



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν Πανεπιστήμιον Αθηνών
----- ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 -----
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διδακτορική Διατριβή

*Ανίχνευση, χαρακτηρισμός και
λειτουργική μελέτη μεταλλαγών σε
ογκοκατασταλτικά και επιδιορθωτικά γονίδια που
σχετίζονται με την καρκινογένεση*

Ανδρομάχη Βαγενά

Μοριακή Βιολόγος & Γενετίστρια
Royal Holloway and Bedford New College,
University of London

Αθήνα 2019

«Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από το Τμήμα Βιολογίας της Σχολής Θετικών
Επιστημών του ΕΚΠΑ δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (ν.
5343/1932, άρθρο 202)»

«Το κείμενο της Διδακτορικής Διατριβής δεν αποτελεί προϊόν λογοκλοπής.»

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Παναγούλα Κόλλια (Επιβλέπουσα), Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου, Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Βασιλική Αλεπόρου, Καθηγήτρια Βιοχημικής και Μοριακής Γενετικής, Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Δρακούλης Γιαννουκάκος, Διευθυντής Ερευνών, Εργαστήριο Μοριακής Διαγνωστικής, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος»

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Παναγούλα Κόλλια (Επιβλέπουσα), Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου, Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Βασιλική Αλεπόρου, Καθηγήτρια Βιοχημικής και Μοριακής Γενετικής, Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Δρακούλης Γιαννουκάκος, Διευθυντής Ερευνών, Εργαστήριο Μοριακής Διαγνωστικής, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος»

Ανδρέας Σκορίλας, Καθηγητής Κλινικής Χημείας, Τομέας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ιωάννης Τρουγκάκος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογίας Ζωϊκού Κυττάρου & Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Δημήτριος Στραβοπόδης, Επίκουρος Καθηγητής Βιολογίας Κυττάρου & Ανάπτυξης, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ειρήνη Κωνσταντοπούλου, Ερευνήτρια Β', ΙΠΡΕΤΕΑ, Εργαστήριο Μοριακής Διαγνωστικής, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος»

Ευχαριστίες

Η διεξαγωγή και η ολοκλήρωση μίας Διδακτορικής Διατριβής αποτελεί μία δύσκολη, αλλά ταυτόχρονα και εποικοδομητική εμπειρία. Φθάνοντας στο τέλος αυτής της πορείας θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόψυχα την Επιβλέπουσα Καθηγήτρια κ. Παναγούλα Κόλλια για τη συνεχή καθοδήγηση, την παροχή κάθε δυνατής βοήθειας, τις καίριες συμβουλές της σε όλα τα επίπεδα, αλλά και για την εμπιστοσύνη που μου έχει δείξει όλα τα χρόνια. Η συμβολή της στην ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής υπήρξε καθοριστική.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Δρακούλη Γιαννουκάκο για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω τη Διατριβή μου στο Εργαστήριο Μοριακής Διαγνωστικής στο «Δημόκριτο» με ερευνητικό αντικείμενο τη γενετική του καρκίνου, ένα αντικείμενο που μου είχε κεντρίσει το επιστημονικό ενδιαφέρον από τα πρώτα χρόνια των σπουδών μου. Θα ήταν παράλειψή να μην ευχαριστήσω την Καθηγήτρια του Τμήματος Βιολογίας, ΕΚΠΑ κ. Βασιλική Αλεπόρου και την Ερευνήτρια Β΄ του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» κ. Ειρήνη Κωνσταντοπούλου για τις πολύτιμες επιστημονικές συμβουλές.

Επίσης, ευχαριστώ πολύ όλα τα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Ανδρέα Σκορίλα, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Γιάννη Τρουγκάκο και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Δημήτρη Στραβοπόδη για τη διάθεσή τους να συμμετάσχουν σε αυτή καθώς και για τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσαν για τη διόρθωση της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ την κ. Φλωρεντία Φωστήρα για την καθημερινή υποστήριξη, καθοδήγηση και βοήθεια, η οποία ήταν ουσιαστική και καθοριστική για την ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης. Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω σε όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Μοριακής Διαγνωστικής για την άρτια συνεργασία, τις χρήσιμες συμβουλές και τις εποικοδομητικές συζητήσεις τόσο σε επιστημονικό, όσο και σε προσωπικό επίπεδο. Ευχαριστώ πολύ τη συνάδελφο και φίλη κ. Δέσποινα Καλφακάκου που με βοήθησε με τις στατιστικές και βιοπληροφορικές αναλύσεις και με στήριξε και σε προσωπικό επίπεδο όποτε αυτό χρειάστηκε. Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Γενετικής Ανθρώπου του Τμήματος Βιολογίας και κυρίως την κ. Ματίνα Ρούσσου και τον προπτυχιακό φοιτητή κ. Γιώργο Φραγκεδάκη για την πολύτιμη βοήθεια στη διεξαγωγή των πειραμάτων της επιγενετικής ανάλυσης.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον πατέρα μου, ο οποίος πάντα με ενθάρρυνε και υποστήριζε όλες τις αποφάσεις μου και ήταν δίπλα μου δείχνοντας αμέριστη συμπαράσταση και παρέχοντας οποιαδήποτε βοήθεια χρειαζόταν. Επιπλέον, θα ήθελα να

ευχαριστήσω το σύντροφό μου Γιάννη που με υποστήριξε σε κρίσιμες στιγμές και μου έδωσε δύναμη να συνεχίσω την προσπάθεια, αλλά και για την καθημερινή υπομονή που επέδειξε όλο αυτό το διάστημα μέχρι την ολοκλήρωση της παρούσας Διατριβής. Τέλος, θα ήταν παράλειψή μου να μην ευχαριστήσω τους φίλους μου που ήταν πάντα δίπλα μου για να μου συμπαρασταθούν και να μου προσφέρουν κάθε είδους βοήθεια.

Η ολοκλήρωση της παρούσας Διδακτορικής διατριβής, η οποία αποτέλεσε ένα προσωπικό στοίχημα για εμένα και μία πολύπλοκη διαδικασία με πολλά προσωπικά κέρδη και απώλειες, ελπίζω να βοηθήσει στην πρόοδό μου ως επιστήμονα αλλά πολύ περισσότερο στη βελτίωσή μου ως άνθρωπο.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	8
Abstract	12
Συνοτομογραφίες	15
Εισαγωγή	18
1. Βλάβες του γενετικού υλικού.....	19
2. Διατήρηση της κυτταρικής ακεραιότητας.....	19
3. Χαρακτηριστικά γνωρίσματα των καρκινικών κυττάρων	20
4. Γονίδια που εμπλέκονται στην καρκινογένεση	22
4.1 Πρωτο - ογκογονίδια	22
4.2 Ογκοκατασταλτικά γονίδια	23
5. Μονοπάτια επιδιόρθωσης βλαβών του γενετικού υλικού.....	23
5.1 Επιδιόρθωση με εκτομή βάσης και εκτομή νουκλεοτιδίων (base excision repair, BER & nucleotide excision repair, NER).....	24
5.2 Επιδιόρθωση αταίριαστων βάσεων (Mismatch Repair, MMR)	25
5.3 Επιδιόρθωση δίκλωνων θραύσεων με σύνδεση μη ομόλογων άκρων	27
5.4 Ομόλογος ανασυνδυασμός.....	28
6. Γονίδια που συμμετέχουν σε επιδιορθωτικά μονοπάτια – Ογκοκατασταλτικά γονίδια	29
6.1 Γονίδια που συμμετέχουν στο μονοπάτι της επιδιόρθωσης αταίριαστων βάσεων	29
6.2 Γονίδια του Ομόλογου Ανασυνδυασμού	31
7. Μεταλλαγές.....	45
7.1 Μεγάλες γονιδιακές αναδιατάξεις.....	46
7.2 Ιδρυτικές μεταλλαγές.....	47
8. Υπόθεση των «Δύο χτυπημάτων» κατά Knudson	48
9. Κληρονομικός καρκίνος – Σύνδρομο κληρονομικού καρκίνου	49
9.1 Σύνδρομο Lynch	50
9.2 Κληρονομικός καρκίνος μαστού/ωοθηκών	57
9.3 Σύνδρομο Li-Fraumeni.....	66
10. Κληρονομικά καρκινικά σύνδρομα και κληρονομικές μορφές κακοήθειας	68
11. Θεραπευτικές προσεγγίσεις στον κληρονομικό καρκίνο μαστού/ωοθηκών	70
12. Επιγενετικές τροποποιήσεις του γενετικού υλικού στον καρκίνο.....	71
12.1 Μεθυλίωση.....	72
Σκοπός	74
Υλικά και Μέθοδοι	76

1. Υλικό Μελέτης	77
2. Ομάδες Μελέτης	78
2.1 Ανάλυση των γονιδίων <i>BRCA1</i> και <i>BRCA2</i>	78
2.2 Ανίχνευση μεγάλων γονιδιακών αναδιατάξεων με τη τεχνική MLPA	78
2.3 Έλεγχος 94 γονιδίων προδιάθεσης καρκίνου με αλληλούχηση DNA νέας γενιάς (NGS).....	78
2.4 Ανάλυση ασθενών για τη μεταλλαγή c.2257 C>T του γονιδίου <i>PALB2</i>	79
2.5 Ανάλυση απλοτύπων σε ασθενείς που έφεραν τη μεταλλαγή c.2257 C>T του γονιδίου <i>PALB2</i>	79
2.7 Ανάλυση των γονιδίων MMR	79
3. Ομάδες Αναφοράς	80
3.2 Ανάλυση ατόμων για τη μεταλλαγή c.2257 C>T του γονιδίου <i>PALB2</i>	80
3.2 Ανάλυση απλοτύπων για τη μεταλλαγή c.2257 C>T του γονιδίου <i>PALB2</i> σε γυναίκες που δεν είχαν διαγνωσθεί με καρκίνο	80
4. Μέθοδοι	80
4.1 Απομόνωση γενωμικού DNA.....	80
4.2 Φωτομέτρηση DNA	82
4.3 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)	82
4.4 Καθαρισμός των προϊόντων της PCR	84
4.5 Αλληλούχηση κατά Sanger	85
4.6 Καθαρισμός των προϊόντων αλληλούχησης σε στήλες σεφαρόζης	86
4.7 Πολλαπλή ενίσχυση τμημάτων DNA εξαρτώμενη από τη σύνδεση ιχνηθετών (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, MLPA)	87
4.8 Αντίδραση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR)	93
4.9 Διερεύνηση ιδρυτικού φαινομένου της μεταλλαγής c.2257 C>T του γονιδίου <i>PALB2</i> - Ανάλυση απλοτύπων	96
4.10 Προσδιορισμός της ηλικίας της μεταλλαγής c.2257C>T.....	98
4.11 Στατιστική ανάλυση.....	99
4.12 Μεγάλου εύρους αντίδραση PCR (Long range PCR).....	99
4.13 Εργαλεία Βιοπληροφορικής για την ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου <i>MSH2</i>	101
4.14 Επιγενετικές τροποποιήσεις του γενετικού υλικού στον καρκίνο – Μεθυλίωση	102
Αποτελέσματα	106
1. Αλληλούχηση κατά Sanger για την ανάλυση του γονιδίου <i>BRCA1</i>	107
2. Αλληλούχηση κατά Sanger για την ανάλυση του γονιδίου <i>BRCA2</i>	109
3. Ανίχνευση μεγάλων γονιδιακών αναδιατάξεων σε γονίδια προδιάθεσης στον καρκίνο του μαστού με την τεχνική MLPA	111

4. Αλληλούχηση DNA Νέας Γενιάς (NGS).....	114
5. Ανίχνευση της μεταλλαγής c.2257 C>T του γονιδίου <i>PALB2</i>	117
6. Ανάλυση απλοτύπων σε ασθενείς που έφεραν τη μεταλλαγή c.2257 C>T του γονιδίου <i>PALB2</i> , καθώς και στην ομάδα ελέγχου	121
7. Προσδιορισμός της ηλικίας της c.2257C>T του γονιδίου <i>PALB2</i>	124
8. Ανίχνευση μεταλλαγών στα γονίδια MMR	125
8.1 Γονίδιο <i>MLH1</i>	126
8.2 Γονίδιο <i>MSH2</i>	128
8.3 Γονίδια <i>MSH6</i> και <i>PMS2</i>	130
8.4 Ανίχνευση μεγάλων γονιδιακών αναδιατάξεων στα γονίδια <i>MLH1/MSH2</i> με τη τεχνική MLPA.....	131
9. Χαρακτηρισμός των μεγάλων γονιδιακών αναδιατάξεων του γονιδίου <i>MSH2</i>	134
9.1 Έλλειμμα των εξονίων 1 - 6 του γονιδίου <i>MSH2</i>	134
9.2 Έλλειμμα των εξονίων 3 - 4 του γονιδίου <i>MSH2</i>	136
9.3 Έλλειμμα των εξονίων 9 - 10 του γονιδίου <i>MSH2</i>	137
9.4 Έλλειμμα των εξονίων 7 -16 του γονιδίου <i>MSH2</i>	138
10. Εργαλεία Βιοπληροφορικής για την ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου <i>MSH2</i>	141
11. Ανάλυση των επιπέδων μεθυλίωσης των υποκινητών 22 γονιδίων	142
Συζήτηση	145
1. Γονίδια προδιάθεσης που συμμετέχουν στον ομόλογο ανασυνδυασμό - Κληρονομικός καρκίνος μαστού/ωθηκίων	146
2. Γονίδια που συμμετέχουν στο μονοπάτι επιδιόρθωσης αταίριαστων βάσεων (Σύνδρομο Lynch)	159
3. Επιγενετικές τροποποιήσεις – Μεθυλίωση	165
Βιβλιογραφία	169

Περίληψη

Ο κληρονομικός καρκίνος αντιπροσωπεύει ένα μικρό ποσοστό των περιστατικών του καρκίνου που διαγνώσκονται και χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη κακοηθειών σε νεαρή ηλικία και την παρουσία πολλαπλών περιστατικών σχετιζόμενων καρκίνων στα μέλη των οικογενειών. Ο καρκίνος του μαστού είναι η πιο συχνή κακοήθεια και η κύρια αιτία θανάτου στις γυναίκες τόσο στις αναπτυγμένες, όσο και στις αναπτυσσόμενες χώρες. Περίπου στο 30% των περιπτώσεων του καρκίνου του μαστού διαγνώσκονται τουλάχιστον δύο συγγενείς (οικογενής) με κακοήθεια, ενώ στο 5-10% έχουν χαρακτηριστεί σαφείς μοριακές αλλαγές (κληρονομικός). Τα δύο κύρια γονίδια, μεταλλαγές των οποίων έχουν συσχετιστεί με κληρονομική προδιάθεση στον καρκίνο του μαστού, είναι τα *BRCA1* και *BRCA2* που συμμετέχουν στο μονοπάτι του ομόλογου ανασυνδυασμού. Ο ομόλογος ανασυνδυασμός είναι ένας μηχανισμός επιδιόρθωσης των θραύσεων της διπλής αλυσίδας του DNA. Ο δια βίου κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του μαστού σε γυναίκες που φέρουν μεταλλαγές στο γονίδιο *BRCA1* είναι 57-65%, ενώ ο αντίστοιχος κίνδυνος για το γονίδιο *BRCA2* είναι 35-57%. Τα τελευταία χρόνια η χρήση της Αλληλούχισης DNA Νέας Γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS) έχει αναδείξει και άλλα γονίδια προδιάθεσης στον καρκίνο του μαστού, υψηλής και ενδιάμεσης διεισδυτικότητας, όπως είναι τα *PALB2*, *ATM* και *CHEK2*. Τα γονίδια αυτά εμπλέκονται επίσης στο μονοπάτι του ομόλογου ανασυνδυασμού.

Εκτός από τα παραπάνω γονίδια, με τον κληρονομικό καρκίνο έχουν συσχετιστεί και τα γονίδια που εμπλέκονται στο μονοπάτι επιδιόρθωσης αταίριαστων βάσεων, τα γονίδια MMR (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* και *PMS2*). Η παρουσία παθογόνων μεταλλαγών σε αυτά τα γονίδια έχει συσχετιστεί με προδιάθεση ανάπτυξης καρκίνου των ωοθηκών, ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά του συνδρόμου Lynch.

Η ανίχνευση μεταλλαγών σε γονίδια προδιάθεσης εξηγεί ένα ποσοστό των περιστατικών του καρκίνου που διαγνώσκονται. Παραμένει όμως ένα ποσοστό περιστατικών με οικογενή χαρακτήρα στο οποίο δεν έχει ανιχνευθεί ο γενετικός παράγοντας που είναι υπεύθυνος για την εμφάνιση της νόσου. Αυτό οδηγεί στην ανάγκη διερεύνησης εναλλακτικών μηχανισμών που μπορεί να συμβάλλουν στην καρκινογένεση, όπως είναι οι επιγενετικές τροποποιήσεις και συγκεκριμένα η μεθυλίωση. Η αλλαγή των επιπέδων της μεθυλίωσης έχει συσχετιστεί με την καρκινογένεση, κυρίως μέσω της τροποποίησης της έκφρασης των γονιδίων επάγοντας τη γενετική αστάθεια.

Σκοπός της παρούσας διατριβής αποτέλεσε η διερεύνηση του γενετικού υπόβαθρου σε ασθενείς Ελληνικής καταγωγής με καρκίνο μαστού, ωθηκών και σχετιζόμενων κακοηθειών με το σύνδρομο Lynch με τη χρήση διαφορετικών προσεγγίσεων/τεχνικών, ώστε να χαρακτηριστούν νέα γονίδια και μεταλλαγές που σχετίζονται με τις διάφορες μορφές καρκίνου. Παράλληλα, έγινε διερεύνηση μηχανισμών αποσιώπησης, όπως είναι η μεθυλίωση, των γονιδίων που πιθανά επηρεάζουν την ανάπτυξη καρκίνου σε ασθενείς που δεν είχε αποσαφηνιστεί το γενετικό υπόβαθρο της νόσου.

Αρχικά, αναλύθηκαν 172 ασθενείς με καρκίνο του μαστού για τα γονίδια *BRCA*. Από την ανάλυση αυτή προέκυψε ότι το 12,2% έφερε μεταλλαγές στο *BRCA1* και 5,2% στο *BRCA2*. Στη συνέχεια οι ασθενείς που ήταν αρνητικές για σημειακές μεταλλαγές αυτών των γονιδίων υποβλήθηκαν σε έλεγχο με τη τεχνική MLPA για την ανεύρεση μεγάλων γονιδιακών αναδιατάξεων. Κατά την ανάλυση αυτή δεν ανιχνεύθηκε καμία γενετική αναδιάταξη. Για να είναι εφικτός ο καθορισμός της παρουσίας αναδιατάξεων στον Ελληνικό πληθυσμό, η ανάλυση με MLPA διευρύνθηκε σε επιπλέον 443 ασθενείς και ανιχνεύθηκαν δύο απαλοιφές (0,5%), μία στο *BRCA1* (απαλοιφή των εξονίων 1-2) και μία στο *BRCA2* (απαλοιφή των εξονίων 12-13). Η τελευταία αποτελεί ένα σχετικά συχνό έλλειμμα στον Ελληνικό πληθυσμό.

Στη συνέχεια αναλύθηκαν ασθενείς με καρκίνο του μαστού (108), οι οποίες ήταν αρνητικές για μεταλλαγές στα γονίδια *BRCA* και είχαν εξαιρετικά βεβαρημένο οικογενειακό ιστορικό. Για την ανάλυση αυτή χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία NGS και συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το γονιδιακό πάνελ «TruSight Cancer Panel», το οποίο περιλαμβάνει 94 γονίδια προδιάθεσης σε διάφορους τύπους κακοήθειας. Η ανάλυση ανέδειξε την παρουσία 17 (15,7%) μεταλλαγών σε γνωστά και νέα γονίδια προδιάθεσης στον καρκίνο του μαστού. Ειδικότερα, ανευρέθηκαν 5 παραλλαγές στο *PALB2*, 4 στο *CHEK2*, 2 στο *ATM*, 2 στο *RAD51C*, 2 στο *TP53*, και από μία στο *ALK* και στο *FANCM*.

Τα *ATM* και *CHEK2* είναι γνωστά γονίδια προδιάθεσης ενδιάμεσης διεισδυτικότητας, ενώ το *PALB2* έχει αναδειχθεί πλέον σε γονίδιο υψηλής διεισδυτικότητας. Το *RAD51C* έχει συσχετιστεί με προδιάθεση στον καρκίνο των ωθηκών, διαφαίνεται όμως ότι συγκεκριμένες μεταλλαγές μπορεί να συσχετίζονται και με προδιάθεση στον καρκίνο του μαστού. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται και από τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής. Τέλος, το *FANCM* είναι ένα γονίδιο που έχει συσχετιστεί πρόσφατα με προδιάθεση στον καρκίνο του μαστού, οι μεταλλαγές του οποίου ανευρίσκονται σε μικρή συχνότητα, όπως και στην παρούσα μελέτη (0,9%).

Η ανάλυση με NGS ανέδειξε ότι η μεταλλαγή c.2257C>T του γονιδίου *PALB2* ανευρίσκεται σχετικά συχνά στις Ελληνίδες ασθενείς. Αυτό αποτέλεσε το έναυσμα να αναλυθούν για τη συγκεκριμένη μεταλλαγή επιπλέον 2496 ασθενείς με καρκίνο του μαστού και 697 ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών. Συνολικά ανευρέθηκαν 6 (0,24%) με καρκίνο του μαστού που έφεραν την μεταλλαγή, ενώ μόνο μία ασθενής με καρκίνο των ωοθηκών (0,14%) έφερε τη c.2257C>T μεταλλαγή. Ακολούθησε ανάλυση απλοτύπων με τη χρήση 7 πολυμορφικών δεικτών σε όλα τα άτομα που έφεραν τη μεταλλαγή και προέκυψε ότι όλοι έφεραν ένα κοινό απλότυπο μεγέθους 1,2 Kb. Η ύπαρξη του κοινού απλοτύπου “157-228-127-166-263” ανέδειξε ότι η c.2257C>T μεταλλαγή προέκυψε από έναν κοινό πρόγονο πριν από περίπου 1600 χρόνια.

Με τον κληρονομικό καρκίνο, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, έχουν συσχετιστεί και τα γονίδια MMR, οπότε σε επόμενο βήμα ελέγχθηκαν 93 ασθενείς βάση του ατομικού (νεαρή ηλικία διάγνωσης) ή/και του οικογενειακού ιστορικού τους (παρουσία σχετιζόμενων καρκίνων με το σύνδρομο Lynch). Η ανάλυση αυτή οδήγησε στην ανίχνευση συνολικά 29 μεταλλαγών στα γονίδια αυτά και συγκεκριμένα 17 μεταλλαγών στο *MLH1* (18,3%), 7 στο *MSH2* (7,5%), 4 στο *MSH6* (4,3%) και 1 στο *PMS2* (1,1%). Στη συνέχεια, οι ασθενείς που ήταν αρνητικοί για σημειακές μεταλλαγές των γονιδίων MMR ελέγχθηκαν για την ανίχνευση μεγάλων γονιδιακών αναδιατάξεων των γονιδίων *MLH1* και *MSH2*, γονίδια τα οποία αριθμούν το μεγαλύτερο αριθμό παραλλαγών. Από την ανάλυση αυτή ανευρέθηκαν 8 απαλοιφές στο γονίδιο *MSH2* (8,6%), ειδικότερα ανιχνεύθηκαν οι απαλοιφές των εξονίων 1-6, 1-7, 1-8, 3-4, 9-10 και 7-16, καταδεικνύοντας τη μεγάλη συχνότητα ανεύρεσης αναδιατάξεων στο συγκεκριμένο γονίδιο. Τέλος, καθορίστηκαν τα ακριβή όρια θραύσης των ελλειμμάτων 1-6, 3-4, 9-10 και 7-16.

Επιπλέον, μετά την ανάλυση με NGS παρέμενε ένα ποσοστό ασθενών στο οποίο δεν ανιχνεύθηκε μεταλλαγή σε κανένα από τα γονίδια προδιάθεσης που αναλύθηκαν. Για το λόγο αυτό προχωρήσαμε σε ανάλυση των επιπέδων μεθυλίωσης των υποκινητών 22 γονιδίων σε επιλεγμένες ασθενείς με νεαρή ηλικία διάγνωσης και τριπλά αρνητικούς όγκους. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τα αποτελέσματα από ασθενείς, με αντίστοιχες διαγνώσεις, οι οποίες όμως έφεραν μεταλλαγές στο γονίδιο *BRCA1*, δηλαδή γνωστό γενετικό υπόβαθρο. Η ανάλυση αυτή ανέδειξε 5 γονίδια με υπερμεθυλιωμένους υποκινητές (ποσοστό μεθυλίωσης >30%), τα *CDH1*, *HIC1*, *PYCARD*, *RASSF1* και *TP73*, καταδεικνύοντας πιθανή συσχέτιση της επιγενετικής αποσιώπησης αυτών των γονιδίων με την ανάπτυξη της νόσου.

Συμπερασματικά από την παρούσα διατριβή αναδείχθηκε τόσο η γενετική ποικιλομορφία όσο και η παρουσία ιδρυτικών μεταλλαγών που χαρακτηρίζουν τον κληρονομικό καρκίνο και ιδιαίτερα τον καρκίνο μαστού και ωοθηκών στον Ελληνικό πληθυσμό. Επιπλέον, δείχθηκε η συμβολή της επιγενετικής αποσιώπησης, υπερμεθυλίωση, συγκεκριμένων γονιδίων τα οποία εμπλέκονται σε καθοριστικά σηματοδοτικά μονοπάτια που επάγουν την καρκινογένεση. Η κατανόηση και η αποσαφήνιση του γενετικού υπόβαθρου και των μηχανισμών που συμμετέχουν στην παθογένεια της νόσου είναι πολύ σημαντική, ώστε να παρέχεται στους ασθενείς και στα μέλη των οικογενειών τους, η κατάλληλη γενετική συμβουλή και να πραγματοποιείται η βέλτιστη κλινική διαχείριση.

Abstract

Hereditary cancer accounts for a small percentage of cancer incidents and is characterized by cancer development at young age and the presence of multiple cases of related malignancies among family members. Breast cancer is the most common malignancy and the leading cause of the death among women in developed and developing countries. Approximately 30% of breast cancer cases present family history with at least two relatives diagnosed with cancer (familial cases), while in 5-10% a mutation in a susceptibility gene has been identified. Hereditary breast cancer is related to germline mutations in *BRCA1* and *BRCA2* genes. Both genes play key roles in homologous recombination, a very important repair pathway of DNA double strand breaks. The lifetime breast cancer risk is 57-65% for *BRCA1* and 35-57% for *BRCA2* mutation carriers. Over the last years, the use of Next Generation Sequencing (NGS) highlighted new susceptibility breast cancer genes, such as *PALB2*, *ATM* and *CHEK2*. All the above genes are also participate in homologous recombination.

Apart from the mentioned genes, mismatch repair genes (MMR) are known cancer susceptibility genes (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* και *PMS2*). Germline mutations in MMR genes are associated with ovarian cancer development, one of the main characteristics of Lynch syndrome, among other malignancies.

Identification of germline mutations of cancer predisposing genes explains a percentage of diagnosed incidents. However, there is still a significant proportion of familial cases in which the genetic background of cancer development remains unidentified. This is a trigger for the investigation of alternative mechanisms that may be involved in carcinogenesis, such as epigenetic alterations and specifically methylation. Changes of methylation patterns is associated with cancer development through gene expression modifications inducing genetic instability.

The aim of the dissertation was to investigate the genetic background of Greek breast, ovarian and Lynch syndrome patients using different approaches/techniques in order to identify new susceptibility genes and characterize new mutations that are associated with various types of cancer. At the same time, epigenetic silencing through hypermethylation of genes that possibly participate on cancer development was investigated on patients whose hereditary background remained undefined.

Originally, 172 breast cancer patients were analyzed for the identification of pathogenic variants on *BRCA* genes by Sanger sequencing. The analysis revealed 12.2% *BRCA1* and 5.2% *BRCA2* mutation carriers. The patients that carried no point mutation were further analyzed by MLPA for the detection of Large Genomic Rearrangements (LGRs) on these genes and no carriers were identified. In order to determine the prevalence of BRCA LGRs on Greek patients, the MLPA analysis was expanded in 443 additional breast cancer patients. This analysis revealed two deletions (0.5%), one on *BRCA1* gene (deletion of exons 1-2) and one on *BRCA2* gene (deletion of exons 12-13). The latter LGR is quite common for people of Greek ancestry.

Furthermore, NGS was employed on breast cancer patients (108) that were not BRCA mutation carriers and presented extremely severe family history. «TruSight Cancer Panel» that includes 94 cancer susceptibility genes, was used and seventeen (17/108, 15.7%) mutations on known and less known cancer susceptibility genes, were identified. Specifically, five *PALB2*, four *CHEK2*, two *RAD51C*, two *TP53* and one on *ALK* and *FANCM* variants were detected.

ATM and *CHEK2* are known predisposing breast cancer genes, while *PALB2* has been recently identified as a high penetrant gene. *RAD51C* is identified as a susceptibility gene to ovarian cancer, although late studies have shown that is possible certain variants to influence breast cancer development as well. This hypothesis is in accordance with the results of the present work. Finally, *FANCM* gene quite recently has been associated with breast cancer predisposition, whose mutations are rare, as it is supported in the present study.

Next Generation Sequencing revealed a recurrent *PALB2* mutation c.2257C>T. So, we aimed to clarify its possible founder effect on Greek population as well as to investigate correlations with cancer diagnosis. Genotyping for the mutation was performed on 2496 breast and 697 ovarian cancer patients and identified 6 (0.24%) and 1 (0.14%) carriers, respectively, while haplotype analysis performed on all mutation carriers. Haplotype analysis was conducted using seven microsatellite markers (one intragenic and 6 extragenic) and all carriers shared a 1.2 Mb common haplotype “157-228-127-166-263” indicating that this variant came from a single recombination event in a common ancestor 1600 years ago.

In addition, as mentioned above, germline mutations on MMR genes are associated with hereditary cancer. Thus, 93 probands selected according to their personal (early onset diagnosis) and/or family history (presence of Lynch syndrome related malignancies) were analyzed in order to determine the mutation spectra of MMR genes on Greek patients. Point

mutations or small insertions/deletions were detected in 29/93 and specifically mutations in *MLH1* and *MSH2* were predominantly identified (25.8%), while the proportion of *MSH6* and *PMS2* was significantly lower, 4.3% and 1.1% respectively. As a next step, MLPA was employed on non-mutation carriers for the detection of LGRs on *MLH1* and *MSH2* genes which represent the majority of the rearrangements that have been described on MMR genes. Genomic rearrangements identified on *MSH2* exclusively (8/93, 8.6%) involving deletions of exons 1-6, 1-7, 1-8, 3-4, 9-10 and 7-16, indicating that such phenomena are possibly frequent in patients of Greek descent. Finally, 1-6, 3-4, 9-10 and 7-16 break points were determined.

Furthermore, NGS analysis pointed out a proportion of patients that carry no mutation on breast cancer predisposing genes. This observation lead us to investigate the promoter methylation status of 22 genes, related to different repair pathways, of patients diagnosed at early age and triple negative tumors. The results compared to *BRCA1* mutation-carriers patients with corresponding diagnoses. This analysis revealed 5 genes with hypermethylated promoters (methylation percentage > 30%), *CDH1*, *HIC1*, *PYCARD*, *RASSF1* and *TP73*, demonstrating a possible correlation of epigenetic silencing of these genes with disease development.

Overall, the present dissertation revealed the genetic diversity of the Greek population which at the same time is characterized by strong founder effects in terms of hereditary cancer and in particular hereditary breast and ovarian cancer. In addition, the contribution of epigenetic silencing, hypermethylation, of specific genes that are involved in crucial for carcinogenesis signaling pathways was shown. Clarification and understanding of genetic background and mechanisms that contribute in carcinogenesis is very important in order to provide patients and their family members appropriate clinical management.

Συντομογραφίες

- **ATR**: πρωτεϊνική κινάση
- **BD**: περιοχή του καρβοξυτελικού άκρου του μορίου της TP53 η οποία συμμετέχει επίσης στο τετραμερισμό του μορίου
- **BER** (base excision repair): επιδιόρθωση με εκτομή βάσης
- **BrCa**: καρκίνος του μαστού
- **Ca**: καρκίνος
- **CC** (coiled-coil domain): δομή σπείρας
- **CDK** (cyclin-dependent kinase): κινάση που εξαρτάται από την κυκλίνη
- **ChAM** (chromatin association motif): περιοχή που αλληλεπιδρά με τη χρωματίνη
- **Chk1**: πρωτεϊνική κινάση 1
- **Chk2**: πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης 2
- **CRC**: καρκίνος παχέος εντέρου
- **Ct** (cycle threshold): κατώφλι κύκλου
- **DBD** (DNA binding domain): περιοχή πρόσδεσης στο DNA
- **ddNTPs**: τριφωσφορικά διδεοξυνουκλεοτίδια
- **DDR** (DNA damage response): μηχανισμοί απόκρισης σε βλάβες του DNA
- **DNA-PKcs** (DNA-dependent protein kinase): εξαρτώμενη από το DNA πρωτεϊνική κινάση
- **dsDNA breaks**: θραύσεις διπλής αλυσίδας του DNA
- **ER**: υποδοχείς οιστρογόνων
- **FAT**: περιοχή πλούσια σε προλίνες
- **HER-2**: υποδοχέας του γονιδίου του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα τύπου 2
- **LGRs (Large Genomic Rearrangements)**: μεγάλες γονιδιακές αναδιατάξεις

- **LINES** (Long interspersed elements): μακρά διάσπαρτα στοιχεία
- **LOH** (Loss of heterozygosity): απώλεια της ετεροζυγωτίας
- **MLPA** (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification): πολλαπλή ενίσχυση τμημάτων DNA εξαρτώμενη από τη σύνδεση ιχνηθετών
- **MMR** (mismatch repair): επιδιόρθωση αταίριαστων βάσεων
- **MRE11/RAD50/NBS1**: πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο σχηματισμό του συμπλόκου MRN
- **MRN**: πρωτεϊνικό σύμπλοκο, που αποτελείται από τις πρωτεΐνες MRE11/RAD50/NBS1 και συμμετέχει στη μεταγωγή σημάτων
- **MSI**: μικροδορυφορική αστάθεια
- **NER** (nucleotide excision repair): επιδιόρθωση με εκτομή νουκλεοτιδίων
- **NGS** (Next Generation Sequencing): Αλληλούχηση Νέας Γενέας
- **NLS**: αλληλουχίες που είναι υπεύθυνες για την πυρηνική εντόπιση μίας πρωτεΐνης
- **OB** (oligonucleotide binding): περιοχές πρόσδεσης μονόκλωνου DNA
- **OvCa**: καρκίνος των ωοθηκών
- **PNC**: καρκίνος του παγκρέατος
- **PR**: υποδοχείς προγεστερόνης
- **PrCa**: καρκίνος του προστάτη
- **PRD**: περιοχή πλούσια σε προλίνες
- **Rad9-hus1-Rad1**: πρωτεϊνικό σύμπλοκο που συμμετέχει στην αναγνώριση των θραύσεων μονής αλυσίδας του DNA
- **RPA**: πρωτεϊνικό σύμπλοκο που συμμετέχει στην αναγνώριση των θραύσεων μονής αλυσίδας του DNA
- **SCD** (SQ/TQ cluster domain): περιοχή με άφθονα ζεύγη σερίνης/γλουταμίνης και θρεονίνης/γλουταμίνης
- **SINEs** (Short interspersed elements): βραχέα διάσπαρτα στοιχεία

- **ssDNA breaks:** θραύσεις μονής αλυσίδας του DNA
- **TAD:** πρωτεΐνη που είναι υπεύθυνη για τη μεταγραφική ικανότητα του μορίου TP53
- **TAFs:** παράγοντες που σχετίζονται με τις πρωτεΐνες πρόσδεσης στο TATA box
- **TD (tower domain):** προεξέχουσα περιοχή πρόσδεσης δίκλωνου DNA
- **TD (tetramerization domain):** περιοχή που είναι υπεύθυνη για το τετραμερισμό του μορίου TP53
- **TNBC:** τριπλά αρνητικός καρκίνος
- **VEGF:** αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας

Εισαγωγή

1. Βλάβες του γενετικού υλικού

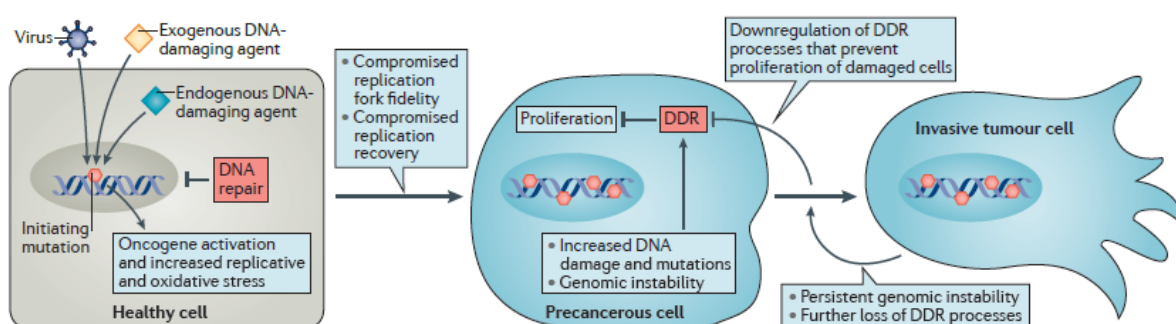
Το ανθρώπινο σώμα αποτελείται από $\sim 10^{13}$ κύτταρα. Σε κάθε κύτταρο του ανθρώπινου σώματος καθημερινά συμβαίνουν ~ 70.000 γενετικές βλάβες. Οι βλάβες αυτές μπορεί να οφείλονται είτε σε ενδογενείς, είτε σε περιβαλλοντικούς παράγοντες. Εξωγενείς παράγοντες είναι η υπεριώδης ακτινοβολία, η ιονίζουσα ακτινοβολία ακτίνων γ και x και διάφορες χημικές ουσίες (χημειοθεραπευτικοί και αλκυλιωτικοί παράγοντες). Συχνοί ενδογενείς στρεσογόνοι παράγοντες είναι οι θραύσεις μονής αλυσίδας DNA (ssDNA breaks), οι οποίες μπορεί να προκύψουν κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού από οξειδωτικές βλάβες ή από υδρόλυση των βάσεων. Αυτές οι θραύσεις μπορεί τελικά να εξελιχθούν σε θραύσεις διπλής αλυσίδας του DNA (dsDNA breaks). Οι θραύσεις διπλής αλυσίδας είναι πιο σπάνιες, αλλά και με πιο καταστροφικά αποτελέσματα [1].

Για την αντιμετώπιση αυτών των βλαβών τα κύτταρα έχουν αναπτύξει πολύπλοκους ρυθμιστικούς μηχανισμούς, οι οποίοι είναι γνωστοί ως μηχανισμοί απόκρισης σε βλάβες του DNA (DNA damage response, DDR). Ο όρος DDR αναφέρεται σε ένα πολύπλοκο δίκτυο σηματοδοτικών μονοπατιών, τα οποία συνδέονται και συνεργάζονται με σκοπό την επιδιόρθωση των αλλοιώσεων του γενετικού υλικού. Αρχικά, ο DDR αναγνωρίζει τη βλάβη και μέσω μονοπατιών μεταγωγής σημάτων, προωθεί την επιδιόρθωση της. Η μεταγωγή του σήματος λόγω της παρουσίας της βλάβης επιτυγχάνεται μέσω δύο πρωτεϊνικών συμπλόκων. Το σύμπλοκο MRN, το οποίο αποτελείται από τις πρωτεΐνες MRE11/RAD50/NBS1, αναγνωρίζει τις θραύσεις της δίκλωνης αλυσίδας και στρατολογεί την πρωτεϊνική κινάση ATM, ενώ οι θραύσεις μονής αλυσίδας αναγνωρίζονται από τα σύμπλοκα RPA (replication protein A) και Rad9-hus1-Rad1 (9-1-1), οι οποίες στρατολογούν την κινάση ATR. Στη συνέχεια αυτές οι κινάσες φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν τις κινάσες Chk2 και Chk1, καθώς και άλλα υποστρώματα με σκοπό την έναρξη της επιδιόρθωσης του γενετικού υλικού μέσω των αντίστοιχων επιδιορθωτικών μηχανισμών. Αν η βλάβη δεν μπορεί να επιδιορθωθεί, το κύτταρο οδηγείται σε απόπτωση ή σε κυτταρική γήρανση [2, 3].

2. Διατήρηση της κυτταρικής ακεραιότητας

Στη διατήρηση της κυτταρικής σταθερότητας και ακεραιότητας συμμετέχουν διάφοροι μηχανισμοί, όπως είναι οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί, ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου και η απόπτωση. Ανάλογα με τη βλάβη του γενετικού υλικού, ενεργοποιείται και το αντίστοιχο

μονοπάτι επιδιόρθωσης. Επίσης, όταν εντοπίζεται κάποια βλάβη στο DNA, ενεργοποιείται και μηχανισμός ελέγχου του κυτταρικού κύκλου με αποτέλεσμα την αναστολή της προόδου του και την παρεμπόδιση της μετάβασης από τη μία φάση του κύκλου στην επόμενη. Η διακοπή αυτή μπορεί να είναι παροδική ή μόνιμη και εμποδίζει το κύτταρο να μεταβεί από τη G1 στη φάση S και από τη φάση G2 στην M. Επιπλέον, η απόπτωση φυσιολογικά είναι ένας μηχανισμός που οδηγεί το κύτταρο σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Όταν σε ένα κύτταρο εντοπίζονται πολλές γενετικές αλλοιώσεις οι οποίες δεν μπορούν να επιδιορθωθούν, τότε αυτό οδηγείται σε απόπτωση. Αντίστοιχα, η μείωση του μήκους των τελομερών που συμβαίνει μετά από κάθε κυτταρική διαίρεση, οδηγεί τελικά στη γήρανση των κυττάρων. Τα καρκινικά κύτταρα για να μπορέσουν να αθανатоποιηθούν, ενεργοποιούν κάποιο μηχανισμό, συνήθως μέσω της υπερέκφρασης της τελομεράσης, για τη διατήρηση του μήκους των τελομερών τους. Όταν αυτοί οι ρυθμιστικοί μηχανισμοί δε λειτουργούν σωστά, τότε το αποτέλεσμα είναι η επικείμενη γενετική αστάθεια, η οποία και αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα των καρκινικών κυττάρων. Στην εικόνα 1 παρουσιάζεται σχηματικά η αλληλουχία των γεγονότων που οδηγούν σε γενετική αστάθεια και τελικά στη δημιουργία καρκινικών κυττάρων [4].



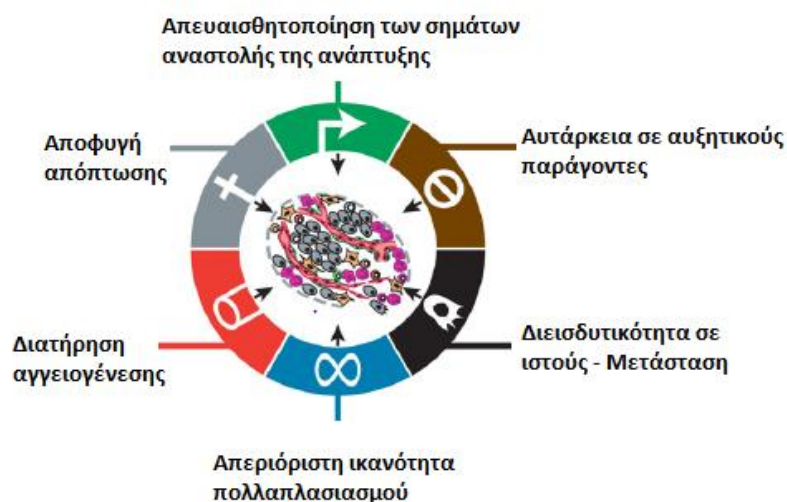
Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση της αλληλουχίας των γεγονότων που οδηγούν σε καρκινογένεση (Ανατύπωση από Jeggo P., et al., Nat. Rev. Cancer, 2016).

3. Χαρακτηριστικά γνωρίσματα των καρκινικών κυττάρων

Τα καρκινικά κύτταρα διέπονται από κάποια χαρακτηριστικά γνωρίσματα. Το κύριο χαρακτηριστικό τους γνώρισμα είναι η γενετική αστάθεια, που προαναφέρθηκε, ενώ άλλα επιμέρους γνωρίσματα είναι:

- Η ικανότητα τους να πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα, μέσω ανάπτυξης μηχανισμών που τους επιτρέπει τη σηματοδότηση για αδιάκοπο πολλαπλασιασμό.

- Η απευαισθητοποίησή τους έναντι στους ελεγκτικούς μηχανισμούς που αναστέλλουν την κυτταρική ανάπτυξη, επιτρέποντας τον συνεχή πολλαπλασιασμό τους. Σε πολλά από αυτά τα μονοπάτια συμμετέχουν κυρίως ογκοκατασταλτικά γονίδια.
- Η ικανότητά τους να καταστρατηγούν τη διαδικασία της απόπτωσης. Αυτό συνήθως επιτυγχάνεται όταν η πρωτεΐνη *TP53* δεν είναι λειτουργική, γι' αυτό και η παρουσία παθογόνων μεταλλαγών στο συγκεκριμένο ογκοκατασταλτικό γονίδιο είναι αρκετά συχνή στα καρκινικά κύτταρα.
- Η διατήρηση του μήκους των τελομερών τους.
- Όπως και τα φυσιολογικά κύτταρα, έτσι και τα καρκινικά για να καλύψουν τις αυξημένες θρεπτικές τους ανάγκες, καθώς και τις ανάγκες τους σε οξυγόνο, αναπτύσσουν δικό τους σύστημα αγγειογένεσης, κυρίως μέσω της σηματοδότησης ογκογονιδίων που οδηγούν στην υπερέκφραση του VEGF.
- Αναπτύσσουν την ικανότητα να διηθούν τοπικά γειτονικούς ιστούς, αλλά και αγγεία (αιμοφόρα και λεμφικά) με αποτέλεσμα να μεθίστανται σε απομακρυσμένους ιστούς δημιουργώντας νέες καρκινικές εστίες. Αυτό αποτελεί και την αιτία, στις περισσότερες περιπτώσεις, που μία κακοήθεια μπορεί να αποβεί θανατηφόρα. Στην εικόνα 2 παρουσιάζονται αναλυτικά τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα των καρκινικών κυττάρων [5].



Εικόνα 2. Χαρακτηριστικά γνωρίσματα των καρκινικών κυττάρων. Ανατύπωση από Hanahan, D., et al., *Cell*, 2011.

4. Γονίδια που εμπλέκονται στην καρκινογένεση

4.1 Πρωτο - ογκογονίδια

Τα πρωτο-ογκογονίδια των φυσιολογικών κυττάρων είναι πολύ σημαντικά ρυθμιστικά γονίδια, τα οποία συνήθως κωδικοποιούν πρωτεΐνες που ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Σε αντίθεση, τα ογκογονίδια είναι ή μεταλλαγμένα πρωτο-ογκογονίδια ή πρωτο-ογκογονίδια που κωδικοποιούν την ίδια πρωτεΐνη σε μη φυσιολογικά επίπεδα (συνήθως υπερεκφράζονται). Το αποτέλεσμα είναι ο μη φυσιολογικός κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η ογκογένεση. Μέχρι στιγμής έχουν περιγραφεί περισσότερα από 100 ογκογονίδια.

Υπάρχουν διάφοροι τρόποι για να μετατραπεί ένα πρωτο-ογκογονίδιο σε ογκογονίδιο. Μπορεί να συμβεί μία σημειακή μεταλλαγή στην κωδική αλληλουχία, ενεργοποιώντας έτσι το ογκογονίδιο. Εναλλακτικά μπορεί να ενεργοποιηθεί το ογκογονίδιο χωρίς να αλλάξει το πρωτεϊνικό προϊόν, μεταβάλλοντας όμως τα επίπεδα πρωτεΐνης που παράγονται. Το πρώτο ογκογονίδιο που περιγράφηκε στον άνθρωπο ήταν το *ras*, το οποίο είχε ενεργοποιηθεί από μία μεταλλαγή που είχε συμβεί στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου (αντικατάσταση της γλυκίνης από βαλίνη). Τα μέλη της οικογένειας *ras* είναι τα ογκογονίδια που απαντώνται πιο συχνά στους όγκους και εμπλέκονται περίπου στο 25% όλων των όγκων. Συγκεκριμένα, εντοπίζονται στο 50% των κακοηθειών του παχέος εντέρου και στο 25% των κακοηθειών του πνεύμονα.

Εκτός από τις σημειακές μεταλλαγές, υπάρχουν και άλλοι τρόποι για την ενεργοποίηση ενός ογκογονιδίου, όπως είναι η γονιδιακή ενίσχυση. Αυτό μπορεί να συμβεί αν διπλασιαστεί ή πολλαπλασιαστεί η περιοχή που εδράζεται το ογκογονίδιο με αποτέλεσμα την υπερέκφρασή του. Επίσης, οι χρωμοσωμικές αναδιατάξεις, όπως είναι οι αμοιβαίες μετατοπίσεις μεταξύ μη ομόλογων χρωμοσωμάτων, μπορεί να οδηγήσουν στην ενεργοποίηση ενός ογκογονιδίου. Ένα τέτοιο χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το χρωμόσωμα Philadelphia, που απαντάται στη χρόνια μυελογενή λευχαιμία και προκύπτει από την αμοιβαία μετατόπιση ανάμεσα στα χρωμοσώματα 9 και 22. Το αποτέλεσμα της μετατόπισης είναι η δημιουργία μίας χμαιρικής πρωτεΐνης (Bcr-Abl), η οποία έχει ως συνέπεια την απώλεια ελέγχου της ενεργότητας κινάσης τυροσίνης της πρωτεΐνης Abl. [6, 7].

4.2 Ογκοκατασταλτικά γονίδια

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια φυσιολογικά συμμετέχουν σε ρυθμιστικούς μηχανισμούς, οι οποίοι ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (αναστέλλοντάς τον) ή είναι απαραίτητα για τη διατήρηση της ακεραιότητας του γενετικού υλικού. Απαραίτητη προϋπόθεση για την ανάπτυξη κακοήθειας είναι η απενεργοποίηση και των δύο αλληλομόρφων. Η προδιάθεση δημιουργίας όγκων τέτοιου είδους μπορεί είτε να κληρονομηθεί μέσω των γαμετικών κυττάρων είτε να προκύψει από σωματικές μεταλλάξεις.

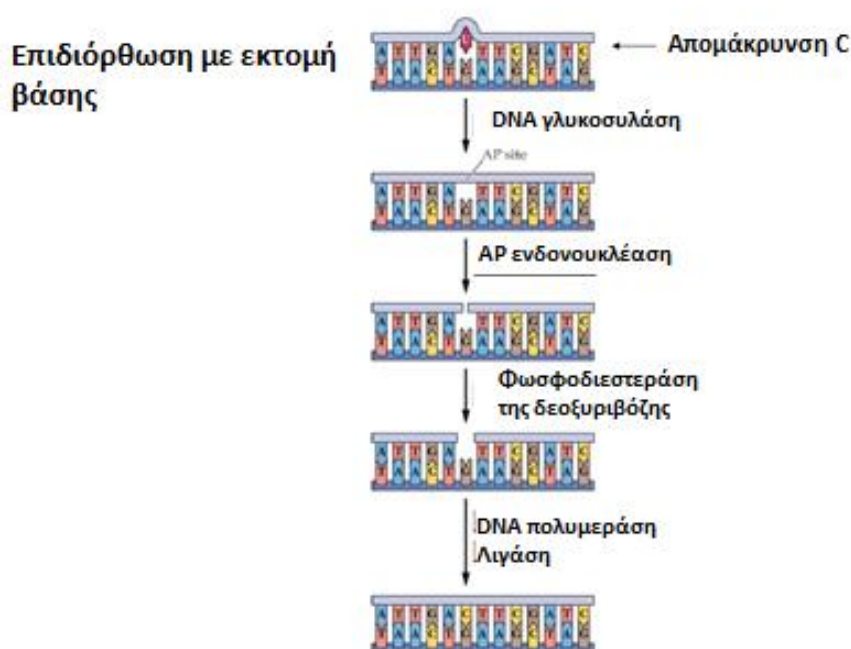
Το πρώτο ογκοκατασταλτικό γονίδιο που χαρακτηρίστηκε είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη RB. Το ρετινοβλάστωμα είναι μία κακοήθεια του αμφιβληστροειδούς που εμφανίζεται στην παιδική ηλικία. Αν η ασθένεια διαγνωστεί έγκαιρα μπορεί να θεραπευθεί. Ένα άλλο ογκοκατασταλτικό γονίδιο που χαρακτηρίστηκε είναι το *TP53*. Φυσιολογικά η πρωτεΐνη p53 ενεργοποιείται όταν εντοπίζονται βλάβες στο DNA, με αποτέλεσμα είτε τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου, είτε την απόπτωση. Ουσιαστικά η πρωτεΐνη p53 καθορίζει τη μοίρα του κυττάρου μετά την αναγνώριση βλαβών του γενετικού υλικού, δηλαδή αν θα επιβιώσει ή θα οδηγηθεί σε κυτταρικό θάνατο. Μεταλλάξεις στο γονίδιο *TP53*, που οδηγούν στην απενεργοποίησή του, ανευρίσκονται στο 50% των περιπτώσεων καρκίνου στον άνθρωπο. Το γεγονός ότι απενεργοποίηση του γονιδίου ανευρίσκεται σε πολλούς και διαφορετικούς καρκίνους, υποδηλώνει αφενός ότι συμμετέχει σε ένα πιο γενικό μηχανισμό ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και αφετέρου τη σημαντικότητα αυτού του γονιδίου [6, 7].

5. Μονοπάτια επιδιόρθωσης βλαβών του γενετικού υλικού

Ύστερα από πρόκληση οποιοσδήποτε αλλοίωσης του γενετικού υλικού, αυτή πρέπει να αναγνωριστεί άμεσα από ειδικά μόρια αναγνώρισης και να σηματοδοτηθεί η επιδιόρθωσή της από τον κατάλληλο μηχανισμό επιδιόρθωσης, ενώ το κύτταρο ανάλογα με τη φύση της βλάβης και τη φάση του κυτταρικού κύκλου που βρίσκεται, οδηγείται σε παύση των κυτταρικών διεργασιών. Ανάλογα με τον τύπο της αλλοίωσης υπάρχει και το αντίστοιχο μονοπάτι επιδιόρθωσης, όπως είναι η επιδιόρθωση με εκτομή βάσης και με εκτομή νουκλεοτιδίων, ο μηχανισμός επιδιόρθωσης αταίριαστων βάσεων, ενώ οι δίκλωνες ρήξεις επιδιορθώνονται μέσω της σύνδεσης μη-ομόλογων άκρων και του ομόλογου ανασυνδυασμού.

5.1 Επιδιόρθωση με εκτομή βάσης και εκτομή νουκλεοτιδίων (base excision repair, BER & nucleotide excision repair, NER)

Ο μηχανισμός εκτομής βάσεων απομακρύνει μεμονωμένες μη φυσιολογικές βάσεις που εντοπίζονται στο γενετικό υλικό. Μία τέτοια συχνή περίπτωση είναι όταν εντοπίζεται ένα νουκλεοτίδιο ουρακίλης στο DNA. Τέτοια κατάλοιπα μπορούν να δημιουργηθούν είτε με απαμίνωση της κυτοσίνης, είτε με τυχαία ενσωμάτωση της τριφωσφορικής δεοξυουριδίνης αντί της θυμίνης κατά τη σύνθεση του DNA. Αρχικά η γλυκοζυλάση του DNA εντοπίζει και καταλύει την εκτομή της ουρακίλης, η οποία και απομακρύνεται, ενώ η πολυμεράση του DNA και στη συνέχεια η λιγάση του DNA αποκαθιστούν το κενό που δημιουργήθηκε. Στην εικόνα 3 παρουσιάζεται σχηματικά το μονοπάτι επιδιόρθωσης με εκτομή βάσης.

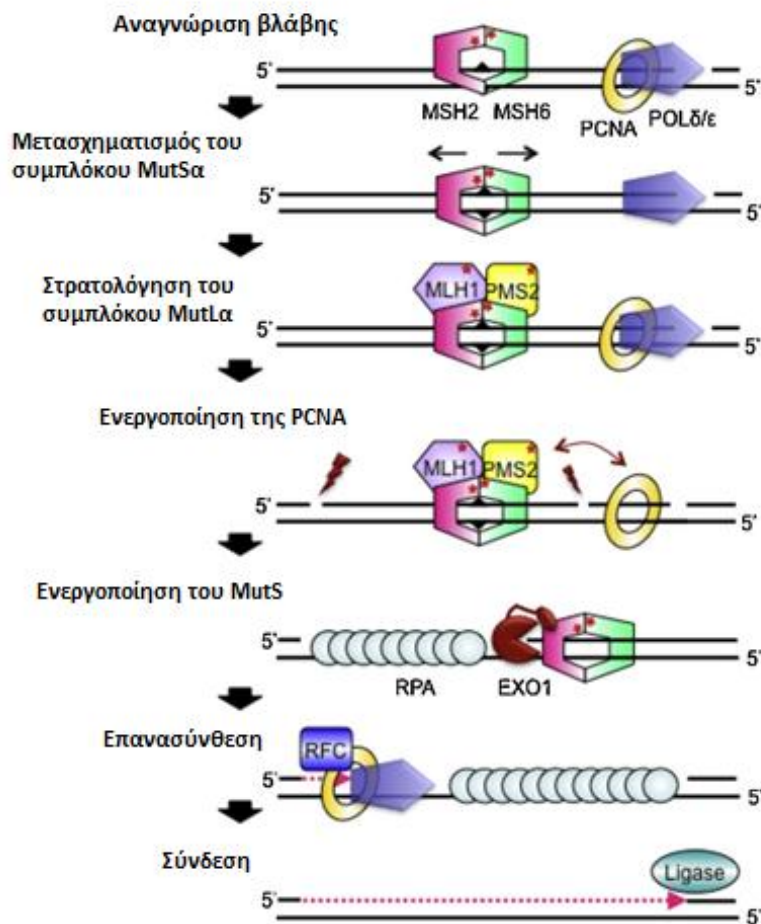


Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού επιδιόρθωσης με εκτομή βάσης (Ανατύπωση από <https://www.slideshare.net/najmhemato/dna-repair>)

Στο DNA, όμως, εντοπίζονται και άλλες αλλοιώσεις, όπως είναι τα διμερή πυριμιδίνης και οι ογκώδεις ομάδες, οι οποίες δε μπορούν να αναγνωριστούν από τη DNA γλυκοζυλάση. Σε αυτές τις περιπτώσεις ενεργοποιείται το σύστημα επιδιόρθωσης με εκτομή νουκλεοτιδίου, το οποίο απομακρύνει τις βάσεις με τη βλάβη ως τμήμα ενός ολιγονουκλεοτιδίου [8].

5.2 Επιδιόρθωση αταίριαστων βάσεων (Mismatch Repair, MMR)

Το σύστημα αυτό εντοπίζει και επιδιορθώνει αταίριαστα ζεύγη βάσεων που προκύπτουν λόγω σφαλμάτων κατά τη διάρκεια της αντιγραφής. Ο πρωταρχικός έλεγχος και η απομάκρυνση των αταίριαστων βάσεων πραγματοποιείται από την DNA πολυμεράση. Το νεοσυντιθέμενο DNA υποβάλλεται σε περαιτέρω έλεγχο και ένας δεύτερος μηχανισμός επιδιορθώνει τις αταίριαστες βάσεις που έχουν διαφύγει του πρώτου ελέγχου. Το σύστημα αυτό αναγνωρίζει, αποκόπτει και αντικαθιστά την αταίριαστη βάση στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα [8]. Στην εικόνα 4 απεικονίζεται σχηματικά το μονοπάτι της επιδιόρθωσης αταίριαστων βάσεων.



Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση της επιδιόρθωσης αταίριαστων βάσεων. (Erie D.A., et al., Elsevier, 2014).

Ο μηχανισμός επιδιόρθωσης αταίριαστων βάσεων είναι ένα εξαιρετικά συντηρημένο σύστημα στους οργανισμούς. Αρχικά μελετήθηκε εκτενώς στην *E. Coli*, το οποίο παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με το αντίστοιχο στον άνθρωπο. Το μονοπάτι μπορεί να

λειτουργήσει και προς τις δύο κατευθύνσεις ($5' \rightarrow 3'$ & $3' \rightarrow 5'$) ανάλογα σε ποια αλυσίδα εντοπίζεται η βλάβη. Η θυγατρική αλυσίδα διακρίνεται από τη μητρική λόγω της παρουσίας των εγκοπών που φέρει το νεοσυντιθέμενο μόριο στα άκρα των τμημάτων Okazaki, ενώ η μητρική διακρίνεται από την παρουσία του αναπτυσσόμενου $3'$ άκρου. Η πρωτεΐνη hMSH2 σχηματίζει ένα διμερές με την η hMSH6, το οποίο αναγνωρίζει τις αταίριαστες βάσεις. Στη συνέχεια, η hMLH1 σχηματίζει ένα διμερές με την hPMS2, το οποίο κατευθύνει την επιδιόρθωση της αταίριαστης βάσης [9]. Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση αταίριαστων βάσεων καθώς και η λειτουργία τους.

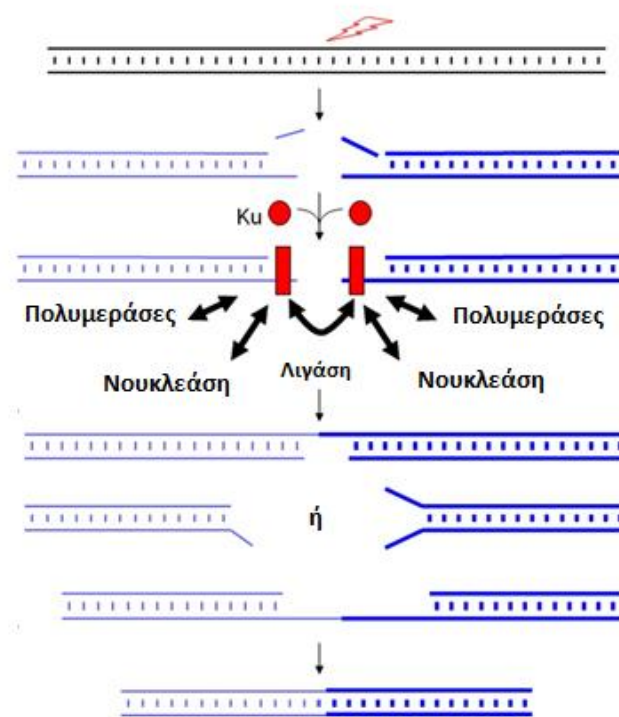
Πίνακας 1. Πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση αταίριαστων βάσεων καθώς και η λειτουργική τους σημασία στο μονοπάτι επιδιόρθωσης.

Πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο μονοπάτι επιδιόρθωσης αταίριαστων βάσεων	Λειτουργία των πρωτεϊνών
hMutSa (MSH2-MSH6)	Αναγνώριση της βλάβης του DNA
hMutSβ (MSH2-MSH3)	
hMutLa (MLH1-PMS2)	Επιδιόρθωση της βλάβης
hMutLβ (MLH1-PMS3)	
hMutLγ (MLH1-PMS1)	
?	Διάκριση μεταξύ των δύο αλυσίδων
?	Δράση DNA ελικάσης
ExoI	Εκτομή των αταίριαστων βάσεων
Poiδ	Σύνθεση του DNA
PCNA	Εκκίνηση του MMR μηχανισμού
RPA	Πρόσδεση στη μονή αλυσίδα, διέγερση της εκτομής αταίριαστων βάσεων, τερματισμός της εκτομής, επαγωγή της σύνθεσης DNA

HMGB1	Πρόκληση εκτομής αταίριαστων βάσεων
RFC	Στρατολόγηση PCNA, επιδιόρθωση με κατευθυνση 3', ενεργοποίηση της ενδονουκλεάσης hMutLa
DNA λιγάση I	Σύνδεση

5.3 Επιδιόρθωση δίκλωνων θραύσεων με σύνδεση μη ομόλογων άκρων

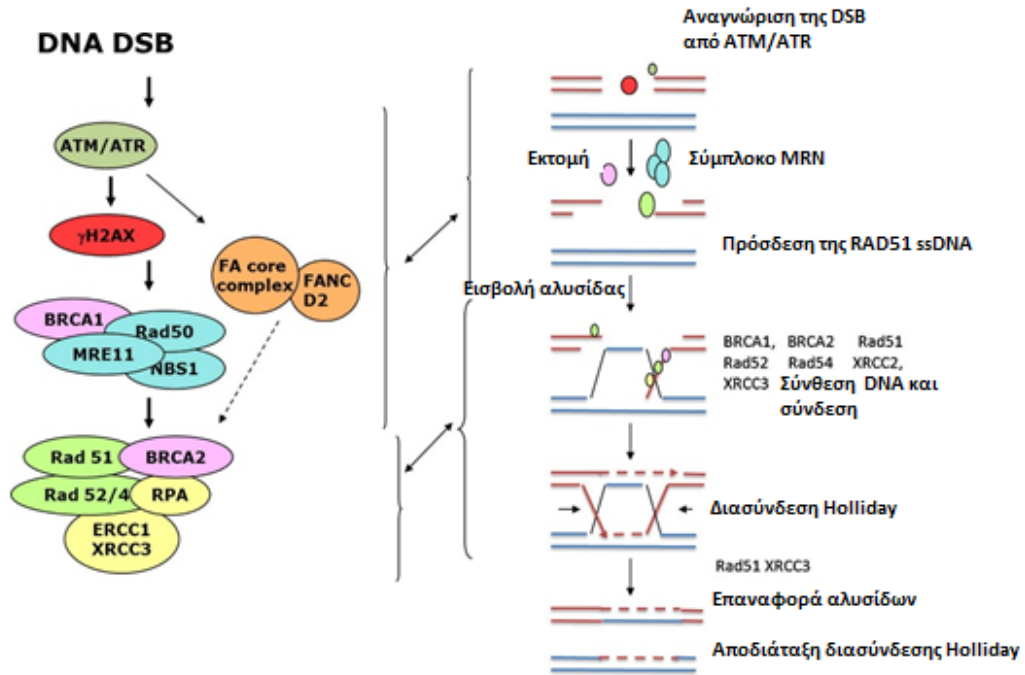
Οι θραύσεις των δίκλωνων αλυσίδων επηρεάζουν και τις δύο αλυσίδες και μπορούν να επιδιορθωθούν με επανασύνδεση των κομμένων άκρων του DNA. Αυτός ο μηχανισμός επιδιόρθωσης είναι επιρρεπής σε λάθη, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε αλλοιώσεις της αλληλουχίας του DNA. Η αναγνώριση της ρήξης επιτυγχάνεται από ένα ετεροδιμερές, το οποίο απαρτίζεται από τις πρωτεΐνες Ku70 και Ku80. Το σύμπλοκο αυτό προσδένεται στο σημείο της θραύσης, συγκρατώντας τα δύο άκρα κοντά, επιτρέποντας με αυτό τον τρόπο στις άλλες πρωτεΐνες να δράσουν. Σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της επιδιόρθωσης διαδραματίζει η εξαρτώμενη από το DNA πρωτεϊνική κινάση (DNA-dependent protein kinase, DNA-PKcs), η οποία και φωσφορυλιώνει πρωτεϊνικούς στόχους, όπως είναι η πρωτεΐνη Άρτεμις. Η σύνδεση των άκρων επιτυγχάνεται από τη DNA λιγάση IV που δρα συνδυαστικά με την XRCC4 [10]. Στην εικόνα 5 απεικονίζεται σχηματικά ο μηχανισμός επιδιόρθωσης δίκλωνων θραύσεων με σύνδεση μη ομόλογων άκρων μετά από θραύση της δίκλωνης αλυσίδας του DNA.



Εικόνα 5. Το μονοπάτι της επιδιόρθωσης δίκλωνων θραύσεων με σύνδεση μη ομόλογων άκρων. (Ανατύπωση από Rappunzio N. R., et al., DNA repair, 2014).

5.4 Ομόλογος ανασυνδυασμός

Ο ομόλογος ανασυνδυασμός είναι ένας μηχανισμός που στα ευκαρυωτικά κύτταρα είναι ενεργός μόνο κατά το στάδιο της αντιγραφής του DNA και χαρακτηρίζεται από μεγάλη ακρίβεια. Οι ρήξεις αυτές μπορεί να προκύψουν είτε από βλάβες, είτε μετά από ανταλλαγή γενετικού υλικού ανάμεσα στα ομόλογα χρωμοσώματα. Αρχικά, στην περιοχή της βλάβης η δίκλωνη αλυσίδα αποικοδομείται από νουκλεάσες και αποδιατάσσεται. Στη συνέχεια, τα άκρα αυτά εισβάλλουν στο ομόλογο μόριο, το οποίο και χρησιμοποιούν ως καλούπι για την ανασύνθεση της αλυσίδας που εντοπίζεται η ρήξη, με τη δράση της πολυμεράσης και της λιγάσης του DNA, οδηγώντας στην αποκατάσταση της βλάβης [8]. Στην εικόνα 6 παρουσιάζονται τα κύρια γονίδια που συμμετέχουν στον ομόλογο ανασυνδυασμό, καθώς και όλη η σειρά των γεγονότων που ακολουθείται μέχρι την αποκατάσταση της θραύσης.



Εικόνα 6. Γονίδια που συμμετέχουν στον ομόλογο ανασυνδυασμό και σχηματική απεικόνιση του μονοπατιού. (Ανατύπωση από Cerbinskaite A., et al., *Canc. Treatm. Rev.* 2012).

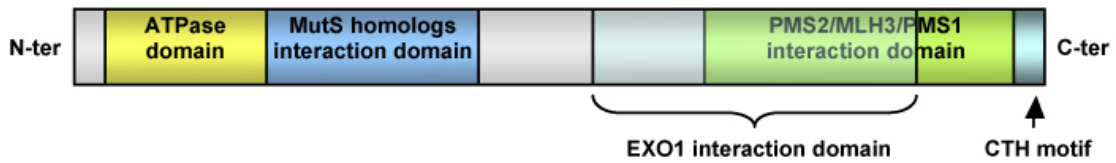
6. Γονίδια που συμμετέχουν σε επιδιορθωτικά μονοπάτια – Ογκοκατασταλτικά γονίδια

6.1 Γονίδια που συμμετέχουν στο μονοπάτι της επιδιόρθωσης αταίριαστων βάσεων

6.1.1 *MLH1*

Το γονίδιο *MLH1* εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 3, αποτελείται από 19 εξόνια (756 αμινοξέα) και κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη 84.6kD. Είναι εξαιρετικά συντηρημένο στους διάφορους οργανισμούς και παρουσιάζει 43% ομολογία με τη ζύμη. Σχηματίζει ετεροδιμερές με το *PMS2* ώστε να δημιουργηθεί το σύμπλοκο MutLα που είναι απαραίτητο στην επιδιόρθωση αταίριαστων βάσεων [11]. Στην εικόνα 7 παρουσιάζονται σχηματικά οι λειτουργικές περιοχές της πρωτεΐνης *MLH1*.

MLH1 protein (756 aa ; 84.6 kDa)



Εικόνα 7. Σχηματική αναπαράσταση των λειτουργικών περιοχών της πρωτεΐνης MLH1. (Ανατύπωση από Raevaara T.E., et al., *Gastroenterology*, 2005)

6.1.2 MSH2

Το γονίδιο *MSH2* συμμετέχει στην επιδιόρθωση του DNA μέσω του μηχανισμού αταίριαστων βάσεων σχηματίζοντας ετεροδιμερές με το *MSH6*, ένα σύμπλοκο που είναι απαραίτητο για την αναγνώριση των αταίριαστων βάσεων. Εδράζεται στο χρωμόσωμα 2, αποτελείται από 16 εξόνια, τα οποία κωδικοποιούν μία πρωτεΐνη μήκους 934 αμινοξέων [12]. Στο αμινοτελικό άκρο του γονιδίου εντοπίζεται η περιοχή που προσδένεται στο DNA, στη μέση περίπου του γονιδίου είναι η περιοχή που αλληλεπιδρά με το *MSH6*, ενώ στο καρβοξυτελικό άκρο εντοπίζεται η περιοχή αλληλεπίδρασης με το σύμπλοκο MutL. Στην εικόνα 8 παρουσιάζονται σχηματικά οι λειτουργικές περιοχές της πρωτεΐνης *MSH2*.



Εικόνα 8. Σχηματική αναπαράσταση των λειτουργικών περιοχών της πρωτεΐνης *MSH2*. (Ανατύπωση από Lamers M. H., et al., *Nature*, 2000).

6.1.3 MSH6

Το γονίδιο *MSH6* εδράζεται στο χρωμόσωμα 2, αποτελείται από 10 εξόνια, τα οποία κωδικοποιούν μία πρωτεΐνη μεγέθους 160 kD. Περιέχει μία συντηρημένη περιοχή, τη Walker – A motif, ενώ στο αμινοτελικό της άκρο εντοπίζεται μία περιοχή που είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά της πρωτεΐνης στον πυρήνα. Επίσης, σχηματίζει ετεροδιμερές με την *MSH2* [13, 14]. Στην εικόνα 9 παρουσιάζονται σχηματικά οι λειτουργικές περιοχές της πρωτεΐνης *MSH6*.



Εικόνα 9. Σχηματική αναπαράσταση των λειτουργικών περιοχών της πρωτεΐνης MSH6. (Ανατύπωση απο Kariola R., et al., *Hum. Mol. Genetics* 2002).

6.1.4 PMS2

Το γονίδιο *PMS2* εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 7, αποτελείται από 15 εξόνια (~35000 ζεύγη βάσεων), τα οποία κωδικοποιούν μία πρωτεΐνη μήκους 862 αμινοξέων. Σχηματίζει ετεροδιμερές με το γονίδιο *MLH1* μέσω του καρβοξυτελικού άκρου του. Η κρυσταλλική δομή του αμινοτελικού άκρου του κατέδειξε την ικανότητά του να υδρολύει το ATP και να προσδένεται στο DNA. Η ύπαρξη πολλών ψευδογονιδίων, με μεγάλη ομολογία με την αλληλουχία του *PMS2*, έχει καταστήσει δύσκολη την ανάλυση του γονιδίου. Συνολικά έχουν ανευρεθεί 15 ψευδογονίδια, εκ των οποίων τα 14 (ψ1-14) παρουσιάζουν ομολογία με τα εξόνια 1-5, ενώ το *PMS2CI* (ψ0) έχει μεγάλη ομολογία με τα εξόνια 9 και 11-15 [15].

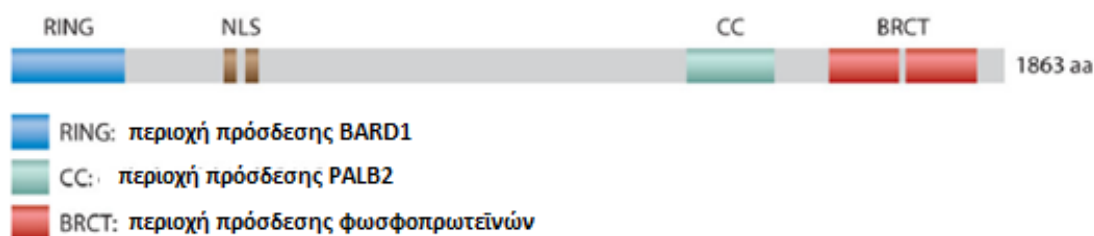
6.2 Γονίδια του Ομόλογου Ανασυνδυασμού

6.2.1 BRCA1

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *BRCA1* κλωνοποιήθηκε το 1994 και χαρακτηρίστηκε ως γονίδιο προδιάθεσης του καρκίνου του μαστού/ωοθηκών. Εδράζεται στο χρωμόσωμα 17, αποτελείται από 24 εξόνια που κωδικοποιούν μία πρωτεΐνη μήκους 1863 αμινοξέων, μοριακού βάρους 220 kD. Η κυτταρική λειτουργία της πρωτεΐνης *BRCA1* διερευνήθηκε εκτενώς και αποδείχθηκε ότι παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ακεραιότητας του γενετικού υλικού, μέσω της συμμετοχής της σε διάφορα μονοπάτια, όπως η επιδιόρθωση βλαβών του DNA, ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου, η ρύθμιση της μεταγραφής και η απόπτωση [16].

Το γονίδιο *BRCA1* αποτελείται από τις παρακάτω λειτουργικές περιοχές, την περιοχή RING που εντοπίζεται στο αμινοτελικό άκρο και περιλαμβάνει τα εξόνια 2-7 (1-109 αμινοξέα). Πρόκειται για μία πολύ συντηρημένη περιοχή, στην οποία εντοπίζονται οι περιοχές δέσμευσης του ψευδαργύρου. Αλληλεπιδρά με το γονίδιο *BARD1* και παίζει σημαντικό

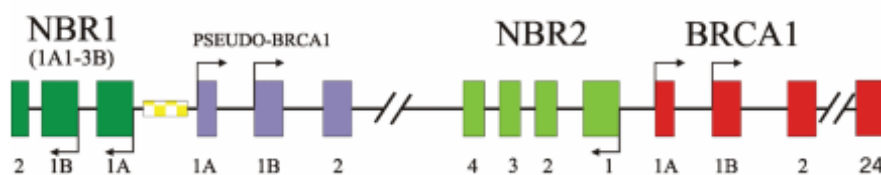
ρόλο στο μονοπάτι της ουβικιτινοποίησης. Η κεντρική περιοχή του γονιδίου, η οποία περιλαμβάνει τα εξόνια 11-13 αλληλεπιδρά με πληθώρα πρωτεϊνών, όπως οι Rb, c-Myc, RAD50 και RAD51, που συμμετέχουν σε διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια π.χ. στην αντιγραφή του DNA, στον κυτταρικό κύκλο, στη μεταγραφή και στην επιδιόρθωση βλαβών του γενετικού υλικού. Στο εξόνιο 11, που κωδικοποιεί ~60% της BRCA1, εντοπίζονται δύο περιοχές στις οποίες εδράζονται αλληλουχίες (NLS) που είναι υπεύθυνες για την πυρηνική εντόπιση της πρωτεΐνης. Οι αλληλουχίες αυτές βρίσκονται ανάμεσα στα αμινοξέα 501-507 και 607-614 και αλληλεπιδρούν με την ιμπορτίνη-α, διευκολύνοντας τη μεταφορά της BRCA1 από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα. Επίσης, η περιοχή με δομή σπείρας (coiled-coil, CC) αποτελεί το σημείο πρόσδεσης του γονιδίου *PALB2*, καθώς και τη θέση φωσφορυλίωσης από την ATM (SQ – cluster). Τέλος, στο καρβοξυτελικό άκρο, ανάμεσα στα αμινοξέα 1650-1863, εντοπίζεται η περιοχή BRCT η οποία αλληλεπιδρά με κινάσες που ενεργοποιούνται όταν αναγνωρίζεται βλάβη του γενετικού υλικού (ATM και ATR), με πρωτεΐνες που ελέγχουν τη μεταγραφή (p53, BACH1) καθώς και με πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση του DNA (CtIP, BRIP1, Abraxas) [16, 17]. Στην εικόνα 10 απεικονίζεται σχηματικά η δομή του γονιδίου *BRCA1*.



Εικόνα 10. Σχηματική αναπαράσταση της δομής του γονιδίου *BRCA1*. Στην εικόνα είναι διακριτές οι διαδοχικές λειτουργικές περιοχές του γονιδίου. Ανατύπωση από Chen C.C., et al., *Annu Rev Cancer Biol*, 2018.

Ανοδικά του γονιδίου *BRCA1*, συγκεκριμένα 44.5kb, εντοπίζεται μία διπλασιασμένη περιοχή που περιλαμβάνει τα εξόνια 1A, 1B και 2, καθώς και τα εσόνια που τα περιβάλλουν. Παρατηρήθηκε μεγάλη ομολογία του ψευδογονιδίου με το *BRCA1*, καταδεικνύοντας τις επιπτώσεις στη ρύθμιση της αντιγραφής, της μεταγραφής αλλά και της λειτουργίας του *BRCA1*. Επίσης, η ύπαρξη αυτής της περιοχής που έχει μεγάλη ομολογία με το *BRCA1* στο ίδιο χρωμόσωμα, το καθιστά επιρρεπές σε συμβάντα ανασυνδυασμού [18]. Στην εικόνα 11 αναπαριστάται η δομή της περιοχής που εντοπίζεται το γονίδιο *BRCA1* στο χρωμόσωμα 17.

HUMAN BRCA1 LOCUS



Εικόνα 11. Σχηματική αναπαράσταση της περιοχής που εντοπίζεται το γονίδιο *BRCA1* στο χρωμόσωμα 17.

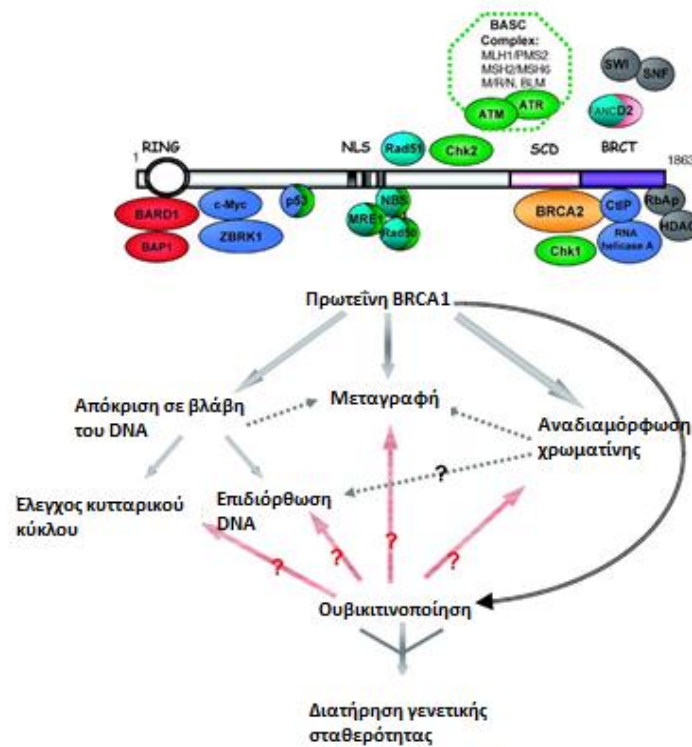
Η έκφραση της πρωτεΐνης διαφέρει ανάλογα με το στάδιο του κυτταρικού κύκλου. Κατά τις φάσεις G₀ και G₁ η έκφραση της *BRCA1* είναι σχετικά χαμηλή, ενώ αρχίζει να αυξάνεται στη φάση G₁/S και παραμένει σταθερή κατά τις φάσεις S, G₂, και M. Κατά το στάδιο S υπερφοσφορυλιώνεται και μετατοπίζεται στον πυρήνα, όπου και ελέγχει τις διαδικασίες επιδιόρθωσης του γενετικού υλικού, την αντιγραφή και την απενεργοποίηση του χρωμοσώματος X, ενώ στη φάση M αποφωσφορυλιώνεται.

Η πιο γνωστή λειτουργία της *BRCA1* είναι η επιδιόρθωση του DNA, μέσω του ομόλογου ανασυνδυασμού. Η ανεύρεση γενετικών βλαβών επάγουν τη μεταφορά της στον πυρήνα, εν συνεχεία υπερφοσφορυλιώνεται από κινάσες (ATM, ATR, Chk) και μεταφέρεται στο σημείο της θραύσης. Το επόμενο βήμα είναι η στρατολόγηση πρωτεϊνικών συμπλόκων που είναι απαραίτητα για την έναρξη της επιδιόρθωσης, καθώς και για τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου. Έτσι, αρχικά μέσω του εξονίου 11 στρατολογείται στην περιοχή της θραύσης το σύμπλοκο RAD50-MRE11-NBS1, ενώ το επόμενο βήμα είναι η σύνδεσή της με τη PALB2, η οποία δρα ως ικρίωμα για τον σχηματισμό του συμπλόκου *BRCA1-BRCA2*, καθώς και με άλλες πρωτεΐνες (RAD51) που είναι απαραίτητες στον ομόλογο ανασυνδυασμό [16].

Επίσης, η *BRCA1* αλληλεπιδρά και με διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες, όπως οι p53, ER-α, c-Myc, STAT1, GtIP, ZBRK1 καθώς και την RNA πολυμεράση II, ελέγχοντας έτσι τη μεταγραφή [19]. Χαρακτηριστικό είναι ότι σε συνθήκες στρες, η *BRCA1* ρυθμίζει τη δική της μεταγραφή με σκοπό τη διατήρηση της σταθερότητας του DNA. Είναι γνωστό ότι η *BRCA1* αλληλεπιδρά με τους μεταγραφικούς παράγοντες p53 και STAT1 μέσω του αμινοτελικού της άκρου (αμινοξέα 240-800), ενώ αλληλεπιδρά με την GtIP με το καρβοξυτελικό της άκρο. Συνεπώς, είναι εμφανές ότι η *BRCA1* συμμετέχει και στην επαγωγή και στην καταστολή της μεταγραφής, ανάλογα με το μονοπάτι το οποίο ενεργοποιεί. Επιπλέον, η *BRCA1* συμμετέχει στην καταστολή της κυτταρικής ανάπτυξης μέσω της αλληλεπίδρασής της με τη Rb.[16].

Η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης συμβαίνει γύρω από τα θραύσματα της διπλής έλικας του DNA με σκοπό τη διευκόλυνση της επιδιόρθωσης των βλαβών σε αυτό. Στη συγκεκριμένη διεργασία συμμετέχει η πρωτεΐνη BRCA1 ως συστατικό διαφόρων συμπλόκων τα οποία λειτουργούν ως μία μονάδα κατά τον ανασχηματισμό της χρωματίνης γύρω από την περιοχή της βλάβης του DNA. Η BRCA1 λειτουργεί και ως διακετυλάση των ιστονών αλληλεπιδρώντας με άλλα πρωτεϊνικά μόρια κατά τη διαδικασία της αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης [20].

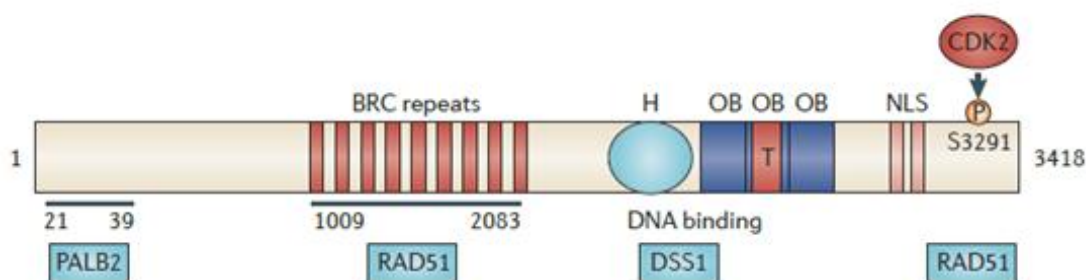
Τέλος, η BRCA1 επιτελεί μία σειρά από λειτουργίες και στο κυτταρόπλασμα. Αναλυτικά συμμετέχει στην κυτταρική διαίρεση (μίτωση), στην απόπτωση και στην επιδιόρθωση του μιτοχονδριακού DNA. Η δράση λιγάσης που έχει το σύμπλοκο BRCA1/BARD1 της επιτρέπει να ρυθμίζει το διπλασιασμό του κεντροσωματίου και κατ'έκταση τον σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου [16]. Στην εικόνα 12 παρουσιάζονται σχηματικά οι πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά η BRCA1 καθώς και όλες τις λειτουργίες στις οποίες συμμετέχει.



Εικόνα 12. Σχηματική αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων της BRCA1 καθώς και όλα τα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία συμμετέχει. (Ανατύπωση από Yarden R. I., et al., Mol. Can. Ther. 2006).

6.2.2 BRCA2

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *BRCA2* κλωνοποιήθηκε λίγο μετά το *BRCA1*, το 1995. Αποτελείται από 27 εξόνια μήκους 3418 αμινοξέων και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 3. Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν ομοιότητες ανάμεσα στη δομή των δύο γονιδίων, δεν παρατηρείται ομολογία ανάμεσα στις αλληλουχίες τους [16]. Η πρωτεΐνη *BRCA2* περιλαμβάνει μία περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DNA binding domain, DBD), η οποία της παρέχει τη δυνατότητα να προσδένεται και σε μονόκλωνο και σε δίκλωνο DNA καθώς και 8 BRC επαναλήψεις όπου προσδένεται η πρωτεΐνη RAD51. Η περιοχή DBD περιλαμβάνει μία περιοχή α-έλικας, 190 αμινοξέων και 3 περιοχές πρόσδεσης μονόκλωνου DNA (oligonucleotide binding, OB). Οι περιοχές αυτές παίζουν σημαντικό ρόλο στη σταθεροποίηση της *BRCA2*. Επίσης, στην περιοχή DBD εντοπίζεται και μία περιοχή πρόσδεσης δίκλωνου DNA, που προεξέχει (tower domain, TD). Στην εικόνα 13 παρουσιάζονται αναλυτικά οι λειτουργικές περιοχές της *BRCA2* [21].



Εικόνα 13. Σχηματική απεικόνιση των λειτουργικών περιοχών του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *BRCA2* (Ανατύπωση από Rohini R., et al., Nat. Rev. 2012).

Η κύρια λειτουργία της *BRCA2* επιτελείται μέσω του μονοπατιού του ομόλογου ανασυνδυασμού και συγκεκριμένα μέσω της αλληλεπίδρασής της με την πρωτεΐνη RAD51. Για την πρόσδεση της RAD51 στο καρβοξυτελικό άκρο της *BRCA2* είναι απαραίτητη η δράση της κινάσης που εξαρτάται από την κυκλίνη (cyclin-dependent kinase, CDK) [21]. Η *BRCA2* είναι υπεύθυνη για τον εντοπισμό της RAD51 στις περιοχές ρήξεων. Αρχικά λοιπόν, η *BRCA2* βοηθά στην πρόσδεση της RAD51 στο μονόκλωνο DNA, παρακάμπτοντας την πρωτεΐνη RPA, η οποία φυσιολογικά προσδένεται και καλύπτει το μονόκλωνο DNA. Στη συνέχεια, εξασφαλίζοντας την πρόσδεση στο μονόκλωνο DNA, έναντι του δίκλωνου, η *BRCA2*

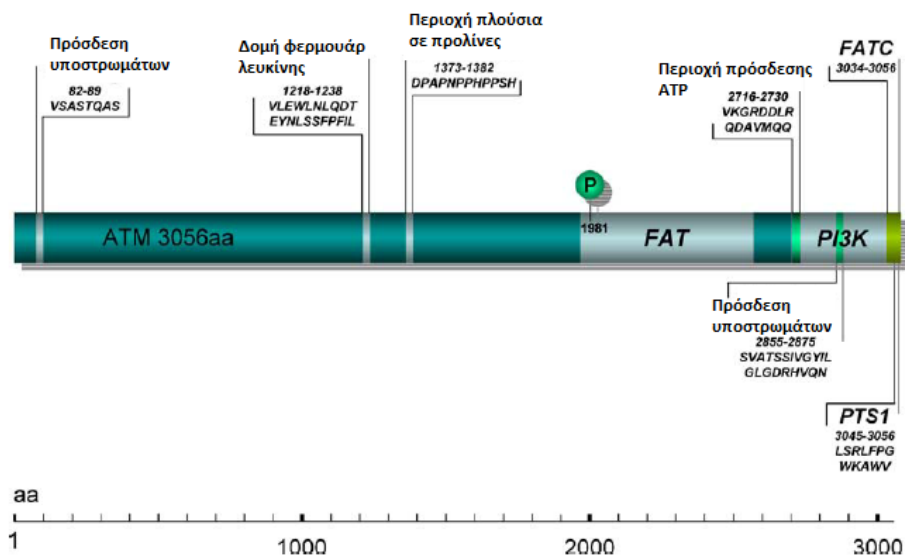
προωθεί τη δημιουργία του δικτύου ινιδίων της RAD51 (RAD51 filaments), η οποία είναι απαραίτητη για να επιτευχθεί η εισβολή του ομόλογου DNA και να ολοκληρωθεί η επιδιόρθωση της ρήξης της διπλής έλικας [17].

Τέλος, πρόσφατες έρευνες καταδεικνύουν ότι το γονίδιο *BRCA2*, εκτός από τον ομόλογο ανασυνδυασμό, εμπλέκεται και στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου κατά τις φάσεις G2/M, στην επεξεργασία των δομών θηλειάς R, στη συγκρότηση της ατράκτου και στην κυτταροκίνηση [17].

6.2.3 ATM

Το γονίδιο *ATM* εντοπίστηκε το 1988 σε οικογένειες που έπασχαν από αταξία τηλεγγειεκτασία και έφεραν διαλληλικές μεταλλαγές του γονιδίου. Η αταξία τηλεγγειεκτασία είναι μία ασθένεια που κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο χαρακτήρα και η κλινική της εικόνα συνοδεύεται από νευρολογική δυσλειτουργία, ανωμαλίες στην ανάπτυξη, ανοσολογική ανεπάρκεια και αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης κακοηθειών. Το *ATM* εδράζεται στο χρωμόσωμα 11 και αποτελείται από 66 εξόνια που κωδικοποιούν μία πρωτεΐνη μήκους 3056 αμινοξέων και μοριακού βάρους 350 kD [22].

Η πρωτεΐνη ATM είναι μία κινάση σερίνης/θρεονίνης και αποτελείται από την περιοχή κινάσης που εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό της άκρο, στο αμινοτελικό άκρο βρίσκεται η περιοχή πρόσδεσης των υποστρωμάτων που ενεργοποιεί την p53 ως απάντηση στις βλάβες του DNA. Επίσης, έχει μία περιοχή γνωστή ως FAT, μία περιοχή πλούσια σε προλίνες όπου προσδέεται η c-Abl και μία περιοχή με δομή φερμουάρ λευκίνης (leucine zipper) όπου μπορούν να προσδένονται διάφορες πρωτεΐνες. Στην εικόνα 14 παρουσιάζονται σχηματικά οι λειτουργικές περιοχές της πρωτεΐνης ATM [23].



Εικόνα 14. Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεΐνης ATM και των λειτουργικών περιοχών της. (Ανατύπωση από Lanvin F. M., et al., *DNA repair*, 2004).

Η πρωτεΐνη ATM φυσιολογικά εντοπίζεται στον πυρήνα του κυττάρου στην ανενεργή της μορφή, ως ομοδιμερές. Το ενεργό μονομερές μόριο φωσφορυλιώνει ποικίλλα υποστρώματα που εμπλέκονται σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, όπως είναι ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου και η επιδιόρθωση του DNA. Όταν το σύμπλοκο MRN εντοπίσει κάποια ρήξη της διπλής έλικας οδηγεί στην ενεργοποίηση της ATM, η οποία μετατρέπεται σε ενεργό μονομερές μόριο. Αρχικά λοιπόν, το ομοδιμερές αποσυγκροτείται και σχεδόν ταυτόχρονα αυτοφωσφορυλιώνεται σε τουλάχιστον τέσσερις θέσεις με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μορίου ως απάντηση στη βλάβη του DNA, φωσφορυλιώνοντας περαιτέρω μόρια ώστε να ξεκινήσει η επιδιόρθωση του [24].

6.2.4 CHEK2

Το γονίδιο *CHEK2* ταυτοποιήθηκε το 1998, εδράζεται στο χρωμόσωμα 22 και κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη μεγέθους 65kD και μήκους 543 αμινοξέων. Πρόκειται για μία κινάση σερίνης/θρεονίνης που ενεργοποιείται όταν εντοπίζεται βλάβη στο DNA και παίζει σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή του σήματος για να προωθηθεί η επιδιόρθωσή της. Η πρωτεΐνη *CHEK2* είναι συντηρημένη σε διάφορους οργανισμούς, όπως στον ποντικό, *zebrafish*, *Drosophila melanogaster* και *C. Elegans*. Η δομή της πρωτεΐνης περιλαμβάνει τρεις λειτουργικές περιοχές, στο αμινοτελικό άκρο βρίσκεται μία περιοχή με άφθονα ζεύγη σερίνης/γλουταμίνης και θρεονίνης/γλουταμίνης, όπου εντοπίζεται και η θέση

φωσφορυλίωσης από την ATM και ATR (SQ/TQ cluster domain, SCD). Ανάμεσα στα αμινοξέα 112-175 εντοπίζεται η περιοχή που αλληλεπιδρά με άλλες φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένου και ενός άλλου φωσφορυλιωμένου μορίου CHEK2, ενώ στα αμινοξέα 220-486 του καρβοξυτελικού άκρου εκτείνεται η περιοχή κινάσης. Η φωσφορυλίωση μίας πολυπεπτιδικής περιοχής (366-406 αμινοξέα), που εντοπίζεται μέσα στην περιοχή της κινάσης, ευθύνεται για την ενεργοποίηση της καταλυτικής δράσης της πρωτεΐνης. Συχνό φαινόμενο είναι η αυτοφωσφορυλίωσή της ώστε να επιτευχθεί η αποτελεσματική δράση της κινάσης. Στο τέλος του καρβοξυτελικού άκρου (αμινοξέα 512-522) εντοπίζεται ένα σήμα πυρηνικής εντόπισης. Στην εικόνα 15 παρουσιάζεται αναλυτικά η δομή της CHEK2 [25, 26].



Εικόνα 15. Σχηματική απεικόνιση των λειτουργικών περιοχών της CHEK2 (Ανατύπωση από Zannini L., et al., *J. Mol. Cell Biol.* 2014).

Η ενεργή CHEK2 συμμετέχει σε ποικίλλες κυτταρικές λειτουργίες, φωσφορυλιώνοντας διάφορα υποστρώματα. Φυσιολογικά η πρωτεΐνη βρίσκεται στον πυρήνα ανενεργή ως μονομερές. Σε περίπτωση που υπάρχει κάποια βλάβη στο γενετικό υλικό, η ATM φωσφορυλιώνει τη CHEK2 στη θέση T68, καθώς και σε άλλες θέσεις φωσφορυλίωσης, με αποτέλεσμα να διμερίζεται και να επάγεται η αυτοφωσφορυλίωση, οδηγώντας στη δημιουργία πλήρως ενεργοποιημένων μονομερών. Στη συνέχεια η CHEK2 φωσφορυλιώνει τη BRCA1 ώστε να μπορέσει να προχωρήσει ο ομόλογος ανασυνδυασμός. Επίσης, φωσφορυλιώνει και τη BRCA2 με αποτέλεσμα να αποσυγκροτείται το σύμπλοκο BRCA2/RAD51 και να απελευθερώνεται η RAD51, ώστε να μπορεί να προσδεθεί στη θέση της βλάβης [26, 27].

Επιπλέον, η CHEK2 συμμετέχει και στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης που είναι απαραίτητη στην επιδιόρθωση των θραύσεων της διπλής έλικας. Όταν μία ρήξη εντοπίζεται σε ετεροχρωματινική περιοχή, για να μπορέσει να γίνει η επιδιόρθωση της θα πρέπει οι κατάλληλες πρωτεΐνες να έχουν πρόσβαση στην περιοχή της βλάβης. Αυτό απαιτεί η δομή της χρωματίνης να χαλαρώσει. Αυτή η αναδιαμόρφωση επιτυγχάνεται από τη δράση πολλών πρωτεϊνών που τροποποιούν τις ιστόνες και αλλάζουν τη δομή του

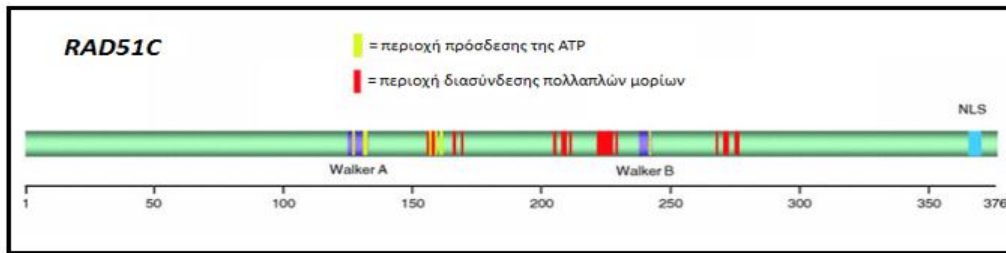
νουκλεοσώματος. Ανάμεσα σε αυτές είναι και η CHEK2 σε συνεργασία με την ATM. Επιπρόσθετα, για να υπάρχει ο χρόνος να γίνει η επιδιόρθωση, θα πρέπει να σταματήσει ο κυτταρικός κύκλος. Η CHEK2 συμμετέχει στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου φωσφορυλιώνοντας τη Cdc25A και τη p53 [27].

Τέλος, η CHEK2 φωσφορυλιώνει την HDMX, η οποία αποικοδομείται και ενεργοποιεί την πρωτεΐνη p53, προωθώντας την απόπτωση, ενώ η φωσφορυλίωση της E2F-1 οδηγεί στην ενεργοποίηση μεταγραφής γονιδίων της απόπτωσης. Όπως είναι γνωστό, σε κάθε κυτταρική διαίρεση το μήκος των τελομερών μικραίνει. Όταν το μήκος τους είναι αρκετά μικρό, τα τελομερή εκτίθενται στη δράση της CHEK2 με αποτέλεσμα το κύτταρο να αναπτύσσει χαρακτηριστικά γήρανσης [26].

6.2.5 RAD51C

Το γονίδιο *RAD51C* ανήκει στη οικογένεια των RAD51 γονιδίων, αποτελείται από 9 εξόνια και η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί έχει μήκος 376 αμινοξέα. Συνολικά έχουν ταυτοποιηθεί 5 ομόλογα (*RAD51B*, *RAD51C*, *RAD51D*, *XRCC2* και *XRCC3*) τα οποία εξασφαλίζουν τη σωστή λειτουργία της RAD51 κατά τη διάρκεια του ομόλογου ανασυνδυασμού. Τα ομόλογα αυτά αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και σχηματίζουν δύο υποσύμπλοκα, *RAD51C/XRCC2* και *RAD51B/RAD51C/RAD51D/XRCC2*. Ο ρόλος του *RAD51C* είναι πολύ σημαντικός στη δημιουργία αυτών των συμπλόκων, μιας και είναι το μόνο ομόλογο που συμμετέχει και στα δύο. Φαίνεται ότι το *RAD51C* συμμετέχει και σε μετέπειτα βήματα του ομόλογου ανασυνδυασμού, πέρα από τη δημιουργία του δικτύου ινιδίων της RAD51, όπως στην αποικοδόμηση των διασυνδέσεων Holliday [28].

Η *RAD51C* παρουσιάζει μόνο 27% ομολογία με τη RAD51 και αποτελείται από δύο χωριστές συντηρημένες περιοχές (Walker motif A & B), οι οποίες ενώνονται για να δημιουργήσουν μία θέση πρόσδεσης στο DNA. Επίσης, αναγνωρίζονται περιοχές πρόσδεσης του ATP, ενώ στο καρβοξυτελικό άκρο, και συγκεκριμένα στα 11 τελευταία αμινοξέα, ανευρίσκεται μία αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού [29]. Στην εικόνα 16 απεικονίζεται σχηματικά η πρωτεΐνη *RAD51C*.



Εικόνα 16. Σχηματική απεικόνιση της πρωτεΐνης RAD51C (Ανατύπωση από Vuorela M., et al., *Breast Cancer Res. Treat.* 2011).

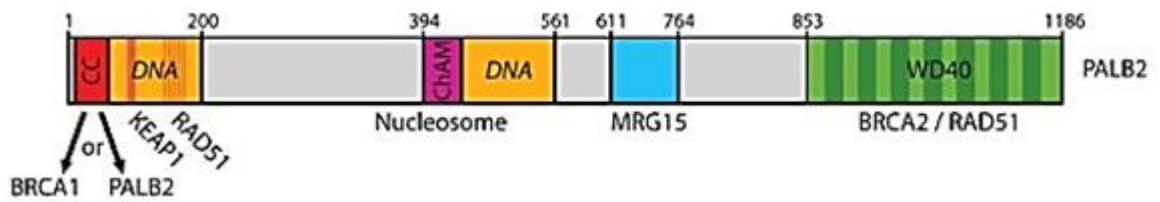
6.2.6 PALB2

Το γονίδιο *PALB2* (Partner and Localizer of *BRCA2*) χαρακτηρίστηκε μόλις το 2006 ως ένα νέο γονίδιο που αλληλεπιδρά με το *BRCA2*, το οποίο ευθύνεται για τον πυρηνικό εντοπισμό της *BRCA2* και την προώθηση του ομόλογου ανασυνδυασμού. Εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 16 και αποτελείται από 13 εξόνια μήκους 1186 αμινοξέα [30]. Είναι γνωστό ότι οι διαλληλικές μεταλλαγές του γονιδίου προκαλούν αναιμία Fanconi, συγκεκριμένα τον υπότυπο FA-N, γ' αυτό και το *PALB2* είναι γνωστό και ως *FANCN* [31].

Η δομή της πρωτεΐνης *PALB2* είναι αρκετά πολύπλοκη και απαρτίζεται από τις παρακάτω περιοχές:

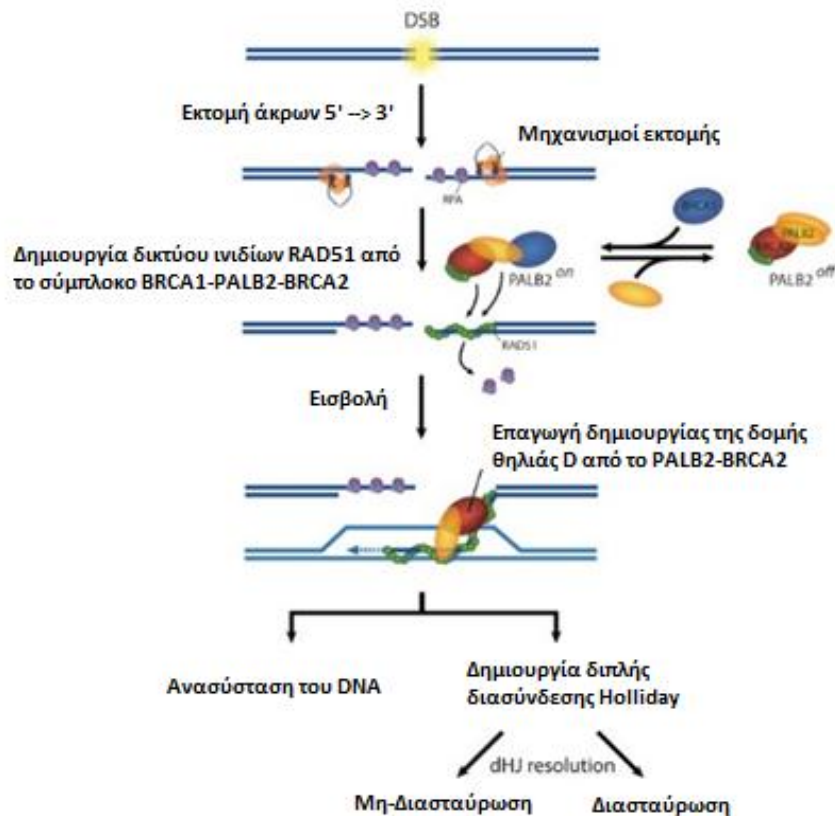
- δύο περιοχές πρόσδεσης στο DNA
- δύο περιοχές που αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη RAD51
- μία αρκετά συντηρημένη περιοχή στο κέντρο του γονιδίου, μεταξύ των αμινοξέων 395-446 που είναι υπεύθυνη για τον εντοπισμό του στη χρωματίνη (chromatin association motif, ChAM) μέσω των ιστονών H3 και H2B
- μία περιοχή με δομή β-προπέλας (β-propeller), η οποία αποτελείται από 7 επαναλήψεις 40-60 αμινοξέων
- μία περιοχή με δομή σπείρας (coiled-coil domain) μέσω της οποίας επιτυγχάνεται ο ομοδιμερισμός του μορίου και ο ετεροδιμερισμός του με τη *BRCA1* [32-34].

Στην εικόνα 17 απεικονίζεται η δομή της πρωτεΐνης *PALB2*.



Εικόνα 17. Σχηματική αναπαράσταση της δομής της πρωτεΐνης PALB2. (Ανατύπωση από Buisson R & Masson J. V. *Nucleic Acid Res.* 2012).

Όταν δεν υπάρχει κάποια βλάβη στο γενετικό υλικό, η PALB2 παραμένει ανενεργή με τη μορφή ομοδιμερούς. Σε περίπτωση που εντοπιστεί κάποια ρήξη της διπλής έλικας διαχωρίζεται και αλληλεπιδρά με τις BRCA1 και BRCA2 σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο. Το σύμπλοκο αυτό είναι απαραίτητο για τον ομόλογο ανασυνδυασμό ώστε να στρατολογηθεί η RAD51 στην περιοχή της βλάβης και να ξεκινήσει ο σχηματισμός του δικτύου ινιδίων της RAD51 (RAD51 filament) στο μονόκλωνο DNA. Μετά τον σχηματισμό του δικτύου, το σύμπλοκο BRCA2-PALB2 διεγείρει τη RAD51 κατά το στάδιο της εισβολής της αλυσίδας. Στην εικόνα 18 παρουσιάζονται τα στάδια του ομόλογου ανασυνδυασμού και πως δρα σε αυτό η PALB2 [32].



Εικόνα 18. Σχηματική αναπαράσταση της δράσης της PALB2 κατά τον ομόλογο ανασυνδυασμό. (Ανατύπωση από Buisson R., et al., *Nucleic Acids Res*, 2012).

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η πρωτεΐνη PALB2 έχει τη δυνατότητα να προσδέεται στο DNA και να αλληλεπιδρά απευθείας με τη RAD51, προωθώντας τη δημιουργία του δικτύου ινιδίων και την εισβολή της αλυσίδας [32].

Επιπλέον, μελέτες έδειξαν ότι η PALB2 έχει λειτουργικό ρόλο και κατά τη διακοπή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, συγκεκριμένα στη φάση G2/M, μετά από αναγνώριση βλάβης του γενετικού υλικού, χωρίς όμως να είναι γνωστός ο ακριβής μηχανισμός. Η PALB2 δρα και σε αυτό το μονοπάτι με ανάλογο τρόπο με αυτόν του ομόλογου ανασυνδυασμού, συνδέοντας τις πρωτεΐνες BRCA1 και BRCA2. Συγκεκριμένα σχηματίζει ένα σύμπλοκο με τη BRCA2, το οποίο μέσω της BRCA1 κατευθύνεται στη θέση της χρωματίνης όπου εντοπίζεται η βλάβη. Ποια από τις δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρά με το μηχανισμό του ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού παραμένει άγνωστο [35].

6.2.7 TP53

Το γονίδιο *TP53* ανακαλύφθηκε το 1979 και αρχικά θεωρήθηκε ότι πρόκειται για ογκογονίδιο λόγω της υπερέκφρασής του στα καρκινικά κύτταρα και της χαμηλής του έκφρασης στα φυσιολογικά κύτταρα. Το 1989 αποδείχθηκε ότι δρα ανασταλτικά στη δημιουργία καρκινικών κυττάρων και άρα πρόκειται για ογκοκατασταλτικό γονίδιο [36].

Το γονίδιο *TP53* εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17 και αποτελείται από 11 εξόνια που κωδικοποιούν μία πρωτεΐνη μήκους 396 αμινοξέων. Η πρωτεΐνη p53 φυσιολογικά βρίσκεται ως τετραμερές στα κύτταρα, σε χαμηλές συγκεντρώσεις και αποτελείται από 5 περιοχές:

- Την περιοχή στο αμινοτελικό άκρο (αμινοξέα 1-42, TAD), που είναι υπεύθυνη για τη μεταγραφική ικανότητα του μορίου καθώς και για την αλληλεπίδρασή της με άλλες πρωτεΐνες, όπως είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες και οι παράγοντες που σχετίζονται με τις πρωτεΐνες πρόσδεσης στο TATA box (TAFs)
- Μια περιοχή πλούσια σε προλίνες (αμινοξέα 61-92, PRD), η οποία είναι σημαντική για τη σταθερότητα της πρωτεΐνης, για τη μεταγραφική δραστηριότητα και για την επαγωγή της απόπτωσης, που δεν σχετίζεται όμως με τη διαδικασία της μεταγραφής
- Την περιοχή πρόσδεσης στο DNA, όπου εντοπίζεται στο κέντρο της πρωτεΐνης (αμινοξέα 101-300, DBD)
- Την περιοχή που είναι υπεύθυνη για το τετραμερισμό του μορίου (αμινοξέα 326-356, TD)
- Την κύρια περιοχή του καρβοξυτελικού άκρου του μορίου (BD), η οποία συμμετέχει επίσης στο τετραμερισμό του μορίου

Η τετραμερής μορφή της p53 είναι σημαντική για την πρόσδεση στο DNA σε συγκεκριμένες θέσεις, για τις μεταγραφικές τροποποιήσεις και για τις αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες. Στην εικόνα 19 παρουσιάζεται αναλυτικά η δομή της πρωτεΐνης p53 καθώς και η αλληλουχία των αμινοξέων που αντιστοιχεί σε κάθε λειτουργική περιοχή [36, 37].

ακεραιότητας του γενετικού υλικού, γι' αυτό και θεωρείται ο «φύλακας» του γονιδιώματος. Σωματικές μεταλλαγές του γονιδίου *TP53* ανευρίσκονται σχεδόν σε όλους του τύπους κακοηθειών.

7. Μεταλλαγές

Μεταλλαγή ορίζεται οποιαδήποτε μόνιμη αλλαγή του γενετικού υλικού, δηλαδή οποιαδήποτε αλλαγή στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων. Τέτοιες αλλαγές μπορούν να συμβούν σε σωματικά και σε γαμετικά κύτταρα, αλλά μόνο οι μεταλλαγές των γαμετικών κυττάρων έχουν δυνατότητα κληρονομής. Στην περίπτωση του καρκίνου οι γαμετικές μεταλλαγές οδηγούν σε προδιάθεση για τον καρκίνο ή σε καρκινικά σύνδρομα, ενώ οι σωματικές μεταλλαγές μπορεί να οδηγήσουν σε καρκινογένεση [38].

Οι γονιδιακές μεταλλαγές μπορούν να προκύψουν είτε από λάθη που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια του διπλασιασμού του DNA, είτε από τη δημιουργία αλλαγών στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων μετά από επίδραση μεταλλαξογόνων. Οι γονιδιακές μεταλλαγές διακρίνονται σε:

- Παρερμηνεύσιμες, οι οποίες προκύπτουν από την αντικατάσταση μίας βάσεως από μία άλλη που οδηγεί σε αντικατάσταση του αμινοξέος.
- Ανερμηνεύσιμες, όταν δημιουργείται ένα κωδικόνιο τερματισμού σε λάθος θέση. Τέτοιες μεταλλαγές μπορεί να οδηγήσουν στη δημιουργία είτε πρόωρου κωδικονίου τερματισμού, είτε να καταστρέψουν ένα κωδικόνιο τερματισμού, με αποτέλεσμα τη συνέχιση της αντιγραφής μέχρι να βρεθεί νέο κωδικόνιο λήξης.
- Μεταλλαγές που επηρεάζουν το μάτισμα, σε αυτές τις περιπτώσεις είτε γίνεται αντικατάσταση μίας βάσεως στη θέση δότη ή δέκτη, οδηγώντας στη διατήρηση περιοχών εσονίων στο προϊόν που μεταγράφεται, είτε από αντικατάσταση μίας βάσεως στις περιοχές εσονίων, δημιουργώντας εναλλακτική θέση ματίσματος, η οποία ανταγωνίζεται τη φυσιολογική.
- Πλαισιοτροποποιητικές ή μετατοπίσεις πλαισίου, οι οποίες προκύπτουν από ενθέσεις ή ελλείψεις μίας ή περισσοτέρων βάσεων, αλλάζοντας το πλαίσιο ανάγνωσης και δημιουργώντας διαφορετική αλληλουχία των αμινοξέων [38].

7.1 Μεγάλες γονιδιακές αναδιατάξεις

Μία άλλη κατηγορία γενετικών παραλλαγών είναι οι μεγάλες γονιδιακές αναδιατάξεις (Large Genomic Rearrangements, LGRs), που οδηγούν σε αλλαγές της δομής του γονιδίου. Οι αναδιατάξεις προκύπτουν από την έλλειψη ή προσθήκη μεγάλων γονιδιακών περιοχών, οι οποίες μπορεί να περιλαμβάνουν ένα ή και περισσότερα εξόνια καθώς και περιοχές εσονίων. Οι μεγάλες γονιδιακές αναδιατάξεις συνήθως οδηγούν στη δημιουργία πρόωρων κωδικονίων λήξης, ενώ οι προσθήκες γενετικού υλικού είναι πιο σπάνιες. Η συχνότητα εμφάνισης τέτοιων αναδιατάξεων εξαρτάται από το γονίδιο, ενώ έχει παρατηρηθεί ότι κάποια γονίδια είναι πιο επιρρεπή σε τέτοια γενετικά φαινόμενα. Οι ελλείψεις μεγάλων περιοχών του γονιδίου συνήθως οφείλονται σε άνισο επιχιασμό ανάμεσα σε αλληλουχίες με μικρή ή μεγάλη ομολογία [38].

Οι μηχανισμοί που μπορούν να οδηγήσουν στη δημιουργία μεγάλων γονιδιακών αναδιατάξεων είναι οι ακόλουθοι:

1. Αλληλουχίες Alu

Το γονιδίωμα του ανθρώπου περιέχει μέχρι και ένα εκατομμύριο αντίγραφα στοιχείων Alu, περίπου δηλαδή μία αλληλουχία Alu ανά 5 kb, οι οποίες μεσολαβούν στις χρωμοσωμικές αναδιατάξεις και στον ομόλογο ανασυνδυασμό οδηγώντας στη δημιουργία μεταθέσεων, διπλασιασμών, αναστροφών και απαλοιφών [39]. Οι αλληλουχίες αυτές ονομάστηκαν Alu γιατί πέπτονται από την περιοριστική ενδονουκλεάση Alu I. Η οικογένεια Alu περιλαμβάνει περίπου 500,000 μέλη και υπολογίζεται ότι αποτελούν το 3% του ανθρώπινου γονιδιώματος. Παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία, χωρίς όμως να είναι πανομοιότυπες [40].

Τα στοιχεία Alu θεωρούνται παράγοντες γονιδιωματικής αστάθειας, επειδή είναι επιρρεπή σε φαινόμενα ανασυνδυασμού σε συγκεκριμένα γονίδια και συχνά εμπλέκονται στον ανασχηματισμό των εξονίων κατά τη μείωση ως αποτέλεσμα μη-ομόλογου ανασυνδυασμού. Οι αλληλουχίες Alu κατηγοριοποιούνται σε μακρά διάσπαρτα στοιχεία (Long interspersed elements, LINEs) και σε μικρά διάσπαρτα στοιχεία (Short interspersed elements, SINEs), τα οποία έχουν μικρότερο μέγεθος και παράγονται από μετάγραφα της RNA πολυμεράσης [40].

1. Μη λειτουργικά ψευδογονίδια

Σε ορισμένα γονίδια η ύπαρξη μη-λειτουργικών ψευδογονιδίων, τα οποία παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία με την αλληλουχία των λειτουργικών γονιδίων, μπορεί να οδηγήσουν σε

άνισο επιχιασμό. Τα ψευδογονίδια ομοιάζουν με τα λειτουργικά γονίδια, αλλά δεν εκφράζονται πια στο κύτταρο ή έχουν χάσει την ικανότητα να κωδικοποιούν πρωτεΐνη [41].

II. Μικρές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (*short tandem repeats*)

Οι μικρές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες μπορεί επίσης να ευθύνονται για τη δημιουργία χρωμοσωμικών απαλοιφών ή ενθέσεων. Αυτές οι επαναλαμβανόμενες μη-κωδικές αλληλουχίες εντοπίζονται σε διάφορα σημεία των χρωμοσωμάτων, κυρίως σε ετεροχρωματινικές περιοχές, όπως αυτές του κεντρομεριδίου. Κατά την αντιγραφή, αυτές οι αλληλουχίες μπορεί να δημιουργήσουν αταίριαστες βάσεις, με αποτέλεσμα απαλοιφές ή ενθέσεις [40].

7.2 Ιδρυτικές μεταλλαγές

Αρχικά, ο Ernst Mayr εισήγαγε την έννοια «φαινόμενο του ιδρυτή» στην προσπάθειά του να εξηγήσει τη μειωμένη γενετική ποικιλομορφία που παρατηρείται σε κάποιους πληθυσμούς σε σχέση με τους προγόνους τους. Σύμφωνα με τη θεωρία του, όταν ένας μικρός πληθυσμός απαρτίζεται από λίγα άτομα, τότε αυτά τα άτομα θα φέρουν ένα μικρό μέρος των γενετικών γνωρισμάτων των προγόνων τους. Έτσι, σε συνδυασμό με τη γεωγραφική απομόνωση, ο πληθυσμός που θα προκύψει θα έχει περιορισμένη γενετική πολυμορφία. Η γενετική ποικιλομορφία θα επανακτηθεί μέσω νέων παραλλαγών ή από την εισροή γενετικών γνωρισμάτων από άλλους πληθυσμούς. Το φαινόμενο του ιδρυτή εξηγεί την πολύ μεγάλη συχνότητα παθογόνων μεταλλαγών σε συγκεκριμένους πληθυσμούς, όπως συμβαίνει στους Εβραίους Εσκενάζυ [42].

Μία επανεμφανιζόμενη μεταλλαγή για να χαρακτηριστεί ιδρυτική, πρέπει να αποδειχθεί ότι συνέβη μία φορά στην ιστορία. Έχουν περιγραφεί διάφορες επανεμφανιζόμενες μεταλλαγές, οι οποίες όμως έχουν δημιουργηθεί σε διάφορους πληθυσμούς, ανεξάρτητες χρονικές στιγμές. Αυτό συμβαίνει γιατί υπάρχουν περιοχές του γενετικού υλικού που είναι επιρρεπείς στη δημιουργία μεταλλαγών, οι οποίες όμως δεν είναι ιδρυτικές. Για να αποδειχθεί ότι μία μεταλλαγή είναι ιδρυτική και άρα συνέβη σε μία ιστορική στιγμή πρέπει να ελεγχθούν γενετικοί δείκτες που εντοπίζονται κοντά στη μεταλλαγή και άρα συγκληρονομούνται στις διαδοχικές γενεές. Τέτοιοι δείκτες είναι οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί και οι μικρές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (μικροδορυφορικοί δείκτες). Οι γενετικοί δείκτες που συγκληρονομούνται στις γενεές αποτελούν έναν

απλότυπο. Έτσι, οι επανεμφανιζόμενες μεταλλαγές που μοιράζονται έναν κοινό απλότυπο, σε ένα πληθυσμό, θεωρούνται ιδρυτικές [42].

8. Υπόθεση των «Δύο χτυπημάτων» κατά Knudson

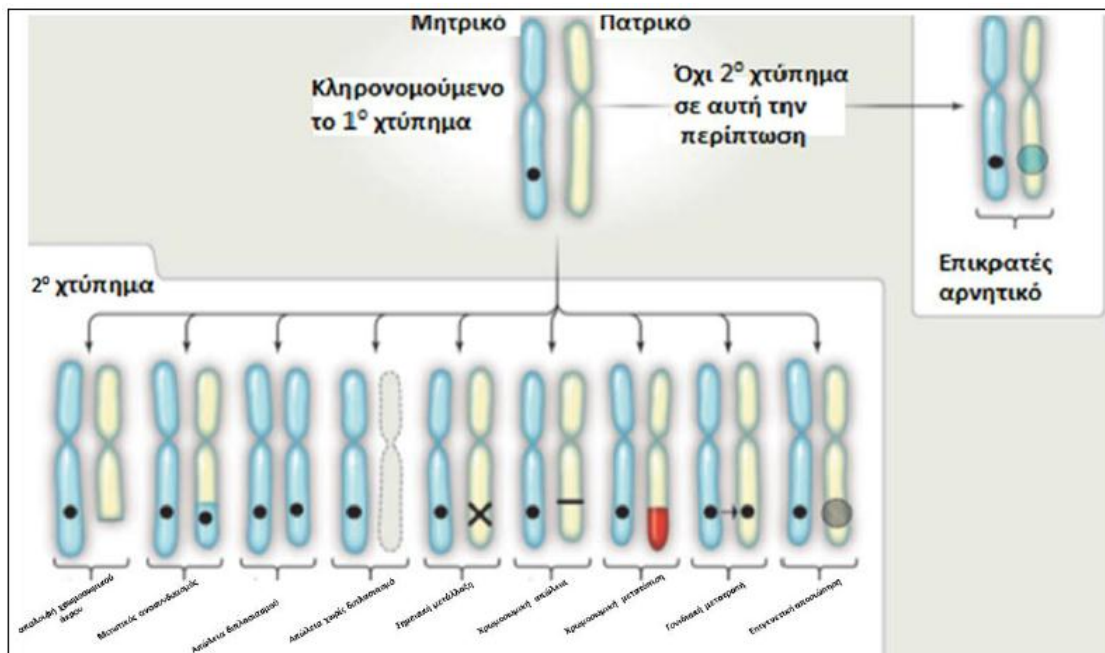
Η καρκινογένεση είναι μία πολύπλοκη διαδικασία κατά την οποία τα φυσιολογικά κύτταρα μετατρέπονται σε καρκινικά και περιλαμβάνει μία σειρά γενετικών αλλαγών. Οι μεταλλαγές που ενεργοποιούν ογκογονίδια ή απενεργοποιούν ογκοκατασταλτικά γονίδια αποτελούν καίρια σημεία για την έναρξη και την εξέλιξη της ογκογένεσης. Αρχικά υπήρξε μεγάλος προβληματισμός ανάμεσα στους ερευνητές, σχετικά με τον επικρατή τρόπο κληρονόμησης των καρκινικών συνδρόμων και τον μηχανισμό που τα διέπει. Η εξήγηση προήλθε από τον Alfred G. Knudson τη δεκαετία του 1970, ο οποίος πρότεινε τη θεωρία των δύο χτυπημάτων, βασισμένος σε στατιστικές μεθόδους. Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία, ένα άτομο έχει κληρονομήσει από τον ένα εκ των δύο γονέων του ένα μεταλλαγμένο αλληλόμορφο, χωρίς να επηρεάζεται η λειτουργία του κυττάρου, εφόσον υπάρχει το φυσιολογικό αλληλόμορφο που είναι λειτουργικό. Στην περίπτωση που συμβεί μία δεύτερη σωματική μεταλλαγή κατά τη διάρκεια της ζωής, η οποία απενεργοποιεί και το δεύτερο αλληλόμορφο, οδηγεί σε απώλεια της ετεροζυγωτίας (Loss of heterozygosity, LOH), η οποία μπορεί να οδηγήσει σε καρκινογένεση σε συνδυασμό φυσικά και με άλλα γενετικά φαινόμενα [43, 44].

Η απώλεια ετεροζυγωτίας μπορεί να προκύψει με διάφορους μηχανισμούς. Μερικοί από αυτούς είναι:

- Απώλεια τμήματος χρωμοσώματος
- Μιτωτικός ανασυνδυασμός
- Απώλεια ολόκληρου χρωμοσώματος
- Μη διαχωρισμός και διπλασιασμός
- Σημειακή μεταλλαγή
- Απαλοιφή
- Μη-ισοζυγισμένη χρωμοσωμική μετατόπιση
- Γονιδιακή μετατροπή

- Επιγενετική αποσιώπηση

Η απώλεια ετεροζυγωτίας εξηγεί και το μηχανισμό με τον οποίο τα καρκινικά σύνδρομα κληρονομούνται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο. Στην εικόνα 20 απεικονίζονται οι τρόποι που οδηγούν σε απώλεια ετεροζυγωτίας [45].



Εικόνα 20. Απεικόνιση μηχανισμών που οδηγούν σε απώλεια ετεροζυγωτίας ογκοκατασταλτικών γονιδίων και ενεργοποίησης ογκογονιδίων, με αποτέλεσμα την έναρξη της καρκινογένεσης. α) ενεργοποίηση ογκογονιδίων, όπου η εμφάνιση μίας μεταλλαγής οδηγεί σε ενεργοποίηση του γονιδίου, β) η απενεργοποίηση του αλληλομόρφου φυσιολογικού τύπου που οδηγεί σε απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Η πρώτη γαμετική μεταλλαγή κληρονομείται από τη μητέρα ή τον πατέρα, ενώ η σωματική μεταλλαγή του ίδιου γενετικού τύπου με αποτέλεσμα την απενεργοποίηση του φυσιολογικού αλληλομόρφου. Οι μηχανισμοί που οδηγούν σε αυτή την απενεργοποίηση μπορεί να είναι: χρωμοσωμικές ελλείψεις, μιτωτικός ανασυνδυασμός, απαλοιφή ή αναδιπλασιασμός, σημειακή μεταλλαγή, απαλοιφή, χρωμοσωμική μετατόπιση, γονιδιακή μετατροπή, επιγενετικοί μηχανισμοί. (Ανατύπωση από Foulkes WD. *N Engl J Med* 2008).

9. Κληρονομικός καρκίνος – Σύνδρομο κληρονομικού καρκίνου

Ο κληρονομικός καρκίνος χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη κακοηθειών σε νεαρή ηλικία και την παρουσία πολλαπλών περιστατικών σχετιζόμενων καρκίνων στα μέλη των οικογενειών, τα οποία συνήθως εμφανίζονται σε διαδοχικές γενεές. Η παρουσία μίας

γαμετικής μεταλλαγής σε κάποιο γονίδιο δημιουργεί κληρονομική προδιάθεση για την ανάπτυξη καρκίνου, σε σχέση με το γενικό πληθυσμό. Σύμφωνα με την υπόθεση των «δύο χτυπημάτων» του Knudson, που περιγράφηκε παραπάνω, για την ανάπτυξη του καρκίνου είναι απαραίτητο να συμβεί και μία δεύτερη σωματική μεταλλαγή στο κύτταρο, ώστε να απενεργοποιηθεί και το δεύτερο φυσιολογικό αλληλόμορφο. Κληρονομική προδιάθεση για την ανάπτυξη καρκίνου προκαλούν οι μεταλλαγές σε γονίδια που εμπλέκονται στα μονοπάτια επιδιόρθωσης του γενετικού υλικού καθώς και σε άλλα ογκοκατασταλτικά γονίδια. Παρακάτω θα περιγραφούν αναλυτικά κάποια από τα κληρονομικά καρκινικά σύνδρομα και κάποιες περιπτώσεις κληρονομικού καρκίνου που αφορούν την παρούσα διατριβή.

Η ανάπτυξη της τεχνολογίας της αλληλούχισης DNA μας έδωσε τη δυνατότητα να κατανοήσουμε καλύτερα και σε βάθος ότι αφορά τα γονίδια προδιάθεσης στην ανάπτυξη του καρκίνου και τα γονίδια που εμπλέκονται στα καρκινικά κληρονομικά σύνδρομα. Κυρίως βοήθησε στον καθορισμό της συχνότητας των μεταλλαγών των γονιδίων αυτών γενικά, αλλά και στους εκάστοτε πληθυσμούς συγκεκριμένα, καθώς και στον προσδιορισμό της διεισδυτικότητας των μεταλλαγών αυτών. Με τον όρο διεισδυτικότητα της μεταλλαγής ενός γονιδίου εννοούμε την αναλογία των ατόμων που φέρουν μία παθογόνο μεταλλαγή του γονιδίου, τα οποία τελικά θα εμφανίσουν τη νόσο.

9.1 Σύνδρομο Lynch

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι ο τέταρτος πιο συχνός καρκίνος στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής με μέση ηλικία εμφάνισης της νόσου τα 68 έτη [46]. Η ανάπτυξη καρκίνου του παχέος εντέρου έχει συσχετιστεί με περιβαλλοντικά και με γενετικά αίτια. Τα σποραδικά περιστατικά καταλαμβάνουν το 70-80-% των περιπτώσεων, ενώ θεωρείται ότι το εναπομείναν 20-30% συνδέεται με ποικίλες κληρονομούμενες μορφές καρκίνου [47].

Το σύνδρομο Lynch είναι το πιο συχνό κληρονομικό σύνδρομο καρκίνου του παχέος εντέρου, κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή χαρακτήρα και αντιπροσωπεύει το ~3% των περιστατικών καρκίνου παχέος εντέρου και το 2-4% των καρκίνων του ενδομητρίου. Το σύνδρομο χαρακτηρίζεται από την παρουσία παθογόνων παραλλαγών σε ένα από τα γονίδια που συμμετέχουν στο μονοπάτι επιδιόρθωσης αταίριαστων βάσεων *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* και *PMS2* (γονίδια MMR), [47, 48].

9.1.1 Γενετικό υπόβαθρο του συνδρόμου Lynch

Η διάγνωση για το σύνδρομο Lynch προκύπτει από την ανίχνευση μίας γαμετικής μεταλλαγής σε ένα από τα γονίδια MMR (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* και *PMS2*) ή όταν ανιχνεύεται μία γαμετική έλλειψη του γονιδίου *EPCAM* (epithelial-cell adhesion molecule), το οποίο εντοπίζεται ανοδικά του γονιδίου *MSH2* και οι ελλείψεις αυτές οδηγούν σε επιγενετική αποσιώπηση του *MSH2*. Οι μεταλλαγές των γονιδίων *MLH1* και *MSH2* αποτελούν το 60 – 80% όλων των περιστατικών του συνδρόμου Lynch, ενώ οι μεταλλαγές του *MSH2* έχουν συσχετιστεί κυρίως με την ανάπτυξη του καρκίνου του ενδομητρίου και άλλων κακοηθειών του ουρογεννητικού συστήματος [46]. Οι μεταλλαγές του *MSH6* και του *PMS2* καταλαμβάνουν το 10% και το 6% των περιστατικών, αντίστοιχα [47]. Οι συχνότητες εμφάνισης των παραλλαγών των γονιδίων επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από τον υπό μελέτη πληθυσμό [48]. Σε αντίθεση με τα μέχρι τώρα δεδομένα, πρόσφατες μελέτες σε μεγάλους αριθμούς ασθενών έδειξαν ότι η συχνότητα εμφάνισης μεταλλαγών στα γονίδια *MSH6* και *PMS2* είναι περίπου ίδια με τα γονίδια *MLH1* και *MSH2*, αν όχι και μεγαλύτερη. Συγκεκριμένα, η Espenschied και οι συνεργάτες της σε μία αναδρομική μελέτη που έκαναν σε 34,980 ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε γονιδιακό έλεγχο (γονιδιακό πάνελ τουλάχιστον για τα γονίδια MMR και *EPCAM*) έδειξαν ότι πιο συχνά ανευρίσκονταν οι μεταλλαγές του *MSH6*, ενώ έπονταν οι μεταλλαγές των γονιδίων *PMS2*, *MSH2*, *MLH1* και *EPCAM* [49]. Επίσης, οι μεταλλαγές των γονιδίων *MSH6* και *PMS2* έχουν μικρότερη διεισδυτικότητα από αυτές των *MLH1* και *MSH2*, ενώ στα άτομα που φέρουν μεταλλαγές στο *MSH6* συνήθως η ηλικία διάγνωσης είναι μεγαλύτερη. Επιπλέον, οι μεγάλες γονιδιακές αναδιατάξεις αποτελούν το 5 – 20% των μεταλλαγών που ανευρίσκονται [46].

Ένας εναλλακτικός τρόπος απενεργοποίησης του *MLH1* έχει περιγραφεί μέσω της υπερμεθυλίωσης του υποκινητή του, η οποία συνήθως παρατηρείται σε σωματικά κύτταρα. Σε κάποιες σπάνιες περιπτώσεις έχει περιγραφεί υπερμεθυλίωση του *MLH1* σε γαμετικά κύτταρα. Οι ασθενείς αυτοί δεν φέρουν άλλες μεταλλαγές του γονιδίου, ενώ συνήθως δεν κληρονομείται στους απογόνους. Παρόλα αυτά, σε κάποιες περιπτώσεις έχει αποδειχθεί κληρονόμηση αυτού του επιγενετικού ευρήματος και οι ασθενείς εκδηλώνουν τη νόσο σε νεαρή ηλικία ή/και πολλαπλούς καρκίνους σχετιζόμενους με το σύνδρομο [47].

Οι διαληθικές μεταλλαγές των γονιδίων MMR έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση συγκεκριμένων φαινοτυπικών χαρακτηριστικών όπως είναι τα στίγματα café au lait, τα κερατοακανθώματα και οι όγκοι των σμηγματογόνων αδένων. Τα ευρήματα αυτά όμως είναι αρκετά σπάνια [47].

9.1.2 Κακοήθειες σχετιζόμενες με το σύνδρομο Lynch

Οι κλινικές εκδηλώσεις του συνδρόμου περιλαμβάνουν την ανάπτυξη καρκίνου του παχέος εντέρου, που είναι και το κύριο χαρακτηριστικό του συνδρόμου, ενώ οι ασθενείς θα αναπτύξουν ένα ή και περισσότερους αδενοματώδεις πολύποδες. Ο δια βίου κίνδυνος ανάπτυξης κακοήθειας παχέος εντέρου εξαρτάται από το γονίδιο στο οποίο εντοπίζεται η μεταλλαγή αλλά και από το φύλο. Έτσι, τα άτομα που φέρουν κάποια μεταλλαγή στα γονίδια *MLH1* και *MSH2* έχουν 30 - 74% πιθανότητα να νοσήσουν, ενώ για τα άτομα που φέρουν μεταλλαγές στο γονίδιο *MSH6* η πιθανότητα μειώνεται στο 10% με 22% και για τα άτομα που φέρουν μεταλλαγές στο γονίδιο *PMS2* το αντίστοιχο ποσοστό είναι 15 – 20%. Η εκδήλωση της νόσου λαμβάνει χώρα σε νεαρότερες ηλικίες (μέσος όρος ηλικίας διάγνωσης τα 45-60 έτη), σε σύγκριση με το γενικό πληθυσμό όπου ο μέσος όρος ηλικίας διάγνωσης είναι τα 68 έτη. Στους ασθενείς με σύνδρομο Lynch ο όγκος συνήθως εντοπίζεται στο δεξί τμήμα του κόλον, ενώ έχουν μεγάλη πιθανότητα να εμφανίσουν σύγχρονο ή μετάχρονο καρκίνο του παχέος εντέρου (16% πιθανότητα εμφάνισης κακοήθειας μετά από 10 χρόνια και 41% πιθανότητα μετά από 20 χρόνια). Σε σχέση με την ιστοπαθολογία του όγκου, η πλειονότητα αφορά αδιαφοροποίητους όγκους, με βλενώδη στοιχεία, μυελοειδές μοτίβο ανάπτυξης και άφθονα διεισδυτικά λεμφοκύτταρα. Τέλος, η εξαλλαγή ενός αδενώματος σε καρκίνο επιτυγχάνεται πιο γρήγορα στα άτομα με σύνδρομο Lynch, περίπου σε τρία έτη, σε σχέση με τα σποραδικά περιστατικά όπου η διαδικασία της εξαλλαγής μπορεί να διαρκέσει και 10 – 15 χρόνια. Το φαινόμενο αυτό είναι πιθανό να σχετίζεται με το γεγονός ότι στα συγκεκριμένα άτομα τα γονίδια MMR δε λειτουργούν σωστά με αποτέλεσμα τη συσσώρευση αταίριαστων βάσεων στο γενετικό υλικό, οδηγώντας στη δυσλειτουργία και άλλων γονιδίων και τελικά στην καρκινογένεση. Στον πίνακα 2 παρουσιάζεται αναλυτικά ο συσσωρευτικός κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του παχέος εντέρου μέχρι την ηλικία των 70 ετών σε σχέση με το γονίδιο που εντοπίζεται η μεταλλαγή [46, 47].

Πίνακας 2. Κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του παχέος εντέρου μέχρι την ηλικία των 70 ετών ανάλογα με το γονίδιο που εντοπίζεται η μεταλλαγή.

Γονίδιο που εντοπίζεται η μεταλλαγή	Κίνδυνος ανάπτυξης κακοήθειας, %	Μέσος όρος ηλικίας διάγνωσης, έτη
Σποραδικός καρκίνος	5.5	69
<i>MLH1/MSH2</i>	Άνδρες: 27-74 Γυναίκες: 22-53	27-46

<i>MSH6</i>	Άνδρες: 22 Γυναίκες: 10	54-63
<i>PMS2</i>	Άνδρες: 20 Γυναίκες: 15	47-66

Το σύνδρομο Lynch χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη και άλλων όγκων του ουρογεννητικού συστήματος. Οι γυναίκες που φέρουν μεταλλαγές των γονιδίων MMR έχουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του ενδομητρίου. Συγκεκριμένα, γυναίκες με μεταλλαγές των γονιδίων *MLH1* και *MSH2* έχουν 54% πιθανότητα να εμφανίσουν καρκίνο του ενδομητρίου, ενώ γυναίκες με μεταλλαγές στα γονίδια *MSH6* και *PMS2* έχουν πιθανότητα ανάπτυξης κακοήθειας του ενδομητρίου 71% και 15%, αντίστοιχα. Η παρουσία μεταλλαγών του γονιδίου *MSH6* έχει συσχετιστεί με εκδήλωση της νόσου σε μεγαλύτερη ηλικία σε σχέση με την παρουσία μεταλλαγών στα άλλα γονίδια MMR. Επίσης, άλλες κακοήθειες που σχετίζονται με το συγκεκριμένο σύνδρομο είναι ο καρκίνος του ουρητήρα, της νεφρικής πυέλου και της ουροδόχου κύστεως. Επιπλέον, υπάρχει αυξημένος κίνδυνος ανάπτυξης αδενοκαρκινώματος των ωοθηκών, του στομάχου, του λεπτού εντέρου και των ηπατοχοληφόρων οδών, καθώς και καρκίνος του εγκεφάλου (γλοιοβλάστωμα) και των σμηγματογόνων αδένων. Τέλος, κάποιες μελέτες καταδεικνύουν την πιθανή συσχέτιση του συνδρόμου με ελαφρώς αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση καρκίνου του παγκρέατος και του προστάτη. Στον πίνακα 3 παρουσιάζεται συγκεντρωτικά ο συσσωρευτικός κίνδυνος ανάπτυξης άλλων κακοηθειών του ουρογεννητικού συστήματος μέχρι την ηλικία των 70 χρόνων σε άτομα που πάσχουν από το σύνδρομο Lynch [47].

Πίνακας 3. Κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του ουρογεννητικού συστήματος σε άτομα που πάσχουν από το σύνδρομο Lynch μέχρι την ηλικία των 70 χρόνων.

Τύπος κακοήθειας	Κίνδυνος ανάπτυξης κακοήθειας στο γενικό πληθυσμό, %	Κίνδυνος ανάπτυξης κακοήθειας σε άτομα με σύνδρομο Lynch, %	Μέσος όρος ηλικίας διάγνωσης, έτη
Ενδομητρίου	2.7		65
<i>MLH1/MSH2</i>		14-54	48-62
<i>MSH6</i>		17-71	54-57
<i>PMS2</i>		15	49
Στομάχου	<1	0.2-13	49-55
Ωοθηκών	1.6	4-20	43-45

Ήπατος/Χοληφόρων	<1	0.02-4	52-60
Ουροποιητικού	<1	0.2-25	52-60
Λεπτού εντέρου	<1	0.4-12	46-49
Κεντρικού νευρικού συστήματος	<1	1-4	50
Νεοπλάσματα σμηγματογόνων αδένων	<1	1-9	Μη διαθέσιμο
Παγκρέατος	1.5	0.4-4	63-65
Προστάτη	16.2	9-30	59-60

9.1.3 Μικροδορυφορική αστάθεια

Ένα άλλο χαρακτηριστικό των κυττάρων των όγκων του συνδρόμου Lynch είναι η μικροδορυφορική αστάθεια (MSI) λόγω της δυσλειτουργίας των γονιδίων MMR. Η μικροδορυφορική αστάθεια δημιουργείται από μεταλλαγές μέσα σε επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (μικροδορυφόρους) με αποτέλεσμα την αλλαγή του μήκους τους. Οι επαναλαμβανόμενες αυτές αλληλουχίες εντοπίζονται σε διάφορα σημεία του γονιδιώματος, συνήθως όμως βρίσκονται σε περιοχές εσονίων. Η MSI ουσιαστικά υποδηλώνει την ενεργοποίηση και απενεργοποίηση γονιδίων, που σχετίζονται με την καρκινογένεση, η οποία έχει προκύψει μετά από κάποια μεταλλαγή. Οι όγκοι με MSI παρουσιάζουν εκατοντάδες χιλιάδες σωματικές μεταλλαγές στις μικροδορυφορικές αλληλουχίες. Η ύπαρξη μικροδορυφορικής αστάθειας στα κύτταρα του όγκου καταδεικνύει την πιθανή δυσλειτουργία ενός εκ των γονιδίων MMR που προέκυψε από σωματικές ή γαμετικές παθογόνους παραλλαγές με αποτέλεσμα τη συσσώρευση λαθών κατά την αντιγραφή και τελικά την δημιουργία μεταλλαγών [50].

Η MSI αποτελεί έναν πολύ σημαντικό δείκτη για την αναγνώριση των ασθενών με σύνδρομο Lynch, καθώς επίσης έχει προγνωστικό και θεραπευτικό ρόλο. Για τον καθορισμό της MSI του όγκου χρησιμοποιούνται τουλάχιστον πέντε μικροδορυφορικοί δείκτες και ανάλογα με τον αριθμό των δεικτών που παρουσιάζουν αστάθεια οι όγκοι καθορίζονται ως:

- MSI-H, όταν >30-40% των δεικτών παρουσιάζουν αστάθεια
- MSI-L, όταν <30-40% των δεικτών παρουσιάζουν αστάθεια

- MSI-S, όταν οι δείκτες δεν παρουσιάζουν αστάθεια

Μικροδορυφορική αστάθεια ανευρίσκεται στο 12-15% των σποραδικών όγκων, η οποία συνήθως οφείλεται στην αποσιώπηση του γονιδίου *MLH1*, λόγω της υπερμεθυλίωσης του υποκινητή του. Το φαινόμενο της υπερμεθυλίωσης σε αυτές τις περιπτώσεις συμβαίνει ως σωματική μεταλλαγή [50].

9.1.4 Ανίχνευση απώλειας της έκφρασης των πρωτεϊνών MMR

Ένα άλλο πολύ χρήσιμο εργαλείο για την αναγνώριση των ασθενών με σύνδρομο Lynch είναι η ανίχνευση της απώλειας της έκφρασης κάποιας πρωτεΐνης MMR, με τη τεχνική της ανοσοϊστοχημείας. Η μειωμένη ή μηδενική παραγωγή μίας MMR πρωτεΐνης αποτελεί ένδειξη ότι υπάρχει κάποια μεταλλαγή (γαμετική ή σωματική) στο αντίστοιχο γονίδιο MMR που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη που δεν εκφράζεται. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων παρατηρείται απώλεια έκφρασης των πρωτεϊνών ανά ζεύγη. Η απώλεια έκφρασης και των δύο πρωτεϊνών *MSH2* και *MSH6* συνήθως υποδηλώνει την ύπαρξη μεταλλαγής στο *MSH2*, ενώ η απώλεια έκφρασης της κάθε πρωτεΐνης χωριστά υποδηλώνει την ύπαρξη μεταλλαγής στο αντίστοιχο γονίδιο. Η απώλεια έκφρασης των πρωτεϊνών *MLH1* και *PMS2* υποδηλώνει την ύπαρξη μεταλλαγής συνήθως στο *MLH1*. Η μέθοδος της ανοσοϊστοχημείας επιτρέπει το στοχευμένο έλεγχο των γονιδίων, ανάλογα με το ποια πρωτεΐνη δεν εκφράζεται [47].

9.1.5 Κλινικά κριτήρια για το σύνδρομο Lynch

Για να είναι δυνατή η αναγνώριση των ασθενών με σύνδρομο Lynch, αρχικά τη δεκαετία του 1990 καθιερώθηκαν τα κριτήρια του Amsterdam I, τα οποία συμπεριελάμβαναν στοιχεία από το ατομικό και το οικογενειακό ιστορικό του ασθενούς. Επειδή όμως τα συγκεκριμένα κριτήρια ήταν αρκετά αυστηρά, μία δεκαετία αργότερα άρχισαν να χρησιμοποιούνται πιο ευαίσθητα κριτήρια (Amsterdam II). Σύμφωνα με τα κριτήρια Amsterdam II, που χρησιμοποιούνται μέχρι και σήμερα, για τη διάγνωση του συνδρόμου Lynch πρέπει να πληρούνται οι παρακάτω προϋποθέσεις:

1. Να υπάρχουν τρεις ή περισσότεροι συγγενείς με διάγνωση κάποιας κακοήθειας συσχετιζόμενη με το σύνδρομο (καρκίνος παχέος εντέρου, ενδομητρίου, λεπτού εντέρου, ουρητήρα ή νεφρικής πυέλου), ένας εκ των οποίων να είναι συγγενής πρώτου βαθμού.

2. Να υπάρχουν διαγνώσεις καρκίνου σε δύο τουλάχιστον γενεές.
3. Μία ή περισσότερες περιπτώσεις κακοήθειας με διάγνωση πριν από τα 50 έτη.

Ωστόσο, μόνο το 50% των ασθενών με σύνδρομο Lynch πληρούσε τα συγκεκριμένα κριτήρια, οπότε για να είναι πιο αποτελεσματική η αναγνώριση αυτών των ασθενών καθιερώθηκαν τα κριτήρια Bethesda, τα οποία στη συνέχεια επικαιροποιήθηκαν για να συμπεριλάβουν και ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά του όγκου. Τα επικαιροποιημένα κριτήρια Bethesda περιλαμβάνουν:

1. Διάγνωση καρκίνου του παχέος εντέρου πριν από τα 50 έτη.
2. Παρουσία σύγχρονου ή μετάχρονου καρκίνου παχέος εντέρου ή κάποιου καρκίνου συσχετιζόμενου με το σύνδρομο, ανεξαρτήτως ηλικίας διάγνωσης.
3. Διάγνωση καρκίνου του παχέος εντέρου με μικροδορυφορική αστάθεια και ηλικία διάγνωσης πριν από τα 60 έτη.
4. Διάγνωση καρκίνου του παχέος εντέρου και έναν ή περισσότερους συγγενείς πρώτου βαθμού με διάγνωση καρκίνου σχετικού με το σύνδρομο Lynch, με μία από τις διαγνώσεις να έχει πραγματοποιηθεί πριν από την ηλικία των 50 χρόνων.
5. Διάγνωση καρκίνου του παχέος εντέρου σε δύο ή περισσότερους πρώτου ή δευτέρου βαθμού συγγενείς με κακοήθειες σχετικές με το σύνδρομο, ανεξαρτήτως ηλικίας.

Στον πίνακα 4 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα κριτήρια Amsterdam II και τα επικαιροποιημένα κριτήρια Bethesda [46].

Πίνακας 4. Κριτήρια Amsterdam II και τα επικαιροποιημένα κριτήρια Bethesda.

Κριτήρια Άμστερνταμ II
1. Τρεις ή περισσότεροι συγγενείς με διαγνωσμένο καρκίνο που σχετίζεται με το σύνδρομο Lynch, ο ένας εκ των οποίων έχει πρώτου βαθμού συγγένεια με κάποιον εκ των δύο
2. Η διάγνωση καρκίνου ανευρίσκεται σε τουλάχιστον δύο γενεές
3. Ένα ή περισσότερα περιστατικά καρκίνου με ηλικία διάγνωσης μικρότερη από τα 50 έτη
Επικαιροποιημένα κριτήρια Bethesda
1. Διάγνωση καρκίνου του παχέος εντέρου πριν από τα 50 έτη

-
2. Παρουσία σύγχρονου ή μετάχρονου καρκίνου παχέος εντέρου ή κάποιου καρκίνου συσχετιζόμενου με το σύνδρομο, ανεξαρτήτως ηλικίας διάγνωσης
 3. Διάγνωση καρκίνου του παχέος εντέρου με μικροδορυφορική αστάθεια και ηλικία διάγνωσης πριν από τα 60 έτη
 4. Διάγνωση καρκίνου του παχέος εντέρου και έναν ή περισσότερους συγγενείς πρώτου βαθμού με διάγνωση καρκίνου σχετικού με το σύνδρομο Lynch, με μία από τις διαγνώσεις να έχει πραγματοποιηθεί πριν από την ηλικία των 50 χρόνων
 5. Διάγνωση καρκίνου του παχέος εντέρου σε δύο ή περισσότερους πρώτου ή δευτέρου βαθμού συγγενείς με κακοήθειες σχετικές με το σύνδρομο, ανεξαρτήτως ηλικίας
-

*Κακοήθειες που σχετίζονται με το σύνδρομο Lynch: ορθοκολικοί, ενδομητρίου, στομάχου, ωοθηκών, παγκρέατος, ουρητήρα, ουροποιητικού, λεπτού εντέρου, εγκεφάλου και σμηγματογόνων αδένων.

9.2 Κληρονομικός καρκίνος μαστού/ωοθηκών

9.2.1 Κληρονομικός καρκίνος μαστού

Ο καρκίνος του μαστού είναι η πιο συχνή κακοήθεια και η κύρια αιτία θανάτου στις γυναίκες τόσο στις αναπτυγμένες, όσο και στις αναπτυσσόμενες χώρες. Παγκόσμια διαγνωσκονται περίπου 1,4 εκατομμύρια νέα περιστατικά ετησίως, εκ των οποίων περίπου το 30% θα καταλήξουν σε θάνατο στην 5ετία. Ο καρκίνος του μαστού διακρίνεται σε οικογενή και σε σποραδικά περιστατικά. Τα οικογενή περιστατικά χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη οικογενειακού ιστορικού, ενώ στα σποραδικά περιστατικά δεν αναφέρεται οικογενειακό ιστορικό. Στην ανάπτυξη της κακοήθειας ενοχοποιούνται γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες. Περιβαλλοντικοί παράγοντες κινδύνου θεωρούνται η ηλικία εμμηναρχής, η ηλικία πρώτης τελειόμηνης κύησης, η ηλικία εμμηνόπαυσης, η ορμονοθεραπεία, η κατανάλωση αλκοόλ, η παχυσαρκία και η έλλειψη άσκησης. Ο κληρονομικός καρκίνος του μαστού χαρακτηρίζεται από επικρατή κληρονόμηση, νεαρή ηλικία διάγνωσης, την παρουσία περιστατικών καρκίνου των ωοθηκών ή ανδρικού καρκίνου του μαστού σε μέλη της οικογένειας [51, 52].

Όταν μία γυναίκα διαγνωστεί με καρκίνο του μαστού, η πιθανότητα να διαγνωστούν και άλλα κοντινά μέλη της οικογένειας αυξάνει δραματικά. Όσο αυξάνει ο αριθμός των συγγενών με διάγνωση καρκίνου, τόσο αυξάνεται και η πιθανότητα να διαγνωσθεί ένα άτομο. Μία γυναίκα που έχει μία συγγενή με διάγνωση καρκίνου του μαστού, αντιμετωπίζει διπλάσια πιθανότητα από το γενικό πληθυσμό να αναπτύξει καρκίνο [52].

Περίπου το 30% των περιπτώσεων του καρκίνου του μαστού έχει κάποιο γενετικό υπόβαθρο, ενώ μόνο το 4-5% έχει σαφή κληρονομική βάση [52]. Με την κληρονομική προδιάθεση στην ανάπτυξη καρκίνου του μαστού έχουν συσχετιστεί διάφορα γονίδια υψηλής διεισδυτικότητας, όπως είναι τα δύο κύρια γονίδια προδιάθεσης, το *BRCA1* και *BRCA2*, αλλά και τα *TP53*, *PTEN*, *CDH1* και *STK11*, καθώς και γονίδια ενδιάμεσης διεισδυτικότητας όπως τα *PALB2*, *ATM* και *CHEK2*. Η ευρεία χρήση της αλληλούχισης DNA Νέας Γενιάς έχει επιτρέψει τον έλεγχο πολλών γονιδίων ταυτόχρονα σε μεγάλο αριθμό ασθενών με αποτέλεσμα να διεξάγονται μεγάλες πολυκεντρικές μελέτες που βοηθούν στην καλύτερη κατανόηση της συνεισφοράς αυτών των γονιδίων στον κληρονομικό καρκίνο του μαστού.

9.2.2 Γονίδια *BRCA1* και *BRCA2* και καρκίνος του μαστού

Ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του μαστού μίας γυναίκας που φέρει μεταλλαγή στο *BRCA1* είναι 57-65%, ενώ για το *BRCA2* κυμαίνεται ανάμεσα στο 35-57%. Ο κίνδυνος αυτός ποικίλλει και εξαρτάται από τον υπό μελέτη πληθυσμό [53]. Οι πιο συχνές μεταλλαγές που ανευρίσκονται στα γονίδια *BRCA* είναι μικρές ενθέσεις ή ελλείψεις (πλαισιοτροποποιητικές) και μη-νοηματικές, οι οποίες οδηγούν στη δημιουργία ενός πρόωρου κωδικονίου λήξης με αποτέλεσμα η πρωτεΐνη να μην είναι λειτουργική. Επίσης, ανευρίσκονται μεταλλαγές που επηρεάζουν το μάτισμα, παρανοηματικές και μεγάλες γονιδιακές ανακατατάξεις, που κατανέμονται κατά μήκος όλης της κωδικής αλληλουχίας. Πέρα από τις επανεμφανιζόμενες και τις ιδρυτικές μεταλλαγές, οι περισσότερες μεταλλαγές (53-55%) που ανευρίσκονται σε αυτά τα γονίδια είναι μοναδικές και μπορεί να εντοπίζονται σε μία και μόνο οικογένεια [51, 53]. Ωστόσο, κάποιες συγκεκριμένες μεταλλαγές ανευρίσκονται σχετικά συχνά σε διάφορους πληθυσμούς. Οι πιο συχνές επανεμφανιζόμενες μεταλλαγές στο γονίδιο *BRCA1* είναι οι πλαισιοτροποποιητικές 185delAG και 5382insC και η παρανοηματική αλλαγή C61G. Στο *BRCA2* οι πιο συχνές επανεμφανιζόμενες είναι οι 6174delT, K3326X, 3036del4 και 6503delTT [52].

Η συχνότητα εμφάνισης μεταλλαγών των γονιδίων *BRCA* στο γενικό πληθυσμό είναι χαμηλή, μπορεί όμως να επηρεάζεται από την παρουσία ιδρυτικών μεταλλαγών σε συγκεκριμένους πληθυσμούς [53]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι οι τρεις ιδρυτικές μεταλλαγές που ανευρίσκονται στους Εβραίους Εσκενάζυ (*BRCA1*: 5382insC και 187delAG, *BRCA2*: 6174delT), οι οποίες αποτελούν το 98-99% των μεταλλαγών που ανιχνεύονται στο

συγκεκριμένο πληθυσμό, ενώ η συχνότητα εμφάνισής τους στον πληθυσμό είναι 2.5%. Άλλες γνωστές ιδρυτικές μεταλλαγές είναι η *BRCA2* 999delTCAAA στην Ισλανδία με συχνότητα εμφάνισης στον συγκεκριμένο πληθυσμό 0.4-0.6%, στη Σουηδία υπάρχουν 6 ιδρυτικές μεταλλαγές που αντικατοπτρίζουν το 75% των παραλλαγών που ανιχνεύονται, ενώ στη Δανία η *BRCA1* 2594delC αντιπροσωπεύει το 18% όλων των *BRCA1* μεταλλαγών [52]. Οι ιδρυτικές μεταλλαγές παρατηρούνται σε αρκετούς πληθυσμούς, κυρίως σε χώρες που είναι γεωγραφικά απομονωμένες. Σε πολυεθνικές χώρες, όπως το Ηνωμένο Βασίλειο και Ηνωμένες πολιτείες της Αμερικής το φαινόμενο του ιδρυτή είναι σπάνιο. Στον πίνακα 5 συνοψίζονται οι γνωστές ιδρυτικές μεταλλαγές των γονιδίων *BRCA1* και *BRCA2* σε διάφορους πληθυσμούς [25].

Πίνακας 5. Γνωστές ιδρυτικές μεταλλαγές των γονιδίων *BRCA1* και *BRCA2* στους διάφορους πληθυσμούς.

Εθνικότητα	<i>BRCA1</i> ιδρυτικές μεταλλαγές	<i>BRCA2</i> ιδρυτικές μεταλλαγές
Εσκενάζυ Εβραίοι	c.68_69delAG, c.5266dupC	c.5946delT
Σουηδοί	c.3052_3053ins	-
Νορβηγοί	c.1556delA, c.3228del, c.697del, c. 1016dupA	-
Φιλανδοί	c.4096+3A>G	c.9117+1G>A, c.7480C>T, c.8327 T>G
Ισλανδοί	c.5074G>A	c.771_775del5
Ολλανδοί	c.2685_2686del, c.4186-1643_4357+2020del	c.5351dupA, c.6275_6276del
Βέλγοι	c.212+3 A>G	-
Γάλλοι	c.3481_3491del	-
Βρετανοί	c.2681_2682del, exon13dup (ins6kbEx13)	c.6275_6276del
Έλληνες	c.5266dupC, c.5212G>A, c.5256_5277+3179del3200, c.5406+664_8273del, c.5468- 285_5592+4019del4429_ins5	-
Ιταλοί	c.3228_3229del, c.3285delA, c.1380dupA, c.5062_5064del (Central Italy), c.4964_4982del (Calabria)	c.8737_8538del (Σαρδηνία)
Πορτογάλοι	-	c.156_157insAlu

Ισπανοί	c.68_69del, c.5153-1G>A	c.5146_5149del4, c.9026_9030del5
Πολωνοί	c.5266dupC, c.181 T>G, c.4035delA	-
Σλοβάκοι	-	c.6589delA
Σλοβένοι	Slovenians c.5266dupC	c.7806-2A>G
Λευκορώσοι	c.5266dupC, c.4035delA	-
Ούγγροι	c.5266dupC, c.181 T>G, c.68_69del	c.9098dupA
Κύπριοι	-	c.8755delG
Ρώσοι	c.5266dupC	-
Κορεάτες		c.7480C>T
Φιλιπινέζοι	-	c.4037_4038delCT, c.4631_4631delA
Μαλαισιανοί	c.2726_2727insA	-
Γαλλοκαναδοί	c.4327C>T	c.3170_3174del, c.8537_8538del
Ισπανόφωνοι (Λατινοαμερικανοί)	c.2552delC, c.2433delC, c.3331_3335del, c.5242C>A	c.2806_2809del
Αφρο-αμερικανοί	c.824_825ins10, c.1713_1717del, c.5177_5180del4	c.4357+ 1G>A

Σε αντίθεση με άλλους Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς που είναι εξαιρετικά ομοιογενείς, όπως οι Ισλανδοί που προαναφέρθηκαν, ο Ελληνικός πληθυσμός παρουσιάζει μεγάλη γενετική ετερογένεια, τουλάχιστον σε ότι αφορά τις μεταλλαγές των γονιδίων *BRCA*, σε συνδυασμό με έντονα ιδρυτικά φαινόμενα. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι οι μεταλλαγές του *BRCA1* είναι αρκετά πιο συχνές σε σύγκριση με το *BRCA2*, ενώ το 56% των ανευρισκόμενων μεταλλαγών εντοπίζεται στο εξόνιο 20 του *BRCA1* [54]. Στον Ελληνικό πληθυσμό έχουν ανιχνευθεί πέντε ιδρυτικές μεταλλαγές στο γονίδιο *BRCA1*, οι οποίες αποτελούν το 68.5% των μεταλλαγών του *BRCA1* και το 58.5% του συνόλου των μεταλλαγών των *BRCA* [55]. Συγκεκριμένα, ελληνικές ιδρυτικές μεταλλαγές είναι: μία πλαισιοτροποποιητική 5382insC [56], που αποτελεί ιδρυτική μεταλλαγή και για τους Εσκενάζυ Εβραίους αλλά και μία από τις πιο συχνά ανευρισκόμενες μεταλλαγές του γονιδίου *BRCA1*, μία παρανοηματική c.5331 G>A (p.Gly1738Arg) [57] και τρεις μεγάλες αναδιατάξεις (απαλοιφές). Οι αναδιατάξεις

περιλαμβάνουν τις απαλοιφές του εξονίων 20 μεγέθους 3.2 kb και 24 μεγέθους 4.4 kb [54] και μία απαλοιφή μεγέθους ~11 kb που περιλαμβάνει τα εξόνια 23 και 24 [58].

Τα τελευταία χρόνια η ευρεία χρήση της μεθόδου της πολλαπλής ενίσχυσης τμημάτων DNA εξαρτώμενη από τη σύνδεση ιχνηθετών (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, MLPA) είχε ως αποτέλεσμα να αυξηθούν οι αναφορές των γονιδιακών αναδιατάξεων. Οι μεγάλες γονιδιακές αναδιατάξεις αποτελούν το 15-27% των μεταλλαγών που ανιχνεύονται στα γονίδια BRCA και η συχνότητα εμφάνισής τους επηρεάζεται από το φαινόμενο του ιδρυτή. Οι αναδιατάξεις αφορούν την απαλοιφή ή ένθεση μεγάλων γονιδιακών αλληλουχιών στην κωδική περιοχή, οδηγώντας στη δημιουργία πρωτεϊνών με μη φυσιολογική δομή ή/και λειτουργία [52]. Μέχρι στιγμής οι αναφορές για γονιδιακές αναδιατάξεις του *BRCA1* είναι πολύ περισσότερες από αυτές που αφορούν το *BRCA2*. Η διαφορά στη συχνότητα εμφάνισης των αναδιατάξεων, η οποία παρατηρείται μεταξύ των δύο γονιδίων, είναι πιθανόν να σχετίζεται με την παρουσία του μη λειτουργικού *BRCA1* ψευδογονιδίου ή του υψηλού ποσοστού εμφάνισης επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών (Alu repeats) που έχει το γονίδιο *BRCA1*, ~42% της αλληλουχίας του είναι Alu repeats [59]. Στον πίνακα 6 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι πιο συχνές γονιδιακές αναδιατάξεις για τον Ελληνικό πληθυσμό.

Πίνακας 6. Συχνές απαλοιφές εξονίων στον Ελληνικό πληθυσμό

Γονίδιο	Εξόνια που απαλείφονται
<i>BRCA1</i>	20
<i>BRCA1</i>	23 – 24
<i>BRCA1</i>	24
<i>BRCA2</i>	12 – 13

Για την ανάπτυξη του καρκίνου δεν αρκεί μόνο η κληρονομική προδιάθεση, πρέπει να συμβεί και μία δεύτερη σωματική μεταλλαγή, σύμφωνα με την υπόθεση του Knudson, που θα οδηγήσει στο φαινόμενο της απώλειας ετεροζυγωτίας, η οποία έχει περιγραφεί στην πλειονότητα των όγκων των ασθενών που φέρουν γαμετική μεταλλαγή. Η απώλεια ετεροζυγωτίας συνήθως εκδηλώνεται με απαλοιφή του φυσιολογικού αλληλομόρφου. Ένας

εναλλακτικός μηχανισμός με το ίδιο αποτέλεσμα είναι η επιγενετική αποσιώπηση, μέσω της μεθυλίωσης του υποκινητή των γονιδίων. Η μεθυλίωση του υποκινητή του *BRCA2* είναι ένα εξαιρετικά σπάνιο γενετικό φαινόμενο. Για τη μεθυλίωση του υποκινητή του *BRCA1* υπάρχουν αρκετές αναφορές και σε γαμετικό και σε σωματικό επίπεδο. Η μεθυλίωση του υποκινητή έχει περιγραφεί σε 9-13% σε σποραδικούς όγκους, ενώ το ποσοστό αυτό φτάνει το 42% όταν αναφερόμαστε σε όγκους ασθενών που φέρουν γαμετική μεταλλαγή σε άλλο γονίδιο, εκτός από τα BRCA [51].

Ο πιο συχνός ιστοπαθολογικός τύπος των ασθενών που φέρουν μεταλλαγές στα γονίδια BRCA είναι το πορογενές διηθητικό (>80%), ενώ τα μυελοειδή καρκινώματα ανευρίσκονται πιο συχνά στις ασθενείς που φέρουν μεταλλαγή στο *BRCA1*. Τα μυελοειδή καρκινώματα είναι αδιαφοροποίητα, υψηλού βαθμού κακοήθειας, χαρακτηρίζονται όμως από καλή πρόγνωση λόγω του ότι σπάνια διηθούν τους λεμφαδένες. Αξίζει να σημειωθεί ότι το 11% των ασθενών με μυελοειδείς όγκους φέρει μεταλλαγή στο *BRCA1*, ενώ τα λοβιακά και τα σωληνοειδή καρκινώματα είναι πιο συχνά σε ασθενείς με γαμετική μεταλλαγή στο *BRCA2*. Συνήθως οι ασθενείς με μεταλλαγή στο *BRCA1* διαγιγνώσκονται με καρκινώματα υψηλού βαθμού κακοήθειας και με υψηλό μιτωτικό δείκτη.

Ο καρκίνος του μαστού χωρίζεται σε διάφορους υπότυπους με βάση κάποιους ανοσοϊστοχημικούς δείκτες που έχουν προγνωστική και προβλεπτική σημασία. Οι πιο σημαντικοί δείκτες είναι οι υποδοχείς οιστρογόνων (ER) και προγεστερόνης (PR) και ο υποδοχέας του γονιδίου του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα τύπου 2 (HER-2). Οι περισσότεροι σποραδικοί όγκοι είναι θετικοί για τους υποδοχείς οιστρογόνων και προγεστερόνης, ενώ ~15% χαρακτηρίζεται από υπερέκφραση του HER-2. Ένας άλλος υπότυπος του καρκίνου του μαστού που ανευρίσκεται στο 15-20% των σποραδικών όγκων, είναι ο τριπλά αρνητικός, ο οποίος χαρακτηρίζεται από την έλλειψη έκφρασης των υποδοχέων οιστρογόνων (ER) και προγεστερόνης (PR), καθώς και από την απουσία ενίσχυσης του γονιδίου του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα τύπου 2 (HER-2). Οι τριπλά αρνητικά όγκοι είναι αδιαφοροποίητοι με επιθετική φύση, υψηλότερα ποσοστά μετάστασης και χειρότερη πρόγνωση, κυρίως λόγω των περιορισμένων θεραπευτικών προσεγγίσεων [60].

Είναι γνωστό ότι ένα σημαντικό ποσοστό γυναικών (57%) με καρκίνο του μαστού και γαμετική μεταλλαγή του *BRCA1* διαγιγνώσκονται με τριπλά αρνητικούς όγκους. Η πλειονότητα αυτών συμπίπτει με το βασικό τύπο, όπου παρουσιάζεται και έκφραση των κυτταροκερατινών, ενώ το ποσοστό των τριπλά αρνητικών όγκων είναι αρκετά μειωμένο σε

γυναίκες με γαμετικές μεταλλαγές στο *BRCA2* (18%) [61]. Αντίθετα, οι *BRCA2* όγκοι έχουν πιο πολλά κοινά χαρακτηριστικά με τους σποραδικούς όγκους, όπου παρατηρείται θετική έκφραση των υποδοχέων ER και PR και των κυτταροκερατινών CK8 και CK18 [51].

9.2.3 Γονίδιο *PALB2*

Το γονίδιο *PALB2* συσχετίστηκε πρόσφατα (2007) με προδιάθεση στον καρκίνο του μαστού [62]. Σε μία μεγάλη πολυκεντρική μελέτη αναφέρεται ότι ο δια βίου κίνδυνος εμφάνισης κακοήθειας του μαστού σε μία γυναίκα που φέρει μεταλλαγή στο *PALB2* είναι 33%, ενώ αν υπάρχει και οικογενειακό ιστορικό το ποσοστό αυτό μπορεί να φτάσει και το 58% [63]. Μέχρι πρόσφατα το *PALB2* θεωρείτο γονίδιο ενδιάμεσης διεισδυτικότητας, ενώ πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι πρόκειται για γονίδιο υψηλής διεισδυτικότητας (το OR κυμαίνεται από 7.46 μέχρι 9.53) [64, 65] και έχει συσχετιστεί και με την εμφάνιση αμφοτερόπλευρης διάγνωσης [65].

Η συχνότητα εμφάνισης μεταλλαγών του *PALB2* ποικίλλει ανάμεσα στους πληθυσμούς και είναι πιθανό να επηρεάζεται από την ύπαρξη ιδρυτικών φαινομένων. Μέχρι στιγμής έχουν περιγραφεί πέντε ιδρυτικές μεταλλαγές, οι οποίες είναι: η c. 2323 C>T στους Γαλλοκαναδούς, που αντιπροσωπεύει το 0.5% των περιστατικών καρκίνου του μαστού με διάγνωση πριν από τα 50 έτη στο συγκεκριμένο πληθυσμό [66], η c.1592delT στη Φινλανδία με δια βίου κίνδυνο ανάπτυξης κακοήθειας του μαστού 40% [67]. Η c.3113 G>A στην Αυστραλία, η οποία έχει συσχετιστεί με ανάπτυξη κακοήθειας του μαστού σε νεαρή ηλικία (κάτω από τα 40 έτη) και δια βίου κίνδυνο εμφάνισης κακοήθειας του μαστού που μπορεί να φτάσει και το 90% [68]. Τέλος, έχουν περιγραφεί και δύο ιδρυτικές μεταλλαγές Ιταλικής προέλευσης, η c.1027 C>T και η c.2167_2168delAT, ενώ η τελευταία έχει ανευρεθεί και στον Ισπανικό πληθυσμό [69]. Στον πίνακα 7 συνοψίζονται οι μέχρι τώρα γνωστές ιδρυτικές μεταλλαγές και οι πληθυσμοί στους οποίους έχουν περιγραφεί.

Πίνακας 7. Γνωστές ιδρυτικές μεταλλαγές του γονιδίου *PALB2*.

Χώρα προέλευσης	Μεταλλαγή	Συχνότητα εμφάνισης (%)	Δια βίου πιθανότητα εμφάνισης BrCa (%)
Καναδάς (Γαλλοκαναδικής καταγωγής)	c.2323 C>T	0.5 (<50 έτη)	Μη διαθέσιμο
Φινλανδία	c.1592delT	1	40

Αυστραλία	c.3113 G>A	0.4	91
Ιταλία	c.1027 C>T	Μη διαθέσιμο	Μη διαθέσιμο
Ιταλία/Ισπανία	c.2167_2168delAT	Μη διαθέσιμο	Μη διαθέσιμο

9.2.4 Άλλα γονίδια προδιάθεσης στον καρκίνο του μαστού

Τα τελευταία χρόνια με την ανάλυση NGS έχουν αναδειχθεί και άλλα γονίδια που προδιαθέτουν στην εμφάνιση κακοήθειας καρκίνου του μαστού. Πρόσφατες μεγάλες μελέτες έδειξαν ότι η συχνότητα ανεύρεσης μεταλλαγών σε άλλα γονίδια, εκτός από από τα BRCA, κυμαίνεται μεταξύ 4-5% [70]. Σε μία μεγάλη μελέτη στην οποία αναλύθηκαν >65000 ασθενείς με καρκίνο του μαστού έδειξε ότι πιο συχνά μεταλλαγές ανευρίσκονται στα γονίδια *CHEK2* (1.73%) και *ATM* (1.06%). Επίσης, μεταλλαγές ανευρέθηκαν στα γονίδια *BARD1* και *RAD51D*, τα οποία πλέον θεωρούνται γονίδια ενδιάμεσης διεισδυτικότητας. Επειδή οι μεταλλαγές στα συγκεκριμένα γονίδια είναι εξαιρετικά σπάνιες (<1 σε 500 ασθενείς με καρκίνο μαστού), σε μελέτες με μικρό αριθμό ασθενών δεν ήταν δυνατός ο καθορισμός του κινδύνου ανάπτυξης κακοήθειας του μαστού, γι'αυτό χρειάζονται και άλλες μελέτες για την καλύτερη κατανόηση της συνεισφοράς αυτών των γονιδίων στον κληρονομικό καρκίνο [64].

Σε συμφωνία με τα προηγούμενα ευρήματα, αντίστοιχη μελέτη με μεγάλο αριθμό ασθενών έδειξε ότι το *CHEK2* και το *ATM* είναι γονίδια ενδιάμεσης διεισδυτικότητας με OR 2.93 και 3.63, αντίστοιχα. Επιπλέον, τα γονίδια αυτά σχετίζονται με όγκους που εκφράζουν τους οιστρογονικούς υποδοχείς, ενώ το *CHEK2* συσχετίστηκε και με όγκους θετικούς στην έκφραση του HER2 και με την εμφάνιση αμφοτερόπλευρης διάγνωσης [65].

9.2.5 Κληρονομικός καρκίνος των ωοθηκών

Ο καρκίνος των ωοθηκών είναι ο έβδομος σε συχνότητα καρκίνος στις γυναίκες και χαρακτηρίζεται από έλλειψη αποτελεσματικής προληπτικής παρακολούθησης, ασαφή συμπτώματα και έχει την υψηλότερη θνησιμότητα από όλες τις γυναικολογικές κακοήθειες [71]. Το 2013 στο Ηνωμένο Βασίλειο ο καρκίνος των ωοθηκών αποτελούσε το 4% όλων των καρκίνων που εκδήλωσαν οι γυναίκες, με μέσο όρο ηλικίας εμφάνισης τα 65-70 έτη, ενώ ο δια βίου κίνδυνος ανάπτυξης της κακοήθειας στο γενικό πληθυσμό είναι 2% [72].

Ο πιο συχνός καρκίνος των ωοθηκών είναι ο επιθηλιακός και αφορά το 90% των ωοθηκικών καρκινωμάτων, ενώ το εναπομείναν 10% αντιπροσωπεύουν τα καρκινοσαρκώματα, οι όγκοι των γεννητικών κυττάρων, οι στρωματικοί όγκοι και άλλες σπάνιες μορφές κακοήθειας. Ο πιο κοινός υπότυπος του επιθηλιακού καρκίνου είναι τα ορώδη αδενοκαρκινώματα (30 – 70%) και είναι συνήθως υψηλού βαθμού κακοήθειας, ακολουθούν τα ενδομητριοειδή (10-20%), τα βλενώδη (5-20%), τα διαυγοκυτταρικά (3-10%) και τα αδιαφοροποίητα (1%). Ο κίνδυνος εκδήλωσης της νόσου είναι άμεσα συνδεδεμένος με την ύπαρξη οικογενειακού ιστορικού. Έτσι, μία γυναίκα που έχει έναν πρώτου βαθμού συγγενή με καρκίνο των ωοθηκών έχει τριπλάσια πιθανότητα να νοσήσει, ενώ όταν υπάρχουν δύο πρώτου βαθμού συγγενείς με διάγνωση, η πιθανότητα αυτή διπλασιάζεται. Όταν υπάρχει κληρονομική προδιάθεση σε μία οικογένεια η νόσος εκδηλώνεται σε νεαρότερη ηλικία και σχετίζεται με την εμφάνιση και άλλων κακοηθειών, όπως του μαστού [72].

9.2.6 Γονίδια *BRCA1* και *BRCA2* και καρκίνος των ωοθηκών

Είναι πλέον γνωστό ότι άτομα που φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *BRCA1* έχουν δια βίου κίνδυνο να εμφανίσουν κακοήθεια των ωοθηκών 40-60%, ενώ το ποσοστό αυτό για τους φορείς μεταλλαγών του *BRCA2* κυμαίνεται στο 10-20%. Η συχνότητα ανεύρεσης μεταλλαγών είναι υψηλότερη για το *BRCA1*, σε σχέση με το *BRCA2*, καθώς και η νεαρή ηλικία διάγνωσης αποτελεί ένδειξη για την ύπαρξη γαμετικών μεταλλαγών. Η εκδήλωση της νόσου επηρεάζεται τόσο από γενετικούς παράγοντες, όσο και από περιβαλλοντικούς. Έχει δειχθεί ότι η ανίχνευση μεταλλαγών στο εξόνιο 11 ή και σε κοντινούς γενετικούς τόπους παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης της νόσου σε σχέση με την ύπαρξη μεταλλαγών εκτός αυτών των περιοχών. Επίσης, κάποιοι πολυμορφισμοί τροποποιούν τον κίνδυνο ανάπτυξης κακοήθειας σε άτομα που φέρουν μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA* (μελέτες GWAS). Επιπλέον, στο γενικό πληθυσμό παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη ωοθηκικών καρκινωμάτων αποτελούν η νεαρή ηλικία εμμηναρχής και η εμμηνόπαυση σε μεγάλη ηλικία, ενώ προστατευτικά επιδρούν ο θηλασμός και η λήψη αντισυλληπτικών χαπιών [72].

Σε ασθενείς που φέρουν μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA* ο πιο κοινός ιστολογικός υπότυπος είναι ο ορώδης υψηλού βαθμού κακοήθειας, ενώ οι όγκοι χαμηλού βαθμού κακοήθειας σχετίζονται πιο σπάνια με την ανεύρεση γαμετικών μεταλλαγών σε αυτά τα γονίδια. Οι ενδομητριοειδείς και οι διαυγοκυτταρικοί όγκοι ανευρίσκονται σπάνια σε ασθενείς με

μεταλλαγές των BRCA, ενώ ο βλενώδης υπότυπος δε σχετίζεται με την ανίχνευση μεταλλαγών των γονιδίων BRCA [72].

9.2.7 Άλλα γονίδια προδιάθεσης καρκίνου των ωοθηκών

Εκτός από τα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2* με κληρονομική προδιάθεση έχουν συσχετιστεί και άλλα γονίδια, όπως *RAD51C* και *RAD51D*. Σε μία μεγάλη μελέτη που αναλύθηκαν ~3500 γυναίκες με επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών, ανιχνεύθηκαν μεταλλαγές στα γονίδια *RAD51C* και *RAD51D* σε ποσοστά 0.41% και 0.35%, αντίστοιχα, αναδεικνύοντας αυτά τα δύο γονίδια ως γονίδια προδιάθεσης στον καρκίνο των ωοθηκών ενδιάμεσης διεισδυτικότητας [73]. Επίσης, γονίδιο προδιάθεσης ενδιάμεσης διεισδυτικότητας στον καρκίνο των ωοθηκών αποτελεί και το *BRIP1*, ενώ τα δεδομένα σχετικά με τη σύνδεση του γονιδίου *PALB2* με την προδιάθεση ανάπτυξης ωοθηκικών καρκινωμάτων μέχρι στιγμής είναι αντικρουόμενα [74, 75] και απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση.

9.3 Σύνδρομο Li-Fraumeni

Το σύνδρομο Li-Fraumeni αρχικά περιγράφηκε από τους Li και Fraumeni το 1969 [76]. Πρόκειται για ένα σπάνιο κληρονομικό καρκινικό σύνδρομο το οποίο χαρακτηρίζεται από ένα ευρύ φάσμα κακοηθειών που εμφανίζονται σε νεαρή ηλικία, οι οποίες συμπεριλαμβάνουν τα σαρκώματα των οστών και των μαλακών μορίων, όγκους στον εγκέφαλο, όγκους των επινεφριδίων, καθώς και καρκίνο του μαστού σε πολύ νεαρές ηλικίες. Οι γαμετικές μεταλλαγές στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο *TP53* οδηγούν στην εμφάνιση του συνδρόμου Li-Fraumeni [77]. Λιγότερο συχνά παρατηρείται ανάπτυξη καρκίνου του πνεύμονα, του παχέος εντέρου και του προστάτη [76].

Οι σωματικές μεταλλαγές του γονιδίου *TP53* είναι οι πιο συχνά ανευρισκόμενες σε διάφορους τύπους κακοήθειας. Οι μεταλλαγές του γονιδίου μπορεί να οδηγήσουν σε απώλεια λειτουργίας της πρωτεΐνης, λόγω της επικάλυψης της λειτουργίας του φυσιολογικού αλληλομόρφου από το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο ή ακόμα και υπερέκφραση της πρωτεΐνης, με τελικό αποτέλεσμα σε όλες τις περιπτώσεις την επαγωγή της καρκινογένεσης [78].

Η πλειονότητα των γαμετικών μεταλλαγών που απαντώνται στο σύνδρομο Li-Fraumeni είναι παρανοηματικές (~73%) μεταλλαγές ή μικρές ελλείψεις. Οι παρανοηματικές

μεταλλαγές ανιχνεύονται κυρίως στα εξόνια 5-8, εκεί που εντοπίζεται και η περιοχή πρόσδεσης της πρωτεΐνης με το DNA, ενώ οι πλαισιοτροποποιητικές μεταλλαγές κατανέμονται σε όλη την κωδική περιοχή του γονιδίου [78]. Οι μεγάλες γονιδιακές αναδιατάξεις αφορούν μόνο το 1% των μεταλλαγών που ανιχνεύονται στο γονίδιο *TP53* και περιλαμβάνουν απαλοιφές ή ενθέσεις των κωδικών περιοχών, του εξονίου 1 ή του υποκινητή [76].

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι ο γενετικός τύπος που ανιχνεύεται η μεταλλαγή μπορεί να επηρεάζει και την εκδήλωση της νόσου. Έτσι, όταν οι παρανοηματικές μεταλλαγές εντοπίζονται στην περιοχή πρόσδεσης του DNA, οι πιθανότητες εμφάνισης κακοήθειας και συγκεκριμένα του καρκίνου του μαστού (σε νεαρή ηλικία) και του κεντρικού νευρικού συστήματος, είναι εξαιρετικά αυξημένες. Αντίθετα, όταν η μεταλλαγή εντοπίζεται εκτός της περιοχής πρόσδεσης του DNA έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση καρκίνου των επινεφριδίων [76].

Τα άτομα που φέρουν μεταλλαγές στο *TP53* έχουν μεγάλη πιθανότητα να διαγνωσθούν με κακοήθεια και μάλιστα σε πολύ νεαρή ηλικία σε σχέση με το γενικό πληθυσμό. Το 30% των ασθενών με Li-Fraumeni θα έχει την πρώτη διάγνωση καρκίνου πριν από τα 30 έτη, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό του γενικού πληθυσμού είναι μόλις 1%. Ο δια βίου κίνδυνος εμφάνισης κακοήθειας στους άνδρες είναι 68 - 73%, ενώ στις γυναίκες αγγίζει το 93 - 100%, λόγω της πολύ μεγάλης πιθανότητας να αναπτύξουν καρκίνο του μαστού [77, 79]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα του νεαρού της ηλικίας διάγνωσης είναι ο καρκίνος του μαστού, όπου το 5-7% όλων των περιστατικών με ηλικία διάγνωσης τα 20 με 30 έτη θα φέρουν μεταλλαγή στο *TP53*. Συνολικά, οι μεταλλαγές του *TP53* αποτελούν <1% όλων των περιστατικών καρκίνου του μαστού. Επιπλέον, οι γυναίκες με σύνδρομο Li-Fraumeni έχουν αυξημένη πιθανότητα να εμφανίσουν πολλαπλές διαγνώσεις καρκίνου του μαστού, της τάξεως του 25% με μέσο όρο ηλικίας διάγνωσης τα 33 έτη, ενώ συνήθως οι όγκοι παρουσιάζουν υπερέκφραση του HER-2. Τα ποσοστά αυτά αυξάνονται με την πάροδο της ηλικίας και διαμορφώνονται στο 56% μέχρι τα 45 έτη και >90% μέχρι τα 60 έτη [79].

Τέλος, τα άτομα με σύνδρομο Li-Fraumeni έχουν αυξημένη πιθανότητα να αναπτύξουν και δεύτερο πρωτοπαθή όγκο, καθώς και δευτεροπαθείς όγκους που σχετίζονται με τη θεραπεία και συγκεκριμένα με την ακτινοθεραπεία. Γι' αυτό και προτείνεται να αποφεύγεται η ακτινοθεραπεία όταν αυτό είναι δυνατόν [77].

10. Κληρονομικά καρκινικά σύνδρομα και κληρονομικές μορφές κακοήθειας

Εκτός από τα κληρονομικά σύνδρομα και τα γονίδια προδιάθεσης εμφάνισης καρκίνου του μαστού που αναφέρθηκαν αναλυτικά, υπάρχουν και άλλα γονίδια που σχετίζονται με κληρονομικά καρκινικά σύνδρομα. Ενδεικτικά παρουσιάζονται κάποια από αυτά στον πίνακα 8.

Πίνακας 8. Γνωστά κληρονομικά καρκινικά σύνδρομα και τα αντίστοιχα εμπλεκόμενα γονίδια.

Σύνδρομο	Όγκοι	Γονίδια
Καρκίνου μαστού/ωοθηκών	Μαστού, ωοθηκών, παγκρέατος	<i>BRCA1, BRCA2</i>
	Αναιμία Fanconi, μυελοβλάστωμα	<i>BRCA2</i>
Li-Fraumeni	Σάρκωμα μαλακών ιστών, μαστού, οστεοσάρκωμα, λευχαιμία, όγκοι εγκεφάλου	<i>TP53</i>
Ataxia telangiectasia	Λευχαιμίες, λεμφώματα, καρκίνος μαστού, ωοθηκών, στομάχου, μελάνωμα, σάρκωμα	<i>ATM</i>
Lynch	Παχέος εντέρου, ενδομητρίου, ωοθηκών, νεφρών, ουροδόχου κύστεως, παγκρέατος, στομάχου κ.α	<i>MLH1, MSH2, MSH6</i>
Οικογενής Αδενωματώδης Πολυποδίαση	Παχέος εντέρου	<i>APC</i>
Αδενωματώδης Πολυποδίαση σχετιζόμενη με MUTYH	Παχέος εντέρου	<i>MUTYH</i>
Κληρονομικός γαστρικός καρκίνος διάχυτου τύπου	Γαστρικός καρκίνος διάχυτου τύπου, λοβιακός καρκίνος μαστού	<i>CDH1</i>

Συγγενής ανεπάρκεια επιδιόρθωσης λανθασμένων ζευγών βάσεων	Όγκοι εγκεφάλου, γαστρεντερικού σωλήνα, αιματολογικές κακοήθειες	<i>MLH1, MSH2, MSH6</i>
Juvenile polyposis	Γαστρεντερικού σωλήνα, παγκρέατος	<i>SMAD4/DPC4, BMPR1A</i>
Peutz-Jeghers	Παχέος εντέρου, λεπτού εντέρου, μαστού, ωοθηκών, παγκρέατος	<i>STK11</i>
	Παγκρέατος, μελάνωμα	<i>CDKN2A/p16</i>
Turcot	Παχέος εντέρου, βασικών κυττάρων, επενδύδωμα, μυελοβλάστωμα, γλοιοβλάστωμα	<i>APC, MLH1, PMS2</i>
Fanconi anemia	Λευχαιμία, ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα, δέρματος, ηπάτωμα	<i>FANCA,B,C,D2, E,F,G</i>
Bloom	Λευχαιμία, καρκίνωμα γλώσσας, πλακώδες καρκίνωμα, όγκοι Wilms', παχέος εντέρου	<i>BLM</i>
Νευροϊνωμάτωση τύπου 1	Νευροϊνοσάρκωμα, φαιοχρωμοκύττωμα, οπτικά γλοιώματα, μηνιγγίωμα	<i>NF1</i>
Νευροϊνωμάτωση τύπου 2	Κεντρικό νευρικό σύστημα	<i>NF2</i>
Οζώδης σκλήρυνση	Πολλαπλό αμφοτερόπλευρο αγγειολίπωμα νεφρών, επενδυματικών οζιδίων εγκεφάλου, όγκοι νεφρών κ.α	<i>TSC1, TSC2</i>
Συμπλέγματος Carney	Καρδιακά μυξώματα, όγκοι επινεφριδίων	<i>PRKAR1A</i>
Gorlin	Καρκίνοι βασικών κυττάρων, όγκοι εγκεφάλου	<i>PTCH</i>

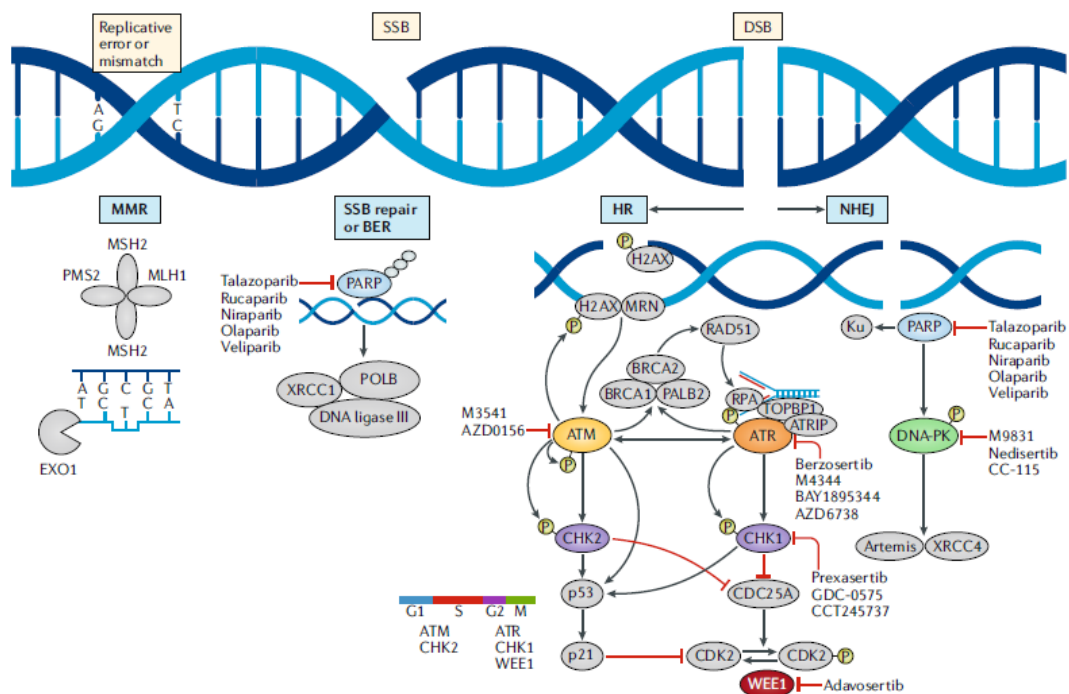
Shwachman-Diamond	Μυελοδυσπλασία, οξεία μυελογενής λευχαιμία	<i>SBDS</i>
Nijmegen breakage	Λεμφώματα, γλοιώματα, μυελοβλαστώματα, ραβδομυοσαρκώματα	<i>NBS1</i>
von Hippel-Lindau	Αιμαγγειοβλαστώματα αμφιβληστροειδούς, νεφρών, φαιοχρωμοκύττωμα	<i>VHL</i>
Beckwith-Wiedemann	Όγκοι Wilms', ηπατοβλάστωμα, καρκίνος επινεφριδίων, γοναδοβλάστωμα	<i>CDKN1C, NSD1</i>
Ρετινοβλάστωμα	Ρετινοβλάστωμα, οστεοσάρκωμα	<i>RB1</i>

11. Θεραπευτικές προσεγγίσεις στον κληρονομικό καρκίνο μαστού/ωοθηκών

Η γονιδιωματική αστάθεια είναι κύριο χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων, η οποία επάγεται όταν οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης του γενετικού υλικού αποτυγχάνουν να λειτουργήσουν σωστά. Το αποτέλεσμα είναι η συσσώρευση γενετικών ανωμαλιών, όπως μεταλλαγές και αναδιατάξεις που ευνοούν την επιβίωση των καρκινικών κλώνων. Οι ίδιοι αυτοί μηχανισμοί που οδηγούν σε γονιδιωματική αστάθεια, μπορούν να αποτελέσουν και θεραπευτικούς στόχους για την αντιμετώπιση του καρκίνου μέσω της ακτινοθεραπείας, της χημειοθεραπείας και τελευταία με την ανάπτυξη χημικών παραγόντων που στοχεύουν συγκεκριμένα μόρια που συμμετέχουν στα μονοπάτια επιδιόρθωσης [80].

Μία νέα και πολλά υποσχόμενη προσέγγιση στη στοχευμένη θεραπεία του καρκίνου αποτελούν οι PARP αναστολείς. Οι πολυμεράσες της πολυαδενοφωσφορικής ριβόζης (PARPs) αποτελούν μία μεγάλη οικογένεια 18 πυρηνικών πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες PARP ενεργοποιούνται με την πρόσδεση τους στο DNA που φέρει τη βλάβη και η κύρια λειτουργία τους είναι η αναγνώριση των θραύσεων τόσο της μονής, όσο και της διπλής έλικας. Στη συνέχεια στρατολογούν τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης και σταθεροποιούν τη δικάλα αντιγραφής κατά την επιδιόρθωση. Οι

αναστολείς αυτοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως θεραπεία στους όγκους που ο ομόλογος ανασυνδυασμός δε λειτουργεί σωστά, δηλαδή σε ασθενείς με γονιδιωματικές μεταλλάξεις των γονιδίων *BRCA1* και *BRCA2*. Ο τρόπος δράσης των αναστολέων βασίζεται στην έννοια της συνθετικής θνησιμότητας. Συμφωνα με αυτή, όταν στο καρκινικό κύτταρο ο ομόλογος ανασυνδυασμός αποτυγχάνει να λειτουργήσει, αν ανασταλλεί με τη χρήση φαρμακευτικών ουσιών και συγκεκριμένα των PARP αναστολέων, η λειτουργία μορίων που συμμετέχουν σε άλλα μονοπάτια επιδιόρθωσης, όπως η PARP, οδηγεί σε αυξημένη γενετική αστάθεια και τελικά σε κυτταρικό θάνατο του καρκινικού κυττάρου. Στην εικόνα 22 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα μονοπάτια επιδιόρθωσης και οι διαθέσιμοι φαρμακευτικοί παράγοντες που στοχεύουν διαφορετικά μόρια [80].



Εικόνα 22. Μηχανισμοί επιδιόρθωσης του γενετικού υλικού, όπου διάφορες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στα μονοπάτια αποτελούν φαρμακευτικούς στόχους για τη θεραπεία του καρκίνου. (Ανατύπωση από Pillie P. G., et al., *Nat Rev Clin Oncol*, 2018).

12. Επιγενετικές τροποποιήσεις του γενετικού υλικού στον καρκίνο

Η καρκινογένεση σχετίζεται άμεσα με τη συσσώρευση αλλοιώσεων του γενετικού υλικού, οι οποίες είναι είτε κληρονομούμενες είτε επίκτητες. Αυτές οι αλλοιώσεις μπορεί να έχουν γενετική και επιγενετική βάση. Με τον όρο επιγενετικές τροποποιήσεις αναφερόμαστε στις αλλαγές της δομής του DNA που κληρονομούνται από κύτταρο σε κύτταρο χωρίς να περιλαμβάνουν αλλαγές της αλληλουχίας του γενετικού υλικού. Τέτοιες τροποποιήσεις

είναι η μεθυλίωση του DNA, τροποποιήσεις των ιστονών (φωσφορυλίωση, ακετυλίωση, μεθυλίωση) και τα microRNAs [81].

12.1 Μεθυλίωση

Η μεθυλίωση συμβαίνει σε όλο το γονιδίωμα, κυρίως όμως στις περιοχές που είναι πλούσιες στα δινουκλεοτίδια CpG, οι οποίες είναι γνωστές και ως νησίδες CpG. Η μεθυλίωση του DNA πραγματοποιείται κυρίως στις νησίδες CpG και περιλαμβάνει την ενζυμική ένθεση μίας μεθυλομάδας σε ένα μόριο κυτοσίνης, χωρίς να μεταβάλλεται η αρχική αλληλουχία του DNA. Σε φυσιολογικές συνθήκες η πλειονότητα των νησίδων CpG είναι μεθυλιωμένες στο γονιδίωμα, με εξαίρεση αυτές που εντοπίζονται στο 5' άκρο στην περιοχή του υποκινητή και του εξονίου 1 των περισσοτέρων γονιδίων, όπου είναι μη-μεθυλιωμένες. Η μεθυλίωση του υποκινητή ενός γονιδίου σχετίζεται, με τροποποιήσεις των ιστονών, αλλαγή της δομής της χρωματίνης και τελικά την αποσιώπηση του γονιδίου. Αυτός ο τρόπος ελέγχου της έκφρασης των γονιδίων είναι αρκετά διαδεδομένος στο γονιδίωμα και περιλαμβάνει την εκλεκτική έκφραση των γονιδίων ανάλογα με το στάδιο της διαφοροποίησης, την απενεργοποίηση του χρωμοσώματος X στις γυναίκες, τη διατήρηση του μοτίβου εντυπώματος των γονιδίων και την αποσιώπηση των μεταθετών στοιχείων [81].

Η αλλαγή του μοτίβου μεθυλίωσης έχει συσχετιστεί άμεσα με την καρκινογένεση, κυρίως μέσω της τροποποίησης της έκφρασης των γονιδίων επάγοντας τη γενετική αστάθεια. Στην περίπτωση του κληρονομικού καρκίνου μαστού/ωοθηκών η ανίχνευση παθογόνων παραλλαγών σε γονίδια προδιάθεσης εξηγούν ένα ποσοστό των περιπτώσεων που διαγιγνώσκονται με καρκίνο του μαστού. Παραμένει όμως, ένα σημαντικό ποσοστό περιστατικών με οικογενή χαρακτήρα στο οποίο δεν ανευρίσκονται τέτοιες μεταλλαγές, καθώς και τα σποραδικά περιστατικά, γεγονός που μας οδηγεί στη διερεύνηση και άλλων γενετικών φαινομένων, όπως είναι οι επιγενετικές αλλαγές. Η μεθυλίωση του υποκινητή του *MLH1* έχει ήδη περιγραφεί εκτενώς στη βιβλιογραφία σε άτομα που έχουν φαινότυπο που ταιριάζει με το σύνδρομο Lynch, αλλά δεν φέρουν μεταλλαγές ή γονιδιακές αναδιατάξεις στα γονίδια MMR [82, 83]. Επίσης, επιγενετικές αλλαγές έχουν περιγραφεί ήδη στη βιβλιογραφία και κυρίως αφορούν τη μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου *BRCA1*, καθώς και άλλων γονιδίων, όπως είναι το *RAD51C* [84, 85]. Οι ασθενείς στις οποίες ανευρέθηκε μεθυλίωση του υποκινητή του *BRCA1* παρουσιάζουν αρκετές ομοιότητες με τις

ασθενείς που φέρουν γαμετικές μεταλλαγές στο *BRCA1*, όπως είναι η νεαρή ηλικία διάγνωσης, οι τριπλά αρνητικοί όγκοι και ο υψηλός βαθμός κακοήθειας [86] .

Σκοπός

Τα κληρονομικά καρκινικά σύνδρομα αποτελούν ένα μικρό ποσοστό του συνόλου των κακοηθειών που διαγιγνώσκονται. Η προδιάθεση στον κληρονομικό καρκίνο του μαστού έχει συσχετιστεί κυρίως με την παρουσία μεταλλαγών στα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2*, τα οποία εμπλέκονται στον ομόλογο ανασυνδυασμό, ένα μονοπάτι επιδιόρθωσης των ρήξεων της διπλής αλυσίδας του DNA. Τα δύο αυτά γονίδια είναι τα καλύτερα μελετημένα γονίδια προδιάθεσης και έχουν αναλυθεί σε βάθος τα τελευταία είκοσι χρόνια. Η αλληλούχηση DNA νέας γενιάς (NGS) που χρησιμοποιείται πλέον ευρέως, έχει αναδείξει και άλλα γονίδια, υψηλής και ενδιάμεσης διεισδυτικότητας, τα οποία έχουν συσχετιστεί με προδιάθεση στον καρκίνο του μαστού. Επιπλέον, με κληρονομική προδιάθεση έχουν συσχετιστεί και τα γονίδια MMR (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* και *PMS2*), τα οποία συμμετέχουν στο μονοπάτι επιδιόρθωσης αταίριαστων βάσεων. Η ανίχνευση μεταλλαγών στα γονίδια MMR οδηγεί σε αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου των ωοθηκών, αλλά και, όπως είναι γνωστό, στην εμφάνιση του συνδρόμου Lynch. Το σύνδρομο αυτό χαρακτηρίζεται κυρίως από την προδιάθεση σε καρκίνο του παχέος εντέρου και ενδομήτριου, αλλά και άλλων κακοηθειών.

Οι σημειακές μεταλλαγές είναι οι πιο συχνά απαντώμενες γενετικές αλλαγές που ανιχνεύονται στα γονίδια προδιάθεσης στον καρκίνο, ενώ οι μεγάλες γονιδιακές αναδιατάξεις καταλαμβάνουν ένα σημαντικό ποσοστό των ανευρισκόμενων γενετικών παραλλαγών. Σε πολλές όμως περιπτώσεις καρκίνου παρά τη γονιδιακή ανάλυση δεν έχει βρεθεί το γενετικό υπόβαθρο που μπορεί να ευθύνεται για την ανάπτυξη της νόσου. Σε αυτές τις περιπτώσεις γίνεται προσπάθεια αναζήτησης εναλλακτικών γενετικών μηχανισμών, όπως είναι η επιγενετική αποσιώπηση των γονιδίων μέσω της μεθυλίωσης.

Με βάση τα παραπάνω σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η διερεύνηση της γενετικής βάσης του καρκίνου σχετικά με το ρόλο της παρουσίας μεταλλαγών σε ογκοκατασταλτικά και επιδιορθωτικά γονίδια καθώς και η ταυτοποίηση επιγενετικών φαινομένων και μηχανισμών, εστιάζοντας στον κληρονομικό καρκίνο μαστού/ωοθηκών και στο σύνδρομο Lynch. Η αρχική προσέγγιση είναι η διερεύνηση του φάσματος των μεταλλαγών των δύο κύριων γονιδίων που σχετίζονται με προδιάθεση στον καρκίνο μαστού και ωοθηκών, τα *BRCA1* και *BRCA2*. Σε ασθενείς που δεν ανευρέθηκαν σημειακές μεταλλαγές θα γίνει έλεγχος για την ανίχνευση μεγάλων γονιδιακών αναδιατάξεων. Εκτός των δύο αυτών βασικών γονιδίων, η ανάλυση θα επεκταθεί και σε νέα γονίδια που έχουν συσχετισθεί με τον κληρονομικό καρκίνο μαστού/ωοθηκών με τη χρήση NGS που επιτρέπει την ταυτόχρονη

αλληλούχηση πολλών γονιδίων. Από την ανάλυση αυτή θα θέλαμε να δούμε τη συμβολή νέων γονιδίων προδιάθεσης στην καρκινογένεση. Επίσης, εκτός από τα γονίδια που εμπλέκονται στον ομόλογο ανασυνδυασμό θα θέλαμε να μελετήσουμε την παρουσία των μεταλλαγών και γονιδιακών αναδιατάξεων των γονιδίων MMR, που συμμετέχουν στο μονοπάτι επιδιόρθωσης αταίριαστών βάσεων και σχετίζονται με την εμφάνιση του συνδρόμου Lynch. Τέλος, σε ασθενείς που δεν έχει αποσαφηνιστεί το γενετικό υπόβαθρο της νόσου θα πραγματοποιηθεί ανάλυση επιγενετικών τροποποιήσεων, συγκεκριμένα της μεθυλίωσης, που πιθανά συμβάλουν στην καρκινογένεση.

Υλικά και Μέθοδοι

1. Υλικό Μελέτης

Τα δείγματα που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία συμπεριλήφθηκαν με βάση τα στοιχεία του ατομικού και του οικογενειακού ιστορικού και του σχεδιασμού του γενεαλογικού δένδρου (κατά προτίμηση σε βάθος τριών γενεών). Παράλληλα, ζητούνται οι ιστολογικές εκθέσεις που πιστοποιούν τη διάγνωση του καρκίνου, ώστε να συνεκτιμηθούν και τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά του όγκου. Συγκεκριμένα οι ασθενείς με καρκίνο του μαστού, σύμφωνα με τις διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες NCCN (National Comprehensive Cancer Network guidelines) [87], πρέπει να πληρούν τα παρακάτω κριτήρια για να είναι αναγκαίος ο γονιδιακός έλεγχος:

- Διάγνωση καρκίνου του μαστού πριν την ηλικία των 50 ετών.
- Διάγνωση τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού σε ηλικία μικρότερη των 60 ετών.
- Διάγνωση σύγχρονου ή μετάχρονου ή αμφοτερόπλευρου καρκίνου μαστού.
- Παρουσία τουλάχιστον μίας συγγενούς 1^{ου} ή 2^{ου} βαθμού με διάγνωση καρκίνου του μαστού σε ηλικία μικρότερη από τα 50 έτη.
- Παρουσία τουλάχιστον μίας στενής συγγενούς με διάγνωση καρκίνου των ωοθηκών σε οποιαδήποτε ηλικία.
- Παρουσία τουλάχιστον δύο στενών συγγενών που έχουν διαγνωσθεί με καρκίνο μαστού, προστάτη (Gleason score ≥ 7) ή/και παγκρέατος σε οποιαδήποτε ηλικία.
- Παρουσία συγγενούς με ανδρικό καρκίνο μαστού.

Μία ασθενής για να υποβληθεί σε γενετικό έλεγχο πρέπει να πληροί τουλάχιστον ένα από τα παραπάνω κριτήρια.

Αντίστοιχα, οι ασθενείς με διάγνωση καρκίνου του παχέος εντέρου και υποψία ότι πάσχουν από σύνδρομο Lynch για να προχωρήσουν σε γενετική ανάλυση πρέπει να πληρούνται τα κριτήρια Άμστερνταμ ή τα επικαιροποιημένα κριτήρια Bethesda, τα οποία και αναφέρθηκαν αναλυτικά παραπάνω (βλέπε 9.1.5).

Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία της αξιολόγησης του περιστατικού προσδιορίζεται αν είναι απαραίτητος ο γονιδιακός έλεγχος, ποιος είναι ο κατάλληλος έλεγχος στην εκάστοτε περίπτωση και ποιο είναι το καταλληλότερο μέλος της οικογένειας να ελεγχθεί, ώστε το αποτέλεσμα να είναι πληροφοριακό. Παράλληλα, όλοι οι ασθενείς προτού προχωρήσουν στη δειγματοληψία και τη γενετική ανάλυση, έχουν ενημερωθεί και συναινέσει εγγράφως.

2. Ομάδες Μελέτης

2.1 Ανάλυση των γονιδίων *BRCA1* και *BRCA2*

Πραγματοποιήθηκε πλήρης αλληλούχηση των γονιδίων *BRCA1* και *BRCA2* σε 172 ασθενείς. Η επιλογή των ασθενών για γονιδιακό έλεγχο που συμπεριλήφθηκαν στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες του National Comprehensive Cancer Network, Inc. (NCCN). Στις ασθενείς που δεν έφεραν μεταλλάξεις στα εν λόγω γονίδια έγινε περαιτέρω ανάλυση για την ανίχνευση μεγάλων γονιδιακών αναδιατάξεων (LGRs) στα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2*, καθώς και σε άλλα γονίδια που εμπλέκονται στον κληρονομικό καρκίνο του μαστού.

2.2 Ανίχνευση μεγάλων γονιδιακών αναδιατάξεων με τη τεχνική MLPA

Από τους παραπάνω ασθενείς, οι 142 ασθενείς που ελέγχθηκαν και ήταν αρνητικοί για μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2* υποβλήθηκαν σε περαιτέρω έλεγχο για την ανίχνευση μεγάλων γονιδιακών αναδιατάξεων σε αυτά τα γονίδια με την τεχνική MLPA. Όπου κρίθηκε απαραίτητο, ανάλογα με το ατομικό και οικογενειακό ιστορικό έγινε έλεγχος για γονιδιακές αναδιατάξεις και σε άλλα γονίδια προδιάθεσης σε καρκίνο του μαστού, όπως είναι το γονίδιο *TP53*.

Λόγω του μικρού ποσοστού των γονιδιακών αναδιατάξεων που απαντώνται, για να υπάρξει πληρέστερος έλεγχος της γενετικής βάσης των ασθενών επεκτάθηκε ο έλεγχος σε επιπλέον 443 ασθενείς. Όλες οι ασθενείς επιλέχθηκαν σύμφωνα με τις διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες NCCN.

2.3 Έλεγχος 94 γονιδίων προδιάθεσης καρκίνου με αλληλούχηση DNA νέας γενιάς (NGS)

Η επιλογή των ασθενών για έλεγχο με NGS έγινε βάση του οικογενειακού ιστορικού. Έτσι, στην παρούσα διατριβή συμπεριλήφθηκαν ασθενείς που είχαν διαγνωσθεί με καρκίνο του μαστού σε ηλικία μικρότερη από τα 65 έτη και είχαν ιδιαίτερα βεβαρημένο οικογενειακό ιστορικό, υπήρχαν δηλαδή τουλάχιστον άλλα 3 περιστατικά κακοήθειας μαστού, ωθηκών ή/και παγκρέατος στην οικογένεια. Συνολικά αναλύθηκαν 108 ασθενείς, οι οποίες

προηγουμένως είχαν ελεγχθεί και ήταν αρνητικές για μεταλλαγές στα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2*.

2.4 Ανάλυση ασθενών για τη μεταλλαγή c.2257 C>T του γονιδίου *PALB2*

Από την ανάλυση NGS, σε συνδυασμό με προηγούμενες μελέτες του Εργαστηρίου Μοριακής Διαγνωστικής, προέκυψε ότι μεγάλο ποσοστό μεταλλαγών απαντώνται στο γονίδιο *PALB2* με τη c.2257C>T να ανευρίσκεται σχετικά συχνά. Για το λόγο αυτό η ανάλυση για την μεταλλαγή c.2257C>T του γονιδίου *PALB2* πραγματοποιήθηκε σε 2496 ασθενείς που είχαν διαγνωστεί με κακοήθεια του μαστού, εκ των οποίων οι 873 είχαν τουλάχιστον ένα συγγενή που είχε διαγνωσθεί με κακοήθεια μαστού ή/και ωθηκών ή/και παγκρέατος, ενώ 1623 ασθενείς δεν ανέφεραν οικογενειακό ιστορικό ή δεν υπήρχαν διαθέσιμες οι σχετικές πληροφορίες. Επιπλέον, για τη συγκεκριμένη μεταλλαγή αναλύθηκαν και 697 ασθενείς που έπασχαν από καρκίνο των ωθηκών, εκ των οποίων οι 220 είχαν αναφέρει την ύπαρξη οικογενειακού ιστορικού με τις προαναφερθείσες κακοήθειες και 477 δεν είχαν αναφέρει άλλα περιστατικά κακοηθειών σε μέλη της οικογένειας. Όλοι οι ασθενείς που συμπεριλήφθηκαν στην παρούσα μελέτη είχαν προηγουμένως ελεγχθεί και ήταν αρνητικοί για μεταλλαγές στα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2*.

2.5 Ανάλυση απλοτύπων σε ασθενείς που έφεραν τη μεταλλαγή c.2257 C>T του γονιδίου *PALB2*

Η ανάλυση απλοτύπων πραγματοποιήθηκε σε 23 άτομα που έφερα μεταλλαγή c.2257 C>T. Οι 12 ήταν οι ασθενείς αναφοράς, στις οποίες αρχικά ανιχνεύθηκε η μεταλλαγή, ενώ οι υπόλοιποι 11 ήταν μέλη των οικογενειών στα οποία είχε ανευρεθεί η c.2257 C>T.

2.7 Ανάλυση των γονιδίων MMR

Η ανάλυση των γονιδίων *MMR* (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*) πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς που έπασχαν από κακοήθειες που σχετίζονται με το σύνδρομο Lynch (βάσει των επικαιροποιημένων κριτηρίων Bethesda). Συνολικά αναλύθηκαν 93 ασθενείς για την ανεύρεση σημειακών μεταλλαγών των γονιδίων. Οι ασθενείς που ήταν αρνητικοί για σημειακές μεταλλαγές αυτών των γονιδίων αναλύθηκαν για την ανίχνευση μεγάλων γονιδιακών αναδιατάξεων των γονιδίων *MLH1* και *MSH2*, με τη τεχνική MLPA.

3. Ομάδες Αναφοράς

3.2 Ανάλυση ατόμων για τη μεταλλαγή c.2257 C>T του γονιδίου *PALB2*

Συνολικά αναλύθηκαν 1.114 γυναίκες χωρίς διάγνωση καρκίνου, Ελληνικής καταγωγής, ως δείγματα αναφοράς για τη μεταλλαγή c.2257 C>T του γονιδίου *PALB2*.

3.2 Ανάλυση απλοτύπων για τη μεταλλαγή c.2257 C>T του γονιδίου *PALB2* σε γυναίκες που δεν είχαν διαγνωσθεί με καρκίνο

Κατά την ανάλυση απλοτύπων ελέγχθηκαν συνολικά 55 υγιείς γυναίκες που δεν έφεραν τη μεταλλαγή c.2257 C>T του γονιδίου *PALB2*.

4. Μέθοδοι

4.1 Απομόνωση γενωμικού DNA

Για την απομόνωση γενωμικού DNA απαιτούνται 5ml ολικού περιφερικού αίματος, τοποθετημένο σε ειδικά σωληνάρια που περιέχουν αντιπηκτικό EDTA. Η διαδικασία περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω. Συνοπτικά περιλαμβάνει τη λύση των ερυθρών και των λευκών αιμοσφαιρίων και την κατακρήμνιση του DNA με αιθανόλη. Η μέθοδος επιτελείται σε δύο ημέρες.

Υλικά:

- Διάλυμα Λύσης
 - 10mM Tris-HCl, pH 7.5
 - 5mM MgCl₂
 - 1% v/v Triton X-100
 - 0.32M σακχαρόζη
- Ρυθμιστικό διάλυμα SET
 - 10mM Tris-HCl, pH 8.0
 - 100mM NaCl
 - 1mM EDTA

- SDS 10% (Sigma - Aldrich Co, St. Louis, MO,USA)
- Πρωτεΐνάση K (Lab Supplies)
- 6M NaCl
- Χλωροφόρμιο (Merck)
- Ισοπροπανόλη
- Αιθανόλη (Merck, Darmstadt, Germany)
- Διάλυμα lowTE (1x)
 - 10 mM Tris-HCl, pH 8
 - 0.1 mM EDTA, pH 8

Διαδικασία

Πρώτη ημέρα

- Προσθήκη του δείγματος σε ειδικά σωληνάρια 50ml τύπου falcon
- Προσθήκη στο σωληνάριο 20ml διαλύματος λύσης
- Ανάδευση σε συσκευή vortex
- Φυγοκέντρηση για 20 λεπτά σε 710g στους 4° C
- Απομάκρυνση του υπερκειμένου
- Προσθήκη 12.5 ml διαλύματος λύσης
- Ανάδευση σε συσκευή vortex
- Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε 710g στους 4° C
- Απομάκρυνση του υπερκειμένου
- Προσθήκη 800μL SET, 40μL 10% SDS & 80 μL πρωτεΐνάση K (10 mg/mL)
- Ανάδευση
- Επώαση του 37° C (υδατόλουτρο) για 16 – 24 ώρες

Δεύτερη ημέρα

- Αφαίρεση από το υδατόλουτρο
- Προσθήκη 300 μL 6M NaCl και 1.5ml διαλύματος χλωροφορμίου-ισοπροπανόλης (αναλογία 24:1)

- Ανάδευση σε συσκευή vortex μέχρι να δημιουργηθεί γαλάκτωμα
- Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε 1000g στους 4° C
- Συλλογή υπερκείμενου/υδάτινης φάσης (DNA) σε φιαλίδια τύπου erpendorf
- Προσθήκη διπλάσιου όγκου απόλυτης αιθανόλης (κατακρήμνιση DNA)
- Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε 14.500g
- Αφαίρεση υπερκείμενου
- Εξάτμιση υπολειμμάτων αιθανόλης
- Επαναδιάλυση του DNA σε low-TE στους 70° C

4.2 Φωτομέτρηση DNA

Μετά την ολοκλήρωση της απομόνωσης του DNA το επόμενο βήμα είναι η εκτίμηση της καθαρότητας και ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του DNA. Η διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται με τη φωτομέτρηση, η οποία πραγματοποιείται σε φωτόμετρο NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, USA). Για την εκτίμηση της καθαρότητας του δείγματος λαμβάνονται δύο μετρήσεις της απορρόφησης, στα 260nm και στα 280nm, και ο λόγος των δύο απορροφήσεων αποτελεί το δείκτη καθαρότητας. Το DNA θεωρείται καθαρό όταν ο λόγος αυτός κυμαίνεται μεταξύ 1.7 και 1.9.

4.3 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)

Η PCR είναι η πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική στα εργαστήρια που επιτρέπει την ενίσχυση μίας συγκεκριμένης περιοχής του DNA. Για να επιτευχθεί αυτό απαραίτητη είναι η χρήση ειδικών εκκινητών (πρόσθιος και ανάστροφος), καθώς και ένα θερμοσταθερό ένζυμο (Taq πολυμεράση).

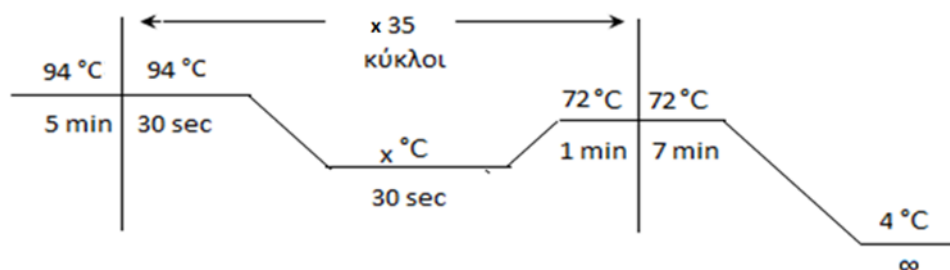
Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε σε θερμοκυκλοποιητή Veriti (Applied Biosystems). Τα απαραίτητα υλικά για την αντίδραση είναι:

- Ρυθμιστικό διάλυμα με MgCl₂
- Εκκινητές (πρόσθιος και ανάστροφος)
- Taq πολυμεράση
- ddH₂O

Η αντίδραση έλαβε χώρα σε τελικό όγκο 25μl και οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα:

Αντιδραστήριο	Αρχική Συγκέντρωση	Τελική Συγκέντρωση	Όγκος
Ρυθμιστικό Διάλυμα	10x	1x	2.5 μl
dNTPs	10mM	0.4 μM	1 μl
Πρόσθιος Εκκινητής	10 μM	0.3 μM	0.75 μl
Ανάστροφος Εκκινητής	10 μM	0.3 μM	0.75 μl
Ταq πολυμεράση	5 U/μl	1 U	0.2 μl
DNA	50ng/μl	100 ng	2.0 μl
ddH ₂ O	-	-	17.8 μl
Τελικός όγκος αντίδρασης	-	-	25 μl

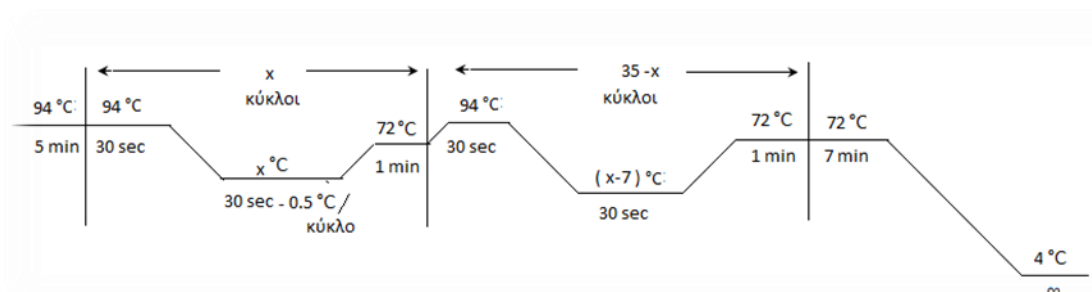
Ανάλογα με τη θερμοκρασία τήξης των ζευγών των εκκινητών χρησιμοποιήθηκαν δύο πρωτόκολλα PCR, το κλασικό (όταν οι εκκινητές έχουν παρόμοιες θερμοκρασίες τήξης) και ένα τροποποιημένο. Οι συνθήκες του κλασικού πρωτοκόλλου παρουσιάζονται στην εικόνα 23.



Εικόνα 23. Παρουσίαση των συνθηκών του κλασικού πρωτοκόλλου της PCR.

Το τροποποιημένο πρωτόκολλο (touch down), χρησιμοποιείται όταν οι θερμοκρασίες τήξης των εκκινητών παρουσιάζουν σημαντική απόκλιση και εμπεριέχει ένα επιπλέον βήμα κατά

το οποίο η θερμοκρασία σύνδεσης των εκκινητών μειώνεται κατά 0.5°C σε κάθε κύκλο. Στην εικόνα 24 παρουσιάζονται αναλυτικά οι συνθήκες αυτού του πρωτοκόλλου.



Εικόνα 24. Περιγραφή των συνθηκών του τροποποιημένου πρωτοκόλλου της PCR.

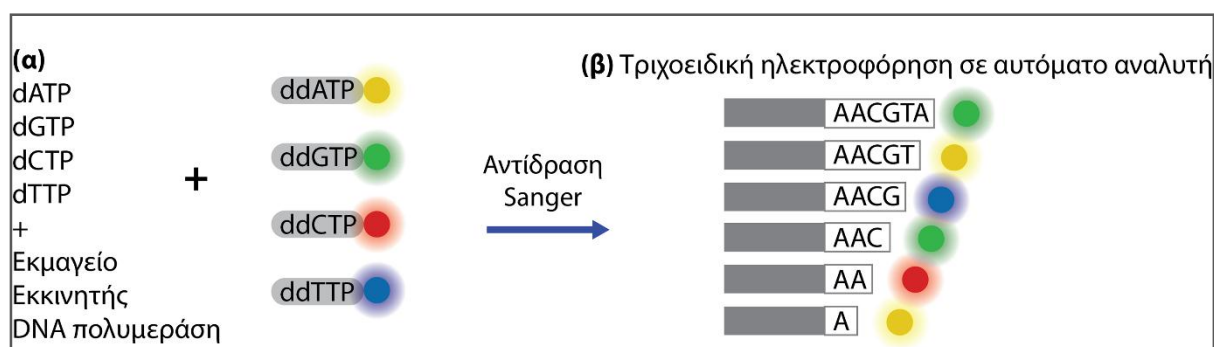
Μετά το πέρας της αντίδρασης ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης για να προσδιοριστεί αν ήταν επιτυχής η ενίσχυση του υπό μελέτη τμήματος του γενετικού υλικού. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης και ακολουθεί φωτογράφιση του πηκτώματος σε ειδική συσκευή φωτογράφισης (MiniBis Pro, DNR Bio-Imaging Systems Ltd).

4.4 Καθαρισμός των προϊόντων της PCR

Για να είναι επιτυχής η αλληλούχιση των προϊόντων της PCR είναι απαραίτητος ο καθαρισμός τους, ώστε να απομακρυνθούν τα αντιδραστήρια που βρίσκονται σε περίσσεια (εκκινητές, dNTPs) και παρεμποδίζουν την επιτυχή και ποιοτική αλληλούχιση. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται ειδικά διαμορφωμένα πιάτα 96 θέσεων (MultiScreen® PCRμ96 96-well plate, Millipore). Τα πιάτα αυτά αποτελούνται από ρητίνες που έχουν την ιδιότητα να κατακρατούν εκλεκτικά στη μεμβράνη τους το προϊόν της PCR, με τη χρήση αντλίας κενού. Έτσι, σε κάθε προϊόν της PCR προστίθενται 80μl ρυθμιστικού διαλύματος TE (1x) και στη συνέχεια τοποθετείται σε μία θέση του πιάτου. Το καθαρό πλέον προϊόν της αντίδρασης επαναδιαλύεται σε 20μl ρυθμιστικού διαλύματος TE (1x).

4.5 Αλληλούχιση κατά Sanger

Η ανάγνωση της αλληλουχίας του DNA βασίζεται στη μεθοδολογία που ανέπτυξε ο Sanger. Η μέθοδος βασίζεται στην ιδιότητα των τριφωσφορικών διδεοξυνουκλεοτιδίων (ddNTPs) να σταματούν την επιμήκυνση ενός κλώνου DNA. Αυτά τα μόρια είναι σημασμένα με τέσσερις διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές (R6G, TAMRA, ROX, R110) από τα οποία απουσιάζει η 3'-OH και τοποθετούνται τυχαία σε διάφορες θέσεις του αναπτυσσόμενου μορίου DNA. Στην αντίδραση της αλληλούχισης προστίθεται το υπό μελέτη DNA, από το οποίο η μία αλυσίδα χρησιμοποιείται ως εκμαγείο, ένας εκ των δύο εκκινητών (πρόσθιος ή ανάστροφος) και έτοιμο μίγμα αντίδρασης (Brilliant Dye Terminator Cycle sequencing kit, v3.1, Nimagen, The Netherlands). Στην εικόνα 25 παρουσιάζεται σχηματικά η διαδικασία της αλληλούχισης κατά Sanger.

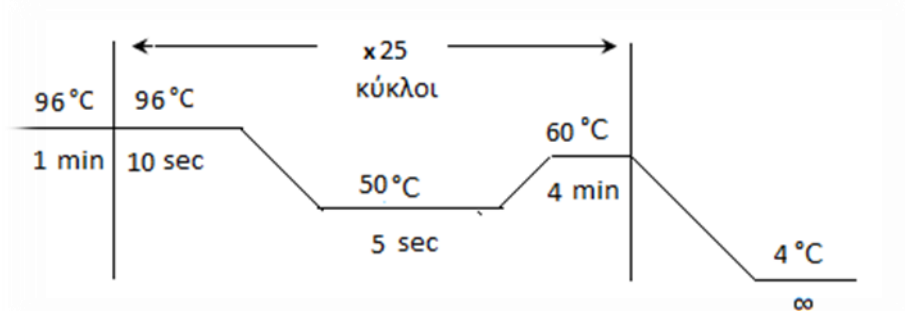


Εικόνα 25. Σχηματική αναπαράσταση της αλληλούχισης κατά Sanger.

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 10μl και οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

Αντιδραστήριο	Όγκος	Τελική Συγκέντρωση
Ρυθμιστικό διάλυμα αλληλούχισης (5x Sequencing Buffer)	2 μl	1x
Ready Reaction Mix v3.1	0.32 μl	-
Εκκινητής	0.5 μl	0.5 μM
PCR product	x μl	50 ng
H ₂ O	7.18-x μl	-

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε θερμοκυκλοποιητή Veriti και οι συνθήκες αναλυτικά παρουσιάζονται στην εικόνα 25.



Εικόνα 25. Περιγραφή των συνθηκών της αντίδρασης αλληλούχισης.

4.6 Καθαρισμός των προϊόντων αλληλούχισης σε στήλες σεφαρόζης

Μετά το πέρας της αντίδρασης της αλληλούχισης ακολουθεί καθαρισμός των προϊόντων σε στήλες σεφαρόζης - Sephadex G-50 (GE Healthcare Life Sciences, UK) ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια των ddNTPs. Η διαδικασία αυτή βασίζεται στη μέθοδο της μοριακής διήθησης κατά την οποία τα μόρια με μεγαλύτερο μοριακό βάρος εκλύονται πιο γρήγορα από τη στήλη, σε σχέση με τα μόρια με μικρό μοριακό βάρος.

Διαδικασία:

- Επιστοίβαξη των στηλών Sephadex G-50 (GE Healthcare Life Sciences, UK)
- Προσθήκη όλης της ποσότητας (10μl) του προϊόντος της αντίδρασης της αλληλούχισης
- Φυγοκέντρηση 1.300g για 2 λεπτά
- Προσθήκη στο έκλουσμα 50μl απόλυτης αιθανόλης
- Φυγοκέντρηση 12000g για 10 λεπτά
- Απόρριψη του υπερκειμένου

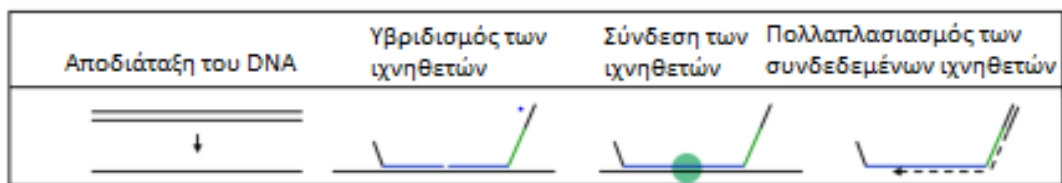
- Εξάτμιση των υπολειμμάτων της αιθανόλης στους 80 ° C
- Επαναδιάλυση του ιζήματος σε φορμαμίδιο (Hi-Di™ Formamide, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

Τα δείγματα υποβάλλονται σε τριχοειδική ηλεκτροφόρηση στο γενετικό αναλυτή ABI 3130XL Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), ενώ η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται με τη χρήση ειδικού λογισμικού (Sequencher, Gene Codes).

4.7 Πολλαπλή ενίσχυση τμημάτων DNA εξαρτώμενη από τη σύνδεση ιχνηθετών (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, MLPA)

Η πολλαπλή ενίσχυση τμημάτων DNA εξαρτώμενη από τη σύνδεση ιχνηθετών χρησιμοποιείται για την ανίχνευση γονιδιακών αναδιατάξεων. Οι μεγάλες γονιδιακές αναδιατάξεις αφορούν την απαλοιφή ή ένθεση μεγάλων γονιδιακών αλληλουχιών στην κωδική περιοχή, οδηγώντας στη δημιουργία πρωτεϊνών με μη φυσιολογική δομή ή/και λειτουργία.

Η αρχή της μεθόδου της βασίζεται στον πολλαπλασιασμό μέχρι και 60 ιχνηθετών με τη χρήση ειδικών ζευγών εκκινήτων. Κάθε ζεύγος ανιχνεύει μία συγκεκριμένη αλληλουχία DNA, η οποία έχει περίπου μέγεθος 60 νουκλεοτιδίων. Αρχικά τα δείγματα DNA αποδιατάσσονται και στη συνέχεια ακολουθεί ο υβριδισμός τους με τους ιχνηθέτες που αντιστοιχούν στις υπό μελέτη περιοχές του γενετικού υλικού. Κάθε ιχνηθέτης αποτελείται από δύο ολιγονουκλεοτίδια τα οποία μετά τον υβριδισμό τους στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA συνδέονται ώστε να δημιουργήσουν έναν και μόνο ιχνηθέτη. Κάθε ιχνηθέτης αντιστοιχεί σε ένα τμήμα DNA με συγκεκριμένο μέγεθος που κυμαίνεται ανάμεσα στα 130-500 νουκλεοτίδια. Κατά την αντίδραση του PCR οι συνδεδεμένοι ιχνηθέτες ενισχύονται, ενώ ο ένας εκ των δύο εκκινήτων της PCR είναι σημασμένος με φθορίζουσα χρωστική. Αυτό εξυπηρετεί στην ανίχνευση των προϊόντων κατά την ηλεκτροφόρησή τους στον αυτόματο γενετικό αναλυτή. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων γίνεται συγκρίνοντας τα υπό μελέτη δείγματα με δείγματα αναφοράς, με δείγματα δηλαδή που είναι γνωστό ότι δεν φέρουν γονιδιακές αναδιατάξεις στα συγκεκριμένα γονίδια. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων επιτυγχάνεται με τη χρήση ειδικού λογισμικού, το Coffalyser. Στην εικόνα 30 παρουσιάζονται τα στάδια της τεχνικής MLPA.



Εικόνα 30. Τα στάδια της τεχνικής MLPA.

Η πολλαπλή ενίσχυση τμημάτων DNA εξαρτώμενη από τη σύνδεση ιχνηθετών είναι μία σχετικά απλή, φθηνή, ευαίσθητη και υψηλής απόδοσης τεχνική, η οποία όμως έχει και κάποια μειονεκτήματα. Αυτά συμπεριλαμβάνουν τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα που προκύπτουν όταν οι ιχνηθέτες έχουν σχεδιασθεί εκτός της περιοχής που εντοπίζεται η αναδιάταξη, καθώς και τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα που αφορούν απαλοιφές. Τα τελευταία προκύπτουν όταν υπάρχει μία σημειακή παραλλαγή η οποία εντοπίζεται στην αλληλουχία του ιχνηθέτη. Επίσης, η συγκεκριμένη τεχνική παρουσιάζει ιδιαίτερη ευαισθησία στις επιμολύνσεις σε σχέση με τις κλασικές μοριακές τεχνικές και δεν προτείνεται η χρήση της σε μελέτες που περιλαμβάνουν ένα κύτταρο.

Η τεχνική MLPA χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση μεγάλων γονιδιακών αναδιατάξεων των γονιδίων *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *MLH1* και *MSH2*. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα μίγματα ιχνηθετών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση αναδιατάξεων των αντίστοιχων γονιδίων. Όλα τα μίγματα προέρχονται από την εταιρεία MRC- Holland (MRC- Holland, Amsterdam, the Netherlands).

Γονίδιο	Μίγμα ιχνηθετών	Αριθμός ιχνηθετών	Μήκος προϊόντων (νουκλεοτίδια)
<i>BRCA1</i>	P002-D1	38	142-459
<i>BRCA2</i>	P045-C1	43	136-481
<i>TP53</i>	P056-D1	26	140-459
<i>MLH1/MSH2</i>	P003-D1	41	142-481

4.6.1 Πειραματικό πρωτόκολλο της τεχνικής MLPA

Η πειραματική διαδικασία της MLPA περιλαμβάνει τρία στάδια, i) υβριδισμός, ii) σύνδεση των ιχνηθετών και iii) πολλαπλασιασμός των συνδεδεμένων ιχνηθετών, τα οποία επιτελούνται σε δύο μέρες.

1^η Μέρα

- Αποδιάταξη των δειγμάτων DNA (60ng) στους 98°C για 5 λεπτά
- Αποδιάταξη των ιχνηθετών στους 95°C για 1 λεπτό
- Υβριδισμός στο 60°C για 16-24 ώρες

2^η Μέρα

- Σύνδεση των υβριδοποιημένων ιχνηθετών
- Αντίδραση της PCR για την ενίσχυση των συνδεδεμένων ιχνηθετών

Η τεχνική MLPA πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Στην εικόνα 31 παρουσιάζονται αναλυτικά οι συνθήκες των αντιδράσεων της MLPA.

• Αποδιάταξη του DNA		
1.	98°C	5 λεπτά
2.	25°C	παύση
• Υβριδισμός		
3.	95°C	1 λεπτό
4.	60°C	παύση
• Αντίδραση Σύνδεσης		
5.	54°C	παύση
6.	54°C	15 λεπτά
7.	98°C	5 λεπτά
8.	20°C	παύση
• Αντίδραση PCR		
9.	95°C	30 δευτερόλεπτα
	60°C	30 δευτερόλεπτα
	72°C	60 δευτερόλεπτα
10.	72°C	20 λεπτά
11.	15°C	παύση

} x35

Εικόνα 31. Συνθήκες των αντιδράσεων της τεχνικής MLPA.

Μετά το πέρας της πειραματικής διαδικασίας, 1μl της αντίδρασης PCR κάθε δείγματος αναμιγνύεται με 9μl φορμαμίδιου (Hi-Di™ Formamide, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) και 0,3μl μίγματος τμημάτων DNA γνωστού μεγέθους «ROX-500» (GeneScan™ 500 ROX™ Size Standard, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Ακολουθεί αποδιάταξη των

δειγμάτων στους 80°C για 3 λεπτά και στη συνέχεια ηλεκτροφορούνται σε αυτόματο γενετικό αναλυτή ώστε να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των προϊόντων. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται με τη χρήση ειδικού λογισμικού.

4.7 Μαζική παράλληλη αλληλούχηση (Next Generation Sequencing, NGS)

Για πολλά χρόνια η αλληλούχηση κατά Sanger αποτελούσε τη μέθοδο επιλογής για την ανάγνωση της αλληλουχίας του γενετικού υλικού. Τα τελευταία χρόνια η ανάπτυξη της τεχνολογίας της αλληλούχησης νέας γενιάς, κατά την οποία είναι δυνατή η πολλαπλή παράλληλη αλληλούχηση γονιδίων και πολλαπλών δειγμάτων ταυτόχρονα, χρησιμοποιείται ευρέως στα εργαστήρια. Αυτή τη στιγμή υπάρχουν διαθέσιμες στο εμπόριο διάφορες τεχνολογίες NGS. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκε το πολυγονιδιακό πάνελ «TruSight Cancer Panel» (Illumina, San Diego, California, U.S.A.), το οποίο περιλαμβάνει 94 γονίδια προδιάθεσης σε διάφορους τύπους καρκίνου όπως μαστού, ωοθηκών, παχέος εντέρου, στομάχου, νεφρών και άλλων κακοηθειών. Το σύνολο των γονιδίων που περιλαμβάνονται στο συγκεκριμένο γονιδιακό πάνελ παρουσιάζεται συγκεντρωτικά στην εικόνα 32.

AIP	ALK	APC	ATM	BAP1	BLM	BMP1A	BRCA1	BRCA2	BRIP1	BUB1B	CDC73
CDH1	CDK4	CDKN1C	CDKN2A	CEBPA	CEP57	CHEK2	CYLD	DDB2	DICER1	DIS3L2	EGFR
EPCAM	ERCC2	ERCC3	ERCC4	ERCC5	EXT1	EXT2	EZH2	FANCA	FANCB	FANCC	FANCD2
FANCE	FANCF	FANCG	FANCI	FANCL	FANCM	FH	FLCN	GATA2	GPC3	HNF1A	HRAS
KIT	MAX	MEN1	MET	MLH1	MSH2	MSH6	MUTYH	NBN	NF1	NF2	NSD1
PALB2	PHOX2B	PMS1	PMS2	PRF1	PRKAR1A	PTCH1	PTEN	RAD51C	RAD51D	RB1	RECQL4
RET	RHBDF2	RUNX1	SBDS	SDHAF2	SDHB	SDHC	SDHD	SLX4	SMAD4	SMARCB1	STK11
SUFU	TMEM127	TP53	TSC1	TSC2	VHL	WRN	WT1	XPA	XPC		

Εικόνα 32. Τα 94 γονίδια προδιάθεσης που περιλαμβάνονται στο πολυγονιδιακό πάνελ «TruSight Cancer Panel» για την ανίχνευση γαμετικών παραλλαγών. Ανάλογα με τον εντοπισμό της κακοήθειας, τα γονίδια έχουν χρωματιστεί και με διαφορετικό χρώμα. Έτσι, με ροζ παρουσιάζονται τα γονίδια προδιάθεσης στον καρκίνο του μαστού, με μωβ σε καρκίνο των ωοθηκών, με μπλε σε καρκίνο του παχέος εντέρου και πολυποδισιακά σύνδρομο, με κόκκινο σε καρκίνο του θυρεοειδούς, με γαλάζιο σε καρκίνο των νεφρών και με πράσινο τα γονίδια που σχετίζονται με την αναιμία Fanconi.

Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει πρωτόκολλο τριών ημερών. Τα δείγματα DNA προετοιμάζονται κατάλληλα με ένα βήμα καθαρισμού για την απομάκρυνση υπολειμμάτων πρωτεϊνών. Η απαιτούμενη συγκέντρωση γενετικού υλικού είναι 5ng/μl, ενώ η τελική συγκέντρωση DNA που απαιτείται στην πειραματική διαδικασία είναι 50ng. Η συγκέντρωση του δίκλωνου DNA καθορίζεται με τη χρήση φθορισμόμετρου (Quantus Fluorometer, Promega, USA).

1η Ημέρα

- Ενζυμικός θρυμματισμός του γενωμικού DNA και παράλληλη προσθήκη ειδικών αλληλουχιών (adapter sequences) που επιτρέπουν την ενίσχυση των θραυσμάτων
- Καθαρισμός των θραυσμάτων που έχουν σημανθεί με τις ειδικές αλληλουχίες
- Προσθήκη ειδικών αλληλουχιών για τη διάκριση των δειγμάτων και πολλαπλασιασμός τους με χρήση ειδικών εκκινητών ώστε να δημιουργηθούν οι βιβλιοθήκες
- Καθαρισμός των βιβλιοθηκών με ειδικά σφαιρίδια καθαρισμού (purification beads)
- Υβριδισμός των βιβλιοθηκών στους 58°C για 14.5-24 ώρες με ιχνηθέτες που αντιστοιχούν στις υπό μελέτη περιοχές

2η Ημέρα

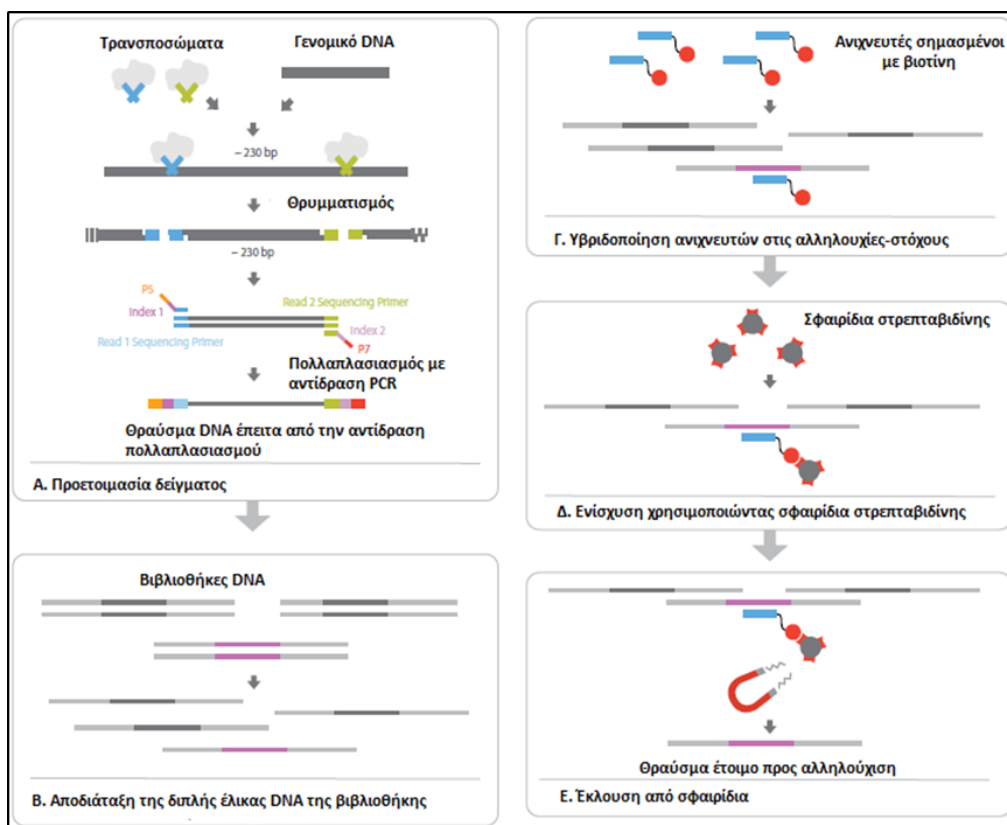
- Συλλογή των υβριδοποιημένων ανιχνευτών με τη χρήση σφαιριδίων στρεπταβιδίνης
- Δύο βήματα καθαρισμού στους 50°C για την απομάκρυνση των μη ειδικών προϊόντων σύνδεσης
- Υβριδισμός των βιβλιοθηκών στους 58°C για 14.5-24 ώρες ώστε να επιτευχθεί σύνδεση υψηλής ειδικότητας των υπό μελέτη περιοχών

3η Ημέρα

- Συλλογή των υβριδοποιημένων ανιχνευτών με τη χρήση σφαιριδίων στεπταβιδίνης

- Δύο βήματα καθαρισμού στους 50°C για την απομάκρυνση των μη ειδικών προϊόντων σύνδεσης
- Ενίσχυση των βιβλιοθηκών με PCR
- Καθαρισμός των προϊόντων PCR με σφαιρίδια καθαρισμού

Τα βήματα της πειραματικής διαδικασίας παρουσιάζονται στην εικόνα 33.



Εικόνα 33. Σχηματική αναπαράσταση της πειραματική πορείας του «TruSight Cancer Panel».

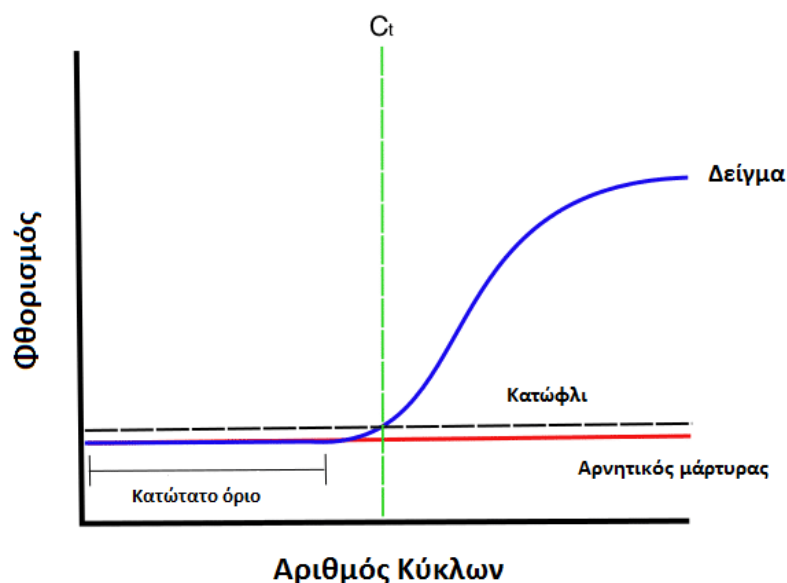
Η αλληλούχιση των δειγμάτων πραγματοποιείται σε γενετικό αναλυτή επόμενης γενιάς MiSeq (Illumina, San Diego, California, U.S.A.). Η διαδικασία αυτή ολοκληρώνεται σε περίπου 25 ώρες και η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιείται με μεθόδους βιοπληροφορικής. Το πρώτο βήμα είναι ο ποιοτικός έλεγχος των αλληλουχιών με το λογισμικό FastQC, στη συνέχεια οι υπό μελέτη αλληλουχίες στοιχίζονται με την ανθρώπινη αλληλουχία αναφοράς και ακολουθεί ανάλυση των αλληλουχιών και ταυτοποίηση των παραλλαγών. Τέλος, για την αξιολόγηση των παραλλαγών και για τον καθορισμό της

κλινικής τους σημασίας χρησιμοποιούνται διάφορες βάσεις δεδομένων, όπως ClinVar και LOVD.

4.8 Αντίδραση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR)

Το κύριο χαρακτηριστικό της μεθόδου της PCR πραγματικού χρόνου είναι ότι το πολλαπλασιαζόμενο DNA υπολογίζεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο. Η μέθοδος βασίζεται στη σύνδεση του παραγόμενου προϊόντος με φθορίζουσα χρωστική η οποία ανιχνεύεται από το οπτικό σύστημα ειδικού θερμοκυκλοποιητή.

Η PCR πραγματικού χρόνου μετράει τα προϊόντα PCR καθώς συσσωρεύονται ή μετράει σε πραγματικό χρόνο το ποσό των προϊόντων PCR όσο η αντίδραση βρίσκεται σε εκθετική φάση με τη χρήση φθορίζουσων χρωστικών. Στην αρχή της αντίδρασης το προϊόν δεν είναι ανιχνεύσιμο λόγω της μικρής του ποσότητας, όσο προχωράει η αντίδραση εισέρχεται στην εκθετική φάση κατά την οποία η ποσότητα του προϊόντος σχεδόν διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο. Το σημείο όπου όλα τα προϊόντα μπορούν συγκριθούν καθορίζεται ως κατώφλι. Ο αριθμός των κύκλων της PCR που απαιτούνται ώστε να παράγεται αρκετό σήμα φθορίζουσας χρωστικής που να μπορεί να είναι ανιχνεύσιμο, ονομάζεται κατώφλι κύκλου (cycle threshold, Ct). Οι τιμές του Ct είναι ανάλογες με την αρχική ποσότητα γενετικού υλικού που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση [88].



Εικόνα 26. Γραφική παράσταση των σταδίων της PCR πραγματικού χρόνου (Ανατύπωση από <https://bitesizebio.com/24581/what-is-a-ct-value/>).

Η γραφική παράσταση του πολλαπλασιασμού είναι η συνάρτηση του φθορισμού σε σχέση με το αριθμό των κύκλων. Οι κύκλοι της αντίδρασης PCR κατά τους οποίους παράγεται σήμα φθορισμού, αλλά δεν είναι αρκετό ώστε να μπορέσει να ανιχνευθεί από το μηχάνημα, καθορίζει το κατώτατο όριο, το οποίο χρησιμοποιείται για τον καθορισμό του κατωφλιού. Όταν το σήμα της χρωστικής ανιχνεύεται πάνω από το όριο του κατωφλιού θεωρείται πραγματικό και χρησιμοποιείται για τον καθορισμό του κατωφλιού κύκλου του δείγματος.

Για την ανίχνευση του πολλαπλασιασμού της αλληλουχίας στόχου υπάρχουν διάφορες μέθοδοι. Οι πιο κοινές είναι οι SYBR GREEN I χρωστική, οι ανιχνευτές υδρόλυσης και οι ανιχνευτές υβριδοποίησης. Η πιο απλή είναι η χρήση της SYBR GREEN I, η οποία είναι μία φθορίζουσα χρωστική που έχει την ιδιότητα να συνδέεται με δίκλιωνα μόρια DNA. Η ένταση του σήματος είναι ανάλογη της ποσότητας του DNA που υπάρχει στην αντίδραση. Συνεπώς, όσο προχωράει η αντίδραση και αυξάνεται η συγκέντρωση του DNA, αυξάνεται και η ένταση του σήματος. Το κύριο μειονέκτημα είναι η σύνδεση της SYBR GREEN I με μη-ειδικά προϊόντα.

4.8.1 Ανίχνευση της μεταλλαγής c.2257 C>T του γονιδίου PALB2 με PCR πραγματικού χρόνου

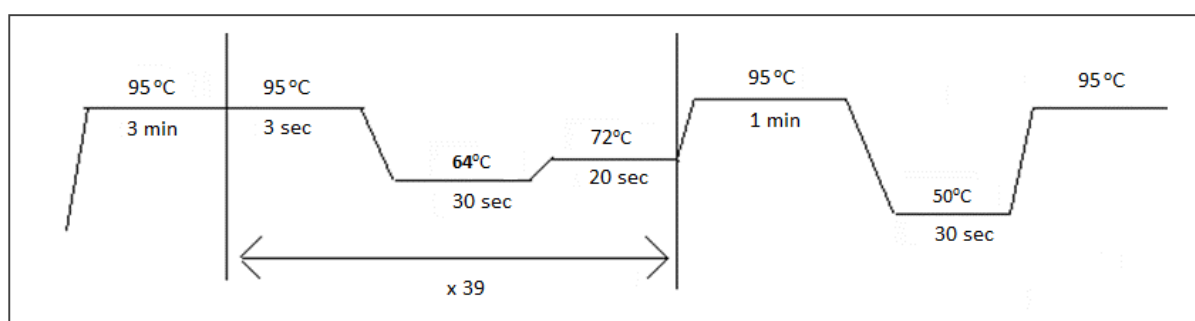
Η ανίχνευση της μεταλλαγής c.2257 C>T πραγματοποιήθηκε με τη τεχνική της PCR πραγματικού χρόνου, με τη χρήση της SYBR GREEN I και σε κυκλοποιητή CFX96 Touch Real-Time PCR (BIO-RAD, Life Science, CA, USA). Για το σκοπό αυτό σχεδιάστηκαν εκκινητές οι οποίοι ευνοούν την παραγωγή του προϊόντος που φέρει τη μεταλλαγή έναντι του προϊόντος αγρίου τύπου. Η c.2257 C>T εντοπίζεται στο εξόνιο 5 του γονιδίου PALB2 και δημιουργεί πρώιμο κωδικόνιο τερματισμού, έτσι ο πρόσθιος εκκινητής σχεδιάστηκε στην περιοχή εσονίου πριν από το εξόνιο 5, ενώ ο ανάστροφος στην αλληλουχία που εντοπίζεται η μεταλλαγή. Το παραγόμενο προϊόν έχει μέγεθος 1004bp. Οι αλληλουχίες των εκκινητών παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Εκκινητής	Αλληλουχία (5'→3')	Εντοπισμός	Θερμοκρασία αποδιάταξης
Πρόσθιος (5F)	GGCTCAAGCAATTCTCTTA	Ιντρόνιο	53°C
Ανάστροφος (5R)	GGTGTGCAGCAAGTTCA	Εξόνιο	53°C
Μέγεθος παραγόμενου προϊόντος 1004bp			

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 10μl, χρησιμοποιήθηκαν οι παραπάνω εκκινητές και η KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X) Universal (KapaBiosystems, Cape Town, South Africa). Για τη διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν πιάτα 96 θέσεων (cell project-Non Skirted PCR 96 well plates). Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκε θετικός και αρνητικός μάρτυρας, ενώ όλα τα θετικά αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με αλληλούχηση κατά Sanger. Οι ακριβείς συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Αντιδραστήριο	Όγκος	Τελική Συγκέντρωση
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X) Universal	5 μl	1x
Πρόσθιος Εκκινητής	0.5 μl	5 pmol/μl
Ανάστροφος Εκκινητής	0.5 μl	5 pmol/μl
DNA	1 μl	50 ng
H₂O	3 μl	-

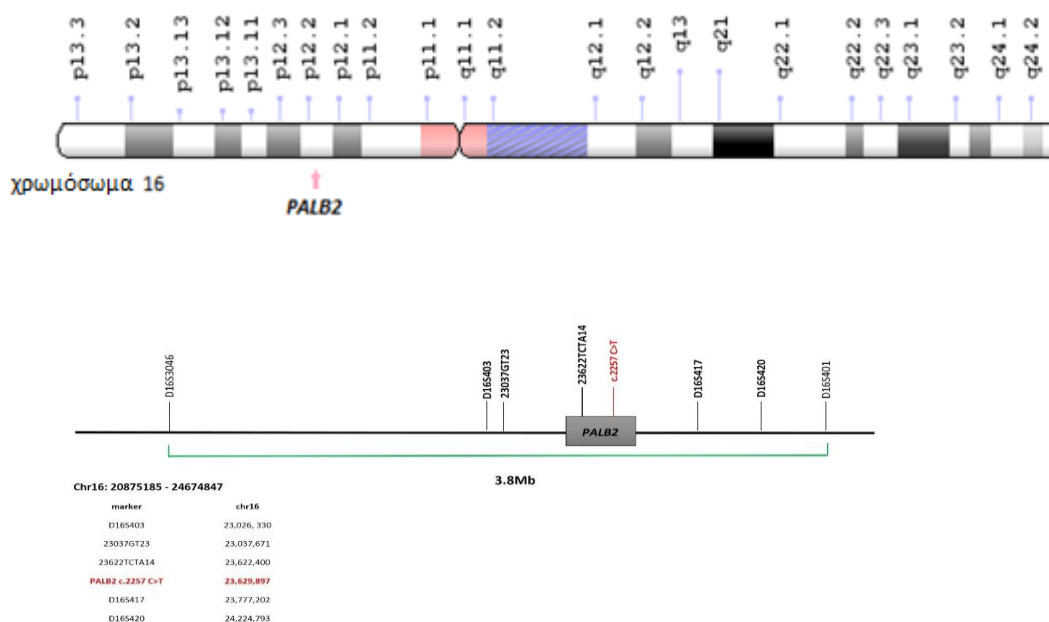
Η αντίδραση έλαβε χώρα σε θερμοκρασία σύνδεσης των εκκινητών 64°C, ώστε να διαχωριστούν τα δείγματα που φέρουν τη μεταλλαγή από εκείνα του φυσιολογικού τύπου. Οι συνθήκες της αντίδρασης φαίνονται στην εικόνα 27.



Εικόνα 27. Περιγραφή των συνθηκών της αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου

4.9 Διερεύνηση ιδρυτικού φαινομένου της μεταλλαγής c.2257 C>T του γονιδίου *PALB2* - Ανάλυση απλοτύπων

Η διερεύνηση της πιθανότητας του ιδρυτικού φαινομένου της παρούσας μεταλλαγής για τον Ελληνικό πληθυσμό πραγματοποιήθηκε με τη χρήση πολυμορφικών δεικτών (microsatellite analysis). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν 7 πολυμορφικοί δείκτες, που καταλαμβάνουν 3.8 Mb του χρωμοσώματος 16. Ο ένας δείκτης βρίσκεται εσωτερικά του γονιδίου (23622TCTA14), ενώ οι άλλοι 6 δείκτες περιβάλλουν το γονίδιο (D16S3046, D16S403, 23037GT23, D16S417, D16S420 and D16S401). Ο εντοπισμός των δεικτών στο χρωμόσωμα 16, καθώς και η θέση τους σε σχέση με το γονίδιο *PALB2* παρουσιάζεται στην εικόνα 28.



Εικόνα 28. Σχηματική αναπαράσταση της θέσης των πολυμορφικών δεικτών σε σχέση με το γονίδιο *PALB2*.

Οι αλληλουχίες των εκκινητών ανακτήθηκαν από τη δημοσίευση της Gattucci I. και των συνεργατών της [69] και από τη βάση δεδομένων ENSEMBL (<http://www.ensembl.org/index.html>). Ο πρόσθιος εκκινητής κάθε ζεύγους ήταν σημασμένος με μία φθορίζουσα χρωστική, FAM ή HEX. Οι αλληλουχίες των εκκινητών παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 9.

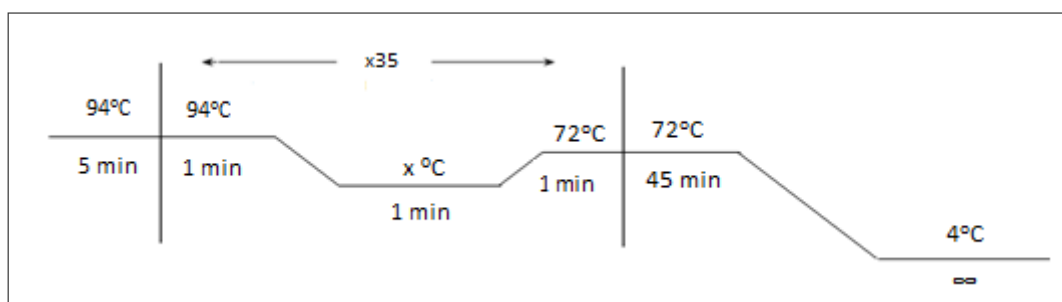
Πίνακας 9. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση απλοτύπων, η θέση τους στο χρωμόσωμα 16 και το μέγεθος των παραγόμενων προϊόντων της PCR.

Μικροδορυφορικός Δείκτης	Συντεταγμένες στο χρ. 16	Πρόσθιος Εκκινητής (5'→3')	Ανάστροφος Εκκινητής (5'→3')	Φθορίζουσα χρωστική	Μέγεθος προϊόντος PCR (bp)
D16S3046	20875185-20875288	CCCAGAATAAACTGCGTG	TTCATGGACCCCTATTG	FAM	84 – 108
D16S403	23026330-23026484	GTCAACGATGTCATGTTTT	TATTCATTTGTGTGGGCATG	FAM	155
23037GT23	23,037,671-23,037,716	GACAGTGAGGTGGGAATCAAAG	AAATCTCTGGGACTCTGAAACC	FAM	218-242
23622TCTA14	23,622,400-23,622,456	AGAGGAAGACTCTGTCTCAAAA	GTA AATCTAGAGATGAATCAACTG	FAM	119-147
D16S417	23,777,202-23,777,238	AACATGCAGCCTCCTTCTTC	CTGGTTAGCCAGACCTGCTC	HEX	152-180
D16S420	24224793-24225048	ACAAGGGTTATGGGAGGTATGAG	GGCAATATAGTGAGAATACCACTAG	HEX	248
D16S401	24674672-24674847	ACGGAGTCCACATAAAAAGCAGGCA	TGCCTGGTGGGTGGAGAATTTGGA	FAM	166 – 180

Η αντίδραση του πολλαπλασιασμού των τμημάτων που περιλαμβάνουν τις μικροδορυφορικές επαναλήψεις πραγματοποιήθηκε σε τελικό 20μl με τη χρήση των σημασμένων εκκινητών με τη φθορίζουσα χρωστική. Οι ακριβείς συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Αντιδραστήριο	Αρχική Συγκέντρωση	Τελική Συγκέντρωση	Όγκος
Ρυθμιστικό Διάλυμα	10x	1x	2 μl
dNTPs	10mM	0.4 μM	0.8 μl
Πρόσθιος Εκκινητής	10 μM	1 μM	2 μl
Ανάστροφος Εκκινητής	10 μM	1 μM	2 μl
Ταq πολυμεράση	5 U/μl	0.5 U	0.1 μl
DNA	50ng/μl	100 ng	2.0 μl
ddH₂O	-	-	11.1 μl
Τελικός όγκος αντίδρασης: 20 μl			

Η ενίσχυση των μικροδορυφορικών επαναλήψεων πραγματοποιήθηκε σε διάφορες θερμοκρασίες υβριδισμού και ο χρόνος επιμήκυνσης των τμημάτων καθορίστηκε στα 45 λεπτά. Οι συνθήκες της αντίδρασης παρουσιάζονται στην εικόνα 29.



Εικόνα 29. Περιγραφή των συνθηκών της αντίδρασης PCR για την ανάλυση απλοτύπων.

Οι θερμοκρασίες σύνδεσης των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση για το κάθε ζεύγος εκκινητών παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Μικροδορυφορικός Δείκτης	Θερμοκρασία σύνδεσης εκκινητών (° C)
D16S3046	50
D16S403	52
23037GT23	55
23622TCTA14	55
D16S417	55
D16S420	55
D16S401	59

Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης τα προϊόντα ηλεκτροφορούνται σε γενετικό αναλυτή και η ανάλυση των αποτελεσμάτων γίνεται με τη χρήση ειδικού λογισμικού, GeneMapper™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

4.10 Προσδιορισμός της ηλικίας της μεταλλαγής c.2257C>T

Η ηλικία της μεταλλαγής προσδιορίστηκε με τη χρήση του λογισμικού DMLE v2.2. Το πρόγραμμα χρησιμοποιεί τον αλγόριθμο Markov Chain Monte Carlo για να επιτρέψει την εκτίμηση της ηλικίας της μεταλλαγής κατά Bayes. Η μέθοδος βασίζεται στην ανισορροπία σύνδεσης που παρατηρείται μεταξύ των μεταλλαγών που σχετίζονται με την ασθένεια και

των συνδεδεμένων πολυμορφικών δεικτών του γενετικού υλικού στους ασθενείς και στα υγιή άτομα. Για το σκοπό αυτό λαμβάνονται υπόψιν οι απλότυποι που καθορίστηκαν στους ασθενείς και στην ομάδα ελέγχου, η φυσική απόσταση των δεικτών στο χρωμόσωμα, ο αριθμός των χρωμοσωμάτων που αναλύθηκαν και ο μέσος ρυθμός αύξησης του υπό μελέτη πληθυσμού [89].

4.11 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του τεστ Wilcoxon rank-sum ώστε να καθοριστούν οι πιθανές στατιστικές σημαντικές συσχετίσεις της μεταλλαγής c.2257C>T με την προδιάθεση στον καρκίνο του μαστού και πιο συγκεκριμένα η συσχέτισή της με τη διάγνωση σε νεαρή ηλικία. Στατιστικώς σημαντικές καθορίστηκαν οι τιμές μικρότερες του 0.05.

4.12 Μεγάλου εύρους αντίδραση PCR (Long range PCR)

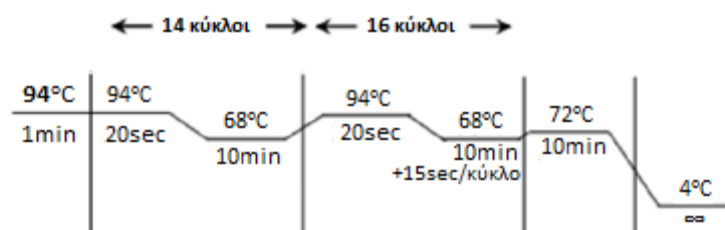
Η τεχνική MLPA χρησιμοποιείται για την ανίχνευση μεγάλων γονιδιακών αναδιατάξεων, χωρίς όμως να έχει τη δυνατότητα να καθορίσει τα ακριβή όρια θραύσης είτε των απαλοιφών είτε των διπλασιασμών, τα οποία συνήθως εντοπίζονται στις περιοχές εσονίων. Ο καθορισμός των ορίων θραύσης επιτυγχάνεται με την αλληλούχιση. Οι μεγάλες γονιδιακές αναδιατάξεις αφορούν μεγάλες περιοχές του γενετικού υλικού, οπότε για να καθοριστούν τα όρια θραύσης μέσω της αλληλούχισης το πρώτο βήμα είναι ο πολλαπλασιασμός μεγάλων τμημάτων DNA. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση της PCR μεγάλου εύρους.

Η PCR μεγάλου εύρους χρησιμοποιεί ένα μίγμα δύο θερμοσταθερών πολυμερασών του DNA εκ των οποίων η μία έχει δράση 3'-5' εξωνουκλεάσης επιτρέποντας την ενίσχυση μεγάλων τμημάτων DNA που μπορεί να φτάσει μέχρι και τον πολλαπλασιασμό προϊόντων μεγέθους έως 35kb. Συνήθως χρησιμοποιείται για την ανίχνευση συγκεκριμένων ανωμαλιών, όπως είναι οι απαλοιφές, οι ενθέσεις, οι διπλασιασμοί και οι θραύσεις των χρωμοσωμάτων. Ο κύριος περιορισμός της συγκεκριμένης τεχνικής είναι ότι δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ευρύτερη ανίχνευση αναδιατάξεων του γενετικού υλικού, αλλά περιορίζεται στην περιοχή που καθορίζεται από τους εκκινητές που χρησιμοποιούνται στην εκάστοτε περίπτωση.

Στην παρούσα διατριβή η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε για την επιβεβαίωση και τον προσδιορισμό των ορίων θραύσης των γονιδιακών αναδιατάξεων που ανιχνεύθηκαν στο γονίδιο *MSH2* (NM_000251.2). Για τη διεξαγωγή της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε η DNA πολυμεράση TaKaRa LA Taq (TAKARA BIO INC., Kyoto, Japan) και η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 25μl, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Οι ποσότητες και οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Αντιδραστήριο	Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση	Όγκος (μl)
Ρυθμιστικό διάλυμα 10X LA PCR Buffer II (Mg ²⁺ free)	10x	1x	2.5
MgCl ₂	25mM	2,5mM	2.5
dNTPs	2.5mM	2μM	4
Πρόσθιος εκκινητής	10μM	0,4μM	1
Ανάστροφος εκκινητής	10μM	0,4μM	1
TaKaRa LA Taq	5U/μl	0,05U	0.25
ddH ₂ O			12.5
DNA	400ng/μl	500ng	1.25

Η αντίδραση επιτελείται σε θερμικό κυκλοποιητή Veriti σύμφωνα με τις παρακάτω συνθήκες.



Εικόνα 30. Σχηματική αναπαράσταση των συνθηκών της αντίδρασης PCR μεγάλου εύρους.

4.12.1 Σχεδιασμός εκκινητών για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό των ορίων θραύσης των LGRs του γονιδίου *MSH2*

Στην PCR μεγάλου εύρους η βέλτιστη θερμοκρασία τήξης των εκκινητών είναι οι 60°C, ώστε οι συνθήκες να είναι κατάλληλες και να επιτευχθεί η ενίσχυση προϊόντων μεγάλου μοριακού βάρους. Αρχικά σχεδιάστηκαν οι κατάλληλοι εκκινητές ανάλογα με την απαλοιφή για την οποία θέλαμε να καθορίσουμε τα όρια θραύσης. Ο πρόσθιος εκκινητής σχεδιάζεται μέσα στο προηγούμενο εξόνιο, το οποίο είναι βέβαιο ότι δεν απαλείφεται και ο ανάστροφος στο αμέσως επόμενο εξόνιο που επίσης δεν απαλείφεται. Συγκεκριμένα για την απαλοιφή των εξονίων: i) 1-6 ο πρόσθιος εκκινητής σχεδιάστηκε στην 5' UTR περιοχή και ο ανάστροφος στο εξόνιο 7, ii) 3-4 ο πρόσθιος εκκινητής εντοπίζεται στο εξόνιο 2 και ο ανάστροφος στο εξόνιο 5, iii) 7-16 ο πρόσθιος εκκινητής βρίσκεται στο εξόνιο 6 και ο ανάστροφος στη 3' UTR περιοχή, iv) 9-10 ο πρόσθιος εκκινητής εντοπίζεται στο εξόνιο 8 και ο ανάστροφος στο εξόνιο 10. Τα τμήματα DNA που προκύπτουν είναι αρκετά μεγάλα και τις περισσότερες φορές απαιτούνται επιπλέον εκκινητές για να είναι δυνατή η ανάγνωση της αλληλουχίας και τελικά ο καθορισμός των ορίων θραύσης. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι αρχικοί εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση της αλληλουχίας των LGRs του γονιδίου *MSH2*.

Απαλοιφή εξονίων <i>MSH2</i>	Πρόσθιος εκκινητής (5'→3')	Ανάστροφος εκκινητής (5'→3')	Μέγεθος PCR προϊόντος (bp)
1-6	CCTTCTCATTTGGTGTCAAGAGCCTG	GTCGGTTAAGATCTGGGAATCGAC	32984
3-4	GCAAAGAATCTGCAGAGTGTGTGC	GGTTAAGGGCTCTGACTGCTGC	6008
7-16	GTTGAAGATACCACTGGCTCTCAG	CTCCTGCAGTGCCTTAGCA	91282
9-10	GGCAGTTTTGTGACTCCTCTTACTG	GACAATTTCTTTAACAATGGCATC	25480

4.13 Εργαλεία Βιοπληροφορικής για την ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου *MSH2*

Η ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου *MSH2*, καθώς και των σημείων θραύσης των αναδιατάξεων που χαρακτηρίστηκαν πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ειδικού λογισμικού, του RepeatMasker, έκδοση 4.0.8 (<http://www.repeatmasker.org/>), χρησιμοποιώντας τις προεπιλεγμένες ρυθμίσεις. Το συγκεκριμένο εργαλείο βιοπληροφορικής καθορίζει το ποσοστό των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών που εντοπίζονται είτε σε ολόκληρο το γονίδιο είτε σε μία συγκεκριμένη αλληλουχία. Η στοίχιση των αλληλουχιών που

εντοπίζονταν κοντά στα σημεία θραύσης πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4.14 Επιγενετικές τροποποιήσεις του γενετικού υλικού στον καρκίνο – Μεθυλίωση

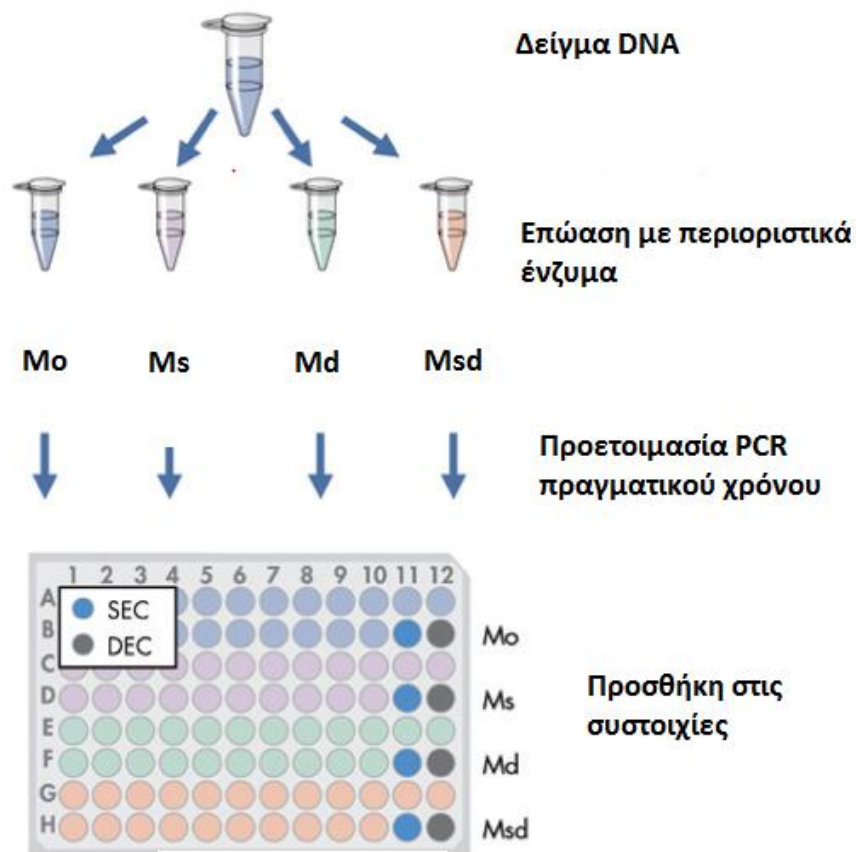
Στην παρούσα διατριβή αναλύθηκαν τα επίπεδα της μεθυλίωσης των υποκινητών 22 γονιδίων, τα οποία εμπλέκονται σε διάφορα μονοπάτια και έχουν συσχετιστεί με τον καρκίνο του μαστού. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το EpiTect® Methyl II PCR Array (Qiagen, Hilden, Germany). Τα γονίδια που αναλύθηκαν είναι τα εξής:

- Κυτταρικός κύκλος, ανάπτυξη και διαφοροποίηση: *BRCA1, CCNA1, CCND2, CDKN1C, CDKN2A, SFN (14-3-3 sigma), TP73*.
- Κυτταρική προσκόλληση: *CDH1, CDH13*.
- Μεταγραφικοί παράγοντες: *CDKN2A, ESR1, HIC1, PRDM2, RASSF1, TP73*.
- Υποδοχείς ορμονών: *ESR1*.
- Μεταβολισμός φαρμάκων: *GSTP1*.
- Απόπτωση και αντι-απόπτωση: *CDKN2A, PYCARD, TNFRSF10C, TP73*.
- Μεθυλίωση του DNA: *MGMT, PRDM2*.
- Φωσφατάσες: *PTEN*.
- Συνθάση της προσταγλανδίνης-ενδοπεροξειδίου (Prostaglandin-Endoperoxide Synthase): *PTGS2*.
- Εξωκυτταρικά μόρια (Extracellular Matrix Molecules): *ADAM23, SLIT2, THBS1*.
- Πρωτεάσες και αναστολείς πρωτεασών: *ADAM23, THBS1*.
- Οικογένεια των RAS πρωτεϊνών: *RASSF1*.

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην ανίχνευση του DNA, το οποίο προκύπτει α) μετά από την πέψη με περιοριστικά ένζυμα (EpiTect II DNA Methylation Enzyme Kit, Qiagen, Hilden, Germany) που είναι “ευαίσθητα” ως προς τη μεθυλίωση (methylation sensitive) με αποτέλεσμα την πέψη του μη-μεθυλιωμένου DNA ή/και β) “εξαρτώμενα” από αυτή (methylation-dependent) με αποτέλεσμα την πέψη του μεθυλιωμένου DNA. Στη συνέχεια, το DNA που προκύπτει ποσοτικοποιείται με PCR πραγματικού χρόνου (RT² SYBR Green ROX qPCR Mastermix, Qiagen, Hilden, Germany) με τη χρήση ειδικών εκκινητών που εντοπίζονται στις περιοχές των υποκινητών των υπό μελέτη γονιδίων.

Για κάθε δείγμα πραγματοποιούνται 4 αντιδράσεις με περιοριστικά ένζυμα κατά τις οποίες προστίθεται το υπό μελέτη DNA (1μg) και στη συνέχεια α) δεν προστίθεται κανένα

περιοριστικό ένζυμο (Mo), β) προστίθεται το ένζυμο που είναι “ευαίσθητο” ως προς τη μεθυλίωση (Ms) (πέπτεται το μη μεθυλιωμένο DNA), γ) προστίθεται το ένζυμο που “εξαρτάται” από τη μεθυλίωση (Md) (πέπτεται το μεθυλιωμένο DNA) και δ) προστίθενται και τα δύο ένζυμα ώστε να καθοριστεί το επίπεδο θορύβου (Msd). Ακολουθεί επώαση 16 ωρών και ποσοτικοποίηση με PCR πραγματικού χρόνου. Το προϊόν της αντίδρασης κατά την οποία δεν προστέθηκε ένζυμο αντιπροσωπεύει το ολικό DNA, κατά την επώαση με ευαίσθητο ως προς τη μεθυλίωση ανιχνεύεται το υπερμεθυλιωμένο DNA, εφόσον πέπτεται το μη-μεθυλιωμένο DNA, ενώ στην αντίδραση με το εξαρτώμενο ως προς τη μεθυλίωση ένζυμο ανιχνεύεται το μη-μεθυλιωμένο DNA. Ακολουθεί ανάλυση με ειδικό πρόγραμμα που παρέχεται από τον κατασκευαστή. Τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα.



Πειραματικό πρωτόκολλο

Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει δύο στάδια i) επώαση με περιοριστικά ένζυμα και ii) PCR πραγματικού χρόνου σε ειδικό πιάτο 96 θέσεων, που περιλαμβάνει τους ειδικούς

εκκινητές. Όλη η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

1^η ημέρα

- Προετοιμασία του υπό μελέτη δείγματος (γενωμικό DNA 1μg) για την αντίδραση της επώασης

Αντιδραστήριο	Όγκος (μl)
DNA (1μg)	x
5x Ρυθμιστικό διάλυμα	26
H ₂ O	z
Τελικός Όγκος	120

- Προσθήκη των ενζύμων

Αντιδραστήριο	Mo	Ms	Md	Msd
Μίγμα με DNA	28μl	28μl	28μl	28μl
Ένζυμο «ευαίσθητο» στη μεθυλίωση-A	-	1μl	-	1μl
Ένζυμο «εξαρτώμενο» από τη μεθυλίωση-B	-	-	1μl	1μl
H ₂ O	2μl	1μl	1μl	-
Τελικός Όγκος	30μl	30μl	30μl	30μl

- Επώαση στους 37°C για 16 ώρες

2^η ημέρα

- Απενεργοποίηση των ενζύμων στους 65°C για 20 λεπτά
- PCR πραγματικού χρόνου

Αντιδραστήριο	Mo	Ms	Md	Msd
RT ² SYBR Green ROX qPCR Mastermix	330μl	330μl	330μl	330μl
Μίγμα Mo	30μl	-	-	-
Μίγμα Ms	-	30μl	-	-
Μίγμα Md	-	-	30μl	-
Μίγμα Msd	-	-	-	30μl
H ₂ O	300μl	300μl	300μl	300μl

Τελικός Όγκος	660μl	660μl	660μl	660μl
---------------	-------	-------	-------	-------

Η αντίδραση επιτελείται σε θερμικό κυκλοποιητή Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific, USA) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Αριθμός κύκλων
95	10 min	1
99	30 sec	3
72	1 min	40
97	15 sec	
72	1 min	

Αποτελέσματα

1. Αλληλούχηση κατά Sanger για την ανάλυση του γονιδίου *BRCA1*

Συνολικά αναλύθηκαν 172 ασθενείς με καρκίνο του μαστού και ανιχνεύθηκαν 21 ασθενείς που έφεραν μεταλλαγές στο γονίδιο *BRCA1* (12.2%) με μέσο όρο ηλικίας διάγνωσης τα 36.9 έτη (εύρος ηλικίας διάγνωσης μεταξύ 25-66 έτη). Από τις 11 μεταλλαγές που ανιχνεύθηκαν οι 5 ήταν μη-νοηματικές μεταλλαγές που οδηγούσαν σε πρόωρο κωδικόνιο λήξης (c.5542C>T, c.3607C>T, c.4327C>T, c.5251C>T, c.5503C>T). Η μεταλλαγή c.3607C>T ανιχνεύθηκε σε τρεις διαφορετικές ασθενείς. Επίσης, ανευρέθηκαν 4 μεταλλαγές που άλλαζαν το πλαίσιο ανάγνωσης, οδηγώντας επίσης σε πρόωρο κωδικόνιο τερματισμού (c.5266dup, c.5030_5033del, c.2504_2505ins, c.3700_3704del). Η μεταλλαγή c.5266dupC ανευρέθηκε σε 7 ασθενείς. Τέλος, ανευρέθηκαν 2 παρανοηματικές μεταλλαγές με αποτέλεσμα την αντικατάσταση ενός νουκλεοτιδίου από ένα άλλο, η c.5212G>A που ανιχνεύθηκε σε τρεις ασθενείς και η c.5467G>A. Οι 3/11 μεταλλαγές (27.3%) εντοπίζονται στο εξόνιο 20, με πιο συχνή τη c.5266dupC (7/21 ασθενείς), ενώ οι υπόλοιπες 10 εντοπίζονται στα εξόνια 11, 13, 17, 22 και 24. Στον πίνακα 10 αναφέρονται αναλυτικά όλες οι μεταλλαγές που ανευρέθηκαν στο γονίδιο *BRCA1*.

Πίνακας 10. Μεταλλαγές του γονιδίου <i>BRCA1</i>				
Κωδικός ασθενούς	Εξόνιο	c.DNA (NM_007294.3)	Πρωτεΐνη (NP_009225.1)	Μεταλλαγή
1600	24	c.5542C>T	p. (Gln1848*)	Μη νοηματική
1604	11	c.3607C>T	p.(Arg1203*)	Μη νοηματική
1627	20	c.5266dupC	p. (Gln1756fs)	Πλαισιοτροποποιητική
1648	20	c.5266dupC	p. (Gln1756fs)	Πλαισιοτροποποιητική
1652	20	c.5212G>A	p. (Gly1738Arg)	Παρανοηματική
1660	17	c.5030_5033del	p. (Thr1677fs)	Πλαισιοτροποποιητική
1675	13	c.4327C>T	p. (Arg1443*)	Μη νοηματική
1687	20	c.5251C>T	p.(Arg1751*)	Μη νοηματική
1708	11	c.2504dupA	p.(His835fs)	Πλαισιοτροποποιητική
1719	11	c.3607C>T	p.(Arg1203*)	Μη νοηματική
1753	20	c.5212G>A	p.(Gly1738Arg)	Παρανοηματική
1761	24	c.5503C>T	p.(Arg1835*)	Μη νοηματική
1776	20	c.5266dupC	p.(Gln1756fs)	Πλαισιοτροποποιητική
1785	20	c.5212G>A	p.(Gly1738Arg)	Παρανοηματική
1789	11	c.3607C>T	p.(Arg1203*)	Μη νοηματική

1791	11	c.3700_3704del	p.(Val1234Glnfs)	Πλαισιοτροποποιητική
1792	20	c.5266dupC	p.(Gln1756fs)	Πλαισιοτροποποιητική
1829	22	c.5467G>A	p.(Gly1803_Ala1813del)	Απαλοιφή εξονίου (exon 23 skipping)
1848	20	c.5266dupC	p.(Gln1756fs)	Πλαισιοτροποποιητική
1862	20	c.5266dupC	p.(Gln1756fs)	Πλαισιοτροποποιητική
1883	20	c.5266dupC	p.(Gln1756fs)	Πλαισιοτροποποιητική

Στον πίνακα 11 περιγράφονται αναλυτικά οι ηλικίες διάγνωσης με καρκίνο του μαστού των ασθενών που έφεραν μεταλλαγές στο γονίδιο *BRCA1*, στοιχεία για το οικογενειακό τους ιστορικό καθώς και τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά του όγκου σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων οιστρογόνου (ER), προγεστερόνης (PR) και την παρουσία/απουσία ενίσχυσης του γονιδίου του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα τύπου 2 (HER-2).

Πίνακας 11. Κλινικά και ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με μεταλλαγές στο γονίδιο <i>BRCA1</i>			
Κωδικός ασθενούς	Ηλικία διάγνωσης (έτη)	Οικογενειακό ιστορικό	Ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά
1600	38	Ναι	ER-, PR-, HER2+
1604	43	Ναι	ER+, PR+, HER2 -
1627	35	Ναι	ER-, PR-, HER2-
1648	32	Ναι	ER-, PR-, HER2-
1652	26	Ναι	ER+, PR-, HER2-
1660	53	Ναι	ER-, PR-, HER2 (2+)
1675	29	Ναι	ER-, PR-, HER2-
1687	25	Ναι	ER-, PR-, HER2-
1708	66	Ναι	ER-, PR-, HER2-
1719	40	Ναι	ER-, PR-, HER2-
1753	41	Ναι	ER+, PR+, HER2-
1761	39, 54	Ναι	ER-, PR-/ER-, PR-, HER2-
1776	42	Ναι	ER+, PR+, HER2-
1785	36, 48	Ναι	ER-, PR-, HER2-/ ER+, PR-, HER2-
1789	27	Μη διαθέσιμο	Μη διαθέσιμο

1791	37	Μη διαθέσιμο	Μη διαθέσιμο
1792	30	Μη διαθέσιμο	ER-, PR-, HER2-
1829	36	Ναι	Μη διαθέσιμο
1848	40	Ναι	ER-, PR-, HER2-
1862	28	Ναι	ER+, PR-, HER2-
1883	31	Ναι	ER+, PR+, HER2-

Όπως προκύπτει από τον παραπάνω πίνακα 19/21 ασθενείς είχαν διαγνωσθεί με καρκίνο του μαστού σε ηλικία μικρότερη από τα 45 έτη. Επίσης, διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με το οικογενειακό ιστορικό υπήρχαν για τις 18/21, οι οποίες όλες ανέφεραν τουλάχιστον άλλο ένα περιστατικό κακοήθειας μαστού, ωθηκών ή παγκρέατος στην οικογένεια. Επιπλέον, 10/21 ασθενείς είχαν διαγνωστεί με τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού.

2. Αλληλούχηση κατά Sanger για την ανάλυση του γονιδίου *BRCA2*

Από τις 172 ασθενείς που αναλύθηκαν οι 9 έφεραν μεταλλάξεις στο γονίδιο *BRCA2* (5.2%) με μέση ηλικία διάγνωσης τα 41.8 έτη (εύρος ηλικίας διάγνωσης μεταξύ 25-66 έτη). Από αυτές τις μεταλλάξεις, 7 ήταν πλαισιοτροποποιητικές (c.3554_3563delCAGTTGAAAT, c.8592delC, c.3865_3868delAAAT, c.8546delA, c.4654_4657delGGTA, c.4415_4418delAGAA και c.9016_9017delTA), 1 ήταν μη-νοηματική (c.2339C>G) και μία επηρέαζε τη θέση ματίσματος (c.8754+1G>A). Οι μεταλλάξεις που ανευρέθηκαν στο γονίδιο *BRCA2* καταγράφονται στον πίνακα 12.

Πίνακας 11. Μεταλλάξεις του γονιδίου <i>BRCA2</i>				
Κωδικός ασθενούς	Εξόνιο	c.DNA (NM_000059.3)	Πρωτεΐνη (NP_000050.2)	Μεταλλαγή
1688	11	c.3554_3563del	p.(Thr1185fs)	Πλαισιοτροποποιητική
1698	20	c.8592delC	p.(Leu2865fs)	Πλαισιοτροποποιητική
1715		c.8754+1G>A (ιντρόνιο 21-22)		Επηρεάζει το μάτισμα
1743	11	c.3865_3868del	p.(Lys1289fs)	Πλαισιοτροποποιητική
1763	20	c.8546delA	p.(Lys2849fs)	Πλαισιοτροποποιητική
1802	11	c.4654_4657del	p.(Glu1552fs)	Πλαισιοτροποποιητική
1817	11	c.2339C>G	p.(Ser780*)	Μη-νοηματική
1850	11	c.4415_4418del	p.(Lys1472fs)	Πλαισιοτροποποιητική

2354	23	c.9016_9017del	p.(Tyr3006fs)	Πλασιοτροποποιητική
------	----	----------------	---------------	---------------------

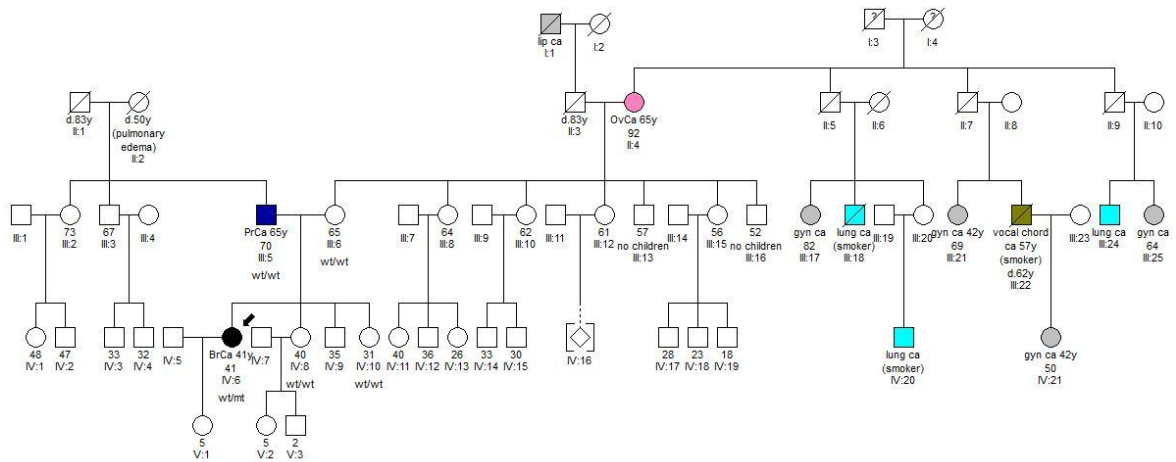
Όπως είναι εμφανές από τον πίνακα οι περισσότερες μεταλλαγές (5/9) εντοπίζονται στο εξόνιο 11, που είναι και το μεγαλύτερο εξόνιο του γονιδίου σε έκταση. Οι υπόλοιπες μεταλλαγές ανιχνεύθηκαν στα εξόνια 20 και 23.

Στον πίνακα 12 περιγράφονται αναλυτικά οι ηλικίες διάγνωσης με καρκίνο του μαστού των ασθενών που έφεραν μεταλλαγές στο γονίδιο *BRCA2*, στοιχεία για το οικογενειακό τους ιστορικό καθώς και τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά του όγκου.

Πίνακας 12. Κλινικά και ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών που έφεραν μεταλλαγές στο γονίδιο <i>BRCA2</i>			
Κωδικός ασθενούς	Ηλικία διάγνωσης (έτη)	Οικογενειακό ιστορικό	Ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά
1688	43	Ναι	ER+, PR+, HER2-
1698	47	Ναι	ER+, PR+, HER2+
1715	44	Ναι	ER+, PR+, HER2-
1743	42	Ναι	ER+, PR+, HER2 +2
1763	37	Ναι	ER+, PR+, HER2 +2
1802	38	Ναι	ER-, PR-, HER2-
1817	52	Ναι	ER+, PR+, HER2+
1850	32	Ναι	ER+, PR+, HER2-
2354	41	Ναι	ER-, PR-, HER2+

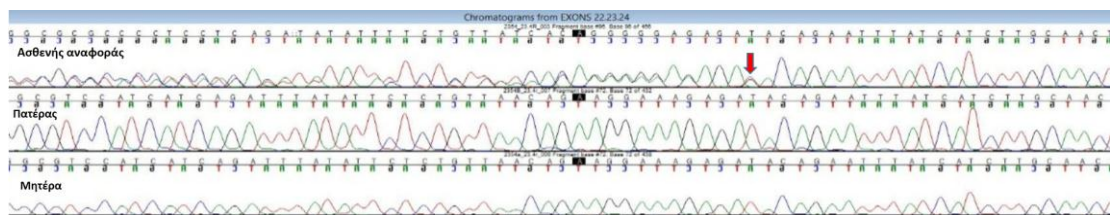
Η πλειονότητα των ασθενών, 7/9 (77.8%) είχαν διαγνωσθεί με ορμονοεξαρτώμενους όγκους (ER+ και PR+), ενώ υπήρχε μόνο μία διάγνωση με τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού. Επίσης, όλες οι ασθενείς είχαν βεβαρημένο οικογενειακό ιστορικό, με τουλάχιστον άλλο ένα περιστατικό κακοήθειας μαστού ή ωοθηκών.

Σε ότι αφορά την ασθενή 2354 όπως φαίνεται και στο γενεαλογικό δένδρο, το οποίο παρατίθεται στην εικόνα 31, εκτός από την ηλικία διάγνωσης της ασθενούς αναφοράς (41 ετών), δεν πρόκειται για ένα τυπικό δένδρο οικογένειας με μεταλλαγή στο γονίδιο *BRCA2*. Γι' αυτό το λόγο ακολούθησε γονοτύπηση των γονέων, καθώς και των αδελφών της ασθενούς, και κανένας από αυτούς δεν έφερε τη συγκεκριμένη μεταλλαγή.



Εικόνα 31. Γενεαλογικό δένδρο της ασθενούς που ανιχνεύθηκε η μεταλλαγή c.9016_9017delTA του γονιδίου BRCA2. Η ασθενής αναφοράς παρουσιάζεται με βέλος.

Στην εικόνα 32 παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα της ασθενούς 2354 και των γονέων της, όπου φαίνεται ότι η ασθενής αναφοράς φέρει την πλακισιοτροποποιητική μεταλλαγή c.9016_9017delTA, ενώ οι γονείς της δε τη φέρουν.



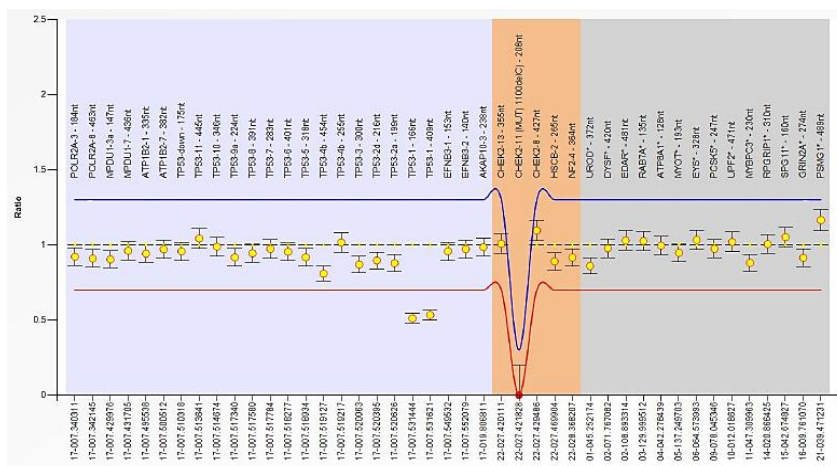
Εικόνα 32. Χρωματογραφήματα της ασθενούς αναφοράς και των γονέων της.

3. Ανίχνευση μεγάλων γονιδιακών αναδιατάξεων σε γονίδια προδιάθεσης στον καρκίνο του μαστού με την τεχνική MLPA

Η αλληλούχηση κατά Sanger κατέδειξε ότι από τις 172 ασθενείς που πληρούσαν τα κριτήρια NCCN και αναλύθηκαν για μεταλλαγές στα γονίδια BRCA1 και BRCA2, οι 142 δεν έφεραν μεταλλαγές σε αυτά τα γονίδια. Αυτές οι ασθενείς αναλύθηκαν με τη τεχνική MLPA για την ανεύρεση μεγάλων γονιδιακών αναδιατάξεων σε αυτά τα γονίδια. Από την ανάλυση δεν ανευρέθηκε καμία γονιδιακή αναδιατάξη στα γονίδια BRCA1 και BRCA2.

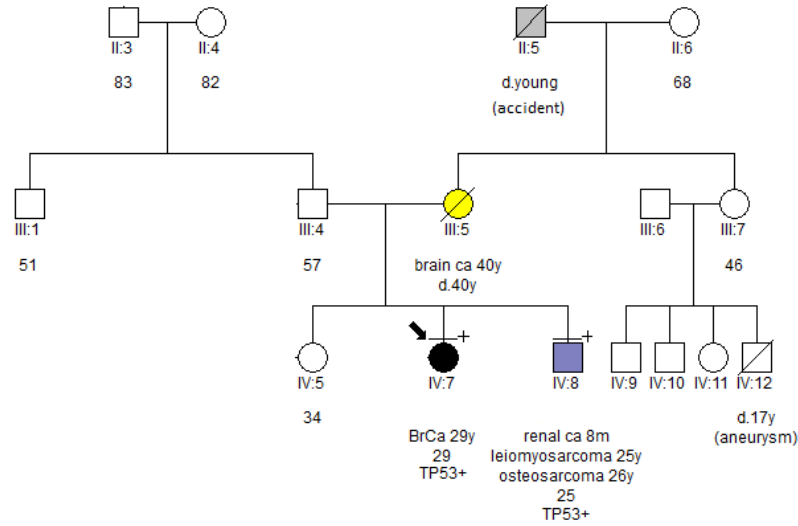
Σε κάποιες επιλεγμένες ασθενείς προχωρήσαμε και σε περαιτέρω διερεύνηση για την ανίχνευση γονιδιακών αναδιατάξεων και σε άλλα γονίδια προδιάθεσης στον καρκίνο του μαστού, όταν αυτό κρινόταν αναγκαίο, όπως σε περιπτώσεις που η ηλικία διάγνωσης με κακοήθεια του μαστού ήταν σε πολύ νεαρή ηλικία (≤ 35 έτη), κάτι που αποτελεί

χαρακτηριστικό γνώρισμα του συνδρόμου Li-Fraumeni. Από αυτή την περαιτέρω διερεύνηση ανευρέθηκε μία ασθενής με απαλοιφή του εξονίου 1 αλλά και του υποκινητή του γονιδίου *TP53*. Στην εικόνα 33 παρουσιάζεται το έλλειμμα του εξονίου 1 του γονιδίου *TP53*.



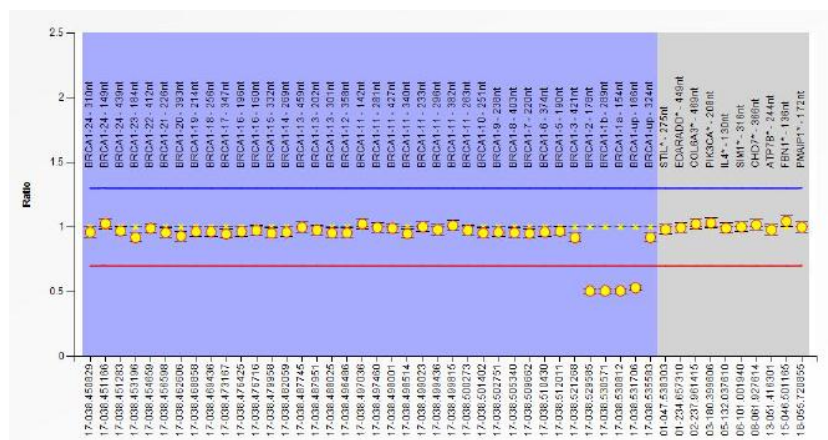
Εικόνα 33. Σχηματική αναπαράσταση του ελλείμματος του εξονίου 1 του γονιδίου *TP53*. Οι φυσιολογικές τιμές κυμαίνονται από 0.7-1.3, ανάμεσα στη μπλε και κόκκινη γραμμή του σχήματος.

Η ασθενής είχε προηγουμένως ελεγχθεί με αλληλούχηση κατά Sanger και για σημειακές μεταλλαγές του γονιδίου *TP53* και ήταν αρνητική. Η ασθενής αναφοράς ελέγχθηκε για το συγκεκριμένο γονίδιο λόγω της πολύ νεαρής ηλικίας διάγνωσης της (29 ετών), καθώς και του οικογενειακού ιστορικού (αδελφός με καρκίνο νεφρού σε ηλικία 8 μηνών και οστεοσάρκωμα 25 ετών και μητέρα με όγκο στον εγκέφαλο με ηλικία διάγνωσης 40 ετών). Τα ευρήματα αυτά είναι χαρακτηριστικά για το σύνδρομο Li-Fraumeni. Στην εικόνα 34 παρουσιάζεται το γενεαλογικό δέντρο της συγκεκριμένης οικογένειας.



Εικόνα 34. Γενεαλογικό δένδρο της ασθενούς που ανιχνεύθηκε το έλλειμμα στο γονίδιο TP53, όπου φαίνεται και ο χαρακτηριστικός φαινότυπος Li-Fraumeni της οικογένειας. Η ασθενής αναφοράς παρουσιάζεται με βέλος

Η ανάλυση για την ανίχνευση γονιδιακών αναδιατάξεων επεκτάθηκε και σε άλλες ασθενείς που είχαν διαγνωσθεί με κακοήθεια του μαστού, πληρούσαν τα κριτήρια NCCN και ήταν αρνητικές για γαμετικές μεταλλαγές των γονιδίων BRCA1 και BRCA2. Έτσι, συνολικά αναλύθηκαν επιπλέον 443 ασθενείς. Η ανάλυση αυτή ανέδειξε δύο ασθενείς (0.5%) με γονιδιακές αναδιατάξεις, μία στο γονίδιο BRCA1, όπου ανευρέθηκε η απαλοιφή των εξονίων 1-2 και μία στο BRCA2, όπου ανευρέθηκε το έλλειμμα των εξονίων 12-13. Στις εικόνες 35 και 36 φαίνονται οι απαλοιφές των γονιδίων BRCA1 και BRCA2, αντίστοιχα.



Εικόνα 35. Σχηματική αναπαράσταση της απαλοιφής των εξονίων 1-2 του γονιδίου BRCA1.

- *ATM*: c.8766dupT (σαφώς παθογόνος μεταλλαγή) και c.7475T>G (εύρημα αγνώστου κλινικής σημασίας, VUS)
- *CHEK2*: c.499G>A, c.507del, c.1317del (3 σαφώς παθογόνοι) και c.1312G>T (ένα εύρημα αγνώστου κλινικής σημασίας)
- *FANCM*: c.5314_5315del
- *PALB2*: c.3255ins, c.2747_2748del, c.1140_1143del, c.2747_2748+4del (σαφώς παθογόνοι) και c.1939C>T (εύρημα αγνώστου κλινικής σημασίας που πιθανόν να επηρεάζει το μάτισμα). Αξίζει να σημειωθεί ότι η μία ασθενής έφερε και μία μεταλλαγή στο γονίδιο *SLX4* (c.4089_4090delAG)
- *RAD51C*: c.706-2A>G η οποία ανιχνεύθηκε σε δύο ασθενείς
- *TP53*: c.743G>A (μάλλον πρόκειται για μωσαϊκισμό με ποσοστό εμφάνισης 18%) και c.509C>T (εύρημα αγνώστου κλινικής σημασίας)

Συγκεντρωτικά στον πίνακα 14 καταγράφονται όλες οι παραλλαγές, σε όλα τα γονίδια που ανευρέθηκαν από την ανάλυση των 94 γονιδίων προδιάθεσης στον καρκίνο.

Πίνακας 14. Μεταλλαγές και ευρήματα αγνώστου κλινικής σημασίας διαφόρων γονιδίων μετά από ανάλυση με NGS				
Κωδικός δείγματος	Γονίδιο	c. DNA	Πρωτεΐνη	Κλινική σημασία
1865	<i>ATM</i>	c.7475T>G	p.(Leu2492Arg)	VUS
2010	<i>PALB2</i>	c.3255insG	p.(Arg1086fs)	επιβλαβής
2050	<i>CHEK2</i>	c.499G>A	p.(Gly167Arg)	επιβλαβής
2216	<i>RAD51C</i>	c.706-2A>G		επιβλαβής
2305	<i>CHEK2</i>	c.507delT	p.(Phe169fs)	επιβλαβής
2322	<i>RAD51C</i>	c.706-2A>G		επιβλαβής
2364	<i>PALB2</i>	c.2747_2748del	p.(Glu916fs)	επιβλαβής
2364	<i>SLX4</i>	c.4089_4090del	p.(Asp1365fs)	επιβλαβής
2529	<i>FANCM</i>	c.5314_5315del	p.(Cys1772X)	επιβλαβής
2624	<i>CHEK2</i>	c.1312G>T	p.(Asp481Tyr)	VUS
2736	<i>PALB2</i>	c.2747_2748+4del	p.(Glu916fs)	επιβλαβής
2771	<i>ATM</i>	c.8766dupT	p.(Val2923fs)	επιβλαβής
2983	<i>CHEK2</i>	c.1317delT	p.(Val397Phefs)	επιβλαβής

3134	<i>TP53</i>	c.509C>T	p.(Thr170Met)	VUS
3139	<i>TP53</i>	c.743G>A	p.(Arg248Gln)	επιβλαβής
3174	<i>ALK</i>	c.1A>T	p.(Met1?)	επιβλαβής
3261	<i>PALB2</i>	c.1939C>T	p.(His647Tyr)	VUS
3297	<i>PALB2</i>	c.1140_1143del	p.(Ser380Argfs)	επιβλαβής

Συνολικά ανευρέθηκαν 2 παραλλαγές στο γονίδιο *ATM*, 1 στο *ALK*, 4 στο *CHEK2*, 1 στο *FANCM*, 5 στο *PALB2*, 2 στο *RAD51C* και 2 στο *TP53*. Όπως φαίνεται, το 50% των παραλλαγών ανιχνεύθηκαν στα γονίδια *PALB2* και *CHEK2*. Στην εικόνα 37 παρουσιάζεται η σχηματική αναπαράσταση της κατανομής των παραλλαγών στα διάφορα γονίδια.



Εικόνα 37. Σχηματική αναπαράσταση της κατανομής των παραλλαγών στα διάφορα γονίδια.

Στον πίνακα 15 παρουσιάζονται αναλυτικά στοιχεία από το ατομικό και το οικογενειακό ιστορικό των ασθενών που έφεραν μεταλλαγές σε γνωστά και πιθανά γονίδια προδιάθεσης, καθώς και ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά των όγκων των ασθενών.

Πίνακας 15. Ατομικό και οικογενειακό ιστορικό ασθενών που φέρουν μεταλλαγές σε γνωστά και πιθανά γονίδια προδιάθεσης σε καρκίνο του μαστού					
Κωδικός δείγματος	Γονίδιο	Ηλικία διάγνωσης (έτη)	2 ^η κακοήθεια/Ηλικία διάγνωσης (έτη)	Οικογενειακό ιστορικό	Ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά
1865	<i>ATM</i>	35		2xBrCa, 1xOvCa, 1xPNC	ER+, PR+, HER2-

2010	<i>PALB2</i>	38		3xBrCa	ER-, PR-, HER2-
2050	<i>CHEK2</i>	46		3xBrCa	ER+, PR+, HER2-
2216	<i>RAD51C</i>	50	BrCa 50	1x male BrCa, 1xPNC	ER+, PR+, HER2- ER-, PR-, HER2+
2305	<i>CHEK2</i>	41		3xBrCa	ER+, PR+, HER2-
2322	<i>RAD51C</i>	56		1xBrCa & 2xOvCa	ER+, PR+
2364	<i>PALB2</i>	44	OvCa 48	2xBrCa	ER+, PR+, HER2-
2364	<i>SLX4</i>	44	OvCa 48	2xBrCa	ER+, PR+, HER2-
2529	<i>FANCM</i>	47		3xBrCa & 1xOvCa	ER+, PR+, HER2-
2624	<i>CHEK2</i>	55	Υποτροπή 65?	3xBrCa	ER+, PR+, HER2-
2736	<i>PALB2</i>	37	BrCa 37	2xBrCa	ER+, PR-, HER2- ER+, PR-, HER2-
2771	<i>ATM</i>	55	BrCa 55	2xBrCa	ER+, PR+ ER+, PR+, HER2+
2983	<i>CHEK2</i>	47		7xBrCa	ER+, PR+, HER2+
3134	<i>TP53</i>	59	BrCa 61	1xBrCa & 1x gyn ca	ER+, PR+, HER2- ER-, PR-, HER2+
3139	<i>TP53</i>	36	BrCa 50	3x BrCa	1 ^η ιστολογική μη διαθέσιμη ER+, PR+, HER2-
3174	<i>ALK</i>	48		5x BrCa	ER-, PR-, HER2+
3261	<i>PALB2</i>	39		1x BrCa & 2x PNC	ER+, PR+, HER2-
3297	<i>PALB2</i>	43	BrCa 69	2x BrCa	1 ^η ιστολογική μη διαθέσιμη ER-, PR-, HER2-

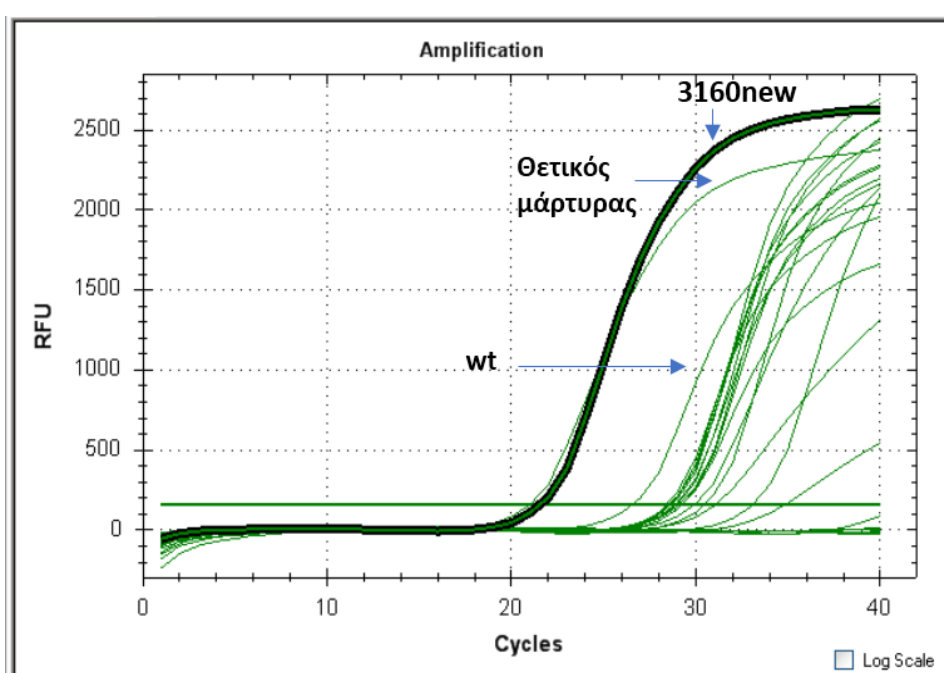
BrCa: καρκίνος μαστού, OvCa: καρκίνος ωοθηκών, PNC: καρκίνος παγκρέατος, gyn ca: γυναικολογικός καρκίνος

Σε σχέση με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών, έξι ασθενείς (33.3%), που έφεραν μεταλλάξεις στα γονίδια *PALB2*, *TP53*, *RAD51C* και *ATM*, εμφάνισαν αμφοτερόπλευρη διάγνωση, ενώ μία ασθενής είχε και μεταγενέστερη διάγνωση με καρκίνο των ωοθηκών (έφερε παραλλαγή στο *PALB2*). Σε ότι αφορά τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά μόνο δύο ασθενείς είχαν διάγνωση με τριπλά αρνητικό καρκίνο (και οι δύο έφεραν παραλλαγές στο γονίδιο *PALB2*), ενώ στην πλειονότητα των ασθενών (15/18) εκφράζονταν οι υποδοχείς οιστρογόνων και προγεστερόνης.

5. Ανίχνευση της μεταλλαγής c.2257 C>T του γονιδίου *PALB2*

Η ανάλυση NGS έδειξε ότι στο γονίδιο *PALB2* απαντώνται συχνά μεταλλαγές. Σε συνδυασμό με προγενέστερη μελέτη που διεξήχθη από το Εργαστήριο Μοριακής Διαγνωστικής

βρέθηκε η μεταλλαγή c.2257C>T σε 5 ανεξάρτητες οικογένειες [90]. Αυτό αποτέλεσε το έναυσμα για περαιτέρω διερεύνηση της συγκεκριμένης μεταλλαγής σε μεγάλο αριθμό ασθενών, καθώς και σε ομάδα ελέγχου με τη χρήση της μεθόδου PCR πραγματικού χρόνου. Έτσι, αναλύθηκαν επιπλέον 2496 ασθενείς που είχαν διαγνωσθεί με καρκίνο του μαστού και ανιχνεύθηκαν 6 ασθενείς που έφεραν τη c.2257 C>T και 697 ασθενείς με κακοήθεια των ωοθηκών και ανευρέθηκε μία ασθενής να φέρει τη συγκεκριμένη μεταλλαγή. Ενδεικτικά στην εικόνα 38 παρουσιάζεται η ανίχνευση της c.2257C>T στην ασθενή 3160 με τη τεχνική της Real-Time PCR.

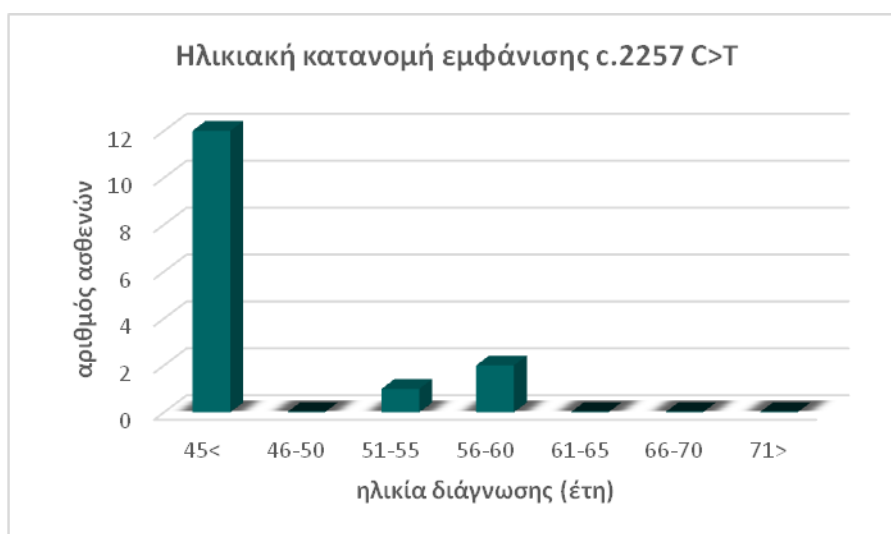


Εικόνα 38. Ανίχνευση της μεταλλαγής c.2257C>T με τη τεχνική της Real-Time PCR.

Συνολικά η συχνότητα εμφάνισης της c.2257 C>T ήταν 0.24% (6/2496) στις ασθενείς με καρκίνο του μαστού και 0.14% (1/697) στις ασθενείς με κακοήθεια των ωοθηκών. Στην ομάδα ελέγχου δεν ανευρέθηκε καμία γυναίκα να φέρει τη c.2257 C>T.

Η γονοτύπηση για τη μεταλλαγή επεκτάθηκε στους διαθέσιμους συγγενείς των ασθενών αναφοράς. Έτσι, αναλύθηκαν στοχευμένα για τη c.2257 C>T 16 μέλη από 5 οικογένειες και ανιχνεύθηκαν 11 άτομα που έφεραν τη μεταλλαγή εκ των οποίων οι τέσσερις είχαν ήδη διαγνωσθεί με κακοήθεια του μαστού σε ηλικία 32, 39, 40 και 54 έτη, ενώ 5 άτομα δεν έφεραν την εν λόγω μεταλλαγή. Στους συγγενείς που έφεραν την μεταλλαγή αναφέρθηκε και μία διάγνωση με καρκίνο του προστάτη σε ηλικία 80 ετών.

Ο μέσος όρος ηλικίας διάγνωσης των ασθενών αναφοράς με καρκίνο του μαστού ήταν τα 42 έτη ($SD\pm 8.39$), ενώ όλων των ασθενών που έφεραν τη μεταλλαγή συμπεριλαμβανομένων και των συγγενών ήταν τα 41.8 έτη ($SD\pm 8.28$). Η πλειονότητα των ασθενών αναφοράς (5/6) είχε διαγνωσθεί με κακοήθεια του μαστού πριν από τα 45 έτη και μόνο δύο ασθενείς είχαν ηλικία διάγνωσης μεγαλύτερη από τα 50 έτη. Στην εικόνα 39 απεικονίζεται σχηματικά η ηλικιακή κατανομή της διάγνωσης όλων των ασθενών που φέρουν τη c.2257 C>T του γονιδίου *PALB2*.



Εικόνα 39. Σχηματική αναπαράσταση της ηλικιακής κατανομής της διάγνωσης όλων των ασθενών που φέρουν τη c.2257 C>T του γονιδίου *PALB2*.

Στην παρούσα μελέτη συμπεριλήφθηκαν 873 ασθενείς, στο οικογενειακό ιστορικό των οποίων αναφερόταν τουλάχιστον ακόμη ένα περιστατικό BrCa και άλλων κακοηθειών όπως ωθηκών, παγκρέατος και στομάχου και 1623 ασθενείς, οι οποίες δεν είχαν οικογενειακό ιστορικό καρκίνου ή δεν υπήρχαν διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με αυτό. Από τους 873 ασθενείς με οικογενειακό ιστορικό οι 3 έφεραν την c.2257 C>T (0.34%), ενώ από τις 1623 ασθενείς χωρίς οικογενειακό ιστορικό ανευρέθηκαν 3 ασθενείς (0.18%) που έφεραν τη συγκεκριμένη μεταλλαγή. Αντίθετα, από τις ασθενείς με καρκίνο των ωθηκών η μόνη που έφερε τη μεταλλαγή δεν είχε οικογενειακό ιστορικό.

Από τις 6 ασθενείς με καρκίνο του μαστού διαθέσιμες πληροφορίες για το οικογενειακό ιστορικό υπήρχαν για τις 3. Συγκεκριμένα, 3/6 είχαν τουλάχιστον άλλο ένα περιστατικό BrCa

στην οικογένεια. Πληροφορίες σχετικά με το οικογενειακό ιστορικό των ασθενών αναφοράς με τη c.2257 C>T παρουσιάζονται στον πίνακα 16.

Πίνακας 16. Οικογενειακό ιστορικό των ασθενών αναφοράς που έφεραν τη c.2257 C>T

Κωδικός ασθενούς	Κακοήθεια/Ηλικία διάγνωσης (έτη)	Οικογενειακό ιστορικό
2135	BrCa (41)	BrCa (49)
3008	BrCa (56)	2x BrCa (32 & 52)
3160	BrCa (37)	2x BrCa (52 & 53)
3270	BrCa (42)	Μη διαθέσιμο
3271	BrCa (39)	Όχι
3272	BrCa (44)	Μη διαθέσιμο
2594	ΟνCa (64)	Μη διαθέσιμο

BrCa: καρκίνος μαστού, ΟνCa: καρκίνος ωοθηκών, PNC: καρκίνος παγκρέατος, GC: γαστρικός καρκίνος, m: μητρική πλευρά, p: πατρική πλευρά

Συνολικά, από όλες τις ασθενείς που έφεραν τη μεταλλαγή c.2257C>T, διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών που είχαν διαγνωσθεί με BrCa και έφεραν τη μεταλλαγή c.2257 C>T, υπήρχαν για 8 από αυτές. Ο πιο κοινός ιστολογικός τύπος ήταν το πορογενές διηθητικό (6/8; 75%). Συγκεκριμένα, 5/8 παρουσίαζαν βαθμό κακοήθειας III (μία εξ αυτών είχε βαθμό κακοήθειας II-III), μία διαγνώσθηκε με βαθμό κακοήθειας II, ενώ οι άλλες δύο είχαν διάγνωση με *in situ* πορογενές βαθμού κακοήθειας II και διηθητικό λοβιακό βαθμού κακοήθειας II, αντίστοιχα. Επιπλέον, η πλειονότητα των ασθενών (5/8, 62.5%) εμφάνιζε θετική έκφραση των υποδοχέων οιστρογόνων ή/και προγεστερόνης, ενώ υπήρχε και ένα περιστατικό με τριπλά αρνητικό καρκίνο. Τα δεδομένα αυτά παρατίθενται στον πίνακα 17.

Πίνακας 17. Ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών που φέρουν τη μεταλλαγή c.2257C>T.

Κωδικός δείγματος	Ιστολογικός τύπος (βαθμός κακοήθειας)	ER	PR	HER2	Ki 67	Λεμφαδενική μετάσταση
776	Πορογενές διηθητικό (III)	-	+	+	10-15%	8/16
945	Πορογενές διηθητικό (III)	+	Μη διαθέσιμο	Μη διαθέσιμο	Μη διαθέσιμο	Μη διαθέσιμο

1309	Πορογενές διηθητικό (II-III)	+	-	-	18%	1/3
1586	In situ πορογενές (II)	+	+	+	Μη διαθέσιμο	-
1586a	Πορογενές διηθητικό(III)	+	+	-	30%	1/15
2135	Λοβιακό διηθητικό (II)	+	+	-	30%	2/11
3008	Πορογενές διηθητικό(III)	-	-	-	80%	Μη διαθέσιμο
3160	Πορογενές διηθητικό(II)	-	-	+	10%	Μη διαθέσιμο

6. Ανάλυση απλοτύπων σε ασθενείς που έφεραν τη μεταλλαγή c.2257 C>T του γονιδίου *PALB2*, καθώς και στην ομάδα ελέγχου

Η ανάλυση απλοτύπων έγινε με τη χρήση 7 πολυμορφικών δεικτών, οι οποίοι καλύπτουν μια περιοχή μεγέθους 3.8 Mb, που περιβάλλει το γονίδιο *PALB2*. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε και στα 23 άτομα που έφεραν την μεταλλαγή, καθώς και στους συγγενείς που δεν έφεραν την μεταλλαγή (5). Τα αποτελέσματα της απλοτύπησης ανέδειξαν ότι όλα τα άτομα που έφεραν τη μεταλλαγή μοιράζονταν έναν κοινό απλότυπο μεγέθους ~1.2Mb υποδηλώνοντας την ύπαρξη ενός κοινού προγόνου. Στον πίνακα 18 παρουσιάζονται τα αλληλόμορφα των ασθενών που μοιράζονται τον κοινό απλότυπο, όπου με κόκκινο χρώμα παρουσιάζονται τα κοινά αλληλόμορφα.

Πίνακας 18. Ο κοινός απλότυπος των ατόμων που φέρουν τη c.2257C>T

Κωδικός δείγματος	D16S3046	D16S403	23037GT23	23622TCTA14	D16S417	D16S420	D16S401
330	76/98	157/149	228/226	127/127	166/154	263/259	252/270
776	80/96	157/149	228/220	127/124	166/168	263/261	268/268
945	76/96	157/147	228/226	127/131	166/154	263/253	250/266
1309	100/112	157/151	228/226	127/123	166/180	263/253	264/268
1309α	78/94	157/147	228/218	127/131	166/178	263/247	250/272
1309β	78/94	157/147	228/218	127/131	166/178	263/247	272/272
1309δ	76/98	157/149	228/220	127/135	166/158	263/261	258/274
1586	78/98	157/161	228/232	127/123	166/176	263/261	270/274
1586α	70/96	157/153	228/226	127/131	166/158	263/245	266/272
1586β	78/98	157/161	228/234	127/123	166/174	263/261	272/276
2135	86/90	157/155	228/226	127/131	166/180	263/257	268/272
3008	68/78	157/151	228/230	127/131	166/164	263/257	250/272
3008β	78/94	157/155	228/230	127/131	166/168	263/253	272/276
3008δ	68/94	157/155	228/222	127/131	166/164	263/253	250/270
3008ε	74/94	157/151	228/226	127/131	166/164	263/257	270/272
3160	76/76	157/153	228/224	127/131	166/152	263/253	246/270

3160α	74/76	157/153	228/224	127/131	166/152	263/253	254/272
3160β	70/96	157/153	228/224	127/123	166/164	263/255	252/272
3160δ	76/96	157/149	228/222	127/131	166/164	263/261	252/272
3270	94/96	157/149	228/218	127/135	166/157	263/257	256/276
3271	94/98	157/153	228/224	127/123	166/153	263/257	254/270
3272	78/98	157/155	228/226	127/131	166/157	263/257	256/270
2594	76/96	157/255	228/224	127/131	166/163	263/261	272/294

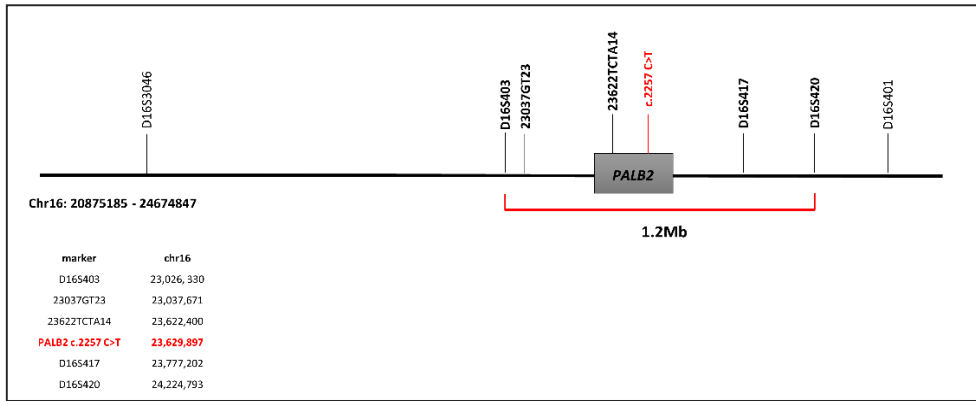
Επίσης, ανάλυση απλοτύπων πραγματοποιήθηκε και σε 55 υγιείς γυναίκες, οι οποίες είχαν διαφορετικό απλότυπο μεταξύ τους. Ο δείκτης που εντοπιζόταν εσωτερικά του γονιδίου αναλύθηκε για συνολικά 100 γυναίκες λόγω της μικρής ποικιλομορφίας που παρατηρήθηκε. Στον πίνακα 19 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης απλοτύπων που έγινε στην ομάδα ελέγχου και στους συγγενείς που δεν έφεραν την υπό μελέτη μεταλλαγή.

Πίνακας 19. Ανάλυση απλοτύπων σε άτομα που δεν έφεραν τη c.2257C>T.

Κωδικός δείγματος	23037GT23	23622TCTA14	D16S417	D16S403	D16S420	D16S3046	D16S401
2135α	228/228	127/131	164/178	157/151	253/257	94/98	272/276
2135β	228/224	123/131	180/164	157/153	257/257	92/98	258/276
1309γ	220/220	123/131	178/178	147/151	247/253	76/78	272/294
3008α	222/230	123/131	166/164	157/151	245/257	78/96	250/270
3008γ	224/230	127/131	164/168	149/151	257/257	70/94	266/272
2103	222/224	127/131	162/162	151/153	257/257	78/94	276/276
2104	222/216	127/131	164/174	149/149	259/259	76/96	266/278
2105	220/220	127/123	166/164	147/149	263/263	96/102	272/276
2107	224/226	131/135	162/180	149/149	263/257	76/78	254/272
2108	220/230	123/131	164/176	153/153	253/259	98/100	266/276
1734	228/220	123/131	173/178	147/153	253/253	98/100	256/276
1735	228/218	119/123	166/178	153/155	263/257	94/98	252/272
1736	220/220	131/131	178/178	149/153	245/245	78/98	246/266
1737	218/226	123/123	166/178	151/153	259/261	96/98	256/274
1739	218/218	123/123	164/173	151/153	251/251	78/98	252/276
1740	218/224	127/135	166/175	157/155	247/257	96/98	266/276
1741	220/226	131/131	164/178	157/155	253/257	94/96	252/272
1743	228/226	127/123	171/173	149/161	255/257	78/98	270/276
1744	228/226	127/123	160/160	151/151	257/261	96/100	274/278
1745	220/222	127/131	177/179	155/157	257/257	94/96	256/276
1747	220/222	127/131	163/179	149/151	263/257	78/98	258/276
1754	218/220	127/131	160/162	147/149	263/257	96/102	272/276
1755	220/222	127/130	162/162	149/151	263/145	78/94	256/276
1758	222/224	135/139	166/162	149/159	153/157	96/98	266/272
1759	218/220	127/139	164/164	149/149	249/257	78/100	254/274
1762	216/220	127/127	176/176	147/149	249/257	94/96	256/266

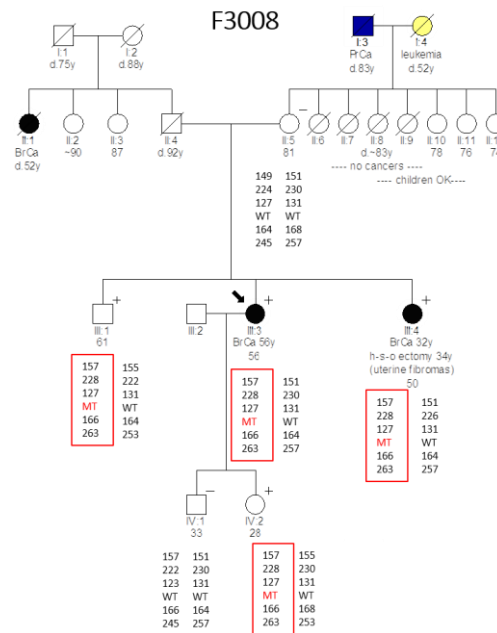
1763	226/236	131/131	180/180	157/155	259/261	78/100	254/274
1764	220/232	127/123	164/164	149/149	257/259	96/98	254/272
1765	222/226	127/123	162/162	153/155	245/259	96/98	266/278
1769	218/226	123/139	160/178	153/155	247/265	94/98	266/272
1770	218/224	131/131	164/164	151/153	263/247	78/98	268/276
1771	220/222	127/119	166/178	151/153	251/253	94/98	252/272
1772	222/230	127/119	164/164	157/153	247/257	94/96	256/274
1775	221/226	127/131	164/180	149/153	247/255	94/98	252/272
1776	224/232	139/139	158/160	151/159	245/257	96/96	254/272
1778	220/229	119/119	166/180	149/155	253/257	94/96	250/272
1779	220/229	127/127	164/178	149/155	245/261	78/96	256/274
1780	218/234	123/123	162/180	149/159	247/247	96/98	256/276
1782	220/220	127/131	166/176	147/149	245/253	96/98	266/276
1783	230/232	143/143	160/163	159/161	245/247	76/84	252/264
1784	226/224	127/131	166/164	157/153	263/257	96/98	270/272
1785	222/224	119/123	164/164	153/155	263/261	96/98	256/274
1787	218/224	123/131	176/178	147/153	247/253	78/96	254/274
1788	224/226	123/131	162/180	157/155	253/253	96/96	256/276
1789	224/226	127/135	160/160	153/155	245/249	94/98	272/276
1791	220/218	127/131	164/164	147/149	245/253	94/96	270/276
1792	222/224	123/135	158/160	151/153	255/257	94/96	272/278
1793	220/226	127/131	160/164	149/153	257/261	94/100	272/276
1795	228/220	127/127	162/164	149/155	247/253	98/100	268/272
1794	220/222	127/123	160/164	149/151	247/261	78/96	268/268
1800	220/222	127/123	160/164	149/151	147/247	96/100	254/274
1803	216/222	123/131	166/180	145/151	245/257	94/96	254/276
1807	224/226	127/139	160/164	155/159	255/257	78/94	252/272
1814	228/226	119/139	160/162	157/155	255/257	78/94	256/276
1821	218/220	131/135	164/180	145/149	255/261	94/100	252/266
1823	220/224	131/139	160/164	151/155	245/253	96/98	252/270
1824	218/236	127/123	160/160	153/155	253/257	94/98	268/272
1826	224/226	127/123	164/176	149/151	245/251	96/100	252/270
1828	220/226	123/123	164/178	147/149	263/249	78/94	254/272
1829	224/226	123/131	178/178	147/153	255/257	76/98	256/272
% των χρωμοσωμάτων	7.5% (9/120)	28.3% (34/120)	9.2% (11/120)	8.3% (10/120)	9.2% (11/120)	-	-

Συνολικά, αναλύθηκαν 46 χρωμοσώματα των ατόμων που έφεραν τη c.2257C>T και όλοι παρουσίαζαν τον απλότυπο: “157-228-127-166-263”. Ο κοινός απλότυπος εντοπίζεται μεταξύ των δεικτών D16S403 (5’ άκρο) και D16S420 (3’ άκρο), οπότε πιθανόν να προέκυψε μετά από γεγονός ανασυνδυασμού που συνέβησαν ανάμεσα στους δείκτες D16S403-D16S3046 και D16S420-D16S401 (εικόνα 40).



Εικόνα 40. Σχηματική αναπαράσταση όπου φαίνεται ο κοινός απλότυπος μεγέθους ~1.2 Mb.

Ενδεικτικά στην εικόνα 41 παρουσιάζεται το γενεαλογικό δέντρο της οικογένειας 3008, όπου φαίνονται και οι απλότυποι όλων των μελών που γονοτυπήθηκαν.

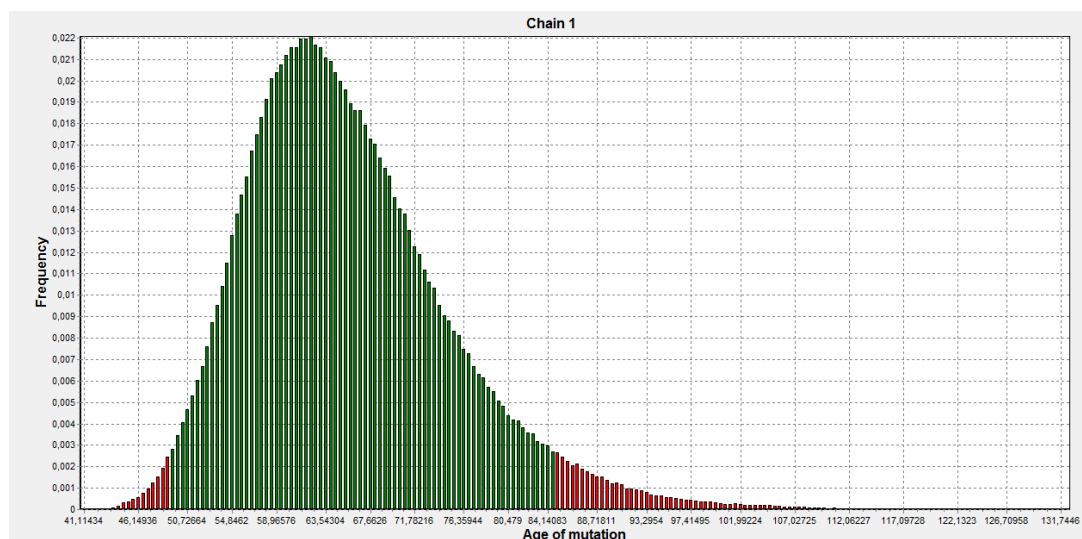


Εικόνα 41. Γενεαλογικό δέντρο της οικογένειας 3008. Η ασθενής αναφοράς παρουσιάζεται με βέλος. Ο κοινός απλότυπος είναι μέσα σε κόκκινο πλαίσιο, σε όλα τα μέλη της οικογένειας που φέρουν τη c.2257C>T, ενώ η μητέρα που δε φέρει την μεταλλαγή έχει διαφορετικό απλότυπο.

7. Προσδιορισμός της ηλικίας της c.2257C>T του γονιδίου PALB2

Ο υπολογισμός της ηλικίας της μεταλλαγής c.2257C>T έγινε με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος DMLE v2.2. Σύμφωνα με το λογισμικό καθορίστηκε ότι η μεταλλαγή προήλθε από γεγονότα ανασυνδυασμού που συνέβησαν σε ένα κοινό πρόγονο πριν από 1250-2100 χρόνια. Συγκεκριμένα, υπολογίζεται ότι η μεταλλαγή εμφανίστηκε στον Ελληνικό

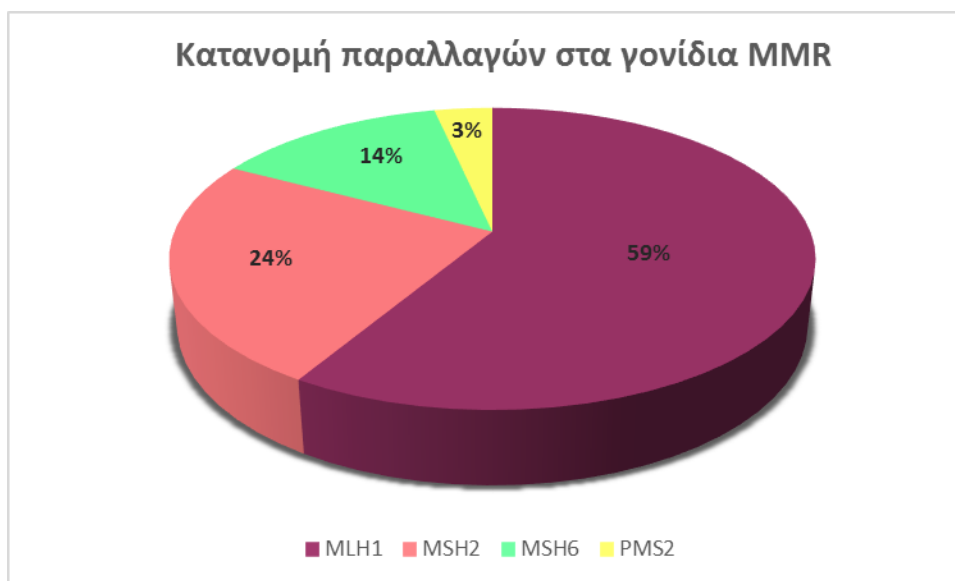
πληθυσμό πριν από 50-84 γενεές, θεωρώντας ότι κάθε γενεά περιλαμβάνει 25 χρόνια και σύμφωνα με τα δημογραφικά δεδομένα ο ρυθμός αύξησης του Ελληνικού πληθυσμού καθορίστηκε ότι είναι 0.135. Έτσι, η μεταλλαγή εμφανίστηκε κατά μέσο όρο πριν από 64 γενεές δηλαδή περίπου 1600 χρόνια (εικόνα 42).



Εικόνα 42. Σχηματική αναπαράσταση του αποτελέσματος του λογισμικού DMLE v2.2 σχετικά με τον υπολογισμό της ηλικίας της μεταλλαγής *c.2257C>T* του γονιδίου *PALB2*.

8. Ανίχνευση μεταλλαγών στα γονίδια MMR

Η παρουσία μεταλλαγών στα γονίδια MMR συνδέεται με την εμφάνιση καρκίνου των ωσθηκών αλλά και άλλων κακοηθειών που σχετίζονται με το σύνδρομο Lynch. Η ανάλυση των γονιδίων MMR πραγματοποιήθηκε με αλληλούχηση κατά Sanger όταν υπήρχαν ενδείξεις για στοχευμένο έλεγχο γονιδίων (π.χ. απώλεια έκφρασης συγκεκριμένων πρωτεϊνών μετά από έλεγχο του όγκου με ανοσοϊστοχημεία) ή με γονιδιακό πάνελ («TruSight Cancer Panel»). Συνολικά αναλύθηκαν 93 ασθενείς που πληρούσαν τα επικαιροποιημένα κριτήρια Bethesda και ανιχνεύθηκαν 29 ασθενείς (31.2%) με σημειακές μεταλλαγές σε κάποιο από τα γονίδια MMR. Η πλειονότητα των παραλλαγών ανιχνεύθηκε στο γονίδιο *MLH1*, ενώ δεύτερο σε συχνότητα ήταν το *MSH2*. Συγκεκριμένα ανευρέθηκαν: 17 παραλλαγές στο γονίδιο *MLH1* (18.3%), 7 μεταλλαγές στο *MSH2* (7.5%) και 4 (4.3%) και 1 (1.1%) μεταλλαγές στα γονίδια *MSH6* και *PMS2*, αντίστοιχα. Στην εικόνα 43 απεικονίζεται σχηματικά η κατανομή των σημειακών παραλλαγών που ανιχνεύθηκαν στα γονίδια MMR.



Εικόνα 43. Κατανομή των παραλλαγών στα γονίδια MMR.

8.1 Γονίδιο *MLH1*

Στο γονίδιο *MLH1* ανιχνεύθηκαν 14 μεταλλαγές εκ των οποίων 4 ήταν μη-νοηματικές (1669G>T, c.2194A>T, c.676C>T, c.67G>T), 1 ήταν πλαισιοτροποποιητική (c.182delT), 3 ήταν παρανοηματικές (c.350C>T, c.199G>A & c.350C>G) και 5 που εντοπίζονταν σε περιοχές εσονίων με αποτέλεσμα είτε να επηρεάζεται το μάτισμα, είτε να απαλείφονται ένα ή περισσότερα εξόνια. Τέλος, ανευρέθηκε και μία παραλλαγή αγνώστου κλινικής σημασίας (c.1685 A>C), όπως είναι χαρακτηρισμένη στις διεθνείς βάσεις δεδομένων. Η μη-νοηματική μεταλλαγή c.676C>T ανευρέθηκε σε τρεις ασθενείς. Στον πίνακα 20 καταγράφονται αναλυτικά οι μεταλλαγές που ανευρέθηκαν στο γονίδιο *MLH1*.

Πίνακας 20. Μεταλλαγές και παραλλαγές αγνώστου κλινικής σημασίας του γονιδίου <i>MLH1</i>			
Κωδικός ασθενούς	c.DNA (NM_000249.3)	Πρωτεΐνη (NP_000240.1)	Μεταλλαγή/Εύρημα αγνώστου κλινικής σημασίας
2407	c.1669G>T	p.(Glu557*)	μη-νοηματική
2416	c.182del	p.(Ile61fs)	Πλαισιοτροποποιητική
2426	c.350 C>T	p.(Thr117Met)	Παρανοηματική
2428	c.2194A>T	p.(Lys732*)	μη-νοηματική

2433	c.199G>A	p.(Gly67Arg)	Παρανοματική
2445	c.116+5G>C	-	Επηρεάζει το μάτισμα
2463	c.350C>G	p.(Thr117Arg)	Παρανοματική
2466	c.676C>T	p.(Arg226*)	μη-νοηματική
2475	c.1685 A>C	p.(Gln562Pro)	Παρανοματική (VUS)
2487	c.790+2dup	p.(Glu227_Ser295del)	Απαλοιφή εξονίων 9-10
2488	c.67G>T	p.(Glu23*)	μη-νοηματική
2497	c.676C>T	p.(Arg226*)	μη-νοηματική
2525	c.67G>T	p.(Glu23*)	μη-νοηματική
2533	c.116+5 G>C	-	Επηρεάζει το μάτισμα
2568	c.1409+1G>A	-	Επηρεάζει το μάτισμα
2575	c.207+5G>A	-	Απαλοιφή εξονίου 2
2576	c.676C>T	p.(Arg226*)	μη-νοηματική

Η πιο συχνή πρώτη διάγνωση των ασθενών που έφεραν παραλλαγές στο *MLH1* ήταν ο καρκίνος του παχέος εντέρου (15/17, 88.2%), ενώ δύο ασθενείς διαγνώστηκαν αρχικά με καρκίνο των ωοθηκών και στη συνέχεια ανέπτυξαν και καρκίνο του παχέος εντέρου. Η πλειονότητα των ασθενών (16/17) εμφάνισαν την πρώτη κακοήθεια σε ηλικία μικρότερη ή ίση από τα 50 έτη, ενώ 9/17 (52.9%) εμφάνισαν μία ή περισσότερες μετέπειτα πρωτοπαθείς διαγνώσεις. Συγκεκριμένα, 3 ασθενείς παρουσίασαν ασθενείς (16/17) εκτός από έναν ανέφεραν βεβαρημένο οικογενειακό ιστορικό με την παρουσία τουλάχιστον ενός ακόμη περιστατικού καρκίνου παχέος εντέρου, ενώ η πλειονότητα ανέφερε πολλαπλά περιστατικά καρκίνου παχέος εντέρου, καθώς και άλλων κακοηθειών που σχετίζονται με το σύνδρομο Lynch, όπως είναι ο καρκίνος του ενδομητρίου, ωοθηκών και στομάχου. Στον πίνακα 21 αναφέρονται τα στοιχεία δεύτερης διάγνωσης με καρκίνο του παχέος εντέρου, 1 ασθενής ανέπτυξε δεύτερο καρκίνο του παχέος εντέρου και καρκίνο του προστάτη, 1 εμφάνισε κακοήθεια του ενδομητρίου, 1 διαγνώστηκε με γαστρικό καρκίνο, 1 με καρκίνο των ωοθηκών, ενώ 1 ασθενής εμφάνισε καρκίνο του ενδομητρίου, του παχέος εντέρου και του δέρματος.

Επιπλέον, όλοι οι σχετικά με το ατομικό και το οικογενειακό ιστορικό των ασθενών που έφεραν παραλλαγές στο *MLH1*.

Πίνακας 21. Ατομικό & οικογενειακό ιστορικό ασθενών που έφεραν παραλλαγές στο γονίδιο <i>MLH1</i>			
Κωδικός ασθενούς	Τύπος κακοήθειας/ Ηλικία διάγνωσης	2η πρωτοπαθής διάγνωση/ Ηλικία	Τύπος οικογενειακού ιστορικού

	(έτη)	διάγνωσης (έτη)	
2407	CRC (40)	-	1x CRC & ca ενδομήτριου
2416	CRC (35)	CRC (61)	1x CRC
2426	CRC (52)	-	5x CRC
2428	CRC (21)	-	Ca δέρματος
2433	CRC (40)	-	6x CRC
2445	CRC (37)	-	3x CRC & γαστρικός ca
2463	CRC (37)	CRC (55)	1xCRC
2466	CRC (39)	CRC (49) & PrCa (59)	8x CRC, 1x ca ενδομήτριου, γαστρικός ca
2475	CRC (30)	ca ενδομήτριου (37)	3x CRC
2487	CRC (49)	Γαστρικός ca (51)	6x CRC
2488	OvCa (41)	CRC (46)	2x CRC & ca ενδομήτριου
2497	CRC (43)	OvCa (47)	1xCRC & 1x ca εγκεφάλου
2525	CRC (50)	-	2x CRC, 1x OvCa, 1x ca εγκεφάλου
2533	CRC (44)	-	1x CRC & 1x γαστρικός ca
2568	OvCa (40)	Ca ενδομητρίου (40), CRC (41), ca δέρματος (56)	5xCRC, 1x ca ενδομητρίου, 1x PNC
2575	CRC (46)	-	-
2576	CRC (43)	-	3x CRC

CRC: καρκίνος παχέος εντέρου, OvCa: καρκίνος ωοθηκών, PrCa: καρκίνος προστάτη, PNC: καρκίνος παγκρέατος, ca: καρκίνος

8.2 Γονίδιο *MSH2*

Στο γονίδιο *MSH2* ανευρέθηκαν 5 μεταλλαγές εκ των οποίων οι 3 ήταν μη-νοηματικές (c.1861C>T, c.1939G>T, c.1216C>T) και οι 2 ήταν πλαισιοτροποποιητικές (c.1285del & c.788_789_del). Οι μεταλλαγές c.1861C>T και c.1285delC ανευρέθηκαν σε δύο ασθενείς. Η μεταλλαγή c.1939G>T έχει αναφερθεί άλλη μία φορά στη βιβλιογραφία ως σωματική μεταλλαγή, ενώ έχει αναφερθεί και ένα εύρημα αγνώστου κλινικής σημασίας στην ίδια θέση [c.1939G>C (p.Glu647Gln), rs63750078]. Στον πίνακα 22 αναφέρονται αναλυτικά οι σημειακές μεταλλαγές που ανιχνεύθηκαν στο γονίδιο *MSH2*.

Πίνακας 22. Μεταλλαγές του γονιδίου *MSH2*

Κωδικός ασθενούς	c.DNA (NM_000251.2)	Πρωτεΐνη (NP_000242.1)	Μεταλλαγή
2425	c.1285del	p.(Gln429fs)	Πλαισιοτροποποιητική
2444	c.1861 C>T	p.(Arg621*)	μη-νοηματική
2447	c.1285del	p.(Gln429fs)	Πλαισιοτροποποιητική
2554	c.1861C>T	p.(Arg621*)	μη-νοηματική
2555	c.788_789_del	p.(Ans263fs)	Πλαισιοτροποποιητική
2566	c.1939G>T	p.(Gln647*)	μη-νοηματική
2569	c.1216C>T	p.(Arg406*)	μη-νοηματική

Στην περίπτωση των ασθενών που έφεραν μεταλλαγές στο *MSH2* η πρώτη διάγνωση αφορούσε διάφορες κακοήθειες που σχετίζονται με το σύνδρομο Lynch, εκτός από τον καρκίνο του παχέος εντέρου. Έτσι, 3 ασθενείς είχαν διαγνωσθεί με καρκίνο του παχέος εντέρου, 2 με καρκίνο του ενδομήτριου, 1 με καρκίνο των ωοθηκών και 1 με καρκίνο του λεπτού εντέρου. Επιπλέον, 4/7 ανέπτυξαν και μεταγενέστερη κακοήθεια που σχετίζεται με το σύνδρομο Lynch και συγκεκριμένα 1 ασθενής διεγνώσθη με καρκίνο του ενδομήτριου και παγκρέατος, 1 με καρκίνο του προστάτη, 1 με γλοιοβλάστωμα και 1 με καρκίνο του δέρματος και παχέος εντέρου.

Τέλος, 5/7 (71.4%) ασθενείς ανέφεραν πολλαπλά περιστατικά στην οικογένεια με σχετιζόμενους καρκίνους με το εν λόγω σύνδρομο και μόνο δύο ασθενείς ανέφεραν μόνο άλλο ένα περιστατικό καρκίνου παχέος εντέρου στην οικογένεια. Αναλυτικά στοιχεία σχετικά με το ατομικό και το οικογενειακό ιστορικό των ασθενών που φέρουν μεταλλαγές στο γονίδιο *MSH2* αναφέρονται στον πίνακα 23.

Πίνακας 23. Ατομικό & οικογενειακό ιστορικό ασθενών που έφεραν μεταλλαγές στο γονίδιο *MSH2*

Κωδικός ασθενούς	Τύπος κακοήθειας/ Ηλικία διάγνωσης (έτη)	2η πρωτοπαθής διάγνωση/ Ηλικία διάγνωσης (έτη)	Τύπος οικογενειακού ιστορικού
2425	CRC 50	ca ενδομητρίου 55, PNC 57	2x CRC & ca ενδομητρίου
2444	ca λεπτού εντέρου 32	-	1x CRC
2447	CRC 64y	PrCa 64y	3x CRC, 2x γαστρικός ca
2554	ca ενδομητρίου 33y	-	1x ca ενδομήτριου, 1x

			ΟνCa, 1x CRC, 1x γαστρικός ca, 1x ca εγκεφάλου
2555	CRC 40	γλοιοβλάστωμα 44	4x CRC
2566	ca ενδομήτριου 39	ca δέρματος 48γ, CRC 49γ	1x CRC
2569	ΟνCa 37		4x ca ενδομήτριου

CRC: καρκίνος παχέος εντέρου, ΟνCa: καρκίνος ωθηκών, PrCa: καρκίνος προστάτη, PNC: καρκίνος παγκρέατος, ca: καρκίνος

8.3 Γονίδια *MSH6* και *PMS2*

Η ανάλυση των γονιδίων *MSH6* και *PMS2* οδήγησε στην ανίχνευση 4 και 1 παραλλαγών, αντίστοιχα. Στο γονίδιο *MSH6* ανευρέθηκαν 3 μεταλλαγές, δύο πλαισιοτροποποιητικές (c.2276_2291delAGAGAGGGTTGATAGTT, c.522_523delAG) και μία μη-νοσηματική (c.2665C>T) και ένα εύρημα αγνώστου κλινικής σημασίας (c.3623C>A), το οποίο δεν ανευρέθηκε στις βάσεις δεδομένων. Ακολούθησε ανάλυση του VUS με εργαλεία βιοπληροφορικής τα αποτελέσματα των οποίων ήταν: SIFT: επιβλαβής (0), PolyPhen: πιθανώς επιβλαβής (1), AlignGVGD: επιβλαβής (C65), MutTaster: επιβλαβής (prob. 0.999), PhastCons: υψηλά συντηρημένη περιοχή-επιβλαβής (1), PhyloP: υψηλά συντηρημένη περιοχή-επιβλαβής (5.055). Στο γονίδιο *PMS2* ανιχνεύθηκε μία μεταλλαγή, c.861_864delACAG. Στον πίνακα 24 αναφέρονται αναλυτικά οι μεταλλαγές και τα ευρήματα αγνώστου κλινικής σημασίας που ανιχνευθήκαν στα γονίδια *MSH6* και *PMS2*.

Πίνακας 24. Μεταλλαγές και ευρήματα αγνώστου κλινικής σημασίας των γονιδίων *MSH6* και *PMS2*

Κωδικός ασθενούς	Γονίδιο	c.DNA	Πρωτεΐνη	Μεταλλαγή/Εύρημα αγνώστου κλινικής σημασίας
2375	<i>MSH6</i>	NM_000179.2: c.2276_2291del	p.(Leu759fs)	Πλαισιοτροποποιητική
2462	<i>MSH6</i>	NM_000179.2: c.522_523del	p.(Arg174Serfs)	Πλαισιοτροποποιητική
2472	<i>MSH6</i>	NM_000179.2: c.2665C>T	p.(Gln889*)	Μη-νοσηματική
2532	<i>MSH6</i>	NM_000179.2: c.3623C>A	p.(Ser1208Tyr)	Παρανοσηματική (VUS)
2577	<i>PMS2</i>	NM_000535: c.861_864del	p.(Arg287Serfs)	Πλαισιοτροποποιητική

Όλοι οι ασθενείς που έφεραν μεταλλαγές στα γονίδια *MSH6* και *PMS2* είχαν διαγνωσθεί με καρκίνο του παχέος εντέρου, ενώ κανένας δεν εμφάνισε δεύτερη πρωτοπαθή διάγνωση. Επίσης, όλοι οι ασθενείς ανέφεραν περισσότερα από ένα περιστατικά κακοηθειών είτε

παχέος εντέρου, είτε άλλων καρκίνων σχετιζόμενων με το σύνδρομο Lynch στην οικογένεια (ενδομήτριου, στομάχου και παγκρέατος). Στον πίνακα 25 παρουσιάζονται αναλυτικά τα στοιχεία που αφορούν το ατομικό και οικογενειακό ιστορικό των ασθενών που έφεραν μεταλλάξεις στα γονίδια *MSH6* και *PMS2*.

Πίνακας 25. Ατομικό & οικογενειακό ιστορικό ασθενών που έφεραν μεταλλάξεις στο γονίδιο *MSH6* και *PMS2*

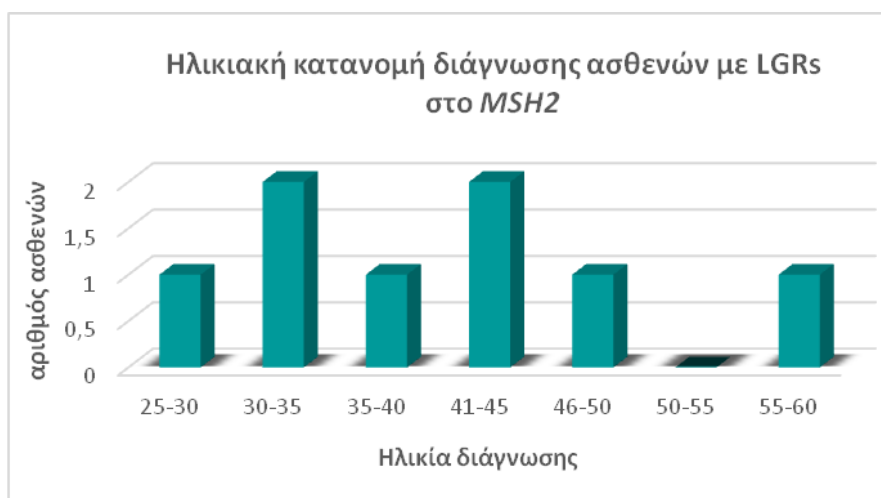
Κωδικός ασθενούς	Γονίδιο	Τύπος κακοήθειας/ Ηλικία διάγνωσης (έτη)	Τύπος οικογενειακού ιστορικού
2375	<i>MSH6</i>	CRC 59	2x CRC & 2x ca ενδομήτριου
2462	<i>MSH6</i>	CRC 41	1x CRC & 1x ca ενδομήτριου
2472	<i>MSH6</i>	CRC 29y	1x γαστρικός ca & 1x γυναικολογικός ca
2532	<i>MSH6</i>	CRC 76	2x CRC & 2x PNC
2577	<i>PMS2</i>	CRC 63	γυναικολογικός ca

CRC: καρκίνος παχέος εντέρου, PNC: καρκίνος παγκρέατος, ca: καρκίνος

8.4 Ανίχνευση μεγάλων γονιδιακών αναδιατάξεων στα γονίδια *MLH1/MSH2* με τη τεχνική MLPA

Όλοι οι ασθενείς στους οποίους η προηγούμενη ανάλυση δεν κατέδειξε την ύπαρξη κάποιας μεταλλαγής (n=64), υποβλήθηκαν σε περαιτέρω διερεύνηση για την ανίχνευση μεγάλων γονιδιακών αναδιατάξεων των γονιδίων *MLH1/MSH2*. Η ανίχνευση των LGRs πραγματοποιήθηκε με τη τεχνική MLPA και χρησιμοποιήθηκε το μίγμα ιχνηθετών P003-D1 (MRC- Holland, Amsterdam, the Netherlands). Από την ανάλυση αυτή ανευρέθηκαν 8 μεγάλες γονιδιακές αναδιατάξεις (8/93, 8.6%) και συγκεκριμένα 8 ελλείμματα στο γονίδιο *MSH2*, ενώ στο γονίδιο *MLH1* δεν ανευρέθηκε καμία γονιδιακή αναδιάταξη. Συγκεκριμένα τα ελλείμματα που ανιχνεύθηκαν ήταν: απαλοιφή των εξονίων 1-6, 1-7, 1-8, 3-4, 9-10 και 7-16. Το έλλειμμα των εξονίων 1-7 ανευρέθηκε σε τρεις ασθενείς εκ των οποίων οι δύο είχαν διαγνωσθεί με γαστρικό καρκίνο.

Οι ασθενείς αναφοράς είχαν διαγνωσθεί με καρκίνο του ενδομητρίου (2), των ωοθηκών (1), γαστρικό καρκίνο (2), του λεπτού εντέρου (1) και του παχέος εντέρου (3), ενώ 7/8 ασθενείς παρουσίασαν την πρώτη διάγνωση με κακοήθεια σε ηλικία μικρότερη από τα 50 έτη (εικόνα 44).



Εικόνα 44. Σχηματική αναπαράσταση της κατανομής της ηλικίας διάγνωσης των ασθενών που έφεραν ελλείμματα στο γονίδιο MSH2.

Επίσης, τρεις από τους ασθενείς αναφοράς (37.5%) εμφάνισαν μετέπειτα μία ή περισσότερες διαγνώσεις κακοήθειας σχετιζόμενες με το σύνδρομο Lynch. Συγκεκριμένα μία ασθενής ανέπτυξε και καρκίνο του παχέος εντέρου, 1 καρκίνο του βλεφάρου, του προστάτη και της ουροδόχου κύστεως και μία ασθενής γαστρικό καρκίνο και της ουροδόχου κύστεως. Όλοι οι ασθενείς ανέφεραν ένα ή περισσότερα περιστατικά καρκίνων που σχετίζονται με το σύνδρομο Lynch στην οικογένεια, ενώ 6/7 ανέφεραν τουλάχιστον άλλο ένα περιστατικό κακοήθειας του παχέος εντέρου σε μέλη της οικογένειάς τους.

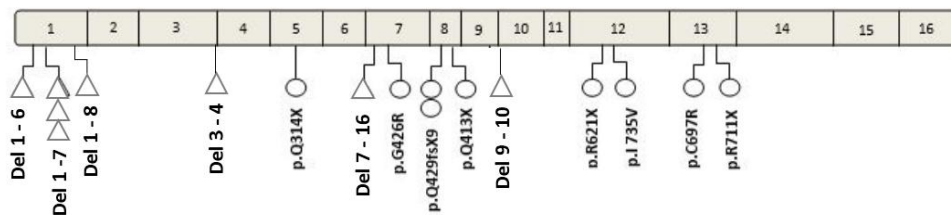
Στον πίνακα 26 περιγράφονται αναλυτικά τα ελλείμματα του γονιδίου MSH2 καθώς και στοιχεία από το ατομικό και το οικογενειακό ιστορικό των ασθενών.

Πίνακας 26. Ελλείμματα του MSH2 - Ατομικό & οικογενειακό ιστορικό ασθενών που έφεραν LGRs στο MSH2				
Κωδικός ασθενούς	Έλλειμμα εξονίων του MSH2	Τύπος κακοήθειας/ Ηλικία διάγνωσης (έτη)	2η πρωτοπαθής διάγνωση/ Ηλικία διάγνωσης (έτη)	Τύπος οικογενειακού ιστορικού
23	1-8	ca ενδομήτριου (32)	CRC (37)	1x ca ενδομήτριου & 1x CRC
886	3-4	ΟνCa (35)	-	1x ΟνCa
2369	1-7	γαστρικός ca (43)	-	2x γαστρικός ca
2430	1-6	ca λεπτού εντέρου (48)	ca βλεφάρου (57), PrCa (66), ca	1x CRC

			ουροδόχου κύστεως (67)	
2437	9-10	CRC 29	-	1x CRC
2446	7-16	CRC 41	-	4x CRC & 1ca εγκεφάλου
2527	1-7	CRC 58	-	1x γαστρικός ca & 1x CRC
2541	1-7	γαστρικός ca 40	ca ουροδόχου κύστεως 44, γαστρικός ca 51	1x ca ενδομήτριου & 1x CRC

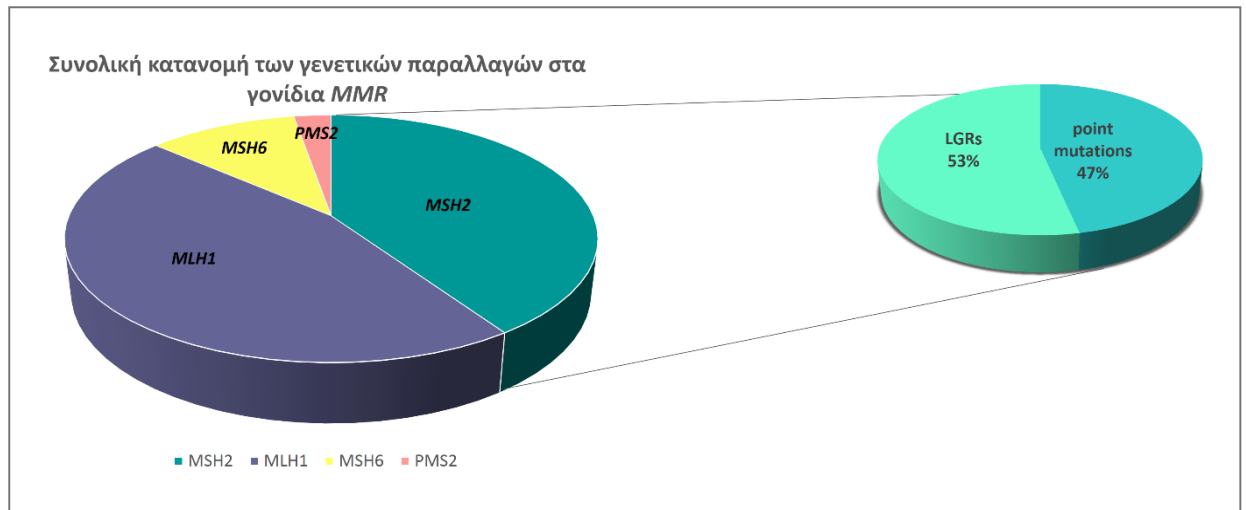
Συνολικά ο αριθμός των ασθενών που έφεραν γενετικές παραλλαγές στο γονίδιο *MSH2*, λαμβάνοντας υπόψιν και τους ασθενείς που έφεραν μεγάλες γονιδιακές αναδιατάξεις ανέρχεται στους 15 (16.1%). Στην εικόνα 45 παρουσιάζεται η κατανομή των γενετικών παραλλαγών που ανιχνεύθηκαν κατά μήκος του γονιδίου *MSH2*, όπου είναι εμφανές ότι οι γενετικές παραλλαγές κατανέμονται κατά μήκος όλου του γονιδίου σχεδόν.

MSH2 – Χρωμόσωμα 2



Εικόνα 45. Κατανομή των γενετικών παραλλαγών κατά μήκος του γονιδίου *MSH2*.

Συνοπτικά μετά το πέρας όλων των αναλύσεων για την ανίχνευση γενετικών παραλλαγών των γονιδίων MMR, συμπεριλαμβανομένου και των γονιδιακών αναδιατάξεων, η κατανομή των παραλλαγών διαμορφώνεται ως εξής: 17 παραλλαγές στο γονίδιο *MLH1* (18.3%), 15 στο *MSH2* (16.1%) (7 σημειακές μεταλλαγές και 8 LGRs), 4 στο *MSH6* (4.3%) και 1 στο *PMS2* (1.1%). Στην εικόνα 46 παρουσιάζεται η σχηματική παράσταση των παραπάνω αποτελεσμάτων.



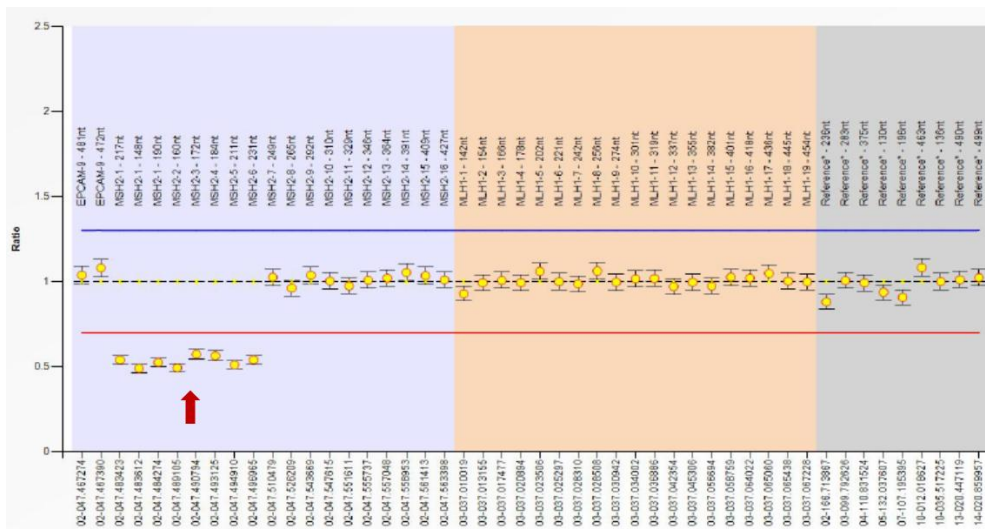
Εικόνα 46. Συνολική κατανομή των γενετικών παραλλαγών στα γονίδια MMR.

9. Χαρακτηρισμός των μεγάλων γονιδιακών αναδιατάξεων του γονιδίου *MSH2*

Τα ελλείμματα του γονιδίου *MSH2* ανιχνεύθηκαν αρχικά με τη μέθοδο MLPA. Η συγκεκριμένη τεχνική καταδεικνύει την απαλοιφή των εξονίων, χωρίς όμως να έχει τη δυνατότητα να καθορίσει τα ακριβή όρια της θραύσης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η PCR μεγάλου εύρους και ταυτοποιήθηκαν τα σημεία θραύσης των ελλειμμάτων των εξονίων 1-6, 3-4, 9-10 και 7-16.

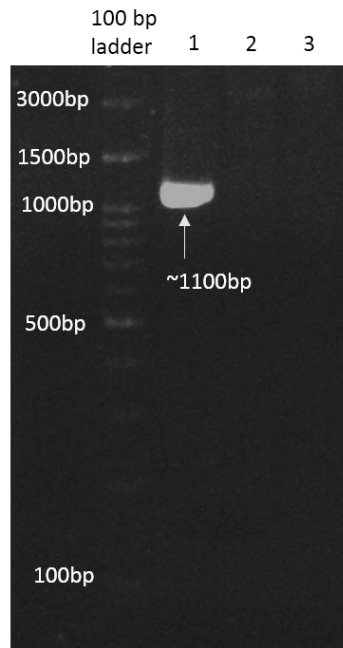
9.1 Έλλειμμα των εξονίων 1 - 6 του γονιδίου *MSH2*

Αρχικά η απαλοιφή των εξονίων 1-6 ανιχνεύθηκε με τη τεχνική MLPA, όπου ήταν εμφανές ότι έλειπαν τα εξόνια 1-6, ενώ δεν έλειπε το εξόνιο 9 του γονιδίου *EPCAM* και το εξόνιο 7 του *MSH2* (εικόνα 47). Το γονίδιο *EPCAM* εντοπίζεται ανοδικά του *MSH2*. Άρα, το 5' άκρο του ελλείμματος εντοπίζεται ανοδικά του γονιδίου, ανάμεσα στο *MSH2* και στο *EPCAM*, και το 3' άκρο εντοπίζεται στο ιντρόνιο ανάμεσα στο εξόνιο 6 και στο εξόνιο 7.



Εικόνα 47. Γραφική αναπαράσταση του ελλείμματος των εξονίων 1-6 του *MSH2*, όπως φάνηκε με τη μέθοδο MLPA. Είναι εμφανές ότι απαλείφονται τα εξόνια 1-6, ενώ το εξόνιο 9 του *EPCAM* και το εξόνιο 7 του *MSH2* παραμένουν φυσιολογικά. Το έλλειμμα σημειώνεται με το κόκκινο βέλος.

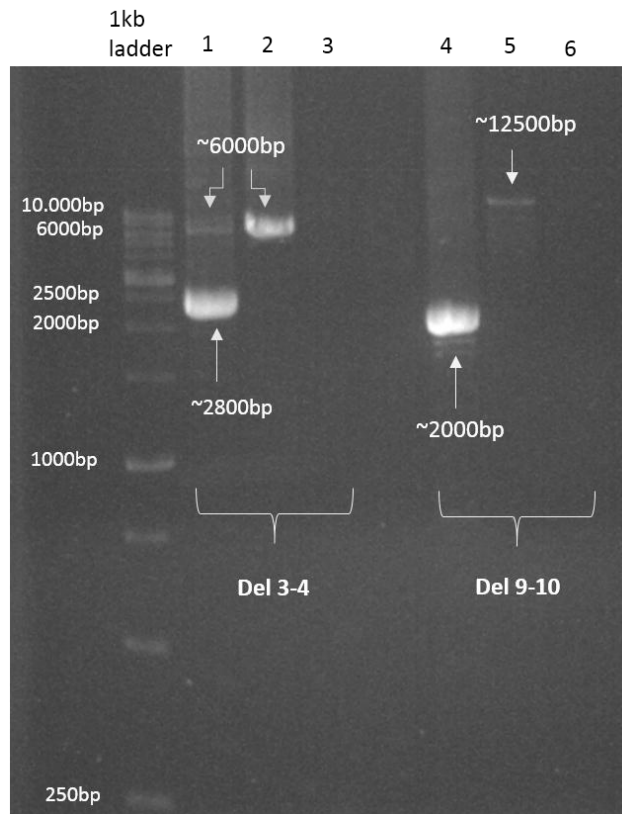
Για να προσδιορισθούν τα σημεία θραύσης του ελλείμματος χρησιμοποιήθηκαν ένας πρόσθιος εκκινητής που εντοπιζόταν στην 5' UTR περιοχή του γονιδίου και ένας ανάστροφος που εντοπιζόταν στο εξόνιο 7. Έτσι, από την αντίδραση PCR μεγάλου εύρους προέκυψαν δύο προϊόντα, ένα που αντιστοιχούσε στο φυσιολογικό αλληλόμορφο και ένα μεγέθους ~1100 bp που αντιστοιχούσε στο αλληλόμορφο που έφερε την απαλοιφή (εικόνα 48). Ακολούθησε αλληλούχηση κατά Sanger με πρόσθιους και ανάστروفους εκκινητές από όπου καθορίστηκαν τα όρια της αναδιάταξης και προέκυψε ότι το μέγεθος του ελλείμματος είναι 19302 bp. Η απαλοιφή σε επίπεδο DNA είναι η NM_000251.2: c.1-4718_1077-1197del και σε πρωτεϊνικό επίπεδο NP_000242.1: p.(Met1_Arg359del). Η ονοματολογία καθορίστηκε σύμφωνα με τους διεθνείς κανόνες ονοματολογίας HGVS [91].



Εικόνα 48. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v. Θέση 1: δείγμα ασθενούς που φέρει το έλλειμμα των εξονίων 1-6 του γονιδίου *MSH2*; θέση 2: δείγμα ατόμου που δε φέρει το υπό μελέτη έλλειμμα; θέση 3: αρνητικός μάρτυρας. Χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης μοριακών μαζών 100bp.

9.2 Έλλειμμα των εξονίων 3 - 4 του γονιδίου *MSH2*

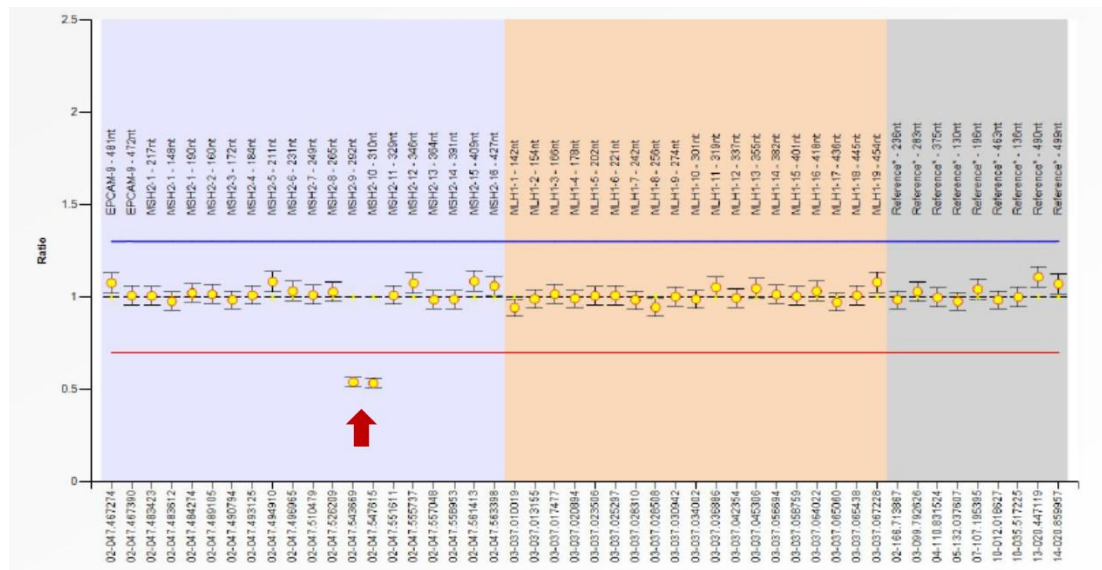
Από την ανάλυση με MLPA ανευρέθηκε η απαλοιφή των εξονίων 3-4. Σύμφωνα με αυτά τα αποτελέσματα το εξόνιο 2 και το εξόνιο 5 παραμένουν φυσιολογικά, ενώ λείπουν τα εξόνια 3 και 4. Έτσι, προκύπτει ότι το 5' άκρο του ελλείμματος εντοπίζεται στο εσόνιο ανάμεσα στα εξόνια 2 και 3 και το 3' άκρο βρίσκεται στο εσόνιο που παρεμβάλλεται ανάμεσα στα εξόνια 4 και 5. Για το χαρακτηρισμό λοιπόν της αναδιάταξης χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που εδράζονταν στο εξόνιο 2 και στο εξόνιο 5, τα οποία σίγουρα παρέμεναν ακέραια. Το αναμενόμενο μέγεθος του PCR προϊόντος ήταν 6008 bp, ενώ προέκυψε και ένα προϊόν PCR μεγέθους ~2800 bp, που αντιστοιχούσε στο αλληλόμορφο με το έλλειμμα (Εικόνα 49). Μετά από αλληλούχηση κατά Sanger με πρόσθιους και ανάστροφους εκκινητές προέκυψε ότι η συγκεκριμένη αναδιάταξη αφορά ένα έλλειμμα μεγέθους 3524 bp [NM_000251.2: c.367-748_793-1400del, NP_000242.1: p.(Ala123_Gln264del)].



Εικόνα 49. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v. Θέση 1: δείγμα ασθενούς που φέρει το έλλειμμα των εξονίων 3-4 του γονιδίου *MSH2*; θέση 2: δείγμα ατόμου που δε φέρει το υπό μελέτη έλλειμμα; θέση 3: αρνητικός μάρτυρας; θέση 4: δείγμα ασθενούς που φέρει την απαλοιφή 9-10; θέση 5: δείγμα ατόμου που δε φέρει το υπό μελέτη έλλειμμα; θέση 6: αρνητικός μάρτυρας; Χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης μοριακού βάρους 1kb.

9.3 Έλλειμμα των εξονίων 9 - 10 του γονιδίου *MSH2*

Στην ασθενή 2437 η ανάλυση με MLPA ανέδειξε την ύπαρξη της απαλοιφής των εξονίων 9 και 10. Σύμφωνα με αυτά τα αποτελέσματα τα εξόνια 8 και 11 παραμένουν ακέραια και άρα τα όρια θραύσης εντοπίζονται στο εσόνιο ανάμεσα στα εξόνια 8 και 9 (5' άκρο του ελλείμματος) και στο εσόνιο ανάμεσα στα εξόνια 10 και 11 (3' άκρο του ελλείμματος) (εικόνα 50).



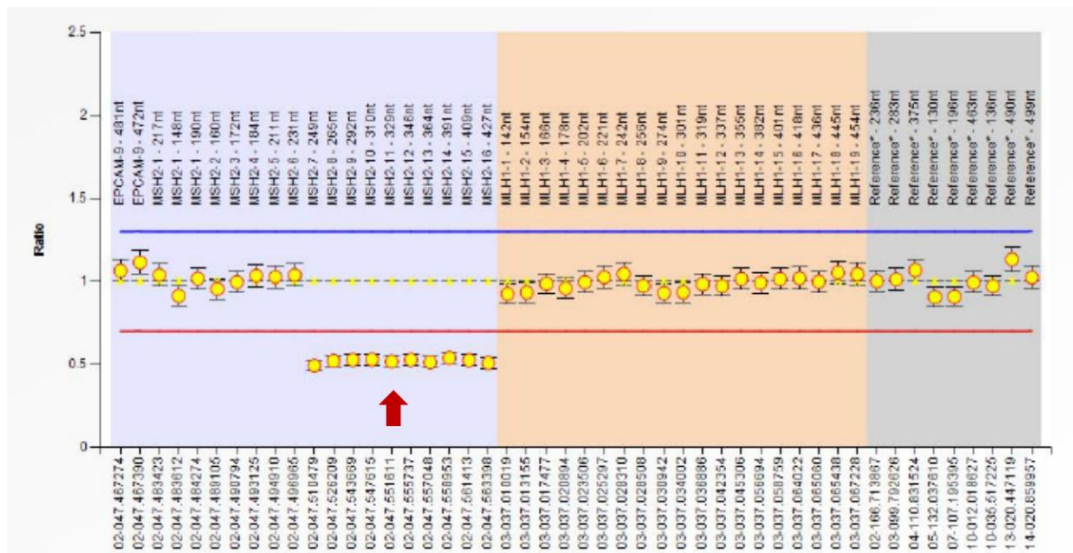
Εικόνα 50. Γραφική αναπαράσταση της απαλοιφής των εξονίων 9 - 10 του *MSH2*, όπου φαίνεται ότι απαλείφονται τα εξόνια 9 και 10, ενώ τα εξόνια 8 και 11 του *MSH2* παραμένουν φυσιολογικά. Το έλλειμμα σημειώνεται με το κόκκινο βέλος.

Ο προσδιορισμός των σημείων θραύσης επιτεύχθηκε με τη χρήση εκκινητών που εντοπίζονταν αρχικά στο εξόνιο 8 και στο εξόνιο 11. Έτσι, ενισχύθηκε μία γενετική περιοχή μεγέθους ~12500 bp (φυσιολογικό αλληλόμορφο), ενώ στο δείγμα της ασθενούς που έφερε την αναδιάταξη υπήρχε και ένα δεύτερο προϊόν PCR μεγέθους ~2000 bp, που αντιστοιχούσε στο μεταλλαγμένο αλληλόμορφο (Εικόνα 49).

Ακολούθησε αλληλούχηση κατά Sanger για το χαρακτηρισμό των ορίων θραύσης, όπου προέκυψε ότι το έλλειμμα είχε μέγεθος 10440 bp. Η απαλοιφή σε επίπεδο DNA είναι η NM_000251.2: c.1387-3387_1662-882del και σε πρωτεϊνικό επίπεδο NP_00242.1: p.(Val463_Ser554del).

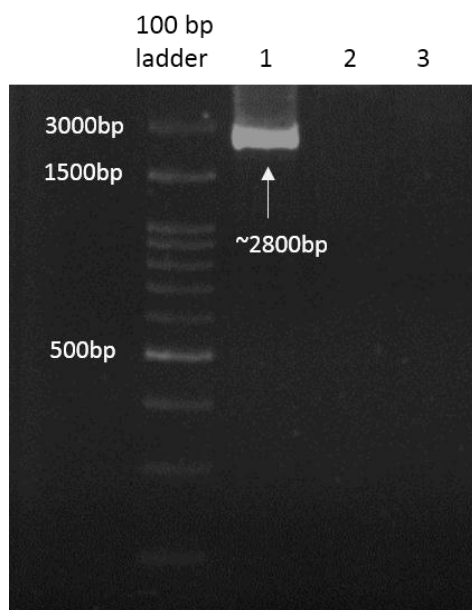
9.4 Έλλειμμα των εξονίων 7 -16 του γονιδίου *MSH2*

Στην ασθενή 2446 η μέθοδος MLPA ανέδειξε την ύπαρξη του ελλείμματος των εξονίων 7 – 16. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 51 το εξόνιο 6 παραμένει ανέπαφο, ενώ απαλείφονται τα εξόνια 7 έως 16. Επομένως, το σημείο θραύσης όσον αφορά το 5' άκρο του ελλείμματος εντοπίζεται στο εσόνιο που παρεμβάλλεται ανάμεσα στα εξόνια 6 και 7, ενώ το 3' άκρο βρίσκεται καθοδικά του γονιδίου, χωρίς να μπορεί να καθοριστεί μέχρι που εκτείνεται.



Εικόνα 51. Γραφική αναπαράσταση της απαλοιφής των εξονίων 7 - 16 του MSH2, όπου φαίνεται ότι απαλείφονται τα εξόνια 7 έως 16, ενώ το εξόνιο 6 παραμένει φυσιολογικό. Το έλλειμμα σημειώνεται με το κόκκινο βέλος.

Για να προσδιορισθούν τα σημεία θραύσης της απαλοιφής χρησιμοποιήθηκε αρχικά ένας πρόσθιος εκκινητής που εντοπιζόταν στο εξόνιο 6, ενώ ο ανάστροφος εκκινητής εντοπιζόταν καθοδικά του γονιδίου στη 3' UTR περιοχή. Το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος της PCR μεγάλου εύρους ήταν 91282 bp, το οποίο αντιστοιχεί στο αλληλόμορφο αγρίου τύπου. Λόγω του πολύ μεγάλου μεγέθους του προϊόντος δεν ήταν δυνατή η ενίσχυση του αυτού τμήματος ούτε με τη PCR μεγάλου εύρους, οπότε το μόνο προϊόν PCR που θα μπορούσε να ενισχυθεί ήταν αυτό που αντιστοιχεί στο αλληλόμορφο που φέρει την αναδιάταξη (εικόνα 52). Η αλληλούχηση κατά Sanger με πρόσθιους και ανάστροφους εκκινητές κατέδειξε την ύπαρξη ενός ελλείματος μεγέθους 67989 bp. Η απαλοιφή σε επίπεδο DNA είναι η NM_000251.2: c.1077-6579_2805+8202del και σε πρωτεϊνικό επίπεδο NP_00242.1: p.(Arg359_Thr934del).



Εικόνα 52. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v. Θέση 1: δείγμα ασθενούς που φέρει το έλλειμα των εξονίων 7-16 του γονιδίου *MSH2*; θέση 2: δείγμα ατόμου που δε φέρει το υπό μελέτη έλλειμα; θέση 3: αρνητικός μάρτυρας. Χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης μοριακών μαζών 100bp.

Συγκεντρωτικά στον πίνακα 27 καταγράφονται όλες οι γονιδιακές αναδιατάξεις που ανευρέθηκαν στο γονίδιο *MSH2*, καθώς και η ονοματολογία του σε επίπεδο DNA, σε γενωμικό και πρωτεϊνικό επίπεδο και η θέση τους στο χρωμόσωμα 2. Η ονοματολογία καθορίστηκε σύμφωνα με τους διεθνείς κανόνες ονοματολογίας HGVS.

Πίνακας 27. Μέγεθος και ονοματολογία των γονιδιακών αναδιατάξεων του γονιδίου <i>MSH2</i>					
Απαλοιφή εξονίων <i>MSH2</i>	Μέγεθος ελλείματος (bp)	c.DNA NM_000251.2	Γενωμικό επίπεδο NG_007110.2	Πρωτεϊνικό επίπεδο NP_000242.1	Χρωμοσωμική θέση
1-6	19302	c.1-4718_1077-1197del	g.351_19652del	p.(Met1_Arg359del)	2:47,625,613 & 2:47,644,914
3-4	3524	c.367-748_793-1400del	g.6280_9803del	p.(Ala123_Gln264del)	2:47,409,347 & 2:47,412,870
9-10	10440	c.1387-3387_1662-882del	g.56578_67017del	p.(Val463_Ser554del)	2:47,686,783 & 2:47,697,222
7-16	67989	c.1077-6579_2805+8202del	g. 25040-93028del	p.(Arg359_Thr934del)	2:47,650,302 & 2:47,718,290

10. Εργαλεία Βιοπληροφορικής για την ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου *MSH2*

Η ανάλυση του γονιδίου *MSH2* με το λογισμικό RepeatMasker ανέδειξε ότι το 53,76% του γονιδίου αποτελείται από διάσπαρτα επαναλαμβανόμενα στοιχεία. Το μεγαλύτερο ποσοστό από αυτά καταλαμβάνουν (33,68%) τα βραχεία διάσπαρτα στοιχεία, με κύρια εμφάνιση των επαναλήψεων Alu που αποτελούν το 32,6%.

Η αντίστοιχη ανάλυση στα σημεία θραύσης των αναδιατάξεων που χαρακτηρίστηκαν, καθώς και στις εγγύς περιοχές τους ανέδειξε ότι όλα εντοπίζονταν είτε μέσα σε περιοχές Alu ή κοντά στα σημεία θραύσης ανευρίσκονταν μεγάλο ποσοστό αυτών των επαναλήψεων (Alu). Μόνο στο έλλειμα των εξονίων 3-4, στο 5' άκρο της θραύσεως παρατηρήθηκε ένα σχετικά χαμηλό ποσοστό επαναλήψεων Alu, της τάξεως του ~52%. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι αυτές οι απαλοιφές πιθανά να προέκυψαν μέσω του ομόλογου ανασυνδυασμού ανάμεσα στις Alu επαναλήψεις. Επιπλέον, από την ανάλυση σχετικά με την ομολογία που παρουσίαζαν οι περιοχές που συμμετείχαν στα σημεία θραύσης (με τη χρήση του BLAST) προέκυψε ότι όλες παρουσίαζαν ομολογία μεγαλύτερη του 90%, εκτός από το έλλειμα των εξονίων 3-4 στο οποίο η ομολογία των αλληλουχιών που περιβάλλουν τα σημεία θραύσης είναι 83% (εικόνα 53). Τα δεδομένα από την *in silico* ανάλυση παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 28.

Del 1-6					
Score	Expect	Identities			
48.2 bits(52)	9e-12	29/31(94%)			
Query 1	CCAGCACTTTGGGAGGCCGAGTTGGGTGGAT	31			
Sbjct 30	CCAACACTTTGGGAGGCCGAGTTGGGTGGAT	60			

Del 3-4					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
125 bits(138)	2e-33	101/121(83%)	1/121(0%)	Plus/Plus	
Query 52	TTTGTATTTTAGTAGAGACAAGGTTTACCATGTTGGCCAGGCTGGTCTGAACTCCTG	111			
Sbjct 257	TTTGTATTTTAGTAGAGATGGGGTTCTCTATGTTGGTCAGGCTGGTCTCAAACCTCCTG	316			
Query 112	-ACCTCAAAGTGATCCGCCCTGCCTTGGCCCTCCCAAAGTGCTGAGATTACAGATGTGAGCCA	170			
Sbjct 317	AACCTCAGGTGATCCGCCCGCCTCGGGCTTCCAAAGCGCTGAGATTGCAGGCATGAGCCA	376			

Del 9-10				
Score	Expect	Identities	Gaps	
57.2 bits(62)	2e-14	37/41(90%)	0/41(0%)	
Query 1	TTTGCTCTTGTGGCCAGGCTGGAGTGCAATGGTGGATCT	41		
Sbjct 20	TTTGCTCCTGTTGTCCAGGCTGGAGTGCAAGTGGTCTATCT	60		

Del 7-16				
Score	Expect	Identities	Gaps	
73.4 bits(80)	2e-19	43/45(96%)	0/45(0%)	
Query 10	TGAGACGGAGTCTTGTCTGTGCCCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCG	54		
Sbjct 1	TGAGACGGAGTCTCGCTCTGTGCCCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCG	45		

Εικόνα 53. *In silico* ανάλυση της ομολογίας των αλληλουχιών των σημείων θραύσης/περιοχών που τα περιβάλλουν

Πίνακας 28. *In silico* ανάλυση της αλληλουχίας του *MSH2*

Απαλοιφή εξονίων <i>MSH2</i>	5' επαναλαμβανόμενη αλληλουχία	3' επαναλαμβανόμενη αλληλουχία	Ομολογία των αλληλουχιών (%)
1-6	AluY 95,83%	AluSx 79,17%	94
3-4	(TTTTA) _n 51,67%	AluSp 100%	83
9-10	AluSq 100%	AluSp 89,17%	90
7-16	AluY 94,17%	AluYa5 100%	96

11. Ανάλυση των επιπέδων μεθυλίωσης των υποκινητών 22 γονιδίων

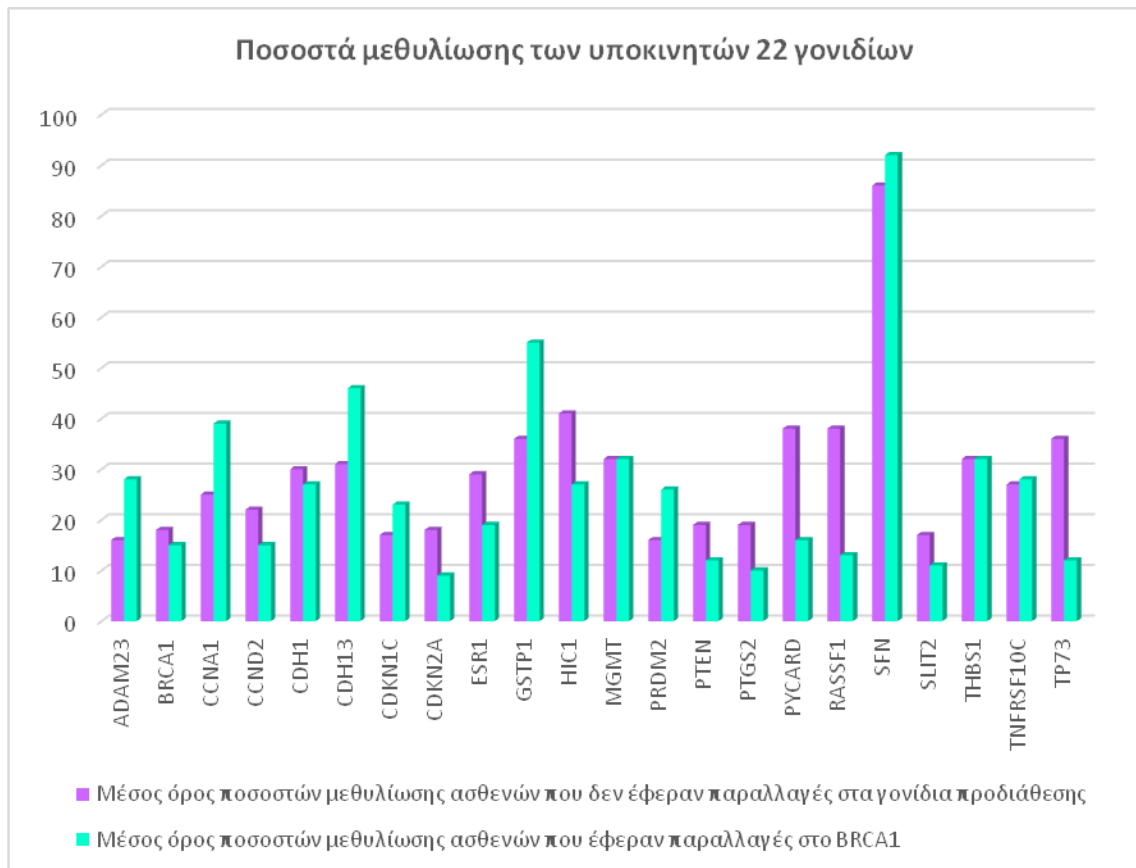
Η ανάλυση με αλληλούχηση νέας γενεάς έδειξε ότι από τις 108 ασθενείς με εξαιρετικά βεβαρημένο οικογενειακό ιστορικό, οι 91 δεν έφεραν μεταλλαγές σε κανένα από τα γονίδια προδιάθεσης σε καρκίνο που ελέγχθηκαν. Σε επόμενο βήμα, σε τέσσερις από αυτές τις ασθενείς, οι οποίες είχαν διαγνωσθεί σε νεαρή ηλικία και είχαν τριπλά αρνητικούς όγκους, ελέγχθηκαν τα επίπεδα μεθυλίωσης σε 22 γονίδια. Τα αποτελέσματα αυτά συγκρίθηκαν με τα αποτελέσματα από τέσσερις ασθενείς, με αντίστοιχές διαγνώσεις, οι οποίες όμως έφεραν μεταλλαγές στο γονίδιο *BRCA1*. Τα γονίδια που περιλαμβάνονται στη μελέτη επιλέχθηκαν βάση δεδομένων που προέκυψαν από την ανάλυση καρκινικών κυττάρων ασθενών με καρκίνο του μαστού, ενώ στην παρούσα εργασία αναλύθηκαν κύτταρα περιφερικού αίματος (germline) ασθενών με κακοήθεια μαστού. Για να θεωρηθεί ότι ο υποκινητής ενός γονιδίου θεωρείται υπερμεθυλιωμένος και άρα επηρεάζεται η έκφραση του γονιδίου, καθορίστηκαν τα ποσοστά μεγαλύτερα του 30%.

Η ανάλυση των επιπέδων μεθυλίωσης των υποκινητών των 22 γονιδίων ανέδειξε ότι σε όλες τις ασθενείς τα ποσοστά υπερμεθυλίωσης του υποκινητή του *SFN* ήταν εξαιρετικά υψηλά (>50%), ενώ τα ποσοστά μεθυλίωσης του υποκινητή του *BRCA1* ήταν παρόμοια σε 7/8 ασθενείς, χωρίς να παρουσιάζουν σημαντική αύξηση της μεθυλίωσης. Επιπλέον, αυξημένα ποσοστά μεθυλίωσης και στις δύο κατηγορίες παρατηρήθηκαν στα γονίδια: *CDH13*, *GSTP1*, *MGMT* και *THBS1*. Τέλος, αυξημένα ποσοστά μεθυλίωσης μόνο στην κατηγορία των ασθενών που δεν είχε ανιχνευθεί μεταλλαγή σε κάποιο γονίδιο προδιάθεσης, παρατηρήθηκε στα γονίδια: *CDH1*, *HIC1*, *PYCARD*, *RASSF1* και *TP73*. Στην ομάδα των ασθενών που έφεραν μεταλλαγές στο *BRCA1* το μόνο γονίδιο που είχε αυξημένα ποσοστά μεθυλίωσης ήταν το *CCNA1*. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των

επιπέδων μεθυλίωσης των υποκινητών των 22 γονιδίων παρουσιάζονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα.

Ποσοστά μεθυλίωσης των υποκινητών 22 γονιδίων										
Γονίδιο	Μεθυλίωση των υποκινητών (%) σε ασθενείς που δεν έφεραν μεταλλάξεις σε γονίδια προδιάθεσης					Μεθυλίωση των υποκινητών (%) σε ασθενείς που έφεραν μεταλλάξεις στο <i>BRCA1</i>				
	2448	2506	1925	2543	Μέσος όρος	2754	2751	2945	2960	Μέσος όρος
<i>ADAM23</i>	11.68	5.38	12.37	32.82	15.56	52.26	11.42	6.26	41.49	27.85
<i>BRCA1</i>	20.60	9.38	13.52	27.66	17.79	17.28	8.45	8.09	27.35	15.29
<i>CCNA1</i>	32.33	13.43	20.35	32.28	24.6	27.78	18.74	21.32	87.07	38.72
<i>CCND2</i>	15.94	10.40	19.97	42.69	22.25	25.51	12.54	12.66	10.74	15.36
<i>CDH1</i>	50	17.61	18.88	33.87	30.09	61.34	21.70	10.51	13.79	26.83
<i>CDH13</i>	50	30.74	13.13	30.40	31.06	50.40	20.60	13.07	99.95	46
<i>CDKN1C</i>	8.51	3.54	15.16	39.69	16.72	19.74	10.90	10.54	52.75	23.48
<i>CDKN2A</i>	33.24	0.94	10.65	27.95	18.19	18.46	6.47	6.88	3.76	8.89
<i>ESR1</i>	40.42	5.72	19.08	49.88	28.77	32.02	19.29	12.13	11.37	18.7
<i>GSTP1</i>	50	50	11.33	33.06	36.09	49.61	16.62	F	99.93	55.38
<i>HIC1</i>	50	42.05	27.03	46.44	41.38	38.88	26.18	27.14	14.62	26.705
<i>MGMT</i>	50	31.33	19.56	25.52	31.6	8.52	16.80	18.54	F	32.44
<i>PRDM2</i>	10.34	7.84	11.88	33.99	16.01	18.56	8.70	6.48	71.01	26.18
<i>PTEN</i>	27.93	9.46	9.74	28.50	18.9	21.73	9.10	9.25	6.43	11.62
<i>PTGS2</i>	40.64	6.53	8.40	22.41	19.49	17.50	8.80	6.32	8.68	10.325
<i>PYCARD</i>	49.68	63.38	13.25	26.29	38.15	22.66	24.32	12.46	6.19	16.4
<i>RASSF1</i>	27.48	67.30	16.93	38.71	37.6	20.03	13.28	12.15	6.39	12.96
<i>SFN</i>	50	98.67	98.27	97.76	86.17	74.02	98.52	98.56	95.20	91.575
<i>SLIT2</i>	14.68	11.45	13.45	28.45	17	17.01	9.28	8.64	9.67	11.15
<i>THBS1</i>	50	8.54	28.51	39.92	31.74	47.51	27.74	26.81	27.87	32.48
<i>TNFRSF10C</i>	F	7.21	23.38	50	26.86	55.15	22.66	23.79	9.33	27.73
<i>TP73</i>	F	56.54	7.91	20.24	36.15	27.91	6.93	5.42	6.06	11.58

Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζονται σχηματικά τα αποτελέσματα και οι διαφορές στα επίπεδα μεθυλίωσης που προέκυψαν από την ανάλυση, ανάμεσα στις δύο κατηγορίες ασθενών.



Εικόνα 54. Σχηματική αναπαράσταση του μέσου όρου των ποσοστών μεθυλίωσης στις δύο κατηγορίες ασθενών.

Συζήτηση

1. Γονίδια προδιάθεσης που συμμετέχουν στον ομόλογο ανασυνδυασμό - Κληρονομικός καρκίνος μαστού/ωθηκών

Τα περιστατικά του καρκίνου του μαστού μπορούν να διαχωριστούν ανάλογα με την ύπαρξη ή όχι οικογενειακού ιστορικού σε σποραδικά, τα οποία συνήθως αποτελούν μοναδικές περιπτώσεις μεταξύ των μελών μιας οικογένειας, σε οικογενή, όπου υπάρχουν πολλαπλά περιστατικά κακοήθειας μαστού στην οικογένεια, αλλά δεν έχει προσδιοριστεί το υπεύθυνο γονίδιο, και σε κληρονομικά, όπου έχει ανιχνευθεί παθογόνος μεταλλαγή σε κάποιο γονίδιο προδιάθεσης καρκίνου. Το 10-30% των περιπτώσεων του καρκίνου του μαστού έχει κληρονομικό χαρακτήρα, όπου περίπου το 5%-10% οφείλεται σε μεταλλαγές των γονιδίων *BRCA1* και *BRCA2* [25].

Αρχικά λοιπόν, αναλύθηκαν τα γονίδια *BRCA*. Η ανάλυση των γονιδίων *BRCA1* και *BRCA2* πραγματοποιήθηκε σε 172 ασθενείς με αλληλούχηση κατά Sanger, οι οποίες είχαν επιλεγεί σύμφωνα με τις διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες NCCN. Συνολικά ανευρέθηκαν 30 ασθενείς που έφεραν μεταλλαγές και στα δύο γονίδια (17,4%), συγκεκριμένα ανιχνεύθηκαν 21 ασθενείς με μεταλλαγές στο *BRCA1* και 9 στο *BRCA2*. Το γεγονός ότι ο αριθμός των ασθενών που έφεραν μεταλλαγές στο γονίδιο *BRCA1* ήταν σχεδόν διπλάσιος σε σχέση με τον αριθμό των παραλλαγών που ανιχνεύθηκαν στο *BRCA2* πιθανόν να οφείλεται στις 5 ιδρυτικές μεταλλαγές που έχουν αναγνωριστεί στο *BRCA1*, αυξάνοντας σημαντικά τη συχνότητα ανεύρεσης παραλλαγών στο συγκεκριμένο γονίδιο στον Ελληνικό πληθυσμό [54, 56-58].

Το ποσοστό ανίχνευσης μεταλλαγών στο *BRCA1* ανέρχεται στο 12.2% (21/172). Το 52.4% των μεταλλαγών εντοπίζονται στο εξόνιο 20, σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία, εφόσον εκεί εντοπίζονται οι μεταλλαγές c.5266dupC και c.5212G>A, οι οποίες είναι ιδρυτικές για τον Ελληνικό πληθυσμό και άρα απαντώνται συχνά. Η πιο συχνά ανευρισκόμενη μεταλλαγή είναι η c.5266dupC (7/21), όπως και στην παρούσα μελέτη, ενώ c.5212G>A είναι η δεύτερη σε συχνότητα εμφάνισης μεταλλαγή στον Ελληνικό πληθυσμό [55]. Επίσης, η c.5266dupC ανευρίσκεται αρκετά συχνά σε διάφορους πληθυσμούς κυρίως της Ανατολικής Ευρώπης [92]. Η μεταλλαγή c.3607C>T που ανευρέθηκε σε τρεις ασθενείς έχει ανιχνευθεί σε αρκετές Ελληνικές οικογένειες. Οι υπόλοιπες μεταλλαγές του γονιδίου *BRCA1* εντοπίζονται σε διάφορα εξόνια καταδεικνύοντας την ιδιαιτερότητα του Ελληνικού πληθυσμού, ο οποίος επηρεάζεται από ισχυρά ιδρυτικά φαινόμενα και ταυτόχρονα παρουσιάζει και γενετική ποικιλομορφία.

Η πλειονότητα των ασθενών (19/21) με μεταλλαγή στο γονίδιο *BRCA1* είχαν διαγνωσθεί σε ηλικία μικρότερη από τα 45 έτη, κάτι που ήταν αναμενόμενο εφόσον το συγκεκριμένο γονίδιο έχει συσχετισθεί με νεαρή ηλικία διάγνωσης. Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι η μέση ηλικία πρώτης διάγνωσης με καρκίνο σε ασθενείς που φέρουν μεταλλαγές στο *BRCA1* υπολογίζεται στα 40 έτη [93], ενώ προηγούμενες μελέτες που αφορούν τον Ελληνικό πληθυσμό έδειξαν ότι η μέση ηλικία διάγνωσης υπολογίζεται στα 42.5 έτη [94].

Επίσης, οι 18/21 ασθενείς (85,7%) για τις οποίες υπήρχαν διαθέσιμες πληροφορίες για το οικογενειακό ιστορικό, ανέφεραν όλες αν όχι πολλαπλά περιστατικά καρκίνων, τουλάχιστον άλλο ένα περιστατικό καρκίνου μαστού, ωθηκών ή/και παγκρέατος στην οικογένεια. Αυτά τα αποτελέσματα συνάδουν με τα μέχρι τώρα γνωστά δεδομένα, όπου οι οικογένειες στις οποίες έχει ανευρεθεί μεταλλαγή στο γονίδιο *BRCA1* χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη διαφόρων περιστατικών καρκίνου, συνήθως μαστού και ωθηκών, σε διαδοχικές γενεές [94].

Τέλος, το 47,6% των γυναικών που έφεραν μεταλλαγή στο *BRCA1* είχαν διαγνωσθεί με τριπλά αρνητικό καρκίνο (TNBC). Ο τριπλά αρνητικός καρκίνος χαρακτηρίζεται από την έλλειψη έκφρασης των υποδοχέων οιστρογόνων (ER) και προγεστερόνης (PR), καθώς και από την απουσία ενίσχυσης του γονιδίου του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα τύπου 2 (HER-2). Η συσχέτιση του *BRCA1* με το τριπλά αρνητικό καρκίνο είναι γνωστή, καθώς το 60-80% των ασθενών με μεταλλαγές στο *BRCA1* θα αναπτύξει TNBC όγκους [95], ενώ σε άλλη μεγάλου εύρους μελέτη αναδείχθηκε ότι το 8,5% των TNBC ασθενών φέρει μεταλλαγή στο *BRCA1* [61], δεδομένα που συνάδουν με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης.

Μεταλλαγές στο γονίδιο *BRCA2* ανευρέθηκαν στο 5,2% (9/172) των ασθενών που αναλύθηκαν για τα *BRCA* γονίδια. Η μέση ηλικία διάγνωσης των ασθενών ήταν τα 41.8 έτη όπως αναμενόταν, εφόσον η μέση ηλικία διάγνωσης των ασθενών που φέρουν μεταλλαγή στο *BRCA2* έχει υπολογιστεί στα 43 έτη [93]. Οι περισσότερες μεταλλαγές (55,5%) εντοπίστηκαν στο εξόνιο 11, που είναι και το μεγαλύτερο εξόνιο του γονιδίου. Η ανεύρεση μεταλλαγών στο συγκεκριμένο εξόνιο πιθανόν να σχετίζεται με διάγνωση καρκίνου του μαστού σε νεαρή ηλικία, γεγονός που δε συμφωνεί απόλυτα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, όπου μόνο 2/5 ασθενείς με μεταλλαγή στο εξόνιο 11 είχαν διαγνωσθεί σε ηλικία μικρότερη από τα 40 έτη [96].

Συγκεκριμένα, στην ασθενή 2354 ανευρέθηκε η πλαισιοτροποποιητική μεταλλαγή c.9016_9017del. Η ασθενής αναφοράς είχε διαγνωσθεί με κακοήθεια του μαστού σε ηλικία

41 ετών, ενώ στην οικογένεια δεν αναφερόταν κανένα άλλο περιστατικό καρκίνου μαστού ή ωθηκών. Η νεαρή ηλικία διάγνωσης ήταν το μόνο στοιχείο που καταδείκνυε την πιθανότητα να υπάρχει κάποιος κληρονομικός επιβαρυντικός παράγοντας. Μετά την ανίχνευση της μεταλλαγής ακολούθησε στοχευμένη ανάλυση για τη συγκεκριμένη μεταλλαγή των γονέων της, ώστε να αποσαφηνιστεί αν η μεταλλαγή προέρχεται από την πατρική ή τη μητρική πλευρά. Η ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στους γονείς και στα αδέρφια της ασθενούς προέκυψε ότι κανένας συγγενής δεν έφερε τη μεταλλαγή. Αυτό μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για *de novo* μεταλλαγή, χωρίς όμως να μπορεί να αποκλειστεί και η πιθανότητα ένας από τους γονείς να μην είναι βιολογικός γονέας.

Οι ασθενείς που φέρουν μεταλλαγές στο γονίδιο *BRCA2* είναι πιο πιθανό να αναπτύξουν όγκους που εκφράζουν τους υποδοχείς οιστρογόνων [97], ενώ υπάρχει μικρότερη συσχέτιση του εν λόγω γονιδίου με τριπλά αρνητικές διαγνώσεις. Ο Couch και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι μόλις το 2,7% των ασθενών με TNBC όγκους φέρει μεταλλαγές στο *BRCA2* [61]. Τα δεδομένα αυτά επιβεβαιώνονται και στην παρούσα μελέτη, όπου 77,8% των ασθενών που έφεραν μεταλλαγές στο συγκεκριμένο γονίδιο είχαν διαγνωσθεί με ορμονοεξαρτώμενους όγκους και μόλις 2 ασθενείς είχαν τριπλά αρνητική διάγνωση.

Η παρουσία βεβαρημένου οικογενειακού ιστορικού είναι άλλο ένα χαρακτηριστικό των οικογενειών στις οποίες ανιχνεύεται μεταλλαγή στο γονίδιο *BRCA2*, γεγονός που επιβεβαιώθηκε και από τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, όπου όλες οι ασθενείς ανέφεραν και άλλα περιστατικά καρκίνου μαστού ή/και ωθηκών στην οικογένεια. Επίσης, πρόσφατα μία μελέτη έδειξε ότι η ύπαρξη και άλλων περιστατικών καρκίνου του μαστού σε μέλη της οικογένειας, αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού σε άτομα που φέρουν μεταλλαγές στο *BRCA2*, αλλά και σε άτομα που φέρουν μεταλλαγές και στο *BRCA1* [97].

Οι μεταλλαγές που απαντώνται πιο συχνά στις ασθενείς που έχουν διαγνωσθεί με κακοήθεια του μαστού είναι οι αντικαταστάσεις βάσεων ή οι μικρές απαλοιφές/ενθέσεις μερικών βάσεων των γονιδίων *BRCA*. Τέτοιες σημειακές μεταλλαγές εντοπίζονται σε όλη την κωδική περιοχή και των δύο γονιδίων [40]. Οι μεγάλες γονιδιακές αναδιατάξεις των γονιδίων *BRCA* αποτελούν ένα σημαντικό ποσοστό των παθογόνων παραλλαγών που ανιχνεύονται σε αυτά τα γονίδια, το οποίο διαφέρει ανάμεσα στους πληθυσμούς. Αυτές οι γενετικές παραλλαγές είναι επιβλαβείς λόγω του ότι η απαλοιφή ή ένθεση μεγάλων γονιδιακών αλληλουχιών έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή πρωτεϊνών με μη

φυσιολογική δομή ή/και λειτουργία. Το μέγεθος των αναδιατάξεων ποικίλλει και μπορεί να κυμαίνεται από μικρότερο από 500bp μέχρι και ολόκληρο το γονίδιο [98].

Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω το πιθανό γενετικό υπόβαθρο των ασθενών, ακολούθησε επιπλέον ανάλυση στις ασθενείς που δεν έφεραν σημειακές μεταλλαγές στα γονίδια *BRCA* για την ανίχνευση μεγάλων γονιδιακών αναδιατάξεων με τη μέθοδο MLPA. Στην ανάλυση αυτή δεν ανευρέθηκε καμία αναδιάταξη στα γονίδια *BRCA*.

Στη προσπάθεια να αποσαφηνιστεί η συμβολή των δομικών αλλαγών στον κληρονομικό καρκίνο του μαστού, η μελέτη επεκτάθηκε σε επιπλέον 443 ασθενείς. Από την ανάλυση αυτή ανευρέθηκαν μία απαλοιφή των εξονίων 1-2 στο γονίδιο *BRCA1* και μία απαλοιφή των εξονίων 12-13 στο *BRCA2*. Τα μέχρι τώρα δεδομένα από τη βιβλιογραφία, δείχνουν ότι η ανίχνευση αναδιατάξεων στο *BRCA1* είναι πιο συχνή από ότι στο *BRCA2* [99]. Το γεγονός αυτό πιθανόν να οφείλεται στη δομή του DNA που περιβάλλει τα δύο γονίδια. Στο *BRCA1* είναι πιθανόν να ανευρίσκονται πιο συχνά γονιδιακές αναδιατάξεις λόγω του ψευδογονιδίου που εντοπίζεται ανοδικά του γονιδίου ή λόγω του γεγονότος ότι το ποσοστό επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών (επαναλήψεις Alu) είναι υψηλότερο σε αυτό το γονίδιο [59].

Η συχνότητα εμφάνισης LGRs στο γονίδιο *BRCA1* ποικίλλει σημαντικά ανάμεσα στους πληθυσμούς, με το μεγαλύτερο ποσοστό να εμφανίζεται στην Βόρεια Ιταλία (23%) [100]. Σε άλλους πληθυσμούς τα ποσοστά αυτά είναι μικρότερα, αναφορικά στη Δανία το ποσοστό των αναδιατάξεων του *BRCA1* είναι 1,3% [101], στη Τσεχία 6% [102], στην Πολωνία 4,7% [103], ενώ μία μεγάλη μελέτη σε ~2000 Γερμανίδες ασθενείς κατέδειξε ότι το ποσοστό αυτό είναι 2,1% [104]. Σε αντίθεση με αυτά τα αποτελέσματα, στην παρούσα μελέτη ανιχνεύθηκε μόνο μία ασθενής που έφερε την απαλοιφή των εξονίων 1-2. Το χαμηλό ποσοστό ανίχνευσης γονιδιακών αναδιατάξεων στη συγκεκριμένη ομάδα μελέτης πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι στον Ελληνικό πληθυσμό έχουν ανευρεθεί τρεις ιδρυτικές απαλοιφές των εξονίων 20, 23-24 και 24, για τις οποίες ελέγχονται με διαγνωστικό PCR όλες οι Ελληνίδες ασθενείς προτού προχωρήσουν σε πλήρη ανάλυση των γονιδίων *BRCA*, οπότε το ποσοστό των ασθενών που φέρουν αυτές τις ιδρυτικές αναδιατάξεις έχει εξαιρεθεί από την παρούσα ανάλυση. Συνεπώς, αυτό το γεγονός εξηγεί το χαμηλό ποσοστό ανεύρεσης αναδιατάξεων στη συγκεκριμένη ομάδα μελέτης, ενώ ταυτόχρονα υποδηλώνει ότι το ποσοστό ανεύρεσης γονιδιακών αναδιατάξεων είναι σαφώς υψηλότερο για τον Ελληνικό πληθυσμό.

Όσον αφορά το έλλειμμα των εξονίων 1-2 που ανιχνεύθηκε στην ασθενή αναφοράς, είναι η πιο συχνή απαλοιφή που ανευρίσκεται στο συγκεκριμένο γονίδιο και έχει ανιχνευθεί σε ασθενείς από διάφορες χώρες, όπως Τσεχία, Γερμανία, Ιταλία, Πολωνία, ΗΠΑ, Ισπανία και Ιρλανδία [40, 59, 99]. Το έλλειμμα αυτό πιθανά να οφείλεται στην παρουσία του ψευδογονιδίου το οποίο παρουσιάζει μεγάλη συμπληρωματικότητα με τα δύο πρώτα εξόνια του *BRCA1*, καθιστώντας το επιρρεπές σε φαινόμενα μη φυσιολογικού ανασυνδυασμού, παρόμοια με αυτά που παρατηρούνται σε περιοχές με επαναλήψεις *Alu*. Η απαλοιφή του πρώτου εξονίου είναι πιθανόν να επηρεάζει τη συνολική έκφραση του γονιδίου [59].

Στους Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς το ποσοστό ανεύρεσης γονιδιακών αναδιατάξεων στο *BRCA2* είναι σαφώς μικρότερο σε σχέση με αυτό που ανευρίσκεται στο *BRCA1*. Το μεγαλύτερο ποσοστό ανεύρεσης αναδιατάξεων στο *BRCA2* έχει αναφερθεί στους Πορτογάλους, όπου ο Machado και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η ιδρυτική αναδιάταξη c.156_157ins*Alu* ανιχνεύθηκε στο 8% των οικογενειών που μελετήθηκαν [105]. Επιπλέον, σε κάποιες μελέτες έχει επισημανθεί πιθανή συσχέτιση των αναδιατάξεων του *BRCA2* με την εμφάνιση ανδρικού καρκίνου του μαστού [106, 107], δεδομένα όμως που δε φαίνεται να ισχύουν στον Ελληνικό πληθυσμό [108].

Στην παρούσα διατριβή ελέγχθηκε η παρουσία μεγάλων γονιδιακών αναδιατάξεων σε Ελληνίδες ασθενείς με καρκίνο του μαστού, όπου και ανευρέθηκε σε μία ασθενή το έλλειμμα των εξονίων 12-13 του γονιδίου *BRCA2*. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με τα δεδομένα από τη βιβλιογραφία, όπου η ανεύρεση δομικών αλλαγών στο *BRCA2* είναι σχετικά σπάνια. Η συγκεκριμένη απαλοιφή έχει ανιχνευθεί σε άλλες 7 οικογένειες Ελληνικής καταγωγής, όπως προκύπτει από τη βάση δεδομένων που διατηρείται από το Εργαστήριο Μοριακής Διαγνωστικής. Επίσης, έχει αναφερθεί και σε άλλους πληθυσμούς, όπως στη Ισπανία [98], στην Ιρλανδία [99], στη Γαλλία [109] και στο Ισραήλ [110]. Η απαλοιφή εξονίων που εντοπίζονται εσωτερικά του γονιδίου οδηγεί στη δημιουργία πρόωρου κωδικονίου τερματισμού με αποτέλεσμα τη σύνθεση μη λειτουργικής πρωτεΐνης μικρότερου μεγέθους ή μπορεί να αφορούν απαλοιφές που δε διαταράσσουν το πλαίσιο ανάγνωσης (in frame), αλλά επηρεάζουν σημαντικές δομικές περιοχές της πρωτεΐνης [59].

Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό, ότι σε γυναίκες με καρκίνο του μαστού σε πολύ νεαρή ηλικία, δηλαδή κάτω από τα 35 έτη, η ανεύρεση μεταλλαγών στο *TP53* είναι πιο συχνή από ότι στα γονίδια *BRCA*, ειδικά όταν συνδυάζεται και με υπερέκφραση του γονιδίου του

υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα τύπου 2 (HER-2) [111]. Συγκεκριμένα, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι 5-7% των ασθενών που έχουν διαγνωσθεί με καρκίνο του μαστού σε ηλικία 20-30 έτων φέρουν μεταλλάξεις στο *TP53*, με τα αποτελέσματα αυτά να επιβεβαιώνονται και για τις Ελληνίδες ασθενείς [79]. Η ασθενής 1686 υποβλήθηκε σε πλήρη αλληλούχηση και ανάλυση γονιδιακών αναδιατάξεων στο συγκεκριμένο γονίδιο λόγω της πολύ νεαρής ηλικίας διάγνωσης με καρκίνο του μαστού (29 ετών), καθώς και του οικογενειακού της ιστορικού (μητέρα με καρκίνο εγκεφάλου και αδελφός με καρκίνο του νεφρού και οστεοσάρκωμα), ευρήματα που είναι ενδεικτικά για το σύνδρομο Li Fraumeni. Η ανάλυση έδειξε ότι η ασθενής έφερε την απαλοιφή του υποκινητή και του εξονίου 1 του γονιδίου *TP53*.

Η απαλοιφή του υποκινητή και του εξονίου 1 του *TP53* είχε αναφερθεί προηγουμένως σε δύο οικογένειες από τη Γαλλία και εκτεινόταν μέχρι το εσόνιο 3 του γονιδίου *FLJ10385*. Όλες οι οικογένειες που έφεραν γονιδιακές αναδιατάξεις στο *TP53* παρουσίαζαν το χαρακτηριστικό φαινότυπο του συνδρόμου. Επίσης, η ίδια μελέτη ανέδειξε ότι οι γονιδιακές αναδιατάξεις αποτελούν το 5% των γενετικών παραλλαγών που ανιχνεύονται σε αυτό το γονίδιο [112]. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με τα δεδομένα της οικογένειας 1686, Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με τα δεδομένα της οικογένειας 1686, που εμφάνιζε τον χαρακτηριστικό φαινότυπο του συνδρόμου Li Fraumeni. Αυτό μπορεί να εξηγείται από το γεγονός ότι παρόλο που στον άνθρωπο το εξόνιο 1 του γονιδίου *TP53* δεν εκφράζεται, θεωρείται ότι έχει λειτουργικό ρόλο. Η μεταγραφή του γονιδίου ξεκινάει από διάφορες θέσεις, οι οποίες εντοπίζονται στο πρώτο μισό τμήμα αυτού του εξονίου. Επομένως, η απαλοιφή του πιθανόν να οδηγεί στην αποσιώπηση του γονιδίου *TP53* και άρα να ευθύνεται για την εμφάνιση του συνδρόμου Li-Fraumeni.

Τα τελευταία δεδομένα από τη διεθνή βιβλιογραφία, κυρίως μέσω αναλύσεων αλληλούχησης νέας γενεάς, έχουν αναδείξει την συμβολή και άλλων γονιδίων, πέρα από τα BRCA, στον κληρονομικό καρκίνο του μαστού. Σε συνέχεια της παρούσας διατριβής πραγματοποιήθηκε αντίστοιχη ανάλυση με τη μέθοδο NGS σε ασθενείς με βεβαρημένο οικογενειακό ιστορικό για την αποσαφήνιση του πιθανού κληρονομικού υπόβαθρου αυτών των οικογενειών και την ανάδειξη νέων γονιδίων προδιάθεσης στον Ελληνικό πληθυσμό.

Συνολικά αναλύθηκαν 108 ασθενείς με καρκίνο του μαστού με ηλικία διάγνωσης κάτω από τα 65 έτη και τουλάχιστον άλλα τρία περιστατικά καρκίνου μαστού, ωθηκών ή/και παγκρέατος, οι οποίες ήταν αρνητικές για μεταλλάξεις στα γονίδια BRCA. Η ανάλυση

πραγματοποιήθηκε με το γονιδιακό πάνελ «TruSight Cancer Panel» και ανευρέθηκαν 17 ασθενείς (15.7%) που έφεραν μεταλλάξεις σε άλλα γονίδια προδιάθεσης. Το ποσοστό αυτό ήταν σημαντικά υψηλότερο από αυτό που έχει αναφερθεί σε αντίστοιχες μελέτες, όπου το ποσοστό ανεύρεσης επιβλαβών παραλλαγών σε γονίδια προδιάθεσης εκτός από τα BRCA κυμαίνεται από 3,8% μέχρι 6,2% [64, 113, 114]. Αυτό είναι πιθανό να οφείλεται στα πολύ αυστηρά κριτήρια που τέθηκαν στην παρούσα διατριβή και οι ασθενείς είχαν εξαιρετικά βεβαρημένο οικογενειακό ιστορικό με αποτέλεσμα το ποσοστό ανεύρεσης μεταλλαγών να είναι αυξημένο και να μην αντιπροσωπεύει το αντικειμενικό ποσοστό ανίχνευσης μεταλλαγών σε μη επιλεγμένους ασθενείς με καρκίνο μαστού/ωοθηκών. Σε μελέτη που έχει διεξαχθεί από το Εργαστήριο Μοριακής Διαγνωστικής σε ~1300 Ελληνίδες ασθενείς το ποσοστό των μεταλλαγών που ανευρέθηκε σε άλλα γονίδια προδιάθεσης καθορίστηκε στο 6,7%, ποσοστό αντίστοιχο με τις προαναφερθείσες μελέτες [90]. Η μέση ηλικία διάγνωσης των ασθενών ήταν τα 45,3 έτη, ενώ κυμαινόταν από τα 35 έτη μέχρι και τα 59 έτη, όπως αναμενόταν εφόσον, σε αντίθεση με τα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2*, δε φαίνεται να συσχετίζεται η παρουσία μεταλλαγών σε άλλα γονίδια προδιάθεσης με τη νεαρή ηλικία διάγνωσης [70].

Το 3,7% των ασθενών (4/108) έφερε κάποια παραλλαγή αγνώστου κλινικής σημασίας (VUS), ποσοστό αρκετά μικρότερο από αυτό που έχει αναφερθεί σε άλλες μελέτες οι οποίες πραγματοποιήθηκαν με NGS. Αυτό πιθανά να συνέβη λόγω του υψηλού ποσοστού μεταλλαγών που ήδη αναφέρθηκαν παραπάνω. Σε αυτές τις μελέτες το αναμενόμενο είναι περίπου το ένα τρίτο των ασθενών να φέρει κάποιο VUS. Τα ευρήματα αυτά θα επαναξιολογηθούν και τα περισσότερα από αυτά θα χαρακτηρισθούν ως μη επιβλαβή, ένα μικρό ποσοστό όμως θα αφορά επιβλαβείς παραλλαγές. Γι' αυτό είναι σημαντικό να μη λαμβάνονται κλινικές αποφάσεις βασιζόμενες στην ανεύρεση VUS μέχρι να διευκρινιστεί η κλινική τους σημασία [115].

Οι περισσότερες μεταλλαγές ανιχνεύθηκαν στα γονίδια *CHEK2* (4/17, 3,7%) και *PALB2* (5/17, 4,6%). Τα αποτελέσματα αυτά συνάδουν με τα μέχρι τώρα δεδομένα, σύμφωνα με τα οποία σε αυτά τα δύο γονίδια ανευρίσκονται μεταλλαγές με μεγαλύτερη συχνότητα. Μελέτες σε μεγάλο αριθμό ασθενών έδειξαν ότι η συχνότητα εμφάνισης παραλλαγών στο *CHEK2* είναι 1,7-2,5% και στο *PALB2* 0,8-1,2% [64, 65], παρόμοια με τα ποσοστά που ανευρέθηκαν στην παρούσα διατριβή. Πρόσφατα αυτά τα δύο γονίδια συσχετίστηκαν με την εμφάνιση αμφοτερόπλευρης διάγνωσης, κάτι που επιβεβαιώθηκε και στην παρούσα διατριβή κατά την οποία δύο ασθενείς με μεταλλαγή στο *PALB2* και μία ασθενής με μεταλλαγή στο *CHEK2* διαγνώστηκαν με μεταγενέστερη κακοήθεια [115]. Σε σχέση με την

ασθενή που έφερε μεταλλαγή στο *CHEK2* δεν είναι ξεκάθαρο αν η δεύτερη διάγνωση αφορούσε δεύτερο πρωτοπαθή όγκο ή υποτροπή.

Σε ότι αφορά τις ασθενείς με μεταλλαγές στο γονίδιο *CHEK2*, όλες διαγνώστηκαν με όγκους στους οποίους εκφράζονταν οι υποδοχείς οιστρογόνων, όπως αναμενόταν εφόσον σύμφωνα με τις μέχρι τώρα μελέτες η ανεύρεση μεταλλαγών στο συγκεκριμένο γονίδιο έχει συσχετισθεί κυρίως με ορμονοεξαρτώμενους όγκους. Επίσης, πρόσφατες μελέτες έχουν κατατάξει το *CHEK2* ως γονίδιο μέτριας διεισδυτικότητας με σχετικό κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού ~2.5 [65, 115], ενώ σε άλλη μελέτη έχει χαρακτηριστεί ως γονίδιο χαμηλής διεισδυτικότητας [64]. Στην ασθενή 2624 ανιχνεύθηκε η παρανοηματική παραλλαγή c.1312G>T, η οποία χαρακτηρίζεται ως εύρημα αγνώστου κλινικής σημασίας στις βάσεις δεδομένων, με τα μέχρι τώρα αποτελέσματα σχετικά με την παθογένειά της να είναι αντικρουόμενα.

Στο γονίδιο *PALB2* ανευρέθηκαν πέντε παραλλαγές εκ των οποίων οι 4 ήταν σαφώς παθογόνοι, με την c.3255ins, p.(Arg1986fs) να είναι καινοφανής, και ένα εύρημα αγνώστου κλινικής σημασίας. Το γονίδιο *PALB2* αν και σχετικά πρόσφατα συσχετίστηκε με προδιάθεση στον καρκίνο του μαστού έχει αναδειχθεί σε ένα πολύ σημαντικό γονίδιο και πλέον θεωρείται γονίδιο υψηλής διεισδυτικότητας με σχετικό κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού που κυμαίνεται από 5,5 μέχρι 9,5 [64, 65, 116, 117].

Μέχρι τώρα διάφορες μελέτες υποστήριζαν τη συσχέτιση της παρουσίας μεταλλαγών στο *PALB2* με θετική έκφραση των υποδοχέων οιστρογόνων. Συγκεκριμένα ο Antonίου και οι συνεργάτες του ανέφεραν ότι το 74% των όγκων *PALB2* είχαν θετική έκφραση των υποδοχέων οιστρογόνων και ένα μικρότερο ποσοστό παρουσίαζε τριπλά αρνητικό φαινότυπο [63]. Αντίστοιχα αποτελέσματα αναφέρθηκαν και σε μία πιο πρόσφατη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε περισσότερες από 1000 ασθενείς όπου παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση της παρουσίας μεταλλαγών του *PALB2* με ορμονοεξαρτώμενη διάγνωση [118]. Αντίθετα, κάποιες πρόσφατες μελέτες ανέφεραν ότι η παρουσία παραλλαγών του *PALB2* σχετίζεται με υψηλό ποσοστό διάγνωσης τριπλά αρνητικών όγκων [117, 119].

Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και στην παρούσα μελέτη, όπου τρεις ασθενείς διαγνώστηκαν με ορμονοεξαρτώμενους όγκους και δύο με τριπλά αρνητικούς. Επομένως, μπορεί να θεωρηθεί ότι δεν υπάρχει σαφής συσχέτιση των μεταλλαγών του *PALB2* με κάποιο συγκεκριμένο ιστολογικό υπότυπο του καρκίνου του μαστού ή η εμφάνιση κάποιου υπότυπου μπορεί να εξαρτάται από τον τύπο της μεταλλαγής [120].

Η παρανοηματική παραλλαγή c.1939C>T που ανιχνεύθηκε στην ασθενή 3261 στο *PALB2* έχει αναφερθεί στις βάσεις δεδομένων και κατατάσσεται στην κατηγορία των ευρημάτων αδιευκρίνιστης κλινικής σημασίας. Παρόλο που τα εργαλεία βιοπληροφορικής δεν τη χαρακτηρίζουν ως επιβλαβή είναι πιθανό να επηρεάζει το μάτισμα και έτσι να εξηγείται και η νεαρή ηλικία διάγνωσης της ασθενούς (39 ετών) και το βεβαρημένο ιστορικό της. Ωστόσο, κρίνεται απαραίτητη η περαιτέρω διερεύνηση της συγκεκριμένης παραλλαγής με λειτουργικές δοκιμασίες (functional assays) και σε περισσότερες ασθενείς ώστε να αποσαφηνιστεί η κλινική της σημασία.

Επίσης, ανευρέθηκαν δύο μεταλλαγές στο γονίδιο *ATM* (1,8%), μία σαφώς παθογόνος και ένα εύρημα αγνώστου κλινικής σημασίας. Το *ATM* έχει χαρακτηριστεί ως γονίδιο ενδιάμεσης διεισδυτικότητας [115] και είναι ένα από τα γονίδια προδιάθεσης στο οποίο ανευρίσκονται σχετικά συχνά μεταλλαγές. Η συχνότητα εμφάνισης παραλλαγών στο συγκεκριμένο γονίδιο κυμαίνεται από 0,94% μέχρι 1,5%, ποσοστά αντίστοιχα με αυτά που βρέθηκαν στην παρούσα διατριβή [64, 65, 70]. Και οι δύο ασθενείς είχαν διαγνωσθεί με όγκους με θετική έκφραση των οιστρογονικών υποδοχέων, όπως αναμενόταν, αφού το συγκεκριμένο γονίδιο έχει συσχετισθεί με διαγνώσεις κατά τις οποίες εκφράζονται οι συγκεκριμένοι υποδοχείς [65, 115]. Επιπλέον, η μία ασθενής παρουσίασε αμφοτερόπλευρη διάγνωση, χωρίς όμως να έχει αναφερθεί συσχέτιση του συγκεκριμένου γονιδίου με δεύτερες πρωτοπαθείς διαγνώσεις. Η παραλλαγή c.7475T>G που ανιχνεύθηκε στην ασθενή 1865 έχει τουλάχιστον άλλες δέκα αναφορές στις βάσεις δεδομένων, ενώ έχει ανευρεθεί και σε αρκετές Ελληνίδες ασθενείς, χωρίς όμως να έχει διευκρινιστεί η κλινική της σημασία.

Η ανάλυση με γονιδιακό πάνελ ανέδειξε την ύπαρξη της c.706-2A>G του γονιδίου *RAD51C* σε δύο ασθενείς. Το *RAD51C* έχει συσχετιστεί με προδιάθεση σε καρκίνο των ωθηκών. Η συχνότητα εμφάνισης μεταλλαγών του συγκεκριμένου γονιδίου σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού είναι μικρή. Σε κάποιες μελέτες το ποσοστό εμφάνισης είναι αρκετά μικρό (0,09%) [64], ενώ σε κάποιες άλλες είναι λίγο μεγαλύτερο (0,16% και 0,2%) [65, 115], με αποτέλεσμα να μην αναδεικνύεται σαφής συσχέτιση του γονιδίου με προδιάθεση σε καρκίνο του μαστού. Στην παρούσα μελέτη το ποσοστό ανεύρεσης παραλλαγών του *RAD51C* ήταν σχετικά υψηλότερο (1,8%) σε σχέση με τις άλλες μελέτες. Αυτό μπορεί να οφείλεται στα πολύ αυστηρά κριτήρια επιλογής της ομάδας μελέτης, καθώς και στο ότι ο αριθμός των ασθενών που αναλύθηκαν ήταν σημαντικά μικρότερος σε σχέση με τις άλλες μελέτες, οπότε μπορεί στην παρούσα μελέτη να υπερεκτιμήθηκε η συνεισφορά του συγκεκριμένου γονιδίου στον κληρονομικό καρκίνο του μαστού. Αξίζει να σημειωθεί ότι συγκεκριμένες μεταλλαγές του γονιδίου μπορεί να επηρεάζουν τον κίνδυνο ανάπτυξης

καρκίνου του μαστού, κάτι που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης [64]. Αυτό μπορεί να ισχύει στην παρούσα μελέτη όπου και οι δύο ασθενείς ανέφεραν και άλλα περιστατικά κακοήθειας μαστού στην οικογένεια, ενώ η μία διαγνώσθηκε ταυτόχρονα και στον άλλο μαστό με κακοήθεια.

Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα από τις προηγούμενες μελέτες, η Shimelis και οι συνεργάτες της σε μία μελέτη που έκαναν σε ~8500 ασθενείς με τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού, έδειξαν ότι το *RAD51C* είναι γονίδιο ενδιάμεσης διεισδυτικότητας προδιάθεσης στον τριπλά αρνητικό καρκίνο [119]. Τα αποτελέσματα αυτά δεν επιβεβαιώθηκαν στην παρούσα διατριβή, αφού και οι δύο ασθενείς είχαν διαγνωσθεί με ορμονοεξαρτώμενους όγκους. Η συγκεκριμένη μεταλλαγή έχει ανευρεθεί σε άλλες 7 ασθενείς με καρκίνο του μαστού που αναλύθηκαν στο Εργαστήριο Μοριακής Διαγνωστικής, εκ των οποίων οι πέντε είχαν τριπλά αρνητική διάγνωση, δεδομένα που συνάδουν με τα αποτελέσματα της μελέτης της Shimelis [119].

Επιπλέον, ανευρέθηκαν δύο ασθενείς που έφεραν παραλλαγές στο γονίδιο *TP53*, το οποίο συσχετίζεται με το σύνδρομο Li Fraumeni. Στην ασθενή 3134 ανιχνεύθηκε η παραλλαγή c.509C>T, η οποία στις βάσεις δεδομένων χαρακτηρίζεται ως εύρημα αγνώστου κλινικής σημασίας. Σύμφωνα με τα εργαλεία βιοπληροφορικής η συγκεκριμένη παραλλαγή χαρακτηρίζεται ως πιθανά επιβλαβής. Η ασθενής διαγνώσθηκε δύο φορές με καρκίνο του μαστού σε ηλικίες 59 και 61 ετών, ενώ η μητέρα της είχε διαγνωσθεί με κακοήθεια του μαστού σε ηλικία 46 ετών και αναφέρεται και ένα περιστατικό καρκίνου του εγκεφάλου στην οικογένεια σε ηλικία 40 ετών. Αν και οι ηλικίες διάγνωσης δεν είναι ενδεικτικές του συνδρόμου Li Fraumeni, που χαρακτηρίζεται από εξαιρετικά νεαρές ηλικίες διάγνωσης (<35 έτη), τα υπόλοιπα στοιχεία του ατομικού και οικογενειακού ιστορικού συνάδουν με το φαινότυπο του συνδρόμου. Επομένως, θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι η συγκεκριμένη παραλλαγή είναι επιβλαβής, χωρίς να έχει την εξαιρετικά υψηλή διεισδυτικότητα που αναμένεται να έχουν οι μεταλλαγές του *TP53*, όπως έχει αναφερθεί και σε άλλη μελέτη του Εργαστηρίου Μοριακής Διαγνωστικής [90].

Στην ασθενή 3139 ανιχνεύθηκε η μεταλλαγή c.743G>A στο γονίδιο *TP53* σε μωσαϊκό με ποσοστό 18%. Η ασθενής διαγνώσθηκε επίσης δύο φορές με κακοήθεια του μαστού, στα 36 και 50 έτη, ενώ στο οικογενειακό της ιστορικό αναφέρονται διάφορες κακοήθειες, οι οποίες όμως δεν είναι ενδεικτικές του συνδρόμου Li Fraumeni. Η μεταλλαγή ανευρέθηκε σε ποσοστό 18%, οπότε δεν μπορεί να καθοριστεί αν πρόκειται για περίπτωση μωσαϊκισμού ή αν αφορά ελεύθερα μόρια DNA προερχόμενα από τον όγκο, οπότε καθίσταται αδύνατος ο

καθορισμός για το αν πρόκειται για κληρονομική μεταλλαγή του *TP53*. Πρόσφατα σε μία μελέτη περιγράφηκε η ύπαρξη ενός φαινομένου κατά το οποίο παράγονται αλληλόμορφα του *TP53* που φέρουν μεταλλαγές, τα οποία δημιουργούνται από μη ομαλή κλωνική αιμοποίηση και μπορούν να ανιχνευθούν στα κύτταρα του αίματος [121]. Αυτό το φαινόμενο θα μπορούσε εναλλακτικά να εξηγεί την περίπτωση της ασθενούς 3139.

Τέλος, ανευρέθηκαν στα γονίδια *ALK* και *FANCM* από μία μεταλλαγή. Το γονίδιο *ALK* πρόκειται για ένα ογκογονίδιο, το οποίο κωδικοποιεί τον υποδοχέα μίας κινάσης τυροσίνης και εδράζεται στο χρωμόσωμα 2. Η πρωτεΐνη *ALK* εκφράζεται κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, συμμετέχοντας στη διαφοροποίηση των νευρώνων. Το συγκεκριμένο γονίδιο έχει χαρακτηριστεί ως γονίδιο προδιάθεσης σε νευροβλάστωμα. Το νευροβλάστωμα είναι εμβρυϊκός όγκος του περιφερικού νευρικού συστήματος και η πιο συχνά ανευρισκόμενη κακοήθεια στα βρέφη. Επίσης, υπερέκφραση της *ALK*, μετά από επίδραση χημικών πρωτεϊνών, έχει αναφερθεί σε διάφορους καρκίνους, όπως είναι τα πλακώδη καρκινώματα και ο μη-μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα [122, 123]. Σαφής συσχέτιση του γονιδίου *ALK* με προδιάθεση στον καρκίνο του μαστού δεν έχει αναφερθεί σε καμία από τις μεγάλες μελέτες με αλληλούχηση νέας γενιάς, που έχουν διεξαχθεί το τελευταίο διάστημα. Συνεπώς, μπορεί να θεωρηθεί ότι το συγκεκριμένο εύρημα ήταν τυχαίο.

Το γονίδιο *FANCM* ανήκει στην οικογένεια των γονιδίων της αναιμίας Fanconi. Οι διαλληλικές μεταλλαγές αυτών των γονιδίων οδηγούν στην εμφάνιση της αναιμίας Fanconi, ενώ οι μονοαλληλικές έχουν συσχετιστεί με προδιάθεση στον καρκίνο του μαστού. Η αναιμία Fanconi είναι μία διαταραχή που κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο και χαρακτηρίζεται από ανεπάρκεια του μυελού των οστών και προδιάθεση στην ανάπτυξη αιματολογικών και συμπαγών όγκων. Το γονίδιο *FANCM*, αν και ανήκει σε αυτή την οικογένεια γονιδίων, πρόσφατα εξαιρέθηκε από τα γονίδια που προκαλούν αναιμία Fanconi, ενώ συσχετίστηκε με προδιάθεση σε κακοήθεια του μαστού [124, 125]. Σε μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε περισσότερες από 2000 ασθενείς με καρκίνο του μαστού κατά την οποία αναλύθηκε πλήρως η κωδική περιοχή του *FANCM*, η συχνότητα εμφάνισης μεταλλαγών καθορίστηκε στο 1,03%. Παράλληλα αποδείχθηκε σαφής συσχέτιση του γονιδίου με προδιάθεση στον καρκίνο του μαστού και κυρίως σε ασθενείς με ηλικία διάγνωσης μικρότερη από τα 51 έτη, ενώ παρατηρήθηκε και συσχέτιση του γονιδίου με τριπλά αρνητικές διαγνώσεις. Έτσι, το *FANCM* αναδείχθηκε σε γονίδιο ενδιάμεσης διεισδυτικότητας [126]. Τα δεδομένα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, όπου μεταλλαγές του *FANCM* ανευρέθηκαν σε ποσοστό 0,9% (1/108), η ασθενής

διαγνώσθηκε σε ηλικία 47 ετών (μικρότερη από τα 51 έτη), αλλά στη συγκεκριμένη ασθενή εκφράζονταν οι υποδοχείς οιστρογόνων. Επίσης, η συγκεκριμένη μεταλλαγή είναι καινοφανής.

Η ανάλυση με γονιδιακό πάνελ σε συνδυασμό με προηγούμενες αναλύσεις NGS του εργαστηρίου ανέδειξε και κάποιες μεταλλαγές γονιδίων που εμφανίζονταν σε σχετικά μεγάλη συχνότητα στον Ελληνικό πληθυσμό. Μία από αυτές είναι και η μεταλλαγή c.2257C>T του γονιδίου *PALB2*. Σε συνέχεια αυτής της παρατήρησης ακολούθησε η διερεύνηση της πιθανότητας του ιδρυτικού φαινομένου της παρούσας επανεμφανιζόμενης μεταλλαγής για τον Ελληνικό πληθυσμό, καθώς και οι πιθανές συσχετίσεις της με υπότυπους του καρκίνου του μαστού και με την παρουσία οικογενειακού ιστορικού. Ιδρυτικά φαινόμενα του γονιδίου *PALB2* έχουν περιγραφεί και σε άλλους πληθυσμούς, τα οποία αναφέρθηκαν αναλυτικά στην εισαγωγή.

Αρχικά, αναλύθηκαν για τη c.2257C>T 2496 ασθενείς με καρκίνο του μαστού και 697 ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών είτε με γονιδιακό πάνελ, είτε με PCR πραγματικού χρόνου και ανευρέθηκαν 6 και 1 ασθενείς να φέρουν την μεταλλαγή, αντίστοιχα. Επομένως, η συχνότητα εμφάνισης της c.2257C>T είναι 0,24% στις ασθενείς με καρκίνο του μαστού και 0,14% στις ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών. Ακολούθησε ανάλυση απλοτύπων σε όλες τις ασθενείς αναφοράς, καθώς και στους συγγενείς που έφεραν τη μεταλλαγή. Συνολικά, αναλύθηκαν 23 άτομα που έφεραν τη c.2257C>T και προέκυψε ότι όλοι έφεραν ένα κοινό απλότυπο μεγέθους 1.2 Mb. Συνεπώς, η c.2257C>T είναι ιδρυτική μεταλλαγή για τον Ελληνικό πληθυσμό, η οποία προήλθε από έναν κοινό πρόγονο πριν από περίπου 1600 χρόνια.

Πρόσφατες μελέτες μεγάλης κλίμακας σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού έδειξαν ότι η συχνότητα ανεύρεσης μεταλλαγών στο *PALB2* κυμαίνεται μεταξύ 0,8-1,2% [64, 65, 70]. Ειδικότερα, σε αντίστοιχες μελέτες στις οποίες περιγράφονται ιδρυτικές μεταλλαγές του γονιδίου, η συχνότητα εμφάνισής τους ήταν υψηλότερη από αυτή που ανευρέθηκε στην παρούσα μελέτη. Συγκεκριμένα στους Γαλλοκαναδούς η c.2323C>T ανιχνεύθηκε στο ~1% [66], ενώ στους Φινλανδούς η c.1592delT ανιχνεύθηκε ~0.5% των ασθενών με καρκίνο του μαστού [67], οι οποίες και στις δύο περιπτώσεις είχαν επιλεγεί ανεξαρτήτως οικογενειακού ιστορικού. Το σχετικά χαμηλότερο ποσοστό ανίχνευσης της ιδρυτικής μεταλλαγής υποδηλώνει ότι στις Ελληνίδες ασθενείς ανευρίσκονται και άλλες μεταλλαγές του *PALB2* πέρα από αυτή.

Η πλειονότητα των ασθενών (9/11) είχαν διαγνωσθεί με καρκίνο του μαστού σε ηλικία μικρότερη από τα 45 έτη, η οποία είναι αρκετά μικρότερη από τη μέση ηλικία εμφάνισης της νόσου, που συνήθως εκδηλώνεται σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Έτσι, προέκυψε ότι η μεταλλαγή c.2257C>T σχετίζεται με νεαρή ηλικία διάγνωσης ($p=0,03$), παρά το γεγονός ότι η μελέτη δεν ήταν εντελώς αμερόληπτη εφόσον σε πολλές ασθενείς υπήρχαν και ηλικιακά κριτήρια. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και σε μία μελέτη μεγάλης κλίμακας, που πραγματοποιήθηκε με αλληλούχηση όλων των κωδικών περιοχών του γονιδιώματος (whole-exome sequencing) κατά την οποία αναφέρθηκε ότι οι μεταλλαγές του *PALB2* συσχετίζονται με διάγνωση καρκίνου του μαστού σε ηλικία μικρότερη από τα 45 έτη [116]. Αυτά τα ευρήματα είναι πολύ σημαντικά για την κλινική διαχείριση των Ελληνίδων ασθενών, καθώς και για τη διαχείριση των μελών των οικογενειών τους.

Επίσης, το οικογενειακό ιστορικό παίζει σημαντικό ρόλο στη διαχείριση των ασθενών με καρκίνο, ειδικά όταν αναφερόμαστε σε ασθενείς που φέρουν μεταλλαγές στο *PALB2*. Σε παλαιότερη μελέτη είχε δειχθεί ότι στα άτομα που φέρουν μεταλλαγές στο εν λόγω γονίδιο σε συνδυασμό με βεβαρημένο οικογενειακό ιστορικό, όταν δηλαδή για παράδειγμα αναφέρονται δύο πρώτου βαθμού συγγενείς που έχουν διαγνωσθεί με καρκίνο του μαστού πριν από τα 50 έτη, ο συσσωρευτικός κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του μαστού αυξάνεται από 33% σε 58% [63]. Στην παρούσα διατριβή, 3/6 ασθενείς στις οποίες ανιχνεύθηκε η c.2257C>T, ανέφεραν τουλάχιστον άλλο ένα περιστατικό καρκίνου του μαστού στην οικογένεια καταδεικνύοντας ότι το οικογενειακό ιστορικό είναι ένας σημαντικός παράγοντας, που πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν όταν αναλύεται το γονίδιο *PALB2*.

Αρκετές μελέτες υποστηρίζουν ότι η πλειονότητα των όγκων των ασθενών που φέρουν μεταλλαγές στο *PALB2* εκφράζουν τους υποδοχείς οιστρογόνων, ενώ κάποιες άλλες υποστηρίζουν σαφή συσχέτιση με τριπλά αρνητικούς όγκους, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως. Στην ανάλυση που έγινε για τη c.2257C>T, οι περισσότερες ασθενείς είχαν διαγνωσθεί με ορμονοεξαρτώμενους όγκους, ενώ υπήρχε μόνο μία ασθενής με τριπλά αρνητική διάγνωση. Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν την υπόθεση ότι η παρουσία μεταλλαγών του *PALB2* πιθανά να μη σχετίζεται με την ανάπτυξη όγκων με συγκεκριμένα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά ή μπορεί η εμφάνιση συγκεκριμένων υποτύπων καρκίνου του μαστού να εξαρτάται από το τύπο της μεταλλαγής [120].

Τα δεδομένα σχετικά με το αν το *PALB2* σχετίζεται με προδιάθεση στον καρκίνο των ωοθηκών παραμένουν αντικρουόμενα. Πρόσφατη μελέτη κατέδειξε στατιστικά σημαντική

συσχέτιση του γονιδίου με προδιάθεση σε καρκίνο των ωοθηκών [75], ενώ σε άλλη μελέτη η συσχέτιση αυτή δεν κατέστη στατιστικώς σημαντική [127]. Στην παρούσα μελέτη κατά την οποία αναλύθηκαν 697 ασθενείς με καρκίνο του μαστού ανευρέθηκε μία ασθενής να φέρει τη συγκεκριμένη μεταλλαγή υποδεικνύοντας μικρή συσχέτιση της υπό μελέτη μεταλλαγής με προδιάθεση σε καρκίνο των ωοθηκών. Αξίζει να επισημανθεί ότι οι συγκεκριμένες ασθενείς αναλύθηκαν μόνο για τη μεταλλαγή c.2257C>T, οπότε δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα οι ασθενείς αυτές να φέρουν άλλες μεταλλαγές του γονιδίου για τις οποίες δεν ελέγχθηκαν και άρα το ποσοστό ανεύρεσης παραλλαγών στο *PALB2* να είναι υψηλότερο.

2. Γονίδια που συμμετέχουν στο μονοπάτι επιδιόρθωσης αταίριαστων βάσεων (Σύνδρομο Lynch)

Ο κληρονομικός καρκίνος έχει συσχετιστεί με την παρουσία μεταλλαγών στα γονίδια που εμπλέκονται στο μονοπάτι επιδιόρθωσης αταίριαστων βάσεων (γονίδια MMR). Η ανίχνευση μεταλλαγών σε αυτά τα γονίδια οδηγεί στην εμφάνιση του συνδρόμου Lynch, το οποίο χαρακτηρίζεται από την αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου των ωοθηκών, αλλά και άλλων κακοηθειών. Τα κύρια γονίδια, οι μεταλλαγές των οποίων ευθύνονται για την εμφάνιση του συνδρόμου, είναι τα *MLH1* και *MSH2* καθώς και το *MSH6* και το *PMS2* [48].

Σε συνέχεια της παρούσας διατριβής διερευνήθηκε το γενετικό υπόβαθρο ασθενών που πιθανά να εμφάνιζαν το σύνδρομο Lynch. Συνολικά αναλύθηκαν 93 ασθενείς βάση του ατομικού ή/και του οικογενειακού τους ιστορικού για την ανίχνευση μεταλλαγών στα γονίδια MMR. Οι ασθενείς στους οποίους δεν ανευρέθηκε κάποια σημειακή μεταλλαγή, υποβλήθηκαν σε περαιτέρω ανάλυση για την ανίχνευση μεγάλων γονιδιακών αναδιατάξεων στα γονίδια *MLH1* και *MSH2*, με την τεχνική MLPA. Η αρχική ανάλυση ανέδειξε 29 ασθενείς (31.2%) που έφεραν μεταλλαγές στα γονίδια MMR. Η πλειονότητα (24/29, 82,7%) αφορούσε τα γονίδια *MLH1* και *MSH2*, όπως αναμενόταν εφόσον αυτά τα δύο γονίδια αντιπροσωπεύουν ~85% των περιπτώσεων του συνδρόμου [48].

Στο γονίδιο *MLH1* ανευρέθηκαν 14 μεταλλαγές, εκ των οποίων η μία ήταν καινοφανής (c.182del) και μία παραλλαγή αδιευκρίνιστης σημασίας (c.1685 A>C). Η c.1685 A>C στις βάσεις δεδομένων χαρακτηρίζεται εύρημα αγνώστου κλινικής σημασίας, τα εργαλεία βιοπληροφορικής όμως προβλέπουν ότι πρόκειται για επιβλαβή παραλλαγή. Η ασθενής αναφοράς διαγνώσθηκε με καρκίνο του παχέος εντέρου (CRC) σε ηλικία 30 ετών και με

καρκίνο του ενδομητρίου στα 37 έτη. Επιπλέον, η μητέρα και η θεία της (αδελφή της μητέρας) διαγνώστηκαν και οι δύο με καρκίνο του παχέος εντέρου σε ηλικία 34 ετών και οι δύο. Η γονοτύπηση της θείας δεν ήταν εφικτή αφού έχει αποβιώσει, ενώ η μητέρα δεν έχει διαθέσει δείγμα της, ώστε να μπορέσει να ακολουθήσει ανάλυση σύνδεσης (segregation analysis). Τα στοιχεία αυτά συνηγορούν ως προς την παθογένεια της παραλλαγής, χωρίς όμως να είναι καθοριστικά ως προς αυτό και σίγουρα η περαιτέρω διερεύνηση είναι απαραίτητη ώστε να καθοριστεί σαφώς η κλινική της σημασία.

Το 88,2% των ασθενών που έφεραν μεταλλαγές στο γονίδιο *MLH1* είχαν διαγνωσθεί με κακοήθεια του παχέος εντέρου, ενώ η ηλικία διάγνωσης στους 16/17 ήταν μικρότερη ή ίση από τα 50 έτη. Τα αποτελέσματα αυτά συνάδουν με τη βιβλιογραφία, σύμφωνα με την οποία ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι η πιο συχνά ανευρισκόμενη κακοήθεια στο σύνδρομο Lynch, ενώ η ηλικία εμφάνισης της νόσου είναι νεαρότερη (45-60 έτη) σε σχέση με την ηλικία διάγνωσης του γενικού πληθυσμού, που είναι τα 69 έτη [46]. Επιπρόσθετα, σε μία αναδρομική μελέτη αναφέρθηκε ότι ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του παχέος εντέρου στο μέλλον αυξάνεται στα άτομα με μεταλλαγές στα γονίδια MMR με την πάροδο των χρόνων [128], κάτι που επαληθεύθηκε και στην παρούσα μελέτη κατά την οποία 5/17 ασθενείς που έφεραν μεταλλαγές στο *MLH1* διαγνώστηκαν μεταγενέστερα με CRC, ενώ τρεις ασθενείς διαγνώστηκαν και με άλλες κακοήθειες που σχετίζονται με το σύνδρομο Lynch (ενδομήτριο, γαστρικό και ωοθηκών). Επίσης, το 94,1% των ασθενών με μεταλλαγές στο συγκεκριμένο γονίδιο ανέφερε οικογενειακό ιστορικό με όγκους που σχετίζονται με το σύνδρομο Lynch, ενώ 7/17 ανέφεραν πολλαπλά περιστατικά CRC σε μέλη της οικογένειας.

Στο γονίδιο *MSH2* ανευρέθηκαν 7 μεταλλαγές (7,5%). Στους ασθενείς που έφεραν μεταλλαγές στο *MSH2* παρατηρήθηκε ευρύ φάσμα διαγνώσεων που σχετίζονται με το συγκεκριμένο σύνδρομο. Συγκεκριμένα, τρεις ασθενείς νόσησαν με καρκίνο του παχέος εντέρου, δύο με ενδομήτριο και από ένας με καρκίνο ωοθηκών και λεπτού εντέρου. Αυτό δεν αποτελεί κάτι παράδοξο αφού το *MSH2* έχει συσχετιστεί με υψηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνων εκτός του CRC και κυρίως του ενδομητρίου [46]. Επιπλέον, όπως ήταν αναμενόμενο, οι περισσότεροι ασθενείς (5/7) είχαν διαγνωσθεί σε ηλικία μικρότερη από τα 50 έτη, ενώ 4/7 εμφάνισαν και μεταγενέστερη διάγνωση.

Τέλος, στα γονίδια *MSH6* και *PMS2* ανευρέθηκαν 4 και 1 παραλλαγές, αντίστοιχα. Η συχνότητα λοιπόν ανεύρεσης παραλλαγών στο *MSH6* ήταν 4,3% και στο *PMS2* 1,1%, μικρότερη από αυτή που έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία για αυτά τα δύο γονίδια (*MSH6* ~10% και *PMS2* ~5%) [48]. Αντίθετα, μία πρόσφατη μελέτη μεγάλης κλίμακας ανέφερε ότι η

συχνότητα ανεύρεσης παραλλαγών σε αυτά τα δύο γονίδια είναι ίδια με αυτή των *MLH1* και *MSH2* αν όχι και μεγαλύτερη [49]. Πιθανόν αυτό να συμβαίνει λόγω του ότι οι μεταλλαγές των *MSH6* και *PMS2* παρουσιάζουν μικρότερη διεισδυτικότητα στην ανάπτυξη καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου του παχέος εντέρου και γι' αυτό ίσως να είχε υποτιμηθεί η συνεισφορά τους [46].

Συγκεκριμένα, στο *MSH6* εκτός από τις τρεις μεταλλαγές ανευρέθηκε στην ασθενή 2532 και μία καινοφανής παρανοσηματική παραλλαγή αδιευκρίνιστης κλινικής σημασίας (c.3623C>A). Σύμφωνα με τα εργαλεία βιοπληροφορικής πρόκειται για μία πιθανώς παθογόνο παραλλαγή. Η ασθενής αναφοράς διαγνώσθηκε με CRC σε ηλικία 76 ετών, ενώ στην οικογένεια αναφέρονται και άλλα περιστατικά κακοήθειας του παχέος εντέρου σε σχετικά μεγάλες ηλικίες, κάτι που όμως είναι ενδεικτικό για τα άτομα με μεταλλαγές στο συγκεκριμένο γονίδιο. Η γονοτύπηση του αδελφού και των παιδιών της δεν κατέληξε σε σαφή συμπεράσματα για τον αν η συγκεκριμένη παραλλαγή σχετίζεται με την εμφάνιση κακοήθειας, αφού αυτά τα άτομα δεν έχουν νοσήσει. Δυστυχώς, σχεδόν όλοι οι υπόλοιποι συγγενείς που έχουν διαγνωσθεί με CRC έχουν αποβιώσει. Περαιτέρω διερεύνηση για την αποσαφήνιση της κλινικής σημασίας της c.3623C>A είναι απαραίτητη.

Επιπλέον, όλοι οι ασθενείς που έφεραν παραλλαγές στο *MSH6* διαγνώσθηκαν με καρκίνο του παχέος εντέρου σε διάφορες ηλικίες (29-76), κάτι που είναι αναμενόμενο εφόσον τα άτομα που φέρουν μεταλλαγές στο *MSH6* συνήθως διαγιγνώσκονται με καρκίνο του παχέος εντέρου και του ενδομήτριου σε μεγαλύτερη ηλικία από αυτή που νοσούν τα άτομα με μεταλλαγές στα *MLH1* και *MSH2* [46].

Ο καθορισμός της συχνότητας εμφάνισης των μεταλλαγών του γονιδίου *PMS2*, καθώς και του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου, είναι δύσκολος κυρίως λόγω του ότι στις περισσότερες μελέτες ο αριθμός των ασθενών που φέρουν μεταλλαγές στο *PMS2* είναι μικρός. Αυτό συμβαίνει λόγω της χαμηλής διεισδυτικότητας των μεταλλαγών του γονιδίου, καθώς και στο γεγονός ότι η ανάλυση του συγκεκριμένου γονιδίου καθίσταται δύσκολη λόγω της ύπαρξης των ψευδογονιδίων [129]. Μία πρόσφατη πολυκεντρική μελέτη στην οποία συμπεριλήφθηκαν 284 οικογένειες που έφεραν μεταλλαγές στο *PMS2* επιβεβαίωσε τον ήπιο φαινότυπο που παρουσιάζουν αυτά τα άτομα και ταυτόχρονα έδειξε ότι ο συσσωρευτικός κίνδυνος ανάπτυξης CRC μέχρι την ηλικία των 80 ετών είναι 13% για τους άνδρες και 12% για τις γυναίκες. Αντίστοιχα, ο συσσωρευτικός κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του ενδομητρίου μέχρι την ηλικία των 80 ετών υπολογίστηκε ότι είναι 13% [130]. Τα δεδομένα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, όπου

ανιχνεύθηκε μόνο μία ασθενής που έφερε τη μεταλλαγή c.861_864delACAG στο γονίδιο *PMS2*. Η ασθενής αναφοράς παρουσίασε καρκίνο του παχέος εντέρου σε ηλικία 63 ετών καταδεικνύοντας τη χαμηλή διεισδυτικότητα που παρουσιάζουν οι μεταλλαγές αυτού του γονιδίου.

Οι σημειακές μεταλλαγές αφορούν την πλειονότητα των μεταλλαγών που ανιχνεύονται στα γονίδια MMR. Παρόλα αυτά, οι μεγάλες γονιδιακές αναδιατάξεις των MMR συνιστούν ένα σημαντικό ποσοστό των ανευρισκόμενων παραλλαγών που προδιαθέτουν σε σύνδρομο Lynch, ενώ είναι πιο συχνές σε κάποιους πληθυσμούς. Η συχνότητα εμφάνισης ποικίλλει ανάλογα με τον πληθυσμό που μελετάται (5-20%), με το *MLH1* και το *MSH2* να αποτελούν τα γονίδια στα οποία έχουν αναφερθεί οι περισσότερες αναδιατάξεις [131]. Έτσι λοιπόν, οι ασθενείς οι οποίοι ήταν αρνητικοί για σημειακές μεταλλαγές των γονιδίων MMR, αναλύθηκαν με MLPA για την ανίχνευση δομικών αλλαγών.

Στην παρούσα μελέτη ανευρέθηκαν οχτώ μεγάλες αναδιατάξεις (8/93, 8,6%), όλες στο γονίδιο *MSH2*, οι οποίες αποτελούν το 53% των μεταλλαγών που ανευρέθηκαν στο γονίδιο. Τα δεδομένα αυτά συνάδουν με τη βιβλιογραφία, σύμφωνα με την οποία στο *MSH2* εντοπίζεται μεγάλο ποσοστό επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών, κυρίως επαναλήψεις Alu, οι οποίες είναι επιρρεπείς σε φαινόμενα ανασυνδυασμού [132, 133]. Τα δεδομένα αυτά συμφωνούν με τα *in silico* εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή, τα οποία κατέδειξαν ότι οι επαναλήψεις Alu αποτελούν το 32,6% του γονιδίου, ενώ συνολικά οι διάσπαρτες επαναλήψεις καταλαμβάνουν το 53,76%.

Συγκεκριμένα, ανιχνεύθηκαν τα ελλείμματα των εξονίων 1-6, 1-7 (σε τρεις ασθενείς), 1-8, 3-4, 9-10 και 7-16. Τα δεδομένα αυτά αναδεικνύουν και τη γενετική ποικιλομορφία του Ελληνικού πληθυσμού σε ότι αφορά τις αναδιατάξεις του *MSH2*. Επίσης, μόνο τρεις ασθενείς είχαν διαγνωσθεί με καρκίνο του παχέος εντέρου, ενώ οι υπόλοιποι νόσησαν με άλλες κακοήθειες που σχετίζονται με το σύνδρομο Lynch (καρκίνος ενδομήτριου, στομάχου, ωοθηκών και λεπτού εντέρου). Αυτό συνάδει με το γεγονός ότι η παρουσία μεταλλαγών στο *MSH2* σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης κακοηθειών σχετιζόμενων με το σύνδρομο, πέραν του καρκίνου του παχέος εντέρου (extracolonic malignancies), όπως προαναφέρθηκε [46].

Στο 50% των αναδιατάξεων που ανιχνεύθηκαν εμπλέκεται το εξόνιο 1. Αυτό μπορεί να εξηγείται από το γεγονός ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών του *MSH2*, συγκεκριμένα το 84% των επαναλήψεων Alu, εντοπίζεται στην περιοχή που περιλαμβάνει το γονίδιο *EPCAM*, που εντοπίζεται ανοδικά του γονιδίου, τον

υποκινητή μέχρι και το εξόνιο 9. Επομένως, είναι πιθανό οι αλληλουχίες αυτές να ευθύνονται για τα φαινόμενα ανασυνδυασμού που παρατηρούνται στο *MSH2* και γι' αυτό να ανευρίσκονται πιο συχνά αναδιατάξεις που αφορούν την 5' UTR περιοχή του γονιδίου έως το εξόνιο 9 [132, 133]. Τα δεδομένα αυτά επιβεβαιώθηκαν στην παρούσα μελέτη κατά την οποία όλα τα ελλείμματα που ανιχνεύθηκαν αφορούσαν τα εξόνια 1-9.

Το γονίδιο *EPCAM* σχετίζεται με την εμφάνιση του συνδρόμου Lynch με έμμεσο τρόπο. Οι απαλοιφές που εντοπίζονται στο 3' άκρο του γονιδίου οδηγούν σε επιγενετική αποσιώπηση του *MSH2* και τελικά στην εμφάνιση του συνδρόμου. Συνεπώς, οι απαλοιφές του τελευταίου εξονίου του *EPCAM* αποτελούν μία ξεχωριστή ομάδα παραλλαγών που συσχετίζονται με το σύνδρομο Lynch. Ελλείμματα του *EPCAM* έχουν αναφερθεί σε διάφορους πληθυσμούς και με ποικίλες συχνότητες εμφάνισης. Σε μία μελέτη αναφέρθηκε πιθανή συσχέτιση των ελλειμμάτων του *EPCAM* με την ανάπτυξη καρκίνου του ενδομητρίου. Επίσης, στην ίδια μελέτη ανέφεραν ότι ο συσσωρευτικός κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του ενδομητρίου μέχρι την ηλικία των 70 ετών, αυτών των ατόμων είναι 12%, σημαντικά μικρότερος από αυτόν που αναφέρεται για τα άτομα με μεταλλαγές του *MSH2* (51%) ή των ατόμων που φέρουν απαλοιφές που εκτείνονται από το *EPCAM* μέχρι και το *MSH2* [134]. Στην παρούσα μελέτη οι μόνες αναδιατάξεις που συμπεριλάμβαναν και το *EPCAM* ήταν τα ελλείμματα 1-8 και 1-7 που ανευρέθηκαν σε τρεις ασθενείς. Τα αποτελέσματα αυτά δε συμφωνούν απόλυτα με τα προηγούμενα δεδομένα, εφόσον μόνο η ασθενής που έφερε το έλλειμμα 1-8 είχε διαγνωσθεί με καρκίνο του ενδομητρίου, ενώ από τους τρεις ασθενείς που έφεραν το έλλειμμα 1-7, οι δύο νόσησαν με γαστρικό καρκίνο και ο ένας με καρκίνο του παχέος εντέρου. Επιπλέον, μόνο στην ασθενή με το έλλειμμα 1-8 στο οικογενειακό της ιστορικό αναφερόταν άλλο ένα περιστατικό με καρκίνο του ενδομητρίου.

Όλα τα ελλείμματα που ανιχνεύθηκαν στην παρούσα διατριβή είχαν αναφερθεί στη βιβλιογραφία, με την απαλοιφή των εξονίων 1-6 να είναι η πιο συχνά ανευρισκόμενη στους διάφορους πληθυσμούς και με τις περισσότερες αναφορές στις βάσεις δεδομένων (LOVD). Συγκεκριμένα, έχει ανιχνευθεί στην Ισπανία [135], στην Ιταλία, όπου στη συγκεκριμένη μελέτη αναδείχθηκε μία πιθανή συσχέτιση της αναδιάταξης με εντοπισμό της νόσου εκτός του παχέος εντέρου και με καρκίνο του δέρματος [136], και στις ΗΠΑ, όπου η συγκεκριμένη απαλοιφή παρουσιάζει και το φαινόμενο του ιδρυτή [137]. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δεν είναι σε απόλυτη συμφωνία με αυτά τα δεδομένα μιας και το έλλειμμα των εξονίων 1-6 ανιχνεύθηκε μόνο σε μία ασθενή, η οποία κίολας είχε διαγνωσθεί με καρκίνο του λεπτού εντέρου. Αντίθετα, η απαλοιφή 1-7 ανευρέθηκε σε τρεις ασθενείς, υποδηλώνοντας πιθανά μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισής της στον Ελληνικό πληθυσμό, αν

και η συγκεκριμένη αναδιάταξη επίσης έχει αρκετές αναφορές στις βάσεις δεδομένων (LOVD).

Το επόμενο βήμα ήταν ο χαρακτηρισμός των αναδιατάξεων που ανευρέθηκαν στο *MSH2*. Με τη μέθοδο της PCR μεγάλου εύρους αναλύθηκαν και καθορίστηκαν τα όρια των ελλειμμάτων 1-6, 3-4, 9-10, 7-16. Αναλυτικά, η απαλοιφή των εξονίων 1-6 αφορούσε ένα έλλειμμα μεγέθους ~ 19 kb, ενώ το 5' άκρο της εκτεινόταν ~4,5 kb ανοδικά του γονιδίου και το 3' άκρο ~1, 3 kb καθοδικά του εξονίου 6. Το συγκεκριμένο έλλειμμα έχει διαφορετικά όρια από αυτό που περιεγράφηκε από τη Wagner και τους συνεργάτες της και αποτελεί ιδρυτική μεταλλαγή στις ΗΠΑ [137], όπως και από εκείνο που έχει αναφερθεί στον Ισπανικό πληθυσμό, όπου απαλειφόταν και το γονίδιο *EPCAM* [135].

Το έλλειμμα των εξονίων 3-4 περιλαμβάνει μία περιοχή ~3500 ζευγών βάσεων, ξεκινώντας ~750 bp ανοδικά του εξονίου 3 και φτάνοντας ~300 bp καθοδικά του εξονίου 4. Πρόκειται για ένα *in frame* έλλειμμα που οδηγεί στη δημιουργία πρωτεΐνης μικρότερου μοριακού βάρους. Η αναδιάταξη που περιλαμβάνει τα εξόνια 9-10, αφορά ένα έλλειμμα μεγέθους ~10 kb, που εκτείνεται ~3,3 kb ανοδικά του εξονίου 9 μέχρι και ~3,2 kb καθοδικά του εξονίου 10.

Τέλος, η απαλοιφή των εξονίων 7-16 έχει μέγεθος περίπου 67 kb. Το 5' άκρο του ελλείματος εντοπίζεται στο εσόνιο που μεσολαβεί των εξονίων 6 και 7, περίπου 6500 bp ανοδικά του εξονίου 7 και εκτείνεται μέχρι 8202 bp στη 3' UTR περιοχή. Ο Romero και οι συνεργάτες του ανέφεραν μία απαλοιφή που αφορά τα ίδια εξόνια, αλλά μεγέθους περίπου 77 kb, σαφώς μεγαλύτερο και άρα διαφορετικό από αυτό που ανευρέθηκε στην παρούσα μελέτη [135].

Η δημιουργία γενετικών αναδιατάξεων οφείλεται σε διάφορους μηχανισμούς, όπως ο ομόλογος ανασυνδυασμός μεταξύ των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών Alu, η μικρο-ομολογία που παρατηρείται σε ομόλογες αλληλουχίες μικρού μεγέθους και η μη-ομόλογη σύνδεση των βάσεων [135]. Στο γονίδιο *MSH2*, όπως φάνηκε και από τα εργαλεία βιοπληροφορικής ανευρίσκεται μεγάλο ποσοστό επαναλήψεων Alu, οπότε ο πιο πιθανός μηχανισμός για τη δημιουργία αναδιατάξεων είναι μέσω του ομόλογου ανασυνδυασμού που μπορεί να συμβαίνει ανάμεσα σε αυτές τις αλληλουχίες. Κάτι που παρατηρήθηκε και στα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, εφόσον όλα τα σημεία που πραγματοποιήθηκαν οι θραύσεις εντοπίζονταν σε περιοχές με επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, κυρίως Alu ή κοντά σε αυτές. Επιπλέον, τα σημεία θραύσης παρουσίαζαν

μεγάλη ομολογία μεταξύ τους και σε κάποια σημεία ταυτίζονταν εντελώς ενισχύοντας την παραπάνω υπόθεση.

Συνοπτικά οι κύριοι άξονες της παρούσας διατριβής αφορούσαν το χαρακτηρισμό των ασθενών με καρκίνο του μαστού σε σχέση με τα δύο κύρια γονίδια προδιάθεσης *BRCA1* και *BRCA2* αναφορικά με τις σημειακές μεταλλαγές, αλλά και τις γονιδιακές αναδιατάξεις που ανευρίσκονται στις ασθενείς Ελληνικής καταγωγής. Η ανάλυση αυτή ανέδειξε ότι για ένα σημαντικό ποσοστό κληρονομικότητας ευθύνονται αυτά τα δύο γονίδια, ενώ η ανεύρεση γονιδιακών αναδιατάξεων είναι πολύ μικρή (0,5%), όταν εξαιρεθούν οι ιδρυτικές αναδιατάξεις που έχουν αναφερθεί στο γονίδιο *BRCA1*.

Επιπλέον, αναδείχθηκαν και νέα γονίδια προδιάθεσης υψηλής διεισδυτικότητας, όπως είναι το *PALB2*, στο οποίο επίσης περιεγράφηκε, μετά από ανάλυση απλοτύπων, ότι η μεταλλαγή c.2257C>T παρουσιάζει το φαινόμενο του ιδρυτή για τον Ελληνικό πληθυσμό. Η συγκεκριμένη μεταλλαγή υπολογίζεται ότι προήλθε από έναν κοινό πρόγονο πριν από περίπου 1600 χρόνια. Επιπρόσθετα, αναδείχθηκαν και άλλα γνωστά γονίδια προδιάθεσης ενδιάμεσης και χαμηλής διεισδυτικότητας, όπως είναι το *ATM* και το *CHEK2*, αλλά και νέα πιθανά γονίδια προδιάθεσης όπως το *FANCM* και το *RAD51C*. Τα γονίδια αυτά ανευρίσκονται σαφώς σε μικρότερη συχνότητα σε σχέση με τα *BRCA1* και *BRCA2*, επεξηγώντας όμως το κληρονομικό υπόβαθρο κάποιων οικογενειών που παρέμενε αδιευκρίνιστο.

Τέλος, στην παρούσα διατριβή αναλύθηκαν οι μεταλλαγές και οι γονιδιακές αναδιατάξεις στα γονίδια MMR που αφορούν ασθενείς που είχαν διαγνωσθεί με κακοήθειες που σχετίζονται με το σύνδρομο Lynch σε μία προσπάθεια να αποσαφηνιστεί το γενετικό υπόβαθρο αυτών των ασθενών. Από την ανάλυση αυτή προέκυψε ότι οι απαλοιφές του γονιδίου *MSH2* αποτελούν ένα σημαντικό ποσοστό (8,6%) των μεταλλαγών που ανευρίσκονται στους ασθενείς με σύνδρομο Lynch Ελληνικής καταγωγής, αναδεικνύοντας τη σημαντικότητα του ελέγχου των ασθενών και για γενετικές αναδιατάξεις τουλάχιστον του *MSH2*.

3. Επιγενετικές τροποποιήσεις – Μεθυλίωση

Η χρήση της αλληλούχισης με NGS έχει αναδείξει αρκετά νέα γονίδια προδιάθεσης σε καρκίνο και έχει καταφέρει να αποσαφηνίσει ένα σημαντικό ποσοστό της κληρονομικής προδιάθεσης. Παραμένει όμως ένα μεγάλο ποσοστό των σποραδικών, αλλά και των

οικογενών περιστατικών που δεν έχει αποσαφηνιστεί το γενετικό υπόβαθρο. Ένας εναλλακτικός τρόπος αποσιώπησης των γονιδίων είναι μέσω των επιγενετικών μηχανισμών. Οι επιγενετικές αλλαγές σε ρυθμιστικές περιοχές, όπως είναι οι υποκινητές των γονιδίων μπορούν να επηρεάσουν τη μεταγραφική ικανότητα του γονιδίου. Συγκεκριμένα, η μεθυλίωση του DNA καταστέλλει τη μεταγραφή, οδηγώντας σε αποσιώπηση του γονιδίου. Σε μία προσπάθεια να διερευνηθεί η πιθανότητα να εμπλέκονται εναλλακτικοί μηχανισμοί στην ανάπτυξη κακοήθειας πραγματοποιήθηκε ανάλυση των επιπέδων μεθυλίωσης 22 γονιδίων σε δείγματα ολικού περιφερικού αίματος. Έτσι, αναλύθηκαν ασθενείς με εξαιρετικά βεβαρημένο οικογενειακό ιστορικό, νεαρή ηλικία διάγνωσης και τριπλά αρνητικούς όγκους στις οποίες δεν ανιχνεύθηκε καμία μεταλλαγή σε κανένα γονίδιο προδιάθεσης όταν ελέγχθηκαν με τη μέθοδο NGS. Η σύγκριση πραγματοποιήθηκε με τα αποτελέσματα ασθενών που έφεραν μεταλλαγή στο γονίδιο *BRCA1* και είχαν αντίστοιχα χαρακτηριστικά στις διαγνώσεις τους.

Η ανάλυση ανέδειξε πολύ υψηλά ποσοστά μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου *SFN*, το οποίο συμμετέχει στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, σε όλες τις ασθενείς και από τις δύο κατηγορίες. Αντίστοιχα αποτελέσματα έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία με αυξημένα ποσοστά μεθυλίωσης σε ιστούς από όγκους του μαστού, αλλά και σε δείγματα από περιφερικό αίμα [138, 139]. Αντίθετα, άλλες μελέτες αναφέρουν ότι παρατηρήθηκαν υψηλά ποσοστά μεθυλίωσης του συγκεκριμένου γονιδίου τόσο σε καρκινικούς όσο και σε φυσιολογικούς ιστούς [140].

Επιπλέον, στην υπό μελέτη ομάδα ανευρέθηκαν υψηλά επίπεδα μεθυλίωσης (>30%) στα γονίδια: *CDH1*, *HIC1*, *PYCARD*, *RASSF1* και *TP73*. Το *CDH1* είναι γνωστό ογκοκατασταλτικό γονίδιο, το οποίο έχει συσχετιστεί με τον κληρονομικό γαστρικό καρκίνο διάχυτου τύπου, αλλά και με το λοβιακό καρκίνο του μαστού [141]. Αναλυτικά, σε 2/4 ασθενείς ανιχνεύθηκαν υψηλά επίπεδα μεθυλίωσης του συγκεκριμένου γονιδίου. Σε μία μελέτη σε ασθενείς με κληρονομικό γαστρικό καρκίνο διάχυτου τύπου ανιχνεύθηκε υπερμεθυλίωση του υποκινητή του *CDH1* σε ποσοστό 1.47% των ασθενών, υποδηλώνοντας ότι πρόκειται για έναν σπάνιο μηχανισμό αποσιώπησης του γονιδίου [142]. Αντίστοιχος μηχανισμός αποσιώπησης είναι πιθανόν να εμπλέκεται και στις ασθενείς της παρούσας μελέτης, εξηγώντας έτσι τα υψηλά επίπεδα μεθυλίωσης που παρατηρήθηκαν. Σε 3/4 ασθενείς ανιχνεύθηκαν υψηλά ποσοστά υπερμεθυλίωσης του υποκινητή του *HIC1*. Το *HIC1* είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο του οποίου η επιγενετική αποσιώπηση έχει περιγραφεί σε διάφορους καρκίνους, όπως του προστάτη, ήπατος, ορθοκολικούς, πνεύμονα και μαστού, ενώ τα πειράματα της απομεθυλίωσής του έδειξαν ότι οδηγεί σε καλύτερη πρόγνωση. Οι

μελέτες αυτές αφορούν καρκινικούς ιστούς [143, 144]. Ο Cheng και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι αποσιώπηση του γονιδίου παρατηρήθηκε σε τριπλά αρνητικούς όγκους, ενώ όταν αποκαθίστατο η έκφρασή του τα κύτταρα παρουσίαζαν μειωμένη ικανότητα διήθησης και μετάστασης [144]. Αυτό μπορεί να αποτελεί μία εξήγηση για την ανίχνευση αυξημένων ποσοστών μεθυλίωσης σε περιφερικό αίμα σε 3 από τις 4 ασθενείς της παρούσας μελέτης εφόσον όλες είχαν τριπλά αρνητικές διαγνώσεις, υποδηλώνοντας ότι η μειωμένη έκφραση του *HIC1* μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης κακής πρόγνωσης.

Επίσης, σε 3/4 ασθενείς παρατηρήθηκαν υψηλά ποσοστά μεθυλίωσης των υποκινητών των γονιδίων *PYCARD* και *RASSF1*, τα οποία και τα δύο συμμετέχουν στο μηχανισμό της απόπτωσης, αλλά και σε άλλα ρυθμιστικά μονοπάτια. Σε μία μελέτη όπου αναλύθηκαν δείγματα όγκων του μαστού και τα αντίστοιχα δείγματα περιφερικού αίματος των ίδιων ασθενών παρατηρήθηκε μεγάλη αντιστοιχία στα επίπεδα μεθυλίωσης του *PYCARD* και στις δύο κατηγορίες, καταδεικνύοντας την πιθανή χρήση του συγκεκριμένου γονιδίου ως βιοδείκτη στην αναγνώριση του καρκίνου του μαστού [145]. Σε ότι αφορά το γονίδιο *RASSF1* υπάρχουν αντικρουόμενες μελέτες σε σχέση με την ανίχνευση της υπερμεθυλίωσης του υποκινητή του. Σε κάποιες δεν έχει ανευρεθεί αυξημένη μεθυλίωση ανάμεσα στα σποραδικά περιστατικά και στις ομάδες ελέγχου [146], ενώ σε μία άλλη μελέτη παρατηρήθηκαν αυξημένα ποσοστά μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου όταν αναλύθηκαν δείγματα αίματος ασθενών με καρκίνο του μαστού και υγιών συγγενών τους σε σχέση με την ομάδα ελέγχου [147].

Τέλος, σε δύο ασθενείς ανιχνεύθηκαν υψηλά επίπεδα μεθυλίωσης στο γονίδιο *TP73*, το οποίο συμμετέχει στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, επάγει την απόπτωση και πιθανά να συμβάλλει στη διαφοροποίηση των κυττάρων. Αντίστοιχα αποτελέσματα αναφέρθηκαν σε μία μελέτη σε καρκινικούς όγκους του μαστού, όπου τα υψηλά ποσοστά μεθυλίωσης του *TP73* συσχετίστηκαν με υψηλούς βαθμούς κακοήθειας και υψηλά ποσοστά πολλαπλασιασμού [148]. Κάτι ανάλογο φαίνεται να συμβαίνει και στα δείγματα της παρούσας διατριβής, όπου η πλειονότητα των ασθενών είχαν διαγνωσθεί με υψηλούς βαθμούς κακοήθειας και υψηλό κυτταρικό δείκτη πολλαπλασιασμού.

Οι περισσότερες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε σχέση με τις επιγενετικές τροποποιήσεις αφορούν κυρίως καρκινικούς ιστούς. Η ανάλυση των επιπέδων μεθυλίωσης σε περιφερικό αίμα ασθενών είναι ένα πεδίο που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης και σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων. Επιπλέον, η χρήση ολικού περιφερικού αίματος για την ανίχνευση ποσοστών μεθυλίωσης είναι επισφαλής

μιας και το DNA που απομονώνεται από τα δείγματα αίματος αντιπροσωπεύει διάφορες κυτταρικές σειρές και η ύπαρξη ελεύθερου καρκινικού DNA δεν μπορεί να αποκλειστεί. Εντούτοις, στην παρούσα μελέτη τα ποσοστά της μεθυλίωσης που θεωρήθηκαν αξιολογήσιμα (>30%) είναι αρκετά υψηλά για να θεωρηθεί ότι αντιπροσωπεύουν ελεύθερο καρκινικό DNA, που πιθανά να υπάρχει στην κυκλοφορία του αίματος.

Όλα αυτά τα δεδομένα αναδεικνύουν την ποικιλομορφία που χαρακτηρίζει την καρκινική εξαλλαγή στους διάφορους τύπους καρκίνων και την ανάγκη της χρήσης νεότερων μεθοδολογιών για την πληρέστερη ταυτοποίηση του γενετικού υπόβαθρου του κληρονομικού καρκίνου, που μέχρι τώρα σε σημαντικό ποσοστό παρέμενε αδιευκρίνιστο. Επιπλέον, αναδείχθηκε η πιθανή συμβολή και άλλων μηχανισμών στην ανάπτυξη της νόσου, όπως η επιγενετική αποσιώπηση γονιδίων, τα οποία εμπλέκονται σε μηχανισμούς καρκινογένεσης, μέσω της υπερμεθυλίωσης του υποκινητή τους, στοιχείο που ταυτοποιήθηκε σε κύτταρα περιφερικού αίματος και πιθανόν να αποτελέσουν νέους βιοδείκτες της νόσου. Τα αποτελέσματα αυτά είναι πολύ σημαντικά για την ορθότερη πρόληψη, διάγνωση και βέλτιστη κλινική διαχείριση των ασθενών Ελληνικής καταγωγής καθώς και για τη διαχείριση των συγγενών τους.

Βιβλιογραφία

1. Tubbs, A. and A. Nussenzweig, *Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in Cancer*. Cell, 2017. **168**(4): p. 644-656.
2. Galluzzi, L., T. Yamazaki, and G. Kroemer, *Linking cellular stress responses to systemic homeostasis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018. **19**(11): p. 731-745.
3. Jackson, S.P. and J. Bartek, *The DNA-damage response in human biology and disease*. Nature, 2009. **461**(7267): p. 1071-8.
4. Jeggo, P.A., L.H. Pearl, and A.M. Carr, *DNA repair, genome stability and cancer: a historical perspective*. Nat Rev Cancer, 2016. **16**(1): p. 35-42.
5. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
6. Cooper G. M., H.R.E., *The Cell: A Molecular Approach*. 2016. 819-867.
7. Lewin, *Genes*. VIII ed. 2004. 1243-1309.
8. Cooper G. M., H.R.E., *The Cell: A Molecular Approach*. 2016. 245-294.
9. Li, G.M., *Mechanisms and functions of DNA mismatch repair*. Cell Res, 2008. **18**(1): p. 85-98.
10. Lewin, *Genes*. VIII ed. 2004. 587-651.
11. Han H-J., e.a., *Genomic structure of human mismatch repair gene, hMLH1, and its mutation analysis in patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)*. 1994: Hum. Mol. Gen. . p. 237-242.
12. Kolodner R. D., e.a., *Structure of the Human MSH2 Locus and Analysis of Two Muir-Torre Kindreds for msh2 Mutations*. 1994: Genomics. p. 516-524.
13. Gassman, N.R., et al., *Cooperative nuclear localization sequences lend a novel role to the N-terminal region of MSH6*. PLoS One, 2011. **6**(3): p. e17907.
14. Mahalingam, M., *MSH6, Past and Present and Muir-Torre Syndrome-Connecting the Dots*. Am J Dermatopathol, 2017. **39**(4): p. 239-249.
15. Blount, J. and A. Prakash, *The changing landscape of Lynch syndrome due to PMS2 mutations*. Clin Genet, 2018. **94**(1): p. 61-69.
16. Paul, A. and S. Paul, *The breast cancer susceptibility genes (BRCA) in breast and ovarian cancers*. Front Biosci (Landmark Ed), 2014. **19**: p. 605-18.
17. Chen, C.C., et al., *Homology-Directed Repair and the Role of BRCA1, BRCA2, and Related Proteins in Genome Integrity and Cancer*. Annu Rev Cancer Biol, 2018. **2**: p. 313-336.
18. Puget, N., et al., *Distinct BRCA1 rearrangements involving the BRCA1 pseudogene suggest the existence of a recombination hot spot*. Am J Hum Genet, 2002. **70**(4): p. 858-65.
19. Takaoka, M. and Y. Miki, *BRCA1 gene: function and deficiency*. Int J Clin Oncol, 2018. **23**(1): p. 36-44.
20. Narod, S.A. and W.D. Foulkes, *BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(9): p. 665-76.
21. Rohini R., e.a., *BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection*. Nat. Rev., 2012. **12**: p. 68-78.
22. Edvardsen, H., et al., *Linkage disequilibrium pattern of the ATM gene in breast cancer patients and controls; association of SNPs and haplotypes to radio-sensitivity and post-lumpectomy local recurrence*. Radiat Oncol, 2007. **2**: p. 25.
23. Lavin, M.F., et al., *Functional consequences of sequence alterations in the ATM gene*. DNA Repair (Amst), 2004. **3**(8-9): p. 1197-205.

24. Stracker, T.H., et al., *The ATM signaling network in development and disease*. Front Genet, 2013. **4**: p. 37.
25. Apostolou, P. and F. Fostira, *Hereditary breast cancer: the era of new susceptibility genes*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 747318.
26. Zannini L., e.a., *CHK2 kinase in the DNA damage response and beyond*. J. Mol. Cell Biol., 2014. **6**(6): p. 442-457.
27. Stracker, T.H., T. Usui, and J.H. Petrini, *Taking the time to make important decisions: the checkpoint effector kinases Chk1 and Chk2 and the DNA damage response*. DNA Repair (Amst), 2009. **8**(9): p. 1047-54.
28. Vuorela, M., et al., *Further evidence for the contribution of the RAD51C gene in hereditary breast and ovarian cancer susceptibility*. Breast Cancer Res Treat, 2011. **130**(3): p. 1003-10.
29. French, C.A., C.E. Tambini, and J. Thacker, *Identification of functional domains in the RAD51L2 (RAD51C) protein and its requirement for gene conversion*. J Biol Chem, 2003. **278**(46): p. 45445-50.
30. Xia, B., et al., *Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2*. Mol Cell, 2006. **22**(6): p. 719-29.
31. Reid, S., et al., *Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer*. Nat Genet, 2007. **39**(2): p. 162-4.
32. Buisson, R. and J.Y. Masson, *PALB2 self-interaction controls homologous recombination*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(20): p. 10312-23.
33. Buisson R., e.a., *Breast cancer proteins PALB2 and BRCA2 stimulate polymerase η in recombination-associated DNA synthesis at blocked replication forks*. 2014: Cell Rep. p. 553-564.
34. Nepomuceno, T.C., et al., *The Role of PALB2 in the DNA Damage Response and Cancer Predisposition*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(9).
35. Simhadri, S., et al., *PALB2 connects BRCA1 and BRCA2 in the G2/M checkpoint response*. Oncogene, 2018.
36. Kamada, R., et al., *Tetramer formation of tumor suppressor protein p53: Structure, function, and applications*. Biopolymers, 2016. **106**(4): p. 598-612.
37. Saha, T., R.K. Kar, and G. Sa, *Structural and sequential context of p53: A review of experimental and theoretical evidence*. Prog Biophys Mol Biol, 2015. **117**(2-3): p. 250-263.
38. Παταργιάς Θ. Α., Α.Β., *Γενετική Ανθρώπου*. 2005. 168-190.
39. Tancredi, M., et al., *Haplotype analysis of BRCA1 gene reveals a new gene rearrangement: characterization of a 19.9 KBP deletion*. Eur J Hum Genet, 2004. **12**(9): p. 775-7.
40. Ewald, I.P., et al., *Genomic rearrangements in BRCA1 and BRCA2: A literature review*. Genet Mol Biol, 2009. **32**(3): p. 437-46.
41. Vanin, E.F., *Processed pseudogenes: characteristics and evolution*. Annu Rev Genet, 1985. **19**: p. 253-72.
42. Fackenthal, J.D. and O.I. Olopade, *Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(12): p. 937-48.
43. Berger, A.H., A.G. Knudson, and P.P. Pandolfi, *A continuum model for tumour suppression*. Nature, 2011. **476**(7359): p. 163-9.
44. Hino, O. and T. Kobayashi, *Mourning Dr. Alfred G. Knudson: the two-hit hypothesis, tumor suppressor genes, and the tuberous sclerosis complex*. Cancer Sci, 2017. **108**(1): p. 5-11.
45. Foulkes, W.D., *Inherited susceptibility to common cancers*. N Engl J Med, 2008. **359**(20): p. 2143-53.

46. Sinicrope, F.A., *Lynch Syndrome-Associated Colorectal Cancer*. N Engl J Med, 2018. **379**(8): p. 764-773.
47. Giardiello, F.M., et al., *Guidelines on genetic evaluation and management of Lynch syndrome: a consensus statement by the US Multi-society Task Force on colorectal cancer*. Am J Gastroenterol, 2014. **109**(8): p. 1159-79.
48. Lindor, N.M., *Lynch syndrome 101 (years, that is)*. Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2014: p. 27-32.
49. Espenschied, C.R., et al., *Multigene Panel Testing Provides a New Perspective on Lynch Syndrome*. J Clin Oncol, 2017. **35**(22): p. 2568-2575.
50. Imai, K. and H. Yamamoto, *Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics*. Carcinogenesis, 2008. **29**(4): p. 673-80.
51. Larsen, M.J., et al., *Hereditary breast cancer: clinical, pathological and molecular characteristics*. Breast Cancer (Auckl), 2014. **8**: p. 145-55.
52. Mahdavi, M., et al., *Hereditary breast cancer; Genetic penetrance and current status with BRCA*. J Cell Physiol, 2018.
53. Rebbeck, T.R., et al., *Mutational spectrum in a worldwide study of 29,700 families with BRCA1 or BRCA2 mutations*. Hum Mutat, 2018. **39**(5): p. 593-620.
54. Pertesi, M., I. Konstantopoulou, and D. Yannoukakos, *Haplotype analysis of two recurrent genomic rearrangements in the BRCA1 gene suggests they are founder mutations for the Greek population*. Clin Genet, 2011. **80**(4): p. 375-82.
55. Konstantopoulou, I., et al., *High prevalence of BRCA1 founder mutations in Greek breast/ovarian families*. Clin Genet, 2014. **85**(1): p. 36-42.
56. Ladopoulou, A., et al., *Germ line BRCA1 & BRCA2 mutations in Greek breast/ovarian cancer families: 5382insC is the most frequent mutation observed*. Cancer Lett, 2002. **185**(1): p. 61-70.
57. Anagnostopoulos, T., et al., *G1738R is a BRCA1 founder mutation in Greek breast/ovarian cancer patients: evaluation of its pathogenicity and inferences on its genealogical history*. Breast Cancer Res Treat, 2008. **110**(2): p. 377-85.
58. Apostolou, P., et al., *Haplotype analysis reveals that the recurrent BRCA1 deletion of exons 23 and 24 is a Greek founder mutation*. Clin Genet, 2017. **91**(3): p. 482-487.
59. del Valle, J., et al., *Identification and comprehensive characterization of large genomic rearrangements in the BRCA1 and BRCA2 genes*. Breast Cancer Res Treat, 2010. **122**(3): p. 733-43.
60. Palma, G., et al., *Triple negative breast cancer: looking for the missing link between biology and treatments*. Oncotarget, 2015. **6**(29): p. 26560-74.
61. Couch, F.J., et al., *Inherited mutations in 17 breast cancer susceptibility genes among a large triple-negative breast cancer cohort unselected for family history of breast cancer*. J Clin Oncol, 2015. **33**(4): p. 304-11.
62. Rahman, N., et al., *PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene*. Nat Genet, 2007. **39**(2): p. 165-7.
63. Antoniou, A.C., et al., *Breast-cancer risk in families with mutations in PALB2*. N Engl J Med, 2014. **371**(6): p. 497-506.
64. Couch, F.J., et al., *Associations Between Cancer Predisposition Testing Panel Genes and Breast Cancer*. JAMA Oncol, 2017. **3**(9): p. 1190-1196.
65. Hauke, J., et al., *Gene panel testing of 5589 BRCA1/2-negative index patients with breast cancer in a routine diagnostic setting: results of the German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer*. Cancer Med, 2018. **7**(4): p. 1349-1358.
66. Foulkes, W.D., et al., *Identification of a novel truncating PALB2 mutation and analysis of its contribution to early-onset breast cancer in French-Canadian women*. Breast Cancer Res, 2007. **9**(6): p. R83.

67. Erkko, H., et al., *Penetrance analysis of the PALB2 c.1592delT founder mutation*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(14): p. 4667-71.
68. Southey, M.C., et al., *A PALB2 mutation associated with high risk of breast cancer*. Breast Cancer Res, 2010. **12**(6): p. R109.
69. Catucci, I., et al., *Haplotype analyses of the c.1027C>T and c.2167_2168delAT recurrent truncating mutations in the breast cancer-predisposing gene PALB2*. Breast Cancer Res Treat, 2016. **160**(1): p. 121-129.
70. Buys, S.S., et al., *A study of over 35,000 women with breast cancer tested with a 25-gene panel of hereditary cancer genes*. Cancer, 2017. **123**(10): p. 1721-1730.
71. Minion, L.E., et al., *Hereditary predisposition to ovarian cancer, looking beyond BRCA1/BRCA2*. Gynecol Oncol, 2015. **137**(1): p. 86-92.
72. Constantinou, P. and M. Tischkowitz, *Genetics of gynaecological cancers*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2017. **42**: p. 114-124.
73. Song, H., et al., *Contribution of Germline Mutations in the RAD51B, RAD51C, and RAD51D Genes to Ovarian Cancer in the Population*. J Clin Oncol, 2015. **33**(26): p. 2901-7.
74. Ramus, S.J., et al., *Germline Mutations in the BRIP1, BARD1, PALB2, and NBN Genes in Women With Ovarian Cancer*. J Natl Cancer Inst, 2015. **107**(11).
75. Norquist, B.M., et al., *Inherited Mutations in Women With Ovarian Carcinoma*. JAMA Oncol, 2016. **2**(4): p. 482-90.
76. Schon, K. and M. Tischkowitz, *Clinical implications of germline mutations in breast cancer: TP53*. Breast Cancer Res Treat, 2018. **167**(2): p. 417-423.
77. Zhou, R., et al., *Li-Fraumeni Syndrome Disease Model: A Platform to Develop Precision Cancer Therapy Targeting Oncogenic p53*. Trends Pharmacol Sci, 2017. **38**(10): p. 908-927.
78. Silwal-Pandit, L., A. Langerod, and A.L. Borresen-Dale, *TP53 Mutations in Breast and Ovarian Cancer*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2017. **7**(1).
79. Fostira, F., et al., *Genetic evaluation based on family history and Her2 status correctly identifies TP53 mutations in very early onset breast cancer cases*. Clin Genet, 2015. **87**(4): p. 383-7.
80. Pilie, P.G., et al., *State-of-the-art strategies for targeting the DNA damage response in cancer*. Nat Rev Clin Oncol, 2018.
81. Brooks, J., P. Cairns, and A. Zeleniuch-Jacquotte, *Promoter methylation and the detection of breast cancer*. Cancer Causes Control, 2009. **20**(9): p. 1539-50.
82. Pinto, D., et al., *Contribution of MLH1 constitutional methylation for Lynch syndrome diagnosis in patients with tumor MLH1 downregulation*. Cancer Med, 2018. **7**(2): p. 433-444.
83. Goel, A., et al., *De novo constitutional MLH1 epimutations confer early-onset colorectal cancer in two new sporadic Lynch syndrome cases, with derivation of the epimutation on the paternal allele in one*. Int J Cancer, 2011. **128**(4): p. 869-78.
84. Wong, E.M., et al., *Constitutional methylation of the BRCA1 promoter is specifically associated with BRCA1 mutation-associated pathology in early-onset breast cancer*. Cancer Prev Res (Phila), 2011. **4**(1): p. 23-33.
85. Hansmann, T., et al., *Constitutive promoter methylation of BRCA1 and RAD51C in patients with familial ovarian cancer and early-onset sporadic breast cancer*. Hum Mol Genet, 2012. **21**(21): p. 4669-79.
86. Iwamoto, T., et al., *BRCA1 promoter methylation in peripheral blood cells is associated with increased risk of breast cancer with BRCA1 promoter methylation*. Breast Cancer Res Treat, 2011. **129**(1): p. 69-77.

87. National Comprehensive Cancer Network. *Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian*. 2018; Available from: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx.
88. Wilhelm, J. and A. Pingoud, *Real-time polymerase chain reaction*. *ChemBiochem*, 2003. **4**(11): p. 1120-8.
89. Reeve, J.P. and B. Rannala, *DMLE+: Bayesian linkage disequilibrium gene mapping*. *Bioinformatics*, 2002. **18**(6): p. 894-5.
90. fostira, F., et al., *One in three highly selected Greek breast cancer patients carries a loss-of-function variant in a cancer susceptibility gene*. 2019. p. under review.
91. *Sequence Variant Nomenclature*. 2019; 19.01]. Available from: <http://varnomen.hgvs.org/>.
92. Hamel, N., et al., *On the origin and diffusion of BRCA1 c.5266dupC (5382insC) in European populations*. *Eur J Hum Genet*, 2011. **19**(3): p. 300-6.
93. Hahnen, E., et al., *Germline Mutations in Triple-Negative Breast Cancer*. *Breast Care (Basel)*, 2017. **12**(1): p. 15-19.
94. Armaou, S., et al., *Contribution of BRCA1 germ-line mutations to breast cancer in Greece: a hospital-based study of 987 unselected breast cancer cases*. *Br J Cancer*, 2009. **101**(1): p. 32-7.
95. Atchley, D.P., et al., *Clinical and pathologic characteristics of patients with BRCA-positive and BRCA-negative breast cancer*. *J Clin Oncol*, 2008. **26**(26): p. 4282-8.
96. Rebbeck, T.R., et al., *Association of type and location of BRCA1 and BRCA2 mutations with risk of breast and ovarian cancer*. *JAMA*, 2015. **313**(13): p. 1347-61.
97. Kuchenbaecker, K.B., et al., *Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers*. *JAMA*, 2017. **317**(23): p. 2402-2416.
98. Ruiz de Garibay, G., et al., *Characterization of four novel BRCA2 large genomic rearrangements in Spanish breast/ovarian cancer families: review of the literature, and reevaluation of the genetic mechanisms involved in their origin*. *Breast Cancer Res Treat*, 2012. **133**(1): p. 273-83.
99. McVeigh, T.P., et al., *Recurrent large genomic rearrangements in BRCA1 and BRCA2 in an Irish case series*. *Cancer Genet*, 2017. **214-215**: p. 1-8.
100. Montagna, M., et al., *Genomic rearrangements account for more than one-third of the BRCA1 mutations in northern Italian breast/ovarian cancer families*. *Hum Mol Genet*, 2003. **12**(9): p. 1055-61.
101. Thomassen, M., et al., *Low frequency of large genomic rearrangements of BRCA1 and BRCA2 in western Denmark*. *Cancer Genet Cytogenet*, 2006. **168**(2): p. 168-71.
102. Vasickova, P., et al., *High occurrence of BRCA1 intragenic rearrangements in hereditary breast and ovarian cancer syndrome in the Czech Republic*. *BMC Med Genet*, 2007. **8**: p. 32.
103. Ratajska, M., et al., *BRCA1 and BRCA2 point mutations and large rearrangements in breast and ovarian cancer families in Northern Poland*. *Oncol Rep*, 2008. **19**(1): p. 263-8.
104. Engert, S., et al., *MLPA screening in the BRCA1 gene from 1,506 German hereditary breast cancer cases: novel deletions, frequent involvement of exon 17, and occurrence in single early-onset cases*. *Hum Mutat*, 2008. **29**(7): p. 948-58.
105. Machado, P.M., et al., *Screening for a BRCA2 rearrangement in high-risk breast/ovarian cancer families: evidence for a founder effect and analysis of the associated phenotypes*. *J Clin Oncol*, 2007. **25**(15): p. 2027-34.
106. Tournier, I., et al., *Significant contribution of germline BRCA2 rearrangements in male breast cancer families*. *Cancer Res*, 2004. **64**(22): p. 8143-7.
107. Hansen, T., et al., *Large BRCA1 and BRCA2 genomic rearrangements in Danish high risk breast-ovarian cancer families*. *Breast Cancer Res Treat*, 2009. **115**(2): p. 315-23.

108. Fostira, F., et al., *Germline deleterious mutations in genes other than BRCA2 are infrequent in male breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2018. **169**(1): p. 105-113.
109. Casilli, F., et al., *The contribution of germline rearrangements to the spectrum of BRCA2 mutations*. J Med Genet, 2006. **43**(9): p. e49.
110. Wang, T., et al., *A deletion/insertion mutation in the BRCA2 gene in a breast cancer family: a possible role of the Alu-polyA tail in the evolution of the deletion*. Genes Chromosomes Cancer, 2001. **31**(1): p. 91-5.
111. Fortuno, C., P.A. James, and A.B. Spurdle, *Current review of TP53 pathogenic germline variants in breast cancer patients outside Li-Fraumeni syndrome*. Hum Mutat, 2018. **39**(12): p. 1764-1773.
112. Bougeard, G., et al., *Molecular basis of the Li-Fraumeni syndrome: an update from the French LFS families*. J Med Genet, 2008. **45**(8): p. 535-8.
113. Tung, N., et al., *Frequency of mutations in individuals with breast cancer referred for BRCA1 and BRCA2 testing using next-generation sequencing with a 25-gene panel*. Cancer, 2015. **121**(1): p. 25-33.
114. Susswein, L.R., et al., *Pathogenic and likely pathogenic variant prevalence among the first 10,000 patients referred for next-generation cancer panel testing*. Genet Med, 2016. **18**(8): p. 823-32.
115. Tung, N., et al., *Frequency of Germline Mutations in 25 Cancer Susceptibility Genes in a Sequential Series of Patients With Breast Cancer*. J Clin Oncol, 2016. **34**(13): p. 1460-8.
116. Lu, H.M., et al., *Association of Breast and Ovarian Cancers With Predisposition Genes Identified by Large-Scale Sequencing*. JAMA Oncol, 2018.
117. Castera, L., et al., *Landscape of pathogenic variations in a panel of 34 genes and cancer risk estimation from 5131 HBOC families*. Genet Med, 2018. **20**(12): p. 1677-1686.
118. Girard, E., et al., *Familial breast cancer and DNA repair genes: Insights into known and novel susceptibility genes from the GENESIS study, and implications for multigene panel testing*. Int J Cancer, 2018.
119. Shimelis, H., et al., *Triple-Negative Breast Cancer Risk Genes Identified by Multigene Hereditary Cancer Panel Testing*. J Natl Cancer Inst, 2018.
120. Nguyen-Dumont, T., et al., *Mutation screening of PALB2 in clinically ascertained families from the Breast Cancer Family Registry*. Breast Cancer Res Treat, 2015. **149**(2): p. 547-54.
121. Weitzel, J.N., et al., *Somatic TP53 variants frequently confound germ-line testing results*. Genet Med, 2018. **20**(8): p. 809-816.
122. Mosse, Y.P., et al., *Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene*. Nature, 2008. **455**(7215): p. 930-5.
123. Marin Navarro, A., et al., *Generation of induced pluripotent stem cell lines from two Neuroblastoma patients carrying a germline ALK R1275Q mutation*. Stem Cell Res, 2019. **34**: p. 101356.
124. Schubert, S., et al., *The identification of pathogenic variants in BRCA1/2 negative, high risk, hereditary breast and/or ovarian cancer patients: High frequency of FANCM pathogenic variants*. Int J Cancer, 2018.
125. Nguyen-Dumont, T., et al., *FANCM and RECQL genetic variants and breast cancer susceptibility: relevance to South Poland and West Ukraine*. BMC Med Genet, 2018. **19**(1): p. 12.
126. Neidhardt, G., et al., *Association Between Loss-of-Function Mutations Within the FANCM Gene and Early-Onset Familial Breast Cancer*. JAMA Oncol, 2017. **3**(9): p. 1245-1248.

127. Kotsopoulos, J., et al., *Frequency of germline PALB2 mutations among women with epithelial ovarian cancer*. *Fam Cancer*, 2017. **16**(1): p. 29-34.
128. Parry, S., et al., *Metachronous colorectal cancer risk for mismatch repair gene mutation carriers: the advantage of more extensive colon surgery*. *Gut*, 2011. **60**(7): p. 950-7.
129. Biller, L.H., S. Syngal, and M.B. Yurgelun, *Recent advances in Lynch syndrome*. *Fam Cancer*, 2019.
130. Ten Broeke, S.W., et al., *Cancer Risks for PMS2-Associated Lynch Syndrome*. *J Clin Oncol*, 2018. **36**(29): p. 2961-2968.
131. Duraturo, F., et al., *Contribution of large genomic rearrangements in Italian Lynch syndrome patients: characterization of a novel alu-mediated deletion*. *Biomed Res Int*, 2013. **2013**: p. 219897.
132. Gylling, A., et al., *Large genomic rearrangements and germline epimutations in Lynch syndrome*. *Int J Cancer*, 2009. **124**(10): p. 2333-40.
133. Perez-Cabornero, L., et al., *Characterization of new founder Alu-mediated rearrangements in MSH2 gene associated with a Lynch syndrome phenotype*. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2011. **4**(10): p. 1546-55.
134. Perez-Cabornero, L., et al., *Frequency of rearrangements in Lynch syndrome cases associated with MSH2: characterization of a new deletion involving both EPCAM and the 5' part of MSH2*. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2011. **4**(10): p. 1556-62.
135. Romero, A., et al., *Frequency and variability of genomic rearrangements on MSH2 in Spanish Lynch Syndrome families*. *PLoS One*, 2013. **8**(9): p. e72195.
136. Stella, A., et al., *Germline novel MSH2 deletions and a founder MSH2 deletion associated with anticipation effects in HNPCC*. *Clin Genet*, 2007. **71**(2): p. 130-9.
137. Wagner, A., et al., *Molecular analysis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in the United States: high mutation detection rate among clinically selected families and characterization of an American founder genomic deletion of the MSH2 gene*. *Am J Hum Genet*, 2003. **72**(5): p. 1088-100.
138. Jing, F., et al., *Hypermethylation of tumor suppressor genes BRCA1, p16 and 14-3-3sigma in serum of sporadic breast cancer patients*. *Onkologie*, 2007. **30**(1-2): p. 14-9.
139. Ye, M., et al., *Detection of 14-3-3 sigma (sigma) promoter methylation as a noninvasive biomarker using blood samples for breast cancer diagnosis*. *Oncotarget*, 2017. **8**(6): p. 9230-9242.
140. Jeronimo, C., et al., *Quantitative hypermethylation of a small panel of genes augments the diagnostic accuracy in fine-needle aspirate washings of breast lesions*. *Breast Cancer Res Treat*, 2008. **109**(1): p. 27-34.
141. Hansford, S., et al., *Hereditary Diffuse Gastric Cancer Syndrome: CDH1 Mutations and Beyond*. *JAMA Oncol*, 2015. **1**(1): p. 23-32.
142. Pinheiro, H., et al., *Allele-specific CDH1 downregulation and hereditary diffuse gastric cancer*. *Hum Mol Genet*, 2010. **19**(5): p. 943-52.
143. Parrella, P., et al., *HIC1 promoter methylation and 17p13.3 allelic loss in invasive ductal carcinoma of the breast*. *Cancer Lett*, 2005. **222**(1): p. 75-81.
144. Cheng, G., et al., *HIC1 silencing in triple-negative breast cancer drives progression through misregulation of LCN2*. *Cancer Res*, 2014. **74**(3): p. 862-72.
145. Mirza, S., et al., *Promoter hypermethylation of TMS1, BRCA1, ERalpha and PRB in serum and tumor DNA of invasive ductal breast carcinoma patients*. *Life Sci*, 2007. **81**(4): p. 280-7.
146. Cao, X., et al., *Evaluation of Promoter Methylation of RASSF1A and ATM in Peripheral Blood of Breast Cancer Patients and Healthy Control Individuals*. *Int J Mol Sci*, 2018. **19**(3).

147. Yazici, H., et al., *Aberrant methylation of RASSF1A in plasma DNA before breast cancer diagnosis in the Breast Cancer Family Registry*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2009. **18**(10): p. 2723-5.
148. Marzese, D.M., et al., *DNA methylation index and methylation profile of invasive ductal breast tumors*. *J Mol Diagn*, 2012. **14**(6): p. 613-22.