



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
— ΙΔΡΥΘΗΝ ΤΟ 1837 —

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΑΘΗΝΩΝ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΤΙΤΛΟΣ:

**«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΩΝ ΜΕ ΒΕΒΑΡΗΜΕΝΟ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ
ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΜΕ ΑΡΝΗΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΑΝΕΛ 36 ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ
EXOME SEQUENCING ΚΑΙ POLYGENIC RISK SCORE (PRS) »**

ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΤΣΟΥΛΟΣ

ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ, MSc

ΑΘΗΝΑ, 2025

Παρέχεται άδεια χρήσης του ψηφιακού αρχείου

Ιπποκράτειος ὄρκος

Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἀσκληπιὸν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἴστορας ποιούμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν ὄρκον τόνδε καὶ ξυγγραφὴν τήνδε.

Ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρηίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ ωυτέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρῶσι, καὶ διδάξῃν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρηίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ ξυγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἰοῖσί τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοισί τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἰητρικῷ, ἄλλῳ δὲ οὐδενί.

Διαιτήμασί τε χρῆσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἶρξειν. Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑφηγήσομαι βουλίην τοιήνδε. Ὅμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω. Ἀγνώως δὲ καὶ ὀσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμήν. 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 φθορίης, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμαίων καὶ ἀνδρώων, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων. Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἦ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπήης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρῆ ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρῶρητα ἠγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα.

Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι, καὶ μὴ ξυγχέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιорκοῦντι, τάναντία τουτέων.

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Ημερομηνία αιτήσεως του υποψηφίου για ορισμό τριμελούς συμβουλευτικής

επιτροπής: 21/05/2021

Ο ορισμός της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής πραγματοποιήθηκε από τη Γενική συνέλευση του Τμήματος Ιατρικής στις 4/11/2021

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων

- **Χρήστος Μαρκόπουλος**, Ομ. Καθηγητής Χειρουργικής Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Μέλη

- **Θεόδωρος Τρουπής**, Καθηγητής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ
- **Ελένη Γκόγκα**, Καθηγήτρια Παθολογίας Ογκολογίας Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Το ερευνητικό πρωτόκολλο εγκρίθηκε από την Επιτροπή Βιοηθικής & Δεοντολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ

Πρώτη έκθεση προόδου: 02/06/2022 54574/06-06-2022

Δεύτερη έκθεση προόδου: 65954/12.07.2023

Τρίτη έκθεση προόδου: 32738/28.03.2025

Κατάθεση διατριβής: 27/03/2025

Ημερομηνία Παρουσίασης: 07/05/2025

Βαθμός: Άριστα

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

- **Χρήστος Μαρκόπουλος**, Ομ. Καθηγητής Χειρουργικής Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ
- **Θεόδωρος Τρουπής**, Καθηγητής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ
- **Ελένη Γκόγκα**, Καθηγήτρια Παθολογικής Ογκολογίας Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ
- **Δημήτριος Μαντάς**, Καθηγητής Χειρουργικής Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ
- **Σαμάρκος Μιχαήλ**, Καθηγητής Παθολογίας-Λοιμώξεις Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ
- **Μαντζουράνη Μαρίνα**, Αν. Καθηγήτρια Παθολογίας Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ
- **Δημήτριος Φιλίππου**, Αν.Καθηγητής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Ευχαριστίες

Ολοκληρώνοντας τη διδακτορική διατριβή μου, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλους όσους είχα την τιμή να συνεργαστώ και οι οποίοι μου προσέφεραν γενναιόδωρα τη βοήθεια και τις γνώσεις τους και συντέλεσαν στην εκπόνηση της.

Πρωτίστως θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τον επιβλέποντα της παρούσας Διατριβής Καθηγητή Χειρουργικής της Ιατρικής Σχολής Αθηνών του ΕΚΠΑ κ. **Χρήστο Μαρκόπουλο**, για την υψηλοτάτου επιπέδου επιστημονική υποστήριξη για την εκπόνηση της Διατριβής, την αρμονική συνεργασία σε όλα τα στάδια διεξαγωγής της, αλλά και για την ειλικρινή ηθική υποστήριξη προς το πρόσωπό μου. Η συνεργασία μας αποτελεί για εμένα ιδιαίτερη τιμή.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς Επιτροπής, την Καθηγήτρια Παθολογικής Ογκολογίας της Ιατρικής Σχολής Αθηνών του ΕΚΠΑ κ. **Ελένη Γκόγκα** και τον Καθηγητή Ανατομίας της Ιατρικής Σχολής Αθηνών κ. **Θεόδωρο Τρουπή** για την αμέριστη επιστημονική και ηθική τους συμπαράσταση σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης του ερευνητικού μου έργου.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Γεώργιο Τσαούση για την βοήθεια στη διεξαγωγή του ερευνητικού μέρους.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ειρήνη Παπαδοπούλου για την επιστημονική υποστήριξη ιδιαίτερα στο κομμάτι της δημοσίευσης.

Ξενόγλωσσες δημοσιεύσεις από την παρούσα διατριβή

- **Tsoulos N**, Papadopoulou E, Agiannitopoulos K, *et al.*
Polygenic Risk Score (PRS) Combined with NGS Panel Testing Increases Accuracy in Hereditary Breast Cancer Risk Estimation.
Diagnostics (Basel). 2024 Aug 21;14(16):1826.
doi:10.3390/diagnostics14161826.PMID: 39202314
- **Tsoulos N**, Agiannitopoulos K, Potska K, *et al.*
The Clinical and Genetic Landscape of Hereditary Cancer: Experience from a Single Clinical Diagnostic Laboratory.
Cancer Genomics Proteomics. 2024 Sep-Oct;21(5):448-463.
doi: 10.21873/cgp.20463. PMID: 39191493

Ξενόγλωσση δημοσίευση abstract

- **Tsoulos N**, Agiannitopoulos K, Goga H, Troupis T, Markopoulos C.
Polygenic Risk Score in a cohort of 105 Breast Cancer patients previously tested with a multi gene panel for hereditary cancer. [abstract].
In: Proceedings of the 2022 San Antonio Breast Cancer Symposium; 2022 Dec 6-10; San Antonio, TX. Philadelphia (PA): AACR;
Cancer Res 2023;83(5 Suppl):Abstract nr P5-12-07.

Ανακοινώσεις σε συνέδρια από την παρούσα διδακτορική διατριβή

- San Antonio Breast Cancer Symposium (SABCS) Dec 6-10 2022, San Antonio, Texas.
- 29ο Ελληνικό Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, 5-8 Απριλίου 2023, Αθήνα.
- 9ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Χειρουργικής Εταιρείας Μαστού, 24 - 26 Νοεμβρίου 2023, Αθήνα

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Νικόλαος Τσούλος

CEO | GeneKor Medical SA

Greece

Περίληψη

Εκτελεστικός Διευθυντής και Κλινικός Βιοχημικός με ιδιαίτερο ενδιαφέρον στη Μοριακή Ογκολογία. Έχω εκτενή εμπειρία στη διαχείριση και ανάπτυξη προϊόντων στον τομέα της Βιοτεχνολογίας με έμφαση στην Ογκολογία. Ειδικεύομαι στην ανάπτυξη δοκιμών από το εργαστήριο στην αγορά και στην δημιουργία εταιρικών μοντέλων που υποστηρίζουν τη διαδικασία σε διεθνές επίπεδο.

Ειδικότητες: Μοριακή Βιολογία, Μοριακή Ογκολογία, Βιοτεχνολογία, Διαχείριση Εταιρειών.

Επαγγελματική Εμπειρία

GeneKor Medical SA

CEO

Νοέμβριος 2006 - Παρόν (18 χρόνια)

Ως CEO της GeneKor SA, είμαι υπεύθυνος για τη λήψη αποφάσεων σε εταιρικό επίπεδο. Δημιουργώ στόχους και σχέδια που επηρεάζουν την οργάνωση και στοχεύω στη διασφάλιση μιας βιώσιμης μελλοντικής πορείας για την εταιρεία. Αυτό περιλαμβάνει τη χρηματοοικονομική και επιχειρησιακή υγεία της εταιρείας.

Εκπαίδευση

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Διδακτορικό στην Μοριακή Βιολογία

Μάιος 2021 - Ιούνιος 2024

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Μεταπτυχιακό στην Μοριακή Βιολογία

Οκτώβριος 2018 - Νοέμβριος 2020

National American University

MBA στη Διαχείριση Υγειονομικής Περίθαλψης
2009 - 2011

Stony Brook University

Πτυχίο στην Μοριακή Ιατρική
2001 - 2006

Δημοσιεύσεις

- Poster at SABCS: *Analysis of hereditary cancer syndromes by using a panel of genes: Novel and multiple pathogenic mutations*
 - *Tumor molecular profiling of NSCLC patients using next generation sequencing*
 - *Economic Consequences of the Adaption of the 21 Gene Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction RT-PCR Assay from The Greek Third Payer Perspective.*
 - *Determination of EGFR and KRAS mutational status in Greek non-small-cell lung cancer patients.*
 - *Comprehensive tumor molecular profile analysis in clinical practice*
-

Γλώσσες

- **Αγγλικά:** Άπταιστα
- **Ελληνικά:** Άπταιστα
- **Γαλλικά:** Περιορισμένη Επαγγελματική Χρήση

Δημοσιεύσεις

1. **Polygenic Risk Score (PRS) Combined with NGS Panel Testing Increases Accuracy in Hereditary Breast Cancer Risk Estimation.** Tsoulos N, Papadopoulou E, Agiannitopoulos K, Grigoriadis D, Tsaousis GN, Bouzarelou D, Gogas H, Troupis T, Venizelos V, Fountzilias E, Theochari M, Ziogas DC, Giassas

S, Koumarianou A, Christopoulou A, Busby G, Nasioulas G, Markopoulos C. *Diagnostics (Basel)*. 2024 Aug 21;14(16):1826. doi: 10.3390/diagnostics14161826. PMID: 39202314

2. **The Clinical and Genetic Landscape of Hereditary Cancer: Experience from a Single Clinical Diagnostic Laboratory.** Tsoulos N, Agiannitopoulos K, Potska K, Katseli A, Ntogka C, Pepe G, Bouzarelou D, Papathanasiou A, Grigoriadis D, Tsaousis GN, Gogas H, Troupis T, Papazisis K, Natsiopoulos I, Venizelos V, Amarantidis K, Giassas S, Papadimitriou C, Fountzilas E, Stathoulopoulou M, Koumarianou A, Xepapadakis G, Blidaru A, Zob D, Voinea O, Özdoğan M, Ergören MÇ, Hegmane A, Papadopoulou E, Nasioulas G, Markopoulos C. *Cancer Genomics Proteomics*. 2024 Sep-Oct;21(5):448-463. doi: 10.21873/cgp.20463. PMID: 39191493
3. **Germline Co-deletion of CDKN2A and CDKN2B Genes in Pleomorphic Xanthoastrocytoma: Case Report.** Agiannitopoulos K, Katseli A, Potska K, Ntogka C, Tsaousis GN, Tsoulos N, Kampoli K, Ntavatzikos A, Papadopoulou E, Nasioulas G, Koumarianou A. *In Vivo*. 2024 Jul-Aug;38(4):1671-1676. doi: 10.21873/invivo.13617. PMID: 38936911
4. **Neuroendocrine Breast Tumors: Could Multigene Assays Help in Guiding Treatment Decisions? Case Presentation.** Markopoulos C, Tsoulos N,

5. Agiannitopoulos K, Karagianni E. *In Vivo*. 2024 May-Jun;38(3):1443-1447. doi: 10.21873/invivo.13587.PMID: 38688618
6. **Only 32.3% of Breast Cancer Families with Pathogenic Variants in Cancer Genes Utilized Cascade Genetic Testing.** Agiannitopoulos K, Potska K, Katseli A, Ntogka C, Tsaousis GN, Pepe G, Bouzarelou D, Tsoulos N, Papathanasiou A, Ziogas D, Venizelos V, Markopoulos C, Iosifidou R, Karageorgopoulou S, Giassas S, Natsiopoulos I, Papazisis K, Vasilaki-Antonatou M, Psyrris A, Koumarianou A, Matthaios D, Zairi E, Blidaru A, Banu E, Jinga DC, Laçin Ş, Özdoğan M, Papadopoulou E, Nasioulas G. *Cancers (Basel)*. 2023 Oct 30;15(21):5218. doi: 10.3390/cancers15215218. PMID: 37958392
7. **Copy Number Variations (CNVs) Account for 10.8% of Pathogenic Variants in Patients Referred for Hereditary Cancer Testing.** Agiannitopoulos K, Pepe G, Tsaousis GN, Potska K, Bouzarelou D, Katseli A, Ntogka C, Meintani A, Tsoulos N, Giassas S, Venizelos V, Markopoulos C, Iosifidou R, Karageorgopoulou S, Christodoulou C, Natsiopoulos I, Papazisis K, Vasilaki-Antonatou M, Kabletsas E, Psyrris A, Ziogas D, Lalla E, Koumarianou A, Anastasakou K, Papadimitriou C, Ozmen V, Tansan S, Kaban K, Ozatli T, Eniu DT, Chiorean A, Blidaru A, Rinsma M, Papadopoulou E, Nasioulas G. *Cancer Genomics Proteomics*. 2023 Sep-Oct;20(5):448-455. doi: 10.21873/cgp.20396. PMID: 37643779
8. **Revisiting the Implications of Positive Germline Testing Results Using Multi-gene Panels in Breast Cancer Patients.** Tsaousis GN, Papadopoulou E, Agiannitopoulos K, Pepe G, Tsoulos N, Boukovinas I, Floros T, Iosifidou R, Katopodi O, Koumarianou A, Markopoulos C, Papazisis K, Venizelos V, Kapsimalis A, Xepapadakis G, Psyrris A, Banu E, Eniu DT, Blidaru A, Stanculeanu DL, Ungureanu A, Ozmen V, Tansan S, Tekinel M, Yalcin S, Nasioulas G. *Cancer*

9. Genomics Proteomics. 2022 Jan-Feb;19(1):60-78. doi: 10.21873/cgp.20304.PMID: 34949660
10. **Comprehensive tumor molecular profile analysis in clinical practice.** Özdoğan M, Papadopoulou E, Tsoulos N, Tsantikidi A, Mariatou VM, Tsaousis G, Kapeni E, Bourkoula E, Fotiou D, Kapetsis G, Boukovinas I, Touroutoglou N, Fassas A, Adamidis A, Kosmidis P, Trafalis D, Galani E, Lypas G, Orhan B, Tansan S, Özatlı T, Kirca O, Çakır O, Nasioulas G. BMC Med Genomics. 2021 Apr 14;14(1):105. doi: 10.1186/s12920-021-00952-9.
11. **Clinical feasibility of NGS liquid biopsy analysis in NSCLC patients.** Papadopoulou E, Tsoulos N, Tsantikidi K, Metaxa-Mariatou V, Stamou PE, Kladi-Skandali A, Kapeni E, Tsaousis G, Pentheroudakis G, Petrakis D, Lampropoulou DI, Aravantinos G, Varthalitis I, Kesisis G, Boukovinas I, Papakotoulas P, Katirtzoglou N, Athanasiadis E, Stavridi F, Christodoulou C, Koumariou A, Eralp Y, Nasioulas G. PLoS One. 2019 Dec 20;14(12):e0226853. doi: 10.1371/journal.pone.0226853. eCollection 2019. PMID: 31860648 Free PMC article.
12. **Tumor molecular profiling of NSCLC patients using next generation sequencing.** Tsoulos N, Papadopoulou E, Metaxa-Mariatou V, Tsaousis G, Efstathiadou C, Tounta G, Scapeti A, Bourkoula E, Zarogoulidis P, Pentheroudakis G, Kakolyris S, Boukovinas I, Papakotoulas P, Athanasiadis E, Floros T, Koumariou A, Barbounis V, Dinischiotu A, Nasioulas G. Oncol Rep. 2017 Dec;38(6):3419-3429. doi: 10.3892/or.2017.6051. Epub 2017 Oct 23.PMID: 29130105

Περιεχόμενα

Περίληψη	3
Abstract	5
Συντομογραφίες	7
1. Εισαγωγή.....	8
1.1 Καρκίνος - Καρκινογένεση	8
1.1.1 Καρκίνος Μαστού	11
1.1.2 Κληρονομικός καρκίνος μαστού	15
1.2 Αλληλούχηση επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing – NGS)	27
1.2.1. Εφαρμογή του NGS στην κλινική πράξη.....	30
1.3 Αλληλούχηση των εξωνίων του γονιδιώματος (Whole Exome Sequencing - WES) ...	36
1.4 Εκτίμηση Πολυγονιδιακού Κινδύνου (Polygenic Risk Score – PRS).....	38
1.4.1 PRS και Καρκίνος Μαστού	39
2. Σκοπός	41
3. Υλικό και μέθοδος.....	43
3.1. Υλικό μελέτης	43
3.1.1. Δημογραφικά χαρακτηριστικά του υλικού μελέτης	44
3.1.2. Υλικό μελέτης - NGS και στοχευμένο πάνελ γονιδίων	46
3.1.2. Υλικό μελέτης- PRS	50
3.1.2. Υλικό μελέτης- WES	50
3.2. Μεθοδολογία.....	52
3.2.1. Απομόνωση γενετικού υλικού (DNA).....	52
3.2.2. NGS πρωτόκολλο για κατασκευή βιβλιοθήκης με εμπλουτισμό μέσω ανιχνευτών και κατασκευή βιβλιοθήκης με εμπλουτισμό μέσω ανιχνευτών (>340.000) σχεδιασμένων για όλες τις εξωνικές περιοχές.....	52
3.3.3. Αλληλούχηση NGS.....	53
3.3.4. Βιοπληροφορική ανάλυση.....	53
3.3.5. PRS ανάλυση	55
4. Αποτελέσματα	57
4.1. Αποτελέσματα από το στοχευμένο πάνελ γονιδίων.....	57
4.1.1 Αποτελέσματα από το στοχευμένο πάνελ γονιδίων ανά τύπο καρκίνου	59

4.1.2. Διπλοί Ετεροζυγώτες.....	62
4.1.3. Παραλλαγές στο γονίδιο <i>CHEK2</i>	63
4.1.4. Παραλλαγές στο γονίδιο <i>TP53</i>	64
4.1.4. Παραλλαγές στα γονίδια ομόλογου ανασυνδυασμού (<i>HR</i>).....	65
4.2. Αποτελέσματα από την ανάλυση <i>WES</i>	66
4.3. Αποτελέσματα εκτίμησης πολυγονιδιακού κινδύνου (<i>PRS</i>)	68
5. Συζήτηση.....	75
5.1. Στοχευμένο πάνελ γονιδίων.....	75
5.1.2. Στοχευμένο πάνελ γονιδίων – <i>CHEK2</i> γονίδιο	77
5.1.3. Στοχευμένο πάνελ γονιδίων – <i>TP53</i> γονίδιο	79
5.1.4. Γονίδια Ομόλογου Ανασυνδυασμού	80
5.2. Ανάλυση όλων των λειτουργικών εξωνίων του γονιδιώματος (<i>WES</i>)	81
5.3. Εκτίμηση Πολυγονιδιακού Κινδύνου (<i>PRS</i>)	83
5.3.1. Εκτίμηση Κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου μαστού βασισμένη στο <i>PRS</i>	83
5.3.2. Κλινική Εφαρμογή της Εκτίμησης Κινδύνου Καρκίνου του Μαστού Βασισμένη στο <i>PRS</i>	85
6. Συμπεράσματα	87
Βιβλιογραφία.....	89
Παράρτημα.....	100

Περίληψη

Εισαγωγή: Ο κληρονομικός καρκίνος αφορά περίπου το 5-10% των περιπτώσεων καρκίνου. Την τελευταία δεκαετία, τα τεχνολογικά πλεονεκτήματα και κυρίως η έλευση της αλληλούχησης επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing - NGS) επέτρεψε την ανάλυση πολλών περισσότερων γονιδίων που σχετίζονται με την κληρονομική προδιάθεση για καρκίνο. Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι: **A)** να αξιολογηθεί αναδρομικά η κλινική χρησιμότητα της εκτίμησης πολυγονιδιακού κινδύνου (Polygenic Risk Score - PRS) στην ανάπτυξη καρκίνου του μαστού, χρησιμοποιώντας μια ομάδα ασθενών που έχουν ήδη διαγνωστεί με καρκίνο του μαστού και **B)** η πιθανή ανεύρεση νέων γενετικών τόπων που σχετίζονται με τον κληρονομικό καρκίνο του μαστού, με την χρήση αλληλούχησης επόμενης γενιάς όλων των εξωνίων (WES).

Υλικά και Μέθοδοι: Κατά την περίοδο 2020-2023, συνολικά 8,261 άτομα παραπέμφθηκαν για πολυγονιδιακό γενετικό έλεγχο 52 γονιδίων με χρήση NGS, στο εργαστήριο της Genekor Ιατρικής Α.Ε. Στην συνέχεια, από τις 4,641 ασθενείς με καρκίνο μαστού, πραγματοποιήθηκε ανάλυση για εκτίμηση πολυγονιδιακού κινδύνου (PRS) σε 105 άτομα με γνωστά αποτελέσματα από τον στοχευμένο γονιδιακό έλεγχο, αναλύοντας 577,113 πολυμορφισμούς ενός νουκλεοτιδίου (SNPs). Επιπλέον, προκειμένου να αποσαφηνιστεί η γενετική αιτία του καρκίνου του μαστού πραγματοποιήθηκε ανάλυση WES σε 85 γυναίκες (εξαιρέθηκαν εκείνες που ήταν θετικές σε γονίδιο υψηλής διεισδυτικότητας

Αποτελέσματα: Το 20% των εξεταζόμενων ατόμων έφερε παθολόγο παραλλαγή. Συγκεκριμένα, το 54,8% των ασθενών είχαν παθολόγο παραλλαγή σε κλινικά σημαντικό γονίδιο (*BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *RAD51C*, *PMS2*, *CDKN2A*, *MLH1*, *MSH2*, *TP53*, *MSH6*, *APC*, *RAD51D*, *PTEN*, *RET*, *CDH1*, *MEN1* και *VHL*). Μεταξύ των διαφόρων τύπων παθολόγων παραλλαγών που ανιχνεύθηκαν, ένα σημαντικό ποσοστό (6,52%) αντιπροσώπευε μεγάλες γενωμικές αναδιατάξεις (Copy Number Variations - CNVs).

Η PRS ανάλυση έδειξε σημαντική διαφορά στην κατανομή των εκατοστημορίων του PRS, η οποία συνδέεται με υψηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού στην ομάδα μελέτης σε σύγκριση με τον γενικό πληθυσμό. Υψηλότερη τιμή PRS παρατηρήθηκε σε γυναίκες που εμφάνισαν την νόσο σε μικρότερη ηλικία και σε εκείνες που είχαν οικογενειακό ιστορικό με καρκίνο μαστού. Μεταξύ των ασθενών στους οποίους ανιχνεύθηκε παθογόνος γονιδιακή παραλλαγή, παρατηρήθηκαν μειωμένες τιμές PRS, καθώς ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου μαστού καθοριζόταν κυρίως από μονογονιδιακή αιτιολογία. Χρησιμοποιώντας την ανάλυση WES εντοπίστηκαν, τα ακόλουθα ευρήματα: *CTC1*:c.880C>T, p.(Gln294*); *MLH3*: c.405del, p.(Asp136Metfs*2), *PPM1D*: c.1426_1430del, p.(Glu476Leufs*3), και *SDHB*: c.395A>G, p.(His132Arg).

Συμπεράσματα: Ο πλήρης γενετικός έλεγχος είναι απαραίτητος καθώς μπορεί να δώσει πληροφορίες για την κλινική διαχείριση των φορέων παθογόνων παραλλαγών. Επίσης, είναι σημαντική η χρησιμότητα του υπολογισμού του PRS σε γυναίκες με οικογενειακό ιστορικό καρκίνου μαστού, όταν δεν ανιχνεύεται μονογονιδιακή αιτιολογία μέσω NGS.

Abstract

Introduction: Hereditary cancer accounts for approximately 5-10% of cancer cases. In the past decade, technological advancements, particularly the advent of Next Generation Sequencing (NGS), have enabled the analysis of many more genes related to hereditary cancer predisposition. The contribution of multiple genes to breast cancer susceptibility has been revealed, and gene panels are widely used in clinical practice. The aim of this doctoral thesis is: **A)** to retrospectively evaluate the clinical utility of the Polygenic Risk Score (PRS) in calculating the risk of developing breast cancer, using a cohort of patients who have already been diagnosed with breast cancer, and **B)** to potentially identify new genetic loci associated with hereditary breast cancer through Whole Exome Sequencing (WES).

Materials and Methods: A total of 8,261 individuals were referred for multigene genetic testing, during the period 2020-2023, in the laboratory, and underwent multigene genetic testing using NGS. Also, PRS analysis was performed on 105 subjects with known results from targeted gene testing, analyzing 577,113 single-nucleotide polymorphisms (SNPs). Furthermore, to elucidate the genetic cause of breast cancer, WES analysis was conducted on 85 women (excluding those who tested positive for a high penetrance gene).

Results: 20% of the examined individuals carried a pathogenic variant. Specifically, 54.8% of the patients had a pathogenic variant in a clinically significant gene (*BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *RAD51C*, *PMS2*, *CDKN2A*, *MLH1*, *MSH2*, *TP53*, *MSH6*, *APC*, *RAD51D*, *PTEN*, *RET*, *CDH1*, *MEN1*, and *VHL*). Among the different types of pathogenic variants detected, a significant percentage (6.52%) represented copy number variation (CNV). The analysis showed a significant difference in the distribution of PRS percentiles, which is associated with a higher risk of developing breast cancer in the study group compared to the general population. Higher PRS values were observed in women who developed the disease at a

younger age and those with a family history of breast cancer. Among patients with pathogenic gene variants, lower PRS values were noted, as the risk of developing breast cancer was primarily determined by monogenic etiology. Using WES analysis, the following findings were identified: *CTC1*: c.880C>T, p.(Gln294*); *MLH3*: c.405del, p.(Asp136Metfs*2), *PPM1D*: c.1426_1430del, p.(Glu476Leufs*3), and *SDHB*: c.395A>G, p.(His132Arg).

Conclusions: Comprehensive genetic analysis is essential as it provides valuable information for the clinical management of individuals carrying pathogenic variants. Additionally, PRS calculation proves to be particularly useful in women with a family history of breast cancer, especially when no monogenic cause is detected through NGS.

Συντομογραφίες

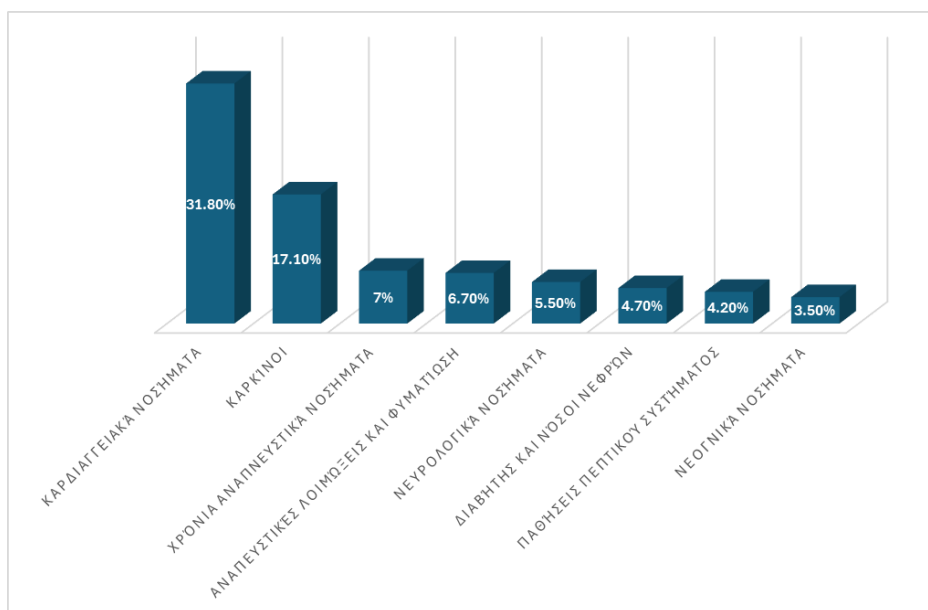
ACMG	American College of Medical Genetics and Genomics	Αμερικανικό Κολέγιο Ιατρικής Γενετικής και Γονιδιωματικής
CNV	Copy Number Variation	Μεγάλη γενωμική αναδιάταξη
CS	Cowden Syndrome	Σύνδρομο Cowden
GWAS	Genome-Wide Association Study	Μελέτες γενετικής συσχέτισης
HRT	Hormone therapy	Ορμονική υποκατάσταση
LoF	Loss-of-function	Παραλλαγές που αλλάζουν το πλαίσιο ανάγνωσης
LOH	Loss Of Heterozygosity	Απώλεια ετεροζυγωτίας
MMR	DNA mismatch repair	Σύστημα επιδιόρθωσης λαθών
MRI	Magnetic resonance imaging	Μαγνητική τομογραφία
NGS	Next Generation Sequencing	Αλληλούχηση Επόμενης Γενιάς
PCR	Polymerase Chain Reaction	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PRS	Polygenic Risk Score	Εκτίμησης πολυγονιδιακού κινδύνου
RRM	Risk-reducing mastectomy	Προληπτική μαστεκτομή
RRSO	Risk-reducing bilateral salpingo-oophorectomy	Αμφοτερόπλευρη Σαλπινγεκτομή και Ωθηκεκτομή
SNP	Single-nucleotide polymorphism	Πολυμορφισμός ενός νουκλεοτιδίου
SNV	Single nucleotide variant	Παραλλαγές που αλλάζουν μια βάση
VUS	Variant of Uncertain Significance	Εύρημα Αδιευκρίνιστης Κλινικής Σημασίας
WES	Whole exome sequencing	Αλληλούχηση όλων των εξωνίων

Σημείωση: Στην παρούσα εργασία οι πιθανώς παθογόνες και οι παθογόνες παραλλαγές αναφέρονται ως παθογόνες παραλλαγές.

1. Εισαγωγή

1.1 Καρκίνος - Καρκινογένεση

Ο καρκίνος είναι μια από τις πιο σοβαρές ασθένειες που πλήττει τον άνθρωπο και αποτελεί μία από τις κύριες αιτίες θανάτου παγκοσμίως [1] (Εικόνα 1.1). Είναι μια γενετική νόσος που χαρακτηρίζεται από παραλλαγές σε συγκεκριμένα γονίδια και χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Αυτές οι γενετικές αλλαγές συμβαίνουν κυρίως στα σωματικά κύτταρα κατά τη διάρκεια της ζωής του ατόμου, οδηγώντας σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Τα καρκινικά κύτταρα αρχικά σχηματίζουν μια μάζα, η οποία με τον καιρό εξελίσσεται σε έναν όγκο που συνεχώς αυξάνεται (Εικόνα 1.2). Ορισμένα κύτταρα του όγκου αποκτούν την ικανότητα να διεισδύουν στους υγιείς ιστούς, ενώ κάποια από αυτά αποσπώνται από τον αρχικό όγκο και μέσω του αίματος και της λέμφου μεταφέρονται σε άλλα μέρη του σώματος, όπως άλλα όργανα και ιστούς [2].



Εικόνα 1.1. Οι διάφοροι τύποι καρκίνων αποτελούν το δεύτερο συχνότερο νόσημα παγκοσμίως. Πηγή World Economic Forum / Institute for Health Metrics and Evaluation.



Εικόνα 1.2. Απεικόνιση δημιουργίας καρκινικού όγκου. Πηγή: <https://www.yashodahospitals.com>.

Η καρκινογένεση περιλαμβάνει τέσσερα κύρια στάδια: **A.** την αρχική δημιουργία του όγκου, **B.** την προώθηση της ανάπτυξης του όγκου, **Γ.** τη μετατροπή του σε κακοήθη όγκο και **Δ.** την εξέλιξή του [3] (Εικόνα 1.3).

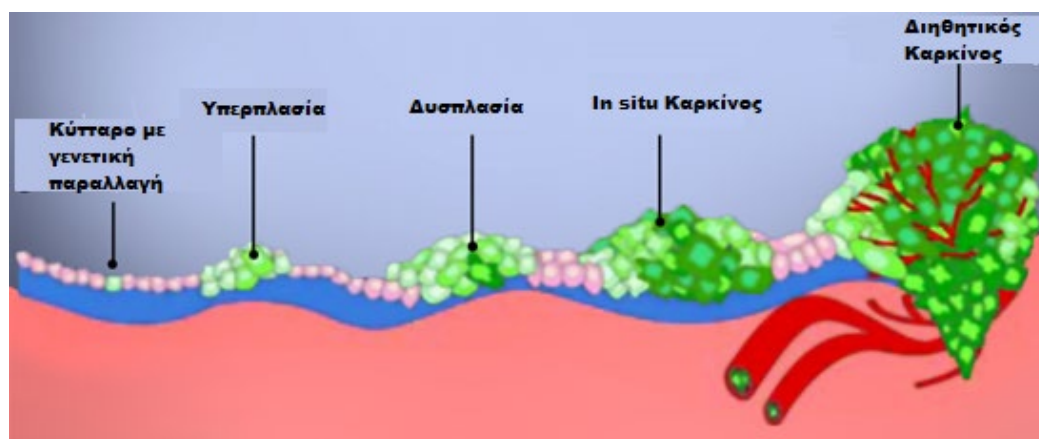
Το πρώτο στάδιο, η δημιουργία του όγκου, προκαλείται από μη αναστρέψιμες γενετικές βλάβες, οι οποίες μπορεί να οφείλονται σε ενδογενείς παράγοντες, όπως λάθη κατά την αντιγραφή του DNA και η αδυναμία επιδιόρθωσης των βλαβών στο DNA, αλλά και σε εξωγενείς παράγοντες, όπως η ιονίζουσα ακτινοβολία, οι χημικές ουσίες και οι ιοί. Αυτές οι γενετικές βλάβες οδηγούν στον σχηματισμό των πρώτων καρκινικών κυττάρων.

Το δεύτερο στάδιο, η προαγωγή του όγκου, αφορά την επιλεκτική εξάπλωση του αρχικού κλώνου καρκινικών κυττάρων. Καθώς αυτός ο κλώνος επεκτείνεται, παράγονται περισσότερα κύτταρα που έχουν αυξημένο κίνδυνο να υποστούν επιπλέον γενετικές μεταλλάξεις και να εξελιχθούν σε κακοήθη όγκο. Οι περισσότεροι όγκοι προέρχονται από ένα μοναδικό κύτταρο που έχει υποστεί την αρχική γενετική μετάλλαξη.

Το τρίτο στάδιο, η μετατροπή σε κακοήθη όγκο, είναι η διαδικασία κατά την οποία ένα νεοπλασματικό κύτταρο εξελίσσεται σε κύτταρο με κακοήθη χαρακτηριστικά, απαιτώντας επιπλέον γενετικές αλλαγές. Η προαγωγή του όγκου συμβάλλει στην

καρκινογένεση με την επέκταση ενός πληθυσμού αρχικών κυττάρων που έχουν αυξημένο κίνδυνο να μετατραπούν σε κακοήθη. Η μετατροπή ορισμένων από αυτά τα κύτταρα σε κακοήθη επιταχύνεται από τον ρυθμό της κυτταρικής διαίρεσης και τον αριθμό των κυττάρων του καλοήθους όγκου που βρίσκονται σε διαίρεση. Η πιθανότητα μετατροπής ενός καλοήθους όγκου σε κακοήθη αυξάνεται όταν τα προ-νεοπλαστικά κύτταρα εκτίθενται σε παράγοντες που προκαλούν βλάβες στο DNA, με τη διαδικασία να περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των πρωτο-ογκογονιδίων και την απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων.

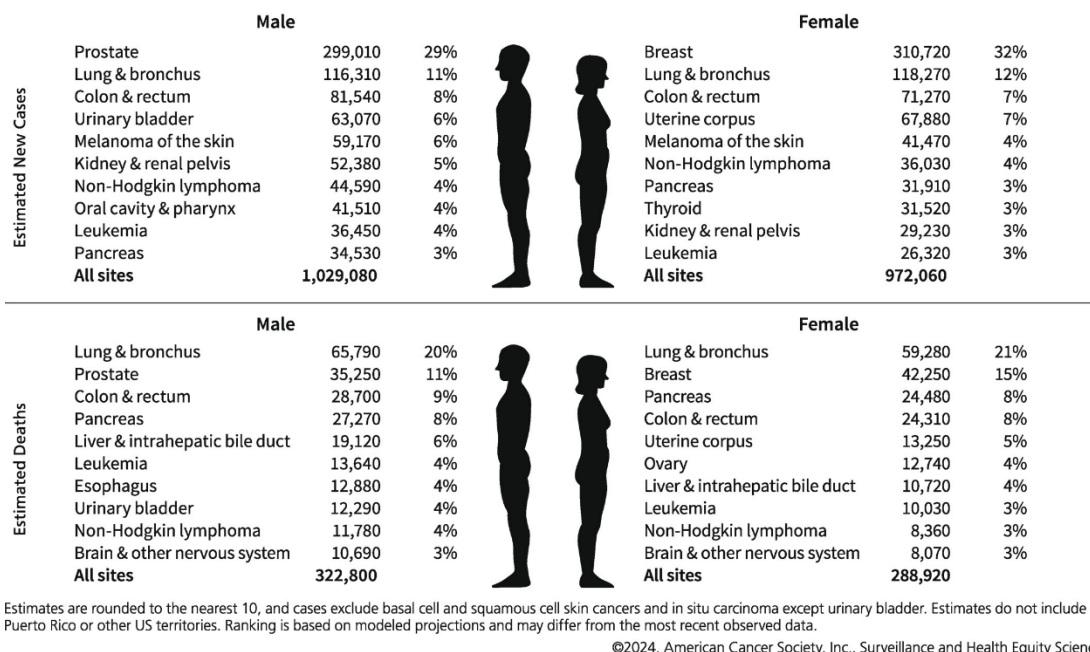
Το τέταρτο στάδιο, η εξέλιξη του όγκου, περιλαμβάνει την πλήρη εκδήλωση του κακοήθους φαινοτύπου και την τάση των καρκινικών κυττάρων να αποκτούν πιο επιθετικά χαρακτηριστικά. Η μετάσταση χαρακτηρίζεται από την ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να εκκρίνουν πρωτεάσες, επιτρέποντάς τους να διεισδύουν σε απομακρυσμένα σημεία πέρα από τον αρχικό όγκο. Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά του κακοήθους φαινοτύπου είναι η γονιδιωματική αστάθεια και η ανεξέλεγκτη αύξηση. Κατά την εξέλιξη του όγκου, συμβαίνουν επιπλέον γενετικές και επιγενετικές αλλαγές, που ενισχύουν την επιθετικότητα και την ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να επιβιώνουν και να πολλαπλασιάζονται χωρίς έλεγχο.



Εικόνα 1.3. Η Καρκινογένεση Αποτελείται από τέσσερα στάδια: τη δημιουργία του όγκου, την προαγωγή του όγκου, τη μετατροπή σε κακοήγη όγκο και την εξέλιξη του όγκο Πηγή: <https://thetruthaboutcancer.com/understanding-four-stages-cancer/>.

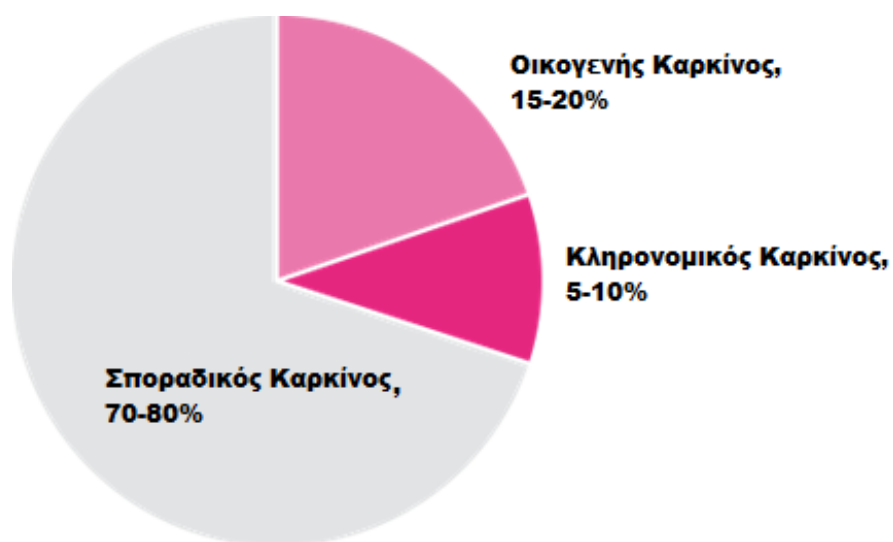
1.1.1 Καρκίνος Μαστού

Ο καρκίνος του μαστού είναι ο πιο συχνά διαγνωσμένος τύπος καρκίνου στις γυναίκες στις ανεπτυγμένες χώρες, με περίπου μία στις οκτώ γυναίκες να αναμένεται να νοσήσει κατά τη διάρκεια της ζωής της [4] (Εικόνα. 1.4). Πολλοί παράγοντες συμβάλλουν στην εμφάνισή του, όπως οι ορμόνες, η αναπαραγωγή και η παχυσαρκία, με το οικογενειακό ιστορικό να είναι ο σημαντικότερος. Ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του μαστού αυξάνεται με τον αριθμό των συγγενών που έχουν νοσήσει, ενώ είναι ακόμη μεγαλύτερος όταν η διάγνωση της κακοήθειας γίνεται σε νεαρή ηλικία [5].



Εικόνα 1.4. Ο καρκίνος μαστού είναι ο συχνότερος μεταξύ των διαφόρων τύπων στις γυναίκες.

Περίπου 10%-20% των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού σχετίζονται με μια κληρονομική προδιάθεση, αν και ο ακριβής γενετικός παράγοντας δεν έχει προσδιοριστεί, και αυτές οι περιπτώσεις θεωρούνται οικογενείς. Αντίθετα, το 5%-15% των περιστατικών καρκίνου του μαστού είναι κληρονομικά και ακολουθούν σαφή Μενδελιανή κληρονομικότητα. Όταν δεν υπάρχει κληρονομικότητα και η διάγνωση γίνεται σε ηλικίες άνω των 60 ετών, ο καρκίνος θεωρείται σποραδικός (Εικόνα 1.5) [6].



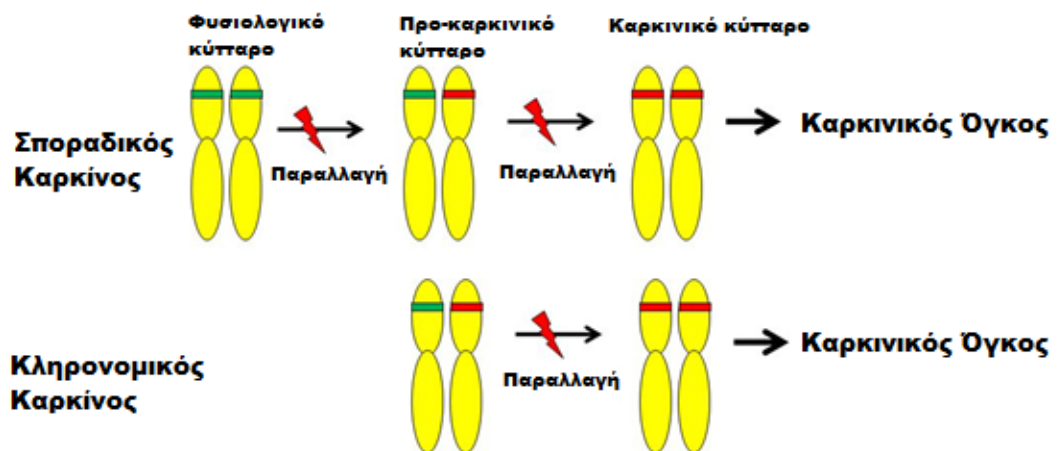
Εικόνα 1.5. Ποσοστά των διαφορετικών τύπων καρκίνου μαστού. Ο οικογενής, ο σποραδικός και ο κληρονομικός καρκίνος μαστού αντιπροσωπεύουν το 15-20%, 70-80% και 5-10%, αντίστοιχα.

Εκτιμάται ότι τουλάχιστον το 5% των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού οφείλεται σε παραλλαγές των γονιδίων *BRCA1* και *BRCA2*. Ένα σημαντικό ποσοστό από τις υπόλοιπες περιπτώσεις συνδέεται με παραλλαγές άλλων γονιδίων υψηλής, μέτριας και χαμηλής διεισδυτικότητας, όπως τα γονίδια *PTEN*, *TP53*, *CDH1*, *STK11*, *CHEK2*, *PALB2*, *RAD51C*, *ATM* και *BARD1*. Είναι αξιοσημείωτο ότι τα πρωτεϊνικά προϊόντα των περισσότερων από αυτά τα γονίδια αλληλεπιδρούν άμεσα ή έμμεσα με τα γονίδια *BRCA1*

και *BRCA2*. Το 70-80% όλων των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού ταξινομούνται ως σποραδικός καρκίνος [7].

Ο σποραδικός καρκίνος του μαστού εμφανίζεται χωρίς κληρονομικούς παράγοντες και συνήθως διαγιγνώσκεται σε μεγαλύτερες ηλικίες. Αντίθετα, οι οικογενείς και κληρονομικοί καρκίνοι του μαστού εμφανίζονται σε άτομα με οικογενειακό ιστορικό καρκίνου και μπορεί να διαγνωστούν σε νεαρότερες ηλικίες. Η κατανόηση αυτών των γενετικών διαφορών είναι σημαντική για την ανάπτυξη στοχευμένων θεραπειών και προληπτικών στρατηγικών [8].

Η διατύπωση της «υπόθεσης των δύο χτυπημάτων - Two-Hit Hypothesis» υπήρξε καθοριστική για την κατανόηση του κληρονομικού καρκίνου και την απόδειξη της γενετικής του βάσης (Εικόνα 1.6). Σύμφωνα με αυτή την υπόθεση, ο καρκίνος μπορεί να αναπτυχθεί όταν συμβούν δύο ξεχωριστές γενετικές αλλαγές στα αλληλόμορφα ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου. Στην περίπτωση του κληρονομικού καρκίνου του μαστού, το πρώτο αλληλόμορφο με τη μετάλλαξη κληρονομείται από έναν από τους γονείς μέσω των γαμετών, ενώ το δεύτερο αλληλόμορφο απενεργοποιείται από μια σωματική μετάλλαξη στο υπόλοιπο φυσιολογικό αλληλόμορφο του ίδιου γονιδίου [9].



Εικόνα 1.6. υπόθεσης των δύο χτυπημάτων - Two-Hit Hypothesis», γνωστή και ως Knudson υπόθεση.

Αυτή η διαδικασία προκαλεί απώλεια ετεροζυγωτίας (Loss Of Heterozygosity-LOH) σε ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο, με αποτέλεσμα την απώλεια ελέγχου της κυτταρικής ανάπτυξης και την προώθηση της καρκινογένεσης. Έτσι, η καρκινογένεση προκύπτει από την απενεργοποίηση ενός αλληλόμορφου του γονιδίου λόγω μιας κληρονομούμενης μετάλλαξης σε γαμετικά κύτταρα (γαμετική μετάλλαξη), σε συνδυασμό με την απενεργοποίηση του δεύτερου αλληλόμορφου σε σωματικά κύτταρα (σωματική μετάλλαξη) [10].

Σε κληρονομικούς καρκίνους, η πρώτη αλλαγή συμβαίνει πριν από το σχηματισμό του ζυγωτού, καθώς είναι ήδη παρούσα στο ωάριο ή το σπερματοζωάριο. Στους σποραδικούς καρκίνους, η πρώτη αλλαγή εμφανίζεται αργότερα, κατά τη διάρκεια της ζωής του ατόμου. Η δεύτερη μετάλλαξη, απαραίτητη και στους δύο τύπους καρκίνου, σχετίζεται με την απώλεια ετεροζυγωτίας και μπορεί να προκύψει μέσω διαφόρων μηχανισμών. Αυτοί οι μηχανισμοί περιλαμβάνουν: την απώλεια τμήματος του χρωμοσώματος που περιέχει το γονίδιο, τον μιτωτικό ανασυνδυασμό, τη μη σωστή διαίρεση των χρωμοσωμάτων κατά τη μείωση που οδηγεί στην απώλεια ολόκληρου του χρωμοσώματος, τον μη διαχωρισμό και διπλασιασμό, σημειακή αλλαγή, απαλοιφή, χρωμοσωμική μετατόπιση και επιγενετική αποσιώπηση.

Αυτοί οι μηχανισμοί προκαλούν γενετικές και επιγενετικές αλλαγές που οδηγούν στην απώλεια της λειτουργίας των ογκοκατασταλτικών γονιδίων και προάγουν την ανάπτυξη καρκίνου. Η κατανόηση αυτών των διεργασιών είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη στρατηγικών πρόληψης και θεραπείας του καρκίνου.

Η έρευνα στο τομέα της ογκολογίας έχει στόχο τον εντοπισμό νέων γενετικών παραγόντων που σχετίζονται με τον καρκίνο του μαστού, ώστε να βελτιωθούν οι μέθοδοι πρόληψης, διάγνωσης και θεραπείας της νόσου. Η γενετική συμβουλευτική και οι γενετικές εξετάσεις μπορούν να συμβάλουν στον εντοπισμό ατόμων με αυξημένο κίνδυνο, επιτρέποντας την εφαρμογή πιο στοχευμένων και αποτελεσματικών παρεμβάσεων.

1.1.2 Κληρονομικός καρκίνος μαστού

Ο κληρονομικός καρκίνος μαστού σχετίζεται με παραλλαγές σε συγκεκριμένα γονίδια. Τα γονίδια αυτά έχουν κατηγοριοποιηθεί σε διαφορετικές ομάδες με βάση τη σύνδεσή τους με τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού [11]. Συγκεκριμένα, παθογόνες παραλλαγές σε γονίδια υψηλού κινδύνου αυξάνουν σημαντικά τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου, με κίνδυνο μεγαλύτερο από τέσσερις φορές (>4X) σε σύγκριση με τον γενικό πληθυσμό κατά τη διάρκεια της ζωής. Τα γονίδια ενδιάμεσου κινδύνου σχετίζονται με κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου μαστού δύο έως τέσσερις φορές (2–4X) σε σύγκριση με τον γενικό πληθυσμό. Επιπλέον, τα γονίδια χαμηλού κινδύνου σχετίζονται με κίνδυνο μικρότερο από δύο φορές (<2X). Για ορισμένα γονίδια, υπάρχουν περιορισμένα ή ανεπαρκή στοιχεία σχετικά με τη σύνδεσή τους με τον καρκίνο και την έκταση του σχετικού κινδύνου [12]. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι αυτή η ταξινόμηση είναι δυναμική και ενημερώνεται συνεχώς με βάση τα κλινικά δεδομένα από διάφορες πηγές.

Τα *BRCA1* και *BRCA2* γονίδια (γνωστά ως BReast CAncer genes 1 and 2) είναι τα πιο ευρέως αναγνωρισμένα γονίδια προδιάθεσης για καρκίνο του μαστού. Οι παθογόνες παραλλαγές σε αυτά τα γονίδια αυξάνουν σημαντικά τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού και/ή των ωοθηκών. Αυτές οι παραλλαγές κληρονομούνται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο, αυξάνοντας σημαντικά τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου στους συγγενείς πρώτου βαθμού που τις κληρονομούν, σε σύγκριση με τον γενικό πληθυσμό [13]. Εκτός από τα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2*, υπάρχουν αρκετά άλλα γονίδια που συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου του μαστού. Μερικά από αυτά τα γονίδια περιλαμβάνουν τα *TP53*, *CHEK2*, *ATM*, *PALB2*, *PTEN*, *STK11*, *CDH1*, *NF1*, *RAD51C* και *RAD51D* [14]. Ο απόλυτος κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου μαστού καθώς και οι κατευθυντήριες οδηγίες για την διαχείριση των ατόμων που φέρουν παθογόνα ευρήματα σε συγκεκριμένα γονίδια φαίνονται στον Πίνακα 1.1.

Πίνακας 1.1. Κατευθυντήριες οδηγίες για την διαχείριση των ατόμων που φέρουν παθογόνα ευρήματα σε συγκεκριμένα γονίδια (NCCN Guidelines Version 1.2025)	
Γονίδιο	Καρκίνος Μαστού
ATM	<p>Πρωτοπαθής καρκίνος του μαστού</p> <p>Απόλυτος κίνδυνος: 21%–24%</p> <p>Διαχείριση: <u>Προληπτικός έλεγχος:</u> Ετήσια μαστογραφία στην ηλικία των 40 ετών και εξέταση της πιθανότητας για μαγνητική τομογραφία μαστού με και χωρίς σκιαγραφικό, ξεκινώντας από την ηλικία των 30–35 ετών</p> <p><u>Μείωση κινδύνου:</u> Δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα για μαστεκτομή με σκοπό τη μείωση του κινδύνου (risk reducing mastectomy - RRM). Η διαχείριση βασίζεται στο οικογενειακό ιστορικό</p> <p>Αμφοτερόπλευρος καρκίνος μαστού</p> <p><u>Συσσωρευτικός κίνδυνος 10ετίας:</u> 4%</p>
BARD1	<p>Πρωτοπαθής καρκίνος του μαστού</p> <p>Απόλυτος κίνδυνος: 17%–30%</p> <p>Διαχείριση: <u>Προληπτικός έλεγχος:</u> Ετήσια μαστογραφία και εξέταση της πιθανότητας για μαγνητική τομογραφία μαστού με και χωρίς σκιαγραφικό, ξεκινώντας από την ηλικία των 40 ετών</p> <p><u>Μείωση κινδύνου:</u> Δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα για τη μαστεκτομή με σκοπό τη μείωση του κινδύνου. Η διαχείριση βασίζεται στο οικογενειακό ιστορικό</p>
BRCA1	<p>Πρωτοπαθής καρκίνος του μαστού</p> <p>Απόλυτος κίνδυνος: 60%–72%</p> <p>Διαχείριση: Πίνακας 1.2. Διαχείριση φορέων παθογόνων παραλλαγών στα γονίδια <i>BRCA</i></p> <p>Αμφοτερόπλευρος καρκίνος μαστού</p> <p><u>Συσσωρευτικός κίνδυνος 20ετίας:</u> 30%–40% <u>Συσσωρευτικός κίνδυνος 15ετίας σε προεμμηνόπαυσιακές γυναίκες:</u> >20%</p> <p>Καρκίνος του μαστού στους άνδρες</p> <p>Απόλυτος κίνδυνος: 0.2%–1.2% έως την ηλικία των 70 ετών</p> <p>Διαχείριση: Πίνακας 1.2. Διαχείριση φορέων παθογόνων παραλλαγών στα γονίδια <i>BRCA</i></p>

BRCA2	<p>Πρωτοπαθής καρκίνος του μαστού</p> <p>Απόλυτος κίνδυνος: 55%–69%</p> <p>Διαχείριση: Πίνακας 1.2. Διαχείριση φορέων παθογόνων παραλλαγών στα γονίδια <i>BRCA</i></p> <p>Αμφοτερόπλευρος καρκίνος μαστού</p> <p><u>Συσσωρευτικός κίνδυνος 20ετίας:</u> 25% <u>Συσσωρευτικός κίνδυνος 15ετίας σε προεμμηνόπαυσιακές γυναίκες:</u> >20%</p> <p>Καρκίνος του μαστού στους άνδρες</p> <p>Απόλυτος κίνδυνος: 1.8%–7.1% έως την ηλικία των 70 ετών</p> <p>Διαχείριση: Πίνακας 1.2. Διαχείριση φορέων παθογόνων παραλλαγών στα γονίδια <i>BRCA</i></p>
CDH1	<p>Πρωτοπαθής καρκίνος του μαστού</p> <p>Απόλυτος κίνδυνος: 37%–55%</p> <p>Διαχείριση: <u>Προληπτικός έλεγχος:</u> Ετήσια μαστογραφία και εξέταση της πιθανότητας για μαγνητική τομογραφία μαστού με και χωρίς σκιαγραφικό, ξεκινώντας από την ηλικία των 30 ετών</p> <p><u>Μείωση κινδύνου:</u> Συζήτηση για την επιλογή της προφυλακτικής μαστεκτομής</p>
CHEK2	<p>Πρωτοπαθής καρκίνος του μαστού</p> <p>Απόλυτος κίνδυνος: 23%–27%</p> <p>Διαχείριση: <u>Προληπτικός έλεγχος:</u> Ετήσια μαστογραφία στην ηλικία των 40 ετών και εξέταση της πιθανότητας για μαγνητική τομογραφία μαστού με και χωρίς σκιαγραφικό, ξεκινώντας από την ηλικία των 30–35 ετών</p> <p><u>Μείωση κινδύνου:</u> Δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα για μαστεκτομή με σκοπό τη μείωση του κινδύνου. Η διαχείριση βασίζεται στο οικογενειακό ιστορικό</p> <p>Αμφοτερόπλευρος καρκίνος μαστού</p> <p><u>Συσσωρευτικός κίνδυνος 10ετίας:</u> 6%–8%</p>
MSH2, MLH1, MSH6, PMS2,	<p>Πρωτοπαθής καρκίνος του μαστού</p> <p><i>MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, και EPCAM</i></p>

EPCAM	<p>Απόλυτος κίνδυνος: <15%</p> <p>Διαχείριση: Ανεπαρκή δεδομένα. Διαχείριση βασισμένη στο οικογενειακό ιστορικό</p>
NF1	<p>Πρωτοπαθής καρκίνος του μαστού</p> <p>Απόλυτος κίνδυνος: 20%–40%</p> <p>Διαχείριση: <u>Προληπτικός έλεγχος:</u> Ετήσια μαστογραφία ξεκινώντας από την ηλικία των 30 ετών και εξέταση της πιθανότητας για μαγνητική τομογραφία μαστού με και χωρίς σκιαγραφικό από την ηλικία των 30 έως 50 ετών</p> <p><u>Μείωση κινδύνου:</u> Δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα για τη μαστεκτομή με σκοπό τη μείωση του κινδύνου. Η διαχείριση βασίζεται στο οικογενειακό ιστορικό</p>
PALB2	<p>Πρωτοπαθής καρκίνος του μαστού</p> <p>Απόλυτος κίνδυνος: 32%–53%</p> <p>Διαχείριση: <u>Προληπτικός έλεγχος:</u> Ετήσια μαστογραφία και μαγνητική τομογραφία μαστού με και χωρίς σκιαγραφικό στα 30 έτη</p> <p><u>Μείωση κινδύνου:</u> Συζήτηση για την επιλογή της προφυλακτικής μαστεκτομής</p> <p>Αμφοτερόπλευρος καρκίνος μαστού</p> <p><u>Συσσωρευτικός κίνδυνος 10ετίας:</u> 5%–8%</p> <p>Καρκίνος του μαστού στους άνδρες</p> <p>Απόλυτος κίνδυνος: 0.9% έως την ηλικία των 70 ετών</p> <p>Διαχείριση: Παρόμοια με αυτή των φορέων παθογόνων παραλλαγών στο <i>BRCA1</i> γονίδιο (Πίνακας 1.2)</p>
PTEN	<p>Πρωτοπαθής καρκίνος του μαστού</p> <p>Απόλυτος κίνδυνος: 40%–60% (ιστορικά δεδομένα), >60% (προβλεπόμενες εκτιμήσεις)</p> <p>Διαχείριση: Πίνακας 1.3. Διαχείριση ατόμων με Σύνδρομο Cowden</p>
RAD51C	<p>Πρωτοπαθής καρκίνος του μαστού</p> <p>Απόλυτος κίνδυνος: ~20%</p> <p>Διαχείριση:</p>

	<p><u>Προληπτικός έλεγχος:</u> Ετήσια μαστογραφία και εξέταση της πιθανότητας για μαγνητική τομογραφία μαστού με και χωρίς σκιαγραφικό, ξεκινώντας από την ηλικία των 40 ετών</p> <p><u>Μείωση κινδύνου:</u> Δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα για τη μαστεκτομή με σκοπό τη μείωση του κινδύνου. Η διαχείριση βασίζεται στο οικογενειακό ιστορικό</p> <p>Αμφοτερόπλευρος καρκίνος μαστού</p> <p><u>Συσσωρευτικός κίνδυνος 10ετίας:</u> ίδιος με τον σποραδικό καρκίνο του μαστού (<2%)</p>
RAD51D	<p>Πρωτοπαθής καρκίνος του μαστού</p> <p>Απόλυτος κίνδυνος: ~20%</p> <p>Διαχείριση: <u>Προληπτικός έλεγχος:</u> Ετήσια μαστογραφία και εξέταση της πιθανότητας για μαγνητική τομογραφία μαστού με και χωρίς σκιαγραφικό, ξεκινώντας από την ηλικία των 40 ετών <u>Μείωση κινδύνου:</u> Δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα για τη μαστεκτομή με σκοπό τη μείωση του κινδύνου. Η διαχείριση βασίζεται στο οικογενειακό ιστορικό</p> <p>Αμφοτερόπλευρος καρκίνος μαστού</p> <p><u>Συσσωρευτικός κίνδυνος 10ετίας:</u> ίδιος με τον σποραδικό καρκίνο του μαστού (<2%)</p>
STK11	<p>Πρωτοπαθής καρκίνος του μαστού</p> <p>Απόλυτος κίνδυνος: 32%–54%</p> <p>Διαχείριση: <u>Προληπτικός έλεγχος:</u> Ετήσια μαστογραφία και μαγνητική τομογραφία μαστού με και χωρίς σκιαγραφικό, ξεκινώντας από την ηλικία των 30 ετών <u>Μείωση κινδύνου:</u> Συζήτηση για την επιλογή της προφυλακτικής μαστεκτομής.</p>
TP53	<p>Πρωτοπαθής καρκίνος του μαστού</p> <p>Απόλυτος κίνδυνος: >60%</p> <p>Διαχείριση: Πίνακας 1.4. Διαχείριση ατόμων με Συνδρόμο Li-Fraumeni</p> <p><u>Συσσωρευτικός κίνδυνος 10ετίας:</u> 18-49%</p>

Πίνακας 1.2. Διαχείριση φορέων παθογόνων παραλλαγών στα γονίδια <i>BRCA</i>	
	Εξέταση/ Διαδικασία και διάστημα παρακολούθησης
Γενικά	Εκπαίδευση σχετικά με σημεία και συμπτώματα καρκίνου.

<p>Καρκίνος Μαστού (Γυναίκες)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Ενημέρωση για τον καρκίνο μαστό από την ηλικία των 18 ετών • Κλινική εξέταση μαστού, κάθε 6–12 μήνες, ξεκινώντας από την ηλικία των 25 ετών • Προληπτικός έλεγχος μαστού <p><u>Ηλικία 25–29 ετών:</u> ετήσια μαγνητική τομογραφία (MRI) μαστού με και χωρίς σκιαγραφικό (ή μαστογραφία, μόνο αν δεν είναι διαθέσιμη η MRI) ή εξατομίκευση με βάση το οικογενειακό ιστορικό αν υπάρχει διάγνωση καρκίνου του μαστού πριν την ηλικία των 30 ετών.</p> <p><u>Ηλικία 30–75 ετών:</u> ετήσια μαστογραφία και μαγνητική τομογραφία (MRI) μαστού με και χωρίς σκιαγραφικό.</p> <p><u>Ηλικία >75 ετών:</u> η διαχείριση θα πρέπει να εξετάζεται εξατομικευμένα</p> <ul style="list-style-type: none"> • Για άτομα με παθογόνο παραλλαγή <i>BRCA</i> που έχουν λάβει θεραπεία για καρκίνο του μαστού και δεν έχουν υποβληθεί σε αμφοτερόπλευρη μαστεκτομή, ο προληπτικός έλεγχος με ετήσια μαστογραφία και μαγνητική τομογραφία (MRI) μαστού πρέπει να συνεχίζεται όπως περιγράφεται παραπάνω • Συζήτηση της επιλογής για προληπτική μαστεκτομή (RRM). • Η συμβουλευτική θα πρέπει να περιλαμβάνει συζήτηση σχετικά με τον βαθμό προστασίας, τις επιλογές αποκατάστασης και τους κινδύνους. Επιπλέον, το οικογενειακό ιστορικό, ο υπολειπόμενος κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του μαστού με την ηλικία, καθώς και το προσδόκιμο ζωής θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά τη διάρκεια της συμβουλευτικής
<p>Καρκίνος Μαστού (Ανδρες)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Εκπαίδευση και ενημέρωση για την αυτοεξέταση μαστού από την ηλικία των 35 ετών. • Κλινική εξέταση μαστού, κάθε 12 μήνες, από την ηλικία των 35 ετών. • Ετήσια μαστογραφία, ειδικά για άτομα με παραλλαγές <i>BRCA2</i> P/LP, όπου ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του μαστού κατά τη διάρκεια της ζωής μπορεί να φτάσει έως και 7%, από την ηλικία των 50 ετών ή 10 χρόνια πριν από την πρώτη γνωστή διάγνωση καρκίνου του μαστού σε άνδρα στην οικογένεια (όποιο από τα δύο συμβεί πρώτο).
<p>Καρκίνοι των Ωοθηκών / Σαλπίνγγων / Περιτοναίου / Μήτρας</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Η συμβουλευτική περιλαμβάνει συζήτηση σχετικά με τις αναπαραγωγικές επιλογές, τον βαθμό προστασίας από τον καρκίνο του μαστού, των ωοθηκών και της μήτρας, τη διαχείριση των συμπτωμάτων της εμμηνόπαυσης, την ορμονική υποκατάσταση και το σχετικό ιατρικό ή χειρουργικό ιστορικό. • Συζήτηση για σαλπινγεκτομή με καθυστερημένη ωοθηκεκτομή, αμφοτερόπλευρη σαλπινγεκτομή ή μη χειρουργικές στρατηγικές μείωσης κινδύνου μπορούν να εφαρμοστούν και σε γονίδια μέτριας διείσδυσης, με προσοχή στον κίνδυνο καρκίνου σχετιζόμενο με την ηλικία για την γνωστή παραλλαγή και το οικογενειακό ιστορικό. <p>Αναπαραγωγικές συστάσεις σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες</p>

- Παραπομπή σε ειδικούς γονιμότητας για συζήτηση σχετικά με τις επιλογές γονιμότητας που σχετίζονται με την ηλικία, τις επιλογές για εξωσωματική γονιμοποίηση, την κρυοσυντήρηση ωαρίων και εμβρύων, καθώς και την εξέταση προεμφυτευτικής γενετικής, την αναδοχή και τη χρήση παρένθετης μητέρας.
- Εάν τα ωάρια/έμβρυα έχουν κρυοσυντηρηθεί, η εγκυμοσύνη μπορεί να επιτευχθεί με την μήτρα στη θέση της, με ή χωρίς σάλπιγγες ή ωοθήκες.
- Άτομα με παθογόνο παραλλαγή *BRCA1* μπορεί να παρουσιάσουν πρόωρη εμμηνόπαυση και γήρανση ωαρίων.

Μη χειρουργική μείωση κινδύνου

- Συνιστάται η συμβουλευτική με γυναικολόγο ογκολόγο ή γυναικολόγο με ειδίκευση/εμπειρία στον κληρονομικό γυναικολογικό καρκίνο.
- Συζήτηση για συνδυασμένη αντισύλληψη με οιστρογόνα/προγεστερόνη, όπως τα από του στόματος αντισυλληπτικά χάπια, για την καταστολή της ωορρηξίας. Γενικά, οι μελέτες σε φορείς παθογόνων παραλλαγών υποστηρίζουν σημαντικά οφέλη στη μείωση του κινδύνου για καρκίνο των ωοθηκών.
- Η ενδομήτρια συσκευή λεβονοργεστρέλης έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τον κίνδυνο για καρκίνο των ωοθηκών στον μέσο κίνδυνο πληθυσμού.

Μείωση Κινδύνου με Αμφοτερόπλευρη Σαλπινγεκτομή και Ωοθηκεκτομή (RRSO)

- Βασισμένο στους κινδύνους που σχετίζονται με την ηλικία για καρκίνο των ωοθηκών/σαλπίγγων:

- **BRCA1:** Συνιστάται η *RRSO* μεταξύ 35 και 40 ετών.
- **BRCA2:** Δεδομένου ότι η εμφάνιση καρκίνου των ωοθηκών σε ασθενείς με παθογόνες παραλλαγές *BRCA2* είναι κατά μέσο όρο 8–10 χρόνια αργότερα σε σχέση με ασθενείς με παραλλαγές *BRCA1*, είναι λογικό να καθυστερηθεί η *RRSO* για τη διαχείριση του κινδύνου καρκίνου των ωοθηκών μέχρι την ηλικία των 40–45 ετών σε ασθενείς με παθογόνες παραλλαγές *BRCA2*, εκτός αν η ηλικία διάγνωσης στην οικογένεια δικαιολογεί νωρίτερα την εξέταση για πρόληπτική χειρουργική επέμβαση.

Σαλπινγεκτομή

- Η σαλπινγεκτομή μειώνει τον κίνδυνο καρκίνου των ωοθηκών στον γενικό πληθυσμό και αποτελεί επιλογή για προεμμηνοπαυσιακές ασθενείς με κληρονομικό κίνδυνο καρκίνου που δεν είναι ακόμη έτοιμες για ωοθηκεκτομή.

- Η ολοκληρωμένη ωθηκεκτομή συνιστάται σύμφωνα με τις ειδικές κατευθυντήριες γραμμές.
- Κλινικές δοκιμές για διαστήματα σαλπινγεκτομής και καθυστερημένης ωθηκεκτομής είναι σε εξέλιξη. Ενδεχόμενη ισχυρή συμμετοχή σε μελέτες επιλογής χειρουργικής εάν είναι διαθέσιμες.

Συζήτηση για Υστερεκτομή

- Περιορισμένα δεδομένα υποδηλώνουν ότι μπορεί να υπάρχει ελαφρώς αυξημένος κίνδυνος καρκίνου της μήτρας τύπου σεροειδούς μεταξύ ατόμων με παθολόγο παραλλαγή *BRCA1/2*. Η κλινική σημασία αυτών των ευρημάτων δεν είναι σαφής.
- Άτομα που υποβάλλονται σε υστερεκτομή κατά την διάρκεια της RRSO είναι υποψήφιοι για θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης (HRT) μόνο με οιστρογόνα, η οποία σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο καρκίνου του μαστού σε σύγκριση με τη συνδυασμένη θεραπεία με οιστρογόνα και προγεστερόνη, η οποία θα απαιτείται εάν η μήτρα παραμείνει στη θέση της.

Επιλογές Ορμονικής Υποκατάστασης μετά από Χειρουργική Μείωση Κινδύνου

- Σε συνεργασία με γυναικολόγο ή άλλο εξειδικευμένο επαγγελματία υγειονομικής περίθαλψης με εμπειρία στη διαχείριση της εμμηνόπαυσης:
Οι συστάσεις για την ορμονική υποκατάσταση (HRT) θα πρέπει να προσαρμόζονται ανάλογα με το προσωπικό ιστορικό της κάθε ασθενούς για καρκίνο του μαστού και/ή στρατηγικές μείωσης του κινδύνου καρκίνου του μαστού.
Η HRT είναι μια σημαντική παράμετρος για προεμμηνόπαυσιακές ασθενείς που δεν φέρουν διάγνωση καρκίνου του μαστού ή δεν έχουν άλλες αντενδείξεις για HRT.
Η πρόωρη εμμηνόπαυση λόγω RRSO μπορεί να προκαλέσει επιπτώσεις στην υγεία των οστών, την καρδιαγγειακή υγεία, την ψυχοκοινωνική υγεία, τη νευρολογική υγεία, τη σεξουαλική υγεία και τις γενικευμένες πτυχές ποιότητας ζωής. Η HRT μπορεί να μειώσει αυτούς τους κινδύνους.

Πίνακας 1.3. Διαχείριση ατόμων με Σύνδρομο Cowden (Cowden Syndrome - CS)	
Γενικά	<ul style="list-style-type: none"> • Λόγω της σπανιότητας του συνδρόμου και των πολυπλοκοτήτων στη διάγνωση και διαχείριση ατόμων με CS, συνιστάται η παραπομπή σε εξειδικευμένη ομάδα ή κέντρα με εμπειρία. • Ετήσια Εξέταση: Ξεκινά από την ηλικία των 18 ετών ή 5 χρόνια πριν από την πιο νεαρή ηλικία διάγνωσης ενός καρκίνου που σχετίζεται με το σύνδρομο στην οικογένεια (όποιο έρθει πρώτο), με ιδιαίτερη προσοχή στην εξέταση του θυρεοειδούς.
Καρκίνος Μαστού (Γυναίκες)	<ul style="list-style-type: none"> • Κλινική Εξέταση Μαστού: Κάθε 6–12 μήνες, ξεκινώντας από την ηλικία των 25 ετών ή 5–10 χρόνια πριν από τον πιο πρώιμο γνωστό καρκίνο του μαστού στην οικογένεια (όποιο έρθει πρώτο). • Προληπτικός Έλεγχος Μαστού: Ετήσια μαστογραφία και μαγνητική τομογραφία μαστού με και χωρίς σκιαγραφικό, ξεκινώντας από την ηλικία των 30 ετών ή 10 χρόνια πριν από τον πιο πρώιμο γνωστό καρκίνο του μαστού στην οικογένεια (όποιο έρθει πρώτο). Για άτομα άνω των 75 ετών, η διαχείριση θα πρέπει να εξετάζεται σε ατομική βάση. • Συνέχιση Ελέγχου: Για άτομα με παθογόνο παραλλαγή <i>PTEN</i> που υποβάλλονται σε θεραπεία για καρκίνο του μαστού και δεν έχουν υποβληθεί σε διπλή μαστεκτομή, συνιστάται η προληπτική εξέταση με ετήσια μαστογραφία και μαγνητική τομογραφία. • Συζήτηση επιλογής προληπτικής μαστεκτομής (RRM) για άτομα με παθογόνο παραλλαγή. Για εκείνους με κλινικό σύνδρομο Cowden η εξέταση της προληπτικής χειρουργικής θα πρέπει να βασίζεται στο οικογενειακό ιστορικό.
Καρκίνος Εντέρου	<ul style="list-style-type: none"> • Κολonosκόπηση: Ξεκινά από την ηλικία των 35 ετών, εκτός εάν υπάρχουν συμπτώματα ή αν υπάρχει κοντινός συγγενής με καρκίνο του παχέος εντέρου πριν από την ηλικία των 40 ετών. Σε αυτή την περίπτωση, η κολonosκόπηση θα πρέπει να αρχίζει 5–10 χρόνια πριν από την πιο πρώιμη γνωστή διάγνωση στην οικογένεια. • Συχνότητα Εξέτασης: Η κολonosκόπηση θα πρέπει να γίνεται κάθε 5 χρόνια ή πιο συχνά αν ο ασθενής παρουσιάζει συμπτώματα ή αν βρεθούν πολύποδες.
Καρκίνος Ενδομητρίου	<ul style="list-style-type: none"> • Έλεγχος για καρκίνο του ενδομητρίου από την ηλικία των 35 ετών. • Εκπαίδευση των ασθενών και την άμεση αντίδραση σε συμπτώματα, όπως ανώμαλη αιμορραγία. Συνιστάται οι ασθενείς να διατηρούν ημερολόγιο για να εντοπίζουν ανωμαλίες στον κύκλο τους. • Σημασία Συμπτωμάτων: Δεδομένου ότι ο καρκίνος του ενδομητρίου μπορεί συχνά να ανιχνευθεί νωρίς με βάση τα συμπτώματα, οι ασθενείς θα πρέπει να κατανοήσουν τη

	<p>σημασία της άμεσης αναφοράς και αξιολόγησης οποιασδήποτε ανώμαλης αιμορραγίας της μήτρας ή μετα-μηνοπαυσιακής αιμορραγίας. Η αξιολόγηση αυτών των συμπτωμάτων θα πρέπει να περιλαμβάνει βιοψία ενδομητρίου.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Συχνότητα Ελέγχου: Ο έλεγχος για καρκίνο του ενδομητρίου δεν έχει αποδειχθεί ότι προσφέρει οφέλη σε άτομα με σύνδρομο Cowden. Ωστόσο, η βιοψία ενδομητρίου είναι και πολύ ευαίσθητη και πολύ ειδική ως διαγνωστική διαδικασία. Μπορεί να εξεταστεί ο έλεγχος μέσω βιοψίας ενδομητρίου κάθε 1 έως 2 χρόνια. • Διαγνωστικός Έλεγχος με Υπερηχογράφημα: Ο διαγνωστικός έλεγχος με διακολπικό υπερηχογράφημα για καρκίνο του ενδομητρίου σε μετα-μηνοπαυσιακά άτομα δεν έχει αποδειχθεί ότι είναι επαρκώς ευαίσθητος ή ειδικός για να υποστηρίξει μια θετική σύσταση, αλλά μπορεί να εξεταστεί κατά την κρίση του κλινικού. Το διακολπικό υπερηχογράφημα δεν συνιστάται ως εργαλείο ελέγχου σε προμηνοπαυσιακά άτομα λόγω της ευρείας ποικιλίας πάχους της ενδομητρικής στιβάδας κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού εμμηνορροϊκού κύκλου. • Συζήτηση για Υστερεκτομή: Συζήτηση για υστερεκτομή μετά την ολοκλήρωση του οικογενειακού προγραμματισμού. Ο κίνδυνος καρκίνου των ωοθηκών δεν είναι αυξημένος· επομένως, οι ωοθήκες μπορούν να παραμείνουν στη θέση τους.
Καρκίνος Νεφρών	<ul style="list-style-type: none"> • Έναρξη Ελέγχου: υπέρηχος νεφρών από την ηλικία των 40 ετών. • Συχνότητα Ελέγχου: Ο υπέρηχος θα πρέπει να επαναλαμβάνεται κάθε 1–2 χρόνια.
Νευρολογικά	<ul style="list-style-type: none"> • Αξιολόγηση Ψυχοκινητικών Δεξιοτήτων: ψυχοκινητική αξιολόγηση • Μαγνητική Τομογραφία Εγκεφάλου: Μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου εάν υπάρχουν συμπτώματα.
Δέρμα	<ul style="list-style-type: none"> • Αυξημένος Κίνδυνος Μελανώματος: Υπάρχει πιθανότητα αυξημένου κινδύνου μελανώματος • Συχνότητα Εξετάσεων: Συνιστώνται ετήσιες δερματολογικές εξετάσεις.
Θυρεοειδής	<ul style="list-style-type: none"> • Έναρξη Ελέγχου: Ετήσιος υπέρηχος του θυρεοειδούς από την ηλικία των 7 ετών.

Πίνακας 1.4. Διαχείριση ατόμων με Συνδρόμο Li-Fraumeni	
Καρκίνος Μαστού (Γυναίκες))	<p>Συστάσεις για Υγειονομική Φροντίδα και Πρόληψη Καρκίνου του Μαστού</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ενημέρωση για τον Μαστό: Ξεκινά από την ηλικία των 18 ετών. • Κλινική εξέταση μαστού: Κάθε 6–12 μήνες από την ηλικία των 20 ετών. • Προληπτικός έλεγχος μαστού: <u>Ηλικία 20–29 ετών:</u> Ετήσιος έλεγχος με μαγνητική τομογραφία μαστού (MRI) με και χωρίς σκιαγραφικό. <u>Ηλικία 30–75 ετών:</u> Ετήσιος έλεγχος με μαγνητική τομογραφία μαστού (MRI) με και χωρίς σκιαγραφικό και μαστογραφία. <u>Ηλικία >75 ετών:</u> Η διαχείριση θα πρέπει να εξετάζεται σε ατομική βάση. Για άτομα με παθογόνο παραλλαγή <i>TP53</i> που υποβάλλονται σε θεραπεία για καρκίνο του μαστού και δεν έχουν υποβληθεί σε διπλή μαστεκτομή, η παρακολούθηση με ετήσια μαγνητική τομογραφία μαστού (MRI) και μαστογραφία θα πρέπει να συνεχίζεται όπως περιγράφεται παραπάνω. <p>Συζήτηση σχετικά με την επιλογή Μαστεκτομή: Η συμβουλευτική θα πρέπει να περιλαμβάνει συζήτηση σχετικά με τον βαθμό προστασίας, τις επιλογές αποκατάστασης και τους κινδύνους. Επιπλέον, θα πρέπει να ληφθούν υπόψη το οικογενειακό ιστορικό και ο υπολειπόμενος κίνδυνος καρκίνου του μαστού με την ηλικία και την προσδόκιμη ζωή κατά τη διάρκεια της συμβουλευτικής.</p>
Κίνδυνος για άλλους τύπους καρκίνου	<ul style="list-style-type: none"> • Ολοκληρωμένη εξέταση: Συμπεριλαμβανομένης της νευρολογικής εξέτασης, με υψηλό δείκτη υποψίας για σπάνιες καρκινικές παθήσεις και δευτερογενείς κακοήθειες σε επιζώντες από καρκίνο κάθε 6–12 μήνες. • Κολοноσκόπηση και άνω γαστρεντερική ενδοσκόπηση: Κάθε 2–5 χρόνια, ξεκινώντας από την ηλικία των 25 ετών ή 5 χρόνια πριν από τον πιο πρώιμο γνωστό καρκίνο του παχέος εντέρου ή του στομάχου στην οικογένεια, αντίστοιχα. Για ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε θεραπευτική ακτινοβολία σε όλο το σώμα ή στην κοιλιακή χώρα, συνιστάται η κολοноσκόπηση 5 χρόνια μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας της νόσου. • Ετήσια δερματολογική εξέταση: Ξεκινά από την ηλικία των 18 ετών. • Ετήσια μαγνητική τομογραφία σώματος. • Ετήσια μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου: Μπορεί να εκτελείται ως μέρος της ετήσιας μαγνητικής τομογραφίας σώματος ή ως ξεχωριστή εξέταση. • Ετήσια εξέταση ειδικού προστατικού αντιγόνου (PSA): Ξεκινώντας από την ηλικία των 40 ετών για πρώιμη ανίχνευση καρκίνου του προστάτη.

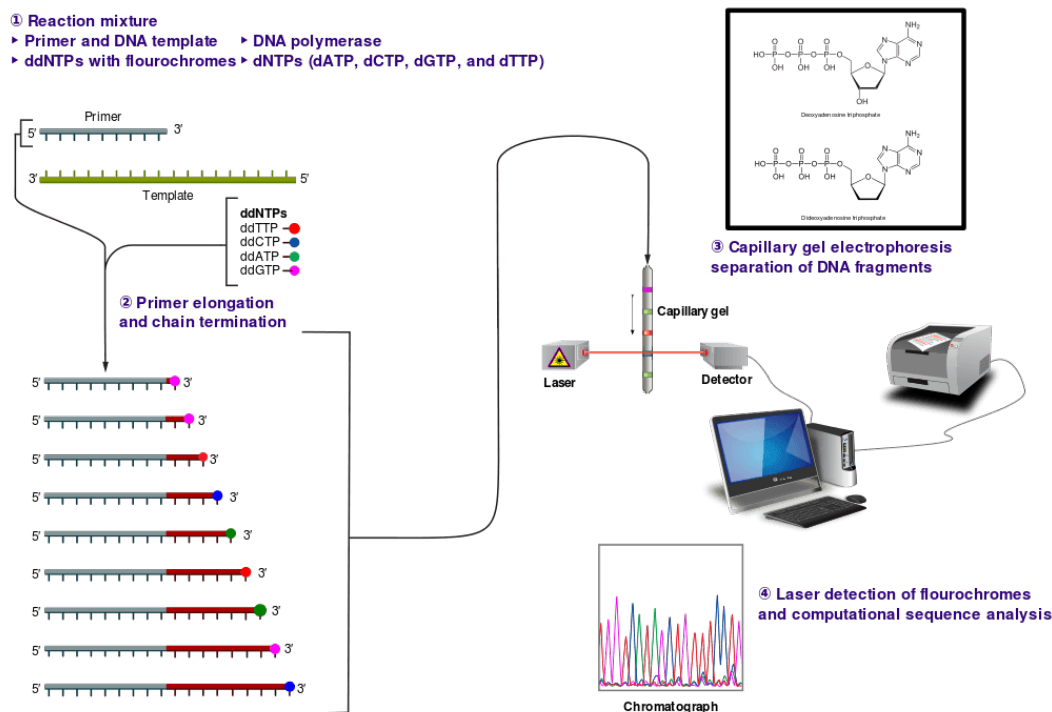
<p>Συστάσεις για την Προληπτική Εξέταση και Διαχείριση του Συνδρόμου Li-Fraumeni</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Η προληπτική εξέταση και διαχείριση του LFS είναι πολύπλοκες και το σύνδρομο είναι σπάνιο. Προτιμάται οι ασθενείς με LFS να παρακολουθούνται σε κέντρα που έχουν εμπειρία στη διαχείριση αυτού του συνδρόμου. • Συνεχιζόμενος Έλεγχος: Λόγω του σημαντικού κινδύνου για πρόσθετους πρωτογενείς νεοπλασματικούς σχηματισμούς, θα πρέπει να εξετάζεται η προληπτική εξέταση για τους επιζώντες από καρκίνο με LFS και καλή πρόγνωση από τους προηγούμενους όγκους τους. • Ενημέρωση Παιδιάτρων: Οι παιδίατροι θα πρέπει να ενημερωθούν για τον κίνδυνο παιδικών καρκίνων σε οικογένειες με παθολόγο παραλλαγή στο TP53 γονίδιο και να επανεξετάσουν τις συστάσεις προληπτικού ελέγχου για παιδιά με LFS. • Ακτινοθεραπεία: Η θεραπευτική ακτινοβολία για καρκίνο θα πρέπει να αποφεύγεται όταν είναι δυνατόν, εκτός εάν η τοπική ή περιφερειακή μείωση κινδύνου ή η συνολική επιβίωση από την ακτινοβολία είναι μεγαλύτερες από τον κίνδυνο εμφάνισης δευτερογενών κακοθειών. Η διαγνωστική ακτινοβολία θα πρέπει να περιορίζεται στο μέγιστο δυνατό χωρίς να θυσιάζεται η ακρίβεια. • Προτιμώμενη Θεραπεία: Για ασθενείς που διαγιγνώσκονται με καρκίνο του μαστού, η μαστεκτομή προτιμάται από την τομή όγκου και την ακτινοβολία, προκειμένου να μειωθεί ο κίνδυνος σαρκώματος που προκαλείται από την ακτινοβολία. • Ιστορικό Καρκίνου: Οι συστάσεις για προληπτικό έλεγχο θα πρέπει να λαμβάνουν υπόψη το προσωπικό και οικογενειακό ιστορικό καρκίνου (5–10 χρόνια πριν από την πρώτη διάγνωση). Παρέχετε πρόσθετη παρακολούθηση βάσει του οικογενειακού ιστορικού καρκίνου.
--	---

1.2 Αλληλούχηση επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing – NGS)

Η ανάπτυξη των τεχνικών αλληλούχησης του DNA τις προηγούμενες δεκαετίες σηματοδότησε την αρχή μιας νέας εποχής στη βιολογική έρευνα, με αποτέλεσμα τον εμπλουτισμό των γνώσεων για τα γονίδια όπως της δομής, της λειτουργίας, της ρύθμισης και της εξέλιξής τους [15]. Η επανάσταση στις τεχνικές αλληλούχησης νουκλεϊκών οξέων ξεκίνησε από τον Sanger το 1975, ο οποίος κατάφερε να προσδιορίσει μεγάλο τμήμα της αλληλουχίας του γονιδιώματος (μεγέθους 5.386 bp) του μικρού φάγου φΧ174 [16]. Η μέθοδος που χρησιμοποίησε, γνωστή ως Μέθοδος Τερματισμού Αλυσίδας ή τεχνική «Διδεοξυνουκλεοτιδίου», παραμένει μέχρι σήμερα γνωστή ως «Αλληλούχηση κατά Sanger». Στη συγκεκριμένη μέθοδο, τα μόρια DNA επισημαίνονται σε ένα άκρο τους και στη συνέχεια χωρίζονται σε τέσσερις ξεχωριστές αντιδράσεις. Μετά από ειδική επεξεργασία, τα θραύσματα διαχωρίζονται μέσω ηλεκτροφόρησης σε πολυακρυλαμιδικό πήκτωμα και ανιχνεύονται μέσω αυτοραδιογραφίας. Το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι στο πολυακρυλαμιδικό πήκτωμα, εκτός από τα νουκλεοτίδια της πρότυπης αλληλουχίας, εμφανίζονται και ομοπολυμερή, καθιστώντας την μέθοδο λιγότερο αξιόπιστη για μεγάλες αλληλουχίες.

Η τεχνική αυτή έχει υποστεί σημαντικές τροποποιήσεις με κύριο στόχο την αυτοματοποίηση και τη βιομηχανοποίησή της. Στη σύγχρονη μορφή της, γνωστή ως τριχοειδική αλληλούχηση κατά Sanger (Capillary Sanger Sequencing), οι εκκινητές επισημαίνονται με φθορίζουσες ουσίες αντί για ραδιενεργά στοιχεία. Οι χρωστικές περιλαμβάνουν μια χρωστική δότη (φλουορεσκεΐνη) συνδεδεμένη με μια χρωστική δέκτη (διχλωροροδαμίνη) μέσω ενός συνδέτη αμινοβενζοϊκού οξέος. Υπάρχουν τέσσερις διαφορετικές χρωστικές δέκτη, καθεμία με διαφορετικό φάσμα εκπομπής, που συνδέονται με συγκεκριμένα διδεοξυνουκλεοτίδια. Η ανίχνευση του σήματος γίνεται με ειδικό laser και το σύστημα ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιεί τριχοειδή σωληνάρια. Το laser κατευθύνεται

κατά μήκος των τριχοειδών, με αποτέλεσμα τα σημασμένα ddNTPs να απορροφούν και να εκπέμπουν φως σε μεγαλύτερο μήκος κύματος. Με κατάλληλο λογισμικό μετατρέπει αυτά τα δεδομένα στις τέσσερις χρωστικές, επιτρέποντας την ανάλυση της πρωτοταγούς δομής. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε χρωματογράφημα που απαιτεί εξειδικευμένο λογισμικό για την ανάλυσή του (Εικόνα 1.7) [17].



Εικόνα 1.7. Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου αλληλούχησης κατά Sanger.

Παρά τα σημαντικά οφέλη και την πρόοδο που έφερε η μέθοδος Sanger, παρουσίασε αρκετούς περιορισμούς. Αυτοί περιλάμβαναν το υψηλό κόστος, το μεγάλο χρόνο που απαιτούνταν για την ανάλυση και την περιορισμένη δυνατότητα ανάγνωσης μεγάλων αλληλουχιών DNA σε σύντομο διάστημα. Αυτοί οι παράγοντες οδήγησαν στην ανάγκη για μια νέα, βελτιωμένη τεχνολογία, ικανή να αλληλουχίσει πολλά ανθρώπινα γονιδιώματα ταυτόχρονα, με μεγαλύτερη ταχύτητα και χαμηλότερο κόστος.

Αυτή η ανάγκη οδήγησε στην ανάπτυξη των μεθόδων της «Νέας Γενιάς Αλληλούχησης» (Next Generation Sequencing-NGS). Οι τεχνολογίες NGS εισήγαγαν καινοτόμες αλλαγές στην αλληλούχηση του DNA, επιτρέποντας την ταυτόχρονη ανάλυση εκατομμυρίων μορίων DNA, με αποτέλεσμα την εκθετική αύξηση των παραγόμενων και αναλυόμενων δεδομένων [18].

Η θεμελιώδης αρχή της αλληλούχησης τόσο στη μέθοδο Sanger όσο και στο NGS είναι παρόμοια, με την κύρια διαφορά να εντοπίζεται στην κλίμακα και την ταχύτητα της διαδικασίας. Και οι δύο τεχνικές βασίζονται στην ανίχνευση των βάσεων ενός μικρού τμήματος DNA μέσω των σημάτων που παράγονται κατά την επανασύνθεση του DNA από ένα πρότυπο τμήμα. Παρόλα αυτά, η μέθοδος Sanger μπορεί να αλληλουχίσει ένα ή λίγα τμήματα DNA κάθε φορά, ενώ το NGS επιτρέπει την ταυτόχρονη αλληλούχηση εκατομμυρίων θραυσμάτων DNA.

Τις τελευταίες δεκαετίες, έχουν αναπτυχθεί διαφορετικές τεχνολογίες αλληλούχησης για τον προσδιορισμό πολλών περιοχών του γονιδιώματος ή και ακόμα ολόκληρου του γονιδιώματος. Το NGS, επιτρέπει την ανάλυση εκατοντάδων τμημάτων DNA στον ίδιο χρόνο, είναι γνωστή ως Μαζική Παράλληλη Αλληλούχηση και αναφέρεται σε συλλογή τεχνολογιών προσδιορισμού αλληλουχιών [19].

Το NGS χρησιμοποιεί διαχωρισμό βάση θέσης, δηλαδή εκατομμύρια διαφορετικά τμήματα DNA προσδένονται σταθερά σε συγκεκριμένες θέσεις σε ειδική επιφάνεια. Σε κάθε τμήμα ο συμπληρωματικός κλώνος συντίθεται χρησιμοποιώντας τις τροποποιημένες βάσεις, οι οποίες ανιχνεύονται από μια πηγή, που αναγνωρίζει τη θέση του κάθε κλώνου στην επιφάνεια και την ένταση σήματος που αυτό δίνει. Στη συνέχεια, κάτι που συμβαίνει μόνο στο NGS, τα τροποποιημένα νουκλεοτίδια που έχουν προστεθεί μετατρέπονται σε απλά νουκλεοτίδια με ενζυμική επεξεργασία, επιτρέποντας την περαιτέρω επέκταση. Αυτό οδηγεί σε πολλαπλούς κύκλους επέκτασης και απεικόνισης σε σύντομο χρόνο, με τελικό

αποτέλεσμα μια ακολουθία νουκλεοτιδίων συγκεκριμένου μήκους που ονομάζεται «διάβασμα» (read) [20].

1.2.1. Εφαρμογή του NGS στην κλινική πράξη

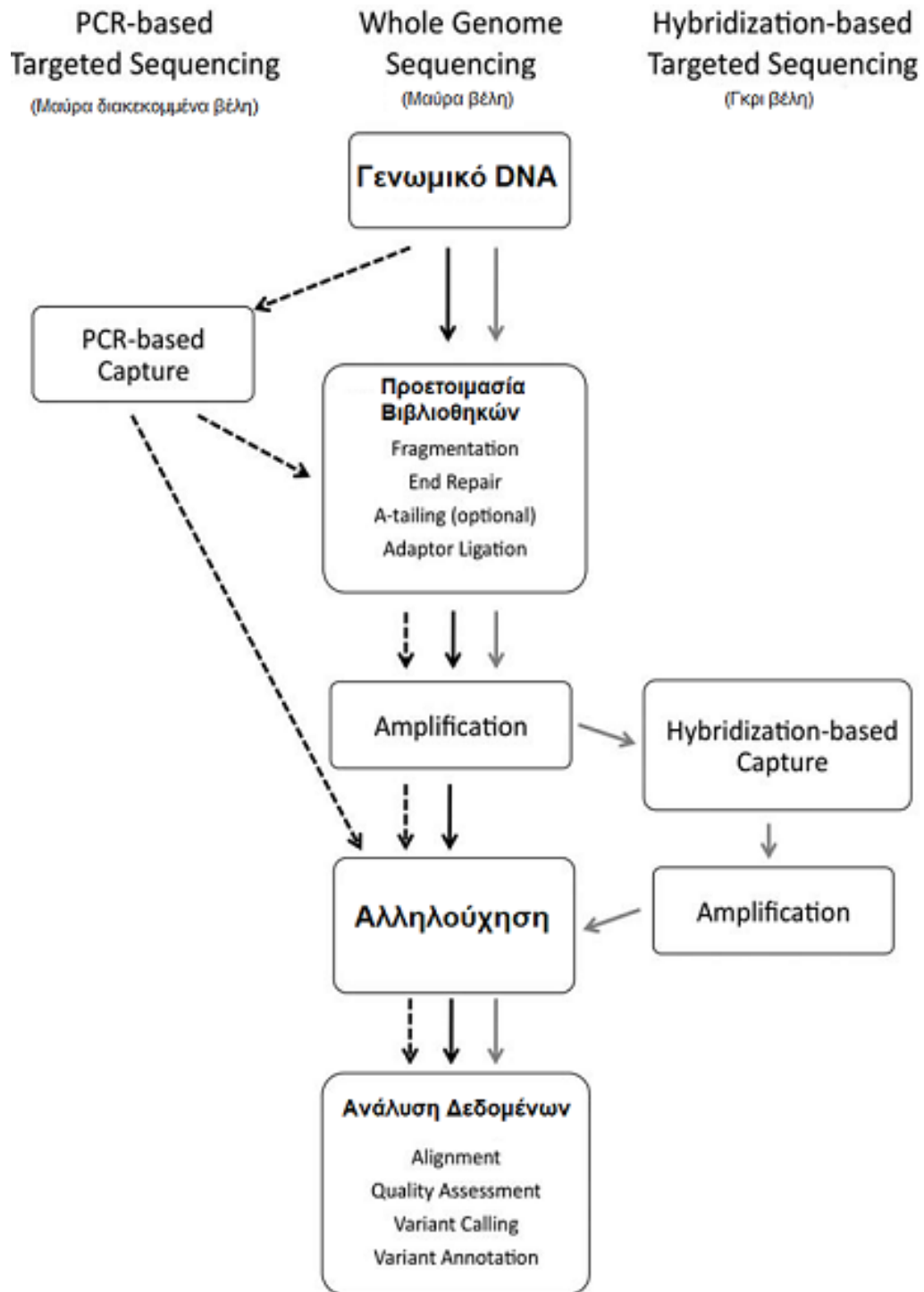
Από την ανακάλυψη των μεθόδων γονιδιωματικής αλληλούχησης έως σήμερα, έχει σημειωθεί εντυπωσιακή πρόοδος όχι μόνο στην έρευνα, αλλά και στην κλινική εφαρμογή αυτών των τεχνολογιών. Αυτή η πρόοδος επιτρέπει την παροχή εξατομικευμένων πληροφοριών που βοηθούν τον ασθενή, τόσο στην ανάπτυξη ενός θεραπευτικού πλάνου προσαρμοσμένου στις δικές του ανάγκες, όσο και σε θέματα συμβουλευτικής και οικογενειακού προγραμματισμού για τον ίδιο και την οικογένειά του. Η γενετική διάγνωση στην κλινική απαιτεί την τήρηση των υψηλότερων προτύπων και την αξιοποίηση προηγμένων τεχνολογιών. Ο τομέας της βιοπληροφορικής παίζει κρίσιμο ρόλο, με την ανάπτυξη κατάλληλων αναλυτικών οδηγιών εργασιών (pipelines) και τη διασφάλιση ποιότητας μέσω των υπολογιστικών εργαλείων που χρησιμοποιούνται [21]. Η ροή εργασίας για την εφαρμογή NGS στην κλινική πράξη περιλαμβάνει τρεις κύριες φάσεις: **A.** την προ-αναλυτική φάση, **B.** την αναλυτική φάση και **Γ.** την μετά-αναλυτική φάση (Εικόνα 1.8).

Εικόνα 1.8. Ροή εργασίας για την εφαρμογή NGS στην κλινική πράξη.



Η προαναλυτική φάση περιλαμβάνει τη συλλογή πληροφοριών από τον κλινικό ιατρό ή/και γενετιστή για το οικογενειακό ιστορικό του ασθενούς και τη λεπτομερή αξιολόγηση του φαινοτύπου, τον καθορισμό των ενδείξεων για τη χρήση της συγκεκριμένης ανάλυσης, την επιλογή του κατάλληλου τύπου δοκιμασίας, τη λήψη δείγματος για την απομόνωση γενετικού υλικού, την ενημέρωση του ασθενούς και τη λήψη της συγκατάθεσής του. Επίσης, ένα κρίσιμο κομμάτι αυτής της φάσης είναι η παροχή γενετικής συμβουλευτικής στον ασθενή πριν από την εξέταση, καλύπτοντας όλες τις παραμέτρους και τους περιορισμούς της, καθώς και η λήψη ενημερωμένης συγκατάθεσης. Η καταγραφή του οικογενειακού ιστορικού πρέπει να είναι αναλυτική, ώστε να εκτιμηθεί εάν υπάρχουν παρόμοιοι φαινότυποι σε άλλα μέλη της οικογένειας και να αξιολογηθεί το μοτίβο κληρονομικότητας [22].

Η αναλυτική φάση της διαδικασίας NGS στην κλινική πράξη περιλαμβάνει διάφορα εργαστηριακά στάδια, όπως η προετοιμασία του δείγματος, η δημιουργία βιβλιοθήκης, ο εμπλουτισμός του στόχου και η διαδικασία αλληλούχησης. Επιπλέον, περιλαμβάνει τρία επίπεδα ανάλυσης δεδομένων: την πρωτοβάθμια ανάλυση, τη δευτεροβάθμια ανάλυση και την τριτοβάθμια ανάλυση, καθώς και την κατηγοριοποίηση των παραλλαγών που εντοπίστηκαν (Εικόνα 1.9).



Εικόνα 1.9. Η αλληλούχηση επόμενης γενεάς (NGS) περιλαμβάνει τρία κύρια στοιχεία: προετοιμασία δείγματος, αλληλούχηση και ανάλυση δεδομένων.

Η εργαστηριακή επεξεργασία του δείγματος ξεκινά με την απομόνωση του γενετικού υλικού, τον καθορισμό της σωστής ποσότητας και την εξασφάλιση της απαιτούμενης ποιότητας. Στη συνέχεια, για την κατασκευή της βιβλιοθήκης, παράγονται θραύσματα DNA συγκεκριμένου μεγέθους μέσω ενζυμικής επεξεργασίας ή υπερήχων, και προστίθενται προσαρμογείς (adaptors) στα άκρα τους. Αυτοί οι προσαρμογείς είναι ειδικές αλληλουχίες που είναι συμπληρωματικές με τους εκκινητές PCR και την αλληλούχιση. Επιπλέον, κάθε δείγμα επισημαίνεται (barcoding) με μοναδικές αλληλουχίες 3-5 βάσεων (tags), επιτρέποντας την ανάμειξη (pooling) των δειγμάτων, μειώνοντας έτσι το κόστος της ανάλυσης [23].

Στις περισσότερες πλατφόρμες αλληλούχισης, απαιτείται εμπλουτισμός των δειγμάτων πριν από τη διαδικασία αλληλούχισης, για την ενίσχυση του στόχου (όπως επιλεγμένα γονίδια ή σύνολα εξωνίων). Οι μέθοδοι εμπλουτισμού βασίζονται είτε στην PCR είτε στον υβριδισμό. Οι σύγχρονες τεχνολογίες αλληλούχισης εκμεταλλεύονται την ικανότητα εκτέλεσης πολλαπλών χημικών αντιδράσεων ταυτόχρονα. Αυτές οι αντιδράσεις επιτρέπουν την αλληλούχιση είτε μέσω σύνθεσης είτε μέσω σύνδεσης με αντίστροφους τερματιστές, την επιλογή σφαιριδίων ή την ανίχνευση ιόντων. Κάθε πλατφόρμα έχει συγκεκριμένες παραμέτρους που σχετίζονται με τις ανάγκες του εργαστηρίου, όπως το κόστος του εξοπλισμού και των αναλωσίμων, τη διάρκεια της αντίδρασης, το μέγεθος των παραγόμενων αλληλουχιών και το κόστος ανά δείγμα [24]. Η αλληλούχιση του γονιδιώματος αποτελεί μόνο το πρώτο βήμα στη διαδικασία μετατροπής ενός δείγματος DNA σε χρήσιμη γενετική πληροφορία.

Το επόμενο βήμα στη συλλογή, ανάλυση και αποθήκευση των δεδομένων περιλαμβάνει τη χρήση διάφορων υπολογιστικών μεθόδων για τη μετατροπή των αρχικών δεδομένων σε πληροφορίες αλληλουχίας, καθώς και την εφαρμογή τεχνικών βιοπληροφορικής για την ερμηνεία αυτής της αλληλουχίας. Η τεράστια ποσότητα δεδομένων που παράγεται από τις τεχνολογίες NGS έχει μεταφέρει το βάρος της εργασίας

από τον πάγκο και την προετοιμασία του δείγματος στον υπολογιστή και την ανάλυση των δεδομένων. Με την πρόοδο των τεχνολογιών αλληλούχισης, είναι επίσης αναγκαία η παράλληλη ανάπτυξη κατάλληλων βιοπληροφορικών εργαλείων για την αποτελεσματική κλινική ερμηνεία των γενωμικών πληροφοριών [25].

Το πρώτο επίπεδο ανάλυσης, η πρωτοβάθμια ανάλυση, αφορά την ταυτοποίηση ενός συγκεκριμένου νουκλεοτιδίου σε μια καθορισμένη θέση της παραγόμενης αλληλουχίας (base calling). Αυτή η ανάλυση εκτελείται αυτόματα από την πλατφόρμα αλληλούχισης, χωρίς εξωτερική παρέμβαση. Στο δεύτερο επίπεδο ανάλυσης, τη δευτεροβάθμια ανάλυση, περιλαμβάνεται η ευθυγράμμιση των παραγόμενων αλληλουχιών (reads) με την αλληλουχία του γονιδιώματος αναφοράς, είτε το GRCh37 είτε την πιο πρόσφατη έκδοση GRCh38 (read alignment/mapping), και η ανίχνευση των παραλλαγών που προκύπτουν σε σχέση με το γονιδίωμα αναφοράς (variant calling). Αυτές οι παραλλαγές καταγράφονται σε ένα αρχείο VCF (Variant Call Format), το οποίο στη συνέχεια επεξεργάζεται το επόμενο επίπεδο ανάλυσης. Στο τρίτο επίπεδο ανάλυσης, την τριτοβάθμια ανάλυση, γίνεται η ταυτοποίηση των παραλλαγών από τη δευτεροβάθμια ανάλυση, προσθέτοντας πληροφορίες για τη χρωμοσωμική θέση, το γονίδιο, το εξόνιο που εντοπίζονται, το είδος της παραλλαγής, την επίπτωση στην πρωτεΐνη και άλλες σχετικές βιβλιογραφικές πληροφορίες (variant analysis/annotation) [26].

Το τελικό στάδιο της αναλυτικής φάσης περιλαμβάνει την κατηγοριοποίηση των παραλλαγών (variant interpretation). Σύμφωνα με τις πιο πρόσφατες οδηγίες, εφαρμόζεται ένα σύστημα ταξινόμησης πέντε κλάσεων (μη παθογόνα, πιθανώς μη παθογόνα, αδιευκρίνιστης κλινικής σημασίας (VUS), πιθανώς παθογόνα και παθογόνα ευρήματα) [27] (Εικόνα 1.10). Είναι σημαντικό να γίνει διάκριση μεταξύ των παραλλαγών και να αξιολογηθεί αν είναι επιβλαβείς για την ερμηνεία του κλινικού αποτελέσματος. Οι μη παθογόνες παραλλαγές πιθανότατα δεν θα εξεταστούν περαιτέρω. Αντιθέτως, οι

παραλλαγές που συνδέονται με το φαινότυπο θα υποβληθούν σε λεπτομερή αξιολόγηση και ερμηνεία στη μετα-αναλυτική φάση.



Εικόνα 1.10. Ταξινόμηση των παραλλαγών που προκύπτουν από το NGS.

Η μετα-αναλυτική φάση αρχίζει με την αξιολόγηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων από την αναλυτική φάση και ολοκληρώνεται με τη σύνταξη της αναφοράς και την παράδοσή της στον ασθενή, συνοδευόμενη από γενετική συμβουλευτική. Τα αποτελέσματα από την αναλυτική φάση μπορούν να διαφέρουν σημαντικά. Σε ορισμένες περιπτώσεις, μια μόνο παραλλαγή μπορεί να θεωρηθεί η πιθανή αιτία της νόσου, ενώ σε άλλες ενδέχεται να εντοπιστούν πολλές υποψήφια παραλλαγές που απαιτούν αξιολόγηση. Υπάρχουν επίσης περιπτώσεις όπου δεν εντοπίζονται υπεύθυνες παραλλαγές. Οι δύο κύριες εκτιμήσεις για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων είναι η αναλυτική εγκυρότητα και η κλινική εγκυρότητα. Η αναλυτική εγκυρότητα αξιολογεί την πιθανότητα ότι ο ασθενής έχει πράγματι το γονότυπο που εμφανίζεται στα αποτελέσματα, ενώ η κλινική εγκυρότητα είναι πιο σύνθετη και αφορά την επιβεβαίωση ότι μια

συγκεκριμένη ασθένεια προκαλείται από παραλλαγές σε ένα συγκεκριμένο γονίδιο και ότι η παραλλαγή που ανιχνεύθηκε είναι πράγματι παθογόνος [28].

Τα θετικά ευρήματα είναι εξαιρετικά ακριβή (αληθώς θετικά), ωστόσο, υπάρχουν επίσης αρκετά ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα που εξαρτώνται από την περιοχή του γονιδιώματος που εξετάζεται. Αξιοσημείωτο είναι ότι πολλά εργαστήρια επιβεβαιώνουν τα θετικά αποτελέσματα χρησιμοποιώντας καθιερωμένες μεθόδους αναφοράς, όπως η αλληλούχηση κατά Sanger [26].

Τέλος, τα αποτελέσματα της αλληλούχησης επόμενης γενιάς που εφαρμόζεται στην κλινική πράξη παραδίδονται στον ασθενή μετά από γενετική συμβουλευτική και καθοδήγηση. Σε αυτό το στάδιο, ο ασθενής ενημερώνεται για την φύση των αποτελεσμάτων, την ερμηνεία τους, τις πιθανές θεραπευτικές επιλογές και τις αναπαραγωγικές επιλογές για την απόκτηση μελλοντικού παιδιού [28].

1.3 Αλληλούχηση των εξωνίων του γονιδιώματος (Whole Exome Sequencing - WES)

Η αλληλούχηση των εξωνίων του γονιδιώματος (WES) έχει επιφέρει σημαντική πρόοδο στον τομέα της βιολογίας και της ιατρικής, διευρύνοντας τόσο τα αποτελέσματα όσο και τις κλινικές εφαρμογές. Η ταυτοποίηση γονιδίων που σχετίζονται με μια ασθένεια γίνεται πιο αποδοτικά μέσω των τεχνολογιών αλληλούχησης επόμενης γενιάς. Αυτές οι στρατηγικές μπορούν να εφαρμοστούν στη διάγνωση ανάλογα με τον τύπο της ασθένειας και τις διαθέσιμες πληροφορίες [29].

Το WES έχει ποικίλες εφαρμογές όπως στη διάγνωση γενετικών νοσημάτων, στην ανίχνευση φορέων και στον νεογνικό έλεγχο. Επιπλέον, η εφαρμογή του WES έχει τη δυνατότητα να βελτιώσει την υγειονομική περίθαλψη γενικότερα, επηρεάζοντας τη διαχείριση της ασθένειας, την ανακάλυψη νέων φαρμάκων και την εφαρμογή εξατομικευμένων θεραπειών όπως στην περίπτωση του καρκίνου [30].

Μέσω του WES, είναι δυνατό να ανακαλυφθούν νέες γενετικές παραλλαγές που δεν έχουν συσχετιστεί ακόμη με συγκεκριμένες ασθένειες ή προκαλούν εξαιρετικά σπάνιες παθήσεις. Ως εκ τούτου, η ανάλυση και η ταξινόμηση τέτοιων παραλλαγών που δεν έχουν καταγραφεί μέχρι τώρα αποτελεί μια σημαντική πρόκληση. Η αξιολόγηση της παθογονικότητας μιας παραλλαγής πρέπει να ακολουθεί καθιερωμένες οδηγίες, αλλά όταν τα δεδομένα για την παθογονικότητά της είναι ανεπαρκή, η παραλλαγή παραμένει ως «αδιευκρίνιστης κλινικής σημασίας» (Variant of Unknown Significance - VUS). Ένα επιπλέον διαγνωστικό όφελος της χρήσης του WES είναι η αναγνώριση παθογόνων παραλλαγών που σχετίζονται με ασθένειες που δεν σχετίζονται με τον κύριο σκοπό της εξέτασης (τυχαία ευρήματα) [30].

Οι τεχνολογίες NGS χρησιμοποιούνται ήδη για τη διάγνωση πολλών κληρονομικών ασθενειών, με την εφαρμογή του WES να αποδεικνύεται ιδιαίτερα χρήσιμη στην κλινική πράξη. Παρ' όλα αυτά, η εφαρμογή του NGS στην κλινική πρακτική εξακολουθεί να αντιμετωπίζει αρκετά προβλήματα. Πρώτον, η ταχεία παραγωγή τεράστιων ποσοτήτων δεδομένων δημιουργεί μεγάλες προκλήσεις για τη διαχείριση και ανάλυσή τους. Δεύτερον, δεν υπάρχει καθιερωμένο πρότυπο για τον ποιοτικό έλεγχο των δεδομένων. Τα σφάλματα στην αλληλούχηση παραμένουν ένα σημαντικό ζήτημα, καθώς μπορούν να συγχέονται με γενετικές παραλλαγές και να λανθασμένα αναγνωρίζονται ως παραλλαγές που σχετίζονται με τον φαινότυπο. Είναι γνωστό ότι οι εμπορικά διαθέσιμες πλατφόρμες NGS έχουν διαφορετικούς τύπους και ποσοστά σφαλμάτων, τα οποία απαιτούν αξιολόγηση και διόρθωση. Επιπλέον, η χρήση διαφορετικών βιοπληροφορικών στρατηγικών έχει σημαντική επίδραση στην ανάλυση των δεδομένων NGS [31].

1.4 Εκτίμηση Πολυγονιδιακού Κινδύνου (Polygenic Risk Score – PRS)

Η εκτίμηση Πολυγονιδιακού Κινδύνου (Polygenic Risk Score – PRS) είναι ένα προηγμένο εργαλείο που χρησιμοποιείται για την ανεύρεση της πιθανότητας ενός ατόμου να αναπτύξει συγκεκριμένες ασθένειες βασισμένο στις γενετικές του πληροφορίες [32]. Το PRS είναι το αθροιστικό ρίσκο που προκύπτει από ένα στατιστικό μοντέλο το οποίο ενσωματώνει ένα σύνολο πολυμορφισμών (SNPs) οι οποίοι σχετίζονται με την εκδήλωση μιας νόσου με βάση μελέτες γενετικής συσχέτισης (GWAS). Τα αποτελέσματα των GWAS παρέχουν δεδομένα σχετικά με τη συσχέτιση κάθε SNP με την ασθένεια. Κάθε SNP αξιολογείται με βάση τη στατιστική του σημασία, συνήθως εκφρασμένη μέσω τιμών p (p -values) που δείχνουν την πιθανότητα ότι η παρατηρούμενη συσχέτιση είναι τυχαία [33].

Για τον υπολογισμό συντελεστών κινδύνου χρησιμοποιούνται στατιστικές μέθοδοι για να υπολογιστεί η συνεισφορά κάθε SNP στον κίνδυνο της ασθένειας. Αυτό γίνεται με βάση τους συντελεστές κινδύνου (βήτα-συντελεστές) που έχουν προσδιοριστεί σε μεγάλες μελέτες συσχέτισης. Οι συντελεστές αυτοί δείχνουν την αύξηση του κινδύνου της ασθένειας που σχετίζεται με την παρουσία κάθε SNP. Κάθε SNP συνήθως έχει έναν συγκεκριμένο συντελεστή κινδύνου, ο οποίος δείχνει πόσο αυξάνει τον κίνδυνο της ασθένειας σε άτομα που φέρουν την συγκεκριμένη παραλλαγή. Οι συντελεστές κινδύνου προέρχονται από προηγούμενες μελέτες και περιγράφουν τη συσχέτιση κάθε SNP με την ασθένεια [34].

Ο συνολικός κίνδυνος του PRS υπολογίζεται συνδυάζοντας την συνεισφορά όλων των σχετικών SNPs. Αυτό γίνεται μέσω του πολλαπλασιασμού της παρουσίας κάθε SNP με τον αντίστοιχο συντελεστή κινδύνου και αθροίζοντας τα αποτελέσματα. Η τελική τιμή PRS δίνει μια συνολική εκτίμηση του γενετικού κινδύνου για την ασθένεια. Συχνά, τα δεδομένα PRS προκύπτουν από ενοποίηση των συντελεστών κινδύνου των SNPs με βάση μια προεπιλεγμένη κατώφλια στατιστικής σημαντικότητας. Τα SNPs που δεν φέρουν

σημαντική συνεισφορά μπορεί να μην περιλαμβάνονται στον τελικό υπολογισμό του PRS [32].

1.4.1 PRS και Καρκίνος Μαστού

Η ταυτοποίηση νέων SNPs που σχετίζονται με την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού από μελέτες GWAS, οδηγεί στην ενσωμάτωσή τους για τον υπολογισμό του PRS για τη βελτίωση της εκτίμησης του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου μαστού.

Οι Evans *et al.* διεξήγαγαν μελέτη όπου χρησιμοποίησαν 18 SNPs (SNP18) και υπολόγισαν το PRS για την εκτίμηση κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου μαστού σε γυναίκες που δεν έφεραν παθολογικό παραλλαγή στα γονίδια *BRCA1/2* [35] και συμπέραναν ότι το PRS θα μπορούσε να βοηθήσει στην ταυτοποίηση αυτών των γυναικών. Πέρα από το SNP18, το SNP77 είναι έχει χρησιμοποιηθεί για του υπολογισμό του PRS για τον καρκίνο του μαστού. Σε μια μελέτη με ~33,000 ασθενείς με καρκίνο του μαστού και ~33,000 υγιείς γυναίκες ευρωπαϊκής καταγωγής, το SNP77 έδειξε ότι κατατάσσει τον κίνδυνο καρκίνου του μαστού σε γυναίκες με οικογενειακό ιστορικό, καθώς και σε αυτές χωρίς [36]. Ο κίνδυνος καρκίνου του μαστού κατά τη διάρκεια της ζωής κατατάχθηκε σε 8.6% και 24.4% στα χαμηλότερα και υψηλότερα ποσοστά αντίστοιχα, για γυναίκες με πρώτο βαθμό συγγενή με ιστορικό καρκίνου του μαστού και 5.2% και 16.6% αντίστοιχα, για γυναίκες χωρίς οικογενειακό ιστορικό.

Καθώς αναγνωρίστηκαν περισσότερα SNPs που σχετίζονται με τον καρκίνο του μαστού, εξετάστηκε ένα πάνελ με 94 SNPs, με την καλύτερη διακριτική ακρίβεια να προέρχεται από 86 από αυτά τα 94 SNPs. Αυτά τα 86 SNPs δημιουργήθηκε το PRS86 [37].

Το SNP143 είναι το επόμενο μεγαλύτερο και καλά επιβεβαιωμένο PRS για τον κίνδυνο καρκίνου του μαστού και περιγράφηκε από τους Brentnall *et al.* όπου ανέπτυξαν αυτό PRS από ένα πάνελ 172 SNPs που συνδέονται με τον καρκίνο του μαστού μέσω

GWAS [38]. Το SNP313, που αναπτύχθηκε από μελέτες που διεξήγαγε το Breast Cancer Association Consortium, είναι προγνωστικό του κινδύνου καρκίνου του μαστού δείχνοντας καλή διακριτική ικανότητα σε λευκούς Ευρωπαίους πληθυσμούς [39].

2. Σκοπός

Ο κληρονομικός καρκίνος αφορά περίπου το 5-10% των περιπτώσεων καρκίνου. Είναι γνωστό ότι παθογόνες παραλλάγες στο γονίδιο *TP53* προδιαθέτουν στο σύνδρομο Li-Fraumeni, ενώ αρκετά άλλα γονίδια συνδέθηκαν με κληρονομικά σύνδρομα καρκίνου, όπως τα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2*, *APC*, *CDH1*, *PTEN*, *STK11*, και τα γονίδια MMR. Την τελευταία δεκαετία, τα τεχνολογικά πλεονεκτήματα και κυρίως η έλευση της αλληλούχησης επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing - NGS) επέτρεψε την ανάλυση πολλών περισσότερων γονιδίων που σχετίζονται με την κληρονομική προδιάθεση για καρκίνο. Η συμβολή πολλών γονιδίων στην προδιάθεση για καρκίνο μαστού έχει αποκαλυφθεί και τα γονιδιακά πάνελ χρησιμοποιούνται ευρέως στην κλινική πρακτική.

Καθώς οι πληροφορίες που συσσωρεύονται από τις αναλύσεις NGS αυξάνουν, αυξάνεται επίσης και κατανόησή μας για τη συμβολή τους στην αύξηση της κληρονομικής προδιάθεσης για ανάπτυξη καρκίνου και αρκετές μελέτες προτείνουν την ανάλυση πολλαπλών γονιδίων ως μέθοδο επιλογής για τη διερεύνηση της κληρονομικότητας του καρκίνου. Η χρήση νέων τεχνολογιών έχει συμβάλει σημαντικά στην αύξηση των οικογενειών με ιστορικό καρκίνου στις οποίες ήταν δυνατό να εντοπιστεί η γενετική αιτία που της νόσου. Σε οικογένειες με ιστορικό καρκίνου μαστού για παράδειγμα, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι μια πολυγονιδιακή ανάλυση περισσότερων γονιδίων είναι ικανή να εντοπίσει το γενετικό προδιαθεσιακό παράγοντα σε 20-25% των περιπτώσεων, σε αντίθεση με την επικρατούσα μέχρι πρόσφατα ανάλυση των γονιδίων *BRCA1/2*, η οποία μπορεί να συμβάλει στη διάγνωση κληρονομούμενου καρκινικού συνδρόμου καρκίνου μαστού, μόνο σε περίπου 10% των περιπτώσεων.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι:

A. Να αξιολογηθεί αναδρομικά η κλινική χρησιμότητα της εκτίμηση του πολυγονιδιακού κινδύνου (Polygenic Risk Score - PRS) στην ανάπτυξη καρκίνου του μαστού, χρησιμοποιώντας μια ομάδα ασθενών που έχουν ήδη διαγνωστεί με καρκίνο του μαστού.

B. Η πιθανή ανεύρεση νέων γενετικών τόπων που σχετίζονται με τον κληρονομικό καρκίνο του μαστού, με την χρήση αλληλούχησης επόμενης γενιάς όλων των εξονίων (WES).

3. Υλικό και μέθοδος

3.1. Υλικό μελέτης

Κατά την περίοδο 2020 έως το 2023, συνολικά 8,261 άτομα παραπέμφθηκαν στο εργαστήριο της Genekor Ιατρική Α.Ε., για τη διεξαγωγή γενετικού ελέγχου χρησιμοποιώντας την τεχνολογία Αλληλούχησης Νέας Γενιάς (Next Generation Sequencing - NGS). Ο στόχος αυτής της ανάλυσης είναι η διερεύνηση γενετικών παραλλαγών που συνδέονται με τον κληρονομικό καρκίνο. Πριν από την πραγματοποίηση του γενετικού ελέγχου, όλα τα άτομα ενημερώθηκαν λεπτομερώς για τον σκοπό και τα πιθανά αποτελέσματα του γενετικού ελέγχου. Μετά την ενημέρωση, κάθε άτομο επιβεβαίωσε ότι κατανοούσε πλήρως τη διαδικασία και παρείχε τη συγκατάθεσή του για την πραγματοποίησή της γενετικής ανάλυσης.

Ιδιαίτερης σημασίας είναι η ρητή άδεια που δόθηκε για την ανώνυμη χρήση των γενετικών τους δεδομένων σε επιστημονικές ερευνητικές δραστηριότητες. Αυτή η άδεια επιτρέπει την αξιοποίηση των δεδομένων για την προαγωγή της επιστημονικής γνώσης, καθώς και τη δυναμική δημοσίευση των ερευνητικών ευρημάτων που μπορούν να προκύψουν από τις αναλύσεις αυτές. Η ανωνυμοποίηση εξασφαλίζει ότι τα προσωπικά στοιχεία των συμμετεχόντων προστατεύονται, ενώ παράλληλα τα δεδομένα τους συμβάλλουν σε μελέτες που μπορεί να έχουν ευρεία εφαρμογή σε παγκόσμιο επίπεδο.

Για να διασφαλιστεί η πληρότητα συλλέχθηκαν επιπρόσθετες πληροφορίες από κάθε άτομο. Αυτές οι πληροφορίες περιλάμβαναν λεπτομέρειες για το ατομικό ιατρικό ιστορικό, καθώς και για το οικογενειακό ιστορικό, όπου αυτό ήταν διαθέσιμο. Οι κλινικοί γιατροί και άλλοι επαγγελματίες υγείας που συμμετείχαν στη μελέτη έπαιξαν καθοριστικό ρόλο στη συλλογή αυτών των πληροφοριών, διασφαλίζοντας ότι καταγράφηκε πλήρως το οικογενειακό ιστορικό κάθε εξεταζόμενου. Με αυτόν τον τρόπο, η ανάλυση δεν

περιορίστηκε απλώς στα γονιδιακά δεδομένα, αλλά συνδυάστηκε με πληροφορίες που προσφέρουν ένα πιο ολοκληρωμένο πλαίσιο για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.1.1. Δημογραφικά χαρακτηριστικά του υλικού μελέτης

Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ατόμων που αναλύθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή, το προσωπικό ιστορικό που σχετίζεται με τη διάγνωση του καρκίνου και μια λεπτομερής αξιολόγηση του οικογενειακού ιστορικού παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1. Η κατανομή των ατόμων με βάση τις χώρες καταγωγής τους είναι η εξής: 5,733 (69.4%) από την Ελλάδα, 991 (12%) από τη Ρουμανία, 816 (9.8%) από την Τουρκία και 721 από άλλες χώρες (8.7%). Η διάμεση ηλικία των εξεταζόμενων κατά την εξέταση ήταν 46.8 έτη, με τις ηλικίες να κυμαίνονται από 18 έως 82 έτη.

Αναφορικά με την κατανομή του φύλου, η πλειοψηφία των ατόμων που εξετάστηκαν ήταν γυναίκες, αποτελώντας το 89.7% (7,407 από τους 8,261) των εξεταζόμενων. Αντίθετα, οι άνδρες αποτελούσαν μόνο το 10.3% (1,854 από τους 8,261) των ατόμων που παραπέμφθηκαν για γενετικό έλεγχο. Σημαντικό ποσοστό εξεταζόμενων, συγκεκριμένα το 86.4% (5,697 από τους 6,591 για τους οποίους υπήρχαν διαθέσιμα δεδομένα οικογενειακού ιστορικού), είχαν οικογενειακό ιστορικό καρκίνου. Εντός αυτής της υποομάδας, το 42% (2,396 από τους 5,697) είχαν οικογενειακό ιστορικό του ίδιου τύπου καρκίνου, υποδεικνύοντας πιθανούς κληρονομικούς παράγοντες που συμβάλλουν στην επικράτηση συγκεκριμένων τύπων καρκίνου στις οικογένειες.

Από τα εξεταζόμενα άτομα, 4,641 (76.6%) διαγνώστηκαν με καρκίνο του μαστού, 560 (6.7%) με καρκίνο των ωοθηκών, 238 με καρκίνο του παχέος εντέρου (3.9%), 210 (3.5%) με καρκίνο του παγκρέατος και 158 με καρκίνο του προστάτη (2.6%). Επιπλέον, 532 ήταν υγιή άτομα με σημαντικό οικογενειακό ιστορικό καρκίνου, ενώ 253 (4.2%) είχαν διαφορετικό τύπο καρκίνου και για 1,670 (20.2%) εξεταζόμενους δεν υπήρχαν πληροφορίες κατά τον χρόνο της γενετικής εξέτασης.

Πίνακας 3.1. Δημογραφικά χαρακτηριστικά των εξεταζομένων.

Δημογραφικά χαρακτηριστικά	Αριθμός εξεταζόμενων	%
Συνολικός αριθμός	8,261	100
Γυναίκες	7,407	89.7
Άνδρες	1,854	10.3
Ηλικία διάγνωσης (έτη)		
Μέση	46.8	
Διάμεση	45	
Εύρος	18–82	
Εθνικότητα		
Ελληνική	5,733	69.4
Ρουμάνικη	991	12
Τουρκική	816	9.9
Άλλη	721	8.7
Κλινική Κατάσταση		
Ασθενείς	6,060	73.4
Υγιείς	532	6.4
Μη διαθέσιμη πληροφορία	1,670	20.2
Τύποι καρκίνων μεταξύ των ασθενών		
Μαστού	4,641	76.6
Ωοθηκών	560	9.2
Παχέος εντέρου	238	3.9
Παγκρέατος	210	3.5
Προστάτη	158	2.6

3.1.2. Υλικό μελέτης - NGS και στοχευμένο πάνελ γονιδίων

Σε όλα τα 8,261 άτομα πραγματοποιήθηκε ανάλυση ενός πάνελ γονιδίων που περιλάμβανε 52 γονίδια, τα οποία σχετίζονται με την προδιάθεση για κληρονομικό καρκίνο με την χρήση NGS (Εικόνα 3.1) (Πίνακας 3.2). Το συγκεκριμένο πάνελ γονιδίων επιλέχθηκε προσεκτικά για να συμπεριλάβει γονίδια που είναι γνωστό ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη καρκίνου. Η συγκεκριμένη ανάλυση είναι σχεδιασμένη να εντοπίζει παραλλαγές σε γονίδια που συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης κληρονομικών μορφών καρκίνου, όπως ο καρκίνος του μαστού, των ωοθηκών, του παχέος εντέρου και άλλων μορφών που παρουσιάζουν γενετική προδιάθεση.

Τα 52 γονίδια που περιλαμβάνονται στο πάνελ καλύπτουν τόσο γονίδια υψηλού κινδύνου, όπως τα *BRCA1* και *BRCA2*, όσο και γονίδια μετρίου ή χαμηλού/αδιευκρίνιστου κινδύνου, τα οποία συμβάλλουν σε μικρότερο αλλά σημαντικό βαθμό στην προδιάθεση για καρκίνο μαστού (Πίνακας 3.3).

Πίνακας 3.2. Λίστα 52 γονιδίων και αλληλουχίες αναφοράς

Γονίδιο	Αλληλουχία αναφοράς
<i>APC</i>	NM_000038
<i>ATM</i>	NM_000051
<i>ATR</i>	NM_001184
<i>AXIN2</i>	NM_004655
<i>BAP1</i>	NM_004656
<i>BARD1</i>	NM_000465
<i>BLM</i>	NM_000057

<i>BMPR1A</i>	NM_004329
<i>BRCA1</i>	NM_007294
<i>BRCA2</i>	NM_000059
<i>BRIP1</i>	NM_032043
<i>CDH1</i>	NM_004360
<i>CDK4</i>	NM_000075
<i>CDKN2A (p14ARF, p16INK4a)</i>	NM_000077, NM_058195
<i>CHEK2</i>	NM_007194
<i>EPCAM</i>	NM_002354
<i>FAM175A</i>	NM_139076
<i>FANCA</i>	NM_000135
<i>FANCL</i>	NM_001114636
<i>FANCM</i>	NM_020937
<i>GALNT12</i>	NM_024642
<i>GEN1</i>	NM_001130009
<i>HOXB13:c.251G>A p.(G84E)</i>	NM_006361
<i>MEN1</i>	NM_000244
<i>MITF</i>	NM_001354604
<i>MLH</i>	NM_000249
<i>MRE11</i>	NM_005591
<i>MSH2</i>	NM_000251
<i>MSH3</i>	NM_002439
<i>MSH6</i>	NM_000179
<i>MUTYH</i>	NM_001128425
<i>NBN</i>	NM_002485

<i>NF1</i>	NM_000267
<i>NTHL1</i>	NM_002528
<i>PALB2</i>	NM_024675
<i>PMS2</i>	NM_000535
<i>POLD1 (Εξώνια 8-13)</i>	NM_001256849
<i>POLE (Εξώνια 1-14)</i>	NM_006231
<i>PPP2R2A</i>	NM_002717
<i>PTEN</i>	NM_000314
<i>RAD50</i>	NM_005732
<i>RAD51B</i>	NM_133509
<i>RAD51C</i>	NM_058216
<i>RAD51D</i>	NM_002878
<i>RET</i>	NM_020975
<i>RNF43</i>	NM_017763
<i>RPS20</i>	NM_001023
<i>SMAD4</i>	NM_005359
<i>SMARCA4</i>	NM_001128849
<i>STK11</i>	NM_000455
<i>TP53</i>	NM_000546
<i>VHL</i>	NM_000551

Πίνακας 3.3. Κατηγορία ρίσκου για καρκίνο μαστού ανα γονίδιο

<i>Γονίδιο</i>	Απόλυτο ρίσκο
----------------	----------------------

<i>ATM</i>	Ενδιάμεσο (21%–24%)
<i>BARD1</i>	Ενδιάμεσο (17%–30%)
<i>BLM</i>	Απροσδιόριστο
<i>BRCA1</i>	Υψηλό (>60%)
<i>BRCA2</i>	Υψηλό (>60%)
<i>BRIP1</i>	Απροσδιόριστο
<i>CDH1</i>	Υψηλό (37%–55%)
<i>CHEK2</i>	Ενδιάμεσο (23%–27%)
<i>EPCAM</i>	Χαμηλό (<15%)
<i>FAM175A</i>	Απροσδιόριστο
<i>FANCA</i>	Απροσδιόριστο
<i>FANCL</i>	Απροσδιόριστο
<i>FANCM</i>	Απροσδιόριστο
<i>MLH1</i>	Χαμηλό (<15%)
<i>MRE11</i>	Απροσδιόριστο
<i>MSH2</i>	Χαμηλό (<15%)
<i>MSH6</i>	Χαμηλό (<15%)
<i>NBN</i>	Απροσδιόριστο
<i>NF1</i>	Ενδιάμεσο (20%–40%)
<i>NTHL1</i>	Απροσδιόριστο
<i>PALB2</i>	Υψηλό (32%–53%)
<i>PMS2</i>	Χαμηλό (<15%)
<i>PTEN</i>	Υψηλό (40%–60%)
<i>RAD50</i>	Απροσδιόριστο
<i>RAD51C</i>	Ενδιάμεσο (~20 %)

<i>RAD51D</i>	Ενδιάμεσο (~20 %)
<i>SMARCA4</i>	Απροσδιόριστο
<i>STK11</i>	Υψηλό (32%–54%)
<i>TP53</i>	Υψηλό (>60%)

3.1.2. Υλικό μελέτης- PRS

Από τις 4,641 ασθενείς με καρκίνο μαστού πραγματοποιήθηκε ανάλυση για εκτίμηση πολυγονιδιακού κινδύνου (PRS) σε 105 γυναίκες, στις οποίες είναι γνωστά τα αποτελέσματα από τον στοχευμένο γονιδιακό έλεγχο (Εικόνα 3.1). Η επιλογή των ατόμων έγινε με στόχο να συμπεριληφθούν όλες οι κατηγορίες αποτελεσμάτων που προκύπτουν από τον γονιδιακό έλεγχο. Αυτές οι κατηγορίες περιλαμβάνουν γυναίκες με θετικά αποτελέσματα σε γονίδια υψηλού κινδύνου, θετικά σε γονίδια μεσαίου ή χαμηλού κινδύνου, καθώς και γυναίκες με αρνητικά αποτελέσματα.

Αναλυτικότερα, από τις 105 γυναίκες:

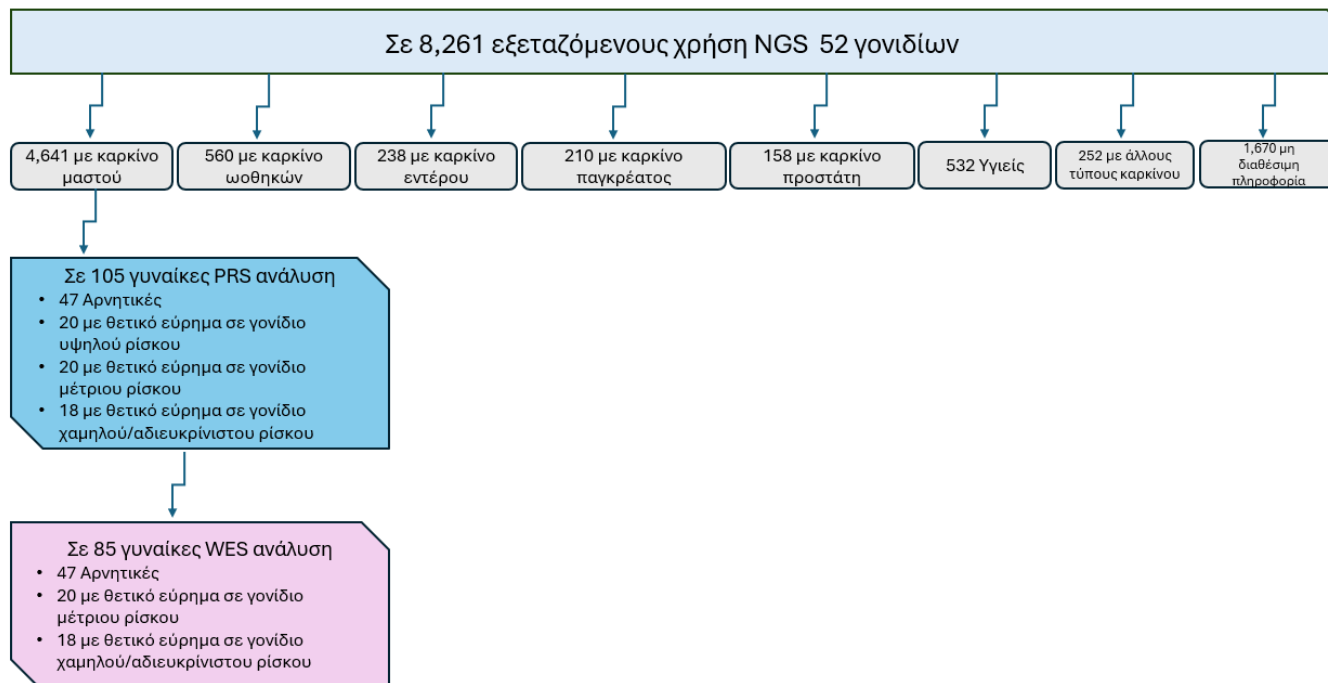
- 47 είχαν οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού ή των ωθηκών, εκ των οποίων οι 41 είχαν συγγενή πρώτου βαθμού με καρκίνο του μαστού.
- 35 γυναίκες είχαν οικογενειακό ιστορικό άλλων μορφών καρκίνου.
- 23 γυναίκες δεν είχαν κανένα οικογενειακό ιστορικό καρκίνου.

Η μέση ηλικία διάγνωσης του καρκίνου του μαστού ήταν τα 47 έτη, με ένα εύρος ηλικιών από 27 έως 74 έτη.

3.1.2. Υλικό μελέτης- WES

Επιπλέον, από τις 105 γυναίκες με καρκίνου μαστού που αναλύθηκαν για PRS, πραγματοποιήθηκε ανάλυση WES σε 85 ασθενείς (Εικόνα 3.1). Πιο συγκεκριμένα, 47 άτομα δεν έφερε παθογόνες παραλλαγές σε κάποιο από τα 52 γονίδια που αναλύθηκαν.

20 άτομα έφεραν παθογόνα ευρήματα σε γονίδια μέτριας διεισδυτικότητας και 18 ασθενείς έφεραν παθογόνα ευρήματα σε γονίδια χαμηλής διεισδυτικότητας.



Εικόνα 3.1. Υλικό μελέτης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

3.2. Μεθοδολογία

3.2.1. Απομόνωση γενετικού υλικού (DNA)

Η απομόνωση γενετικού υλικού DNA από δείγματα ολικού περιφερικού αίματος πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το kit MagCore® Genomic DNA Whole Blood (RBC Bioscience, New Taipei City, Taipei, Taiwan, ROC) σύμφωνα με το πρωτόκολλο που ορίζει ο κατασκευαστής. Το συγκεκριμένο kit χρησιμοποιεί μια αυτοματοποιημένη διαδικασία, η οποία βασίζεται σε τεχνολογία μαγνητικών σφαιριδίων για την απομόνωση του DNA. Με την συγκεκριμένη διαδικασία πραγματοποιείται απομόνωση DNA υψηλής καθαρότητας και ακεραιότητας, το οποίο είναι κατάλληλο για χρήση σε γενετικές αναλύσεις με την χρήση NGS. Επιπλέον, η χρήση του συγκεκριμένου kit διασφαλίζει την αποφυγή επιμολύνσεων και την διατήρηση της ποιότητας του DNA (Εικόνα 3.2).

3.2.2. NGS πρωτόκολλο για κατασκευή βιβλιοθήκης με εμπλουτισμό μέσω ανιχνευτών και κατασκευή βιβλιοθήκης με εμπλουτισμό μέσω ανιχνευτών (>340.000) σχεδιασμένων για όλες τις εξωνικές περιοχές

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή για την ανάλυση των 52 γονιδίων καθώς και του WES εφαρμόστηκε μέθοδος επιλογής μέρους του γονιδιώματος για πολλαπλασιασμό και αλληλούχηση με την χρήση ανιχνευτών (probes) και υβριδισμό (Capture based NGS). Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε το εμπορικά διαθέσιμο kit KAPA HyperPlus της ROCHE. Η προετοιμασία της βιβλιοθήκης κάθε δείγματος πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας.

Αρχικά, από κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκε 150 ng δίκλωνου DNA, το οποίο κατακερματίστηκε ενζυματικά. Για να διατηρηθεί η σταθερότητα αυτής της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε EDTA πριν από τον κατακερματισμό. Στην συνέχεια το κατακερματισμένο DNA επεξεργάστηκε για την επιδιόρθωση των άκρων (A-tailing) και των

ανταπτόρων (adaptors). Τέλος, η βιβλιοθήκη ενισχύθηκε χρησιμοποιώντας PCR χρησιμοποιώντας αλληλουχία «ετικάτα» (indexes). Το τελικό στάδιο είναι η ανάμειξη όλων των βιβλιοθηκών και υβριδοποίηση με την χρήση ανιχνευτών (για 52 γονίδια ή για όλες τις εξωνικές περιοχές) (Εικόνα 3.2).

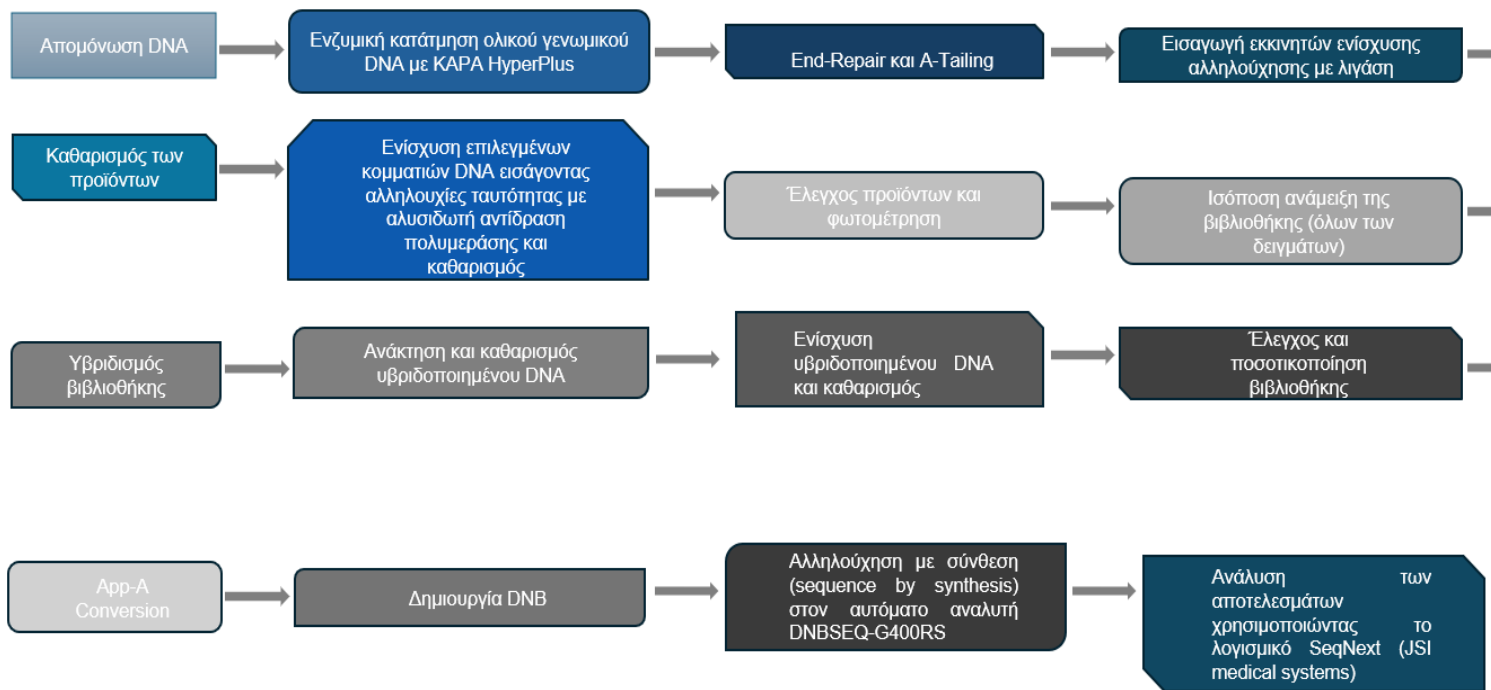
3.3.3. Αλληλούχηση NGS

Η αλληλούχηση των προετοιμασμένων δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με την τεχνολογία DNBG400, η οποία παρέχεται από την εταιρεία MGI Tech Co., Ltd. Η τεχνολογία αυτή είναι γνωστή για την υψηλή απόδοσή της στην αλληλούχηση DNA, επιτρέποντας τη γρήγορη και ακριβή ανάλυση μεγάλου όγκου γενετικών δεδομένων. Η αλληλούχηση που πραγματοποιήθηκε με το DNBG400 εξασφάλισε την παραγωγή δεδομένων υψηλής ποιότητας, κατάλληλα για την ανίχνευση γενετικών παραλλαγών (Εικόνα 3.2).

3.3.4. Βιοπληροφορική ανάλυση

Τα δεδομένα αλληλούχησης που προέκυψαν υποβλήθηκαν σε επεξεργασία και ανάλυση χρησιμοποιώντας το λογισμικό SeqNext, έκδοση 4.4.0 (JSI Medical Systems GmbH). Το συγκεκριμένο λογισμικό είναι εξειδικευμένο για την ανάλυση δεδομένων αλληλούχησης επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing - NGS) και προσφέρει ολοκληρωμένα εργαλεία για την ανίχνευση και ερμηνεία γενετικών παραλλαγών.

Η πλατφόρμα SeqNext επιτρέπει τον ακριβή εντοπισμό αλλαγών στην αλληλουχία DNA, όπως μονονουκλεοτιδικές αλλαγές (SNPs), μικρές εισαγωγές ή ελλείψεις (indels) και άλλες σημαντικές γενετικές παραλλαγές. Επιπλέον, το λογισμικό διευκόλυνε την ερμηνεία αυτών των αλλαγών εντός του πλαισίου των κλινικά σχετικών γονιδίων και μεταγραφών, επιτρέποντας τη συσχέτιση των γενετικών αποτελεσμάτων με την κλινική εικόνα του εξεταζόμενου (Εικόνα 3.2).



Εικόνα 3.2. Η πειραματική ροή εργασιών που ακολουθήθηκε στην παρούσα διατριβή.

3.3.5. PRS ανάλυση

Τα αποτελέσματα της εκτίμησης πολυγονιδιακού κινδύνου (PRS) ελήφθησαν από εξωτερικό εργαστήριο (Allelica, Νέα Υόρκη, ΗΠΑ) όπου πραγματοποιήθηκε γονοτύπωση για περίπου 750.000 γενετικές παραλλαγές χρησιμοποιώντας το Global Screening Array (GSA) της Illumina. Το PRS υπολογίστηκε από 577.113 SNPs, προσθέτοντας τον αριθμό των αλληλομόρφων κινδύνου κάθε SNP με βάση το αντίστοιχο μέγεθος επίδρασης. Τα SNPs και τα μεγέθη επίδρασης αντλήθηκαν από στατιστικά στοιχεία GWAS μελετών για τον καρκίνο του μαστού. Το μοντέλο PRS που επιλέχθηκε έχει δείξει σημαντική δυνατότητα ταξινόμησης σε διάφορες φυλετικές καταγωγές [40].

Το οικογενειακό ιστορικό ορίστηκε ως η ύπαρξη τουλάχιστον ενός συγγενή πρώτου βαθμού που διαγνώστηκε με καρκίνο του μαστού. Ο ατομικός κίνδυνος υπολογίστηκε αξιολογώντας πρώτα τη θέση του PRS του εξεταζόμενου ατόμου σε μια κατανομή τιμών PRS προσαρμοσμένη στη γενετική του καταγωγή, και στη συνέχεια μετατρέποντας αυτό το ποσοστό σε κίνδυνο κατά τη διάρκεια της ζωής του. Οι κατανομές κινδύνου υπολογίστηκαν εφαρμόζοντας το PRS της Allelica στο σύνολο δεδομένων του UK Biobank.

Ο κίνδυνος καρκίνου του μαστού καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής εκτιμήθηκε χρησιμοποιώντας ένα αναλογικό μοντέλο κινδύνου Cox για περιστατικά καρκίνου του μαστού στο σύνολο δεδομένων του UK Biobank. Ο υψηλός κίνδυνος ορίστηκε ως ποσοστό άνω του 20% κινδύνου καρκίνου του μαστού καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής, όπως συνιστά η Αμερικανική Αντικαρκινική Εταιρεία [41]. Οι κίνδυνοι υπολογίστηκαν τόσο με και χωρίς την προσθήκη παραγόντων κινδύνου, συμπεριλαμβανομένων της κατάστασης γονιδίων και του οικογενειακού ιστορικού. Στον υπολογισμό του κινδύνου καρκίνου του μαστού, οι παθογόνες παραλλαγές των γονιδίων *BRCA1/2* και *CHEK2* ήταν οι μόνοι παράγοντες που λήφθηκαν υπόψη σε σχέση με την κατάσταση των γονιδίων.

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας t-tests με τη χρήση της συνάρτησης 'ttest_ind' από τη βιβλιοθήκη scipy.stats της Python (έκδοση 3.10.9) [42] για τη σύγκριση ομάδων σε διάφορα χαρακτηριστικά, όπως οικογενειακό ιστορικό, αποτελέσματα γενετικών εξετάσεων, ποσοστό PRS, κίνδυνος PRS και διάφορες συνδυαστικές στρατηγικές εκτίμησης κινδύνου.

Τα διαγράμματα πυκνότητας και διασποράς δημιουργήθηκαν χρησιμοποιώντας τις βιβλιοθήκες matplotlib και seaborn της Python (έκδοση 3.10.9). Χρησιμοποιήθηκε η εκτίμηση πυκνότητας (KDE) για την απεικόνιση της κατανομής συνεχών μεταβλητών, όπως το ποσοστό PRS. Οι παράμετροι για τα διαγράμματα εκτίμησης πυκνότητας (KDE) προσαρμόστηκαν, με την παράμετρο εύρους εξομάλυνσης να ορίζεται ως 'Scott' και τον συντελεστή κλιμάκωσης (bw_adjust) να ορίζεται στο 0,9. Η παράμετρος εύρους εξομάλυνσης ('Scott') και ο συντελεστής κλιμάκωσης (bw_adjust = 0,9) επιλέχθηκαν για να παρέχουν ισορροπία μεταξύ της υπερβολικής και ανεπαρκούς εξομάλυνσης των δεδομένων.

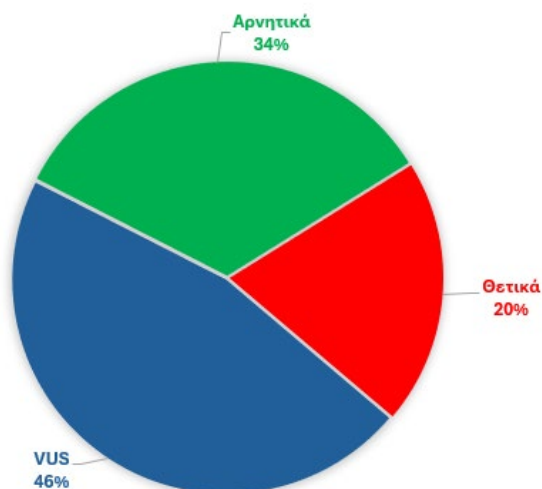
4. Αποτελέσματα

4.1. Αποτελέσματα από το στοχευμένο πάνελ γονιδίων

Από τον πολυγονιδιακό έλεγχο των 52 γονιδίων με την χρήση NGS προέκυψε ότι το 20% (1,656 από τους 8,261) των εξεταζόμενων που μελετήθηκαν έφεραν παθολόγο παραλλαγή (Εικόνα 4.1). Πιο συγκεκριμένα, το 54.8% (908 από τους 1,656) των εξεταζόμενων έφεραν παθολόγο παραλλαγή σε κλινικά σημαντικό γονίδιο.

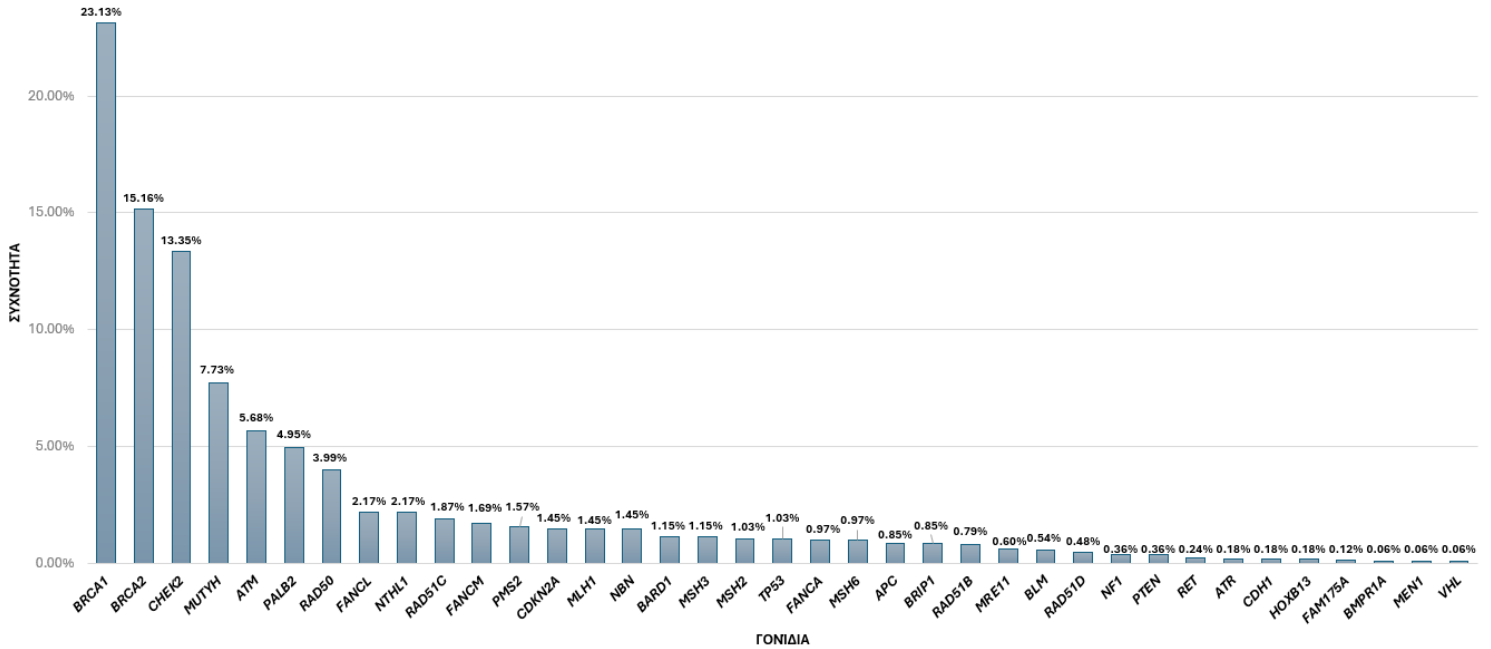
Η κατανομή αυτών των παραλλαγών στα συγκεκριμένα γονίδια είναι η εξής: *BRCA1* (23.13%), *BRCA2* (15.16%), *PALB2* (4.95%), *RAD51C* (1.87%), *PMS2* (1.57%), *CDKN2A* (1.45%), *MLH1* (1.45%), *MSH2* (1.03%), *TP53* (1.03%), *MSH6* (0.97%), *APC* (0.85%), *RAD51D* (0.48%), *PTEN* (0.36%), *RET* (0.24%), *CDH1* (0.18%), *MEN1* (0.06%) και *VHL* (0.06%) (Εικόνα 4.2).

Επίσης, μεταξύ των παθολόγων παραλλαγών που εντοπίστηκαν στους εξεταζόμενους, ένα σημαντικό ποσοστό που ανέρχεται σε 6.52% (108 από τους 1,656) αφορούν μεγάλες γενωμικές αναδιατάξεις (CNVs) (Εικόνα 4.3).

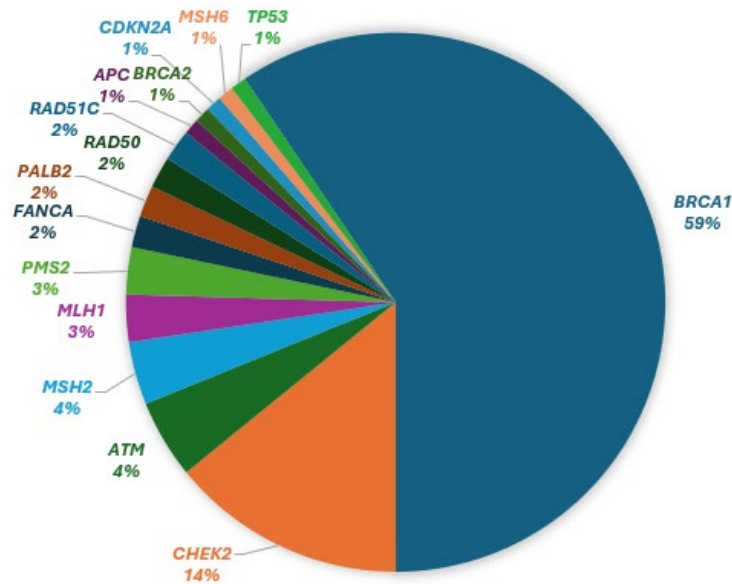


Εικόνα 4.1. Αποτελέσματα από τον πολυγονιδιακό έλεγχο που πραγματοποιήθηκε σε 8,216 άτομα. Τα θετικά αποτελέσματα αφορούν τις περιπτώσεις όπου εντοπίστηκε παθολόγος

παραλλαγή και τα αρνητικά αποτελέσματα εκείνα που δεν εντοπίστηκε παθογόνο εύρημα. VUS: Αδιευκρίνιστης Κλινικής Σημασίας ευρήματα.



Εικόνα 4.2. Ποσοστό παθογόνων ευρημάτων που ανιχνεύθηκαν σε κάθε γονίδιο.

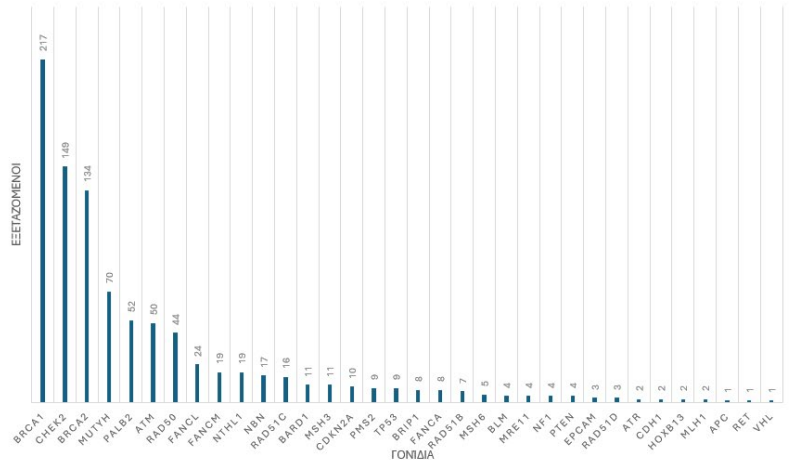
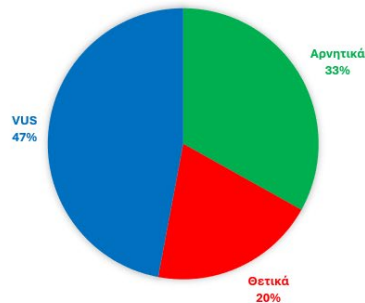


Εικόνα 4.3. Ποσοστό παθογόνων μεγάλων γενωμικών αναδιατάξεων (CNVs) που ανιχνεύθηκαν σε κάθε γονίδιο.

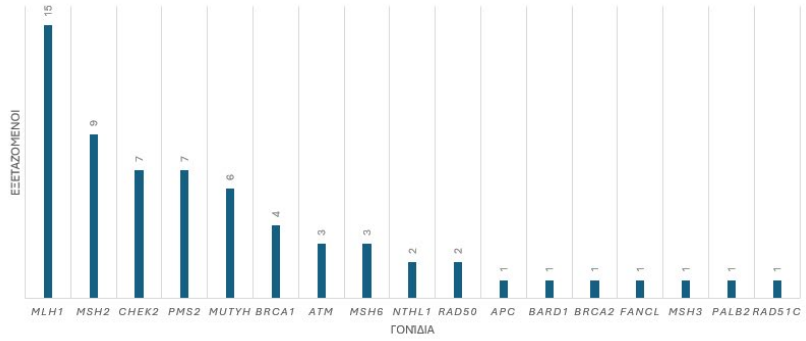
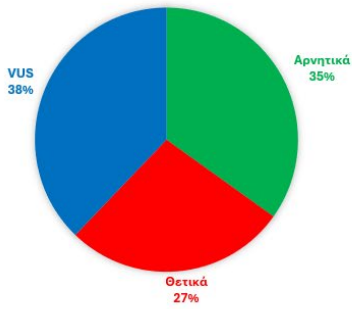
4.1.1 Αποτελέσματα από το στοχευμένο πάνελ γονιδίων ανά τύπο καρκίνου

Μεταξύ των εξεταζόμενων που διαγνώστηκαν με διαφορετικούς τύπους καρκίνου, όπως καρκίνο του μαστού, καρκίνο των ωοθηκών, καρκίνο του παχέος εντέρου, καρκίνο του παγκρέατος και καρκίνο του προστάτη, εντοπίστηκαν παθογόνες παραλλαγές στα υπό ανάλυση γονίδια. Συγκεκριμένα, από τους 4,641 ασθενείς με καρκίνο του μαστού, το 20% έφερε παθογόνο εύρημα. Για τους ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών (συνολικά 560), το ποσοστό αυτό ανήλθε στο 27%, ενώ το 21% των 238 ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου βρέθηκε να φέρει παθογόνο παραλλαγή. Στην περίπτωση του καρκίνου του παγκρέατος, που νόσησαν 210 άτομα, το 27% έφερε παθογόνες παραλλαγές. Τέλος, μεταξύ των 158 ασθενών με καρκίνο του προστάτη, το 17% αυτών έφερε παθογόνο εύρημα. Η κατανομή των γονιδίων που εντοπίστηκαν παθογόνες παραλλαγές σε κάθε τύπο καρκίνου παρουσιάζεται στην Εικόνα 4.4.

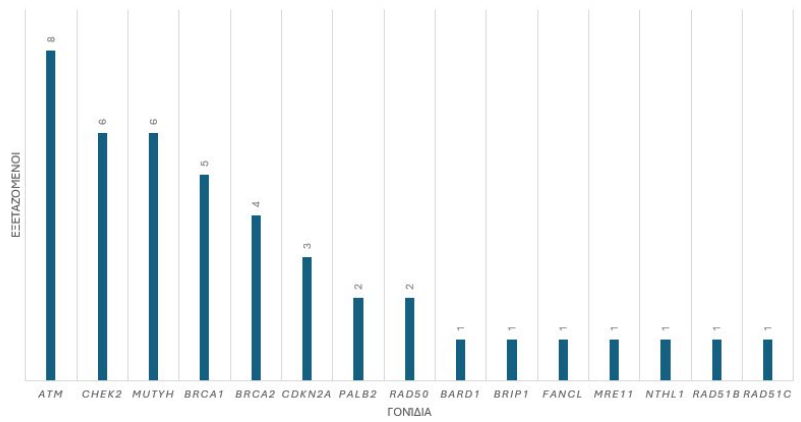
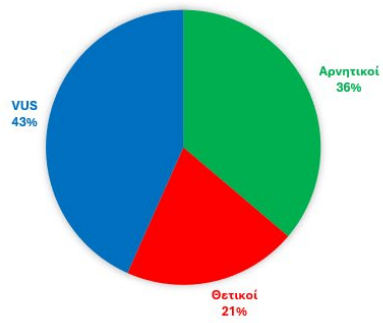
A.Καρκίνος Μαστού



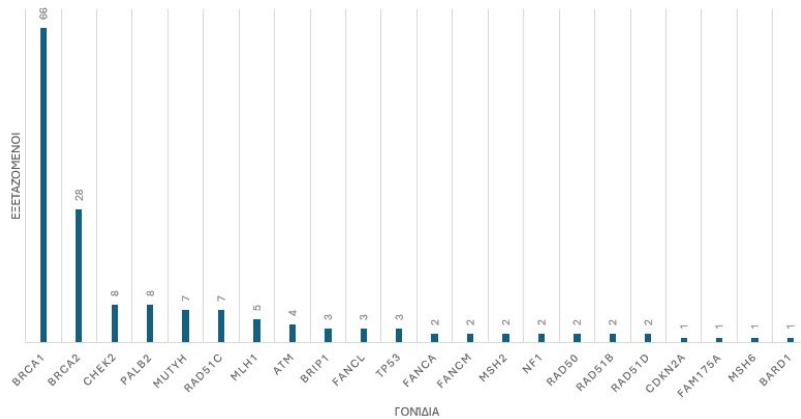
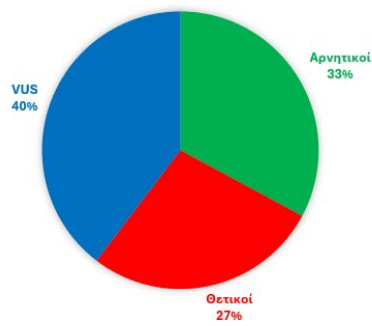
Β. Καρκίνος Παχέος Εντέρου



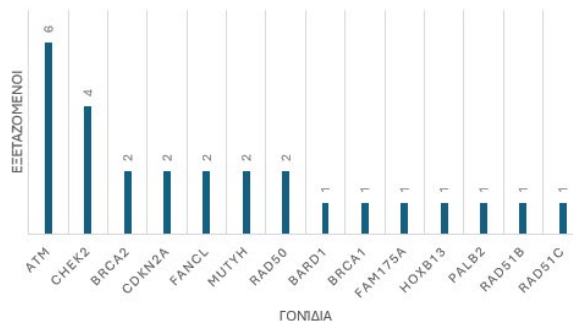
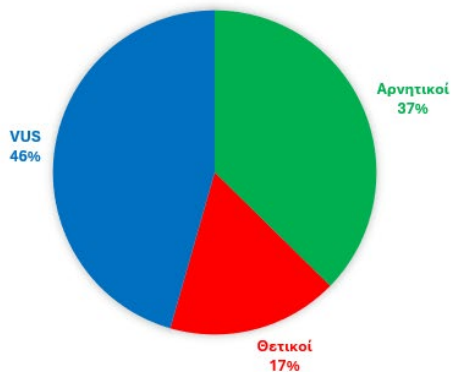
Γ. Καρκίνος Παγκρέατος



Δ. Καρκίνος Ωοθηκών



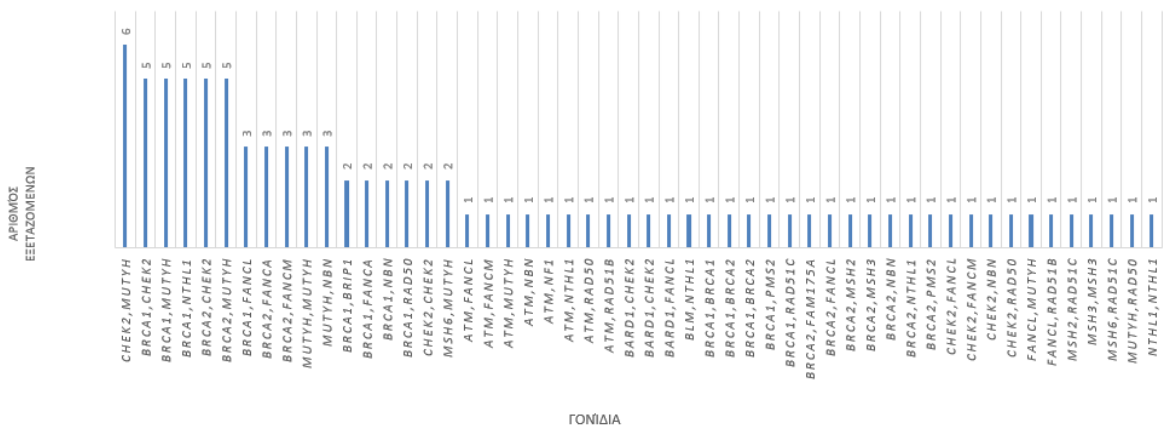
Ε. Καρκίνος Προστάτη



Εικόνα 4.4. Αποτελέσματα του πολυγονιδιακού ελέγχου των ατόμων που διαγνώστηκαν με καρκίνο Α) μαστού, Β) παχέος εντέρου, Γ) παγκρέατος, Δ) ωθηκών και Ε) προστάτη

4.1.2. Διπλοί Ετεροζυγώτες

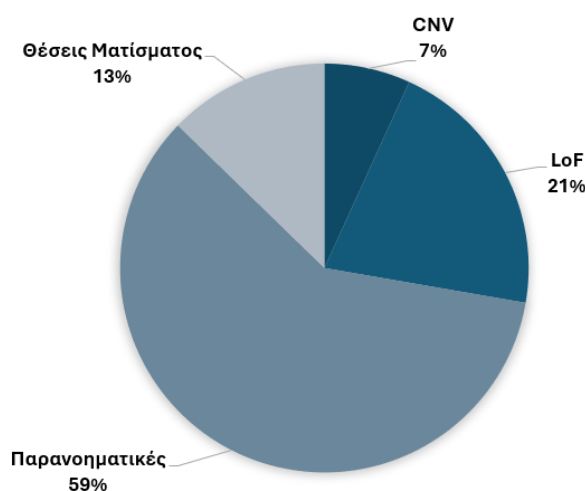
Μεταξύ των 1,656 εξεταζόμενων που ανιχνεύθηκαν παθογόνα ευρήματα 95 από τους αυτούς (5.73%), έφεραν ταυτόχρονα δύο παθογόνες παραλλαγές (Εικόνα 4.5). Ένα ενδιαφέρον περιστατικό αφορά μια ασθενή που διαγνώστηκε με καρκίνο του μαστού στην ηλικία των 27 ετών και βρέθηκε να φέρει δύο παθογόνες παραλλαγές στο γονίδιο *BRCA1*. Αυτές οι παραλλαγές είναι οι c.1287_1291del AGACT, p.(Asp430Thrfs*4) και c.1300_1307dupAGTG ATCC, p.(His437Valfs*7). Επιπλέον, σε δύο ασθενείς εντοπίστηκαν να φέρουν ένα παθογόνο εύρημα στο *BRCA1* και ένα άλλο στο γονίδιο *BRCA2*. Συγκεκριμένα, μια ασθενής που διαγνώστηκε με καρκίνο του μαστού στην ηλικία των 37 ετών έφερε την παθογόνο παραλλαγή c.5467G>A, p.(Ala1823Thr) στο γονίδιο *BRCA1* και το παθογόνο εύρημα c.2490_2491insT, p.(Val831Cysfs*2) στο γονίδιο *BRCA2*. Σε μια άλλη περίπτωση, μια ασθενής που διαγνώστηκε με καρκίνο των ωοθηκών στην ηλικία των 38 ετών βρέθηκε να φέρει την παθογόνο παραλλαγή c.3607C>T, p.(Arg1203*) στο γονίδιο *BRCA1*, και το παθογόνο εύρημα c.9371A>T, p.(Asn3124Ile) στο γονίδιο *BRCA2*.



Εικόνα 4.5. Αριθμός εξεταζόμενων και γονίδια στις περιπτώσεις όπου υπάρχουν δύο παθογόνες παραλλαγές (διπλοί ετεροζυγώτες).

4.1.3. Παραλλαγές στο γονίδιο *CHEK2*

Μεταξύ των παθογόνων παραλλαγών που ανιχνεύθηκαν στο γονίδιο *CHEK2*, στην παρούσα εργασία, ο τύπος των παρανοηματικών παραλλαγών αφορούν το 59% (Εικόνα 4.6). Αυτές οι αλλαγές οδηγούν στην αντικατάσταση ενός αμινοξέος με άλλο στην πρωτεΐνη. Όλες οι παθογόνες παραλλαγές που εντοπίστηκαν στο γονίδιο *CHEK2* φαίνονται στον Πίνακα 4.1.



Εικόνα 4.6. Οι διαφορετικών τύπων παραλλαγών που ανιχνεύθηκαν στο γονίδιο *CHEK2* στην παρούσα μελέτη.

Πίνακας 4.1. Λίστα παθογόνων παραλλαγών στο γονίδιο <i>CHEK2</i>				
Εύρημα	Αριθμός Εξεταζόμενων	Τύπος παραλλαγής	gnomAD (no cancer)	rs
del9-10	9	CNV		
del3-4	3	CNV		
del7	3	CNV		
c.100C>T, p.(Gln34*)	4	LoF	-	rs1231012263
c.1011C>A, p.(Tyr337*)	2	LoF	-	rs760502479
c.1100del, p.(Thr367Metfs*15)	13	LoF	0.00171	rs555607708
c.1164del, p.(Thr389Profs*25)	2	LoF	-	rs758677815

c.1188delT, p.(Val397Phefs*17)	7	LoF	-	rs753159426
c.1232G>A, p.(Trp411*)	10	LoF	-	rs371418985
c.1442T>G, p.(Leu481*)	2	LoF	-	-
c.159_160del, p.(His54Leufs*22)	2	LoF	-	rs2054324732
c.222delT, p.(Pro75Leufs*35)	2	LoF	-	-
c.893_897del, p.(Tyr298Cysfs*12)	2	LoF	6.76764e-6	rs1390889028
c.1427C>T, p.(Thr476Met)	12	Παρανοηματική	0.000318	rs142763740
c.349A>G, p.(Arg117Gly)	2	Παρανοηματική	7.43565e-5	rs28909982
c.470T>C, p.(Ile157Thr)	83	Παρανοηματική	0.00403	rs17879961
c.499G>A, p.(Gly167Arg)	35	Παρανοηματική	1.35239e-5	rs72552322
c.444+1G>A	13	Θέση ματίσματος	8.11381e-5	rs121908698
c.592+3A>T	13	Θέση ματίσματος	1.35248e-5	rs587782849
c.792+2T>A	2	Θέση ματίσματος	-	rs545982789

4.1.4. Παραλλαγές στο γονίδιο *TP53*

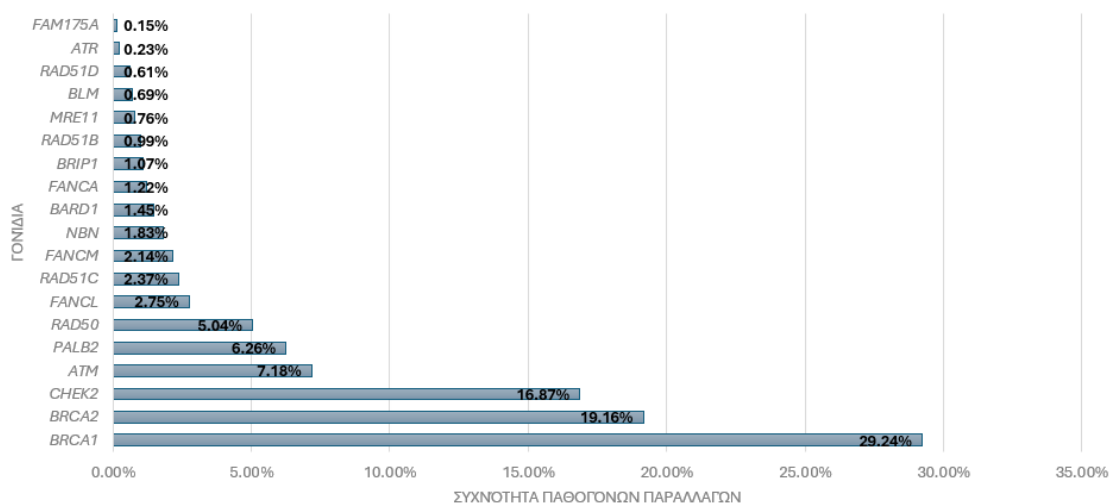
Στην παρούσα διδακτορική διατριβή σε 17 άτομα εντοπίστηκαν παθογόνες παραλλαγές στο γονίδιο *TP53*. Οι περισσότερες από αυτές τις παραλλαγές είναι παρανοηματικές όπως φαίνεται στον πίνακα 4.2.

Εύρημα	Αριθμός Εξεταζόμενων	Εξώνιο	Τύπος παραλλαγής	gnomA D (no cancer)	rs
c.375G>A, p.(Thr125=)	1	Exon 4	Συνώνυμη	-	rs55863639
c.524G>A, p.(Arg175His)	1	Exon 5	Παρανοηματική	4.22e-6	rs28934578
c.542G>A, p.(Arg181His)	1	Exon 5	Παρανοηματική	1.49e-5	rs397514495
c.584T>C, p.(Ile195Thr)	1	Exon 6	Παρανοηματική	-	rs760043106
c.638G>A, p.(Arg213Gln)	1	Exon 6	Παρανοηματική	4.22e-6	rs587778720
c.722C>G, p.(Ser241Cys)	1	Exon 7	Παρανοηματική	-	rs28934573

c.730G>A, p.(Gly244Ser)	1	Exon 7	Παρανοηματική	-	rs1057519989
c.814delinsCTT, p.(Val272Leufs*74)	1	Exon 8	LoF	-	-
c.818G>A, p.(Arg273His)	3	Exon 8	Παρανοηματική	1.69e-5	rs28934576
c.844C>T, p.(Arg282Trp)	1	Exon 8	Παρανοηματική	-	rs28934574
c.916C>T, p.(Arg306*)	1	Exon 8	LoF	-	rs121913344
c.1010G>A, p.(Arg337His)	3	Exon 10	Παρανοηματική	-	rs121912664
c.1025G>C, p.(Arg342Pro)	1	Exon 10	Παρανοηματική	-	rs375338359

4.1.4. Παραλλαγές στα γονίδια ομόλογου ανασυνδυασμού (HR).

Μεταξύ των 1,656 εξεταζόμενων που ανιχνεύθηκαν παθογόνα εύρηματα, 1,310 άτομα βρέθηκαν να φέρουν παθογόνα παραλλαγή σε ένα ή περισσότερα γονίδια που συνδέονται με το μονοπάτι του ομόλογου ανασυνδυασμού (Εικόνα 4.7). Αυτά τα γονίδια που εμπλέκονται στο μονοπάτι του ομόλογου ανασυνδυασμού είναι απαραίτητα για την σταθερότητα και την ακεραιότητα του γονιδιώματος.



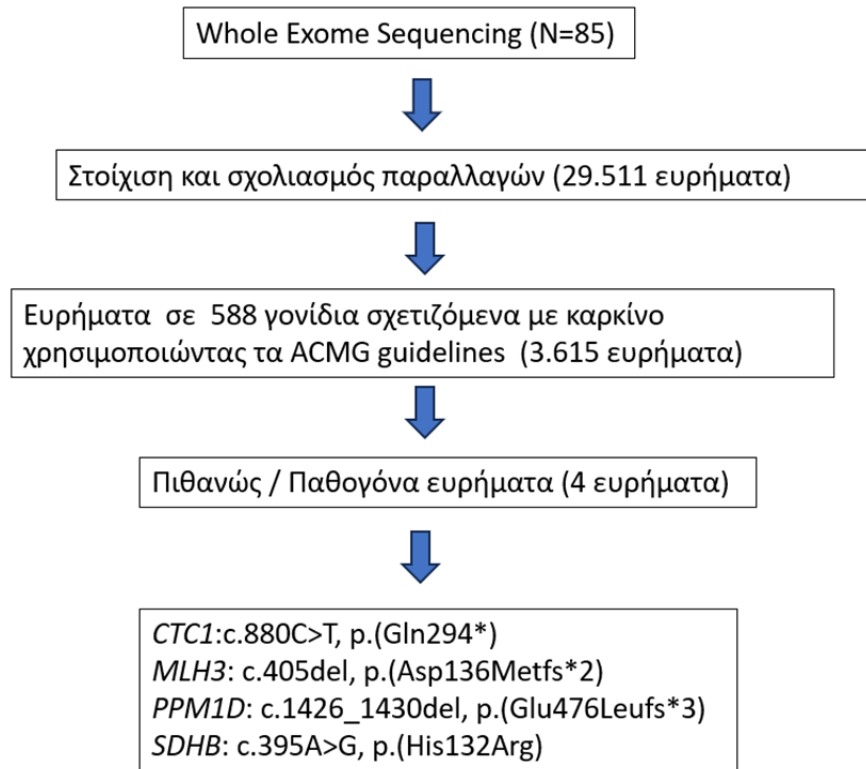
Εικόνα 4.7. Ποσοστό παθογόνων παραλλαγών σε γονίδια που σχετίζονται με τον ομόλογο ανασυνδυασμό (HR).

4.2. Αποτελέσματα από την ανάλυση WES

Στην παρούσα εργασία προκειμένου να αποσαφηνιστεί η γενετική αιτία του καρκίνου του μαστού, πραγματοποιήθηκε ανάλυση WES σε 85 με καρκίνο μαστού. Τα δεδομένα που προέκυψαν (fastq αρχεία) από το NGS αναλύθηκαν στο εμπορικά διαθέσιμο λογισμικό SeqPilot (JSI). Με την χρήση του συγκεκριμένου λογισμικού πραγματοποιήθηκε ευθυγράμμιση και σχολιασμός, οδηγώντας στον εντοπισμό ενός σημαντικού αριθμού παραλλαγών κατά μέσο 29.511.

Στην συνέχεια από τις παραπάνω παραλλαγές αξιολογήθηκαν αυτές που ανιχνεύθηκαν σε 588 γονίδια που σχετίζονται με τον καρκίνο, ακολουθώντας τις οδηγίες που έχει θέσει το Αμερικανικό Κολέγιο Ιατρικής Γενετικής και Γονιδιωματικής (American College of Medical Genetics and Genomics - ACMG). Προέκυψαν κατά μέσο όρο 3.615 παραλλαγές οι οποίες κατηγοριοποιήθηκαν στις πέντε κλάσεις (μη παθογόνα, πιθανώς μη παθογόνα, αδιευκρίνιστης κλινικής σημασίας (VUS), πιθανώς παθογόνα και παθογόνα ευρήματα).

Χρησιμοποιώντας την ανάλυση WES, από 3.615 παραλλαγές χαρακτηρίστηκαν ως παθογόνες/ πιθανώς παθογόνες οι ακόλουθες: *CTC1*:c.880C>T, p.(Gln294*); *MLH3*: c.405del, p.(Asp136Metfs*2), *PPM1D*: c.1426_1430del, p.(Glu476Leufs*3), και *SDHB*: c.395A>G, p.(His132Arg) (Εικόνα 4.8).

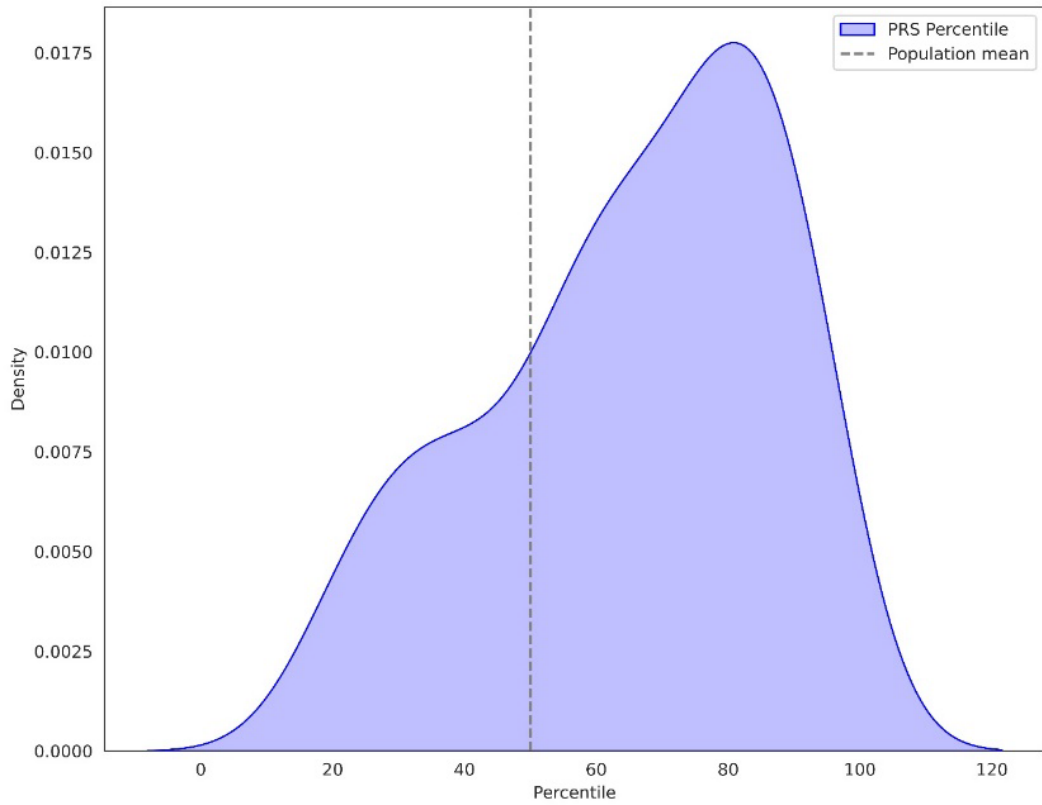


Εικόνα 4.8. Σχηματική απεικόνιση που πραγματοποιήθηκε στην ανάλυση WES και τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης.

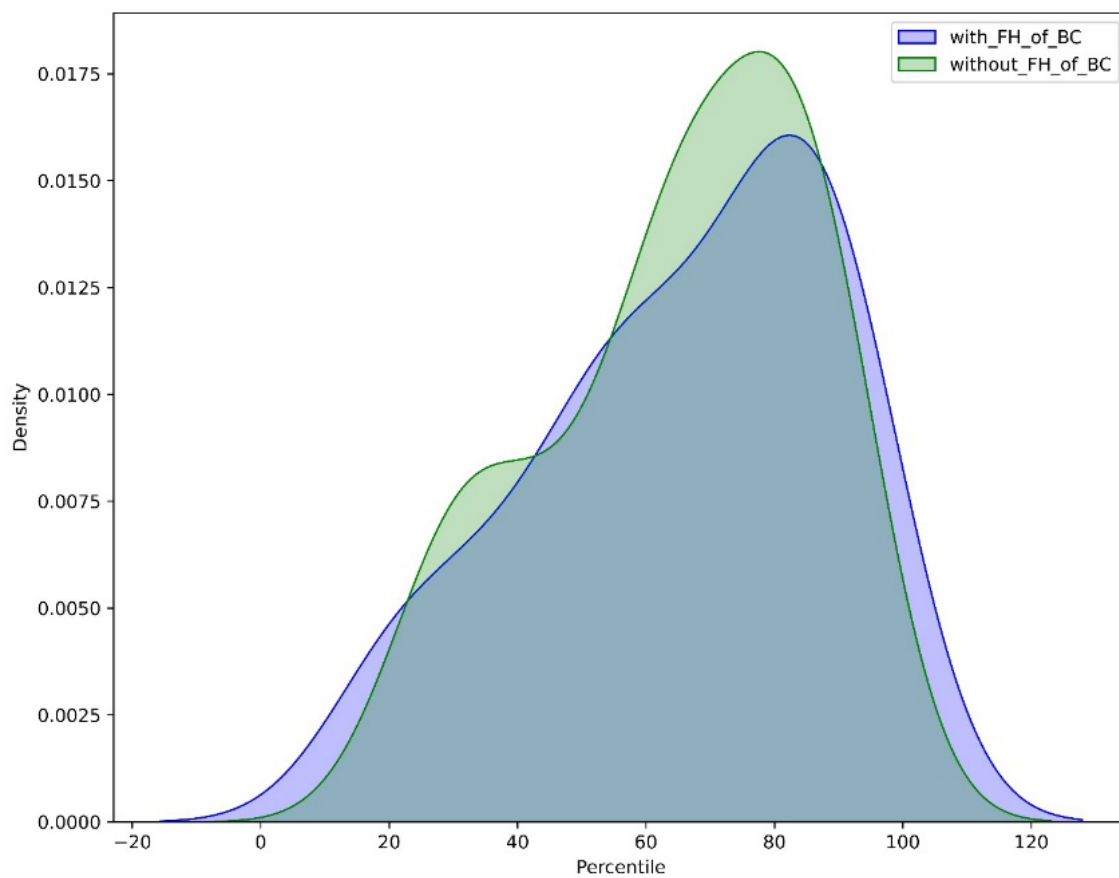
4.3. Αποτελέσματα εκτίμησης πολυγονιδιακού κινδύνου (PRS)

Η χρήση της κατηγοριοποίησης εκατοστημορίου για το PRS στην ομάδα μελέτης της παρούσας διατριβής, έδειξε ότι έχει υψηλότερη τιμή από τον γενικό πληθυσμό, όπως καθορίζεται από τη βιοτράπεζα του Ηνωμένου Βασιλείου (εσωτερικά δεδομένα Allelica) (Εικόνα 4.9). Επιπλέον, αυξημένες τιμές PRS παρατηρήθηκαν τόσο σε ασθενείς με οικογενειακό ιστορικό με καρκίνο μαστού όσο και χωρίς. Παρ'όλα αυτά, η έντονη δεξιά ασύμμετρη κατανομή των ασθενών με οικογενειακό ιστορικό καρκίνο μαστού, υποδηλώνει ότι οι τιμές PRS είναι πιο αυξημένες σε αυτό το υποσύνολο ασθενών (Εικόνα 4.10).

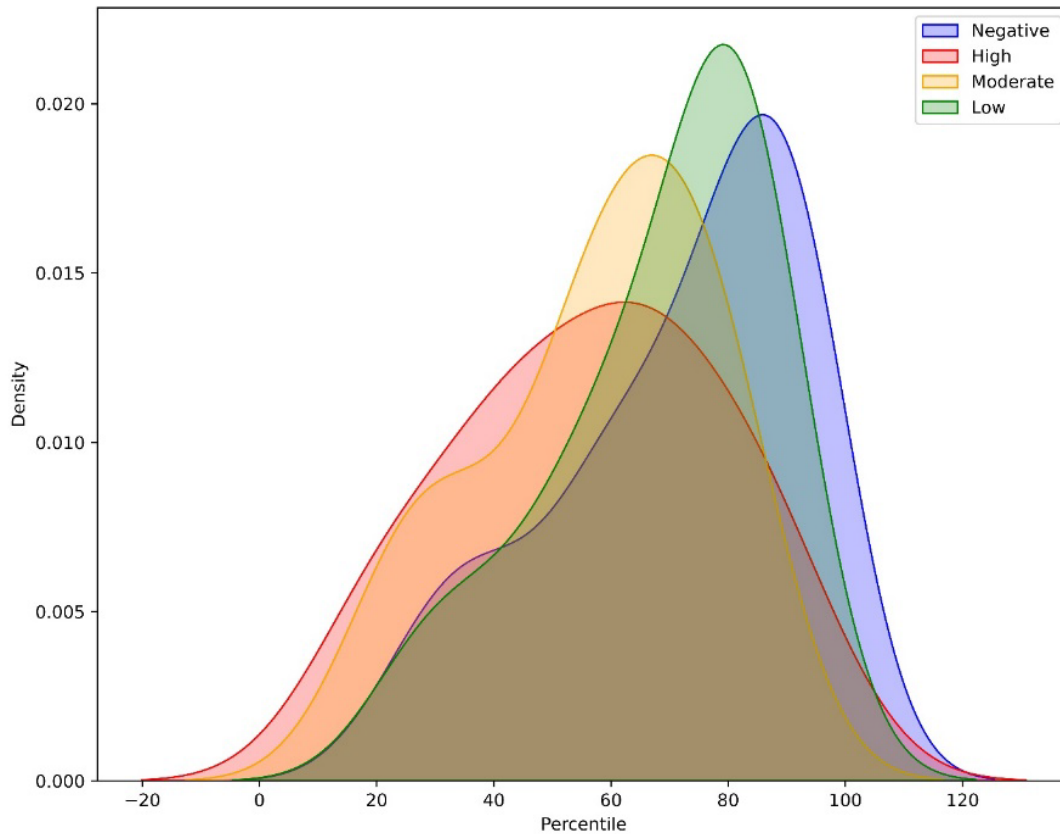
Όσον αφορά την ύπαρξη παθογόνου παραλλαγής, οι ασθενείς με θετικό γενετικό αποτέλεσμα σε ένα γονίδιο υψηλού κινδύνου εμφάνισαν χαμηλότερες τιμές κατανομής PRS από εκείνους που φέρουν παθογόνο παραλλαγή σε ένα γονίδιο ενδιάμεσης ή χαμηλής διεισδυτικότητας. Στους ασθενείς με αρνητικό πολυγονιδιακό γενετικό έλεγχο παρατηρήθηκαν αυξημένες τιμές PRS (Εικόνα 4.11). Επομένως, υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στο εκατοστημόριο PRS που παρατηρείται σε ασθενείς με γονιδιακή παραλλαγή σε γονίδια υψηλού ή ενδιάμεσου κινδύνου σε σύγκριση με ασθενείς με αρνητικά αποτελέσματα ($p=0,013$ και $p=0,015$ αντίστοιχα). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στις τιμές PRS μεταξύ φορέων παραλλαγών σε γονίδια χαμηλής διεισδυτικότητας και μη φορέων ($p=0,600$).



Εικόνα 4.9 . Εκατοστημόρια κατανομή PRS σε 105 ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Η διακεκομμένη γραμμή αντιπροσωπεύει τη μέση αναμενόμενη PRS στον γενικό πληθυσμό.



Εικόνα 4.10 . Εκατοστημότητα κατανομή PRS σε ασθενείς με και χωρίς οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού.



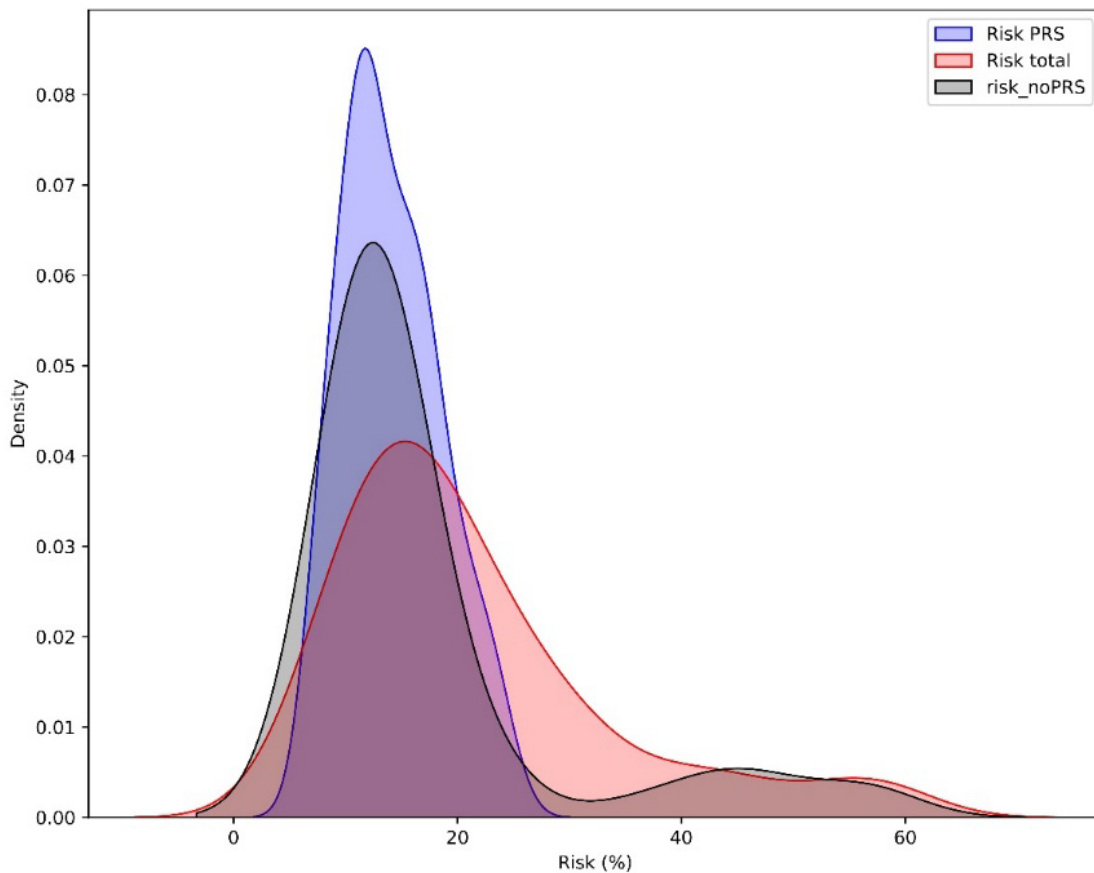
Εικόνα 4.11 . Εκατοστημότητα κατανομή PRS σε ασθενείς χωρίς παθογόνες γονιδιακές παραλλαγές και με παθογόνα ευρήματα σε γονίδια υψηλού, ενδιάμεσου και χαμηλού κινδύνου.

Η κατανομή εκτίμησης του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου μαστού που καθορίστηκε από τα αποτελέσματα PRS έδειξε ότι αυξημένος κίνδυνος αφορούσε μόνο 12,38% (13/105) των γυναικών της παρούσας εργασίας. Από την πολυπαραγοντική ανάλυση που περιλαμβάνει το οικογενειακό καρκίνο μαστού, την γονιδιακή κατάσταση και το PRS, διαπιστώθηκε ότι το 41,90% (44/105) των ασθενών παρουσίασαν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου (Εικόνα 4.12).

Μεταξύ των ασθενών με οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού, το PRS χωρίς να ληφθούν υπόψη άλλοι παράγοντες κινδύνου, θα μπορούσε να εντοπίσει αυξημένο

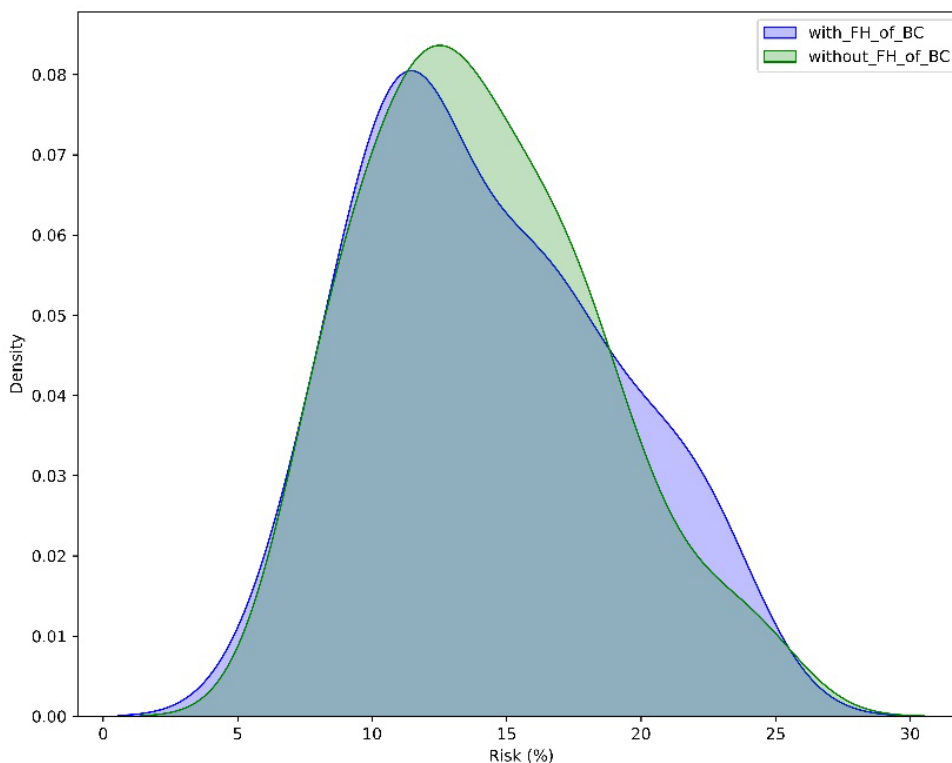
κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου μαστού (>20%) στο 15% των ασθενών, ενώ το ποσοστό αυτό μειώνεται ελαφρώς στο 10,77% σε ασθενείς χωρίς οικογενειακό ιστορικό.

Όταν το οικογενειακό ιστορικό, η γονιδιακή κατάσταση όσο και το PRS λαμβάνονται υπόψη στην εκτίμηση κινδύνου, στο 65,00% των περιπτώσεων με οικογενειακό ιστορικό παρατηρήθηκε αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου μαστού, με μέση ηλικία διάγνωσης της νόσου τα 47.31 έτη (29-67 έτη). Αντίθετα, το ποσοστό αυτό περιορίστηκε μόνο στο 27,69% σε ασθενείς χωρίς οικογενειακό ιστορικό καρκίνου μαστού, με μέση ηλικία διάγνωσης της νόσου τα 41.95 έτη (28-64 έτη) (Εικόνα 4.13). Η διαφορά του υψηλού PRS μεταξύ γυναικών με και χωρίς οικογενειακό ιστορικό καρκίνου μαστού είναι στατιστικά σημαντική ($p<0,01$).



Εικόνα 4.12. Κατανομή κινδύνου καρκίνου μαστού με βάση μόνο το PRS, το οικογενειακό ιστορικό καρκίνου μαστού και γονιδιακή κατάσταση χωρίς το PRS (κίνδυνος χωρίς PRS)

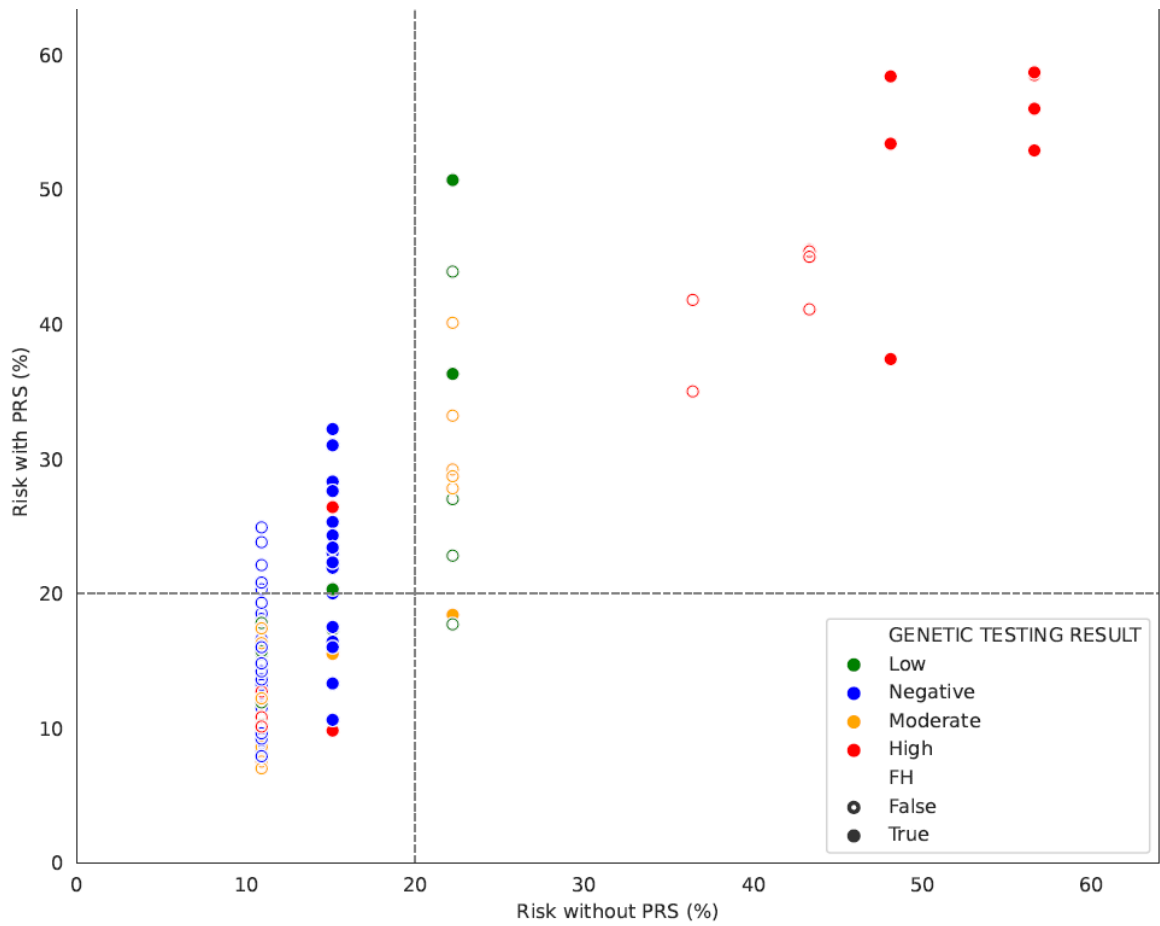
και συμπεριλαμβάνοντας όλους τους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του PRS (σύνολο κινδύνου).



Εικόνα 4.13 . Εκτίμηση κινδύνου βάσει του PRS σε ασθενείς με και χωρίς οικογενειακό ιστορικό καρκίνου μαστού.

Επιπλέον, το PRS διαφέρει σημαντικά μεταξύ ηλικιωμένων και νεότερων ασθενών. Στην ομάδα μελέτης της παρούσας διατριβής το 16,42% (11/67) των ασθενών ηλικίας <45 ετών εμφάνισαν αυξημένο PRS (διάμεσος κίνδυνος 15,5%), σε σύγκριση με το 5,26% (2/38) των ασθενών ηλικίας ≥45 ετών (διάμεσος κίνδυνος 11,5%).

Επιπροσθέτως, υψηλό PRS παρατηρήθηκε στους ασθενείς που δεν είχαν παθογόνο παραλλαγή, αποτελώντας το 25,53% των περιπτώσεων. Αντίθετα, μόνο το 1,72% των ασθενών με παθογόνο παραλλαγή είχαν αυξημένο PRS (Εικόνα 4.14).



Εικόνα 4.14. Η κατανομή κινδύνου με και χωρίς την ενσωμάτωση PRS έχει ως αποτέλεσμα οι ασθενείς να κατηγοριοποιούνται ανάλογα με το οικογενειακό ιστορικό και την γονιδιακή κατάσταση.

5. Συζήτηση

5.1. Στοχευμένο πάνελ γονιδίων

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκαν προηγμένες τεχνικές μοριακής βιολογίας, όπως η τεχνολογία NGS για την ανίχνευση παραλλαγών σε γονίδια που σχετίζονται με κληρονομικό καρκίνο. Το NGS επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση πολλών γονιδίων και πολλών δειγμάτων ταυτόχρονα, επιτρέποντας την συνολική αξιολόγηση των γενετικών παραλλαγών που προδιαθέτουν για διάφορες μορφές καρκίνου. Επιπλέον, η τεχνολογία NGS επιτρέπει πιο γρήγορη και οικονομική ανάλυση των γονιδίων που σχετίζονται με τον κληρονομικό καρκίνο [43].

Η μελέτη περιλάμβανε την γενετική ανάλυση γονιδίων που σχετίζονται με την προδιάθεση για κληρονομικό καρκίνο σε 8,261 ατόμων που παραπέμφθηκαν στο εργαστήριο της Genekor I.A.E. Αυτός ο σημαντικός αριθμός ατόμων υπογραμμίζει την έκταση και το βάθος της μελέτης για την ανίχνευση γενετικών παραγόντων που σχετίζονται με τον κληρονομικό καρκίνο. Η συμπερίληψη μιας τόσο μεγάλης ομάδας δείχνει τη σημαντική ζήτηση για γενετικές εξετάσεις στον τομέα της ογκολογίας και επισημαίνει τη σημασία της γνώσης των κληρονομικών παραγόντων στην εκτίμηση και διαχείριση του κινδύνου καρκίνου.

Από την ανάλυση των δεδομένων προέκυψε ότι στο 20% των εξεταζόμενων έφερε τουλάχιστον μία παθολόγο παραλλαγή στα υπο ανάλυση γονίδια. Οι γενετικές αυτές αλλαγές είναι γνωστό ότι αυξάνουν τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου. Η ανίχνευση των παθολόγων αλλαγών τονίζει τη σημαντική αξία της γενετικής εξέτασης στην ύπαρξη πιθανής γενετικής προδιάθεσης και αναδεικνύει τη χρησιμότητα τέτοιων αναλύσεων στην κλινική πρακτική. Η ύπαρξη παθολόγων παραλλαγών σε συγκεκριμένα γονίδια επιτρέπει την εκτίμηση κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου, την συστηματική παρακολούθηση και πιθανές προληπτικές ενέργειες για την μείωση του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου.

Μεταξύ των ατόμων που φέρουν παθογόνες παραλλαγές, σε ένα σημαντικό ποσοστό που ανέρχεται στο 54,8% (908 από 1.656), βρέθηκε να φέρει αυτές τις παραλλαγές σε γονίδια που έχουν χαρακτηρίζονται ως κλινικά σημαντικά. Συγκεκριμένα, τα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2*, καλά εδραιωμένα και χαρακτηρισμένα γονίδια που σχετίζονται με το σύνδρομο κληρονομικού καρκίνου του μαστού και των ωοθηκών, αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο ποσοστό ανίχνευσης παθογόνων παραλλαγών (*BRCA1*: 23,13% και *BRCA2*: 15,16%).

Επιπλέον, άλλα γονίδια που εμπλέκονται σε σύνδρομα κληρονομικού καρκίνου παρουσίασαν ποικίλες συχνότητες παθογόνων παραλλαγών στους εξεταζόμενους της παρούσας διατριβής. Όπως τα γονίδια *PALB2*, *RAD51C* και *PMS2*, στα οποία ανιχνεύθηκαν το 4,95%, 1,87% και 1,57% των παραλλαγών, αντίστοιχα. Επιπλέον, η ανίχνευση παθογόνων σε γονίδια, όπως *CDKN2A*, *MLH1*, *MSH2*, *TP53*, *MSH6*, *APC*, *RAD51D*, *PTEN*, *RET*, *CDH1*, *MEN1* και *VHL*, υπογραμμίζει τη σημασία του γενετικού ελέγχου για την ύπαρξη πιθανών παραγόντων κινδύνου σε ένα φάσμα καρκινικών τύπων και συνδρόμων [44].

Επιπροσθέτως, μια σημαντική και αξιοσημείωτη παρατήρηση μεταξύ των ανιχνευθέντων παθογόνων παραλλαγών είναι η ύπαρξη των μεγάλων γενωμικών αναδιατάξεων (CNVs) σε ένα σημαντικό ποσοστό εξεταζομένων, που αντιπροσωπεύει το 6,52% (108 από 1,656). Αυτή η παρατήρηση τονίζει το ποικιλόμορφο φάσμα γενετικών παραλλαγών που σχετίζονται με την κληρονομική προδιάθεση για καρκίνο. Το γεγονός αυτό υπογραμμίζει τη σημασία των ολοκληρωμένων τεχνικών γενετικής ανάλυσης που επιτρέπουν την ανίχνευση διάφορων τύπων γενετικών ανωμαλιών [45]. Τα CNVs αντιπροσωπεύουν μια κατηγορία γενετικών παραλλαγών που χαρακτηρίζονται από επαναλήψεις, ελλείψεις ή αναδιοργανώσεις μεγάλων τμημάτων DNA, οι οποίες μπορούν να έχουν σοβαρές επιπτώσεις στη λειτουργία των γονιδίων. Στο πλαίσιο της κληρονομικής προδιάθεσης για καρκίνο, τα CNVs μπορούν να περιλαμβάνουν μεταβολές σε

ογκοκατασταλτικά γονίδια ή ογκογονίδια, επηρεάζοντας σημαντικά τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου ενός ατόμου. Αυτά τα ευρήματα τονίζουν την αναγκαιότητα χρήσης προηγμένων γενετικών τεχνολογιών που μπορούν να ανιχνεύσουν CNVs καθώς και SNVs και μικρές προσθήκες/διαγραφές (indels) για μια συνολική εκτίμηση των γενετικών παραγόντων κινδύνου [46].

Μια ακόμη σημαντική παρατήρηση της παρούσας εργασίας είναι ότι στα άτομα που έφεραν παθογόνα ευρήματα, στο 5,73% (95 από 1.656) ανιχνεύθηκαν δύο παθογόνες παραλλαγές. Αυτή η παρατήρηση υπογραμμίζει την πολυπλοκότητα της γενετικής προδιάθεσης ορισμένες περιπτώσεις, υποδεικνύοντας μια πολυπαραγοντική συνεισφορά στην ανάπτυξη καρκίνου [47]. Η ύπαρξη ατόμων με διπλές παθογόνες παραλλαγές εγείρει αρκετές ερωτήσεις σχετικά με την αλληλεπίδραση αυτών των γενετικών αλλαγών και την σωρευτική τους επίδραση στον κίνδυνο καρκίνου. Υποδεικνύει την παρουσία συνεργιστικών ή προσθετικών επιδράσεων, όπου ο συνδυασμός πολλών παθογόνων αλλαγών μπορεί να προσδώσει ακόμα μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου σε σύγκριση με την παρουσία μόνο μιας παραλλαγής [48].

5.1.2. Στοχευμένο πάνελ γονιδίων – *CHEK2* γονίδιο

Το γονίδιο *CHEK2* παράγει την πρωτεΐνη που ονομάζεται checkpoint kinase 2, η οποία είναι απαραίτητη για την επιδιόρθωση του DNA και τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Οι παραλλαγές σε αυτό το γονίδιο συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο διαφόρων τύπων καρκίνων, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού [49]. Βάση της διεθνούς βιβλιογραφίας οι παθογόνες παραλλαγές στο γονίδιο *CHEK2* σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού μπορεί να διαφέρουν μεταξύ των πληθυσμών και των περιοχών. Σε ευρωπαϊκές μελέτες, αυτές οι παραλλαγές έχουν βρεθεί στο 1-5% των ασθενών με καρκίνο του μαστού, υποδεικνύοντας ότι οι παραλλαγές στο γονίδιο *CHEK2* θα μπορούσαν να συνεισφέρουν σημαντικά στην ανάπτυξη καρκίνου του μαστού σε αυτούς τους πληθυσμούς. Αντιθέτως,

η επικράτηση παθογόνων παραλλαγών στο *CHEK2* φαίνεται να είναι χαμηλότερη σε άλλους πληθυσμούς, όπως οι Ασιάτες ή οι Αφρικανοί [50].

Η κλινική σημασία των παραλλαγών του γονιδίου *CHEK2* σχετίζεται με το είδος της παραλλαγής και την επίδρασή της στη λειτουργία της πρωτεΐνης. Ορισμένες παραλλαγές μπορεί να προκαλέσουν μέτρια αύξηση του κινδύνου, ενώ άλλες θα μπορούσαν να συνδέονται με υψηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου μαστού [51]. Οι παραλλαγές που προκαλούν αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης (frameshift) αναμένεται να οδηγήσουν σε μια μη λειτουργική ή μερικώς λειτουργική πρωτεΐνη. Οι παραλλαγές αυτές στο γονίδιο *CHEK2* έχουν συνδεθεί με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου του μαστού, του προστάτη και άλλων καρκίνων [52].

Οι παρανοηματικές παραλλαγές (missense) είναι αλλαγές σε έναν μόνο νουκλεοτίδιο που οδηγούν στην αντικατάσταση ενός αμινοξέος από κάποιο άλλο. Στο γονίδιο *CHEK2*, οι παραλλαγές αυτού του τύπου μπορούν να επηρεάσουν τη δομή και τη λειτουργία της πρωτεΐνης, μεταβάλλοντας τη τρισδιάστατη διαμόρφωση ή τη ενζυματική δραστηριότητά της. Ανάλογα με την θέση και τη φύση της αλλαγής αμινοξέων, οι παραλλαγές αυτού του τύπου μπορεί να αυξήσουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου. Ορισμένες παρανοηματικές παραλλαγές μπορεί να οδηγήσουν σε προβληματική πρωτεΐνη, διαταράσσοντας τις φυσιολογικές κυτταρικές διεργασίες. Άλλες μπορεί να οδηγήσουν σε μη λειτουργική πρωτεΐνη, επηρεάζοντας την ικανότητα του κυττάρου να ανταποκριθεί στην επιδιόρθωση του DNA και να διατηρεί τη γενετική σταθερότητα [53]. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, το φάσμα των γενετικών παραλλαγών που παρατηρήθηκε στο γονίδιο *CHEK2*, το 59% των παθογόνων παραλλαγών αφορούσαν παρανοηματικές αλλαγές.

5.1.3. Στοχευμένο πάνελ γονιδίων – *TP53* γονίδιο

Το σύνδρομο Li-Fraumeni (LFS) είναι ένα σπάνιο κληρονομικό σύνδρομο προδιάθεσης για καρκίνο, το οποίο χαρακτηρίζεται από σημαντικά αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου σε νεαρή ηλικία. Το LFS προκαλείται κυρίως από γονιδιακές παραλλαγές στο γονίδιο *TP53*, το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p53 [54]. Το γονίδιο *TP53* παίζει κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση της ανάπτυξης των κυττάρων, της επιδιόρθωσης του DNA και της απόπτωσης και συμβάλλει στην γενετική σταθερότητα [55]. Τα άτομα με LFS έχουν υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης διαφόρων τύπων καρκίνων, συμπεριλαμβανομένων των σαρκωμάτων μαλακών ιστών, οστεοσαρκομάτων, καρκίνου του μαστού, όγκων εγκεφάλου, λευχαιμίας, καρκίνου του παχέος εντέρου, μελανώματος και άλλων σπάνιων καρκίνων [56]. Το χαρακτηριστικό γνώρισμα του LFS είναι η πρώιμη εμφάνιση πολλαπλών πρωτογενών καρκίνων σε διάφορα συστήματα οργάνων, συχνά πριν την ηλικία των 45 ετών. Το πρότυπο κληρονόμησης του καρκίνου στο LFS ακολουθεί αυτοσωμικό επικρατές πρότυπο.

Το σύνδρομο Like Li-Fraumeni (LFL) αναφέρεται σε οικογένειες που εμφανίζουν ορισμένα, αλλά όχι όλα, από τα κλασικά χαρακτηριστικά του LFS. Αυτές οι οικογένειες συνήθως έχουν ιστορικό πρώιμων καρκίνων, συχνά σε πολλές γενιές, που υποδεικνύει μια κληρονομική προδιάθεση για καρκίνο. Ωστόσο, μπορεί να μην πληρούν τα αυστηρά διαγνωστικά κριτήρια για LFS λόγω έλλειψης συγκεκριμένων τύπων καρκίνου ή της παρουσίας πρόσθετων γενετικών ή περιβαλλοντικών παραγόντων που επηρεάζουν τον κίνδυνο καρκίνου [57].

Η γενετική βάση του LFL είναι ετερογενής και οι παραλλαγές σε γονίδια εκτός του *TP53* μπορεί να συμβάλλουν στην παρατηρούμενη προδιάθεση για καρκίνο σε αυτές τις οικογένειες. Για παράδειγμα, οι παραλλαγές σε γονίδια όπως τα *CHEK2*, *BRCA1*, *BRCA2*

και άλλα έχουν εμπλακεί σε οικογενειακά σύνδρομα καρκίνου με επικαλυπτόμενα χαρακτηριστικά με το LFS [58].

Η διαχείριση ατόμων με LFS ή LFL συνήθως περιλαμβάνει τακτικό έλεγχο για ύπαρξη καρκίνου και παρακολούθηση ξεκινώντας από νεαρή ηλικία για την ανίχνευση όγκων στα πρώιμα, πιο θεραπεύσιμα στάδια τους. Η γενετική συμβουλευτική είναι απαραίτητη στα άτομα με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου καθώς και στις οικογένειές τους για την αξιολόγηση του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου. Επιπλέον, οι τροποποιήσεις στον τρόπο ζωής, όπως η αποφυγή του καπνίσματος, η διατήρηση ενός φυσιολογικού βάρους και η περιορισμένη έκθεση σε περιβαλλοντικούς καρκινογόνους παράγοντες, μπορούν να βοηθήσουν στη μείωση του κινδύνου καρκίνου σε αυτά τα άτομα [59].

Στη παρούσα μελέτη, οι πιο συχνές παραλλαγές που παρατηρήθηκαν στο γονίδιο *TP53* ήταν παρανοηματικές, οι οποίες αποτελούσαν το 88,2% των αλλαγών. Οι αλλαγές αυτές στο γονίδιο *TP53* είναι ιδιαίτερα σημαντικές λόγω του κρίσιμου ρόλου που παίζει το *TP53* στη ρύθμιση της κυτταρικής διαίρεσης [60].

5.1.4. Γονίδια Ομόλογου Ανασυνδυασμού

Η ύπαρξη παθογόνων παραλλαγών σε γονίδια του ομόλογου ανασυνδυασμού δίνει σημαντικές πληροφορίες πέρα από τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου αλλά και επιλογές για την σωστή θεραπευτική προσέγγιση των ασθενών [61]. Στη παρούσα διατριβή, το 79,1% των εξεταζόμενων έφερε παθογόνες παραλλαγές σε γονίδια που σχετίζονται με το μονοπάτι του ομόλογου ανασυνδυασμού.

5.2. Ανάλυση όλων των λειτουργικών εξωνίων του γονιδιώματος (WES)

Η πλήρης ανάλυση όλων των λειτουργικών εξωνίων του γονιδιώματος (WES) είναι μια σημαντική καινοτομία στη γενετική, επιτρέποντας στους επιστήμονες και τους επαγγελματίες υγείας να αναλύσουν σε βάθος τη γενετική σύνθεση ενός ατόμου.

Αυτή η προηγμένη μέθοδος επικεντρώνεται κυρίως στην προσεκτική εξέταση των εξωνίων, των τμημάτων του DNA που είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση πρωτεϊνών. Ενδιαφέρον είναι ότι αυτό το τμήμα αποτελεί ένα μικρό ποσοστό, γύρω στο 1-2%, του συνολικού γονιδιώματος [62]. Παρά το μικρό του μέγεθος σε σύγκριση με ολόκληρο το γονιδίωμα, το WES κατέχει μεγάλη σημασία στη γενετική έρευνα.

Μια σημαντική εφαρμογή του WES είναι στον τομέα της ογκολογίας, ιδίως στη αποκωδικοποίηση των περίπλοκων σχέσεων των γενετικών μεταβολών στην ανάπτυξη του καρκίνου.

Το WES έχει διαδραματίσει καθοριστικό ρόλο στην αποκάλυψη του σύνθετου δικτύου που περιβάλλει την ανάπτυξη του καρκίνου όπως ο καρκίνος του μαστού, μια πολυπαραγοντική ασθένεια που επηρεάζεται από συνδυασμό γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Στο πεδίο της γενετικής, συγκεκριμένες παραλλαγές γονιδίων, ιδιαίτερα σε σημαντικά γονίδια, συνεισφέρουν σημαντικά στον αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου μαστού [63].

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μέσω WES εντοπίστηκαν οι εξής γενετικές παραλλαγές: *CTC1*:c.880C>T, p.(Gln294*); *MLH3*:c.405del, p.(Asp136Metfs*2); *PPM1D*: c.1426_1430del, p.(Glu476Leufs*3); και *SDHB*: c.395A>G, p.(His132Arg).

Το γονίδιο *CTC1*, μέρος του συμπλέγματος CST, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της σταθερότητας των τελομερών στα άκρα των χρωμοσωμάτων. Τα τελομερή προστατεύουν το γενετικό υλικό κατά την αντιγραφή του DNA και προφυλάσσουν τα χρωμοσώματα από την αποδόμηση [64]. Η παραλλαγή c.880C>T, p.(Gln294*) οδηγεί σε

πρόωρο κωδικόνιο τερματισμού, σχηματίζοντας κολοβή πρωτεΐνη. Στη συντήρηση των τελομερών, τέτοιες παραλλαγές, μπορεί να εμποδίσουν την αλληλεπίδραση του CTC1 με το σύμπλεγμα CST ή τον ρόλο του στη ρύθμιση του μήκους των τελομερών [65]. Ως εκ τούτου, τα τελομερή μπορεί να αποσταθεροποιηθούν ταχύτερα προκαλώντας αστάθεια του γονιδιώματος και αυξημένο κίνδυνο γενετικών διαταραχών.

Το γονίδιο *MLH3* έχει σημαντικό ρόλο στην επιδιόρθωση του DNA και στη διατήρηση της σταθερότητας και της ακεραιότητας του γονιδιώματος. Η παραλλαγή c.405del, p.(Asp136Metfs*2) οδηγεί σε πρόωρο τερματισμό της πρωτεϊνοσύνθεσης κωδικόνιο. Παραλλαγές όπως η c.405del, p.(Asp136Metfs*2), είναι συχνά παθογόνες, επηρεάζοντας τη φυσιολογική λειτουργία του *MLH3*. Αυτές οι παραλλαγές προσδίδουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ορισμένων καρκίνων, όπως αυτοί που συνδέονται με το σύνδρομο Lynch [66].

Το γονίδιο *PPM1D* (Protein Phosphatase Mg²⁺/Mn²⁺ Dependent 1D), επίσης γνωστό ως Wip1, παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των κυτταρικών αντιδράσεων στο στρες και στη βλάβη του DNA. Κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που δρα ως φωσφατάση. Αυτή η δράση μπορεί να ρυθμίσει τη δραστηριότητα διαφόρων πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε κρίσιμες κυτταρικές διαδικασίες [67]. Η παραλλαγή c.1426_1430del, p.(Glu476Leufs*3) στο γονίδιο *PPM1D* έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή στο πλαίσιο ανάγνωσης που οδηγεί στη δημιουργία ενός πρόωρου κωδικονίου τερματισμού. Αυτή η παραλλαγή μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη ευαισθησία στη γενετική αστάθεια και στην ανάπτυξη διαφόρων τύπων καρκίνου. Σημειωτέων, ορισμένες παραλλαγές στο γονίδιο *PPM1D* έχουν συνδεθεί με προδιάθεση για μια σειρά από καρκίνους, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού και του καρκίνου των ωοθηκών [68].

Το γονίδιο *SDHB* (Succinate Dehydrogenase Complex Iron Sulfur Subunit B) κωδικοποιεί για ένα κρίσιμο συστατικό του μιτοχονδριακού ενζυμικού συμπλέγματος γνωστού ως αφυδρογονάση του διακλαδισμένου δικτύου (SDH) ή σύμπλεγμα II. Αυτό το

ενζυμικό σύμπλεγμα παίζει καίριο ρόλο τόσο στον κύκλο του κιτρικού οξέος (κύκλος του Krebs) όσο και στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων μέσα στα μιτοχόνδρια [69]. Η παραλλαγή c.395A>G, p.(His132Arg) στο γονίδιο *SDHB* περιλαμβάνει μια αλλαγή ενός νουκλεοτιδίου στη θέση 395. Οι παραλλαγές στο *SDHB* σχετίζονται με κληρονομικά σύνδρομα παρααγγλιώματος και φαιοχρωμοκυτώματος [70].

5.3. Εκτίμηση Πολυγονιδιακού Κινδύνου (PRS)

Ο γενετικός έλεγχος θεωρείται σημαντικός για τις γυναίκες με οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού ή προσωπικό ιστορικό καρκίνου μαστού [71]. Παρά το γεγονός ότι μια τέτοια ανάλυση μπορεί να προσδιορίσει τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου μαστού σε ασθενείς με παθογόνο εύρημα, παραμένει αδιευκρίνιστος ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου μαστού σε περίπτωση αρνητικού γενετικού αποτελέσματος. Η εκτίμηση πολυγονιδιακού κινδύνου (PRS) χρησιμοποιείται ολοένα και περισσότερο για τη διενέργεια ελέγχου του γενικού πληθυσμού με σκοπό την εκτίμηση κινδύνου διαφόρων ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου. Επομένως, η ενσωμάτωση του PRS στην υγειονομική περίθαλψη για λήψη αποφάσεων έχει προταθεί σε αρκετές μελέτες [72].

5.3.1. Εκτίμηση Κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου μαστού βασισμένη στο PRS

Στην παρούσα διατριβή, πραγματοποιήθηκε αναδρομική εκτίμηση του κινδύνου καρκίνου μαστού από την ανάλυση του PRS, σε ασθενείς που είχαν ήδη διαγνωστεί με καρκίνο του μαστού, λαμβάνοντας υπόψη και άλλους σημαντικούς παράγοντες, όπως το οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού και τα αποτελέσματα γενετικών εξετάσεων βασισμένων σε NGS σε γονίδια σχετιζόμενα με τον καρκίνο του μαστού. Δεδομένου ότι ο καρκίνος του μαστού είχε ήδη εκδηλωθεί στην ομάδα μας, ο στόχος της μελέτης ήταν να εξετάσει εάν η προσθήκη των αποτελεσμάτων του PRS σε άλλους παράγοντες κινδύνου θα μπορούσε να βελτιώσει το ποσοστό ανίχνευσης ατόμων υψηλού κινδύνου που θα είχαν

επωφεληθεί από προληπτικό έλεγχο πριν από την εμφάνιση της ασθένειας. Τα αποτελέσματα της διατριβής υποδεικνύουν ότι η προσθήκη του PRS στην εκτίμηση κινδύνου καρκίνου αυξάνει σημαντικά την ευαισθησία της εκτίμησης κινδύνου.

Συγκεκριμένα, στην ομάδα των ασθενών με αρνητικό γονιδιακό έλεγχο ανιχνεύθηκε υψηλό PRS, αντιπροσωπεύοντας το 25,53%, σε αντίθεση με την ομάδα με θετικό γονιδιακό έλεγχο με ποσοστό 1,72%. Η διαφορά στις τιμές PRS μεταξύ γυναικών που είχαν αρνητικά αποτελέσματα γονιδιακού ελέγχου και εκείνων που είχαν παθογόνο παραλλαγή σε γονίδια ήταν στατιστικά σημαντική ($p = 0,0028$). Επομένως, το PRS φαίνεται να έχει αμελητέα επιρροή στην εκτίμηση κινδύνου σε άτομα που φέρουν παθογόνες παραλλαγές σε γονίδια υψηλού και ενδιάμεσου κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου μαστού καθώς η μονογονιδιακή παραλλαγή αντιπροσωπεύει την πιο πιθανή αιτία ανάπτυξης του καρκίνου μαστού. Ενώ, στις ασθενείς με αρνητικό γενετικό έλεγχο η μεγαλύτερη επιρροή στην εμφάνιση της ασθένειας αποδίδεται σε πολυγονιδιακή αιτιολογία.

Από την παρούσα διατριβή προέκυψε ότι στην ομάδα των ασθενών με θετικό οικογενειακό ιστορικό, ο συνδυασμός PRS, οικογενειακού ιστορικού και κατάστασης γονιδίων θα είχε εντοπίσει το 65% των περιπτώσεων υψηλού κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου μαστού. Η κυριότερη χρησιμότητα παρατηρήθηκε στους ασθενείς με οικογενειακό ιστορικό και αρνητικά αποτελέσματα γενετικού ελέγχου, όπου ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου έφτασε το ποσοστό του 63,63% (14/22) των ασθενών. Επομένως, η χρησιμότητα του PRS φαίνεται να είναι σημαντική στις περιπτώσεις όπου υπάρχει με θετικό οικογενειακό ιστορικό.

Τα αποτελέσματα αυτά, είναι παρόμοια με άλλη μελέτη στην οποία πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας του PRS όταν συνδυάζεται με επιπλέον παράγοντες κινδύνου, συμπεριλαμβανομένου του οικογενειακού ιστορικού και της ύπραξης παθογόνου παραλλαγής σε γονίδια που σχετίζονται με τον κληρονομικό καρκίνο. Ένας συνδυασμός παραγόντων κινδύνου αύξησε την θετική προγνωστική αξία

κατά 45 έως 50%, ενώ ένα υψηλό PRS εντόπισε το 39,5% των γυναικών που ήταν πιο πιθανό να διαγνωστούν με καρκίνο του μαστού [73].

5.3.2. Κλινική Εφαρμογή της Εκτίμησης Κινδύνου Καρκίνου του Μαστού Βασισμένη στο PRS

Παρά τις επικρίσεις σχετικά με την κλινική εφαρμογή της εκτίμησης κινδύνου με βάση το PRS, η ενσωμάτωσή του με πρόσθετους παράγοντες κινδύνου μπορεί να προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα [74].

Η εφαρμογή του PRS σε γυναίκες με οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού, στην παρούσα μελέτη, συνέβαλε ουσιαστικά στην ανίχνευση ενός μεγαλύτερου ποσοστού περιπτώσεων υψηλού κινδύνου μεταξύ ασθενών με αρνητικά αποτελέσματα γενετικού ελέγχου. Σε αυτές τις ασθενείς, ο συνδυασμός του οικογενειακού ιστορικού με το PRS θα μπορούσε να υποδείξει αυξημένο κίνδυνο καρκίνου σε περισσότερες από το 63% των περιπτώσεων, αναδεικνύοντας την ανάγκη για ενισχυμένες στρατηγικές προληπτικού ελέγχου για την αποτροπή της εμφάνισης του καρκίνου. Αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες που δείχνουν ότι το PRS θα μπορούσε να εξηγήσει το 10–18% του κινδύνου για ανάπτυξη καρκίνου του μαστού [75,76]. Ωστόσο, όταν απουσιάζει το οικογενειακό ιστορικό, το ποσοστό ανίχνευσης υψηλού κινδύνου μεταξύ ασθενών με αρνητικό αποτέλεσμα NGS μειώνεται στο 28%.

Αν και οι τιμές PRS είναι υψηλότερες στους ασθενείς με εμφάνιση της νόσου σε μικρή ηλικία σε σύγκριση με τις γυναίκες που διαγνώστηκαν με καρκίνο σε ηλικία >45 ετών, η χρησιμότητα του PRS στην ανίχνευση κινδύνου καρκίνου φαίνεται να είναι σταθερή στην ομάδα με αρνητικό γενετικό έλεγχο ανεξαρτήτως ηλικίας. Η προσθήκη του οικογενειακού ιστορικού είναι πιο ουσιαστική στους ασθενείς που εμφάνισαν την νόσο σε ηλικία <45 ετών, αυξάνοντας το ποσοστό των ασθενών υψηλού κινδύνου στο 75%.

Τα αποτελέσματα της διατριβής δείχνουν ότι αν και το PRS τείνει να είναι υψηλότερο στην ομάδα των ασθενών με καρκίνο μαστού σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό, δεν μπορεί να αντικαταστήσει άλλους παράγοντες κινδύνου όπως το οικογενειακό ιστορικό και τα αποτελέσματα γενετικών αναλύσεων. Ωστόσο, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με αυτούς ώστε να αυξηθεί ο αριθμός των ατόμων υψηλού κινδύνου που απαιτούν εντακτική παρακολούθηση για την πρόληψη της ασθένειας ή για πρώιμη ανίχνευση της νόσου. Παρά αυτά τα αποτελέσματα, η εφαρμογή όλων των παραγόντων κινδύνου εξακολουθεί να χάνει περισσότερες από τις μισές γυναίκες που τελικά ανέπτυξαν καρκίνο του μαστού στην ομάδα μας. Επομένως, πρέπει να δοθεί προσοχή στην κατάλληλη ερμηνεία των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από τέτοιες αναλύσεις, δίνοντας ιδιαίτερη προσοχή στο να εξηγείται ρητά ότι ένα αρνητικό αποτέλεσμα δεν αποκλείει την πιθανότητα καρκίνου και δεν θα πρέπει να οδηγήσει μείωση της ετήσιας παρακολούθησης.

6. Συμπεράσματα

Η παρούσα διδακτορική διατριβή σηματοδοτεί ένα σημαντικό ορόσημο, καθώς είναι η πιο ολοκληρωμένη έρευνα που έχει πραγματοποιηθεί από ένα διαγνωστικό εργαστήριο στην Ελλάδα, αναλύοντας περισσότερα από 10.000 άτομα για κληρονομικό καρκίνο χρησιμοποιώντας τεχνολογία NGS από το 2015 .

Οι πληροφορίες που προκύπτουν από την παρούσα μελέτη είναι χρήσιμες για τους παρόχους υγειονομικής περίθαλψης, επιτρέποντάς τους να προσαρμόσουν στρατηγικές φροντίδας των ασθενών με βάση τις πληροφορίες του γενετικού υλικού, αντί να βασίζονται αποκλειστικά στις παραδοσιακές προσωπικές και οικογενειακές ιατρικές πληροφορίες.

Στη διεθνή βιβλιογραφία, πολλές μελέτες έχουν εντοπίσει πιθανά νέα γονίδια που συνδέονται με τον καρκίνο του μαστού μέσω WES. Ωστόσο, είναι κρίσιμο να διεξαχθούν επιπλέον αναλύσεις για την επιβεβαίωση αυτών των συσχετίσεων. Οι σύγχρονες ερευνητικές προσπάθειες δίνουν προτεραιότητα στην ανάλυση όλων των εξωνίων και, πιο πρόσφατα, ολόκληρων γονιδιωμάτων, αντί να εστιάζουν αποκλειστικά σε συγκεκριμένα γονίδια-υποψήφια. Αυτή η προσέγγιση προωθεί την εξερεύνηση νέων συνδέσεων μεταξύ γονιδίων και ασθενειών. Επιπλέον, οι πρόσφατες εξελίξεις στην τεχνολογία που στοχεύουν στην ανίχνευση δομικών παραλλαγών μέσα στο γονιδίωμα αρχίζουν να αποκαλύπτουν γενετικές παραλλαγές που μπορεί να έχουν χαθεί από τις συμβατικές τεχνικές αλληλούχησης σύντομων διαβασμάτων.

Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη σε ελληνικό πληθυσμό που υπολογίζει το PRS σε γυναίκες με καρκίνο του μαστού, λαμβάνοντας επίσης υπόψη το οικογενειακό ιστορικό και τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την ανάλυση NGS για κληρονομικά καρκινικά σύνδρομα. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν σημαντική χρησιμότητα του υπολογισμού του PRS σε γυναίκες με οικογενειακό ιστορικό, στην απουσία μονογονιδιακής αιτιολογίας. Συνδυάζοντας στρατηγικές υψηλού κινδύνου, όπως η ανάλυση κληρονομικών ασθενειών,

με στρατηγικές χαμηλού κινδύνου, όπως το οικογενειακό ιστορικό και το PRS, μπορεί να βελτιωθεί η στρατηγική αξιολόγησης του κινδύνου καρκίνου του μαστού. Αυτό θα διευκόλυνε την ανάπτυξη πιο αποτελεσματικών προληπτικών μέτρων και θα βελτιστοποιούσε την κατανομή των πόρων υγειονομικής περίθαλψης. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι τα τρέχοντα στοιχεία που υποστηρίζουν τη χρήση του PRS στην κλινική πρακτική είναι ακόμη περιορισμένα. Συνεπώς, αν και το PRS έχει τη δυνατότητα να ενισχύσει την εξατομικευμένη ιατρική και την πρόβλεψη κινδύνου, απαιτείται επιπλέον έρευνα για να αποκτηθεί μια πλήρης κατανόηση της πρακτικής εφαρμογής του και της επίδρασής του στην κλινική πρακτική.

Για να ενισχυθεί η εφαρμογή του PRS στην κλινική πράξη για την εκτίμηση κινδύνου καρκίνου του μαστού και εξατομικευμένη διαχείριση, είναι απαραίτητο να αξιολογηθούν διάφορα στοιχεία. Η ανάπτυξη ισχυρών εργαλείων υποστήριξης αποφάσεων για τους παρόχους υγειονομικής περίθαλψης, η αποτελεσματική παρακολούθηση, η αξιολόγηση του κόστους που σχετίζεται με το PRS, η παροχή ολοκληρωμένης εκπαίδευσης στους ασθενείς για τις επιπτώσεις και περιορισμούς των αποτελεσμάτων PRS, και η διασφάλιση της προσβασιμότητας στον γενετικό έλεγχο είναι ενέργειες που πρέπει να εξεταστούν. Για να αντιμετωπιστούν τα εμπόδια, και να διασφαλιστεί η δίκαιη πρόσβαση στο PRS, και να βελτιστοποιηθούν τα πλεονεκτήματα της εξατομικευμένης φροντίδας καρκίνου του μαστού, οι επαγγελματίες υγείας, οι ερευνητές, η πολιτεία, οι γενετικοί σύμβουλοι και οι ομάδες υποστήριξης των ασθενών πρέπει να συνεργαστούν.

Βιβλιογραφία

1. Siegel RL, Giaquinto AN, Jemal A. Cancer statistics, 2024. *CA Cancer J Clin.* 2024 Jan-Feb;74(1):12-49. doi: 10.3322/caac.21820. Epub 2024 Jan 17. Erratum in: *CA Cancer J Clin.* 2024 Mar-Apr;74(2):203. doi: 10.3322/caac.21830. PMID:38230766
2. Chen VE, Greenberger BA, Taylor JM, Edelman MJ, Lu B. The Underappreciated Role of the Humoral Immune System and B Cells in Tumorigenesis and Cancer Therapeutics: A Review. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2020 Sep 1;108(1):38-45. doi: 10.1016/j.ijrobp.2020.03.022. Epub 2020 Apr 3. PMID: 32251756
3. Bertolaso M, Dieli AM. Cancer and intercellular cooperation. *R Soc Open Sci.* 2017 Oct 4;4(10):170470. doi: 10.1098/rsos.170470. PMID: 29134064; PMCID: PMC5666247
4. Siegel RL, Giaquinto AN, Jemal A. Cancer statistics, 2024. *CA Cancer J Clin.* 2024 Jan-Feb;74(1):12-49. doi: 10.3322/caac.21820. Epub 2024 Jan 17. Erratum in: *CA Cancer J Clin.* 2024 Mar-Apr;74(2):203. doi: 10.3322/caac.21830. PMID: 38230766
5. Visvader JE, Rosen JM, Aparicio S. Breast Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2024 Aug 1;14(8):a041729. doi: 10.1101/cshperspect.a041729. PMID: 38692741; PMCID: PMC11293531
6. Shu X, Long J, Cai Q, *et al.* Identification of novel breast cancer susceptibility loci in meta-analyses conducted among Asian and European descendants. *Nat Commun.* 2020 Mar 5;11(1):1217. doi: 10.1038/s41467-020-15046-w. PMID: 32139696; PMCID: PMC7057957
7. Tsaousis GN, Papadopoulou E, Agiannitopoulos K, Pepe G, Tsoulos N, Boukovinas I, Floros T, Iosifidou R, Katopodi O, Koumarianou A, Markopoulos C, Papazisis K, Venizelos V, Kapsimalis A, Xepapadakis G, Psyrris A, Banu E, Eniu DT, Blidaru A, Stanculeanu DL, Ungureanu A, Ozmen V, Tansan S, Tekinel M, Yalcin S, Nasioulas G. Revisiting the Implications of Positive Germline Testing Results Using Multi- gene Panels in Breast Cancer

- Patients. *Cancer Genomics Proteomics*. 2022 Jan- Feb;19(1):60-78. doi: 10.21873/cgp.20304. PMID: 34949660; PMCID: PMC8717958
8. Manna EDF, Serrano D, Aurilio G, Bonanni B, Lazzeroni M. Chemoprevention and Lifestyle Modifications for Risk Reduction in Sporadic and Hereditary Breast Cancer. *Healthcare (Basel)*. 2023 Aug 21;11(16):2360. doi: 10.3390/healthcare11162360. PMID: 37628558; PMCID: PMC10454363
 9. Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971 Apr;68(4):820-3. doi: 10.1073/pnas.68.4.820. PMID: 5279523; PMCID: PMC389051
 10. Zhang X, Sjöblom T. Targeting Loss of Heterozygosity: A Novel Paradigm for Cancer Therapy. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021 Jan 13;14(1):57. doi: 10.3390/ph14010057. PMID: 33450833; PMCID: PMC7828287
 11. Economopoulou P, Dimitriadis G, Psyrri A. Beyond BRCA: new hereditary breast cancer susceptibility genes. *Cancer Treat Rev*. 2015 Jan;41(1):1-8. doi: 10.1016/j.ctrv.2014.10.008. Epub 2014 Nov 6. PMID: 25467110
 12. Sokolova A, Johnstone KJ, McCart Reed AE, Simpson PT, Lakhani SR. Hereditary breast cancer: syndromes, tumour pathology and molecular testing. *Histopathology*. 2023 Jan;82(1):70-82. doi: 10.1111/his.14808. Epub 2022 Dec 5. PMID: 36468211; PMCID: PMC10953374
 13. Lee A, Moon BI, Kim TH. *BRCA1*/*BRCA2* Pathogenic Variant Breast Cancer: Treatment and Prevention Strategies. *Ann Lab Med*. 2020 Mar;40(2):114-121. doi: 10.3343/alm.2020.40.2.114. PMID: 31650727; PMCID: PMC6822003
 14. Daly MB, Pilarski R, Yurgelun MB, *et al*. NCCN Guidelines Insights: Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast, Ovarian, and Pancreatic, Version 1.2020. *J Natl Compr Canc Netw*. 2020 Apr;18(4):380-391. doi: 10.6004/jnccn.2020.0017. PMID: 32259785

15. Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*. 2016 Jan;107(1):1-8. doi: 10.1016/j.ygeno.2015.11.003. Epub 2015 Nov 10. PMID: 26554401; PMCID: PMC4727787
16. Sanger F, Donelson JE, Coulson AR, Kössel H, Fischer D. Use of DNA polymerase I primed by a synthetic oligonucleotide to determine a nucleotide sequence in phage fl DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1973 Apr;70(4):1209-13. doi: 10.1073/pnas.70.4.1209. PMID: 4577794; PMCID: PMC433459
17. Hood LE, Hunkapiller MW, Smith LM. Automated DNA sequencing and analysis of the human genome. *Genomics*. 1987 Nov;1(3):201-12. doi: 10.1016/0888-7543(87)90046-2. PMID: 3328736
18. Thapliyal P, Sah V, Rautela I, Joshi M, Tyagi S, Verma R, Sharma MD. Next Generation Sequencing: Latent applications in clinical diagnostics with the advent of bioinformatic frameworks. *Pathol Res Pract*. 2024 Sep 25;263:155606. doi: 10.1016/j.prp.2024.155606. Epub ahead of print. PMID: 39357183
19. Mardis ER. Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2008;9:387-402. doi: 10.1146/annurev.genom.9.081307.164359. PMID: 18576944
20. Muzzey D, Evans EA, Lieber C. Understanding the Basics of NGS: From Mechanism to Variant Calling. *Curr Genet Med Rep*. 2015;3(4):158-165. doi: 10.1007/s40142-015-0076-8. Epub 2015 Sep 4. PMID: 26566462; PMCID: PMC4633438
21. Morganti S, Tarantino P, Ferraro E, *et al*. Complexity of genome sequencing and reporting: Next generation sequencing (NGS) technologies and implementation of precision medicine in real life. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2019 Jan;133:171-182. doi: 10.1016/j.critrevonc.2018.11.008. Epub 2018 Nov 26. PMID: 30661654
22. Shashi V, McConkie-Rosell A, Rosell B, *et al*. The utility of the traditional medical genetics diagnostic evaluation in the context of next-generation sequencing for undiagnosed genetic disorders. *Genet Med*. 2014 Feb;16(2):176-82. doi: 10.1038/gim.2013.99. Epub 2013 Aug

29. Erratum in: *Genet Med.* 2013 Oct;15(10):849. Goldstein, David G [corrected to Goldstein, David B]. PMID: 23928913
23. Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, *et al.* ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genet Med.* 2013 Sep;15(9):733-47. doi: 10.1038/gim.2013.92. Epub 2013 Jul 25. PMID: 23887774; PMCID: PMC4098820
24. Endrullat C, Glökler J, Franke P, Frohme M. Standardization and quality management in next-generation sequencing. *Appl Transl Genom.* 2016 Jul 1;10:2-9. doi: 10.1016/j.atg.2016.06.001. PMID: 27668169; PMCID: PMC5025460
25. Moorthie S, Hall A, Wright CF. Informatics and clinical genome sequencing: opening the black box. *Genet Med.* 2013 Mar;15(3):165-71. doi:10.1038/gim.2012.116. Epub 2012 Sep 13. PMID: 22975759
26. Kassahn KS, Scott HS, Caramins MC. Integrating massively parallel sequencing into diagnostic workflows and managing the annotation and clinical interpretation challenge. *Hum Mutat.* 2014 Apr;35(4):413-23. doi: 10.1002/humu.22525. Epub 2014 Mar 6. PMID: 24510514.
27. Richards S, Aziz N, Bale S, *et al.* Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015 May;17(5):405-24. doi: 10.1038/gim.2015.30. Epub 2015 Mar 5. PMID: 25741868; PMCID: PMC4544753
28. Smith HS, Swint JM, Lalani SR, *et al.* Clinical Application of Genome and Exome Sequencing as a Diagnostic Tool for Pediatric Patients: a Scoping Review of the Literature. *Genet Med.* 2019 Jan;21(1):3-16. doi: 10.1038/s41436-018-0024-6. Epub 2018 May 14. PMID: 29760485

29. Rabbani B, Tekin M, Mahdieh N. The promise of whole-exome sequencing in medical genetics. *J Hum Genet.* 2014 Jan;59(1):5-15. doi: 10.1038/jhg.2013.114. Epub 2013 Nov 7. PMID: 24196381
30. Suwinski P, Ong C, Ling MHT, Poh YM, Khan AM, Ong HS. Advancing Personalized Medicine Through the Application of Whole Exome Sequencing and Big Data Analytics. *Front Genet.* 2019 Feb 12;10:49. doi: 10.3389/fgene.2019.00049. PMID: 30809243; PMCID: PMC6379253
31. Tanjo T, Kawai Y, Tokunaga K, Ogasawara O, Nagasaki M. Practical guide for managing large-scale human genome data in research. *J Hum Genet.* 2021 Jan;66(1):39-52. doi: 10.1038/s10038-020-00862-1. Epub 2020 Oct 23. PMID: 33097812; PMCID: PMC7728600
32. Xiang R, Kelemen M, Xu Y, Harris LW, Parkinson H, Inouye M, Lambert SA. Recent advances in polygenic scores: translation, equitability, methods and FAIR tools. *Genome Med.* 2024 Feb 19;16(1):33. doi: 10.1186/s13073-024-01304-9. PMID: 38373998; PMCID: PMC10875792
33. Nguyen TV, Eisman JA. Post-GWAS Polygenic Risk Score: Utility and Challenges. *JBMR Plus.* 2020 Sep 19;4(11):e10411. doi: 10.1002/jbm4.10411. PMID: 33210063; PMCID: PMC7657393
34. Ndong Sima CAA, Step K, Swart Y, Schurz H, Uren C, Möller M. Methodologies underpinning polygenic risk scores estimation: a comprehensive overview. *Hum Genet.* 2024 Nov;143(11):1265-1280. doi: 10.1007/s00439-024-02710-0. Epub 2024 Oct 19. PMID: 39425790; PMCID: PMC11522080
35. Evans DG, Brentnall A, Byers H, *et al.* The impact of a panel of 18 SNPs on breast cancer risk in women attending a UK familial screening clinic: a case-control study. *J Med Genet.* 2017 Feb;54(2):111-113. doi: 10.1136/jmedgenet-2016-104125. Epub 2016 Oct 28. PMID: 27794048

36. Mavaddat N, Pharoah PD, Michailidou K, *et al.* Prediction of breast cancer risk based on profiling with common genetic variants. *J Natl Cancer Inst.* 2015 Apr 8;107(5):djv036. doi: 10.1093/jnci/djv036. PMID: 25855707; PMCID: PMC4754625
37. Hughes E, Tshiaba P, Gallagher S, *et al.* Development and Validation of a Clinical Polygenic Risk Score to Predict Breast Cancer Risk. *JCO Precis Oncol.* 2020 Jun 8;4:PO.19.00360. doi: 10.1200/PO.19.00360. PMID: 32923876; PMCID: PMC7446363
38. Brentnall AR, van Veen EM, Harkness EF, *et al.* A case-control evaluation of 143 single nucleotide polymorphisms for breast cancer risk stratification with classical factors and mammographic density. *Int J Cancer.* 2020 Apr 15;146(8):2122-2129. doi: 10.1002/ijc.32541. Epub 2019 Jul 13. PMID: 31251818; PMCID: PMC7065068
39. Mavaddat N, Michailidou K, Dennis J, *et al.* Polygenic Risk Scores for Prediction of Breast Cancer and Breast Cancer Subtypes. *Am J Hum Genet.* 2019 Jan 3;104(1):21-34. doi: 10.1016/j.ajhg.2018.11.002. Epub 2018 Dec 13. PMID: 30554720; PMCID: PMC6323553
40. Hayeck TJ, Busby GB, Chun S, Lewis ACF, Roberts MC, Vilhjálmsson BJ. Polygenic Risk Scores: Genomes to Risk Prediction. *Clin Chem.* 2023 May 26:hvad049. doi: 10.1093/clinchem/hvad049. Epub ahead of print. PMID: 37232050; PMCID: PMC10681370
41. Onishi N, Kataoka M. Breast cancer screening for women at high risk: review of current guidelines from leading specialty societies. *Breast Cancer.* 2021 Nov;28(6):1195-1211. doi: 10.1007/s12282-020-01157-1. Epub 2020 Sep 21. PMID: 32959120
42. Virtanen P, Gommers R, Oliphant TE, *et al.* SciPy 1.0 Contributors. SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python. *Nat Methods.* 2020 Mar;17(3):261-272. doi: 10.1038/s41592-019-0686-2. Epub 2020 Feb 3. Erratum in: *Nat Methods.* 2020 Mar;17(3):352. doi: 10.1038/s41592-020-0772-5. PMID: 32015543; PMCID: PMC7056644
43. Jones JC, Golafshar MA, Coston TW, *et al.* Universal Genetic Testing vs. Guideline-Directed Testing for Hereditary Cancer Syndromes Among Traditionally Underrepresented Patients in

- a Community Oncology Program. *Cureus*. 2023 Apr 11;15(4):e37428. doi: 10.7759/cureus.37428. PMID: 37181954; PMCID: PMC10173369
44. Morrish N, Snowsill T, Dodman S, Medina-Lara A. Preferences for Genetic Testing to Predict the Risk of Developing Hereditary Cancer: A Systematic Review of Discrete Choice Experiments. *Med Decis Making*. 2024 Apr;44(3):252-268. doi: 10.1177/0272989X241227425. Epub 2024 Feb 7. PMID: 38323553; PMCID: PMC10988993
45. Agiannitopoulos K, Pepe G, Tsaousis GN, *et al*. Copy Number Variations (CNVs) Account for 10.8% of Pathogenic Variants in Patients Referred for Hereditary Cancer Testing. *Cancer Genomics Proteomics*. 2023 Sep- Oct;20(5):448-455. doi: 10.21873/cgp.20396. PMID: 37643779; PMCID: PMC10464942
46. Quinodoz M, Kaminska K, Cancellieri F, *et al*. Detection of elusive DNA copy-number variations in hereditary disease and cancer through the use of noncoding and off-target sequencing reads. *Am J Hum Genet*. 2024 Apr 4;111(4):701-713. doi: 10.1016/j.ajhg.2024.03.001. Epub 2024 Mar 25. PMID: 38531366; PMCID: PMC11023916
47. Madar L, Majoros V, Szűcs Z, *et al*. Double Heterozygosity for Rare Deleterious Variants in the *BRCA1* and *BRCA2* Genes in a Hungarian Patient with Breast Cancer. *Int J Mol Sci*. 2023 Oct 18;24(20):15334. doi: 10.3390/ijms242015334. PMID: 37895014; PMCID: PMC10607119
48. Megid TBC, Barros-Filho MC, Pisani JP, Achatz MI. Double heterozygous pathogenic variants prevalence in a cohort of patients with hereditary breast cancer. *Front Oncol*. 2022 Aug 8;12:873395. doi: 10.3389/fonc.2022.873395. PMID: 36003761; PMCID: PMC9393394
49. Boonen RACM, Vreeswijk MPG, van Attikum H. CHEK2 variants: linking functional impact to cancer risk. *Trends Cancer*. 2022 Sep;8(9):759-770. doi: 10.1016/j.trecan.2022.04.009. Epub 2022 May 25. PMID: 35643632

50. Pavlovica K, Irmejs A, Noukas M, *et al.* Spectrum and frequency of CHEK2 variants in breast cancer affected and general population in the Baltic states region, initial results and literature review. *Eur J Med* PMID: 35314380
51. LaDuca H, Polley EC, Yussuf A, *et al.* A clinical guide to hereditary cancer panel testing: evaluation of gene-specific cancer associations and sensitivity of genetic testing criteria in a cohort of 165,000 high-risk patients. *Genet Med.* 2020 Feb;22(2):407-415. doi: 10.1038/s41436-019-0633-8. Epub 2019 Aug 13. PMID: 31406321; PMCID: PMC7000322
52. Kleiblova P, Stolarova L, Krizova K, *et al.* Identification of deleterious germline CHEK2 mutations and their association with breast and ovarian cancer. *Int J Cancer.* 2019 Oct 1;145(7):1782-1797. doi: 10.1002/ijc.32385. Epub 2019 May 20. PMID: 31050813
53. Mundt E, Mabey B, Rainville I, Ricker C, Singh N, Gardiner A, Manley S, Slavin T Jr. Breast and colorectal cancer risks among over 6,000 CHEK2 pathogenic variant carriers: A comparison of missense versus truncating variants. *Cancer Genet.* 2023 Nov;278-279:84-90. doi: 10.1016/j.cancergen.2023.10.002. Epub 2023 Oct 11. PMID: 37839337
54. Guha T, Malkin D. Inherited *TP53* Mutations and the Li-Fraumeni Syndrome. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017 Apr 3;7(4):a026187. doi: 10.1101/cshperspect.a026187. PMID: 28270529; PMCID: PMC5378014
55. Zhu KL, Su F, Yang JR, *et al.* TP53 to mediate immune escape in tumor microenvironment: an overview of the research progress. *Mol Biol Rep.* 2024 Jan 25;51(1):205. doi: 10.1007/s11033-023-09097-7. PMID: 38270700; PMCID: PMC10811008
56. Mansur MB, Greaves M. Convergent TP53 loss and evolvability in cancer. *BMC Ecol Evol.* 2023 Sep 25;23(1):54. doi: 10.1186/s12862-023-02146-6. PMID: 37743495; PMCID: PMC10518978
57. Giacomazzi CR, Giacomazzi J, Netto CB, *et al.* Pediatric cancer and Li- Fraumeni/Li-Fraumeni-like syndromes: a review for the pediatrician. *Rev Assoc Med Bras (1992).* 2015 May-Jun;61(3):282-9. doi: 10.1590/1806-9282.61.03.282. PMID: 26248253

58. Vogel WH. Li-Fraumeni Syndrome. *J Adv Pract Oncol*. 2017 Nov-Dec;8(7):742-746.mEpub 2017 Nov 1. PMID: 30333936; PMCID: PMC6188099
59. Consul N, Amini B, Ibarra-Rovira JJ, *et al*. Li-Fraumeni Syndrome and Whole-Body MRI Screening: Screening Guidelines, Imaging Features, and Impact on Patient Management. *AJR Am J Roentgenol*. 2021 Jan;216(1):252-263. doi: 10.2214/AJR.20.23008. Epub 2020 Nov 5. PMID: 33151095"
60. Vogel WH. Li-Fraumeni Syndrome. *J Adv Pract Oncol*. 2017 Nov-Dec;8(7):742-746. Epub 2017 Nov 1. PMID: 30333936; PMCID: PMC6188099
61. Collet L, Hanvic B, Turinetto M, Treilleux I, Chopin N, Le Saux O, Ray- Coquard I. BRCA1/2 alterations and reversion mutations in the area of PARP inhibitors in high grade ovarian cancer: state of the art and forthcoming challenges. *Front Oncol*. 2024 Mar 13;14:1354427. doi: 10.3389/fonc.2024.1354427. PMID: 38544832; PMCID: PMC10965616
62. Udupa P, Ghosh DK. Implementation of Exome Sequencing to Identify Rare Genetic Diseases. *Methods Mol Biol*. 2024;2719:79-98. doi: 10.1007/978-1-0716-3461-5_5. PMID: 37803113
63. Zelli V, Compagnoni C, Cannita K, *et al*. Applications of Next Generation Sequencing to the Analysis of Familial Breast/Ovarian Cancer. *High Throughput*. 2020 Jan 10;9(1):1. doi: 10.3390/ht9010001. PMID: 31936873; PMCID: PMC7151204
64. Lim CJ, Cech TR. Shaping human telomeres: from shelterin and CST complexes to telomeric chromatin organization. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2021 Apr;22(4):283-298. doi: 10.1038/s41580-021-00328-y. Epub 2021 Feb 9. Erratum in: *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2021 Apr;22(4):299. doi: 10.1038/s41580-021-00353-x. PMID: 33564154; PMCID: PMC8221230
65. Nasheuer HP, Onwubiko NO. Lagging Strand Initiation Processes in DNA Replication of Eukaryotes-Strings of Highly Coordinated Reactions Governed by Multiprotein Complexes. *Genes (Basel)*. 2023 Apr 29;14(5):1012. doi: 10.3390/genes14051012. PMID: 37239371; PMCID: PMC10218536

66. Valle L, de Voer RM, Goldberg Y, *et al.* Update on genetic predisposition to colorectal cancer and polyposis. *Mol Aspects Med.* 2019 Oct;69:10-26. doi: 10.1016/j.mam.2019.03.001. Epub 2019 Mar 18. PMID: 30862463
67. Husby S, Hjermind Justesen E, Grønbæk K. Protein phosphatase, Mg²⁺/Mn²⁺-dependent 1D (PPM1D) mutations in haematological cancer. *Br J Haematol.* 2021 Feb;192(4):697-705. doi: 10.1111/bjh.17120. Epub 2020 Dec 8. PMID: 33616916
68. Vodolazhsky DI, Mayakovskaya AV, Kubyshkin AV, Aliev KA, Fomochkina II. Clinical significance of gene polymorphisms for hereditary predisposition to breast and ovarian cancer (review of literature). *Klin Lab Diagn.* 2021 Dec 21;66(12):760-767. English. doi: 10.51620/0869-2084-2021-66-12-760-767. PMID: 35020290
69. Liu C, Zhou D, Yang K, Xu N, Peng J, Zhu Z. Research progress on the pathogenesis of the SDHB mutation and related diseases. *Biomed Pharmacother.* 2023 Nov;167:115500. doi: 10.1016/j.biopha.2023.115500. Epub 2023 Sep 19. PMID: 37734265
70. Schipani A, Nannini M, Astolfi A, Pantaleo MA. *SDHA* Germline Mutations in SDH-Deficient GISTs: A Current Update. *Genes (Basel).* 2023 Mar 4;14(3):646. doi: 10.3390/genes14030646. PMID: 36980917; PMCID: PMC10048394
71. Daly MB, Pal T, Berry MP, *et al.* Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast, Ovarian, and Pancreatic, Version 2.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw.* 2021 Jan 6;19(1):77-102. doi: 10.6004/jnccn.2021.0001. PMID: 33406487
72. Tamlander M, Jermy B, Seppälä TT, Färkkilä M; FinnGen; Widén E, Ripatti S, Mars N. Genome-wide polygenic risk scores for colorectal cancer have implications for risk-based screening. *Br J Cancer.* 2024 Mar;130(4):651-659. doi: 10.1038/s41416-023-02536-z. Epub 2024 Jan 3. PMID: 38172535; PMCID: PMC10876651

73. Mars N, Kerminen S, Tamlander M, *et al.* Comprehensive Inherited Risk Estimation for Risk-Based Breast Cancer Screening in Women. *J Clin Oncol.* 2024 May 1;42(13):1477-1487. doi: 10.1200/JCO.23.00295. Epub 2024 Feb 29. PMID: 38422475; PMCID: PMC11095905
74. Koch S, Schmidtke J, Krawczak M, Caliebe A, *et al.* Clinical utility of polygenic risk scores: a critical 2023 appraisal. *J Community Genet.* 2023 Oct;14(5):471-487. doi: 10.1007/s12687-023-00645-z. Epub 2023 May 3. PMID: 37133683; PMCID: PMC1057669
75. Michailidou K, Lindström S, Dennis J, *et al.* Association analysis identifies 65 new breast cancer risk loci. *Nature.* 2017 Nov 2;551(7678):92-94. doi: 10.1038/nature24284. Epub 2017 Oct 23. PMID: 29059683; PMCID: PMC5798588
76. Mars N, Lindbohm JV, Della Briotta Parolo P, *et al.* Systematic comparison of family history and polygenic risk across 24 common diseases. *Am J Hum Genet.* 2022 Dec 1;109(12):2152-2162. doi: 10.1016/j.ajhg.2022.10.009. Epub 2022 Nov 7. PMID: 36347255; PMCID: PMC9748261

The Clinical and Genetic Landscape of Hereditary Cancer: Experience from a Single Clinical Diagnostic Laboratory

NIKOLAOS TSOULOS¹, KONSTANTINOS AGIANNITOPOULOS¹, KEVISA POTSKA¹, ANASTASIA KATSELI¹, CHRISTINA NTOGKA¹, GEORGIA PEPE¹, DIMITRA BOUZARELOU¹, ATHANASIOS PAPATHANASIOU¹, DIMITRIOS GRIGORIADIS¹, GEORGIOS N. TSAOUSIS¹, HELEN GOGAS², THEODORE TROUPIS³, KONSTANTINOS PAPAZISIS⁴, IOANNIS NATSIOPOULOS⁵, VASSILEIOS VENIZELOS⁶, KYRIAKOS AMARANTIDIS⁷, STYLIANOS GIASSAS⁸, CHRISTOS PAPADIMITRIOU⁹, ELENA FOUNTZILAS¹⁰, MAROULIO STATHOULOPOULOU⁶, ANNA KOUMARIANOU¹¹, GRIGORIOS XEPAPADAKIS⁸, ALEXANDRU BLIDARU¹², DANIELA ZOB¹³, OANA VOINEA¹⁴, MUSTAFA ÖZDOĞAN¹⁵, MAHMUT ÇERKEZ ERGÖREN¹⁶, ALINTA HEGMANE¹⁷, EIRINI PAPADOPOULOU¹, GEORGE NASIOULAS¹ and CHRISTOS MARKOPOULOS³

¹Genekor Medical S.A, Athens, Greece;

²First Department of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens - School of Medicine, Athens, Greece;

³School of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece;

⁴Euromedica General Clinic, Thessaloniki, Greece;

⁵Interbalkan Medical Center of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece;

⁶Metropolitan Hospital, Athens, Greece;

⁷Department of Medical Oncology, Medical School, Democritus University of Thrace, Alexandroupolis, Greece;

⁸IASO, General Maternity and Gynecology Clinic, Athens, Greece;

⁹Oncology Unit, Aretaieion University Hospital, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece;

¹⁰Department of Medical Oncology, St. Lukes's Clinic, Thessaloniki, Greece;

¹¹Section of Medical Oncology, Attikon University Hospital, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece;

¹²Saint Constantin Hospital, Brasov, Romania;

¹³Oncology Department, "Prof. Dr. Al. Trestioreanu" Bucharest Oncology Institute, Bucharest, Romania;

¹⁴Department of Pathology, "Carol Davila" University of Medicine and Pharmacy, Bucharest, Romania;

¹⁵Division of Medical Oncology, Memorial Antalya Hospital, Antalya, Turkey;

¹⁶Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Near East University, Nicosia, Cyprus;

¹⁷Riga East University Hospital, Oncology Center of Latvia, Riga, Latvia

Abstract. *Background/Aim:* The application of next-generation sequencing (NGS) technology in the genetic investigation of hereditary cancer is important for clinical surveillance, therapeutic approach, and reducing the risk of

developing new malignancies. The aim of the study was to explore genetic predisposition in individuals referred for hereditary cancer. *Materials and Methods:* A total of 8,261 individuals were referred for multigene genetic testing, during the period 2020-2023, in the laboratory, and underwent multigene genetic testing using NGS. Among the examined individuals, 56.17% were diagnosed with breast cancer, 6.77% with ovarian cancer, 2.88% with colorectal cancer, 1.91% with prostate cancer, 6.43% were healthy with a significant family history of cancer, while 3.06% had a different type of cancer and 0.21% had not provided any information. Additionally, in 85 women with breast cancer we performed whole exome sequencing analysis. *Results:* 20% of the examined individuals carried a pathogenic variant. Specifically, 54.8% of the patients had a pathogenic variant

Correspondence to: Dr. Konstantinos Agiannitopoulos, Ph.D., Genekor Medical S.A, Athens, Greece. E-mail: kagiannitopoulos@genekor.com

Key Words: Hereditary cancer, next generation sequencing, whole exome sequencing.



This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY-NC-ND) 4.0 International license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

in a clinically significant gene (*BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *RAD51C*, *PMS2*, *CDKN2A*, *MLH1*, *MSH2*, *TP53*, *MSH6*, *APC*, *RAD51D*, *PTEN*, *RET*, *CDH1*, *MEN1*, and *VHL*). Among the different types of pathogenic variants detected, a significant percentage (6.52%) represented copy number variation (CNV). With WES analysis, the following findings were detected: *CTC1*: c.880C>T, p.(Gln294*); *MLH3*: c.405del, p.(Asp136Metfs*2), *PPM1D*: c.1426_1430del, p.(Glu476Leufs*3), and *SDHB*: c.395A>G, p.(His132Arg). Conclusion: Comprehensive multigene genetic testing is necessary for appropriate clinical management of pathogenic variants' carriers. Additionally, the information obtained is important for determining the risk of malignancy development in family members of the examined individuals.

Hereditary cancers arise due to specific alterations in genes critical for controlling cell growth, division, and repair. These genetic variants are typically found in germ cells, and they can be transmitted from one generation to the next (1). Hereditary cancer syndromes often adhere to Mendelian inheritance patterns, including autosomal dominant, autosomal recessive, or X-linked inheritance, wherein autosomal dominant conditions necessitate only one copy of the mutated gene from either parent to heighten the risk of cancer (2). Several genes contribute to hereditary cancers. For instance, pathogenic/likely pathogenic variants (PVs/LPVs) in *BRCA1* and *BRCA2* are linked to an increased risk of breast, ovarian, and other cancers (3), while *TP53* PVs/LPVs are associated with Li-Fraumeni syndrome, elevating the risk of various cancer types (4). PVs/LPVs in *APC*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, and *PMS2* relate to Lynch syndrome, leading to an elevated risk of colorectal and other cancers (5).

Penetrance indicates the likelihood that an individual with a specific gene variant will develop cancer. In some instances, the presence of a PVs/LPVs does not assure cancer development, as other factors can influence penetrance. Hereditary cancers often manifest at an earlier age compared to sporadic cases of the same cancer, a characteristic feature distinguishing them (6). The risk of hereditary cancers within families can have a cascade effect. Upon identifying a specific gene PV/LPV, other family members may undergo genetic testing to assess their own risk (7).

Genetic testing involves examining an individual's DNA to identify specific PVs/LPVs associated with hereditary cancer syndromes. Prior to and following genetic testing, genetic counseling is recommended to furnish individuals and families with information about the implications of the test results and guidance on managing cancer risk (8). Understanding the genetic foundation of hereditary cancers is essential for formulating targeted prevention and early detection strategies. While hereditary cancers constitute a relatively small proportion of all cancer cases, the

identification of high-risk individuals facilitates proactive management and personalized medical care (9).

Next-generation sequencing (NGS) approach has transformed the domain of genetics and has been pivotal in uncovering and comprehending hereditary cancer. NGS stands out as a high-throughput sequencing technology that expeditiously and cost-effectively analyzes extensive DNA segments (10). It permits the simultaneous sequencing of multiple genes or even entire genomes, delivering a holistic perspective on an individual's genetic composition. In contrast to labor-intensive and time-consuming traditional genetic testing methods like Sanger sequencing, NGS allows the concurrent analysis of numerous genes linked to hereditary cancers in a single test, emerging as a potent tool for all-encompassing screening (11).

NGS finds application in panel testing, where a predetermined set of genes associated with specific hereditary cancer syndromes is concurrently examined. Hereditary cancer panels typically encompass genes, such as *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *APC*, and *MLH1*, among others, contingent upon the suspected syndrome (12). Whole exome sequencing (WES) targets the sequencing of gene protein-coding regions (exons), where disease-causing variants are commonly located. On the other hand, whole genome sequencing (WGS) scrutinizes the entire genome, offering a comprehensive overview of both coding and non-coding regions (13).

NGS simplifies the identification of PVs/LPVs within genes linked to hereditary cancers. Uncovering these variants aids in evaluating an individual's cancer risk and formulating personalized management strategies. The high-throughput nature of NGS enhances diagnostic efficacy compared to conventional sequencing methods, allowing for the detection of rare or novel mutations that might escape targeted approaches (14).

Despite its advantages, NGS introduces challenges, including grappling with variants of uncertain significance (VUS) and the imperative need for meticulous variant interpretation. Genetic counseling is paramount in both pre- and post-testing phases to facilitate individuals in comprehending the implications of the results (15). Moreover, NGS has played a pivotal role in large-scale genomic research, contributing to the identification of novel genes associated with hereditary cancers and deepening our understanding of the genetic underpinnings of these conditions (16).

The aim of this study was to investigate the genetic predisposition in individuals referred for hereditary cancer using NGS technology. Moreover, genetic testing was conducted on a sample of 85 women diagnosed with breast cancer, employing the advanced technology WES. This comprehensive analysis sheds light on the diverse genetic landscapes that contribute to breast cancer susceptibility, offering valuable insights for further research and potential clinical implications.

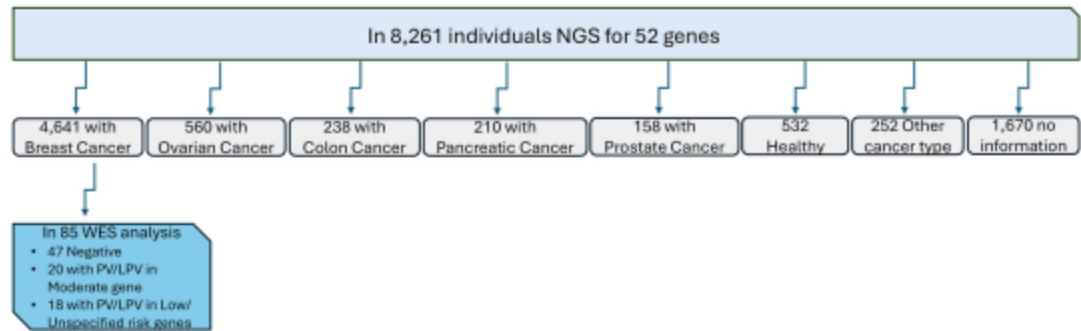


Figure 1. Schematic representation of the workflow used in this study. PV: Pathogenic variant; LPV: likely pathogenic variant; NGS: next-generation sequencing; WES: whole exome sequencing.

Materials and Methods

During the period from 2020 to 2023, a total of 8,261 individuals were referred to at Genekor's laboratory, with a focus on genetic analysis using NGS. Before undergoing molecular genetic testing, everyone participated in an informed consent process, signifying their understanding and agreement to have their genetic information analyzed. Importantly, they also granted explicit permission for the anonymized utilization of their data in scientific research endeavors and potential publication of research findings. To provide a comprehensive context for the genetic analysis, additional information was gathered from these individuals. Clinicians and healthcare providers collaborating in the study facilitated the collection of these vital data, ensuring that each patient's unique medical and family background was thoroughly documented.

In all 8,261 individuals we performed NGS analysis using a customized gene panel including 52 genes. Moreover, we analyzed using WES 85 breast cancer patients. Of these patients, a significant subgroup of 47 individuals exhibited no observable PVs/LPVs in a comprehensive panel of 52 genes known to be associated with susceptibility to hereditary cancer. A distinct group of 20 participants displayed PVs/LPVs in moderate genes. Furthermore, 18 individuals exhibited PVs/LPVs within low-penetrance genes associated with breast cancer (Figure 1).

According to the manufacturer's protocol, genomic DNA extraction from peripheral blood samples was performed utilizing the MagCore® Genomic DNA Whole Blood Kit (RBC Bioscience, New Taipei City, Taipei, Taiwan, ROC). This extraction process ensured the retrieval of high-quality DNA suitable for downstream genetic analysis. For the comprehensive analysis of hereditary cancer predisposition, a solution-based capture technique was employed, targeting 52 genes implicated in such predisposition (17). This capture method utilized the Roche NimbleGen SeqCap EZ Choice kit (Pleasanton, CA, USA), along with WES facilitated by the KAPA HyperExome kit (Pleasanton, CA, USA). The sample preparation adhered meticulously to the instructions provided in the SeqCap EZ Choice Library User's Guide by Roche NimbleGen, ensuring consistency and accuracy throughout the process. Briefly, the assay creates a library using a solution-based capture method to enrich targeted genomic DNA regions. Initially, each sample

required 150 ng of double-stranded DNA, which was enzymatically fragmented. To maintain the stability of this reaction, an EDTA neutralizing solution was applied before fragmentation. The fragmented DNA was then processed through end-repair, A-tailing, and ligation with paired-end indexed adapters. Finally, the library was amplified using ligation-mediated PCR and hybridized overnight with custom probes. Library preparation concluded with post-capture LM-PCR, following the manufacturer's protocol. Sequencing of the prepared samples was carried out utilizing DNBSG400 technology provided by MGI Tech Co., Ltd (Beishan Industrial Zone, Shenzhen, PR China). The generated sequencing data underwent analysis using the SeqNext version 4.4.0 software suite developed by JSI Medical Systems GmbH (Ettenheim, Germany). This software facilitated the identification and interpretation of sequence alterations within the context of clinically relevant transcripts.

Bioinformatics tools were instrumental in the identification of various genetic variations, including single nucleotide variations (SNVs), insertions, deletions (indels), and copy number variations (CNVs). Following variant identification, thorough annotation and prioritization processes were implemented, with a specific emphasis on discerning potentially pathogenic alterations. This meticulous approach ensured the comprehensive evaluation of genetic variants, ultimately contributing to the identification of clinically relevant findings relevant to hereditary cancer predisposition.

Results

Demographics. The demographic characteristics of individuals, clinical history related to cancer diagnosis, and a thorough family history assessment are shown in Table I. The breakdown of individuals based on their countries of origin was as follows: 5,733 (69.4%) from Greece, 991 (12%) from Romania, 816 (9.8%) from Turkey, and 721 from other countries (8.7%). The median age at testing for individuals in our cohort was 46.8 years, with ages ranging from 18 to 82 years. In terms of sex distribution, the majority of individuals tested were female, constituting 89.7% (7,407 out of 8,261) of the cohort. Conversely, males comprised

Table I. Demographic characteristics of the individuals.

Demographic	No.	%
Total individuals	8,261	100
Female	7,407	89.7
Male	1,854	10.3
Age at diagnosis (years)		
Mean	46.8	
Median	45	
Range	18-82	
Ethnicity		
Greek	5,733	69.4
Romanian	991	12
Turkish	816	9.9
Other	721	8.7
Clinical status		
Affected	6,060	73.4
Unaffected	532	6.4
No information	1,670	20.2
Cancers among affected patients		
Breast	4,641	76.6
Ovarian	560	9.2
Colorectal	238	3.9
Pancreatic	210	3.5
Prostate	158	2.6
Other type	253	4.2

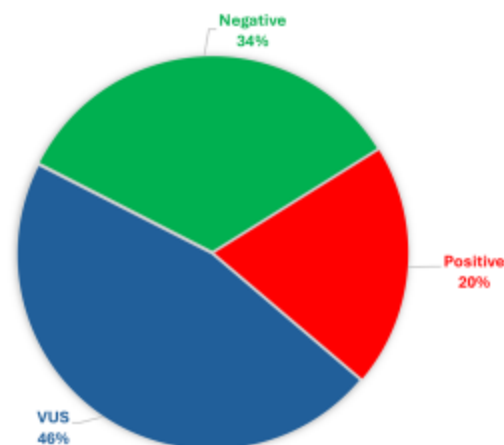


Figure 2. Results from the panel testing conducted on 8,216 individuals. Positive outcomes pertain to instances where a pathogenic variant/likely pathogenic variant was detected. VUS: Variant of unknown significance.

only 10.3% (1,854 out of 8,261) of the individuals referred for testing. A notable finding was that a significant proportion of individuals, specifically 86.4% (5,697 out of 6,591 for whom family history data was available), had a family history of cancer. Within this subgroup, 42% (2,396 out of 5,697) had a family history of the same type of cancer, indicating potential hereditary factors contributing to the prevalence of certain cancer types within families.

Out of the examined individuals, 4,641 (76.6%) were diagnosed with breast cancer, 560 (6.7%) with ovarian cancer, 238 with colorectal cancer (3.9%), 210 (3.5%) with pancreatic cancer, and 158 with prostate cancer (2.6%). Additionally, 532 were referred as healthy individuals with a significant family history of cancer, while 253 (4.2%) had a different type of cancer, and 1,670 (20.2%) had not provided any information at the time of genetic testing.

Hereditgene results. Approximately 20% (1,656 out of 8,261) of the individuals studied showed a LP/P variant (Figure 2). More precisely, within this group, 54.8% (908 out of 1,656) of the patients exhibited a LP/P in a gene of clinical significance. The breakdown of these variants in specific genes is as follows: *BRCA1* (23.13%), *BRCA2* (15.16%), *PALB2* (4.95%), *RAD51C* (1.87%), *PMS2* (1.57%), *CDKN2A* (1.45%), *MLH1* (1.45%), *MSH2* (1.03%), *TP53* (1.03%), *MSH6* (0.97%), *APC* (0.85%), *RAD51D* (0.48%),

PTEN (0.36%), *RET* (0.24%), *CDH1* (0.18%), *MEN1* (0.06%), and *VHL* (0.06%) (Figure 3). Notably, among the identified PVs, a significant proportion (6.52%, 108 out of 1,656) were CNVs (Figure 4).

Hereditgene results by cancer type. Among the patients diagnosed with various types of cancer, including breast cancer, ovarian cancer, colorectal cancer, pancreatic cancer, and prostate cancer, specific PVs/LPVs have been identified in a subset of cases. Specifically, out of 4,641 patients with breast cancer, 20% were found to have a PV/LPV. For ovarian cancer patients (totaling 560), this assumption rose to 27%, while 21% of the 238 colorectal cancer patients were found to carry PVs/LPVs. In the case of pancreatic cancer, affecting 210 individuals, 27% were found to have identifiable PVs. Lastly, among the 158 patients with prostate cancer, 17% were identified as having PVs/LPVs. The contribution of genes that identify PVs in each cancer type is shown in Figure 5A-E.

Double heterozygosity. Within the cohort of positive individuals, comprising 95 out of 1,656 cases (5.73%), it was observed that some individuals carry two PVs concurrently (Figure 6). One notable case involves a patient diagnosed with breast cancer at the age of 27, who was found to harbor two PVs within the *BRCA1* gene. These variants are identified as c.1287_1291del AGACT, p.(Asp430Thrfs*4), and c.1300_1307dupAGTG ATCC, p.(His437Valfs*7). Moreover, two patients were identified as carrying one PV in *BRCA1* and another in the

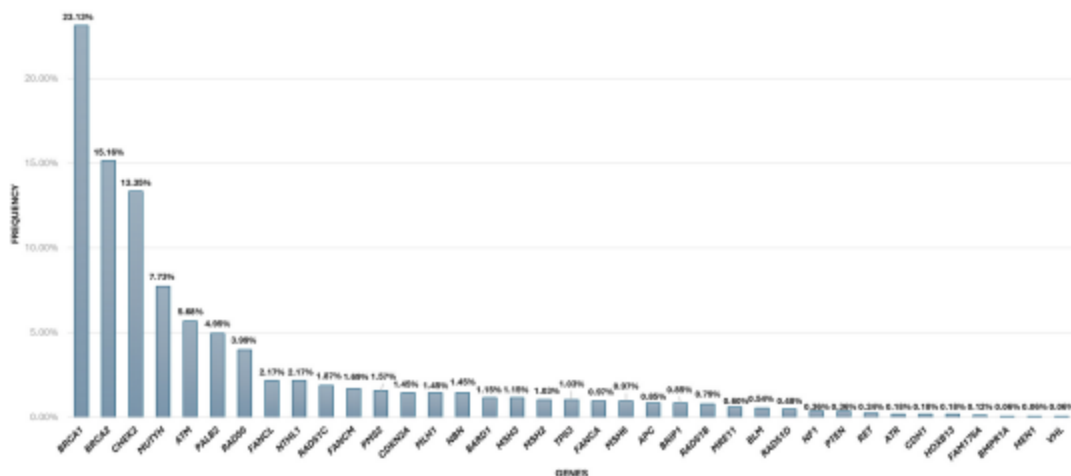


Figure 3. Percentage of pathogenic/likely pathogenic findings identified in each gene.

BRCA2 gene. In one instance, a patient diagnosed with breast cancer at 37 years old exhibited the pathogenic variant c.5467G>A, p.(Ala1823Thr) in *BRCA1*, alongside the variant c.2490_2491insT, p.(Val831Cysfs*2) in *BRCA2*. In another case, a patient diagnosed with ovarian cancer at 38 years old was found to harbor the pathogenic variant c.3607C>T, p.(Arg1203), in *BRCA1*, and the pathogenic variant c.9371A>T, p.(Asn3124Ile), in the *BRCA2* gene.

CHEK2 variants. Among the genetic variants in the *CHEK2* gene, missense variants are the most prevalent (59%). These mutations entail a single nucleotide change, leading to the substitution of one amino acid with another in the associated protein (Figure 7). One particular variant in the *CHEK2* gene, denoted as c.470T>C, results in the amino acid alteration p.(Ile157Thr) (Table II).

TP53 variants. Within the examined group, 17 individuals were identified to carry PVs within the *TP53* gene. Remarkably, most of these variants are present as missense variants, signifying changes where a single nucleotide substitution leads to the substitution of one amino acid with another within the *TP53* protein sequence (Table III).

Variants in homologous recombination (HR) genes. In the group of 1,656 individuals who yielded positive test results, a significant segment, precisely 1,310 individuals, were discovered to possess a PV in one or more genes linked to HR repair (Figure 8). These HR genes are pivotal in the precise restoration of double-stranded DNA breaks, safeguarding the stability and completeness of the genome.

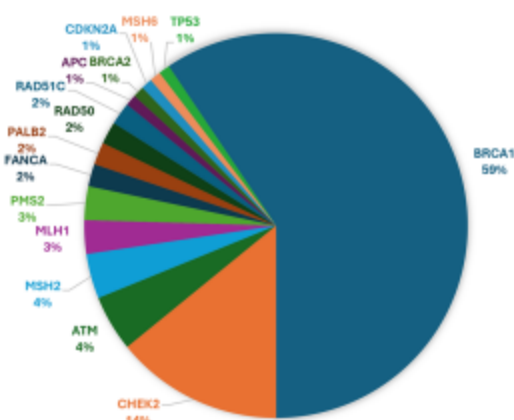


Figure 4. Percentage of pathogenic/likely pathogenic copy number variation findings identified in each gene.

WES results. The results of the study involve WES conducted on a total of 85 samples. During the analysis, the data underwent alignment, and variant annotation using JSI, leading to the identification of a substantial number of variants – 29,511 to be precise. These variants were further scrutinized, focusing on 588 genes associated with cancer, employing the guidelines set by the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). This refined the pool of variants to 3,615, narrowing down the focus to those with potential relevance to cancer. From this subset, a more

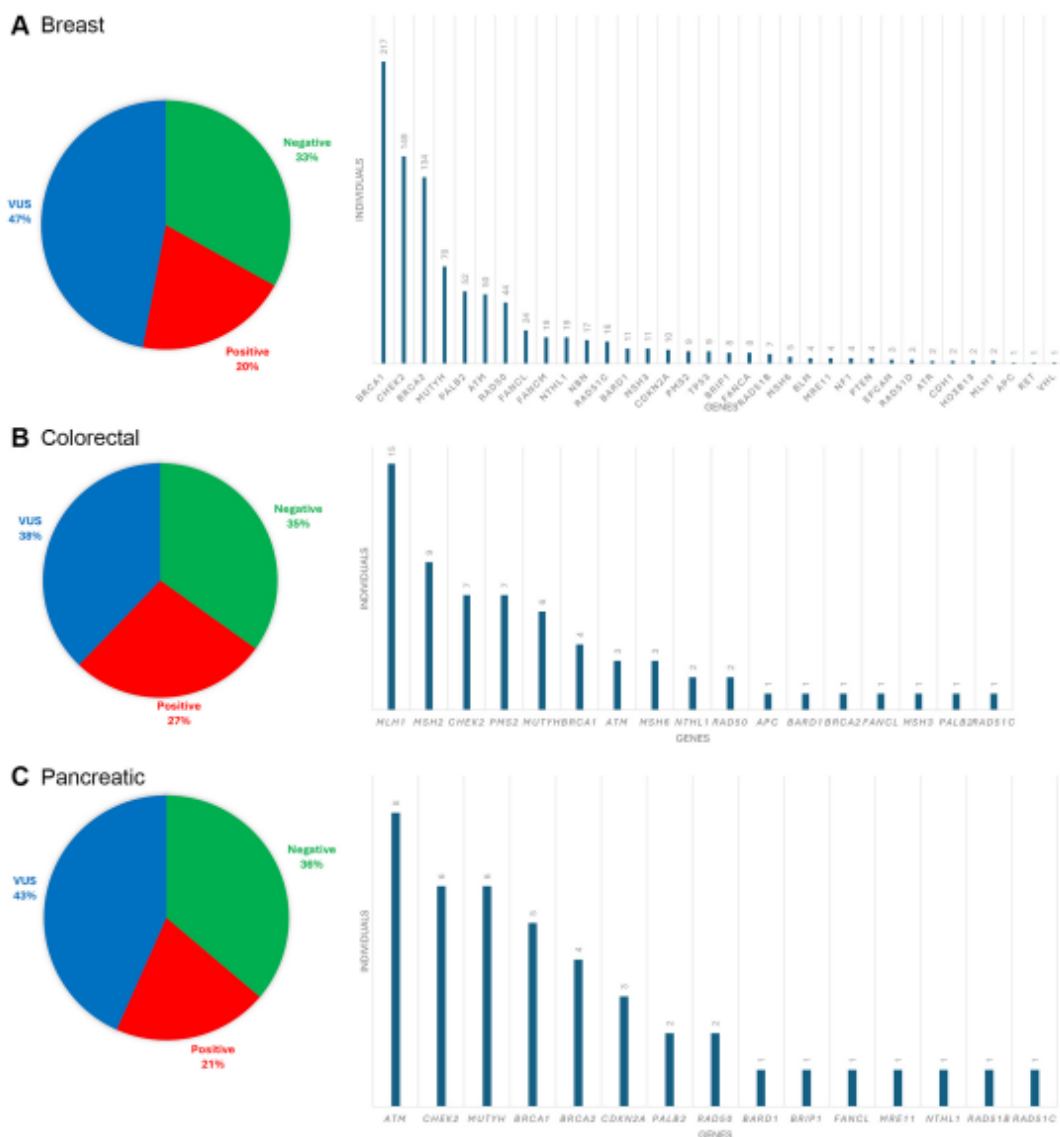


Figure 5. Continued

targeted investigation was carried out, resulting in the identification of four candidate variants that stood out as potential indicators of interest. Using WES analysis, the following findings were identified: *CTC1*: c.880C>T, p.(Gln294*); *MLH3*: c.405del, p.(Asp136Metfs*2), *PPM1D*: c.1426_1430del, p.(Glu476Leufs*3), and *SDHB*: c.395A>G, p.(His132Arg) (Figure 9, Table IV).

Discussion

The current study utilized advanced genetic analysis techniques, employing NGS technology to detect P/PL variants associated with hereditary cancer. This cutting-edge technique enabled the simultaneous examination of multiple genes, allowing for a comprehensive assessment of genetic predispositions to various

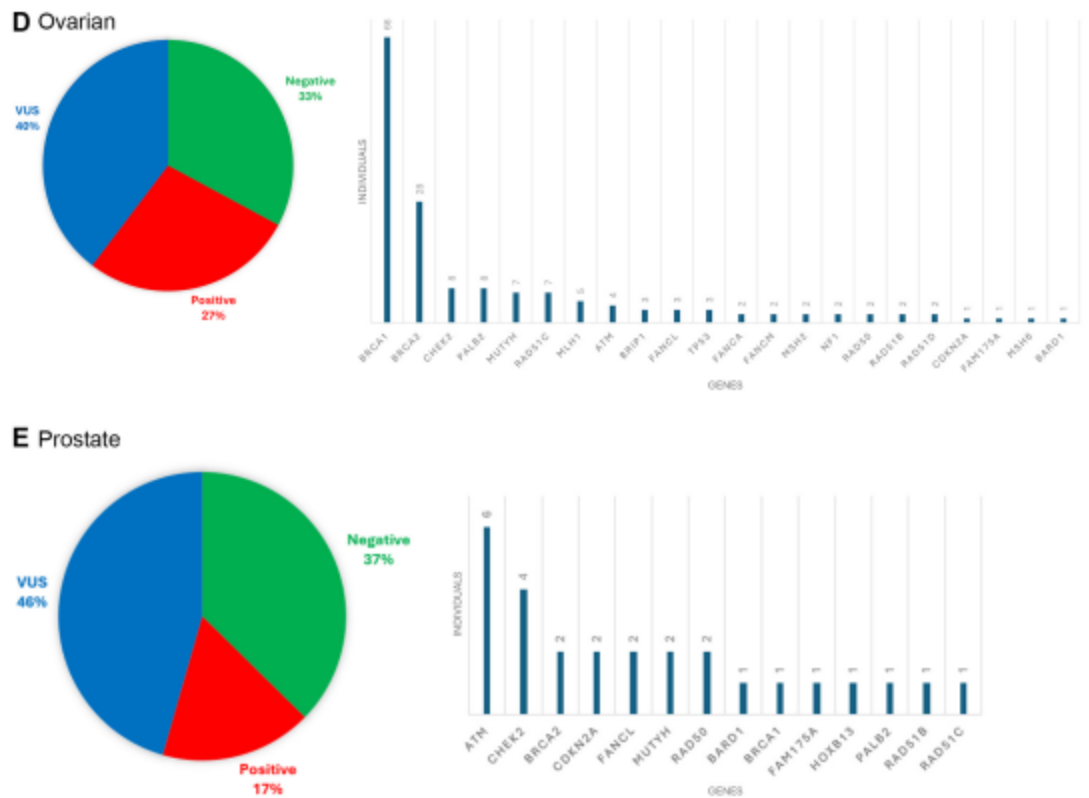


Figure 5. Results of panel testing for individuals diagnosed with A) breast, B) colorectal, C) pancreatic, D) ovarian, and E) prostate cancer.

forms of cancer. NGS technology revolutionizes genetic analysis by facilitating high-throughput sequencing of DNA samples, thereby enabling the rapid and cost-effective analysis of vast genomic regions (18). By examining a panel of genes associated with various cancer types, the study sought to capture a broad spectrum of potential genetic risk factors. By harnessing the power of NGS technology and multi-gene analysis, the study aimed to enhance our understanding of the genetic underpinnings of cancer susceptibility, ultimately paving the way for improved risk assessment, early detection, and personalized management strategies for individuals at heightened risk of hereditary cancer.

This study encompassed a comprehensive cohort of 8,261 individuals who were consecutively referred to our laboratory for the analysis of genes associated with hereditary cancer predisposition. This sizable and consecutive inclusion of individuals underscores the breadth and depth of the study's scope, reflecting a significant sample size representative of

those seeking genetic testing for hereditary cancer concerns. The inclusion of such a large and consecutive cohort speaks to the substantial demand for genetic testing in this field and highlights the importance of addressing hereditary factors in cancer risk assessment and management.

Upon variant analysis, findings unveiled the presence of at least one PV or LPV in a notable 20% of the studied cohort. This observation underscores the significance of genetic alterations in the context of hereditary cancer predisposition, suggesting a substantial proportion of individuals harboring genetic mutations with potential clinical implications. These PVs/LPVs represent alterations in genes known to confer an increased risk of developing cancer. Their identification within the study cohort highlights the importance of genetic testing in uncovering potential genetic predispositions and underscores the utility of such analyses in clinical practice. The 20% prevalence of PVs/LPVs underscores the importance of genetic screening

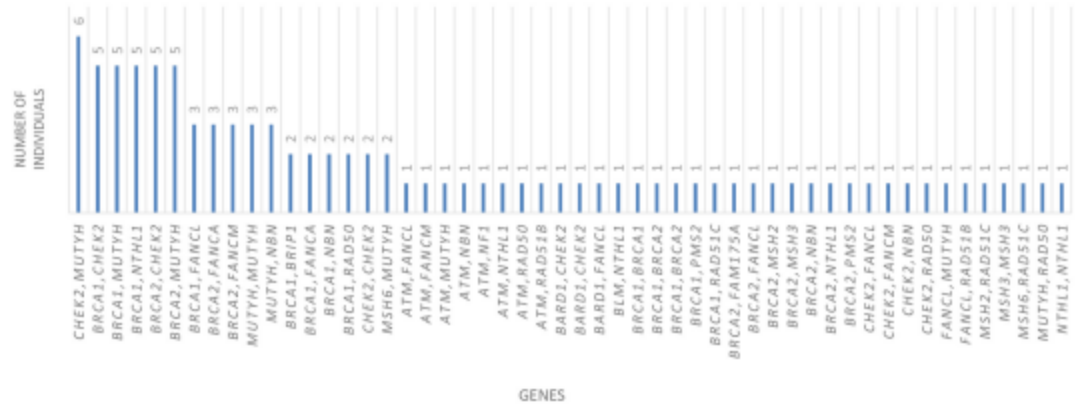


Figure 6. Configurations of genes in instances where there are two pathogenic variants/likely pathogenic variants (double heterozygotes).

and counseling in individuals with suspected hereditary cancer predisposition. Identifying these variants allows for targeted risk assessment, surveillance, and potentially preventive measures to mitigate the risk of cancer development in affected individuals and their families.

Among the subset of individuals harboring P/LP variants, a noteworthy proportion, comprising 54.8% (908 out of 1,656), were found to carry these variants within genes recognized for their clinical significance. This finding underscores the importance of identifying PVs/LPVs within genes known to play a pivotal role in hereditary cancer predisposition. Delving deeper into the breakdown of PVs within clinically significant genes, several notable patterns emerged. *BRCA1* and *BRCA2*, well-established tumor suppressor genes associated with hereditary breast and ovarian cancer syndrome, accounted for the largest proportions, with *BRCA1* contributing to 23.13% and *BRCA2* to 15.16% of the variants detected. These findings align with the established role of *BRCA1* and *BRCA2* variants in predisposing individuals to breast, ovarian, and other cancers (19). Additionally, other genes implicated in hereditary cancer syndromes exhibited varying frequencies of PVs within the cohort. Notable examples include *PALB2*, *RAD51C*, and *PMS2*, each contributing to 4.95%, 1.87%, and 1.57% of the variants, respectively, further highlighting the diverse genetic landscape of hereditary cancer predisposition. Moreover, the detection of PVs in genes, such as *CDKN2A*, *MLH1*, *MSH2*, *TP53*, *MSH6*, *APC*, *RAD51D*, *PTEN*, *RET*, *CDH1*, *MEN1*, and *VHL* underscores the importance of comprehensive genetic testing in uncovering potential risk factors across a spectrum of cancer types and syndromes (20, 21).

Furthermore, a significant and noteworthy discovery among the identified PVs was the occurrence of CNV in a substantial

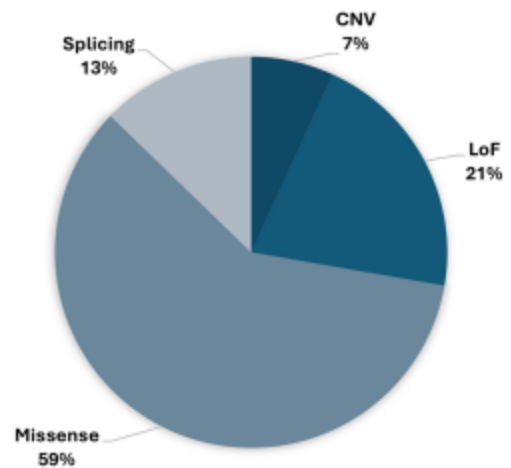


Figure 7. The involvement of different types of variants detected in the *CHEK2* gene within this study.

subset of cases, accounting for 6.52% (108 out of 1,656) of the individuals studied. This observation sheds light on the diverse spectrum of genetic alterations contributing to hereditary cancer predisposition, highlighting the importance of comprehensive genetic analysis techniques capable of detecting various types of genomic aberrations (22). CNVs represent a class of genetic mutations characterized by duplications, deletions, or rearrangements of large segments of DNA, which can have profound implications for gene function and disease susceptibility. In the context of hereditary cancer predisposition,

Table II. List of pathogenic and likely pathogenic variants (PVs/LPVs) in the *CHEK2* gene.

Variant	Number of individuals	Type of variant	gnomAD (no cancer)	rs
del9-10	9	CNV		
del3-4	3	CNV		
del7	3	CNV		
c.100C>T, p.(Gln34*)	4	LoF	-	rs1231012263
c.1011C>A, p.(Tyr337*)	2	LoF	-	rs760502479
c.1100del, p.(Thr367Metfs*15)	13	LoF	0.00171	rs555607708
c.1164del, p.(Thr389Profs*25)	2	LoF	-	rs758677815
c.1188delT, p.(Val397Phefs*17)	7	LoF	-	rs753159426
c.1232G>A, p.(Trp411*)	10	LoF	-	rs371418985
c.1442T>G, p.(Leu481*)	2	LoF	-	-
c.159_160del, p.(His54Leufs*22)	2	LoF	-	rs2054324732
c.222delT, p.(Pro75Leufs*35)	2	LoF	-	-
c.893_897del, p.(Tyr298Cysfs*12)	2	LoF	6.76764e-6	rs1390889028
c.1427C>T, p.(Thr476Met)	12	Missense	0.000318	rs142763740
c.349A>G, p.(Arg117Gly)	2	Missense	7.43565e-5	rs28909982
c.470T>C, p.(Ile157Thr)	83	Missense	0.00403	rs17879961
c.499G>A, p.(Gly167Arg)	35	Missense	1.35239e-5	rs72552322
c.444+1G>A	13	Splicing	8.11381e-5	rs121908698
c.592+3A>T	13	Splicing	1.35248e-5	rs587782849
c.792+2T>A	2	Splicing	-	rs545982789

CNV: Copy number variation; LoF: loss of function.

Table III. List of pathogenic and likely pathogenic variants (PVs/LPVs) in the *TP53* gene.

Variant	Number of individuals	Exon	Type of variant	gnomAD (no cancer)	rs
c.375G>A, p.(Thr125=)	1	Exon 4	Synonymous	-	rs55863639
c.524G>A, p.(Arg175His)	1	Exon 5	Missense	4.22e-6	rs28934578
c.542G>A, p.(Arg181His)	1	Exon 5	Missense	1.49e-5	rs397514495
c.584T>C, p.(Ile195Thr)	1	Exon 6	Missense	-	rs760043106
c.638G>A, p.(Arg213Gln)	1	Exon 6	Missense	4.22e-6	rs587778720
c.722C>G, p.(Ser241Cys)	1	Exon 7	Missense	-	rs28934573
c.730G>A, p.(Gly244Ser)	1	Exon 7	Missense	-	rs1057519989
c.814delinsCTT, p.(Val272Leufs*74)	1	Exon 8	LoF	-	-
c.818G>A, p.(Arg273His)	3	Exon 8	Missense	1.69e-5	rs28934576
c.844C>T, p.(Arg282Trp)	1	Exon 8	Missense	-	rs28934574
c.916C>T, p.(Arg306*)	1	Exon 8	LoF	-	rs121913344
c.1010G>A, p.(Arg337His)	3	Exon 10	Missense	-	rs121912664
c.1025G>C, p.(Arg342Pro)	1	Exon 10	Missense	-	rs375338359

LoF: Loss of function.

CNVs can encompass alterations in critical tumor suppressor genes or oncogenes, thereby significantly impacting an individual's risk of developing cancer. These findings emphasize the necessity of utilizing advanced genomic technologies capable of detecting CNVs alongside SNVs and small insertions/deletions (indels) for a comprehensive assessment of genetic risk factors (23). Understanding the prevalence and significance of CNVs in hereditary cancer predisposition has important clinical implications, as it can inform risk assessment, screening, and management strategies for individuals at heightened risk of developing cancer. By

integrating CNV analysis into genetic testing protocols, healthcare providers can provide more tailored and personalized care for individuals with suspected hereditary cancer predisposition, ultimately improving patient outcomes and reducing the burden of cancer within affected families (24, 25).

Within the cohort of individuals who tested positive for PVs/LPVs, an intriguing subset emerged, comprising 5.73% (95 out of 1,656) who were identified as carrying not just one, but two P/LP variants. This discovery underscores the complexity and potential severity of genetic predispositions observed in certain cases, suggesting a multifactorial

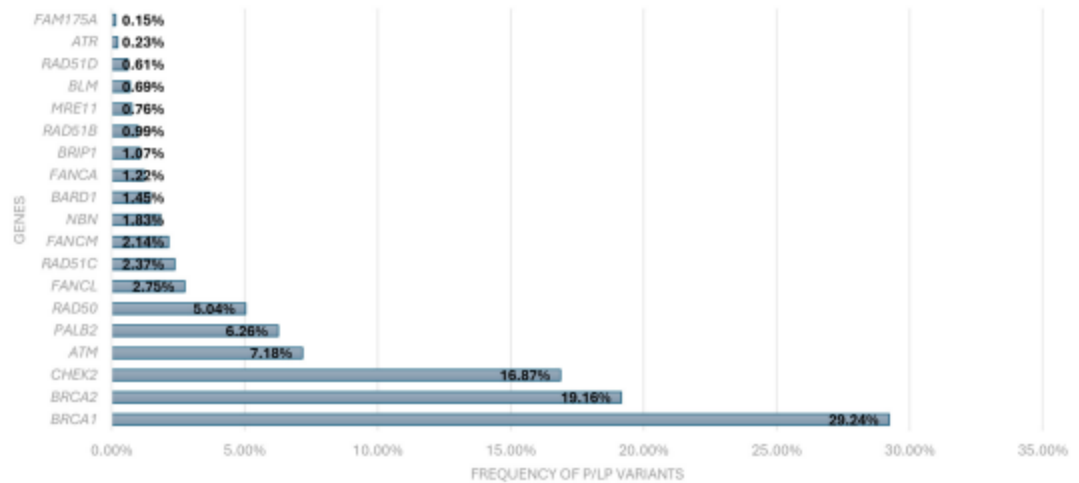


Figure 8. The occurrence rate of pathogenic/likely pathogenic (P/LP) variants in genes associated with homologous recombination (HR).

contribution to cancer susceptibility within this subset of individuals (26). Finding individuals with dual PVs/LPVs raises several compelling questions about the interplay between these genetic alterations and their cumulative effect on cancer risk. It suggests the presence of synergistic or additive effects, where the combination of multiple PVs may confer an even higher risk of cancer development compared to having a single variant alone (27). Furthermore, identifying individuals with two PVs/LPVs highlights the importance of thorough genetic analysis and counseling. It underscores the need for healthcare providers to consider the cumulative impact of multiple genetic variants when assessing cancer risk and developing personalized management strategies for affected individuals.

The *CHEK2* gene produces a protein called checkpoint kinase 2, which is essential for DNA damage response and cell cycle regulation. Variants in this gene are linked to an increased risk of various cancers, including breast cancer (28). It is crucial to recognize that the prevalence of *CHEK2* PVs in breast cancer patients can differ among populations and regions. In European studies, these variants have been found in 1-5% of breast cancer patients, indicating that *CHEK2* mutations could contribute significantly to hereditary breast cancer cases in these populations. In contrast, the prevalence of *CHEK2* PVs seems to be lower in other populations, such as Asians or Africans (29).

The clinical importance of *CHEK2* gene variants can be influenced by the specific mutation and its effect on protein function. Some variants might cause a moderate risk increase, while others could be linked to a higher risk (30).

Frameshift variants result from insertions or deletions of nucleotides that disrupt the reading frame of a gene. In the context of the *CHEK2* gene, frameshift variants can lead to a truncated or altered protein product. These variants can introduce premature stop codons, resulting in a non-functional or partially functional protein. Frameshift variants in the *CHEK2* gene have been linked to an increased risk of breast, prostate, and other cancers (31). Missense variants are single nucleotide changes that lead to the substitution of one amino acid for another in the protein sequence. In the *CHEK2* gene, missense mutations can affect the protein's structure and function by altering its three-dimensional conformation or enzymatic activity. Depending on the location and nature of the amino acid change, missense variants can either increase or decrease the risk of cancer. Some missense variants may result in a hyperactive protein, disrupting normal cellular processes. Others may lead to a non-functional protein, compromising the cell's ability to respond to DNA damage and maintain genomic stability (32). In the spectrum of genetic variants observed within the *CHEK2* gene, a prominent pattern emerges, with missense variants standing out as the most prevalent, constituting a significant 59% of the identified P/LP variants.

Li-Fraumeni syndrome (LFS) is a rare hereditary cancer predisposition syndrome characterized by a significantly increased risk of developing a wide range of cancers at a young age. LFS is primarily caused by germline variants in the *TP53* gene, which encodes the tumor suppressor protein p53 (33). *TP53* gene plays a crucial role in regulating cell growth, DNA repair, and apoptosis, making it a key guardian

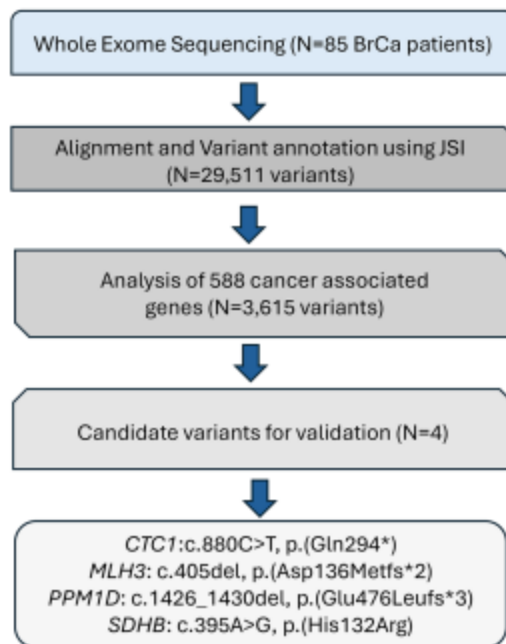


Figure 9. Workflow for prioritizing genes based on genetic information.

of genomic stability (34). Individuals with LFS have a high lifetime risk of developing various types of cancers, including soft tissue sarcomas, osteosarcomas, breast cancer, brain tumors, leukemia, colorectal cancer, melanoma, other rare cancers (35). The hallmark of LFS is the early onset of multiple primary cancers across different organ systems, often occurring before the age of 45. The pattern of cancer inheritance in LFS follows an autosomal dominant pattern, meaning that a person with a mutation in one copy of the *TP53* gene has a 50% chance of passing the mutation on to each of their offspring (36).

Like Li-Fraumeni Syndrome (LFL) refers to families who exhibit some, but not all, of the classic features of LFS. These families typically have a history of early-onset cancers, often involving multiple generations, suggestive of a hereditary predisposition to cancer. However, they may not meet the strict diagnostic criteria for LFS due to a lack of specific cancer types or the presence of additional genetic or environmental factors influencing cancer risk (37). The genetic basis of LFL is heterogeneous, and variants in genes other than *TP53* may contribute to the observed cancer predisposition in these families. For example, variants in genes, such as *CHEK2*, *BRCA1*, *BRCA2*, and others have been implicated in familial cancer syndromes with overlapping

features with LFS (38). Management of individuals with LFS or LFL typically involves regular cancer screening and surveillance starting at an early age to detect tumors at their earliest, most treatable stages. Genetic counseling and testing are essential for at-risk individuals and their families to assess their cancer risk, inform medical management decisions, and facilitate personalized cancer screening and prevention strategies. Additionally, lifestyle modifications, such as avoiding tobacco use, maintaining a healthy weight, and limiting exposure to environmental carcinogens, may help reduce cancer risk in these individuals (39).

In this study, the most common variants observed were missense variants, accounting for 88.2% of alterations within the *TP53* gene. Missense variants in the *TP53* gene are particularly significant due to the critical role *TP53* plays in regulating cell division and preventing the proliferation of cells with damaged DNA. As a tumor suppressor gene, *TP53* is instrumental in orchestrating cellular responses to stressors such as DNA damage, thereby safeguarding genomic integrity and inhibiting the development of cancer (40).

The identification of P/LP variants in HR genes among these individuals has significant implications for their cancer risk and treatment options. Disruption of HR pathway genes can impair the cell's ability to repair DNA damage effectively, leading to genomic instability and an increased predisposition to cancer development (41, 42). In our study, 79.1% of individuals possess P/LP variants in genes associated with HR. Understanding the prevalence of P/LP in HR genes within this cohort underscores the importance of genetic testing and counseling in identifying individuals at increased risk of hereditary cancer syndromes associated with HR pathway dysfunction.

WES is a breakthrough in genomics, enabling scientists and healthcare professionals to deeply analyze an individual's genetic makeup. This cutting-edge method primarily concentrates on meticulously examining the exome, the DNA segment responsible for protein coding. Interestingly, this portion constitutes a small percentage, around 1-2%, of the entire genome (43). Despite its small size compared to the vast genome, the exome holds great significance in genetic research. This compact genetic database is where most mutations causing diseases are found, making it an invaluable focus for understanding the origins and mechanisms of various disorders (44). A crucial application of WES lies in the field of oncology, particularly in deciphering the intricate relationships of genetic alterations in cancer development. WES has been instrumental in unraveling the complex network surrounding cancer progression. Breast cancer, a multifaceted disease influenced by a combination of genetic and environmental factors, serves as an example. Within the realm of genetics, specific gene variants, especially those in key genes, significantly contribute to heightened breast cancer risk. To fully grasp the intricate dance between genetic predispositions

Table IV. Genetic variants observed in breast cancer patients through whole exome sequencing (WES).

Age of breast cancer diagnosis	Family history BC	Transcript	Gene	Function	cDNA variant	Protein level	Type of variant	Classification ACMG-AMP	ClinVar	gnomAD (controls)	gnomAD v2.1.1 (non-cancer)	Other pathogenic variant
31	No	NM_025099	<i>CTCF</i>	CTIS telomere maintenance complex component 1	c.880C>T	p.(Gln294*)	Stopgain	Pathogenic	1451275	-	-	<i>MRE11</i> : c.1726C>T, p.(Arg576*)
44	No	NM_001040108	<i>MLH3</i>	Probably involved in the repair of mismatches in DNA	c.405del	p.(Asp136Metfs*2)	Frameshift	Likely pathogenic	1018651	-	-	-
40	No	NM_003620	<i>PPM1D</i>	Required for the relief of p53-dependent checkpoint mediated cell cycle arrest	c.1426_1430del	p.(Glu476Leufs*3)	Frameshift	Likely pathogenic	-	-	-	<i>RAD51C</i> : c.556C>T, p.(Arg186*)
54	No	NM_003000	<i>SDHB</i>	Iron-sulfur protein (IP) subunit of succinate dehydrogenase (SDH) that is involved in complex II of the mitochondrial electron transport chain and is responsible for transferring electrons from succinate to ubiquinone (coenzyme Q)	c.395A>G	p.(His132Arg)	Misense	Likely pathogenic	412452	-	-	<i>MRE11</i> : c.1714C>T, p.(Arg572*)

and environmental influences, it is vital to understand the complexity of breast cancer. This comprehensive approach is essential for developing well-rounded strategies for prevention, early detection, and tailored treatment plans to combat this widespread and impactful disease (45).

This study detected the following genetic variations in 85 female breast cancer patients through WES: *CTC1*:c.880C>T, p.(Gln294*); *MLH3*: c.405del, p.(Asp136Metfs*2); *PPM1D*: c.1426_1430del, p.(Glu476Leufs*3); and *SDHB*: c.395A>G, p.(His132Arg).

The *CTC1* gene, part of the CST complex, is vital for maintaining telomere stability at chromosome ends. Telomeres protect genetic material during DNA replication and shield chromosomes from degradation (46). The variant c.880C>T, p.(Gln294*) leads to a premature stop codon, forming a shortened protein. This can be detrimental as it disrupts normal protein function. In telomere maintenance, such variants may hinder CTC1's interaction with the CST complex or its role in telomere length regulation (47). Consequently, telomeres may destabilize and shorten faster, causing cellular issues, genome instability, and a heightened risk of genetic disorders.

The *MLH3* gene is a vital component of the DNA mismatch repair (MMR) pathway, crucial for maintaining genome stability and integrity. MMR corrects errors during DNA replication to ensure accurate genetic information (48). The variant c.405del, p.(Asp136Metfs*2) involves a nucleotide deletion at position 405, causing a frameshift mutation. This alters the protein-building instructions, disrupting the normal amino acid sequence. The variant results in a premature stop codon, producing a truncated MLH3 protein. Variants like c.405del, p.(Asp136Metfs*2), are often pathogenic or deleterious, affecting MLH3's normal function in the MMR pathway. This impairment may lead to a higher accumulation of genetic mutations and an increased risk of certain cancers, such as those associated with Lynch syndrome (49).

The gene protein phosphatase Mg²⁺/Mn²⁺ dependent 1D (*PPM1D*), also known as Wip1, plays a vital role in regulating cellular responses to stress and DNA damage. It encodes a protein that acts as a phosphatase, which means it removes phosphate groups from other proteins. This action can modulate the activity of various proteins involved in critical cellular processes (50). The variant c.1426_1430del, p.(Glu476Leufs*3) in the *PPM1D* gene involves the deletion of five nucleotides starting from position 1426. This deletion results in a frameshift mutation that leads to the creation of a premature stop codon, which results in a truncated or abnormally shortened PPM1D protein. This disrupts the normal function of the PPM1D protein, which can have significant implications for cellular responses to stress and DNA damage. This disruption may lead to an increased susceptibility to genetic instability and the development of various types of cancer. Notably, certain

variants in the *PPM1D* gene have been associated with a predisposition to a range of cancers, including breast cancer and ovarian cancer (51).

The gene succinate dehydrogenase complex iron sulfur subunit B (*SDHB*) is a crucial component of the mitochondrial enzyme complex known as succinate dehydrogenase (SDH) or complex II. This enzyme complex plays a pivotal role in both the citric acid cycle (Krebs cycle) and the electron transport chain within the mitochondria. It is involved in the oxidation of succinate to fumarate, a critical step in energy production through oxidative phosphorylation (52). The variant c.395A>G, p.(His132Arg) in the *SDHB* gene involves a change in a single nucleotide at position 395. Variants in genes like *SDHB* are of particular interest in the context of hereditary paraganglioma and pheochromocytoma syndromes, which are genetic conditions associated with the development of certain neuroendocrine tumors.

In international literature, several studies have identified potential new genes linked to breast cancer through WES (53, 54). However, it is crucial to conduct additional analysis to confirm these associations. Contemporary research endeavors are prioritizing the analysis of entire exomes and, more recently, whole genomes, rather than solely focusing on specific candidate genes. This approach is driving the exploration of novel connections between genes and diseases. By examining the entirety of the genome, which includes non-coding regions, studies utilizing whole-genome sequencing hold significant potential for identifying previously unrecognized genetic variants that play a role in disease susceptibility. Furthermore, recent advancements in technology aimed at detecting structural variations within the genome are starting to reveal genetic variants that may have been missed by conventional short-read sequencing techniques.

Conclusion

This study marks a significant milestone as the most comprehensive research undertaken by a single clinical diagnostic facility in Greece, encompassing the examination of over 10,000 individuals for hereditary cancer utilizing NGS technology since 2015 (55). The insights gleaned from this investigation hold transformative potential for healthcare providers, enabling them to customize patient care strategies based on the intricate nuances of genetic makeup rather than solely relying on traditional personal and family medical histories. Notably, the identification of PVs across multiple genes can offer invaluable insights into the complex array of tumor types observed within certain families, shedding light on potential genetic predispositions, and informing targeted treatment approaches.

However, while these initial findings are promising, further research endeavors are imperative to consolidate and expand upon these discoveries. Future studies, encompassing a larger

cohort of families and employing advanced WES techniques, are warranted to validate and build upon the initial findings, ultimately paving the way for more precise and personalized approaches to cancer management and prevention.

Conflicts of Interest

The Authors have no conflicts of interest to declare in relation to this study.

Authors' Contributions

All Authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by Nikolaos Tsoulos, Konstantinos Agiannitopoulos, Kevisa Potska, Anastasia Katseli, Christina Ntoga, Georgia Pepe, Dimitra Bouzarelou, Athanasios Papanthasiou, Dimitrios Grigoriadis, Georgios N. Tsaousis, Helen Gogas, Theodore Troupis, Konstantinos Papazisis, Ioannis Natsiopoulos, Vassileios Venizelos, Kyriakos Amaranitidis, Stylianos Giassas, Christos Papadimitriou, Elena Fountzilias, Maroulio Stathouloupoulou, Anna Koumariou, Grigorios Xepapadakis, Alexandru Blidaru, Daniela Zob, Oana Voinea, Mustafa Özdoğan, Mahmut Çerkez Ergören, Alinta Hegmane, Eirini Papadopoulou, George Nasioulas and Christos Markopoulos. The first draft of the article was written by Nikolaos Tsoulos and Konstantinos Agiannitopoulos and all Authors commented on previous versions of the article. All Authors read and approved the final article.

References

- Garutti M, Foffano L, Mazzeo R, Michelotti A, Da Ros L, Viel A, Miolo G, Zambelli A, Puglisi F: Hereditary cancer syndromes: a comprehensive review with a visual tool. *Genes (Basel)* 14(5): 1025, 2023. DOI: 10.3390/genes14051025
- Imyanitov EN, Kuligina ES, Sokolenko AP, Susptsin EN, Yanus GA, Iyevleva AG, Ivantsov AO, Aleksakhina SN: Hereditary cancer syndromes. *World J Clin Oncol* 14(2): 40-68, 2023. DOI: 10.5306/wjco.v14.i2.40
- Pozzar RA, Seven M: Interventions to support decision making in people considering germline genetic testing for BRCA 1/2 pathogenic and likely pathogenic variants: A scoping review. *J Genet Couns* 33(2): 392-401, 2024. DOI: 10.1002/jgc4.1738
- Rocca V, Blandino G, D'Antona L, Iuliano R, Di Agostino S: Li-Fraumeni syndrome: Mutation of TP53 is a biomarker of hereditary predisposition to tumor: new insights and advances in the treatment. *Cancers (Basel)* 14(15): 3664, 2022. DOI: 10.3390/cancers14153664
- Dal Buono A, Puccini A, Franchellucci G, Airoldi M, Bartolini M, Bianchi P, Santoro A, Repici A, Hassan C: Lynch syndrome: from multidisciplinary management to precision prevention. *Cancers (Basel)* 16(5): 849, 2024. DOI: 10.3390/cancers16050849
- Mighton C, Lerner-Ellis JP: Principles of molecular testing for hereditary cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 61(6): 356-381, 2022. DOI: 10.1002/gcc.23048
- Levine R, Kahn RM, Perez L, Brewer J, Ratner S, Li X, Yeoshua E, Frey MK: Cascade genetic testing for hereditary cancer syndromes: a review of barriers and breakthroughs. *Fam Cancer* 23(2): 111-120, 2024. DOI: 10.1007/s10689-024-00373-4
- Charron M, Kaiser B, Dauge A, Gallois H, Lapointe J, Dorval M, Nabi H, Joly Y: Integrating hereditary breast and ovarian cancer genetic counselling and testing into mainstream clinical practice: Legal and ethical challenges. *Crit Rev Oncol Hematol* 178: 103797, 2022. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2022.103797
- Ueki A, Yoshida R, Kosaka T, Matsubayashi H: Clinical risk management of breast, ovarian, pancreatic, and prostatic cancers for BRCA1/2 variant carriers in Japan. *J Hum Genet* 68(8): 517-526, 2023. DOI: 10.1038/s10038-023-01153-1
- Price KS, Svenson A, King E, Ready K, Lazzarin GA: Inherited cancer in the age of next-generation sequencing. *Biol Res Nurs* 20(2): 192-204, 2018. DOI: 10.1177/1099800417750746
- Kamps R, Brandão RD, Bosch BJ, Paulussen AD, Xanthoulea S, Blok MJ, Romano A: Next-generation sequencing in oncology: Genetic diagnosis, risk prediction and cancer classification. *Int J Mol Sci* 18(2): 308, 2017. DOI: 10.3390/ijms18020308
- Pei XM, Yeung MHY, Wong ANN, Tsang HF, Yu ACS, Yim AKY, Wong SCC: Targeted sequencing approach and its clinical applications for the molecular diagnosis of human diseases. *Cells* 12(3): 493, 2023. DOI: 10.3390/cells12030493
- Imyanitov E, Sokolenko A: Integrative genomic tests in clinical oncology. *Int J Mol Sci* 23(21): 13129, 2022. DOI: 10.3390/ijms232113129
- Serrati S, De Summa S, Pilato B, Petriella D, Lacalamita R, Tommasi S, Pinto R: Next-generation sequencing: advances and applications in cancer diagnosis. *Onco Targets Ther* 9: 7355-7365, 2016. DOI: 10.2147/OTT.S99807
- Monteiro AN, Bouwman P, Kousholt AN, Eccles DM, Millot GA, Masson JY, Schmidt MK, Sharan SK, Scully R, Wiesmüller L, Couch F, Vreeswijk MPG: Variants of uncertain clinical significance in hereditary breast and ovarian cancer genes: best practices in functional analysis for clinical annotation. *J Med Genet* 57(8): 509-518, 2020. DOI: 10.1136/jmedgenet-2019-106368
- Davidson AL, Dressel U, Norris S, Canson DM, Glubb DM, Fortuno C, Hollway GE, Parsons MT, Vidgen ME, Holmes O, Koufariotis LT, Lakis V, Leonard C, Wood S, Xu Q, McCart Reed AE, Pickett HA, Al-Shinnag MK, Austin RL, Burke J, Cops EJ, Nichols CB, Goodwin A, Harris MT, Higgins MJ, Ip EL, Kiraly-Borri C, Lau C, Mansour JL, Millward MW, Monnik MJ, Pachter NS, Raganathan A, Susman RD, Townshend SL, Trainer AH, Troth SL, Tucker KM, Wallis MJ, Walsh M, Williams RA, Winship IM, Newell F, Tudini E, Pearson JV, Poplawski NK, Mar Fan HG, James PA, Spurdle AB, Waddell N, Ward RL: The clinical utility and costs of whole-genome sequencing to detect cancer susceptibility variants—a multi-site prospective cohort study. *Genome Med* 15(1): 74, 2023. DOI: 10.1186/s13073-023-01223-1
- Agiannitopoulos K, Potska K, Katseli A, Ntoga C, Tsaousis GN, Pepe G, Bouzarelou D, Tsoulos N, Papanthasiou A, Ziogas D, Venizelos V, Markopoulos C, Iosifidou R, Karageorgopoulou S, Giassas S, Natsiopoulos I, Papazisis K, Vasilaki-Antonatou M, Psyrris A, Koumariou A, Matthaios D, Zairi E, Blidaru A, Banu E, Jinga DC, Laçin Ş, Özdoğan M, Papadopoulou E, Nasioulas G: Only 32.3% of breast cancer families with pathogenic variants in cancer genes utilized cascade genetic testing. *Cancers (Basel)* 15(21): 5218, 2023. DOI: 10.3390/cancers15215218
- Jones JC, Golafshar MA, Coston TW, Rao R, Wysokinska E, Johnson E, Esplin ED, Nussbaum RL, Heald B, Klint M, Barrus K, Usón PL Jr, Nguyen CC, Colon-Otero G, Bekaii-Saab TS,

- Dronca R, Kunze KL, Samadder NJ: Universal genetic testing vs. guideline-directed testing for hereditary cancer syndromes among traditionally underrepresented patients in a community oncology program. *Cureus* 15(4): e37428, 2023. DOI: 10.7759/cureus.37428
- 19 Valentini V, Bucalo A, Conti G, Celli L, Porzio V, Capalbo C, Silvestri V, Ottini L: Gender-specific genetic predisposition to breast cancer: BRCA genes and beyond. *Cancers (Basel)* 16(3): 579, 2024. DOI: 10.3390/cancers16030579
- 20 Morrish N, Snowsill T, Dodman S, Medina-Lara A: Preferences for genetic testing to predict the risk of developing hereditary cancer: a systematic review of discrete choice experiments. *Med Decis Making* 44(3): 252-268, 2024. DOI: 10.1177/0272989X241227425
- 21 Kamio T, Kamio H, Aoki T, Ondo Y, Uchiyama T, Yamamoto-Shimajima K, Watanabe M, Okamoto T, Kanno H, Yamamoto T: Molecular profiles of breast cancer in a single institution. *Anticancer Res* 40(8): 4567-4570, 2020. DOI: 10.21873/anticancer.14462
- 22 Agiannitopoulos K, Pepe G, Tsaousis GN, Potska K, Bouzarelou D, Katseli A, Ntougka C, Meintani A, Tsoulos N, Giassas S, Venizelos V, Markopoulos C, Iosifidou R, Karageorgopoulou S, Christodoulou C, Natsopoulos I, Papazisis K, Vasilaki-Antonatou M, Kabletsas E, Psyrri A, Ziogas D, Lalla E, Koumariou A, Anastasakou K, Papadimitriou C, Ozmen V, Tansan S, Kaban K, Ozatli T, Eniu DT, Chiorean A, Blidaru A, Rinsma M, Papadopoulou E, Nasioulas G: Copy number variations (CNVs) account for 10.8% of pathogenic variants in patients referred for hereditary cancer testing. *Cancer Genomics Proteomics* 20(5): 448-455, 2023. DOI: 10.21873/cgp.20396
- 23 Quinodoz M, Kaminska K, Cancellieri F, Han JH, Peter VG, Celik E, Janeschitz-Kriegl L, Schäfer N, Hauenstein D, György B, Calzetti G, Hahaut V, Custódio S, Sousa AC, Wada Y, Murakami Y, Fernández AA, Hernández CR, Minguez P, Ayuso C, Nishiguchi KM, Santos C, Santos LC, Tran VH, Vaclavik V, Scholl HPN, Rivolta C: Detection of elusive DNA copy-number variations in hereditary disease and cancer through the use of noncoding and off-target sequencing reads. *Am J Hum Genet* 111(4): 701-713, 2024. DOI: 10.1016/j.ajhg.2024.03.001
- 24 Agaoglu NB, Unal B, Akgun Dogan O, Zolfagharian P, Sharifli P, Karakurt A, Can Senay B, Kizilboga T, Yildiz J, Dinler Doganay G, Doganay L: Determining the accuracy of next generation sequencing based copy number variation analysis in Hereditary Breast and Ovarian Cancer. *Expert Rev Mol Diagn* 22(2): 239-246, 2022. DOI: 10.1080/14737159.2022.2048373
- 25 Ueda T, Tsubamoto H, Takimoto Y, Isono-Taniguchi R, Narita S, Nakagawa K, Wakimoto Y, Nishimura Y, Muroi Y, Nagahashi M, Hirota S, Sawai H, Shibahara H: Comprehensive genomic profiling detects hereditary cancers and confers survival advantage in patients with gynaecological cancers. *Anticancer Res* 43(5): 2091-2101, 2023. DOI: 10.21873/anticancer.16370
- 26 Madar L, Majoros V, Szűcs Z, Nagy O, Babicz T, Butz H, Patócs A, Balogh I, Koczok K: Double heterozygosity for rare deleterious variants in the BRCA1 and BRCA2 genes in a Hungarian patient with breast cancer. *Int J Mol Sci* 24(20): 15334, 2023. DOI: 10.3390/ijms242015334
- 27 Megid TBC, Barros-Filho MC, Pisani JP, Achatz MI: Double heterozygous pathogenic variants prevalence in a cohort of patients with hereditary breast cancer. *Front Oncol* 12: 873395, 2022. DOI: 10.3389/fonc.2022.873395
- 28 Boonen RA, Vreeswijk MP, van Attikum H: CHEK2 variants: linking functional impact to cancer risk. *Trends Cancer* 8(9): 759-770, 2022. DOI: 10.1016/j.trecan.2022.04.009
- 29 Pavlovica K, Irmejs A, Noukas M, Palover M, Kals M, Tonisson N, Metspalu A, Gronwald J, Lubinski J, Murmane D, Kalina A, Loza P, Maksimenko J, Trofimovics G, Subatniece S, Daneberga Z, Miklasevics E, Gardovskis J: Spectrum and frequency of CHEK2 variants in breast cancer affected and general population in the Baltic states region, initial results and literature review. *Eur J Med Genet* 65(5): 104477, 2022. DOI: 10.1016/j.ejmg.2022.104477
- 30 LaDuca H, Polley EC, Yussuf A, Hoang L, Gutierrez S, Hart SN, Yadav S, Hu C, Na J, Goldgar DE, Fulk K, Smith LP, Horton C, Profato J, Pesaran T, Gau CL, Pronold M, Davis BT, Chao EC, Couch FJ, Dolinsky JS: A clinical guide to hereditary cancer panel testing: evaluation of gene-specific cancer associations and sensitivity of genetic testing criteria in a cohort of 165,000 high-risk patients. *Genet Med* 22(2): 407-415, 2020. DOI: 10.1038/s41436-019-0633-8
- 31 Kleiblova P, Stolarova L, Krizova K, Lhota F, Hojny J, Zemankova P, Havranek O, Vocka M, Cerna M, Lhotova K, Borecka M, Janatova M, Soukupova J, Sevcik J, Zimovjanova M, Kotlas J, Panczak A, Vesela K, Cervenkova J, Schneiderova M, Burocziova M, Burdova K, Stranecky V, Foretova L, Machackova E, Tavandzis S, Kmoch S, Macurek L, Kleibl Z: Identification of deleterious germline CHEK2 mutations and their association with breast and ovarian cancer. *Int J Cancer* 145(7): 1782-1797, 2019. DOI: 10.1002/ijc.32385
- 32 Mundt E, Mabey B, Rainville I, Ricker C, Singh N, Gardiner A, Manley S, Slavin T Jr: Breast and colorectal cancer risks among over 6,000 CHEK2 pathogenic variant carriers: A comparison of missense versus truncating variants. *Cancer Genet* 278-279: 84-90, 2023. DOI: 10.1016/j.cancergen.2023.10.002
- 33 Guha T, Malkin D: Inherited TP53 mutations and the Li-Fraumeni syndrome. *Cold Spring Harb Perspect Med* 7(4): a026187, 2017. DOI: 10.1101/cshperspect.a026187
- 34 Zhu KL, Su F, Yang JR, Xiao RW, Wu RY, Cao MY, Ling XL, Zhang T: TP53 to mediate immune escape in tumor microenvironment: an overview of the research progress. *Mol Biol Rep* 51(1): 205, 2024. DOI: 10.1007/s11033-023-09097-7
- 35 Mansur MB, Greaves M: Convergent TP53 loss and evolvability in cancer. *BMC Ecol Evol* 23(1): 54, 2023. DOI: 10.1186/s12862-023-02146-6
- 36 Abdel-Razeq H: Surgical options for patients with early-stage breast cancer and pathogenic germline variants: an oncologist perspectives. *Front Oncol* 13: 1265197, 2023. DOI: 10.3389/fonc.2023.1265197
- 37 Giacomazzi CR, Giacomazzi J, Netto CB, Santos-silva P, Selistre SG, Maia AL, Oliveira VZD, Camey SA, Goldim JR, Ashton-prolla P: Pediatric cancer and Li-Fraumeni/Li-Fraumeni-like syndromes: a review for the pediatrician. *Rev Assoc Med Bras* (1992) 61(3): 282-289, 2015. DOI: 10.1590/1806-9282.61.03.282
- 38 Vogel WH: Li-Fraumeni syndrome. *J Adv Pract Oncol* 8(7): 742-746, 2017. DOI: 10.6004/jadpro.2017.8.7.7
- 39 Consul N, Amini B, Ibarra-Rovira JJ, Blair KJ, Moseley TW, Taher A, Shah KB, Elsayes KM: Li-Fraumeni syndrome and whole-body MRI screening: Screening guidelines, imaging features, and impact on patient management. *AJR Am J Roentgenol* 216(1): 252-263, 2021. DOI: 10.2214/AJR.20.23008
- 40 Kennedy MC, Lowe SW: Mutant p53: it's not all one and the same. *Cell Death Differ* 29(5): 983-987, 2022. DOI: 10.1038/s41418-022-00989-y
- 41 Collet L, Hanvic B, Turinetto M, Treilleux I, Chopin N, Le Saux O, Ray-Coquard I: BRCA1/2 alterations and reversion mutations

- in the area of PARP inhibitors in high grade ovarian cancer: state of the art and forthcoming challenges. *Front Oncol* 14: 1354427, 2024. DOI: 10.3389/fonc.2024.1354427
- 42 Voutsadakis IA, Stravodimou A: Homologous recombination defects and mutations in DNA damage response (DDR) genes besides *BRCA1* and *BRCA2* as breast cancer biomarkers for PARP inhibitors and other DDR targeting therapies. *Anticancer Res* 43(3): 967-981, 2023. DOI: 10.21873/anticancer.16241
- 43 Udupa P, Ghosh DK: Implementation of exome sequencing to identify rare genetic diseases. *Methods Mol Biol* 2719: 79-98, 2024. DOI: 10.1007/978-1-0716-3461-5_5
- 44 Hartley T, Gillespie MK, Graham ID, Hayeems RZ, Li S, Sampson M, Boycott KM, Potter BK: Exome and genome sequencing for rare genetic disease diagnosis: A scoping review and critical appraisal of clinical guidance documents produced by genetics professional organizations. *Genet Med* 25(11): 100948, 2023. DOI: 10.1016/j.gim.2023.100948
- 45 Zelli V, Compagnoni C, Cannita K, Capelli R, Capalbo C, Di Vito Nolfi M, Alesse E, Zazzeroni F, Tessitore A: Applications of next generation sequencing to the analysis of familial breast/ovarian cancer. *High Throughput* 9(1): 1, 2020. DOI: 10.3390/ht9010001
- 46 Lim CJ, Cech TR: Shaping human telomeres: from shelterin and CST complexes to telomeric chromatin organization. *Nat Rev Mol Cell Biol* 22(4): 283-298, 2021. DOI: 10.1038/s41580-021-00328-y
- 47 Nasheuer HP, Onwubiko NO: Lagging strand initiation processes in DNA replication of eukaryotes-strings of highly coordinated reactions governed by multiprotein complexes. *Genes (Basel)* 14(5): 1012, 2023. DOI: 10.3390/genes14051012
- 48 Muro Y, Sugiura K, Mimori T, Akiyama M: DNA mismatch repair enzymes: Genetic defects and autoimmunity. *Clin Chim Acta* 442: 102-109, 2015. DOI: 10.1016/j.cca.2015.01.014
- 49 Valle L, de Voer RM, Goldberg Y, Sijursen W, Försti A, Ruiz-Ponte C, Caldés T, Garré P, Olsen MF, Nordling M, Castellvi-Bel S, Hemminki K: Update on genetic predisposition to colorectal cancer and polyposis. *Mol Aspects Med* 69: 10-26, 2019. DOI: 10.1016/j.mam.2019.03.001
- 50 Husby S, Hjerminde Justesen E, Grønbaek K: Protein phosphatase, Mg²⁺/Mn²⁺-dependent 1D (*PPM1D*) mutations in haematological cancer. *Br J Haematol* 192(4): 697-705, 2021. DOI: 10.1111/bjh.17120
- 51 Vodolazhsky DI, Mayakovskaya AV, Kubyshekin AV, Aliev KA, Fomochkina II: Clinical significance of gene polymorphisms for hereditary predisposition to breast and ovarian cancer (review of literature). *Klin Lab Diagn* 66(12): 760-767, 2021. DOI: 10.51620/0869-2084-2021-66-12-760-767
- 52 Liu C, Zhou D, Yang K, Xu N, Peng J, Zhu Z: Research progress on the pathogenesis of the SDHB mutation and related diseases. *Biomed Pharmacother* 167: 115500, 2023. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.115500
- 53 Glentis S, Dimopoulos AC, Rouskas K, Ntritsos G, Evangelou E, Narod SA, Mes-Masson AM, Foulkes WD, Rivera B, Tonin PN, Ragoussis J, Dimas AS: Exome sequencing in *BRCA1*- and *BRCA2*-negative Greek families identifies *MDM1* and *NBEAL1* as candidate risk genes for hereditary breast cancer. *Front Genet* 10: 1005, 2019. DOI: 10.3389/fgene.2019.01005
- 54 Lee NY, Hum M, Amali AA, Lim WK, Wong M, Myint MK, Tay RJ, Ong PY, Samol J, Lim CW, Ang P, Tan MH, Lee SC, Lee ASG: Whole-exome sequencing of *BRCA*-negative breast cancer patients and case-control analyses identify variants associated with breast cancer susceptibility. *Hum Genomics* 16(1): 61, 2022. DOI: 10.1186/s40246-022-00435-7
- 55 Tsaousis GN, Papadopoulou E, Apeessos A, Agiannitopoulos K, Pepe G, Kampouri S, Diamantopoulos N, Floros T, Iosifidou R, Katopodi O, Koumariou A, Markopoulos C, Papazisis K, Venizelos V, Xanthakis I, Xepapadakis G, Banu E, Eniu DT, Negru S, Stanculeanu DL, Ungureanu A, Ozmen V, Tansan S, Tekinel M, Yalcin S, Nasioulas G: Analysis of hereditary cancer syndromes by using a panel of genes: novel and multiple pathogenic mutations. *BMC Cancer* 19(1): 535, 2019. DOI: 10.1186/s12885-019-5756-4

Received June 26, 2024

Revised July 12, 2024

Accepted July 15, 2024

Article

Polygenic Risk Score (PRS) Combined with NGS Panel Testing Increases Accuracy in Hereditary Breast Cancer Risk Estimation

Nikolaos Tsoulos¹, Eirini Papadopoulou¹, Konstantinos Agiannitopoulos^{1,*}, Dimitrios Grigoriadis¹, Georgios N. Tsaousis¹, Dimitra Bouzarelou¹, Helen Gogas², Theodore Troupis³, Vassileios Venizelos⁴, Elena Fountzilias⁵, Maria Theochari⁶, Dimitrios C. Ziogas², Stylianos Giassas⁷, Anna Koumariou⁸, Athina Christopoulou⁹, George Busby¹⁰, George Nasioulas¹ and Christos Markopoulos³

- ¹ Genekor Medical S.A., 15344 Athens, Greece; ntsoulos@genekor.com (N.T.); eirinipapad@genekor.com (E.P.); d.grigoriadis@genekor.com (D.G.); gtsaousis@genekor.com (G.N.T.); d.bouzarelou@genekor.com (D.B.); gnasioulas@genekor.com (G.N.)
 - ² First Department of Internal Medicine, Laikon General Hospital, School of Medicine, National Kapodistrian University of Athens, 11527 Athens, Greece; helggogas@gmail.com (H.G.); ziogasc@gmail.com (D.C.Z.)
 - ³ School of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, 11527 Athens, Greece; ttroupis@med.uoa.gr (T.T.); klinikimastou@yahoo.gr (C.M.)
 - ⁴ Metropolitan Hospital, 18547 Athens, Greece; bennievenizelos@gmail.com
 - ⁵ Second Department of Medical Oncology, Euromedica General Clinic, 54645 Thessaloniki, Greece; fountzila@oncogenome.gr
 - ⁶ Oncology Unit, "Hippokrateion" General Hospital of Athens, 11527 Athens, Greece; mtheochari@gmail.com
 - ⁷ Second Oncology Clinic IASO, General Maternity and Gynecology Clinic, 15123 Athens, Greece; sgiassas@yahoo.com
 - ⁸ Hematology Oncology Unit, 4th Department of Internal Medicine, School of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, Attikon University Hospital, 12462 Athens, Greece; akoumari@yahoo.com
 - ⁹ Oncology Unit, ST Andrews General Hospital of Patras, 26332 Patras, Greece; athinachristo@hotmail.com
 - ¹⁰ Allelica Inc., 447 Broadway, New York, NY 10013, USA; george@allelica.com
- * Correspondence: kagiannitopoulos@genekor.com; Tel.: +30-21-0603-2138



Citation: Tsoulos, N.; Papadopoulou, E.; Agiannitopoulos, K.; Grigoriadis, D.; Tsaousis, G.N.; Bouzarelou, D.; Gogas, H.; Troupis, T.; Venizelos, V.; Fountzilias, E.; et al. Polygenic Risk Score (PRS) Combined with NGS Panel Testing Increases Accuracy in Hereditary Breast Cancer Risk Estimation. *Diagnostics* **2024**, *14*, 1826. <https://doi.org/10.3390/diagnostics14161826>

Academic Editor: Sandeep K. Vashist

Received: 11 June 2024
Revised: 21 July 2024
Accepted: 15 August 2024
Published: 21 August 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Breast cancer (BC) is the most prominent tumor type among women, accounting for 32% of newly diagnosed cancer cases. BC risk factors include inherited germline pathogenic gene variants and family history of disease. However, the etiology of the disease remains occult in most cases. Therefore, in the absence of high-risk factors, a polygenic basis has been suggested to contribute to susceptibility. This information is utilized to calculate the Polygenic Risk Score (PRS) which is indicative of BC risk. This study aimed to evaluate retrospectively the clinical usefulness of PRS integration in BC risk calculation, utilizing a group of patients who have already been diagnosed with BC. The study comprised 105 breast cancer patients with hereditary genetic analysis results obtained by NGS. The selection included all testing results: high-risk gene-positive, intermediate/low-risk gene-positive, and negative. PRS results were obtained from an external laboratory (Allelica). PRS-based BC risk was computed both with and without considering additional risk factors, including gene status and family history. A significantly different PRS percentile distribution consistent with higher BC risk was observed in our cohort compared to the general population. Higher PRS-based BC risks were detected in younger patients and in those with FH of cancers. Among patients with a pathogenic germline variant detected, reduced PRS values were observed, while the BC risk was mainly determined by a monogenic etiology. Upon comprehensive analysis encompassing FH, gene status, and PRS, it was determined that 41.90% (44/105) of the patients demonstrated an elevated susceptibility for BC. Moreover, 63.63% of the patients with FH of BC and without an inherited pathogenic genetic variant detected showed increased BC risk by incorporating the PRS result. Our results indicate a major utility of PRS calculation in women with FH in the absence of a monogenic etiology detected by NGS. By combining high-risk strategies, such as inherited disease analysis, with low-risk screening strategies, such as FH and PRS, breast cancer risk stratification can be improved. This would facilitate the development of more effective preventive measures and optimize the allocation of healthcare resources.

Keywords: polygenic risk score (PRS); breast cancer; next-generation sequencing (NGS)

1. Introduction

Breast cancer is the most prominent tumor type among women, accounting for 32% of newly diagnosed cancer cases. Annually, the incidence of this malignancy increases by 0.6% to 1% [1]. As of 2022, the worldwide incidence of breast cancer among women surpassed 2.3 million [2]. The etiology of the disease is frequently unknown, with non-hereditary causes and risk factors predominating; thus, the identification of risk factors that could be utilized for early cancer detection and increased surveillance is critical and continues to be an active area of investigation [3].

Recent research has indicated that a polygenic risk model of inheritance, wherein a substantial quantity of prevalent single-nucleotide polymorphisms (SNPs) collectively contribute to overall risk, may account for certain instances of cancer predisposition [4,5]. The influence of common, low-penetrance genetic loci has been studied using data from genome-wide studies (GWS). Genome-wide association studies use the genetic risk information from the millions of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) discovered to determine an individual's genetic susceptibility to a specific, usually complex, trait. Using this information, the sum of all common, intermediate, and rare variants considered to contribute to disease susceptibility is derived. Interactions within and between these variants form a Polygenic Risk Score (PRS). PRS's utility has been investigated in several complex diseases as well as several cancers, including breast and prostate cancer [6]. Furthermore, for breast cancer, PRS combined with family history appears to be able to stratify the risk of developing the disease. In addition, studies have shown that PRS analysis can modify the risk in carriers of pathogenic mutations mainly in intermediate-risk genes [7–9]. However, there are no studies that indicate the contribution of this analysis to the increase in cancer predisposition in patients with a personal history of the disease.

Multigene analysis by Next-Generation Sequencing (NGS) is a highly effective method for identifying individuals who possess a genetic susceptibility to inherited malignancies, especially in cases involving a familial history of cancers, the occurrence of multiple cancers in a single individual, or the onset of cancer at a younger age [10]. Moreover, a germline alteration in a cancer-associated gene is usually detected in up to 25% of breast cancer patients [11]. However, only 10–15% of them harbor an alteration in a high-risk gene that could explain the disease onset [12]. The remaining cases involve patients with moderate-to-low risk variants, which are not sufficient to explain the development of cancer and therefore cannot be utilized to modify treatment or predict recurrence.

Similarly, the identification of a low-risk germline variant in a non-affected individual usually creates confusion even following genetic counselling without providing concrete information about the risk of cancer or the preventive measures required based on the genetic analysis result. Hence, there is a suggestion that PRS could be incorporated into risk models and utilized in such cases to more accurately compute the breast cancer risk and subsequently adjust patients' stratification into lower- or higher-risk groups, leading to a more individualized risk assessment [4]. Moreover, it could be implemented to identify at-risk patients among the gene-negative group and modify their preventive management accordingly [13].

This study aims to evaluate retrospectively the clinical usefulness of PRS, utilizing a group of patients with a BC diagnosis. The PRS-calculated risk will be incorporated with other risk factors such as the family history of BC and germline variant status. The number of patients that could have been identified by the combination of risk factors will be determined, with an emphasis on the additive value that this multivariable analysis provides for adequate risk prediction. Since our cohort consists of individuals who are already affected, the primary objective is to evaluate the sensitivity of this multi-factor approach in risk assessment.

2. Materials and Methods

2.1. Patient Information

A total of 105 women with diagnosed breast cancer and hereditary analysis results available were included in the study. The selection was performed in order to include all testing results categories: positive in a high-risk gene, positive in an intermediate/low-risk gene, and negative. Of those, 47 had a family history of breast/ovarian cancer (41 with a first-degree relative with BC), 35 a family history of other tumors, and 23 were without any family history of cancer. The mean age of diagnosis was 47 years (range 27–74) (Table 1).

Table 1. Cohort characteristics that were incorporated into the study.

	All	With FH of BC	Without FH of BC
Age at Diagnosis			
Number of Women < 45 yo	67	20	47
Number of Women > 45 yo	38	20	18
Average age	47	47.6	42.7
Genetic testing			
Number of Negative cases	47	22	25
Number of Pathogenic in high risk gene	20	11	9
Number of Pathogenic in moderate risk gene	20	3	17
Number of Pathogenic in low/unspecified risk gene	18	4	14

2.2. PRS Calculation

Polygenic Risk Score results were obtained from an external laboratory (Allelica, New York, NY, USA) using DNA genotyping in about 750,000 genetic variants by an Illumina genotyping array, the Global Screening Array (GSA), and Beagle V.5 to impute 50 million additional genome wide variants. The PRS was computed from 577,113 SNPs by summing the number of risk alleles of each SNP weighted by the corresponding effect size. SNPs and effect sizes were retrieved from summary statistics of the GENOME WIDE Association Study (GWAS) on breast cancer as previously reported [14] with an additional selection step using a modified Stacked Clumping and Thresholding approach [15,16]. The PRS model that was chosen has demonstrated substantial stratification potential across a variety of ancestries [17].

Family history was defined as having at least one first-degree relative diagnosed with BC. Individual level risk was computed by first assessing where in a genetic ancestry-matched distribution of PRS values the test individual's PRS lies, and then converting this percentile into lifetime risk. Risk distributions were built by applying Allelica's PRS to the UK Biobank dataset [18].

Lifetime risk of breast cancer was estimated using a Cox proportional hazards model of incident breast cancer in the UK Biobank dataset. High risk was defined as a greater than 20% lifetime risk threshold for BC, as recommended by the American Cancer Society [19]. The risks were computed both with and without considering additional risk factors, including gene status and family history. In calculating the risk of BC, pathogenic variants of the *BRCA1/2* and *CHEK2* genes were the only factors taken into account in relation to gene status.

2.3. Statistical Analysis

The statistical analysis employed *t*-tests using the 'ttest_ind' module from Python's (version 3.10.9) *scipy.stats* library [20] to compare groups across different features such as family history, genetic testing outcomes, PRS percentile, PRS risk, and various combined risk estimation strategies. This choice was based on the observation that our data are normally distributed, which is a key requirement for the *t*-test.

Density and scatter plots were generated using Python's (version 3.10.9) *matplotlib* [21] and *seaborn* libraries [22]. We used kernel density estimation (KDE) to visualize the

distribution of continuous variables such as PRS percentile and risk scores. Parameters for the kernel density estimation (KDE) figures were adjusted, with the smoothing bandwidth parameter set to 'Scott' and the scaling factor (bw_adjust) set to 0.9. The smoothing bandwidth parameter ('Scott') and the scaling factor (bw_adjust = 0.9) were chosen to provide a balance between over-smoothing and under-smoothing the data.

3. Results

3.1. PRS Results

A total of 105 breast cancer (BC) cases that had been genetically analyzed using a capture-based next-generation sequencing (NGS) method to examine 52 cancer-related genes were selected for PRS analysis [23].

The inclusion of all NGS result categories was ensured in the selection of cases that had undergone PRS evaluation. Twenty patients harbored a pathogenic variant in a gene associated with a high risk of developing the disease (*BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *TP53*), twenty patients carried a moderate risk variant (*CHEK2*, *ATM*, *BRIP1*, *RAD51C*, *PMS2*), eighteen patients had a pathogenic variant in a gene with low /undetermined correlation with BC, and forty-seven patients had no detectable variation. Whole-Exome Sequencing analysis has also been conducted in all 85 cases without a high-risk gene pathogenic alteration; however, no additional clinically significant alteration was identified.

PRS values for every patient were computed. Patients were categorized into distinct categories according to the presence or absence of family history (FH), the presence of a gene alteration, and the classification of the gene variant as high, moderate, or low risk. The PRS percentile for each case was computed. Cancer risk for each subgroup was determined solely based on the absolute PRS values.

Additionally, risk assessments were computed, incorporating factors such as age, FH, and *BRCA*/*CHEK2* gene status, both with and without PRS, following the provided algorithms.

3.1.1. Percentile of PRS in BC Patients

The utilization of percentile categorization for PRS in our cohort indicates that it has a higher mean PRS than the general population as determined by the UK Biobank (Allelica internal data [24,25] (Figure 1). Moreover, PRS values were increased both in patients with and without a FH of BC. Nevertheless, the more pronounced right-skewed distribution of patients with FH of BC, suggests that the PRS values are even more elevated in this subset of patients (Figure 2).

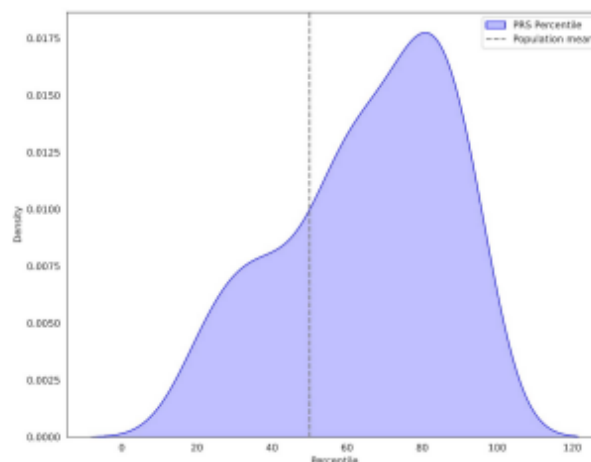


Figure 1. PRS percentile distribution in 105 patients with breast cancer. The dotted line represents the average PRS expected in the general population.

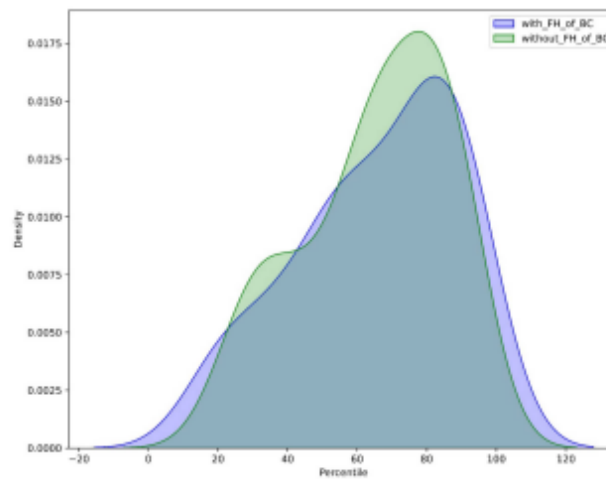


Figure 2. PRS percentile distribution in patients with and without family history (FH) of breast cancer. Blue: PRS-based risk estimation in patients with FH of BC. Green: PRS-based risk estimation in patients without FH of BC.

With respect to the pathogenic variant status, patients with a positive genetic result in a high-risk gene exhibited lower PRS distribution values than those harboring an alteration in a moderate- or low-risk gene. Patients with negative genetic test results appear to have the greatest PRS contribution to breast cancer risk, as indicated by their elevated PRS values (Figure 3). Therefore, there is a statistically significant difference in the PRS percentile observed in patients with a high- or moderate-risk gene alteration compared to patients with negative genetic test results ($p = 0.013$ and $p = 0.015$, respectively). There was no statistically significant difference observed in the PRS values between low-risk gene carriers and non-carriers ($p = 0.600$). Similar observations were obtained when considering the younger patients' group (<45 years), while no difference in the PRS percentile based on gene status could be observed for older patients (>45 years).

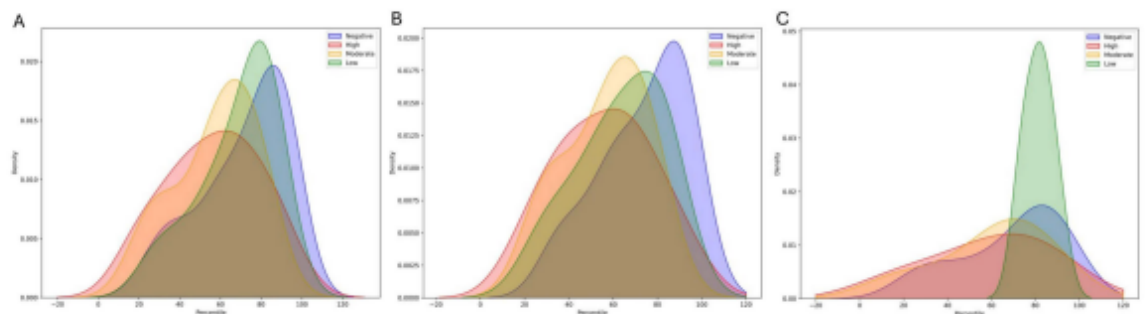


Figure 3. (A) PRS percentile distribution in patients without pathogenic gene alterations and with alterations in high-, moderate-, and low/unspecified-risk genes. (B) PRS percentile distribution in patients <45 years without pathogenic gene alterations and with alterations in high-, moderate-, and low/unspecified-risk genes. (C) PRS percentile distribution in patients >45 years without pathogenic gene alterations and with alterations in high-, moderate-, and low/unspecified-risk genes. Blue: PRS-based risk estimation in patients without a cancer gene alteration detected by NGS. Green: PRS-based risk estimation in patients with a variant in a low-risk gene. Orange: PRS-based risk estimation in patients with a variant in a moderate-risk gene. Red: PRS-based risk estimation in patients with a variant in a high-risk gene.

3.1.2. The Contribution of FH and Gene Status in Accurate Risk Estimation

The cancer risk estimation distribution determined by PRS results revealed that an elevated risk of cancer incidence was present in merely 12.38% (13/105) of the cases examined. When considering factors such as FH and gene status, in addition to PRS, it was found that 41.90% (44/105) of the patients who underwent testing exhibited greater than twice the average lifetime risk (Figure 4).

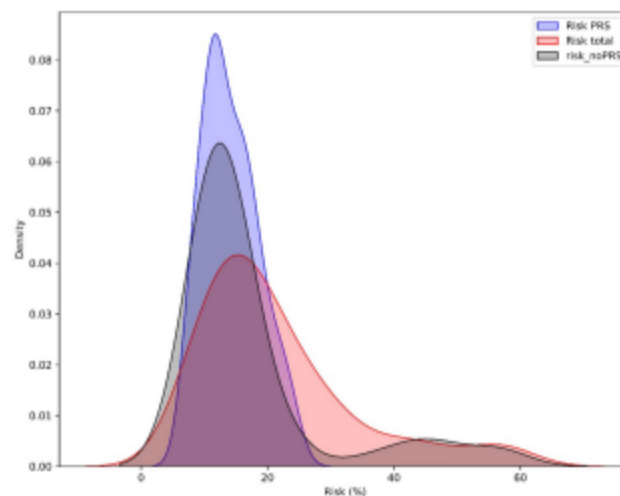


Figure 4. Density curves of BC risk distribution in the cohort of BC patients. Red density curve: BC risk estimation based on PRS only (Risk PRS), Blue: BC risk estimation based on FH and gene status without PRS (risk_noPRS). Grey: BC risk estimation including all factors in addition to PRS (Risk total).

Among the patients with a family history of breast cancer, the implementation of the PRS without considering other risk factors could identify an increased >20% BC risk in 15% of the patients, while this percentage is slightly reduced to 10.77% in patients with no FH. When FH, gene status, and PRS are all considered in the risk estimation, 65.00% of the cases with FH would show an increased risk of BC occurrence, with a mean age of disease diagnosis of 47.31 years (29–67 years). In contrast, this percentage was limited to only 27.69% in patients without a FH of the disease, with a mean age of disease diagnosis of 41.95 (28–64 years) (Figure 5). The difference in the rate of high PRS between women with positive and negative FH of cancer is statistically significant ($p < 0.01$).

Moreover, PRS-calculated risks differ significantly among older and younger patients. In our cohort, 16.42% (11/67) of the patients <45 showed increased PRS-calculated BC risk (median risk 15.5%), compared to solely 5.26% (2/38) of those ≥ 45 (median risk 11.5%).

Furthermore, PRS results indicative of a high risk of BC were identified more frequently in the 47 patients lacking a gene alteration, comprising 25.53% of the cases. The median PRS-based calculated risk of BC was 16%, which was further empowered if the FH information was incorporated in the risk calculation (18.1%). In contrast, only 1.72% of the gene-positive cases would have shown an increased BC risk based on the PRS results if the genetic testing analysis had not been performed. A low penetrance *CHEK2* variation was present in the only patient among the gene-positive cohort with an increased BC risk of 20.4% based solely on PRS (or 28.2% when the FH of BC in the family is considered). The difference in the rate of high PRS between women who tested positive for pathogenic mutations and those with negative genetic testing results is also statistically significant ($p < 0.01$) (Figure 6). In addition, the PRS-based risk values were considerably lower, with a median PRS-based risk of 12.15%. This value is very close to the population risk of breast cancer, as determined by the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) registry, which is 13% [1]. As a result, we could deduce that the BC incidence in gene-positive cases is not of

polygenic origin but probably has a monogenic etiology, thereby elevating the significance of single-gene involvement in such instances. In the gene-negative patients, though, the polygenic etiology of cancer is more plausible, and it leads to increased PRS values.

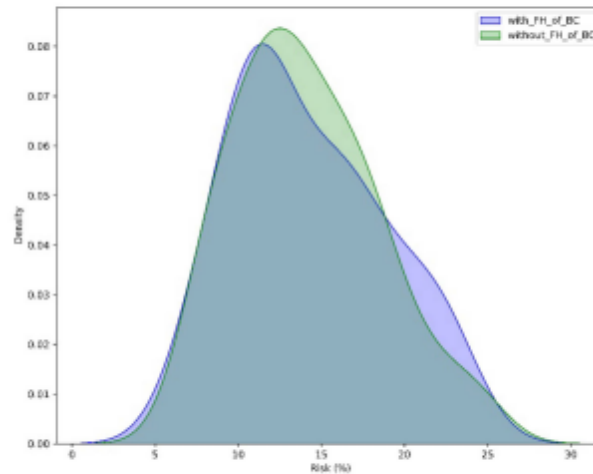


Figure 5. Density curves of PRS-based risk estimation in patients with and without FH of BC. Blue: PRS-based risk estimation in patients with FH of BC. Green: PRS-based risk estimation in patients without FH of BC.

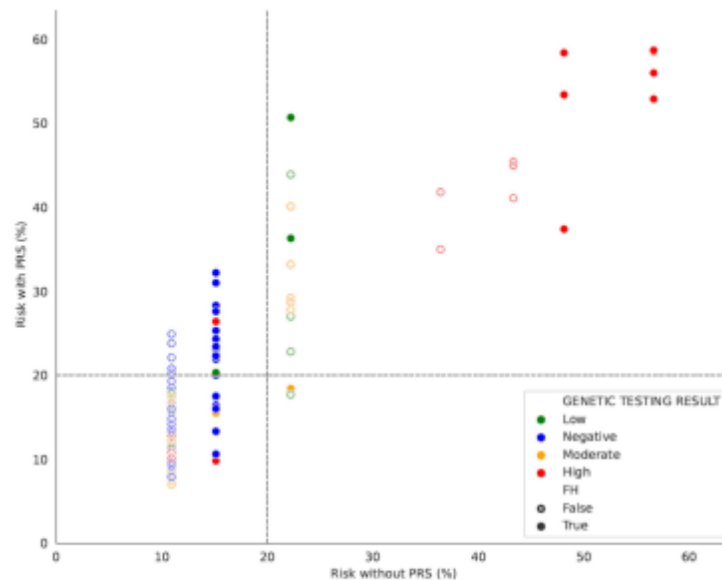


Figure 6. Risk distribution with and without the integration of PRS results in patients categorized according to their FH/gene status.

4. Discussion

Genetic testing is considered mandatory for women with FH of BC or a personal history of BC and/or specific clinical features [26]. Even though such an analysis can determine the risk of disease in cases with a pathogenic finding, it is not informative concerning the BC risk occurrence in case of a negative result.

PRS is increasingly used to screen the general population for the estimation of several disease risk assessments, including cancer. Therefore, the integration of PRS into routine healthcare decision-making has been proposed in several studies [27,28].

Even though this approach could be useful to identify individuals with high PRS and therefore increased need of surveillance, it could also lead to complacency in case of negative PRS results. Therefore, the identification of the appropriate population to be screened is of great utility.

4.1. PRS-Based BC Risk Estimations

In this study we retrospectively evaluated the risk estimations obtained by PRS in patients already diagnosed with breast cancer, taking also into account other important factors such as breast cancer FH and NGS-based genetic test results for inherited alterations in BC-related genes. Given that BC has already manifested in our cohort, the objective of this study was to examine whether adding PRS to other risk factors could enhance the detection rate of high-risk individuals who would have benefited from preventive screening prior to the disease's onset. Our results indicate that the addition of PRS in cancer risk evaluation significantly increases the sensitivity of such risk estimation.

The gene-negative group exhibited a higher prevalence of high PRS detection, accounting for 25.53% of the cases, in contrast to the gene-positive group's 1.72%. The disparity in PRS values between women who received negative genetic testing results and those who tested positive for a pathogenic alteration was identified as statistically significant ($p = 0.0028$). Hence, PRS appears to exert a negligible influence on risk estimation in individuals carrying high or intermediate risk alleles, whereas the monogenic variant represents the most likely cause of BC. In negative patients, the greatest influence on disease occurrence is attributed to polygenic etiology.

In the population of FH-positive patients, the combination of PRS, FH, and gene status would have identified 65% of high-risk cases. In FH-negative cases, 27.69% of patients at increased risk would be detected, indicating a less significant contribution of PRS analysis.

The major utility was also seen in FH-positive patients with negative genetic test results where the positivity in terms of increased risk of cancer development reached the percentage of 63.63% (14/22) patients. Therefore, PRS's utility seems to be increased in FH-positive cases, identifying a bigger percentage of at-risk cases.

These findings align with a prior investigation that examined the efficacy of PRS when combined with additional risk factors, including family history and positivity in a gene associated with moderate to high susceptibility to disease. A combination of risk factors enhanced the positive predictive value by 45 to 50%, while a high PRS identified 39.5% of the women who were more likely to receive a breast cancer diagnosis [29].

Moreover, a study investigating a genetic risk-based approach in identifying women at low risk of disease has shown that BC incidence was significantly reduced in the absence of variant *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *ATM*, or *CHEK2* genes and a low polygenic risk score (hazard ratio, 0.39) [30].

4.2. Clinical Applicability of PRS-Guided BC Risk Assessment

Notwithstanding the critiques pertaining to the clinical applicability of PRS-guided risk assessment, its integration with additional risk factors can yield substantial advantages in our study [31,32]. The implementation of PRS among women with a FH of BC in our cohort contributed substantially to the detection of a greater proportion of at-risk cases within patients with negative genetic testing results. Among these patients, FH combined with PRS could indicate increased cancer risk in more than 63% of the cases, highlighting the need for enhanced preventive screening strategies to prevent the onset of cancer in this subset. These results are in accordance with previous studies showing that PRSs could explain 10–18% of familial breast cancer risk [33,34].

However, when FH is absent, the proportion of high-risk detections among patients with NGS-negative status is diminished to 28%. Considering that the individuals in our

cohorts have already suffered from BC, we could deduce that in these cases PRS analysis would have failed to identify at-risk individuals in 70% of the cases, showing a lack of sensitivity in cancer risk detection in the absence of other risk factors.

Although PRS values are higher in the patients with younger disease onset compared with those who were diagnosed with cancer at >45 years, the utility of PRS in detecting cancer risk seems constant in the gene-negative cohort independently of age, with 37.5% and 52.17% high BC risk, respectively. The addition of the family history parameter is more meaningful in the younger patients though increasing the rate of higher-risk patients to 75% (6/8), compared to 57.14% (8/14) in the older group.

Our results indicate that although PRS tends to be higher in our cohort than in the general population, it cannot replace other risk factors such as FH and genetic analysis results. However, it can be used in combination with them to increase the rate of at-risk individuals who require enhanced surveillance to prevent disease or for early disease detection. Despite these results, the implementation of all risk factors still misses more than half of the women who eventually developed BC in our cohort. Therefore, attention should be given to the appropriate interpretation of the results obtained when performing such analysis paying special attention to explicitly explaining that a negative result does not exclude the possibility of cancer and should not lead to complacency and diminished surveillance may result inadvertently.

Numerous studies have demonstrated the superiority of PRS implementation in enhancing population estimates of women's breast cancer risk in comparison to the use of family history or pathogenic variants alone [30]. Research has shown that integrating PRS into breast cancer risk assessment can lead to cost-effective risk stratification strategies [35,36]. However, the extent to which polygenic risk stratification contributes to cost-effective cancer screening remains uncertain [37]. Based on these results, it is crucial to incorporate PRS into population-wide initiatives to improve the precision of breast cancer risk assessment among study participants. Nevertheless, the implementation of PRS in clinical settings requires the consideration of several critical factors. These include the absence of evidence-based guidelines, the lack of standardization in test methodology and reporting, and the absence of patient education to facilitate comprehension of the results [38].

To enhance the applicability of PRS in clinical settings for the evaluation of breast cancer risk and personalized management, it is essential to assess a variety of components. The development of robust decision support tools for healthcare providers, the establishment of effective monitoring and evaluation mechanisms, the evaluation of the costs associated with PRS testing, the provision of comprehensive patient education on the implications and limitations of PRS results, and the assurance of accessibility to testing facilities are among the actions to consider.

To address obstacles, guarantee equitable access to PRS testing, and optimize the advantages of personalized breast cancer care, healthcare providers, researchers, policy-makers, genetic counsellors, and patient advocacy groups must collaborate [39].

4.3. Limitations of the Study

The most significant limitation of the study is the number of patients available for PRS calculation. However, these patients were derived from a breast cancer patient population with known genetic test results and included both individuals with and without a family history of cancer. Unfortunately, other clinical data were not available.

Another limitation is that the lifetime risk is estimated from the PRS alone using a model based on the relative risk conferred by the PRS and a baseline average lifetime risk of 12%. Other risk estimation models such as the CanRisk/BOADICEA model were not included in the analysis, partially because this model is designed to estimate future risks of developing cancer, while the population studied has already developed the disease [40,41].

Additionally, the retrospective design of the study restricts its ability to draw definitive conclusions regarding the potential of PRS integration in clinical practice.

5. Conclusions

To our knowledge, this is the first study in a Greek population to calculate the PRS in women with breast cancer while also considering FH and the outcomes derived from NGS analysis for inherited cancer syndromes. Our results indicate a major utility of PRS calculation in women with FH in the absence of a monogenic etiology detected by NGS. By combining high-risk strategies, such as inherited disease analysis, with low-risk screening strategies, such as FH and PRS, breast cancer risk stratification can be improved. This would facilitate the development of more effective preventive measures and optimize the allocation of healthcare resources. However, it is important to note that the current evidence supporting the use of PRS in clinical practice is still limited. Consequently, although PRS has the potential to enhance personalized medicine and risk prediction, additional research is required to gain a comprehensive understanding of its practical application and impact on clinical practice.

Author Contributions: Conceptualization, N.T. and E.P.; methodology, G.B.; software, G.B.; validation, G.B.; formal analysis, G.N.T. and D.G.; investigation, E.P. and A.K.; data curation, H.G., T.T., V.V., E.F., M.T., D.C.Z., S.G., A.K., A.C. and C.M.; writing—original draft preparation, N.T. and E.P.; writing—review and editing, K.A., G.N.T., D.G., D.B., H.G., T.T., V.V., E.F., M.T., D.C.Z., S.G., A.K., A.C., G.B., G.N. and C.M.; supervision, G.N.; project administration, C.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committee of the Hellenic Breast Surgeons Society (1256/06-06-2024).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Data is contained within the article.

Conflicts of Interest: G.B. is employed by and holds equity in Allelica, Inc. The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

1. Siegel, R.L.; Giaquinto, A.N.; Jemal, A. Cancer statistics, 2024. *CA Cancer J. Clin.* **2024**, *74*, 12–49.
2. Breast Cancer. 2024. Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer> (accessed on 2 May 2024).
3. Løyland, B.; Sandbekken, I.H.; Grov, E.K.; Utne, I. Causes and Risk Factors of Breast Cancer, What Do We Know for Sure? An Evidence Synthesis of Systematic Reviews and Meta-Analyses. *Cancers* **2024**, *16*, 1583. [CrossRef]
4. Roberts, E.; Howell, S.; Evans, D.G. Polygenic risk scores and breast cancer risk prediction. *Breast* **2023**, *67*, 71–77.
5. Wang, Y.; Zhu, M.; Ma, H.; Shen, H. Polygenic risk scores: The future of cancer risk prediction, screening, and precision prevention. *Med. Rev.* **2021**, *1*, 129–149.
6. Lambert, S.A.; Abraham, G.; Inouye, M. Towards clinical utility of polygenic risk scores. *Hum. Mol. Genet.* **2019**, *28*, 133–142.
7. Gallagher, S.; Hughes, E.; Wagner, S.; Tshiaba, P.; Rosenthal, E.; Roa, B.B.; Kurian, A.W.; Domchek, S.M.; Garber, J.; Lancaster, J.; et al. Association of a Polygenic Risk Score with Breast Cancer among Women Carriers of High- and Moderate-Risk Breast Cancer Genes. *JAMA Netw. Open* **2020**, *3*, e208501.
8. Gao, C.; Polley, E.C.; Hart, S.N.; Huang, H.; Hu, C.; Gnanaolivu, R.; Lilyquist, J.; Boddicker, N.J.; Na, J.; Ambrosone, C.B.; et al. Risk of Breast Cancer among Carriers of Pathogenic Variants in Breast Cancer Predisposition Genes Varies by Polygenic Risk Score. *J. Clin. Oncol.* **2021**, *39*, 2564–2573. [CrossRef]
9. Lakeman, I.M.M.; Rodríguez-Girondo, M.D.M.; Lee, A.; Celosse, N.; Braspenning, M.E.; van Engelen, K.; van de Beek, I.; van der Hout, A.H.; Gómez García, E.B.; Mensenkamp, A.R.; et al. Clinical Applicability of the Polygenic Risk Score for Breast Cancer Risk Prediction in Familial Cases. *J. Med. Genet.* **2023**, *60*, 327–336. [CrossRef]
10. Kamps, R.; Brandão, R.D.; van den Bosch, B.J.; Paulussen, A.D.; Xanthoulea, S.; Blok, M.J.; Romano, A. Next-Generation Sequencing in Oncology: Genetic Diagnosis, Risk Prediction and Cancer Classification. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 308. [CrossRef]
11. Tsaousis, G.N.; Papadopoulou, E.; Apeossos, A.; Agiannitopoulos, K.; Pepe, G.; Kampouri, S.; Diamantopoulos, N.; Floros, T.; Iosifidou, R.; Katopodi, O.; et al. Analysis of hereditary cancer syndromes by using a panel of genes: Novel and multiple pathogenic mutations. *BMC Cancer* **2019**, *19*, 535.

12. Henkel, J.; Laner, A.; Locher, M.; Wohlfrom, T.; Neitzel, B.; Becker, K.; Neuhann, T.; Abicht, A.; Steinke-Lange, V.; Holinski-Feder, E. Diagnostic yield and clinical relevance of expanded germline genetic testing for nearly 7000 suspected HBOC patients. *Eur. J. Hum. Genet.* **2023**, *31*, 925–930. [PubMed]
13. Michailidou, K.; The Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Collaboration; Hall, P.; Gonzalez-Neira, A.; Ghoussaini, M.; Dennis, J.; Milne, R.L.; Schmidt, M.K.; Chang-Claude, J.; Bojesen, E.S.; et al. Large-scale genotyping identifies 41 new loci associated with breast cancer risk. *Nat. Genet.* **2013**, *45*, 353–361. [PubMed]
14. Bolli, A.; Di Domenico, P.; Bottà, G. Software as a Service for the Genomic Prediction of Complex Diseases. *bioRxiv* **2019**, 763722. Available online: <http://biorxiv.org/content/early/2019/09/27/763722.abstract> (accessed on 2 May 2024).
15. Busby, G.B.; Craig, P.; Yousfi, N.; Hebbalkar, S.; Di Domenico, P.; Bottà, G. Genetic Assessments of Breast Cancer Risk That Do not Account for Polygenic Background Are Incomplete and Lead to Incorrect Preventative Strategies. *medRxiv* **2021**. Available online: <http://medrxiv.org/content/early/2021/08/23/2021.08.13.21262050.abstract> (accessed on 2 May 2024).
16. Bycroft, C.; Freeman, C.; Petkova, D.; Band, G.; Elliott, L.T.; Sharp, K.; Motyer, A.; Vukcevic, D.; Delaneau, O.; O'Connell, J.; et al. The UK Biobank resource with deep phenotyping and genomic data. *Nature* **2018**, *562*, 203–209. [PubMed]
17. Busby, G.; Kulm, S.; Bolli, A.; Kintzle, J.; Di Domenico, P.; Neary, J.; Morganstern, D.; Bottà, G. Ancestry-Specific Polygenic Risk Scores Improve Clinical Assessments of Breast Cancer Risk in Diverse Populations. *Res. Sq.* **2024**. [CrossRef]
18. Onishi, N.; Kataoka, M. Breast cancer screening for women at high risk: Review of current guidelines from leading specialty societies. *Breast Cancer* **2021**, *2*, 1195–1211.
19. Virtanen, P.; Gommers, R.; Oliphant, T.E.; Haberland, M.; Reddy, T.; Cournapeau, D.; Burovski, E.; Peterson, P.; Weckesser, W.; Bright, J.; et al. SciPy 1.0: Fundamental algorithms for scientific computing in Python. *Nat. Methods* **2020**, *17*, 261–272. [PubMed]
20. Hunter, J.D. Matplotlib: A 2D Graphics Environment. *Comput. Sci. Eng.* **2007**, *9*, 90–95.
21. Waskom, M. seaborn: Statistical data visualization. *J. Open Source Softw.* **2021**, *6*, 3021.
22. Riddle, L.; Joseph, G.; Caruncho, M.; Koenig, B.A.; James, J.E. The role of polygenic risk scores in breast cancer risk perception and decision-making. *J. Community Genet.* **2023**, *14*, 489–501. [PubMed]
23. Agiannitopoulos, K.; Pepe, G.; Tsaousis, G.N.; Potska, K.; Bouzarelou, D.; Katseli, A.; Ntogka, C.; Meintani, A.; Tsoulos, N.; Giassas, S.; et al. Copy Number Variations (CNVs) Account for 10.8% of Pathogenic Variants in Patients Referred for Hereditary Cancer Testing. *Cancer Genom. Proteom.* **2023**, *20*, 448–455.
24. Hassanin, E.; Spier, I.; Bobbili, D.R.; Aldisi, R.; Klinkhammer, H.; David, F.; Dueñas, N.; Hüneburg, R.; Perne, C.; Brunet, J.; et al. Clinically relevant combined effect of polygenic background, rare pathogenic germline variants, and family history on colorectal cancer incidence. *BMC Med. Genom.* **2023**, *16*, 42.
25. Collister, J.A.; Liu, X.; Clifton, L. Calculating Polygenic Risk Scores (PRS) in UK Biobank: A Practical Guide for Epidemiologists. *Front. Genet.* **2022**, *13*, 818574.
26. Dwyer, M. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast, Ovarian, and Pancreatic. 2024. Available online: <https://www.nccn.org/guidelines/guidelines-detail?category=2&id=1503> (accessed on 2 May 2024).
27. Zirpoli, G.R.; Pfeiffer, R.M.; Bertrand, K.A.; Huo, D.; Lunetta, K.L.; Palmer, J.R. Addition of polygenic risk score to a risk calculator for prediction of breast cancer in US Black women. *Breast Cancer Res.* **2024**, *26*, 2. [PubMed]
28. Tamlander, M.; Jermy, B.; Seppälä, T.T.; Färkkilä, M.; FinnGen Widén, E.; Ripatti, S.; Mars, N. Genome-wide polygenic risk scores for colorectal cancer have implications for risk-based screening. *Br. J. Cancer* **2024**, *130*, 651–659.
29. Mars, N.; Kerminen, S.; Tamlander, M.; Pirinen, M.; Jakkula, E.; Aaltonen, K.; Meretoja, T.; Heinävaara, S.; Widén, E.; Ripatti, S. Comprehensive Inherited Risk Estimation for Risk-Based Breast Cancer Screening in Women. *J. Clin. Oncol.* **2024**, *42*, 1477–1487. [PubMed]
30. Bolze, A.; Cirulli, E.T.; Hajek, C.; Schnell Blitstein, J.M.; Grzymalski, J.J. The Potential of Genetics in Identifying Women at Lower Risk of Breast Cancer. *JAMA Oncol.* **2024**, *10*, 236. [PubMed]
31. Koch, S.; Schmidtke, J.; Krawczak, M.; Caliebe, A. Clinical utility of polygenic risk scores: A critical 2023 appraisal. *J. Community Genet.* **2023**, *14*, 471–487. [PubMed]
32. Lewis, A.C.F.; Green, R.C. Polygenic risk scores in the clinic: New perspectives needed on familiar ethical issues. *Genome Med.* **2021**, *13*, 14.
33. Mars, N.; Lindbohm, J.V.; Parolo, P.D.B.; Widén, E.; Kaprio, J.; Palotie, A.; Ripatti, S. Systematic comparison of family history and polygenic risk across 24 common diseases. *Am. J. Human. Genet.* **2022**, *109*, 2152–2162.
34. Michailidou, K.; Lindstrom, S.; Dennis, J.; Beesley, J.; Hui, S.; Kar, S.; Lemacon, A.; Soucy, P.; Glubb, D.; Rostamianfar, A.; et al. Association analysis identifies 65 new breast cancer risk loci. *Nature* **2017**, *551*, 92–94.
35. Carver, T.; Hartley, S.; Lee, A.; Cunningham, A.P.; Archer, S.; Babb de Villiers, C.; Roberts, J.; Ruston, R.; Walter, F.M.; Tischkowitz, M.; et al. CanRisk Tool—A Web Interface for the Prediction of Breast and Ovarian Cancer Risk and the Likelihood of Carrying Genetic Pathogenic Variants. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2021**, *30*, 469–473. [CrossRef]
36. Yiangou, K.; Mavaddat, N.; Dennis, J.; Zanti, M.; Wang, Q.; Bolla, M.K.; Abubakar, M.; Ahearn, T.U.; Andrulis, I.L.; Anton-Culver, H.; et al. Differences in Polygenic Score Distributions in European Ancestry Populations: Implications for Breast Cancer Risk Prediction. *medRxiv* **2024**. [CrossRef]

37. Wolfson, M.; Gribble, S.; Pashayan, N.; Easton, D.F.; Antoniou, A.C.; Lee, A.; van Katwyk, S.; Simard, J. Potential of Polygenic Risk Scores for Improving Population Estimates of Women's Breast Cancer Genetic Risks. *Genet. Med.* **2021**, *23*, 2114–2121. [[CrossRef](#)]
38. Ho, P.J.; Lim, E.H.; Hartman, M.; Wong, F.Y.; Li, J. Breast Cancer Risk Stratification Using Genetic and Non-Genetic Risk Assessment Tools for 246,142 Women in the UK Biobank. *Genet. Med.* **2023**, *25*, 100917. [[CrossRef](#)]
39. Dixon, P.; Keeney, E.; Taylor, J.C.; Wordsworth, S.; Martin, R.M. Can Polygenic Risk Scores Contribute to Cost-Effective Cancer Screening? A Systematic Review. *Genet. Med.* **2022**, *24*, 1604–1617. [[CrossRef](#)]
40. Yanes, T.; Tiller, J.; Haining, C.M.; Wallingford, C.; Otlowski, M.; Keogh, L.; McInerney-Leo, A.; Lacaze, P. Future Implications of Polygenic Risk Scores for Life Insurance Underwriting. *NPJ Genom. Med.* **2024**, *9*, 25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Lewis, A.C.F.; Perez, E.F.; Prince, A.E.R.; Flaxman, H.R.; Gomez, L.; Brockman, D.G.; Chandler, P.D.; Kerman, B.J.; Lebo, M.S.; Smoller, J.W.; et al. Patient and Provider Perspectives on Polygenic Risk Scores: Implications for Clinical Reporting and Utilization. *Genome Med.* **2022**, *14*, 114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.