tumors from non-cancerous samples with the statistical significance ($P<0.05$). Breast tumors were distinguished from control samples with the highest statistical significance ($P<0.0001$) by hypermethylated *PRCKB* (77%, 86/111), *RASSF1* (69%, 79/115), *ADAMTS12* (63%, 67/107), *APC* (53%, 61/115) and *RUNX3* (40%, 46/114). These genes also had the highest specificity (100%, 86%, 93%, 100%, and 100%, respectively). *ESR1*, *RARB*, *GSTP1*, *MGMT*, and *MT1E* gene promoter hypermethylation frequencies were lower, ranging from 19% to 44%, with a specificity of 86% to 100%, respectively ($P<0.05$) (Fig. 3.2). *MT1F*, *P14*, *P16*, *DAPK1*, *MT1G*, *FILIP1L*, *NAALAD2*, and *ESR1-4* gene promoters (2–57%) were the least hypermethylated, and although the specificity of these markers ranged from 36% to 100%, the differences between BC tumors and control methylation samples were not statistically significant ($P>0.05$).

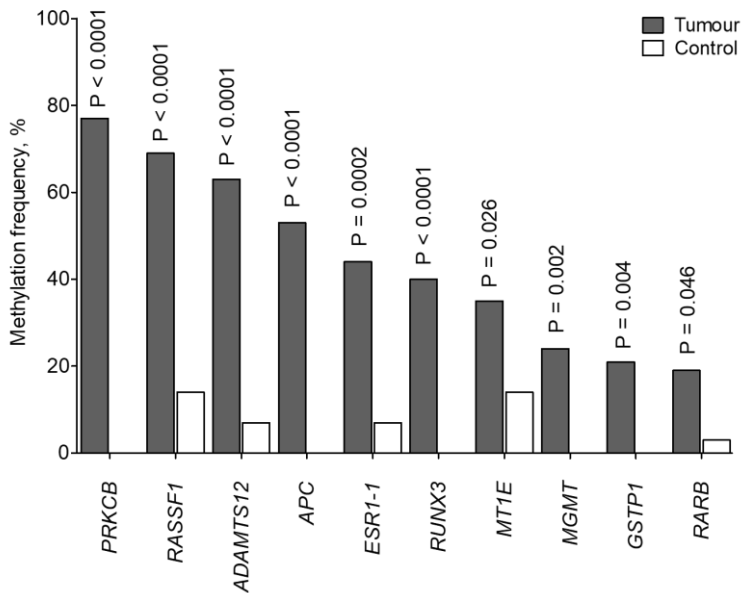


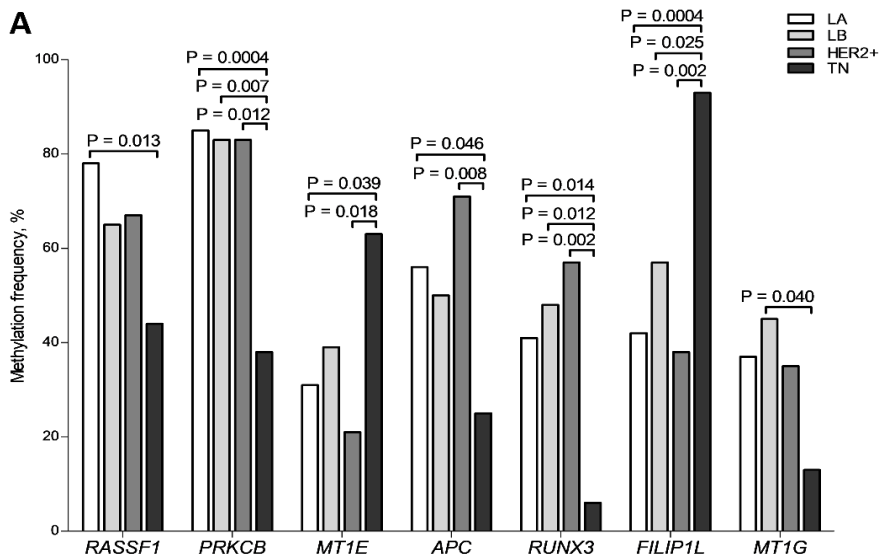
Figure 3.2 Comparison of hypermethylation frequencies of studied gene promoters between breast tumors and control samples.

Link between DNA methylation and clinical-pathological BC indicators

BC subtypes. *FILIP1L* (TN –93% vs. LA – 42%, LB – 57%, HER2+ – 38%) and *MT1E* (TN – 63% vs. LA – 31%, LB – 39%, HER2+ – 21%) gene hypermethylation predominated in the TN BC subtype, whereas the other subtypes showed higher frequency of *RASSF1*, *PRKCB*, *MTG*, *APC*, and *RUNX3* hypermethylation (all P<0.05) (Fig. 3.3 A). Biomarker analysis by tumor hormonal receptor status showed the same trend, i.e., hypermethylated *PRKCB* (86% vs. 40%; P<0.0001) and *RUNX3* (46% vs. 18%; P<0.028) were more common in ER+ than ER– tumors. And, in contrast, *FILIP1L* promoter hypermethylation predominated in ER– and PR– BC samples (84% vs. 45% and 76% vs. 47%, respectively; P<0.05). In the HER2 subtype, hypermethylation of *PRKCB*, *MT1E*, *APC*, *RUNX3*, and *FILIP1L* genes statistically significantly separated HER2+ and TN subtypes, but no statistically significant links were detected between Luminal and HER2+ subtypes. A more detailed analysis of biomarker sensitivity, specificity, and prevalence of hypermethylation frequencies among different subtypes is provided in Table S5.

Other clinical-pathological BC indicators. Comparing the frequency of biomarker hypermethylation between ductal and lobular breast tumors, the

MT1E gene was found to be hypermethylated almost six times more often in ductal BC tumors (40% vs. 7%; $P=0.018$). Analysis of the distribution of hypermethylation in stage I and II samples showed that *P16* hypermethylation is unique to stage II tumors (8% vs. 0%; $P=0.041$), while *RUNX3* hypermethylation was significantly higher in BC with affected regional lymph nodes (52% vs. 31%; $P=0.032$). Also, *MT1E* and *FILIP1L* were more frequently hypermethylated in Ki-67 positive tumors (48% vs. 28% and 66% vs. 42%; $P<0.05$) (Figure 3.3 B). Analysis of the DNA methylation pattern in BC tumors of different degrees of differentiation revealed a higher frequency of *ADAMTS12* and *RASSF1* hypermethylation in well-differentiated (G1) than in moderately differentiated (G2) tumors (78% vs. 52%; $P=0.041$ and 87% vs. 60%; $P=0.030$), and double the frequency of *MT1E* hypermethylation in G3 compared to G2 (53% vs. 21%; $P=0.003$; Fig 3.3 C. Analyzing the link of hypermethylation with age and comparing the data of the age group of ≤ 50 years with the data of patients of >50 years, twofold higher hypermethylation frequency of *FILIP1L* (33% vs. 62%; $P=0.007$) and *NAALAD2* (36% vs. 68%; $P=0.002$) is found in BC samples from elderly (>50 years) patients' group.



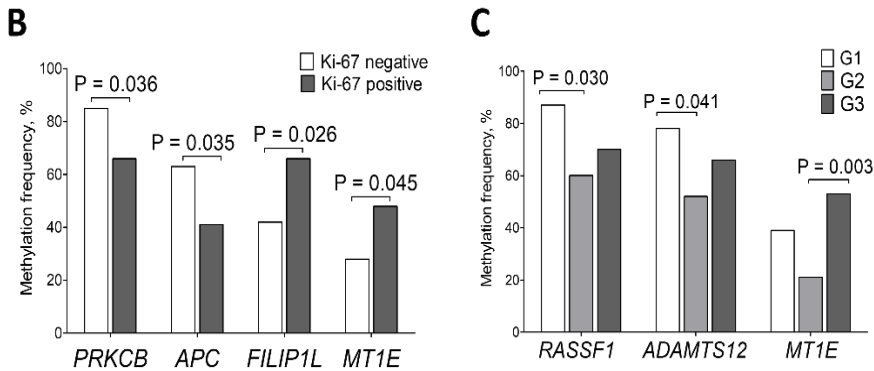


Figure 3.3 Comparison of hypermethylation frequencies of studied gene promoters among different breast cancer subtypes (A); by Ki-67 status (B); between tumors of different differentiation group (C).

Links between *TP53* mutations and DNA methylation

Comparison of the frequency of DNA methylation biomarkers in the *TP53-mut* and *TP53-wt* BC groups showed that hypermethylation of the *MT1E* marker was almost twice as frequent in the *TP53-mut* group (58% vs. 32%, $P=0.024$). And, on the contrary, *PRKCB* and *RUNX3* genes were less frequently hypermethylated in *TP53-mut* tumors (92% vs. 61%, $P=0.001$ and 49% vs. 23%, $P=0.021$, respectively).

DNA methylation biomarkers for predicting overall survival rate

Univariate and multivariate *Cox* regression and *Kaplan-Meier* survival rate curve analyses were performed to evaluate the links between the studied methylation markers and overall survival (OS) rate of patients. Observation data were collected for 67% of all subjects in BC cohort (78/116).

Univariate *Cox* analysis showed that TN BC subtype and older patient age were significantly linked to shorter survival ($P<0.05$). Only variables with $HR>1.0$ and P value <0.2 were included in multivariate analyses. When genetic (*FILIP1L*, *P16*, *RUNX3*), clinical-pathological indicators of BC (G, N status, TN subtype) and age were analyzed together, *RUNX3* hypermethylation was found to be an independent predictor of shorter OS ($HR = 4.6$; 95% CI 1.14 – 18.75; $P= 0.032$) as well as TN subtype ($HR = 13.92$; 95% CI 2.97 – 65.2; $P=0.010$), and age ($HR = 1.7$; 95% CI 1.02 – 1.12; $P=0.010$) (Supplementary Table S6).

Kaplan-Meier survival rate analyses revealed various combinations of DNA methylation biomarkers to be statistically significantly linked to shorter patient OS. Combinations of hypermethylated *MT1E* and *RUNX3* or *FILIP1L* and *RUNX3* (P=0.045 and P=0.039, respectively; Fig. 3.4 A-B) or a combination of all three biomarkers (P=0.031; Fig. 3.4 C) were linked to poor patient outcome prognosis. Meanwhile, *FILIP1L* hypermethylation was statistically significantly linked to shorter OS in the *TP53-mut* BC group (P=0.045; Fig 3.4 D).

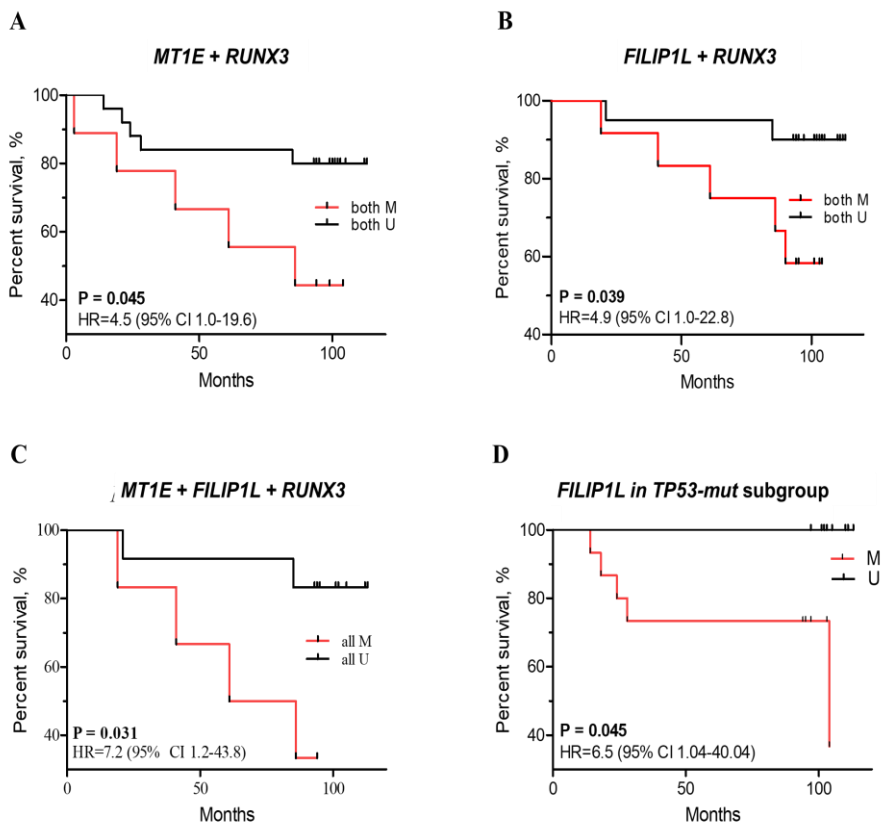


Figure 3.4 Analysis of patient overall survival rate according to hypermethylation status of *RUNX3* with *MT1E* and *FILIP1L* markers (A–B), methylation of three biomarkers (C), and *FILIP1L* hypermethylation in *TP53-mut* BC subgroup (D). *TP53-mut* – mutated *TP53*; HR – hazard ratio; 95% CI – 95% confidence interval.

DISCUSSION

Genetic changes in breast cancer

BRCA1/2 gene mutations and their significance

A dissertation study described a family where three first-tier relatives had an inherited *BRCA2* *c.3847_3848delGT* mutation. All 3 women with this mutation were found to have advanced ductal carcinoma at a young age (mean of 41 years). On average, women with an inherited *BRCA2* gene mutation develop breast cancer around 47 years of age [Honrado et al., 2004; Godet et al., 2017], although in the described familial case, two out of three patients were diagnosed with BC around the age of 30. In both cases of an early BC disease patients were diagnosed with different BC histological subtypes, and various pathological changes were detected during disease progression.

The *BRCA2* *c.3847_3848delGT* (4075delGT, rs80359405) pathogenic mutation found in the studied family is located in exon 11 of the *BRCA2* gene and results in a deletion of two nucleotides, resulting in a frameshift at codon 1283 and thus generating a premature STOP codon. When the amino acid valine is changed to lysine, the mutant, truncated protein p.V1283fs*2 is translated, which no longer performs its function in the cell [Gornstein et al., 2018; Henrie et al., 2022].

Tumors with *BRCA2* mutations typically have a high expression of ER (~65%) and PR (~50%), in contrast to tumors with *BRCA1* mutations, which tend to be ductal-type, resemble basal-like carcinomas, and usually have a TN phenotype [Lakhani et al., 1999; Honrado et al., 2004]. In the study presented in the dissertation, two of the three patients with the *BRCA2* *c.3847_3848delGT* mutation were diagnosed with the BC type of TN, and one patient with a tumor with an increased hormone receptor expression. Honrado et al. suggest that ER+ and/or PR+ tumors without evidence of basal-like carcinoma should be screened first for *BRCA2* mutations in families with recurrent breast and ovarian cancer [Honrado et al., 2004]. No major morphologic differences between *BRCA2*-mutated and sporadic tumors are known [Armes et al., 1998; Phillips et al., 2000], and there is little information about the histological features of *BRCA2*-mutated tumors, but, based on this study, the histological phenotype of a *BRCA2*-mutated tumor could be discerned.

TP53 gene mutations and their significance

In the study, 78% of the *TP53* mutations were found in the DNA-binding region of the gene, while the rest of the changes occurred in the intronic parts of the gene. Analyzing the distribution of *TP53* mutations among the affected gene regions, it was found that exons 5, 6, and 8 were mutated the most. It is also known that about 80% of *TP53* mutations are found in the 102-292 codons (the DNA-binding region of the gene) and about 80% of them are *missense* alterations, which results in the formation of a stable p53 protein that can no longer bind to DNA and therefore accumulates in the nucleus of tumor cells, interacts with oncogenes, and causes cell transformations [Soussi et al., 2007; Zhou et al., 2009; Bouaoun et al., 2016]. In the dissertation, 52% of the mutations were of the *missense* mutation type, and slightly less - splicing changes, frameshift mutations, and *nonsense* mutations. A rare 23-nucleotide deletion *g.7578546_7578568del* was also detected in intron 4, found to be described in only one Canadian BC study [Pollett et al., 2000].

One-third of breast tumors have mutations in the *TP53* gene, and about 80% of them are found in the TN subtype [Shahbandi et al., 2020]. In the studied sample, 38% of tumors had a mutated *TP53* gene, which was most frequently found in the TN (87%) and least frequently in the LA (14%) subtype. In addition, this study showed that in the TN subtype, more than two-thirds of *TP53* mutations were found in poorly differentiated tumors and tumors with increased Ki-67 expression. An analysis of Ki-67 and TN BC subtype performed by Pan et al. stated that *TP53* mutation and Ki-67 marker expression correlated with each other and with the degree of BC differentiation [Pan et al., 2017]. The value of *TP53* mutations as a prognostic marker is debatable due to dual results of studies, but *TP53* mutations are useful in predicting treatment response. A meta-analysis, including approximately 3.5 thousand breast tumors, showed a link between neoadjuvant anthracycline therapy and alterations in the *TP53* gene [Chen et al., 2012; Shahbandi et al., 2020]. *TP53* mutations are widely studied, leading to the discovery of more and more potential avenues for personalized therapy [Duffy et al., 2022] and the introduction of sequencing into patient diagnostics routine.

Epigenetic changes in BC

Sporadic BC formations are characterized by an abundance of not only genetic but also epigenetic changes. The pattern of DNA methylation varies between

BC subtypes, but a high frequency of hypermethylation is not characteristic to the complex and heterogeneous TN subtype [Yu et al., 2019]. Therefore, it is important to find subtype-specific diagnostic and prognostic markers that would allow more accurate differentiation of the internal subgroups of the TN subtype, significant in predicting the course of the disease or response to treatment and application of the individualized target therapy.

At least one DNA hypermethylation change was detected in all BC samples studied during the preparation of the dissertation, and the nature of hypermethylation of 10 out of 17 studied genes statistically significantly distinguished tumors from non-cancerous breast specimens. *PRKCB*, *RASSF1*, *ADAMTS12*, *APC*, and *RUNX3* showed the highest specificity and sensitivity for breast cancer. Different hypermethylation of BC subtypes was also revealed: Hypermethylation of *RASSF1*, *PRKCB*, *RUNX3*, *APC*, and *MTIG* prevailed in Luminal BC samples, and a high frequency of *MTIE* and *FILIPIL* genes hypermethylation stood out in TN BC subtype.

Specific DNA hypermethylation of individual BC subtypes is common in our and other researchers' studies [Holm et al., 2010; Titus et al., 2017]. A widely studied marker in breast tumors, *RASSF1*, was found to be hypermethylated at a frequency of 69% in the dissertation, as well *GSTP1* and *APC*, are known to be specific biomarkers for BC [Moelans et al., 2015; Alnaes et al., Liu et al., 2020]. Hypermethylated *PRKCB* showed the highest sensitivity and specificity results for breast tumors and *ADAMTS12* was characteristic for Luminal tumors in our study. Clinical studies of *PRKCB* and *ADAMTS12* gene hypermethylation in BC have not been described yet, so the high specificity and sensitivity of these markers found in the dissertation is new and promising for the development of diagnostic markers for BC.

The most aggressive BC subtype, TN, is characterized by a lower frequency of DNA methylation than ER- and PR-positive tumors with not much data on TN subtype-specific hypermethylation markers [Fang et al., 2011; 2018; Pineda et al., 2019]. In our study, the frequency of *MTIE* and *FILIPIL* hypermethylation in the TN BC subtype was twice more frequent than of Luminal and HER2+ BC. A high frequency of *MTIE* and *FILIPIL* hypermethylation was also characteristic for BC containing *TP53* mutations. Although there is no data on hypermethylation of *MTIE* and *FILIPIL* markers in TN BC, there are studies confirming their specificity for BC [Tommasi et al., 2009; Kwon et al., 2013].

When BC tumors were compared according to the degree of differentiation and tumor proliferation marker Ki-67 status, poorly differentiated tumors showed hypermethylation of *MTIE* as well as Ki-67-

positive tumors showed a high frequency of *MTIE* and *FILIP1L* hypermethylation. Ki-67 expression in ER+ and PR+ tumors is lower than in TN tumors [Soliman et al., 2016], so it could be hypothesized that the link between methylated genes and Ki-67 is also related to the tumor hormone receptor status. *P16* hypermethylation stood out in comparing tumors according the stage, as it was found only in T2 stage tumors, while *RUNX3* hypermethylation was statistically significantly linked to micrometastases in the study, which is also supported by scholarly reference data [Chen et al., 2016]. There is no data on hypermethylation of *MTIE*, *ADAMTS12*, *PRKCB*, and *FILIP1L* in breast tumors, so the correlations of these markers with clinical-pathological BC indicators found in the dissertation allow us to consider the hypermethylation of these genes as early occurrence of epigenetic changes, and the markers as suitable for early diagnosis of BC.

Survival rate analysis

There is still no consensus on whether inherited *BRCA1/2* mutations lead to poor survival rate in patients with BC. There is evidence that *BRCA1/2* mutations are associated with lower survival rate [Brekelmans et al., 2006; Moller et al., 2007]. Also, there are studies demonstrating even better survival rate in BC patients with *BRCA1/2* mutations [Veronesi et al., 2005; Gonzalez-Angulo et al., 2011] which is explained a higher sensitivity to chemotherapy caused by homologous recombination or activation of the immune system, as it is known that mutated BC tumors are more sensitive to DNA-damaging [Sporikova et al., 2018].

The dissertation analyzed the link of *TP53* mutations to survival rate, but no statistically significant link was found. Interestingly, there is no consensus on the impact of *TP53* gene mutation on patient survival rate. Some scientific sources suggest that TN BC patients with mutated, loss-of-function p53 protein, have poor survival rate and an increased risk of developing metastases [Powell et al., 2016]. Other sources refute such data, but indicate that *TP53* mutated in TN BC subtype may be a potential prognostic marker for chemotherapy resistance [Aas et al., 1996; Geisler et al., 2001; Chae et al., 2009].

Hypermethylation of the *FILIP1L* marker analyzed in the *TP53-mut* tumor group in the dissertation study was statistically significantly linked to lower OS. Both *FILIP1L* and *TP53* are responsible for apoptosis and cell cycle control processes, and individually they are linked to tumor invasiveness [Kwon et al., 2013; Sporikova et al., 2018]. Since there is not much data on

the function of *FILIP1L* in the cell, unlike *TP53*, the link between the changes of these two markers and the impact on the malignant processes of the cell should be investigated in more detail.

Not all BC types have the same OS prognosis, and among the BC subtypes, the worst survival was found in the TN BC subtype [Maxmen et al., 2012]. TN BC hypermethylated genes are involved in various cellular response pathways and may be used to predict survival and response to treatment [Temian et al., 2018; Pineda et al., 2019]. In our study, hypermethylation of several genes (*RUNX3*, *MTIE*, and *FILIP1L*) was found to be associated with lower OS. Multivariate analysis showed that *RUNX3* independently predicted lower OS, and combinations of *RUNX3* with *MTIE* and *FILIP1L* showed a statistically significant link to poor disease outcome. *RUNX3* hypermethylation is known to correlate with lower survival rate in BC patients, but there are very few studies about *MTIE* methylation significance in BC, however it is known that methylated *MTIE* (along with other metallothioneins) can predict poor survival rate in BC patients [Jadhav et al., 2015]. The link between *FILIP1L* and survival rate have not been published yet, however studies of hypermethylation in breast cell lines [Kwon et al., 2013] showed a link between gene hypermethylation and increased tumor invasiveness due to loss of control of cell proliferation, migration, and apoptosis in the cell [Stelzer et al., 2016].

CONCLUSIONS

1. Early onset of BC was found in three first-tier relatives who inherited the *BRCA2 c.3847_3848delGT* gene mutation, two of whom had BC before the age of 35. Genetically identical mutation caused different histological parameters and clinical course of the disease.
2. *TP53* mutation was dominant in ER and/or PR negative breast tumors (87% in TN BC subtype), and were less common in HER2+ (38%), LB (47%), or LA (14%) BC subtypes (all $P<0.05$). Tumors with *TP53* mutation were characterized by poor differentiation and increased Ki-67 marker expression ($P<0.0001$).
3. In breast tumors, promoter DNA hypermethylation was frequent (40-77%) in *PRCKB*, *RASSF1*, *ADAMTS12*, *APC*, and *RUNX3* genes ($P<0.0001$). These changes were highly specific to BC (all $P<0.0001$). TN BC subtype was dominated by *FILIP1L* (TN - 93%) and *MTIE* (TN - 63%) hypermethylation (all $P<0.05$), while other subtypes were specific for *RASSF1*, *PRCKB*, *RUNX3*, *APC*, and *MTIG* hypermethylation (all $P<0.05$).
4. DNA methylation biomarkers showed diagnostic potential: hypermethylation of *MTIE* was frequent in ductal BC type (40%; $P=0.018$) and poorly differentiated tumors (G3 - 53%; $P=0.003$), *MTIE* and *FILIP1L* - in Ki-67-positive tumors (48% and 66%; $P=0.045$ and $P=0.026$, respectively), *RUNX3* - in BC with affected lymph nodes (52%; $P=0.032$), whereas *P16* hypermethylation was specific to T2-stage tumors (8%; $P=0.041$).
5. In *TP53* mutant BC, *MTIE* hypermethylation was almost twice as common than in tumors without *TP53* mutations (58%; $P=0.024$), while *PRCKB* and *RUNX3* genes were less frequently hypermethylated (61%; $P=0.001$ and 23%; $P=0.021$, respectively). *FILIP1L* hypermethylation was statistically significantly linked to a lower overall survival rate of this group ($P<0.045$).
6. In BC, lower overall survival rate was independently predicted by *RUNX3* hypermethylation (HR = 4.64; 95% CI 1.14–18.75; $P=0.032$), TN subtype (HR = 13.92; 95% CI 2.97–65.20; $P=0.010$) and older age (HR = 1.7; 95% CI 1.02–1.12; $P=0.010$). Combinations of hypermethylated *MTIE* and *RUNX3* ($P=0.045$) and *FILIP1L* and *RUNX3* ($P=0.039$) were also associated with a lower overall survival rate, as well as the combination of the three biomarkers ($P=0.031$).

CURRICULUM VITAE

Kontaktinė informacija:

Tel. Nr.: +370 68827769

El. p.: sadzeviciene.ieva@gmail.com

Tyrimų sritis: Biologija (genetika)

Išsilavinimas:

2001–2005 m. Bakalauro laipsnis, VU. Molekulinė biologija.

2005–2007 m. Magistro laipsnis, VU. Genetika.

Nuo 2007 m. Doktorantūros studijos, VU. Biologijos mokslai.

Mokslinė patirtis:

2003–2005 m. – VU, Botanikos ir genetikos katedra. Bakalauro mokslinis darbas. Tema: "Paprastosios avietės (*Rubus idaeus L.*) populiacijų genetinės struktūros tyrimas RAPD metodu".

2005-2007 m. – Biotechnologijos institutas. Imunologijos laboratorija. Magistro mokslinis darbas. Tema: "Molekulinio šaperono Hsp90 vaidmuo hipoksijos indukuojamo faktoriaus (HIF-1 α) stabilumo reguliavime".

2007-2015 m. – VU, Botanikos ir genetikos katedra; Inovatyvios medicinos centras. "Epigenetinių veiksnių įtaką suaugusio žmogaus kamieninių ląstelių diferenciacijai".

2015 – dabar – VU, Botanikos ir genetikos katedra. "Genetinių ir epigenetinių biožymenų tyrimai krūties vėžio diagnostikai ir ligos eigos prognozavimui".

Darbinė veikla:

2007–2015 m. Inovatyvios medicinos centro, regeneracinės medicinos ir reumatologijos skyriaus jaunesnioji mokslo darbuotoja.

Akademinė veikla:

Vadovavimas vienam bakalauro darbui.

Publikacijos ir konferencijos:

4 moksliniai straipsniai paskelbti leidiniuose, turinčiuose cituojamumo rodiklį *Clarivate Analytics Web of Science* duomenų bazėje. 3 tarptautinių konferencijų stendiniai pranešimai.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Aas T, Borresen A-L, Geisler S, Smith-Sorensen B, Johnsen H, Varhaug JE, Akslen LA, Lonning PE. 1996. „Specific P53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients.“ *Nature Medicine* 2 (7): 811-814. doi:10.1038/nm0796-811.
2. Agnarsson BA, Jonasson JG, Björnsdóttir IB, Barkardóttir RB, Egilsson V, Sigurdsson H. 1998. „Inherited BRCA2 mutation associated with high grade breast cancer.“ *Breast Cancer Research and Treatment* 47 (2): 121-127. doi:10.1023/a:1005853022804.
3. Ahmad A, Nay S.L, O'Connor T.R. 2015. „Direct Reversal Repair.“ *Advances in DNA Repair*, 496. London: IntechOpen. doi:<https://www.intechopen.com/books/4558>.
4. Ahmed IA, Pusch CM, Hamed T, Rashad H, Idris A, El-Fadle AA, Blin N. 2010. „Epigenetic alterations by methylation of RASSF1 and DAPK1 promoter sequences in mammary carcinoma detected in extracellular tumor DNA.“ *Cancer genetics and Cytogenetics* 199: 96-100.
5. Akram M, Iqbal M, Daniyal M, Kham AU. 2017. „Awareness and current knowledge of breast cancer.“ *Biological Research* 50 (33). doi:10.1186/s40659-017-0140-9.
6. Alexandrova EM, Mirza SA, Xu S, Schulz-Heddergott R, Marchenko ND, Moll UM. 2017. „p53 loss-of-heterozygosity is a necessary prerequisite for mutant p53 stabilization and gain-of-function in vivo.“ *Cell Death & Disease* 8 (3): e2661. doi:10.1038/cddis.2017.80.
7. Alkam Y, Mitomi H, Nakai K, Himuro T, Saito T, Takahashi M, Arakawa A, Yao T, Saito M. 2013. „Protein expression and methylation of DNA repair genes hMLH1, hMSH2, MGMT and BRCA1 and their correlation with clinicopathological parameters and prognosis in basal-like breast cancer.“ *Histopathology* 63 (5): 713-725. doi:10.1111/his.12220.
8. Alnaes GIG, Ronneberg JA, Kristensen VN, Tost J. 2015. „Heterogeneous DNA Methylation Patterns in the GSTP1.“ *Genes* 6: 878-900. doi:10.3390/genes6030878.
9. American Cancer Society [elektroninis išteklius]. Atlanta, JAV, 2019. *Cancer Facts & Figures 2019*. Prieiga per internetą: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2019/cancer-facts-and-figures-2019.pdf> [Žiūrėta 2022-12-20].
10. Andre F, Zielinski CC. 2012. „Optimal strategies for the treatment of metastatic triple-negative breast cancer with currently approved agents.“ *Annals of oncology* 23 (6): 46-51.

11. Andreassen PR, Seo J, Wiek C, Hanenberg H. 2021. „Understanding BRCA2 Function as a Tumor Suppressor Based on Domain-Specific Activities in DNA Damage Responses.“ *Genes (Basel)* 12 (7): 1034. doi:10.3390/genes12071034.
12. Andreotti G, Karami S, Pfeiffer RM, Hurwitz L, Liao LM, Weinstein SJ, Albanes D, Virtamo J, Silverman DT, Rothman N, Moore LE. 2014. „LINE1 methylation levels associated with increased bladder cancer risk in pre-diagnostic blood DNA among US (PLCO) and European (ATBC) cohort study participants.“ *Epigenetics* 9 (3): 404-15. doi:10.4161/epi.27386.
13. Anothaisintawee T, Wiratkapun C, Lerdstitthichai P, Kasamesup V, Wongwaisayawan S, Srinakaran J, Hirunpat S, Woodtichartpreecha P, Boonlikit S, Teerawattananon Y, Thakkestian A. 2013. „Risk factors of breast cancer: a systematic review and meta-analysis.“ *Asia-Pacific Journal of Public Health* 25 (5): 368-387. doi:10.1177/1010539513488795.
14. Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, Loman N, Olsson H, Johannsson O, Borg A, Pasini B, Radice P, Manoukian S, Eccles DM, Tang N, Olah E, Anton-Culver H, Warner E, Lubinski J, Gronwald J, Gorski B, Tulinius H, et al. 2003. „Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies.“ *American journal of human genetics* 72 (5): 1117-1130. doi:10.1086/375033.
15. Armes JE, Egan AJ, Southey MC, Dite GS, McCredie MR, Giles GG, Hopper JL, Venter DJ. 1998. „The histologic phenotypes of breast carcinoma occurring before age 40 years in women with and without BRCA1 or BRCA2 germline mutations: a population-based study.“ *Cancer* 83 (11): 2335-2345.
16. Askari M, Sobti RC, Nikbakht M, Sharma SC. 2013. „Promoter hypermethylation of tumor suppressor genes (p14/ARF and p16/INK4a): Case-control study in North Indian population.“ *Molecular Biology Reports* 40 (8): 4921-4928.
17. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology [elektroninis šaltinis], Banerjee S., 2007. Prieiga per internetą: [http://atlasgeneticsoncology.org/gene/163/brca1-\(breast-cancer-1-early-onset\)/](http://atlasgeneticsoncology.org/gene/163/brca1-(breast-cancer-1-early-onset)/) [Žiūrėta 2022-12-19].
18. Baylin S, Herman JG. 2000. „DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics.“ *Trends in Genetics* 14 (4): 168-174. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(99\)01971-X](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(99)01971-X).

19. Bayraktar S, Gluck S. 2012. „Systemic therapy options in BRCA mutation-associated breast cancer.“ *Breast Cancer Research Treatment* 135: 355-366.
20. Bareche Y, Venet D, Ignatiadis M, Aftimos P, Piccart M, Rothe F, Sotiriou C. 2018. „Unravelling triple-negative breast cancer molecular heterogeneity using an integrative multiomic analysis.“ *Annals of Oncology* 29 (4): 895-902. doi:10.1093/annonc/mdy024.
21. Barrow TM, Michels KB. 2014. „Epigenetic epidemiology of cancer.“ *Biochemical and Biophysical Research Communications* 455 (1-2): 70-83.
22. Baselga J, Norton L. 2002. „Focus on breast cancer.“ *Cancer Cell* 1 (4): 319-322.
23. Basu AK. 2018. „DNA Damage, Mutagenesis and Cancer.“ *International Journal of Molecular Sciences* 19 (4): 970. doi:0.3390/ijms19040970.
24. Batra RN, Lifshitz A, Vidakovic AT, Chin SF, Sati-Batra A, Sammut SJ, Provenzano E, Ali HR, Dariush A, Bruna A, Murphy L, Purushotham A, Ellis I, Green A, Garrett-Bakelman FE, Mason C, Melnick A, Aparicio SAJR, Rueda OM, Tanay A, Caldas C. 2021. „DNA methylation landscapes of 1538 breast cancers reveal a replication-linked clock, epigenomic instability and cis-regulation.“ *Nature Communications* 12 (1): 5406. doi:10.1038/s41467-021-25661-w.
25. Bland KI, Copeland EM, Klimberg VS. 2018. „Anatomy of the Breast, Axilla, Chest Wall, and Related Metastatic Sites.“ 2 skyrius *The Breast: Comprehensive Management of Benign and Malignant Diseases*, 5th Edition, autorius K I Bland, V S Klimberg, III, E M Copeland ir W J Gradisha, 20-38. Elsevier. doi:10.1016/b978-0-323-35955-9.00002-7 .
26. Bonadona V, Dussart-Moser S, Voirin N, Sinilnikova OM, Mignotte H, Mathevet P, Brémond A, Treilleux I, Martin A, Romestaing P. 2007. „Prognosis of early-onset breast cancer based on BRCA1/2 mutation status in a French population-based cohort and review.“ *Breast cancer research and treatment* 101: 233-245. <https://doi.org/10.1007/s10549-006-9288-7>.
27. Bouaoun L, Sonkin D, Ardin M, Hollstein M, Byrnes G, Zavadil J, Olivier M. 2016. „TP53 Variations in Human Cancers: New Lessons from the IARC TP53 Database and Genomics Data.“ *Human Mutation* 37 (9): 865-876. doi:10.1002/humu.23035.
28. BRCA2 (breast cancer 2, early onset). Guenard F, Durocher F [elektroninis išteklius]. Kanada, 2010. „Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology 14 (12): 1124-1131. Prieiga per internetą: [http://atlasgeneticsoncology.org/gene/164/brca2-\(breast-cancer-2-early-onset\)](http://atlasgeneticsoncology.org/gene/164/brca2-(breast-cancer-2-early-onset)) [Žiūrėta 2022-12-28].

29. Brekelmans C, Seynaeve C, Menke-Pluymers M, Brüggewirth H, Tilanus-Linthorst M, Bartels C, Kriege M, van Geel A, Crepin C, Blom J. 2006. „Survival and prognostic factors in BRCA1-associated breast cancer.“ *Annals of oncology* 17: 391-400. doi:10.1093/annonc/mdj095.
30. Calhoun BC, Grobmyer SR, Simpson JF. 2018. „Benign, High-Risk, and Premalignant Lesions of the Breast. The Breast.“ 8 skyrius *The Breast: Comprehensive Management of Benign and Malignant Diseases*, 5th Edition, autorius K I Bland, V S Klimberg, III, E M Copeland ir W J Gradisha, 116-129.e3. Elsevier. doi:10.1016/b978-0-323-35955-9.00008-8.
31. Carlin JL. 2011. „Mutations Are the Raw Materials of Evolution.“ *Nature Education Knowledge* 3 (10).
32. Chae BJ, Bae JS, Lee A, Park WC, Seo YJ, Song BJ, Kim JS, Jung SS. 2009. „p53 as a Specific Prognostic Factor in Triple-negative Breast Cancer.“ *Japanese Journal of Clinical Oncology* 39 (4): 217-224. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyp007>.
33. Chang H, Pannunzio N, Adachi N, Lieber MR. 2017. „Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair.“ *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18: 495-506. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.48>.
34. Chen F, Liu X, Bai J, Pei D, Zheng J. 2016. „The emerging role of RUNX3 in cancer metastasis.“ *Oncology Reports* 35 (3): 1227-1236. doi:10.3892/or.2015.4515.
35. Chen MB, Zhu YQ, Xu JY, Wang LQ, Liu CY, Ji ZY, Lu PH. 2012. „Value of TP53 status for predicting response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: a meta-analysis.“ *PLoS One* 7 (6): e39655. doi:10.1371/journal.pone.0039655.
36. Cho YH, Shen J, Gammon MD, Zhang YJ, Wang Q, Gonzalez K, Xu X, Bradshaw PT, Teitelbaum SL, Garbowski G, Hibshoosh H, Neugut AI, Chen J, Santella RM. 2012. „Prognostic significance of gene-specific promoter hypermethylation in breast cancer patients.“ *Breast Cancer Research and Treatment* 131 (1): 197-205. doi:10.1007/s10549-011-1712-y.
37. Cho SB. 2022. „Uncovering Oncogenic Mechanisms of Tumor Suppressor Genes in Breast Cancer Multi-Omics Data.“ *International Journal of Molecular Sciences* 23 (17): 9624. doi:10.3390/ijms23179624.
38. ClinVar Miner [duomenų bazė internete], Henrie A., 2022. Prieiga per internetą: https://clinvarminer.genetics.utah.edu/submissions-by-variant/NM_000059.4%28BRCA2%29%3Ac.3847_3848del%20%28p.Val1283fs%29 [Žiūrėta 2023-01-04].

39. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. 2012. „Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies.“ *The Lancet Oncology* 13 (11): 1041-1051. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70425-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70425-4).
40. Colombo PE, Milanezi F, Weigelt B, Reis-Filho JS. 2011. „Microarrays in the 2010s: the contribution of microarray-based gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction.“ *Breast Cancer Research* 13 (3): 212. doi:10.1186/bcr2890.
41. Dall GV, Britt KL. 2017. „Estrogen Effects on the Mammary Gland in Early and Late Life and Breast Cancer Risk.“ *Frontiers in Oncology* 7 (110). doi:10.3389/fonc.2017.00110.
42. Daniunaite K, Bakavicius A, Zukauskaite K, Rauluseviciute I, Lazutka JR, Ulys A, Jankevicius F, Jarmalaite S. 2021. „Promoter Methylation of PRKCB, ADAMTS12, and NAALAD2 Is Specific to Prostate Cancer and Predicts Biochemical Disease Recurrence.“ *e. Int. J. Mol. Sci.* 11 (11). doi:10.3390/ijms22116091.
43. Das PM, Singal R. 2004. „DNA Methylation and Cancer.“ *DNA Methylation and Cancer* 22 (22): 4632-4642. doi:10.1200/JCO.2004.07.151.
44. de Almeida BP, Apolônio JD, Binnie A, Castelo-Branco P. 2019. „Roadmap of DNA methylation in breast cancer identifies novel prognostic biomarkers.“ *BMC Cancer* 19 (1): 219. doi:10.1186/s12885-019-5403-0.
45. Downs B, Wang SM. 2015. „Epigenetic changes in BRCA1-mutated familial breast cancer.“ *Cancer Genetics* 208 (5): 237-240. doi:10.1016/j.cancergen.2015.02.001.
46. Drooger JC, Heemskerk-Gerritsen BAM, Smallegenbroek N, Epskamp C, Seynaeve CM, Jager A. 2016. „Toxicity of (neo)adjuvant chemotherapy for BRCA1- and BRCA2- associated breast cancer.“ *Breast Cancer Research Treatment* 156: 557-566.
47. Dubois F, Berge E, Zalzman G, Levallet G. 2019. „RASSF1A, puppeteer of cellular homeostasis, fights tumorigenesis, and metastasis—an updated review.“ *Cell Death & Disease* 10 (928). <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2169-x>.
48. Duffy MJ, Synnott NC, Crown J. 2018. „Mutant p53 in breast cancer: potential as a therapeutic target and biomarker.“ *Breast Cancer Research and Treatment* 170: 213-219. <https://doi.org/10.1007/s10549-018-4753-7>.
49. Duffy MJ, Synnott NC, O'Grady S, Crown J. 2022. „Targeting p53 for the treatment of cancer.“ *Seminars in Cancer Biology* 79: 58-67. doi:10.1016/j.semcancer.2020.07.005.

50. Dugué PA, Bodelon C, Chung FF, Brewer HR, Ambatipudi S, Sampson JN, Cuenin C, Chajès V, Romieu I, Fiorito G, Sacerdote C, Krogh V, Panico S, Tumino R, Vineis P, Polidoro S, Baglietto L, English D, Severi G, Giles GG, Milne RL, Herceg Z, Garcia-Closas M, F. 2022. „Methylation-based markers of aging and lifestyle-related factors and risk of breast cancer: a pooled analysis of four prospective studies.“ *Breast Cancer Research* 24 (1): 59. doi:10.1186/s13058-022-01554-8.
51. Dumitrescu RG, Cotarla I. 2005. „Understanding breast cancer risk - where do we stand in 2005?“ *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 9 (1): 208-221. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2005.tb00350.x>.
52. Easton DF, Bishop DT, Ford D, Crockford GP. 1993. „Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: results from 214 families. The Breast Cancer Linkage Consortium.“ *American Journal of Human Genetics* 52 (4): 678-701.
53. ECIS - European Cancer Information System [elektroninis išteklius]. Europos Sąjunga, 2019. Prieiga per internetą: <https://ecis.jrc.ec.europa.eu> [Žiūrėta 2022-12-13].
54. Ecsedi SI, Hernandez-Vargas H, Lima SC, Herceg Z, Adany R, Balazs M. 2013. „Transposable hypomethylation is associated with metastatic capacity of primary melanomas.“ *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 6 (12): 2943-8.
55. Ehrlich M. 2009. „DNA hypomethylation in cancer cells.“ *Epigenomics* 1 (2): 239-259.
56. Elbadawy M, Usui T, Yamawaki H, Sasaki K. 2018. „Novel Functions of Death-Associated Protein Kinases through Mitogen-Activated Protein Kinase-Related Signals.“ *International Journal of Molecular Sciences* 19 (10): 3031. doi:10.3390/ijms19103031.
57. Eliyatkin N, Yalçın E, Zengel B, Aktaş S, Vardar E. 2015. „Molecular Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way.“ *The Journal of Breast Health* 11 (2): 59-66. doi:10.5152/tjbh.2015.1669.
58. Fang F, Turcan S, Rimner A, Kaufman A, Giri D, Morris LG, Shen R, Seshan V, Mo Q, Heguy A, Baylin SB, Ahuja N, Viale A, Massague J, Norton L, Vahdat LT, Moynahan ME, Chan TA. 2011. „Breast cancer methylomes establish an epigenomic foundation for metastasis.“ *Science Translational Medicine* 3 (75). doi:10.1126/scitranslmed.3001875.
59. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F. 2022. *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. 11 26 d. <https://gco.iarc.fr/today>.

60. Fiegl H, Millinger S, Mueller-Holzner E, Marth C, Ensinger C, Berger A, Klocker H, Goebel G, Widschwendter M. 2005. „Circulating Tumor-Specific DNA: A Marker for Monitoring Efficacy of Adjuvant Therapy in Cancer Patients.“ *Cancer Research* 65 (4): 1141-1145. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2438>.
61. Fontanil T, Rúa S, Llamazares M, Moncada-Pazos A, Quirós PM, García-Suárez O, Vega JA, Sasaki T, Mohamedi Y, Esteban MM, Obaya AJ, Cal S. 2014. „Interaction between the ADAMTS-12 metalloprotease and fibulin-2 induces tumor-suppressive effects in breast cancer cells.“ *Oncotarget* 5 (5): 1253-1264. doi:10.18632/oncotarget.1690.
62. Foulkes, WD. 2008. „Inherited susceptibility to common cancers.“ *The New England journal of medicine* 359 (20): 2143-2153. doi:10.1056/NEJMra0802968.
63. Fradet-Turcotte A, Sitz J, Grapton D, Orthwein A. 2016. „BRCA2 functions: from DNA repair to replication fork stabilization.“ *Endocrine-related Cancer* 23 (10): T1-T17. doi:10.1530/ERC-16-0297.
64. Gaudet MM, Gapstur SM, Sun J, Diver WR, Hannan LM, Thun. 2013. „Active smoking and breast cancer risk: original cohort data and.“ *Journal of the National Cancer Institute* 105: 515-525.
65. Geisler S, Lonning PE, Aas T., Johnsen H, Fluge O, Haugen DF, Lillehaug JR, Akslén LA, Borresen-Dale A-L. 2001. „Influence of TP53 gene alterations and c-erbB-2 expression on the response to treatment with doxorubicin in locally advanced breast cancer.“ *Cancer Research* 61 (6): 2505-2512.
66. Geoffroy MC, Esnault C, de Thé H. 2021. „Retinoids in hematology: a timely revival?“ *Blood* 137 (18): 2429-2437. <https://doi.org/10.1182/blood.2020010100>.
67. Ghalkhani E, Akbari MT, Izadi P, Mahmoodzadeh H, Kamali F. 2021. „Assessment of DAPK1 and CAVIN3 Gene Promoter Methylation in Breast Invasive Ductal Carcinoma and Metastasis.“ *Cell* 23 (4): 397-405. doi:10.22074/cellj.2021.7251.
68. Ghent WR, Eskin BA, Low DA, Hill LP. 1993. „Iodine replacement in fibrocystic disease of the breast.“ *Canadian Journal of Surgery* 36: 453-460.
69. Ghyselinck NB, Duester G. 2019. „Retinoic acid signaling pathways.“ *Development* 146 (13): dev167502. <https://doi.org/10.1242/dev.167502>.
70. Györffy B, Bottai G, Fleischer T, Munkácsy G, Budczies J, Paladini L, Børresen-Dale AL, Kristensen VN, Santarpia L. 2016. „Aberrant DNA methylation impacts gene expression and prognosis in breast cancer subtypes.“ *International Journal of Cancer* 138 (1): 87-97. doi:10.1002/ijc.29684.

71. Godet I, Gilkes DM. 2017. „BRCA1 and BRCA2 mutations and treatment strategies for breast cancer.“ *Integrative Cancer Science and Therapeutics* 4 (1).
72. Gonzalez-Angulo AM, Timms KM, Liu S, Chen H, Litton JK, Potter J, Lanchbury JS, Stenke-Hale K, Hennessy BT, Arun BK. 2011. „Incidence and outcome of BRCA mutations in unselected patients with triple receptor-negative breast cancer.“ *Clinical Cancer Research* 17 (5): 1082-1089. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2560>.
73. Gornstein EL, Sandefur S, Chung JH, Gay LM, Holmes O, Erlich RL, Soman S, Martin LK, Rose AV, Stephens PJ, Ross JS, Miller VA, Ali SM, Blau S. 2018. „BRCA2 Reversion Mutation Associated With Acquired Resistance to Olaparib in Estrogen Receptor-positive Breast Cancer Detected by Genomic Profiling of Tissue and Liquid Biopsy.“ *Clinical Breast Cancer* 18 (2): 184-188. doi:10.1016/j.clbc.2017.12.010.
74. Gozuacik D, Kimchi A. 2006. „DAPK protein family and cancer.“ *Autophagy* 2 (2): 74-79. doi:10.4161/auto.2.2.2459.
75. Grayson M. 2012. „Breast cancer.“ *Nature* 485: S49. <https://doi.org/10.1038/485S49a>.
76. Guray M, Sahin AA. 2006. „Benign Breast Diseases: Classification, Diagnosis, and Management.“ *The Oncologist* 11 (5): 435-449. doi:10.1634/theoncologist.11-5-435.
77. Hagrass HA, Pasha HF, Shaheen MA, Abdel Bary EH, Kassem R. 2014. „Methylation status and protein expression of RASSF1A in breast cancer patients.“ *Molecular Biology Reports* 41 (1): 57-65. doi:10.1007/s11033-013-2837-3.
78. Hainaut P, Pfeifer GP. 2016. „Somatic TP53 Mutations in the Era of Genome Sequencing.“ *Cold Spring Harb Perspect Med* 6 (11). doi:10.1101/cshperspect.a026179.
79. Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, King MC. 1990. „Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21.“ *Science* 250 (4988): 1684-1689. doi:10.1126/science.2270482.
80. Han W, Wang Y, Fan J, Wang C. 2018. „Is APC hypermethylation a diagnostic biomarker for bladder cancer? A meta-analysis.“ *OncoTargets and Therapy* 11: 8359-8369. doi:10.2147/OTT.S177601.
81. Hatchi E, Skourti-Stathaki K, Ventz S, Pinello L, Yen A, Kamieniarz-Gdula K, Dimitrov Stoil, Pathania S, McKinney KM, Eaton ML, Kellis M, Hill SJ, Parmigiani G, Proudfoot NJ, Livingston DM. 2015. „BRCA1 Recruitment to Transcriptional Pause Sites Is Required for R-Loop-Driven DNA Damage Repair.“ *Molecular Cell* 57 (4): 636-647. doi:10.1016/j.molcel.2015.01.011.

82. Hesson LB, Cooper WN, Latif F. 2007. „The role of RASSF1 methylation in cancer.“ *Disease markers* 23: 73-87.
83. Hollis RL, Churchman M, Gourley Ch. 2017. „Distinct implications of different BRCA mutations: efficacy of cytotoxic chemotherapy, PARP inhibition and clinical outcome in ovarian cancer.“ *Onco Targets and Therapy* 10: 2539-2551.
84. Holm K, Hegardt C, Staaf J, Vallon-Christersson J, Jönsson G, Olsson H, Borg A, Ringnér M. 2010. „Molecular subtypes of breast cancer are associated with characteristic DNA methylation patterns.“ *Breast Cancer Research* 12 (R36): R36. doi: 10.1186/bcr2590.
85. Holmila R, Husgafvel-Pursiainen K. 2006. „Analysis of TP53 gene mutations in human lung cancer: Comparison of capillary electrophoresis single strand conformation polymorphism assay with denaturing gradient gel electrophoresis and direct sequencing.“ *Cancer Detection and Prevention* 30 (1): 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.cdp.2005.10.004>.
86. Honrado E, Benitez J, Palacios J. 2004. „The Pathology of Hereditary Breast Cancer.“ *Hereditary Cancer in Clinical Practice* 2 (3): 131-138. doi:10.1186/1897-4287-2-3-131.
87. Huang B, Qu Z, Ong CW, Tsang YH, Xiao G, Shapiro D, Salto-Tellez M, Ito K, Ito Y, Chen LF. 2012. „RUNX3 acts as a tumor suppressor in breast cancer by targeting estrogen receptor α .“ *Oncogene* 31 (4): 527-534. doi:10.1038/onc.2011.252.
88. Huang Y, Nayak S, Jankowitz R, Davidson NE, Oesterreich S. 2011. „Epigenetics in breast cancer: what's new?“ *Breast Cancer Research* 13 (225).
89. Huszno J, Grzybowska E. 2018. „TP53 mutations and SNPs as prognostic and predictive factors in patients with breast cancer.“ *Oncology letters* 16: 34-40. doi:10.3892/ol.2018.8627.
90. Yan PS, Venkataramu C, Ibrahim A, Liu JC, Shen RZ, Diaz NM, Centeno B, Weber F, Leu YW, Shapiro CL, Eng C, Yeatman TJ, Huang TH. 2006. „Mapping Geographic Zones of Cancer Risk with Epigenetic Biomarkers in Normal Breast Tissue.“ *Human Cancer Biology* 12 (22): 6626-6636. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0467.
91. Yang X, Yan L, Davidson NE. 2001. „DNA methylation in breast cancer.“ *Endocrine-Related Cancer* 8 (2): 115-27. doi:10.1677/erc.0.0080115.
92. Ye L, Lin C, Wang X, Li Q, Li Y, Wang M, Zhao Z, Wu X, Shi D, Xiao Y, Ren L, Jian Y, Yang M, Ou R, Deng G, Ouyang Y, Chen X, Li J, Song L. 2019. „Epigenetic silencing of SALL2 confers tamoxifen resistance in breast cancer.“ *EMBO Molecular Medicine* 11 (12): e10638. doi:10.15252/emmm.201910638.

93. Yegnasubramanian S, Haffner MC, Zhang Y, Gurel B, Cornish TC, Wu Z, Irizarry RA, Morgan J, Hicks J, DeWeese TL, Isaacs WB, Bova GS, De Marzo AM, Nelson WG. 2008. „DNA hypomethylation arises later in prostate cancer progression than CpG island hypermethylation and contributes to metastatic tumor heterogeneity.“ *Cancer Research* 68 (21): 8954-67. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6088.
94. Iyengar NM, Arthur R, Manson JE, Chlebowski RT, Kroenke CH, Peterson L, Cheng TD, Feliciano EC, Lane D, Luo J, Nassir R, Pan K, Wassertheil-Smoller S, Kamensky V, Rohan TE, Dannenberg AJ. 2019. „Association of Body Fat and Risk of Breast Cancer in Postmenopausal Women With Normal Body Mass Index: A Secondary Analysis of a Randomized Clinical Trial and Observational Study.“ *JAMA Oncology* 5 (2): 155-163. doi:10.1001/jamaoncol.2018.5327.
95. Yin L, Duan JJ, Bian XW, Yu SC. 2020. „Triple-negative breast cancer molecular.“ *Breast Cancer Research* 22 (61). <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01296-5>.
96. You JS, Jones PA. 2012. „Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin?“ *Cancer Cell* 22 (1): 9-20. doi:10.1016/j.ccr.2012.06.008.
97. Yu J, Zayas J, Qin B, Wang L. 2019. „Targeting DNA methylation for treating triple-negative breast cancer.“ *Pharmacogenomics* 20 (16): 1151-1157. doi:10.2217/pgs-2019-0078.
98. Jadhav RR, Ye Z, Huang RL, Liu J, Hsu PY, Huang YW, Rangel LB, Lai HC, Roa JC, Kirma NB, Huang TH, Jin VX. 2015. „Genome-wide DNA methylation analysis reveals estrogen-mediated epigenetic repression of metallothionein-1 gene cluster in breast cancer.“ *Clinical Epigenetics* 7 (1).
99. Janavicius R. 2010. „Founder BRCA1/2 mutations in the Europe: implications for hereditary breast-ovarian cancer prevention and control.“ *EPMA Journal* 1: 397-412.
100. Jank P, Gehlhaar C, Bianca L, Caterina F, Andreas S, Karn T, Marmé F, Sinn HP, van Mackelenbergh M, Sinn B, Zahm DM, Ingold-Heppner B, Schem C, Stickeler E, Fasching PA, Nekljudova V, Taube ET, Heppner F, Müller V, Denkert C, Loibl S. 2020. „MGMT promoter methylation in triple negative breast cancer of the GeparSixto trial.“ *PLoS One* 15 (8): e0238021. doi:10.1371/journal.pone.0238021.
101. Jankowitz RC, Oesterreich S, Lee AV, Davidson NE. 2017. „New Strategies in Metastatic Hormone Receptor-Positive Breast Cancer: Searching for Biomarkers to Tailor Endocrine and Other Targeted Therapies.“ *Clinical Cancer research* 23 (5): 1126-1131. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-0591.

102. Jiang Y, Tong D, Lou G, Zhang Y, Geng J. 2008. „Expression of RUNX3 gene, methylation status and clinicopathological significance in breast cancer and breast cancer cell lines.“ *Pathobiology* 75 (4): 244-251. doi:10.1159/000132385.
103. Jin R, Bay BH, Chow VTK, Tan PH, Lin VCL. 2000. „Methallothionein 1E mRNA is highly expressed in oestrogen receptor-negative human invasive ductal breast cancer.“ *British Journal of Cancer* 83 (3): 319-323.
104. Jin Z, Tamura G, Tsuchiya T, Sakata K, Kashiwaba M, Osakabe M, Motoyama T. 2001. „Adenomatous polyposis coli (APC) gene promoter hypermethylation in primary breast cancers.“ *British Journal of Cancer* 85 (1): 69-73. doi:10.1054/bjoc.2001.1853.
105. Jones PA, Liang G. 2009. „Rethinking how DNA methylation patterns are maintained.“ *Nature Reviews Genetics* 10 (11): 805-811. doi:10.1038/nrg2651.
106. Jones PA, Rideout WM, Shen JC, Spruck CH, Tsai YC. 1992. „Methylation, mutation and cancer.“ *Bioessays* 14: 33-36.
107. Joshi H, Press MF. 2018. „Molecular oncology of breast cancer.“ 22 skyrius *The Breast. Comprehensive Management of Benign and Malignant Diseases*, 5th Edition, autorius K I Bland, V S Klimberg, E M Copeland, III ir W J Gradisha, 282-307.e5. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35955-9.00022-2>.
108. Jovanovic J, Ronneberg JA, Tost J, Kristensen V. 2010. „The epigenetics of breast cancer.“ *Molecular Oncology* 4 (3): 242-254. doi:10.1016/j.molonc.2010.04.002.
109. Juwle A, Saranath D. 2012. „BRCA1/BRCA2 gene mutations/SNPs and BRCA1 haplotypes in early-onset breast cancer patients of Indian ethnicity.“ *Medical oncology* 29 (5): 3272-3281. doi:10.1007/s12032-012-0294-9.
110. Karami S, Andreotti G, Liao LM, Pfeiffer RM, Weinstein SJ, Purdue MP, Hofmann JN, Albanes D, Mannisto S, Moore LE. 2015. „LINE1 methylation levels in pre-diagnostic leukocyte DNA and future renal cell carcinoma risk.“ *Epigenetics* 10 (4): 282-92. doi:10.1080/15592294.2015.
111. Karray-Chouayekh S, Trifa F, Khabir A, Boujelbane N, Sellami-Boudawara T, Daoud J, Frikha M, Jlidi R, Gargouri A, Mokdad-Gargouri R. 2010. „Aberrant methylation of RASSF1A is associated with poor survival in Tunisian breast cancer patients.“ *Journal of Cancer research and Clinical Oncology* 136 (2): 203-210. doi:0.1007/s00432-009-0649-6.
112. Kassem HS, Girolami F, Sanoudou D. 2012. „Molecular genetics made simple,.“ *GlobalCardiology Science and Practice* 6. <http://dx.doi.org/10.5339/gcsp.2012.6>.

113. Kasthuber ER, Lowe SW. 2017. „Putting p53 in Context.“ *Cell* 170 (6): 1062-1078. doi:10.1016/j.cell.2017.08.028.
114. Kessler M, Fotopoulou C, Meyer TF. 2013. „The Molecular Fingerprint of High Grade Serous Ovarian Cancer Reflects Its Fallopian Tube Origin.“ *International Journal of Molecular Sciences* 14 (4): 6571-6596. doi:10.3390/ijms14046571.
115. Kim Y, Je Y. 2014. „Vitamin D intake, blood 25(OH)D levels, and breast cancer risk or mortality: a meta-analysis.“ *British Journal of Cancer*. 110: 2772-2784.
116. Kim JY, Park K, Jung HH, Lee E, Cho EY, Lee KH, Bae SY, Lee SK, Kim SW, Lee JE, Nam SJ, Ahn JS, Im YH, Park YH. 2016. „Association between Mutation and Expression of TP53 as a Potential Prognostic Marker of Triple-Negative Breast Cancer.“ *Cancer Research and Treatment* 48 (4): 1338-1350. doi:10.4143/crt.2015.430.
117. Klajic J, Fleischer T, Dejeux E, Edvardsen H, Warnberg F, Bukholm I, Lønning PE, Solvang H, Børresen-Dale AL, Tost J, Kristensen VN. 2013. „Quantitative DNA methylation analyses reveal stage dependent DNA methylation and association to clinico-pathological factors in breast tumors.“ *BMC Cancer* 13 (456). doi:10.1186/1471-2407-13-456.
118. Kohli RM, Zhang Y. 2014. „TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation.“ *Nature* 502 (7472): 472-479. doi:10.1038/nature12750.
119. Kwon M, Lee SJ, Reddy S, Rybak Y, Adem A, Libutti SK. 2013. „Down-Regulation of Filamin A interacting protein 1-like Is Associated with Promoter Methylation and an Invasive Phenotype in Breast, Colon, Lung and Pancreatic Cancers.“ *PLoS One* 8 (12). doi:10.1371/journal.pone.0082620.
120. Kwon M, Rubio G, Nolan N, Auteri P, Volmar JA, Adem A, Javidian P, Zhou Z, Verzi MP, Pine SR, Libutti SK. 2021. „FILIP1L Loss Is a Driver of Aggressive Mucinous Colorectal Adenocarcinoma and Mediates Cytokinesis Defects through PFDN1.“ *Cancer Research* 81 (21): 5523-5539. doi:10.1158/0008-5472.CAN-21-0897.
121. Laitman Y, Simeonov M, Herskovitz L, Kushnir A, Shimon-Paluch S, Kaufman B, Zidan J, Friedman E. 2012. „Recurrent germline mutations in BRCA1 and BRCA2 genes in high risk families in Israel.“ *Epidemiology* 133: 1153-1157.
122. Lakhani SR. 1999. „The pathology of familial breast cancer: Morphological aspects.“ *Breast Cancer Research* 1 (1): 31-35. doi:10.1186/bcr10.
123. Lakshminarasimhan R, Liang G. 2016. The Role of DNA Methylation in Cancer. In: Jeltsch, A., Jurkowska, R. (eds) *DNA Methyltransferases*

- Role and Function. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. T. 945. Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-43624-1_7.
124. Langerød A, Zhao H, Borgan Ø, Nesland JM, Bukholm IR, Ikdahl T, Kåresen R, Børresen-Dale AL, Jeffrey SS. 2007. „TP53 mutation status and gene expression profiles are powerful prognostic markers of breast cancer.“ *Breast cancer Research* 9 (3): R30. doi:10.1186/bcr1675.
 125. Lazzari G, Buono G, Zannino B, Silvano G. 2021. „Breast Cancer Adjuvant Radiotherapy in BRCA1/2, TP53, ATM Genes Mutations: Are There Solved Issues?“ *Breast Cancer* 13: 299-310. doi:10.2147/BCTT.S306075.
 126. Lee JS. 2007. „GSTP1 promoter hypermethylation is an early event in breast carcinogenesis.“ *Virchows Archiv* 450: 637-642. <https://doi.org/10.1007/s00428-007-0421-8>.
 127. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, Pietenpol JA. 2011. „Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies.“ *The Journal of clinical investigation* 121 (7): 2750-67. doi:10.1172/JCI45014.
 128. Li Y, Melnikov AAM, Levenson V, Guerra E, Simeone P, Alberti S, Deng Y. 2015. „A seven-gene CpG-island methylation panel predicts breast cancer progression.“ *BMC Cancer* 15 (417).
 129. Li J, Huang Q, Zeng F, Li W, He Z, Chen W, Zhu W, Zhang B. 2014. „The prognostic value of global DNA hypomethylation in cancer: a meta-analysis.“ *PLOS One* 9 (9): e106290. doi:10.1371/journal.pone.0106290.
 130. Li JP, Zhang XM, Zhang Z, Zheng LH, Jindal S, Liu YJ. 2019. „Association of p53 expression with poor prognosis in patients with triple-negative breast invasive ductal carcinoma.“ *Medicine* 98 (18). doi:10.1097/MD.00000000000015449.
 131. Li X, Chen X, Wen L, Wang Y, Chen B, Xue Y, Guo L, Liao N. 2020. „Impact of TP53 mutations in breast cancer: Clinicopathological features and prognosis.“ *Thoracic Cancer* 11 (7): 1861-1868. doi:10.1111/1759-7714.13467.
 132. Lietuvos vėžio registro duomenys: Vėžys Lietuvoje 2017 [elektroninis išteklius]. Nacionalinis vėžio institutas, Vilnius, Lietuva, 2017. Prieiga per internetą: <https://www.nvi.lt/uploads/pdf/Vezio%20registas/V%20C4%97%C5%BEys%20Lietuvoje%202017.pdf> [Žiūrėta 2023-02-13].
 133. Liu H, Yan Z, Yin Q, Cao K, Wei Y, Rodriguez-Canales J, Ma D, Wu Y. 2018. „RUNX3 Epigenetic Inactivation Is Associated With Estrogen Receptor Positive Breast Cancer.“ *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 66 (10): 709-721. doi:10.1369/0022155418797315.

134. Liu Y, Nguyen N, Colditz GA. 2015. „Links between alcohol consumption.“ *Women’s Health* 11 (1): 65-77.
135. Liu S, Chen X, Chen R, Wang J, Zhu G, Jiang J, Wang H, Duan S, Huang J. 2017. „Diagnostic role of Wnt pathway gene promoter methylation in non small cell lung cancer.“ *Oncotarget* 8 (22): 36354-36367. doi:10.18632/oncotarget.16754.
136. Liu XP, Hou J, Chen C, Guan L, Hu HK, Li S. 2020. „A DNA Methylation-Based Panel for the Prognosis and Diagnosis of Patients With Breast Cancer and Its Mechanisms.“ *Frontiers in Molecular Biosciences* 7 (118). doi:10.3389/fmolb.2020.00118.
137. Lu D, Ma Y, Zhu A, Han Y. 2017. „An early biomarker and potential therapeutic target of RUNX3 hyper methylation in breast cancer, a system review and metaanalysis.“ *Oncotarget* 8 (13): 22166-22174.
138. Lu DG, Ma YM, Zhu AJ, Han YW. 2017. „An early biomarker and potential therapeutic target of RUNX 3 hypermethylation in breast cancer, a system review and meta-analysis.“ *Oncotarget* 8 (13): 22166-22174. doi:10.18632/oncotarget.13125.
139. Maleckaite R, Zalimas A, Bakavicius A, Jankevicius F, Jarmalaite S, Daniunaite K. 2019. „DNA methylation of metallothionein genes is associated with the clinical features of renal cell carcinoma“. *Oncology Reports* 41, 3535–3544.
140. Marzese DM, Hoon DS, Chong KK, Gago FE, Orozco JI, Tello OM, Vargas-Roig LM, Roqué M. 2012. „DNA methylation index and methylation profile of invasive ductal breast tumors.“ *The Journal of Molecular Diagnostics* 14 (6): 613-622. doi:10.1016/j.jmoldx.2012.07.001.
141. Matta BP, Gomes R, Mattos D, Olicio R, Nascimento CM, Ferreira GM, Brant AC, Boroni M, Furtado C, Lima V, Moreira MAM, Dos Santos ACE. 2022. „Familial history and prevalence of BRCA1, BRCA2 and TP53 pathogenic variants in HBOC Brazilian patients from a public healthcare service.“ *Scientific Reports* 12 (1): 18629. doi:10.1038/s41598-022-23012-3.
142. Matthaios D, Balgouranidou I, Karayiannakis A, Bolanaki H, Xenidis N, Amarantidis K, Chelis L, Romanidis K, Chatzaki A, Lianidou E, Trypsianis G, Kakolyris S. 2016. „Methylation status of the APC and RASSF1A promoter in cell-free circulating DNA and its prognostic role in patients with colorectal cancer.“ *Oncology Letters* 12 (1): 748-756. doi:10.3892/ol.2016.4649.
143. Matthews HK, Bertoli C, de Bruin RAM. 2022. „Cell cycle control in cancer.“ *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 23: 74-88. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00404-3>.

144. Maxmen A. 2012. „The hard facts.“ *Nature* 485: S50–S51. <https://doi.org/10.1038/485S50a>.
145. Miyake T, Nakayama T, Kagara N, Yamamoto N, Nakamura Y, Otani Y, Uji K, Naoi Y, Shimoda M, Maruyama N, Shimomura A, Shimazu K, Kim SJ, Noguchi S. 2013. „Association of GSTP1 methylation with aggressive phenotype in ER-positive breast cancer.“ *Anticancer Research* 33 (12): 5617-5623.
146. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W et al. 1994. „A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1.“ *Science* 266 (5182): 66-71. doi:10.1126/science.7545954.
147. Mizuno H, Spike BT, Wahl GM, Levine AJ. 2010. „Inactivation of p53 in breast cancers correlates with stem cell transcriptional signatures.“ *PNAS* 107 (52): 22745-22750. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017001108>.
148. Moelans CB, Vlug EJ, Ercan C, Bult P, Buerger H, Cserni G, van Diest PJ, Derksen PW. 2015. „Methylation biomarkers for pleomorphic lobular breast cancer - a short report.“ *Cell Oncology* 38 (5): 397-405.
149. Moller P, Evans DG, Reis MM, Gregory H, Anderson E, Maehle L, Lalloo F, Howell A, Apold J, Clark N. 2007. „Surveillance for familial breast cancer: Differences in outcome according to BRCA mutation status.“ *International journal of cancer* 121 (5): 1017-1020. <https://doi.org/10.1002/ijc.22789>.
150. Moncada-Pazos A, Obaya AJ, Fraga MF, Vilorio CG, Capellá G, Gausachs M, Esteller M, López-Otín C, Cal S. 2009. „The ADAMTS12 metalloprotease gene is epigenetically silenced in tumor cells and transcriptionally activated in the stroma during progression of colon cancer.“ *Journal of Cell Science* 122 (Pt16): 2906-2913. doi:10.1242/jcs.050468.
151. Monti P, Menichini P, Speciale A, Cutrona G, Fais F, Taiana E, Neri A, Bomben R, Gentile M, Gattei V, Ferrarini M, Morabito F, Fronza G. 2020. „Heterogeneity of TP53 Mutations and P53 Protein Residual Function in Cancer: Does It Matter?“ *Frontiers in Oncology* 10 (593383). doi:10.3389/fonc.2020.593383.
152. Mulero-Navarro S, Esteller M. 2008. „Epigenetic biomarkers for human cancer: The time is now.“ *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 68 (1): 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2008.03.001>.
153. Nascimento RG, Otoni KM. 2020. „Histological and molecular classification of breast cancer: what do we know?“ *Mastology* 30: e20200024. doi:10.29289/25945394202020200024.
154. National Library of Medicine – NCBI [elektroninis išteklius]. Rokvilis, JAV, 2022. Prieiga per internetą: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1029> [Žiūrėta 2022-12-22].

155. NVI duomenys: Apie krūties vėžį, 2014 [elektroninis išteklius]. Nacionalinis vėžio institutas, Vilnius, Lietuva, 2014. Prieiga per internetą: <https://www.nvi.lt/uploads/pdf/leidiniai%20pacientams/Krutiesvezys.pdf> [Žiūrėta 2021-10-16].
156. Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. 2010. „TP53 mutations in human cancers: origins, consequences and clinical use.“ *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (1): a001008.
157. Olivier M, Taniere P. 2011. „Somatic mutations in cancer prognosis and prediction: lessons from TP53 and EGFR genes.“ *Current Opinion in Oncology* 23 (1): 88-92. doi:10.1097/CCO.0b013e3283412dfa.
158. Otto T, Sicinski P. 2017. „Cell cycle proteins as promising.“ *Nature reviews cancer* 17: 93-115. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.138>.
159. Palomer S, Diaz-Lagares Á, Viñas G, Setien F, Ferreira HJ, Oliveras G, Crujeiras AB, Hernández A, Lum DH, Welm AL, Esteller M, Puig T. 2019. „Epigenetic silencing of TGFBI confers resistance to trastuzumab in human breast cancer.“ *Breast Cancer Research* 21 (1): 79. doi:10.1186/s13058-019-1160-x.
160. Paluszczak J, Baer-Dubowska W. 2014. „DNA Methylation as a Target of Cancer Chemoprevention by Dietary Polyphenols.“ 105 skyrius *Polyphenols in Human Health and Disease*, autorius Preedy VR, Zibadi S Watson RR. Elsevier Inc. Kreiptasi 2022 m. 12 29 d. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398456-2.00105-5>.
161. Pan Y, Yuan Y, Liu G, Wei Y. 2017. „P53 and Ki-67 as prognostic markers in triple-negative breast cancer patients.“ *PLoS One* 12 (2): e0172324. doi:10.1371/journal.pone.0172324.
162. Park YL, Park SY, Lee SH, Kim RB, Kim JK, Rew SY, Myung DS, Cho SB, Lee WS, Kim HS, Joo YE. 2016. „Filamin A interacting protein 1-like expression inhibits progression in colorectal cancer.“ *Oncotarget* 7 (44): 72229-72241. doi:10.18632/oncotarget.12664.
163. Pastor WA, Aravind L, Rao A. 2013. „TETonic shift: biological roles of TET proteins in DNA demethylation and transcription.“ *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14 (6): 341-356. doi:10.1038/nrm3589.
164. Penkert J, Schmidt G, Hofmann W, Schubert S, Schieck M, Auber B, Ripperger T, Hackmann K, Sturm M, Prokisch H, Hille-Betz U, Mark D, Illig T, Schlegelberger B, Steinemann D. 2018. „Breast cancer patients suggestive of Li-Fraumeni syndrome: mutational spectrum, candidate genes, and unexplained heredity.“ *Breast Cancer Research* 20 (87). doi:10.1186/s13058-018-1011-1.
165. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale

- AL, Brown PO, Botstein D. 2000. „Molecular portraits of human breast tumours.“ *Nature* 406: 747-752.
166. Petitjean A, Achatz MI, Borresen-Dale AL, Hainaut P, Olivier M. 2007. „TP53 mutations in human cancers: Functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes.“ *Oncogene* 26: 2157-2165.
167. Petrelli F, Viale G, Cabiddu M, Barni S. 2015. „Prognostic value of different cut-off levels of Ki-67 in breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 64,196 patients.“ *Breast Cancer Research and Treatment* 153 (3): 477-491. doi:10.1007/s10549-015-3559-0.
168. Phillips KA. 2000. „Immunophenotypic and pathologic differences between BRCA1 and BRCA2 hereditary breast cancers.“ *Journal of Clinical Oncology* 18 (21 Suppl): 107S-112S.
169. Pineda B, Diaz-Lagares A, Pérez-Fidalgo JA, Burgués O, González-Barrallo I, Crujeiras AB, Sandoval J, Esteller M, Lluch A, Eroles P. 2019. „A two-gene epigenetic signature for the prediction of response to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer patients.“ *Clinical Epigenetics* 11 (33). <https://doi.org/10.1186/s13148-019-0626-0>.
170. Pitollì C, Wang Y, Candi E, Shi Y, Melino G, Amelio I. 2019. „p53-Mediated Tumor Suppression: DNA-Damage Response and Alternative Mechanisms.“ *Cancers (Basel)* 11 (12): 1983. doi:10.3390/cancers11121983.
171. Pizot C, Boniol M, Mullie P, Koechlin A, Boniol M, Boyle P, Autier P. 2016. „Physical activity, hormone replacement therapy and breast cancer risk: A meta-analysis of prospective studies.“ *European Journal of Cancer* 52: 138-154. doi:10.1016/j.ejca.2015.10.063.
172. Poggio F, Bruzzone M, Ceppi M, Conte B, Martel S, Maurer C, Tagliamento M, Viglietti G, Del Mastro L, de Azambuja E, Lambertini M. 2018. „Single-agent PARP inhibitors for the treatment of patients with BRCA-mutated HER2-negative metastatic breast cancer: a systematic review and meta-analysis.“ *ESMO open* 3.
173. Pollett A, Bedard YC, Li SQ, Rohan T, Kandel R. 2000. „Correlation of p53 mutations in ThinPrep-processed fine needle breast aspirates with surgically resected breast cancers.“ *Modern Pathology* 13: 1173-1179. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3880216>.
174. Ponnusamy L, Mahalingaiah PKS, Chang YW, Singh KP. 2018. „Reversal of epigenetic aberrations associated with the acquisition of doxorubicin resistance restores drug sensitivity in breast cancer cells.“ *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 123: 56-69. doi:10.1016/j.ejps.2018.07.028.
175. Pourteimoor V, Mohammadi- Yeganeh S, Paryan M. 2016. „Breast cancer classification and prognostication through diverse systems along with recent emerging findings in this respect; the dawn of new

- perspectives in the clinical applications.“ *Tumour Biology* 37 (11): 14479-14499.
176. Powell B, Soong R, Lacopetta B, Seshadri R, Smith DR. 2000. „Prognostic significance of mutations to different structural and functional regions of the p53 gene in breast cancer.“ *Clinical Cancer Research* 6 (2): 443-451.
 177. Powell E, Shao J, Yuan Y, Chen HC, Cai S, Echeverria GV, Mistry N, Decker KF, Schlosberg C, Do KA, Edwards JR, Liang H, Piwnica-Worms D, Piwnica-Worms H. 2016. „p53 deficiency linked to B cell translocation gene 2 (BTG2) loss enhances metastatic potential by promoting tumor growth in primary and metastatic sites in patient-derived xenograft (PDX) models of triple-negative breast cancer.“ *Breast Cancer Research* 18 (1). doi:10.1186/s13058-016-0673-9.
 178. Pradhan MP, Desai A, Palakal MJ. 2013. „Systems biology approach to stage-wise characterization of epigenetic genes in lung adenocarcinoma.“ *BMC Systems Biology* 7: 141. doi:10.1186/1752-0509-7-141.
 179. Ramos EA, Camargo AA, Braun K, Slowik R, Cavalli IJ, Ribeiro EM, Pedrosa Fde O, de Souza EM, Costa FF, Klassen G. 2010. „Simultaneous CXCL12 and ESR1 CpG island hypermethylation correlates with poor prognosis in sporadic breast cancer.“ *BMC Cancer* 10: 23. doi:10.1186/1471-2407-10-23.
 180. Rasmussen KD, Helin K. 2016. „Role of TET enzymes in DNA methylation, development, and cancer.“ *Genes & Development* 30 (7): 733-750. doi:10.1101/gad.276568.115.
 181. Ravichandran M, Rafalski D, Davies CI, Ortega-Recalde O, Nan X, Glanfield CR, Kotter A, Misztal K, Wang AH, Wojciechowski M, Rażew M, Mayyas IM, Kardailsky O, Schwartz U, Zembrzycki K, Morison IM, Helm M, Weichenhan D, Jurkowska RZ, Krueger F, Plass C, Za. 2022. „Pronounced sequence specificity of the TET enzyme catalytic domain guides its cellular function.“ *Science Advances* 8 (36): eabm2427. doi:10.1126/sciadv.abm2427.
 182. Rebbeck TR, Friebel TM, Friedman E, et al. 2018. „Mutational spectrum in a worldwide study of 29.700 families with BRCA1 or BRCA2 mutations.“ *Human mutation* 1 (28).
 183. Rebbeck TR, Friebel TM, Friedman E, Hamann U, Huo D, Kwong A, Olah E, Olopade OI, Solano AR, Teo SH, Thomassen M, Weitzel JN, Chan TL, Couch FJ, Goldgar DE, Kruse TA, Palmero EI, Park SK, Torres D, van Rensburg EJ, McGuffog L, Parsons MT, Leslie G. 2018. „Mutational spectrum in a worldwide study of 29.700 families with BRCA1 or BRCA2 mutations.“ *Human mutation* 1 (28): 593-620. doi:10.1002/humu.23406.

184. Rennert G, Bisland-Naggan S, Barnett-Griness O, Bar-Joseph N, Zhang S, Rennert HS, Narod SA. 2007. „Clinical outcomes of breast cancer in carriers of BRCA1 and BRCA2 mutations.“ *New England Journal of Medicine* 357 (2): 115-123. doi:10.1056/NEJMoa070608.
185. Richiardi L, Fiano V, Vizzini L, De Marco L, Delsedime L, Akre O, Tos AG, Merletti F. 2009. „Promoter methylation in APC, RUNX3, and GSTP1 and mortality in prostate cancer patients.“ *Journal of Clinical Oncology* 27 (19): 3161-3168. doi:10.1200/JCO.2008.18.2485.
186. Ryu HH, Jung S, Jung TY, Moon KS, Kim IY, Jeong YI, Jin SG, Pei J, Wen M, Jang WY. 2012. „Role of metallothionein 1E in the migration and invasion of human glioma cell lines.“ *International Journal of Oncology* 41 (4): 1305-1313. <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1570>.
187. Rivandi M, Khorrami MS, Fiuji H, Shahidsales S, Hasanzadeh M, Jazayeri MH, Hassanian SM, Ferns GA, Saghafi N, Avan A. 2018. „The 9p21 locus: A potential therapeutic target.“ *Journal of Cellular Physiology* 233 (7): 5170-5179. doi: 10.1002/jcp.26332.
188. Rosen EM, Fan S, Pestell RG, Goldberg ID. 2003. „BRCA1 gene in breast cancer.“ *Journal of cellular physiology* 196 (1): 19-41. doi:10.1002/jcp.10257. PMID: 12767038.
189. Sadeghi F, Asgari M, Matloubi M, Ranjbar M, Yousefi NK, Azari T, Zaki-Dizaji M. 2020. „Molecular contribution of BRCA1 and BRCA2 to genome instability in breast cancer patients: review of radiosensitivity assays.“ *Biological Procedures Online* 22 (23). <https://doi.org/10.1186/s12575-020-00133-5>.
190. Sadzevičienė I, Liaugaudienė O, Besusparis J, Asadauskienė J, Kulikienė I, Brasiūnienė B, Sabaliauskaitė R, Jarmalaitė S. 2020. „Recurrent Germline BRCA2 Gene Mutation in Lithuanian Family“. *Medicina (Kaunas)* 56(3):119. doi: 10.3390/medicina56030119.
191. Sadzeviciene I, Snipaitiene K, Scesnaite-Jerdiakova A, Daniunaite K, Sabaliauskaite R, Laurinaviciene A, Drobniene M, Ostapenko V, Jarmalaite S. 2022. „Analysis of Intrinsic Breast Cancer Subtypes: The Clinical Utility of Epigenetic Biomarkers and TP53 Mutation Status in Triple-Negative Cases“. *International Journal of Molecular Science* 23(23):15429. doi: 10.3390/ijms232315429.
192. Saelee P, Chaiwerawattana A, Ogawa K, Cho YM, Tiwawech D, Suktangman V. 2014. „Clinicopathological significance of BRCA1 promoter hypermethylation in Thai breast cancer patients.“ *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 15 (24): 10585-10589. doi:10.7314/apjcp.2014.15.24.10585.
193. Saelee P, Pongtheerat T. 2020. „APC Promoter Hypermethylation as a Prognostic Marker in Breast Cancer Patients.“ *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 21 (12): 3627-3632. doi:10.31557/APJCP.2020.21.12.3627.

194. Salas LA, Lundgren SN, Browne EP, Punska EC, Anderton DL, Karagas MR, Arcaro KF, Christensen BC. 2020. „Prediagnostic breast milk DNA methylation alterations in women who develop breast cancer.“ *Human Molecular Genetics* 29 (4): 662-673. doi:10.1093/hmg/ddz301.
195. Sasaki J, Geletzke A, Kass RB, Klimberg VS, Copeland EM, Bland KI. 2018. „Etiology and Management of Benign Breast Disease.“ 5 skyrius *The Breast: Comprehensive Management of Benign and Malignant Diseases*, 5th Edition, autorius K I Bland, V S Klimberg, III, E M Copeland ir W J Gradisha, 79-92.e5. Elsevier. doi:10.1016/b978-0-323-35955-9.00005-2.
196. Saxena T, Lee E, Henderson KD, Clarke CA, West D, Marshall SF, Deapen D, Bernstein L, Ursin G. 2010. „Menopausal Hormone Therapy and Subsequent Risk of Specific Invasive Breast Cancer Subtypes in the California Teachers Study.“ *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 19 (9): 2366-2378. doi:10.1158/1055-9965.EPI-10-0162.
197. Schnekenburger M, Karius T, Diederich M. 2014. „Regulation of epigenetic traits of the glutathione S-transferase P1 gene: from detoxification toward cancer prevention and diagnosis.“ *Frontiers in Pharmacology* 16 (5). doi:10.3389/fphar.2014.00170.
198. Senst N, Llacuchaqui M, Lubinski J, Lynch H, Armel S, Neuhausen S, Ghadirian P, Sun P, Narod SA. 2013. „Hereditary Breast Cancer Study Group. Parental origin of mutation and the risk of breast cancer in a prospective study of women with a BRCA1 or BRCA2 mutation.“ *Clinical Genetics* 84 (1): 43-46. doi:10.1111/cge.12037.
199. Serenaitė I, Daniūnaitė K, Jankevičius F, Laurinavičius A, Petroska D, Lazutka JR, Jarmalaite S. 2015. „Heterogeneity of DNA methylation in multifocal prostate cancer“. *Virchows Archiv*.466(1):53-9. doi: 10.1007/s00428-014-1678-3.
200. Shahbandi A, Nguyen HD, Jackson JG. 2020. „TP53 Mutations and Outcomes in Breast Cancer: Reading beyond the Headlines.“ *Trends in Cancer* 6 (2). <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.01.007>.
201. Shahid T, Soroka J, Kong E, Malivert L, McIlwraith MJ, Pape T, West SC, Zhang X. 2014. „Structure and mechanism of action of the BRCA2 breast cancer tumor suppressor.“ *Nature structural & molecular biology* 21 (11): 962-968.
202. Shan M, Zhang L, Liu Y, Gao C, Kang W, Yang W, He Y, Zhang G. 2019. „DNA Methylation Profiles and Their Diagnostic Utility in BC.“ *Disease Markers*.
203. Sharma G, Mirza S, Yang YH, Parshad R, Hazrah P, Datta Gupta S, Ralhan R. 2009. „Prognostic relevance of promoter hypermethylation of

- multiple genes in breast cancer patients.“ *Cellular Oncology* 31 (6): 487-500. doi:10.3233/CLO-2009-0507.
204. Sharma G, Mirza S, Parshad R, Srivastava A, Gupta SD, Pandya P, Ralhan R. 2010. „Clinical significance of promoter hypermethylation of DNA repair genes in tumor and serum DNA in invasive ductal breast carcinoma patients.“ *Life Sciences* 87 (3-4): 83-91. doi:10.1016/j.lfs.2010.05.001.
 205. Sharma S, De Carvalho DD, Jeong S, Jones PA, Liang G. 2011. „Nucleosomes Containing Methylated DNA Stabilize DNA Methyltransferases 3A/3B and Ensure Faithful Epigenetic Inheritance.“ *PLOS Genetics* 7 (2): e1001286. doi:10.1371/journal.pgen.1001286 .
 206. Sharma S, Salehi F, Scheithauer BW, Rotondo F, Syro LV, Kovacs K. 2009. „Role of MGMT in tumor development, progression, diagnosis, treatment and prognosis.“ *Anticancer Research* 29 (10): 3759-3768.
 207. Sher G, Salman NA, Khan AQ, Prabhu KS, Raza A, Kulinski M, Dermime S, Haris M, Junejo K, Uddin S. 2022. „Epigenetic and breast cancer therapy: Promising diagnostic and therapeutic applications.“ *Seminars in Cancer Biology* 83: 152-165. doi:10.1016/j.semcancer.2020.08.009.
 208. Shinozaki M, Hoon DS, Giuliano AE, Hansen NM, Wang HJ, Turner R, Taback B. 2005. „Distinct hypermethylation profile of primary breast cancer is associated with sentinel lymph node metastasis.“ *Clinical Cancer Research* 11 (6): 2156-2162. doi:0.1158/1078-0432.CCR-04-1810.
 209. Silwal-Pandit L, Langerod A, Borresen-Dale A-L. 2017. „TP53 Mutations in Breast and Ovarian Cancer.“ *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 7 (1): a026252. doi:10.1101/cshperspect.a026252.
 210. Sisti JS, Bernstein JL, Lynch CF, Reiner AS, Mellemkjaer L, Brooks JD, Knight JA, Bernstein L, Malone KE, Woods M, Liang X, John EM, WECARE Study Collaborative Group. 2015. „Reproductive factors, tumor estrogen receptor status and contralateral breast cancer risk: results from the WECARE study.“ *Springerplus* 4 (825). <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1642-y>.
 211. Sisti JS, Collins LC, Beck AH, Tamimi RM, Rosner BA, Eliassen AH. 2016. „Reproductive risk factors in relation to molecular subtypes of breast cancer: results from the nurses’ health studies.“ *International Journal of Cancer* 138 (10): 2346-2356. <https://doi.org/10.1002/ijc.29968>.
 212. Soejima H, Zhao W, Mukai T. 2005. „Epigenetic silencing of the MGMT gene in cancer.“ *Biochemistry and Cell Biology* 83 (4): 429-437. doi:10.1139/o05-140.
 213. Soliman NA, Yussif SM. 2016. „Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer molecular subtype.“ *Cancer Biology & Medicine* 13 (4): 496-504. doi:10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0066.

214. Song B, Wang L, Zhang Y, Li N, Dai H, Xu H, Cai H, and Yan J. 2019. „Combined Detection of HER2, Ki67, and GSTP1 Genes on the Diagnosis and Prognosis of Breast Cancer.“ *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* 34 (2): 85-90. <http://doi.org/10.1089/cbr.2018.2570>.
215. Song X, Li B, Zhou E, Wu F. 2016. „The clinicopathological significance of RUNX3 hypermethylation and mRNA expression in human breast cancer, a meta-analysis.“ *OncoTargets and Therapy* 9: 5339-5347. <https://doi.org/10.2147/OTT.S77828>.
216. Soria JC, Rodriguez M, Liu DD, Lee JJ, Hong WK, Mao L. 2002. „Aberrant promoter methylation of multiple genes in bronchial brush samples from former cigarette smokers.“ *Cancer Research* 62 (2): 351-355.
217. Soussi T. 2007. „p53 alterations in human cancer: more questions than answers.“ *Oncogene* 26: 2145-2156.
218. Spectrum Health Lakeland [elektroninis išteklius].Niles, JAV, 2022. Prieiga per internetą: <https://www.spectrumhealthlakeland.org/> [Žiūrėta 2023-01-18].
219. Spitzwieser M, Holzweber E, Pfeiler G, Hacker S, Cichna-Markl M. 2015. „Applicability of HIN-1, MGMT and RASSF1A promoter methylation as biomarkers for detecting field cancerization in breast cancer.“ *Breast Cancer Research* 17 (1): 125. doi:10.1186/s13058-015-0637-5.
220. Sporikova Z, Koudelakova V, Trojanec R, Hajduch M. 2018. „Genetic Markers in Triple-Negative Breast Cancer.“ *Clinical Breast Cancer* 18 (5): e841-50. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2018.07.023>.
221. Stelzer G, Rosen R, Plaschkes I, Zimmerman S, Twik M, Fishilevich S, Iny Stein T, Nudel R, Lieder I, Mazor Y, Kaplan S, Dahary, D, Warshawsky D, Guan - Golan Y, Kohn A, Rappaport N, Safran M, and Lancet D. 2016. „The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analysis.“ *Current Protocols in Bioinformatics* 54 (1): 1.30.1-1.30.33. <https://doi.org/10.1002/cpbi.5>.
222. Stieber P, Nagel D, Blankenburg I, Heinemann V, Untch M, Bauerfeind I, Di Gioia D. 2015. „Diagnostic efficacy of CA 15-3 and CEA in the early detection of metastatic breast cancer-A retrospective analysis of kinetics on 743 breast cancer patients.“ *Clinica Chimica Acta* 448: 228-231. doi:10.1016/j.cca.2015.06.022.
223. Stirzaker C, Zotenko E, Song JZ, Qu W, Nair SS, Locke WJ, Stone A, Armstrong NJ, Robinson MD, Dobrovic A, Avery-Kiejda KA, Peters KM, French JD, Stein S, Korbie DJ, Trau M, Forbes JF, Scott RJ, Brown MA, Francis GD, Clark SJ. 2015. „Methylome sequencing in triple-negative breast.“ *Nature Communications* 6 (5899). doi:10.1038/ncomms6899.

224. Stucci LS, Internò V, Tucci M, Perrone M, Mannavola F, Palmirota R, Porta C. 2021. „The ATM Gene in Breast Cancer: Its Relevance in Clinical Practice.“ *Genes* 12 (5): 727. doi:10.3390/genes12050727.
225. Subramaniam MM, Chan JY, Soong R, Ito K, Ito Y, Yeoh KG, Salto-Tellez M, Putti TC. 2009. „RUNX3 inactivation by frequent promoter hypermethylation and protein mislocalization constitute an early event in breast cancer progression.“ *Breast Cancer Research and Treatment* 113: 113-121.
226. Suijkerbuijk KPM, van Diest PJ, van der Wall E. 2011. „Improving early breast cancer detection: focus on methylation.“ *Annals of Oncology* 22 (1): 24-29. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq305>.
227. Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, Xu F, Lu HJ, Zhu ZY, Shi W, Jiang J, Yao PP, Zhu HP. 2017. „Risk Factors and Preventions of Breast Cancer.“ *International Journal of Biological Sciences* 13 (11): 1387-1397. doi:10.7150/ijbs.21635.
228. Sunami E, Shinozaki M, Sim MS, Nguyen SL, Vu AT, Giuliano AE, Hoon DS. 2008. „Estrogen receptor and HER2/neu status affect epigenetic differences of tumor-related genes in primary breast tumors.“ *Breast Cancer Research* 10 (R46). doi:10.1186/bcr2098.
229. Tai SK, Tan OJ, Chow VT, Jin R, Jones JL, Tan PH, Jayasurya A, Bay BH. 2003. „Differential Expression of Metallothionein 1 and 2 Isoforms in Breast Cancer Lines with Different Invasive Potential.“ *American Journal of Pathology* 163 (5): 2009-2019.
230. Tang Q, Cheng J, Cao X, Surowy H, Burwinkel B. 2016. „Blood-based DNA methylation as biomarker for breast cancer: a systematic review.“ *Clinical Epigenetics* 8: 115. doi:10.1186/s13148-016-0282-6.
231. Temian DC, Pop LA, Irimie AI, Berindan-Neagoe I. 2018. „The Epigenetics of Triple-Negative and Basal-Like Breast Cancer: Current Knowledge.“ *Journal of Breast Cancer* 21 (3): 233-243. <https://doi.org/10.4048/jbc.2018.21.e41>.
232. Terada K, Okochi-Takada E, Akashi-Tanaka S, Miyamoto K, Taniyama K, Tsuda H, Asada K, Kaminishi M, Ushijima T. 2009. „Association between frequent CpG island methylation and HER2 amplification in human breast cancers.“ *Carcinogenesis* 30 (3): 466-471. doi:10.1093/carcin/bgp021.
233. The Catalogue of Somatic Mutations in Cancer – COSMIC [duomenų bazė internete], 2004. Prieiga per internetą: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic> [Žiūrėta 2021-02-04].
234. The Web site of the National Cancer Institute [elektroninis išteklius]. Winslow T., Rokvilis, JAV 2014. Prieiga per internetą: www.cancer.gov [Žiūrėta 2023-01-18].

235. Titus AJ, Way GP, Johnson KC, Christensen BC. 2017. „Deconvolution of DNA methylation identifies differentially methylated gene regions on 1p36 across breast cancer subtypes.“ *Scientific Reports* 7 (1): 11594. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10199-z>.
236. Tommasi S, Karm DL, Wu X, Yen Y, Pfeifer GP. 2009. „Methylation of homeobox genes is a frequent and early epigenetic event in breast cancer.“ *Breast Cancer Research* 11 (R14). <https://doi.org/10.1186/bcr2233>.
237. Tserga A, Michalopoulos NV, Levidou G, Korkolopoulou P, Zografos G, Patsouris E, Saetta AA. 2011. „Association of aberrant DNA methylation with clinicopathological features in breast cancer.“ *Oncology reports* 27: 1630-1638.
238. Tsuboi K, Nagatomo T, Gohno T, Higuchi T, Sasaki S, Fujiki N, Kurosumi M, Takei H, Yamaguchi Y, Niwa T, Hayashi SI. 2017. „Single CpG site methylation controls estrogen receptor gene transcription and correlates with hormone therapy resistance.“ *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 171: 209-217. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.04.001>.
239. Tsuchiya T, Tamura G, Sato K, Endoh Y, Sakata K, Jin Z, Motoyama T, Usuba O, Kimura W, Nishizuka S, Wilson KT, James SP, Yin J, Fleisher AS, Zou T, Silverberg SG, Kong D, Meltzer SJ. 2000. „Distinct methylation patterns of two APC gene promoters in normal and cancerous gastric epithelia.“ *Oncogene* 19 (32): 3642-3646. doi:10.1038/sj.onc.1203704.
240. Turner NC, Reis-Filho JS. 2006. „Basal-like breast cancer and the BRCA1 phenotype.“ *Oncogene* 25 (43): 5846-5853. doi:10.1038/sj.onc.1209876.
241. UICC – The Union for International Cancer Control [elektroninis išteklius], 2022. Prieiga per internetą: <https://www.uicc.org/resources/tnm> [Žiūrėta 2022-12-18].
242. Venkitaraman AR. 2002. „Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2.“ *Cell* 108 (2): 171-182. doi:10.1016/s0092-8674(02)00615-3.
243. Veronesi A, de Giacomi C, Magri MD, Lombardi D, Zanetti M, Scuderi C, Dolcetti R, Viel A, Crivellari D, Bidoli E. 2005. „Familial breast cancer: characteristics and outcome of BRCA 1–2 positive and negative cases.“ *BMC cancer* 5 (70). doi:10.1186/1471-2407-5-70.
244. Wang F, Fang Q, Ge Z, Yu N, Xu S, Fan X. 2012. „Common BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer families:a meta-analysis from systematic review.“ *Molecular Biology Reports* 39: 2109-2118.
245. Wang L, Tang L, Xie R, Nie W, Chen L, Guan X. 2012. „p16 promoter hypermethylation is associated with increased breast cancer risk.“ *Molecular Medicine Reports* 6 (4): 904-908. doi:10.3892/mmr.2012.1001.

246. Weinberg RA. 2014. *The Biology of Cancer*. second. Garland Science, Taylor and Francis Group, LLC.
247. Welch DR, Hurst DR. 2019. „Defining the Hallmarks of Metastasis.“ *Cancer Research* 79 (12): 3011-3027. doi:10.1158/0008-5472.
248. White ND. 2018. „Hormonal Contraception and Breast Cancer Risk.“ *American Journal of Lifestyle Medicine* 12 (3): 224-226. doi:10.1177/1559827618754833.
249. Willis NA, Frock RL, Menghi F, Duffey EE, Panday A, Camacho V, Hasty EP, Liu ET, Alt FW, Scully R. 2017. „Mechanism of tandem duplication formation in BRCA1-mutant cells.“ *Nature* 551 (7682): 590-595. doi:10.1038/nature24477.
250. Wolff EM, Byun HM, Han HF, Sharma S, Nichols PW, Siegmund KD, Yang AS, Jones PA, Liang G. 2010. „Hypomethylation of a LINE-1 promoter activates an alternate transcript of the MET oncogene in bladders with cancer.“ *PLOS Genetics* 6 (4): e1000917. doi:10.1371/journal.pgen.1000917.
251. Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, Nguyen K, Seal S, Tran T, Averill D. 1994. „Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13.“ *Science* 265 (5181): 2088-2090. doi:10.1126/science.8091231.
252. Zardavas D, Irrthum A, Swanton Ch, Piccart M. 2015. „Clinical management of breast cancer heterogeneity.“ *Nature reviews Clinical Oncology* 12: 381-394.
253. Zhou W, Muggerud AA, Vu P, Due EU, Sørli T, Børresen-Dale AL, Wärnberg F, Langerød A. 2009. „Full sequencing of TP53 identifies identical mutations within in situ and invasive components in breast cancer suggesting clonal evolution.“ *Molecular Oncology* 3 (3): 214-219.
254. Zhu J, Sammons MA, Donahue G, Dou Z, Vedadi M, Getlik M, Barsyte-Lovejoy D, Al-awar R, Katona BW, Shilatifard A, Huang J, Hua X, Arrowsmith CH, Berger SL. 2015. „Gain-of-function p53 mutants co-opt chromatin pathways to drive cancer growth.“ *Nature* 525 (7568): 206-211. doi:10.1038/nature15251.

PRIEDAI

S1 lentelė. Pradmenys, naudoti *BRCA1* geno PGR tyrimui.

Genas	Egzono nr.	Pradmens prasminė seka 5'–3'	Pradmens antiprasminė seka 5'–3'	Amplikono ilgis, bp	Pradmens prilydymo temp., °C
<i>BRCA1</i>	5	CTCTTAAGGGCAGTTGTGAG	TTCCTACTGTGGTTGCTTCC	240	52;52
	11	AAGCCCGTTCCTCTTTGTCA	TCCTAGCCCTTTCACCCATACA	480	52;55
	20	ATATGACGTGTCTGCTCCAC	CCTTTCTGTCCTGGGGATT	170	52;51

S2 lentelė. *TP53* NKS analizei naudoti pradmenys bei PGR sąlygos.

Tiriamas egzonas	Pradmuo	Pradmens seka	PGR sąlygos <i>TP53</i> amplikonų bibliotekai		
			Temp.	Trukmė	Ciklų sk.
4	Prasminis	uni-MID-GACTGCTCTTTTCACCCATCTA	98 °C	30 s	1
	Antiprasminis	uni-MID-AGGAATCCCAAAGTTCCAAACAA			
5	Prasminis	uni-MID-TTGCAGGAGGTGCTTACG	98 °C	10 s	} 34
	Antiprasminis	uni-MID-GAGCAATCAGTGAGGAATCAGA	98 °C	30 s	
6	Prasminis	uni-MID-GTCACAGCACATGACGGAG	65 °C	30 s	
	Antiprasminis	uni-MID-GGTTATAGGGAGGTCAAATAAGCAG	72 °C	30 s	
7	Prasminis	uni-MID-CTTGCCACAGGTCTCCC	72 °C	10 min	1
	Antiprasminis	uni-MID-AGAAGCCACAGGTAAAGAGGT	4 °C	∞	1
8	Prasminis	uni-MID-CTTTGGGACCTCTTAACCTGT	4 °C	∞	1
	Antiprasminis	uni-MID-TGATAAAAGTGAATCTGAGGCATAACT			

Santrumpos: uni- universalus segmentas, MID- multiplekso identifikatorius.

S3 lentelė. MSP reakcijai naudoti pradmenys.

Genas	Pradmens ID	Sekos kryptis 5'-3'	Sekos kryptis 5'-3'	Amplikono ilgis, bp	PGR ciklai	Pradm. lyd. temp., (°C)	Lit.sąr.	
<i>PRKCB</i>	M	TAAGCGTAGTTGGACGAGC	AAAACGACGACCCTACTAC	124	36	56	[Danuinaite ir kt., 2021]	
	U	TGTTAAGTGTAGTTGGATGAGT	AAAACAACAACCACTACTACACC	127				
<i>ADAMTS12</i>	M	GAGTTCGGGAGGAAGATGTATC	ACAACGACTACAAAACCTACCCG	241	35	62		
	U	GAGTTTGGGAGGAAGATGTATT	AAACAACAACCTACAAAACCTACCA	243				
<i>NAALAD2</i>	M	TATTTATTATGTTCTGGGTTATTGC	CCTACTACATTCTCGGAACCTC	244	35	58		
	U	GTTATTTATTATGTTTGGGTTATTGT	CCTACTACATTCACAAAACCTCAA	246				
<i>FILIPIL</i>	M	TACGGTTCGTTTATACGGTC	CGACCTATAAACGTTTACGTCA	160	37	57		
	U	GGAATTATGGTTTGTATATGGTT	CCCAACCTATAAACATTACATCAC	167				
<i>DAPK1</i>	M	GGATAGTCGGATCGAGTTAACGTC	CCCTCCAAACGCCGA	98	37	66		[Sereinaite ir kt., 2015]
	U	GGAGGATAGTTGGATTGAGTTAATGTT	CAAATCCCTCCCAAACACCAA	106				
<i>GSTP1</i>	M	TTCGGGGTGTAGCGGTCGTC	GCCCCAATACTAAATCAGGACG	91	37	60		
	U	GATGTTTGGGGTGTAGTGGTTGTT	CCACCCCAATACTAAATCACAACA	97				
<i>MGMT</i>	M	ATTTGGTGAGTGTTGGGTCGTTTC	AAAACGCACCTAAAACCTCGCCC	159	37	67		
	U	ATTTGGTGAGTGTTGGGTTGTTTT	AAAACACACCTAAAACCTCACCC	159		64		
<i>P14</i>	M	GTGTTAAAGGGCGGCGTAGC	AAAACCCTCACTCGCGACGA	122	37	66		
	U	TTTTTGGTGTTAAAGGGTGGTGTAGT	CACAAAAACCCTCACTCACAACAA	132				
<i>P16</i>	M	TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC	GACCCCGAACCGGACCGTAA	150	36	64-30s		
	U	TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT	CAACCCCAAAACCAACCATAA	151				
<i>RARB</i>	M	TCGAGAACGCGAGCGATTCCG	GACCAATCCAACCGAAACGA	145	39	60		
	U	TTGAGAAATGTGAGTGATTGA	AACCAATCCAACCAAAAACAA	145				
<i>RASSF1</i>	M	GGGTTTTGCGAGAGCGCG	GCTAACAAACGCGAACCG	169	39	61		
	U	GGTTTTGTGAGAGTGTGTTTAG	CACTAACAAACACAAACCAAAC	169		63		
<i>ESR1-1</i>	M	TTTTGGGATTGTATTTGTTTTCGTC	AACAAAATACAAACCGTATCCCCG	197	37	60		
	U	TTTTGGGATTGTATTTGTTTGTGTTG	AAACAAAATACAAACCATATCCCCA	198				
<i>ESR1-4</i>	M	CGAGTTGGAGTTTTTGAATCGTTC	CTACGCGTTAACGACGACCG	151	37	58		

	U	ATGAGTTGGAGTTTTTGAATTGTTT	ATAAACCTACACATTAACAACAACCA	158			[Malekate ir kt., 2019]
<i>MTIE</i>	M	GGATTCGGAATATCGC	ACGAAAATCGAACCGAAC	217	38	56	
	U	TTTGGATTTTGGGAATATTGT	ACAAAAATCAAACCAAAACACA	220			
<i>MTIF</i>	M	GTATTCGGAATTTAAGGGGC	CGAACCGTCCCTTTAAAATC	134	36	56	
	U	TAGGTATTTGGAATTTAAGGGGT	CACAAACCATCCCTTTAAAATC	139			
<i>MTIG</i>	M	TCGTATACGGGGGGTATAGC	GCGATCCCGACCTAAACT	131	37	58	
	U	AAGTTGTATATGGGGGGTATAGT	CCCACAATCCCAACCTAAACT	137			
<i>APC</i>	M	TATTGCGGAGTGC GGTC	TCGACGAACTCCCGACGA	98	38	59	Šis tyrimas
	U	GTGTTTATTGTGGAGTGTGGGT	CCAATCAACAAACTCCCAACAA	108			
<i>RUNX3</i>	M	ATAATAGCGGTCTGTTAGGGCGTGC	GCTTCTACTTTCCCGCTTCTCGCG	115	38	59	
	U	ATAATAGTGGTTGTTAGGGTGTG	ACTTCTACTTTCCCACTTCTCACA	115			

Santrumpos: M- metilintai sekai, o U- nemetilintai sekai specifiški pradmenys.

S4 lentelė. Patogeninės *TP53* mutacijos, rastos KV mėginiuose.

Nr	Mutacijos vieta, bp	Egz/Intr	Kodo-no nr.	Sekos pokytis	Mutacijos tipas	WT a.r.	Mut. a. r.	Mutavęs baltymas	Mutacijos poveikis	Paveikta geno dalis	Vid. mut. dažnis, %	Mut. dažnis mėginiuose
1	11608:T>C	4-intr.	0	c.375+2T>C	A:T>G:C	-	-	-	Splaisingo p.	Intronas	45.24	1
2	11608:T>G	4-intr.	0	c.375+2T>G	A:T>C:G	-	-	-	Splaisingo p.	Intronas	58.8	1
3	11621-11643:DEL(23)	4-intr.	0	c.376-14_384del23	del	-	-	-	Splaisingo p.	Intronas	58.8	1
4	12278:T>C	4-intr.	0	c.376-86T>C	A:T>G:C	-	-	-	Intronų p.	Intronas	10.19	1
5	12383:A>G	5-egz.	132	c.395A>G	A:T>G:C	Lys	Arg	p.K132R	P.r.m.	Su DNR b.s.	49.34	1
6	12457:G/T	5-egz.	157	c.469G>T	G:C>T:A	Val	Phe	p.V157F	P.r.m.	Su DNR b.s.	44.43	1
7	12515:G/A	5-egz.	176	c.527G>A	G:C>A:T	Cys	Tyr	p.C176Y	P.r.m.	Su DNR b.s.	33.75	1
8	12517-12534:DEL(18)	5-egz.	177	c.529_546del18	del	Pro	-	p.P177_C182delPHHERC	Splaisingo p.	Su DNR b.s.	45.05	1

9	12521:A/C	5-egz.	178	c.533A>C	A:T>C:G	His	Pro	p.H178P	P.r.m	Su DNR b.s.	0.53	2
10	12524:A>G	5-egz.	179	c.536A>G	A:T>G:C	His	Arg	p.H179R	P.r.m	Su DNR b.s.	53.99	1
11	12643:C>T	6-egz.	192	c.574C>T	G:C>A:T	Gln	STOP	p.Q192*	STOP k.į.m	Su DNR b.s.	75.63	1
12	12650:T>A	6-egz.	194	c.581T>A	A:T>T:A	Leu	His	p.L194H	P.r.m	Su DNR b.s.	20.98	1
13	12653:T>C	6-egz.	195	c.584T>C	A:T>G:C	Ile	Thr	p.I195T	P.r.m	Su DNR b.s.	44.97	1
14	12655:C>T	6-egz.	196	c.586C>T	G:C>A:T at CpG	Arg	STOP	p.R196*	STOP k.į.m.	Su DNR b.s.	56.21	1
15	12694- 12695:AG>--	6-egz.	209	c.625_626del 2	del	Arg	-	-	Splaisingo p.	Su DNR b.s.	18.41	1
16	12710:A>G	6-egz.	214	c.641A>G	A:T>G:C	His	Arg	p.H214R	P.r.m	Su DNR b.s.	76.55	1
17	13380:G>A	7-egz.	248	c.743G>A	G:C>A:T at CpG	Arg	Gln	p.R248Q	P.r.m	Su DNR b.s.	46.2	1
18	13392:T/C	7-egz.	252	c.755T>C	A:T>G:C	Leu	Pro	p.L252P	P.r.m	Su DNR b.s.	53.86	1
19	13420:G>A	7-intr.	0	c.782+1G>A	G:C>A:T	-	-	-	Splaisingo p.	Intronas	71.41	1
20	13781:G/-	8-egz.	267	c.801del1	del	Arg	-	-	Splaisingo p.	Su DNR b.s.	34.5	1
21	13797:C/T	8-egz.	273	c.817C>T	G:C>A:T at CpG	Arg	Cys	p.R273C	P.r.m	Su DNR b.s.	43.04	1
22	13798:G>A	8-egz.	273	c.818G>A	G:C>A:T at CpG	Arg	His	p.R273H	P.r.m	Su DNR b.s.	90.78	2
23	13813:C>G	8-egz.	278	c.833C>G	G:C>C:G	Pro	Arg	p.P278R	P.r.m	Su DNR b.s.	30.53	1
24	13833:G>A	8-egz.	285	c.853G>A	G:C>A:T	Glu	Lys	p.E285K	P.r.m	Su DNR b.s.	36.89	1
25	13833:G>T	8-egz.	285	c.853G>T	G:C>T:A	Glu	STOP	p.E285*	STOP k.į.m	Su DNR b.s.	16.26	1
26	13896:C/T	8-egz.	306	c.916C>T	G:C>A:T at CpG	Arg	STOP	p.R306*	STOP k.į.m	Su DNR b.s.	29.64	1
27	13900:G/T	8-intr.	0	c.919+1G>T	G:C>T:A	-	-	-	Splaisingo p.	Intronas	32.28	1

Santrumpos: Egz. – egzozas; Intr. – intronas; Su DNR b.s. – su DNR besijungianti sritis; Splaisingo p. – splaisingo pokyčiai; Intronų p. – intronų pakaita; mut. – mutacija; P.r.m – pakitusios reikšmės mutacija (angl. *missense*); STOP k.į.m. – STOP kodoną įvedanti mutacija (angl. *nonsense*).

S5 lentelė. Hipermetilintų genų dažniai KV ir kontroliniuose mėginiuose bei jų pasiskirstymas tarp KV potipių.

Genas	Metilinta KV (n/N)	Jautrumas, %	Metilinta kontrolė (n/N)	Specifiškumas, %	P-vertė	LA, % (n/N)	LB, % (n/N)	HER2+, % (n/N)	TN, % (n/N)
<i>PRKCB</i>	86/111	77	0/29	100	< 0,0001	85 (46/54)	83 (19/23)	83 (15/18)	38 (6/16)
<i>RASSF1</i>	79/115	69	4/29	86	< 0,0001	78 (43/55)	65 (15/23)	67 (14/21)	44 (7/16)
<i>ADAMTS12</i>	67/107	63	2/29	93	< 0,0001	65 (34/52)	68 (15/22)	71 (12/17)	38 (6/16)
<i>APC</i>	61/115	53	0/29	100	< 0,0001	56 (30/54)	50 (12/24)	71 (15/21)	25 (4/16)
<i>RUNX3</i>	46/114	40	0/29	100	< 0,0001	41 (22/54)	48 (11/23)	57 (12/21)	6 (1/16)
<i>ESR1-1</i>	51/116	44	2/29	93	0,0002	47 (26/55)	50 (12/24)	38 (8/21)	36 (5/14)
<i>MGMT</i>	28/116	24	0/28	100	0,0023	22 (12/55)	25 (6/24)	29 (6/21)	25 (4/16)
<i>GSTP1</i>	24/116	21	0/29	100	0,0042	20 (11/55)	21 (5/24)	33 (7/21)	6 (1/16)
<i>MTIE</i>	40/113	35	4/29	86	0,0256	31 (17/55)	39 (9/23)	21 (4/19)	63 (10/16)
<i>RARB</i>	22/116	19	1/29	97	0,0464	18 (10/55)	25 (6/24)	14 (3/21)	19 (3/16)
<i>ESR1-4</i>	63/111	57	11/29	62	(s.n.)	57 (30/53)	63 (15/24)	65 (13/20)	36 (5/14)
<i>MTIG</i>	39/112	35	6/29	79	(s.n.)	37 (20/54)	45 (10/22)	35 (7/20)	13 (2/16)
<i>DAPK1</i>	17/116	15	7/29	76	(s.n.)	16 (9/55)	13 (3/24)	19 (4/21)	6 (1/16)
<i>FILIP1L</i>	53/102	52	18/28	36	(s.n.)	42 (21/50)	57 (12/21)	38 (6/16)	93 (14/15)
<i>NAALAD2</i>	61/108	56	13/28	54	(s.n.)	56 (29/52)	64 (14/22)	50 (9/18)	56 (9/16)
<i>PI6</i>	4/116	3	0/29	100	(s.n.)	2 (1/55)	8 (2/24)	5 (1/21)	0 (0/16)
<i>MT1F</i>	2/110	2	0/29	100	(s.n.)	4 (2/54)	0 (0/22)	0 (0/18)	0 (0/16)
<i>PI4</i>	3/115	3	0/29	100	(s.n.)	4 (2/54)	4 (1/24)	0 (0/18)	0 (0/16)

Santrumpos: LA – luminalinis A, LB – luminalinis B, HER2+ – HER2 teigiamas ir luminalinis B HER2 teigiamas, TN KV – trigubai neigiamas krūties vėžys, s.n. – statistiškai nereikšminga.

S6 lentelė. Vienmatė ir daugiamatė Kokso regresinė analizė bendrajam išgyvenamumui prognozuoti.

Kintamasis		Vienmatė analizė		Daugiamatė analizė	
		HR (95% CI)	P-vertė	HR (95 % CI)	P - vertė
Metilinta: taip/ne	<i>FILIP1L</i>	3,33 (0,92-11,97)	0,067	4,64 (1,15 - 18,75)	0,032
	<i>P16</i>	3,14 (0,72-13,67)	0,128		
	<i>RUNX3</i>	2,07 (0,78-5,50)	0,147		
	<i>P14</i>	2,14 (0,29-16,03)	0,462		
	<i>MT1F</i>	2,02 (0,27-15,15)	0,497		
	<i>ADAMTS12</i>	1,42 (0,51-3,98)	0,502		
	<i>DAPK1</i>	1,34 (0,39-4,62)	0,643		
	<i>MT1E</i>	1,20 (0,47-3,11)	0,704		
	<i>NAALAD2</i>	1,15 (0,43-3,11)	0,779		
Klinikiniai-patologiniai KV rodikliai	<u>Amžius</u>	1,04 (1,00-1,09)	0,049	1,07 (1,02 - 1,12)	0,010
	T (1 vs. 2)	1,06 (0,42-2,69)	0,897	13,92 (2,97 – 65,20)	0,010
	N (taip/ne)	2,15 (0,84-5,53)	0,113		
	G (<2 vs. 3)	1,55 (0,62-3,88)	0,357		
	TN potipis (taip/ne)	2,91 (1,04-8,18)	0,044		
	Molek. Žymenų raiška (didelė/maža):				
	ER	0,61 (0,22-1,71)	0,349		
	PR	0,68 (0,26-1,74)	0,422		
	HER2	0,25 (0,03-1,86)	0,177		
	Ki-67	1,02 (0,40-2,58)	0,963		
	<i>TP53-mut</i> (taip/ne)	0,95 (0,34-2,65)	0,919		

Santrumpos: T - naviko stadija, N – metastazės artimuosiuose limfmazgiuose, G – naviko diferenciacijos laipsnis, TN- trigubai neigiamas KV potipis, ER- estrogeno receptorius, PR – progesterono receptorius, HER2- žmogaus epidermio augimo receptorius 2, Ki-67 – ląstelių proliferacijos žymuo, *TP53-mut* – mutavęs *TP53*, HR – rizikos santykis (angl. *hazard ratio*), 95 % CI – 95 % pasikliautinis intervalas (angl. *confidence interval*). Į daugiamatę analizę itaukti kintamieji lentelėje pabraukti.

PADĖKA

Norėčiau padėkoti savo studijų vadovei prof. Sonatai Jarmalaitei už skatinimą eiti tolyn, pasitikėjimą, ir tikėjimą manimi bei nuoširdų rūpestį. Ačiū Jums, už suteiktą galimybę tobulėti ir grįžti į mėgiamą veiklą, Jūsų kantrybę ir palaikymą, taip pat mokslines konsultacijas bei jaukius ir šiltus pašnekesius. Taip pat dėkoju prof. habil. dr. Juozui Rimantui Lazutkai, doc. Veronikai Dedonytei, prof. Gražinai Slapšytei už nuoširdžius pašnekesius ir gyvenimiškus patarimus.

Nuoširdžiai dėkoju dr. Kristinai Šnipaitienei, kuri ne tik buvo mokytoja, nuoširdžiai ir kantriai mokydama, išklausydama, patardama, pataisydama mane, bet ir tapo geriausia drauge. Be tavęs ir tavo mielų kumštelėjimų, nebūčiau perlipusi per tuos didelius „akmenis“, o mūsų detektyvinius galvosūkius, „Marianų įdubas“ ir įvairiausių hipotezių nagrinėjimą prisiminsiu ilgai.

Taip pat noriu padėkoti Rasai Sabaliauskaitei už diskusijas, palaikymą, patarimus ir pagalbą bei Raimondai Kubiliūtei už patarimus ir draugystę. Ačiū Agnei Šeštokaitei, Justinai Gaiževskai, Rūtai Maleckaitei, Kristinai Žukauskaitei, Markui Baviršai, Saulei Zagreckaitei, Ritai Banciul prisidėjus prie tyrimų atlikimo. Taip pat noriu padėkoti doc. Kristinai Daniūnaitei už pamokymus, skatinimą tobulėti ir siekti užsibrėžtų tikslų.

Esu dėkinga NVI medikams, rinkusiems mėginius ir medžiagą tyrimams, taip pat dėkoju pacientams, sutikusiems dalyvauti projekte.

Atskirai norėčiau padėkoti savo šeimai – vyrui Valdui už meilę ir didžiulį palaikymą siekiant tikslo, taip pat savo vaikučiams: Klarai, Sofijai ir Benui, kurie buvo kantrūs ir supratingi. Dėkoju savo mamai Jūratei, tėčiui Arūnui ir sesei Ingai bei vyro tėvams – Anelei ir Leonardui už pagalbą ir palaikymą. Taip pat esu be galo dėkinga savo seneliams: mamutei ir tetukui, kad tikėjote manimi ir neleidote pasiduoti.

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

Mokslinės publikacijos, susijusios su disertaciniu darbu yra paskelbtos leidiniuose, turinčiuose cituojamumo rodiklį (IF) bei priklausančiuose *Clarivate Analytics Web of Science* duomenų bazei:

1. **Sadzeviciene I**, Snipaitiene K, Scesnaite-Jerdiakova A, Daniunaite K, Sabaliauskaite R, Laurinaviciene A, Drobnienė M, Ostapenko V, Jarmalaite S. Analysis of Intrinsic Breast Cancer Subtypes: The Clinical Utility of Epigenetic Biomarkers and TP53 Mutation Status in Triple-Negative Cases. *Int J Mol Sci*. 2022 Dec 6;23(23):15429. doi: 10.3390/ijms232315429.
2. **Sadzeviciene I**, Liaugaudiene O, Besusparis J, Asadauskiene J, Kulikiene I, Brasiuniene B, Sabaliauskaite R, Jarmalaite S. Recurrent Germline BRCA2 Gene Mutation in Lithuanian Family. *Medicina*. 2020 Mar 10;56(3):119. doi: 10.3390/medicina56030119.

Kitos publikacijos, tiesiogiai nesusijusios su doktorantūros studijomis, paskelbtos žurnale, priklausančiame *Clarivate Analytics Web of Science* duomenų bazei.

1. Patamsytė J, Žvingila D, **Mažonytė I**, Kleizaitė V, Baliuckas V, Balčiūnienė L, Rančelis V. Assessment of ecological impact on genetic diversity among populations of *Rubus idaeus* L. *Biologija*. 2005 Oct 1;51(4):24-28.
2. Tunaitis V, **Sadzevičienė I**, Suriakaitė K, Surovas A, Aldonytė R, Magnusson KE, Pivoriūnas A. Expression and subcellular localization of histone deacetylases in mesenchymal stem-like cells from exfoliated deciduous teeth. *Biologija*. 2008 Oct 1;54(4):306-311. doi: 10.2478/v10054-008-0061-1.

REZULTATŲ VIEŠINIMAS

Stendiniai pranešimai:

- **Ieva Sadzevičienė**, Kristina Daniūnaitė, Valerijus Ostapenko, Sonata Jarmalaitė. Epigenetic Biomarkers For Breast Cancer Diagnosis And Prognosis. COINS2017; Vilnius, Lietuva. 2017 m. Vasario 28 – kovo 2 d.
- **Ieva Sadzevičienė**, Kristina Daniūnaitė, Rasa Sabaliauskaitė, Valerijus Ostapenko, Sonata Jarmalaitė. Analysis Of Promoter DNA Methylation And *TP53* Mutation Status in Breast Tumors. COINS2018; Vilnius, Lietuva. 2018 m. vasario 28 – kovo 2 d.
- **Ieva Sadzevičienė**, Kristina Daniūnaitė, Rasa Sabaliauskaitė, Valerijus Ostapenko, Sonata Jarmalaitė. *TP53* mutation analysis in the etiology of breast cancer. Open Readings 2018; Vilnius, Lietuva. 2018 m. kovo 20-23 d.

Rezultatai taip pat buvo pristatyti:

- Rita Banciul, Kristina Daniūnaite, **Ieva Sadzevičienė**, Sonata Jarmalaitė. *APC* gene promoter methylation in breast cancer. Open Readings 2018; Vilnius, Lietuva. 2018 m. kovo 20-23 d.

FINANSINĖ PARAMA

Moksliniai tyrimai buvo remiami Lietuvos valstybinio mokslo fondo (granto nr. C03/2007). Dalinai studijos buvo remiamos Lietuvos mokslo tarybos (LMT) projekto MIP-109/2010 lėšomis.

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
bookshop.vu.lt, journals.vu.lt
Tiražas 20 egz.