

ΚΛΗΡΟΝΟΜΟΥΜΕΝΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΜΑΣΤΟΥ ΚΑΙ ΩΟΘΗΚΩΝ: ΓΟΝΙΔΙΑ *BRCA1* ΚΑΙ *BRCA2*

ΧΡΗΣΤΟΣ ΚΡΟΥΠΗΣ

Εισαγωγή

Οι κυριότεροι **προδιαθεσικοί παράγοντες (risk factors)** για την ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού ή των ωοθηκών είναι η ηλικία, οικογενειακό ιστορικό της νόσου καθώς και ενδείξεις παθολογίας σε ενδεχόμενη βιοψία (π.χ. υπερπλασία, *borderline lesions* όπως επιθηλιακή ατυπία, λοβιακή *in situ* νεοπλασία). Οι υπόλοιποι προδιαθεσικοί παράγοντες καταδεικνύουν την αλληλεπίδραση ορμονών, γονιδίων και του περιβάλλοντος. Ότι αυξάνει τον αριθμό των ωοθηλακιορηξιών αυξάνει την έκθεση στα ενδογενή οιστρογόνα και προγεστερόνη και κατά συνέπεια και τον κίνδυνο: η πρόωμη εμμηνарχή (<12 ετών), η εμμηνόπαυση σε μεγάλη ηλικία, η ατεκνία. Υπάρχει αύξηση του κινδύνου αμέσως μετά από μία κύηση ωστόσο μακροπρόθεσμα, η κύηση και ο θηλασμός δρουν προστατευτικά καθώς μειώνουν τον αριθμό των ορμονικών κύκλων και η προστατευτική δράση αυξάνεται με τον αριθμό των τελειόμηνων κυήσεων. Πιστεύεται ότι η δραστική αλλαγή στη ζωή της γυναίκας του 20^{ου} αιώνα σε σχέση με τη γυναίκα του 19^{ου} αιώνα -η οποία καθώς δεν δούλευε γεννούσε περισσότερα παιδιά ενώ άρχιζε αργά την εμμηνарχή της χωρίς να υπάρχει αλλαγή στην ηλικία εμμηνόπαυσης- μπορεί να δικαιολογήσει την αύξηση των γυναικολογικών καρκίνων στην εποχή μας [1]. Επίσης, η χορήγηση εξωγενών ορμονών είτε με την μορφή των αντισυλληπτικών δισκίων είτε η επί μακρό χρονικό διάστημα χορήγηση ορμονικής υποκατάστασης αυξάνουν τον κίνδυνο για καρκίνο του μαστού [2]. Δευτερεύοντες παράγοντες κινδύνου αποτελούν η έκθεση σε ακτινοβολία, η έλλειψη άσκησης και η παχυσαρκία, το αλκοόλ και το κάπνισμα, η λήψη φυτοορμονών μέσω των τροφίμων όπως επίσης και η χαμηλή ποσότητα των λαχανικών και η έλλειψη βιταμίνης Α στο καθημερινό διααιτολόγιο.

Περίπου 25% των ασθενών με **καρκίνο μαστού** έχουν κάποιο περιστατικό ανάλογο καρκίνου στην οικογένεια (**familial cancer, οικογενής καρκίνος**) ωστόσο μόνο στο 20-40% των περιπτώσεων αυτών ο καρκίνος μπορεί να αποδοθεί σε

μεντελιανή κληρονόμηση ενός **υψηλής διεισδυτικότητας (penetrance)** γονιδίου. Έχει υπολογισθεί ότι ένα ποσοστό της τάξεως του 7% των συνολικών περιπτώσεων καρκίνου του μαστού εντάσσεται στη περίπτωση του **κληρονομούμενου (hereditary) καρκίνου** (π.χ. τρεις γενιές με νόσο ή περισσότερα των δύο περιστατικών σε συγγενείς α βαθμού). Προσφάτως το 1994 και το 1995 ανακαλύφθηκαν δύο γονίδια τα οποία ενέχονται στην πλειονότητα των περιπτώσεων αυτών: το γονίδιο **BRCA1** (**BR**east **C**Ancer **S**usceptibility **g**ene **1**) το οποίο ευθύνεται για το 45% των περιπτώσεων κληρονομούμενου καρκίνου του μαστού και το γονίδιο **BRCA2** για το 35% [3,4]. Ένα τρίτο γονίδιο **BRCA3** αναζητείται επίμονα χωρίς όμως μέχρι στιγμής να έχει εντοπισθεί. Το υπόλοιπο 20% των περιπτώσεων κληρονομούμενου καρκίνου μαστού πιθανότατα οφείλεται είτε σε διάφορα σπάνια γονίδια υψηλής διεισδυτικότητας που δεν έχουν ανακαλυφθεί έως τώρα είτε σε διάφορα σύνδρομα όπου ανάμεσα στα άλλα οι ασθενείς νοσούν και με καρκίνο μαστού όπως Li-Fraumeni, Cowden, Muir-Torre, Peutz-Jegher, Αταξία-Τελαγγειεκτασία για τα οποία ευθύνονται τα ακόλουθα γονίδια: *p53*, *PTEN*, *MLH1*, *STK/LKB1* και *ATM* κατ'αντιστοιχία [5].

Για τις **ωοθήκες** αντίστοιχα στα δύο γονίδια **BRCA1** και **BRCA2** οφείλεται το 85-90% του κληρονομούμενου καρκίνου των ωοθηκών (10% των συνολικών περιπτώσεων του καρκίνου των ωοθηκών, στο **BRCA1** η μεγάλη πλειοψηφία). Το υπόλοιπο 10-15% των περιπτώσεων κληρονομούμενου καρκίνου ωοθηκών ανήκει στο σύνδρομο HNPCC (παλαιότερη ονομασία: σύνδρομο Lynch) όπου κυριαρχεί ο μη πολυποδιασικός καρκίνος του παχέος εντέρου και συνδυάζεται με καρκίνο ωοθηκών και ενδομητρίου στις γυναίκες (στο 95% των περιπτώσεων αυτών ενέχονται εξίσου τα γονίδια *MSH2* και *MLH1* ενώ στο 5% το γονίδιο *PMS2*) [6]. Μετά από αυτά τα στοιχεία γίνεται αντιληπτό ότι η ονομασία των δύο γονιδίων **BRCA1/2** δεν αποδίδει σωστά τον κίνδυνο για τον καρκίνο των ωοθηκών και ότι πιο ακριβής θα ήταν η ονομασία **OVBRC1/2**. Μάλιστα τα ανωτέρω δύο γονίδια ενοχοποιούνται επίσης και για τον σχετικά σπάνιο κληρονομούμενο καρκίνο των σαλπγγών (fallopian tube Ca) [7].

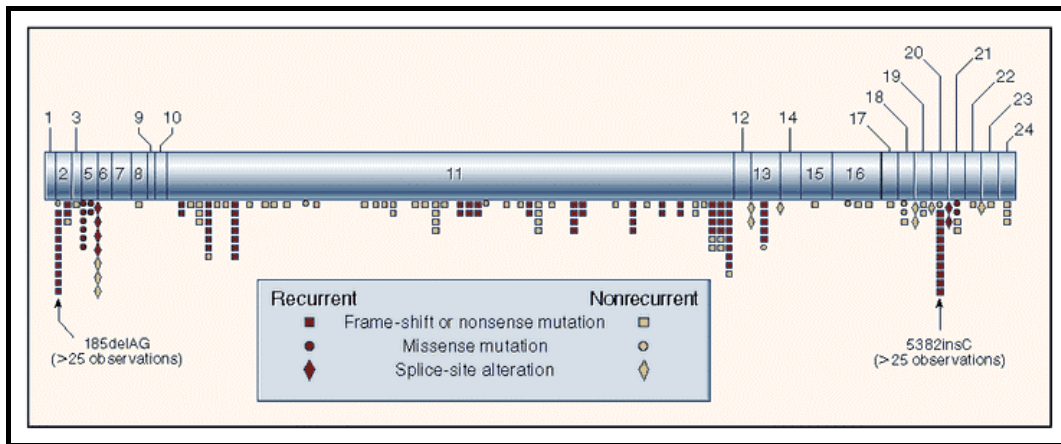
Τα ανωτέρω γονίδια έχουν καταγραφεί στο **Cancer Genome Project** στην κατηγορία των **66 γονιδίων** που ενέχονται στον **κληρονομούμενο καρκίνο** [8] και τα οποία είναι υψηλής διεισδυτικότητας και ανήκουν στην κατηγορία των ογκοκατασταλτικών γονιδίων (tumor suppressors) με ρόλο είτε στον έλεγχο του

πολλαπλασιασμού (gatekeepers) είτε στην ακεραιότητα και επιδιόρθωση του DNA (caretakers). Οι μεταλλάξεις των γονιδίων αυτών, στη γαμετική σειρά, δρουν συνήθως με υπολειπόμενο τρόπο στο κυτταρικό επίπεδο και προσδίδουν προδιάθεση στους φορείς για καρκινογένεση συνήθως επιθηλιακής προέλευσης.

Για το υπόλοιπο 60-80% των περιπτώσεων οικογενούς καρκίνου μαστού ή ωθηκών πιθανολογείται ότι ευθύνεται ένας συνδυασμός από μερικά γονίδια μέτριας διεισδυτικότητας και ένας πολύ μεγαλύτερος αριθμός (100 ή περισσότερα) από γονίδια χαμηλής διεισδυτικότητας με σχετικό κίνδυνο (RR, relative risk) 1,5-2,0 [9]. Πιθανολογείται ότι ακόμη και ένα γονίδιο με σχετικό κίνδυνο μόνο 1,5 αλλά με υψηλή συχνότητα στον γενικό πληθυσμό θα μπορούσε να ευθύνεται για ένα μεγάλο ποσοστό οικογενούς καρκίνου [10].

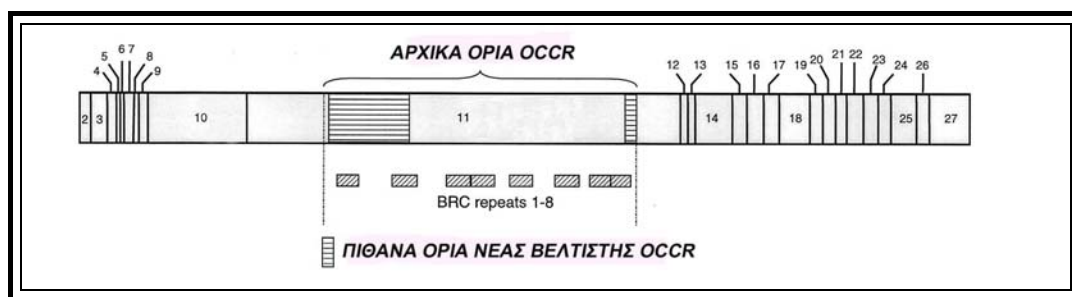
Δομή γονιδίων *BRCA1* και *BRCA2*

Ο εντοπισμός γονιδίου το 1990 σε μεγάλες οικογένειες με καρκίνο μαστού σε νεαρή ηλικία με γενετική σύνδεση σε περιοχή 117.143 βάσεων στο 17q21 οδήγησε στην τελική ανακάλυψη της δομής του *BRCA1* το 1994 [3]. Το γονίδιο *BRCA1* αποτελείται από 24 εξόνια εκ των οποίων τα 22 κωδικοποιούν cDNA 5,7 kb και παράγεται πρωτεΐνη 1.863 αμινοξέων. Τα εξόνια 1 και 4 δεν κωδικοποιούν cDNA (σχήμα 1). Η ακολουθία του cDNA και της αντίστοιχης πρωτεΐνης είναι καταχωρημένα στην GenBank του NCBI με κωδικό U14680 ενώ η ακολουθία της γενωμικής περιοχής έχει κωδικό L78833. Πλήρως ενημερωμένη βιβλιογραφικά για το *BRCA1* είναι και η τράπεζα πληροφοριών για τις γενετικές ασθένειες OMIM με κωδικό 113705.



Σχήμα 1. Δομή γονιδίου BRCA1 και μεταλλάξεις που έχουν ανιχνευθεί [11].

Ο εντοπισμός και άλλου γονιδίου το 1994 σε οικογένειες όπου συνοπήρχε και καρκίνος μαστού σε άνδρες με γενετική σύνδεση σε περιοχή 127.079 βάσεων στο 13q12-13 οδήγησε το 1995 στην τελική ανακάλυψη της δομής του δεύτερου γονιδίου *BRCA2* [4]. Το γονίδιο *BRCA2* αποτελείται από 27 εξόνια εκ των οποίων τα 26 κωδικοποιούν cDNA 11 kb και παράγεται πρωτεΐνη 3.418 αμινοξέων. Τα εξόνιο 1 δεν κωδικοποιεί cDNA (σχήμα 2). Η ακολουθία του cDNA και της αντίστοιχης πρωτεΐνης είναι καταχωρημένα στην GenBank του NCBI με κωδικό U43746 ενώ η ακολουθία της γενωμικής περιοχής έχει κωδικό Z74739 [12]. Πλήρως ενημερωμένη βιβλιογραφικά για το *BRCA2* είναι και η τράπεζα πληροφοριών για τις γενετικές ασθένειες OMIM με κωδικό 600185.



Σχήμα 2. Δομή γονιδίου BRCA2 (OCCR: ovarian cancer cluster region) [13].

Και τα δύο γονίδια είναι πλούσια σε αδενίνη και θυμίνη >60% και είναι εξαιρετικά μεγάλα (μεγαλύτερα του 90% των ανθρώπινων γονιδίων). Αν και έχουν μερικά κοινά δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά, δεν υπάρχει καμία ομολογία

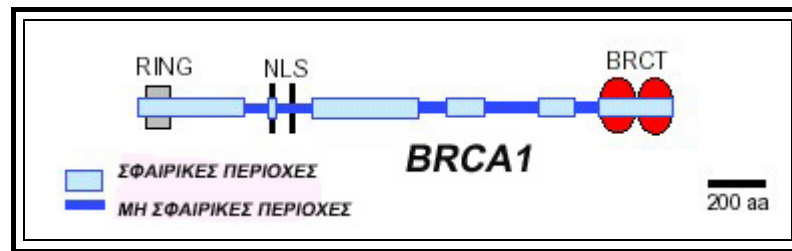
μεταξύ τους ως προς την DNA ακολουθία και οι μόνες ομοιότητες είναι ότι η μετάφραση ξεκινάει από ATG του εξονίου 2 και ότι διαθέτουν ένα ασυνήθιστα μεγάλο -για ευκαρυωτικό οργανισμό- κεντρικό εξόνιο: το εξόνιο 11, το οποίο κωδικοποιεί το μεγαλύτερο ποσοστό της αντίστοιχης πρωτεΐνης (>50%). Σε πολλούς ιστούς έχει ανευρεθεί εναλλακτικά ματισμένο *BRCA1* που του λείπει το εξόνιο 11 (*BRCA1-Δ11b*) προφανώς με κάποια λειτουργικότητα [3,14]. Ωστόσο αντίστοιχο αντίγραφο για το *BRCA2* δεν έχει ανευρεθεί.

Δομή και ρόλος πρωτεϊνών *BRCA1* και *BRCA2*

Οι πρωτεΐνες *BRCA1* και *BRCA2* σε SDS-PAGE ηλεκτόματα συμπεριφέρονται ως να έχουν MB 208 KDa και 384 KDa αντίστοιχα. Σε ισοηλεκτρική εστίαση (IEF) τα ισοηλεκτρικά σημεία των *BRCA1* και *BRCA2* βρέθηκαν να είναι 5,2 και 6,3 αντίστοιχα. Περισσότερες πληροφορίες για τις δύο αυτές πρωτεΐνες υπάρχουν στη βάση δεδομένων Swiss-Prot, στους κωδικούς P38398 και P51587. Σε επίπεδο αμινοξέων και οι δύο πρωτεΐνες έχουν μικρή αναλογία με τις αντίστοιχες πρωτεΐνες των υπολοίπων θηλαστικών π.χ. μόνο 60% ομολογία με τα *brca1* και *brca2* του ποντικού, σε αντίθεση με άλλες πρωτεΐνες που ενέχονται στη προδιάθεση για καρκίνο όπως π.χ. τη ανθρώπινη APC πρωτεΐνη που είναι κατά 90% ομολογη με αυτήν του ποντικού. Πιθανολογείται ότι κατά τη διάρκεια της εξελικτικής διαδικασίας στον άνθρωπο οι πρωτεΐνες αυτές απέκτησαν και άλλες περιοχές και αυτό θα φανεί στη συνέχεια όταν θα εξετασθεί ο πολύπλευρος ρόλος τους [15].

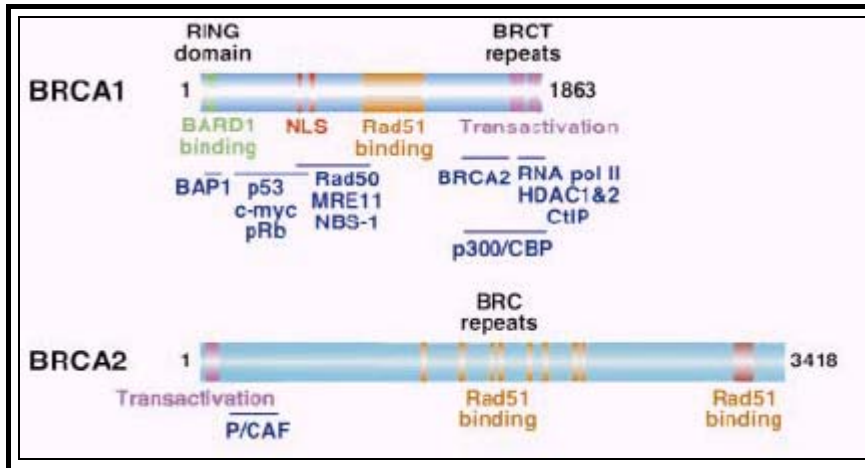
Ωστόσο μερικές περιοχές των δύο πρωτεϊνών είναι καλά διατηρημένες στα θηλαστικά (σχήμα 3). Στην πρωτεΐνη ***BRCA1*** υπάρχουν τρεις τέτοιες περιοχές: α) στο αμινοτελικό άκρο μεταξύ των αμινοξέων 20-68 υπάρχει μια περιοχή δέσμευσης ψευδαργύρου (zinc-binding **RING** finger) περιοχή Cys₃-His-Cys₄ που πιθανότερα ενέχεται σε αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες (π.χ. BARD-1, BAP-1) και όχι με ακολουθίες του DNA, β) στο καρβοξυτελικό άκρο και μεταξύ των αμινοξέων 1649-1736 και 1756-1855 ανευρίσκονται δύο σφαιρικές περιοχές σε σειρά επονομαζόμενες **BRCT** (***BRCA1*** C-Terminal N και C) που ενέχονται σε **μεταγραφική ενεργοποίηση (transactivation)** [16] και τέλος γ) υπάρχουν δύο περιοχές **σημάτων πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Signal) NLS1** και **NLS2** στις θέσεις 501-507 και 607-614 του εξονίου 11 που δεσμεύουν την ιμφορτίνη-α (υπομονάδα του transport signal πυρηνικού υποδοχέα) και κατά συνέπεια διατηρούν την πρωτεΐνη στον

πυρήνα [17]. Γι' αυτό το λόγο η εντόπιση του προαναφερθέντος BRCA1-Δ11b είναι κυτταροπλασματική. Πιο απαραίτητη έχει αποδειχθεί ότι είναι η πρώτη NLS1.



Σχήμα 3. Διάφορες περιοχές στην πρωτεΐνη BRCA1 [18].

Στην πρωτεΐνη **BRCA2** δεν υπάρχουν αντίστοιχες RING και BRCT περιοχές ενώ υπάρχει NLS περιοχή, στο καρβοξυτελικό άκρο σε περιοχή όπου δεσμεύεται και η πρωτεΐνη Rad51 (σχήμα 4). Στο αμινοτελικό άκρο του BRCA2 υπάρχει ομολογία με την περιοχή ενεργοποίησης πρωτεΐνης της c-Jun και γι' αυτό η περιοχή αυτή -που περιλαμβάνει το εξόνιο 3- είναι απαραίτητη για την μεταγραφική ενεργοποίηση μέσω της BRCA2 πρωτεΐνης. Αξιοπεριεργη είναι η ύπαρξη οκτώ επαναλαμβανόμενων ακολουθιών από 20-30 αμινοξέα επονομαζόμενες **BRC repeats** (**B**Reast **C**ancer) στο εξόνιο 11 του BRCA2 (σχήματα 2 και 4). Η ομολογία των περιοχών αυτών είναι μεγαλύτερη του 80% με τις αντίστοιχες πρωτεΐνες των διαφόρων θηλαστικών και η σημασία τους καταδεικνύεται από το γεγονός ότι μόνο η παρουσία τριών τουλάχιστον από τις περιοχές αυτές είναι συμβατή με τη ζωή. Έχει δειχθεί ότι εκεί είναι η κύρια περιοχή πρόσδεσης της RAD51 [19]. Τις περιοχές αυτές περικλείει και η λεγόμενη **OCCR** περιοχή (**O**varian **C**ancer **C**luster **R**egion) (σχήμα 2).



Σχήμα 4. Δομικές περιοχές και περιοχές πρόσδεσης διαφόρων πρωτεϊνών στις BRCA1 και BRCA2 πρωτεΐνες [20].

Οι πρωτεΐνες BRCA1/2 είναι ογκοκατασταλτικές και έχουν πολύπλευρο **ρόλο** στην επιδιόρθωση του DNA, στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, στην ουβικιτινίωση και αποικοδόμηση πρωτεϊνών, στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και τη μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων [20-22]:

Μετά την ανίχνευση βλάβης στο DNA οι κινάσες ATM, ATR και CHEK2 φωσφορυλιώνουν τη πρωτεΐνη BRCA1 η οποία σε συνεργασία με το RAD51 και το BRCA2 οδηγεί το κύτταρο άμεσα στη επιδιόρθωση των βλαβών με σπασίματα και στις δύο έλικες του DNA (**Double Strand Breaks, DSB**) κατά τη διάρκεια του αναδιπλασιασμού και μάλιστα μόνο μέσω του ιδιαίτερης ακρίβειας μηχανισμού του ομόλογου ανασυνδυασμού (**Homologous Recombination, HR**). Το BRCA1 έχει πολύ σημαντικό ρόλο και στη επιδιόρθωση οξειδωτικών βλαβών κατά την S-φάση όπου υπάρχει έντονη μεταγραφική δραστηριότητα στο κύτταρο και απαιτείται «γρήγορη» επιδιόρθωση **NER** (**Nucleotide-Excision Repair**) μέσω του μηχανισμού της **TCR** (**Transcription-Coupled Repair**) αποκλειστικά στην έλικα που μεταγράφεται.

Η πρωτεΐνη BRCA1 αλληλεπιδρά και με την πρωτεΐνη BARD1 μέσω των RING περιοχών που υπάρχουν και στις δύο πρωτεΐνες και τη δημιουργία ετεροδιμερούς. Πιθανολογείται ότι όταν η RNA πολυμεράση συναντά βλάβη κατά τη διάρκεια της μεταγραφής τότε το σύμπλοκο BRCA1-BARD οδηγεί το ολοένζυμο σε πρωτεολυτική αποικοδόμηση μέσω ουβικιτινίωσης του και έτσι απομένει μόνο το BRCA1 για να δεσμευτεί στο διακλαδισμένο DNA και να επιδιορθώσει τη βλάβη

σύμφωνα με τα προηγούμενα. Πιθανός ρυθμιστής της διαδικασίας είναι η πρωτεΐνη **BAP1 (BRCA-Associated Protein-1)**.

Η πρωτεΐνη BRCA1 συμμετέχοντας στο μεγάλο σύμπλεγμα **BASC (BRCA1-Associated genome Surveillance Complex)** μαζί με MRE11-RAD50-NBS1, ελέγχει την ακεραιότητα του γονιδιώματος και τα σημεία ελέγχου μεταξύ των φάσεων του κυτταρικού κύκλου.

Οι πρωτεΐνες BRCA1 και BRCA2 μαζί με το ολοένζυμο της RNA πολυμεράσης αλληλεπιδρούν σε ένα μεγάλο σύμπλεγμα μαζί με RNA ελικάση A, ακετυλάσες και απο-ακετυλάσες ιστονών -όπως τα HDAC, p300/CBP, P/CAF, CtIP- και το σύμπλεγμα αναδιαμόρφωσης της χρωματινής SW1/SNF (chromatin remodeling complex) πιθανότατα μέσω των BRCT περιοχών στο BRCA1 και του transactivation domain στο εξόνιο 3 του BRCA2. Η ακετυλίωση ή μη των ιστονών οδηγεί σε ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση downstream γονιδίων. Έτσι πιθανολογείται ότι οι δύο πρωτεΐνες αναλόγως των σημάτων που δέχονται από άλλες πρωτεΐνες -με τις οποίες έχει αποδειχθεί ότι αλληλεπιδρούν όπως ZBRK1, Ki-67, p53, RB, C-MYC,- ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων σημαντικών για την ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου ή για την επιδιόρθωση του DNA όπως τα *GADD45*, *p21*.

Γενετική ανάλυση γονιδίων BRCA1/2

Οι οικογένειες με μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1/2* χαρακτηρίζονται από ανάπτυξη καρκίνου μαστού ή και ωοθηκών σε ένα ή σε περισσότερα μέλη του ίδιου οικογενειακού δέντρου και μάλιστα πολλές φορές είτε σε πρόωμη ηλικία (κάτω των 40 ετών) είτε με ύπαρξη αμφοτερόπλευρου καρκίνου μαστού. Επίσης συνήθως, εμφανίζονται και άλλα είδη καρκίνου στα μέλη της οικογένειας (προστάτου, παγκρέατος κλπ) ή και καρκίνος του μαστού στους άρρενες της οικογένειας. Ο λόγος είναι γιατί τα γονίδια αυτά έχουν σημαντικό και γενικό ρόλο σε κάθε κύτταρο και έτσι οι μεταλλάξεις τους μπορούν να δώσουν και άλλο καρκίνο σε άλλον ιστό απ' αυτόν στον οποίο παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ειδικότητα (πχ το γονίδιο *BRCA2* δίνει και καρκίνους παγκρέατος ενώ υπομορφικές μεταλλάξεις του σε ομοζυγωτία δίδουν την κακοήθη αναιμία Fanconi σε μικρή ηλικία).

Οι φορείς μεταλλάξεων στα παραπάνω γονίδια έχουν αθροιστικό κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου μαστού ο οποίος στα 80 έτη αγγίζει το 82% ενώ ειδικά οι φορείς

μεταλλάξεων στο γονίδιο *BRCA1* έχουν και αθροιστικό κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου ωοθηκών ο οποίος στα 80 έτη αγγίζει το 54% [23].

Μεταλλάξεις στα δύο γονίδια έχουν καταγραφεί στους διάφορους πληθυσμούς ασθενών παγκοσμίως σε όλο το μήκος των παραπάνω γονιδίων [εκτός από τους Ασκενάζι Εβραίους, όπου η γενετική ανάλυση μπορεί να περιοριστεί αρχικά σε τρεις ιδρυτικές (founder) μεταλλάξεις και από τους Ισλανδούς, σε μία μετάλλαξη].

Από τα παραπάνω, γίνεται αντιληπτό ότι η ανίχνευση μεταλλάξεων στα παραπάνω γονίδια είναι ιδιαίτερα επίπονη και δαπανηρή διαδικασία. Συνεπώς, απαιτείται αυστηρή τήρηση κριτηρίων για την επιλογή ασθενών είτε με βάση το οικογενειακό ιστορικό είτε άλλα ιστοπαθολογικά και βιολογικά κριτήρια (τα οποία θα αναφερθούν στη συνέχεια). Απαραίτητα, πριν τη γενετική ανάλυση, προηγείται έγγραφη συναίνεση (informed consent) του ασθενούς ή των εξεταζόμενων μελών της οικογένειας του μετά από κατάλληλη **γενετική συμβουλευτική**, ώστε να υπάρξει ενημέρωση για το τι σημαίνουν τα αποτελέσματα και το τι συνέπειες προκύπτουν από τη γενετική ανάλυση.

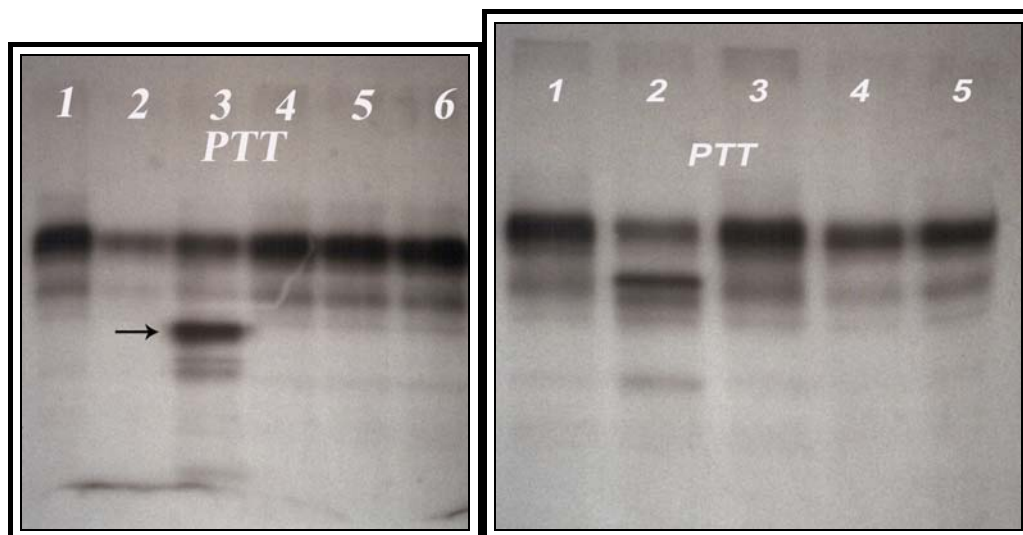
Μέθοδος αναφοράς αποτελεί το DNA Sequencing και στα δύο γονίδια το οποίο και εφαρμόζει και η εταιρεία Myriad Genetics η οποία και πρωτοασχολήθηκε με τα δύο γονίδια. Ωστόσο, πολλοί ερευνητές χρησιμοποιώντας άλλες τεχνικές σάρωσης μεταλλάξεων πέτυχαν εξαιρετικά αποτελέσματα ανιχνεύοντας μάλιστα και μεταλλάξεις τις οποίες το DNA Sequencing δεν θα μπορούσε. Επειδή ο κύριος τρόπος με τον οποίο τα ογκοκατασταλτικά αυτά γονίδια χάνουν τη λειτουργία τους (loss of function) είναι μέσω μεταλλάξεων που οδηγούν σε συντμημένη πρωτεΐνη (περίπου 87% των μεταλλάξεων), ένας πολύ καλός συνδυασμός μεθόδων ανίχνευσης μεταλλάξεων είναι η εφαρμογή της μεθόδου **PTT (Protein Truncation Test)** στα μεγάλα εξόνια των δύο γονιδίων σε συνδυασμό με **DNA Sequencing** για τα μικρά εξόνια αλλά και για την ταυτοποίηση των ανιχνευόμενων μεταλλάξεων. Με αυτό τον τρόπο ανακαλύφθηκαν και οι πρώτες μεταλλάξεις στον Ελληνικό πληθυσμό [24,25] πχ. 3277insG, 3099delT, 1623del5 (*BRCA1*), 2024del5 (*BRCA2*), με πιο συχνή τη μετάλλαξη 5382insC στο εξόνιο 20 του γονιδίου *BRCA1*. Η μέθοδος PTT εφαρμόζεται επίσης και με αρχικό υλικό RNA σε όλο το μήκος των γονιδίων όπως επίσης και έχει εξελιχθεί στην εντυπωσιακή multiplex fluorescent PTT μέθοδο. Άλλες πολύ αποτελεσματικές μέθοδοι για ανίχνευση μεταλλάξεων σε όλα τα εξόνια των παραπάνω γονιδίων είναι η **DHPLC** και η **multiplex 2-D DGGE**. Με αυτές τις

μεθόδους, ανιχνεύονται και όλες οι παρανοηματικές (missense) μεταλλάξεις αλλά και πολλοί πολυμορφισμοί, με μειονέκτημα ωστόσο, το ότι καθυστερεί η γενετική ανάλυση, χωρίς η πλειονότητα των παραπάνω μεταλλάξεων ή πολυμορφισμών να έχει κλινική σημασία. Παρανοηματικές μεταλλάξεις με κλινική σημασία είναι αυτές οι οποίες κωδικοποιούν αμινοξέα σε δύο λειτουργικές περιοχές της πρωτεΐνης BRCA1, στις περιοχές RING και BRCT και υπάρχουν συγκεκριμένα κριτήρια με τα οποία χαρακτηρίζονται σημαντικές [26] ενώ στο BRCA2 δεν υπάρχουν πολλές τέτοιες μεταλλάξεις [27]. Ένα άλλο αντικείμενο προβληματισμού στη γενετική ανάλυση των ασθενών με κληρονομούμενο καρκίνο μαστού και ωοθηκών, είναι οι μεγάλοι ανασυνδυασμοί που συμβαίνουν ενίοτε στο γονίδιο BRCA1 λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε *Alu* επαναληπτικές ακολουθίες και οι οποίοι σε κάποιους πληθυσμούς ανιχνεύονται σε μεγάλο ποσοστό (πχ στην Ολλανδία το 23% των μεταλλάξεων). Για την ανίχνευση τέτοιων μεταλλάξεων απαιτούνται τεχνικές όπως οι **MLPA**, **QMPSF**, **real-time quantitative PCR** κλπ [28]. Στον Ελληνικό χώρο δεν έχει ανιχνευθεί μεγάλο ποσοστό τέτοιων μεταλλάξεων [29].

Χρήση ιστοπαθολογικών και άλλων βιολογικών κριτηρίων για παραπομπή σε γενετική ανάλυση γονιδίων BRCA1/2

Είναι επιτακτική η ανάγκη της ανίχνευσης όσο το δυνατόν περισσότερων φορέων μεταλλάξεων στα δύο γονίδια ώστε να παρασχεθεί γενετική συμβουλή καθώς και θεραπευτική ή προληπτική παρέμβαση στους ίδιους ή στους απογόνους τους. Ωστόσο μερικές φορές δεν υπάρχει ιδιαίτερο οικογενειακό ιστορικό είτε λόγω του μικρού μεγέθους της οικογένειας είτε λόγω ατελούς διεισδυτικότητας είτε λόγω μετάδοσης της μετάλλαξης μέσω των αρρένων μελών της οικογένειας -οι οποίοι δεν νοσούν απαραίτητα- είτε λόγω υιοθεσιών. Σε αυτή τη περίπτωση μπορεί να χρησιμοποιηθούν ορισμένα χαρακτηριστικά των καρκινωμάτων. Τα BRCA1 καρκινώματα τείνουν να είναι πιο συχνά βαθμού διαφοροποίησης III με αυξημένο μιτωτικό δείκτη στην ιστολογική εξέταση. Στην κυτταρομετρία ροής ή εικόνας είναι ανευπλοειδικά με έντονη S-φάση. Στην ανοσοϊστοχημεία (IHC) είναι αρνητικά ως προς την έκφραση ορμονικών υποδοχέων ER και PgR και συνήθως παρουσιάζουν πυρηνική συσσώρευση στην ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 ενώ δεν υπερεκφράζουν το ογκογονίδιο *C-ERBB-2*. Επιπλέον, αναφέρεται ότι ο ιστολογικός τύπος του μυελοειδούς καρκινώματος υπάρχει σε μεγαλύτερο ποσοστό στα BRCA1 καρκινώματα απ' ό,τι στα BRCA2 ή στις σποραδικές περιπτώσεις [30,31]. Οι

προγνωστικοί δείκτες των BRCA2 καρκινωμάτων είναι ενδιάμεσοι μεταξύ των BRCA1 και των σποραδικών καρκινωμάτων. Οι παρατηρήσεις αυτές επιβεβαιώθηκαν και σε μελέτη μοριακού προφίλ έκφρασης γονιδίων σε μικροσυστοιχία DNA όπου παρατηρήθηκε διαφορετική έκφραση 176 γονιδίων μεταξύ των τριών ομάδων [32]. Προτείνεται λοιπόν από πολλές ομάδες, η χρησιμοποίηση ορισμένων από τους προγνωστικούς δείκτες ως συμπληρωματικά κριτήρια για την «αναγνώριση» της «BRCA1 υπογραφής» πάνω στα καρκινώματα πέραν του οικογενειακού ιστορικού. Με τη χρήση προγνωστικών δεικτών ανιχνεύθηκαν στον Ελληνικό χώρο με τη μεθοδολογία PTT (σχήμα 5) και οι BRCA1 μεταλλάξεις R1203X σε υιοθετημένη γυναίκα και 3896delT σε γυναίκα με καρκίνο μαστού και ωθηκών (47 και 48 ετών) χωρίς οικογενειακό ιστορικό [33].



Σχήμα 5. Ανίχνευση με τη μεθοδολογία PTT της μετάλλαξης R1203X (θέση 3, αριστερά) και 3896delT (θέση 2, δεξιά) στο εξόνιο 11 του γονιδίου BRCA1.

Τροποποιητές κινδύνου για κληρονομούμενο καρκίνο μαστού και ωθηκών

Υπάρχουν γονίδια που αφορούν αλληλεπιδράσεις με το μικροπεριβάλλον του όγκου (πχ λεμφοκύτταρα, στρωματικά κύτταρα κλπ) ή άλλες ουσίες, ορμόνες ή φάρμακα και εν γένει αποτελούν **γενετικούς τροποποιητές (modifier genes)** του

σχετικού κινδύνου του φορέα μετάλλαξης στα γονίδια υψηλής διεισδυτικότητας *BRCA1/2*. Τροποποίηση του κινδύνου ή ακόμη και της ειδικότητας σε συγκεκριμένο ιστό, μπορεί να προκαλέσει επίσης η θέση και το είδος της μετάλλαξης (allelic variance). Διάφορα γονίδια (*AIB1*, *RAD51*, *HRAS*, *Androgen receptor* κλπ) και άλλοι μη-γενετικοί παράγοντες όπως η εγκυμοσύνη και ο θηλασμός, η λήψη αντισυλληπτικών ή ορμονοθεραπείας υποκατάστασης εξετάζονται επισταμένα για την επιρροή τους ως προς την τελική ανάπτυξη καρκίνου στους φορείς μεταλλάξεων στα γονίδια *BRCA1/2* [27].

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Olsson H. Tumour biology of a breast cancer at least partly reflects the biology of the tissue/epithelial cell of origin at the time of initiation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000;74:345-50.
- [2] Sundquist M, Thorstenson S, Brudin L, Wingren S, Nordenskjold B. Incidence and prognosis in early onset breast cancer. *The Breast* 2002;11:30-5.
- [3] Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene *BRCA1*. *Science* 1994;266:66-71.
- [4] Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene *BRCA2*. *Nature* 1995;378:789-92.
- [5] Nathanson KN, Wooster R, Weber BL. Breast cancer genetics: what we know and what we need. *Nat Med* 2001;7:552-6.
- [6] Boyd J. Molecular genetics of hereditary ovarian cancer. *Oncology* 1998;12:399-413.
- [7] Boyd J. *BRCA*: the breast, ovarian, and other cancer genes. *Gynecol Oncol* 2001;80:337-40.
- [8] Futreal PA, Coin L, Marshall M, Down T, Hubbard T, Wooster R et al. A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer* 2004;4:177-83.
- [9] Ponder BA. Cancer genetics. *Nature* 2001;411:336-41.

- [10] Pharoah PD, Antoniou A, Bobrow M, Zimmern RL, Easton DF, Ponder BA. Polygenic susceptibility to breast cancer and implications for prevention. *Nat Genet* 2002;31:33-6.
- [11] Collins FS. BRCA1--lots of mutations, lots of dilemmas. *N Engl J Med* 1996;334:186-8.
- [12] Tavtigian SV, Simard J, Rommens J, Couch F, Shattuck-Eidens D, Neuhausen S et al. The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds. *Nat Genet* 1996;12:333-7.
- [13] Thompson D, Easton D. Variation in cancer risks, by mutation position, in BRCA2 mutation carriers. *Am J Hum Genet* 2001;68:410-9.
- [14] Wilson CA, Payton MN, Elliott GS, Buaas FW, Cajulis EE, Grosshans D et al. Differential subcellular localization, expression and biological toxicity of BRCA1 and the splice variant BRCA1-delta11b. *Oncogene* 1997;14:1-16.
- [15] Rahman N, Stratton MR. The genetics of breast cancer susceptibility. *Annu Rev Genet* 1998;32:95-121.
- [16] Vallon-Christersson J, Cayan C, Haraldsson K, Loman N, Bergthorsson JT, Brondum-Nielsen K et al. Functional analysis of BRCA1 C-terminal missense mutations identified in breast and ovarian cancer families. *Hum Mol Genet* 2001;10:353-60.
- [17] Welch PL, Schubert EL, King MC. Inherited breast cancer: an emerging picture. *Clin Genet* 1998;54:447-58.
- [18] Monteiro AN. BRCA1: exploring the links to transcription. *Trends Biochem Sci* 2000;25:469-74.
- [19] Gayther SA, Ponder BA. Clues to the function of the tumour susceptibility gene BRCA2. *Dis Markers* 1998;14:1-8.
- [20] Scully R, Livingston DM. In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2. *Nature* 2000;408:429-32.
- [21] Venkitaraman AR. Breast cancer genes and DNA repair. *Science* 1999;286:1100-2.
- [22] Narod SA, Foulkes WD. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nat Rev Cancer* 2004;4:665-76.
- [23] King MC, Marks JH, Mandell JB. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science* 2003;302:643-6.
- [24] Konstantopoulou I, Kroupis C, Ladopoulou A, Pantazidis A, Boumba D, Lianidou ES et al. BRCA1 mutation analysis in breast/ovarian cancer families from Greece. *Hum Mutat* 2000;16:272-3.

- [25] Kroupis C and Ladopoulou A*, C, Konstantopoulou I, Ioannidou-Mouzaka L, Schofield AC, Pantazidis A et al. Germ line BRCA1 & BRCA2 mutations in Greek breast/ovarian cancer families: 5382insC is the most frequent mutation observed. *Cancer Lett* 2002;185:61-70. (***equal first authors**)
- [26] Goldgar DE, Easton DF, Deffenbaugh AM, Monteiro AN, Tavtigian SV, Couch FJ. Integrated evaluation of DNA sequence variants of unknown clinical significance: application to BRCA1 and BRCA2. *Am J Hum Genet* 2004;75:535-44.
- [27] Narod SA. Modifiers of risk of hereditary breast and ovarian cancer. *Nat Rev Cancer* 2002;2:113-23.
- [28] Mazoyer S. Genomic rearrangements in the BRCA1 and BRCA2 genes. *Hum Mutat* 2005;25:415-22.
- [29] Belogianni I and Apeessos A*, A, Mihalatos M, Razi E, Labropoulos S, Petounis A et al. Characterization of a novel large deletion and single point mutations in the BRCA1 gene in a Greek cohort of families with suspected hereditary breast cancer. *BMC Cancer* 2004;4:61.
- [30] Lakhani SR, van de Vijver MJ, Jacquemier J, Anderson TJ, Osin P, McGuffog L et al. The pathology of familial breast cancer: predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and p53 in patients with mutations in BRCA1 and BRCA2. *J Clin Oncol* 2002;20:2310-8.
- [31] Kroupis C, Lianidou E, Goutas N, Ladopoulou A, Konstantopoulou I, Pantazidis A et al. Atypical Medullary Breast Carcinoma in a Family Carrying the 5382insC BRCA-1 Mutation. *Breast J* 2003;9:260-2.
- [32] Hedenfalk I, Duggan D, Chen Y, Radmacher M, Bittner M, Simon R et al. Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. *N Engl J Med* 2001;344:539-48.
- [33] Kroupis C, Lianidou E, Goutas N, Vasilaros S, Yannoukakos D, Petersen MB. Genetic counseling of medullary breast cancer patients. *Clin Genet* 2004;65:343-4.