



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΟΜΕΑΣ ΥΓΕΙΑΣ ΜΗΤΕΡΑΣ-ΠΑΙΔΙΟΥ

Α΄ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ-ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ

Διευθυντής: Καθηγητής Δ. Λουτράδης

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΝΕΩΝ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ ΣΕ ΓΟΝΙΔΙΑ

ΠΟΥ ΠΡΟΔΙΑΘΕΤΟΥΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΜΥΡΤΩ-ΣΩΤΗΡΙΑ ΠΑΠΑΜΕΝΤΖΕΛΟΠΟΥΛΟΥ

ΧΗΜΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΚΟΣ, MSc

ΑΘΗΝΑ 2019

Ημερομηνία αίτησης υποψηφίου: 28/3/2014

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 14/7/2014

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Δημητρακάκης Κωνσταντίνος, Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών, ΓΝΑ Αλεξάνδρα (Επιβλέπων)

Λουτράδης Δημήτριος, Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Διευθυντής Α΄ Μαιευτικής-Γυναικολογικής Κλινικής Πανεπιστημίου Αθηνών, ΓΝΑ Αλεξάνδρα

Γιαννουκάκος Δρακούλης, Διευθυντής Ερευνών, Εργαστήριο Μοριακής Διαγνωστικής, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 18/7/2014

Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής Αθηνών:

Καθηγητής Πέτρος Π. Σφηκάκης

Μέλη Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής:

Δημητρακάκης Κωνσταντίνος, Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών, ΓΝΑ Αλεξάνδρα (Επιβλέπων)

Λουτράδης Δημήτριος, Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Διευθυντής Α΄ Μαιευτικής-Γυναικολογικής Κλινικής Πανεπιστημίου Αθηνών, ΓΝΑ Αλεξάνδρα

Γιαννουκάκος Δρακούλης, Διευθυντής Ερευνών, Εργαστήριο Μοριακής Διαγνωστικής, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος

Ροδολάκης Αλέξανδρος, Καθηγητής Γυναικολογικής Ογκολογίας Παν/μίου Αθηνών, Α' Μ/Γ Κλινική, ΓΝΑ Αλεξάνδρα

Ζαγουρή Φλώρα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Θεραπευτικής Κλινικής, ΓΝΑ Αλεξάνδρα

Θωμάκος Νικόλαος, Επίκουρος Καθηγητής Γυναικολογικής Ογκολογίας, ΓΝΑ Αλεξάνδρα

Κωνσταντοπούλου Ειρήνη, Ερευνήτρια Β΄, Εργαστήριο Μοριακής Διαγνωστικής, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος

Ημερομηνία υποστήριξης διδακτορικής διατριβής: 10/7/2019

Βαθμός: Άριστα

Ο ὄρκος του Ιπποκράτη

Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἀσκληπιὸν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἴστορας ποιούμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν ὄρκον τόνδε καὶ συγγραφὴν τήνδε· ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρηρίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ ωυτέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρῃσι, καὶ διδάξειν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρηρίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ συγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσί τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμῆ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοισί τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἰητρικῷ, ἄλλῳ δὲ οὐδενί. Διαιτήμασί τε χρήσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἴρξῃ. Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑφηγήσομαι συμβουλίην τοιήνδε· ὁμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω. Ἄγνῳς δὲ καὶ ὀσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμὴν. Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε. Ἐς οἰκίας δὲ ὀκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίας, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμάτων καὶ ἀνδρῶν, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων. Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἢ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπιῆς κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἕξω, σιγήσομαι, ἄρῃητα ἠγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα. Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι, καὶ μὴ συγγέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον· παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιορκοῦντι, τάναντία τουτέων.

Ἰπποκράτης, Ὅρκος

Βιογραφικό σημείωμα

ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΠΑΠΑΜΕΝΤΖΕΛΟΠΟΥΛΟΥ ΜΥΡΤΩ-ΣΩΤΗΡΙΑ

Καυκάσου 84, 18454 Νίκαια (Ελλάδα)
6936739919, email:mpntua@yahoo.gr

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ

- 01/09/2013–Σήμερα Υποψήφια Διδάκτωρ
Εργαστήριο Μοριακής Διαγνωστικής, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος, σε συνεργασία με την Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ
Θέμα: "Ανίχνευση νέων αλληλομόρφων σε γονίδια που προδιαθέτουν για τον κληρονομικό καρκίνο"
- 01/04/2012–30/07/2013 Μεταπτυχιακή Εργασία
Ερευνητική Μονάδα, Τμήμα Κλινικής Χημείας και Μοριακής Βιολογίας, 401 Γενικό Στρατιωτικό Νοσοκομείο Αθηνών
- 02/01/2010–30/12/2011 Μεταπτυχιακό της Ιατρικής Σχολής Αθηνών
"Αναπαραγωγική-Αναγεννητική Ιατρική" (M.Sc)
Ιατρική Σχολή Αθηνών σε συνεργασία με το Εργαστήριο Εξωσωματικής Γονιμοποίησης, Α' Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, Νοσοκομείο «Αλεξάνδρα»
Θέμα: "Ανίχνευση της έκφρασης του υποδοχέα της LH και του μεταγραφικού παράγοντα RUNX2 σε δείγματα κοκκωδών κυττάρων και περιφερικού αίματος", σσ.134, επιβλέπων Καθηγητής: Λουτράδης Δ, Βαθμός: Άριστα (9.21/10)
- 02/01/2009–30/09/2009 Μεταπτυχιακή εργασία
Εργαστήριο Βιομηχανικής Ενζυμολογίας, Ινστιτούτο Βιολογικών Ερευνών και Βιοτεχνολογίας (ΙΒΕΒ), Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών (ΕΙΕ)
- 01/12/2008–23/12/2008 Συμμετοχή στο ευρωπαϊκό πρόγραμμα STSM
Θέμα: "Structure and dynamics of nanodispersions in veiled virgin olive oil studied by light scattering and small-angle X-ray scattering", Πανεπιστήμιο του Graz, Αυστρία
- 02/01/2008–12/07/2008 Διπλωματική Εργασία στη Βιοτεχνολογία Ενζύμων
Εργαστήριο Βιομηχανικής Ενζυμολογίας, Ινστιτούτο Βιολογικών Ερευνών και Βιοτεχνολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών (ΕΙΕ)
- 01/10/2007–30/11/2007 Πρακτική άσκηση
Εργαστήριο Βιομηχανικής Ενζυμολογίας, Ινστιτούτο Βιολογικών Ερευνών και Βιοτεχνολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών (ΕΙΕ)
- 16/09/2003–16/07/2008 Δίπλωμα Χημικού Μηχανικού
Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π., Αθήνα
Εξειδίκευση: Βιοτεχνολογία
Βαθμός: Λίαν καλώς (7.83)

Δημοσιεύσεις

1. 'Prevalence and founder effect of the *BRCA1* p.(Val1833Met) variant in the Greek population, with further evidence for pathogenicity and risk modification', Myrto Papamentzelopoulou, Paraskevi Apostolou, Florentia Fostira, Constantine Dimitrakakis, Dimitris Loutradis, Drakoulis Yannoukakos, Irene Konstantopoulou, *Cancer Genet*, 2019 (accepted).
2. 'PALB2 c.2257C>T truncating variant is a Greek founder and is associated with high breast cancer risk', , Andromachi Vagena, Myrto Papamentzelopoulou, Despoina Kalfakakou, Panagoula Kollia, Christos Papadimitriou, Amanda Psyri, Paraskevi Apostolou, George Fountzilias, Irene Konstantopoulou, Drakoulis Yannoukakos, Florentia Fostira, *J Hum Genet*, 2019.
3. '*CHEK2* c.1100delC allele is rarely identified in greek breast cancer cases', Apostolou P, Fostira F, Papamentzelopoulou M, Michelli M, Konstantopoulou I, Yannoukakos D, Voutsinas G, *Cancer Genet*. 2015 Apr;208(4):129-34.
4. 'Detection of *RUNX2* gene expression in cumulus cells in women undergoing controlled ovarian stimulation', Papamentzelopoulou M, Mavrogianni D, Dinopoulou V, Theofanakis H, Malamas F, Marinopoulos S, Bletsas R, Anagnostou E, Kallianidis K, Loutradis D, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2012; 10(1):99
5. 'LH receptor gene expression in cumulus cells in women entering an ART program', Papamentzelopoulou M, Mavrogianni D, Partsinevelos GA, Marinopoulos S, Dinopoulou V, Theofanakis C, Anagnostou E, Loutradis D. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2012; 29(5):409-416.
6. 'Immobilization and activity of Rhizomucor miehei lipase. Effect of the matrix properties prepared from nonionic fluorinated surfactants', Michaux F , Zoumpantioti M, Papamentzelopoulou M, Stébé MJ, Blin JL, Xenakis A. *Process Biochemistry*, 2010; 45(1): 39-46.

Συνέδρια **ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΚΑΙ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ****§ Προφορική επιστημονική ανακοίνωση**

"Ανίχνευση της έκφρασης του υποδοχέα της LH και του μεταγραφικού παράγοντα RUNX2 σε δείγματα κοκκωδών κυττάρων και περιφερικού αίματος", Παπαμεντζελοπούλου Μ., Μαυρογιάννη Δ., Μαρινόπουλος Σ., Ντινοπούλου Β., Θεοφανάκης Χ., Αναγνώστου Ε., Λουτράδης Δ., 4^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γονιμότητας & Στείριότητας, Αθήνα, 10-12 Δεκεμβρίου 2010

§ Προφορικές ομαδικές επιστημονικές ανακοινώσεις

1. "Η αξιολόγηση της έκφρασης του υποδοχέα της LH στα κοκκώδη κύτταρα, ως δείκτη της ωθητικής απάντησης και της επιτυχίας της μικρογονιμοποίησης", Παπαμεντζελοπούλου Μ., Παρτσινέβελος Γ., Μαυρογιάννη Δ., Μαρινόπουλος Σ., Ντινοπούλου Β., Θεοφανάκης Χ., Αναγνώστου Ε., Λουτράδης Δ., 12^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μαιευτικής και Γυναικολογίας, Θεσσαλονίκη, Μάιος 2012
2. "Structure and dynamics of nanodispersions in veiled virgin olive oil studied by light scattering and small-angle X-ray scattering", V. Papadimitriou, M. Papamentzelopoulou, M. Dulle, W. Wachter, G. Scherf, T.G. Sotiroudis, O. Glatter and A. Xenakis, *Lipids, Fats and Oils Congress*, Graz, Austria, October, 2009.

§ Πόστερ

1. «Η συχνότητα και η ιδρυτική επίδραση της παραλλαγής p.(Val1833Met) του γονιδίου *BRCA1* στον Ελληνικό πληθυσμό», Μ. Παπαμεντζελοπούλου, Π. Αποστόλου, Φ. Φωστήρα, Δ. Γιαννουκάκος, Ε. Κωνσταντοπούλου, 3ο Συνέδριο του Συνδέσμου Ιατρικών Γενετιστών Ελλάδας (ΣΙΓΕ) ΕΙΕ, 2-4 Νοεμβρίου 2018.
2. «Prevalence and founder effect of the *BRCA1*, p.(Val1833Met) missense variant among Greek breast/ovarian cancer patients», Myrto Papamentzelopoulou, Florentia Fostira, Andromachi Vagena, Paraskevi Apostolou, Irene Konstantopoulou, Drakoulis Yannoukakos, 8th ESO-CNIO Conference on Familial Cancer, 17-18.05.2018, Madrid, Spain.
3. «Μελέτη της Παραλλαγής p.(Val1833Met) του Γονιδίου *BRCA1* σε Ελληνίδες Ασθενείς Με Καρκίνο Μαστού-Ωθηκών», Μ. Παπαμεντζελοπούλου, Π. Αποστόλου, Φ. Φωστήρα, Δ. Γιαννουκάκος, Ε. Κωνσταντοπούλου, ΣΙΓΕ, Αθήνα, 2016
4. "*CHEK2* c.1100delC allele is rarely identified in greek breast cancer cases", Apostolou P, Fostira F, Papamentzelopoulou M, Michelli M, Konstantopoulou I, Yannoukakos D, Voutsinas G, 26th Familial Cancer Conference, Madrid, June, 2014
5. "LH Receptor gene expression profiling in cumulus cells as a novel biomarker in the prediction of ovarian response and ART outcome", Papamentzelopoulou M, Mavrogianni D, Partsinevelos GA, Marinopoulos S, Dinopoulou V, Theofanakis C, Anagnostou E, Loutradis D, 28th ESHRE Annual Meeting, Turkey, July, 2012.
6. "Βιοκαταλυτική σύνθεση εστέρων από λιπάση ακινητοποιημένη σε μεσοπορώδη υλικά", 3ο Πανελλήνιο Συνέδριο Λίπη, Έλαια, Λιπίδια: Παρόν και Μέλλον, Αθήνα, Ιούνιος, 2009.

Επαγγελματικές δεξιότητες

▪ Άριστη γνώση των κάτωθι τεχνικών:

Αλληλούχιση επόμενης γενεάς (NGS)
 Αλληλούχιση κατά Sanger
 RT-PCR
 Real-Time PCR (γονοτύπηση/ποσοτικοποίηση)
 Ηλεκτροφόρηση
 Απομόνωση DNA/RNA
 Σύνθεση cDNA
 Ανοσοφθορισμός
 In situ υβριδισμός
 Μικροσκόπιο φθορισμού
 ELISA
 GC, MS, HPLC
 Φωτόμετρο/Φασματοφωτόμετρο

Λογισμικά Βιοπληροφορικής: PyMOL, Gerasi

Μεταφράσεις Βιοτεχνολογικών Ευρεσιτεχνιών για κατάθεση στον Οργανισμό Βιομηχανικής Ιδιοκτησίας

Ψηφιακές δεξιότητες: European Computer Driving License (ECDL) MS Windows, XP-2009, Vista, MS Office (Word, Excel, PowerPoint, Access), Internet Explorer, Outlook Express, Fortran 90

Γλώσσες

Αγγλικά : Επίπεδο: C2
 Ισπανικά: Επίπεδο: B2

Συνδρομές

-Μέλος Τεχνικού Επιμελητηρίου Ελλάδος (ΤΕΕ)
 -Μέλος Συνδέσμου Ιατρικών Γενετιστών Ελλάδος (ΣΙΓΕ)
 -Μέλος της Ελληνικής Εταιρείας Κλινικής Χημείας-Κλινικής Βιοχημείας (ΕΕΚΧ-ΚΒ)

Στην οικογένειά μου

Περιεχόμενα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	12
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	14
ABSTRACT	17
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	19
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	22
1. Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ.....	23
Εισαγωγή στον καρκίνο του μαστού.....	23
Τα γονίδια BRCA1 και BRCA2 στον καρκίνο του μαστού	24
Το γονίδιο <i>BRCA1</i>	24
Το γονίδιο <i>BRCA2</i>	25
Διεισδυτικότητα των μεταλλάξεων και λειτουργίες των γονιδίων BRCA1 και BRCA2	25
Ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά του κληρονομικού καρκίνου του μαστού	28
Μοριακοί υπότυποι κληρονομικού καρκίνου μαστού	29
Ο τριπλά αρνητικός καρκίνος μαστού	30
Κλινικές οδηγίες για άτομα που φέρουν μεταλλάξεις σε γονίδια που προδιαθέτουν στον καρκίνο του μαστού	32
2. Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ	34
Εισαγωγή στον καρκίνο των ωοθηκών	34
Ιστοπαθολογία του καρκίνου των ωοθηκών	35
Υψηλού Βαθμού Ορώδες Καρκίνωμα Ωοθηκών (HGSC)	38
Χαμηλού Βαθμού Ορώδες Καρκίνωμα Ωοθηκών (LGSC).....	41
Βλεννώδες Καρκίνωμα Ωοθηκών (MC)	42
Ενδομητριοειδές Καρκίνωμα Ωοθηκών (EC).....	43
Διαυγοκυτταρικό Καρκίνωμα Ωοθηκών (CCC).....	44
Σπάνιοι όγκοι των ωοθηκών	46
Όγκοι ωοθηκών άγνωστης προέλευσης	47

Κληρονομικό σύνδρομο καρκίνου μαστού/ωθηκών	48
Τα γονίδια <i>BRCA1</i> και <i>BRCA2</i> στον καρκίνο των ωθηκών.....	49
Άλλα γονίδια προδιάθεσης στον καρκίνο των ωθηκών	49
Γενετική του καρκίνου των ωθηκών με νεαρή ηλικία διάγνωσης.....	51
Στρατηγική μείωσης του κινδύνου για καρκίνο των ωθηκών	51
Θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου των ωθηκών	54
Κατευθυντήριες οδηγίες παραπομπής για γονιδιακό έλεγχο στον καρκίνο των ωθηκών.....	55
Σύνδρομο Lynch	55
3. ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗ ΛΑΘΩΝ ΣΤΟ DNA	59
Γονιδιωματική αστάθεια και καρκίνος	59
Μονοπάτια επιδιόρθωσης λαθών του DNA	60
Συνθετική θνησιμότητα.....	64
Ανάπτυξη Αναστολέων της PARP	66
Αναστολή του μηχανισμού BER	69
Παγίδευση της PARP1 στη θέση βλάβης του DNA.....	70
Ανεπαρκής στρατολόγηση της BRCA1	71
Ενεργοποίηση του μηχανισμού NHEJ	71
Απόκριση στους αναστολείς της PARP.....	72
Olaparib	73
Rucaparib.....	74
Niraparib.....	75
Οι αναστολείς της PARP στο φαινόμενο BRCAness	76
Αντίσταση στους αναστολείς της PARP μέσω μεταλλάξεων αναστροφής.....	77
4. ΠΟΛΥΓΟΝΙΔΙΑΚΑ ΠΑΝΕΛ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ.....	79
Η χρήση των πάνελ στην κλινική και εργαστηριακή πρακτική.....	79
Η σημασία του γονιδίου PALB2 στον κληρονομικό καρκίνο	86
Ανάλυση του Όγκου και Εξατομικευμένη Θεραπεία.....	87

Η Ιατρική Ακριβείας στην Ογκολογία.....	90
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	94
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	95
ΣΚΟΠΟΣ	95
A. ΜΕΘΟΔΟΙ	96
1. Ανίχνευση μεταλλάξεων με τη συμβατική αλληλούχηση κατά Sanger	96
1.1 Απομόνωση DNA	96
1.2. Φωτομέτρηση του απομονωμένου DNA	98
1.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	98
1.4. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR.....	101
1.5. Καθαρισμός των προϊόντων PCR σε αντλία κενού	103
1.6 Αντίδραση αλληλούχησης του DNA.....	104
1.7. Καθαρισμός των προϊόντων σε στήλη σεφαρόζης	106
1.8 Γενετικός αναλυτής	107
2. Ανίχνευση μεγάλων γονιδιακών αναδιατάξεων με PCR πολλαπλών εκκινήτων (multiplex PCR)	108
3. Ποσοτική PCR (real-time PCR).....	110
4. Ανάλυση απλοτύπου	113
5. Αξιολόγηση της παθογονικότητας μέσω ανάλυσης συν-διαχωρισμού.....	115
6. Ανάλυση 94 γονιδίων με τη μέθοδο της αλληλούχησης νέας γενιάς (Trusight Rapid Capture).....	115
B. ΟΜΑΔΕΣ ΑΣΘΕΝΩΝ	122
1. Ανίχνευση μεταλλάξεων στα γονίδια BRCA1 & BRCA2 σε ασθενείς με καρκίνο μαστού ή/και ωοθηκών με οικογενειακό ιστορικό ή/και νεαρή ηλικία διάγνωσης (≤45 έτη) με τη συμβατική μέθοδο αλληλούχησης κατά Sanger.....	122
2. Διερεύνηση της συχνότητας και του ιδρυτικού φαινομένου της παραλλαγής p.(Val1833Met) του γονιδίου BRCA1	123
3. Διερεύνηση της μετάλλαξης p.Arg753Ter του γονιδίου PALB2, σε Ελληνίδες ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών ανεξαρτήτως ηλικίας διάγνωσης και οικογενειακού ιστορικού	124

4. Ανάλυση 94 γονιδίων σε 285 ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών με το γονιδιακό πάνελ Trusight Cancer panel.....	124
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	126
1. Ανίχνευση μεταλλάξεων στα γονίδια BRCA1 & BRCA2 σε ασθενείς με καρκίνο μαστού ή/και ωοθηκών με οικογενειακό ιστορικό ή/και νεαρή ηλικία διάγνωσης (≤ 45 έτη) με τη συμβατική μέθοδο αλληλούχησης κατά Sanger.....	126
2. Διερεύνηση της συχνότητας της παραλλαγής p.(Val1833Met) του γονιδίου BRCA1 ..	136
Ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών που φέρουν την παραλλαγή p.(Val1833Met)	140
Διερεύνηση ιδρυτικού φαινομένου της p.(Val1833Met) του γονιδίου BRCA1 με ανάλυση απλοτύπου	142
Υπολογισμός της ηλικίας της παραλλαγής p.(Val1833Met)	147
Αξιολόγηση της παθογονικότητας της παραλλαγής p.(Val1833Met) μέσω ανάλυσης συν-διαχωρισμού	147
3. Διερεύνηση της μετάλλαξης p.Arg753Ter του γονιδίου PALB2 σε Ελληνίδες ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών ανεξαρτήτως ηλικίας διάγνωσης και οικογενειακού ιστορικού	148
4. Ανάλυση 94 γονιδίων σε 285 ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών με το γονιδιακό πάνελ Trusight Cancer panel.....	149
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	169
Ανίχνευση μεταλλάξεων στα γονίδια BRCA1 & BRCA2 σε ασθενείς με καρκίνο μαστού ή/και ωοθηκών με οικογενειακό ιστορικό ή/και νεαρή ηλικία διάγνωσης (≤ 45 έτη) με τη συμβατική μέθοδο αλληλούχησης	169
Η συχνότητα και η ιδρυτική επίδραση της παραλλαγής p.(Val1833Met) του γονιδίου BRCA1 στον Ελληνικό πληθυσμό – Επιπρόσθετες ενδείξεις παθογονικότητας	171
Γονίδια προδιάθεσης στον καρκίνο των ωοθηκών - Εστιάζοντας στα BRCA1/2.....	173
Άλλα γονίδια προδιάθεσης στον καρκίνο των ωοθηκών	176
Το γονίδιο PALB2 και η προδιάθεση στον καρκίνο των ωοθηκών	180
Η σημασία των γονιδιακών πάνελ στην Κλινική Γενετική του Καρκίνου	181
ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ.....	183
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	200

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Διαγνωστικής του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος, αξιοποιώντας τον εργαστηριακό εξοπλισμό και τους χώρους του εργαστηρίου, σε συνεργασία με τον Τομέα Υγείας Μητέρας-Παιδιού της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή Γυναικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Δημητρακάκη Κωνσταντίνο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναλαμβάνοντας ως ο Επιβλέπων Καθηγητής της διδακτορικής διατριβής μου, καθώς και για το ειλικρινές ενδιαφέρον του και την υποστήριξή του. Οι πολύτιμες συμβουλές του αποτέλεσαν στοιχεία πολύτιμα για την πραγμάτωσή της. Οφείλω, επίσης, θερμότερες ευχαριστίες στον Καθηγητή Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών και Διευθυντή της Α΄ Μαιευτικής-Γυναικολογικής Κλινικής Πανεπιστημίου Αθηνών (ΓΝΑ Αλεξάνδρα) κ. Λουτράδη Δημήτριο, ο οποίος με μεγάλη προθυμία αποτέλεσε μέλος της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, συνεχίζοντας να δείχνει την αμέριστη στήριξή του και την εμπιστοσύνη του καθόλη τη διάρκεια της παρούσας διατριβής.

Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω από καρδιάς τον Διευθυντή Ερευνών του Εργαστηρίου Μοριακής Διαγνωστικής του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος κ. Γιαννουκάκο Δρακούλη, πρωτίστως, για τη δυνατότητα που μου παρείχε να εκπονήσω τη διδακτορική διατριβή μου στο εργαστήριό του και κατ' επέκταση για τη συνολική προσφορά και καθοδήγησή του. Οι πολύτιμες επιστημονικές γνώσεις του σε συνδυασμό με το ειλικρινές και ανθρώπινο ενδιαφέρον που μου έδειξε με γεμίζουν με ευγνωμοσύνη για τη συνεργασία μας.

Χωρίς αμφιβολία, δε θα παραλείψω να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη του Εργαστηρίου Μοριακής Διαγνωστικής του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος. Αρχικά, οφείλω θερμές ευχαριστίες στην Ερευνήτρια Β΄ του Εργαστηρίου Μοριακής Διαγνωστικής του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος κα. Κωνσταντοπούλου Ειρήνη για τις πολύτιμες συμβουλές και γνώσεις της, καθώς και τη στήριξή της καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη Συνεργαζόμενη

Ερευνήτρια του Εργαστηρίου Μοριακής Διαγνωστικής του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος κα. Φωστήρα Φλωρεντία για την ουσιαστική και στενή συνεργασία που είχαμε, καθώς και για τη συνολική καθοδήγησή της και τις χρήσιμες συμβουλές της για την πραγμάτωση της παρούσας διατριβής. Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω και στα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου Μοριακής Διαγνωστικής για τις ευχάριστες στιγμές, αλλά και τις αγωνίες που μοιραστήκαμε για την περαίωση των μελετών μας. Η συμβολή όλων των μελών ήταν καθοριστική για να γνωρίσω και να εξειδικευτώ στον τομέα της Γενετικής του Καρκίνου, μια επιστήμη ιδιαίτερα απαιτητική, αλλά συνάμα πολύτιμη.

Τέλος, θα ήθελα ολόψυχα να ευχαριστήσω τους γονείς μου και τους δύο αδελφούς μου για την ψυχική συμπαράσταση και την υποστήριξή τους σε όλα τα στάδια αυτής της πορείας μου, ώστε να μπορώ να σπουδάζω και να εμπλουτίζω τις γνώσεις μου πάνω στον τομέα που επιθυμώ. Τους ευχαριστώ από καρδιάς και είμαι ευγνώμων προς αυτούς.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Από τα μέσα της δεκαετίας του 1990 έγινε σαφές ότι ένα σημαντικό ποσοστό (5-20%) των διαγνώσεων καρκίνου οφείλεται σε γενετικούς παράγοντες που κληρονομούνται συνήθως με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο. Οι παράγοντες αυτοί είναι μεταλλάξεις σε γονίδια που σχετίζονται με την επιδιόρθωση του DNA και έχουν ως αποτέλεσμα την απώλεια λειτουργίας της αντίστοιχης πρωτεΐνης. Τα άτομα που φέρουν μεταλλάξεις στα γονίδια αυτά εμφανίζουν σαφώς υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό και θα πρέπει να έχουν εξατομικευμένη ιατρική παρακολούθηση είτε έχουν νοσήσει είτε όχι. Η ταυτοποίηση των ατόμων αυτών γίνεται σήμερα μέσω της αλληλούχησης του γενετικού υλικού ασθενών ή υγιών συγγενών σε οικογένειες με ιστορικό καρκίνου ή νεαρές ηλικίες διάγνωσης.

Η ανάπτυξη των πολυγονιδιακών πάνελ αποτελεί *state of the art* πρακτική, με χρήση της οποίας είναι δυνατή η ταυτοποίηση νέων γονιδίων, οι μεταλλάξεις των οποίων προδιαθέτουν στον κληρονομικό καρκίνο μαστού ή/και ωθηκών. Εκτιμάται ότι περίπου το 5-10% των ασθενών με διάγνωση καρκίνου του μαστού φέρει παθογόνους μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2* και ένα μέγιστο της τάξεως του 2,5% στα γονίδια *ATM*, *CHEK2*, *PALB2*, *PTEN*, *TP53* και άλλα. Τα αντίστοιχα ποσοστά για τον επιθηλιακό καρκίνο των ωθηκών κυμαίνονται σε 20-30% για τα *BRCA1* και *BRCA2* και 6-15% για τα υπόλοιπα γονίδια των πάνελ, ποσοστά τα οποία ποικίλλουν ανάλογα με τα κριτήρια επιλογής των ασθενών που υποβάλλονται σε γονιδιακό έλεγχο. Μέσω της ταυτοποίησης του γενετικού υποβάθρου στα άτομα αυτά θα μπορούσε να παρασχεθεί στοχευμένη ιατρική παρακολούθηση και επιπρόσθετα μέτρα πρόληψης, καθώς και έλεγχος των συγγενών 1^{ου} βαθμού. Συνεπώς, καταδεικνύεται η ικανότητα λήψης ιατρικών αποφάσεων (clinical actionability) μέσω της χρήσης των πολυγονιδιακών αυτών πάνελ, όταν ταυτοποιούνται μεταλλάξεις τόσο όσον αφορά στα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2* όσο και στα *ATM*, *CHEK2*, *PALB2*, για τα οποία υπάρχουν κλινικές οδηγίες (NCCN guidelines).

Στην παρούσα διατριβή η συνολική συχνότητα μεταλλάξεων στα γονίδια *BRCA1/2* για ένα σύνολο 50 ασθενών επιλεγμένων με βάση τα κριτήρια NCCN για το προσωπικό ή οικογενειακό ιστορικό καρκίνου μαστού ή/και ωοθηκών υπολογίστηκε στο 12%. Ειδικότερα, το 6% αφορούσε στην ανίχνευση ιδρυτικών για τον Ελληνικό πληθυσμό μεταλλάξεων, συγκεκριμένα, της μετάλλαξης c.5382insC (c.5266dupC) και της απαλοιφής του εξονίου 20 (c.5256_5277+3179del3200), καθώς και της απαλοιφής των εξονίων 23 και 24 (g.169527_180579del11052) του γονιδίου *BRCA1*.

Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στην ανάλυση της παραλλαγής p.(Val1833Met) του γονιδίου *BRCA1*, καθώς ανιχνεύθηκε σε υψηλή συχνότητα σε ασθενείς που είχαν διαγνωστεί τόσο με καρκίνο μαστού όσο και με καρκίνο ωοθηκών (1.82%), καθώς και σε ασθενείς που είχαν διαγνωστεί μόνο με καρκίνο ωοθηκών (1.59%). Η παρατήρηση ότι η παραλλαγή p.(Val1833Met) συν-κληρονομείται με τη νόσο, η μη συνύπαρξή της με άλλη παθογόνο μετάλλαξη και η απουσία της από την ομάδα μαρτύρων, φανερώνουν μια σαφώς σχετιζόμενη με τον καρκίνο παραλλαγή με παθογόνο επίδραση. Επιπλέον, μέσω ανάλυσης συν-διαχωρισμού, όπου ο συνολικός λόγος πιθανοφανειών (LR) υπολογίστηκε στο 1.88, η παραλλαγή p.(Val1833Met) χαρακτηρίζεται ως παθογόνος. Η ανάλυση απλοτύπου απέδειξε την ιδρυτική επίδραση της p.(Val1833Met), αποκαλύπτοντας την Ελληνική προέλευσή της περίπου πριν από 1.450 έτη. Αντίθετα, βρέθηκε ότι η συχνότητα της επανεμφανιζόμενης σε περιστατικά καρκίνου μαστού μετάλλαξης p.Arg753Ter του γονιδίου *PALB2* ήταν εξαιρετικά χαμηλή σε ασθενείς με επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών και πιθανώς να μη σχετίζεται με τον καρκίνο των ωοθηκών.

Τέλος, από την εφαρμογή του γονιδιακού πάνελ προκύπτει ότι η συνολική συχνότητα παθογόνων μεταλλάξεων στα υπό εξέταση γονίδια για ασθενείς με επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών υπολογίζεται στο 29,1%. Ως αναμενόταν, η πλειονότητα των παθογόνων μεταλλάξεων στις υπό μελέτη ασθενείς αφορά στα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2* με ποσοστό 13,3% και 6,7%, αντίστοιχα. Ωστόσο, εντοπίζονται μεταλλάξεις και σε άλλα γονίδια, συγκεκριμένα στο *RAD51C* (2,1%), σε γονίδια της ομάδας FANC (*FANCE*, *FANCL*, *FANCD2*) (1,8%), καθώς και στα γονίδια *PPM1D* (1,4%), *PALB2* (0,7%), *CHEK2*, *NBN*, *PMS1*, *PMS2*, *MLH1*, *DIS3L2*, *BLM*,

RECQL4 και *ATM* (0,35% για το κάθε ένα). Επιπλέον, παρατηρείται μικρότερη ηλικία διάγνωσης καρκίνου των ωθηκών σε γυναίκες που φέρουν παθογόνους μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1/2* συγκριτικά τόσο με τις γυναίκες που δε φέρουν καμία παθογόνο μετάλλαξη στα υπό εξέταση γονίδια όσο και με τις γυναίκες που φέρουν μεταλλάξεις σε γονίδια εκτός των *BRCA1/2*. Η παρούσα μελέτη καταδεικνύει, επίσης, ότι τα υψηλόβαθμα ορώδη ωθηκικά καρκινώματα συνδέονται περισσότερο με την ύπαρξη παθογόνων μεταλλάξεων στα γονίδια *BRCA1/2* σε σχέση είτε με την ανίχνευση μεταλλάξεων σε γονίδια εκτός των *BRCA1/2* είτε με την απουσία παθογόνων μεταλλάξεων στα υπό εξέταση γονίδια. Αντίθετα, παρατηρείται ότι τα ενδομητριοειδή και τα διαυγοκυτταρικά ωθηκικά καρκινώματα σχετίζονται λιγότερο με παθογόνους μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1/2*.

ABSTRACT

In the middle of the 1990's it became clear that a substantial percentage (5-20%) of cancer diagnoses was due to genetic factors mainly characterized by an autosomal dominant inheritance pattern. These factors correspond to mutations in genes related to DNA repair mechanisms and result in loss of function of the corresponding proteins. Individuals carrying such mutations have a higher risk of developing cancer compared to general population and should be provided with personalized clinical surveillance whether they have been diagnosed with cancer or not. Through DNA sequencing of patients or healthy relatives it is feasible to identify such individuals in families with family history of cancer and/or younger ages at diagnosis.

Multigene panel testing provides *a state of the art* approach, through of which the identification of new genes, whose mutations predispose to hereditary breast and/or ovarian cancer, is feasible. It is estimated that about 5-10% of patients with breast cancer diagnosis carry pathogenic mutations in *BRCA1* and *BRCA2* genes and a maximum of 2.5% in *ATM*, *CHEK2*, *PALB2*, *PTEN*, *TP53*, etc. The corresponding percentages for epithelial ovarian cancer range between 20-30% for *BRCA1* and *BRCA2* and 6-15% for the rest of panel genes. A targeted clinical surveillance and additional preventive measures could be provided to such individuals, as well as genetic testing to 1st degree relatives. Accordingly, clinical actionability is highlighted through multigene panel use, especially when mutations are identified either in *BRCA1/2* or *ATM*, *CHEK2*, *PALB2* and *TP53* genes, for which established clinical guidelines are provided (NCCN guidelines).

In the present thesis, an overall mutation prevalence of 12% for *BRCA1/2* genes was estimated for a total of 50 patients selected based on NCCN guidelines for personal or family history of breast and/or ovarian cancer diagnosis. Specifically, half of the total identified mutations concerned Greek founder/recurrent mutations, in particular, the c.5382insC (c.5266dupC) mutation, a deletion of exon 20 (c.5256_5277+3179del3200) and a deletion of exons 23 and 24 (g.169527_180579del11052) of *BRCA1*.

A particular attention was given in the analysis of p.(Val1833Met) variant of *BRCA1*, due to its high prevalence observed in both breast and ovarian cancer patients (1.82%) and ovarian cancer patients only (1.59%). The observation that p.(Val1833Met) variant co-segregates with the disease, the lack of co-existence with another pathogenic mutation and its absence in the control group discloses a cancer-related variant with pathogenic effect. In addition, through co-segregation analysis where the total likelihood ratio (LR) was calculated at 1.88, the p.(Val1833Met) variant is characterized as pathogenic. Haplotype analysis demonstrated the founder effect of p.(Val1833Met) variant, highlighting its Greek origin about 1,450 years ago. On the contrary, the prevalence of the recurrent in breast cancer cases p.Arg753Ter variant of *PALB2* was extremely low in epithelial ovarian cancer patients, indicating that this variant is not an ovarian cancer-related one.

Finally, the implementation of massive parallel sequencing in patients with epithelial ovarian cancer diagnosis revealed an overall germline mutation prevalence of 29.1%. As expected, the majority of the pathogenic mutations is identified in *BRCA1* and *BRCA2* genes, with prevalences of 13.3% and 6.7%, respectively. Nevertheless, pathogenic mutations are identified in other genes, in particular, *RAD51C* (2.1%), *FANC* genes (*FANCE*, *FANCL*, *FANCD2*) (1.8%), as well as *PPMID* (1.4%), *PALB2* (0.7%), *CHEK2*, *NBN*, *PMS1*, *PMS2*, *MLH1*, *DIS3L2*, *BLM*, *RECQL4* and *ATM* (0.35% each). In addition, an earlier age at diagnosis is observed in women carrying pathogenic mutations in *BRCA1/2* compared to women that are either identified with mutations in non-*BRCA1/2* genes or not carrying any pathogenic mutations. The present thesis also demonstrates that high-grade serous ovarian carcinomas are more related to *BRCA1/2* mutations rather than non-*BRCA1/2* mutations, whereas, endometrioid and clear-cell ovarian carcinomas are less related to *BRCA1/2* mutations.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ACMG	American College of Medical Genetics and Genomics	Αμερικάνικο Κολέγιο Ιατρικής Γενετικής και Γονιδωματικής
AGCT	Adult Granulosa Cell Tumour	κοκκιοκυτταρικός όγκος ενήλικου τύπου
ARH3	ADP-ribosylhydrolase 3	υδρολάση 3 ADP-ριβόζης
ARID1A	AT-rich interactive domain 1A	τομέας αλληλεπίδρασης 1A πλούσιος σε AT
BARD1	BRCA1 associated RING domain 1	τομέας 1 δομής δακτυλίου σχετιζόμενος με BRCA1
BASC	BRCA1-associated genome surveillance complex	σύμπλοκο παρακολούθησης γονιδιώματος
BER	base-excision repair	επιδιόρθωση με εκτομή βάσης
BrCa	Breast Cancer	καρκίνος μαστού
BRCT	BRCA1 C-terminal	καρξοκυτελικός τομέας BRCA1
BRIP1	BRCA1-Interacting Protein 1	αλληλεπιδρούσα με BRCA1 πρωτεΐνη 1
CCC	clear cell carcinoma	διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα
CIMBA	Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2	Σύμπραξη Ερευνητών για Τροποποιητές των BRCA1/2
CK7	Cytokeratin 7	κυτοκερατίνη 7
CK20	Cytokeratin 20	κυτοκερατίνη 20
CRC	Colorectal Cancer	καρκίνος παχέος εντέρου
CTNNB1	Catenin Beta 1	β-κατενίνη
DCIS	Ductal Carcinoma In Situ	μη διηθητικό πορογενές καρκίνωμα
DDR	DNA Damage Response	μηχανισμός απόκρισης σε βλάβες του DNA
ddNTPs	Dideoxynucleotide triphosphates	τριφωσφορικά 2',3' διδεοξυ-νουκλεοτίδια
DICER1	ribonuclease III	ριβονουκλεάση III
DNA-PKcs	DNA-dependent Protein Kinase	DNA-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση
dNTPs	deoxynucleotide triphosphates	τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
EGFR	Epidermal growth factor receptor	υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα
EMA	Epithelial membrane antigen	επιθηλιακό μεμβρανικό αντιγόνο
EMA	European Medicines Agency	Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων
EOC	Epithelial ovarian cancer	επιθηλιακά ωθηκικά καρκινώματα
ER	Estrogen Receptor	υποδοχέας οιστρογόνων
FA	Fanconi anemia	Αναιμία Fanconi
FANCI	Fanconi Anemia Complementation Group J	ομάδα συμπληρωματικότητας J αναιμίας Fanconi
FANCD1	Fanconi anemia Complementation Group N	ομάδα συμπληρωματικότητας N αναιμίας Fanconi
FDA	Food and Drug Administration	Αμερικανικός Οργανισμός Φαρμάκων
FFPE	formalin-fixed paraffin-embedded	μονιμοποιημένος σε φορμαλίνη και εγκλεισμένος σε παραφίνη
GG-NER	Global-Genome NER	NER ολικού γονιδιώματος

GWAS	genome-wide association study	μελέτες συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος
HBOC	Hereditary breast–ovarian cancer	σύνδρομο κληρονομικού καρκίνου μαστού/ωοθηκών
HER2	human epidermal growth factor receptor 2	υποδοχέας 2 ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα
HGSC	High-grade serous carcinoma	υψηλόβαθμο ορώδες καρκίνωμα ωοθηκών
HR	Homologous Recombination	ομόλογος ανασυνδυασμός
ICLs	interstrand cross-links	διακλωνικές εγκάρσιες συνδέσεις
IHC	Immunohistochemistry	ανοσοϊστοχημική χρώση
LGSC	Low-grade serous carcinoma	χαμηλού βαθμού ορώδες καρκίνωμα
LumA	Luminal A	αυλικού τύπου A
LumB	Luminal B	αυλικού τύπου B
MAF	minor allele frequency	συχνότητα ελάσσονος αλληλομόρφου
MC	Mucinous Carcinoma	βλεννώδες καρκίνωμα
MGMT	O6-methylguanine DNA methyltransferase	DNA μεθυλοτρανσφεράση της O6-μεθυλογουανίνης
MMEJ	microhomology-mediated end-joining	μεσολαβούμενη από αλληλουχίες μικροομολογίας ένωση των άκρων
MMR	mismatch repair	επιδιόρθωση αταίριαστων βάσεων
MRE11	mitotic recombination 11	σύμπλοκο μιτωτικού ανασυνδυασμού 11
MSI	Microsatellite instability	μικροδορυφορική αστάθεια
NCCN	National Comprehensive Cancer Network	Εθνικό Δίκτυο των ΗΠΑ για τον Καρκίνο
NER	nucleotide-excision repair	επιδιόρθωση με εκτομή νουκλεοτιδίου
NGS	Next Generation Sequencing	αλληλούχηση επόμενης γενεάς
NHEJ	Non-homologous end joining	μη ομόλογη σύνδεση των άκρων
OR	Odds Ratios	λόγοι σχετικών πιθανοτήτων
OvCa	Ovarian Cancer	καρκίνος των ωοθηκών
pADPr	poly(ADP-ribose) polymer	πολυμερές πολυ(ADP-ριβόζης)
PALB2	partner and localizer of BRCA2	
PAM50	Prediction Analysis of Microarray	προβλεπτική ανάλυση με μικροσυστοιχίες για 50 γονίδια
PARG	Poly(ADP-ribose) glycohydrolase	γλυκούδρολάση πολυ(ADP-ριβόζης)
PARP	poly(ADP-ribose)polymerase	πολυμεράση πολυ(ADP-ριβόζης)
PARP1	Poly [ADP-ribose] polymerase 1	πολυμεράση 1 πολυ(ADP-ριβόζης)
PCR	Polymerase Chain Reaction	αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PDX	patient-derived xenografts	ξеноμοσχεύματα προερχόμενα από ασθενή
PR	Progesterone Receptor	υποδοχέας προγεστερόνης
PRS	Polygenic Risk Score	βαθμολογία πολυγονιδιακού κινδύνου
RPA	Replication protein A	πρωτεΐνη αντιγραφής A
RTPS2	Rhabdoid Tumor Predisposition Syndrome-2	σύνδρομο προδιάθεσης σε ραβδοειδείς όγκους τύπου 2
SBT	Serous borderline tumor	ορώδης όγκος οριακής κακοήθειας

SCCOHT	Small Cell Carcinoma of the Ovary Hypercalcaemic Type	μικροκυτταρικό καρκίνωμα ωοθηκών υπερασβεσσιαμικού τύπου
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate	θεικό δωδεκύλιο νάτριο
SIC	Serous intraepithelial carcinoma	ορώδες ενδοεπιθηλιακό καρκίνωμα
SLCT	Sertoli–Leydig Cell Tumour	όγκοι από κύτταρα Sertoli-Leydig
SMARCA4	SWI/SNF Related Matrix Associated Actin Dependent Regulator Of Chromatin Subfamily A Member 4	συστατικό του συμπλέγματος αναδιαμόρφωσης χρωματίνης SWI/SNF
SNV	single-nucleotide variant	παραλλαγή μονού νουκλεοτιδίου
SSB	single-stranded breaks	θραύσεις μονών αλύσων του DNA
STIC	Serous tubal intraepithelial carcinoma	ορώδες ενδοεπιθηλιακό καρκίνωμα των σαλπίνγων
TC-NER	Transcription – coupled NER	μεταγραφική NER
TLS	translesion synthesis	σύνθεση δια μέσου βλάβης
TNBC	triple-negative breast cancer	τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού
VUS	Variants of Unknown Significance	παραλλαγές άγνωστης κλινικής σημασίας
wt	wild-type	αγρίου τύπου
XRCC1	X-Ray Repair Cross Complementing 1	πρωτεΐνη επιδιόρθωσης βλαβών μονών αλύσων του DNA
53BP1	p53-binding protein 1	πρωτεΐνη πρόσδεσης 1 στο p53
95% CI	95% confidence interval	διάστημα εμπιστοσύνης 95%

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Εισαγωγή στον καρκίνο του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί την πιο συχνή κακοήθεια στις γυναίκες τόσο σε αναπτυγμένες όσο και σε αναπτυσσόμενες χώρες, με τον δια βίου κίνδυνο ανάπτυξης να προσεγγίζει το 12%. Υπολογίζεται ότι το 5-10% όλων των περιστατικών καρκίνων του μαστού συνδέεται με κληρονομικό υπόβαθρο, χαρακτηριζόμενο από νεαρή ηλικία διάγνωσης και πολλαπλά περιστατικά καρκίνου μαστού ή/και ωθηκών, αμφοτερόπλευρου καρκίνου του μαστού, ανδρικού καρκίνου του μαστού, παγκρέατος, κ.ά. [1].

Ο οικογενής καρκίνος του μαστού ορίζεται από συγκεκριμένα κριτήρια, τα οποία, μεταξύ άλλων, είναι η διάγνωση καρκίνου του μαστού πριν τα 50 έτη, τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού πριν τα 60 έτη, δύο πρωτοπαθών καρκίνων του μαστού, ανδρικού καρκίνου του μαστού, καρκίνου των ωθηκών σε οποιαδήποτε ηλικία, ή το βεβαρυμμένο οικογενειακό ιστορικό, όπως διάγνωση σε συγγενή 1^{ου} ή 2^{ου} βαθμού καρκίνου του μαστού πριν τα 45 έτη, καρκίνου των ωθηκών σε οποιαδήποτε ηλικία, ανδρικού καρκίνου του μαστού, ή τουλάχιστον δύο περιστατικών καρκίνου του μαστού στην ίδια μητρική ή πατρική πλευρά, με το ένα τουλάχιστον να έχει διαγνωστεί πριν από τα 50 έτη [2].

Περίπου το 1/3 των περιστατικών καρκίνου του οικογενούς καρκίνου μαστού έχει ένα σαφώς ταυτοποιημένο γενετικό υπόβαθρο. Η πλειονότητα αφορά μεταλλάξεις υψηλής διεισδυτικότητας για τον καρκίνο του μαστού σε ένα από τα γονίδια *BRCA1*, *BRCA2*, *PTEN*, *TP53*, *CDH1* και *STK11*, η ταυτοποίηση των οποίων συνοδεύεται από κατευθυντήριες οδηγίες ορθής κλινικής διαχείρισης των ατόμων που τις φέρουν. Ωστόσο, έχουν ταυτοποιηθεί και γονίδια μέτριας διεισδυτικότητας (*CHEK2*, *ATM*, *BRIP1* και *PALB2*), οι μεταλλάξεις των οποίων εξηγούν ένα μικρό ποσοστό αυτών των περιστατικών [3].

Τα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2* στον καρκίνο του μαστού

Το 1990 μέσω ανάλυσης σύνδεσης ταυτοποιήθηκε το γονίδιο *BRCA1*, το πρώτο γονίδιο που συνδέθηκε με τον κληρονομικό καρκίνο του μαστού. Εδράζεται στο χρωμόσωμα 17, συγκεκριμένα στη θέση 17q21.3 [4]. Το δεύτερο γονίδιο που συσχετίστηκε με την κληρονομικότητα στον καρκίνο του μαστού ήταν το *BRCA2*, το οποίο χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 13 (θέση 13q12-13) το 1994 [5] [6].

Το γονίδιο *BRCA1*

Το γονίδιο *BRCA1* αποτελείται από 24 εξόνια που κωδικοποιούν μια πρωτεΐνη 1.863 αμινοξέων (NM_007294.3), εδράζεται στο χρωμόσωμα 17q21.3 και καλύπτει μια περιοχή περίπου 80kb γενωμικού DNA. Η πρωτεΐνη *BRCA1* εμφανίζει περιορισμένη ομολογία με άλλες πρωτεΐνες, αλλά περιέχει δύο λειτουργικούς τομείς. Στο αμινοτελικό άκρο της, περιέχει μια σειρά οκτώ συντηρημένων επαναλήψεων Cys3-His-Cys4 που ορίζουν τον τομέα RING, απαραίτητος για τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις και την ουβικιτινίωση των πρωτεϊνών. Είναι γνωστό ότι η *BRCA1* αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη BARD1 (**BRCA1 associated RING domain protein 1**), σχηματίζοντας το ετεροδιμερές *BRCA1/BARD1*, ένα γνωστό σύμπλοκο λιγάσης E3 ουβικουΐτινης, απαραίτητο για τη σταθερότητα των δύο πρωτεϊνών [7] [8] [9]. Μετά από βλάβη στο DNA, το ετεροδιμερές *BRCA1/BARD1* μεσολαβεί στην ουβικουΐτινίωση της ιστόνης H2A, με αύξηση της δραστηριότητας της λιγάσης E3 στις θραύσεις των δύο αλυσίδων του DNA, μέσω εξαρτώμενης από τις πρωτεΐνες PIAS1/4 σουμοΰλωσης της *BRCA1*. Επί μειωμένων πρωτεϊνικών επιπέδων των PIAS1/4 προκύπτει ανεπάρκεια στην επιδιόρθωση των θραύσεων των δύο αλυσίδων του DNA και ευαισθησία σε παράγοντες που επιφέρουν βλάβες στο DNA, υποδηλώνοντας ότι η εξαρτώμενη από την *BRCA1* ουβικιτινίωση στις θέσεις θραύσεων παίζει σημαντικό ρόλο στην επιδιόρθωση αυτών και κατά συνέπεια στην ογκοκαταστολή. Από την άλλη πλευρά, το καρβοξυτελικό άκρο της *BRCA1* περιλαμβάνει δύο συντηρημένους τομείς BRCT (**BRCA1 C-terminal**) με δράση ενίσχυσης της ενεργοποίησης (διενεργοποίηση) [10] [11]. Στην περιοχή αυτή έχουν ταυτοποιηθεί αρκετές μεταλλάξεις προδιάθεσης στον καρκίνο που επηρεάζουν τόσο τη μετενεργοποίηση της *BRCA1* όσο και τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις [8]

[12]. Επιπλέον, η BRCA1 περιέχει δύο σήματα πυρηνικού εντοπισμού στα αμινοξέα 503-509 και 606-615, αντίστοιχα, τα οποία στοχεύουν την BRCA1 στον πυρήνα. Η κεντρική περιοχή της πρωτεΐνης αυτής, που κωδικοποιείται από ένα μόνο εξόνιο, το εξόνιο 11, δεν περιλαμβάνει κάποιο γνωστό δομημένο τομέα, αλλά είναι σημαντική διότι κατά μήκος της εντοπίζονται θέσεις φωσφορυλίωσης επαγόμενες από βλάβες στο DNA που συμβάλλουν στο σχηματισμό συμπλόκων με άλλα μόρια [11].

Το γονίδιο *BRCA2*

Το γονίδιο *BRCA2* αποτελείται από 27 εξόνια που κωδικοποιούν μια πρωτεΐνη 3.418 αμινοξέων (NM_000059.3) και εδράζεται στο μακρύ βραχίονα (q) του χρωμοσώματος 13 στη θέση 12.3 (13q12.3). Η πρωτεΐνη BRCA2 περιλαμβάνει οχτώ συντηρημένα μοτίβα επαναλήψεων περίπου 35 αμινοξέων (επαναλήψεις BRC), που συνιστούν το εξόνιο 11, μέσω του οποίου πραγματοποιείται η πρόσδεση με τη RAD51, μια σημαντική πρωτεΐνη που συμμετέχει στην επιδιόρθωση μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού. Το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης περιλαμβάνει έναν τομέα μεταγραφικής ενεργοποίησης, ενώ το καρβοξυτελικό άκρο, το οποίο αποτελεί περιοχή πρόσδεσης μορίων DNA, συνίσταται από έναν συντηρημένο ελικοειδή τομέα και τρεις τομείς πρόσδεσης (τομείς OB). Επιπλέον, έχουν ταυτοποιηθεί δύο σήματα πυρηνικού εντοπισμού (NLS) στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης [13, 14].

Διεισδυτικότητα των μεταλλάξεων και λειτουργίες των γονιδίων BRCA1 και BRCA2

Με βάση τη θεωρία των δύο χτυπημάτων του Knudson [15], μια μετάλλαξη γαμετικής σειράς στα γονίδια *BRCA1* ή *BRCA2* αντιστοιχεί στο πρώτο χτύπημα, ενώ πραγματοποιείται και μια δεύτερη μετάλλαξη απενεργοποίησης στα σωματικά κύτταρα που αφορά την απαλοιφή του αλληλομόρφου αγρίου τύπου, οδηγώντας στην απώλεια της ετεροζυγωτίας (LOH), φαινόμενο που συναντάται στην πλειονότητα των όγκων (>80%) ασθενών που φέρουν μεταλλάξεις στα γονίδια αυτά [16].

Οι μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1/2*, οι οποίες κληρονομούνται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο, συνιστούν το σύνδρομο του Κληρονομικού Καρκίνου Μαστού-Ωοθηκών (HBOC), ωστόσο, ο κλινικός φαινότυπος που το συνοδεύει εντοπίζεται και σε άτομα που δε φέρουν μεταλλάξεις στα συγκεκριμένα γονίδια. Το ποσοστό των μεταλλάξεων στα δύο αυτά γονίδια προσεγγίζει περίπου το 25% στον κληρονομικό καρκίνο μαστού, με τις γυναίκες που φέρουν μεταλλάξεις σε ένα από τα γονίδια αυτά να έχουν αυξημένο δια βίου κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου των ωοθηκών ή δεύτερου πρωτοπαθούς καρκίνου του μαστού, ενώ οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *BRCA2* αυξάνουν επιπλέον τον κίνδυνο εμφάνισης ανδρικού καρκίνου μαστού, καρκίνου προστάτη, παγκρέατος, χοληδόχου κύστεως, χοληφόρου πόρου, στομάχου και μελανώματος [3, 17].

Ωστόσο, η διεισδυτικότητα των μεταλλάξεων των γονιδίων *BRCA1* και *BRCA2* είναι ατελής και εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες, όπως ο τύπος και η θέση της μετάλλαξης, καθώς και από εξωγενείς παράγοντες, όπως το σωματικό βάρος, η ηλικία εμμηναρχής, πρώτης τελειόμηνης κύησης, εμμηνόπαυσης και η άσκηση που επηρεάζουν τη χρονική εκδήλωση του καρκίνου του μαστού. Συνεπώς, έχει υπολογιστεί ότι ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του μαστού μέχρι την ηλικία των 70 ετών σε γυναίκες που φέρουν μετάλλαξη στα γονίδια *BRCA1/2* κυμαίνεται μεταξύ 45% και 87%, ενώ ο αντίστοιχος κίνδυνος για τον καρκίνο των ωοθηκών ανέρχεται στο 45-60% για μεταλλάξεις στο γονίδιο *BRCA1* και στο 11-35% για μεταλλάξεις στο γονίδιο *BRCA2* [18].

Τα *BRCA1* και *BRCA2*, ως ογκοκατασταλτικά γονίδια, συμβάλλουν στη διατήρηση της γονιδιωματικής σταθερότητας μέσω του ρόλου τους στα μονοπάτια σηματοδότησης και επιδιόρθωσης βλαβών του DNA. Οι πρωτεΐνες *BRCA1* και *BRCA2* εμπλέκονται στην επιδιόρθωση θραύσεων των δύο αλυσίδων του DNA μέσω του μηχανισμού του ομόλογου ανασυνδυασμού (HR) με αλληλεπιδράσεις με την πρωτεΐνη *RAD51*. Μετά από βλάβη στο DNA, η *BRCA1* θα αλληλεπιδράσει με τη *RAD51* σχηματίζοντας εστίες *RAD51* οι οποίες θα εδράσουν στην προσβεβλημένη περιοχή, όπου εκεί θα φωσφορυλιωθεί η *BRCA1*. Η *BRCA2* λειτουργεί καθοδικά της *BRCA1* σχηματίζοντας σύμπλοκο με τη *RAD51*, τόσο μέσω των επαναλήψεων *BRC*

όσο και μέσω του καρβοξυτελικού άκρου της. Συνεπώς, επί απουσίας της BRCA2 δεν είναι εφικτός ο σχηματισμός εστιών RAD51 μετά από βλάβη στο DNA. Τα κύτταρα με ανεπάρκεια σε BRCA1 ή BRCA2 δεν είναι σε θέση να επιδιορθώσουν τις θραύσεις στις δύο αλυσίδες του DNA, με αποτέλεσμα αυτές να υπόκεινται σε επιδιόρθωση μέσω ενός άλλου μηχανισμού επιδιόρθωσης επιρρεπούς σε λάθη, τη μη ομόλογη σύνδεση των άκρων (NHEJ), οδηγώντας σε χρωμοσωμική αστάθεια και συχνά στον κυτταρικό θάνατο [1] [19] [20].

Ωστόσο, η πρωτεΐνη BRCA1 εμφανίζει επιπρόσθετες λειτουργίες στην επιδιόρθωση του DNA. Συγκεκριμένα, αποτελεί μέρος του σχετιζόμενου με την BRCA1 συμπλόκου παρακολούθησης γονιδιώματος (BASC), που περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες ATM, RAD50, MRE11 και NBS1 και τις πρωτεΐνες επιδιόρθωσης αταίριαστων βάσεων MLH1, PMS2, MSH2 και MSH6. Επιπλέον, συμμετέχει στη συζευγμένη με τη μεταγραφή επιδιόρθωση μέσω εκτομής, την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και στον έλεγχο σημείων του κυτταρικού κύκλου [19] [21].

Σε αμφότερα τα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2* οι πιο κοινοί τύποι παθογόνων μεταλλάξεων είναι οι μικρές απαλοιφές ή ενθέσεις ή οι μη νοηματικές μεταλλάξεις που οδηγούν σε σχηματισμό πρόωρου κωδικονίου τερματισμού και κατά συνέπεια σε μη λειτουργική πρωτεΐνη. Επιπλέον, ταυτοποιούνται μεταλλάξεις στις περιοχές ματίσματος, καθώς και μεγάλες γονιδιακές αναδιατάξεις. Οι παρανοηματικές μεταλλάξεις και οι σιωπηλές ή συνώνυμες μεταλλάξεις αποτελούν επίσης πολύ συχνά εντοπισμένους τύπους μεταλλάξεων. Ωστόσο, στην περίπτωση αυτή, η δυσκολία έγκειται στον καθορισμό της παθογονικότητάς τους και στην επακόλουθη κλινική ερμηνεία αυτών. Άλλοι τύποι μεταλλάξεων με ασαφή παθογονικότητα αποτελούν οι μικρές ενθέσεις και απαλοιφές εντός πλαισίου ανάγνωσης, καθώς και οι παραλλαγές σε πιθανές θέσεις ματίσματος. Συνεπώς, προκύπτουν παραλλαγές άγνωστης κλινικής σημασίας (VUS) και στα δύο γονίδια, οι οποίες χρήζουν ορθής αξιολόγησης μέσω γενετικών, ιστοπαθολογικών και άλλων κλινικών δεδομένων [1] [22]. Περίπου το 15% των οικογενών καρκίνων του μαστού συνδέεται με μεταλλάξεις όλων των τύπων στα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2*. Σε ορισμένους πληθυσμούς η συχνότητα των μεταλλάξεων είναι υψηλότερη λόγω παρουσίας

ιδρυτικών μεταλλάξεων, όπως για παράδειγμα ο πληθυσμός των Εβραίων Ashkenazi όπου τρεις μεταλλάξεις μόνο (*BRCA1_c.185delAG*, *BRCA1_c.5382insC* και *BRCA2_c.6174delT*) αντιπροσωπεύουν την πλειονότητα των κληρονομικών περιστατικών (~10 του συνόλου των περιστατικών) [18] [23].

Ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά του κληρονομικού καρκίνου του μαστού

Η πλειονότητα των περιστατικών καρκίνων του μαστού (>80%) σε ασθενείς με μετάλλαξη στα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2* αφορούν στο διηθητικό πορογενές καρκίνωμα. Τα μυελοειδή καρκινώματα μαστού παρουσιάζουν ιδιαίτερα υψηλή συχνότητα, αντιπροσωπεύοντας περίπου το 10% των όγκων με μετάλλαξη στο *BRCA1* και αφορούν σε υψηλού βαθμού καρκινώματα χαμηλής διαφοροποίησης με διάχυτη λεμφοκυτταρική διήθηση, αλλά με αξιοσημείωτη καλή πρόγνωση, λόγω χαμηλής συχνότητας λεμφαδενικής μετάστασης [24]. Έναν άλλο ιστολογικό τύπο καρκίνου του μαστού αποτελούν τα διηθητικά λοβιακά και σωληνοειδή καρκινώματα που έχουν συνδεθεί με μεταλλάξεις στο γονίδιο *BRCA2*, με την πλειονότητα αυτών των όγκων να χαρακτηρίζονται από μέτριο προς υψηλό βαθμό διαφοροποίησης και υψηλούς ρυθμούς μιτωτικών διαιρέσεων. Οι όγκοι μαστού που συνοδεύονται από μετάλλαξη στο γονίδιο *BRCA1* είναι κυρίως χαμηλού βαθμού διαφοροποίησης, με υψηλότερο αριθμό μιτώσεων, μεγάλη συχνότητα νεκρωτικών περιοχών και λεμφοκυτταρικής διήθησης, καθιστώντας τους περισσότερο επιθετικούς [25].

Οι ανοσοϊστοχημικοί δείκτες που χαρακτηρίζουν ένα καρκίνωμα μαστού παρέχουν σημαντικές πληροφορίες θεραπείας και πρόγνωσης. Συγκεκριμένα, οι σημαντικότεροι εξ αυτών είναι ο υποδοχέας των οιστρογόνων (ER), ο υποδοχέας της προγεστερόνης (PR) και η ογκοπρωτεΐνη HER2. Μεταξύ των σποραδικών όγκων, το 70% αυτών είναι θετικοί στον ER και το 50% είναι θετικοί στον PR, ενώ το HER2 υπερεκφράζεται περίπου στο 15% των περιπτώσεων. Οι θετικοί στον ER όγκοι ανταποκρίνονται καλύτερα στην αντι-οιστρογονική θεραπεία, ενώ οι όγκοι που υπερεκφράζουν το HER2 ανταποκρίνονται ικανοποιητικά σε στοχευμένη θεραπεία,

όπως η τραστοζουμάμπη (Herceptin). Αντίθετα, περίπου το 20% των καρκίνων μαστού δεν εκφράζουν τα ER, PR και HER2 και ονομάζονται «τριπλά αρνητικοί». Οι όγκοι αυτοί συνήθως συνδέονται με κακή πρόγνωση, λόγω του ότι είναι περισσότερο επιθετικοί και οι θεραπείες ενάντια στο HER2 δεν είναι αποτελεσματικές [26].

Η πλειονότητα των όγκων με μετάλλαξη στο γονίδιο *BRCA1* παρουσιάζει βασικό/επιθηλιακό φαινότυπο που συνδέεται με έκφραση διαφόρων δεικτών, όπως κυτοκερατίνες CK5/CK6, CK14, βιμεντίνη, λαμινίνη και EGFR [27], ενώ χαρακτηρίζονται από υψηλή συχνότητα σωματικών μεταλλάξεων του γονιδίου TP53, συγκριτικά με τους σποραδικούς καρκίνους μαστού [28]. Αντίθετα, οι όγκοι με μετάλλαξη στο γονίδιο *BRCA2* προσεγγίζουν περισσότερο την ιστοπαθολογία των σποραδικών όγκων αναφορικά με την έκφραση των ανοσοϊστοχημικών δεικτών. Συγκεκριμένα, η πλειονότητα αυτών των όγκων μαστού εμφανίζουν φαινότυπο αυλικού τύπου με υπερέκφραση των ER και PR και των κυτοκερατινών CK8 και CK18. Οι οικογενείς καρκίνοι μαστού που δε συνδέονται με μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2* είναι συχνά χαμηλότερου βαθμού διαφοροποίησης σε σύγκριση με τους σποραδικούς καρκίνους, αλλά με ανοσοϊστοχημικά προφίλ παρόμοια με αυτά των σποραδικών καρκίνων [29].

Μοριακοί υπότυποι κληρονομικού καρκίνου μαστού

Ο καρκίνος του μαστού κατηγοριοποιείται σε τέσσερις ενδογενείς μοριακούς υπότυπους, οι οποίοι είναι οι εξής: βασικού τύπου, αυλικού τύπου A (lumA), αυλικού τύπου B (lumB), και εμπλουτισμένοι με HER2. Οι υπότυποι αυτοί χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά και κλινική έκβαση. Οι καρκίνοι μαστού βασικού τύπου είναι κυρίως όγκοι υψηλού βαθμού διαφοροποίησης και τριπλά αρνητικοί, ενώ οι εμπλουτισμένοι με HER2 καρκίνοι παρουσιάζουν ενισχυμένη έκφραση του γονιδίου *HER2 (ERBB2)*. Οι καρκίνοι μαστού αυλικού τύπου είναι θετικοί στον ER. Πιο αναλυτικά, ο υπότυπος lumA αφορά σε όγκους χαμηλού βαθμού κακοήθειας και θετικούς στον PR, ενώ ο υπότυπος lumB

χαρακτηρίζει όγκους κυρίως υψηλού βαθμού κακοήθειας και αρνητικούς στον PR, με δυσμενέστερη πρόγνωση συγκριτικά με τον υπότυπο A [30]. Πρέπει να αναφερθεί ότι ο καρκίνος του μαστού με μετάλλαξη στο γονίδιο *BRCA1* συνδέεται κυρίως με τον βασικό μοριακό υπότυπο (74%), ενώ ο καρκίνος μαστού με μετάλλαξη στο γονίδιο *BRCA2* σχετίζεται με τον μοριακό υπότυπο lumB (73%) [31].

Θεωρείται ότι ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου και ο υπότυπος του προκύπτοντος όγκου μπορεί να είναι αποτέλεσμα είτε μεμονωμένων μεταλλάξεων σε γονίδια υψηλής διεισδυτικότητας είτε πολλαπλών μεταλλάξεων σε γονίδια μέτριας και χαμηλής διεισδυτικότητας που δρουν συνεργιστικά. Συνεπώς, κρίνεται απαραίτητη η ομαδοποίηση οικογενειών με περιστατικά καρκίνων μαστού με βάση κοινά μοριακά χαρακτηριστικά προκειμένου να ταυτοποιηθούν νέα γονίδια προδιάθεσης στον καρκίνο με υψηλή διεισδυτικότητα [1].

Ο τριπλά αρνητικός καρκίνος μαστού

Ο υπότυπος του τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού (triple-negative breast cancer, TNBC) ορίζεται από την αρνητική έκφραση του υποδοχέα των οιστρογόνων (ER), του υποδοχέα της προγεστερόνης (PR) και της ογκοπρωτεΐνης HER2 και σχετίζεται με κακή πρόγνωση. Ο συγκεκριμένος φαινότυπος αντιπροσωπεύει το 12-24% όλων των καρκίνων του μαστού, συνοδεύεται από νεαρή ηλικία διάγνωσης, ενώ εμφανίζεται με υψηλές συχνότητες σε πληθυσμούς Αφροαμερικανών [32].

Η πλειονότητα των τριπλά αρνητικών καρκίνων μαστού είναι διηθητικά πορογενή καρκινώματα υψηλού βαθμού διαφοροποίησης, που χαρακτηρίζονται από σημαντική πυρηνική πλειομορφία, έλλειψη σχηματισμού σωληναρίων/αδένων και υψηλούς ρυθμούς μιτωτικών διαιρέσεων, ενώ συχνά εμφανίζουν έντονη λεμφοκυτταρική διήθηση και περιοχές κεντρικής νέκρωσης. Σε ένα υποσύνολο αυτών των όγκων μπορούν να αναγνωριστούν μυελοειδή χαρακτηριστικά και περιοχές εστιακής μεταπλαστικής διαφοροποίησης υπό τη μορφή πλακωδών και ατρακτοειδών κυττάρων [33].

Αναφορικά με την ορολογία των υποτύπων του τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού, ο Lehmann και οι συνεργάτες του [34] διαπίστωσαν ότι ο τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού είναι ένα σύνολο πολλαπλών μοριακών υποτύπων, που συνοψίζονται σε τρεις βασικές κατηγορίες, βασικού, μεσεγγυματικού και αυλικού υπότυπου AR, με τον τελευταίο να προσομοιάζει τον καρκίνο μαστού αυλικού τύπου θετικό στον ER. Τόσο η ομάδα του Lehmann όσο και η ομάδα του Pegou και των συνεργατών του [35], που περιέγραψαν πρώτα τους βασικούς υπότυπους του καρκίνου του μαστού και εξελίχθηκαν μεταγενέστερα μέσω της δοκιμασίας PAM50 (**P**rediction **A**nalysis of **M**icroarray-για ένα σύνολο 50 γονιδίων) [36], αναγνώρισαν τον υπότυπο του «βασικού-τύπου». Με βάση τη δοκιμασία PAM50, οι καρκίνοι μαστού βασικού τύπου συμπεριλαμβάνουν τριπλά αρνητικούς καρκίνους μαστού βασικού τύπου, καθώς και ορισμένους όγκους μεσεγγυματικού τύπου, όπως ορίζονται από την ομάδα του Lehmann και των συνεργατών του. Ομοίως, οι πρότυποι ιστολογικοί ορισμοί του τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού βασικού τύπου, που περιλαμβάνουν θετικότητα στον υποδοχέα του EGF (EGFR) ή στις κυτοκερατίνες βασικού τύπου, πιθανόν να αναγνωρίζουν υπότυπους των τριπλά αρνητικών καρκίνων μαστού τόσο βασικού όσο και μεσεγγυματικού τύπου [33].

Θα πρέπει να αναφερθεί ότι ο τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού συνδέεται συνήθως με νεαρή ηλικία διάγνωσης και θετικό οικογενειακό ιστορικό καρκίνου μαστού ή/και ωοθηκών σε περισσότερο από το ένα τρίτο όλων των περιπτώσεων, υποδηλώνοντας ότι αυτός ο ιστολογικός τύπος καρκίνου σχετίζεται με ένα κληρονομικό αίτιο [32]. Σε μελέτη του Couch και των συνεργατών του αποδείχθηκε ότι το 11.2% μη επιλεγμένων για οικογενειακό ιστορικό και ηλικία διάγνωσης περιστατικών τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού είχε παθογόνους μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1* (8.5%) και *BRCA2* (2.7%), αντίστοιχα. Επιπλέον, οι ασθενείς με τριπλά αρνητικό καρκίνο μαστού και μεταλλάξεις στα γονίδια αυτά είχαν μικρότερη ηλικία διάγνωσης (μέση ηλικία διάγνωσης τα 44 και 47 έτη για ασθενείς με μετάλλαξη στα *BRCA1* και *BRCA2*, αντίστοιχα) και όγκους υψηλότερου βαθμού διαφοροποίησης από τους ασθενείς με τριπλά αρνητικό καρκίνο μαστού

που δεν έφεραν παθογόνους μεταλλάξεις (μέση ηλικία διάγνωσης τα 51 έτη) [37]. Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι το 66-70% των καρκίνων μαστού που συνοδεύονται από μεταλλάξεις στο γονίδιο *BRCA1* και το 16-23% των καρκίνων μαστού με μεταλλάξεις στο γονίδιο *BRCA2* είναι τριπλά αρνητικοί. Ωστόσο, εκτός από τα γονίδια αυτά, μεταλλάξεις στα γονίδια *PALB2* και *FANCM* δείχθηκε επίσης να σχετίζονται με τον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού [38].

Επί του συνόλου, οι ασθενείς με τριπλά αρνητικό καρκίνο μαστού ή βασικού-τύπου καρκίνο μαστού παρουσιάζουν έναν επιθετικό κλινικό φαινότυπο, χωρίς να επωφελούνται από ενδοκρινή ή αντι-HER2 θεραπεία. Ωστόσο, ένα υποσύνολο αυτών των όγκων είναι ιδιαίτερος ευαίσθητο στη χημειοθεραπεία και σχετίζονται με καλή πρόγνωση όταν αντιμετωπίζονται με συμβατικά χημειοθεραπευτικά σχήματα. Επιπλέον, ορισμένοι εξ αυτών μπορεί να χαρακτηρίζονται από ανεπάρκεια λειτουργικότητας του γονιδίου *BRCA1* καθιστώντας τους ευαίσθητους σε παράγοντες όπως άλατα πλατίνας και αναστολείς του ενζύμου της PARP (poly(ADP-ribose)polymerase) που στοχεύουν επιλεκτικά τα κύτταρα με ανεπάρκεια στην επιδιόρθωση του DNA μέσω του μηχανισμού του ομόλογου ανασυνδυασμού [39]. Συνεπώς, απαιτείται η καθιέρωση στοχευμένων, εξαρτώμενων από τον μοριακό υπότυπο, θεραπειών. Επί του παρόντος, είναι σε εξέλιξη κλινικές μελέτες κυρίως για τους αναστολείς της PARP και τις θεραπείες με βάση την πλατίνα, αλλά και για αναστολείς σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος, αναστολείς υποδοχέων ανδρογόνων και αναστολείς υποδοχέα αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα [40].

Κλινικές οδηγίες για άτομα που φέρουν μεταλλάξεις σε γονίδια που προδιαθέτουν στον καρκίνο του μαστού

Για τα άτομα που φέρουν παθογόνους μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1/2* έχουν συσταθεί κλινικές οδηγίες διαχείρισης του κινδύνου για καρκίνο μαστού. Συγκεκριμένα, συστήνεται ετήσια MRI μαστού από την ηλικία των 25 ετών ή μαστογραφία σε ένα εξατομικευμένο πρωτόκολλο παρακολούθησης λαμβάνοντας υπ' όψιν και το οικογενειακό ιστορικό του ατόμου. Μετά την ηλικία των 30 ετών η

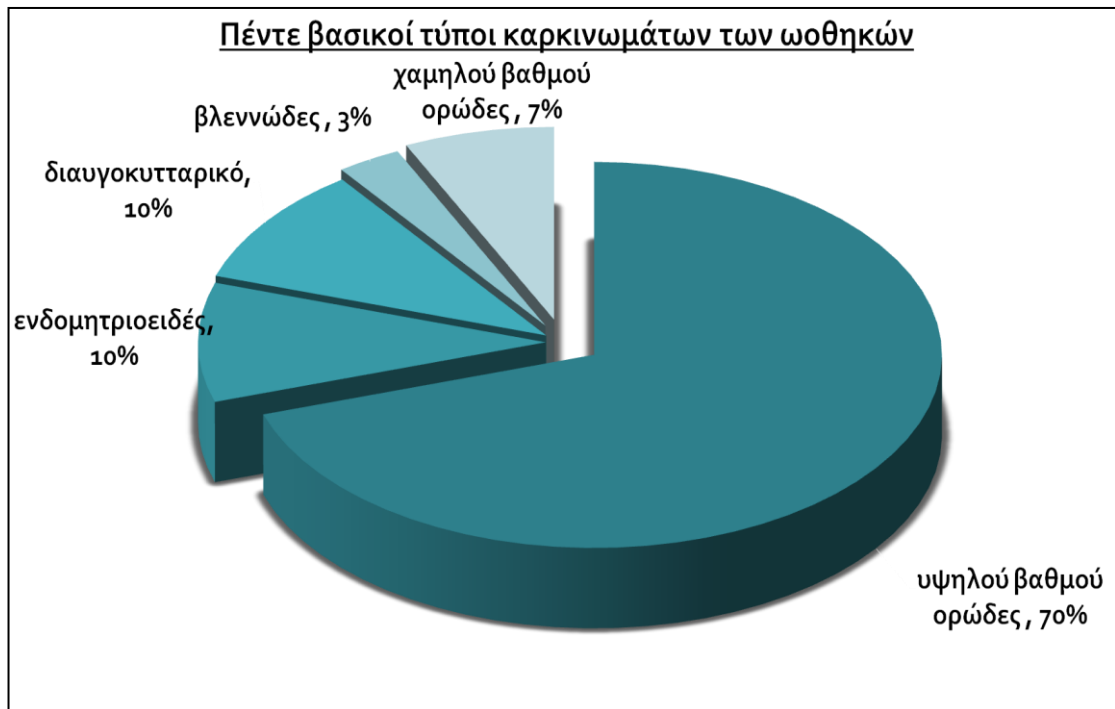
στρατηγική παρακολούθησης περιλαμβάνει ετήσια μαστογραφία και MRI μαστού. Από την άλλη πλευρά, η μείωση του κινδύνου για καρκίνο του μαστού μέσω προφυλακτικής αμφοτερόπλευρης μαστεκτομής είναι μια εναλλακτική που θα πρέπει να συζητηθεί. Έχει αποδειχθεί ότι η προφυλακτική αμφοτερόπλευρη μαστεκτομή επιφέρει τουλάχιστον 90% μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του μαστού σε άτομα με παθογόνους μεταλλάξεις στα *BRCA1/2* ή σε άλλα γονίδια που συνδέονται με ενδιάμεσο και υψηλό κίνδυνο για καρκίνο μαστού. Στους άνδρες με παθογόνους μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1/2* συστήνεται ετήσια κλινική εξέταση μαστού από την ηλικία των 35 ετών, ενώ επί παρουσίας μεταλλάξεων στο *BRCA2* θα πρέπει να παρακολουθείται κλινικά και ο προστάτης από την ηλικία των 45 ετών [2] [41].

2. Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ

Εισαγωγή στον καρκίνο των ωοθηκών

Ο καρκίνος των ωοθηκών αποτελεί τον έβδομο πιο συχνά εμφανιζόμενο καρκίνο στις γυναίκες και την κύρια αιτία θανάτου από γυναικολογικό καρκίνο παγκοσμίως, με τον κίνδυνο εμφάνισης στο γενικό πληθυσμό να προσεγγίζει το 1.7% [42]. Παρά τις σημαντικές προσπάθειες, οι ποικίλες στρατηγικές παρακολούθησης και θεραπείας δεν έχουν οδηγήσει σε μια βελτιωμένη συνολική επιβίωση, με τη 10ετή επιβίωση να μην ξεπερνά το 30% [43].

Περίπου το 90% των καρκίνων των ωοθηκών προκύπτουν από το ωοθηκικό επιθήλιο που καλύπτει τον εξωτερικό φλοιό και χαρακτηρίζονται ως επιθηλιακά ωοθηκικά καρκινώματα (EOC). Το υπόλοιπο 10% αφορά σε μη επιθηλιακά ωοθηκικά καρκινώματα που περιλαμβάνουν καρκινοσαρκώματα, όγκους γεννητικών χορδών, όγκους από αρχέγονα γεννητικά κύτταρα και άλλες σπάνιες μορφές. Το υψηλόβαθμο ορώδες αδενοκαρκίνωμα αποτελεί τον κυρίαρχο ιστολογικό τύπο, που αντιπροσωπεύει περίπου το 70% όλων των επιθηλιακών ωοθηκικών καρκινωμάτων, και ακολουθούν τα ενδομητριοειδή (~10%), τα διαυγοκυτταρικά (~10%), τα χαμηλόβαθμα ορώδη (~7%) και τα βλεννώδη (~3%) (Σχήμα 1). Το υψηλόβαθμο ορώδες καρκίνωμα των ωοθηκών διαγιγνώσκεται σε προχωρημένο στάδιο περίπου στο 70% των περιπτώσεων, με τις γυναίκες αυτές να έχουν σημαντικά χειρότερη πρόγνωση από τις γυναίκες που βρίσκονται σε πρώιμο στάδιο της νόσου. Σε οικογένειες που εντοπίζεται κληρονομικό υπόβαθρο, ο καρκίνος των ωοθηκών εμφανίζεται συχνά σε νεαρότερη ηλικία συγκριτικά με το μέσο όρο και μπορεί να συνοδεύεται και από άλλους τύπους καρκίνου μέσα στην οικογένεια στα πλαίσια καρκινικών συνδρόμων, όπως καρκίνο του μαστού (κληρονομικό σύνδρομο καρκίνου μαστού/ωοθηκών) ή καρκίνο παχέος εντέρου και ορθού (σύνδρομο Lynch) [44].



Σχήμα 1. Κατηγοριοποίηση των επιθηλιακών καρκινωμάτων των ωθηκών σε πέντε βασικούς τύπους.

Ιστοπαθολογία του καρκίνου των ωθηκών

Το υψηλόβαθμο ορώδες καρκίνωμα ωθηκών σχετίζεται περισσότερο με μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2* από τους όγκους χαμηλότερου βαθμού κακοήθειας. Τα ενδομητριοειδή και διαυγοκυτταρικά ωθηκικά καρκινώματα σπάνια συνδέονται με μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια, ενώ τα βλεννώδη αδενοκαρκινώματα και οι οριακής κακοήθειας ωθηκικοί όγκοι δε φαίνεται να σχετίζονται με τέτοιου τύπου μεταλλάξεις. Αναφορικά με την προέλευση των ωθηκικών καρκινωμάτων, έχει διατυπωθεί η θεωρία ότι οι πρόδρομες αλλοιώσεις αυτών προκύπτουν από τις σάλπιγγες [45].

Πιο αναλυτικά, πληροφορίες για την παθογένεση του υψηλόβαθμου ορώδους ωθηκικού καρκινώματος προέκυψαν από τη διερεύνηση του κλινικά μη ορατού καρκίνου των ωθηκών και των φαλοπιανών σαλπίγγων σε γυναίκες με μεταλλάξεις γαμετικής σειράς στα γονίδια *BRCA1/2*. Σε μελέτη του Medeiros και των συνεργατών του εντοπίστηκαν πρόδρομες αλλοιώσεις υψηλόβαθμου ορώδους

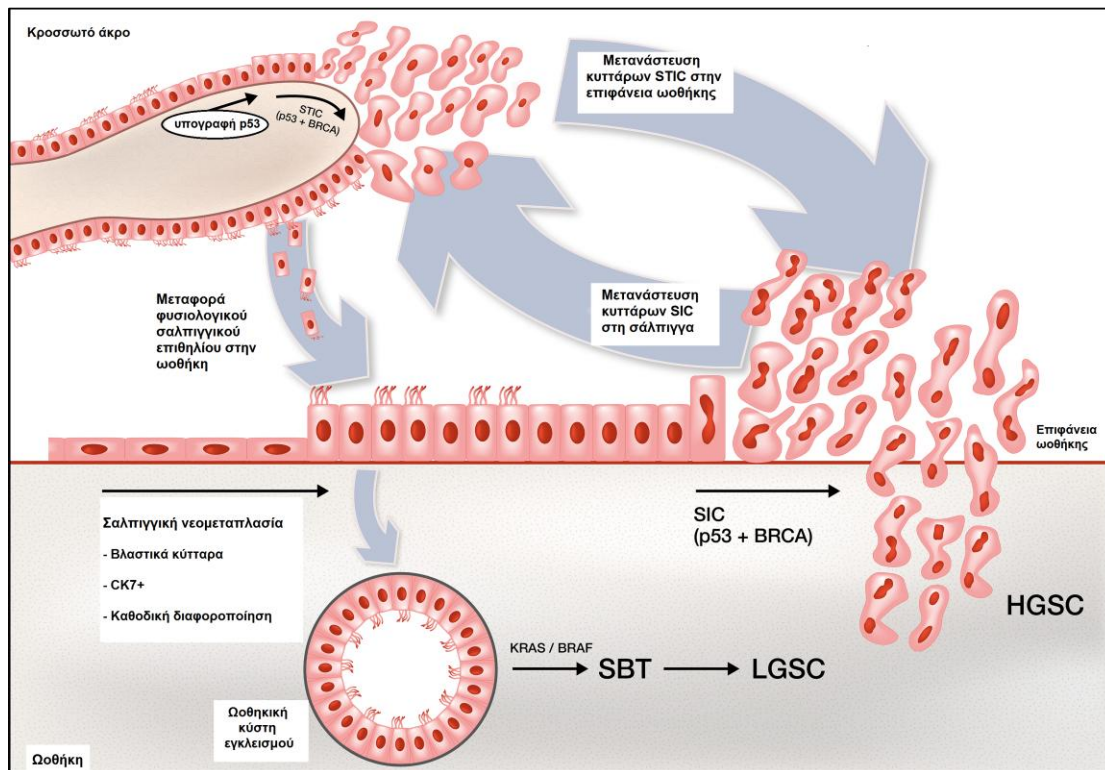
ωοθηκικού καρκινώματος στο κροσσωτό επιθήλιο των φαλοπιανών σαλπίνγων που συλλέχθηκαν μετά από προφυλακτική χειρουργική επέμβαση [46]. Τέτοιες αλλοιώσεις περιλαμβάνουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *TP53* (υπογραφή p53) και ορώδες ενδοεπιθηλιακό καρκίνωμα των σαλπίνγων (STIC) και έχουν εντοπιστεί σε ασθενείς με προχωρημένο στάδιο σποραδικού υψηλόβαθμου ορώδους ωοθηκικού καρκινώματος, στις φαλοπιανές σάλπιγγες και στο περιτόναιο. Μέσω αναλύσεων ανοσοϊστοχημείας και αλληλούχησης έχει δείχθει ότι οι αλλοιώσεις στις φαλοπιανές σάλπιγγες κατέχουν την ίδια μετάλλαξη στο *TP53* με τα περιβάλλοντα διηθητικά καρκινώματα [47].

Σε ιστολογικά φυσιολογικό επιθήλιο σαλπίνγων εντοπίζονται μικρές εστίες έντονα ανοσοαντιδραστικών στο p53 κυττάρων. Αυτές οι εστίες, που κυριαρχούν στο περιφερικό άκρο των φαλοπιανών σαλπίνγων, ονομάζονται «υπογραφές p53» και εμφανίζουν ενδείξεις βλαβών στο DNA. Περίπου οι μισές από τις υπογραφές p53 χαρακτηρίζονται από μεταλλάξεις στο *TP53*, ωστόσο, ο δείκτης πολλαπλασιασμού Ki-67 είναι χαμηλός (~3%). Θεωρείται ότι αντιπροσωπεύουν μια πρώιμη κλωνική επέκταση και ανευρίσκονται σχεδόν με την ίδια συχνότητα τόσο σε γυναίκες που φέρουν μεταλλάξεις στα *BRCA1/2* όσο και σε εκείνες που δε φέρουν [48].

Σε πρόσφατη ανάλυση μελετήθηκαν μέσω αλληλούχησης του γονιδιώματος και δομικών αναλύσεων πολλαπλά δείγματα όγκου από τους ίδιους ασθενείς. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο καρκίνος των ωοθηκών προέρχεται από τις φαλοπιανές σάλπιγγες, με την ανάπτυξη των υπογραφών του p53 και των ορωδών ενδοεπιθηλιακών καρκινωμάτων των σαλπίνγων να αποτελούν πρώιμα συμβάντα. Επομένως, διατυπώθηκε η άποψη ότι ο σχηματισμός του ωοθηκικού καρκινώματος ξεκινά από έναν πρωτοπαθή όγκο στις φαλοπιανές σάλπιγγες που ήδη χαρακτηρίζεται από αλλαγές στην αλληλουχία και τη δομή βασικών γονιδίων-οδηγών, συμπεριλαμβανομένων εκείνων του μονοπατιού PI3K, του *TP53* και των *BRCA1/2*. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν και χρωμοσωμικές μεταβολές υποδηλώνοντας την ύπαρξη επιπρόσθετων γονιδίων που εμπλέκονται στη διεργασία εξέλιξης του όγκου. Ο χρόνος που μεσολαβεί από τη δημιουργία των ορωδών ενδοεπιθηλιακών

καρκινωμάτων των σαλπίνγων μέχρι τον καρκίνο των ωθηκών υπολογίστηκε περίπου στα 6.5 έτη, αλλά στη συνέχεια παρατηρήθηκε ταχεία εξάπλωση των μεταστατικών αλλοιώσεων σε αυτούς τους ασθενείς [45]. Αυτό το χρονικό «παράθυρο» των 7 περίπου ετών μπορεί να εξηγήσει τη διάγνωση του ορώδους υψηλόβαθμου ωθηκικού καρκινώματος σε προχωρημένο στάδιο (στάδιο III/IV) που συνήθως συνοδεύεται από πυελικές και περιτοναϊκές διηθήσεις και το γεγονός ότι σε ασυμπτωματικές γυναίκες που φέρουν μεταλλάξεις γαμετικής σειράς στα γονίδια *BRCA1/2* οι μισές που έχουν διαγνωστεί με ασυμπτωματική νεοπλασία των εξαρτημάτων έχουν ήδη περιτοναϊκές ή πυελικές διηθήσεις.

Επί απουσίας συμμετοχής του βλεννογόνου των σαλπίνγων στα υψηλόβαθμα ορώδη ωθηκικά καρκινώματα, ως πιθανή προέλευση αυτών έχουν προταθεί οι κύστες εγκλεισμού στο φλοιό των ωθηκών. Οι κύστες αυτές με σαλπινγικού τύπου διαφοροποίηση (ενδοσαλπινγίωση) θα μπορούσαν να εξελιχθούν με αποκόλληση και εμφύτευση του κροσσωτού επιθηλίου των σαλπίνγων, που ενδεχομένως περιέχει μια αλλοίωση με υπογραφή στο p53, ή με μεταπλασία του ωθηκικού επιθηλίου στο φλοιό της ωθήκης ή και με τις δύο διεργασίες [49] (Εικόνα 1). Οι ευμεγέθεις κυστικές αλλοιώσεις σαλπινγικού τύπου θεωρούνται ως πιθανή προέλευση των χαμηλόβαθμων ορώδων καρκινωμάτων ή των ορώδων όγκων οριακής κακοήθειας [50].



Εικόνα 1. Ανάπτυξη των υψηλόβαθμων (HGSC) και χαμηλόβαθμων (LGSC) ορώδων ωθηκικών καρκινωμάτων. (SBT: ορώδης όγκος οριακής κακοήθειας, STIC: ορώδες ενδοεπιθηλιακό καρκίνωμα των σαλπίγγων, SIC: ορώδες ενδοεπιθηλιακό καρκίνωμα) (Τροποποιημένο σχήμα από τους Prat, J. *et al.*, Hum Pathol, 2018 [51]).

Υψηλού Βαθμού Ορώδες Καρκίνωμα Ωθηκών (HGSC)

Τα υψηλόβαθμα ορώδη ωθηκικά καρκινώματα αποτελούν τον πιο συχνό τύπο καρκίνου των ωθηκών, ο οποίος λόγω της ασυμπτωματολογίας του κατά την έναρξη της νόσου, διαγιγνώσκεται σε προχωρημένο στάδιο σε περισσότερο από το 80% των περιπτώσεων. Στα 2/3 των περιστατικών αυτών εντοπίζεται σε αμφοτερόπλευρη μορφή, ενώ ο εντοπισμός του μόνο στην ωθήκη περιορίζεται σε λιγότερο από το 10% του συνόλου των περιπτώσεων. Παρόλο που το μέγεθος του όγκου είναι συγκριτικά μικρότερο από άλλους τύπους ωθηκικών καρκινωμάτων, ο αριθμός και η έκταση των εξω-ωθηκικών κακοήθων ευρημάτων είναι συχνό χαρακτηριστικό αυτών των όγκων.

Από μορφολογικής άποψης, τα υψηλόβαθμα ορώδη ωοθηκικά καρκινώματα είναι αρκετά ετερογενή, εμφανίζοντας θηλώδες και συμπαγές πρότυπο ανάπτυξης με σχισμοειδείς αδενικούς αυλούς. Τα καρκινικά κύτταρα είναι ενδιάμεσου μεγέθους και μαζί με διασκορπισμένα γιγάντια μονοπύρρηνα κύτταρα σχηματίζουν προεξέχοντες πυρηνίσκους (Εικόνα 2Α).

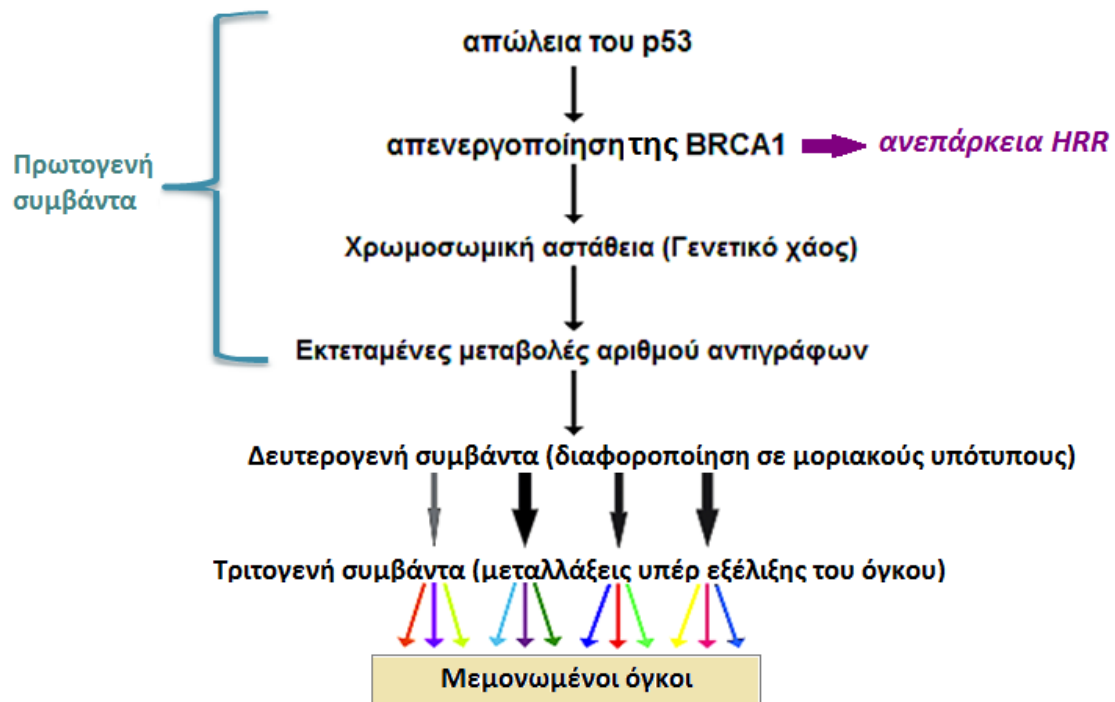
Τα περισσότερα υψηλόβαθμα ορώδη ωοθηκικά καρκινώματα ανταποκρίνονται σε ανοσοδοκιμασίες για τις πρωτεΐνες p53, BRCA1, WT1 και p16, ενώ χαρακτηρίζονται συνήθως από υψηλό δείκτη πολλαπλασιασμού (Ki-67). Ο υποδοχέας των οιστρογόνων εκφράζεται περίπου στο 75% των περιπτώσεων, όπως επίσης και στα χαμηλόβαθμα ορώδη και στα ενδομητριοειδή ωοθηκικά καρκινώματα, αλλά είναι απών σχεδόν σε όλα τα διαυγοκυτταρικά και βλενώδη ωοθηκικά καρκινώματα [52].

Οι γυναίκες με μεταλλάξεις γαμετικής σειράς στα γονίδια *BRCA1* ή *BRCA2* έχουν δια βίου κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών που κυμαίνεται μεταξύ 30% και 70% και διαγιγνώσκονται κυρίως με υψηλόβαθμο ορώδες ωοθηκικό καρκίνωμα. Η απενεργοποίηση του *BRCA1* αποτελεί την κύρια γενετική αλλαγή στα καρκινώματα αυτά, μέσω απενεργοποιητικών μεταλλάξεων γαμετικής σειράς. Ωστόσο, η ανεπάρκεια του μονοπατιού BRCA μπορεί να προκύψει τόσο από σωματικές μεταλλάξεις στα *BRCA1/2* όσο και από υπερμεθυλίωση του υποκινητή του *BRCA1* [53]. Η πλειονότητα των όγκων αυτών (>95%) φέρουν σωματικές μεταλλάξεις στο *TP53*, ενώ περίπου το 25% των όγκων συνοδεύονται από μεταλλάξεις γαμετικής σειράς ή σε σωματικά κύτταρα στα *BRCA1* και *BRCA2*. Επιπλέον, χαρακτηρίζονται από σωματικές αλλαγές του αριθμού των αντιγράφων που υποδηλώνουν γενωμική αστάθεια, ενώ έχουν παρατηρηθεί και συμβάντα μεθυλίωσης υποκινητών [54]. Περίπου στις μισές περιπτώσεις των υψηλόβαθμων ορώδων ωοθηκικών καρκινωμάτων αναγνωρίζεται ανεπάρκεια του μηχανισμού του ομόλογου ανασυνδυασμού, μέσω γενετικής και επιγενετικής απενεργοποίησης των γονιδίων που συμμετέχουν στο μονοπάτι αυτό, όπως τα *BRCA1/2*. Η ανεπάρκεια του ομόλογου ανασυνδυασμού αποτελεί σημαντική ένδειξη για ευαισθησία στους παράγοντες της πλατίνας και για τη χρήση των αναστολέων της PARP, οι οποίοι

απενεργοποιούν τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA σε αυτούς τους όγκους [55].

Ανάλογα με την έκφραση συγκεκριμένων παραγόντων, τα υψηλόβαθμα ορώδη ωθηκικά καρκινώματα κατηγοριοποιούνται σε τέσσερις μοριακούς υπότυπους, που είναι οι εξής: «ανοσοαντιδραστικός», «πολλαπλασιαστικός», «διαφοροποιημένος» και «μεσεγχυματικός» υπότυπος. Στον ανοσοαντιδραστικό υπότυπο εκφράζονται οι προσδέτες χημειοκινών των T-λεμφοκυττάρων CXCL11 και CXCL10, καθώς και ο υποδοχέας CXCR3. Η υψηλή έκφραση μεταγραφικών παραγόντων, όπως οι HMGA2 και SOX11, δεικτών πολλαπλασιασμού, όπως οι MCM2 και PCNA, και η χαμηλή έκφραση δεικτών ωθηκικών όγκων, όπως οι MUC1 και MUC16, είναι ενδεικτικές του πολλαπλασιαστικού υπότυπου. Αντίθετα, ο διαφοροποιημένος υπότυπος χαρακτηρίζεται από υψηλή έκφραση των δεικτών MUC1 και MUC16, καθώς και από έκφραση του εκκριτικού δείκτη φαλοπιανών σαλπίνγων SLPI, φανερώνοντας μια περισσότερο διαφοροποιημένη και ώριμη ανάπτυξη του όγκου. Ο μεσεγχυματικός υπότυπος συνοδεύεται από υψηλή έκφραση των γονιδίων *HOX* και δεικτών στρωματικών συνιστωσών, όπως η πρωτεΐνη FAP των ινοβλαστών. Τα υψηλόβαθμα ορώδη ωθηκικά καρκινώματα ανοσοαντιδραστικού υπότυπου χαρακτηρίζονται από βελτιωμένη επιβίωση, λόγω αυξημένης συχνότητας των ενδοεπιθηλιακών ογκοδιηθητικών λεμφοκυττάρων που σχετίζεται με μεγαλύτερο προσδόκιμο επιβίωσης. Αντίθετα, τα μεσεγχυματικού υπότυπου ορώδη ωθηκικά καρκινώματα έχουν χαμηλότερο προσδόκιμο επιβίωσης, λόγω του εκτεταμένου δεσμοπλαστικού υποστρώματος [56].

Η έναρξη του υψηλόβαθμου ορώδους ωθηκικού καρκινώματος σηματοδοτείται από την απώλεια του p53, τη μετέπειτα απώλεια του BRCA1 που οδηγεί σε ανεπάρκεια του μηχανισμού επιδιόρθωσης των θραύσεων στο δίκλωνο DNA, που ακολούθως επιφέρει χρωμοσωμική αστάθεια (γενετικό χάος) και εκτεταμένες αλλαγές στον αριθμό των αντιγράφων (Σχήμα 2) [57].



Σχήμα 2. Παθογονικό μοντέλο που περιλαμβάνει τα στάδια της έναρξης και της εξέλιξης των υψηλόβαθμων ορώδων ωοθηκικών καρκινωμάτων (Τροποποιημένο σχήμα από τους Bowtell DD *et al.*, Nat Rev Cancer, 2010 [57].)

Χαμηλού Βαθμού Ορώδες Καρκίνωμα Ωοθηκών (LGSC)

Τα χαμηλόβαθμα ορώδη ωοθηκικά καρκινώματα αντιπροσωπεύουν λιγότερο από το 5% όλων των περιστατικών των ωοθηκικών καρκινωμάτων. Μορφολογικά, παρουσιάζονται αρχικά με έναν μη-διηθητικό ορώδη οριακής κακοήθειας όγκο, με ή χωρίς μικροθλώδες μοτίβο ανάπτυξης, το οποίο μετατρέπεται σταδιακά σε χαμηλού βαθμού ορώδες καρκίνωμα κατά ένα μικρό ποσοστό (<10% των περιστατικών) και ακόμα πιο σπάνια σε υψηλόβαθμο ορώδες. Η παρουσία μικρών εστιών σε έναν όγκο οριακής κακοήθειας σχετίζεται με καλή πρόγνωση, εκτός εάν η νόσος βρίσκεται σε προχωρημένο στάδιο. Τα χαμηλόβαθμα ορώδη ωοθηκικά καρκινώματα αποτελούνται από μικρά θηλώδη καρκινικά κύτταρα με μικρούς ομοιόμορφους πυρήνες, χαρακτηριστικό που τα διακρίνει από τα αντίστοιχα υψηλόβαθμα ορώδη καρκινώματα (Εικόνα 2B) [58].

Επιπλέον, έχουν παρόμοιο ανοσοϊστοχημικό προφίλ με τα υψηλόβαθμα ορώδη καρκινώματα, αλλά μικρότερο Ki-67. Χαρακτηρίζονται από μεταλλάξεις στα γονίδια *BRAF* και *KRAS*, ενώ δεν υπάρχει συσχέτιση με μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1*, *BRCA2* και *TP53*, με αποτέλεσμα να μην παρουσιάζουν χρωμοσωμική αστάθεια. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι τα χαμηλόβαθμα ορώδη καρκινώματα που συνοδεύονται από μεταλλάξεις στο *BRAF* έχουν καλύτερη πρόγνωση από τα αντίστοιχα καρκινώματα με μεταλλάξεις στο *KRAS* [59]. Η παρουσία μεταλλάξεων στο *BRAF* συμβάλλει στην ογκογένεση και στην κατά περίπτωση εξέλιξη των οριακής κακοήθειας ορώδων όγκων σε χαμηλόβαθμα ορώδη ωοθηκικά καρκινώματα.

Βλεννώδες Καρκίνωμα Ωοθηκών (MC)

Τα βλεννώδη ωοθηκικά καρκινώματα αντιπροσωπεύουν λιγότερο από το 5% όλων των επιθηλιακών ωοθηκικών όγκων, με το 80% περίπου να είναι καλοήθη και το μεγαλύτερο μέρος των υπολοίπων οριακής κακοήθειας. Απαντώνται συνήθως σε νεαρές γυναίκες ηλικίας 20-40 ετών, ωστόσο, περιστατικά έχουν καταγραφεί και σε περι- και μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Η πλειονότητα αυτών των όγκων εμφανίζει γαστρική ή ανώτερου πεπτικού συστήματος διαφοροποίηση, ενώ η προέλευσή τους είναι άγνωστη. Χαρακτηρίζονται από μεγάλη ετερογένεια, συνεπώς, μέσα σε έναν μεμονωμένο όγκο μπορούν να συνυπάρχουν φαινομενικά καλοήθεις, οριακής κακοήθειας, μη διηθητικές και διηθητικές συνιστώσες, υποδηλώνοντας την εξέλιξη του υποκείμενου όγκου από καλοήθες σε οριακής κακοήθειας και εν τέλει σε κακοήθες καρκίνωμα. Τα πρωτοπαθή βλεννώδη ωοθηκικά καρκινώματα χαρακτηρίζονται από μεγάλο μέγεθος και μονόπλευρες εντοπίσεις, ενώ τα μεταστατικά καρκινώματα αυτού του τύπου είναι μικρότερου μεγέθους και εντοπίζονται αμφοτερόπλευρα. Τα πρωτοπαθή βλεννώδη ωοθηκικά καρκινώματα περιορίζονται συνήθως στις ωοθήκες, χωρίς εμπλοκή της επιφάνειας των ωοθηκών ή του περιτοναίου.

Με βάση το μοτίβο ανάπτυξής τους, τα βλεννώδη ωοθηκικά καρκινώματα κατηγοριοποιούνται σε δύο τύπους, τον «επεκτατικό» και τον «διηθητικό». Τα βλεννώδη καρκινώματα «επεκτατικού» τύπου παρουσιάζονται χωρίς εμφανή

στρωματική διήθηση, αλλά με πολύπλοκους κακοήθεις αδένες με ελάχιστο ή καθόλου παρεμβαλλόμενο στρώμα. Αντίθετα, τα βλεννώδη καρκινώματα «διηθητικού» τύπου εμφανίζουν έντονη στρωματική διήθηση υπό τη μορφή αδένων ή κυτταρικών συστάδων ή μεμονωμένων κυττάρων και συχνά σχετίζονται με μια δεσμοπλαστική στρωματική αντίδραση (Εικόνα 2Γ). Το «επεκτατικό» βλεννώδες καρκίνωμα σχετίζεται με πιο ευνοϊκή πρόγνωση από το αντίστοιχο «διηθητικό».

Τα πρωτοπαθή βλεννώδη καρκινώματα ανοσοαντιδρούν σχεδόν πάντα (~80%) με την κυτοκερατίνη 7 (CK7) και την κυτοκερατίνη 20 (CK20) στο 65% των περιπτώσεων, ενώ δεν εκφράζουν τα ER και WT1. Επιπλέον, οι μεταλλάξεις στο *KRAS*, που αποτελούν πρώιμη εκδήλωση στην ογκογένεση του βλεννώδους καρκινώματος, απαντώνται περίπου στο 45% των περιπτώσεων αυτών, ενώ η υπερέκφραση του HER2 περίπου στο 20%. Ωστόσο, το εναπομένει 35% των βλεννώδων καρκινωμάτων που δε χαρακτηρίζεται από υπερέκφραση του HER2 και μεταλλάξεις στο *KRAS* σχετίζεται με αυξημένη πιθανότητα υποτροπής [60] [61].

Ενδομητριοειδές Καρκίνωμα Ωοθηκών (EC)

Τα ενδομητριοειδή ωοθηκικά καρκινώματα αποτελούν περίπου το 10% όλων των ωοθηκικών καρκινωμάτων, εκδηλώνονται συχνότερα σε περιεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και οι περισσότεροι όγκοι εντοπίζονται σε πρώιμο στάδιο. Ο φαινότυπος αυτός αναγνωρίζεται συχνά σε ασθενείς με κληρονομούμενο μη πολυποδιασικό καρκίνο του παχέος εντέρου (σύνδρομο Lynch). Το 17% αυτών είναι αμφοτερόπλευροι όγκοι, ενώ στην πλειονότητά τους αφορούν χαμηλού βαθμού αδenoκαρκινώματα με εστίες ενδομητρίωσης, ενδομητριοειδών αδenoϊνωμάτων ή οριακής κακοήθειας ενδομητριοειδών όγκων. Στο 50% των διαγνώσεων παρατηρείται πλακώδης διαφοροποίηση [61] (Εικόνα 2Δ). Ωστόσο, τα υψηλού βαθμού ενδομητριοειδή ωοθηκικά καρκινώματα είναι μορφολογικά δυσδιάκριτα από τα αντίστοιχα υψηλόβαθμα ορώδη και συχνά εκφράζουν το WT1. Η άτυπη ενδομητρίωση αποτελεί την πρόδρομη αλλοίωση των ενδομητριοειδών ωοθηκικών καρκινωμάτων, όπου μετεξελίσσεται σε κακοήθες νεόπλασμα μέσω

απενεργοποίησης ογκοκατασταλτικών γονιδίων, όπως το *PTEN* [62]. Περίπου στο 30% των ενδομητριοειδών ωθηκικών καρκινωμάτων ταυτοποιούνται μεταλλάξεις στο γονίδιο *ARID1A* (**A**T-rich interactive **d**omain **1A**). Το γονίδιο αυτό αποτελεί μέλος του συμπλόκου αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης SWI/SNF-A, έχει ογκοκατασταλτική δράση και, ως εκ τούτου, επί απουσίας της λειτουργικότητάς του επάγεται η καρκινογένεση. Επιπλέον, οι σωματικές μεταλλάξεις στα γονίδια της β-κατενίνης (*CTNNB1*) και του *PTEN* είναι οι πιο συχνές γενετικές αλλαγές στα ενδομητριοειδή ωθηκικά καρκινώματα [63]. Οι μεταλλάξεις στο *CTNNB1* ανευρίσκονται στο 38-50% των περιπτώσεων και σχετίζονται με πλακώδη διαφοροποίηση, όγκους χαμηλού βαθμού κακοήθειας και ευνοϊκότερη πρόγνωση. Από την άλλη πλευρά, οι μεταλλάξεις στο *PTEN* απαντώνται περίπου στο 20% των περιστατικών αυτών και στο 46% εξ αυτών συνοδεύονται από απώλεια ετεροζυγωτίας στο 10q23 [62]. Επιπλέον, έχουν ταυτοποιηθεί μεταλλάξεις στο γονίδιο *PIK3CA* περίπου στο 20% των ενδομητριοειδών ωθηκικών καρκινωμάτων, που σχετίζονται, ωστόσο, με δυσμενή πρόγνωση [64].

Επιπλέον, εμφανίζουν ανοσοαντιδραστικότητα για τη βιμεντίνη, τις κυτοκερατίνες CK7 (97%) και CK20 (13%), το επιθηλιακό μεμβρανικό αντιγόνο (EMA) και τους υποδοχείς οιστρογόνων και προγεστερόνης, ενώ ο δείκτης Ki-67 έχει μια μέση τιμή 8.2%. Γενικά, τα ενδομητριοειδή ωθηκικά καρκινώματα έχουν την καλύτερη πρόγνωση από όλους τους τύπους των ωθηκικών καρκινωμάτων, πιθανώς λόγω του χαμηλού βαθμού κακοήθειας και του αρχικού σταδίου διάγνωσης αυτών [65].

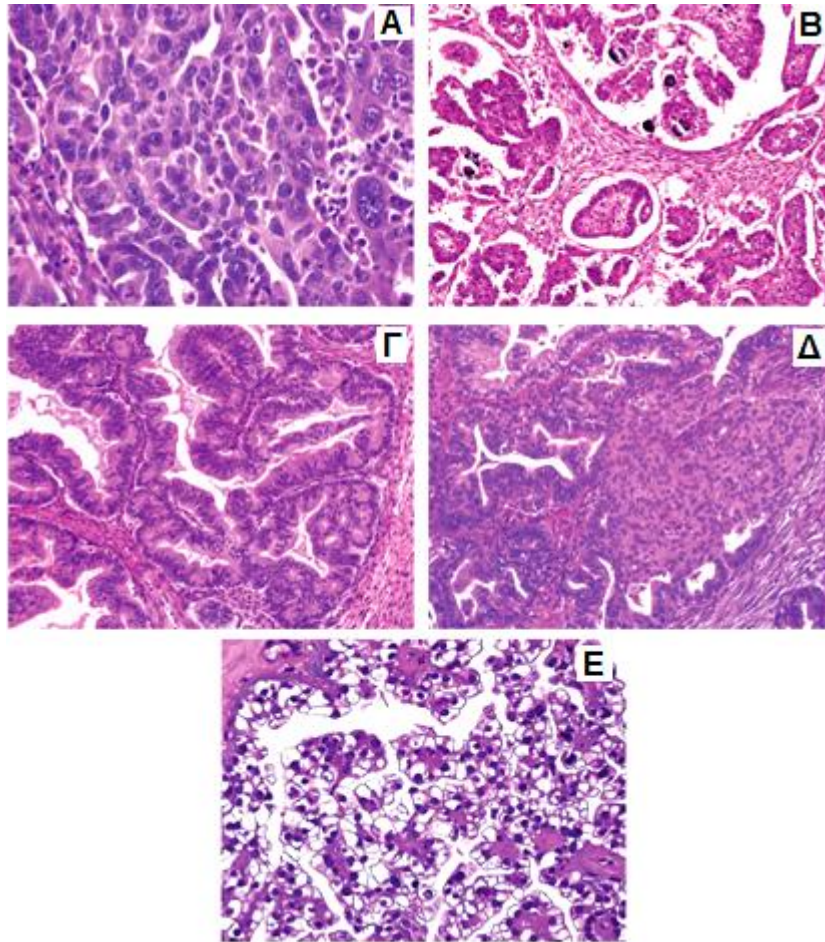
Διαυγοκυτταρικό Καρκίνωμα Ωθηκών (CCC)

Τα διαυγοκυτταρικά ωθηκικά καρκινώματα αποτελούν περίπου το 10% όλων των ωθηκικών καρκινωμάτων, κατά τη διάγνωση είναι σταδίου 1 ή 2 και σπανίως είναι αμφοτερόπλευρα. Έχουν στενή σύνδεση με την ενδομητρίωση και σε αυτές τις περιπτώσεις σχετίζονται με καλύτερη πρόγνωση [66]. Τα διαυγοκυτταρικά καρκινώματα ενδέχεται να περιέχουν μια συνιστώσα οριακής κακοήθειας και σε αυτή την περίπτωση είναι υπό τη μορφή αδenoϊνωματοειδών νεοπλασμάτων, χωρίς

στρωματική διήθηση. Δεδομένου ότι το διαυγοκυτταρικό κυτταρόπλασμα μπορεί να αναγνωρισθεί τόσο στα υψηλού βαθμού ωθηκικά καρκινώματα όσο και στα ενδομητριοειδή καρκινώματα, η διάγνωση βασίζεται κυρίως σε διαφοροποιημένα ιστολογικά ευρήματα, όπως πολύπλοκο θηλώδες πρότυπο ανάπτυξης ή υαλώδη σωμάτια. Επιπλέον, ο ρυθμός των μιτωτικών διαιρέσεων είναι χαμηλότερος συγκριτικά με τους άλλους τύπους των ωθηκικών καρκινωμάτων (Εικόνα 2Ε).

Στα διαυγοκυτταρικά καρκινώματα απουσιάζουν οι μεταλλάξεις στα *BRCA1* και *BRCA2*, επομένως και η χρωμοσωμική αστάθεια, ενώ πολύ σπάνια εντοπίζονται μεταλλάξεις στο *TP53*. Απώλεια του *PTEN* χαρακτηρίζει το 40% των διαυγοκυτταρικών καρκινωμάτων αρχικού σταδίου, ενώ μεταλλάξεις στο γονίδιο *PIK3CA* ανευρίσκονται στο 33% των περιπτώσεων [67]. Επιπλέον, το 46-57% των καρκινωμάτων αυτών συνδέονται με μεταλλάξεις στο γονίδιο *ARID1A* [68]. Γενικά, τα διαυγοκυτταρικά καρκινώματα εκφράζουν τον παράγοντα HNF1-β (>90% των περιπτώσεων), ενώ έχουν αρνητική έκφραση για τον ER και το WT1 (95% των περιπτώσεων). Ο HNF-1β ρυθμίζει διάφορα γονίδια που εμπλέκονται στην παθογένεση και στη συμπεριφορά του διαυγοκυτταρικού καρκινώματος, συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων για την διπεπτιδυλοπεπτιδάση IV, την οστεοποντίνη και το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης.

Τα διαυγοκυτταρικά καρκινώματα σταδίου IA έχουν ευνοϊκότερο πενταετές προσδόκιμο επιβίωσης που προσεγγίζει το 80-90% [69], σε αντίθεση με τα διαυγοκυτταρικά προχωρημένου σταδίου που σχετίζονται με δυσμενέστερη πρόγνωση. Ωστόσο, έχει δειχθεί ότι οι διαυγοκυτταρικοί όγκοι προχωρημένου σταδίου με ανεπάρκεια στο μηχανισμό επιδιόρθωσης μέσω των γονιδίων MMR ή που σχετίζονται με το σύνδρομο Lynch ενδέχεται να έχουν μεγαλύτερο προσδόκιμο επιβίωσης, υποδηλώνοντας μια ανοσογονικότητα του όγκου, πιθανώς επιδεκτική σε ανοσοθεραπεία [70].



Εικόνα 2: Αντιπροσωπευτικές βιοψίες από τους πέντε κύριους τύπους ωθηκικών καρκινωμάτων: Α) υψηλόβαθμο ορώδες καρκίνωμα, Β) χαμηλόβαθμο ορώδες καρκίνωμα, Γ) βλενώδες καρκίνωμα, Δ) ενδομητριοειδές καρκίνωμα και Ε) διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα (Τροποποιημένο από τον Prat, J., Ann Oncol, 2012 [61])

Σπάνιοι όγκοι των ωθηκών

Ένας σπάνιος τύπος καρκίνου των ωθηκών είναι ο κοκκιοκυτταρικός όγκος ενήλικου τύπου (**A**dult **G**ranulosa **C**ell **T**umour, **AGCT**) που αντιπροσωπεύει περίπου το 2% όλων των ωθηκικών καρκινωμάτων. Ο εντοπισμός τους στην περιοχή των ωθηκών και τα κοινά ιστολογικά, ανοσοφαινοτυπικά και ενδοκρινολογικά χαρακτηριστικά με τα φυσιολογικά κοκκώδη κύτταρα υποστηρίζουν τη θεωρία ότι αυτοί οι όγκοι προέρχονται από τα κοκκώδη κύτταρα. Σχεδόν στο σύνολό τους οι όγκοι αυτοί έχουν μια πανομοιότυπη παρανοσηματική μετάλλαξη (c.402C>G,

p.C134W) στο γονίδιο *FOXL2* και σε συνδυασμό με την απουσία της σε άλλους τύπους ωθηκικών καρκινωμάτων καθιστούν τους κοκκιοκυτταρικούς όγκους ενήλικου τύπου μια διακριτή ιστοπαθολογική κατηγορία.

Οι όγκοι από κύτταρα Sertoli-Leydig (Sertoli-Leydig Cell Tumour, SLCT) αποτελούν σπάνιους όγκους (>0.5%) που εμφανίζονται σε γυναίκες νεαρής έως μέσης ηλικίας. Η πιθανή διεργασία ανάπτυξης αυτών των όγκων περιλαμβάνει μεταλλάξεις που επάγουν την παραγωγή των κυττάρων Sertoli από τα κοκκώδη κύτταρα. Οι όγκοι αυτοί τόσο σποραδικού όσο και κληρονομικού τύπου συνδέονται με μεταλλάξεις στο γονίδιο *DICER1*. Ωστόσο, έχει δειχθεί ότι πραγματοποιείται μια μετάλλαξη γαμετικής σειράς στο ένα αλληλόμορφο του γονιδίου *DICER1* και μια δεύτερη παρανοηματική υπομορφική μετάλλαξη στον όγκο. Αυτός ο συνδυασμός των μεταλλάξεων δεν απενεργοποιεί πλήρως την πρωτεΐνη, ωστόσο, επιδρά αρνητικά στην επεξεργασία του microRNA (miRNA) [71].

Όγκοι ωθηκικών άγνωστης προέλευσης

Το μικροκυτταρικό καρκίνωμα ωθηκών, υπερασβεστιαϊμικού τύπου (Small Cell Carcinoma of the Ovary, Hypercalcaemic Type, **SCCOHT**) αποτελεί τον πιο θανατηφόρο και λιγότερο κατανοητό καρκίνο των ωθηκών, με περίπου 300 περιπτώσεις αυτού να έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία. Εμφανίζεται σε νεαρές γυναίκες και παιδιά (μέσος όρος ηλικίας τα 24 έτη), έχει κυρίως ραβδοειδή μορφολογικά χαρακτηριστικά και σε ορισμένες περιπτώσεις κληρονομικό χαρακτήρα. Σε αυτά τα καρκινώματα έχουν ταυτοποιηθεί μεταλλάξεις γαμετικής σειράς ή σωματικές μεταλλάξεις στο γονίδιο *SMARCA4* που συνδέονται με το σύνδρομο προδιάθεσης σε ραβδοειδείς όγκους τύπου 2 (Rhabdoid Tumor Predisposition Syndrome-2, RTPS2) [72]. Δεν υπάρχει σαφής εικόνα για την προέλευση των καρκινωμάτων αυτών, ωστόσο, υπάρχουν ενδείξεις ότι μπορεί να προέρχονται από κάποιον υποπληθυσμό κυττάρων ενός ανώριμου τερατώματος [73].

Πίνακας 1. Ιστοπαθολογία, προέλευση και γενετικοί παράγοντες κινδύνου για τους διαφορετικούς τύπους καρκίνου των ωοθηκών (Τροποποιημένος πίνακας από τους Karnezis *et al.*, Nat Rev Cancer, 2017 [74])

Ιστολογικός τύπος	Προέλευση	Πρόδρομη αλλοίωση	Σχετιζόμενα γονίδια
Υψηλόβαθμο ορώδες καρκίνωμα ωοθηκών (HGSC)	Κροσσωτό επιθήλιο σαλπίνγων ή ωοθηκικές κύστες	Ορώδη ενδοεπιθηλιακά καρκινώματα σαλπίνγων (STIC)	<i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> , <i>BRIP1</i> , <i>RAD51C</i> και <i>RAD51D</i>
Ενδομητριοειδές καρκίνωμα ωοθηκών (EC)/Διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα ωοθηκών (CCC)	Ενδομητρίωση ή ενδομητριοειδές αδενοϊνίωμα	Ενδομητριοειδής όγκος οριακής κακοήθειας	<i>MLH1</i> , <i>PMS2</i> , <i>MSH2</i> και <i>MSH6</i> (σύνδρομο Lynch)
Χαμηλόβαθμο ορώδες καρκίνωμα ωοθηκών (LGSC)	Ενδοσαλπινγγίωση ή θηλώδης υπερπλασία σαλπίνγων	Ορώδης όγκος οριακής κακοήθειας	-
Βλεννώδες καρκίνωμα ωοθηκών (MC)	Άγνωστο τεράτωμα, ενδομητρίωση ή σαλπινγγική-περιτοναϊκή συμβολή	Βλεννώδης όγκος οριακής κακοήθειας, όγκος Brenner, τεράτωμα ή ενδομητρίωση	-
Όγκοι από κύτταρα Sertoli-Leydig (SLCT)	Άγνωστη	Καμία	<i>DICER1</i>
Μικροκυτταρικό καρκίνωμα ωοθηκών, υπερασβεστιαμικού τύπου (SCCOHT)	Άγνωστη, τεράτωμα	Καμία	<i>SMARCA4</i>

Κληρονομικό σύνδρομο καρκίνου μαστού/ωοθηκών

Το κληρονομικό σύνδρομο καρκίνου μαστού/ωοθηκών ακολουθεί τον αυτοσωμικό επικρατή τρόπο κληρονόμησης και προκαλείται από μεταλλάξεις στα ογκοκατασταλτικά γονίδια *BRCA1* και *BRCA2*, τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες που είναι σημαντικές για την επιδιόρθωση των θραύσεων στις δύο αλυσίδες του DNA.

Σε πρόσφατη ανασκόπηση αναφέρεται ότι η μέση συχνότητα μεταλλάξεων στα γονίδια *BRCA1/2* προσεγγίζει το 12.7% σε περιστατικά επιθηλιακών ωοθηκικών καρκινωμάτων, με τις μεταλλάξεις στο *BRCA1* να είναι περίπου δύο φορές συχνότερες σε σχέση με τις μεταλλάξεις στο *BRCA2* [75]. Το οικογενειακό ιστορικό καρκίνου μαστού/ωοθηκών, καθώς και η νεαρή ηλικία διάγνωσης καρκίνου των

ωοθηκών φαίνεται να συνδέονται με αυξημένη συχνότητα μεταλλάξεων στα γονίδια *BRCA1/2*.

Τα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2* στον καρκίνο των ωοθηκών

Οι γυναίκες που φέρουν μετάλλαξη στο γονίδιο *BRCA1* έχουν δια βίου κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών 40-60%, ενώ ο κίνδυνος αυτός μειώνεται στο 10-20% στις γυναίκες που φέρουν μετάλλαξη στο γονίδιο *BRCA2*. Επιπλέον, υπάρχουν ορισμένοι γενετικοί και μη γενετικοί παράγοντες που μπορούν να τροποποιήσουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών σε ένα άτομο. Μεταλλάξεις εντός ή εγγύς του εξονίου 11 στα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2* έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο των ωοθηκών σε σύγκριση με μεταλλάξεις εκτός αυτών των περιοχών [76]. Επιπλέον, η ταυτοποίηση γενετικών πολυμορφισμών είναι σημαντική, καθώς μέσω αυτών ενδέχεται να τροποποιείται ο κίνδυνος για καρκίνο σε άτομα που φέρουν μεταλλάξεις στα *BRCA1* και *BRCA2*. Μέσω μελετών συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος (GWAS) έχουν ταυτοποιηθεί πολυμορφισμοί χαμηλής διεισδυτικότητας για καρκίνο των ωοθηκών σε άτομα που φέρουν παθογόνους μεταλλάξεις.

Ωστόσο, έχουν αναγνωριστεί και άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τον κίνδυνο για καρκίνο των ωοθηκών στο γενικό πληθυσμό, όπως ο αριθμός των ωορρηξιών κατά τη διάρκεια της ζωής. Επιπλέον, η πρόωρη εμμηναρχή, η όψιμη εμμηνόπαυση και η ατοκία αποτελούν παράγοντες κινδύνου, ενώ ο θηλασμός, η χρήση αντισυλληπτικών χαπιών και η πολυτοκία έχουν προστατευτικό ρόλο. Ωστόσο, οι παράγοντες αυτοί φαίνεται να μην τροποποιούν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών σε άτομα που φέρουν μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2* [77].

Άλλα γονίδια προδιάθεσης στον καρκίνο των ωοθηκών

Τα τελευταία πέντε χρόνια με την εμφάνιση της αλληλούχησης επόμενης γενεάς, έχουν ταυτοποιηθεί μεταλλάξεις και σε άλλα γονίδια που κωδικοποιούν

πρωτεΐνες που δρουν συνεργιστικά με τις πρωτεΐνες BRCA1 και BRCA2 στην επιδιόρθωση θραύσεων στις δύο αλυσίδες του DNA και έχουν συσχετιστεί με το κληρονομικό σύνδρομο καρκίνου μαστού/ωοθηκών. Πιο αναλυτικά, σε πρόσφατη μελέτη μεταξύ 2000 γυναικών επιλεγμένες με βάση το οικογενειακό ιστορικό, οι συχνότητες μεταλλάξεων για τα γονίδια *RAD51C* και *RAD51D* ήταν 0.41% και 0.35%, αντίστοιχα [78]. Ο δια βίου κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών ανέρχεται περίπου στο 5% για μεταλλάξεις στο γονίδιο *RAD51C* [79] και στο 12% για μεταλλάξεις στο γονίδιο *RAD51D* [78]. Ένα επιπρόσθετο σημαντικό γονίδιο οι μεταλλάξεις του οποίου προδιαθέτουν στον καρκίνο των ωοθηκών είναι το *BRIP1*, για το οποίο παρατηρούνται χαμηλές συχνότητες μεταλλάξεων, αλλά με ενδιάμεσο δια βίου κίνδυνο για καρκίνο των ωοθηκών [80]. Το *BRIP1* μαζί με τα γονίδια *BARD1*, *NBN* και *PALB2* έχουν αναφερθεί ως πιθανά γονίδια προδιάθεσης στον καρκίνο των ωοθηκών καθώς οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούν συμμετέχουν στα μονοπάτια επιδιόρθωσης των λαθών του DNA μέσω των πρωτεϊνών BRCA1 και BRCA2. Πιο αναλυτικά, η πρωτεΐνη *BARD1* (BRCA1-associated RING domain protein 1) αλληλεπιδρά με την BRCA1 εξασφαλίζοντας τη σταθερότητα της BRCA1. Η πρωτεΐνη *BRIP1* (BRCA1-Interacting Protein 1) είναι μέλος της ομάδας πρωτεϊνών αναμίας Fanconi (FANCI), η οποία είναι σημαντική στην ομαλή λειτουργία επιδιόρθωσης των θραύσεων των δύο αλυσίδων του DNA στον καρκίνο του μαστού. Συγκεκριμένα, αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη BRCA1 μέσω των επαναλήψεων του τομέα BRCT στο καρβοξυτελικό άκρο της BRCA1. Η πρωτεΐνη *NBN* αποτελεί μέλος του συμπλόκου επιδιόρθωσης θραύσεων στο δίκλωνο DNA MRN, η οποία αναγνωρίζει τη βλάβη στο DNA και μετατοπίζεται γρήγορα στις θέσεις των θραύσεων και σχηματίζει πυρηνικές εστίες. Η πρωτεΐνη *PALB2* (partner and localizer of BRCA2) ανήκει στην ομάδα των πρωτεϊνών αναμίας Fanconi (FANCN), η οποία προσδένεται και συν-εντοπίζεται με την πρωτεΐνη BRCA2 σε πυρηνικές εστίες επιτρέποντας τον σταθερό ενδοπυρηνικό εντοπισμό και τη συσσώρευση της BRCA2.

Οι ερευνητές υπολόγισαν ότι οι μεταλλάξεις στο *BRIP1* συνδέονται με έναν μέσο σχετικό κίνδυνο για επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών κοντά στο 3.41 με τον σωρευτικό κίνδυνο να προσεγγίζει το 5.8% μέχρι την ηλικία των 80 ετών. Ο κλινικός

φαινότυπος περιοριζόταν στον υψηλόβαθμο ορώδη υπότυπο του επιθηλιακού καρκίνου των ωοθηκών με μέση ηλικία διάγνωσης τα 64 έτη, γεγονός που συνάδει με τη λειτουργική ιδιότητα της πρωτεΐνης αυτής λόγω αλληλεπίδρασης με τις πρωτεΐνες BRCA1 και BRCA2 στο μηχανισμό του ομόλογου ανασυνδυασμού. Αντίθετα, στη συγκεκριμένη μελέτη οι συχνότητες παθογόνων μεταλλάξεων στα γονίδια *BARD1*, *NBN* και *PALB2* ήταν ιδιαίτερα χαμηλές, υποδηλώνοντας ότι αυτά τα γονίδια δε φαίνεται να σχετίζονται με επιπρόσθετο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών, χωρίς να αποκλείεται το ενδεχόμενο ενδιάμεσων κινδύνων [80] [81]. Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν αντικρουόμενες ενδείξεις για τη συσχέτιση του γονιδίου *BRIP1* με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού, όπου ο υψηλότερος σχετικός κίνδυνος δεν ξεπερνά το 2.0 [82].

Γενετική του καρκίνου των ωοθηκών με νεαρή ηλικία διάγνωσης

Η πλειονότητα των περιστατικών καρκίνου των ωοθηκών νεαρής ηλικίας διάγνωσης (≤ 40 έτη) συνδέεται με μεταλλάξεις στο γονίδιο *BRCA1* και λιγότερο συχνά με άλλα γονίδια προδιάθεσης, με τη διάγνωση καρκίνου των ωοθηκών πριν τα 40 έτη σε άτομα που φέρουν μετάλλαξη στο γονίδιο *BRCA2* να είναι πολύ σπάνια. Για την υποομάδα ασθενών με διάγνωση καρκίνου των ωοθηκών πριν από τα 30 έτη, τα δεδομένα είναι περιορισμένα κυρίως λόγω του μικρού αριθμού των υπό μελέτη ασθενών, με τις ταυτοποιημένες μεταλλάξεις να είναι σπάνιες και να περιορίζονται κυρίως στα γονίδια που χαρακτηρίζουν το σύνδρομο Lynch [83].

Στρατηγική μείωσης του κινδύνου για καρκίνο των ωοθηκών

Στα άτομα με διαπιστωμένη κληρονομική προδιάθεση έχουν συσταθεί κλινικές κατευθυντήριες οδηγίες παρακολούθησης και εφαρμογής προφυλακτικών ιατρικών ενεργειών. Η πρωτογενής πρόληψη, που παρέχεται μέσω της αμφοτερόπλευρης σαλπινγο-ωοθηκεκτομής, ζητείται από το 75% των γυναικών με μετάλλαξη στα γονίδια *BRCA1/2* και μειώνει τους κινδύνους ανάπτυξης καρκίνου των ωοθηκών κατά 80-96% και τη συνολική θνησιμότητα κατά 60-70%. Στα άτομα

που φέρουν μετάλλαξη στο γονίδιο *BRCA1* συνιστάται η αμφοτερόπλευρη σαλπινγο-ωθηκεκτομή μέχρι την ηλικία των 35-40 ετών (ή όταν ολοκληρωθεί η απόκτηση οικογένειας), ενώ στα άτομα που φέρουν μετάλλαξη στο γονίδιο *BRCA2* η αμφοτερόπλευρη σαλπινγο-ωθηκεκτομή προτείνεται στα 40-45 έτη λόγω διαφορών στη διεισδυτικότητα και την ηλικία εμφάνισης του καρκίνου των ωθηκών.

Ένα προτεινόμενο πρωτόκολλο χειρουργικής προσέγγισης περιλαμβάνει αμφοτερόπλευρη σαλπινγο-ωθηκεκτομή με απομάκρυνση ολόκληρων των φαλοπιανών σαλπίγγων, κυτταρολογική εξέταση των περιτοναϊκών εκπλυμάτων και διαδοχική εκτομή ολόκληρων των φαλοπιανών σαλπίγγων και των ωθηκών ανά 2-3 mm με μικροσκοπική εξέταση όλων των εκτομών για κλινικά μη φανερό καρκίνο, ο οποίος εντοπίζεται περίπου στο 9% των ατόμων που υποβάλλονται σε αμφοτερόπλευρη σαλπινγο-ωθηκεκτομή και φέρουν μετάλλαξη στα γονίδια *BRCA* [84] [85].

Λόγω των ενδείξεων ότι τα ορώδη ωθηκικά καρκινώματα προέρχονται από τις σάλπιγγες, η σαλπινγεκτομή θεωρείται πλέον ότι συμβάλλει στη μείωση του κινδύνου για καρκίνο των ωθηκών. Η στρατηγική της προφυλακτικής αφαίρεσης των φαλοπιανών σαλπίγγων μόνο και όχι των ωθηκών σε γυναίκες που φέρουν μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA* θεωρείται θεραπευτική καθώς εξαλείφει τους υποκείμενους κυτταρικούς προδρόμους του καρκίνου των ωθηκών, ενώ η ταυτόχρονη διατήρηση των ωθηκών παρέχει μακροπρόθεσμα οφέλη, όπως μειωμένο κίνδυνο για στεφανιαία νόσο. Σημαντικός περιορισμός αυτής της προσέγγισης είναι ότι το χρονικό παράθυρο κατά το οποίο τα δυνητικά καρκινικά κύτταρα μετατοπίζονται από το κροσσωτό επιθήλιο της σάλπιγγας στην ωθήκη δεν είναι με ακρίβεια οριοθετημένο, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να προσφέρει τη βέλτιστη μείωση του κινδύνου. Ως εκ τούτου, σε άτομα που φέρουν μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1/2*, έχει προταθεί μια προσέγγιση δύο βημάτων που αφορά σε σαλπινγεκτομή και καθυστερημένη ωθηκεκτομή, με σκοπό να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα της καθυστερημένης ωθηκεκτομής και της επίπτωσης στην ποιότητα ζωής καθυστερώντας την ηλικία της επαγόμενης πρόωρης εμμηνόπαυσης.

Σε πρόσφατη μελέτη, φάνηκε ότι η αμφοτερόπλευρη σαλπινγεκτομή, η οποία πραγματοποιήθηκε ως αντισυλληπτική μέθοδος, μείωσε τον κίνδυνο καρκίνου των ωοθηκών κατά 61% σε διάστημα 10 ετών [86].

Αναφορικά με τις γυναίκες που φέρουν μεταλλάξεις στα γονίδια *BRIP1*, *RAD51C* και *RAD51D* και έχουν έναν αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο των ωοθηκών (10-15%), θα πρέπει πριν από την απόφαση για προφυλακτική σαλπινγο-ωοθηκτομή να αξιολογηθεί εξίσου και το οικογενειακό τους ιστορικό. Συγκεκριμένα για το γονίδιο *BRIP1*, επί παρουσίας μεταλλάξεων το ενδεχόμενο μιας προφυλακτικής σαλπινγο-ωοθηκτομής θα πρέπει να αξιολογηθεί προσεκτικά λαμβάνοντας υπ' όψιν για αυτά τα άτομα έναν καθορισμένο μεν μέτριο δε κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών, μια μέση ηλικία διάγνωσης καρκίνου των ωοθηκών στα 64 έτη, έναν αβέβαιο, πιθανώς, χαμηλό κίνδυνο για καρκίνο του μαστού και τις γνωστές αρνητικές επιδράσεις μιας πρώιμης ωοθηκτομής. Συνεπώς, υπάρχει η πρόκληση να εκτιμηθεί ορθά η αναλογία κινδύνου/οφέλους καταδεικνύοντας την ανάγκη για βελτιωμένη έγκαιρη ανίχνευση του καρκίνου των ωοθηκών. Επιπλέον, δεδομένου ότι η *BRIP1* αποτελεί μια πρωτεΐνη που συμμετέχει στην επιδιόρθωση λαθών του DNA, πιστεύεται ότι οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *BRIP1* αποτελούν δυνητικούς θεραπευτικούς στόχους, όπως οι αναστολείς της *PARP*, χωρίς, ωστόσο, αυτό να έχει αποδειχθεί [80]. Αντίθετα, οι μεταλλάξεις στα *PALB2*, *ATM*, *CHEK2*, *BARD1*, *MRE11A*, *NBN* και *RAD51B* φαίνεται, επί του παρόντος, να μη σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο των ωοθηκών και, ως εκ τούτου, στις γυναίκες που φέρουν τέτοιες μεταλλάξεις δεν προτείνεται κάποιο πρωτόκολλο μείωσης του κινδύνου για καρκίνο των ωοθηκών [87].

Από την άλλη πλευρά, η στρατηγική της παρακολούθησης ατόμων που φέρουν μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1/2* δεν αντιπροτείνεται στη θέση της αμφοτερόπλευρης σαλπινγο-ωοθηκτομής για τη διαχείριση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών, καθώς δεν έχει φανεί ότι μειώνει τη θνησιμότητα.

Αναφορικά με την επίδραση της αμφοτερόπλευρης σαλπινγο-ωοθηκτομής στον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού υπάρχουν αντικρουόμενες απόψεις.

Έχει δειχθεί ότι μια αμφοτερόπλευρη ωθηκεκτομή παρέχει επιπρόσθετο όφελος σε άτομα που φέρουν μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2* μειώνοντας τον δια βίου κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού περίπου κατά 50% [84]. Σε άλλη μελέτη υποστηρίχθηκε ότι μια μείωση του κινδύνου για εμφάνιση καρκίνου του μαστού θα μπορούσε να παρατηρηθεί σε άτομα που φέρουν μετάλλαξη στο γονίδιο *BRCA2*, καθώς οι περισσότεροι καρκίνοι μαστού με μετάλλαξη στο *BRCA2* είναι θετικοί στον υποδοχέα των οιστρογόνων [88]. Συνεπώς, απαιτούνται προοπτικές μελέτες μεγάλης κλίμακας με συστηματική παρακολούθηση των ατόμων που συμμετέχουν σε τέτοια πρωτόκολλα για την αποσαφήνιση αυτού του ζητήματος.

Θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου των ωθηκών

Όπως έχει αναφερθεί, τα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2* κωδικοποιούν πρωτεΐνες που είναι σημαντικές κατά την επιδιόρθωση θραύσεων στις δύο αλυσίδες του DNA. Το «δεύτερο χτύπημα» σε ένα άτομο που φέρει μια τέτοια μετάλλαξη προκύπτει σε κύτταρα που είναι επιρρεπή στη μεταλλαξιγένεση λόγω χρήσης των μηχανισμών επιδιόρθωσης λαθών στο DNA που είναι επιρρεπείς σε λάθη. Ως γνωστόν, το ένζυμο της PARP (πολυμεράση της πολυ-(ADP-ριβόζης)) κατέχει σημαντικό ρόλο στην επιδιόρθωση λαθών στο δίκλωνο DNA μέσω του μηχανισμού του ομόλογου ανασυνδυασμού. Η απώλεια λειτουργικότητας τόσο της PARP όσο και του *BRCA1* ή του *BRCA2* οδηγεί σε συνθετική θνησιμότητα για το κύτταρο. Μελέτες έχουν καταδείξει τη θεραπευτική χρήση των αναστολέων της PARP σε γυναίκες με καρκίνο που σχετίζεται με μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2*, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου των ωθηκών [89]. Αρκετές δοκιμές που μελετούν τη χρήση των αναστολέων της PARP είναι σε εξέλιξη και ένας τέτοιος παράγοντας (olaparib) έχει εγκριθεί τόσο από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (EMA) όσο και από τον Αμερικανικό Οργανισμό Φαρμάκων (FDA) σε συγκεκριμένες περιπτώσεις ατόμων με καρκίνο των ωθηκών και μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1/BRCA2*. Η χρήση των αναστολέων της PARP στη θεραπεία του καρκίνου των ωθηκών θα αναλυθεί λεπτομερώς ακολούθως.

Κατευθυντήριες οδηγίες παραπομπής για γονιδιακό έλεγχο στον καρκίνο των ωοθηκών

Δεδομένης της σχετικά υψηλής συχνότητας των μεταλλάξεων κυρίως στα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2*, αλλά και σε άλλα γονίδια, οι μεταλλάξεις των οποίων προδιαθέτουν στον καρκίνο των ωοθηκών, υπάρχει πλέον η προσέγγιση της ενσωμάτωσης των γενετικών αναλύσεων στη συνήθη κλινική πρακτική για γυναίκες με διάγνωση καρκίνου των ωοθηκών όλων των ιστολογικών υποτύπων εκτός του βλεννώδους, ανεξαρτήτως ηλικίας διάγνωσης και οικογενειακού ιστορικού [2] [90].

Σύνδρομο Lynch

Το σύνδρομο Lynch προκαλείται από ανεπάρκειες στα γονίδια επιδιόρθωσης αταίριαστων βάσεων (mismatch repair, MMR), *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* και *PMS2*, οι οποίες αντιπροσωπεύουν το 1-3% όλων των καρκίνων παχέος εντέρου, ή μέσω μιας μεγάλης απαλοιφής στο 3' άκρο του γονιδίου *EPCAM* που οδηγεί σε μεθυλίωση του παρακείμενου υποκινητή του *MSH2*, ενώ το 15% των σποραδικών καρκίνων παχέος εντέρου προκαλούνται από μεθυλίωση του υποκινητή του *MLH1* [91]. Η συχνότητα του συνδρόμου αυτού υπολογίστηκε πρόσφατα στο 1:279 περιστατικά ορθοκολικού καρκίνου/καρκίνου ενδομητρίου, καθιστώντας το ένα συχνό κληρονομικό καρκινικό σύνδρομο [92]. Η μη φυσιολογική λειτουργία του μηχανισμού MMR που οφείλεται σε υπερμεθυλίωση του υποκινητή του *MLH1* οδηγεί σε πλήρη αποσιώπηση του γονιδίου [93]. Ο σωρευτικός δια βίου κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου παχέος εντέρου κυμαίνεται μεταξύ 10% και 74%, ενώ για τον καρκίνο του ενδομητρίου ο κίνδυνος εμφάνισης είναι στο 15-71%. Έχει βρεθεί ότι οι αθροιστικές συχνότητες εμφάνισης καρκίνου παχέος εντέρου μέχρι την ηλικία των 70 ετών είναι 46%, 35%, 20% και 10% για άτομα που φέρουν μεταλλάξεις στα *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* και *PMS2*, αντίστοιχα. Αντίθετα, δεν έχει φανεί να σχετίζεται η ανίχνευση μεταλλάξεων στα *MSH6* and *PMS2* με την εκδήλωση καρκίνου οποιουδήποτε τύπου πριν την ηλικία των 40 ετών [94].

Αναφορικά με τον καρκίνο του ενδομητρίου, ο δια βίου κίνδυνος εμφάνισης για γυναίκες που φέρουν μεταλλάξεις στα *MLH1* ή *MSH2* είναι 40% με μέση ηλικία

διάγνωσης τα 49 έτη, ενώ οι γυναίκες με μεταλλάξεις στο *MSH6* έχουν παραπλήσιο κίνδυνο, αλλά μεγαλύτερη μέση ηλικία διάγνωσης. Ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών σε γυναίκες με σύνδρομο Lynch ανέρχεται στο 6-8% και περιορίζεται κυρίως σε γυναίκες που φέρουν μεταλλάξεις στα *MLH1* και *MSH2* [94] [95]. Το σύνδρομο Lynch σχετίζεται και με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του στομάχου, του ηπατοχολικού συστήματος, του λεπτού εντέρου, του εγκεφάλου και του δέρματος. Γενικά, ο σωρευτικός κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου εκτός του παχέος εντέρου προσεγγίζει το 47.4% για τις γυναίκες και το 26.5% για τους άνδρες [96]. Η συσχέτιση γονότυπου-φαινότυπου έχει περιγραφεί και στο σύνδρομο Lynch, όπου τα άτομα που φέρουν μεταλλάξεις στο *MSH2* έχουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ουροθηλιακού καρκίνου, καρκίνου του δέρματος και του εγκεφάλου [97] [98], οι γυναίκες με μεταλλάξεις στο *MSH6* έχουν αυξημένο κίνδυνο για γυναικολογικούς καρκίνους, τα άτομα με μεταλλάξεις στο *MLH1* έχουν αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο του μαστού, ενώ χαμηλότερος κίνδυνος για καρκίνο παχέος εντέρου παρατηρείται στα άτομα με μεταλλάξεις στα *MSH6* και *PMS2* [94]. Οι διαφορετικοί τύποι καρκίνου που συνδέονται με το σύνδρομο Lynch εκδηλώνονται σε διαφορετικά ηλικιακά εύρη, όπου για τον καρκίνο των ωοθηκών το εύρος είναι τα 30-49 έτη, για τον καρκίνο του ενδομητρίου ή του εγκεφάλου το εύρος είναι τα 50-69 έτη και για τον ουροθηλιακό καρκίνο, τον καρκίνο του λεπτού εντέρου, τον καρκίνο του στομάχου ή του δέρματος η ηλικία εκδήλωσης είναι συνήθως μετά τα 70 έτη [99]. Επί του παρόντος, δεν υπάρχει σαφής σύνδεση του συνδρόμου Lynch με αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο του μαστού, παρόλο που ορισμένες μελέτες το αναφέρουν, και για το λόγο αυτό δεν έχουν συσταθεί κλινικές οδηγίες για εντατικοποιημένη παρακολούθηση του μαστού σε γυναίκες με σύνδρομο Lynch [100] [101]. Ωστόσο, σε πρόσφατη μελέτη, ασθενείς με καρκίνο μαστού ή/και ωοθηκών βρέθηκαν να φέρουν μεταλλάξεις στα γονίδια MMR, με μεγαλύτερα ποσοστά μεταλλάξεων στα *MSH6* και *PMS2*. Το 27.5% των ασθενών αυτών με μεταλλάξεις στα γονίδια MMR είχαν πρώτη διάγνωση καρκίνου μαστού ή ωοθηκών, με την πλειονότητα αυτών (73.1%) να μην έχει διαγνωστεί με καρκίνο παχέος εντέρου ή ενδομητρίου τη στιγμή του γονιδιακού ελέγχου [102]. Συνεπώς, αυτή η ομάδα ασθενών δε θα είχε ένα

ξεκάθαρο γενετικό υπόβαθρο με τις τρέχουσες μεθόδους διαλογής για σύνδρομο Lynch.

Τα κριτήρια Amsterdam, που έχουν συσταθεί για την ταυτοποίηση ασθενών που πιθανώς φέρουν μεταλλάξεις που συνδέονται με το σύνδρομο Lynch [103], σχετίζονται με σχετικά χαμηλή ευαισθησία (28–45%), αλλά υψηλή ειδικότητα (99%), ενώ οι αναθεωρημένες οδηγίες Bethesda, βάσει των οποίων μπορούν να επιλεχθούν ασθενείς με μικροδορυφορική αστάθεια στον όγκο για να προχωρήσουν σε γονιδιακό έλεγχο, [104] σχετίζονται με υψηλότερη ευαισθησία (73–91%), αλλά χαμηλότερη ειδικότητα (82–77%). Αποτέλεσμα της εφαρμογής αυτών των κριτηρίων είναι να χάνεται περίπου το 72% και 27% των υποψήφιων περιστατικών για σύνδρομο Lynch, αντίστοιχα [105]. Συνεπώς, για την ορθότερη προεπιλογή περιστατικών καρκίνων παχέος εντέρου που χρήζουν γονιδιακού ελέγχου για υποψία συνδρόμου Lynch έχει προταθεί η αξιολόγηση των όγκων με ανοσοϊστοχημική χρώση (IHC) των πρωτεϊνών MMR ή με έλεγχο για μικροδορυφορική αστάθεια (MSI) [106] [107]. Με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων προκύπτουν μοτίβα χρώσης στα οποία παρατηρείται διατήρηση ή απώλεια της χρώσης, ανάλογα με την έκφραση των τεσσάρων αυτών πρωτεϊνών υπό τη μορφή διμερών, δηλαδή MLH1/PMS2 και MSH2/MSH6. Αμφότερα τα MSI και IHC είναι αποτελεσματικά εργαλεία διαλογής περιστατικών καρκίνου παχέος εντέρου, αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις, και ενδομητρίου, που, ωστόσο, ενδέχεται να χάσουν την ταυτοποίηση του 13-23% των ασθενών με σύνδρομο Lynch, ενώ έχει παρατηρηθεί ότι έχουν χαμηλότερη ευαισθησία στην ανίχνευση μεταλλάξεων στα *MSH6* και *PMS2*.

Σε ασθενείς που παρουσιάζουν απώλεια της πρωτεΐνης MLH1 κατά την ανοσοϊστοχημεία, προτείνεται να διεξαχθεί έλεγχος για μεταλλάξεις στο *BRAF* (π.χ., p.V600E) και για υπερμεθυλίωση του υποκινητή του *MLH1*, ώστε να γίνει διαχωρισμός μεταξύ των περιστατικών καρκίνου παχέος εντέρου που έχουν απώλεια στην MLH1 λόγω συνδρόμου Lynch και των σποραδικών περιστατικών που οφείλονται σε επιγενετική μεθυλίωση του υποκινητή του *MLH1*. Οι μεταλλάξεις στο *BRAF* εντοπίζονται σε ποσοστό 40-87% των σποραδικών καρκίνων παχέος εντέρου

με μικροδορυφορική αστάθεια, αλλά είναι σπάνιες σε ασθενείς με σύνδρομο Lynch [108]. Ουσιαστικά, η ανίχνευση μιας μετάλλαξης στο *BRAF* σε ένα περιστατικό καρκίνου παχέος εντέρου με μικροδορυφορική αστάθεια μπορεί να αποκλείσει την ύπαρξη συνδρόμου Lynch.

Ωστόσο, πρέπει να αναφερθεί ότι η ετερογένεια στην έκφραση των πρωτεϊνών MMR αποτελεί σπάνιο φαινόμενο και οφείλεται σε διαφορετικά μοτίβα έκφρασης αυτών των πρωτεϊνών τα οποία μπορεί να συνυπάρχουν στον ίδιο όγκο. Αυτές οι διαφορές στην έκφραση μπορεί να οφείλονται στη διαφορετική έκφραση των επιτόπων, σε μεταλλάξεις δεύτερου χτυπήματος ή σε μεθυλίωση επιλεγμένων καρκινικών κλώνων, ακόμα και σε παράγοντες μικροπεριβάλλοντος του όγκου, όπως υποξία και οξειδωτικό στρες [109] [110].

3. ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗ ΛΑΘΩΝ ΣΤΟ DNA

Γονιδιωματική αστάθεια και καρκίνος

Το 1914, ο βιολόγος Theodor Boveri υπέθεσε πρώτος ότι οι χρωμοσωμικές ανισορροπίες είναι η υποκείμενη αιτία της ογκογένεσης. Πλέον είναι γνωστό ότι θεμελιώδες χαρακτηριστικό του καρκίνου αποτελεί η γονιδιωματική αστάθεια. Η ανάπτυξή του βασίζεται σε δύο βασικές διεργασίες, τη συνεχή απόκτηση κληρονομήσιμων γενετικών παραλλαγών σε μεμονωμένα κύτταρα με περισσότερο ή λιγότερο τυχαίες μεταλλάξεις και τη φυσική επιλογή, επιδρώντας αμφότερες στην προκύπτουσα φαινοτυπική ποικιλομορφία. Η επιλογή μπορεί είτε να εξαλείψει κύτταρα που φέρουν επιβλαβείς μεταλλάξεις είτε μπορεί να ενισχύσει τα κύτταρα που φέρουν γενετικές μεταβολές προσδίδοντας σε αυτά την ικανότητα πολλαπλασιασμού και επιβίωσης συγκριτικά με παρακείμενα κύτταρα. Συνεπώς, υπάρχει το ενδεχόμενο να προκύψει ένα μεμονωμένο κύτταρο που θα έχει τις επωφελείς για το ίδιο μεταλλάξεις που θα του επιτρέπουν να πολλαπλασιάζεται αυτόνομα, να διηθεί τους ιστούς και να μεθίσταται [111] [112].

Τα κύτταρα κατά την εξέλιξή τους διέρχονται από διάφορα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου. Επί παρουσίας βλαβών στο DNA επιστρατεύονται οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης αυτών. Σε περίπτωση που η βλάβη δεν μπορεί να επιδιορθωθεί, ενεργοποιούνται επιπρόσθετα μονοπάτια σηματοδότησης που οδηγούν στην επαγωγή της απόπτωσης. Το δίκτυο αυτών των μηχανισμών που ονομάζεται DDR (**D**NA **D**amage **R**esponse) ελέγχεται και ρυθμίζεται σε επίπεδο μεταγραφικό, μετα-μεταγραφικό και μετα-μεταφραστικό [113, 114].

Η σημασία της σωστής λειτουργίας του δικτύου DDR αφορά στη διατήρηση του γονιδιώματος και την πρόληψη του καρκίνου. Είναι γνωστό ότι τα γονίδια που κωδικοποιούν σημαντικές για το DDR πρωτεΐνες που συμμετέχουν στα μονοπάτια επιδιόρθωσης του DNA είναι αυτά που μεταλλάσσονται συχνότερα. Πιστεύεται ότι η ύπαρξη απενεργοποιητικών μεταλλάξεων στο σύστημα του DDR πυροδοτεί την συσσώρευση επιπρόσθετων γενετικών ανωμαλιών που οδηγούν εν τέλει στη δημιουργία όγκου. Οι πρώιμες προκαρκινικές αλλοιώσεις παρουσιάζονται με συσσώρευση γενοτοξικών αλλοιώσεων και σημείων γήρανσης. Θωρείται ότι η

γήρανση δρα ανασταλτικά ως προς τη μετατροπή αυτών των αλλοιώσεων σε κακόηθες νεόπλασμα. Κατά την εξέλιξη της ογκογένεσης, τα αρχόμενα καρκινικά κύτταρα απενεργοποιούν το σύστημα DDR και ξεπερνούν τις διεργασίες της γήρανσης, υποδηλώνοντας ότι η αποσιώπηση του καταρράκτη σηματοδότησης στο δίκτυο DDR είναι προαπαιτούμενο για την κακοήθη αυτή μετατροπή [115] [116].

Μονοπάτια επιδιόρθωσης λαθών του DNA

Υπάρχουν τουλάχιστον οκτώ διακριτοί μηχανισμοί επιδιόρθωσης των λαθών που προκύπτουν στο DNA για την αντιμετώπιση των διαφορετικών γενοτοξικών αλλοιώσεων. Επιγραμματικά, οι μηχανισμοί αυτοί αφορούν σε:

- ✓ Ομόλογο ανασυνδυασμό (homologous recombination, HR)
- ✓ Μη ομόλογη ένωση άκρων (non-homologous end joining, NHEJ)
- ✓ Επιδιόρθωση λαθών των αταίριαστων βάσεων (mismatch repair, MMR)
- ✓ Επιδιόρθωση με εκτομή βάσης (base-excision repair, BER)
- ✓ Επιδιόρθωση με εκτομή νουκλεοτιδίου (nucleotide-excision repair, NER)
- ✓ Σύνθεση δια μέσου βλάβης (translesion synthesis, TLS)
- ✓ Αναιμία Fanconi (Fanconi anemia, FA), και
- ✓ Άμεση επιδιόρθωση με DNA μεθυλοτρανσφεράση της O^6 -μεθυλογουανίνης (O^6 -methylguanine DNA methyltransferase, MGMT).

με την Εικόνα 3 να απεικονίζει τους πέντε βασικότερους μηχανισμούς επιδιόρθωσης (Εικόνα 3α) με έμφαση στο μονοπάτι του ομόλογου ανασυνδυασμού (Εικόνα 3β).

Πιο αναλυτικά, το μονοπάτι **MMR** αναγνωρίζει λανθασμένες ενθέσεις, και απαλοιφές που έχουν παραβλεφθεί από την ενδογενή διορθωτική δράση των DNA πολυμερασών. Από την άλλη πλευρά, ο μηχανισμός **BER** επιδιορθώνει θραύσεις

μονών αλυσίδων του DNA (single-stranded breaks, SSB) και τροποποιήσεις βάσεων που δεν αλλοιώνουν την έλικα. Οι τροποποιημένες βάσεις ανιχνεύονται και αποκόπτονται από τις DNA γλυκοζυλάσες, δημιουργώντας μια αβασική θέση [117]. Τα ένζυμα πολυμερασών PARP1 και PARP2 ενεργοποιούνται παρουσία θραύσεων μονών αλυσίδων του DNA και διευκολύνουν την στρατολόγηση επιπρόσθετων παραγόντων, όπως το XRCC1 (X-Ray Repair Cross Complementing 1) στο σημείο της γενοτοξικής βλάβης [118].

Ένας άλλος σημαντικός μηχανισμός αντιμετώπισης λαθών μονόκλωνου DNA είναι ο μηχανισμός επιδιόρθωσης με εκτομή νουκλεοτιδίου (**NER**). Υπάρχουν δύο υποκατηγορίες της NER, η μεταγραφική NER (Transcription – coupled NER, TC-NER) που πυροδοτείται από αλλοιώσεις που εμποδίζουν τη δράση της RNA πολυμεράσης II και η NER ολικού γονιδιώματος (Global-Genome NER, GG-NER), που εντοπίζει βλάβες οπουδήποτε στο γονιδίωμα [119].

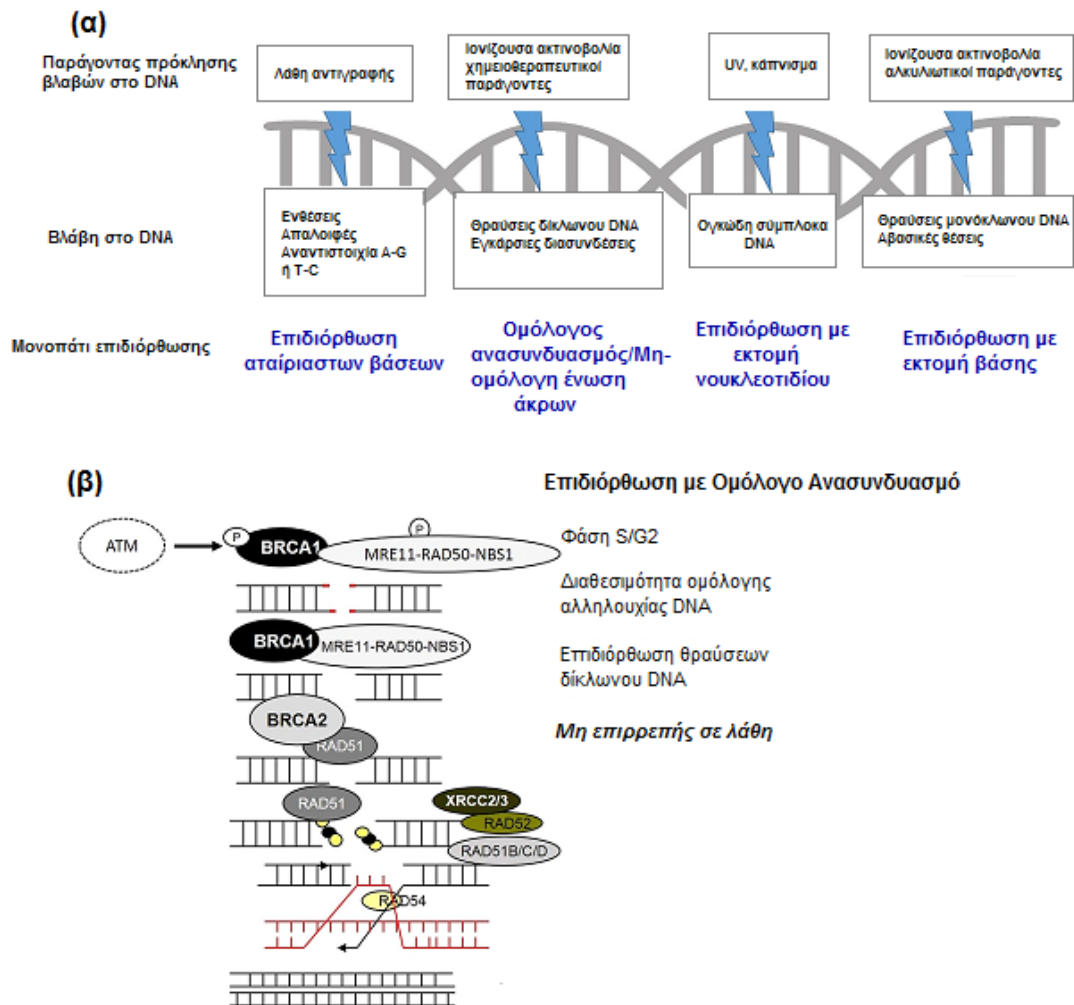
Αναφορικά με την επιδιόρθωση θραύσεων στις δύο αλυσίδες του DNA (DSB) ενεργοποιούνται οι μηχανισμοί του ομόλογου ανασυνδυασμού (**HR**) και της μη-ομόλογης ένωσης των άκρων (**NHEJ**). Οι δύο αυτοί επιδιορθωτικοί μηχανισμοί διαφοροποιούνται ως προς τη φάση του κυτταρικού κύκλου στην οποία ενεργοποιούνται. Ο ομόλογος ανασυνδυασμός αποτελεί ένα μονοπάτι επιδιόρθωσης για τις θραύσεις του δίκλωνου DNA, μη επιρρεπές σε λάθη, που περιορίζεται στις φάσεις S και G2 του κυτταρικού κύκλου, χρησιμοποιώντας μια ομόλογη αδελφή χρωματίδα. Αρχικά, η δίκλωνη θραύση αποκόβεται για να δημιουργήσει μια μονόκλωνη 3'-προεξοχή, η οποία επικαλύπτεται άμεσα από την πρωτεΐνη πρόσδεσης σε μονόκλωνο DNA, RPA (Replication protein A), με την προεξοχή αυτή να διηθεί εν τέλει την αδελφή χρωματίδα. Εν συνεχεία, η RPA αντικαθίσταται από τη RAD51 με έναν τρόπο που εξαρτάται από τη δράση των πρωτεϊνών ATM/CHK2/BRCA1/BRCA2/PALB2. Η RAD51 μεσολαβεί στην ανεύρεση ομολογίας, την ανταλλαγή κλώνων και το σχηματισμό του κόμβου του Holliday. Η σημασία του συγκεκριμένου μηχανισμού έγκειται στο γεγονός ότι ασθενείς με μεταλλάξεις γαμετικής σειράς σε ετεροζυγωτία σε διαφορετικά γονίδια του ομόλογου ανασυνδυασμού, όπως *BRCA1*, *BRCA2* και *RAD51C*, εμφανίζουν

σημαντικά αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης διαφόρων τύπων καρκίνου. Επιπλέον, έχουν ταυτοποιηθεί επανειλημμένα μεταλλάξεις σε γονίδια, όπως τα *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *CHEK2*, *RAD50*, *RAD51C* σε διαφορετικούς τύπου καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του πνεύμονα, των ωοθηκικών καρκινωμάτων, του παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος και της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας [120] [121] [122].

Για την αντιμετώπιση των θραύσεων στο δίκλωνο DNA μπορεί να επιστρατευτεί και ο μηχανισμός της μη ομόλογης ένωσης των άκρων (**NHEJ**). Για την ενεργοποίηση αυτού του μονοπατιού δεν απαιτείται η ύπαρξη ενός άθικτου εκμαγείου (δηλαδή, μια ομόλογη αδελφή χρωματίδα). Ο μηχανισμός αυτός ενεργοποιείται κατά τη διάρκεια της φάσης G1 του κυτταρικού κύκλου, όπου κατά την έναρξη, οι μη-καταλυτικές υπομονάδες Ku70 και Ku80 σχηματίζουν ένα ετεροδιμερές που προσδένεται στα ελεύθερα άκρα του DNA. Εν συνεχεία, το σύμπλοκο αυτό στρατολογεί την καταλυτική υπομονάδα DNA-PKcs (DNA-dependent Protein Kinase). Η δραστικότητα κινάσης της υπομονάδας DNA-PKcs είναι απαραίτητη για τη μεσολαβούμενη από το σύμπλοκο XRCC4-Lig4 επανένωση των σπασμένων άκρων του DNA κατά τη διάρκεια της μη ομόλογης ένωσης των άκρων. Ωστόσο, ο μηχανισμός αυτός είναι επιρρεπής σε λάθη διότι η αρχική αλληλουχία μπορεί να συντηρηθεί μόνο όταν τα δύο άκρα του DNA μπορούν να συνδεθούν χωρίς προηγούμενη εκτομή. Εάν η δίκλωνη θραύση δεν οφείλεται σε διασπασμένο φωσφοδιεστερικό δεσμό αλλά είναι το αποτέλεσμα της διάσπασης του πολυπεπτιδικού σκελετού της δομής του DNA, η επανένωση δεν μπορεί να λάβει χώρα πριν τη δημιουργία μιας ελεύθερης 5'-φωσφορικής ομάδας και μιας 3'-υδροξυλομάδας. Τα ελεύθερα άκρα του DNA υπόκεινται σε διάφορες τροποποιήσεις, όπως νουκλεολυτική διάσπαση και πλήρωση των κενών των άκρων, οι οποίες, όμως, είναι ιδιαίτερα επιδεκτικές σε μεταλλάξεις, καθιστώντας την επιδιόρθωση των δίκλωνων θραύσεων ανακριβή. Εκτός από τον κλασικό τύπο της μη ομόλογης ένωσης των άκρων, υπάρχουν εναλλακτικοί μηχανισμοί, ομοίως επιρρεπείς σε λάθη, όπως η μεσολαβούμενη από αλληλουχίες μικρο-ομολογίας

ένωση των άκρων (microhomology-mediated end-joining, MMEJ), η οποία βασίζεται στην εκτομή των κλώνων και την ένωση μικρών περιοχών με ομολογία [123] [124].

Το μονοπάτι της αναιμίας Fanconi (**FA**) ενεργοποιείται για την απομάκρυνση των διακλωνικών εγκάρσιων συνδέσεων (ICLs) και μοιράζεται κοινές συνιστώσες με τα μονοπάτια του ομόλογου ανασυνδυασμού και της επιδιόρθωσης με εκτομή νουκλεοτιδίου, όπως οι πρωτεΐνες BRCA2 και PALB2. Οι πρωτεΐνες στο μονοπάτι αυτό μπορούν να ομαδοποιηθούν σε τρεις λειτουργικές υποομάδες: το σύμπλοκο-πυρήνας FA, το σύμπλοκο FA-ID και τις καθοδικές για το μονοπάτι πρωτεΐνες. Το σύμπλοκο-πυρήνας FA περιλαμβάνει οκτώ πρωτεΐνες (FANCA, B, C, E, F, G, L και M). Επί της ουσίας, αποτελείται από ένα σύμπλοκο λιγάσης E3 ουβικιτίνης πολλαπλών υπομονάδων, που επάγει τη μονο-ουβικιτινίωση του συμπλόκου FA-ID που αποτελείται από τις πρωτεΐνες FANCD2 και FANCI. Με τη σειρά του, το σύμπλοκο FA-ID συμβάλλει στην επιδιόρθωση των διακλωνικών εγκάρσιων συνδέσεων μέσω των καθοδικών πρωτεϊνών, δηλαδή των πρωτεϊνών FANCD1 (BRCA2), FANCI (BRIP1/BACH1), FANCN (PALB2), FANCO (SLX4) και FANCP (RAD51C), οι οποίες περιλαμβάνουν γνωστά γονίδια προδιάθεσης στον καρκίνο του μαστού. Μετά την επιδιόρθωση των συνδέσεων αυτών προκύπτει μια θέση δίκλωνης θραύσης, μέσω της οποίας ενεργοποιείται το μονοπάτι του ομόλογου ανασυνδυασμού με τη βοήθεια των TLS (translesion DNA synthesis) πολυμερασών. Εν τέλει, επιστρατεύεται το μονοπάτι της επιδιόρθωσης με εκτομή νουκλεοτιδίου για την εκκαθάριση των υπολειμματικών προϊόντων προσθήκης του DNA, πριν το κλείσιμο του κενού από τις DNA πολυμεράσες. Συνεπώς, το μονοπάτι της αναιμίας Fanconi βασίζεται στη συντονισμένη συνεργασία συνιστωσών των μηχανισμών του ομόλογου ανασυνδυασμού και της επιδιόρθωσης με εκτομή νουκλεοτιδίου, καθώς και στη δράση των TLS πολυμερασών [122] [125].

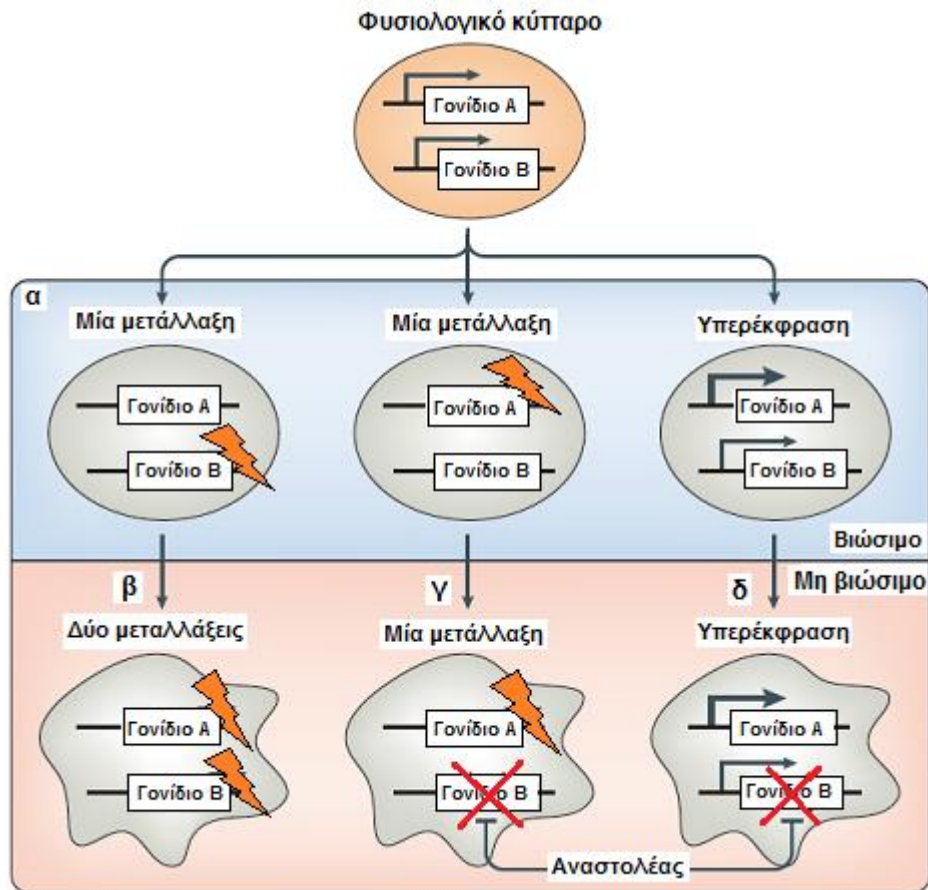


Εικόνα 3: α) Οι πέντε βασικοί μηχανισμοί επιδιόρθωσης λαθών στο DNA· β) Επιδιόρθωση θραύσεων δίκλωνου DNA μέσω του μηχανισμού του ομόλογου ανασυνδυασμού. (Τροποποιημένο σχήμα από τους Ledermann *et al.*, Eur J Cancer, 2016 [126])

Συνθετική θνησιμότητα

Η συνθετική θνησιμότητα περιγράφει το φαινόμενο σε ένα κύτταρο ή έναν οργανισμό όπου μια ανεπάρκεια, μέσω μιας μετάλλαξης, σε ένα από τα δύο γονίδια έχει ελάχιστη ή μηδαμινή επίδραση, αλλά ο συνδυασμός ανεπαρκειών και στα δύο γονίδια οδηγεί σε μια νοσούσα κατάσταση (synthetic sickness) ή ακόμα και στο θάνατο (synthetic lethality) (Εικόνα 4). Μια βασική εφαρμογή της συνθετικής θνησιμότητας είναι η χρήση αναστολέων του ενζύμου της PARP1 (Poly [ADP-ribose])

polymerase 1) για τη θεραπεία καρκίνων με ανεπάρκεια στα γονίδια *BRCA1* ή *BRCA2*. Η ριβοζυλίωση του ADP εμπλέκεται σε ποικίλες διεργασίες, όπως η κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση, η απόπτωση και η μεταγραφική ρύθμιση. Ωστόσο, έχει περιγραφεί επαρκώς και ο ρόλος της στην επιδιόρθωση των λαθών του DNA και τη σταθερότητα του γονιδιώματος [127] [128].



Εικόνα 4: Η λογική της συνθετικής θνησιμότητας. Η απώλεια ή η αναστολή ενός εκ των πρωτεϊνών των γονιδίων A ή B ή η υπερέκφραση του γονιδίου A οδηγεί σε βιώσιμο κύτταρο (α). Η μετάλλαξη (β) ή η φαρμακολογική αναστολή (γ) της πρωτεΐνης του γονιδίου B σε κύτταρα με μετάλλαξη (β, γ) ή υπερέκφραση (δ) του γονιδίου A οδηγεί σε συνθετική θνησιμότητα. Το πυκνότερο βέλος αντιπροσωπεύει την υπερέκφραση, το σχήμα κεραυνού τη μετάλλαξη και το κόκκινο χιαστί τη φαρμακολογική αναστολή. Τα βιώσιμα κύτταρα έχουν οβάλ σχήμα και τα μη βιώσιμα απεικονίζονται ως τυχαία σχήματα. (Τροποποιημένο σχήμα από τους O' Neil *et al.*, Nat Rev Genet, 2017 [129]).

Ανάπτυξη Αναστολέων της PARP

Τα ένζυμα πολυμερασών της πολυ(ADP-ριβόζης) εμπλέκονται στην επιδιόρθωση λαθών του DNA μέσω ενεργοποίησης των μονοπατιών επιδιόρθωσης με εκτομή βάσης (BER) και εναλλακτικής ένωσης των άκρων (Alt-EJ) και αναστολής του μονοπατιού της μη ομόλογης ένωσης των άκρων (NHEJ). Σε κύτταρα με ανεπάρκεια λειτουργίας του ομόλογου ανασυνδυασμού η παρουσία αναστολέων της PARP προκαλεί συσσώρευση μη επιδιορθωμένων θραύσεων στο δίκλωνο DNA, με κατάληξη τον κυτταρικό θάνατο [55].

Το ένζυμο PARP1 είναι το βασικό μέλος της οικογένειας των ενζύμων PARP, που απαριθμεί 17 μέλη, και ανακαλύφθηκε τη δεκαετία του 1960 [130]. Αποτελείται από τρεις λειτουργικούς τομείς. Ο αμινοτελικός τομέας πρόσδεσης του DNA αποτελείται από δύο δακτύλους ψευδαργύρου, σημαντικοί για την πρόσδεση της PARP1 στις θραύσεις μονής και διπλής αλύσου, ενώ πρόσφατα περιγράφηκε και ένας τρίτος δάκτυλος ψευδαργύρου που συμβάλλει στη σύζευξη μεταξύ μορίων DNA και καταλυτικών περιοχών της PARP1 [131]. Η κεντρική περιοχή της πρωτεΐνης αφορά σε έναν τομέα αυτοτροποποίησης στον οποίο προσκολλώνται χαρακτηριστικές ομάδες ADP-ριβόζης, επιτρέποντας την πολυ(ADP-ριβοζυλίωση) του μορίου, ενώ περιλαμβάνει και ένα μοτίβο BRCT που εξυπηρετεί σε πιθανές άλλες πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Ο καρβοξυτελικός τομέας συμβάλλει στη μεταφορά των υπομονάδων ADP-ριβόζης από μόρια NAD^+ σε πρωτεϊνικούς δέκτες, σχηματίζοντας πολυμερή pADPr.

Μετά από βλάβη στο DNA, η PARP1 προσεγγίζει τη θέση της αλλαγής και προκαλεί το σχηματισμό διακλαδισμένων αλύσεων pADPr. Η προσθήκη των μορίων pADPr παρεμβαίνει στις λειτουργίες των πρωτεϊνών, όπως των ιστονών, της τοποϊσομεράσης I και της DNA-PK. Εν τέλει, το συσσωμάτωμα από pADPr προσαρτάται στην PARP1, γεγονός που οδηγεί στην στρατολόγηση διαφόρων πρωτεϊνών, όπως η XRCC1, μια πρωτεΐνη που συναρμολογεί και ενεργοποιεί το μηχανισμό επιδιόρθωσης με εκτομή βάσης. Παράλληλα, μειώνεται η συγγένεια πρόσδεσης της PARP1, οδηγώντας σε απομάκρυνση του μορίου αυτού από τη θέση βλάβης. Με τον τρόπο αυτό, παρέχεται η πρόσβαση στις πρωτεΐνες των

επιδιορθωτικών μηχανισμών και καταστέλλεται η περαιτέρω σύνθεση του pADPr. Σε αυτή την καταστολή συμβάλλουν δύο ένζυμα που υδρολύουν το συσσωμάτωμα pADPr, η γλυκοϋδρολάση πολυ(ADP-ριβόζης) (PARG) και πιθανόν η υδρολάση ADP-ριβόζης (ARH3). Συνεπώς, μέσω της συνεργιστικής δράσης αυτών των ενζύμων το pADPr απομακρύνεται από την PARP1, αποκαθίσταται η ικανότητά της να αναγνωρίζει θραύσεις στους κλώνους του DNA και ξεκινά ένας νέος κύκλος σηματοδότησης της βλάβης [132].

Εκτός από το ρόλο της PARP1 στο μηχανισμό επιδιόρθωσης με εκτομή βάσης, έχει παρατηρηθεί ότι ανάλογα με τη σύνθεση του pADPr είναι εφικτή η στρατολόγηση των πρωτεϊνών MRE11 (recruitment of mitotic recombination 11) και NBS1 (κωδικοποιείται από το γονίδιο *NBN*) [133] για την ενεργοποίηση του ομόλογου ανασυνδυασμού, που επιτρέπει στο ένα αντίγραφο του γονιδίου να δράσει ως εκμαγείο για την αποκατάσταση ενός δεύτερου αντιγράφου του ίδιου γονιδίου. Μια επιπρόσθετη λειτουργία της είναι να προλαμβάνει την πρόσδεση των πρωτεϊνών Ku στα ελεύθερα άκρα του DNA, προλαμβάνοντας την ενεργοποίηση του ανταγωνιστικού, αλλά επιρρεπούς σε λάθη μηχανισμού της μη ομόλογης ένωσης των άκρων [134]. Επιπλέον, η PARP1 ενδέχεται να συμμετέχει σε μεταγραφικές ρυθμίσεις, με τροποποίηση της δομής της χρωματίνης, μεταβολή των προτύπων μεθυλίωσης του DNA ή αλληλεπιδρώντας με μεταγραφικούς παράγοντες [135].

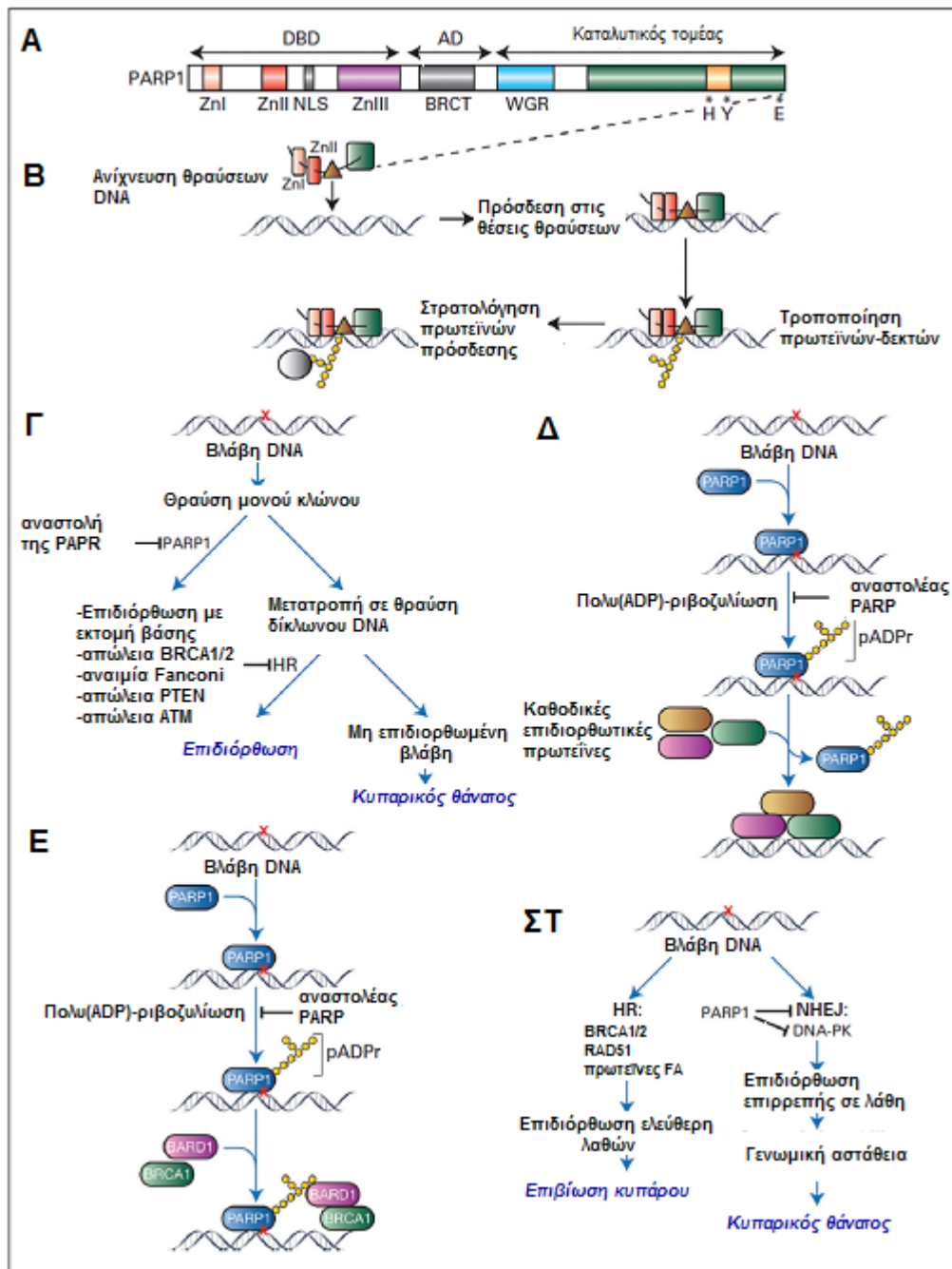
Ωστόσο, θέτοντας αυστηρά δομικά και λειτουργικά κριτήρια, άλλα έξι ένζυμα της οικογένειας PARP μπορούν να έχουν ρόλο πολυμερασών πολυ(ADP-ριβόζης), ενώ τα εναπομείναντα ένζυμα δρουν ως μονο-ADP-ριβοζυλ-τρανσφεράσες. Πιο αναλυτικά, τα έξι ένζυμα κατηγοριοποιούνται σε τρεις ομάδες, με τις PARP1, PARP2 και PARP3 στην πρώτη ομάδα, την PARP4 στη δεύτερη ομάδα και τις τανκυράσες 1 και 2 (TNKS/TNKS2) στην τρίτη ομάδα. Η PARP2 συνεργάζεται με την PARP1 στη σύνθεση της pADPr μετά από βλάβη του DNA. Η PARP3 καταστέλλει την επιρρεπή σε λάθη NHEJ, ενώ ταυτόχρονα μαζί με την PARP1 ενισχύουν την επιδιόρθωση των δίκλωνων θραύσεων [136] [137].

Η ανάπτυξη αναστολέων PARP ως θεραπευτικοί παράγοντες στην αντιμετώπιση καρκίνων με συγκεκριμένες γενετικές αλλοιώσεις βασίζεται στο

γεγονός ότι τα κύτταρα με ανεπάρκεια στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης των θραύσεων διπλής αλυσού του DNA εξαρτώνται περισσότερο από την PARP1 και το μηχανισμό της επιδιόρθωσης με εκτομή βάσης για τη διατήρηση της γονιδιωματικής ακεραιότητας [132].

Οι αναστολείς της PARP χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά το 2009 σε κλινικές μελέτες σε όγκους με μεταλλάξεις γαμετικής σειράς στα γονίδια *BRCA1/2* [138], ενώ επιπρόσθετες αλλαγές που επιφέρουν ανεπάρκεια στον ομόλογο ανασυνδυασμό προκαλούν υπερευαισθησία στους αναστολείς της PARP [139].

Έχουν προταθεί τέσσερα μοντέλα μέσω των οποίων οι αναστολείς της PARP μπορούν να επιφέρουν τη συνθετική θνησιμότητα στα κύτταρα και αυτοί περιλαμβάνουν την αναστολή της επιδιόρθωσης με εκτομή βάσης (NER), την παγίδευση της PARP1 στη θέση της βλάβης του DNA, την ανεπαρκή στρατολόγηση της BRCA1 στη θέση αυτή και την ενεργοποίηση του επιρρεπούς σε λάθη μηχανισμού της μη ομόλογης ένωσης των άκρων (NHEJ) [140] (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Η δομή, οι λειτουργίες και ο ρόλος της PARP1 στη συνθετική θνησιμότητα (Τροποποιημένο σχήμα από τους Scott *et al.*, J Clin Oncol, 2015 [55]).

Αναστολή του μηχανισμού BER

Θεωρήθηκε ότι οι θραύσεις μονόκλωνου DNA διατηρούνται κατά τη θεραπεία με αναστολείς της PARP και μετατρέπονται σε θραύσεις δίκλωνου DNA, οι

οποίες επιδιορθώνονται μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού σε κύτταρα με επάρκεια στο μηχανισμό αυτόν, αλλά παραμένουν σε κύτταρα ανεπαρκή για τον ομόλογο ανασυνδυασμό. Ωστόσο, έχει αμφισβητηθεί η θεωρία αυτή, διότι η XRCC1, μια πρωτεΐνη που δρα καθοδικά της PARP1 και είναι απαραίτητη στην ενεργοποίηση του μηχανισμού επιδιόρθωσης με εκτομή βάσης, σε κύτταρα ανεπαρκή στον ομόλογο ανασυνδυασμό δεν οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο, υποδηλώνοντας ότι η απώλεια της PARP δρα καταλυτικά στη θανάτωση των κυττάρων με ανεπάρκεια στον ομόλογο ανασυνδυασμό, αλλά η αναστολή του μηχανισμού επιδιόρθωσης με εκτομή βάσης δεν έχει ανάλογη επίδραση [55] [141].

Παγίδευση της PARP1 στη θέση βλάβης του DNA

Επί παρουσίας βλάβης στο DNA, ενεργοποιείται η PARP1, σχηματίζεται το πολυμερές pADPr μέσω του οποίου στρατολογούνται επιδιορθωτικές πρωτεΐνες και ταυτόχρονα μειώνεται η συγγένεια πρόσδεσης της PARP1 στο DNA, επιτρέποντας την απομάκρυνσή της. Ωστόσο, εάν η δραστηριότητα της PARP1 ανασταλεί, το ένζυμο παραμένει δεσμευμένο, δηλαδή «παγιδευμένο», στη θέση βλάβης, εμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο την επιδιόρθωση. Αυτός ο μηχανισμός έχει εμπλακεί στη συνεργιστική δράση μεταξύ των αναστολέων της PARP και συγκεκριμένων χημειοθεραπευτικών παραγόντων, όπως η τεμοζολομίδη και η τοποτεκάνη [142] [143]. Η τεμοζολομίδη σχηματίζει σύμπλοκα PARP-DNA στις θέσεις θραύσεων μονόκλωνου DNA, ωστόσο, ο συνδυασμός με αναστολείς της PARP με ιδιότητες πιο ισχυρής παγίδευσης της PARP1 μπορεί να αποτελούν μια πιο αποτελεσματική επιλογή. Θεωρήθηκε ότι η κυτταροτοξικότητα των αναστολέων της PARP σε κύτταρα με ανεπάρκεια στον ομόλογο ανασυνδυασμό μπορεί να οφείλεται στην παγίδευση της PARP1 σε θέσεις ενδογενούς βλάβης, ωστόσο, αυτός ο μηχανισμός δεν μπορεί να εξηγήσει ότι και σε κύτταρα με μειωμένη δραστηριότητα της PARP1 παρατηρείται θανάτωση των κυττάρων με ανεπάρκεια στα *BRCA1/2* [144].

Ανεπαρκής στρατολόγηση της BRCA1

Η στρατολόγηση της BRCA1 στη θέση βλάβης του DNA περιλαμβάνει δύο στάδια, την αλληλεπίδραση του πολυμερούς pADPr και της πρωτεΐνης BARD1, που μαζί της φέρνει την BRCA1, και την αλληλεπίδραση της BRCA1 με την γ-H2AX, μια τροποποιημένη ιστόνη που σχηματίζεται σε απόκριση στη βλάβη [145]. Εάν η μετάλλαξη στο *BRCA1* επιδράσει αρνητικά στην αλληλεπίδραση BRCA1/γ-H2AX, καθίσταται καταλυτική η στρατολόγηση του συμπλόκου BARD1-BRCA1 στο πολυμερές pADPr για την επιδιόρθωση της βλάβης. Η ικανότητα των αναστολέων της PARP να εμποδίζουν την προσέγγιση του συμπλόκου BARD1-BRCA1 στη θέση της βλάβης, παρεμποδίζοντας την επιδιόρθωση, μπορεί να αιτιολογήσει την υπερευαισθησία που εμφανίζουν κύτταρα με μεταλλάξεις στο *BRCA1* στους αναστολείς της PARP, χωρίς, ωστόσο, να μπορεί να αποσαφηνιστεί εάν αυτό ισχύει και με άλλες ανεπάρκειες του ομόλογου ανασυνδυασμού [146].

Ενεργοποίηση του μηχανισμού NHEJ

Ένας επιπρόσθετος μηχανισμός για τη δράση των αναστολέων της PARP βασίζεται στο ρόλο της PARP1 στην καταστολή του μονοπατιού της μη ομόλογης ένωσης των άκρων, NHEJ. Υπάρχουν διάφορες πρωτεΐνες που προσδέονται στο πολυμερές pADPr, όπως οι Ku70, Ku80 και DNA-PKcs. Μέσω αλληλεπιδράσεων των Ku70 και Ku80 με την pADPr καταστέλλεται ο μηχανισμός της μη ομόλογης ένωσης των άκρων [147]. Ωστόσο, επί παρουσίας αναστολέων της PARP, αναιρείται η καταστολή του μηχανισμού αυτού, ο οποίος καθίσταται ενεργός στα κύτταρα με ανεπάρκεια στον ομόλογο ανασυνδυασμό. Οι αναστολείς της PARP επάγουν χρωμοσωμικές αναδιατάξεις και μεταλλάξεις, οι οποίες εξαλείφονται με προσθήκη αναστολέων της DNA-PK σε κύτταρα με ανεπάρκεια στον ομόλογο ανασυνδυασμό. Επιπλέον, η κυτταροτοξικότητα των αναστολέων της PARP σε αυτά τα κύτταρα ελαχιστοποιείται μέσω αναστολής του μηχανισμού της μη ομόλογης ένωσης των άκρων, υποδηλώνοντας ότι η ενεργοποίηση του μηχανισμού αυτού συμβάλλει στη συνθετική θνησιμότητα [148].

Απόκριση στους αναστολείς της PARP

Η ταυτοποίηση μεταλλάξεων στα γονίδια BRCA αποτελεί ουσιαστική ένδειξη για την επιλογή των ασθενών που είναι περισσότερο πιθανό να επωφεληθούν από μια θεραπεία με αναστολείς της PARP. Στην καλύτερη επιλογή των κατάλληλων ασθενών που θα ανταποκριθούν ικανοποιητικά σε μια τέτοια θεραπεία έρχονται να προστεθούν οι γονιδιακές υπογραφές που προκύπτουν από ανεπάρκειες στα γονίδια του ομόλογου ανασυνδυασμού και η αξιολόγηση της απώλειας της ετεροζυγωτίας στον όγκο [149] [150].

Όταν οι αναστολείς της PARP χορηγούνται ως μονοθεραπεία σε υποτροπιάζοντα καρκίνο ωθηκών με μεταλλάξεις γαμετικής σειράς στα *BRCA1/2* έχει παρατηρηθεί απόκριση στο 30-45% αυτών των περιστατικών. Το ποσοστό αυτό αυξάνεται στο 61.5% σε υψηλόβαθμα ορώδη ωθηκικά καρκινώματα με μεταλλάξεις στα *BRCA1/2* που έχουν ευαισθησία στην πλατίνα, ωστόσο, αποκρίσεις της τάξεως του 40% έχουν παρατηρηθεί και σε αντίστοιχους όγκους με αντίσταση στην πλατίνα [151]. Επιπλέον, έχουν αναφερθεί αποκρίσεις και σε άλλους τύπους συμπαγών όγκων με μεταλλάξεις στα *BRCA1/2*, όπως μαστού, παγκρέατος και προστάτη [152].

Ωστόσο, δεν ανταποκρίνονται όλοι οι ασθενείς στους αναστολείς της PARP με παθογόνους μεταλλάξεις στα *BRCA1/2*. Έχει παρατηρηθεί ότι μπορεί να πραγματοποιηθούν σωματικές μεταλλάξεις σε κύτταρα με μεταλλάξεις γαμετικής σειράς στα *BRCA1/2*, οι οποίες ενεργοποιούν εκ νέου το μηχανισμό του ομόλογου ανασυνδυασμού και προσδίδουν αντίσταση στους αναστολείς της PARP και την πλατίνα. Περίπου το 45% των υποτροπιάζόντων ωθηκικών καρκινωμάτων με μεταλλάξεις στα *BRCA1/2* με αντίσταση στην πλατίνα έχουν δευτερογενείς σωματικές μεταλλάξεις [153-155]. Ωστόσο, η αποκατάσταση του μονοπατιού του ομόλογου ανασυνδυασμού μπορεί να προκύψει μέσω κάποιων υπομορφικών αλληλομόρφων. Ορισμένα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα του *BRCA1* κωδικοποιούν πρωτεΐνες που είναι λειτουργικές, αλλά αποδομούνται τάχιστα. Η σταθεροποίηση αυτών των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών μπορεί να επαναφέρει τον ομόλογο ανασυνδυασμό και να προσδώσει αντίσταση στους αναστολείς της PARP [146]. Ένας

άλλος μηχανισμός που προσδίδει αντίσταση είναι μέσω της μειωμένης έκφρασης της πρωτεΐνης 53BP1 (p53-binding protein 1), όπου αποκαθίσταται το μονοπάτι του ομόλογου ανασυνδυασμού [156].

Τα ωθητικά καρκινώματα με σωματικές μεταλλάξεις στα *BRCA1/2* φαίνεται να επωφελούνται από τη θεραπεία συντήρησης με αναστολείς της PARP όπως αυτά με μεταλλάξεις γαμετικής σειράς, παρόλο που ο αριθμός των ασθενών που υποβάλλονται σε θεραπεία και φέρουν σωματικές μεταλλάξεις στα *BRCA1/2* είναι μικρός [157]. Επιπλέον, μεταλλάξεις γαμετικής σειράς ή σωματικές μεταλλάξεις σε άλλα γονίδια που εμπλέκονται στο μονοπάτι του ομόλογου ανασυνδυασμού φαίνεται να σχετίζονται με ευαισθησία στην πλατίνα σε ωθητικά καρκινώματα και μπορεί επίσης να προβλέψουν την απόκριση σε αναστολέα της PARP [158]. Για παράδειγμα, έχει παρατηρηθεί αποτελεσματικότητα του olaparib σε καρκίνο του ενδομητρίου με ανεπάρκεια στο *PTEN* [159] και σε συνδυασμό με πακλιταξέλη σε υποτροπιάζοντα ή μεταστατικό καρκίνο του στομάχου με ανεπάρκεια στο *ATM* [160]. Ευαισθησία στους αναστολείς της PARP μπορούν, ωστόσο, να επιφέρουν και επιγενετικές αλλαγές στην έκφραση των microRNA και των μεταγραφικών παραγόντων, όπως μέσω υπερμεθυλίωσης του υποκινητή του *BRCA1* (επιγενετική καθοδική ρύθμιση του *BRCA1*).

Επί του παρόντος, υπάρχουν τρεις αναστολείς της PARP με κλινική χρήση για τον καρκίνο των ωθηκών με μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1/2*, οι οποίοι έχουν εγκριθεί από τον FDA. Αυτοί είναι τα olaparib, rucaparib και niraparib, οι οποίοι θα αναλυθούν λεπτομερώς ακολούθως [128] [161].

Olaparib

Το olaparib αποτέλεσε τον πρώτο αναστολέα που έλαβε έγκριση από τον EMA και τον FDA για υψηλόβαθμα ορώδη ωθητικά καρκινώματα με μεταλλάξεις γαμετικής σειράς στα γονίδια BRCA. Πιο αναλυτικά, το olaparib ως μονοθεραπεία σε υποτροπιάζοντα υψηλόβαθμα ορώδη ωθητικά καρκινώματα με ευαισθησία στην πλατίνα και μεταλλάξεις στα BRCA έχει ποσοστά απόκρισης που προσεγγίζουν το

46% [151]. Πλέον χρησιμοποιείται ως θεραπεία συντήρησης σε ασθενείς με υποτροπιάζοντα επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών. Επιπλέον, συστήνεται η χρήση του και σε ασθενείς με καρκίνο των φαλοπιανών σαλπίνγων ή με πρωτοπαθές περιτοναϊκό καρκίνο, οι οποίοι αποκρίνονται πλήρως ή μερικώς σε χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα. Επιπλέον, η χρήση του olaparib προβλέπεται και σε ασθενείς με προχωρημένου σταδίου καρκίνο των ωοθηκών που φέρουν παθογόνους μεταλλάξεις γαμετικής σειράς στα γονίδια *BRCA1/2* που έχουν ήδη λάβει τρεις ή περισσότερες σειρές χημειοθεραπείας [162].

Η χρήση του olaparib έχει επεκταθεί και σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού αρνητικό στο HER2, με παθογόνους μεταλλάξεις γαμετικής σειράς στα γονίδια *BRCA* και οι οποίοι έχουν λάβει προεγχειρητική ή επικουρική χημειοθεραπεία. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι η μονοθεραπεία με olaparib παρείχε μεγαλύτερο προσδόκιμο επιβίωσης κατά 2.8 μήνες και μείωσε κατά 42% τον κίνδυνο εξέλιξης της νόσου σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού και μετάλλαξη στα *BRCA* από ότι τα συμβατικά χημειοθεραπευτικά σχήματα [163]. Σε μια τελευταία μελέτη (κλινική δοκιμή SOLO1 φάσης 3) η χρήση του olaparib ως θεραπεία συντήρησης επέφερε 70% λιγότερο κίνδυνο εξέλιξης της νόσου ή θανάτου σε ασθενείς με προσφάτως διαγνωσθέν καρκίνωμα των ωοθηκών και μεταλλάξεις στα *BRCA1/2* συγκριτικά με τους ασθενείς που έλαβαν placebo [164].

Rucaparib

Πρόσφατη μελέτη (κλινική δοκιμή ARIEL2) αποκάλυψε ότι οι ασθενείς με υποτροπιάζον υψηλόβαθμο ορώδες καρκίνωμα των ωοθηκών με ευαισθησία στην πλατίνα επωφελούνται από τη χρήση του rucaparib, ενός δια του στόματος αναστολέα της PARP, εάν ο όγκος αυτός χαρακτηρίζεται είτε από μετάλλαξη στα γονίδια *BRCA* είτε δε φέρει μετάλλαξη στα γονίδια αυτά, αλλά έχει υψηλό φορτίο απώλειας ετεροζυγωτίας. Τα ποσοστά απόκρισης στο rucaparib προσεγγίζουν το 80% στην ομάδα ασθενών με όγκους με μεταλλάξεις στα *BRCA*, το 36% σε ασθενείς με όγκους χωρίς μεταλλάξεις στα *BRCA*, αλλά υψηλή απώλεια ετεροζυγωτίας, ενώ σε ασθενείς με όγκους χωρίς μεταλλάξεις στα *BRCA* και χαμηλή απώλεια

ετεροζυγωτίας το ποσοστό απόκρισης δεν ξεπερνά το 10% [165] [166]. Η χρήση του rucaparib συστήνεται πλέον ως θεραπεία ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών προχωρημένου σταδίου με μεταλλάξεις γαμετικής σειράς ή/και σωματικές μεταλλάξεις στα γονίδια BRCA, οι οποίοι έχουν λάβει προηγουμένως δύο ή περισσότερα χημειοθεραπευτικά σχήματα [128].

Niraparib

Το niraparib αποτελεί έναν ισχυρό και εκλεκτικό αναστολέα της PARP, ο οποίος είναι αποτελεσματικός τόσο σε κληρονομικά όσο και σποραδικά υψηλόβαθμα ορώδη ωοθηκικά καρκινώματα. Σε πρόσφατη μελέτη (κλινική δοκιμή NOVA) φάνηκε ότι ασθενείς με υποτροπιάζον ορώδες ωοθηκικό καρκίνωμα και μεταλλάξεις στα BRCA που έλαβαν το niraparib είχαν μεγαλύτερο προσδόκιμο επιβίωσης σε σύγκριση με τους ασθενείς που έλαβαν placebo (21 μήνες έναντι 5 μηνών, αντίστοιχα). Επίσης, σημαντική ήταν η διαφορά μεταξύ της ομάδας ασθενών χωρίς μεταλλάξεις στα BRCA, αλλά με ανεπάρκεια στον ομόλογο ανασυνδυασμό και της ομάδας ασθενών που έλαβαν placebo (12.9 μήνες έναντι 3.8 μηνών, αντίστοιχα), αλλά και μεταξύ της ομάδας όλων των ασθενών χωρίς μεταλλάξεις στα BRCA ανεξάρτητα από την ύπαρξη ανεπάρκειας στον ομόλογο ανασυνδυασμό και της ομάδας ασθενών που έλαβαν placebo (9.3 μήνες έναντι 3.9 μηνών, αντίστοιχα) [167]. Το niraparib συστήνεται πια ως θεραπεία συντήρησης σε ασθενείς με υποτροπιάζοντα καρκίνο των ωοθηκών, καρκίνο των φαλοπιανών σαλπίνγων ή πρωτοπαθή περιτοναϊκό καρκίνο και οι οποίοι έχουν πλήρη ή μερική απόκριση στη χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα, ανεξάρτητα από τον ιστολογικό τύπο, την παρουσία ή απουσία μεταλλάξεων στα γονίδια BRCA και την αναγνώριση ή μη ανεπαρκειών στον ομόλογο ανασυνδυασμό [128].

Οι αναστολείς της PARP στο φαινόμενο BRCAness

Με τον όρο «BRCAness» ορίζεται ένα υποσύνολο όγκων που ενώ δε χαρακτηρίζονται από μεταλλάξεις γαμετικής σειράς στα γονίδια *BRCA1/2*, μοιράζονται άλλα παρόμοια χαρακτηριστικά, κυρίως ανεπάρκεια στον ομόλογο ανασυνδυασμό, και ως εκ τούτου αποτελούν φαινοτυπικά αντίγραφα των όγκων με μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια. Οι όγκοι με φαινότυπο BRCAness και ανεπάρκειες στον ομόλογο ανασυνδυασμό μπορεί επίσης να έχουν αλληλεπιδράσεις συνθετικής θνησιμότητας με αναστολείς της PARP [168].

Έχει παρατηρηθεί ότι οι ανεπάρκειες σε ένα από τα ογκοκατασταλτικά γονίδια που εμπλέκονται στον ομόλογο ανασυνδυασμό ή σε άλλα μονοπάτια επιδιόρθωσης βλαβών του DNA, όπως στα γονίδια *ATM*, *ATR* και *PALB2*, μπορεί εξίσου να προκαλέσουν ευαισθησία σε αναστολείς της PARP σε προκλινικά μοντέλα [169]. Επιπλέον, έχουν προκύψει ανεπάρκειες και σε άλλα γονίδια, όπως τα *CDK12*, *RAD51B* και *RAD51C* που θα μπορούσαν επίσης να συσχετιστούν με έναν φαινότυπο BRCAness [168]. Πράγματι, έχει παρατηρηθεί ότι τα κύτταρα αποκτούν ευαισθησία στους αναστολείς της PARP ακόμα και παρουσία μεταλλάξεων σε γονίδια που εμπλέκονται εμμέσως με την επιδιόρθωση λαθών στο DNA. Για παράδειγμα, έχει βρεθεί ότι η απενεργοποίηση της πρωτεΐνης *CDK12*, μιας κινάσης που διευκολύνει την έκφραση της *BRCA1*, καθώς και άλλων επιδιορθωτικών πρωτεϊνών, επιφέρει εξίσου ευαισθησία στα κύτταρα ωθηκικών καρκινωμάτων για τους αναστολείς της PARP [170].

Μέσω της μαζικής παράλληλης αλληλούχησης έχει προκύψει ένα σημαντικό ποσοστό όγκων που θα μπορούσαν να θεωρηθούν ότι χαρακτηρίζονται από ένα φαινότυπο BRCAness, όπως το υψηλόβαθμο ορώδες καρκίνωμα των ωθηκών, ο ευνουχοάντοχος καρκίνος του προστάτη προχωρημένου σταδίου, ο καρκίνος του παγκρέατος και άλλοι καρκίνοι που συνοδεύονται από ανάλογες μεταλλάξεις [171] [172].

Αντίσταση στους αναστολείς της PARP μέσω μεταλλάξεων αναστροφής

Πρόκληση αποτελεί το φαινόμενο της αντίστασης που μπορούν να αναπτύξουν τα κύτταρα ωθηκικών καρκινωμάτων μέσω σωματικών μεταλλάξεων αναστροφής στα γονίδια *BRCA1/2* μετά από έκθεση σε χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα είτε σε αναστολείς της PARP. Οι δευτερογενείς αυτές μεταλλάξεις αναφέρθηκαν για πρώτη φορά το 2008 σε μια ανθρώπινη παγκρεατική κυτταρική σειρά και σε ανθρώπινο ωθηκικό καρκίνωμα [153, 154], όπου παρατηρήθηκε ότι αποκαθίσταται το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του *BRCA2* αγρίου τύπου σε ασθενείς με καρκίνο των ωθηκών, με υψηλότερο ποσοστό στις γυναίκες με ωθηκικό καρκίνωμα και αντίσταση στην πλατίνα που είχαν λάβει προηγουμένως χημειοθεραπεία [155] [173].

Πιο πρόσφατα, ανιχνεύθηκαν πολλαπλά συμβάντα αναστροφής μεταλλάξεων γαμετικής σειράς στα *BRCA1/2*, όπως και απώλεια μεθυλίωσης του υποκινητή του *BRCA1*, ενώ είναι αξιοσημείωτο το ότι σε έναν ασθενή με καρκίνο των ωθηκών τελικού σταδίου που έφερε μετάλλαξη γαμετικής σειράς στο *BRCA2* και που είχε λάβει πολλαπλά χημειοθεραπευτικά σχήματα ανευρέθηκαν 12 διαφορετικά συμβάντα αναστροφής [174]. Μέχρι σήμερα, οι περισσότερες από τις δευτερεύουσες μεταλλάξεις στα *BRCA1/2* παρατηρούνται μετά από έκθεση των ασθενών σε χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα, ενώ οι αναφορές για έκθεση μετά από αναστολείς της PARP είναι περιορισμένες [175].

Οι μεταλλάξεις γαμετικής σειράς ή σε σωματικά κύτταρα σε γονίδια που συμμετέχουν στον ομόλογο ανασυνδυασμό, εκτός των *BRCA1/2*, παρόλο που ανιχνεύονται σπανίως, συνολικά απαντώνται στο 7%-8% των ωθηκικών καρκινωμάτων. Σε μελέτη βρέθηκε ότι το 1/3 των ωθηκικών καρκινωμάτων έφερε παθογόνους μεταλλάξεις γαμετικής σειράς (24%) ή/και μεταλλάξεις σε κύτταρα του όγκου (9%) σε ένα ή περισσότερα από τα γονίδια που συμμετέχουν στον ομόλογο ανασυνδυασμό (*BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *BARD1*, *BRIP1*, *CHEK1*, *CHEK2*, *FAM175A*, *MRE11A*, *NBN*, *PALB2*, *RAD51C* και *RAD51D*) και έχει δειχθεί ότι ασθενείς που τις φέρουν μπορούν να ανταποκριθούν στους αναστολείς της PARP [158, 165]. Ωστόσο,

με την αυξανόμενη χρήση των πολυγονιδιακών αναλύσεων, καθώς και της αλληλούχησης δειγμάτων από τον όγκο, η ταυτοποίηση αυτών των μεταλλάξεων αυξάνεται συνεχώς.

Σε πρόσφατη μελέτη ανιχνεύθηκαν τέσσερις διακριτές δευτερεύουσες μεταλλάξεις στο γονίδιο *RAD51C* σε υψηλόβαθμο ορώδες ωθηκικό καρκίνωμα, υποδηλώνοντας την επιλεκτική πίεση των καρκινικών κυττάρων να αποκαταστήσουν το μηχανισμό επιδιόρθωσης του ομόλογου ανασυνδυασμού παρουσία αναστολέων της PARP. Οι λειτουργικές αναλύσεις έδειξαν ότι μέσω των δευτερευουσών μεταλλάξεων στο *RAD51C* κατέστη δυνατή η αποκατάσταση της λειτουργίας της πρωτεΐνης *RAD51C* στα κύτταρα καρκίνου των ωθηκών, όπως αποδείχθηκε με την ενεργοποίηση του μονοπατιού του ομόλογου ανασυνδυασμού, την αποκατάσταση της ικανότητας δέσμευσης των εταίρων πρόσδεσης για τις *RAD51C*, *RAD51B* και *XRCC3*, και την αυξημένη αντίσταση στην πλατίνα και τους αναστολείς της PARP. Οι *in vitro* λειτουργικές αναλύσεις των πρωτευσών και δευτερευουσών μεταλλάξεων στο *RAD51D* έδειξαν ότι οι πρωτεύουσες μεταλλάξεις προσέδωσαν στα κύτταρα αυτά ευαισθησία στην πλατίνα και τους αναστολείς της PARP, ενώ οι δευτερεύουσες μεταλλάξεις επέφεραν αντίσταση και στις δύο περιπτώσεις [176].

Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι με την ανίχνευση λειτουργικών βιοδεικτών μπορεί να γίνει βέλτιστη πρόβλεψη της ευαισθησίας σε αναστολείς της PARP. Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι η ανίχνευση εσίων *RAD51* σε όγκους με ανεπάρκεια στα γονίδια *BRCA1* ή *BRCA2* σχετίζεται με αντίσταση στους αναστολείς της PARP ανεξάρτητα από το μηχανισμό που αποκαθιστά τη λειτουργία επιδιόρθωσης του ομόλογου ανασυνδυασμού. Επίσης, υποστηρίζεται ότι η αντίσταση στους αναστολείς της PARP θα μπορούσε να αναστραφεί μέσω συνδυασμού ενός αναστολέα της PARP με αναστολείς της ATM [177]. Απώτερος σκοπός είναι η κατάλληλη επιλογή των ασθενών που θα επωφεληθούν περισσότερο από τη μονοθεραπεία με αναστολείς της PARP και αυτών που θα επωφεληθούν περισσότερο από μια συνδυαστική θεραπεία.

4. ΠΟΛΥΓΟΝΙΔΙΑΚΑ ΠΑΝΕΛ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Η χρήση των πάνελ στην κλινική και εργαστηριακή πρακτική

Με την ενσωμάτωση της τεχνολογίας της αλληλούχησης επόμενης γενεάς στην εργαστηριακή και κλινική πρακτική, αντικαθιστώντας σε πολλές περιπτώσεις τη συμβατική αλληλούχηση μεμονωμένων γονιδίων, έχει καταστεί πιο άμεση η πρόσβαση στην πληροφορία που μπορεί εξ ολοκλήρου ή τουλάχιστον μερικώς να αποσαφηνίσει το γενετικό υπόβαθρο νοσημάτων, όπως ο καρκίνος. Η ταυτόχρονη αλληλούχηση πολλών γονιδίων που προδιαθέτουν στον καρκίνο, με χαμηλότερο κόστος και πιο άμεση αποδέσμευση των αποτελεσμάτων έχουν οδηγήσει στην προτίμηση των πάνελ έναντι της συμβατικής αλληλούχησης μεμονωμένων γονιδίων. Εξίσου σημαντική είναι και η βελτιωμένη διαγνωστική απόδοση που προσφέρουν, όπου τα ποσοστά ανίχνευσης μεταλλάξεων σε γονίδια εκτός των *BRCA1/2* κυμαίνονται μεταξύ 4% και 16% [178, 179]. Αναμφίβολα, μελετώντας μέσω των πολυγονιδιακών πάνελ το σύνδρομο του κληρονομικού καρκίνου μαστού/ωοθηκών παρατηρεί κανείς ότι η πλειονότητα των μεταλλάξεων γαμετικής σειράς αφορά στα γονίδια *BRCA1/2* για τα οποία έχουν συσταθεί κλινικές οδηγίες πρόληψης και διαχείρισης του κινδύνου, οι οποίες επικαιροποιούνται με βάση τα τρέχοντα επιστημονικά δεδομένα. Ωστόσο, σε πολλές οικογένειες με βεβαρυμένο οικογενειακό ιστορικό καρκίνων μαστού/ωοθηκών, η μεμονωμένη ανάλυση των *BRCA1/2* δεν επαρκεί για τον προσδιορισμό της αιτιατής μετάλλαξης.

Ως εκ τούτου, η ανάγκη για εκτενέστερες γονιδιακές αναλύσεις οδήγησε στην ανίχνευση μεταλλάξεων και σε άλλα γονίδια, όπως τα *PALB2*, *ATM*, *NBN* και *CHEK2* για τα οποία ο μέσος δια βίου κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του μαστού προσεγγίζει ή ξεπερνά το 30%. Στα άτομα αυτά θα πρέπει να συστήνεται ένα πιο εντατικοποιημένο πρωτόκολλο παρακολούθησης με MRI μαστού και μαστογραφίες συναξιολογώντας το οικογενειακό ιστορικό [2]. Εξαιρέση αποτελούν οι μεταλλάξεις p.I157T και p.S428F του γονιδίου *CHEK2*, που σχετίζονται με χαμηλότερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού (RR<2) και ο δια βίου κίνδυνος δεν ξεπερνά το 20% απουσία οικογενειακού ιστορικού καρκίνου μαστού. Το ίδιο ισχύει και για άτομα που φέρουν μεταλλάξεις στα *BARD1*, *BRIP1*, *MRE11A*, *RAD51C* και *RAD51D*, όπου

υπάρχουν ανεπαρκείς ενδείξεις συσχέτισης με τον καρκίνο του μαστού ώστε να προτείνεται μια εντατικοποιημένη παρακολούθηση με MRI μαστού ή μαστογραφία, ειδικά επί απουσίας οικογενειακού ιστορικού [180].

Με τη χρήση των πολυγονιδιακών πάνελ έχουν ταυτοποιηθεί ποικίλα γονίδια οι μεταλλάξεις των οποίων προδιαθέτουν στον κληρονομικό καρκίνο μαστού/ωοθηκών, πολλά από τα οποία εντάσσονται σε σπάνια καρκινικά σύνδρομα. Επιγραμματικά αναφέρονται οι μεταλλάξεις στα γονίδια *CDH1*, *PTEN*, *STK11* και *TP53*, που σχετίζονται με τον κληρονομικό καρκίνο στομάχου διάχυτου τύπου, το σύνδρομο Cowden, το σύνδρομο Peutz-Jeghers και το σύνδρομο Li-Fraumeni, αντίστοιχα, και οποίες, αν και ανιχνεύονται σπάνια, αυξάνουν τον κίνδυνο για καρκίνο του μαστού. Επιπλέον, έχουν αναδειχθεί και γονίδια οι μεταλλάξεις των οποίων επιφέρουν έναν ενδιάμεσο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού, όπως τα *PALB2*, *ATM* και *CHEK2* [181] [182]. Ωστόσο, έχουν προκύψει και πολυάριθμες παραλλαγές που προσδίδουν χαμηλό κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού που αποτελούνται κυρίως από παραλλαγές ενός μόνο νουκλεοτιδίου (SNV) σε μη κωδικές περιοχές [183]. Ομοίως, για τον καρκίνο των ωοθηκών έχουν συσχετιστεί και άλλα γονίδια, πέραν των *BRCA1/2*. Συγκεκριμένα, τα γονίδια *RAD51C*, *RAD51D* και *BRIP1*, καθώς και τα γονίδια επιδιόρθωσης αταίριαστων βάσεων (MMR), *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* και *EPCAM*, που σχετίζονται με το σύνδρομο Lynch, αυξάνουν τον κίνδυνο για καρκίνο των ωοθηκών [184]. Συνεπώς, ο ουσιαστικός ρόλος των πολυγονιδιακών πάνελ αφορά στον ακριβέστερο προσδιορισμό του κινδύνου και της μετέπειτα κλινικής διαχείρισης των ατόμων. Ωστόσο, ο περιορισμός στη χρήση τους έγκειται στην ορθή κατηγοριοποίηση των ταυτοποιημένων παραλλαγών, η οποία δεν είναι σε όλες τις περιπτώσεις σαφής [185]. Συνολικά, τα γονίδια που προσδίδουν υψηλό κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού αντιστοιχούν περίπου στο 20-25% του οικογενών περιπτώσεων καρκίνου του μαστού, ακολουθούν τα γονίδια ενδιάμεσου κινδύνου που αντιπροσωπεύουν περίπου το 5% των περιπτώσεων, ενώ οι γονιδιακές παραλλαγές χαμηλού κινδύνου σωρευτικά μπορούν να εξηγήσουν περίπου το 14% των οικογενών περιστατικών καρκίνου του μαστού [186]. Ωστόσο, για τις μεταλλάξεις

στα γονίδια πέραν των *BRCA1/2*, θα πρέπει να αποσαφηνιστεί η συχνότητα, η διεισδυτικότητα και ο φαινότυπος που τα συνοδεύει. Για παράδειγμα, σε μια πρόσφατη μελέτη με χρήση πολυγονιδιακού πάνελ το 3.8% των ασθενών με καρκίνο μαστού ή/και ωοθηκών, που ήταν αρνητικοί για μεταλλάξεις στα *BRCA1/2*, βρέθηκε να φέρει παθογόνους μεταλλάξεις σε γονίδια ενδιάμεσης διεισδυτικότητας, όπως τα *CHEK2*, *ATM* και *PALB2*, και σε γονίδια που συνδέονται με το σύνδρομο Lynch, ενώ εντοπίστηκαν τρεις περιπτώσεις με παραλλαγές στο *CDH1* [178].

Ωστόσο, η χρήση των πολυγονιδιακών πάνελ μπορεί να οδηγήσει και σε απροσδόκητα (τυχαία) ευρήματα. Για παράδειγμα, κατά την ανάλυση ασθενών με καρκίνο ωοθηκών, περιτοναίου ή σαλπίνγγων εντοπίστηκαν δύο παθογόνοι μεταλλάξεις στο *MSH6* σε άτομα χωρίς οικογενειακό ιστορικό συνδρόμου Lynch και τρεις παθογόνοι μεταλλάξεις στο *TP53* χωρίς οικογενειακό ιστορικό συνδρόμου Li-Fraumeni [187]. Είναι σημαντικό η ταυτοποίηση τέτοιων «τυχαίων» παθογόνων ευρημάτων να αντιμετωπίζεται με προσοχή κατά τη γενετική συμβουλευτική συγγενών-ατόμων που δεν έχουν διαγνωστεί με κάποιο τύπο κακοήθειας, ως προς την αξιολόγηση του κινδύνου και τη μελλοντική κλινική παρακολούθηση του ατόμου.

Η δυσκολία ερμηνείας των αποτελεσμάτων από ένα πολυγονιδιακό πάνελ έγκειται και στον τύπο μετάλλαξης που ανιχνεύεται. Κατά κύριο λόγο, οι μεταλλάξεις που οδηγούν σε πρωτεΐνες μικρότερου μεγέθους (truncated mutations) χαρακτηρίζονται από παθογονικότητα λόγω του ότι οδηγούν σε απώλεια της λειτουργικότητας της πρωτεΐνης. Ωστόσο, η πρόκληση προκύπτει κατά την ερμηνεία των παρανοηματικών μεταλλάξεων (missense mutations) που ανιχνεύονται, καθώς η επίπτωση στη λειτουργία της πρωτεΐνης δεν είναι πάντα γνωστή. Οι πιθανοί τρόποι αξιολόγησης αυτών των μεταλλάξεων αφορούν στη χρήση *in silico* εργαλείων πρόβλεψης, δεδομένων συντήρησης των περιοχών που πραγματοποιείται η αλλαγή των αμινοξέων για να εκτιμηθεί εάν η παραλλαγή υπάρχει και σε άλλα είδη, αναλύσεων διαχωρισμού (segregation analysis) και πιθανώς αναλύσεων στον όγκο.

Ένα εξίσου σημαντικό αντικείμενο μελέτης είναι η αξιολόγηση των παραλλαγών άγνωστης κλινικής σημασίας (VUS), ο αριθμός των οποίων συνεχώς αυξάνεται με την ευρεία χρήση των πάνελ. Η συχνότητα των VUS στα πάνελ είναι μεταξύ 20% και 40%. Τα τελευταία χρόνια γίνεται μια εντατικοποιημένη προσπάθεια κατηγοριοποίησης και επαναξιολόγησης αυτών των παραλλαγών μέσω διεθνών κοινοπραξιών, όπως το ENIGMA, και υπολογίζοντας σημαντικές παραμέτρους, όπως η εκ των υστέρων πιθανότητα αιτιότητας (posterior probability of causality) [188, 189]. Ενδεικτικά αναφέρεται μια μελέτη στην οποία μέσω πάνελ ανιχνεύθηκαν περίπου 2.1 VUS ανά ασθενή με καρκίνο μαστού, η πλειονότητα των οποίων αφορούσε καινοφανείς παραλλαγές [190]. Αντιστοίχως, σε άλλη μελέτη βρέθηκε το ένα τρίτο ασθενών με καρκίνο του μαστού να φέρει VUS, όπου σε κάθε ασθενή αντιστοιχούσαν περίπου τρεις τέτοιες παραλλαγές [191].

Για τα γονίδια μέτριας διεισδυτικότητας, τα οποία ταυτοποιούνται περίπου στο 5% των ατόμων που ελέγχονται μέσω πάνελ, υπάρχουν περιορισμένα στοιχεία ως προς την κλινική τους διαχείριση. Σχετίζονται με χαμηλότερους κινδύνους εμφάνισης καρκίνου από ότι τα γονίδια υψηλής διεισδυτικότητας (*BRCA1/2*, *TP53*, *PTEN*, *MLH1/MSH2/MSH6/PMS2*, *APC*, *CDH1* και *STK11*), για τα οποία έχουν συσταθεί οι σχετικές κλινικές οδηγίες διαχείρισης. Ωστόσο, στα γονίδια μέτριας διεισδυτικότητας υπάρχουν μεμονωμένες μεταλλάξεις που επιφέρουν ανάλογο κίνδυνο με αυτόν των γονιδίων υψηλής διεισδυτικότητας, όπως η *ATM*, c.7271T>G (p.Val2424Gly) και η *PALB2*, c.3113G>A (p.W1038X)). Για πολλά από αυτά τα γονίδια υπάρχουν περιορισμένα στοιχεία σχετικά με τον ακριβή βαθμό του σχετικού κινδύνου, ο οποίος γενικά κυμαίνεται μεταξύ 2 και 5 [180]. Για παράδειγμα, για το γονίδιο *CHEK2* υπάρχουν δεδομένα τα οποία προέρχονται κυρίως από την παραλλαγή c.1100delC, η οποία είναι η συνηθέστερη παραλλαγή στους πληθυσμούς της Βόρειας Ευρώπης και οδηγεί σε πρωτεΐνη μικρότερου μεγέθους [192]. Οι μεταλλάξεις στα γονίδια *BRIP1*, *RAD51C* και *RAD51D*, έχουν συσχετιστεί σαφώς με τον καρκίνο των ωοθηκών, ωστόσο, η συσχέτισή τους με τον καρκίνο του μαστού δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί [193]. Συνεπώς, ένα θετικό αποτέλεσμα που

προκύπτει από ένα γονιδιακό πάνελ μπορεί να μην είναι πάντα κλινικά αξιοποιήσιμο.

Σημασία θα πρέπει να δοθεί και σε ένα αρνητικό αποτέλεσμα σε ένα άτομο που δεν έχει διαγνωστεί με κάποιον τύπο καρκίνου και ελέγχεται για μία παθογόνο μετάλλαξη σε ένα γονίδιο μέτριας διεισδυτικότητας. Η ενσωμάτωση μεταλλάξεων που οδηγούν σε πρωτεΐνες μικρότερου μεγέθους σε τρία γονίδια ενδιάμεσου κινδύνου για καρκίνο του μαστού (*ATM*, *CHEK2* και *PALB2*) στον αλγόριθμο πρόβλεψης κινδύνου BOADICEA έδειξε ότι η μείωση του κινδύνου για τις γυναίκες των οποίων η μητέρα έφερε μια μετάλλαξη στο *PALB2* ήταν συγκρίσιμη με μια μετάλλαξη στο *BRCA2*, ενώ αυτό δεν παρατηρήθηκε με μεταλλάξεις στα *ATM* και *CHEK2*, όπου η μείωση του κινδύνου ήταν σαφώς μικρότερη ακόμα και με ισχυρό οικογενειακό ιστορικό [194]. Επί του παρόντος, θεωρείται ότι οι συγγενείς που δε φέρουν την «οικογενειακή» μετάλλαξη θα πρέπει να αντιμετωπίζονται με βάση το οικογενειακό τους ιστορικό και ενδεχομένως να χρήζουν μιας εντατικοποιημένης παρακολούθησης [181] [180].

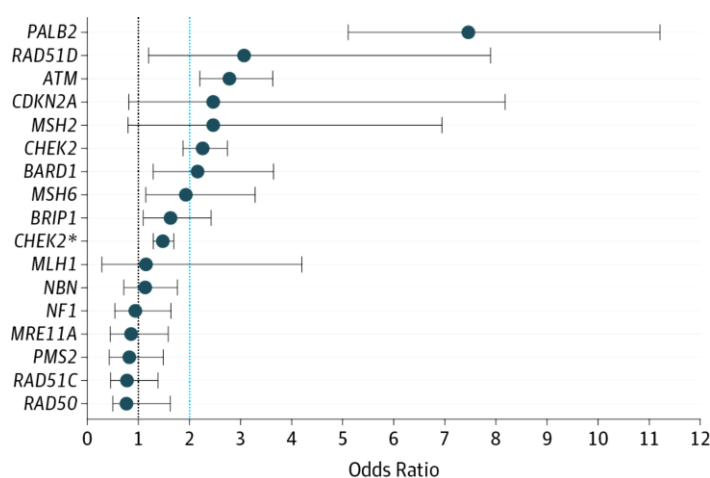
Οι παθογόνοι μεταλλάξεις στα γονίδια που ελέγχονται μέσω των πάνελ ανιχνεύονται στο γενικό πληθυσμό με συχνότητα που προσεγγίζει το 0.5% και τις περισσότερες φορές επιφέρουν διπλάσιο ή και μεγαλύτερο κίνδυνο για ανάπτυξη καρκίνου σε σχέση με το γενικό πληθυσμό. Μια πρόσφατη τεχνολογική εξέλιξη είναι η χρήση πάνελ για ανίχνευση παραλλαγών μονού νουκλεοτιδίου (SNV) που σχετίζονται με κίνδυνο για καρκίνο μαστού, οι οποίες έχουν προκύψει με τις μελέτες GWAS. Αυτές οι παραλλαγές έχουν συχνότητες αλληλομόρφων (MAF) μεγαλύτερες από 1% και σχετίζονται με χαμηλό κίνδυνο για καρκίνο της τάξεως του 1.0-1.5. Η χρήση αυτών των πάνελ έγκειται στη βελτίωση του υπολογισμού του κινδύνου για καρκίνο μαστού στα διαθέσιμα μοντέλα πρόβλεψης [195]. Πλέον τα SNV μπορούν να ενσωματωθούν σε μοντέλα που υπολογίζουν μια βαθμολογία πολυγονιδιακού κινδύνου (Polygenic Risk Score, PRS), όπου αξιολογώντας συνολικά 90 κοινούς γενετικούς τόπους προδιάθεσης στον καρκίνο έχει προκύψει ότι το 5% των γυναικών έχει διπλάσιο ή μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού και το 0.7% έχει τριπλάσιο ή μεγαλύτερο κίνδυνο σε σχέση με το γενικό πληθυσμό

[196]. Η διεθνής κοινοπραξία CIMBA (Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2) μελέτησε τις επιδράσεις κοινών SNV στους κινδύνους εμφάνισης καρκίνου μαστού που σχετίζονται με τα *BRCA1/2* και ταυτοποίησε 24 SNV που τροποποιούν τον σχετιζόμενο με το *BRCA1* κίνδυνο και 20 SNV που τροποποιούν τον σχετιζόμενο με το *BRCA2* κίνδυνο [24]. Γονίδια που περιλαμβάνονται στα διαθέσιμα πάνελ πέραν των *BRCA1/2*, όπως τα *PALB2*, *CHEK2*, *ATM*, *TP53*, *PTEN*, *CHD1*, *STK11*, *NF1* και *NBN*, εξηγούν ένα 5% των περιπτώσεων οικογενούς καρκίνου του μαστού, ενώ περισσότερα από 100 κοινά SNV αντιπροσωπεύουν ένα επιπρόσθετο 16%. Επομένως, περισσότερο από το 50% των οικογενών περιπτώσεων παραμένει αδιευκρίνιστο [195] [197].

Μέσω συνεργασιών μεγάλης κλίμακας είναι εφικτός ο καθορισμός συσχετίσεων μεταξύ παραλλαγών και σπάνιων φαινοτύπων με μεγάλη ετερογένεια, όπως ο επιθηλιακός καρκίνος των ωοθηκών. Σε πρόσφατη μελέτη που περιελάμβανε την ανάλυση δεδομένων από 25.500 περιστατικά επιθηλιακού καρκίνου των ωοθηκών εντοπίστηκαν 12 διαφορετικοί γενετικοί τόποι οι οποίοι συνδέθηκαν με διαφορετικούς ιστολογικούς υποτύπους ωοθηκικών καρκινωμάτων, όπως το ορώδες, το ενδομητριοειδές και το βλεννώδες ωοθηκικό καρκίνωμα [198].

Παρόλη την ευρεία διάθεση των διαφορετικών πολυγονιδιακών πάνελ υπάρχει η ανάγκη επιλογής του κατάλληλου πάνελ ανάλογα με τον υπό μελέτη φαινότυπο, σε συνδυασμό με όλα τα διαθέσιμα δεδομένα ατομικού και οικογενειακού ιστορικού του εξεταζόμενου για τον ακριβέστερο προσδιορισμό του κινδύνου εμφάνισης του καρκίνου, ειδικότερα σε περιπτώσεις γονιδίων μέτριας, χαμηλής ή άγνωστης διεισδυτικότητας [199]. Σε πρόσφατη μελέτη του Couch και των συνεργατών του [200] με χρήση πολυγονιδιακού πάνελ 21 γονιδίων ανιχνεύθηκαν παθογόνοι μεταλλάξεις και σε άλλα γονίδια με υψηλούς ή ενδιάμεσους κινδύνους, εκτός των *BRCA1/2*, *CDH1*, *PTEN* και *TP53*. Αυτά τα γονίδια ήταν τα *ATM*, *BARD1*, *CHEK2*, *PALB2* και *RAD51D*, με τις μεταλλάξεις στο *PALB2* να σχετίζονται με μεγαλύτερο κίνδυνο για καρκίνο μαστού (OR=7.46). Αντίθετα, οι παραλλαγές στα γονίδια *BRIP1*, *RAD51C*, *MRE11A*, *RAD50*, *NBN*, *MLH1*, *PMS2* και *NF1* δε φάνηκε να αυξάνουν τον κίνδυνο για καρκίνο μαστού. Οριακή συσχέτιση

προέκυψε μεταξύ των μεταλλάξεων του *MSH6* και του κινδύνου για καρκίνο του μαστού (OR=1.93), παρουσία, ωστόσο, οικογενειακού ιστορικού καρκίνου παχέος εντέρου. Από την άλλη, οι μεταλλάξεις στα *MSH2* και *CDKN2A* φαίνεται να προσδίδουν μέτριο κίνδυνο για καρκίνο του μαστού, χωρίς οι συσχετίσεις αυτές να φτάνουν τη στατιστική σημαντικότητα (Σχήμα 3). Ο βασικός περιορισμός που διατυπώνεται σε αυτή τη μελέτη είναι ότι οι υπολογισμένοι κίνδυνοι πιθανόν να είναι προσαυξημένοι λόγω του έντονου ατομικού και οικογενειακού ιστορικού των περιστατικών καρκίνων μαστού που ελέγχθηκαν.



Σχήμα 3: Λόγοι σχετικών πιθανοτήτων (Odds Ratios) μεταξύ συνδυασμένων παθογόνων παραλλαγών για κάθε γονίδιο και κινδύνου εμφάνισης καρκίνου μαστού σε Καυκάσιες γυναίκες με καρκίνο μαστού και γυναίκες-μάρτυρες. Τα εύρη απόκλισης αντιπροσωπεύουν το διάστημα εμπιστοσύνης 95% (95% CI). (Τροποποιημένο σχήμα από τους Couch *et al.*, JAMA Oncol, 2017 [200])

Επί του παρόντος, υπάρχουν 11 γονίδια μεταλλάξεις των οποίων προσδίδουν προδιάθεση στον καρκίνο μαστού ή/και ωθηκών η οποία και έχει προσδιοριστεί επαρκώς. Αυτά είναι τα *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *BRIP1*, *CDH1*, *CHEK2*, *PALB2*, *PTEN*, *RAD51C*, *RAD51D* και *TP53* [191]. Ωστόσο, για άλλα 6 γονίδια (*BARD1*, *CDKN2A*, *NF1*, *MRE11A*, *RAD50* και *NBN*) οι ενδείξεις δεν επαρκούν ώστε να αποσαφηνιστεί ο κίνδυνος που επιφέρουν στην εκδήλωση καρκίνου του μαστού [81]. Σε τελευταία μελέτη [201] εντοπίστηκαν συσχετίσεις μεταξύ παθογόνων μεταλλάξεων στα γονίδια *ATM*, *CHEK2*, *PALB2* και *MSH6* και αυξημένου κινδύνου για καρκίνο του μαστού, ενώ για τον καρκίνο των ωθηκών αναφέρθηκαν

συσχετίσεις με μεταλλάξεις στα γονίδια *RAD51C*, *TP53*, *MSH6* και *ATM*. Συγκεκριμένα για το *ATM*, οι ερευνητές απέδειξαν ότι ο κίνδυνος για καρκίνο των ωοθηκών αυξήθηκε 2-3 φορές, μια συσχέτιση που δεν είχε φανεί σε προηγούμενες μελέτες. Ομοίως, για τις μεταλλάξεις στο *MSH6* υπολογίστηκε ένας διπλάσιος περίπου κίνδυνος για καρκίνο του μαστού.

Πίνακας 2: Γονίδια προδιάθεσης καρκίνου μαστού και ωοθηκών

Γονίδιο	Σχετιζόμενο Σύνδρομο ή άλλος τύπος καρκίνου
Γονίδια προδιάθεσης καρκίνου του μαστού	
<u>Υψηλής διεισδυτικότητας (RR≥5.0)</u>	
<i>BRCA1/BRCA2</i>	Κληρονομικό σύνδρομο καρκίνου μαστού/ωοθηκών
<i>CDH1</i>	Καρκίνος στομάχου διάχυτου τύπου
<i>PTEN</i>	Σύνδρομο Cowden
<i>STK11</i>	Σύνδρομο Peutz-Jeghers
<i>TP53</i>	Σύνδρομο Li Fraumeni
<u>Ενδιάμεσης διεισδυτικότητας (2≤RR≤5)</u>	
<i>ATM</i>	Αταξία-Τελαγγειεκτασία
<i>CHEK2</i>	
<i>PALB2</i>	Καρκίνος παγκρέατος
<u>Χαμηλής διεισδυτικότητας (άγνωστου κινδύνου) (1≤RR≤2)</u>	
<i>BRIP1/NBN?</i>	
<i>RAD51C/D?</i>	
Γονίδια προδιάθεσης καρκίνου των ωοθηκών	
<i>BRCA1/BRCA2</i>	Κληρονομικό σύνδρομο καρκίνου μαστού/ωοθηκών
<i>BRIP1</i>	
<i>RAD51C</i>	
<i>RAD51D</i>	
<i>MLH1/MSH2/MSH6</i>	Σύνδρομο Lynch

Η σημασία του γονιδίου *PALB2* στον κληρονομικό καρκίνο

Μία από τις σημαντικότερες συμβολές της χρήσης των πολυγονιδιακών πάνελ είναι ότι μέσω αυτών αναδείχθηκε η σημασία του γονιδίου *PALB2*. Η

πρωτεΐνη PALB2 αλληλεπιδρά με την BRCA2 κατά την επιδιόρθωση των θραύσεων του δίκλωνου DNA στο μονοπάτι του ομόλογου ανασυνδυασμού. Μεταλλάξεις και στα δύο αλληλόμορφα του γονιδίου *PALB2* προκαλούν την αναμμία Fanconi τύπου N, που χαρακτηρίζεται από αναπτυξιακές καθυστερήσεις και αναπηρίες, ενώ υπάρχει υψηλός κίνδυνος για παιδιατρικούς συμπαγείς όγκους. Μεταλλάξεις σε ετεροζυγωτία σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού, ιδιαίτερα σε οικογένειες με οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού [202] [203]. Σε πρόσφατη μελέτη το γονίδιο *PALB2* αναδείχθηκε σε γονίδιο προδιάθεσης για τον καρκίνο του μαστού με μέτρια προς υψηλή διεισδυτικότητα, όπου αποδείχθηκε μια σαφής συσχέτιση μεταξύ των μεταλλάξεων απώλειας λειτουργικότητας και ενός κλινικά σημαντικού κινδύνου. Συγκεκριμένα, ο σωρευτικός κίνδυνος μέχρι τα 70 έτη για γυναίκες που φέρουν μεταλλάξεις στο *PALB2* προσεγγίζει το 35% και ο απόλυτος κίνδυνος χωρίς οικογενειακό ιστορικό φτάνει το 33%, ενώ όταν υπάρχουν στην οικογένεια δύο ή περισσότεροι συγγενείς με καρκίνο μαστού κοντά στα 50 έτη ο κίνδυνος αυξάνεται στο 58%. Οι ερευνητές διαπίστωσαν, επίσης, έναν σχετικό κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου των ωθηκών της τάξεως του 2.3, χωρίς ωστόσο να προσεγγίζει τη στατιστική σημαντικότητα [204]. Επιπλέον, έχουν ταυτοποιηθεί μεταλλάξεις με χαμηλή συχνότητα (~3%) σε οικογένειες με κληρονομικό καρκίνο του παγκρέατος [205], χωρίς, ωστόσο, να έχει καθοριστεί με ακρίβεια ο δια βίου κίνδυνος λόγω του μικρού αριθμού των υπό μελέτη περιστατικών [206] [207]. Συνεπώς, δεδομένου ότι η συχνότητα των μεταλλάξεων στο *PALB2* είναι χαμηλή, καθίσταται απαραίτητη η ενσωμάτωσή του σε όλα τα διαθέσιμα πάνελ για τον κληρονομικό καρκίνο.

Ανάλυση του Όγκου και Εξατομικευμένη Θεραπεία

Τα τελευταία χρόνια έχει αναδειχθεί η σημασία ανάλυσης του όγκου για ανίχνευση σωματικών μεταλλάξεων στα γονίδια *BRCA*, καθώς οι ασθενείς αυτοί μπορούν επίσης να επωφεληθούν από τη θεραπεία με αναστολείς της PARP, παρέχοντας μια περισσότερο εξατομικευμένη θεραπευτική προσέγγιση στα άτομα αυτά. Δεδομένου ότι η πλειοψηφία των δειγμάτων όγκου προέρχεται από ιστούς

που έχουν μονιμοποιηθεί με φορμαλίνη και ενσωματωθεί σε παραφίνη (FFPE), η επακόλουθη αλληλούχηση του DNA που εξάγεται από τέτοια δείγματα όγκου FFPE αποτελεί πρόκληση. Τα κλινικά δείγματα μπορεί να είναι μικρά και συχνά παρέχουν μια περιορισμένη ποσότητα DNA χαμηλής ποιότητας, περιορίζοντας με αυτόν τον τρόπο την ανάλυση. Έχουν περιγραφεί χιλιάδες κλινικά σχετιζόμενες παραλλαγές στα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2* και αυτές κατανέμονται ευρέως σε πολλαπλές, μεγάλες κωδικές περιοχές και στις περιοχές ματίσματος. Αυτό αποτελεί σημαντική πρόκληση όσον αφορά στην ακριβή ανίχνευση, το χρόνο ανάλυσης, το χαρακτηρισμό και την ερμηνεία των παραλλαγών που εντοπίζονται στα γονίδια *BRCA1/2* [208].

Πιο αναλυτικά, τα δείγματα όγκων χαρακτηρίζονται από μεγάλη ιστολογική ετερογένεια και το DNA που απομονώνεται αναμένεται να περιέχει και DNA από φυσιολογικά κύτταρα [209]. Συνεπώς, οι μέθοδοι ανίχνευσης μεταλλάξεων σε κύτταρα του όγκου πρέπει να έχουν την δυνατότητα να ανιχνεύουν μεταβολές στο DNA που μπορεί να υπάρχουν σε χαμηλό ποσοστό επί του συνόλου του DNA που απομονώνεται από το δείγμα. Με την τεχνολογία αλληλούχησης επόμενης γενεάς (NGS) μπορεί να ανιχνεύονται παραλλαγές σε χαμηλά επίπεδα προσμίξεων λόγω της κλωνικής φύσης της μεθόδου [210]. Αντίθετα, η αλληλούχηση και των δύο γονιδίων *BRCA* χρησιμοποιώντας συμβατικές μεθόδους, όπως η αλληλούχηση κατά Sanger, απαιτεί μια επαρκή αρχική ποσότητα DNA σε επίπεδο τόσο ποσότητας όσο και ποιότητας. Ως εκ τούτου, η τεχνολογία NGS ενδείκνυται σε αυτό το δύσκολο είδος ανάλυσης, καθώς δεν απαιτείται μεγάλη αρχική ποσότητα DNA και οι αντιδράσεις που πραγματοποιούνται είναι πολλαπλές.

Ωστόσο, και η απόδοση του NGS ενδέχεται να επηρεαστεί από την ποιότητα του αρχικού DNA που απομονώνεται από το δείγμα ιστού, φαινόμενο που παρατηρείται πιθανώς λόγω βλαβών στο DNA που οφείλονται σε απαμίνωση και εγκάρσιες διασυνδέσεις κατά τη διάρκεια της μονιμοποίησης σε φορμαλίνη. Αυτό το πρόβλημα μπορεί να ξεπεραστεί με επανάληψη της ανάλυσης ξεκινώντας από το αρχικό DNA, καθώς τα σφάλματα που προκύπτουν είναι γενικά τυχαία. Τα τεχνικής φύσεως σφάλματα είναι συχνά σε δείγματα DNA χαμηλότερης ποιότητας με

χαμηλές ποσότητες αρχικού DNA που τυπικά έχουν ένα υψηλότερο συνολικό επίπεδο θορύβου υποβάθρου. Επί ανίχνευσης παραλλαγών σε σωματικά κύτταρα, αυτές αναλύονται και με αλληλούχηση κατά Sanger προς επιβεβαίωση της μεθόδου του NGS [211].

Θα πρέπει να γίνει σαφές ότι η ανάλυση στον όγκο δε θα πρέπει να χρησιμοποιείται ως υποκατάστατο μιας ολοκληρωμένης ανάλυσης για μεταλλάξεις γαμετικής σειράς στα BRCA σε ασθενείς με μεγάλες πιθανότητες να φέρουν μια παθογόνο παραλλαγή στα *BRCA1/2*, αλλά θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση ατόμων που φέρουν παραλλαγές στα *BRCA1/2* μόνο στα κύτταρα του όγκου, καθιστώντας τα άτομα αυτά υποψήφια για λήψη θεραπείας με αναστολείς της PARP προσδίδοντας πιθανό όφελος.

Πλέον σε ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών μπορεί να πραγματοποιηθεί ανάλυση στον όγκο τους για την ταυτοποίηση του υπολογιζόμενου 3-9% των ασθενών με σωματικές μεταλλάξεις στα *BRCA1/2*, οι οποίοι θα μπορούσαν να ανταποκριθούν σε μια θεραπεία με αναστολείς της PARP εξίσου ικανοποιητικά με τα άτομα που φέρουν μεταλλάξεις γαμετικής σειράς στα γονίδια αυτά. Αυτή η νέα στρατηγική, ωστόσο, εμπεριέχει τις προαναφερθείσες τεχνικές προκλήσεις λόγω φύσεως του απομονωμένου από δείγματα ιστού DNA [212].

Αναφορικά με τους τριπλά αρνητικούς καρκίνους του μαστού, αυτοί χαρακτηρίζονται από μεταλλάξεις στο *TP53* σε ιστικό επίπεδο, ενώ μεταλλάξεις σε άλλα γονίδια είναι σπάνιες και μη επαναλαμβανόμενες [213]. Οι όγκοι σε ασθενείς που φέρουν μεταλλάξεις στα *BRCA1/2* χαρακτηρίζονται συχνά από μεταλλάξεις στο *TP53* και συνοδεύονται από ειδικά μοτίβα γονιδιωματικής αστάθειας [214]. Τόσο η ύπαρξη μεταλλάξεων γαμετικής σειράς στα *BRCA1/2* όσο και η επακόλουθη γονιδιωματική αστάθεια μπορεί να είναι ιδιαίτερα σημαντικές για την επιλογή της θεραπείας. Αυτοί οι ασθενείς φαίνεται να επωφελούνται από τη θεραπεία με βάση την πλατίνα και όχι από τα συμβατικά χημειοθεραπευτικά μέσα, όπως οι ταξάνες, γεγονός που δεν παρατηρείται σε ασθενείς που δε φέρουν τέτοιες μεταλλάξεις [215]. Συγκεκριμένα, σε πρόσφατη μελέτη σε δείγματα όγκων από 194 ασθενείς με τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού ταυτοποιήθηκαν 50 μεταλλάξεις απώλειας της

λειτουργίας σε οκτώ γονίδια (*BRCA1*, *BRCA2*, *BARD1*, *BRIP1*, *MRE11*, *RAD50*, *RAD51C* και *NBN*) οι μεταλλάξεις των οποίων προδιαθέτουν στον καρκίνο [216]. Η παρατηρούμενη συχνότητα (26%) είναι υψηλότερη από τη συχνότητα που έχει αναφερθεί σε προηγούμενη μελέτη (14.6%) [37] και το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί στις ισχυρές ιδρυτικές επιδράσεις που αντιπροσωπεύουν τις Ελληνίδες ασθενείς με καρκίνο μαστού ή/και ωοθηκών [217]. Επίσης, παρατηρήθηκε απώλεια της παθογόνου μετάλλαξης γαμετικής σειράς περίπου στο 40% των αντιστοιχισμένων δειγμάτων περιφερικού αίματος και όγκου.

Η Ιατρική Ακριβείας στην Ογκολογία

Σκοπός της ιατρικής ακριβείας είναι μέσω της κατανόησης του γενετικού προφίλ ενός όγκου να αντιστοιχήσει τη σωστή θεραπεία στους κατάλληλους ασθενείς τη σωστή χρονική στιγμή. Κάθε όγκος περιέχει κληρονομήσιμες (γαμετικής σειράς) και ειδικές του όγκου (σωματικές) παραλλαγές. Τα τελευταία χρόνια με την εξέλιξη της αλληλούχησης μεγάλης κλίμακας και της υπολογιστικής βιολογίας η πλειονότητα των παραλλαγών που ταυτοποιούνται εμπλουτίζονται με πληθώρα γενετικών πληροφοριών. Το προφίλ του όγκου μπορεί να συμπεριλαμβάνει δείκτες εκτίμησης κινδύνου ή πρόβλεψης απόκρισης στη θεραπεία [218, 219].

Στην πρόβλεψη αυτή έρχεται να προστεθεί το φαινόμενο της αντίστασης στη θεραπεία που αναπτύσσουν οι όγκοι κατά την εξέλιξή τους και προέρχεται από την ενδογενή ποικιλομορφία τους ή ετερογένειά τους. Ουσιαστικά, σε έναν όγκο συνυπάρχουν κυτταρικοί πληθυσμοί που φέρουν διαφορετικές γενετικές ή/και επιγενετικές αλλαγές, και υπό πιέσεις, που προέρχονται είτε από το μικροπεριβάλλον του όγκου είτε μέσω φαρμακευτικής αγωγής, κάποιοι υποπληθυσμοί καρκινικών κυττάρων υπερτερούν έναντι άλλων. Με την ανάλυση δειγμάτων όγκου από διαφορετικές περιοχές μιας μεμονωμένης καρκινικής μάζας και από διακριτές μεταστατικές αλλοιώσεις από τον ίδιο ασθενή μπορεί να προκύψει η κλωνικότητα των μεταβολών αυτών. Οι κλωνικές αλλαγές πιθανόν αντιπροσωπεύουν γεγονότα που συμβαίνουν κατά την έναρξη της ογκογένεσης,

ενώ η ετερογένεια μέσω των καρκινικών υποκλώνων αφορά σε μετέπειτα γεγονότα που πραγματοποιούνται κατά την εξέλιξη ενός όγκου [220].

Έχει δειχθεί ότι πληθυσμοί γενετικά ανθεκτικών κυτταρικών υποκλώνων συχνά προϋπάρχουν της θεραπείας, υποδηλώνοντας ότι η επιλογή κλώνου σε προϋπάρχοντες πληθυσμούς είναι ο κύριος μηχανισμός για την επίκτητη αντίσταση στη στοχευμένη θεραπεία [221]. Μέσω ταυτοποίησης των γενετικών αλλαγών που θα αποτελέσουν δυνητικούς θεραπευτικούς στόχους μειώνονται οι πιθανότητες διαφυγής των υποκλώνων που δε φέρουν τη στοχεύουσα αλλαγή. Οι συνδυαστικές θεραπείες πρόληψης μπορεί να επιφέρουν εξάλειψη των ανθεκτικών κυττάρων πριν τη δημιουργία μηχανισμών αντίστασης στη θεραπεία. Από την άλλη πλευρά, η ανοσοαπόκριση θα μπορούσε να τροποποιηθεί έναντι της εξέλιξης του όγκου είτε με έγχυση καρκινικών λεμφοκυττάρων ειδικών των γενετικών αυτών αλλαγών είτε με πυροδότηση της εξέλιξης ώστε να ενισχυθεί η ανοσοαπόκριση, μέσω αύξησης του αριθμού των νεοαντιγόνων, δηλαδή πεπτιδίων που παράγονται από σωματικές μεταλλάξεις [222].

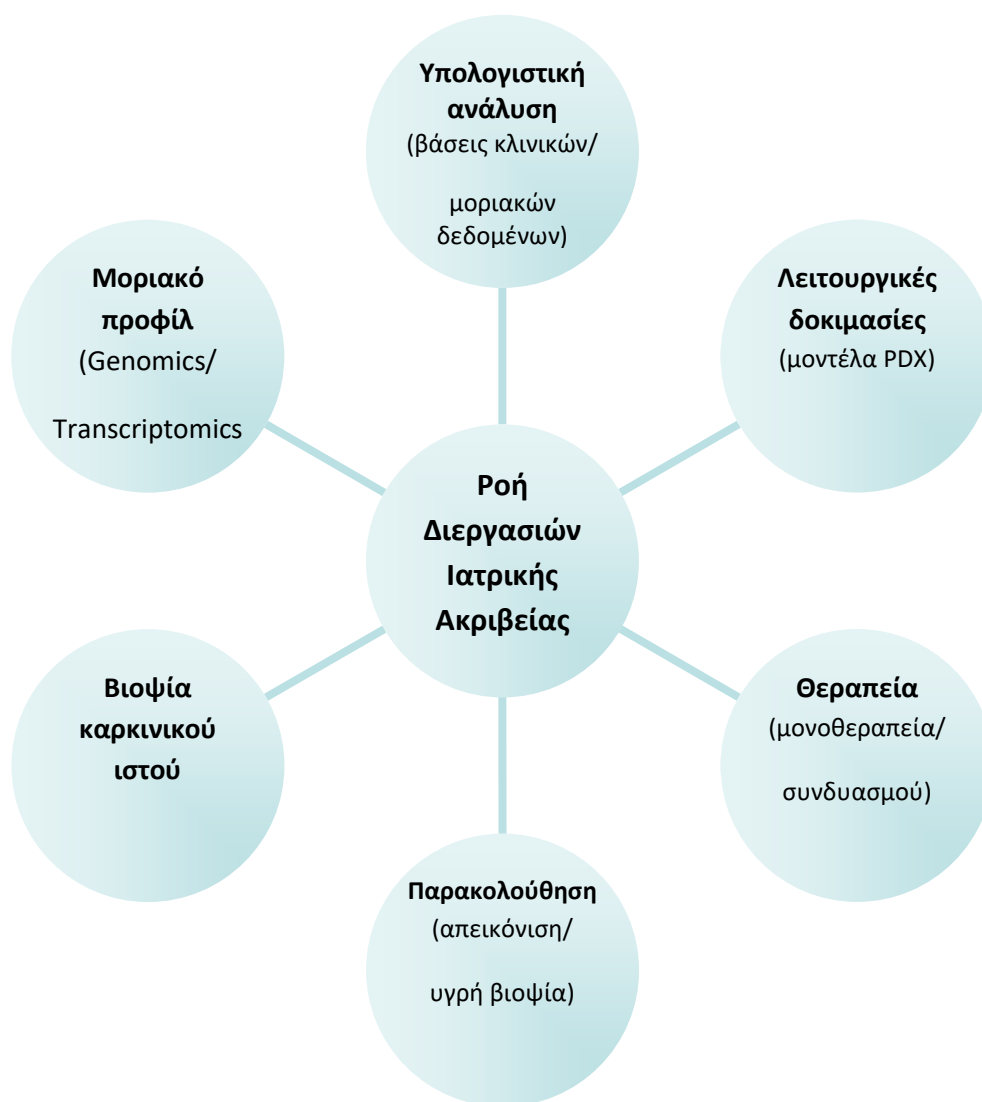
Η παρατήρηση ότι οι ανθεκτικοί κυτταρικοί κλώνοι συχνά προϋπάρχουν στην έναρξη της θεραπείας υποστηρίζει τη θεωρία ότι η αρχική χορήγηση συνδυαστικών θεραπειών έχει περισσότερες πιθανότητες να οδηγήσει σε εξάλειψη αυτών των κλώνων όταν ο αριθμός τους είναι μικρός, πριν την εμφάνιση της επίκτητης αντίστασης, ως εκ τούτου, μειώνοντας την πιθανότητα υποτροπής. Μια ολοκληρωμένη ανάλυση του όγκου στο χώρο και στο χρόνο μέσω αλληλούχησης πολλαπλών βιοψιών του συμπαγούς όγκου και υγρών βιοψιών θα φανερώσει τον τρόπο με τον οποίο τα μοριακά αυτά προφίλ σχετίζονται με την εξέλιξη του όγκου υπό την πίεση των αντικαρκινικών θεραπειών. Η ανάλυση των πολλαπλών βιοψιών από έναν ενιαίο όγκο μπορεί να υποστηριχθεί με την τεχνολογία αλληλούχησης μεμονωμένων κυττάρων, παρέχοντας ανάγνωση δεδομένων υψηλής ανάλυσης, ακόμα και με μικρή αρχική ποσότητα γενετικού υλικού [223]. Τα τελευταία χρόνια οι ερευνητές χρησιμοποιούν μοντέλα ξενομοσχευμάτων ανθρώπινων όγκων (patient-derived xenografts, PDX) και καλλιέργειες δύο ή τριών διαστάσεων ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών προκειμένου να κατανοήσουν

καλύτερα τη βιολογία του όγκου και να προβλέψουν ακριβέστερα την απόκριση του ασθενούς στη θεραπεία που πρόκειται να λάβει [224].

Η χωρική και η χρονική μεταβλητότητα των γενετικών αλλαγών, της επιλογής των κλώνων και της γενετικής μετατόπισης ενισχύουν την πολυπλοκότητα και μαζί με τα στοχαστικά συμβάντα, περιορίζουν τη δυνατότητα πρόβλεψης της εξέλιξης του καρκίνου [225]. Συγκεκριμένα, δεδομένης της ετερογένειας των υπό εξέταση όγκων και της εξέλιξης αυτών, δεν είναι συχνά εφικτή η αντιστοίχιση της θεραπείας με το γονότυπο του όγκου [226]. Σε μελέτη του Catenacci και των συνεργατών του [227] βρέθηκε ότι στα 110 υπό μελέτη δείγματα όγκων, τα 21 δείγματα είχαν πιθανές μεταλλάξεις γαμετικής σειράς σε γονίδια προδιάθεσης στον καρκίνο. Ομοίως, σε μια μεγαλύτερη μελέτη αναλύθηκαν 815 ζεύγη όγκων-φυσιολογικού ιστού από ασθενείς με 15 τύπους όγκων. Από αναλύσεις με αντιστοιχισμένο φυσιολογικό DNA ταυτοποιήθηκαν μεταβολές γαμετικής σειράς σε γονίδια που προδιαθέτουν στον καρκίνο περίπου στο 3% των ασθενών με φαινομενικά σποραδικούς καρκίνους. Αντίθετα, μια προσέγγιση αλληλούχησης μόνο σε δείγματα όγκου δεν μπόρεσε να ταυτοποιήσει σαφώς τις μεταβολές γαμετικής σειράς σε γονίδια που προδιαθέτουν στον καρκίνο και οδήγησε σε επιπρόσθετα ψευδώς θετικά ευρήματα που αντιστοιχούν στο 31% και στο 65% των μεταβολών που αναγνωρίστηκαν σε στοχευμένες αναλύσεις και αναλύσεις όλων των κωδικών περιοχών του γονιδιώματος, αντίστοιχα [228]. Στο σύνολό τους, τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι ένα μεγάλο ποσοστό των όγκων παρουσιάζει μεταβολές που μπορεί να είναι κλινικά χρήσιμες και ότι ένα μικρό αλλά σημαντικό ποσοστό των φαινομενικά σποραδικών καρκίνων συνοδεύεται από παθογόνους μεταλλάξεις γαμετικής σειράς σε γονίδια που προδιαθέτουν στον καρκίνο.

Η νέα στρατηγική της ενσωμάτωσης αναλύσεων για την ταυτοποίηση των γενετικών και επιγενετικών αλλαγών του όγκου στη θεραπεία του καρκίνου, παρ' όλους τους περιορισμούς, έχει δυνατότητες βελτίωσης και επέκτασης της εξατομικευμένης θεραπείας σε ένα ευρύτερο υποσύνολο ασθενών. Στην προσπάθεια αυτή θα πρέπει να ληφθεί υπ' όψιν το μικροπεριβάλλον του όγκου που περιλαμβάνει μεταβολικές και ανοσολογικές τροποποιήσεις. Επιπλέον, είναι

αναγκαίο να συμπεριληφθούν τα δεδομένα που προκύπτουν από αναλύσεις μεταγραφώματος (transcriptomics) για την καλύτερη επιλογή των ασθενών ή πιθανών θεραπειών συνδυασμού, καθώς και από λειτουργικές αναλύσεις με *ex vivo* ή/και *in vivo* μοντέλα ώστε να συνδεθεί το γενετικό προφίλ με την απόκριση στην εκάστοτε θεραπεία (Σχήμα 4) [229].



Σχήμα 4: Προτεινόμενη ροή διεργασιών στην Ιατρική Ακριβείας (Τροποποιημένο σχήμα από τους Senft, D., *et al.*, Trends Mol Med, 2017 [229])

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Υπολογίζεται ότι περίπου το 10-15% του συνόλου των περιπτώσεων καρκίνων μαστού/ωοθηκών έχουν γενετικό υπόβαθρο, με το ποσοστό αυτό να αυξάνεται σημαντικά (25-30%) στις ομάδες ασθενών που διαγιγνώσκονται σε νεαρή ηλικία (<45 ετών) ή/και έχουν σοβαρό οικογενειακό ιστορικό. Οι παθογόνοι μεταλλάξεις σε μια σειρά από γονίδια, και κυρίως στα υψηλής διεισδυτικότητας γονίδια *BRCA1* και *BRCA2*, προδιαθέτουν τόσο σε κακοήθεια μαστού όσο και ωοθηκών, με τον δια βίου κίνδυνο ανάπτυξης να ανέρχεται στο 80% και 40% για τον καρκίνο μαστού και στο 50% και 20% για τον καρκίνο των ωοθηκών, για μεταλλάξεις γαμετικής σειράς στα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2*, αντίστοιχα [230] [231].

Δεδομένης της σημαντικής εξέλιξης στον τομέα της γενετικής του καρκίνου, έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερα από 20 γονίδια, μεταλλάξεις των οποίων προδιαθέτουν για καρκίνο μαστού και ωοθηκών [199]. Επομένως, η τρέχουσα εργαστηριακή πρακτική έχει ενσωματώσει τη μέθοδο αλληλούχησης επόμενης γενεάς (Next Generation Sequencing) και πιο συγκεκριμένα, τη χρήση των γονιδιακών πάνελ, με στόχο την ταυτόχρονη ανάλυση πολλών γονιδίων και ασθενών, συντελώντας στην ορθότερη κλινική διαχείριση των ασθενών βάσει του γενετικού τους υποβάθρου.

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποτελεί η ανάλυση ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών με στόχο την ταυτοποίηση νέων αλληλομόρφων προδιάθεσης σε γνωστά και νέα γονίδια και η πιθανή συσχέτιση αυτών με την εμφάνιση της νόσου.

A. ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Ανίχνευση μεταλλάξεων με τη συμβατική αλληλούχηση κατά Sanger

1.1 Απομόνωση DNA

Αντιδραστήρια:

- Ρυθμιστικό Διάλυμα Λύσης (Lysis Buffer)
 - 1M Tris-HCl, pH 7.5
 - 1M MgCl₂ (PanReac AppliChem, Spain/Germany)
 - 0.32M σακχαρόζη (Merck, Germany)
 - 1% v/v Triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA)
- Ρυθμιστικό Διάλυμα SET
 - 10mM Tris-HCl, pH 8.0
 - 100mM NaCl
 - 1mM EDTA
- SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) 10%, Sigma
- Πρωτεΐνάση K, (Macherey-Nagel, Germany)
- Χλωροφόρμιο, (Merck, Germany)
- Ισοπροπανόλη (Merck, Germany)
- NaCl 6M
- Αιθανόλη, (Merck, Germany)
- Διάλυμα TE
 - 10mM TrisHCl pH 8
 - 1mM EDTA

Εξοπλισμός:

- Απαγωγός εστία, Vircus Labco
- Φυγόκεντρος, Universal 32R Hettich
- Υδατόλουτρο, Bioline

Στους ανθρώπους, η πιο συνηθισμένη πηγή DNA είναι τα λευκά αιμοσφαίρια του αίματος, από τα οποία απομονώνεται εύκολα γενετικό υλικό υψηλής συγκέντρωσης και ποιότητας. Η μέθοδος απομόνωσης του DNA πραγματοποιείται σε ολικό περιφερικό αίμα με εφαρμογή της μεθόδου εκχύλισης με άλας κατά Miller [232]. Αρχικά, σε ειδικό περιέκτη (falcon) προστίθεται συγκεκριμένη ποσότητα αίματος (~5 mL) και διαλύματος λύσης (25 mL) και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 2500 rpm για 20 min. Το διάλυμα λύσης συμβάλλει στη λύση των

κυτταροπλασματικών και πυρηνικών μεμβρανών, απελευθερώνοντας το DNA στο διάλυμα. Εν συνεχεία, το υπερκείμενο απορρίπτεται και προστίθεται νέα ποσότητα διαλύματος λύσης (12,5 mL) με επακόλουθη φυγοκέντρηση στις 2500 rpm για 10 min. Μετά από απόρριψη του υπερκειμένου, ακολουθεί η προσθήκη των απορρυπαντικών διαλυμάτων SET (800 µl) και SDS (40 µl) και της πρωτεΐνάσης K (80 µl). Τα απορρυπαντικά συντελούν στη λύση των κυτταρικών μεμβρανών, ενώ συγκεκριμένα το διάλυμα δωδεκυλοθειικού νατρίου (SDS) απομακρύνει τις ιστόνες από τα μόρια του DNA και δρα ως αποδιατακτικός παράγοντας, διαταράσσοντας τους δεσμούς μεταξύ των πρωτεϊνών. Η πρωτεΐνάση K αποτελεί μια πρωτεάση σερίνης, που αναγνωρίζει και διασπά τον πεπτιδικό δεσμό δίπλα στην καρβοξυλομάδα των αλειφατικών και αρωματικών αμινοξέων. Μετά την προσθήκη της στο διάλυμα, η πρωτεΐνάση K απενεργοποιεί αμέσως τις ενδογενείς νουκλεάσες (DNAσες) του κυττάρου, που μπορεί να κατακερματίσουν το DNA κατά τη διαδικασία απομόνωσης. Ένα πλεονέκτημα της πρωτεΐνάσης K είναι ότι παραμένει δραστική ακόμα και παρουσία SDS και χηλικών παραγόντων, όπως το EDTA. Ακολουθεί επώαση του δείγματος στους 37°C για 16 ώρες. Στη συνέχεια, προστίθεται μίγμα χλωροφορμίου/ισοπροπανόλης (1.5mL) σε αναλογία 24:1 και NaCl 6M (300µL). Το μίγμα χλωροφορμίου/ισοπροπανόλης οδηγεί στο διαχωρισμό της οργανικής από την υδατική φάση, στην οποία περιέχονται τα νουκλεϊκά οξέα, βοηθώντας, ως εκ τούτου, στην απομάκρυνση της υδατικής φάσης με την ελάχιστη διασταυρούμενη επιμόλυνση από την οργανική φάση. Το NaCl βοηθά στην απομάκρυνση των πρωτεϊνών που είναι δεσμευμένες στο DNA, διατηρώντας τις πρωτεΐνες διαλυμένες στη υδατική φάση έτσι ώστε να μην κατακρημνιστούν μαζί με το DNA. Ακολούθως, το μίγμα ανακινείται έντονα μέχρις ότου σχηματιστεί γαλάκτωμα και φυγοκεντρείται στις 3000 rpm για 10 min σε θερμοκρασία 4°C, στάδιο κατά το οποίο πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των δύο φάσεων. Το υπερκείμενο που αποτελείται από την υδατική φάση μεταφέρεται σε erpendorf 1.5ml, στο οποίο προστίθεται παγωμένη αιθανόλη 100% ίσου όγκου. Ακολουθεί έντονη ανακίνηση του δείγματος μέχρις ότου κατακρημνιστεί το DNA. Εν συνεχεία, το δείγμα φυγοκεντρείται στις 13000 για 1 min, το υπερκείμενο, που αποτελείται

από την αιθανόλη, απορρίπτεται προσεκτικά και ακολουθεί ξήρανση με θέρμανση στους 70°C και επαναδιάλυση του DNA σε διάλυμα TE (150-200 μl).

1.2. Φωτομέτρηση του απομονωμένου DNA

Στη συνέχεια, αξιολογείται η ποσότητα και η ποιότητα του δείγματος του απομονωμένου DNA με τη χρήση φωτόμετρου NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, USA), όπου απαιτείται μια μικρή ποσότητα δείγματος (1-2 μl). Πραγματοποιείται μέτρηση στα 260 nm, όπου τα νουκλεϊκά οξέα εμφανίζουν το μέγιστο της απορρόφησής τους, και στα 280 nm, όπου απορροφούν οι πρωτεΐνες, για να προκύψει ο λόγος καθαρότητας του δείγματος (A_{260nm}/A_{280nm}). Οι μετρήσεις παρουσιάζονται αυτόματα στην οθόνη του υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με το φωτόμετρο. Ένας λόγος A_{260nm}/A_{280nm} μεταξύ 1,8 και 1,9 αντιστοιχεί σε δείγμα DNA καλής καθαρότητας.

1.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Αντιδραστήρια:

- 10X ρυθμιστικό διάλυμα με 2mM $MgCl_2$, Biotools
- Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs), Invitrogen
- Taq πολυμεράση 5U/μL, Biotools
- Εκκινητές, IDT, Integrated DNA Technologies

Εξοπλισμός:

- Θερμοκυκλοποιητής Veriti, Applied Biosystems

Ακολουθεί η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR) για την ενίσχυση των υπό μελέτη περιοχών του γενωμικού DNA. Αρχικά, χρησιμοποιούνται κατάλληλα ζεύγη ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών (πρόσθιος και ανάστροφος εκκινητής), τα οποία εμφανίζουν συμπληρωματικότητα με μία από τις δύο αλυσίδες του DNA και μια DNA πολυμεράση (Taq πολυμεράση), που έχει την ιδιότητα να παραμένει δραστική σε υψηλές θερμοκρασίες. Επιπλέον, απαιτείται κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα που διατηρεί το pH και τη συγκέντρωση αλάτων στις βέλτιστες συνθήκες διεξαγωγής της αντίδρασης. Το ρυθμιστικό

διάλυμα περιέχει επίσης $MgCl_2$, που είναι απαραίτητος συμπαράγοντας της DNA πολυμεράσης. Στο μίγμα της αντίδρασης προστίθενται τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (deoxynucleotide triphosphates, dNTPs), τα οποία χρησιμοποιούνται ως ισομοριακό μίγμα των τεσσάρων νουκλεοτιδίων (ATP, TTP, CTP και GTP). Τα ιόντα Mg^{2+} σχηματίζουν διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs, το DNA και τους εκκινητές. Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκυκλοποιητή (Veriti) με τις ακόλουθες συνθήκες:

- ✓ Αποδιάταξη: στους $94^{\circ}C$ για 5 min (1 κύκλος)
- ✓ Υβριδισμός:

}	στοιχείο	στοιχείο	}	30 κύκλοι
	στοιχείο	στοιχείο		
	στοιχείο	στοιχείο		
- ✓ Επιμήκυνση: στους $72^{\circ}C$ για 7 min (1 κύκλος)

Πίνακας 3: Στοιχειομετρία της αντίδρασης PCR

Αντιδραστήριο	Αρχική συγκέντρο	Όγκος	Τελική συγκέντρο
Ρυθμιστικό διάλυμα	10x	2 μ l	1x
dNTPs	2.5 mM	0.8 μ l	0.1 μ M
Πρόσθιος εκκινητής	10 μ M	0.6 μ l	0.3 μ M
Ανάστροφος εκκινητής	10 μ M	0.6 μ l	0.3 μ M
Taq πολυμεράση	5 U/ μ l	0.1 μ l	0.025 U
DNA	25 ng/ μ l	2.0 μ l	50 ng
H ₂ O		13.9 μ l	

Πίνακας 4. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν και το μήκος του κάθε προϊόντος της PCR για τα γονίδια *BRCA1* (A) και *BRCA2* (B).

(A) Εκκινητές για το γονίδιο <i>BRCA1</i>			
Εξόνιο	Πρόσθιος εκκινητής	Ανάστροφος εκκινητής	Μέγεθος προϊόντος (bp)
2	GAAGTTGTCATTTTATAAACCTTT	TGTCCTTTCTCCCTAGTATGT	253

3	AACGAACTTGAGGCCTTATG	TTGGATTTTTCGTTCTCACTT	308
5	CTCTTAAGGGCAGTTGTGAG	ATGGTTTTATAGGAACGCTATG	278
6	TTTCTACTGTTGCTGCATCT	TAATTTGCAAATTCCTGAG	274
7	CACAACAAAGAGCATAACATAGGG	CCACAGAGCAAGACTCCATC	327
8	GCTGACTGATGATGGTCAATTT	GCTGCTACCACAAATACAAA	321
9	CCTGCCACAGTAGATGCT	ACACCAAATCCCAAGTCGTGTG	336
10	CCCAGCAACCATTTCAATTC	AAGGTCCCAAATGGTCTTCA	351
11.1N	GGAATTAATGAAAGAGTATGAGC	TCTGTGGCTCAGTAACAAATGCTC	976
11.2N	GCCAGTGATCCTCATGAGGC	AGGTACCAATGAAATACTGCTAC	1027
11.3N	CCCAGAGCTGAAGTTAACAAATGC	CTTCATTAATATTGCTTGAGCTGGC	1051
11.4N	TCAATGTCACCTGAAAGAGAAATGG	GAAGCAGTTCCTTAACTATACTTGG	1194
12	GTCCTGCCAATGAGAAGAAA	TGTCAGCAAACCTAAGAATGT	265
13	AATGAAAGCTTCTCAAAGTA	ATGTTGGAGCTAGTTCCTTAC	320
14	CTAACCTGAATTATCACTATCA	GTGTATAAATGCCTGTATGCA	312
15	TGGCTGCCAGGAAGTATG	AACCAGAATATCTTTATGTAGGA	338
16	AATTCTTAACAGAGACCAGAAC	AAAACCTTTCCAGAATGTTG	450
17	GTGTAGAACGTGCAGGATTG	TCGCCTCATGTGGTTTTA	263
18/19	GGCTCTTTAGCTTCTTAGGAC	CATTGTTAAGGAAAGTGGTGC	799
20	ATATGACGTGTCTGCTCCAC	GTATTCCACTCCCCTTGCAGAG	234
21	TTCACTCTCCATCCCAACC	CATCGTGGGATCTTGCTTAT	249
22	TCCCATTGAGAGGTCTTGCT	GAGAAGACTTCTGAGGCTAC	297
23	CAGAGCAAGACCCTGTCTCA	TCAAAAAGACATTTTAGCCATTCA	307
24	ATGAATTGACACTAATCTCTGC	GTAGCCAGGACAGTAGAAGGA	280

(B) Εκκινητές για το γονίδιο BRCA2			
Εξόνιο	Πρόσθιος εκκινητής	Ανάστροφος εκκινητής	Μέγεθος προϊόντος (bp)
2	GTTCCAGGAGATGGGACTGA	TGGGTTTTTAGCAAGCATTTTT	303
3	TGGTTAAAACATAAGGTGGGATTTT	ACACAATTAATGAATGAGCT	377
4	CCAAAGAATGCAAATTTATAATCCA	TCTACCAGGCTCTTAGCCAAA	287
5/6/7	TTCCAACAATTTATATGAATGAGAATC	CCTTTTAACAGAAGTATTAG	696
8	TGTGCTTTTTGATGTCTGACAAA	AAGGCATTCCAAAATGTTAGC	382
9	GATTGCAGATAACTGAAATC	GGGTGACAGAGCAAGACTCC	312
10A,B	TGTTTCTATGAGAAAGTTGTGAGA	TTGCCTGCTTACTGCAAGA	753
10C,D	CTTTGCCACGTATTCTAGCC	AAAAACACAGAAGGAATCGTCA	645
11A,B	CACTGTGCCCAAACACTACC	GGCAACAGCTCAACGTTTTT	693
11C	AAAATGTCAGACAAGCTCAAAGG	TCCTCTGCAAGAACATAAACCA	485
11D,E	CGAACCCATTTTCAAGAACTC	AATCGATGGGGCATTCTTA	766
11F	ACACCTAGCCAAAAGGCAGA	TTGAAACGACAGAATCATGACA	505
11G	TGAAGCTCTGCAAAAAGCTG	GCTTCTTGAGCTTTCGCAAC	501

11H	GAATTTGATGGCAGTGATTCAA	TTCCCGCTAGCTGTATGAAAA	587
11I,J	CCCAGTTGGTACTGGAAATCA	TGGCTCAATACCAGAATCAAGTT	838
11K,L	TCATCTCTCCGAAAAACAAGA	TGAGCTGGTCTGAATGTTTCG	887
11M,N	TGGGATTTTTAGCACAGCAA	TTGTTAGCATACCAAGTCTACTGAA	996
12	AAACTGATATTATTTGCCTTAAAAACA	GGATCCACCTGAGGTCAGAA	220
13	CATTCAGTGAATAATGTAAAGCCTA	TCATTTATAAAAAACGAGACTTTTCTCA	251
14	ATGAGGGTCTGCAACAAAGG	GGGGAAAAACCATCAGGACAT	595
15	GCCAGGGGTTGTGCTTTTTA	AGCCATTTGTAGATACTAGT	322
16	TTTGGTAAATTCAGTTTTGGTTTG	GAAGAAAGAGGGATGAGGGGAAT	348
17/18	TGATCTTGAACAATGTAGTTTTTGT	ACATCTAAGAAATTGAGCATCCTT	1225
19/20	GGCAGTTCTAGAAGAATGAAAACT	TTGTTGCTATTCTTTGTCTAACACC	966
21	TGGGTGTTTTATGCTTGGTTC	TCCTGTGATGGCCAGAGAGT	288
22/23/24	TTTGTCTGTTTAAAGCCATCT	GTAGCCAGGACAGTAGAAGGA	1010
25	TTGGAAAACCTGAGCTTTCG	CTGAGGTTTCATGGGCAATTA	552
26	TGGGTTTGCAATTTATAAAGCAG	CAGAATATACGATGGCCTCCA	254
27	GTGTAATATTTGCGTGCTTA	GTTTTAAGATATGCAACTGA	924

1.4. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR

Αντιδραστήρια:

- Αγαρόζη (NIPPON Genetics Europe, Germany)
- Ρυθμιστικό Διάλυμα TBE (5x)
 - Tris-HCl, (Sigma)
 - Βορικό οξύ, (PanReac AppliChem)
 - EDTA, Riedel de Haen
- Κυανούν της βρωμοφαινόλης
- Βρωμιούχο αιθίδιο (PanReac AppliChem, Spain/Germany)
- 100 bp DNA marker (Nippon Genetics Europe, Germany)

Εξοπλισμός:

- Ζυγός (Kern, EMB 500-I)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης (PowerPac Basic, Biorad)
- Συσκευή οπτικοποίησης των πηκτωμάτων αγαρόζης (MiniBis Pro, DNR Bio-Imaging Systems Ltd.)

Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης αποτελεί μία βασική μέθοδο διαχωρισμού τμημάτων DNA διαφορετικού μεγέθους. Η αγαρόζη αποτελεί έναν φυτικό πολυσακχαρίτη, ο οποίος όταν διαλυθεί υπό αυξημένη θερμοκρασία και στη συνέχεια ψυχθεί σχηματίζει ένα πορώδες πήκτωμα. Το μέγεθος των πόρων εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης και καθορίζει την ταχύτητα με την οποία τα μόρια DNA θα κινηθούν από τον αρνητικό στο θετικό

πόλο υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Συνεπώς, τα μόρια DNA με το μεγαλύτερο αριθμό βάσεων κινούνται με μικρότερη ταχύτητα μέσα στο πήκτωμα. Το μέγεθος των τμημάτων DNA μπορεί να προσδιοριστεί μέσω μοριακών δεκτών (ladders) που περιέχουν τμήματα DNA γνωστού μεγέθους. Τα μόρια DNA γίνονται ορατά μέσω μίας χρωστικής, του βρωμιούχου αιθιδίου, που παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων και φθορίζει παρουσία υπεριώδους ακτινοβολίας. Επιπλέον, χρησιμοποιείται μία μπλε χρωστική ουσία, η βρωμοφαινόλη, που διευκολύνει την παρακολούθηση της ηλεκτροφόρησης, καθώς φέρει ένα ελαφρώς αρνητικό φορτίο και ακολουθεί την ίδια κατεύθυνση με τα μόρια DNA. Τέλος, η ηλεκτροφόρηση λαμβάνει χώρα σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1X, συνθήκη η οποία διευκολύνει την κινητικότητα των μορίων DNA στο ηλεκτρικό πεδίο. Πιο αναλυτικά, η διαδικασία που εφαρμόστηκε περιγράφεται ακολούθως:

- ❖ **Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης 1%:** Σε 150 ml TBE 1X διαλύονται 1,5 gr αγαρόζης και το διάλυμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι την πλήρη διάλυση της αγαρόζης και την τελική ομογενοποίησή της. Εν συνεχεία, προστίθενται 15 ml βρωμιούχο αιθίδιο και το διάλυμα αποχύνεται σε ειδικό καλούπι, στο οποίο προηγουμένως έχει τοποθετηθεί ειδική χτένα για τη διαμόρφωση μικρών οπών. Το πήκτωμα στερεοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου εντός ολίγων λεπτών (~15 min), αφαιρείται η χτένα διαμορφώνοντας μικρές οπές και το πήκτωμα είναι έτοιμο προς χρήση. Χρησιμοποιούνται 3 ml από κάθε δείγμα, τα οποία αναμειγνύονται με 3 ml βρωμοφαινόλης.
- ❖ **Ηλεκτροφόρηση:** Το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετείται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία πληρώνεται με κατάλληλο όγκο διαλύματος TBE 1X. Τα δείγματα μαζί με τη χρωστική τοποθετούνται στις οπές του πηκτώματος, ενώ παράλληλα χρησιμοποιούνται και 2 ml μοριακού δείκτη, τα οποία τοποθετούνται μαζί με 2 ml βρωμοφαινόλης σε μία από οπές. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης συνδέεται με τα κατάλληλα ηλεκτρόδια και εφόσον ρυθμιστεί η τάση ηλεκτροφόρησης ανάλογα με την περιεκτικότητα του πηκτώματος σε αγαρόζη (υψηλή περιεκτικότητα συνοδεύεται από

υψηλή τάση) ξεκινάει η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης. Για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων της PCR το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετείται σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας.

1.5. Καθαρισμός των προϊόντων PCR σε αντλία κενού

Υλικά:

- Διάλυμα TE 10X

Εξοπλισμός:

- πιάτο 96 μικροκυψελίδων (MultiScreen, Millipore)
- αντλία κενού

Τα προϊόντα PCR που επιλέγονται κατά την ηλεκτροφόρηση ως κατάλληλα για να συνεχίσουν στη μετέπειτα πειραματική διαδικασία, θα πρέπει να υποβληθούν σε καθαρισμό, απομακρύνοντας την περίσσεια των αντιδραστηρίων. Ο καθαρισμός πραγματοποιείται με τη χρήση ειδικών μεμβρανών από ρητίνες που έχουν την ιδιότητα να κατακρατούν το DNA και οι οποίες βρίσκονται στον πυθμένα μικροκυψελίδων ενός πιάτου 96 τέτοιων θέσεων. Η συνολική ποσότητα των προϊόντων PCR (~22 μl) συμπληρώνεται με 80 μl διαλύματος TE, τα δείγματα τοποθετούνται στο πιάτο των 96 μικροκυψελίδων και εφαρμόζεται κενό υπό πίεση με τη χρήση ειδικής αντλίας κενού. Ως εκ τούτου, το προϊόν της PCR δεσμεύεται στην ειδική μεμβράνη, ενώ η περίσσεια εκκινητών, dNTPs και εναπομένοντος διαλύτη διέρχεται από αυτή. Τέλος, τα προϊόντα της PCR επαναδιαλύονται σε 20-25μl διαλύματος TE 1X. Τα καθαρισμένα δείγματα ηλεκτροφορούνται εκ νέου σε πήκτωμα αγαρόζης 1% ώστε να καθοριστεί η ποσότητα του δείγματος που θα χρησιμοποιηθεί στην αντίδραση για την αλληλούχηση του DNA.

1.6 Αντίδραση αλληλούχησης του DNA

Αντιδραστήρια:

- Ready Reaction Mix v.3.1
- Ρυθμιστικό διάλυμα αλληλούχησης
- Εκκινητής

Εξοπλισμός:

- Θερμοκυκλοποιητής Veriti, Applied Biosystems
- Αυτόματος γενετικός αναλυτής, ABI PRISM 3130XL genetic analyzer, Applied Biosystems

Η τεχνική της αλληλούχησης του DNA βασίζεται στη μέθοδο του Sanger όπου η μία αλυσίδα του DNA χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας [233]. Σε κάθε αντίδραση αλληλούχησης προστίθεται το μόριο DNA προς αλληλούχηση, ο κατάλληλος εκκινητής, η πολυμεράση, τα dNTPs και τα δι-δεοξυ-ανάλογά τους, τα τριφωσφορικά 2',3'-διδεοξυ-νουκλεοτίδια (ddNTPs), στα οποία υπάρχει έλλειψη της υδροξυλομάδας στο 3' άκρο. Τα ddNTPs είναι σημασμένα με τέσσερις διαφορετικές φθορίζουσες ουσίες (**Πίνακας 5**), που εκπέμπουν σε διαφορετικό μήκος κύματος, καθιστώντας δυνατή την ταυτοποίηση του τελευταίου νουκλεοτιδίου κάθε νεοσυντιθέμενης αλυσίδας. Όταν η Taq πολυμεράση εισάγει ένα ddNTP, δεδομένης της έλλειψης της υδροξυλομάδας στο 3' άκρο, τερματίζεται πρόωρα η επιμήκυνση του μορίου DNA. Ως εκ τούτου, σχηματίζονται μόρια DNA που διαφέρουν κατά ένα νουκλεοτίδιο. Τα προϊόντα που προκύπτουν υποβάλλονται σε τριχοειδική ηλεκτροφόρηση σε αυτόματο γενετικό αναλυτή. Στο τέλος της ηλεκτροφόρησης το κάθε φθοροσημασμένο προϊόν DNA περνάει από το σύστημα ανίχνευσης με αισθητήρες laser, που αναγνωρίζει τη χρωστική που φέρει κάθε προϊόν στο 3' άκρο του, άρα και την αντίστοιχη βάση.

Το μίγμα αντιδραστηρίων για την αντίδραση της αλληλούχησης συνίσταται από το Big Dye Termination Ready Reaction Mix, που περιέχει την Taq πολυμεράση, τα dNTPs και τα ddNTPs, το ρυθμιστικό διάλυμα αλληλούχησης (sequencing buffer: Tris-HCl 200 mM, MgCl₂ 10 mM, pH 9), και σε αυτό προστίθενται ο κατάλληλος

εκκινητής και συγκεκριμένη ποσότητα καθαρισμένου προϊόντος PCR (~50 ng). Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ανέρχεται στα 10μl.

Πίνακας 5: Η φθορίζουσα χρωστική και το χρώμα που αντιστοιχεί σε κάθε βάση DNA

Βάση	Φθορίζουσα χρωστική	Χρώμα
Αδείνη - A	dR6G	πράσινο
Θυμίνη - T	dTAMRA	κόκκινο
Γουανίνη - G	dR110	μαύρο
Κυτοσίνη - C	dROX	μπλε

Πίνακας 6: Στοιχειομετρία της αντίδρασης αλληλούχησης του DNA

Αντιδραστήριο	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
Ρυθμιστικό διάλυμα αλληλούχησης	2 μl	1x
Έτοιμο μίγμα αντίδρασης v.3.1	0,32 μl	-
Εκκινητής	0,5 μl	0.5 μM
Προϊόν PCR	0,8-1 μl	50 ng
H ₂ O	6,2 μl	-

Η αντίδραση αλληλούχησης πραγματοποιείται σε θερμοκυκλοποιητή Veriti με βάσει τις παρακάτω συνθήκες:

- ✓ 96°C για 5 min (1 κύκλος)
- ✓

{	96°C για 10 sec	}	25 κύκλοι
	50°C για 5 sec		
	60°C για 4 min		
- ✓ 8°C για ∞

1.7. Καθαρισμός των προϊόντων σε στήλη σεφαρόζης

Αντιδραστήρια:

- Sephadex™ G-50 (GE Healthcare)
- Αιθανόλη 100% (VWR Chemicals)
- Φορμαμίδιο (Hi-Di™ Formamide, Applied Biosystems)

Εξοπλισμός:

- Φυγόκεντρος (Thermo Scientific)
- Συσκευή ξηρής θέρμανσης (Accublock Digital dry-bath, Labnet International)

Εν συνεχεία, πραγματοποιείται ο καθαρισμός των προϊόντων της αντίδρασης αλληλούχησης σε στήλη σεφαρόζης (Sephadex™ G-50, GE Healthcare Life Sciences, Germany) με σκοπό την απομάκρυνση της περίσσειας των αντιδραστηρίων. Συγκεκριμένα, απομακρύνονται τα ddNTPs που δεν έχουν χρησιμοποιηθεί κατά την αντίδραση και ολιγονουκλεοτίδια μεγέθους έως και 20 ζεύγη βάσεων. Βάσει της μεθόδου της μοριακής διήθησης, τα μόρια που είναι μικρότερα από 20bp εγκλωβίζονται στις οπές του πορώδους υλικού (σεφαρόζη) που χρησιμοποιείται για την παρασκευή της στήλης και εκλούνται πιο αργά, ενώ τα μεγαλύτερα μόρια εκλούνται σε μικρότερους χρόνους.

Η κατασκευή της στήλης πραγματοποιείται με τοποθέτηση 1 ml διαλύματος Sephadex™ G-50 σε στήλες που έχουν τοποθετηθεί σε υποδοχείς όγκου 2 ml και φυγοκεντρούνται στα 4600 rpm για 2 λεπτά. Το έκλουσμα απορρίπτεται και η στήλη μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο τύπου erpendorf όγκου 1,5 ml, όπου εναποτίθεται ο συνολικός όγκος της αντίδρασης αλληλούχησης. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 4100 rpm για 2 λεπτά, όπου τα σημασμένα μόρια DNA εκλούνται από τη στήλη και συλλέγονται στο σωληνάριο τύπου erpendorf. Εν συνεχεία, στο έκλουσμα προστίθενται 50μL αιθανόλης 100% και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 12000 g για 10 min, όπου το DNA κατακρημνίζεται. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα στεγνώνει στους 75-80°C για ~3min, το οποίο, έπειτα, επαναδιαλύεται σε 20μL φορμαμιδίου (Hi-Di™ Formamide), που δρα ως αποδιατακτικός παράγοντας. Εν

τέλει, το καθαρισμένο δείγμα μπορεί να φορτωθεί στο γενετικό αναλυτή ή να αποθηκευθεί στους -20°C .

1.8 Γενετικός αναλυτής

Αντιδραστήρια:

- NanoPOP-7 (MCLAB)

Εξοπλισμός:

- Αυτόματος γενετικός αναλυτής, ABI PRISM 3130xl, Applied Biosystems
(**Εικόνα 6**)

Τα καθαρισμένα δείγματα τοποθετούνται σε πιάτο 96 θέσεων, το οποίο φορτώνεται στο γενετικό αναλυτή, και υποβάλλονται σε ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (NanoPOP-7). Ως εκ τούτου, πραγματοποιείται διαχωρισμός των μορίων DNA με βάση το μέγεθός τους. Μόλις εξέλθουν από τη διάταξη τριχοειδών, τα μόρια DNA διέρχονται από δέσμη laser και διεγείρονται οι φθορίζουσες ουσίες που συνοδεύουν έκαστο. Κάθε φθορίζουσα ουσία εκπέμπει σε διαφορετικό μήκος κύματος και με αυτόν τον τρόπο ταυτοποιείται το τελευταίο νουκλεοτίδιο κάθε μορίου DNA. Το μήκος κύματος της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας φθορισμού ανιχνεύεται από ειδική συσκευή (CCD camera). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων αλληλούχησης πραγματοποιείται με το λογισμικό πρόγραμμα Sequencing Analysis v5.2, όπου και προκύπτουν τα αντίστοιχα χρωματογραφήματα.



Εικόνα 6 : Αυτόματος γενετικός αναλυτής ABI PRISM 3130xl, Applied Biosystems

2. Ανίχνευση μεγάλων γονιδιακών αναδιατάξεων με PCR πολλαπλών εκκινήτων (multiplex PCR)

Για την ανίχνευση των μεγάλων γονιδιακών αναδιατάξεων που έχουν χαρακτηριστεί ιδρυτικές για τον Ελληνικό πληθυσμό (απαλοιφή του εξονίου 20 (c.5256_5277+3179del3200), απαλοιφή του εξονίου 24 (c.5468-285_5592+4019del4429_insCACAG) και απαλοιφή των εξονίων 23 και 24 (g.169527_180579del11052)) έχει σχεδιαστεί μία διαγνωστική αντίδραση PCR με χρήση πολλαπλών εκκινήτων (multiplex PCR), για την ταυτόχρονη ανίχνευση των τριών γονιδιακών αναδιατάξεων.

Πίνακας 7: Στοιχειομετρία της multiplex PCR

Master Mix:	Ποσότητα (μl)
Ρυθμιστικό διάλυμα	2,5
dNTPs	1,0
19Fneon_HM	0,65
20Rmut_HM	0,65
23Fmut_HM	0,30
24Rmut_HM	0,35
23Fwt_HM	0,25
23-24F_HM	0,30
23-24Rmut_HM	0,30
Ταq πολυμεράση	0,20
DNA	2,5 (50-80ng/μl)
H ₂ O	16,5
Σύνολο	25 μl

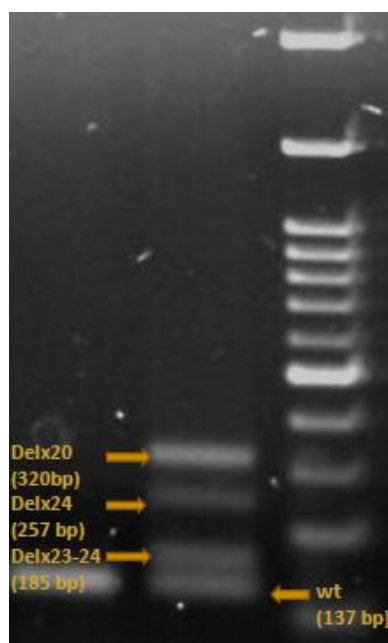
Η αντίδραση της multiplex PCR πραγματοποιείται σε θερμοκυκλοποιητή Veriti με τις ακόλουθες συνθήκες:



Πίνακας 8: Αλληλουχίες των εκκινητών της multiplex PCR

Εκκινητής	Αλληλουχία 5' → 3'
<i>BRCA1_19Fneon_HM</i>	CTG ATG GGT TGT GTT TGG TTT C
<i>BRCA1_20Rmut_HM</i>	TGG AGT GGA GCT GGT AGT GA
<i>BRCA1_23Fmut_HM</i>	GCT GAG CAA CAA GAG CAA GAC T
<i>BRCA1_23Fwt_HM</i>	GCA ACA CCA TCA CCT AGG AAT T
<i>BRCA1_24Rmut_HM</i>	GCC CCT TAC ACT AAG TCA TTT G
<i>BRCA1_23-24F_HM</i>	GAG AGA GAG AGA AAA GCT AGG T
<i>BRCA1_23-24Rmut_HM</i>	TAG AAG GTT TGG GCT TTG GTG

Μετά το πέρας της αντίδρασης, τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 2.5% και το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης έχει την εξής ενδεικτική εικόνα:



Εικόνα 7: Μεγέθη των τριών μεγάλων γονιδιακών αναδιατάξεων με βάση το μοριακό δείκτη (ladder 100bp) όπως απεικονίζονται σε πήκτωμα αγαρόζης 2.5% (delx20: απαλοιφή εξονίου 20, delx24: απαλοιφή εξονίου 24 και delx23-24: απαλοιφή εξονίων 23 και 24, wt: προϊόν αγρίου τύπου).

3. Ποσοτική PCR (real-time PCR)

Η PCR σε πραγματικό χρόνο (real-time PCR) αποτελεί βασική μέθοδο μοριακής βιολογίας με πολλές δυνατότητες και χρήσιμες εφαρμογές στη διαγνωστική, αλλά και στη βασική έρευνα. Πιο αναλυτικά, κύριες εφαρμογές της real-time PCR αποτελούν η ποσοτικοποίηση του γονιδίου-στόχου και η γονοτύπηση για την ανίχνευση μεταλλάξεων, η οποία πραγματοποιείται μέσω ανάλυσης του σημείου τήξης (T_m).

Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου βασίζεται στην εκπομπή και στην ανίχνευση φθορισμού μέσω χρήσης φθορίζουσών χρωστικών ουσιών που συνοδεύουν ειδικές αλληλουχίες και οι οποίες ονομάζονται ανιχνευτές (probes). Οι ανιχνευτές αποτελούν ολιγονουκλεοτίδια, τα οποία φέρουν μία φθορίζουσα ουσία και υβριδίζουν τη συμπληρωματική αλληλουχία του προϊόντος της PCR. Τα σήματα φθορισμού που μετρώνται καθ'όλη τη διάρκεια των κύκλων ενός πειράματος real-time PCR είναι ανάλογα του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζονται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος. Ωστόσο, για την εφαρμογή της ποσοτικής PCR και όπως ορίζει η αρχή λειτουργίας της PCR χρησιμοποιούνται δύο εκκινητές, καθένας από τους οποίους είναι συμπληρωματικός προς μια συγκεκριμένη αλληλουχία για κάθε μία από τις δύο αλυσίδες του DNA. Εν συνεχεία, η αλληλουχία των εκκινητών επιμηκύνεται μέσω του ενζύμου της DNA πολυμεράσης, με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή μεταγράφων της αλληλουχίας-στόχου. Οι εκκινητές επαναχρησιμοποιούνται πολλές φορές για την περαιτέρω ενίσχυση της συγκεκριμένης αλληλουχίας από τα ήδη υπάρχοντα μετάγραφα, με αποτέλεσμα την λογαριθμική αύξηση των μεταγράφων. Σε κάθε κύκλο της διαδικασίας ενίσχυσης, οι δύο κλώνοι του DNA αποδιατάσσονται μέσω αύξησης της θερμοκρασίας. Ακολουθεί μείωση της θερμοκρασίας για την πρόσδεση των εκκινητών και σύνθεση της αλληλουχίας μέσω της DNA πολυμεράσης.

Θα πρέπει να αναφερθεί ότι χρησιμοποιούνται διαφόρων τύπων ανιχνευτές ανάλογοι του πειραματικού σκοπού, οι οποίοι κατηγοριοποιούνται ως εξής:

- ανιχνευτές εξαρτώμενοι από την αλληλουχία-στόχο, όπως είναι οι ανιχνευτές υβριδισμού (hybridization probes) και οι ανιχνευτές Taqman.

- ανιχνευτές ανεξάρτητοι από την αλληλουχία-στόχο, οι οποίοι αλληλεπιδρούν με όλα τα δίκλινα μόρια DNA, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τη χρωστική SYBR Green I.

Στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής μελετήθηκε η μετάλλαξη p.Arg753Ter (c.2257C>T) του γονιδίου *PALB2*, η οποία εδράζεται στο εξόνιο 5, με τη μέθοδο της PCR σε πραγματικό χρόνο (Real-Time PCR) και με τη χρήση της χρωστικής SYBR green (KapaBiosystems, Wilmington, MA). Η ανάλυση διεξήχθη με τη χρήση του μηχανήματος CFX96 της Bio-Rad (Bio-Rad, USA). Η συγκέντρωση των εκκινητών (IDT, Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgium) που σχεδιάστηκαν για τη συγκεκριμένη μετάλλαξη ήταν στα 10 pmoI/μl και οι αλληλουχίες αυτών συνοψίζονται στον ακόλουθο Πίνακα 9.

Πίνακας 9: Αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση της real-time PCR για τη μελέτη της παραλλαγής p.Arg753Ter του γονιδίου *PALB2*.

p.Arg753Ter (c.2257C>T), <i>PALB2</i> (εξόνιο 5)	
Εκκινητές	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> Πρόσθιος εκκινητής 5'-GGC TCA AGC AAT TCT CTT AC-3' </div> <div style="width: 45%;"> Ανάστροφος εκκινητής 5'-GGT GTG CAG CAA GTT CA-3' </div> </div>

Το μίγμα της αντίδρασης περιέχει 5 μl master mix (KapaBiosystems, Wilmington, MA), 0,5 μl για κάθε εκκινητή και 3 μl H₂O, στο οποίο προστίθενται 1 μl DNA με τελικό όγκο 10 μl. Οι συνθήκες της αντίδρασης real-time PCR για τη μελέτη της μετάλλαξης p.Arg753Ter (c.2257C>T) του γονιδίου *PALB2* αναφέρονται ακολούθως:

- 95 °C για 3 min (1 κύκλος)
- $\left. \begin{array}{l} 95^{\circ}\text{C για 3 sec} \\ 60^{\circ}\text{C για 30 sec} \\ 72^{\circ}\text{C για 20 sec} \end{array} \right\} 40 \text{ κύκλοι}$
- $\left. \begin{array}{l} 95^{\circ}\text{C για 1 min} \\ 55^{\circ}\text{C για 30 sec} \\ 95^{\circ}\text{C για 30 sec} \end{array} \right\} 1 \text{ κύκλος}$

Επιπλέον, στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η μετάλλαξη ρ.(Val1833Met) του γονιδίου *BRCA1* με χρήση ανιχνευτών Taqman και της ανάλυσης διαχωρισμού αλληλομόρφων τελικού σημείου. Κάθε αντίδραση περιλαμβάνει ένα ζεύγος εκκινητών και δύο φθορίζοντες ανιχνευτές, που είναι σημασμένοι με δύο διακριτές φθορίζουσες χρωστικές, συγκεκριμένα τις FAM (G) και HEX (A), που επιτρέπουν τη γονοτύπηση των δύο αλληλομόρφων (μεταλλαγμένου και αγρίου τύπου) στην αλληλουχία-στόχο. Χρησιμοποιήθηκε το κιτ KAPA PROBE FAST Universal qPCR Master mix (KapaBiosystems, Wilmington, MA) και η αντίδραση διεξήχθη σε μηχάνημα CFX96 της Bio-Rad (BioRad, California, USA). Το μίγμα της αντίδρασης τελικού όγκου 10 μl περιείχε 5 μl master mix, 0,5 μl από κάθε εκκινητή, 0,25 μl από κάθε ανιχνευτή A και 2,50 μl H₂O, με προσθήκη 1 μl DNA. Οι συνθήκες της αντίδρασης real-time PCR για τη μελέτη της μετάλλαξης ρ.(Val1833Met) (c.5497G>A) του γονιδίου *BRCA1* παρουσιάζονται ακολούθως:

- 95°C για 3 min (1 κύκλος)
- 95°C για 3 sec και 60°C για 15 sec (40 κύκλοι)

Οι αλληλουχίες των εκκινητών και των ανιχνευτών που σχεδιάστηκαν για τη συγκεκριμένη μετάλλαξη συνοψίζονται στον ακόλουθο Πίνακα 10.

Πίνακας 10: Αλληλουχίες των εκκινητών και των ανιχνευτών που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση της real-time PCR για τη μελέτη της παραλλαγής ρ.(Val1833Met) του γονιδίου *BRCA1*.

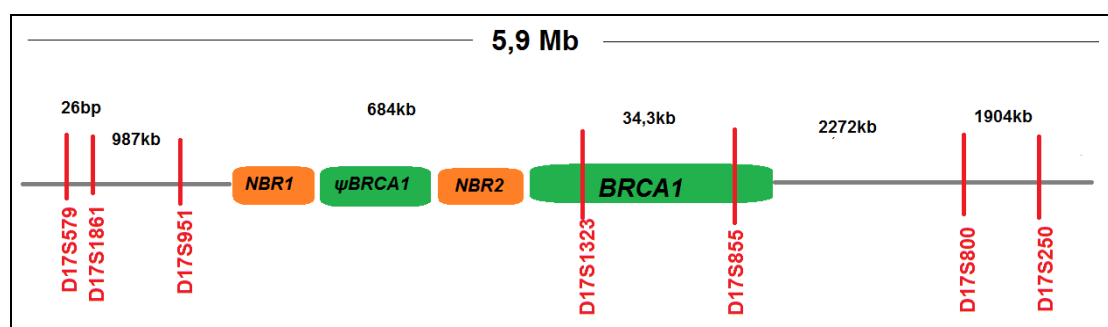
ρ.(Val1833Met) (c.5497G>A), <i>BRCA1</i> (εξόνιο 24)		
Εκκινητές	Πρόσθιος εκκινητής: 5'-CAA TTG GGC AGA TGT GTG-3' Tm=53,7 °C	Ανάστροφος εκκινητής: 5'-ATC TGG GGT ATC AGG TAG-3' Tm= 53,7 °C
Ανιχνευτές	Ως προς τη βάση G: 5'-FAM- CACCTGTG G TGACCCGAGAGT- BHQ1-3' Tm=63,7 °C	Ως προς τη βάση A: 5'-HEX- CACCTGTG A TGACCCGAGAGTG- BHQ1-3' Tm=64 °C

Η ανάλυση μετά το πέρας της αντίδρασης real-time PCR προσδιορίζει την ύπαρξη φυσιολογικού ομοζυγώτη (δείγματα που έχουν και τα δύο αλληλόμορφα

αγρίου-τύπου) ή ετεροζυγώτη (δείγματα που έχουν τόσο το αλληλόμορφο αγρίου τύπου όσο και το αλληλόμορφο που φέρει την υπό εξέταση παραλλαγή (p.Arg753Ter (*PALB2*) ή p.(Val1833Met) (*BRCA1*)). Το κατώφλι φθορισμού που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των τιμών Ct (κύκλος της real-time PCR κατά τον οποίο ο φθορισμός ξεπερνά το κατώφλι ανίχνευσης) προσαρμόζεται μέσω κανονικοποίησης του φθορισμού διορθωμένου από το βασικό επίπεδο (baseline). Η ανίχνευση ετεροζυγωτίας επιβεβαιώνεται μέσω αλληλούχησης κατά Sanger.

4. Ανάλυση απλοτύπου

Η ανάλυση απλοτύπου χρησιμοποιήθηκε για τη διερεύνηση ύπαρξης ιδρυτικής επίδρασης της παραλλαγής p.(Val1833Met) του γονιδίου *BRCA1*. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν πέντε πολυμορφικοί μικροδορυφορικοί δείκτες ανοδικά και καθοδικά του γονιδίου *BRCA1* (D17S951, D17S800, D17S250, D17S579 και D17S1861) και δύο δείκτες εντός του γονιδίου (D17S855 και D17S1323) καλύπτοντας μια περιοχή περίπου 5,9 Mb στο χρωμόσωμα 17. Οι δείκτες D17S855, D17S800, D17S250, D17S579 και D17S1323 ήταν σημασμένοι με φθορίζουσα χρωστική FAM, και είχαν εύρη μεγεθών 141-155 bp, 168-178 bp, 147-169 bp, 109-133 bp και 147-163 bp, αντίστοιχα, ο δείκτης D17S1861 ήταν σημασμένος με τη φθορίζουσα χρωστική HEX, που είχε εύρος μεγέθους 92-112 bp, ενώ ο δείκτης D17S951 ήταν σημασμένος με τη φθορίζουσα χρωστική TAMRA, που είχε εύρος μεγέθους 170-188 bp (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. Γενωμικός χάρτης με τη θέση των δεικτών μικροδορυφορικού DNA που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη συναρτήσει του γονιδίου *BRCA1*.

Η μέθοδος περιλαμβάνει τον πολλαπλασιασμό του κάθε δείκτη μέσω αντίδρασης PCR χρησιμοποιώντας 50 ng γενωμικού DNA από κάθε υπό εξέταση άτομο και φθορίζοντες εκκινητές. Χαρακτηριστικό των εκκινητών αυτών είναι ότι οι πρόσθιοι εκκινητές φέρουν μια φθορίζουσα χρωστική στο 5' άκρο τους (5'-HEX, 5'-6-FAM, 5'-TAMRA) κάτι που δεν ισχύει στους ανάστροφους εκκινητές. Τα φθορίζοντα προϊόντα PCR που προκύπτουν ηλεκτροφορούνται στο γενετικό αναλυτή ABI 3130xl (Applied Biosystems, CA, USA) με χρήση προτύπου GeneScan® size standard ROX-500 (Applied Biosystems, CA, USA). Τα δεδομένα αναλύονται μέσω λογισμικού GeneScan™ 3.1 (GeneMapper™). Η αρίθμηση των αλληλομόρφων πραγματοποιείται βάσει του μεγέθους της επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας μικροδορυφορικού DNA σε σχέση με την αρίθμηση που δίνεται από τη βάση δεδομένων Genome Database.

Πίνακας 11. Εκκινητές ενίσχυσης τμημάτων DNA που περιλαμβάνουν τις αλληλουχίες μικροδορυφορικού DNA.

δείκτης	τύπος επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας	πρόσθιος εκκινητής	ανάστροφος εκκινητής	μέγεθος προϊόντος PCR (bp)
D17S579	δινουκλεοτίδιο	FAM - AGTCCTGTAGACAAAACCTG	CAGTTTCATACCAAGTTCCT	109 - 133
D17S1861	δινουκλεοτίδιο	HEX - AGGGGACAGCAGTCTGTGA	ACATCATCCTGAAATCTAATGGG	92 - 112
D17S951	δινουκλεοτίδιο	TAMRA - GGCTCCCAACTGCTT	TCTACCCCGATGAGCCA	170 - 188
D17S1323	δινουκλεοτίδιο	FAM - TAGGAGATGGATTATTGGTG	AAGAACITTTGCAATGAGTG	147 - 163
D17S855	δινουκλεοτίδιο	FAM - GGATGGCCTTTTAGAAAGTGG	ACACAGACTTGTCTACTGCC	141 - 155
D17S800	δινουκλεοτίδιο	FAM - GGTCTCATCCATCAGTTTT	ATAGACTGTGTACTGGCATTGA	168 - 178
D17S250	δινουκλεοτίδιο	FAM - GGAAGAATCAAATAGACAAT	GCTGGCCATATATATATTTAAACC	147 - 169

Υπολογισμός της ηλικίας της παραλλαγής p.(Val1833Met) του γονιδίου BRCA1

Για τον προσδιορισμό της ηλικίας της παραλλαγής p.(Val1833Met) χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό DMLE2.2 (<http://www.dmle.org>). Το πρόγραμμα χρησιμοποιεί τη μέθοδο Markov Chain Monte Carlo, η οποία γενικά επιτρέπει την συμπερασματολογία κατά Bayesian της ηλικίας της παραλλαγής βάσει της

παρατηρούμενης ανισορροπίας στις γενεαλογικές σειρές σε μελετηθέντες γενετικούς δείκτες [234].

5. Αξιολόγηση της παθογονικότητας μέσω ανάλυσης συν-διαχωρισμού

Προκειμένου να αξιολογηθεί περαιτέρω η παθογονικότητα της παραλλαγής p.(Val1833Met), εφαρμόστηκε ο διαθέσιμος στο διαδικτυακό τόπο <http://www.msbi.nl/cosegregation> αλγόριθμος, κατά τη χρήση του οποίου απαιτούνται πληροφορίες μόνο για το φύλο, το γονότυπο, την τρέχουσα ηλικία και την ηλικία διάγνωσης καρκίνου μαστού ή/και ωοθηκών των ατόμων μιας οικογένειας που αναλύεται μέσω της μεθόδου του συν-διαχωρισμού (co-segregation analysis). Με κατάλληλη χρήση των προαναφερθέντων πληροφοριών είναι δυνατός ο υπολογισμός του λόγου πιθανοφανειών (likelihood ratios, LR) υπέρ ή κατά της αιτιότητας της παραλλαγής.

6. Ανάλυση 94 γονιδίων με τη μέθοδο της αλληλούχησης νέας γενιάς (Trusight Rapid Capture)

Ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών υποβλήθηκαν σε έλεγχο με στόχο την ταυτοποίηση μεταλλάξεων σε 94 γονίδια με εφαρμογή του γονιδιακού πάνελ, Trusight Rapid Capture (Illumina, San Diego, USA). Η μέθοδος περιλαμβάνει αρχικά τον κατακερματισμό και τη σήμανση του DNA με το ένζυμο τρανσποζάση (Nextera transposome). Ακολουθεί ενίσχυση μέσω PCR με χρήση ειδικών αλληλουχιών (index1 και index2). Στη συνέχεια, με τη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων καθαρίζονται οι προκύπτουσες βιβλιοθήκες και πραγματοποιούνται δύο υβριδισμοί με τη χρήση ανιχνευτών πρόσδεσης (capture probes). Και στις δύο περιπτώσεις, ακολουθεί η δέσμευση των ανιχνευτών σε σφαιρίδια στρεπταβιδίνης. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται ενίσχυση των βιβλιοθηκών μέσω PCR και ο τελικός καθαρισμός αυτών.

Επόμενο βήμα αποτελεί η ποσοτική και ποιοτική αξιολόγηση των καθαρισμένων και ενισχυμένων βιβλιοθηκών. Η ποσοτικοποίηση των βιβλιοθηκών

πραγματοποιείται μέσω φθορομετρικής μεθόδου με χρήση του φθορομέτρου Quantus (Quantus™ Fluorometer, Promega) για ανίχνευση φθορισμού υψηλής ευαισθησίας. Εφαρμόζοντας το πρωτόκολλο Quantifluor ONE dsDNA System, το φθορόμετρο μετρά τα δίκλινα μόρια του DNA (dsDNA), αποφεύγοντας τις μη ακριβείς μετρήσεις λόγω επιμόλυνσης με μονόκλινα μόρια DNA, RNA και πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα, το QuantiFluor® dsDNA System (Promega) περιέχει μια φθορίζουσα χρωστική η οποία προσδένεται στο DNA (504nm_{Διέγερσης}/531nm_{Εκπομπής}) που καθιστά δυνατή την ποσοτικοποίηση μικρών ποσοτήτων μορίων δίκλωνου DNA σε ένα καθαρισμένο δείγμα.

Εκτός από τη φθορομετρική μέθοδο, για την ακριβέστερη αξιολόγηση των βιβλιοθηκών διεξάγεται η ανάλυση των θραυσμάτων των βιβλιοθηκών τόσο ποσοτικά όσο και ποιοτικά. Η ανάλυση πραγματοποιείται στο μηχάνημα Fragment Analyzer (Advanced Analytical, AATI, **Εικόνα 9**) και επιτρέπει την ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδική διάταξη (12-Capillary Array Cartridge, 50 μm (ID), 33 cm (EFF)) ελάχιστης ποσότητας γενωμικής βιβλιοθήκης (2-4 μl). Τα τριχοειδή περιέχουν μια μήτρα πηκτώματος διαχωρισμού στην οποία έχει εγχυθεί μια φθορίζουσα χρωστική παρεμβολής που πληρώνει τα τριχοειδή πριν από κάθε πειραματική ανάλυση. Κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης, στο κάθε δείγμα τα θραύσματα νουκλεϊκών οξέων μεταναστεύουν και διαχωρίζονται με βάση το μέγεθός τους, αλληλεπιδρώντας με τη φθορίζουσα χρωστική κατά μήκος της διαδρομής. Καθώς τα διαχωρισμένα θραύσματα διέρχονται από το παράθυρο ανίχνευσης, η χρωστική που έχει προσδεθεί στα μόρια νουκλεϊκών οξέων διεγείρεται από μια πηγή συνεχούς φωτός, παράγοντας εκπομπή φθορισμού που ανιχνεύεται από έναν ευαίσθητο ανιχνευτή CCD. Ο χρόνος που απαιτείται για τη διέλευση από το παράθυρο ανίχνευσης υποδηλώνει το μέγεθος των θραυσμάτων και το σήμα σχετικής εκπομπής παρέχει τη συγκέντρωση των νουκλεϊκών οξέων μετά από σύγκριση με βαθμονομημένο μοριακό δείκτη (ladder).



Εικόνα 9: Fragment Analyzer (Advanced Analytical, AATI)

Με βάση τα αποτελέσματα των ποσοτικών και ποιοτικών αναλύσεων, οι βιβλιοθήκες NGS αποδιατάσσονται και αραιώνονται καταλλήλως, ενώ ταυτόχρονα προετοιμάζεται μέσω αποδιάταξης και αραιώσης η βιβλιοθήκη για τον βακτηριοφάγο PhiX, που λειτουργεί ως εσωτερικός μάρτυρας της αλληλούχησης που θα πραγματοποιηθεί στη συνέχεια. Εν τέλει, οι υπό εξέταση βιβλιοθήκες συνενώνονται με τη βιβλιοθήκη του PhiX, φορτώνονται σε έναν ενιαίο περιέκτη αντιδραστηρίων (reagent cartridge), ο οποίος τοποθετείται στον αναλυτή επόμενης γενιάς, MiSeq (Illumina, San Diego, USA) (**Εικόνα 12**) προς ανάλυση. Επιπλέον, στον αναλυτή εισάγεται μια κυψέλη ροής (flow-cell), που αποτελείται από ένα μονής χρήσης γυάλινο υπόστρωμα πάνω στο οποίο πραγματοποιείται η παραγωγή δεσμίδων των νουκλεϊκών οξέων (cluster generation) και η αντίδραση της αλληλούχησης.

Κατά τη διάρκεια της παραγωγής των δεσμίδων, τα μόρια μονόκλωνου DNA προσδένονται στην επιφάνεια του flow-cell και πολλαπλασιάζονται μέσω δημιουργίας γεφυρών (bridge amplification) που οδηγούν στον τελικό σχηματισμό των δεσμίδων. Κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου αλληλούχησης, ένα σημασμένο δεοξυνουκλεοτίδιο προστίθεται στην αλυσίδα των νουκλεϊκών οξέων. Η νουκλεοτιδική σήμανση λειτουργεί ως τερματιστής του πολυμερισμού, έτσι ώστε μετά από κάθε ενσωμάτωση δεοξυνουκλεοτιδίου, η φθορίζουσα χρωστική οπτικοποιείται για την ταυτοποίηση της βάσης και στη συνέχεια αποκόπτεται ενζυμικά για να επιτραπεί η ενσωμάτωση του επόμενου νουκλεοτιδίου (Sequencing

by Synthesis, SBS). Η διεργασία αυτή επαναλαμβάνεται για κάθε κύκλο αλληλούχησης. Η ταυτοποίηση των βάσεων (base calling) πραγματοποιείται απευθείας κατά τις μετρήσεις της έντασης του σήματος σε κάθε κύκλο. Ως εκ τούτου, μετά την ανάλυση των εικόνων, το λογισμικό πραγματοποιεί ταυτοποίηση, διαλογή και βαθμολόγηση της ποιότητας των βάσεων.

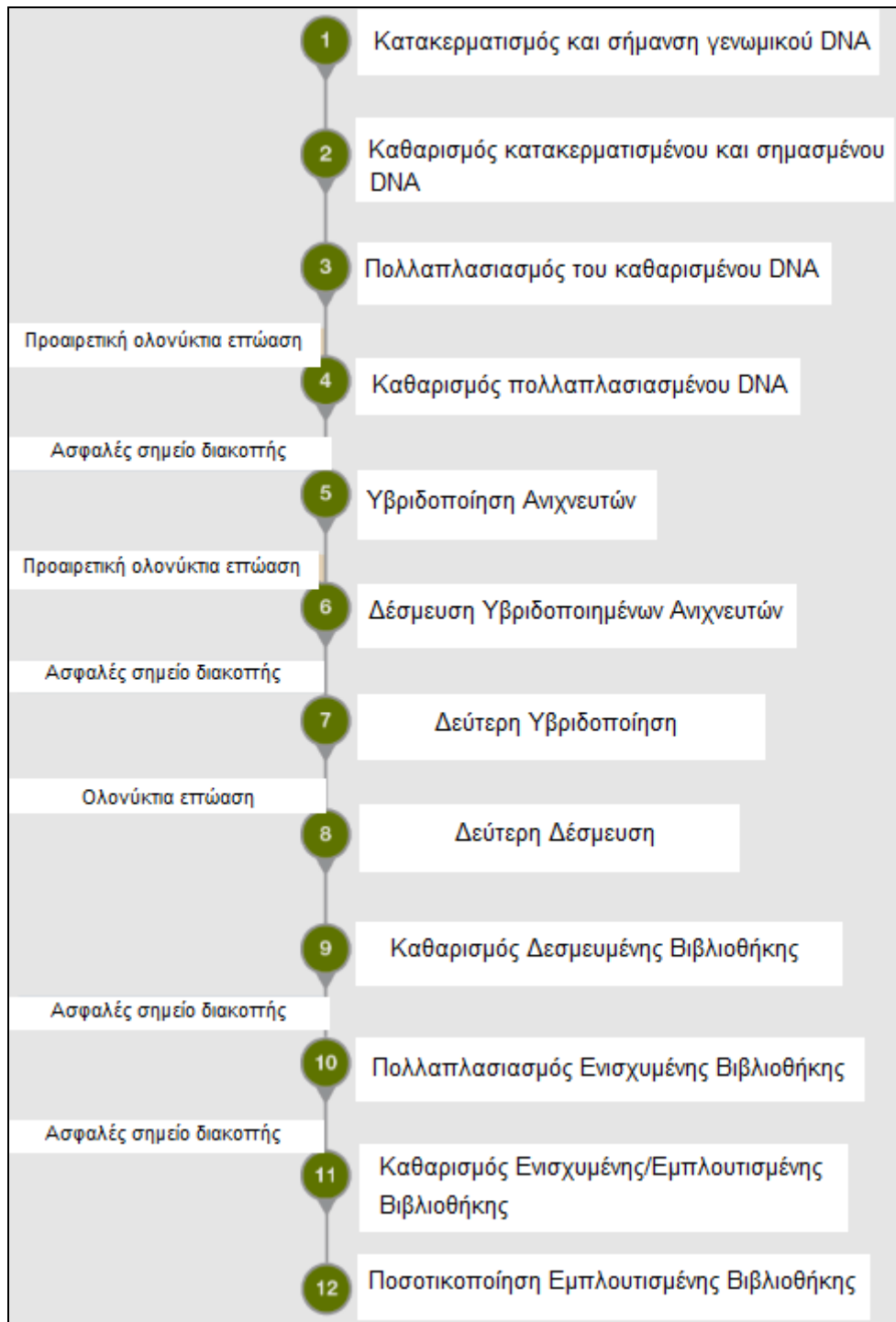
Εν συνεχεία, πραγματοποιείται δευτερογενής βιοπληροφορική ανάλυση, που περιλαμβάνει την αντιστοίχιση των αναγνωσμένων αλληλουχιών με την αλληλουχία του γονιδιώματος αναφοράς (alignment) και την ταυτοποίηση των γενετικών παραλλαγών (variant calling). Μέσω βάσεων δεδομένων και βιβλιογραφικών αναφορών συγκεντρώνονται όλες οι απαραίτητες πληροφορίες για την κατηγοριοποίηση των παραλλαγών αυτών ως προς την παθογένειά τους (variant annotation). Η αξιολόγηση των ευρημάτων πραγματοποιείται με βάση τον τύπο της παραλλαγής (παρανοηματικές, μη νοηματικές μεταλλάξεις, μεταλλάξεις σε θέσεις ματίσματος) και με βάση τη συχνότητα εμφάνισής τους. Συγκεκριμένα, εάν MAF (minor allele frequency) >1% αυτό σημαίνει μεγάλη συχνότητα του ευρήματος στον πληθυσμό και, ως επί το πλείστον, δεν αξιολογείται κλινικά. Για ευρήματα αγνώστου κλινικής σημασίας (VUS), είναι χρήσιμη η εφαρμογή *in silico* προγραμμάτων τα οποία προβλέπουν την επίπτωση των παραλλαγών αυτών στη δομή και τη λειτουργία της πρωτεΐνης.

Πίνακας 12: Συγκεντρωτική λίστα των 94 γονιδίων (Πίνακας 12α) και των 284 NPSs (Πίνακας 12β) που σχετίζονται με προδιάθεση στον καρκίνο, τα οποία ελέγχονται με το γονιδιακό πάνελ Trusight Cancer panel της Illumina.

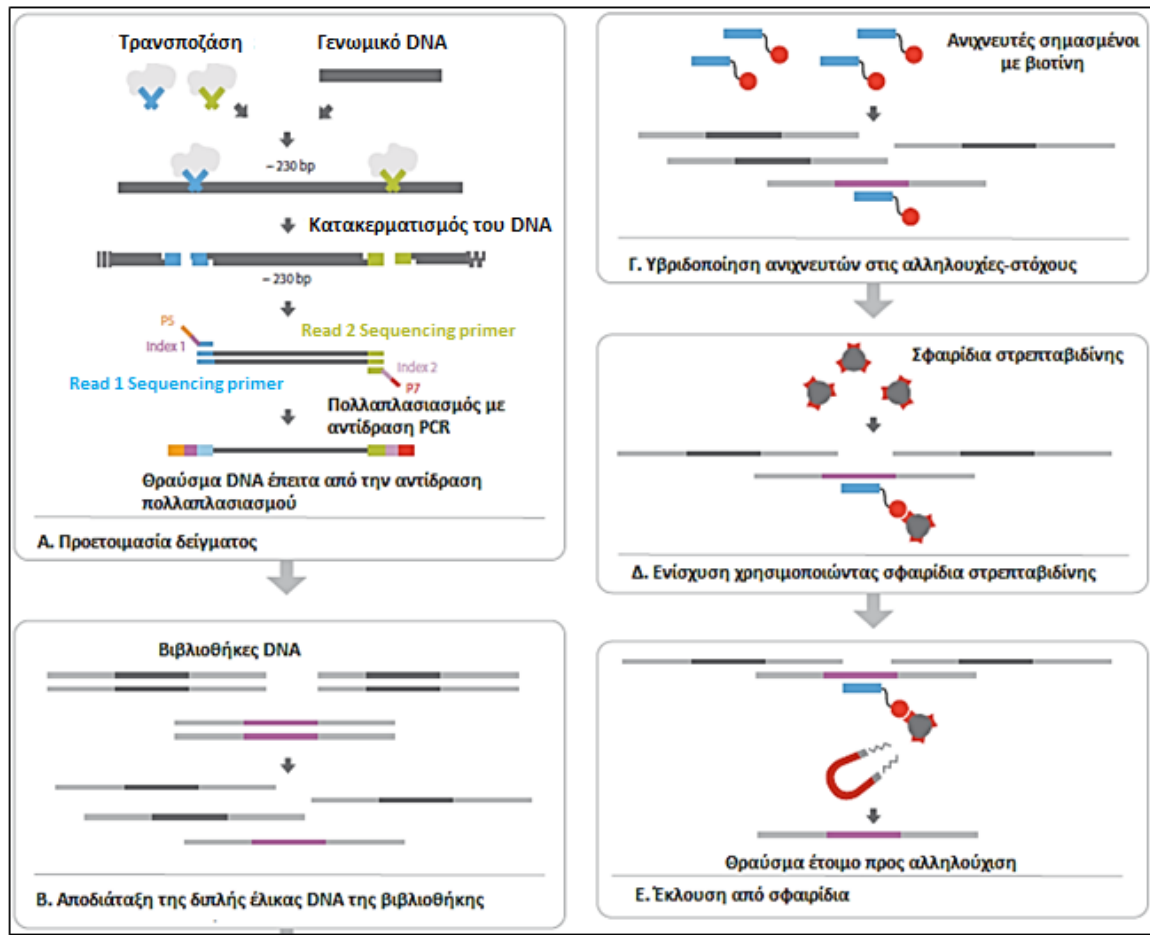
Πίνακας 12α									
<i>AIP</i>	<i>BUB1B</i>	<i>DDB2</i>	<i>EXT2</i>	<i>FANCL</i>	<i>MEN1</i>	<i>PALB2</i>	<i>RB1</i>	<i>SLX4</i>	<i>WRN</i>
<i>ALK</i>	<i>CDC73</i>	<i>DICER1</i>	<i>EZH2</i>	<i>FANCM</i>	<i>MET</i>	<i>PHOX2B</i>	<i>RECQL4</i>	<i>SMAD4</i>	<i>WT1</i>
<i>APC</i>	<i>CDH1</i>	<i>DIS3L2</i>	<i>FANCA</i>	<i>FH</i>	<i>MLH1</i>	<i>PMS1</i>	<i>RET</i>	<i>SMARCB1</i>	<i>XPA</i>
<i>ATM</i>	<i>CDK4</i>	<i>EGFR</i>	<i>FANCB</i>	<i>FLCN</i>	<i>MSH2</i>	<i>PMS2</i>	<i>RHBDF2</i>	<i>STK11</i>	<i>XPC</i>
<i>BAP1</i>	<i>CDKN1C</i>	<i>EPCAM</i>	<i>FANCC</i>	<i>GATA2</i>	<i>MSH6</i>	<i>PRF1</i>	<i>RUNX1</i>	<i>SUFU</i>	
<i>BLM</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>ERCC2</i>	<i>FANCD2</i>	<i>GPC3</i>	<i>MUTYH</i>	<i>PRKAR1A</i>	<i>SBDS</i>	<i>TMEM127</i>	
<i>BMPR1A</i>	<i>CEBPA</i>	<i>ERCC3</i>	<i>FANCE</i>	<i>HNF1A</i>	<i>NBN</i>	<i>PTCH1</i>	<i>SDHAF2</i>	<i>TP53</i>	
<i>BRCA1</i>	<i>CEP57</i>	<i>ERCC4</i>	<i>FANCF</i>	<i>HRAS</i>	<i>NF1</i>	<i>PTEN</i>	<i>SDHB</i>	<i>TSC1</i>	
<i>BRCA2</i>	<i>CHEK2</i>	<i>ERCC5</i>	<i>FANCG</i>	<i>KIT</i>	<i>NF2</i>	<i>RAD51C</i>	<i>SDHC</i>	<i>TSC2</i>	
<i>BRIP1</i>	<i>CYLD</i>	<i>EXT1</i>	<i>FANCI</i>	<i>MAX</i>	<i>NSD1</i>	<i>RAD51D</i>	<i>SDHD</i>	<i>VHL</i>	

Πίνακας 12β

rs17401966	rs1052501	rs401681	rs9268542	rs16901979	rs865686	rs10896449	rs9543325	rs4939827	rs5934683
rs9430161	rs2660753	rs31489	rs6903608	rs2456449	rs505922	rs7130881	rs7335046	rs8170	rs2283873
rs7538876	rs9284813	rs12653946	rs2395185	rs16902094	rs10795668	rs7105934	rs944289	rs8102137	rs807624
rs11249433	rs17181170	rs2255280	rs2858870	rs445114	rs11012732	rs614367	rs116909374	rs10411210	rs1027643
rs7412746	rs9841504	rs13361707	rs674313	rs13281615	rs3123078	rs1393350	rs4444235	rs8102476	rs3755132
rs3790844	rs10934853	rs2121875	rs28421666	rs1562430	rs10993994	rs1801516	rs4779584	rs11083846	rs790356
rs6691170	rs6763931	rs4415084	rs2647012	rs10505477	rs10821936	rs3802842	rs4924410	rs2735839	rs5955543
rs6687758	rs6774494	rs889312	rs10484561	rs6983267	rs7089424	rs498872	rs4775302	rs961253	rs10974944
rs801114	rs10936599	rs10052657	rs9275572	rs7014346	rs10822013	rs735665	rs8030672	rs910873	rs1210110
rs1465618	rs10936632	rs20541	rs210138	rs1447295	rs10995190	rs2900333	rs7176508	rs4925386	rs7555566
rs7579899	rs4488809	rs4624820	rs10484761	rs4242382	rs224278	rs718314	rs8034191	rs6010620	rs1364054
rs1432295	rs10937405	rs10058728	rs339331	rs4242384	rs704010	rs10875943	rs1051730	rs4809324	rs6734275
rs721048	rs17505102	rs872071	rs2180341	rs7837688	rs3765524	rs11169552	rs8042374	rs372883	rs7584993
rs10187424	rs710521	rs12210050	rs9485372	rs9642880	rs2274223	rs902774	rs3803662	rs2014300	rs17272796
rs17483466	rs2131877	rs4712653	rs2046210	rs2019960	rs3781264	rs995030	rs4784227	rs45430	rs1155741
rs12621278	rs798766	rs6939340	rs651164	rs10088218	rs17119461	rs3782181	rs3112612	rs1547374	rs161792
rs2072590	rs1494961	rs4324798	rs9364554	rs891835	rs12413624	rs4474514	rs9929218	rs738722	rs11940551
rs13016963	rs12500426	rs29232	rs7758229	rs4295627	rs11199874	rs11066015	rs391525	rs36600	rs9293511
rs13393577	rs17021918	rs3129055	rs4487645	rs2294008	rs2981579	rs671	rs258322	rs2284063	rs9352613
rs3768716	rs1229984	rs2860580	rs11978267	rs7040024	rs2981575	rs4767364	rs1805007	rs1014971	rs685449
rs6435862	rs971074	rs2517713	rs4132601	rs755383	rs1219648	rs2074356	rs4785763	rs5759167	rs7808249
rs13387042	rs7679673	rs6457327	rs6465657	rs3814113	rs2981582	rs11066280	rs4795519	rs5768709	rs1106334
rs966423	rs10069690	rs130067	rs1495741	rs7023329	rs3817198	rs4765623	rs4430796	rs1327301	rs149617956
rs13397985	rs2242652	rs2894207	rs1512268	rs2157719	rs7127900	rs1572072	rs7501939	rs5945572	rs138213197
rs7584330	rs2736100	rs2596542	rs2439302	rs1412829	rs110419	rs9510787	rs7210100	rs5945619	
rs2292884	rs2853676	rs2248462	rs16892766	rs1011970	rs1945213	rs753955	rs1859962	rs5919432	
rs757978	rs4635969	rs3117582	rs1016343	rs4977756	rs11228565	rs9600079	rs17674580	rs1321311	
rs4973768	rs4975616	rs204999	rs1456315	rs965513	rs7931342	rs9573163	rs7238033	rs3824999	
rs4793172	rs242076	rs6603251	rs11655512	rs1528601	rs4775699	rs4905366	rs9572094	rs11017876	



Εικόνα 10: Ροή διεργασιών κατά την προετοιμασία των βιβλιοθηκών NGS



Εικόνα 11: Τα βήματα της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιώντας το πολυγονιδιακό πάνελ «TruSight Cancer Panel»



Εικόνα 12: Αναλυτής επόμενης γενεάς, MiSeq (Illumina, San Diego, USA)

B. ΟΜΑΔΕΣ ΑΣΘΕΝΩΝ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή αποτελείται από τέσσερις διακριτές υπομελέτες ασθενών με διάγνωση καρκίνου μαστού ή/και ωθηκών. Η επιλογή των ασθενών που υποβλήθηκαν σε γονιδιακό έλεγχο διεξήχθη σύμφωνα με τα διεθνώς αναγνωρισμένα κριτήρια του National Comprehensive Cancer Network (NCCN) (<http://www.nccn.org>) [2]. Ακολουθως, παρουσιάζονται λεπτομερώς οι ομάδες των υπό μελέτη ασθενών με τα αντίστοιχα κλινικά χαρακτηριστικά για το ατομικό και οικογενειακό ιστορικό τους.

1. Ανίχνευση μεταλλάξεων στα γονίδια BRCA1 & BRCA2 σε ασθενείς με καρκίνο μαστού ή/και ωθηκών με οικογενειακό ιστορικό ή/και νεαρή ηλικία διάγνωσης (≤45 έτη) με τη συμβατική μέθοδο αλληλούχησης κατά Sanger

Στην παρούσα υπομελέτη εντάχθηκαν 50 ασθενείς με διαγνώσεις καρκίνου μαστού/ ωθηκών είτε λόγω νεαρής ηλικίας διάγνωσης είτε παρουσίας πολλαπλών περιστατικών καρκίνου μαστού/ωθηκών στην οικογένεια. Πιο αναλυτικά, 44 ασθενείς έχουν διαγνωστεί με καρκίνο του μαστού με μέση ηλικία διάγνωσης τα 43,2±6,4 έτη, 5 έχουν διαγνωστεί με καρκίνο των ωθηκών με μέση ηλικία διάγνωσης τα 54,2±11,9 έτη και μία ασθενής έχει διαγνωστεί με καρκίνο μαστού και καρκίνο ωθηκών στα 53 και 63 έτη, αντίστοιχα. Από τις 44 διαθέσιμες ιστολογικές εκθέσεις για τις διαγνώσεις καρκίνου του μαστού, η πλειονότητα (77%· 34/44) αφορά στον διηθητικό πορογενή ιστολογικό υπότυπο, ενώ ακολουθούν 3 λοβιακά καρκινώματα, ένα μυελοειδές, ένα σωληνοειδές, ένα μικτό (πορογενές/λοβιακό) και 4 μη διηθητικά πορογενή καρκινώματα (DCIS). Επιπλέον, παρατηρείται ότι οι 10 διαγνώσεις καρκίνου του μαστού (23%· 10/44) αφορούν σε τριπλά αρνητικό καρκίνο μαστού. Καταγράφοντας τις διαγνώσεις καρκίνου των ωθηκών, συμπεραίνεται ότι το σύνολο αυτών αφορά σε υψηλόβαθμα ορώδη ωθηκικά καρκινώματα. Αναφορικά με την παρουσία οικογενειακού ιστορικού, η πλειονότητα των ασθενών με καρκίνο του μαστού (75%· 33/44) αναφέρει οικογενειακό ιστορικό καρκίνου μαστού ή/και ωθηκών. Ομοίως, οι 4 από τις 5 ασθενείς με καρκίνο των

ωοθηκών (80%· 4/5) δηλώνουν οικογενειακό ιστορικό καρκίνου μαστού ή/και ωοθηκών, με τις 2 εξ αυτών να αναφέρουν ιστορικό μόνο καρκίνου των ωοθηκών.

2. Διερεύνηση της συχνότητας και του ιδρυτικού φαινομένου της παραλλαγής p.(Val1833Met) του γονιδίου BRCA1

Για τη διεξαγωγή της συγκεκριμένης υπομελέτης αναλύθηκαν 3389 Ελληνίδες ασθενείς με καρκίνο μαστού ή/και ωοθηκών, ορίζοντας τρεις διακριτές ομάδες ασθενών. Πιο αναλυτικά, στη μελέτη εντάχθηκαν 2397 ασθενείς με καρκίνο του μαστού, 882 ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών και 110 ασθενείς με καρκίνο μαστού και ωοθηκών. Η μέση ηλικία διάγνωσης ήταν τα 46.7 ± 11.0 έτη (εύρος: 19-84 έτη) και τα 53.6 ± 11.6 έτη (εύρος: 17-87 έτη) για τη διάγνωση καρκίνου μαστού και καρκίνου των ωοθηκών, αντίστοιχα. Επιπλέον, εξετάστηκαν 1558 Ελληνίδες γυναίκες αντίστοιχης ηλικίας οι οποίες δεν είχαν διαγνωστεί με καμίας μορφής κακοήθεια (ομάδα μαρτύρων). Για την ανάλυση της παραλλαγής χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλληλούχησης κατά Sanger, καθώς και η τεχνική της PCR σε πραγματικό χρόνο (Real-Time PCR). Για την εφαρμογή της μεθόδου της Real-Time PCR χρησιμοποιήθηκαν ανιχνευτές Taqman και πραγματοποιήθηκε ανάλυση διαχωρισμού αλληλομόρφων τελικού σημείου με τη χρήση του μηχανήματος CFX96 της Bio-Rad (Bio-Rad, USA).

Η διερεύνηση ύπαρξης ιδρυτικής επίδρασης για την παραλλαγή p.(Val1833Met) πραγματοποιήθηκε μέσω ανάλυσης απλοτύπου με τη χρήση πολυμορφικών μικροδορυφόρων. Συνολικά αναλύθηκαν 41 άτομα που έφεραν την παραλλαγή p.(Val1833Met), οι οποίοι προήλθαν από 26 μη-συγγενείς οικογένειες. Επιπρόσθετα, ελέγχθηκαν 14 συγγενείς των παραπάνω ατόμων που δεν είχαν την παραλλαγή, καθώς και 40 ανεξάρτητα άτομα χωρίς διάγνωση καρκίνου που όριζαν την ομάδα μαρτύρων.

3. Διερεύνηση της μετάλλαξης p.Arg753Ter του γονιδίου PALB2, σε Ελληνίδες ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών ανεξαρτήτως ηλικίας διάγνωσης και οικογενειακού ιστορικού

Για τη μελέτη της μη νοηματικής μετάλλαξης p.Arg753Ter (c.2257C>T), η οποία εδράζεται στο εξόνιο 5 του γονιδίου PALB2, σε Ελληνίδες ασθενείς με επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών, αναλύθηκαν 885 ασθενείς ανεξαρτήτως ηλικίας εμφάνισης και οικογενειακού ιστορικού που ήταν αρνητικές για μεταλλάξεις στα γονίδια BRCA1/2. Η μέση ηλικία διάγνωσης καρκίνου των ωοθηκών στην υπό μελέτη ομάδα ήταν τα 52,3±14,9 έτη (εύρος:23-78 έτη) και η πλειονότητα των ιστοπαθολογιών αφορούσε στον υψηλόβαθμο ορώδη υπότυπο.

4. Ανάλυση 94 γονιδίων σε 285 ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών με το γονιδιακό πάνελ Trusight Cancer panel

Με τη χρήση του γονιδιακού πάνελ Trusight Cancer panel αναλύθηκαν 285 ασθενείς με επιθηλιακό καρκίνο ωοθηκών για 94 γονίδια ανεξαρτήτως ηλικίας διάγνωσης και οικογενειακού ιστορικού και εξαιρώντας τα βλενώδη ωοθηκικά καρκινώματα, επιλεγμένες με βάση τα κριτήρια NCCN [2]. Οι ασθενείς αυτές εντάχθηκαν στο πρωτόκολλο του γονιδιακού πάνελ αφού προηγουμένως είχαν βρεθεί αρνητικές στον έλεγχο για τυχόν ύπαρξη μίας εκ των γνωστών έξι ιδρυτικών και επανεμφανιζόμενων μεταλλάξεων του γονιδίου BRCA1 στον Ελληνικό πληθυσμό. Η μέση ηλικία διάγνωσης καρκίνου των ωοθηκών των υπό μελέτη ασθενών ήταν τα 53,2 ±12,1 έτη (εύρος:20-80 έτη). Διαθέσιμα δεδομένα για το οικογενειακό ιστορικό των ασθενών υπάρχουν για 278 από τις 285 ασθενείς, όπου υπολογίζεται ότι το 54,7% (152/278) είχαν οικογενειακό ιστορικό κακοηθειών. Πιο αναλυτικά, 70 ασθενείς έχουν οικογενειακό ιστορικό καρκίνου μαστού, 14 ασθενείς με ιστορικό καρκίνου ωοθηκών, 23 ασθενείς με ιστορικό καρκίνων μαστού και ωοθηκών, 15 ασθενείς με ιστορικό καρκίνου παχέος εντέρου, 16 ασθενείς με ιστορικό καρκίνων μαστού και παχέος εντέρου, 9 ασθενείς με ιστορικό καρκίνων ωοθηκών και παχέος εντέρου, 2 ασθενείς με ιστορικό καρκίνου ενδομητρίου, 2 ασθενείς με ιστορικό καρκίνου μαστού και ενδομητρίου, μία ασθενής με ιστορικό καρκίνων μαστού, ωοθηκών και παχέος εντέρου, ενώ 126 (45,3%· 126/278)

ασθενείς δεν αναφέρουν ιστορικό κακοηθειών στην οικογένειά τους. Αναφορικά με το ατομικό ιστορικό των 285 υπό μελέτη ασθενών, το 13% (37/285) αυτών έχει εμφανίσει δεύτερο πρωτοπαθή καρκίνο. Συγκεκριμένα, το 9,8% (28/285) των ασθενών, εκτός από καρκίνο ωθηκών, έχει εμφανίσει και πρωτοπαθή καρκίνο μαστού, το 2,1% (6/285) έχει διαγνωστεί και με πρωτοπαθή καρκίνο ενδομητρίου, στο 0,7% (2/285) έχει διαγνωστεί και πρωτοπαθής καρκίνος παγκρέατος, ενώ μία ασθενής (0,4%· 1/285) έχει εμφανίσει και πρωτοπαθή καρκίνο παχέος εντέρου.

Όσον αφορά στην ιστοπαθολογία των διαγνώσεων καρκίνου των ωθηκών, για τις 268 από τις συνολικά 285 διαγνώσεις υπάρχουν διαθέσιμες ιστοπαθολογικές εκθέσεις. Παρατηρείται ότι την πλειονότητα των ιστολογιών καταλαμβάνουν τα ορώδη ωθηκικά καρκινώματα (79,5%· 213/268), όπου τα 192 από τα 213 αφορούν σε υψηλόβαθμα ορώδη καρκινώματα, τα 6 από τα 213 αντιστοιχούν σε χαμηλόβαθμα ορώδη καρκινώματα, ενώ τα εναπομείναντα 15 είναι αγνώστου βαθμού κακοήθειας ορώδη καρκινώματα. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το 4,1% των συνολικών διαθέσιμων ιστοπαθολογιών αφορά σε ορώδη καρκινώματα οριακής κακοήθειας (11/268). Το 9% (24/268) των διαγνώσεων αντιστοιχεί στα ενδομητριοειδή ωθηκικά καρκινώματα, το 2,2% (6/268) στα διαυγοκυτταρικά ωθηκικά καρκινώματα, το 4,5% (12/268) στα μικτά ωθηκικά καρκινώματα (4 ορώδη/ ενδομητριοειδή, 3 ορώδη/ διαυγοκυτταρικά, 3 ενδομητριοειδή/ διαυγοκυτταρικά και 2 ορώδη/ενδομητριοειδή/διαυγοκυτταρικά), ενώ το 0,7% (2/268) αντιστοιχεί σε αποδιαφοροποιημένα ωθηκικά καρκινώματα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

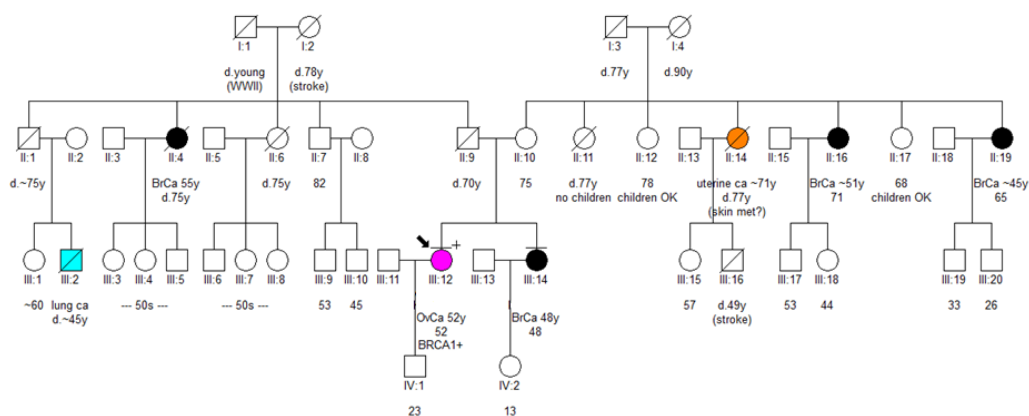
1. Ανίχνευση μεταλλάξεων στα γονίδια BRCA1 & BRCA2 σε ασθενείς με καρκίνο μαστού ή/και ωθηκών με οικογενειακό ιστορικό ή/και νεαρή ηλικία διάγνωσης (≤ 45 έτη) με τη συμβατική μέθοδο αλληλούχησης κατά Sanger

Αρχικός άξονας της παρούσας διατριβής αποτέλεσε ο έλεγχος ασθενών με καρκίνο μαστού ή/και ωθηκών για την ανίχνευση μεταλλάξεων στα γονίδια BRCA1 και BRCA2 με τη συμβατική μέθοδο αλληλούχησης κατά τον πρώτο χρόνο της διατριβής, πριν την εγκατάσταση του εξοπλισμού για αλληλούχηση επόμενης γενεάς στο εργαστήριο. Η επιλογή των ασθενών που υποβλήθηκαν σε γονιδιακό έλεγχο διεξήχθη σύμφωνα με τα διεθνώς αναγνωρισμένα κριτήρια του National Comprehensive Cancer Network (NCCN) (<http://www.nccn.org>) [2].

Η ομάδα των υπό μελέτη ασθενών αποτελείται από 50 ασθενείς, εκ των οποίων 44 έχουν διαγνωστεί με καρκίνο του μαστού με μέση ηλικία διάγνωσης τα $43,2 \pm 6,4$ έτη, 5 έχουν διαγνωστεί με καρκίνο των ωθηκών με μέση ηλικία διάγνωσης τα $54,2 \pm 11,9$ έτη και μία ασθενής έχει διαγνωστεί με καρκίνο μαστού και καρκίνο ωθηκών στα 53 και 63 έτη, αντίστοιχα. Διαθέσιμα δεδομένα ιστολογικών εκθέσεων υπάρχουν για τις 44 από τις 45 συνολικές διαγνώσεις καρκίνου του μαστού, με την πλειονότητα αυτών (77%· 34/44) να αντιπροσωπεύεται από τον διηθητικό πορογενή ιστολογικό υπότυπο, ενώ ακολουθούν 3 λοβιακά καρκινώματα, ένα μυελοειδές, ένα σωληνοειδές, ένα μικτό (πορογενές/λοβιακό) και 4 μη διηθητικά πορογενή καρκινώματα (DCIS). Επιπλέον, από τις 44 διαθέσιμες ιστοπαθολογίες παρατηρείται ότι οι 10 (23%· 10/44) αφορούν σε τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού. Αναφορικά με τις ιστολογικές εκθέσεις για τις διαγνώσεις καρκίνου των ωθηκών, το σύνολο αυτών αφορά σε υψηλόβαθμα ορώδη ωθηκικά καρκινώματα. Η πλειονότητα των ασθενών με καρκίνο του μαστού (75%· 33/44) αναφέρει οικογενειακό ιστορικό καρκίνου μαστού ή/και ωθηκών. Ομοίως, οι 4 από τις 5 ασθενείς με καρκίνο των ωθηκών (80%· 4/5) δηλώνουν οικογενειακό ιστορικό καρκίνου μαστού ή/και ωθηκών, με τις 2 εξ αυτών να έχουν ιστορικό

μόνο καρκίνου των ωθηκών. Αναλυτικά τα δεδομένα για το ατομικό και οικογενειακό ιστορικό των ασθενών, καθώς και για την ιστοπαθολογία των διαγνώσεων συνοψίζονται στον Πίνακα 13.

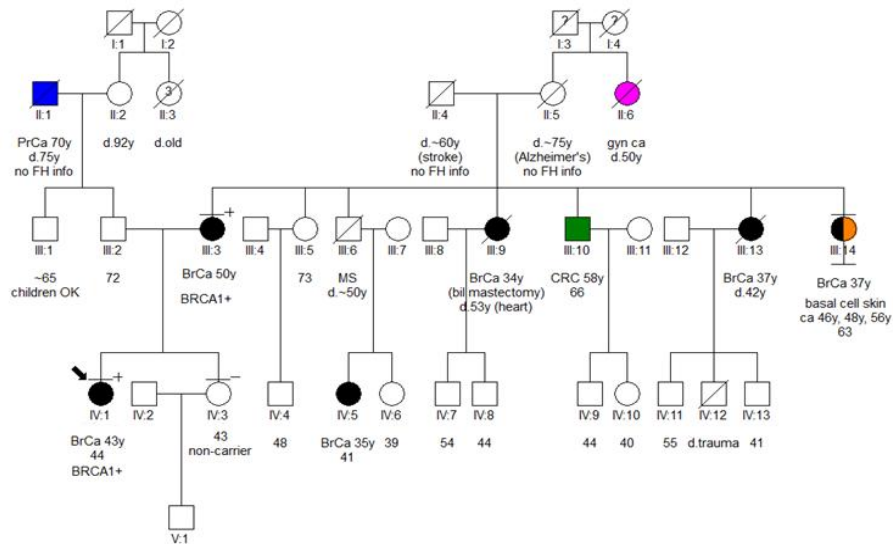
Η ανάλυση των ασθενών ξεκίνησε με τον αρχικό έλεγχο για την ύπαρξη ιδρυτικών και επανεμφανιζόμενων μεταλλάξεων του γονιδίου *BRCA1* στον Ελληνικό πληθυσμό. Οι 3 από τις 50 ασθενείς (6%: 3/50) βρέθηκαν να φέρουν μία εκ των ιδρυτικών και επανεμφανιζόμενων μεταλλάξεων. Συγκεκριμένα, στην ασθενή #2292, η οποία είχε διαγνωστεί με υψηλόβαθμο ορώδες καρκίνωμα των ωθηκών στην ηλικία των 52 ετών, ανιχνεύθηκε η πλαισιοτροποποιητική μετάλλαξη c.5382insC στο εξόνιο 20 του γονιδίου *BRCA1*. Στο οικογενειακό ιστορικό της ασθενούς παρατηρούνται 4 περιστατικά καρκίνου του μαστού, δύο εκ των οποίων σε ηλικία μικρότερη των 50 ετών. Το αναλυτικό γενεαλογικό δέντρο της ασθενούς #2292 απεικονίζεται στην Εικόνα 13.



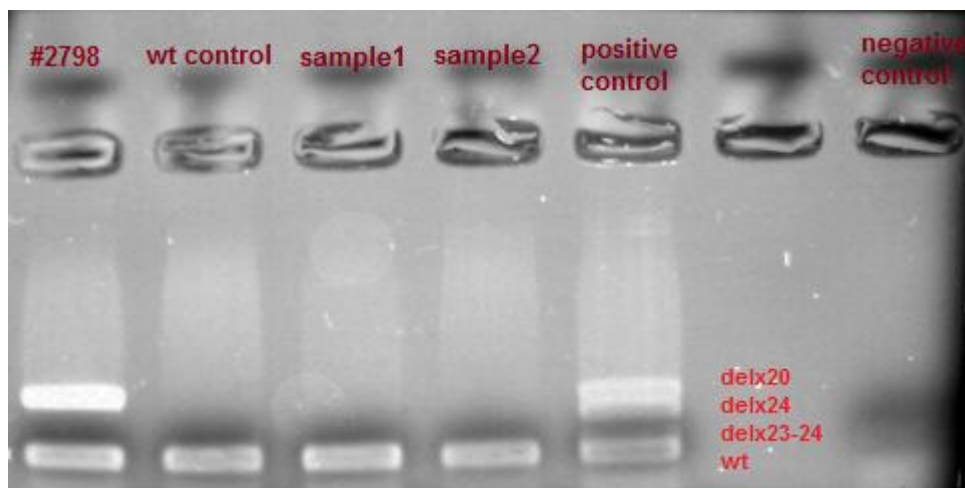
Εικόνα 13. Γενεαλογικό δέντρο της οικογένειας της ασθενούς #2292 στην οποία ανιχνεύτηκε η μετάλλαξη c.5382insC, η οποία εδράζεται στο εξόνιο 20 του γονιδίου *BRCA1*.

Στην ασθενή #2798, η οποία διαγνώστηκε με τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού σε ηλικία 43 ετών, ανιχνεύθηκε μέσω multiplex PCR (Εικόνα 15) η μεγάλη γονιδιακή αναδιάταξη del3.2KbEx20 που αφορά στην απαλοιφή 3,2 Kb στο εξόνιο 20 του γονιδίου *BRCA1*, η οποία είναι ιδρυτική για τον Ελληνικό πληθυσμό. Η συγκεκριμένη ασθενής αναφέρει πέντε περιστατικά καρκίνου του μαστού μητρικής

πλευράς, εκ των οποίων τα τέσσερα έχουν διαγνωστεί σε ηλικία μικρότερη των 40 ετών. Μετά από γονοτύπηση της μητέρας της ασθενούς, η οποία έχει διαγνωστεί με καρκίνο του μαστού σε ηλικία 50 ετών, επιβεβαιώθηκε το μοτίβο μητρικής κληρονομησης της μετάλλαξης αυτής στη συγκεκριμένη οικογένεια. Στην ακόλουθη Εικόνα 14 απεικονίζεται το γενεαλογικό δέντρο της ασθενούς #2798.

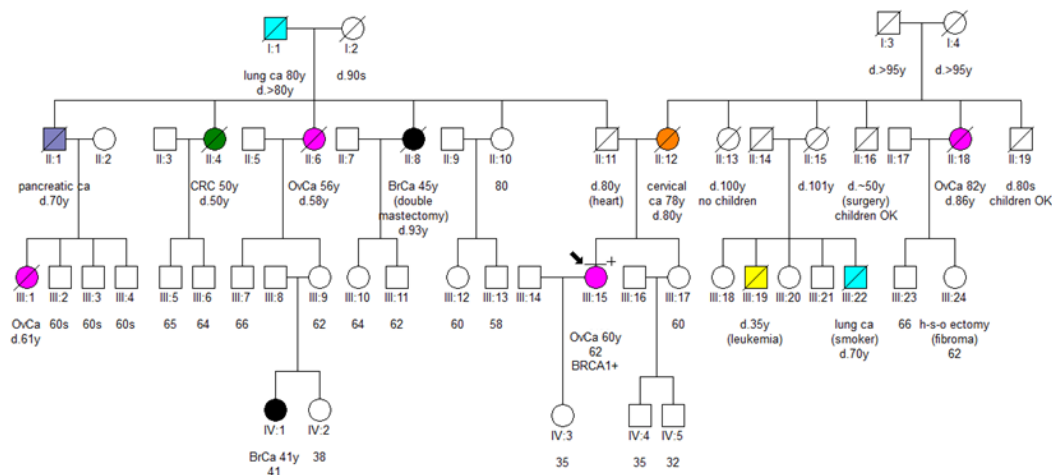


Εικόνα 14. Γενεαλογικό δέντρο της οικογένειας της ασθενούς #2798 στην οποία ανιχνεύτηκε η γονιδιακή αναδιάταξη del3.2KbEx20 του εξονίου 20 του γονιδίου *BRCA1*.

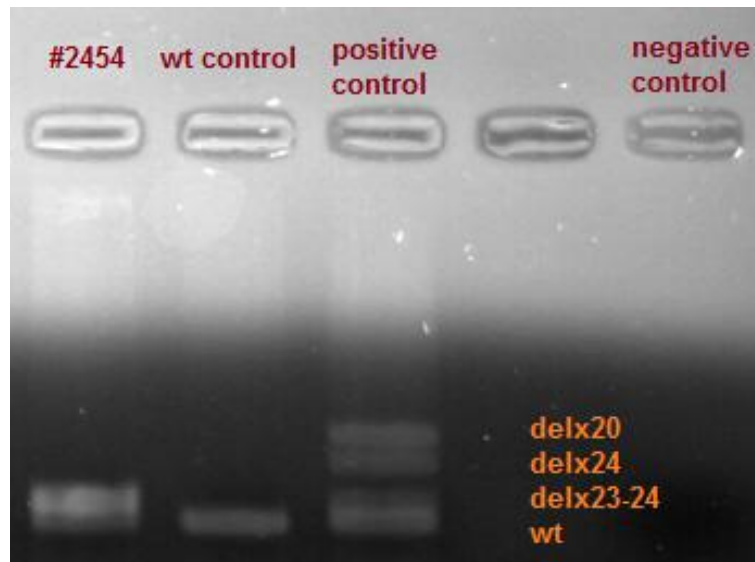


Εικόνα 15: Ανίχνευση της απαλοιφής του εξονίου 20 του γονιδίου *BRCA1* στην ασθενή #2798 μέσω multiplex PCR.

Στην ασθενή #2454, η οποία διαγνώστηκε με υψηλόβαθμο ορώδες καρκίνωμα των ωθηκών σε ηλικία 60 ετών, ανιχνεύθηκε μέσω multiplex PCR (Εικόνα 17) η μεγάλη γονιδιακή αναδιάταξη που αφορά στην απαλοιφή των εξονίων 23 και 24 του γονιδίου *BRCA1* (g.169527_180579del11052), μια μετάλλαξη ιδρυτική για τον Ελληνικό πληθυσμό. Το οικογενειακό ιστορικό της ασθενούς περιλαμβάνει δύο διαγνώσεις καρκίνου του μαστού σε ηλικία μικρότερη των 45 ετών και τρεις διαγνώσεις καρκίνου των ωθηκών. Παρατηρώντας το γενεαλογικό δέντρο της ασθενούς (Εικόνα 16), μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η μετάλλαξη αυτή πιθανόν να προέρχεται από την πατρική πλευρά, λόγω των τεσσάρων περιστατικών καρκίνου σε νέες ηλικίες (41-61 ετών) σε αυτή την πλευρά.

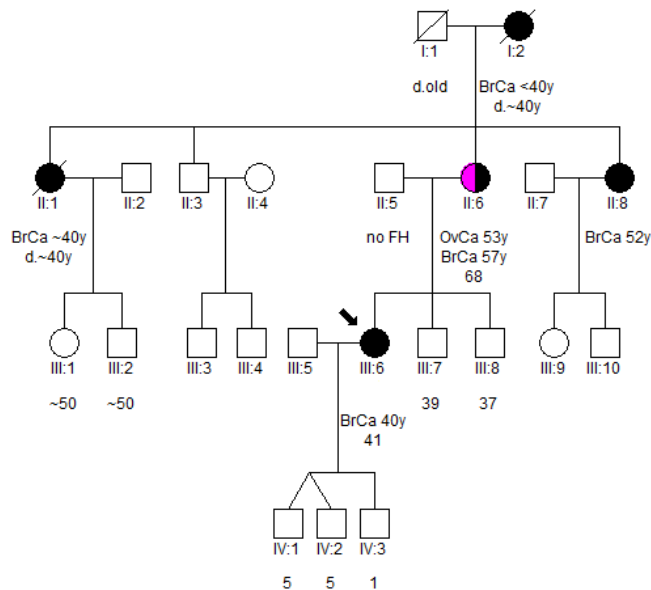


Εικόνα 16. Γενεαλογικό δέντρο της οικογένειας της ασθενούς #2454 στην οποία ανιχνεύτηκε η απαλοιφή των εξονίων 23 και 24 (g.169527_180579del11052) του γονιδίου *BRCA1*.



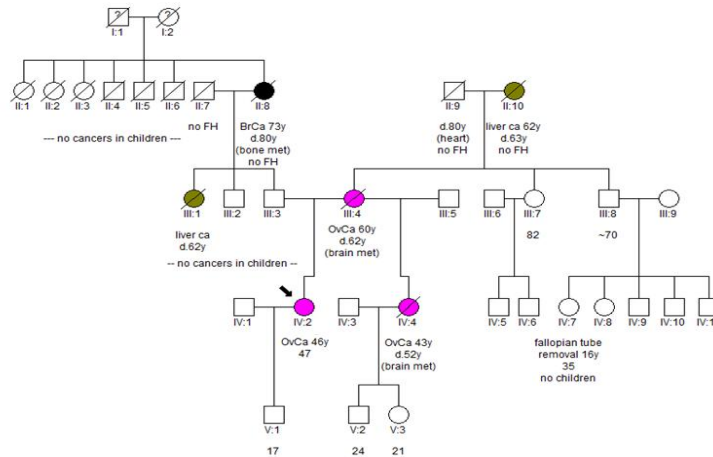
Εικόνα 17: Ανίχνευση της απαλοιφής των εξονίων 23 και 24 του γονιδίου *BRCA1* στην ασθενή #2454 μέσω multiplex PCR.

Στις υπόλοιπες 47 ασθενείς συνεχίστηκε ο έλεγχος με πλήρη αλληλούχηση των γονιδίων *BRCA1/2*, όπου στις 3 εξ αυτών ανιχνεύθηκαν σαφώς παθογόνοι μεταλλάξεις στα γονίδια αυτά, δύο μεταλλάξεις στο γονίδιο *BRCA1* και μία στο γονίδιο *BRCA2*. Πιο αναλυτικά, στην ασθενή #1719, η οποία διαγνώστηκε με διηθητικό πορογενές, τριπλά αρνητικό καρκίνωμα μαστού στην ηλικία των 40 ετών, εντοπίστηκε η μη νοσηματική μετάλλαξη p.Arg1203Ter (c.3607C>T), που εδράζεται στο εξόνιο 11 του γονιδίου *BRCA1*. Αξιοσημείωτο είναι το οικογενειακό ιστορικό της ασθενούς (Εικόνα 18), όπου παρατηρούνται δύο πρωτοπαθείς καρκίνοι στη μητέρα της, ωθηκών και μαστού, αντίστοιχα, και άλλοι τρεις καρκίνοι μαστού μητρικής πλευράς, δύο εκ των οποίων σε ηλικία μικρότερη των 45 ετών. Τα παραπάνω στοιχεία συνηγορούν υπέρ της κληρονόμησης της μετάλλαξης από τη μητέρα της ασθενούς.



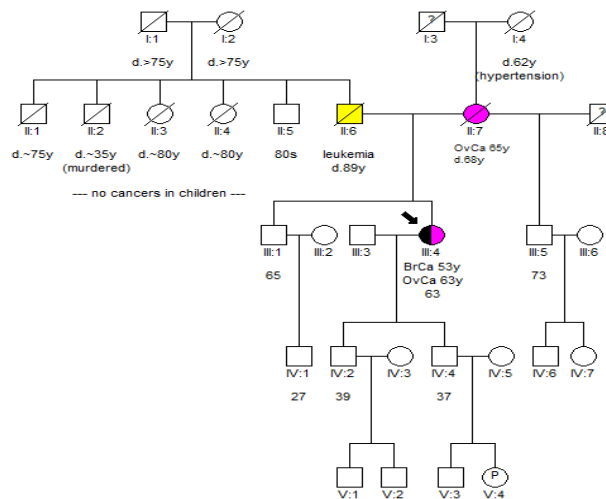
Εικόνα 18: Γενεαλογικό δέντρο της οικογένειας της ασθενούς #1719 στην οποία ανιχνεύτηκε η μετάλλαξη c.3607C>T, η οποία εδράζεται στο εξόνιο 11 του γονιδίου *BRCA1*.

Επιπλέον, στην ασθενή #1899 ανιχνεύθηκε η πλαισιοτροποποιητική μετάλλαξη p.Val1234GlnfsTer8 (c.3700_3704delGTAAA), η οποία εδράζεται στο εξόνιο 11 του γονιδίου *BRCA1*. Η ασθενής που φέρει την εν λόγω μετάλλαξη, της οποίας το γενεαλογικό δέντρο φαίνεται στην Εικόνα 19, διαγνώστηκε με αμφοτερόπλευρο υψηλόβαθμο ορώδες καρκίνωμα των ωθηκών σε ηλικία 46 ετών. Πιο συγκεκριμένα, το καρκίνωμα είχε διηθήσει το επίπλουν, το μεσεντέριο, τη μήτρα και το ορθοσιγμοειδές, ενώ υπήρχαν και τρεις διηθημένοι λεμφαδένες. Στο οικογενειακό ιστορικό της εξεταζόμενης αναφέρονται δύο περιστατικά καρκίνου των ωθηκών που αφορούν στη μητέρα της ασθενούς, η οποία νόσησε σε ηλικία 60 ετών, και στην ετεροθαλή αδελφή της ασθενούς, η οποία νόσησε σε ηλικία 43 ετών. Επιπλέον, καταγράφεται ένα περιστατικό καρκίνου του μαστού από την πατρική πλευρά, που αφορά στη μητέρα του πατέρα της ασθενούς, η οποία νόσησε σε ηλικία 73 ετών. Συνεπώς, συμπεραίνεται ότι η ασθενής #1899 πιθανόν έχει κληρονομήσει τη μετάλλαξη από τη μητέρα της.



Εικόνα 19: Γενεαλογικό δέντρο της οικογένειας της ασθενούς #1899 στην οποία ανιχνεύτηκε η μετάλλαξη c.3700_3704delGTAAA, η οποία εδράζεται στο εξόνιο 11 του γονιδίου *BRCA1*.

Αντιστοίχως, μία σαφώς παθογόνος μετάλλαξη, η μη νοηματική αλλαγή p.Ser1882Ter (c.5645C>A), η οποία εδράζεται στο εξόνιο 11 του γονιδίου *BRCA2*, ανιχνεύθηκε στην ασθενή #2046, η οποία διαγνώστηκε με τριπλά αρνητικό καρκίνο μαστού σε ηλικία 53 ετών και πρωτοπαθές υψηλόβαθμο ορώδες καρκίνωμα των ωοθηκών σε ηλικία 63 ετών. Ακολούθως, παρατίθεται το γενεαλογικό δέντρο της ασθενούς (Εικόνα 20), όπου παρατηρείται ένα ακόμα περιστατικό καρκίνου των ωοθηκών. Συγκεκριμένα, η μητέρα της ασθενούς νόσησε από καρκίνο των ωοθηκών σε ηλικία 65 ετών και απεβίωσε τρία χρόνια μετά τη διάγνωση, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ασθενής #2046 πιθανώς κληρονόμησε τη μετάλλαξη αυτή από τη μητέρα της.



Εικόνα 20: Γενεαλογικό δέντρο της οικογένειας της ασθενούς #2046 στην οποία ανιχνεύτηκε η μετάλλαξη p.Ser1882Ter (c.5645C>A), η οποία εδράζεται στο εξόνιο 11 του γονιδίου *BRCA2*.

Συνοψίζοντας, το 12% των υπό μελέτη ασθενών (12%: 6/50) με καρκίνο μαστού ή/και ωθηκών έφεραν σαφώς παθογόνο μετάλλαξη στα γονίδια *BRCA1/2*. Από τις έξι αυτές ασθενείς, οι τρεις είχαν διαγνωστεί με καρκίνο των ωθηκών, οι δύο με καρκίνο του μαστού και μία με καρκίνο μαστού και ωθηκών. Συνολικά, το 4,5% (2/44) των περιστατικών καρκίνων του μαστού έφερε παθογόνους μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1/2*, το 60% (3/5) των περιστατικών με καρκίνο των ωθηκών έφερε μεταλλάξεις στα γονίδια αυτά, ενώ η μοναδική ασθενής της μελέτης με καρκίνο μαστού και ωθηκών έφερε, ομοίως, παθογόνο μετάλλαξη. Οι 3 από τις 5 ασθενείς (60%: 3/5) στις οποίες ανιχνεύθηκε μετάλλαξη στο γονίδιο *BRCA1* έφεραν μία εκ των ιδρυτικών για τον Ελληνικό πληθυσμό μεταλλάξεων. Αξίζει να αναφερθεί ότι το 30% (3/10) των περιστατικών τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού βρέθηκε να φέρει παθογόνο μετάλλαξη στα γονίδια *BRCA1/2*, συγκεκριμένα δύο ασθενείς στο *BRCA1* και μία ασθενής στο *BRCA2*. Επιπλέον, δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά στη μέση ηλικία διάγνωσης μεταξύ της υπό μελέτη ομάδας ασθενών με καρκίνο μαστού ($n=45, 43,2\pm 6,4$) και των ασθενών με παθογόνο μετάλλαξη και καρκίνο μαστού ($n=3, 42\pm 10,1$) ($p=0.7619, 95\% \text{ CI } [-9.1, -6.7]$), παρόλο που η μέση ηλικία διάγνωσης καρκίνου του μαστού στις θετικές σε

μετάλλαξη ασθενείς είναι ελαφρώς μικρότερη. Η απουσία της στατιστικής σημαντικότητας μπορεί να αποδοθεί και στην εμφανή αριθμητική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων (n=45 vs n=3).

Αντίθετα, η μέση ηλικία διάγνωσης στις ασθενείς με καρκίνο των ωθηκών που φέρουν παθολογικό μετάλλαξη στα γονίδια *BRCA1/2* είναι ελαφρώς μεγαλύτερη (n=6, 55,3±7,7) συγκριτικά με τη μέση ηλικία διάγνωσης όλων των υπό μελέτη ασθενών με καρκίνο των ωθηκών (n=4, 54,2±11,9), χωρίς, ωστόσο, η διαφορά αυτή να είναι στατιστικά σημαντική (p=0.8754, 95% CI [-14.5, -16.7]).

Πίνακας 13. Δεδομένα ατομικού και οικογενειακού ιστορικού 50 υπό μελέτη ασθενών, καθώς και της ιστοπαθολογίας των διαγνώσεών τους (BrCa=καρκίνος μαστού, OvCa=καρκίνος ωθηκών).

A/A	ΑΤΟΜΙΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ	ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ
1645	BrCa 46y (πορογενές διηθητικό grade I, ER+(100%), PR+(30%), HER2-(1+), 0/16 LN+)	1 BrCa	Αρνητικό <i>BRCA1/2</i>
1662	BrCa 42y (πολυεστιακό μικτό (λοβιακό/πορογενές) grade II & DCIS-LCIS, 0/23 LN+, ER+(80%), PR+(70%), HER2-(0), Ki67:20%)	ελεύθερο	Αρνητικό <i>BRCA1/2</i>
1671	BrCa 48y (πορογενές διηθητικό NOS grade II, 0/18 LN+, ER+(70%), PR+(75%), HER2-)	2 BrCa <50y	Αρνητικό <i>BRCA1/2</i>
1681	BrCa 42y (πορογενές διηθητικό grade II, 1/2 LN+, ER+(80-90%), PR+(15-20%), HER2-(1+))	1 BrCa <50y	Αρνητικό <i>BRCA1/2</i>
1712	BrCa 46y (πορογενές διηθητικό grade II, ER+(70%), PR+(70%), HER2-(0), Ki67:20%)	1 BrCa <50y	Αρνητικό <i>BRCA1/2</i>
1719	BrCa 40y (πορογενές διηθητικό grade III, 1sn/39 LN+, basal-like/ <u>TNBC</u> : ER-(0%), PR-(1%), HER2:2+(FISH-), Ki67:40%)	4 BrCa (2 BrCa <50y) & 1 OvCa	<i>BRCA1 c.3607C>T, p.Arg1203Ter</i>
1722	BrCa 31y (πορογενές διηθητικό NOS grade II, 4/16 LN+, ER+(80%), PR+(15%), HER2:1-2+, Ki67:25%)	1 BrCa	Αρνητικό <i>BRCA1/2</i>
1727	BrCa 30y (μυελοειδές grade III & DCIS comedo grade III, 1sLN, <u>TNBC</u> , Ki67:40%)	1 BrCa <50y	Αρνητικό <i>BRCA1/2</i>
1730	BrCa 59y (DCIS grade II-III με μικροδιήθηση, 0/5 LN+, ER+++ PR+++ HER2-(1+))	1 BrCa <25y	Αρνητικό <i>BRCA1/2</i>
1737	BrCa 32y (διηθητικό πορογενές NOS grade II, & in situ, 0/22 LN+, ER+, PR+)	3 BrCa (1 BrCa <50y)	Αρνητικό <i>BRCA1/2</i>
1738	BrCa 40y (διηθητικό πορογενές NOS grade III & DCIS, ER+, PR+, HER2+(3+), Ki67:40%, p53<10%)	1 BrCa	Αρνητικό <i>BRCA1/2</i>
1739	BrCa 46y (διηθητικό λοβιακό grade II, 1/39 LN+, ER+(90%), PR+(99%), HER2-(FISH), Ki67:5%)	1 BrCa <50y	Αρνητικό <i>BRCA1/2</i>

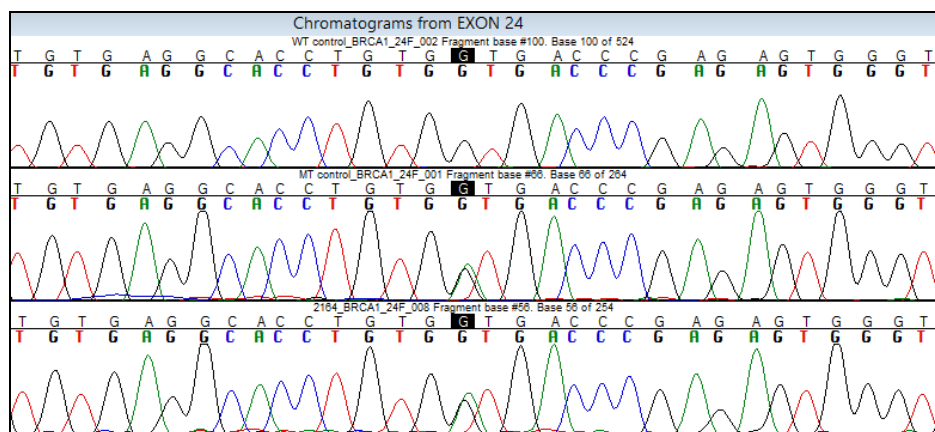
1780	BrCa 33y (DCIS comedo grade III, ER+(95%), PR+(30%), HER2+(3+), Ki67:30%, p53:90%)	ελεύθερο	Αρνητικό <i>BRCA1/2</i>
1781	BrCa 33y (διηθητικό πορογενές grade III, 1/19 LN+, ER-(0%), PR-(0%), HER2+(3+), Ki67:40%)	ελεύθερο	Αρνητικό <i>BRCA1/2</i>
1783	BrCa 44y (διηθητικό σωληνώδες grade I, 0/4 LN+, ER+(80%), PR+(70%), HER2-(1+), Ki67:10%, p53:20%)	2 BrCa (1 BrCa <45y)	Αρνητικό <i>BRCA1/2</i>
1786	BrCa 43y (DCIS grade I-II με μικροδιήθηση, grade I, 0/2 LN+, ER+(90%), PR+(95%) HER2-(0), Ki67:4%)	1 BrCa <50y	Αρνητικό <i>BRCA1/2</i>
1787	BrCa 44y (διηθητικό πορογενές NOS grade II-III, ER+(90%), PR+(40%), HER2+(3+), Ki67:20%)	1 BrCa <50y	Αρνητικό <i>BRCA1/2</i>
1798	BrCa 45y (διηθητικό λοβιακό & in situ, 0/2 LN+, ER+(40%), PR-(0%), HER2+, Ki67:5%, p53-)	1 BrCa <50y	Αρνητικό <i>BRCA1/2</i>
1806	BrCa 47y (διηθητικό πορογενές grade I, 2/13 LN+, ER+, PR+, HER2+)	1 BrCa & 1 OvCa	Αρνητικό <i>BRCA1/2</i>
1807	OvCa 36y (ορώδες grade III, στάδιο IIIc)	ελεύθερο	Αρνητικό <i>BRCA1/2</i>
1808	BrCa 39y (διηθητικό πορογενές NOS grade II, 0/10 LN+, <u>TNBC</u> : ER:0%, PR:0%, HER2:1+, Ki67:8%)	1 BrCa <40y	Αρνητικό <i>BRCA1/2</i>
1811	BrCa 43y (διηθητικό πορογενές NOS grade I, ER+(75%), PR+(85%), HER2-(1+), Ki67:15%, p53-)	ελεύθερο	Αρνητικό <i>BRCA1/2</i>
1813	BrCa 37y (διηθητικό πορογενές NOS grade III, <u>TNBC</u> : ER:0%, PR:0%, HER2:0, Ki67:60%, p53+(100%))	ελεύθερο	Αρνητικό <i>BRCA1/2</i>
1820	BrCa 47y (πολυεστιακό DCIS grade III, 0/13 LN+, ER+(70%), PR+(20%))	2 BrCa <50y	Αρνητικό <i>BRCA1/2</i>
1821	BrCa 46y (I-διηθητικό πορογενές NOS grade II & in situ comedo, 0/1 LN+, ER+(90%), PR+(80%), HER2:2+, Ki67:30%) & BrCa 47y (r-διηθητικό πορογενές NOS grade II, 0 LN+, ER+(80%), PR+(75%), HER2-(1+), Ki67:10%)	ελεύθερο	Αρνητικό <i>BRCA1/2</i>
1824	BrCa 45y (διηθητικό πορογενές NOS grade III, 17/20 LN+: ER+(70%), PR-<1%), HER2-(1+), Ki67:25%)	1 OvCa	Αρνητικό <i>BRCA1/2</i>
1828	BrCa 36y (I-διηθητικό πορογενές NOS grade II & in situ, 12/20 LN+, ER+(40%), PR+(50%), HER2-(1+), Ki67:30%) & BrCa 38y (r-διηθητικό πορογενές grade III, 1/13 LN+, ER+(60%), PR-<1%), HER2:2+, Ki67:30%)	ελεύθερο	Αρνητικό <i>BRCA1/2</i>
1836	BrCa 45y (διηθητικό πορογενές grade III, 9/30 LN+, <u>TNBC</u> : ER:0%, PR:0%, HER2:2+, FISH-, Ki67:70%)	1 BrCa <45y	Αρνητικό <i>BRCA1/2</i>
1839	BrCa 51y (διηθητικό πορογενές grade III, <u>TNBC</u> : ER:0%, PR:0%, HER2:1+, Ki67:40%, p53+(100%))	ελεύθερο	Αρνητικό <i>BRCA1/2</i>
1878	BrCa 43y (διηθητικό πορογενές grade III, 0 LN+, ER+(80%), PR+(65%), HER2-(1+), Ki67:25%, p53:45%)	3 BrCa (1 BrCa <45y)	Αρνητικό <i>BRCA1/2</i>
1886	BrCa 45y (διηθητικό λοβιακό grade II, 1 LN+, ER+(100%), PR+(100%), HER2-(0), Ki67:12%)	1 BrCa	Αρνητικό <i>BRCA1/2</i>
1896	BrCa 43y (διηθητικό πορογενές NOS grade II, 2/9 LN+, ER+(95%), PR-(0%), HER2-(1+), Ki67:20%)	3 BrCa (2 BrCa <50y)	Αρνητικό <i>BRCA1/2</i>
1899	OvCa 46y (ορώδες grade III, Ki67:70%, 3/7 LN+)	1 BrCa & 2 OvCa	BRCA1 c.3700_3704delGTAAA, p.Val1234fsTer8
1942	BrCa 49y (διηθητικό πορογενές NOS grade II & DCIS grade III, 1/7 LN+, ER+(100%), PR+(80%), HER2-(1+), p53:30%, Ki67:25%)	1 BrCa <50y	Αρνητικό <i>BRCA1/2</i>

1961	BrCa 48γ (διηθητικό πορογενές grade II, & DCIS grade II, ER+(95%), PR+(90%), HER2:2+, Ki67:15%)	1 BrCa <50y	Αρνητικό <i>BRCA1/2</i>
1965	BrCa 46γ (διηθητικό πορογενές NOS grade II & DCIS grade III)	3 BrCa (2 BrCa <50y)	Αρνητικό <i>BRCA1/2</i>
1986	BrCa 46γ (I-DCIS grade III) & BrCa 47γ (r-διηθητικό πορογενές NOS grade III & DCIS grade III, 0/3 LN+, ER-(0%), PR-(0%), HER2+(3+), Ki67:10%)	3 BrCa (2 BrCa <50y)	Αρνητικό <i>BRCA1/2</i>
2005	BrCa 46γ (διηθητικό πορογενές NOS grade II, & DCIS, 1/35 LN+, ER+(85%), PR+(25%), HER2-(1+), Ki67:20%)	2 BrCa & 2 OvCa	Αρνητικό <i>BRCA1/2</i>
2011	BrCa 45γ (διηθητικό πορογενές grade II, ER+(100%), PR+(90%), HER2:2+, Ki67:5%)	1 BrCa	Αρνητικό <i>BRCA1/2</i>
2034	BrCa 42γ (μη διαθέσιμη ιστολογική)	1 BrCa <50y	Αρνητικό <i>BRCA1/2</i>
2046	BrCa 53γ (<u>TNBC</u>) & OvCa 63γ (ορώδες grade III, στάδιο I)	1 OvCa	<i>BRCA2 p.Ser1882Ter (c.5645C>A)</i>
2055	OvCa 68γ (ορώδες grade III)	1 OvCa	Αρνητικό <i>BRCA1/2</i>
2069	BrCa 46γ (διηθητικό πορογενές NOS grade II & DCIS, ER+(80%), PR+(100%), HER2-(0), Ki67:7%)	2 BrCa (1 BrCa <50y)	Αρνητικό <i>BRCA1/2</i>
2081	BrCa 45γ (διηθητικό πορογενές, <u>TNBC</u> , ER-(0%), PR-(0%), HER2-(0), Ki67:70%)	ελεύθερο	Αρνητικό <i>BRCA1/2</i>
2147	BrCa 33γ (διηθητικό πορογενές NOS grade III, 0/4 LN+, <u>TNBC</u> , ER-(0%), PR-(0%), HER2-(0), Ki67:~90%)	ελεύθερο	Αρνητικό <i>BRCA1/2</i>
2155	BrCa 58γ (I-διηθητικό πορογενές grade III, 0/6 LN+, <u>TNBC</u> , ER-(0%), PR-(0%), HER2-(1+), Ki67:80%) & BrCa 58γ (r-DCIS comedo grade II, ER+(80%), PR-(0%), HER2+(3+), Ki67:10%)	3 BrCa (2 BrCa <50y)	Αρνητικό <i>BRCA1/2</i>
2200	BrCa 39γ (διηθητικό πορογενές NOS grade II, & DCIS grade II, 0/2 sLN+, ER+(90%), PR+(95%), HER2-(0), Ki67:30%)	3 BrCa (2 BrCa <50y)	Αρνητικό <i>BRCA1/2</i>
2292	OvCa 52γ (ορώδες grade III, 0/39 LN+, στάδιο I)	4 BrCa (2 BrCa <50y)	<i>BRCA1 c.5266dupC (c.5382insC)</i>
2798	BrCa 43γ (διηθητικό πορογενές NOS grade III & DCIS comedo grade III, 1/11 LN+, <u>TNBC</u> /basal-like, Ki67:90%)	5 BrCa (4 BrCa <40y)	<i>BRCA1 del3.2KbEx20</i>
2454	OvCa 60γ (ορώδες grade III, στάδιο IIIc)	2 BrCa <50y & 3 OvCa	<i>BRCA1 del exons 23 & 24 (g.169527_180579del11052)</i>

2. Διερεύνηση της συχνότητας της παραλλαγής p.(Val1833Met) του γονιδίου *BRCA1*

Η παραιοηματική παραλλαγή p.(Val1833Met) (c.5497G>A) του γονιδίου *BRCA1* διερευνήθηκε σε Ελληνίδες ασθενείς με διάγνωση καρκίνου μαστού ή/και ωθηκών, βάσει αποτελεσμάτων προηγούμενης μελέτης [235]. Συνολικά, σε 26 ασθενείς με καρκίνο μαστού ή/και ωθηκών ανιχνεύθηκε η συγκεκριμένη παραλλαγή. Η συχνότητα ήταν 0,42% (0,42%·10/2397) σε ασθενείς με καρκίνο μαστού, 1,59% (1,59%· 14/882) σε ασθενείς με καρκίνο ωθηκών και 1,82% (1,82%· 2/110) σε ασθενείς με καρκίνο μαστού και ωθηκών, με τη συνολική συχνότητα να

ανέρχεται στο 0,77% (0,77%· 26/3389). Ενδεικτικά, στην ακόλουθη Εικόνα 21 παρουσιάζεται για την ασθενή #2164, που βρέθηκε να φέρει την παραλλαγή p.(Val1833Met), το αντίστοιχο ηλεκτροφερογράφημα που δείχνει την αλλαγή G>A (διπλή κορυφή) σε ετεροζυγωτία.



Εικόνα 21: Ενδεικτικό ηλεκτροφερογράφημα μιας ασθενούς (#2164) που βρέθηκε να φέρει την παραλλαγή p.(Val1833Met) (c.5497G>A) του γονιδίου *BRCA1* (αλληλούχηση κατά Sanger).

Πιο αναλυτικά, 10 από τις 26 (38,5%· 10/26) ασθενείς που έφεραν την παραλλαγή p.(Val1833Met) είχαν διαγνωστεί με καρκίνο μαστού με μέση ηλικία διάγνωσης τα 42,9±10,3 έτη (εύρος: 27-66 έτη), 14 από τις 26 (53,8%· 14/26) ασθενείς που έφεραν την παραλλαγή είχαν διαγνωστεί με καρκίνο των ωοθηκών με μέση ηλικία διάγνωσης τα 57,2±9,7 έτη (εύρος: 45-74 έτη), ενώ 2 από τις 26 (7,7%· 2/26) ασθενείς είχαν διαγνωστεί τόσο με καρκίνο μαστού όσο και με καρκίνο ωοθηκών, με μετάχρονη εμφάνιση του καρκίνου των ωοθηκών. Από την άλλη πλευρά, η μέση ηλικία εμφάνισης καρκίνου του μαστού ήταν τα 46,7±11,0 έτη (εύρος: 19-84 έτη), ενώ η μέση ηλικία εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών ήταν τα 53,6±11,6 έτη (εύρος: 17-87 έτη) στις αντίστοιχες ομάδες μελέτης. Συγκριτικά, παρατηρείται μια μειωμένη μέση ηλικία διάγνωσης καρκίνου του μαστού στην ομάδα ασθενών που φέρουν την παραλλαγή p.(Val1833Met) σε σχέση με την αντίστοιχη μέση ηλικία διάγνωσης καρκίνου του μαστού στην υπό μελέτη ομάδα ασθενών με καρκίνο μαστού, χωρίς, ωστόσο, να αγγίζει τη στατιστική σημαντικότητα ($p=0.276$, 95% CI [-10.6, 3.1]). Αντίθετα, η μέση ηλικία διάγνωσης

καρκίνου των ωοθηκών στις ασθενείς που φέρουν την παραλλαγή αυτή είναι ελαφρώς αυξημένη συγκριτικά με την αντίστοιχη ηλικία διάγνωσης στην υπό μελέτη ομάδα ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών, με τη διαφορά αυτή να μην είναι στατιστικά σημαντική ($p=0.6541$, 95% CI [-7.5, 4.7]).

Συνεπώς, παρατηρείται ότι η $p.(Val1833Met)$ αποτελεί μια παραλλαγή που σχετίζεται με τον καρκίνο μαστού ή/και ωοθηκών, με μια ισχυρότερη συσχέτιση με τον καρκίνο των ωοθηκών, καθότι παρατηρείται μια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των συχνοτήτων στις δύο ομάδες ασθενών ($p=0.0005$, 95% CI [0.4-2.3]). Επιπλέον, η υψηλή συχνότητα της παραλλαγής στην ομάδα ασθενών με διάγνωση καρκίνου μαστού και ωοθηκών διαφέρει σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο σε σχέση με τη συχνότητα στην ομάδα ασθενών με διάγνωση καρκίνου μαστού μόνο ($p=0.0381$, 95% CI [-0.2-6.0]). Στην ομάδα μαρτύρων, που αποτελούνταν από 1558 Ελληνίδες αντίστοιχης ηλικίας χωρίς διάγνωση οποιασδήποτε μορφής κακοήθειας, η παραλλαγή δεν ανιχνεύθηκε. Για τις 25 από τις 26 ασθενείς στις οποίες ανιχνεύθηκε η $p.(Val1833Met)$ υπάρχουν δεδομένα για το οικογενειακό τους ιστορικό, συνεπώς, 18 εξ αυτών (72%) έχουν οικογενειακό ιστορικό καρκίνου μαστού ή/και ωοθηκών και οι υπόλοιπες 7 (28%) δεν αναφέρουν κανένα οικογενειακό ιστορικό διαγνώσεων καρκίνου μαστού ή/και ωοθηκών.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ανάλυση διαχωρισμού (segregation analysis) σε 8 οικογένειες στις οποίες ανιχνεύθηκε η παραλλαγή $p.(Val1833Met)$, προκειμένου να διερευνηθεί πιθανή συσχέτιση με παθογένεια. Στην Εικόνα 22 (α-η) απεικονίζονται όλα τα γενεαλογικά δέντρα των 8 οικογενειών, μέλη των οποίων βρέθηκαν να φέρουν την παραλλαγή αυτή.

Η συν-κληρονομία της παραλλαγής με το φαινότυπο είναι εμφανής στις Εικόνες 22ε, 22στ, 22ζ και 22η. Πιο αναλυτικά, η πιο αντιπροσωπευτική οικογένεια ανάλυσης διαχωρισμού της παραλλαγής $p.(Val1833Met)$ απεικονίζεται στην Εικόνα 22στ, καθότι τόσο η ασθενής αναφοράς (II.5) όσο και οι δύο κόρες της (III.4 και III.5), που διαγνώστηκαν με κακοήθειες ωοθηκών και μαστού, αντίστοιχα, φέρουν την παραλλαγή. Αντίθετα, η άλλη κόρη (III.2), στην οποία δεν έχει διαγνωστεί καμία μορφή κακοήθειας μέχρι την ηλικία των 49 ετών όπου ελέγχθηκε, δε βρέθηκε να

φέρει τη συγκεκριμένη παραλλαγή. Επιπλέον, στην Εικόνα 22ε, η ασθενής αναφοράς (III.9), στην οποία διαγνώστηκε καρκίνος του μαστού σε ηλικία 49 ετών, βρέθηκε να έχει κληρονομήσει την παραλλαγή από τον πατέρα της (II.9), ο οποίος δεν έχει διαγνωστεί με κανέναν τύπο κακοήθειας μέχρι την ηλικία των 83 ετών. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι ο ανδρικός καρκίνος του μαστού είναι ένας πολύ σπάνιος τύπος καρκίνου, συνεπώς, δεν είναι σύνηθες ένας άνδρας που φέρει μια παραλλαγή στο γονίδιο *BRCA1* να αναπτύσσει καρκίνο του μαστού. Αναφορικά με την Εικόνα 22ζ, η ασθενής αναφοράς (III.3), η οποία έχει διαγνωστεί με καρκίνο των ωοθηκών στην ηλικία των 55 ετών, κληροδότησε την p.(Val1833Met) στο γιο της (IV.1), ο οποίος είναι ελεύθερος κακοήθειας στην ηλικία των 35 ετών, ενώ η κόρη της (IV.2) δεν έχει κληρονομήσει την παραλλαγή και δεν έχει διαγνωστεί με καμία μορφή κακοήθειας στην ηλικία των 32 ετών. Στην Εικόνα 22η, η ασθενής αναφοράς (II.8) και η αδελφή της (II.2), οι οποίες έχουν διαγνωστεί με καρκίνο των ωοθηκών σε ηλικία 49 και 68 ετών, αντίστοιχα, φέρουν την παραλλαγή p.(Val1833Met). Οι δύο κόρες της ασθενούς αναφοράς (III.8 και III.9) βρέθηκαν να φέρουν την παραλλαγή, χωρίς να έχουν νοσήσει από κάποιον τύπο κακοήθειας μέχρι την ηλικία των 43 και 36 ετών, αντίστοιχα, όπου και ελέγχθηκαν. Αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί από τη διακύμανση που παρατηρείται στην ηλικία εμφάνισης καρκίνου μαστού ή/και ωοθηκών σε άτομα που φέρουν την παραλλαγή αυτή. Από την άλλη πλευρά, η p.(Val1833Met) ανιχνεύθηκε σε μία από τις δύο κόρες (III.3) της II.2, η οποία διαγνώστηκε με καρκίνο μαστού στην ηλικία των 41 ετών, ενώ δεν ανιχνεύθηκε στην άλλη κόρη (III.2) της II.2, η οποία μέχρι την ηλικία των 48 ετών, όπου και ελέγχθηκε, ήταν ελεύθερη κακοήθειας. Στην Εικόνα 22β, η ασθενής αναφοράς (IV.2), η οποία διαγνώστηκε με καρκίνο μαστού στην ηλικία των 33 ετών και βρέθηκε να φέρει την παραλλαγή p.(Val1833Met), έχει μία γιαγιά μητρικής πλευράς (II.4) με διάγνωση καρκίνου του μαστού σε ηλικία 58 ετών, στην οποία δεν ανιχνεύθηκε η συγκεκριμένη παραλλαγή. Αυτό υποδηλώνει ότι η ασθενής αναφοράς πιθανώς κληρονόμησε την παραλλαγή από τον πατέρα της, όπου παρατηρείται μια πλειονότητα αρρένων, αποτελώντας έναν περιοριστικό παράγοντα για την περαιτέρω αξιολόγηση της παθογονικότητας της παραλλαγής αυτής στη συγκεκριμένη οικογένεια.

Στην Εικόνα 22α προκύπτει μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση. Συγκεκριμένα, η ασθενής αναφοράς (III.3), που φέρει την p.(Val1833Met), διαγνώστηκε με υψηλόβαθμο ορώδες καρκίνωμα των ωοθηκών στην ηλικία των 64 ετών. Ο ανιψιός της (IV.1) και η ανιψιά της (IV.4) βρέθηκαν να φέρουν τη συγκεκριμένη παραλλαγή, χωρίς να έχουν διαγνωστεί με κάποιο τύπο καρκίνου μέχρι την ηλικία των 41 και 40 ετών, αντίστοιχα, όπου και ελέγχθηκαν. Η ξαδέλφη της από τη μητρική πλευρά (III.7), η οποία είχε ελεγχθεί ανεξάρτητα και είχε εμφανίσει καρκίνο των ωοθηκών στην ηλικία των 63 ετών, βρέθηκε να φέρει μια άλλη γνωστή παθογόνο μετάλλαξη στο γονίδιο *BRCA1*, χωρίς, ωστόσο, να ανιχνεύεται στην ίδια η υπό μελέτη παραλλαγή. Αυτή η απουσία συνύπαρξης της p.(Val1833Met) με άλλη παθογόνο μετάλλαξη ενισχύει την παθογονικότητα της συγκεκριμένης παραλλαγής.

Ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών που φέρουν την παραλλαγή p.(Val1833Met)

Δεδομένα των ιστοπαθολογιών των διαγνώσεων καρκίνου του μαστού ήταν διαθέσιμα για 10 από τις 12 ασθενείς που έφεραν την παραλλαγή p.(Val1833Met) με μέση ηλικία εμφάνισης τα 43,8±9,7 έτη. Πιο αναλυτικά, ο κυρίαρχος ιστολογικός τύπος στον καρκίνο του μαστού ήταν το πορογενές καρκίνωμα (90%· 9/10), ενώ μία περίπτωση αφορούσε σε λοβιακό καρκίνωμα μαστού. Η πλειονότητα των καρκίνων μαστού ήταν χαμηλής διαφοροποίησης, συγκεκριμένα grade III (89%· 8/9). Ενδιαφέρουσα είναι η παρατήρηση ότι 6 από τις 10 διαθέσιμες ιστολογικές αφορούσαν σε τριπλά αρνητικά καρκίνο μαστού (60%· 6/10) και 5 από τους 9 καρκίνους μαστού (55,6%) χαρακτηρίζονταν από λεμφαδενική διήθηση.

Το σύνολο των περιστατικών καρκίνων των ωοθηκών στα οποία ανιχνεύθηκε η παραλλαγή p.(Val1833Met) ήταν 16 με μέση ηλικία εμφάνισης τα 58,4±9,9 έτη. Ο κύριος ιστολογικός τύπος στις 13 διαθέσιμες ιστολογικές εκθέσεις ήταν το ορώδες καρκίνωμα (76,9%· 10/13), ακολουθούσε το ενδομητριοειδές καρκίνωμα που διαγνώστηκε σε δύο ασθενείς (15,3%· 2/13), ενώ ένας μικτός τύπος διαγνώστηκε σε μία ασθενή (7,8%· 1/13). Με βάση τα διαθέσιμα δεδομένα για τη διαφοροποίηση του όγκου 10 ωοθηκικών καρκινωμάτων, το σύνολο αυτών αφορούσε σε

υψηλόβαθμα καρκινώματα (100%· 10/10). Στον Πίνακα 14 συνοψίζονται τα δεδομένα οικογενειακού ιστορικού και ιστοπαθολογιών για όλες τις ασθενείς φέρουσες την παραλλαγή p.(Val1833Met).

Πίνακας 14							
Ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά και οικογενειακό ιστορικό των ασθενών που φέρουν την παραλλαγή p.(Val1833Met) που έχουν διαγνωστεί με καρκίνο μαστού (n=12) και καρκίνο ωθηκών (n=16)							
A/A	Ηλικία διάγνωσης καρκίνου μαστού (έτη)	Ηλικία διάγνωσης καρκίνου ωθηκών (έτη)	Ιστολογικός τύπος	TAKM	Υψηλού βαθμού κακοήθεια	Οικογενειακό ιστορικό καρκίνου μαστού ή/και ωθηκών	Διήθηση λεμφαδένων
123		59	ενδομητριοειδές		ναι	ναι	NA
301		45	NA		NA	ναι	NA
460		63	ορώδες		NA	ναι	NA
636	66		πορογενές	ναι	ναι	ναι	ναι
649	51		πορογενές	όχι	NA	ναι	NA
791		49	ορώδες		ναι	ναι	όχι
1294	33		πορογενές	ναι	ναι	ναι	ναι
1319		62	μικτό		ναι	όχι	NA
1320		48	NA		NA	όχι	NA
1321		48	ορώδες		ναι	όχι	NA
1322		70	NA		NA	όχι	NA
1323		69	ορώδες		NA	όχι	ναι
1434	45	74	πορογενές ενδομητριοειδές	NA	ναι	ναι	NA
1439	43		λοβιακό	όχι	όχι	ναι	όχι
1460	27		NA	όχι	NA	ναι	ναι
1967	49		πορογενές	ναι	ναι	ναι	NA
2107	52	59	πορογενές ορώδες	όχι	ναι	ναι	NA
2164	38		πορογενές	ναι	ναι	ναι	ναι
2233		71	ορώδες		ναι	ναι	NA
2250		48	ορώδες		ναι	ναι	όχι
369d		64	ορώδες		ναι	ναι	NA
2390	39		NA	NA	NA	ναι	NA
2425		55	ορώδες		ναι	όχι	NA

2596	38		πορογενές	ναι	ναι	ναι	όχι
4699	45		πορογενές	ναι	ναι	όχι	ναι
5037		73	ορώδες		ναι	NA	NA

NA Μη διαθέσιμο

TAKM Τριπλά Αρνητικός Καρκίνος Μαστού

Διερεύνηση ιδρυτικού φαινομένου της p.(Val1833Met) του γονιδίου *BRCA1* με ανάλυση απλοτύπου

Η ανάλυση απλοτύπου που διεξήχθη σε 41 άτομα που βρέθηκε να φέρουν την παραλλαγή p.(Val1833Met), συμπεριλαμβάνοντας τις ασθενείς αναφοράς και συγγενείς αυτών, από 26 οικογένειες αποκάλυψε ένα κοινό απλότυπο, τον '180-147-169', κατά μήκος μιας περιοχής 2,76 Mb στο χρωμόσωμα 17, υποδεικνύοντας μια κοινή προγονική προέλευση για την παραλλαγή p.(Val1833Met). Ο προκύπτων απλότυπος καθορίστηκε από δύο μικροδορυφορικούς δείκτες ανοδικά και καθοδικά του γονιδίου *BRCA1* (D17S951 και D17S800) και ένα δείκτη εντός του γονιδίου (D17S855). Επιπλέον, η ανάλυση απλοτύπου πραγματοποιήθηκε και σε 14 συγγενείς μη φέροντες την παραλλαγή, οι οποίοι είχαν διαφορετικούς απλότυπους (Πίνακες 15 και 16). Οι διαφορετικοί απλότυποι για τα άτομα που έφεραν, καθώς και για αυτά που δεν έφεραν την p.(Val1833Met) απεικονίζονται στην Εικόνα 22. Συγκεκριμένα, από την Εικόνα 22α έως την Εικόνα 22η, ο κοινός απλότυπος '180-147-169' παρατηρείται σε όλα τα άτομα που φέρουν τη συγκεκριμένη παραλλαγή, ενώ τα άτομα στα οποία δεν ανιχνεύθηκε η παραλλαγή είχαν ποικίλους απλότυπους, τονίζοντας την ιδρυτική επίδραση της παραλλαγής αυτής σε Ελληνίδες ασθενείς με καρκίνο μαστού ή/και ωοθηκών. Επιπλέον, η ανάλυση απλοτύπου διεξήχθη σε 40 Ελληνίδες αντίστοιχης ηλικίας ελεύθερες κακοήθειας δίνοντας τις συχνότητες αλληλομόρφων στον πληθυσμό για τη συγκεκριμένη γονιδιωματική περιοχή (Πίνακας 17). Κατά συνέπεια, τα παραπάνω αποτελέσματα αποδεικνύουν την ιδρυτική επίδραση της παραλλαγής p.(Val1833Met) στον ελληνικό πληθυσμό.

Πίνακας 15**Ανάλυση απλοτύπου για τα άτομα που φέρουν την παραλλαγή p.(Val1833Met)**

A/A	D17S951	D17S855	D17S800
2233	170/180	145/147	167/169
2250	172/180	145/147	169/175
2425	172/180	145/147	169/175
2164	174/180	145/147	167/169
2107	178/180	143/147	167/169
1967	178/180	145/147	169/175
1460	172/180	145/147	169/171
1322	172/180	145/147	169/173
1321	178/180	145/147	169/175
1320	174/180	145/147	169/175
1319	172/180	147/147	167/169
1439	170/180	145/147	167/169
1434	172/180	145/147	167/169
1323	178/180	145/147	169/171
123	170/180	145/147	167/169
460	180/180	145/147	167/169
636	174/180	145/147	167/169
649	172/180	147/149	167/169
791	174/180	145/147	167/169
791a	178/180	141/147	169/171
791b	172/180	145/147	167/169
791c	176/180	145/147	169/171
791e	178/180	145/147	169/171
791h	172/180	145/147	167/169
791i	172/180	143/147	169/175
1294	170/180	145/147	167/169
1294a	170/180	145/147	167/169
1434b	170/180	145/147	169/171
1439b	170/180	141/147	167/169
1967a	172/180	141/147	169/175
1967c	174/180	147/151	169/175
2233a	172/180	145/147	167/169
2233b	176/180	145/147	169/171
369d	172/180	141/147	167/169
369e	170/180	145/147	167/169
369f	170/180	145/147	167/169
2390	178/180	145/147	167/169
2425a	178/180	147/147	169/173
2596	178/180	145/147	167/169
4699	178/180	145/147	167/169
5037	172/180	141/147	169/173

Πίνακας 16

Ανάλυση απλοτύπου για τους συγγενείς που δε φέρουν την παραλλαγή p.(Val1833Met)

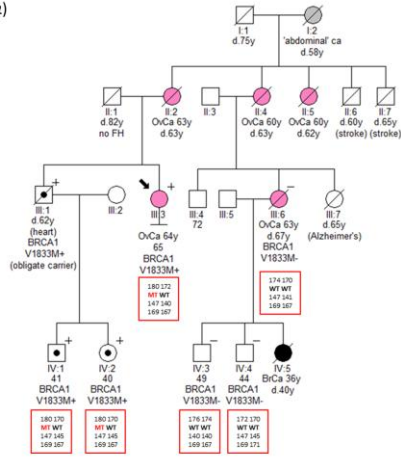
A/A	D17S951	D17S855	D17S800
791d	172/174	141/141	167/169
791f	172/174	141/141	167/169
791g	174/180	138/141	167/169
1294b	174/180	147/149	171/173
1434a	172/180	145/147	167/171
1439a	170/172	139/145	167/169
1967b	172/180	141/143	169/173
2233c	170/172	145/147	171/173
369a	170/174	141/147	167/169
369b	174/176	141/141	167/169
369c	170/172	145/147	171/173
2425b	172/178	141/143	167/173
791j	172/176	147/149	173/175
2596a	170/172	141/143	169/173

Πίνακας 17

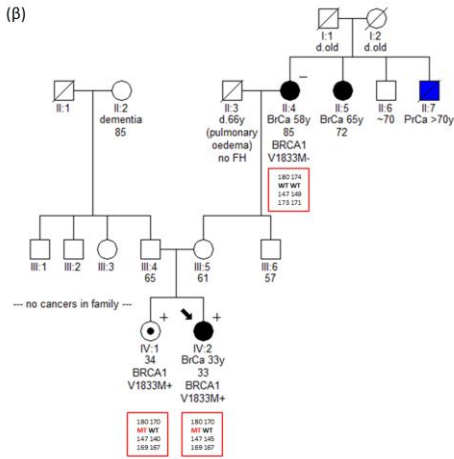
Συχνότητες αλληλομόρφων των τριών πολυμορφικών δεικτών που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση απλοτύπου

D17S951		D17S855		D17S800	
Αλληλόμορφο	Συχνότητα	Αλληλόμορφο	Συχνότητα	Αλληλόμορφο	Συχνότητα
180	0.200	147	0.375	169	0.200
170	0.125	143	0.425	173	0.325
174	0.625	153	0.100	175	0.300
168	0.050	149	0.325	171	0.425
172	0.275	141	0.200	177	0.225
176	0.025	145	0.200	179	0.125
182	0.150	151	0.150		
184	0.025				
178	0.175				

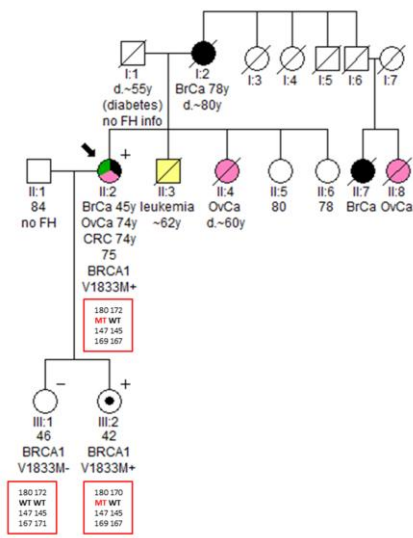
(α)



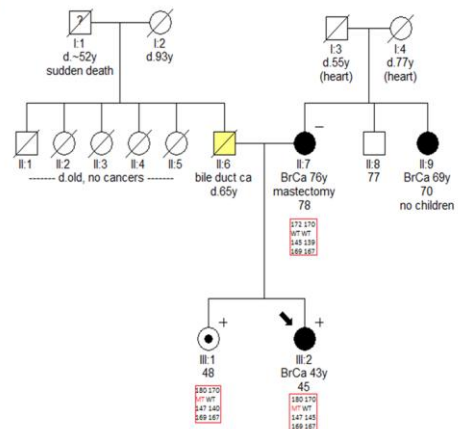
(β)



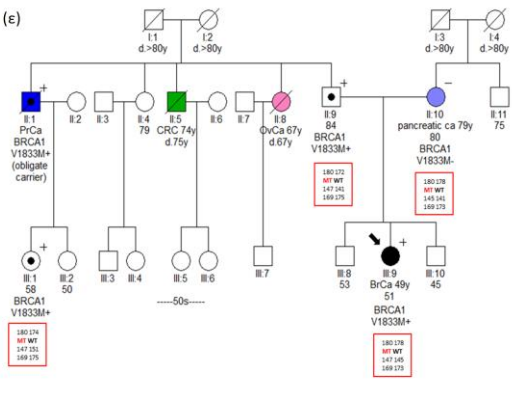
(γ)



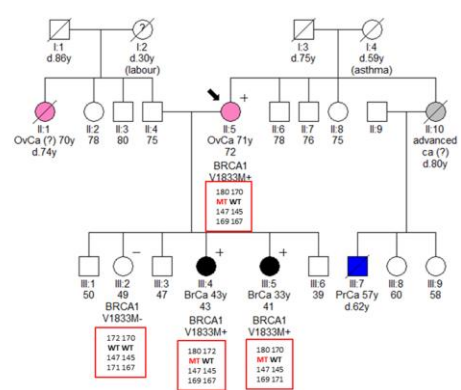
(δ)

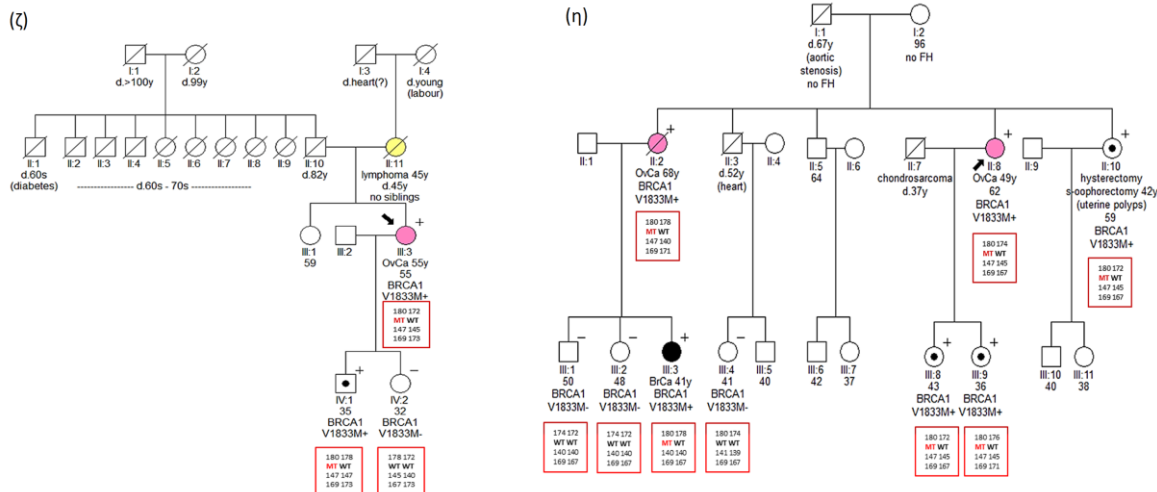


(ε)



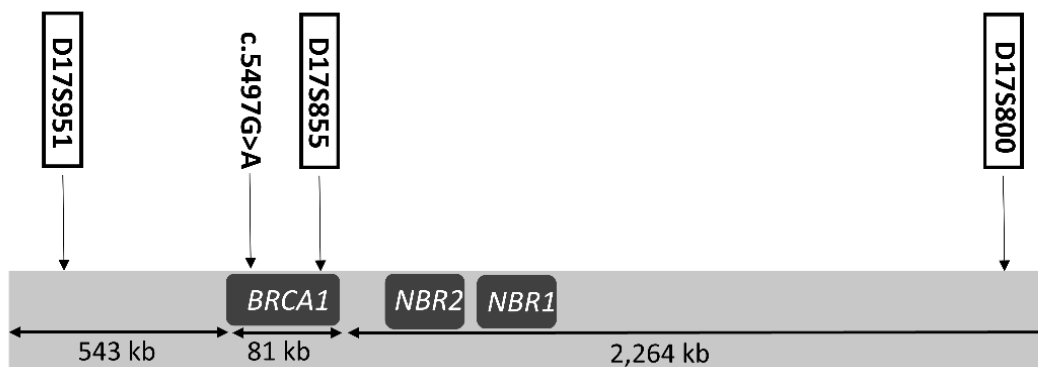
(σ)





Εικόνα 22. Γενεαλογικά δέντρα 8 οικογενειών (α-η) μέλη των οποίων φέρουν την παραλλαγή p.(Val1833Met), στις οποίες έχει διεξαχθεί ανάλυση διαχωρισμού και απλοτύπου. Τα βέλη υποδεικνύουν την ασθενή αναφοράς και οι κουκκίδες αντιστοιχούν στα άτομα φέροντα την παραλλαγή, ελεύθερα κακοήθειας. Τα σημεία συν (+) και πλην (-) αντιστοιχούν στα άτομα που φέρουν και δε φέρουν την παραλλαγή, αντίστοιχα. Ο καρκίνος του μαστού (BrCa) και ο καρκίνος των ωθηκών (OvCa) σημειώνεται με μαύρο και ροζ χρώμα, αντίστοιχα, ενώ άλλοι τύποι καρκίνου έχουν διαφορετικό χρώμα (π.χ., καρκίνος παχέος εντέρου (CRC) με πράσινο). Ο απλότυπος του κάθε εξεταζόμενου ατόμου αναφέρεται σε κόκκινο πλαίσιο.

Η Εικόνα 23 απεικονίζει το γενετικό τόπο που εκτείνεται από τον μικροδορυφορικό δείκτη D17S951 ανοδικά του γονιδίου *BRCA1* έως τον δείκτη D17S800 καθοδικά του γονιδίου *BRCA1*, καλύπτοντας μια έκταση 2,760 Mb στο χρωμόσωμα 17. Ο μικροδορυφορικός δείκτης D17S855 εντοπίζεται εντός του γονιδίου *BRCA1* και 0,615 Mb μακριά από τον δείκτη D17S951.



Εικόνα 23. Γενωμικός χάρτης που δείχνει τους τρεις μικροδορυφορικούς δείκτες (D17S951, D17S855, D17S800) που ορίζουν τον κοινό απλότυπο με τις υποδεικνυόμενες αποστάσεις, που εκτείνονται σε μια περιοχή 2,76 Mb στο χρωμόσωμα 17. Η παραλλαγή p.(Val1833Met) (c.5497G>A) απεικονίζεται εντός του γονιδίου *BRCA1*.

Υπολογισμός της ηλικίας της παραλλαγής p.(Val1833Met)

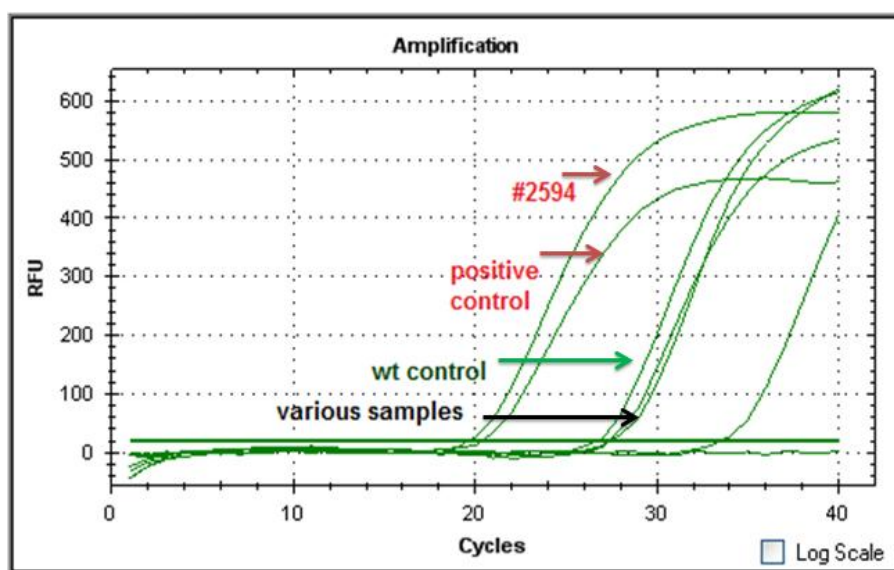
Η παραλλαγή p.(Val1833Met) εκτιμάται ότι προέρχεται από 45 έως 79 γενεές πίσω, συμπεριλαμβάνοντας μια χρονική περίοδο που εκτείνεται από τα 1.125 έτη έως τα 1.975 έτη ($r=0.135$). Κατά συνέπεια, η ηλικία της παραλλαγής υπολογίζεται περίπου στις 58 γενεές, που αντιστοιχούν στα 1.450 έτη.

Αξιολόγηση της παθογονικότητας της παραλλαγής p.(Val1833Met) μέσω ανάλυσης συν-διαχωρισμού

Για κάθε μία από τις 8 οικογένειες που υποβλήθηκαν σε ανάλυση διαχωρισμού για την παραλλαγή p.(Val1833Met) υπολογίστηκε ένας λόγος πιθανοφανειών, LR, υπέρ ή κατά της παθογονικότητας, που κυμαινόταν από 0.07 έως 4.74. Συνδυάζοντας τους λόγους πιθανοφανειών κάθε οικογένειας, προσδιορίστηκε ένας συνολικός λόγος πιθανοφανειών της τάξεως του 1.88. Λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι μια παραλλαγή με LR μεγαλύτερο από 1 εκτιμάται ως παθογόνος και μια παραλλαγή με LR μικρότερο του 1 χαρακτηρίζεται ως ουδέτερη, η p.(Val1833Met) αξιολογείται ως παθογόνος.

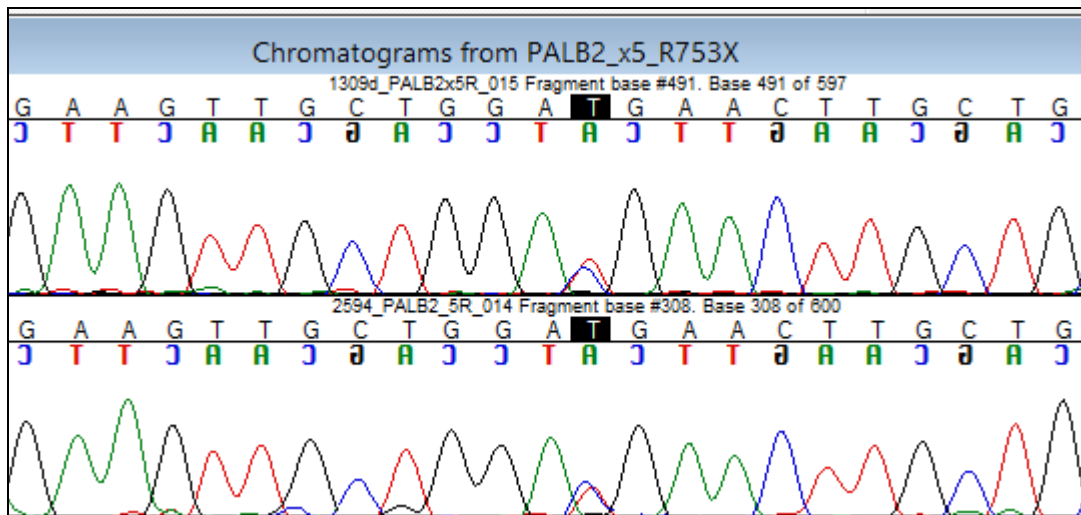
3. Διερεύνηση της μετάλλαξης p.Arg753Ter του γονιδίου *PALB2* σε Ελληνίδες ασθενείς με καρκίνο ωθηκών ανεξαρτήτως ηλικίας διάγνωσης και οικογενειακού ιστορικού

Για τη μελέτη της μη νοσηματικής μετάλλαξης p.Arg753Ter (c.2257C>T) του γονιδίου *PALB2* σε Ελληνίδες ασθενείς με επιθηλιακό καρκίνο των ωθηκών, αναλύθηκαν 885 ασθενείς ανεξαρτήτως ηλικίας εμφάνισης και οικογενειακού ιστορικού που ήταν αρνητικές για μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1/2*. Η μέση ηλικία διάγνωσης καρκίνου των ωθηκών στην υπό μελέτη ομάδα ήταν τα $52,3 \pm 14,9$ έτη (εύρος: 23-78 έτη) και η πλειονότητα των ιστοπαθολογιών αφορά στον υψηλόβαθμο ορώδη υπότυπο. Η μετάλλαξη ανιχνεύθηκε σε μία ασθενή (#2594), η οποία εμφάνισε καρκίνο των ωθηκών σε ηλικία 64 ετών (Εικόνα 24). Επιπρόσθετα στοιχεία για το ατομικό και οικογενειακό ιστορικό της συγκεκριμένης ασθενούς δεν ήταν εφικτό να ανευρεθούν.



Εικόνα 24: Ανίχνευση της μετάλλαξης p.Arg753Ter του γονιδίου *PALB2* στην ασθενή #2594 (real-time PCR).

Το εύρημα αυτό επιβεβαιώθηκε με ανεξάρτητη μέθοδο (αλληλούχηση κατά Sanger), όπως παρουσιάζεται στην ακόλουθη **Εικόνα 25**.



Εικόνα 25: Ανίχνευση της μετάλλαξης p.Arg753Ter του γονιδίου *PALB2* στην ασθενή #2594 (αλληλούχηση κατά Sanger).

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα, στο σύνολο των 885 εξεταζόμενων ασθενών με καρκίνο των ωθηκών, η συγκεκριμένη μετάλλαξη ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 0.1% (1/885), καθιστώντας την εξαιρετικά σπάνια σε πληθυσμό Ελληνίδων ασθενών με επιθηλιακό καρκίνο των ωθηκών.

4. Ανάλυση 94 γονιδίων σε 285 ασθενείς με καρκίνο ωθηκών με το γονιδιακό πάνελ *Trusight Cancer panel*

Με τη χρήση του γονιδιακού πάνελ *Trusight Cancer panel*, που περιλαμβάνει 94 γονίδια προδιάθεσης στον κληρονομικό καρκίνο, αναλύθηκαν 285 ασθενείς με επιθηλιακό καρκίνο ωθηκών ανεξαρτήτως ηλικίας διάγνωσης και οικογενειακού ιστορικού με βάση τα κριτήρια NCCN [2]. Η μέση ηλικία διάγνωσης καρκίνου των ωθηκών των υπό μελέτη ασθενών ήταν τα $53,2 \pm 12,1$ έτη (εύρος: 20-80 έτη). Από τις 268 διαθέσιμες ιστοπαθολογίες, η πλειονότητα αφορά στα ορώδη ωθηκικά καρκινώματα (79,5% 213/268), όπου τα 192 από τα 213 αφορούν σε υψηλόβαθμα ορώδη καρκινώματα, τα 6 από τα 213 αντιστοιχούν σε χαμηλόβαθμα ορώδη καρκινώματα, ενώ τα εναπομείναντα 15 είναι ορώδη καρκινώματα αγνώστου βαθμού κακοήθειας. Επιπλέον, το 9% (24/268) των διαγνώσεων αντιστοιχεί σε ενδομητριοειδή ωθηκικά καρκινώματα, το 2,2% (6/268) σε διαυγοκυτταρικά

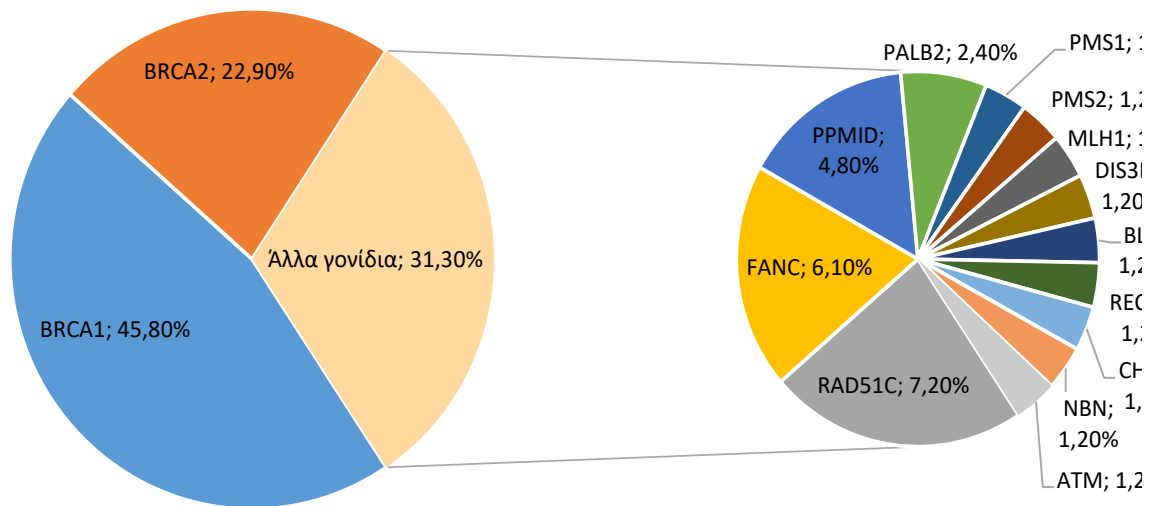
ωοθηκικά καρκινώματα, το 4,5% (12/268) σε μικτά ωοθηκικά καρκινώματα (4 ορώδη/ενδομητριοειδή, 3 ορώδη/διαυγοκυτταρικά, 3 ενδομητριοειδή/διαυγοκυτταρικά και 2 ορώδη/ενδομητριοειδή/διαυγοκυτταρικά), ενώ το 0,7% (2/268) αντιστοιχεί σε αποδιαφοροποιημένα ωοθηκικά καρκινώματα.

Καταγράφοντας το οικογενειακό ιστορικό των υπό μελέτη ασθενών, το 54,7% (152/278) αναφέρει οικογενειακό ιστορικό κακοηθειών μαστού/ωοθηκών και συναφών νεοπλασιών. Πιο αναλυτικά, 70 ασθενείς έχουν οικογενειακό ιστορικό καρκίνου μαστού, 14 ασθενείς με ιστορικό καρκίνου ωοθηκών, 23 ασθενείς με ιστορικό καρκίνων μαστού και ωοθηκών, 15 ασθενείς με ιστορικό καρκίνου παχέος εντέρου, 16 ασθενείς με ιστορικό καρκίνων μαστού και παχέος εντέρου, 9 ασθενείς με ιστορικό καρκίνων ωοθηκών και παχέος εντέρου, 2 ασθενείς με ιστορικό καρκίνου ενδομητρίου, 2 ασθενείς με ιστορικό καρκίνου μαστού και ενδομητρίου και μία ασθενής με ιστορικό καρκίνων μαστού, ωοθηκών και παχέος εντέρου. Επιπλέον, το 13% (37/285) των υπό μελέτη ασθενών έχει αναπτύξει δεύτερο πρωτοπαθή καρκίνο. Συγκεκριμένα, το 9,8% (28/285) των ασθενών, εκτός από καρκίνο ωοθηκών, έχει εμφανίσει πρωτοπαθή καρκίνο μαστού, το 2,1% (6/285) έχει διαγνωστεί με πρωτοπαθή καρκίνο ενδομητρίου, στο 0,7% (2/285) έχει διαγνωστεί πρωτοπαθής καρκίνος παγκρέατος, ενώ μία ασθενής (0,4%· 1/285) έχει εμφανίσει πρωτοπαθή καρκίνο παχέος εντέρου.

Από την ανάλυση του γονιδιακού πάνελ προέκυψε ότι το 29,1% (83/285) των ασθενών έφερε παθογόνους μεταλλάξεις σε γονίδια τα οποία σχετίζονται με μεγαλύτερη ή μικρότερη προδιάθεση στον καρκίνο των ωοθηκών, ενώ σε άλλα γονίδια εξ αυτών η προδιάθεση στον καρκίνο των ωοθηκών είναι υπό διερεύνηση. Η μέση ηλικία των ασθενών που φέρουν αυτές τις μεταλλάξεις είναι τα 53,6±10,6 έτη (εύρος:31-78 έτη). Την πλειονότητα των μεταλλάξεων συγκεντρώνουν τα γονίδια *BRCA1* (45,8%· 38/83) με μέση ηλικία διάγνωσης τα 50,0±10,9 έτη (εύρος:31-75 έτη) και *BRCA2* (22,9%· 19/83) με μέση ηλικία διάγνωσης τα 54,2±6,6 έτη (εύρος:43-69 έτη), με συνολικό ποσοστό που αγγίζει το 68,7% (57/83) των μεταλλάξεων που ανιχνεύθηκαν. Στις υπόλοιπες 26 ασθενείς (31,3%· 26/83) ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις σε γονίδια εκτός των *BRCA1/2*, με μέση ηλικία

διάγνωσης τα 58,5±10,9 έτη (εύρος:40-78 έτη). Συγκεκριμένα, 6 ασθενείς (7,2%· 6/83) έφεραν μεταλλάξεις στο γονίδιο *RAD51C*, 5 ασθενείς (6%· 5/83) έφεραν μεταλλάξεις σε γονίδια της ομάδας FANC, 4 ασθενείς (4,8%· 4/83) στο γονίδιο *PPM1D*, 2 (2,4%· 2/83) στο γονίδιο *PALB2* και μία παθολόγος μετάλλαξη ανιχνεύθηκε στα γονίδια *ATM*, *BLM*, *CHEK2*, *DIS3L2*, *MLH1*, *NBN*, *PMS1*, *PMS2* και *RECQL4*, αντιπροσωπεύοντας το 10,8% των συνολικών μεταλλάξεων (Σχήμα 5).

Κατανομή μεταλλάξεων σε ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών



Σχήμα 5: Γραφική απεικόνιση των μεταλλάξεων ανά γονίδιο στις 83 ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών που βρέθηκαν να φέρουν παθολόγους μεταλλάξεις στα υπό εξέταση γονίδια του Trusight Cancer panel.

Εξετάζοντας το οικογενειακό ιστορικό των ασθενών με μετάλλαξη, υπάρχουν πληροφορίες για τις 80 από τις 83 ασθενείς, όπου το 62,5% (50/80) αναφέρει ιστορικό κακοηθειών μαστού/ωοθηκών και άλλων συναφών νεοπλασιών στην οικογένειά τους. Συγκεκριμένα, 23 ασθενείς έχουν ιστορικό σε καρκίνο μαστού, 9

ασθενείς αναφέρουν ιστορικό σε καρκίνο ωοθηκών, 11 ασθενείς έχουν ιστορικό σε καρκίνους μαστού και ωοθηκών, 3 ασθενείς με ιστορικό καρκίνων μαστού και παγκρέατος, 2 ασθενείς με ιστορικό καρκίνων μαστού, ωοθηκών και παγκρέατος, μία ασθενής με ιστορικό καρκίνων μαστού και παχέος εντέρου και μία ασθενής με ιστορικό καρκίνων ωοθηκών και παχέος εντέρου. Οι υπόλοιπες 30 ασθενείς (37,5% 30/80) δεν αναφέρουν ιστορικό αντίστοιχων κακοηθειών. Στις ασθενείς με μετάλλαξη στο γονίδιο *BRCA1* αναφέρεται οικογενειακό ιστορικό κακοηθειών στο 69,5% (25/36) εξ αυτών, το αντίστοιχο ποσοστό στις ασθενείς με μετάλλαξη στο *BRCA2* αγγίζει το 52,6% (10/19), ενώ το 60% (12/25) των ασθενών με μετάλλαξη σε γονίδια εκτός των *BRCA1/2* αναφέρουν ιστορικό κακοηθειών στην οικογένειά τους.

Αναφορικά με την ιστοπαθολογία των διαγνώσεων των ασθενών με μετάλλαξη, υπάρχουν διαθέσιμες ιστολογικές εκθέσεις για τις 81 από τις 83 ασθενείς. Πιο αναλυτικά, τα ορώδη ωοθηκικά καρκινώματα αντιστοιχούν στο 89% (72/81) του συνόλου των διαγνώσεων, τα ενδομητριοειδή ωοθηκικά καρκινώματα αφορούν στο 5% (4/81), ενώ τα μικτά ωοθηκικά καρκινώματα αντιπροσωπεύουν το 6% (5/81) των διαγνώσεων (3 μικτά ορώδη/ενδομητριοειδή, 1 μικτό ορώδες/διαυγοκυτταρικό, 1 μικτό ενδομητριοειδές/διαυγοκυτταρικό). Οι ασθενείς με υψηλόβαθμο ορώδες ωοθηκικό καρκίνωμα έχουν συνολική συχνότητα μεταλλάξεων που αγγίζει το 33,8% (72/213) και για τις ασθενείς που φέρουν μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1/2* η συχνότητα περιορίζεται στο 24,9% (53/213). Αντιστοίχως, για τα ενδομητριοειδή καρκινώματα η συνολική συχνότητα μεταλλάξεων προσεγγίζει το 16,7% (4/24), ενώ για τις ασθενείς που φέρουν μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1/2* η συχνότητα περιορίζεται στο 4,2% (1/24). Πιο συγκεκριμένα, η πλειονότητα των ασθενών με μετάλλαξη στο γονίδιο *BRCA1* έχει διαγνωστεί με ορώδες ωοθηκικό καρκίνωμα (95%· 35/37), μία ασθενής με ενδομητριοειδές ωοθηκικό καρκίνωμα (2,5%, 1/37) και μία ασθενής με μικτό ορώδες/ενδομητριοειδές ωοθηκικό καρκίνωμα (2,5%, 1/37). Ομοίως, για τις ασθενείς με μετάλλαξη στο γονίδιο *BRCA2*, η πλειονότητα των ιστοπαθολογιών αφορά σε ορώδη ωοθηκικά καρκινώματα (95%, 18/19), ενώ μία ασθενής έχει διαγνωστεί με μικτό ορώδες/διαυγοκυτταρικό ωοθηκικό καρκίνωμα (5%, 1/19). Στην ομάδα των ασθενών με μετάλλαξη σε γονίδια εκτός των *BRCA1/2*

παρατηρείται μεγαλύτερη ετερογένεια στις ιστοπαθολογίες, όπου τα ορώδη ωοθηκικά καρκινώματα αντιστοιχούν στο 76% (19/25), τα ενδομητριοειδή καρκινώματα στο 12% (3/25) και τα μικτά ωοθηκικά καρκινώματα στο 12% (3/25) (1 μικτό διαυγοκυτταρικό/ενδομητριοειδές, 2 μικτά ορώδη/ενδομητριοειδή) του συνόλου των διαγνώσεων σε αυτές τις ασθενείς.

Εστιάζοντας στο ατομικό ιστορικό των ασθενών με μετάλλαξη παρατηρείται ότι το 22,9% εξ αυτών (19/83) έχει διαγνωστεί με δεύτερο πρωτοπαθή καρκίνο. Ειδικότερα, 16 ασθενείς έχουν εμφανίσει καρκίνο μαστού, μία ασθενής έχει διαγνωστεί με καρκίνο παχέος εντέρου, μία ασθενής με καρκίνο παγκρέατος και μία ασθενής με καρκίνο ενδομητρίου. Από τις ασθενείς με μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1/2*, το 22,8% (13/57) έχει διαγνωστεί με δεύτερο πρωτοπαθή καρκίνο (11 ασθενείς με καρκίνο μαστού, μία ασθενής με καρκίνο παχέος εντέρου και μία ασθενής με καρκίνο παγκρέατος). Παρόμοιο ποσοστό υπολογίζεται και στις ασθενείς με μεταλλάξεις σε γονίδια εκτός των *BRCA1/2*, όπου το 23,1% (6/26) εξ αυτών έχει εμφανίσει δεύτερο πρωτοπαθή καρκίνο (5 ασθενείς με καρκίνο μαστού και μία ασθενής με καρκίνο ενδομητρίου). Ως προς το σύνολο των ασθενών που έχουν διαγνωστεί με δεύτερο πρωτοπαθή καρκίνο μαστού (n=29), το 55,2% (16/29) φέρει μεταλλάξεις σε ένα από τα εξετασθέντα γονίδια, ενώ το 37,9% (11/29) φέρει μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1/2*. Αξίζει να σημειωθεί ότι στο 13,8% (4/29) των ασθενών με δεύτερο πρωτοπαθή καρκίνο μαστού και μεταλλάξεις στα υπό εξέταση γονίδια η διάγνωση του καρκίνου των ωοθηκών προηγήθηκε της διάγνωσης του καρκίνου του μαστού. Αναλυτικά στοιχεία για το ατομικό και οικογενειακό ιστορικό των ασθενών που βρέθηκαν να φέρουν παθογόνους μεταλλάξεις στα υπό εξέταση γονίδια του Trusight Cancer panel συνοψίζονται στον Πίνακα 20.

Αναλύοντας την ομάδα των ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών στις οποίες δεν ανιχνεύθηκε καμία παθογόνος μετάλλαξη στα υπό ανάλυση γονίδια (n=202), υπολογίζεται ότι η μέση ηλικία διάγνωσης καρκίνου των ωοθηκών είναι τα 54,7±11,7 έτη (εύρος:26-80 έτη). Διαθέσιμα στοιχεία οικογενειακού ιστορικού κακοηθειών υπάρχουν για τις 198 από τις 202 ασθενείς, όπου βρέθηκε ότι το 50,5% (100/198) των ασθενών αυτών αναφέρουν ιστορικό συναφών κακοηθειών στην

οικογένειά τους. Πιο αναλυτικά, 48 ασθενείς έχουν ιστορικό καρκίνου μαστού, 8 ασθενείς παρουσιάζονται με ιστορικό καρκίνου ωοθηκών, 10 ασθενείς με ιστορικό καρκίνων μαστού και ωοθηκών, 13 ασθενείς με ιστορικό καρκίνου παχέος εντέρου, 11 ασθενείς με ιστορικό καρκίνων μαστού και παχέος εντέρου, 5 ασθενείς με ιστορικό καρκίνων ωοθηκών και παχέος εντέρου, 2 ασθενείς με ιστορικό καρκίνου ενδομητρίου, 2 ασθενείς με ιστορικό καρκίνων μαστού και ενδομητρίου, μία ασθενής με ιστορικό καρκίνων μαστού, ωοθηκών και παχέος εντέρου, ενώ οι υπόλοιπες 98 ασθενείς (49,5%· 98/198) δεν αναφέρουν ιστορικό αντίστοιχων κακοηθειών.

Αναφορικά με την ιστοπαθολογία των διαγνώσεων στις ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών χωρίς μετάλλαξη στα υπό ανάλυση γονίδια, διαθέσιμες ιστολογικές εκθέσεις υπάρχουν για τις 187 από τις 202 ασθενείς. Συνεπώς, υπολογίζεται ότι το 77% (144/187) των ιστοπαθολογιών αντιστοιχεί στα ορώδη ωοθηκικά καρκινώματα, ενώ το 4,3% (8/187) σε ορώδη καρκινώματα οριακής κακοήθειας. Τα ενδομητριοειδή ωοθηκικά καρκινώματα αντιπροσωπεύουν το 10,7% (20/187), τα διαυγοκυτταρικά ωοθηκικά καρκινώματα απαντώνται στο 3,2% (6/187), τα μικτά ωοθηκικά καρκινώματα αφορούν στο 3,2% (6/187) (2 μικτά ενδομητριοειδή/διαυγοκυτταρικά, 2 μικτά ορώδη/ενδομητριοειδή/διαυγοκυτταρικά, 1 μικτό ορώδες/ενδομητριοειδές και 1 μικτό ορώδες/διαυγοκυτταρικό), ενώ το 1,1% (2/187) αντιστοιχεί σε αποδιαφοροποιημένα ωοθηκικά καρκινώματα.

Εξετάζοντας το ατομικό ιστορικό των ασθενών με καρκίνο ωοθηκών χωρίς καμία παθογόνο μετάλλαξη στα υπό εξέταση γονίδια, παρατηρείται ότι το 8,9% (18/202) αυτών έχει διαγνωστεί με δεύτερο πρωτοπαθή καρκίνο. Συγκεκριμένα, 13 ασθενείς έχουν εμφανίσει καρκίνο μαστού, 4 ασθενείς έχουν παρουσιάσει καρκίνο ενδομητρίου και μία ασθενής έχει διαγνωστεί με καρκίνο παγκρέατος. Στον Πίνακα 18 καταγράφονται τα χαρακτηριστικά για τη μέση ηλικία διάγνωσης, το ατομικό και οικογενειακό ιστορικό των ασθενών ανά ομάδα (ομάδα ασθενών με μετάλλαξη/ομάδα ασθενών χωρίς μετάλλαξη/ομάδα όλων των υπό μελέτη ασθενών).

Συγκρίνοντας τα χαρακτηριστικά της ομάδας των ασθενών με μετάλλαξη (n=83) με τα αντίστοιχα χαρακτηριστικά της ομάδας των ασθενών χωρίς μετάλλαξη

(n=202) παρατηρείται ότι οι ασθενείς με μετάλλαξη στο γονίδιο *BRCA1* έχουν στατιστικά μικρότερη ηλικία διάγνωσης καρκίνου των ωθηκών σε σχέση με τις ασθενείς στις οποίες δεν ανιχνεύθηκε καμία παθογόνος μετάλλαξη (50,0 έτη και 54,7 έτη, αντίστοιχα) ($p=0.0248$, 95% CI [-8.7, 0.6]). Παρόμοια στατιστικά σημαντική διαφορά στη μέση ηλικία διάγνωσης εντοπίζεται μεταξύ των ασθενών με μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1/2* και στις ασθενείς χωρίς μετάλλαξη (51,4 έτη και 54,7 έτη, αντίστοιχα) ($p=0.0566$, 95% CI [-6,6, 0.1]). Επιπλέον, η μέση ηλικία εμφάνισης καρκίνου των ωθηκών στις ασθενείς με μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1/2* συγκριτικά με αυτή των ασθενών με μεταλλάξεις σε γονίδια εκτός των *BRCA1/2* είναι μικρότερη (51,4 έτη και 58,5 έτη, αντίστοιχα) και η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική ($p=0.0039$, 95% CI [2.4, 11.9]). Αντίθετα, παρόλο που παρατηρείται διαφορά στη μέση ηλικία διάγνωσης καρκίνου των ωθηκών μεταξύ των ασθενών με μεταλλάξεις στα γονίδια εκτός των *BRCA1/2* και των ασθενών χωρίς μετάλλαξη (58,5 έτη και 54,7 έτη, αντίστοιχα), η διαφορά αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική ($p=0.1107$, 95% CI [-0.9, 8.6]). Παρόμοια μη στατιστικά σημαντική διαφορά προκύπτει και κατά τη σύγκριση των ασθενών με μετάλλαξη στο γονίδιο *BRCA1* και των ασθενών με μετάλλαξη στο γονίδιο *BRCA2* (50,0 έτη και 54,2 έτη, αντίστοιχα) ($p=0.1354$, 95% CI [-1.3, 9.6]). Από την άλλη πλευρά, δεν παρατηρείται διαφορά στη μέση ηλικία διάγνωσης μεταξύ των ασθενών με μετάλλαξη στο γονίδιο *BRCA2* και των ασθενών χωρίς μετάλλαξη (54,2 έτη και 54,7 έτη, αντίστοιχα). Συνεπώς, η παρουσία μεταλλάξεων στα γονίδια *BRCA1/2* φαίνεται να σχετίζεται με μικρότερη ηλικία εμφάνισης καρκίνου των ωθηκών στις γυναίκες αυτές σε σχέση με τις γυναίκες που είτε φέρουν μεταλλάξεις σε γονίδια εκτός των *BRCA1/2* είτε δε φέρουν καμία παθογόνο μετάλλαξη στα υπό εξέταση γονίδια.

Αναφορικά με το οικογενειακό ιστορικό των υπό μελέτη ασθενών παρατηρείται ότι οι ασθενείς με μετάλλαξη στο γονίδιο *BRCA1* έχουν μεγαλύτερο ποσοστό παρουσίας ιστορικού κακοηθειών συγκριτικά με το αντίστοιχο ποσοστό στις ασθενείς στις οποίες δεν ανιχνεύθηκε καμία παθογόνος μετάλλαξη στα υπό μελέτη γονίδια (69,5% και 50,5%, αντίστοιχα) ($p=0.0359$, 95% CI [1.3, 26.5]). Αντίθετα, δεν παρατηρείται διαφορά στα ποσοστά παρουσίας οικογενειακού ιστορικού μεταξύ των ασθενών με μετάλλαξη στο γονίδιο *BRCA2* και στις ασθενείς

χωρίς μετάλλαξη (52,6% και 50,5%, αντίστοιχα). Συγκρίνοντας τα ποσοστά παρουσίας οικογενειακού ιστορικού στις ασθενείς με μετάλλαξη στο γονίδιο *BRCA1* και στις ασθενείς με μετάλλαξη στο γονίδιο *BRCA2* προκύπτει μια διαφορά της τάξεως του 16,9%, η οποία, ωστόσο, δεν είναι στατιστικά σημαντική (69,5% και 52,6%, αντίστοιχα) ($p=0.2195$, 95% CI [-8.9, 41.3]). Το ίδιο ισχύει και στις ομάδες των ασθενών με μετάλλαξη στα *BRCA1/2* και των ασθενών με μετάλλαξη σε γονίδια εκτός των *BRCA1/2* (63,6% και 60%, αντίστοιχα) ($p=0.7594$, 95% CI [-17.6, 26.0]). Επιπλέον, παρόλο που υπάρχει διαφορά στα ποσοστά παρουσίας οικογενειακού ιστορικού μεταξύ των ασθενών με μετάλλαξη και των ασθενών χωρίς μετάλλαξη, η διαφορά αυτή προσεγγίζει χωρίς να φτάνει τη στατιστική σημαντικότητα (62,5% και 50,5%, αντίστοιχα) ($p=0.0697$, 95% CI [-0.9, 23.9]). Συμπερασματικά, διαπιστώνεται ότι η παρουσία οικογενειακού ιστορικού κακοηθειών είναι πιο έντονη στις ασθενείς με μετάλλαξη στο γονίδιο *BRCA1* συγκριτικά με τις ασθενείς στις οποίες δεν ανιχνεύεται καμία παθογόνος μετάλλαξη στα υπό μελέτη γονίδια, ενώ δε φαίνεται να διαφοροποιείται σημαντικά στο οικογενειακό ιστορικό ασθενών με παθογόνους μεταλλάξεις σε οποιοδήποτε από τα υπό εξέταση γονίδια.

Αξιολογώντας την ιστοπαθολογία των διαγνώσεων καρκίνου των ωοθηκών στις υπό μελέτη ασθενείς παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ποσοστών παρουσίας ορωδών καρκινωμάτων μεταξύ των ασθενών με μετάλλαξη και των ασθενών χωρίς μετάλλαξη (89% και 77%, αντίστοιχα) ($p=0.0227$, 95% CI [1.8, 20.3]). Αυτή η στατιστικά σημαντική διαφορά είναι πιο εμφανής κατά τη σύγκριση των ποσοστών παρουσίας ορωδών καρκινωμάτων μεταξύ των ασθενών με μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1/2* και των ασθενών χωρίς μετάλλαξη (95% και 77%, αντίστοιχα) ($p=0.0026$, 95% CI [7.3, 25.3]). Ομοίως, το στατιστικά σημαντικό αυτό εύρημα εντοπίζεται και κατά τη σύγκριση των ασθενών με μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1/2* και των ασθενών με μεταλλάξεις σε γονίδια εκτός των *BRCA1/2* (95% και 76%, αντίστοιχα) ($p=0.0116$, 95% CI [3.5, 38.7]). Αντίθετα, δεν υπάρχει διαφορά μεταξύ των ποσοστών παρουσίας συνιστώσας ορώδους τύπου στις διαγνώσεις ωοθηκικών καρκινωμάτων μεταξύ των ασθενών που έφεραν μεταλλάξεις σε γονίδια εκτός των *BRCA1/2* και των ασθενών χωρίς μεταλλάξεις (76% και 77%, αντίστοιχα). Κατά συνέπεια, εξάγεται το συμπέρασμα ότι η παρουσία μεταλλάξεων στα γονίδια

BRCA1/2 συνδέεται περισσότερο με διάγνωση ορώδους ωθηκικού καρκινώματος σε σχέση με τις ασθενείς που είτε φέρουν μεταλλάξεις σε γονίδια εκτός των *BRCA1/2* είτε δε φέρουν καμία παθογόνο μετάλλαξη στα υπό εξέταση γονίδια.

Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση προκύπτει κατά την αξιολόγηση των ενδομητριοειδών ωθηκικών καρκινωμάτων. Συγκεκριμένα, υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ποσοστών παρουσίας ενδομητριοειδών ωθηκικών καρκινωμάτων στις ασθενείς χωρίς μεταλλάξεις και στις ασθενείς με μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1/2* (10,7% και 1,8%, αντίστοιχα) ($p=0.0381$, 95% CI [0.4, 14.4]). Η στατιστική σημαντικότητα αυτής της διαφοράς εντοπίζεται και κατά τη σύγκριση των ποσοστών παρουσίας ενδομητριοειδών καρκινωμάτων μεταξύ των ασθενών με μεταλλάξεις στα *BRCA1/2* και των ασθενών με μεταλλάξεις σε γονίδια εκτός των *BRCA1/2* (1.8% και 12%, αντίστοιχα) ($p=0.0520$, 95% CI [-0.8, 28.2]). Επιπλέον, τα ποσοστά παρουσίας ενδομητριοειδών ωθηκικών καρκινωμάτων μεταξύ των ασθενών χωρίς μεταλλάξεις και των ασθενών με μεταλλάξεις σε γονίδια εκτός των *BRCA1/2* είναι παραπλήσια (10,7% και 12%, αντίστοιχα). Ως εκ τούτου, συμπεραίνεται ότι τα ενδομητριοειδή ωθηκικά καρκινώματα είναι λιγότερο συχνά στις ασθενείς με μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1/2*. Από την άλλη πλευρά, οι ασθενείς που είχαν διαγνωστεί με καρκίνο ωθηκών διαυγοκυτταρικού τύπου δεν έφεραν καμία παθογόνο μετάλλαξη σε κανένα από τα υπό εξέταση γονίδια.

Προχωρώντας στην ανάλυση των μικτών ωθηκικών καρκινωμάτων προκύπτει μια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ποσοστών παρουσίας μικτών καρκινωμάτων στις ασθενείς με μεταλλάξεις σε γονίδια εκτός των *BRCA1/2* και στις ασθενείς χωρίς καμία μετάλλαξη στα υπό εξέταση γονίδια (12% και 3,2%, αντίστοιχα) ($p=0.0407$, 95% CI [0.2, 26.8]). Επιπλέον, παρατηρείται διαφορά στα ποσοστά παρουσίας μικτών ωθηκικών καρκινωμάτων μεταξύ των ασθενών με μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1/2* και των ασθενών με μεταλλάξεις σε γονίδια εκτός των *BRCA1/2* (1,8% και 12%, αντίστοιχα), η οποία αγγίζει τη στατιστική σημαντικότητα ($p=0.0520$, 95% CI [-0.8, 28.2]). Συνεπώς, η παρουσία μικτών ωθηκικών καρκινωμάτων, κυρίως αυτών με συνιστώσα ενδομητριοειδούς τύπου, είναι πιο συχνή σε ασθενείς που φέρουν μεταλλάξεις σε γονίδια εκτός των *BRCA1/2*

από ότι σε ασθενείς είτε με μεταλλάξεις στα γονίδια αυτά είτε χωρίς καμία παθογόνο μετάλλαξη στα υπό εξέταση γονίδια.

Αναφορικά με την παρουσία δεύτερου πρωτοπαθούς καρκίνου στο ατομικό ιστορικό των υπό μελέτη ασθενών, παρατηρείται ότι οι ασθενείς με μεταλλάξεις στα υπό εξέταση γονίδια έχουν μεγαλύτερο ποσοστό εμφάνισης δεύτερου πρωτοπαθούς καρκίνου σε σχέση με τις ασθενείς χωρίς καμία παθογόνο μετάλλαξη (22,9% και 8,9, αντίστοιχα), ένα εύρημα με στατιστική σημαντικότητα ($p=0.0014$, 95% CI [4.9, 24.6]). Η διαπίστωση αυτή ισχύει τόσο κατά τη σύγκριση των ασθενών με μεταλλάξεις στα *BRCA1/2* και των ασθενών χωρίς μεταλλάξεις (22,8% και 8,9%, αντίστοιχα) ($p=0.0044$, 95% CI [3.8, 26.7]) όσο και κατά τη σύγκριση των ασθενών με μεταλλάξεις σε γονίδια εκτός των *BRCA1/2* και των ασθενών χωρίς μεταλλάξεις (23,1% και 8,9%, αντίστοιχα) ($p=0.0267$, 95% CI [1.2, 33.4]). Επομένως, οι ασθενείς με παθογόνους μεταλλάξεις είτε στα γονίδια *BRCA1/2* είτε σε άλλα γονίδια είναι πιο πιθανό να διαγνωστούν με δεύτερο πρωτοπαθή καρκίνο, όπως καρκίνο μαστού, παγκρέατος, ενδομητρίου ή παχέος εντέρου, συγκριτικά με τις ασθενείς που δε φέρουν καμία παθογόνο μετάλλαξη στα υπό εξέταση γονίδια. Αναλυτικά τα χαρακτηριστικά της ομάδας όλων των υπό μελέτη ασθενών συγκεντρώνονται στον Πίνακα 21 στην ενότητα «Συμπληρωματικό Υλικό».

Πίνακας 18: Συγκεντρωτικά στοιχεία για τη μέση ηλικία διάγνωσης, το οικογενειακό και ατομικό ιστορικό, καθώς και την ιστοπαθολογία των διαγνώσεων καρκίνου των ωοθηκών στις επιμέρους ομάδες ασθενών (Ασθενείς με μετάλλαξη (n=83), Ασθενείς με μετάλλαξη στο *BRCA1* (n=38), Ασθενείς με μετάλλαξη στο *BRCA2* (n=19), Ασθενείς με μετάλλαξη στα *BRCA1/2* (n=57), Ασθενείς με μετάλλαξη εκτός των *BRCA1/2* (n=26), Ασθενείς χωρίς μετάλλαξη (n=202), Υπό μελέτη ομάδα ασθενών (n=285)).

	Ασθενείς με μετάλλαξη (n=83)	Ασθενείς με μετάλλαξη στο <i>BRCA1</i> (n=38)	Ασθενείς με μετάλλαξη στο <i>BRCA2</i> (n=19)	Ασθενείς με μετάλλαξη στα <i>BRCA1/2</i> (n=57)	Ασθενείς με μετάλλαξη εκτός των <i>BRCA1/2</i> (n=26)	Ασθενείς χωρίς μετάλλαξη (n=202)	Υπό μελέτη ομάδα ασθενών (n=285)
ΜΕΣΗ ΗΛΙΚΙΑ	53,63855422±10,62966203	50,02631579±10,90620166	54,15789474±6,56813146	51,4035088±9,81409273	58,53846154±10,88569986 (εύρος:40-	54,6584158415842±11,72008326	53,1824561403509±12,09971951

ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ± STD	(εύρος:31-78)	(εύρος:31-75)	(εύρος:43-69)	(εύρος:31-75)	78)	(εύρος:26-80)	(εύρος:20-80)
ΙΣΤΟΡΙΚΟ	62,5% (50/80)	69,5% (25/36)	52,6% (10/19)	63,6% (35/55)	60% (12/25)	50,5% (100/198)	54,7% (152/278)
ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ	89% ορώδη (72/81)	95% ορώδη (35/37)	95% ορώδη (18/19)	95% ορώδη (53/56)	76% ορώδη (19/25)	77% ορώδη (144/187) + 4,3% ορώδη οριακής κακοήθειας (8/187)	79,5% ορώδη (213/268) + 4,1% ορώδη οριακής κακοήθειας (11/268)
	4 ενδομητριοειδή (5%, 4/81)	1 ενδομητριοειδές (2,7%, 1/37)	1 μικτό ορώδες/διαυγοκυτταρικό (5%, 1/19)	1,8% (1/56) ενδομητριοειδή	1 μικτό διαυγοκυτταρικό/ενδομητριοειδές (4%, 1/25)	20 ενδομητριοειδή (10,7%, 20/187)	9% ενδομητριοειδή (24/268)
	5 μικτά (6,2%, 5/81) 3 μικτά ορώδη/ενδομητριοειδή (3,7%, 3/81)	1 μικτό ορώδες/ενδομητριοειδές (2,7%, 1/37)		1,8% (1/56) μικτά	2 μικτά ορώδες/ενδομητριοειδές (8%, 2/25)	6 διαυγοκυτταρικά (3,2%, 6/187)	2,2% διαυγοκυτταρικά (6/268)
	1 μικτό ορώδες/διαυγοκυτταρικό (1,23%, 1/81)	1 μη διαθέσιμη ιστολογική			3 ενδομητριοειδή (12%, 3/25)	6 μικτά (3,2%, 6/187)	4,5% μικτά (12/268)
	1 μικτό διαυγοκυτταρικό/ενδομητριοειδές (1,23%, 1/81)				1 μη διαθέσιμη ιστολογική	2 αποδιαφοροποιημένα (1,1%, 2/187)	0,7% (2/268) αποδιαφοροποιημένα
	2 μη διαθέσιμες ιστολογικές					15 μη διαθέσιμες ιστολογικές	17 μη διαθέσιμες ιστολογικές
2ος ΠΡΩΤΟΠΑΘΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ	19 (22,9%, 19/83) (16 καρκίνοι μαστού +1 καρκίνος παχέος εντέρου +1 καρκίνος παγκρέατος +1 καρκίνος ενδομητρίου)	9 (23,7%, 9/38) (8 καρκίνοι μαστού + 1 καρκίνος παχέος εντέρου)	4 (21,1%, 4/19) (3 καρκίνοι μαστού +1 καρκίνος παγκρέατος)	13 (22,8%, 13/57) (11 καρκίνοι μαστού + 1 καρκίνος παχέος εντέρου + 1 καρκίνος παγκρέατος)	6 (23,1%, 6/26) (5 καρκίνοι μαστού +1 καρκίνος ενδομητρίου)	8,9% (18/202)	13% (37/285)

Πίνακας 19: Συχνότητα μεταλλάξεων ως προς το σύνολο των υπό μελέτη ασθενών (n=285) και ως προς το σύνολο των ασθενών με μετάλλαξη (n=83), καθώς και η μέση ηλικία διάγνωσης καρκίνου των ωθηκών στις ασθενείς που βρέθηκαν να φέρουν παθογόνους μεταλλάξεις στα υπό εξέταση γονίδια.

Γονίδιο	Συχνότητα μεταλλάξεων		Μέση ηλικία διάγνωσης καρκίνου των ωοθηκών
	Ως προς το σύνολο των ασθενών (n=285)	Ως προς το σύνολο των ασθενών με μετάλλαξη (n=83)	
BRCA1	13,3% (38/285)	45,8% (38/83)	50,0±10,9 έτη (εύρος:31-75 έτη)
BRCA2	6,7% (19/285)	22,9% (19/83)	54,2±6,6 έτη (εύρος:43-69 έτη)
Λοιπά γονίδια	9,1% (26/285)	31,3% (26/83)	58,5±10,9 έτη (εύρος:40-78 έτη)
Συνολική συχνότητα μεταλλάξεων σε ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών	29,1% (83/285)		53,6±10,6 έτη (εύρος:31-78 έτη)

Επί του συνόλου των υπό εξέταση ασθενών, η συχνότητα μεταλλάξεων για το γονίδιο *BRCA1* είναι 13,3% (38/285), για το γονίδιο *BRCA2* είναι 6,7% (19/285) και για τα υπόλοιπα γονίδια αγγίζει το 9,1% (26/285) (Πίνακας 19). Στο 1,4% (4/285) των ασθενών ανιχνεύθηκαν δύο παθογόνοι μεταλλάξεις σε γονίδια είτε μέτριας/χαμηλής είτε άγνωστης για τον καρκίνο των ωοθηκών διεισδυτικότητας. Πιο αναλυτικά, σε 6 ασθενείς (2,1%· 6/285) ανιχνεύθηκε παθογόνος μετάλλαξη στο γονίδιο *RAD51C* με μέση ηλικία διάγνωσης τα 62,5±11,1 έτη. Πρέπει να σημειωθεί ότι 4 από τις 6 ασθενείς έφεραν τη μετάλλαξη c.706-2A>C στην περιοχή ματίσματος στο ιντρόνιο 4 του γονιδίου *RAD51C* και έχουν διαγνωστεί με ορώδες ωοθηκικό καρκίνωμα. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη έχει εντοπιστεί συνολικά σε 15 ανεξάρτητες οικογένειες ελληνικής καταγωγής. Στις άλλες 2 ασθενείς με διάγνωση μικτών ωοθηκικών καρκινωμάτων (μικτό ορώδες/ενδομητριοειδές και μικτό ενδομητριοειδές/διαυγοκυτταρικό) έχει ανιχνευθεί μία νοηματική μετάλλαξη (p.Arg193Ter) που οδηγεί σε σχηματισμό πρόωρου κωδικονίου τερματισμού στο εξόνιο 4 του γονιδίου και μία πλαισιοτροποποιητική μετάλλαξη (c.363_364delAG) στο εξόνιο 2 του γονιδίου που, ομοίως, οδηγεί σε σχηματισμό πρόωρου κωδικονίου τερματισμού. Μόνο μία από τις 6 ασθενείς έχει εμφανίσει και δεύτερο πρωτοπαθή καρκίνο, συγκεκριμένα αμφοτερόπλευρο καρκίνο μαστού, ενώ 5 από τις 6 ασθενείς αναφέρουν οικογενειακό ιστορικό καρκίνων μαστού, ωοθηκών και παγκρέατος.

Σε 5 ασθενείς (1,8%· 5/285) ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις σε γονίδια της οικογένειας FANC (*FANCL*, *FANCD2*, *FANCE*) με μέση ηλικία διάγνωσης τα 58,6±13,5 έτη. Οι 3 από τις 5 ασθενείς έχουν διαγνωστεί με ορώδες ωθητικό καρκίνωμα, μία με ενδομητριοειδές καρκίνωμα, ενώ για μία ασθενή δεν υπήρχε διαθέσιμη ιστολογική έκθεση. Από τις 5 αυτές ασθενείς οι 3 είχαν οικογενειακό ιστορικό κακοηθειών μαστού. Σε επίπεδο μεταλλάξεων, σε 3 ασθενείς εντοπίστηκαν μεταλλάξεις στο γονίδιο *FANCL* (μία ασθενής με τη μετάλλαξη c.217-2A>G και δύο ασθενείς με τη μετάλλαξη p.Met1Thr), μία πλαισιοτροποποιητική μετάλλαξη στο γονίδιο *FANCD2* (c.2917_2918delTC) και μία μετάλλαξη σε περιοχή ματίσματος στο γονίδιο *FANCE* (c.1383+1G>T).

Στο γονίδιο *PPM1D* εντοπίστηκαν παθογόνοι μεταλλάξεις σε 4 ασθενείς (1,4%· 4/285) με μέση ηλικία διάγνωσης τα 67,3±7,1 έτη. Οι 4 αυτές ασθενείς έχουν διαγνωστεί με ορώδες καρκίνωμα των ωθηκών και δύο εξ αυτών έχουν οικογενειακό ιστορικό καρκίνου μαστού. Σε δύο ασθενείς εντοπίστηκε από μία μη νοηματική μετάλλαξη (p.Arg552Ter και p.Glu423Ter) σε μωσαϊκισμό. Στις άλλες δύο ασθενείς ανιχνεύθηκε από μία πλαισιοτροποποιητική μετάλλαξη (c.1529delA (p.Asn512IlefsTer2) και c.1378delA). Η μετάλλαξη c.1378delA συνοδευόταν από μία παρανοηματική παραλλαγή άγνωστης κλινικής σημασίας στο γονίδιο *PALB2* (p.Thr1099Arg) και η ασθενής που φέρει τα δύο αυτά ευρήματα έχει διαγνωστεί με πρωτοπαθή καρκίνο μαστού, ενώ δεν αναφέρει οικογενειακό ιστορικό κακοηθειών.

Σε δύο ασθενείς ανιχνεύθηκε από μία παθογόνος μετάλλαξη στο γονίδιο *PALB2* (c.2747_2748+4delAGGTAA και p.Glu916fsTer7), όπου η μία εξ αυτών, η πλαισιοτροποποιητική μετάλλαξη p.Glu916fsTer7, συνοδευόταν από μία άλλη πλαισιοτροποποιητική μετάλλαξη στο γονίδιο *SLX4* (c.4089_4090delAG, p.Asp1365ProfsTer26). Στη συγκεκριμένη ασθενή έχει διαγνωστεί πορογενές διηθητικό καρκίνωμα του μαστού σε ηλικία 44 ετών και υψηλόβαθμο ορώδες ωθητικό καρκίνωμα σε ηλικία 48 ετών.

Επιπλέον, από μία παθογόνος μετάλλαξη ανιχνεύθηκε στα γονίδια *CHEK2*, *NBN*, *MLH1*, *PMS2*, *PMS1*, *RECQL4*, *BLM*, *ATM* και *DIS3L2* με μέση ηλικία διάγνωσης καρκίνου των ωθηκών τα 53,3±9,4. Οι 5 από τις 9 ασθενείς με μεταλλάξεις στα

προαναφερθέντα γονίδια δεν αναφέρουν οικογενειακό ιστορικό κακοηθειών. Η ασθενής με μετάλλαξη στο γονίδιο *CHEK2* έχει διαγνωστεί με καρκίνο ωοθηκών ενδομητριοειδούς τύπου στην ηλικία των 42 ετών και πρωτοπαθή καρκίνο του ενδομητρίου στην ίδια ηλικία. Η μετάλλαξη που εντοπίστηκε στο γονίδιο *MLH1* αφορά σε ασθενή που έχει διαγνωστεί με καρκίνο ωοθηκών ενδομητριοειδούς τύπους σε ηλικία 47 ετών και πρωτοπαθή καρκίνο μαστού λοβιακού τύπου σε ηλικία 62 ετών. Από την άλλη πλευρά, ανιχνεύθηκε μία μη νοηματική μετάλλαξη στο γονίδιο *PMS1* (p.Arg277Ter), η οποία συνοδευόταν από μία παρανοηματική μετάλλαξη στο γονίδιο *NBN* (p.Ile171Val), για την οποία υπάρχουν αντικρουόμενα στοιχεία για την παθογονικότητάς και επί του παρόντος θεωρείται πιθανός παράγοντας κινδύνου. Η συγκεκριμένη ασθενής έχει διαγνωστεί με μικτό ορώδες/ενδομητριοειδές καρκίνωμα των ωοθηκών σε ηλικία 55 ετών και αναφέρει οικογενειακό ιστορικό καρκίνων μαστού, ωοθηκών και παγκρέατος. Ωστόσο, σε μία ασθενή ανιχνεύθηκε μία πλαισιοτροποποιητική μετάλλαξη στο γονίδιο *NBN* (c.657_661delACAAA/p.Lys219fsTer16), η οποία προκαλεί το σχηματισμό πρόωρου κωδικονίου τερματισμού στο εξόνιο 6 του γονιδίου. Η ασθενής αυτή έχει διαγνωστεί με χαμηλόβαθμο ορώδες καρκίνωμα των ωοθηκών σε ηλικία 40 ετών και αναφέρει οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού.

Στο γονίδιο *PMS2* ανιχνεύθηκε μία πλαισιοτροποποιητική μετάλλαξη (c.2186_2187delTC) σε μία ασθενή με υψηλόβαθμο ορώδες καρκίνωμα των ωοθηκών σε ηλικία 56 ετών, η οποία αναφέρει οικογενειακό ιστορικό καρκίνου των ωοθηκών. Μία πλαισιοτροποποιητική μετάλλαξη ανιχνεύθηκε και στο γονίδιο *ATM* (c.5975_5979delAAAGT) σε μία ασθενή που έχει διαγνωστεί με υψηλόβαθμο ορώδες καρκίνωμα των ωοθηκών σε ηλικία 55 ετών, χωρίς οικογενειακό ιστορικό κακοηθειών.

Επιπλέον, μία πλαισιοτροποποιητική μετάλλαξη εντοπίστηκε στο γονίδιο *DIS3L2* (c.1572delG), όπου η ασθενής που τη φέρει έχει διαγνωστεί με υψηλόβαθμο ορώδες ωοθηκικό καρκίνωμα σε ηλικία 68 ετών, χωρίς οικογενειακό ιστορικό. Μία ασθενής φέρει μία μη νοηματική μετάλλαξη στο γονίδιο *BLM* (p.Q548Ter), η οποία έχει εμφανίσει ορώδες ωοθηκικό καρκίνωμα grade II σε ηλικία 52 ετών, χωρίς να

αναφέρει ιστορικό κακοηθειών στην οικογένειά της. Τέλος, στο γονίδιο *RECQL4* ανιχνεύθηκε μία πλαισιοτροποποιητική μετάλλαξη (c.2300delG) σε μία ασθενή με υψηλόβαθμο ορώδες καρκίνωμα των ωοθηκών σε ηλικία 65 ετών, ομοίως, χωρίς οικογενειακό ιστορικό κακοηθειών. Ακολούθως, αναπαριστάται σχηματικά η κατανομή των μεταλλάξεων ανά γονίδιο που ανιχνεύθηκαν σε 83 ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών.

Πίνακας 20: Συγκεντρωτικά στοιχεία για τις 83 ασθενείς, που βρέθηκαν να φέρουν παθογόνους μεταλλάξεις στα υπό εξέταση γονίδια του Trusight Cancer panel, για το ατομικό και οικογενειακό ιστορικό τους, καθώς και η ονομασία των αντίστοιχων μεταλλάξεων ανά γονίδιο.

A/A	Τύπος κακοήθειας (ηλικία διάγνωσης)	Ιστοπαθολογία	Οικογενειακό ιστορικό	Γονίδιο	Μετάλλαξη
1927	καρκίνος ωοθηκών (43 χρ) / καρκίνος μαστού (45 χρ)	ορώδες grade III / διηθητικό πορογενές grade III, ER+(95%), PR+(60%), HER2-(2+, CISH-), Ki67:30%	ελεύθερο	<i>BRCA1</i>	p.Arg1443Ter
1993	καρκίνος ωοθηκών (47 χρ)	ορώδες grade III	3 καρκίνοι μαστού και 2 καρκίνοι ωοθηκών	<i>BRCA1</i>	c.3756_3759delGTCT
2002	καρκίνος μαστού (38 χρ) & καρκίνος ωοθηκών (42 χρ)	πορογενές διηθητικό grade II, ER+(20%), PR-(0%), HER2-(1+) / ορώδες grade III	1 καρκίνος ωοθηκών	<i>BRCA1</i>	c.5434C>G (p.Pro1812Ala)
2003	καρκίνος ωοθηκών (54 χρ)	ορώδες grade III	3 καρκίνοι μαστού	<i>BRCA1</i>	c.5406+5G>C
2009	καρκίνος ωοθηκών (74 χρ)	ορώδες	2 καρκίνοι μαστού και 1 καρκίνος ωοθηκών	<i>BRCA1</i>	p.Cys61Gly
2014	καρκίνος ωοθηκών (41 χρ)	ορώδες grade III	3 καρκίνοι ωοθηκών και 1 καρκίνος μαστού	<i>BRCA1</i>	c.3375_3376delTC
2020	καρκίνος ωοθηκών (43 χρ)	NA/ ορώδες στάδιο II	2 καρκίνοι μαστού και 1 καρκίνος ωοθηκών	<i>BRCA1</i>	p.Arg1443Ter

2071	καρκίνος ωοθηκών (39 χρ)	ορώδες grade III	ελεύθερο	<i>BRCA1</i>	c.3700_3704delGTAAA
2072	καρκίνος ωοθηκών (41 χρ)	ορώδες grade III	ελεύθερο	<i>BRCA1</i>	p.Met1Val (c.1A>G - exon 2)
2107	καρκίνος μαστού (52 χρ) / καρκίνος ωοθηκών (59 χρ)	πορογενές διηθητικό grade II, ER-, PR-, HER2- / ορώδες grade III	2 καρκίνοι ωοθηκών και 1 καρκίνος μαστού	<i>BRCA1</i>	p.(Val1833Met)
2118	καρκίνος ωοθηκών (43 χρ)	ορώδες grade III	ελεύθερο	<i>BRCA1</i>	c.3700_3704delGTAAA
2172	καρκίνος ωοθηκών (46 χρ)	ορώδες grade III	1 καρκίνος μαστού	<i>BRCA1</i>	p.Cys61Gly
2208	καρκίνος ωοθηκών (49 χρ)	ορώδες grade III	3 καρκίνοι μαστού, 1 καρκίνος ωοθηκών και 1 καρκίνος παγκρέατος	<i>BRCA1</i>	c.3700_3704delGTAAA
2226	καρκίνος ωοθηκών (37 χρ)	ορώδες grade III	1 καρκίνος ωοθηκών	<i>BRCA1</i>	c.5431C>T , p.Gln1811Ter
2233	καρκίνος ωοθηκών (71 χρ)	ορώδες grade III	2 καρκίνοι μαστού	<i>BRCA1</i>	p.(Val1833Met)
2250	καρκίνος ωοθηκών (48 χρ)	ορώδες grade III	2 καρκίνοι ωοθηκών	<i>BRCA1</i>	p.(Val1833Met)
2331	καρκίνος ωοθηκών (46 χρ)	ορώδες grade III	2 καρκίνοι μαστού και 1 καρκίνος ωοθηκών	<i>BRCA1</i>	p.Cys61Gly
2346	καρκίνος μαστού (36 χρ) / καρκίνος ωοθηκών (56 χρ)	ER-, PR- / ορώδες grade III	1 καρκίνος μαστού	<i>BRCA1</i>	c.2503_2504insA, p.His835fsTer2
2357	καρκίνος μαστού (57 χρ) / καρκίνος ωοθηκών (60 χρ)	πορογενές διηθητικό grade II, ER+(100%), PR+(50%), HER2:2+, Ki67:35% / ενδομητριοειδές grade III	2 καρκίνοι μαστού και 1 καρκίνος παγκρέατος	<i>BRCA1</i>	p.Cys61Gly
2358	καρκίνος ωοθηκών (39 χρ)	ορώδες grade III	ελεύθερο	<i>BRCA1</i>	c.150delA / p.Lys50fsX19
2401	καρκίνος ωοθηκών (48 χρ)	ορώδες grade III	ελεύθερο	<i>BRCA1</i>	c.1823_1826delAGAA / p.Lys608fsTer3
2408	καρκίνος ωοθηκών (38 χρ)	ορώδες grade III	1 καρκίνος ωοθηκών	<i>BRCA1</i>	c.3317delC

2425	καρκίνος ωοθηκών (55 χρ)	ορώδες grade III	ελεύθερο	<i>BRCA1</i>	p.(Val1833Met)
2501	καρκίνος ωοθηκών (40 χρ) / καρκίνος μαστού (58 χρ)	ορώδες grade III / πορογενές διηθητικό grade II, ER-, PR-, HER2-	1 καρκίνος μαστού	<i>BRCA1</i>	p.Cys61Gly
2507	καρκίνος ωοθηκών (75 χρ)	ορώδες grade III	1 καρκίνος μαστού	<i>BRCA1</i>	c.3375_3376delTC / p.Pro1125fsTer6
2523	καρκίνος ωοθηκών (68 χρ)	ορώδες grade III	4 καρκίνοι μαστού και 2 καρκίνοι ωοθηκών	<i>BRCA1</i>	c.3756_3759delGTCT
2528	καρκίνος ωοθηκών (52 χρ)	μικτό ορώδες και ενδομητριοειδές grade II-III	1 καρκίνος ωοθηκών	<i>BRCA1</i>	c.2576delA / p.Asn859fsTer34
2656	καρκίνος ωοθηκών (54 χρ)	ορώδες grade III	2 καρκίνοι μαστού	<i>BRCA1</i>	p.Glu1114X / c.3340G>T
2803	καρκίνος ωοθηκών (71 χρ)	ορώδες grade II-III	2 καρκίνοι μαστού	<i>BRCA1</i>	c.5492delC
2883	καρκίνος ωοθηκών (58 χρ)	ορώδες grade III	1 καρκίνος μαστού και 1 καρκίνος παγκρέατος	<i>BRCA1</i>	c.1504_1508delTTAAA, p.Leu502fsTer2
2895	καρκίνος ωοθηκών (31 χρ)	ορώδες grade III	ελεύθερο	<i>BRCA1</i>	c.302-1G>C
1972	καρκίνος ωοθηκών (54 χρ)/ καρκίνος μαστού (62 χρ)	ορώδες στάδιο Ib) / DCIS grade I, 1/20 LN+, ER+(100%), PR+(70%), HER2-, Ki67:40%	1 καρκίνος μαστού	<i>BRCA2</i>	c.6941delC
2070	καρκίνος μαστού (46 χρ) / καρκίνος ωοθηκών (63 χρ)	NA/ ορώδες στάδιο II	2 καρκίνοι μαστού και 1 καρκίνος ωοθηκών	<i>BRCA2</i> / <i>RECQL4</i>	<i>BRCA2</i> c.1813_1814insA, p.I605fsTer10 (exon 10) & <i>RECQL4</i> c.1879-1G>A
2152	καρκίνος ωοθηκών (54 χρ)	ορώδες grade II-III	ελεύθερο	<i>BRCA2</i>	c.7976G>A (exon 17 skipping)
2156	καρκίνος ωοθηκών (43 χρ)	ορώδες grade III	1 καρκίνος μαστού και 1 καρκίνος ωοθηκών	<i>BRCA2</i>	p.Ser780Ter
2163	καρκίνος ωοθηκών (55 χρ)	ορώδες grade III	2 καρκίνοι μαστού	<i>BRCA2</i>	c.9089_9090insA
2201	καρκίνος ωοθηκών (57 χρ)	μικτό ορώδες/διαυγοκυ τταρικό, grade III	1 καρκίνος μαστού	<i>BRCA2</i>	c.4415_4418delAGAA
2262	καρκίνος ωοθηκών (51 χρ)	ορώδες grade II-III	ελεύθερο	<i>BRCA2</i>	c.6941delC

2337	καρκίνος ωοθηκών (47 χρ)	ορώδες grade III	1 καρκίνος μαστού	<i>BRCA2</i>	c.4512_4522delGACCTT CCAGG / p.Phe1506fsTer4
2450	καρκίνος ωοθηκών (61 χρ)	ορώδες grade III	ελεύθερο	<i>BRCA2</i>	c.9246_9247insA
2475	καρκίνος ωοθηκών (51 χρ)	ορώδες grade III	2 καρκίνοι μαστού	<i>BRCA2</i>	c.8953+1 G>T (exon 22 skipping)
2539	καρκίνος ωοθηκών (53 χρ)	ορώδες grade III	ελεύθερο	<i>BRCA2</i>	p.Ser780Ter)
2577	καρκίνος ωοθηκών (49 χρ)	ορώδες grade III	ελεύθερο	<i>BRCA2</i>	c.8953+1 G>T
2910	καρκίνος ωοθηκών (69 χρ)	ορώδες grade III	ελεύθερο	<i>BRCA2</i>	c.1405_1406delGA
4666	καρκίνος ωοθηκών (57 χρ)	ορώδες grade III	ελεύθερο	<i>BRCA2</i>	c.4410_4413delAAGA
4668	καρκίνος ωοθηκών (54 χρ)	ορώδες grade II-III	ελεύθερο	<i>BRCA2</i>	c.7976G>A (exon 17 skipping)
1800	καρκίνος ωοθηκών (74 χρ)	διαγοκυτταρικό και ενδομητριοειδές grade III	1 καρκίνος ωοθηκών	<i>RAD51C</i>	c.577C>T p.Arg193Ter
2048	καρκίνος ωοθηκών (69 χρ)	ορώδες grade III	ελεύθερο	<i>RAD51C</i>	c.706-2A>G p.V236_A279del44
2216	αμφοτερόπλευρο ς καρκίνος μαστού (50 χρ)/ καρκίνος ωοθηκών (54 χρ)	δε-DCIS grade III, ER+(90%), PR+(30%), HER2- (0), Ki67:15% & αρ-πορογενές διηθητικό grade II, ER-(0%), PR- (0%), HER2+(3+), Ki67:65% / ορώδες grade III	2 καρκίνοι μαστού και 1 καρκίνος παγκρεάτος	<i>RAD51C</i>	c.706-2A>G p.V236_A279del44
2269	καρκίνος ωοθηκών (72 χρ)	ορώδες grade III	1 καρκίνος μαστού	<i>RAD51C</i> / <i>CHEK2</i>	c.706-2 A>C (p.V236_A279del44) & I157T
2403	καρκίνος ωοθηκών (46 χρ)	ορώδες grade III	1 καρκίνος μαστού	<i>RAD51C</i>	c.706-2A>C p.V236_A279del44
2807	καρκίνος ωοθηκών (60 χρ)	ορώδες grade II και ενδομητριοειδές	1 καρκίνος μαστού	<i>RAD51C</i>	c.363_364delAG
2492	καρκίνος ωοθηκών (57 χρ)	ορώδες grade II-III	1 καρκίνος μαστού και 1 καρκίνος ωοθηκών	<i>PALB2</i>	c.2747_2748+4delAGGT AA

2059	καρκίνος ωοθηκών (69 χρ)	ορώδες	ελεύθερο	<i>PPM1D</i>	c.1529delA (p.Asn512IlefsTer2)
2066	καρκίνος ωοθηκών (73 χρ)	ορώδες grade III	1 καρκίνος μαστού	<i>PPM1D</i>	p.Arg552Ter (mosaic)
2232	καρκίνος ωοθηκών (70 χρ)	ορώδες grade III	4 καρκίνοι μαστού	<i>PPM1D</i>	p.Glu423Ter (mosaic)
2043	καρκίνος ωοθηκών (57 χρ) / καρκίνος μαστού (58 χρ)	ορώδες grade III / NA	ελεύθερο	<i>PPM1D</i> / <i>PALB2</i> (<i>VUS</i>)	<i>PPM1D</i> c.1378delA & <i>PALB2</i> <i>VUS</i> p.Thr1099Arg
1290	καρκίνος ωοθηκών (66 χρ)	N/A	ελεύθερο	<i>FANCL</i>	c.217-2 A>G
4642	καρκίνος ωοθηκών (78 χρ)	ορώδες grade III	ελεύθερο	<i>FANCL</i>	p.Met1Thr
2525	καρκίνος ωοθηκών (47 χρ)	ενδομητριοειδές grade II	1 καρκίνος μαστού	<i>FANCL</i>	p.Met1Thr
2734	καρκίνος μαστού (53 χρ) / καρκίνος ωοθηκών (56 χρ)	πορογενές διηθητικό grade III, ER-(0%), PR- (0%), HER2+(3+)/ ορώδες grade III	1 καρκίνος μαστού	<i>FANCD2</i>	c.2917_2918delTC
1478	καρκίνος ωοθηκών (55 χρ)	ορώδες, μερικώς ενδομητριοειδές σταδίου IIb	1 καρκίνος μαστού, 1 καρκίνος ωοθηκών και 1 καρκίνος παγκρέατος	<i>PMS1</i> / <i>NBN</i>	<i>PMS1</i> p.Arg277Ter / <i>NBN</i> p.Ile171Val (possible risk factor)
2058	καρκίνος ωοθηκών (56 χρ)	ορώδες grade III	1 καρκίνος ωοθηκών	<i>PMS2</i>	c.2186_2187delTC
2931	καρκίνος ωοθηκών (47 χρ) / καρκίνος μαστού (62 χρ)	ενδομητριοειδές grade III) / λοβιακό διηθητικό, ER- (0%), PR-(0%), HER2-(CISH-), Ki67:20%	ελεύθερο	<i>MLH1</i>	c.31delC
4651	καρκίνος ωοθηκών (68 χρ)	ορώδες grade III	ελεύθερο	<i>DIS3L2</i>	c.1572delG
4446	καρκίνος ωοθηκών (52 χρ)	ορώδες grade II	ελεύθερο	<i>BLM</i>	p.Q548Ter
2013	καρκίνος ωοθηκών (65 χρ)	ορώδες grade III	ελεύθερο	<i>RECQL4</i>	c.2300delG
4504	καρκίνος ωοθηκών (55 χρ)	ορώδες grade III	ελεύθερο	<i>ATM</i>	c.5975_5979delAAAGT
1944	καρκίνος ωοθηκών (46 χρ)	ορώδες grade III	1 καρκίνος ωοθηκών 1 καρκίνος παχέος εντέρου	<i>BRCA1</i>	c.1016_1017insA p.Val340GlyfsTer6
2196	καρκίνος ωοθηκών (52 χρ) & καρκίνος παχέος εντέρου (61 χρ)	ορώδες grade III & σκληροειδές αδενοκαρκίνωμα grade III	1 καρκίνος ωοθηκών	<i>BRCA1</i>	p.Arg1443Ter

1303	Καρκίνος ωοθηκών (50 χρ)	(μη διαθέσιμη ιστολογική)	άγνωστο	<i>BRCA1</i>	p.Cys61Gly
2486	Καρκίνος μαστού (36 χρ) & καρκίνος ωοθηκών (42 χρ) & καρκίνος μαστού (49 χρ)	(r-DCIS, grade III) & (ορώδες grade III) & (I-διηθητικό πορογενές grade III, 0/18 LN+, ER+(95%), PR low (3-5%), HER2-)	ελεύθερο	<i>BRCA1</i>	p.Glu111LysfsTer8
4893	Καρκίνος ωοθηκών (55 χρ)	(ορώδες grade III, στάδιο IIc, 0/7 LN+, Ki67 high)	ελεύθερο	<i>BRCA1</i>	p.Q1832X
4814	Καρκίνος ωοθηκών (48 χρ)	(ορώδες grade II-III)	άγνωστο	<i>BRCA1</i>	p.Ser1676TyrfsTer16
2185	Καρκίνος μαστού (38 χρ) & καρκίνος ωοθηκών (40 χρ)	(πορογενές διηθητικό NOS, grade III, 0/10 LN+, TNBC, Ki67:35%) & (ορώδες grade III)	ελεύθερο	<i>BRCA1</i>	p.Thr509SerfsTer3
2599	Καρκίνος ωοθηκών (48 χρ) & καρκίνος παγκρέατος (60 χρ)	ορώδες grade II-III, 0/16 LN+, στάδιο Ib	1 καρκίνος μαστού	<i>BRCA2</i>	c.2808_2811delACAA
2093	Καρκίνος ωοθηκών (52 χρ)	ορώδες grade III, στάδιο IIIc	1 καρκίνος μαστού	<i>BRCA2</i>	c.9089_9090insA p.Thr3033AsnfsTer11
4808	Καρκίνος ωοθηκών (46 χρ)	ορώδες grade III, στάδιο IIIc	ελεύθερο	<i>BRCA2</i>	p.Gly1552LeufsTer15
2468	Καρκίνος μαστού (53 χρ) & καρκίνος ωοθηκών (56 χρ)	(διηθητικό πορογενές grade II, 0/2 LN+, ER+(90%), PR low (7%), HER2:2+, Ki67:15%) & (ορώδες grade III, 0/27 LN+)	2 καρκίνοι μαστού 1 καρκίνος ωοθηκών	<i>BRCA2</i>	p.Trp2788X
4815	Καρκίνος ωοθηκών (42 χρ) & καρκίνος ενδομητρίου (42 χρ)	ενδομητριοειδές grade II	άγνωστο	<i>CHEK2</i>	c.573+1G>A
2140	Καρκίνος ωοθηκών (46 χρ)	ορώδες grade III	1 καρκίνος μαστού 1 καρκίνος παχέος εντέρου	<i>FANCE</i>	c.1383+1G>T
2942	Καρκίνος ωοθηκών (40 χρ)	ορώδες grade I, 1/23 LN+	2 καρκίνοι μαστού	<i>NBN</i>	c.657_661delACAAA / p.Lys219fs16X
2364	Καρκίνος μαστού (44 χρ) & καρκίνος ωοθηκών (48 χρ)	(διηθητικό πορογενές grade II & DCIS, 0/17 LN+, ER+(65%), PR+(65%), HER2-(1+), p53+(30%), Ki67:5%) & (ορώδες grade III, στάδιο Ia)	2 καρκίνοι μαστού	<i>PALB2 / SLX4</i>	p.Glu916fsTer7 p.Asp1365ProfsTer26

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ανίχνευση μεταλλάξεων στα γονίδια *BRCA1* & *BRCA2* σε ασθενείς με καρκίνο μαστού ή/και ωοθηκών με οικογενειακό ιστορικό ή/και νεαρή ηλικία διάγνωσης (≤ 45 έτη) με τη συμβατική μέθοδο αλληλούχησης

Βάσει των αποτελεσμάτων της παρούσας διατριβής από την εφαρμογή της συμβατικής μεθόδου αλληλούχησης κατά Sanger υπολογίστηκε ότι η συνολική συχνότητα μεταλλάξεων στα γονίδια *BRCA1/2* για ένα σύνολο 50 ασθενών με καρκίνο μαστού ή/και ωοθηκών προσέγγισε το 12%. Ειδικότερα, το 6% του συνόλου των μεταλλάξεων αφορούσε στην ανίχνευση ιδρυτικών για τον Ελληνικό πληθυσμό μεταλλάξεων, συγκεκριμένα, της μετάλλαξης c.5382insC (c.5266dupC) και της απαλοιφής του εξονίου 20 (c.5256_5277+3179del3200), καθώς και της απαλοιφής των εξονίων 23 και 24 (g.169527_180579del11052)) του γονιδίου *BRCA1*. Είναι γεγονός ότι η συχνότητα και η κατανομή των μεταλλάξεων στα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2* ποικίλει μεταξύ των πληθυσμών, αναδεικνύοντας τη γενετική τους ετερογένεια. Οι διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες παραπομπής ενός ατόμου για γονιδιακό έλεγχο κληρονομικού καρκίνου μαστού/ωοθηκών δε διαφοροποιείται ανά εθνικότητα, ωστόσο, η συχνότητα των παθογόνων μεταλλάξεων σε ασθενείς με ιστορικό καρκίνου σε συγκεκριμένους πληθυσμούς, όπως στους Εβραίους Ashkenazi, είναι σημαντικά υψηλότερη (30-40%) κυρίως λόγω παρουσίας ιδρυτικών μεταλλάξεων [236].

Τα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2* έχουν μελετηθεί εκτενώς σε Ελληνίδες ασθενείς με καρκίνο μαστού ή/και ωοθηκών αποκαλύπτοντας ένα ιδιαίτερος διακριτό φάσμα μεταλλάξεων που αποτελείται ως επί το πλείστον από επανεμφανιζόμενες και ιδρυτικές μεταλλάξεις, καθώς και από μεγάλες γονιδιακές αναδιατάξεις. Σε προηγούμενη μελέτη έχει δείχθει ότι η κατανομή των μεταλλάξεων του γονιδίου *BRCA1* στον Ελληνικό πληθυσμό επηρεάζεται από ισχυρές ιδρυτικές επιδράσεις. Συγκεκριμένα, ταυτοποιήθηκαν τρεις μεταλλάξεις (οι ιδρυτικές μεταλλάξεις p.Gly1738Arg και c.5266dupC και η επανεμφανιζόμενη μετάλλαξη p.Arg1751Ter) στο εξόνιο 20 και τρεις μεγάλες γονιδιακές αναδιατάξεις (απαλοιφή του εξονίου 20

(c.5256_5277+3179del3200), απαλοιφή του εξονίου 24 (c.5468-285_5592+4019del4429_insCACAG) και απαλοιφή των εξονίων 23 και 24 (g.169527_180579del11052)) που εντοπίζονται στο 3' άκρο του γονιδίου *BRCA1* όπου συνολικά αντιπροσωπεύουν το 68.5% όλων των μεταλλάξεων που ανιχνεύονται στο γονίδιο *BRCA1* σε Ελληνίδες ασθενείς με καρκίνο μαστού ή/και ωθηκών [217], μια εκτίμηση που προσεγγίζει το αντίστοιχο ποσοστό της παρούσας διατριβής (60% 3/5). Η ιδρυτική επίδραση της απαλοιφής των εξονίων 23 και 24 του γονιδίου *BRCA1* στον Ελληνικό πληθυσμό αποκαλύφθηκε σε πρόσφατη μελέτη [237], ενώ οι αντίστοιχες απαλοιφές των εξονίων 20 και 24 έχουν χαρακτηριστεί ιδρυτικές για τον Ελληνικό πληθυσμό σε παλαιότερη μελέτη [238].

Ενδιαφέρουσα παρατήρηση αποτελεί το γεγονός ότι το 30% (3/10) των ασθενών με τριπλά αρνητικό καρκίνο μαστού έφερε παθογόνους μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1/2*, ένα εύρημα που προσεγγίζει την αντίστοιχη συχνότητα (22%) προηγούμενης μελέτης [216], αλλά διαφοροποιείται από τη συχνότητα (15,85%) που προκύπτει σε πρόσφατη μελέτη και η οποία είναι σημαντικά χαμηλότερη λόγω επιλογής ασθενών χωρίς οικογενειακό ιστορικό κακοηθειών [239].

Αναφορικά με την ηλικία διάγνωσης καρκίνου του μαστού, δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των γυναικών που φέρουν μεταλλάξεις στα *BRCA1/2* και των γυναικών που δε φέρουν μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια, παρόλο που οι γυναίκες με μεταλλάξεις στα *BRCA1/2* έχουν μια ελαφρώς μικρότερη ηλικία διάγνωσης. Η μη στατιστική σημαντικότητα αυτής της παρατήρησης πιθανώς οφείλεται στη μεγάλη αριθμητική διαφορά των δύο ομάδων των ασθενών. Για την ηλικία διάγνωσης καρκίνου των ωθηκών, οι τιμές στις δύο ομάδες ασθενών είναι παραπλήσιες και η παρατήρηση αυτή συμφωνεί με τη σύσταση για γονιδιακό έλεγχο σε ασθενείς με επιθηλιακό καρκίνο των ωθηκών ανεξαρτήτως ηλικίας διάγνωσης [2], καθώς και με τα αποτελέσματα πρόσφατης μελέτης σε Ελληνίδες ασθενείς με καρκίνο των ωθηκών, όπου δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην ηλικία διάγνωσης μεταξύ των ασθενών με μεταλλάξεις στο γονίδιο *BRCA1* και των ασθενών που δεν έφεραν μετάλλαξη [235].

Εστιάζοντας στις υπόλοιπες μεταλλάξεις των γονιδίων *BRCA1/2* που ανιχνεύθηκαν στις υπό μελέτη ασθενείς, η πλαισιοτροποποιητική μετάλλαξη p.Val1234GlnfsTer8 (c.3700_3704delGTAAA) του γονιδίου *BRCA1*, που οδηγεί σε πρωτεΐνη μικρότερου μεγέθους, έχει εντοπιστεί μέχρι στιγμής σε άλλες 17 Ελληνίδες ασθενείς με καρκίνο μαστού ή/και ωθηκών [217], ενώ αποτελεί ιδρυτική μετάλλαξη για άτομα Πολωνικής καταβολής [240] [241].

Η μη νοηματική μετάλλαξη p.Ser1882Ter (c.5645C>A) του γονιδίου *BRCA2* καταγράφεται για πρώτη φορά στο παρόν σε Ελληνίδες ασθενείς με καρκίνο μαστού/ωθηκών. Στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρεται σε μία Ασιάτισσα ασθενή με καρκίνο των ωθηκών [242], ενώ έχει ανιχνευθεί σε τέσσερις Τσέχες ασθενείς με καρκίνο μαστού/ωθηκών [243].

Μια επιπλέον μη νοηματική μετάλλαξη, η p.Arg1203Ter (c.3607C>T) του γονιδίου *BRCA1* εντοπίστηκε στην παρούσα μελέτη, η οποία έχει ανιχνευθεί σε άλλες 12 Ελληνίδες ασθενείς με καρκίνο μαστού ή/και ωθηκών [217]. Σε παλαιότερη μελέτη έχει ανιχνευθεί σε μία ασθενή με ορώδες ωθηκικό καρκίνωμα [187], ενώ σε άλλη μελέτη έχει εντοπιστεί σε δύο ασθενείς με καρκίνο των ωθηκών, Ιταλικής και Ινδο-Πακιστανικής καταγωγής, αντίστοιχα [244].

Η συχνότητα και η ιδρυτική επίδραση της παραλλαγής p.(Val1833Met) του γονιδίου BRCA1 στον Ελληνικό πληθυσμό – Επιπρόσθετες ενδείξεις παθογονικότητας

Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, η παραλλαγή p.(Val1833Met) του γονιδίου *BRCA1*, ενώ απαντάται εξαιρετικά σπάνια διεθνώς [245], είναι επανεμφανιζόμενη σε Ελληνίδες ασθενείς με καρκίνο μαστού ή/και ωθηκών, έχοντας υψηλή συχνότητα σε ασθενείς που έχουν διαγνωστεί τόσο με καρκίνο μαστού όσο και με καρκίνο ωθηκών (1.82%), καθώς και σε ασθενείς που έχουν διαγνωστεί μόνο με καρκίνο ωθηκών (1.59%). Η ανάλυση διαχωρισμού έδειξε ότι η παραλλαγή p.(Val1833Met) συν-κληρονομείται με τη νόσο, φανερώνοντας μια σαφώς σχετιζόμενη με τον καρκίνο παραλλαγή με παθογόνο επίδραση. Αυτό το εύρημα συμφωνεί με την ταξινόμηση IARC (<https://www.iarc.fr/>)

βάσει της οποίας η παραλλαγή αυτή κατηγοριοποιείται ως πιθανώς παθογόνος (probably damaging – IARC Class 4) [245]. Η παθογονικότητα της παραλλαγής p.(Val1833Met) ενισχύεται τόσο από τη μη συνύπαρξή της με άλλη παθογόνο μετάλλαξη όσο και από την απουσία της σε άτομα που δεν έχουν διαγνωστεί με κάποια μορφή κακοήθειας. Σημαντική απόδειξη υπέρ της παθογονικότητας της p.(Val1833Met) προκύπτει από τον συνολικό λόγο πιθανοφανειών που προσδιορίστηκε στο 1.88. Παρόλο που ο λόγος δεν είναι πολύ μεγαλύτερος από το 1, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στη δομή των οικογενειών που υποβλήθηκαν σε ανάλυση διαχωρισμού, στα διαθέσιμα μέλη των οικογενειών που γονοτυπήθηκαν και στο ότι οι παρανοηματικές παραλλαγές δε βλάπτουν ολοκληρωτικά τη λειτουργία της πρωτεΐνης όπως οι παραλλαγές που οδηγούν σε πρωτεΐνες μικρότερου μεγέθους, αναμφισβήτητα προστίθεται ένα σημαντικό στοιχείο στην πολυπαραγοντική προσέγγιση της παθογονικότητας της p.(Val1833Met).

Ενδιαφέρον προκύπτει από την παρατήρηση ότι οι ασθενείς που φέρουν την παραλλαγή p.(Val1833Met) παρουσιάζουν παρόμοια ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά με αυτά του φαινοτύπου ασθενών που φέρουν μια σαφώς παθογόνο μετάλλαξη στο γονίδιο *BRCA1*. Συγκεκριμένα, η πλειονότητα των περιστατικών καρκίνου του μαστού ήταν τριπλά αρνητικά, υψηλόβαθμα πορογενή καρκινώματα με μικρότερη ηλικία διάγνωσης, που είναι σε συμφωνία με προηγουμένως δημοσιευθέντα δεδομένα [217]. Προσφάτως, η παραλλαγή p.(Val1833Met) ανιχνεύθηκε σε 1 από τις 194 Ελληνίδες ασθενείς με τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού που μελετήθηκαν και χαρακτηρίστηκε ως παθογόνος στις κατευθυντήριες οδηγίες ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics) [216]. Επιπλέον, σε συμφωνία με αποτελέσματα πρόσφατης μελέτης σε Ελληνίδες ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών [235], ο πιο κοινός ιστολογικός υπότυπος σε ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών που έφεραν τη συγκεκριμένη παραλλαγή ήταν το υψηλόβαθμο ορώδες καρκίνωμα.

Η ανάλυση απλοτύπου απέδειξε την ιδρυτική επίδραση της p.(Val1833Met), αποκαλύπτοντας την Ελληνική προέλευσή της περίπου πριν από 1.450 έτη. Κατά

συνέπεια, θα πρέπει να συζητηθεί η πιθανή ενσωμάτωση της παραλλαγής αυτής κατά τον γονιδιακό έλεγχο πρώτης γραμμής σε Ελληνίδες ασθενείς με καρκίνο μαστού ή/και ωοθηκών, ειδικότερα στα άτομα που έχουν διαγνωστεί με καρκίνο των ωοθηκών. Μια άλλη σημαντική πλευρά αφορά στη γενετική συμβουλευτική και την επακόλουθη κλινική παρακολούθηση των ατόμων που φέρουν την παραλλαγή p.(Val1833Met), τα οποία μέχρι και τη στιγμή του γονιδιακού ελέγχου δεν έχουν διαγνωστεί με καρκίνο μαστού ή/και ωοθηκών, αλλά έχουν σοβαρό οικογενειακό ιστορικό τέτοιων κακοηθειών. Αξιολογώντας τα τρέχοντα δεδομένα και ακολουθώντας μια εξατομικευμένη γενετική προσέγγιση, θα μπορούσε να αποδοθεί ενός αυξημένος κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου μαστού ή/και ωοθηκών στα άτομα αυτά.

Παρόλο που η τρέχουσα πρακτική στις γενετικές αναλύσεις και στη γενετική συμβουλευτική συνοψίζεται στις διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες NCCN, η ταυτοποίηση ιδρυτικών μεταλλάξεων στον Ελληνικό πληθυσμό θα μπορούσε να βελτιώσει τις στρατηγικές διαλογής και πρόληψης ελέγχοντας σε πρώτη γραμμή την ύπαρξη ή μη τέτοιων ιδρυτικών μεταλλάξεων σε ασθενείς με καρκίνο μαστού ή/και ωοθηκών. Ως εκ τούτου, θα μπορούν να παρασχεθούν χρονικά και οικονομικά αποδοτικότερες υπηρεσίες, βελτιώνοντας την κλινική διαχείριση των Ελληνίδων ασθενών.

Γονίδια προδιάθεσης στον καρκίνο των ωοθηκών - Εστιάζοντας στα BRCA1/2

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα του γονιδιακού πάνελ για την παρούσα διατριβή προκύπτει ότι η συνολική συχνότητα παθογόνων μεταλλάξεων στα υπό εξέταση γονίδια για ασθενείς με επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών υπολογίζεται στο 29,1%. Η πλειονότητα των παθογόνων μεταλλάξεων στις υπό μελέτη ασθενείς αφορά, ως αναμενόταν, στα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2* με ποσοστό 13,3% και 6,7%, αντίστοιχα. Τα παρόντα ποσοστά των συχνοτήτων των μεταλλάξεων στα γονίδια *BRCA1/2* σε ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών συμφωνούν με αυτά που έχουν προκύψει σε πρόσφατες μελέτες, όπου περίπου στο 13-18% των ασθενών με

καρκίνο των ωοθηκών ανιχνεύονται μεταλλάξεις γαμετικής σειράς στα γονίδια *BRCA1/2* [87] [239]. Δεδομένου ότι οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *BRCA1* προσδίδουν περίπου 50% δια βίου κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για μεταλλάξεις στο γονίδιο *BRCA2* προσεγγίζει το 20%, η προφυλακτική αμφοτερόπλευρη σαλπινγο-ωοθηκεκτομή μειώνει κατά 80% τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών, των φαλοπιανών σαλπίγγων και του περιτοναίου στις γυναίκες που φέρουν τέτοιες μεταλλάξεις [187] [85].

Ωστόσο, στο παρόν εντοπίζονται μεταλλάξεις και σε άλλα γονίδια, συγκεκριμένα στο *RAD51C*, σε γονίδια της ομάδας FANC (*FANCE*, *FANCL*, *FANCD2*), καθώς και στα γονίδια *PPMID*, *CHEK2*, *NBN*, *PALB2*, *PMS1*, *PMS2*, *MLH1*, *DIS3L2*, *BLM*, *RECQL4* και *ATM*, η συνεισφορά των οποίων αγγίζει το 9,1%. Το ποσοστό αυτό θεωρείται σημαντικό, καθότι χωρίς τη χρήση της μαζικής παράλληλης αλληλούχησης το γενετικό υπόβαθρο των ασθενών αυτών δε θα είχε αποσαφηνιστεί. Σε πρόσφατη μελέτη υπολόγισαν ότι το ποσοστό των ασθενών με επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών και με μεταλλάξεις σε γονίδια εκτός των *BRCA1/2* ανέρχεται στο 9,3% [246], μια εκτίμηση παραπλήσια με αυτή της παρούσας μελέτης, ενώ σε προηγούμενη μελέτη το ποσοστό αυτό ανερχόταν μόλις στο 3,7% [87].

Σημαντικό εύρημα της παρούσας διατριβής αποτελεί η μικρότερη ηλικία εμφάνισης του καρκίνου των ωοθηκών σε γυναίκες που φέρουν παθογόνους μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1/2* συγκριτικά όχι μόνο με τις γυναίκες που δε φέρουν καμία παθογόνο μετάλλαξη στα υπό εξέταση γονίδια αλλά και με τις γυναίκες που φέρουν μεταλλάξεις σε γονίδια εκτός των *BRCA1/2*. Ωστόσο, η παρατήρηση ότι η ηλικία διάγνωσης καρκίνου των ωοθηκών στις γυναίκες με μετάλλαξη στα *BRCA1/2* είναι σημαντικά μικρότερη από αυτή των γυναικών με μετάλλαξη σε γονίδια εκτός των *BRCA1/2* δεν ίσχυε σε πρόσφατη μελέτη, όπου οι ηλικίες διάγνωσης καρκίνου των ωοθηκών ήταν παραπλήσιες στις δύο αντίστοιχες ομάδες ασθενών. Εν τούτοις, οι συγκεκριμένοι ερευνητές απέδειξαν ότι μόνο οι γυναίκες με μετάλλαξη στο *BRCA1* είχαν μικρότερη ηλικία διάγνωσης καρκίνου των

ωοθηκών συγκριτικά με τις γυναίκες που δεν έφεραν καμία παθογόνο μετάλλαξη [87].

Επιπλέον, η παρούσα μελέτη δείχνει ότι στις ασθενείς με μετάλλαξη στο γονίδιο *BRCA1* είναι πιο έντονη η παρουσία οικογενειακού ιστορικού κακοηθειών μαστού/ωοθηκών συγκριτικά με τις ασθενείς στις οποίες δεν ανιχνεύεται καμία παθογόνος μετάλλαξη στα υπό μελέτη γονίδια, ενώ είναι παραπλήσια με την παρουσία οικογενειακού ιστορικού κακοηθειών στις ασθενείς με παθογόνους μεταλλάξεις σε οποιοδήποτε από τα υπό εξέταση γονίδια. Η συγκεκριμένη συσχέτιση συμφωνεί με την ισχύουσα παρατήρηση ότι μία γυναίκα με οικογενειακό ιστορικό καρκίνου μαστού ή/και ωοθηκών έχει πιθανότητα μεγαλύτερη από 75% να φέρει μια παθογόνο μετάλλαξη στα γονίδια *BRCA1/2* [247].

Αναφορικά με την ιστοπαθολογία των διαγνώσεων της παρούσας μελέτης, τα υψηλόβαθμα ορώδη ωοθηκικά καρκινώματα συνδέονται περισσότερο με την ύπαρξη παθογόνων μεταλλάξεων στα γονίδια *BRCA1/2* σε σχέση είτε με την ανίχνευση μεταλλάξεων σε γονίδια εκτός των *BRCA1/2* είτε με την απουσία παθογόνων μεταλλάξεων στα υπό εξέταση γονίδια. Γενικά, έχει υπολογιστεί ότι το ποσοστό των υψηλόβαθμων ορώδων ωοθηκικών καρκινωμάτων με μεταλλάξεις στα *BRCA1/2* προσεγγίζει το 22% [212] [248], το οποίο είναι παραπλήσιο με το αντίστοιχο ποσοστό της παρούσας διατριβής (24,9%). Από την άλλη πλευρά, βάσει των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης προκύπτει ότι οι ασθενείς με μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1/2* διαγιγνώσκονται λιγότερο συχνά με ενδομητριοειδή ωοθηκικά καρκινώματα, ενώ τα ωοθηκικά καρκινώματα διαυγοκυτταρικού τύπου φαίνεται να μη σχετίζονται με μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1/2*, μια παρατήρηση που συμφωνεί με συμπεράσματα προηγούμενης μελέτης [249]. Κατ' αντιστοιχία, τα μικτά ωοθηκικά καρκινώματα, κυρίως αυτά που εμπεριέχουν συνιστώσα ενδομητριοειδούς τύπου, διαγιγνώσκονται πιο συχνά σε ασθενείς που φέρουν μεταλλάξεις σε γονίδια εκτός των *BRCA1/2* από ότι σε ασθενείς είτε με μεταλλάξεις στα γονίδια αυτά είτε χωρίς καμία παθογόνο μετάλλαξη στα υπό εξέταση γονίδια. Σε πρόσφατη μελέτη, όπου αναλύθηκαν 887 ωοθηκικά καρκινώματα, βρέθηκε ότι <5% των ασθενών που έφεραν μετάλλαξη στα

BRCA1/2 είχαν διαγνωστεί με ενδομητριοειδές καρκίνωμα [250], μια εκτίμηση που συμφωνεί με το αντίστοιχο αποτέλεσμα της παρούσας μελέτης (4,2%).

Σχολιάζοντας την πιθανότητα διάγνωσης δεύτερου πρωτοπαθούς καρκίνου στις ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών, συμπεραίνεται ότι οι ασθενείς με παθογόνους μεταλλάξεις είτε στα γονίδια *BRCA1/2* είτε σε άλλα γονίδια είναι πιθανότερο να διαγνωστούν με δεύτερο πρωτοπαθή καρκίνο, όπως καρκίνο μαστού, παγκρέατος, ενδομητρίου ή παχέος εντέρου, σε σχέση με τις ασθενείς που δε φέρουν καμία παθογόνο μετάλλαξη. Σε πρόσφατες μελέτες τα ποσοστά των ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών και μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1/2* που διαγνώστηκαν με δεύτερο πρωτοπαθή καρκίνο μαστού εντός δέκα ετών από τη διάγνωση του καρκίνου των ωοθηκών κυμαίνονταν από 3,9% έως 8,9% [251] [252], ποσοστά ελαφρώς μικρότερα από το αντίστοιχο της παρούσας μελέτης (13,8%).

Άλλα γονίδια προδιάθεσης στον καρκίνο των ωοθηκών

Στην παρούσα διατριβή στο 2,1% των ασθενών με επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών ανιχνεύθηκαν παθογόνοι μεταλλάξεις στο γονίδιο *RAD51C*. Η προδιάθεση στον καρκίνο των ωοθηκών έχει αποκαλυφθεί σε προηγούμενη μελέτη για το γονίδιο *RAD51C* [78] [253]. Σε πρόσφατη μελέτη αποδείχθηκε ότι η παρουσία παθογόνων μεταλλάξεων στο γονίδιο *RAD51C* αυξάνει κατά 4 με 5 φορές τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών ($OR=4.98$, $p=4.6 \times 10^{-11}$) [254]. Πλέον στις κλινικές κατευθυντήριες οδηγίες για την πρόληψη του καρκίνου των ωοθηκών έχει ενταχθεί και το γονίδιο *RAD51C* δεδομένου ότι οι μεταλλάξεις σε αυτό το γονίδιο συνοδεύονται από τριπλάσιο ή μεγαλύτερο κίνδυνο για καρκίνο των ωοθηκών, με αποτέλεσμα να προτείνεται η προφυλακτική αμφοτερόπλευρη σαλιγγο-ωοθηκεκτομή περί την ηλικία των 45-50 ετών σε άτομα που φέρουν σαφείς παθογόνους μεταλλάξεις [2].

Επιπλέον, στο παρόν ανιχνεύθηκαν παθογόνοι μεταλλάξεις σε γονίδια της ομάδας FANC σε ποσοστό 1,8%. Για τα γονίδια της ομάδας συμπληρωματικότητας αναίμιας Fanconi (FANC) δεν υπάρχουν επαρκείς ενδείξεις συσχέτισης με αυξημένο

κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου των ωθηκών, εκτός από το γονίδιο *FANCM*, το οποίο φαίνεται να προσδίδει μέτρια αύξηση του κινδύνου (RR=2.5) [255]. Αντίστοιχα, στο γονίδιο *PPM1D* ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις που προσεγγίζουν περίπου το 1,4%. Ιδιαίτερη περίπτωση αποτελεί η συσχέτιση μεταλλάξεων του γονιδίου αυτού με τον καρκίνο των ωθηκών. Προσφάτως προσδιορίστηκε ότι το 0.37% των ασθενών με επιθηλιακό καρκίνο των ωθηκών φέρει μεταλλάξεις στο γονίδιο *PPM1D*, οι οποίες οδηγούν στο σχηματισμό πρωτεΐνης μικρότερου μεγέθους. Ωστόσο, η πλειονότητά τους αφορά σε σωματικές μεταλλάξεις που βρίσκονται σε κυκλοφορούντα στο αίμα καρκινικά κύτταρα (μωσαϊκισμό) και προκαλούνται από την εξελικτική πίεση που ασκεί η χημειοθεραπεία και πιθανόν να μη σχετίζονται με γενετική προδιάθεση στον καρκίνο των ωθηκών [256] [257].

Για το γονίδιο *CHEK2* η συχνότητα μεταλλάξεων που προκύπτει στην παρούσα διατριβή προσεγγίζει το 0,35%, όπου η ασθενής που έφερε παθολόγο μετάλλαξη στο γονίδιο αυτό έχει διαγνωστεί τόσο με ενδομητριοειδές ωθηκικό καρκίνωμα όσο και με πρωτοπαθή καρκίνο του ενδομητρίου σε ηλικία μικρότερη των 45 ετών. Γενικά το γονίδιο *CHEK2* θεωρείται γονίδιο μέτριας διεισδυτικότητας για τον καρκίνο του μαστού. Τα περισσότερα δεδομένα αφορούν στην καλά μελετημένη παραλλαγή c.1100delC, η οποία προσδίδει διπλάσιο, ακόμα και τριπλάσιο, κίνδυνο για καρκίνο μαστού, αλλά δε συνδέεται με εμφάνιση καρκίνου των ωθηκών [258]. Η συγκεκριμένη παραλλαγή έχει μελετηθεί εκτενώς σε Ελληνίδες ασθενείς με καρκίνο μαστού, στις οποίες ανιχνεύεται πολύ σπάνια (συχνότητα=0,16%) [259]. Ωστόσο, έχουν αναφερθεί άλλες κωδικές παραλλαγές, οι οποίες πιθανώς σχετίζονται με προδιάθεση στον καρκίνο των ωθηκών. Συγκεκριμένα, σε μία μελέτη στην οποία αναλύθηκαν 360 περιστατικά επιθηλιακού καρκίνου των ωθηκών, ανιχνεύθηκαν πέντε παρανοηματικές παραλλαγές στο γονίδιο *CHEK2*, δύο εκ των οποίων βρέθηκαν να είναι παθολόγοι μέσω λειτουργικών δοκιμασιών [187]. Επίσης, κοινές παραλλαγές χαμηλής διεισδυτικότητας μπορεί να υπάρχουν εντός, καθώς και ανοδικά ή καθοδικά του γονιδίου *CHEK2*. Σε πρόσφατη μελέτη οι ερευνητές αποκάλυψαν ισχυρές ενδείξεις συσχέτισης διαφόρων πολυμορφισμών μονού νουκλεοτιδίου (SNPs) του γενετικού

τόπου 22q12.1, που εδράζεται το γονίδιο *CHEK2* (rs17507066, rs6005807), με τον κίνδυνο για εμφάνιση καρκίνου των ωοθηκών, τα οποία SNPs ήταν κάτω από το όριο της σημαντικότητας που έχουν τεθεί στις μελέτες GWAS ($p < 5 \times 10^{-8}$). Η συσχέτιση αφορά στα διηθητικά επιθηλιακά ωοθηκικά καρκινώματα και ειδικότερα το SNP rs6005807 συνδέεται με τον ορώδη υπότυπο [260]. Από την άλλη πλευρά, σε πρόσφατη μελέτη υπολογίστηκε ότι δεν αυξάνεται ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών σε άτομα με μεταλλάξεις στο *CHEK2* χωρίς, ωστόσο, η συσχέτιση αυτή να είναι στατιστικά σημαντική (OR=0.86, $p=0.3000$) [254].

Αναφορικά με τη συχνότητα μεταλλάξεων στα γονίδια *NBN* και *ATM* στο παρόν, αυτή προσδιορίστηκε στο 0,35% για το κάθε ένα. Αρχικά για το γονίδιο *NBN*, υπήρχαν ορισμένες ενδείξεις συσχέτισης με τον καρκίνο των ωοθηκών, χωρίς να έχει προσδιοριστεί επαρκώς η συσχέτιση αυτή [81]. Σε μελέτη της Kurian και των συνεργατών της προκύπτει ότι σε άτομα που φέρουν παθογόνους μεταλλάξεις στο γονίδιο *NBN* ο κίνδυνος εμφάνισης επιθηλιακού καρκίνου των ωοθηκών σχεδόν διπλασιάζεται (OR=1.85, $p=0.0320$). Αντίθετα, μελέτη του 2018 αποδυναμώνει τη συσχέτιση μεταξύ παθογόνων μεταλλάξεων του γονιδίου *NBN* και προδιάθεσης στον καρκίνο μαστού ή/και ωοθηκών και προτείνει τη μη ένταξή του στα διαθέσιμα γονιδιακά πάνελ για τον κληρονομικό καρκίνο [261].

Αναφορικά με την ανίχνευση μεταλλάξεων γαμετικής σειράς στο γονίδιο *ATM*, πρόσφατη μελέτη συσχέτισε την ύπαρξη παθογόνων μεταλλάξεων στο γονίδιο *ATM* με έναν σχετικά αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο ωοθηκών (OR=1.69, $p=0.0032$, [254]). Ωστόσο, δεδομένου ότι το 1% των ασθενών με καρκίνο μαστού και το 0,5% του γενικού πληθυσμού μπορεί να φέρει μια μετάλλαξη γαμετικής σειράς στο γονίδιο *ATM*, τις περισσότερες φορές χωρίς παρουσία οικογενειακού ιστορικού καρκίνου των ωοθηκών, κρίνεται σημαντικός ο ακριβής καθορισμός του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών [262]. Για το γονίδιο *ATM* υπάρχουν ενδείξεις ότι οι μεταλλάξεις σε αυτό σχετίζονται με διπλάσιο ή και τριπλάσιο κίνδυνο για καρκίνο των ωοθηκών [239] [263], προσδίδοντάς του μια μέτρια διεισδυτικότητα, χωρίς, ωστόσο, να υπάρχουν επαρκείς αποδείξεις για σύσταση προφυλακτικών χειρουργείων [2]. Συνεπώς, για τα γονίδια *NBN* και *ATM* έχουν προκύψει μικρότεροι

κίνδυνοι για καρκίνο των ωοθηκών ($OR < 2$), αποτελώντας μη επαρκείς ενδείξεις για αντίστοιχα προφυλακτικά χειρουργεία. Στην περίπτωση που επιβεβαιωθούν οι κίνδυνοι εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών για τα δύο αυτά γονίδια, θα πρέπει κατά τη γενετική συμβουλευτική του ατόμου που φέρει αντίστοιχες μεταλλάξεις να λαμβάνεται υπ' όψιν και το οικογενειακό ιστορικό του πριν τη λήψη οποιασδήποτε κλινικής απόφασης.

Στην παρούσα διατριβή η συχνότητα μεταλλάξεων για τα γονίδια *MLH1* και *PMS2* υπολογίστηκε στο 0,35% για το κάθε ένα. Οι μεταλλάξεις στα γονίδια *MLH1* και *PMS2* συνδέονται με το σύνδρομο Lynch, με την αθροιστική επίπτωση (cumulative incidence) εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών να ανέρχεται στο 11% για το *MLH1*, ενώ η αντίστοιχη επίπτωση για το *PMS2* είναι ιδιαίτερα χαμηλή, απαιτώντας μεγαλύτερο αριθμό ασθενών με μεταλλάξεις στο *PMS2* για τον ακριβή προσδιορισμό της [94]. Σε πρόσφατη μελέτη υπολογίστηκε ότι ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών τριπλασιάζεται σε άτομα που φέρουν παθογόνους μεταλλάξεις στο γονίδιο *MLH1* ($OR=3.11$, $p=0.0031$), ενώ για το γονίδιο *PMS2* ο αντίστοιχος κίνδυνος σχεδόν διπλασιάζεται ($OR=1.57$, $p=0.0820$) χωρίς, όμως, να αποτελεί στατιστικά σημαντική συσχέτιση [254]. Εν τούτοις, πρέπει να τονιστεί ότι η ανίχνευση μεταλλάξεων στα γονίδια MMR μπορεί να αξιολογηθεί κλινικά ως προς τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών με εντατικοποιημένη ιατρική παρακολούθηση από την ηλικία των 35-40 ετών και εξατομικευμένη σύσταση για αμφοτερόπλευρη σαλπινγο-ωοθηκεκτομή, ειδικότερα στην περίπτωση ύπαρξης παθογόνων μεταλλάξεων στο *MLH1* [94] [264].

Αντιστοίχως, η συχνότητα μεταλλάξεων για τα γονίδια *PMS1*, *RECQL4*, *BLM* και *DIS3L2* ανέρχεται στο 0,35% για το κάθε ένα, με τις ασθενείς που φέρουν παθογόνους μεταλλάξεις συγκεκριμένα στα γονίδια *RECQL4*, *BLM* και *DIS3L2* να μην αναφέρουν οικογενειακό ιστορικό κακοηθειών. Ωστόσο, η συσχέτιση μεταξύ παθογόνων μεταλλάξεων στα ανωτέρω γονίδια και αυξημένου κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου των ωοθηκών δεν έχει αποσαφηνιστεί, καθιστώντας τα γονίδια χαμηλής διεισδυτικότητας [265] [266] [267]. Αξίζει να αναφερθεί ότι για τη μετάλλαξη p.Q548Ter του γονιδίου *BLM*, η οποία ανιχνεύθηκε σε ασθενή της παρούσας

μελέτης, συμφωνούν τα κλινικά και ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά που τη συνοδεύουν με αυτά σχετικής μελέτης, όπως ο ορώδης υπότυπος, η διάγνωση καρκίνου των ωθηκών σε ηλικία μεγαλύτερη των 45 ετών και η απουσία οικογενειακού ιστορικού [267].

Το γονίδιο PALB2 και η προδιάθεση στον καρκίνο των ωθηκών

Σύμφωνα με τα δεδομένα της παρούσας διατριβής, προκύπτει ότι η συχνότητα της μετάλλαξης p.Arg753Ter του γονιδίου *PALB2* σε πληθυσμό Ελληνίδων ασθενών με επιθηλιακό καρκίνο των ωθηκών είναι εξαιρετικά χαμηλή και πιθανώς να μη σχετίζεται με τον συγκεκριμένο φαινότυπο. Στη διεθνή βιβλιογραφία, η p.Arg753Ter έχει εντοπιστεί τρεις φορές σε άτομα Ευρωπαϊκής καταγωγής που είχαν διαγνωστεί με καρκίνο του μαστού πριν την ηλικία των 50 ετών [268] [269]. Επιπλέον, μέσω του γονιδιακού πάνελ που εφαρμόστηκε στην παρούσα διατριβή ανιχνεύθηκε παθογόνος μετάλλαξη στο *PALB2* σε δύο ασθενείς με καρκίνο ωθηκών (συχνότητα 0,7%). Μία εκ των δύο ασθενών είχε διαγνωστεί και με πρωτοπαθή καρκίνο του μαστού και έφερε μία επιπρόσθετη μετάλλαξη στο γονίδιο *SLX4*, οι μεταλλάξεις του οποίου δεν έχουν συνδεθεί με προδιάθεση στον καρκίνο των ωθηκών και, ως εκ τούτου, κατά τη γενετική συμβουλευτική των ατόμων που φέρουν παθογόνους μεταλλάξεις στο γονίδιο *SLX4* θα πρέπει να συναξιολογείται το οικογενειακό ιστορικό και άλλοι κλινικοί παράγοντες. Θα πρέπει να τονιστεί ότι οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *PALB2* αυξάνουν 2-3 φορές το σχετικό κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού, αν και η συχνότητά τους είναι σχετικά χαμηλή σε αντίστοιχο πληθυσμό ασθενών. Αναφορικά με τον καρκίνο των ωθηκών, η συσχέτιση μεταλλάξεων στο *PALB2* με τον συγκεκριμένο φαινότυπο διερευνήθηκε σε πρόσφατη μελέτη όπου παρόλο που η συχνότητα των παθογόνων μεταλλάξεων στο *PALB2* ήταν ιδιαιτέρως χαμηλή (0,2%) σε πληθυσμό ασθενών με επιθηλιακό καρκίνο των ωθηκών, ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου των ωθηκών τετραπλασιάστηκε, χωρίς ωστόσο να προσεγγίζει τη στατιστική σημαντικότητα [270]. Η χαμηλή συχνότητα παθογόνων μεταλλάξεων στο γονίδιο *PALB2* σε ασθενείς με καρκίνο των ωθηκών φανερώνεται και σε μία άλλη πρόσφατη μελέτη, με τη

συχνότητα να μην ξεπερνά το 0,3% και τους ερευνητές να συμπεραίνουν ότι ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου των ωθηκών σε ασθενείς με μεταλλάξεις στο *PALB2* είναι πιθανότατα μέτριος [81]. Αντίθετα, μια άλλη πρόσφατη μελέτη αναφέρει αυξημένη συχνότητα μεταλλάξεων στο γονίδιο *PALB2* σε ασθενείς με καρκίνο των ωθηκών [87], που προσεγγίζει το 0,6%. Σε μια τελευταία μελέτη οι ερευνητές υπολόγισαν ότι ο κίνδυνος για ανάπτυξη καρκίνου των ωθηκών σε άτομα που φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *PALB2* ήταν μεγαλύτερος περίπου 1,5 φορές, ωστόσο, η συσχέτιση αυτή δεν ήταν μέσα στα όρια της στατιστικής σημαντικότητας [254]. Κατά συνέπεια, η διεξαγωγή επιπρόσθετων μελετών καθίσταται απαραίτητη για την αποσαφήνιση της συχνότητας και της διεισδυτικότητας των μεταλλάξεων του γονιδίου *PALB2* σε ασθενείς με καρκίνο των ωθηκών.

Η σημασία των γονιδιακών πάνελ στην Κλινική Γενετική του Καρκίνου

Η ανάγκη ταυτοποίησης του γενετικού υποβάθρου μεμονωμένων καρκίνων ή καρκίνων που εντάσσονται στα πλαίσια καρκινικών συνδρόμων μέσω χρήσης ποικίλων γονιδιακών πάνελ έχει αυξηθεί ραγδαία τα τελευταία χρόνια. Η στρατηγική αυτή συντελεί στον άμεσο προσδιορισμό του κινδύνου για κληρονομικό καρκίνο, ενώ χαρακτηρίζεται από ευκολία και οικονομική αποδοτικότητα, παρέχοντας πάνελ που περιλαμβάνουν όλα τα γονίδια που σχετίζονται με κάθε τύπο κληρονομικού καρκίνου [271]. Επιπλέον, η χρήση των πάνελ κρίνεται απαραίτητη σε περιπτώσεις όπου η κληρονομικότητα υποκρύπτεται είτε σε μη τυπικούς φαινότυπους ενός καρκινικού συνδρόμου είτε σε ελλιπή στοιχεία οικογενειακού ιστορικού [246]. Η βασικότερη, όμως, αιτία της αυξανόμενης χρήσης των πάνελ είναι ότι μέσω της ταυτοποίησης μεταλλάξεων γαμετικής σειράς ή/και σωματικών μεταλλάξεων ο κλινικός μπορεί να προχωρήσει σε εξατομικευμένες θεραπείες καρκίνων προχωρημένου σταδίου ή μεταστατικών καρκίνων. Η σημαντικότερη πρόκληση που εγείρεται μέσω αυτής της προσέγγισης είναι η αυξανόμενη πιθανότητα εντοπισμού μιας παραλλαγής με άγνωστη κλινική σημασία ή μιας παθογόνου παραλλαγής σε ένα γονίδιο χαμηλής διεισδυτικότητας. Επιπλέον, για αρκετά από τα κοινώς εξεταζόμενα γονίδια δεν έχουν υπολογιστεί με ακρίβεια

οι σχετικοί κίνδυνοι για ανάπτυξη καρκίνου [182]. Οι κατευθυντήριες οδηγίες παραπομπής ενός ατόμου για γονιδιακό έλεγχο θα πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν όταν το ατομικό ή/και οικογενειακό ιστορικό του ατόμου είναι ενδεικτικό ενός κληρονομικού καρκινικού συνδρόμου. Ωστόσο, για πολλά από τα γονίδια, οι μεταλλάξεις των οποίων προδιαθέτουν στον κληρονομικό καρκίνο μαστού ή/και ωοθηκών, που περιλαμβάνονται στα εμπορικά διαθέσιμα πάνελ, δεν έχει προσδιοριστεί επαρκώς η συσχέτισή τους με τη νόσο και, ως εκ τούτου, δε συνοδεύονται από συγκεκριμένες συστάσεις κλινικής διαχείρισης [2].

Με βάση τις ανωτέρω συσχετίσεις, καταδεικνύεται η σημασία της σύνδεσης του γενετικού υποβάθρου περιστατικών καρκίνου των ωοθηκών με την κλινική διαχείριση αυτών των ασθενών διαμορφώνοντας μια νέα προσέγγιση, αυτή της Ιατρικής Ακριβείας (Precision Medicine). Ως εκ τούτου, μέσω της ταυτοποίησης μεταλλάξεων γαμετικής σειράς σε γονίδια οι μεταλλάξεις των οποίων προδιαθέτουν στον καρκίνο μπορεί να προκύψουν εξατομικευμένα πρωτόκολλα παρακολούθησης και προφυλακτικών ενεργειών τόσο σε επίπεδο πρόληψης όσο και θεραπευτικής αντιμετώπισης, όπως γίνεται ήδη με τη χρήση αναστολέων του ενζύμου της πολυμεράσης PARP σε ασθενείς που φέρουν μεταλλάξεις σε γονίδια που συμμετέχουν στο μηχανισμό επιδιόρθωσης μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού [272].

ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Πίνακας 21: Συγκεντρωτικά στοιχεία των 285 ασθενών, που αναλύονται με το γονιδιακό πάνελ Trusight panel, για το ατομικό και οικογενειακό ιστορικό τους.

A/A	Ηλικία Διάγνωσης Καρκίνου Ωοθηκών & Ιστολογικός Τύπος	2 ^{ος} Πρωτοπαθής Καρκίνος	ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ
1800	74χρ. (διαυγοκυτταρικό & ενδομητριοειδές grade III)		1 καρκίνος παχέος εντέρου 1 καρκίνος ωοθηκών
1927	43χρ. (ορώδες grade III)	καρκίνος μαστού 45χρ. (διηθητικό πορογενές grade III)	ελεύθερο
1993	47χρ. (ορώδες grade III)		3 καρκίνοι μαστού 2 καρκίνοι ωοθηκών
2002	42χρ. (ορώδες grade III)	καρκίνος μαστού 38χρ. (διηθητικό πορογενές grade II & DCIS grade III)	1 καρκίνος ωοθηκών
2003	54χρ. (ορώδες grade III)		3 καρκίνοι μαστού
2009	74χρ. (ορώδες)		2 καρκίνοι μαστού 1 καρκίνος ωοθηκών
2013	65χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
2014	41χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού 3 καρκίνοι ωοθηκών
2020	43χρ. (ορώδες grade III)		2 καρκίνοι μαστού 1 καρκίνος ωοθηκών
2043	57χρ. (ορώδες grade III)	καρκίνος μαστού 58χρ.	ελεύθερο
1972	54 χρ. (ορώδες) &	καρκίνος μαστού 62χρ. (DCIS grade I)	1 καρκίνος μαστού
2048	69χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
2058	56χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος ωοθηκών
2059	69χρ. (ορώδες)		ελεύθερο
2066	73χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού
2070	63χρ. (ορώδες στάδιο II)	καρκίνος μαστού 46χρ.	2 καρκίνοι μαστού 1 καρκίνος ωοθηκών
2071	39χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος παχέος εντέρου
2072	41χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
2107	59χρ. (ορώδες grade III)	καρκίνος μαστού 52χρ. (διηθητικό πορογενές grade III & DCIS grade III)	1 καρκίνος μαστού 2 καρκίνοι ωοθηκών
2118	43χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
2152	54χρ. (ορώδες grade II-III)		ελεύθερο
2156	43χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού 1 καρκίνος ωοθηκών
2163	55χρ. (ορώδες grade III)		2 καρκίνοι μαστού
2172	46χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού

2201	57χρ. (μικτό ορώδες/διαυγοκυτταρικό, grade III)		2 καρκίνοι μαστού
2208	49χρ. (ορώδες grade III)		3 καρκίνοι μαστού 1 καρκίνος ωθηκών
2216	54χρ. (ορώδες grade III)	καρκίνος μαστού 50χρ. (δ-DCIS grade III) & καρκίνος μαστού 50χρ. (αρ-διηθητικό πορογενές grade II)	2 καρκίνοι μαστού
2226	37χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος ωθηκών 1 καρκίνος παχέος εντέρου
2232	70χρ. (ορώδες grade III)		4 καρκίνοι μαστού
2233	71χρ. (ορώδες grade III)		2 καρκίνοι μαστού
2250	48χρ. (ορώδες grade III)		2 καρκίνοι ωθηκών
2262	51χρ. (ορώδες grade II-III)		1 καρκίνος παχέος εντέρου
2269	72χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού 1 καρκίνος παχέος εντέρου
2331	46χρ. (ορώδες grade III)		2 καρκίνοι μαστού 1 καρκίνος ωθηκών
2337	47χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού
2346	56χρ. (ορώδες grade III)	καρκίνος μαστού 36χρ.	1 καρκίνος μαστού 1 καρκίνος παχέος εντέρου
2357	60χρ. (ενδομητριοειδές grade III)	καρκίνος μαστού 57χρ. (διηθητικό πορογενές grade III)	2 καρκίνοι μαστού 1 καρκίνος παχέος εντέρου
2358	39χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
2401	48χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
2403	46χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού
2408	38χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος ωθηκών 1 καρκίνος παχέος εντέρου
2425	55χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
2450	61χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
2475	51χρ. (ορώδες grade III)		2 καρκίνοι μαστού
2492	57χρ. (ορώδες grade II-III)		1 καρκίνος μαστού 1 καρκίνος ωθηκών
2501	40χρ. (ορώδες grade II)	καρκίνος μαστού 58χρ. (διηθητικό πορογενές grade III)	1 καρκίνος μαστού
2507	75χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού
2523	68χρ. (ορώδες grade III)		4 καρκίνοι μαστού 2 καρκίνοι ωθηκών
2528	52χρ. (μικτό ορώδες/ενδομητριοειδές, grade II-III)		1 καρκίνος ωθηκών
2539	53χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
2577	49χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
2656	54χρ. (ορώδες grade III)		2 καρκίνοι μαστού
2803	71χρ. (ορώδες grade II-III)		2 καρκίνοι μαστού

2883	58χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού
2895	31χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
2910	69χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
2931	47χρ. (ενδομητριοειδές grade III)	καρκίνος μαστού 62χρ. (διηθητικό λοβιακό & LCIS)	ελεύθερο
1290	66χρ. (μη διαθέσιμη ιστολογική)		ελεύθερο
4446	52χρ. (ορώδες grade II)		ελεύθερο
4642	78χρ. (ορώδες)		ελεύθερο
1110α	31χρ. (μη διαθέσιμη ιστολογική)		1 καρκίνος ωοθηκών
1218	37χρ. (ενδομητριοειδές grade I)		1 καρκίνος μαστού
1478	55χρ. (μικτό ορώδες/ενδομητριοειδές)		1 καρκίνος μαστού 1 καρκίνος ωοθηκών
1876	57χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού
1926	64χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού
1930	29χρ. (ορώδες grade III)	καρκίνος μαστού 25χρ. (αρ-διηθητικό λοβιακό grade II) & καρκίνος μαστού 30χρ. (δ-διηθητικό πορογενές grade II)	ελεύθερο
2924	37χρ. (ενδομητριοειδές grade I)	καρκίνος μαστού 41χρ. (διηθητικό πορογενές grade II)	1 καρκίνος μαστού 1 καρκίνος ωοθηκών
1958	45χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού 1 καρκίνος παχέος εντέρου
1980	26χρ. (ενδομητριοειδές grade III)		1 καρκίνος μαστού
2035	57χρ. (ορώδες grade II)		1 καρκίνος μαστού 1 καρκίνος ωοθηκών
2037	67χρ. (ορώδες)		1 καρκίνος μαστού 1 καρκίνος ωοθηκών
2038	47χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού 1 καρκίνος παχέος εντέρου
2041	40χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού 1 καρκίνος παχέος εντέρου
2042	43χρ. (ορώδες grade III)		2 καρκίνοι μαστού 1 καρκίνος ωοθηκών
2052	65χρ. (ορώδες grade III)		3 καρκίνοι μαστού
2061	60χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος ωοθηκών
2064	56χρ. (ορώδες grade III)		4 καρκίνοι μαστού
2073	55χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος ωοθηκών
2077	59χρ. (μικτό ενδομητριοειδές/ διαυγοκυτταρικό/ορώδες grade III)		2 καρκίνοι μαστού
2101	45χρ. (ορώδες grade III)		3 καρκίνοι μαστού
2106	28χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος ενδομητρίου
2126	26χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος ενδομητρίου

2153	33χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος παχέος εντέρου
2160	71χρ. (ορώδες)	καρκίνος μαστού 72χρ. (διηθητικό πορογενές grade I-II)	4 καρκίνοι μαστού
2166	47χρ. (ορώδες οριακής κακοήθειας grade III)		2 καρκίνοι μαστού
2168	37χρ. (ορώδες grade III)		2 καρκίνοι παχέος εντέρου
2175	75χρ. (ορώδες grade III)		5 καρκίνοι μαστού
2176	44χρ. (ορώδες)		1 καρκίνος μαστού
2230	48χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού
5093	37χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
2245	42χρ. (ορώδες grade III)		2 καρκίνοι μαστού 1 καρκίνος ωοθηκών
2256	68χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού 1 καρκίνος ωοθηκών
2268	71χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος ωοθηκών
2296	47χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού
2300	56χρ. (ορώδες grade II-III)		2 καρκίνοι μαστού 1 καρκίνος ωοθηκών
2313	61χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού
2353	58χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού
2359	62χρ. (ορώδες grade III)	καρκίνος μαστού 58χρ. (διηθητικό πορογενές grade I)	1 καρκίνος μαστού 1 καρκίνος παχέος εντέρου
2368	64χρ. (ορώδες grade III, στάδιο IIIc)		1 καρκίνος ωοθηκών 1 καρκίνος παχέος εντέρου
2382	50χρ. (ορώδες grade III, στάδιο IIIc)		ελεύθερο
2392	51χρ. (ορώδες grade III)	καρκίνος μαστού 40χρ. (διηθητικό πορογενές)	ελεύθερο
2393	41χρ. (μικτό ορώδες/διαυγοκυτταρικό, grade III)		1 καρκίνος μαστού
2397	65χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος ωοθηκών 1 καρκίνος παχέος εντέρου
2410	59χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού
2416	32χρ. (ορώδες grade I)		2 καρκίνοι μαστού 1 καρκίνος ενδομητρίου
2435	20χρ. (ορώδες grade I)		ελεύθερο
2446	72χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος ωοθηκών 1 καρκίνος παχέος εντέρου
2465	68χρ. (ορώδες)		1 καρκίνος ωοθηκών 1 καρκίνος παχέος εντέρου
2476	53χρ. (ορώδες grade II-III)		1 καρκίνος μαστού
2488	60χρ. (ορώδες grade III)		2 καρκίνοι μαστού 2 καρκίνοι παχέος εντέρου
2498	46χρ. (ενδομητριοειδές grade I)	καρκίνος ενδομητρίου 46χρ. (ενδομητριοειδές grade I-II)	1 καρκίνος μαστού 1 καρκίνος παχέος εντέρου

2512	45χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος παχέος εντέρου
2525	47χρ. (ενδομητριοειδές grade II)		1 καρκίνος μαστού 1 καρκίνος παχέος εντέρου
2633	63χρ. (μικτό ενδομητριοειδές/ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού 1 καρκίνος παχέος εντέρου
2670	56χρ. (ορώδες οριακής κακοήθειας)	καρκίνος μαστού 70χρ. (αρ-διηθητικό λοβιακό grade II) & καρκίνος μαστού 74χρ. (δ-διηθητικό πορογενές grade II)	1 καρκίνος ωοθηκών
2734	56χρ. (ορώδες grade III)	καρκίνος μαστού 53χρ. (διηθητικό πορογενές grade III)	1 καρκίνος μαστού
2750	75χρ. (αποδιαφοροποιημένο)		2 καρκίνοι μαστού
2777	52χρ. (ενδομητριοειδές grade II)		3 καρκίνοι μαστού
2788	66χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού 1 καρκίνος παχέος εντέρου
2792	63χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού
5065	53χρ. (ορώδες grade II-III)		ελεύθερο
2824	30χρ. (διαυγοκυτταρικό grade III)		1 καρκίνος μαστού
2866	38χρ. (ενδομητριοειδές grade I)	καρκίνος ενδομητρίου 38χρ. (ενδομητριοειδές grade I)	1 καρκίνος μαστού 2 καρκίνοι ενδομητρίου
2880	64χρ. (ορώδες grade III)	καρκίνος μαστού 51χρ. (grade III)	1 καρκίνος μαστού
2881	55χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού
2884	56χρ. (ορώδες grade III)	καρκίνος μαστού 54χρ. (DCIS grade III)	ελεύθερο
2898	58χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού
2904	45χρ. (ορώδες)		1 καρκίνος μαστού
1145	67 χρ. (μη διαθέσιμη ιστολογική)		ελεύθερο
1291	48 χρ. (μη διαθέσιμη ιστολογική)		ελεύθερο
1292	68 χρ. (μη διαθέσιμη ιστολογική)		ελεύθερο
1328	65 χρ. (ορώδες grade II)		ελεύθερο
1340	59 χρ. (μη διαθέσιμη ιστολογική)		ελεύθερο
1353	75 χρ. (μη διαθέσιμη ιστολογική)		ελεύθερο
2054	57 χρ. (μη διαθέσιμη ιστολογική)		ελεύθερο
2058sro	80 χρ. (μη διαθέσιμη ιστολογική)		ελεύθερο
2065	70 χρ. (μη διαθέσιμη ιστολογική)		ελεύθερο
2807	60χρ. (μικτό ορώδες grade II/ενδομητριοειδές)		1 καρκίνος μαστού
3200	65χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
3206	59χρ. (ενδομητριοειδές grade III)		1 καρκίνος μαστού

3271	41χρ. (ενδομητριοειδές grade III)		ελεύθερο
3328	71χρ. (ορώδες grade III, στάδιο IIIc)		ελεύθερο
3332	75 χρ. (μη διαθέσιμη ιστολογική)		ελεύθερο
3340	63χρ. (ενδομητριοειδές)		ελεύθερο
3474	59χρ. (ενδομητριοειδές)		ελεύθερο
3486	68χρ. (ορώδες grade II-III)		ελεύθερο
3958	48χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4070	57 χρ. (μη διαθέσιμη ιστολογική)		ελεύθερο
4399	55χρ. (ορώδες grade II-III)		ελεύθερο
4405	78χρ. (μη διαθέσιμη ιστολογική)		ελεύθερο
4428	41χρ. (ορώδες grade II-III)		ελεύθερο
4504	55χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4531	37χρ. (δ-ορώδες οριακής κακοήθειας) & 38χρ. (αρ-ορώδες)		ελεύθερο
4553	42χρ. (ορώδες grade II)		1 καρκίνος παχέος εντέρου
4557	78χρ. (ορώδες, grade II)		1 καρκίνος μαστού 1 καρκίνος παχέος εντέρου
4564	40χρ. (ορώδες οριακής κακοήθειας)		ελεύθερο
4570	57χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4574	63χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4579	57χρ. (ενδομητριοειδές)		1 καρκίνος μαστού
4585	30χρ. (ενδομητριοειδές grade I)		1 καρκίνος παχέος εντέρου
4588	26χρ. (ορώδες οριακής κακοήθειας)		ελεύθερο
4589	51χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού
4592	68χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος παχέος εντέρου
4593	59χρ. (ορώδες)		ελεύθερο
4594	54χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4595	37χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4598	50χρ. (ορώδες grade III)	καρκίνος μαστού 36χρ. (διηθητικό πορογενές grade III)	ελεύθερο
4599	62χρ. (ορώδες grade II-III)		ελεύθερο
4601	58χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος παχέος εντέρου
4606	52χρ. (ορώδες οριακής κακοήθειας)		ελεύθερο

4609	60χρ. (ορώδες)		ελεύθερο
4614	62χρ. (ορώδες)		ελεύθερο
4615	58χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4616	62χρ. (ορώδες grade III)		2 καρκίνοι μαστού
4617	46χρ. (ενδομητριοειδές grade II)		ελεύθερο
4618	51χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος παχέος εντέρου
4621	62χρ. (ορώδες grade I)		1 καρκίνος μαστού
4622	59χρ. (ορώδες)		ελεύθερο
4623	69χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος ωθηκών
4624	73χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος ωθηκών
4629	56χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4632	69χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4633	43χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4636	68χρ. (ορώδες grade II)		ελεύθερο
4637	49χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4638	52χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4639	46χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος παχέος εντέρου
4640	56χρ. (ορώδες grade I)		ελεύθερο
4641	61χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4643	57χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4644	64χρ. (ορώδες grade II)		ελεύθερο
4648	75χρ. (ορώδες grade II)		ελεύθερο
4649	49χρ. (αρ-μικτό ορώδες/ενδομητριοειδές/ διαυγοκυτταρικό grade III & δ- διαυγοκυτταρικό/ενδομητριοειδές grade III)		ελεύθερο
4650	53χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4651	68χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4653	75χρ. & 78χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4654	43χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4656	63χρ. (διαυγοκυτταρικό grade III)		ελεύθερο
4657	47χρ. (ορώδες grade II)		ελεύθερο

4661	49χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4662	54χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4663	55χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4664	69χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού
4666	57χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4667	51χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος παχέος εντέρου
4668	54χρ. (ορώδες grade II-III)		ελεύθερο
4672	68χρ. (ορώδες grade III)		καρκίνος παχέος εντέρου
4673	52χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4674	49χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4677	49χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού 1 καρκίνος παχέος εντέρου
4678	65χρ. (δ-ορώδες grade III / αρ-ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού
4680	78χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4684	55χρ. & 57χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού
4685	58χρ. (ορώδες grade III,)		ελεύθερο
4686	66χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4687	48χρ. (ορώδες)		ελεύθερο
4688	75χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4689	61χρ. (ορώδες grade III)		άγνωστο
4691	58χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού
4694	51χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4695	69χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4696	46χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
1944	46χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος ωοθηκών 1 καρκίνος παχέος εντέρου
2196	52χρ. (ορώδες grade III)	καρκίνος παχέος εντέρου 61χρ.	1 καρκίνος ωοθηκών
1303	50χρ. (μη διαθέσιμη ιστολογική)		άγνωστο
2486	42χρ. (ορώδες grade III)	καρκίνος μαστού 36χρ. (δ-DCIS, grade III) καρκίνος μαστού 49χρ. (αρ-διηθητικό πορογενές grade III)	ελεύθερο
4893	55χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4814	48χρ. (ορώδες grade II-III)		άγνωστο

2185	40χρ. (ορώδες grade III)	καρκίνος μαστού 38χρ. (διηθητικό πορογενές, grade III)	ελεύθερο
2599	48χρ. (ορώδες grade II-III)	καρκίνος παγκρέατος 60χρ.	1 καρκίνος μαστού
2093	52χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού
4808	46χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
2468	56χρ. (ορώδες grade III)	καρκίνος μαστού 53χρ. (διηθητικό πορογενές grade II)	2 καρκίνοι μαστού 1 καρκίνος ωοθηκών
4815	42χρ. (ενδομητριοειδές grade II)	καρκίνος ενδομητρίου 42χρ. (ενδομητριοειδές)	άγνωστο
2140	46χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού 1 καρκίνος παχέος εντέρου
2942	40χρ. (ορώδες grade I)		2 καρκίνοι μαστού
2364	48χρ. (ορώδες grade III)	καρκίνος μαστού 44χρ. (διηθητικό πορογενές grade II)	2 καρκίνοι μαστού
4744	56χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος παχέος εντέρου
4972	49χρ. (ορώδες grade II)		ελεύθερο
4915	28χρ. (ορώδες grade I)		ελεύθερο
4939	28χρ. (ορώδες)		ελεύθερο
5098	48χρ. (ενδομητριοειδές grade II)		ελεύθερο
5100	69χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
5104	54χρ. (διαυγοκυτταρικό grade III)		ελεύθερο
4978	34χρ. (αρ-ενδομητριοειδές grade III / δ- ενδομητριοειδές οριακής κακοήθειας)	καρκίνος παγκρέατος 35χρ. (αδενοπλάκωδες)	ελεύθερο
4861	36χρ. (ενδομητριοειδές grade I)		ελεύθερο
4937	36χρ. (ορώδες οριακής κακοήθειας)		ελεύθερο
5114	58χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4531	37χρ. (δ-ορώδες οριακής κακοήθειας) & 38χρ. (αρ- ορώδες)		ελεύθερο
4714	39χρ. (ορώδες grade II)		1 καρκίνος παχέος εντέρου
1593	40χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
2243	40χρ. (ενδομητριοειδές grade I)	καρκίνος ενδομητρίου 40χρ. (ενδομητριοειδές grade I)	1 καρκίνος μαστού
1885	41χρ. (ορώδες grade III)		2 καρκίνοι μαστού 1 καρκίνος ωοθηκών
4928	43χρ. (ορώδες οριακής κακοήθειας)		ελεύθερο
4968	44χρ. (διαυγοκυτταρικό)		ελεύθερο
2047	45χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού
4922	45χρ. (διαυγοκυτταρικό grade I-II)		ελεύθερο

2498	46χρ. (I-ενδομητριοειδές grade I)	καρκίνος ενδομητρίου 46χρ. (ενδομητριοειδές grade I-II)	1 καρκίνος παχέος εντέρου 1 καρκίνος μαστού
1291	48χρ. (μη διαθέσιμη ιστολογική)		άγνωστο
2190	49χρ. (ενδομητριοειδές grade III & διαυγοκυτταρικό)		2 καρκίνοι μαστού
4830	50χρ. (διαυγοκυτταρικό grade III)		ελεύθερο
1294	50χρ. (μη διαθέσιμη ιστολογική)		άγνωστο
2057	51χρ. (μη διαθέσιμη ιστολογική)		άγνωστο
2259	55χρ. (ορώδες grade III)	καρκίνος μαστού 49χρ.	2 καρκίνοι μαστού
4926	55χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
2919	57χρ. (ενδομητριοειδές, grade I)		3 καρκίνοι μαστού 7 καρκίνοι παχέος εντέρου 1 καρκίνος ωθηκών
2953	76χρ. (ορώδες grade III)		2 καρκίνοι μαστού
4946	57χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού
2947	55χρ. (αποδιαφοροποιημένο, grade III)		1 καρκίνος ωθηκών
5092	73χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού
5100	69χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
5106	57χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
5114	58χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
5121	71 χρ. (ενδομητριοειδές grade I)		ελεύθερο
5126	41 χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
5149	67 χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
5154	69 χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
2959	53χρ. (ορώδες)		1 καρκίνος ωθηκών
2970	67χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος ωθηκών
2972	26χρ. (ορώδες grade III)		2 καρκίνοι μαστού
2981	68χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού 1 καρκίνος παχέος εντέρου
2989	60χρ. (ορώδες grade III)		4 καρκίνοι μαστού 1 καρκίνος ωθηκών
3027	45χρ. (ορώδες grade I)		1 καρκίνος μαστού
3035	55 χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού
3038	50χρ. (ενδομητριοειδές grade I)		3 καρκίνοι μαστού

Πίνακας 22: Συγκεντρωτικά στοιχεία 202 ασθενών, που βρέθηκαν να μη φέρουν παθογόνους μεταλλάξεις στα υπό εξέταση γονίδια του Trusight panel, για το ατομικό και οικογενειακό ιστορικό τους.

A/A	Ηλικία & Ιστολογικός Τύπος Καρκίνου Ωοθηκών	2 ^{ος} Πρωτοπαθής Καρκίνος	ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ
1110α	31χρ. (μη διαθέσιμη ιστολογική)		1 καρκίνος ωοθηκών
2953	76χρ. (ορώδες grade III)		2 καρκίνοι μαστού
2919	57χρ. (ενδομητριοειδές, grade I)		3 καρκίνοι μαστού 7 καρκίνοι παχέος εντέρου 1 καρκίνος ωοθηκών
2947	55χρ. (αποδιαφοροποιημένο, grade III)		1 καρκίνος ωοθηκών
2924	37χρ. (ενδομητριοειδές grade I)	καρκίνος μαστού 41χρ. (διηθητικό πορογενές grade II)	1 καρκίνος μαστού 1 καρκίνος ωοθηκών
2058spo	80 χρ. (μη διαθέσιμη ιστολογική)		ελεύθερο
4680	78χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4405	78χρ. (μη διαθέσιμη ιστολογική)		ελεύθερο
4557	78χρ. (ορώδες, grade II)		1 καρκίνος μαστού 1 καρκίνος παχέος εντέρου
2750	75χρ. (αποδιαφοροποιημένο)		2 καρκίνοι μαστού
2175	75χρ. (ορώδες grade III)		5 καρκίνοι μαστού
4653	Καρκίνος ωοθηκών 75χρ. & 78χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4688	75χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4648	75χρ. (ορώδες grade II)		ελεύθερο
1353	75 χρ. (μη διαθέσιμη ιστολογική)		ελεύθερο
3332	75 χρ. (μη διαθέσιμη ιστολογική)		ελεύθερο
4624	73χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος ωοθηκών
5092	73χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού
2446	72χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος ωοθηκών 1 καρκίνος παχέος εντέρου
2160	71χρ. (ορώδες)	καρκίνος μαστού 72χρ. (διηθητικό πορογενές grade I-II)	4 καρκίνοι μαστού
3328	71χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
2268	71χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος ωοθηκών
2065	70 χρ. (μη διαθέσιμη ιστολογική)		ελεύθερο
4623	69χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος ωοθηκών
4664	69χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού

5100	69χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4632	69χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4695	69χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
2256	68χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού 1 καρκίνος ωοθηκών
4672	68χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος παχέος εντέρου
3486	68χρ. (ορώδες grade II-III)		ελεύθερο
4592	68χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος παχέος εντέρου
2465	68χρ. (ορώδες)		1 καρκίνος ωοθηκών 1 καρκίνος παχέος εντέρου
4636	68χρ. (ορώδες grade II)		ελεύθερο
1292	68 χρ. (μη διαθέσιμη ιστολογική)		ελεύθερο
2037	67χρ. (ορώδες)		1 καρκίνος μαστού 1 καρκίνος ωοθηκών
1145	67 χρ. (μη διαθέσιμη ιστολογική)		ελεύθερο
4686	66χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
2788	66χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού 1 καρκίνος παχέος εντέρου
2397	65χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος ωοθηκών 1 καρκίνος παχέος εντέρου
2052	65χρ. (ορώδες grade III)		3 καρκίνοι μαστού
3200	65χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4678	65χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού
1328	65 χρ. (ορώδες grade II)		ελεύθερο
2368	64χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος ωοθηκών 1 καρκίνος παχέος εντέρου
1926	64χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού
4644	64χρ. (ορώδες grade II)		ελεύθερο
4574	63χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
2792	63χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού
3340	63χρ. (ενδομητριοειδές)		ελεύθερο
2633	63χρ. (μικτό ενδομητριοειδές/ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού 1 καρκίνος παχέος εντέρου
4656	63χρ. (διαυγοκυτταρικό grade III)		ελεύθερο
4599	62χρ. (ορώδες grade II-III)		ελεύθερο
4616	62χρ. (ορώδες grade III)		2 καρκίνοι μαστού
4621	62χρ. (ορώδες grade I)		1 καρκίνος μαστού

4614	62χρ. (ορώδες)		ελεύθερο
4641	61χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4689	61χρ. (ορώδες grade III)		άγνωστο
2313	61χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού
4609	60χρ. (ορώδες)		ελεύθερο
2488	60χρ. (ορώδες grade III)		2 καρκίνοι μαστού 2 καρκίνοι παχέος εντέρου
2061	60χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος ωοθηκών
4593	59χρ. (ορώδες)		ελεύθερο
4622	59χρ. (ορώδες)		ελεύθερο
2077	59χρ. (μικτό ενδομητριοειδές/ διαυγοκυτταρικό/ορώδες grade III)		2 καρκίνοι μαστού
3474	59χρ. (ενδομητριοειδές)		ελεύθερο
3206	59χρ. (ενδομητριοειδές grade III)		1 καρκίνος μαστού
2410	59χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού
1340	59 χρ. (μη διαθέσιμη ιστολογική)		ελεύθερο
4685	58χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4601	58χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος παχέος εντέρου
2898	58χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού
2353	58χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού
4691	58χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού
4615	58χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
5114	58γ (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4946	57χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού
4643	57χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4579	57χρ. (ενδομητριοειδές)		1 καρκίνος μαστού
1876	57χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού
4570	57χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
2035	57χρ. (ορώδες grade II)		1 καρκίνος μαστού 1 καρκίνος ωοθηκών
2054	57 χρ. (μη διαθέσιμη ιστολογική)		ελεύθερο
4070	57 χρ. (μη διαθέσιμη ιστολογική)		ελεύθερο
2300	56χρ. (ορώδες grade II-III)		2 καρκίνοι μαστού 1 καρκίνος ωοθηκών

2064	56χρ. (ορώδες grade III)		4 καρκίνοι μαστού
4744	56χρ. (ορώδες grade III)		καρκίνος παχέος εντέρου
4629	56χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
2670	56χρ. (ορώδες οριακής κακοήθειας)	καρκίνος μαστού 70χρ. (αρ-διηθητικό λοβιακό grade II) & καρκίνος μαστού 74χρ. (δ-LCIS grade II & DCIS)	1 καρκίνος ωοθηκών 2 καρκίνοι παχέος εντέρου
4640	56χρ. (ορώδες grade I)		ελεύθερο
4399	55χρ. (ορώδες grade II-III)		ελεύθερο
4926	55χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
2881	55χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού
2073	55χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος ωοθηκών
4684	55χρ. & 57χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού
4663	55χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
5104	54χρ. (διαυγοκυτταρικό grade III)		ελεύθερο
4662	54χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4594	54χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4650	53χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
2476	53χρ. (ορώδες grade II-III)		1 καρκίνος μαστού
5065	53χρ. (ορώδες grade II-III)		ελεύθερο
4638	52χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4673	52χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4606	52χρ. (ορώδες οριακής κακοήθειας)		ελεύθερο
2777	52χρ. (ενδομητριοειδές grade II)		3 καρκίνοι μαστού
4618	51χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος παχέος εντέρου
2057	51χρ. (μη διαθέσιμη ιστολογική)		άγνωστο
4589	51χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού
4667	51χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος παχέος εντέρου
4694	51χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
1294	50χρ. (μη διαθέσιμη ιστολογική)		άγνωστο
2382	50χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4830	50χρ. (διαυγοκυτταρικό grade III)		ελεύθερο

4677	49χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού 1 καρκίνος παχέος εντέρου
4972	49χρ. (ορώδες grade II)		ελεύθερο
2190	49χρ. (μικτό ενδομητριοειδές/διαυγοκυτταρικό grade III)		2 καρκίνοι μαστού
4637	49χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4649	49χρ. (αρ-μικτό ορώδες/ενδομητριοειδές/διαυγοκυτταρικό grade III & δ-διαυγοκυτταρικό/ενδομητριοειδές grade III & ορώδες grade III)		ελεύθερο
4661	49χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4674	49χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4687	48χρ. (ορώδες)		ελεύθερο
2230	48χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού
1291	48χρ. (μη διαθέσιμη ιστολογική)		άγνωστο
3958	48χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
5098	48χρ. (ενδομητριοειδές grade II)		ελεύθερο
1291	48 χρ. (μη διαθέσιμη ιστολογική)		ελεύθερο
2166	47χρ. (ορώδες οριακής κακοήθειας grade III)		2 καρκίνοι μαστού
2038	47χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού 1 καρκίνος παχέος εντέρου
2296	47χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού
4657	47χρ. (ορώδες grade II)		ελεύθερο
4696	46χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
2498	46χρ. (ενδομητριοειδές grade I)	καρκίνος ενδομητρίου 46χρ. (ενδομητριοειδές grade I-II)	1 καρκίνος μαστού 1 καρκίνος παχέος εντέρου
4617	46χρ. (ενδομητριοειδές grade II)		ελεύθερο
4639	46χρ. (ορώδες grade III)		καρκίνος παχέος εντέρου
2904	45χρ. (ορώδες)		1 καρκίνος μαστού
2512	45χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος παχέος εντέρου
4922	45χρ. (διαυγοκυτταρικό grade I-II)		ελεύθερο
1958	45χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού 1 καρκίνος παχέος εντέρου
2047	45χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού
2101	45χρ. (ορώδες grade III)		3 καρκίνοι μαστού
2176	44χρ. (ορώδες)		1 καρκίνος μαστού

4968	44χρ. (διαυγοκυτταρικό)		ελεύθερο
4928	43χρ. (ορώδες οριακής κακοήθειας)		ελεύθερο
2042	43χρ. (ορώδες grade III)		2 καρκίνοι μαστού 1 καρκίνος ωοθηκών
4654	43χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4633	43χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4553	42χρ. (ορώδες grade II)		καρκίνος παχέος εντέρου
2245	42χρ. (ορώδες grade III)		2 καρκίνοι μαστού 1 καρκίνος ωοθηκών
2393	41χρ. (μικτό ορώδες/διαυγοκυτταρικό, grade III)		1 καρκίνος μαστού
3271	41χρ. (ενδομητριοειδές grade III)		ελεύθερο
4428	41χρ. (ορώδες grade II-III)		ελεύθερο
1885	41χρ. (ορώδες grade III)		2 καρκίνοι μαστού 1 καρκίνος ωοθηκών
4564	40χρ. (ορώδες οριακής κακοήθειας)		ελεύθερο
2041	40χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού 1 καρκίνος παχέος εντέρου
1593	40χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
2243	40χρ. (ενδομητριοειδές grade I)	καρκίνος ενδομητρίου 40χρ. (ενδομητριοειδές grade I)	1 καρκίνος μαστού
4714	39χρ. (ορώδες grade II)		1 καρκίνος παχέος εντέρου
2866	38χρ. (ενδομητριοειδές grade I)	καρκίνος ενδομητρίου 38χρ. (ενδομητριοειδές grade I)	1 καρκίνος μαστού 2 καρκίνος ενδομητρίου
1218	37χρ. (ενδομητριοειδές grade I)		1 καρκίνος μαστού
4531	37χρ. (δ-ορώδες οριακής κακοήθειας) & 38χρ. (αρ-ορώδες)		ελεύθερο
4595	37χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
2168	37χρ. (ορώδες grade III)		2 καρκίνοι παχέος εντέρου
5093	37χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
4531	37χρ. (δ-ορώδες οριακής κακοήθειας) & 38χρ. (αρ-ορώδες)		ελεύθερο
4937	36χρ. (ορώδες οριακής κακοήθειας)		ελεύθερο
4861	36χρ. (αρ-ενδομητριοειδές grade I)		ελεύθερο
4978	34χρ. (αρ-ενδομητριοειδές grade III / δ- ενδομητριοειδές)	καρκίνος παγκρέατος 35χρ. (αδενοπλάκωδες)	ελεύθερο
2153	33χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος παχέος εντέρου
2416	32χρ. (ορώδες grade I)		2 καρκίνοι μαστού 1 καρκίνος ενδομητρίου
4585	30χρ. (ενδομητριοειδές grade I)		καρκίνος παχέος εντέρου
2824	30χρ. (διαυγοκυτταρικό grade III)		1 καρκίνος μαστού

4939	28χρ. (ορώδες)		ελεύθερο
2106	28χρ. (ορώδες grade III)		καρκίνος ενδομητρίου
4915	28χρ. (ορώδες grade I)		ελεύθερο
2126	26χρ. (ορώδες grade III)		καρκίνος ενδομητρίου
1980	26χρ. (ενδομητριοειδές grade III)		1 καρκίνος μαστού
4588	26χρ. (ορώδες οριακής κακοήθειας)		ελεύθερο
2435	20χρ. (ορώδες grade I)		ελεύθερο
2359	62χρ. (ορώδες grade III)	Καρκίνος μαστού 58χρ. (διηθητικό πορογενές grade I)	1 καρκίνος μαστού 1 καρκίνος παχέος εντέρου
2884	56χρ. (ορώδες grade III)	Καρκίνος μαστού 54χρ. (DCIS comedo grade III)	ελεύθερο
2880	64χρ. (ορώδες grade III)	Καρκίνος μαστού 51χρ. (grade III, TNBC)	1 καρκίνος μαστού
2259	55χρ. (ορώδες grade III)	Καρκίνος μαστού 49χρ. (HER2+)	2 καρκίνοι μαστού
2392	51χρ. (ορώδες grade III)	Καρκίνος μαστού 40χρ. (διηθητικό πορογενές)	ελεύθερο
4598	50χρ. (ορώδες grade III)	Καρκίνος μαστού 36χρ. (διηθητικό πορογενές grade III)	ελεύθερο
1930	29χρ. (ορώδες grade III)	Καρκίνος μαστού 25χρ. (αρ-διηθητικό λοβιακό grade II) & Καρκίνος μαστού 30χρ. (δ-διηθητικό πορογενές grade II)	ελεύθερο
5100	69 χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
5106	57 χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
5114	58 χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
5121	71 χρ. (ενδομητριοειδές grade I)		ελεύθερο
5126	41 χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
5149	67 χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
5154	69 χρ. (ορώδες grade III)		ελεύθερο
2959	53χρ. (ορώδες)		1 καρκίνος ωθηκών
2970	67χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος ωθηκών
2972	26χρ. (ορώδες grade III)		2 καρκίνοι μαστού
2981	68χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού 1 καρκίνος παχέος εντέρου
2989	60χρ. (ορώδες grade III)		4 καρκίνοι μαστού 1 καρκίνος ωθηκών
3027	45χρ. (ορώδες grade I)		1 καρκίνος μαστού
3035	55 χρ. (ορώδες grade III)		1 καρκίνος μαστού
3038	50χρ. (ενδομητριοειδές grade I)		3 καρκίνοι μαστού

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Larsen, M.J., et al., *Hereditary breast cancer: clinical, pathological and molecular characteristics*. Breast Cancer (Auckl), 2014. **8**: p. 145-55.
2. Daly, M.B., et al., *NCCN Guidelines Insights: Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian, Version 2.2017*. J Natl Compr Canc Netw, 2017. **15**(1): p. 9-20.
3. Shiovitz, S. and L.A. Korde, *Genetics of breast cancer: a topic in evolution*. Ann Oncol, 2015. **26**(7): p. 1291-9.
4. Hall, J.M., et al., *Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21*. Science, 1990. **250**(4988): p. 1684-9.
5. Wooster, R., et al., *Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13*. Science, 1994. **265**(5181): p. 2088-90.
6. Wooster, R., et al., *Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2*. Nature, 1995. **378**(6559): p. 789-92.
7. Miki, Y., et al., *A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1*. Science, 1994. **266**(5182): p. 66-71.
8. Wu, W., et al., *The ubiquitin E3 ligase activity of BRCA1 and its biological functions*. Cell Div, 2008. **3**: p. 1.
9. Baer, R. and T. Ludwig, *The BRCA1/BARD1 heterodimer, a tumor suppressor complex with ubiquitin E3 ligase activity*. Curr Opin Genet Dev, 2002. **12**(1): p. 86-91.
10. Chapman, M.S. and I.M. Verma, *Transcriptional activation by BRCA1*. Nature, 1996. **382**(6593): p. 678-9.
11. Savage, K.I. and D.P. Harkin, *BRCA1, a 'complex' protein involved in the maintenance of genomic stability*. FEBS J, 2015. **282**(4): p. 630-46.
12. Manke, I.A., et al., *BRCT repeats as phosphopeptide-binding modules involved in protein targeting*. Science, 2003. **302**(5645): p. 636-9.
13. Rajendra, E. and A.R. Venkitaraman, *Two modules in the BRC repeats of BRCA2 mediate structural and functional interactions with the RAD51 recombinase*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(1): p. 82-96.
14. Yang, H., et al., *BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure*. Science, 2002. **297**(5588): p. 1837-48.
15. Knudson, A.G., Jr., *Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1971. **68**(4): p. 820-3.
16. Tapia, T., et al., *Promoter hypermethylation of BRCA1 correlates with absence of expression in hereditary breast cancer tumors*. Epigenetics, 2008. **3**(3): p. 157-63.
17. Thompson, D. and D. Easton, *The genetic epidemiology of breast cancer genes*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2004. **9**(3): p. 221-36.
18. King, M.C., et al., *Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2*. Science, 2003. **302**(5645): p. 643-6.
19. Narod, S.A. and W.D. Foulkes, *BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(9): p. 665-76.
20. Foulkes, W.D. and A.Y. Shuen, *In brief: BRCA1 and BRCA2*. J Pathol, 2013. **230**(4): p. 347-9.
21. Wang, Y., et al., *BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures*. Genes Dev, 2000. **14**(8): p. 927-39.
22. Spearman, A.D., et al., *Clinically applicable models to characterize BRCA1 and BRCA2 variants of uncertain significance*. J Clin Oncol, 2008. **26**(33): p. 5393-400.
23. Antoniou, A.C. and D.F. Easton, *Models of genetic susceptibility to breast cancer*. Oncogene, 2006. **25**(43): p. 5898-905.
24. Mavaddat, N., et al., *Pathology of breast and ovarian cancers among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2 (CIMBA)*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2012. **21**(1): p. 134-47.
25. van der Groep, P., E. van der Wall, and P.J. van Diest, *Pathology of hereditary breast cancer*. Cell Oncol (Dordr), 2011. **34**(2): p. 71-88.
26. de Ruijter, T.C., et al., *Characteristics of triple-negative breast cancer*. J Cancer Res Clin Oncol, 2011. **137**(2): p. 183-92.

27. Lakhani, S.R., et al., *Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(14): p. 5175-80.
28. Greenblatt, M.S., et al., *TP53 mutations in breast cancer associated with BRCA1 or BRCA2 germ-line mutations: distinctive spectrum and structural distribution*. Cancer Res, 2001. **61**(10): p. 4092-7.
29. Honrado, E., et al., *Immunohistochemical classification of non-BRCA1/2 tumors identifies different groups that demonstrate the heterogeneity of BRCA families*. Mod Pathol, 2007. **20**(12): p. 1298-306.
30. Sorlie, T., et al., *Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(19): p. 10869-74.
31. Waddell, N., et al., *Subtypes of familial breast tumours revealed by expression and copy number profiling*. Breast Cancer Res Treat, 2010. **123**(3): p. 661-77.
32. Reis-Filho, J.S. and A.N. Tutt, *Triple negative tumours: a critical review*. Histopathology, 2008. **52**(1): p. 108-18.
33. Turner, N.C. and J.S. Reis-Filho, *Tackling the diversity of triple-negative breast cancer*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(23): p. 6380-8.
34. Lehmann, B.D., et al., *Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies*. J Clin Invest, 2011. **121**(7): p. 2750-67.
35. Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 747-52.
36. Parker, J.S., et al., *Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes*. J Clin Oncol, 2009. **27**(8): p. 1160-7.
37. 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.
38. Couch, F.J., et al., *Genome-wide association study in BRCA1 mutation carriers identifies novel loci associated with breast and ovarian cancer risk*. PLoS Genet, 2013. **9**(3): p. e1003212.
39. Foulkes, W.D., I.E. Smith, and J.S. Reis-Filho, *Triple-negative breast cancer*. N Engl J Med, 2010. **363**(20): p. 1938-48.
40. Denkert, C., et al., *Molecular alterations in triple-negative breast cancer-the road to new treatment strategies*. Lancet, 2017. **389**(10087): p. 2430-2442.
41. Li, X., et al., *Effectiveness of Prophylactic Surgeries in BRCA1 or BRCA2 Mutation Carriers: A Meta-analysis and Systematic Review*. Clin Cancer Res, 2016. **22**(15): p. 3971-81.
42. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2015*. CA Cancer J Clin, 2015. **65**(1): p. 5-29.
43. Jacobs, I.J., et al., *Ovarian cancer screening and mortality in the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS): a randomised controlled trial*. Lancet, 2016. **387**(10022): p. 945-956.
44. Constantinou, P. and M. Tischkowitz, *Genetics of gynaecological cancers*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2017. **42**: p. 114-124.
45. Labidi-Galy, S.I., et al., *High grade serous ovarian carcinomas originate in the fallopian tube*. Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 1093.
46. Medeiros, F., et al., *The tubal fimbria is a preferred site for early adenocarcinoma in women with familial ovarian cancer syndrome*. Am J Surg Pathol, 2006. **30**(2): p. 230-6.
47. McDaniel, A.S., et al., *Next-Generation Sequencing of Tubal Intraepithelial Carcinomas*. JAMA Oncol, 2015. **1**(8): p. 1128-32.
48. Leonhardt, K., et al., *p53 signature and serous tubal in-situ carcinoma in cases of primary tubal and peritoneal carcinomas and serous borderline tumors of the ovary*. Int J Gynecol Pathol, 2011. **30**(5): p. 417-24.
49. Kuhn, E., R.J. Kurman, and I.M. Shih, *Ovarian Cancer Is an Imported Disease: Fact or Fiction?* Curr Obstet Gynecol Rep, 2012. **1**(1): p. 1-9.
50. Ho, C.L., et al., *Mutations of BRAF and KRAS precede the development of ovarian serous borderline tumors*. Cancer Res, 2004. **64**(19): p. 6915-8.
51. Prat, J., E. D'Angelo, and I. Espinosa, *Ovarian carcinomas: at least five different diseases with distinct histological features and molecular genetics*. Hum Pathol, 2018. **80**: p. 11-27.

52. Kobel, M., et al., *A limited panel of immunomarkers can reliably distinguish between clear cell and high-grade serous carcinoma of the ovary*. Am J Surg Pathol, 2009. **33**(1): p. 14-21.
53. Esteller, M., et al., *Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors*. J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(7): p. 564-9.
54. Cancer Genome Atlas Research, N., *Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma*. Nature, 2011. **474**(7353): p. 609-15.
55. Scott, C.L., E.M. Swisher, and S.H. Kaufmann, *Poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors: recent advances and future development*. J Clin Oncol, 2015. **33**(12): p. 1397-406.
56. Konecny, G.E., et al., *Prognostic and therapeutic relevance of molecular subtypes in high-grade serous ovarian cancer*. J Natl Cancer Inst, 2014. **106**(10).
57. Bowtell, D.D., *The genesis and evolution of high-grade serous ovarian cancer*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(11): p. 803-8.
58. Gershenson, D.M., et al., *Clinical behavior of stage II-IV low-grade serous carcinoma of the ovary*. Obstet Gynecol, 2006. **108**(2): p. 361-8.
59. Grisham, R.N., et al., *BRAF mutation is associated with early stage disease and improved outcome in patients with low-grade serous ovarian cancer*. Cancer, 2013. **119**(3): p. 548-554.
60. Brown, J. and M. Frumovitz, *Mucinous tumors of the ovary: current thoughts on diagnosis and management*. Curr Oncol Rep, 2014. **16**(6): p. 389.
61. Prat, J., *New insights into ovarian cancer pathology*. Ann Oncol, 2012. **23** Suppl 10: p. x111-7.
62. Sato, N., et al., *Loss of heterozygosity on 10q23.3 and mutation of the tumor suppressor gene PTEN in benign endometrial cyst of the ovary: possible sequence progression from benign endometrial cyst to endometrioid carcinoma and clear cell carcinoma of the ovary*. Cancer Res, 2000. **60**(24): p. 7052-6.
63. Catasus, L., et al., *Molecular genetic alterations in endometrioid carcinomas of the ovary: similar frequency of beta-catenin abnormalities but lower rate of microsatellite instability and PTEN alterations than in uterine endometrioid carcinomas*. Hum Pathol, 2004. **35**(11): p. 1360-8.
64. Catasus, L., et al., *PIK3CA mutations in the kinase domain (exon 20) of uterine endometrial adenocarcinomas are associated with adverse prognostic parameters*. Mod Pathol, 2008. **21**(2): p. 131-9.
65. Kobel, M., et al., *Ovarian carcinoma subtypes are different diseases: implications for biomarker studies*. PLoS Med, 2008. **5**(12): p. e232.
66. Komiyama, S., et al., *Prognosis of Japanese patients with ovarian clear cell carcinoma associated with pelvic endometriosis: clinicopathologic evaluation*. Gynecol Oncol, 1999. **72**(3): p. 342-6.
67. Yamamoto, S., et al., *PIK3CA mutation is an early event in the development of endometriosis-associated ovarian clear cell adenocarcinoma*. J Pathol, 2011. **225**(2): p. 189-94.
68. Wiegand, K.C., et al., *ARID1A mutations in endometriosis-associated ovarian carcinomas*. N Engl J Med, 2010. **363**(16): p. 1532-43.
69. Bennett, J.A., et al., *Clear cell carcinoma of the ovary: evaluation of prognostic parameters based on a clinicopathological analysis of 100 cases*. Histopathology, 2015. **66**(6): p. 808-15.
70. Howitt, B.E., et al., *Clear cell ovarian cancers with microsatellite instability: A unique subset of ovarian cancers with increased tumor-infiltrating lymphocytes and PD-1/PD-L1 expression*. Oncoimmunology, 2017. **6**(2): p. e1277308.
71. Chen, J., et al., *Recurrent DICER1 hotspot mutations in endometrial tumours and their impact on microRNA biogenesis*. J Pathol, 2015. **237**(2): p. 215-25.
72. Kascak, P., M. Zamecnik, and B. Bystricky, *Small Cell Carcinoma of the Ovary (Hypercalcemic Type): Malignant Rhabdoid Tumor*. Case Rep Oncol, 2016. **9**(2): p. 305-11.
73. Kupryjanczyk, J., et al., *Ovarian small cell carcinoma of hypercalcemic type - evidence of germline origin and SMARCA4 gene inactivation. a pilot study*. Pol J Pathol, 2013. **64**(4): p. 238-46.
74. Karnezis, A.N., et al., *The disparate origins of ovarian cancers: pathogenesis and prevention strategies*. Nat Rev Cancer, 2017. **17**(1): p. 65-74.
75. Arts-de Jong, M., et al., *Germline BRCA1/2 mutation testing is indicated in every patient with epithelial ovarian cancer: A systematic review*. Eur J Cancer, 2016. **61**: p. 137-45.

76. 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.
77. Kotsopoulos, J., et al., *Factors influencing ovulation and the risk of ovarian cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers*. Int J Cancer, 2015. **137**(5): p. 1136-46.
78. 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.
79. Loveday, C., et al., *Germline RAD51C mutations confer susceptibility to ovarian cancer*. Nat Genet, 2012. **44**(5): p. 475-6; author reply 476.
80. Balmana, J. and S.M. Domchek, *BRIP1 as an ovarian cancer susceptibility gene: ready for the clinic?* J Natl Cancer Inst, 2015. **107**(11).
81. 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).
82. Seal, S., et al., *Truncating mutations in the Fanconi anemia J gene BRIP1 are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles*. Nat Genet, 2006. **38**(11): p. 1239-41.
83. Bernards, S.S., et al., *Genetic characterization of early onset ovarian carcinoma*. Gynecol Oncol, 2016. **140**(2): p. 221-5.
84. Domchek, S.M., et al., *Association of risk-reducing surgery in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers with cancer risk and mortality*. JAMA, 2010. **304**(9): p. 967-75.
85. Finch, A.P., et al., *Impact of oophorectomy on cancer incidence and mortality in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation*. J Clin Oncol, 2014. **32**(15): p. 1547-53.
86. Falconer, H., et al., *Ovarian cancer risk after salpingectomy: a nationwide population-based study*. J Natl Cancer Inst, 2015. **107**(2).
87. Norquist, B.M., et al., *Inherited Mutations in Women With Ovarian Carcinoma*. JAMA Oncol, 2016. **2**(4): p. 482-90.
88. Kauff, N.D., et al., *Risk-reducing salpingo-oophorectomy for the prevention of BRCA1- and BRCA2-associated breast and gynecologic cancer: a multicenter, prospective study*. J Clin Oncol, 2008. **26**(8): p. 1331-7.
89. Liu, J.F., P.A. Konstantinopoulos, and U.A. Matulonis, *PARP inhibitors in ovarian cancer: current status and future promise*. Gynecol Oncol, 2014. **133**(2): p. 362-9.
90. Plaskocinska, I., et al., *New paradigms for BRCA1/BRCA2 testing in women with ovarian cancer: results of the Genetic Testing in Epithelial Ovarian Cancer (GTEOC) study*. J Med Genet, 2016. **53**(10): p. 655-61.
91. de la Chapelle, A., *The incidence of Lynch syndrome*. Fam Cancer, 2005. **4**(3): p. 233-7.
92. Win, A.K., et al., *Prevalence and Penetrance of Major Genes and Polygenes for Colorectal Cancer*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2017. **26**(3): p. 404-412.
93. Li, X., et al., *MLH1 promoter methylation frequency in colorectal cancer patients and related clinicopathological and molecular features*. PLoS One, 2013. **8**(3): p. e59064.
94. Moller, P., et al., *Cancer incidence and survival in Lynch syndrome patients receiving colonoscopic and gynaecological surveillance: first report from the prospective Lynch syndrome database*. Gut, 2017. **66**(3): p. 464-472.
95. Lu, K.H. and M. Daniels, *Endometrial and ovarian cancer in women with Lynch syndrome: update in screening and prevention*. Fam Cancer, 2013. **12**(2): p. 273-7.
96. Barrow, E., et al., *Cumulative lifetime incidence of extracolonic cancers in Lynch syndrome: a report of 121 families with proven mutations*. Clin Genet, 2009. **75**(2): p. 141-9.
97. Joost, P., et al., *Urinary Tract Cancer in Lynch Syndrome; Increased Risk in Carriers of MSH2 Mutations*. Urology, 2015. **86**(6): p. 1212-7.
98. Therkildsen, C., et al., *Glioblastomas, astrocytomas and oligodendrogliomas linked to Lynch syndrome*. Eur J Neurol, 2015. **22**(4): p. 717-24.
99. Therkildsen, C., et al., *Towards gene- and gender-based risk estimates in Lynch syndrome; age-specific incidences for 13 extra-colorectal cancer types*. Br J Cancer, 2017. **117**(11): p. 1702-1710.
100. Walsh, M.D., et al., *Lynch syndrome-associated breast cancers: clinicopathologic characteristics of a case series from the colon cancer family registry*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(7): p. 2214-24.

101. Lotsari, J.E., et al., *Breast carcinoma and Lynch syndrome: molecular analysis of tumors arising in mutation carriers, non-carriers, and sporadic cases*. *Breast Cancer Res*, 2012. **14**(3): p. R90.
102. Espenschied, C.R., et al., *Multigene Panel Testing Provides a New Perspective on Lynch Syndrome*. *J Clin Oncol*, 2017. **35**(22): p. 2568-2575.
103. American Gastroenterological, A., *American Gastroenterological Association medical position statement: hereditary colorectal cancer and genetic testing*. *Gastroenterology*, 2001. **121**(1): p. 195-7.
104. Umar, A., et al., *Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability*. *J Natl Cancer Inst*, 2004. **96**(4): p. 261-8.
105. Palomaki, G.E., et al., *EGAPP supplementary evidence review: DNA testing strategies aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome*. *Genet Med*, 2009. **11**(1): p. 42-65.
106. Moreira, L., et al., *Identification of Lynch syndrome among patients with colorectal cancer*. *JAMA*, 2012. **308**(15): p. 1555-65.
107. Heald, B., et al., *Implementation of universal microsatellite instability and immunohistochemistry screening for diagnosing lynch syndrome in a large academic medical center*. *J Clin Oncol*, 2013. **31**(10): p. 1336-40.
108. Jin, M., et al., *BRAF V600E mutation analysis simplifies the testing algorithm for Lynch syndrome*. *Am J Clin Pathol*, 2013. **140**(2): p. 177-83.
109. Joost, P., et al., *Heterogenous mismatch-repair status in colorectal cancer*. *Diagn Pathol*, 2014. **9**: p. 126.
110. Shia, J., *Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part I. The utility of immunohistochemistry*. *J Mol Diagn*, 2008. **10**(4): p. 293-300.
111. Pearl, L.H., et al., *Therapeutic opportunities within the DNA damage response*. *Nat Rev Cancer*, 2015. **15**(3): p. 166-80.
112. Stratton, M.R., P.J. Campbell, and P.A. Futreal, *The cancer genome*. *Nature*, 2009. **458**(7239): p. 719-24.
113. Jackson, S.P. and J. Bartek, *The DNA-damage response in human biology and disease*. *Nature*, 2009. **461**(7267): p. 1071-8.
114. Harper, J.W. and S.J. Elledge, *The DNA damage response: ten years after*. *Mol Cell*, 2007. **28**(5): p. 739-45.
115. Bartkova, J., et al., *Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints*. *Nature*, 2006. **444**(7119): p. 633-7.
116. Negrini, S., V.G. Gorgoulis, and T.D. Halazonetis, *Genomic instability--an evolving hallmark of cancer*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010. **11**(3): p. 220-8.
117. Li, G.M., *Mechanisms and functions of DNA mismatch repair*. *Cell Res*, 2008. **18**(1): p. 85-98.
118. Campalans, A., et al., *Distinct spatiotemporal patterns and PARP dependence of XRCC1 recruitment to single-strand break and base excision repair*. *Nucleic Acids Res*, 2013. **41**(5): p. 3115-29.
119. Shuck, S.C., E.A. Short, and J.J. Turchi, *Eukaryotic nucleotide excision repair: from understanding mechanisms to influencing biology*. *Cell Res*, 2008. **18**(1): p. 64-72.
120. Heyer, W.D., K.T. Ehmsen, and J. Liu, *Regulation of homologous recombination in eukaryotes*. *Annu Rev Genet*, 2010. **44**: p. 113-39.
121. Chapman, J.R., M.R. Taylor, and S.J. Boulton, *Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice*. *Mol Cell*, 2012. **47**(4): p. 497-510.
122. Dietlein, F., L. Thelen, and H.C. Reinhardt, *Cancer-specific defects in DNA repair pathways as targets for personalized therapeutic approaches*. *Trends Genet*, 2014. **30**(8): p. 326-39.
123. Lees-Miller, S.P. and K. Meek, *Repair of DNA double strand breaks by non-homologous end joining*. *Biochimie*, 2003. **85**(11): p. 1161-73.
124. McVey, M. and S.E. Lee, *MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings*. *Trends Genet*, 2008. **24**(11): p. 529-38.
125. Kottemann, M.C. and A. Smogorzewska, *Fanconi anaemia and the repair of Watson and Crick DNA crosslinks*. *Nature*, 2013. **493**(7432): p. 356-63.

126. Ledermann, J.A., Y. Drew, and R.S. Kristeleit, *Homologous recombination deficiency and ovarian cancer*. Eur J Cancer, 2016. **60**: p. 49-58.
127. Kaelin, W.G., Jr., *The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(9): p. 689-98.
128. Ashworth, A. and C.J. Lord, *Synthetic lethal therapies for cancer: what's next after PARP inhibitors?* Nat Rev Clin Oncol, 2018. **15**(9): p. 564-576.
129. O'Neil, N.J., M.L. Bailey, and P. Hieter, *Synthetic lethality and cancer*. Nat Rev Genet, 2017. **18**(10): p. 613-623.
130. Chambon, P., J.D. Weill, and P. Mandel, *Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme*. Biochem Biophys Res Commun, 1963. **11**: p. 39-43.
131. Langelier, M.F., et al., *A third zinc-binding domain of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 coordinates DNA-dependent enzyme activation*. J Biol Chem, 2008. **283**(7): p. 4105-14.
132. Rouleau, M., et al., *PARP inhibition: PARP1 and beyond*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(4): p. 293-301.
133. Haince, J.F., et al., *PARP1-dependent kinetics of recruitment of MRE11 and NBS1 proteins to multiple DNA damage sites*. J Biol Chem, 2008. **283**(2): p. 1197-208.
134. Wang, M., et al., *PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(21): p. 6170-82.
135. Kraus, W.L., *Transcriptional control by PARP-1: chromatin modulation, enhancer-binding, coregulation, and insulation*. Curr Opin Cell Biol, 2008. **20**(3): p. 294-302.
136. Hassa, P.O. and M.O. Hottiger, *The diverse biological roles of mammalian PARPs, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 3046-82.
137. Lehtio, L., et al., *Structural basis for inhibitor specificity in human poly(ADP-ribose) polymerase-3*. J Med Chem, 2009. **52**(9): p. 3108-11.
138. Fong, P.C., et al., *Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers*. N Engl J Med, 2009. **361**(2): p. 123-34.
139. Lord, C.J., et al., *A high-throughput RNA interference screen for DNA repair determinants of PARP inhibitor sensitivity*. DNA Repair (Amst), 2008. **7**(12): p. 2010-9.
140. Konecny, G.E. and R.S. Kristeleit, *PARP inhibitors for BRCA1/2-mutated and sporadic ovarian cancer: current practice and future directions*. Br J Cancer, 2016. **115**(10): p. 1157-1173.
141. Curtin, N., *PARP inhibitors for anticancer therapy*. Biochem Soc Trans, 2014. **42**(1): p. 82-8.
142. Murai, J., et al., *Rationale for poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors in combination therapy with camptothecins or temozolomide based on PARP trapping versus catalytic inhibition*. J Pharmacol Exp Ther, 2014. **349**(3): p. 408-16.
143. Patel, A.G., et al., *Enhanced killing of cancer cells by poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors and topoisomerase I inhibitors reflects poisoning of both enzymes*. J Biol Chem, 2012. **287**(6): p. 4198-210.
144. Farmer, H., et al., *Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy*. Nature, 2005. **434**(7035): p. 917-21.
145. Bonner, W.M., et al., *GammaH2AX and cancer*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(12): p. 957-67.
146. Johnson, N., et al., *Stabilization of mutant BRCA1 protein confers PARP inhibitor and platinum resistance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(42): p. 17041-6.
147. Paddock, M.N., et al., *Competition between PARP-1 and Ku70 control the decision between high-fidelity and mutagenic DNA repair*. DNA Repair (Amst), 2011. **10**(3): p. 338-43.
148. Patel, A.G., J.N. Sarkaria, and S.H. Kaufmann, *Nonhomologous end joining drives poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor lethality in homologous recombination-deficient cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(8): p. 3406-11.
149. George, A., S. Kaye, and S. Banerjee, *Delivering widespread BRCA testing and PARP inhibition to patients with ovarian cancer*. Nat Rev Clin Oncol, 2017. **14**(5): p. 284-296.
150. Vanderstichele, A., et al., *Genomic signatures as predictive biomarkers of homologous recombination deficiency in ovarian cancer*. Eur J Cancer, 2017. **86**: p. 5-14.
151. Fong, P.C., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition: frequent durable responses in BRCA carrier ovarian cancer correlating with platinum-free interval*. J Clin Oncol, 2010. **28**(15): p. 2512-9.

152. Kaufman, B., et al., *Olaparib monotherapy in patients with advanced cancer and a germline BRCA1/2 mutation*. J Clin Oncol, 2015. **33**(3): p. 244-50.
153. Edwards, S.L., et al., *Resistance to therapy caused by intragenic deletion in BRCA2*. Nature, 2008. **451**(7182): p. 1111-5.
154. Sakai, W., et al., *Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers*. Nature, 2008. **451**(7182): p. 1116-20.
155. Norquist, B., et al., *Secondary somatic mutations restoring BRCA1/2 predict chemotherapy resistance in hereditary ovarian carcinomas*. J Clin Oncol, 2011. **29**(22): p. 3008-15.
156. Nacson, J., et al., *BRCA1 Mutation-Specific Responses to 53BP1 Loss-Induced Homologous Recombination and PARP Inhibitor Resistance*. Cell Rep, 2018. **25**(5): p. 1384.
157. Ledermann, J., et al., *Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer: a preplanned retrospective analysis of outcomes by BRCA status in a randomised phase 2 trial*. Lancet Oncol, 2014. **15**(8): p. 852-61.
158. Pennington, K.P., et al., *Germline and somatic mutations in homologous recombination genes predict platinum response and survival in ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinomas*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(3): p. 764-75.
159. Forster, M.D., et al., *Treatment with olaparib in a patient with PTEN-deficient endometrioid endometrial cancer*. Nat Rev Clin Oncol, 2011. **8**(5): p. 302-6.
160. Bang, Y.J., et al., *Randomized, Double-Blind Phase II Trial With Prospective Classification by ATM Protein Level to Evaluate the Efficacy and Tolerability of Olaparib Plus Paclitaxel in Patients With Recurrent or Metastatic Gastric Cancer*. J Clin Oncol, 2015. **33**(33): p. 3858-65.
161. Lord, C.J. and A. Ashworth, *PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic*. Science, 2017. **355**(6330): p. 1152-1158.
162. Ledermann, J.A., et al., *Overall survival in patients with platinum-sensitive recurrent serous ovarian cancer receiving olaparib maintenance monotherapy: an updated analysis from a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 2 trial*. Lancet Oncol, 2016. **17**(11): p. 1579-1589.
163. Robson, M., et al., *Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation*. N Engl J Med, 2017. **377**(6): p. 523-533.
164. Moore, K., et al., *Maintenance Olaparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer*. N Engl J Med, 2018.
165. Swisher, E.M., et al., *Rucaparib in relapsed, platinum-sensitive high-grade ovarian carcinoma (ARIEL2 Part 1): an international, multicentre, open-label, phase 2 trial*. Lancet Oncol, 2017. **18**(1): p. 75-87.
166. Dockery, L.E., C.C. Gunderson, and K.N. Moore, *Rucaparib: the past, present, and future of a newly approved PARP inhibitor for ovarian cancer*. Onco Targets Ther, 2017. **10**: p. 3029-3037.
167. Mirza, M.R., et al., *Niraparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive, Recurrent Ovarian Cancer*. N Engl J Med, 2016. **375**(22): p. 2154-2164.
168. Lord, C.J. and A. Ashworth, *BRCAness revisited*. Nat Rev Cancer, 2016. **16**(2): p. 110-20.
169. McCabe, N., et al., *Deficiency in the repair of DNA damage by homologous recombination and sensitivity to poly(ADP-ribose) polymerase inhibition*. Cancer Res, 2006. **66**(16): p. 8109-15.
170. Bajrami, I., et al., *Genome-wide profiling of genetic synthetic lethality identifies CDK12 as a novel determinant of PARP1/2 inhibitor sensitivity*. Cancer Res, 2014. **74**(1): p. 287-97.
171. Waddell, N., et al., *Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer*. Nature, 2015. **518**(7540): p. 495-501.
172. Robinson, D., et al., *Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer*. Cell, 2015. **161**(5): p. 1215-1228.
173. Stover, E.H., et al., *Biomarkers of Response and Resistance to DNA Repair Targeted Therapies*. Clin Cancer Res, 2016. **22**(23): p. 5651-5660.
174. Patch, A.M., et al., *Whole-genome characterization of chemoresistant ovarian cancer*. Nature, 2015. **521**(7553): p. 489-94.
175. Barber, L.J., et al., *Secondary mutations in BRCA2 associated with clinical resistance to a PARP inhibitor*. J Pathol, 2013. **229**(3): p. 422-9.

176. Kondrashova, O., et al., *Secondary Somatic Mutations Restoring RAD51C and RAD51D Associated with Acquired Resistance to the PARP Inhibitor Rucaparib in High-Grade Ovarian Carcinoma*. *Cancer Discov*, 2017. **7**(9): p. 984-998.
177. Cruz, C., et al., *RAD51 foci as a functional biomarker of homologous recombination repair and PARP inhibitor resistance in germline BRCA-mutated breast cancer*. *Ann Oncol*, 2018. **29**(5): p. 1203-1210.
178. Desmond, A., et al., *Clinical Actionability of Multigene Panel Testing for Hereditary Breast and Ovarian Cancer Risk Assessment*. *JAMA Oncol*, 2015. **1**(7): p. 943-51.
179. Cybulski, C., et al., *Mutations predisposing to breast cancer in 12 candidate genes in breast cancer patients from Poland*. *Clin Genet*, 2015. **88**(4): p. 366-70.
180. Tung, N., et al., *Counselling framework for moderate-penetrance cancer-susceptibility mutations*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2016. **13**(9): p. 581-8.
181. Prapa, M., J. Solomons, and M. Tischkowitz, *The use of panel testing in familial breast and ovarian cancer*. *Clin Med (Lond)*, 2017. **17**(6): p. 568-572.
182. Easton, D.F., et al., *Gene-panel sequencing and the prediction of breast-cancer risk*. *N Engl J Med*, 2015. **372**(23): p. 2243-57.
183. Michailidou, K., et al., *Association analysis identifies 65 new breast cancer risk loci*. *Nature*, 2017. **551**(7678): p. 92-94.
184. Hall, M.J., et al., *Genetic testing for hereditary cancer predisposition: BRCA1/2, Lynch syndrome, and beyond*. *Gynecol Oncol*, 2016. **140**(3): p. 565-74.
185. Thompson, E.R., et al., *Panel Testing for Familial Breast Cancer: Calibrating the Tension Between Research and Clinical Care*. *J Clin Oncol*, 2016. **34**(13): p. 1455-9.
186. Castera, L., et al., *Next-generation sequencing for the diagnosis of hereditary breast and ovarian cancer using genomic capture targeting multiple candidate genes*. *Eur J Hum Genet*, 2014. **22**(11): p. 1305-13.
187. Walsh, T., et al., *Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(44): p. 18032-7.
188. Spurdle, A.B., et al., *ENIGMA--evidence-based network for the interpretation of germline mutant alleles: an international initiative to evaluate risk and clinical significance associated with sequence variation in BRCA1 and BRCA2 genes*. *Hum Mutat*, 2012. **33**(1): p. 2-7.
189. Easton, D.F., et al., *A systematic genetic assessment of 1,433 sequence variants of unknown clinical significance in the BRCA1 and BRCA2 breast cancer-predisposition genes*. *Am J Hum Genet*, 2007. **81**(5): p. 873-83.
190. Kurian, A.W., et al., *Clinical evaluation of a multiple-gene sequencing panel for hereditary cancer risk assessment*. *J Clin Oncol*, 2014. **32**(19): p. 2001-9.
191. 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.
192. Schmidt, M.K., et al., *Age- and Tumor Subtype-Specific Breast Cancer Risk Estimates for CHEK2*1100delC Carriers*. *J Clin Oncol*, 2016. **34**(23): p. 2750-60.
193. Wang, Y.A., et al., *Germline breast cancer susceptibility gene mutations and breast cancer outcomes*. *BMC Cancer*, 2018. **18**(1): p. 315.
194. Lee, A.J., et al., *Incorporating truncating variants in PALB2, CHEK2, and ATM into the BOADICEA breast cancer risk model*. *Genet Med*, 2016. **18**(12): p. 1190-1198.
195. Kurian, A.W., A.C. Antoniou, and S.M. Domchek, *Refining Breast Cancer Risk Stratification: Additional Genes, Additional Information*. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 2016. **35**: p. 44-56.
196. Michailidou, K., et al., *Genome-wide association analysis of more than 120,000 individuals identifies 15 new susceptibility loci for breast cancer*. *Nat Genet*, 2015. **47**(4): p. 373-80.
197. Mavaddat, N., et al., *Familial relative risks for breast cancer by pathological subtype: a population-based cohort study*. *Breast Cancer Res*, 2010. **12**(1): p. R10.
198. Phelan, C.M., et al., *Identification of 12 new susceptibility loci for different histotypes of epithelial ovarian cancer*. *Nat Genet*, 2017. **49**(5): p. 680-691.
199. Slavin, T.P., et al., *Clinical Application of Multigene Panels: Challenges of Next-Generation Counseling and Cancer Risk Management*. *Front Oncol*, 2015. **5**: p. 208.

200. Couch, F.J., et al., *Associations Between Cancer Predisposition Testing Panel Genes and Breast Cancer*. JAMA Oncol, 2017. **3**(9): p. 1190-1196.
201. Lu, H.M., et al., *Association of Breast and Ovarian Cancers With Predisposition Genes Identified by Large-Scale Sequencing*. JAMA Oncol, 2018.
202. Park, J.Y., F. Zhang, and P.R. Andreassen, *PALB2: the hub of a network of tumor suppressors involved in DNA damage responses*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1846**(1): p. 263-75.
203. Evans, M.K. and D.L. Longo, *PALB2 mutations and breast-cancer risk*. N Engl J Med, 2014. **371**(6): p. 566-8.
204. Antoniou, A.C., et al., *Breast-cancer risk in families with mutations in PALB2*. N Engl J Med, 2014. **371**(6): p. 497-506.
205. Slater, E.P., et al., *PALB2 mutations in European familial pancreatic cancer families*. Clin Genet, 2010. **78**(5): p. 490-4.
206. Canto, M.I., et al., *International Cancer of the Pancreas Screening (CAPS) Consortium summit on the management of patients with increased risk for familial pancreatic cancer*. Gut, 2013. **62**(3): p. 339-47.
207. Borecka, M., et al., *Mutation analysis of the PALB2 gene in unselected pancreatic cancer patients in the Czech Republic*. Cancer Genet, 2016. **209**(5): p. 199-204.
208. Ellison, G., et al., *A reliable method for the detection of BRCA1 and BRCA2 mutations in fixed tumour tissue utilising multiplex PCR-based targeted next generation sequencing*. BMC Clin Pathol, 2015. **15**: p. 5.
209. Chen, V.W., et al., *Pathology and classification of ovarian tumors*. Cancer, 2003. **97**(10 Suppl): p. 2631-42.
210. Sims, D., et al., *Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses*. Nat Rev Genet, 2014. **15**(2): p. 121-32.
211. Ellison, G., et al., *A comparison of ARMS and DNA sequencing for mutation analysis in clinical biopsy samples*. J Exp Clin Cancer Res, 2010. **29**: p. 132.
212. Capoluongo, E., et al., *Guidance Statement On BRCA1/2 Tumor Testing in Ovarian Cancer Patients*. Semin Oncol, 2017. **44**(3): p. 187-197.
213. Shah, S.P., et al., *The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers*. Nature, 2012. **486**(7403): p. 395-9.
214. Timms, K.M., et al., *Association of BRCA1/2 defects with genomic scores predictive of DNA damage repair deficiency among breast cancer subtypes*. Breast Cancer Res, 2014. **16**(6): p. 475.
215. Byrski, T., et al., *Pathologic complete response to neoadjuvant cisplatin in BRCA1-positive breast cancer patients*. Breast Cancer Res Treat, 2014. **147**(2): p. 401-5.
216. Kotoula, V., et al., *The fate of BRCA1-related germline mutations in triple-negative breast tumors*. Am J Cancer Res, 2017. **7**(1): p. 98-114.
217. Konstantopoulou, I., et al., *High prevalence of BRCA1 founder mutations in Greek breast/ovarian families*. Clin Genet, 2014. **85**(1): p. 36-42.
218. Ngeow, J. and C. Eng, *Precision medicine in heritable cancer: when somatic tumour testing and germline mutations meet*. NPJ Genom Med, 2016. **1**: p. 15006.
219. Narod, S.A., *Personalised medicine and population health: breast and ovarian cancer*. Hum Genet, 2018. **137**(10): p. 769-778.
220. Amirouchene-Angelozzi, N., C. Swanton, and A. Bardelli, *Tumor Evolution as a Therapeutic Target*. Cancer Discov, 2017.
221. Burrell, R.A. and C. Swanton, *Tumour heterogeneity and the evolution of polyclonal drug resistance*. Mol Oncol, 2014. **8**(6): p. 1095-111.
222. Efremova, M., et al., *Neoantigens Generated by Individual Mutations and Their Role in Cancer Immunity and Immunotherapy*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 1679.
223. Navin, N.E., *The first five years of single-cell cancer genomics and beyond*. Genome Res, 2015. **25**(10): p. 1499-507.
224. Letai, A., *Functional precision cancer medicine-moving beyond pure genomics*. Nat Med, 2017. **23**(9): p. 1028-1035.
225. Lipinski, K.A., et al., *Cancer Evolution and the Limits of Predictability in Precision Cancer Medicine*. Trends Cancer, 2016. **2**(1): p. 49-63.

226. Kurian, A.W. and C.R. Friese, *Precision Medicine in Breast Cancer Care: An Early Glimpse of Impact*. JAMA Oncol, 2015. **1**(8): p. 1109-10.
227. Catenacci, D.V., et al., *Tumor genome analysis includes germline genome: are we ready for surprises?* Int J Cancer, 2015. **136**(7): p. 1559-67.
228. Jones, S., et al., *Personalized genomic analyses for cancer mutation discovery and interpretation*. Sci Transl Med, 2015. **7**(283): p. 283ra53.
229. Senft, D., et al., *Precision Oncology: The Road Ahead*. Trends Mol Med, 2017. **23**(10): p. 874-898.
230. Mavaddat, N., et al., *Cancer risks for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from prospective analysis of EMBRACE*. J Natl Cancer Inst, 2013. **105**(11): p. 812-22.
231. Minion, L.E., et al., *Hereditary predisposition to ovarian cancer, looking beyond BRCA1/BRCA2*. Gynecol Oncol, 2015. **137**(1): p. 86-92.
232. Miller, S.A., D.D. Dykes, and H.F. Polesky, *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells*. Nucleic Acids Res, 1988. **16**(3): p. 1215.
233. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
234. Slatkin, M. and B. Rannala, *Estimating allele age*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2000. **1**: p. 225-49.
235. Stavropoulou, A.V., et al., *Prevalence of BRCA1 mutations in familial and sporadic greek ovarian cancer cases*. PLoS One, 2013. **8**(3): p. e58182.
236. Forman, A.D. and M.J. Hall, *Influence of race/ethnicity on genetic counseling and testing for hereditary breast and ovarian cancer*. Breast J, 2009. **15 Suppl 1**: p. S56-62.
237. 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.
238. 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.
239. Engel, C., et al., *Prevalence of pathogenic BRCA1/2 germline mutations among 802 women with unilateral triple-negative breast cancer without family cancer history*. BMC Cancer, 2018. **18**(1): p. 265.
240. Domagala, P., et al., *Prevalence of Germline Mutations in Genes Engaged in DNA Damage Repair by Homologous Recombination in Patients with Triple-Negative and Hereditary Non-Triple-Negative Breast Cancers*. PLoS One, 2015. **10**(6): p. e0130393.
241. Ratajska, M., et al., *Mutational analysis of BRCA1/2 in a group of 134 consecutive ovarian cancer patients. Novel and recurrent BRCA1/2 alterations detected by next generation sequencing*. J Appl Genet, 2015. **56**(2): p. 193-8.
242. Hirotsu, Y., et al., *Detection of BRCA1 and BRCA2 germline mutations in Japanese population using next-generation sequencing*. Mol Genet Genomic Med, 2015. **3**(2): p. 121-9.
243. Machackova, E., et al., *Spectrum and characterisation of BRCA1 and BRCA2 deleterious mutations in high-risk Czech patients with breast and/or ovarian cancer*. BMC Cancer, 2008. **8**: p. 140.
244. Zhang, S., et al., *Frequencies of BRCA1 and BRCA2 mutations among 1,342 unselected patients with invasive ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2011. **121**(2): p. 353-7.
245. Woods, N.T., et al., *Functional assays provide a robust tool for the clinical annotation of genetic variants of uncertain significance*. NPJ Genom Med, 2016. **1**.
246. Eoh, K.J., et al., *Detection of Germline Mutations in Patients with Epithelial Ovarian Cancer Using Multi-gene Panels: Beyond BRCA1/2*. Cancer Res Treat, 2018. **50**(3): p. 917-925.
247. Ramus, S.J. and S.A. Gayther, *The contribution of BRCA1 and BRCA2 to ovarian cancer*. Mol Oncol, 2009. **3**(2): p. 138-50.
248. Alsop, K., et al., *BRCA mutation frequency and patterns of treatment response in BRCA mutation-positive women with ovarian cancer: a report from the Australian Ovarian Cancer Study Group*. J Clin Oncol, 2012. **30**(21): p. 2654-63.
249. Toss, A., et al., *Hereditary ovarian cancer: not only BRCA 1 and 2 genes*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 341723.

250. Hanley, G.E., et al., *A population-based analysis of germline BRCA1 and BRCA2 testing among ovarian cancer patients in an era of histotype-specific approaches to ovarian cancer prevention*. BMC Cancer, 2018. **18**(1): p. 254.
251. Gangi, A., et al., *Breast cancer following ovarian cancer in BRCA mutation carriers*. JAMA Surg, 2014. **149**(12): p. 1306-13.
252. McGee, J., et al., *Risk of breast cancer after a diagnosis of ovarian cancer in BRCA mutation carriers: Is preventive mastectomy warranted?* Gynecol Oncol, 2017. **145**(2): p. 346-351.
253. Pelttari, L.M., et al., *RAD51C is a susceptibility gene for ovarian cancer*. Hum Mol Genet, 2011. **20**(16): p. 3278-88.
254. Kurian, A., et al., *Breast and Ovarian Cancer Penetrance Estimates Derived From Germline Multiple-Gene Sequencing Results in Women*. 2017. 1-12.
255. Dicks, E., et al., *Germline whole exome sequencing and large-scale replication identifies FANCM as a likely high grade serous ovarian cancer susceptibility gene*. Oncotarget, 2017. **8**(31): p. 50930-50940.
256. Pharoah, P.D.P., et al., *PPM1D Mosaic Truncating Variants in Ovarian Cancer Cases May Be Treatment-Related Somatic Mutations*. J Natl Cancer Inst, 2016. **108**(3).
257. Swisher, E.M., et al., *Somatic Mosaic Mutations in PPM1D and TP53 in the Blood of Women With Ovarian Carcinoma*. JAMA Oncol, 2016. **2**(3): p. 370-2.
258. Consortium, C.B.C.C.-C., *CHEK2*1100delC and susceptibility to breast cancer: a collaborative analysis involving 10,860 breast cancer cases and 9,065 controls from 10 studies*. Am J Hum Genet, 2004. **74**(6): p. 1175-82.
259. Apostolou, P., et al., *CHEK2 c.1100delC allele is rarely identified in Greek breast cancer cases*. Cancer Genet, 2015. **208**(4): p. 129-34.
260. Lawrenson, K., et al., *Common variants at the CHEK2 gene locus and risk of epithelial ovarian cancer*. Carcinogenesis, 2015. **36**(11): p. 1341-53.
261. Taylor, A., et al., *Consensus for genes to be included on cancer panel tests offered by UK genetics services: guidelines of the UK Cancer Genetics Group*. J Med Genet, 2018. **55**(6): p. 372-377.
262. Renwick, A., et al., *ATM mutations that cause ataxia-telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles*. Nat Genet, 2006. **38**(8): p. 873-5.
263. Lilyquist, J., et al., *Frequency of mutations in a large series of clinically ascertained ovarian cancer cases tested on multi-gene panels compared to reference controls*. Gynecol Oncol, 2017. **147**(2): p. 375-380.
264. Ryan, N.A.J., et al., *Association of Mismatch Repair Mutation With Age at Cancer Onset in Lynch Syndrome: Implications for Stratified Surveillance Strategies*. JAMA Oncol, 2017. **3**(12): p. 1702-1706.
265. Xiao, X., D.W. Melton, and C. Gourley, *Mismatch repair deficiency in ovarian cancer -- molecular characteristics and clinical implications*. Gynecol Oncol, 2014. **132**(2): p. 506-12.
266. Tedaldi, G., et al., *Multiple-gene panel analysis in a case series of 255 women with hereditary breast and ovarian cancer*. Oncotarget, 2017. **8**(29): p. 47064-47075.
267. Bogdanova, N., et al., *Prevalence of the BLM nonsense mutation, p.Q548X, in ovarian cancer patients from Central and Eastern Europe*. Fam Cancer, 2015. **14**(1): p. 145-9.
268. Papi, L., et al., *A PALB2 germline mutation associated with hereditary breast cancer in Italy*. Fam Cancer, 2010. **9**(2): p. 181-5.
269. Hellebrand, H., et al., *Germline mutations in the PALB2 gene are population specific and occur with low frequencies in familial breast cancer*. Hum Mutat, 2011. **32**(6): p. E2176-88.
270. Kotsopoulos, J., et al., *Frequency of germline PALB2 mutations among women with epithelial ovarian cancer*. Fam Cancer, 2017. **16**(1): p. 29-34.
271. Stanislaw, C., Y. Xue, and W.R. Wilcox, *Genetic evaluation and testing for hereditary forms of cancer in the era of next-generation sequencing*. Cancer Biol Med, 2016. **13**(1): p. 55-67.
272. Kumar-Sinha, C. and A.M. Chinnaiyan, *Precision oncology in the age of integrative genomics*. Nat Biotechnol, 2018. **36**(1): p. 46-60.