



ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2010

ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟ ΤΕΥΧΟΣ 2



# ΕΝΗΜΕΡΩΤΙΚΟ ΔΕΛΤΙΟ



## ΠΡΑΚΤΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΟΥ



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ - ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ  
Αλωπεκής 47 - 106 76 Αθήνα - τηλ.: 210 3645751  
[www.eekx-kb.gr](http://www.eekx-kb.gr)

## MEDICAL APPLICATIONS OF RECOMBINANT ERYTHROPOIETINS, ANALOGUES AND MIMETICS AND BIOMONITORING THEREOF

C. Tsitsimpikou

Sub. Secretary of Hellenic Society of Toxicology, Department of Drugs and Narcotics, General Chemical State Laboratory

The present report summarizes biochemical actions and side effects of recombinant erythropoietins (rhEPOs), their analogues and mimetics, their use as therapeutic and abuse as doping agents and the main analytical strategies developed to identify them in athletes' biological fluids. Patients suffering from a wide range of pathologies, such as chronic kidney disease, human brain diseases (like acute ischemic stroke, chronic schizophrenia and chronic progressive multiple sclerosis), chronic heart failure and several malignancies, have benefited from the administration of rhEPOs to correct severe anemia. At the moment, the biological effect of rhEPO is monitored in patients under treatment through measuring hemoglobin concentration. It could be proven useful, however, to directly monitor the actual levels of the administered drug and reveal a dose-dependent correlation with any possible clinical adverse effect observed, therefore being able to adopt a more patient-specific administration regime. The detection method presently approved for doping control is an isoelectric-focusing, double blotting, chemiluminescence assay based on charge differences between isoforms of rhEPOs and native urinary EPO. The advantages and limitations of this method are presented and commented. Indirect evidence of rhEPOs use is based on the analysis of blood parameters (haemoglobin, haematocrit, reticulocytes, macrocytes, etc.) and serum markers (concentration of EPO and serum transferrin receptors, etc.). Enrichment of the screened parameters with gene or biochemical markers revealing altered erythropoiesis could also be a complementary approach.

### ΣΤΡΟΓΓΥΛΟ ΤΡΑΠΕΖΙ: ΝΕΟΤΕΡΕΣ ΕΞΕΛΙΞΕΙΣ ΣΤΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Συντονιστές: Χ. Κρούπης, Ε. Λιανίδου

### ΝΕΟΤΕΡΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΣΤΟΝ ΚΛΗΡΟΝΟΜΟΥΜΕΝΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΜΑΣΤΟΥ ΚΑΙ ΩΘΗΚΩΝ. ΝΕΑ ΓΟΝΙΔΙΑ PALB2 ΚΑΙ RAD51C

Χ. Κρούπης

MSc, PhD, EurClinChem Λέκτορας Κλινικής Βιοχημείας-Μοριακής Βιολογίας, Αττικόν Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών

Σε ένα μεγάλο ποσοστό οικογενειών με κληρονομούμενο καρκίνο μαστού ή/και ωθηκίων (~50% αναλόγως

του πληθυσμού) δεν έχουν ανιχνευθεί έως τώρα παθολογικές μεταλλάξεις στο περιφερικό αίμα στα δύο σπάνια μεν αλλά υψηλής διεισδυτικότητας γονίδια *BRCA1* και *BRCA2*, παρ' όλες τις τεχνολογικές βελτιώσεις και την εξοχιστική πλέον γενετική ανάλυση που συμπεριλαμβάνει και τους μεγάλους γενωμικούς ανασυνδυασμούς και τις μη-εξονικές περιοχές. Ένα επιπλέον μικρό μεταλλάξεων επίσης ήταν γνωστό ότι υπήρχαν σε γονίδια της ίδιας κατηγορίας υψηλής διεισδυτικότητας *p53*, *PTEN*, *STK11*, *CDH1* τα οποία ωστόσο είναι ευκόλως αναγνωρίσιμα καθώς ο καρκίνος μαστού είναι μέρος ενός ευρύτερου συνδρόμου με πολλαπλούς καρκίνους. Το υπόλοιπο ποσοστό πιστεύεται ότι θα συμπληρωθεί είτε από συνδυασμό χαμηλής διεισδυτικότητας αλλά συχνών μεταλλαγμένων αλληλίων (μέσω genome-wide association studies) είτε από γονίδια μέτριας διεισδυτικότητας όπως τα *ATM*, *CHEK2*, *BRIP1*, *NBS1*, *RAD50* καθώς και το *PALB2* που πρωτοαναφέρθηκε το 2006 καθώς και το προσφάτως συσχετισθέν *RAD51C* [1-3].

Σε αυτά τα δύο τελευταία γονίδια θα αναφερθούμε ιδιαίτερα και θα γίνει προσπάθεια να ενταχθεί ο ρόλος τους στη συνολική προσπάθεια ενός κυττάρου για επιδιόρθωση των βλαβών του DNA και να εξηγηθεί πως συσχετίζονται και με την κακοήγη αναιμία Fanconi. Επίσης, θα δοθεί έμφαση στους πολλαπλούς ρόλους της πρωτεΐνης *BRCA1* και στην ερμηνεία του πιο επιθετικού φαινοτύπου των *BRCA1* καρκίνων. Τέλος, θα αναφερθούμε σε καινούργιες έξυπνες θεραπευτικές προσεγγίσεις για τους ασθενείς αυτούς, οι οποίες βασίστηκαν στη διαλεύκανση των μονοπατιών της DNA επιδιόρθωσης μέσω βασικής έρευνας.

#### Γονίδιο PALB2

Το γονίδιο αυτό εντοπίστηκε στο χρωμόσωμα 16 (16p12.1) και απλώνεται σε περιοχή 38,2 Kb [4]. Αποτελείται από 13 εξόνια που μεταγράφουν mRNA περίπου 3,5 Kb το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη αποτελούμενη από 1186 αμινοξέα (131 KDa) με pI 6,4 και φορτίο -2. Τα εξόνια 4 και 5 είναι αισθητά μεγαλύτερα από τα υπόλοιπα. Το C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης *PALB2* -μέσω WD40 περιοχών πλούσιων σε αμινοξέα τρυπτοφάνη και ασπαρτικό-προσκολλάται στο N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης *BRCA2* (AA 10-40), συμβάλλοντας στον εντοπισμό του *BRCA2* σε πυρηνικές δομές χρωματίνης, εξ' ου και το πλήρες όνομά του γονιδίου *PALB2*, Partner And Localizer of *BRCA2* [4,5]. Ο συνεντοπισμός των *PALB2* και *BRCA2* αποδείχθηκε με πειράματα ανοσοκαθίζησης και ανοσοφθορισμού μετά από πρόκληση DNA βλαβών με ιονίζουσα ακτινοβολία. Επίσης έλλειμμα στην DNA επιδιόρθωση μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού (HR) διαπιστώθηκε μετά από επιμόλυνση με siRNA έναντι του *PALB2*. Προσφάτως βρέθηκε επίσης ότι το N-τελικό άκρο του *PALB2* αλληλεπιδρά και με τη πρωτεΐνη *BRCA1* μέσω coiled coil περιοχών [6]! Γίνεται

πλέον φανερό ότι η DNA επιδιόρθωση με ομόλογο ανασυνδυασμό -στην οποία έχουν μεγάλο ρόλο και τα τρία προαναφερθέντα γονίδια- γίνεται μόνο μέσω υπερμεγεθών μοριακών συμπλεγμάτων [7].

Μεταλλάξεις στο DNA του γονιδίου *PALB2* σε ετεροζυγωτία ανιχνεύθηκαν για πρώτη φορά το 2007 σε οικογένειες με κληρονομούμενο καρκίνο του μαστού αλλά και με παρουσία άλλων καρκινωμάτων [8]. Έχουν ανευρεθεί επίσης σε καρκίνο μαστού στον άνδρα [9] και σε οικογενή καρκίνο παγκρέατος [10]. Διαλληλικές μεταλλάξεις ανιχνεύθηκαν σε περιπτώσεις κακοήθους αναιμίας Fanconi της παιδικής ηλικίας καθώς και σε όγκους της παιδικής ηλικίας [11,12]. Η αναιμία Fanconi (FA) είναι μια σπάνια υπολειπόμενη διαταραχή η οποία είναι ετερογενής κλινικά, ωστόσο έχει ως κοινό εργαστηριακό εύρημα την χρωμοσωματική ευθραυστότητα στον καρυότυπο και ιδιαίτερα μετά από καλλιέργεια ινοβλαστών των ασθενών με μιτομυκίνη C. Κλινικές εκδηλώσεις μπορεί να αποτελούν η προοδευτική εξασθένηση του μυελού των οστών, οι συγγενείς αναπτυξιακές ανωμαλίες και η προδιάθεση για καρκίνο στην παιδική ηλικία συμπεριλαμβανομένων της λευχαιμίας και συμπαγών όγκων (μυελοβλάστωμα, όγκος Wilms). Έως τώρα έχει χωριστεί σε τουλάχιστον 13 κατηγορίες, τις επονομαζόμενες ομάδες συμπληρωματικότητας (FA complementation groups) οι οποίες έχουν αποδοθεί τελικά σε μεταλλάξεις σε 13 γονίδια: *FANCA*-*A-N* (το D έχει δύο: D1 και D2, παραλείφθηκαν H και K). Η αποκατάσταση της έκφρασης του γονιδίου *PALB2* αποκαθιστά το κυτταρικό ελάττωμα της αναιμίας Fanconi της ομάδας N, γι' αυτό και αλλιώς καλείται *FANCN* [11]. Αντίστοιχα σε παλιότερες μελέτες, βρέθηκαν το γονίδιο *BRCA2* να αντιστοιχεί στο *FANCD1* και το γονίδιο *BRIP1* (παλαιότερα *BACH1*) στο *FANCF* [13].

Σε ασθενείς φέροντες *PALB2* μεταλλάξεις, η ηλικία έναρξης του καρκίνου μαστού καθώς και τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά (ιστολογικός τύπος, ανοσοϊστοχημική IHC μελέτη ορμονικών υποδοχέων ER/PgR, p53, Ki-67 και ογκογονιδίου HER2) μοιάζουν με καρκίνους προερχόμενους από *BRCA2* μεταλλάξεις [14,15]. Έως τώρα δεν έχει ανευρεθεί LOH (Loss of Heterozygosity) στους καρκινικούς ιστούς των ασθενών αυτών εκτός από μία μελέτη [16] και υπάρχει πιθανότητα να ισχύει το μοντέλο της απλοανεπάρκειας για τη δράση του ογκοκατασταλτικού αυτού γονιδίου [14,15].

Οι μεταλλάξεις που έχουν βρεθεί μέχρι τώρα στο γονίδιο *PALB2* είναι κυρίως κωδικόνια τερματισμού ή αλλαγής πλαισίου ανάγνωσης και απλώνονται σε όλη την έκταση του γονιδίου (ακόμη και στο τελευταίο 13° εξόνιο). Με μεθοδολογία MLPA, έχουν ανιχνευθεί και μεταλλάξεις με μεγάλους γενωμικούς ανασυνδυασμούς [11], ωστόσο εν γένει θεωρούνται σπανιότατες [15,17]. Έως

τώρα, παθογνωμικές *PALB2* μεταλλάξεις ανευρίσκονται σε διάφορους πληθυσμούς σε ποσοστό περίπου 1% των γυναικών με κληρονομούμενο καρκίνο μαστού και ωθηκών που έχουν εξετασθεί με γενετική ανάλυση των γονιδίων *BRCA1/2* και έχουν βρεθεί αρνητικές [14,16,18,19]. Σε κάποιους πληθυσμούς όπως στους Φιλανδούς ή τους Γάλλους του Καναδά ανευρέθηκαν επαναλαμβανόμενες ή ιδρυτικές μεταλλάξεις και μάλιστα ακόμη και σε ασθενείς στους οποίους δεν είχε γίνει επιλογή με βάση το οικογενειακό ιστορικό [14,15]. Στον Ελληνικό χώρο, στο εργαστήριο μας επιχειρήθηκε να γίνει γενετική ανάλυση σε 30 *BRCA(-)* ασθενείς με τη μεθοδολογία αναφοράς DNA Sequencing σε όλα τα εξόνια του *PALB2* γονιδίου. Η προσπάθεια υπήρξε εργώδης και εντοπίστηκαν μόνο πολυμορφισμοί όπως η παρανοηματική αλλοίωση c.1676 A G (Q559R) σε δύο δείγματα και η συνώνυμη c.3300 T G σε άλλα 3 δείγματα [20]. Λόγω της σπανιότητας των παθογνωμικών μεταλλάξεων επιβάλλεται ανάπτυξη γρήγορων μεθοδολογιών σάρωσης σε μεγάλα τμήματα όπως π.χ. η PTT από DNA στα μεγάλα εξόνια 4 και 5, κατά αναλογία με την προηγηθείσα λίαν αποτελεσματική εμπειρία στα γονίδια *BRCA* [21-23].

### Γονίδιο *RAD51C*

Η πρωτεΐνη *RAD51C* μετέχει και αυτή στην DNA επιδιόρθωση μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού και είναι προϊόν ενός εκ των πέντε παράλογων γονιδίων του *RAD51* (τα άλλα είναι -B, -D, *XRCC-2,-3*). Το γονίδιο εντοπίζεται στη 17q23 θέση και διαθέτει 9 εξόνια. Παθογνωμικές μεταλλάξεις του ανευρέθησαν σε ποσοστό 1,3% Γερμανίδων γυναικών με κληρονομούμενο καρκίνο μαστού και ωθηκών που είχαν εξετασθεί με γενετική ανάλυση των γονιδίων *BRCA1/2* και είχαν βρεθεί αρνητικές [24]. Οι μεταλλάξεις ήταν όλων των ειδών (κωδικονίου τερματισμού, αλλαγής πλαισίου ανάγνωσης, παρανοηματικές, ματισματος). Επίσης, υπομορφική παρανοηματική μετάλλαξη σε ομοζυγωτία ανευρέθηκε και σε μία οικογένεια με αιμομιξία όπου υπήρχαν περιστατικά με Fanconi-like αναιμία με κυρίως αναπτυξιακές συγγενείς ανωμαλίες. Ωστόσο, η προαναφερθείσα συχνότητα αμφισβητήθηκε σε άλλους πληθυσμούς [25,26].

### Ρόλος στην επιδιόρθωση του DNA – Σύνδεση με αναιμία Fanconi

Καθημερινώς κάτω από την επίδραση περιβαλλοντικών εξωγενών παραγόντων (ακτινοβολίες, χημικές ουσίες κλπ) συμβαίνουν δεκάδες DNA βλάβες ανά κύτταρο ανά ημέρα. Τα σπασίματα διπλής έλικας (DSB, double stranded breaks) τα οποία προκύπτουν κάτω από την επίδραση ιονίζουσας ακτινοβολίας είναι τα πιο τοξικά και πρέπει να διορθωθούν άμεσα και με αλάθητο τρόπο. Ο ιδανικός

τρόπος είναι ο ομόλογος ανασυνδυασμός (HR, homologous Recombination) και όχι ο NHEJ (non-homologous end joining). Κύτταρα με έλλειμμα στον ομόλογο ανασυνδυασμό είτε οδηγούνται στην απόπτωση είτε σε καρκινογένεση λόγω της ένωσης σπασμένων χρωμοσωμάτων ή της συσσώρευσης μεταλλάξεων λόγω λαθών κατά την NHEJ. Ένα άλλο είδος βλάβης, οι δίκλωνοι δεσμοί (ICLs, Inter-strand crosslinks), οι οποίοι προκαλούνται υπό την επίδραση χημικών όπως η πλατίνα, η μιτομυκίνη C κ.λπ. καταλήγουν και αυτοί -εάν δεν επιδιορθωθούν- σε σπασίματα διπλής έλικας. Πρώτα απ' όλα όμως, πρέπει να εντοπιστούν και στη συνέχεια να επιδιορθωθούν με συνδυασμό μεθόδων επιδιόρθωσης όπως οι NER (Nucleotide excision repair), TLS (trans-lesion synthesis) και τελικά HR. Την ICL βλάβη εντοπίζουν μέσω ATR η ελικάση FANCM και η AP24 πρωτεΐνη και πάνω τους οικοδομείται ο βασικός πυρήνας του Fanconi συμπλέγματος (FANCA, -G, -F, -C, -B, AP100, -E, -L) [27]. Οι δύο τελευταίες έχουν δράση E3 λιγάσης της ουβικιτίνης και μονοουβικιτιλιώνουν τις FANCD2 και FANCI μέσω UBE2T2 [28]. Ο βασικός πυρήνας απομακρύνεται και οι FANCD2 και FANCI είτε συμμετέχουν είτε προσδένουν απλά τις πρωτεΐνες του ομόλογου ανασυνδυασμού BRCA2 (FANCD1), BRIP (FANCI), PALB2 (FANCN) και ίσως και την RAD51C, με τελικό εκτελεστή του HR την RAD51. Εάν δεν υπάρχει ICL, η βλάβη σπασίματος διπλής έλικας εντοπίζεται μέσω ATM και «μαρκάρεται» στη χρωματίνη με φωσφορυλίωση και στη συνέχεια με ουβικιτιλίωση για να έρθουν διαδοχικά αρχικά το σύμπλεγμα BRCA1-ABRAXAS-RAP80 και κατόπιν το σύμπλεγμα MRN (MRE11-RAD50-NBS1) για να συνεργασθούν με το προαναφερθέν σύμπλεγμα πρωτεϊνών που εκτελεί HR [29-31]. Από το προτεινόμενο μοντέλο επιδιόρθωσης των DSB και ICL βλαβών, γίνεται φανερό γιατί μεταλλάξεις σε ορισμένα γονίδια δίνουν μόνο Fanconi αναιμία, σε άλλα μόνο σύνδρομο καρκίνου μαστού ή/και ωθηκών, ενώ σε μερικά δίνουν και τα δύο σύνδρομα [32]!

### Νεότερα για τον BRCAness φαινότυπο

Επίσης γίνεται φανερό γιατί μεταλλάξεις στο γονίδιο *BRCA1* προσδίδουν ένα πιο επιθετικό φαινότυπο στους καρκίνους των φορέων και μάλιστα σε πιο νεαρή ηλικία: η πρωτεΐνη *BRCA1* πέραν της συμμετοχής της στη αναδιαμόρφωση της χρωματίνης μετά από DSB καθώς και στον ομόλογο ανασυνδυασμό, μετέχει στο σύστημα ανίχνευσης βλαβών BASC (BRCA1-Associated Surveillance Complex), σταματάει τον κυτταρικό κύκλο στην S-φάση, ουβικιτιλιώνει μέσω της αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη *BARD1* άλλους στόχους, έχει ρόλο στη μίτωση και ρυθμίζει μεταγραφικά άλλα γονίδια όπως το *ER* μέσω του *ESR1*. Είναι πολύ πιθανό η πρωτεΐνη *BRCA1* να συμμετέχει και σε άλλα μονοπάτια DNA επιδιόρθωσης και ειδικά των

βλαβών εκείνων που προκύπτουν από τους μεταβολίτες των οιστρογόνων και ίσως αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει το παράδοξο ότι ενώ είναι γονίδιο έχει γενικό ρόλο στο κύτταρο, οι μεταλλάξεις του προδιαθέτουν κυρίως τις γυναίκες για καρκίνο μαστού και ωθηκών (ενώ οι άνδρες *BRCA* φορείς νοσούν αρκετά σπανιότερα από καρκίνους)!

Ένα 80% των *BRCA1* καρκίνων μαστού ανήκουν στην κατηγορία TNBC (Triple Negative Breast Cancer), δηλαδή το αποτέλεσμα στην ανοσοϊστοχημεία των καρκινικών ιστών είναι ER-/PgR-/HER2-. Εάν γίνει ανάλυση με μικροσυστοιχίες της έκφρασης γονιδίων στους ιστούς αυτούς, ταξινομούνται στον κακής πρόγνωσης βασικοειδή τύπο (basal) [15% όλων των καρκίνων μαστού] και όχι στους καλής πρόγνωσης αυλοκυτταρικούς (luminal) τύπους A και B αλλά και ούτε στην HER2+ υποκατηγορία, στην οποία οι ασθενείς μπορούν να λάβουν αποτελεσματική βιολογική θεραπεία mAb (π.χ. Herceptin) [33]. Τελευταία, έχει προστεθεί και άλλη μια κατηγορία κακής πρόγνωσης με EMT (epithelial to mesenchymal transition) χαρακτηριστικά και claudin-low έκφραση [34]. Η προσθήκη των αντιγόνων CK14 και CK5/6 τα οποία είναι δείκτες βασικοειδούς τύπου στην IHC μελέτη του ιστού αυξάνει την πιθανότητα εύρεσης *BRCA1* μετάλλαξης στη γενετική ανάλυση του περιφερικού αίματος κατά 148 φορές όταν συνυπάρχει ο TNBC φαινότυπος [35]! Ο φαινότυπος BRCAness όμως υπάρχει και σε ένα ποσοστό 25% του σποραδικού καρκίνου καθώς το ίδιο αποτέλεσμα μπορεί να προέλθει και με σίγαση της έκφρασης του *BRCA1* γονιδίου π.χ. με μεθυλίωση των CpG νησίδων στον υποκινητή του.

### Έξυπνη θεραπευτική αντιμετώπιση TNBC

Έχει προταθεί η έννοια της «συνθετικής θνητότητας» (synthetic lethality) για τις περιπτώσεις καρκίνων όπου βασικό πρόβλημα αποτελεί γενετικό ελάττωμα σε ένα μονοπάτι DNA επιδιόρθωσης π.χ. τον HR στους TNBC ή/και BRCAness καρκίνους [31,36]. Εάν δοθεί χημειοθεραπευτικό σχήμα που αυξάνει σημαντικά τις βλάβες αυτές οι οποίες επιδιορθώνονται με το HR μονοπάτι (π.χ. πλατίνα), τότε τα καρκινικά κύτταρα ίσως καταφέρουν να επιζήσουν μέσω αύξησης της δραστηριότητας άλλων μονοπατιών επιδιόρθωσης όπως π.χ. το BER (Base excision repair). Εάν όμως συγχωρηθεί και ένας αναστολέας του άλλου μονοπατιού, όπως π.χ. ένας αναστολέας *PARP1* (poly (ADP-Ribose) Polymerase 1) ο οποίος παρεμποδίζει την BER επιδιόρθωση, τότε τα καρκινικά κύτταρα θα πεθάνουν ενώ τα φυσιολογικά τελικά θα καταφέρουν να ζήσουν με τον ένα μηχανισμό επιδιόρθωσης. Οι πρώτες κλινικές δοκιμές με τέτοιους αναστολείς (*BSI-201*, *Olaparib*) έχουν ξεκινήσει σε μεταστατικούς TNBC ασθενείς με σχετικά καλά αποτελέσματα αλλά και κάποιες παρενέργειες λόγω μη εκλεκτικότητάς τους ή ακόμη και ανθεκτικότητα λόγω

αναστροφής *BRCA* μετάλλαξης [37,38]. Ίσως η παραγωγή πιο εκλεκτικών έξυπνων θεραπευτικών στο μέλλον να αποτελέσει χημειοπροφύλαξη για τους *BRCA1* φορείς μεταλλάξεων αλλά πιθανόν και για φορείς άλλων γονιδίων όπως π.χ. του *PALB2* όπου και εκεί παρουσιάζεται έλλειμμα στο ίδιο μονοπάτι DNA επιδιόρθωσης.

### Νέος αλγόριθμος γενετικής ανάλυσης για κληρονομούμενο καρκίνο μαστού ή/και ωοθηκών

Υπάρχει πληθώρα υπολογιστικών προγραμμάτων για την υποβοήθηση της γενετικής συμβουλευτικής σε ασθενείς με κληρονομούμενο καρκίνο μαστού ή/και ωοθηκών ή σε άτομα με υποψία για προδιάθεση για το σύνδρομο αυτό λόγω οικογενειακού ιστορικού ή σε φορείς μεταλλάξεων όπως τα *BRCA* Risk calculator, *BOADICEA* [39], *BRCAPRO*, *IBIS*, *FHAT*, *Penn*, *Manchester score* κ.λπ. καθώς και βιβλιογραφία για τη συγκριτική τους αξιολόγηση [40]. Είναι φανερό ότι μελλοντικές εκδόσεις των ανωτέρω προγραμμάτων πρέπει -σύμφωνα και με τα νεότερα δεδομένα που προαναφέρθηκαν- να περιλαμβάνουν στοιχεία πέραν της ηλικίας και του οικογενειακού ιστορικού όπως ο ιστολογικός τύπος και η *IHC* μελέτη (όταν υπάρχουν τα δεδομένα) αλλά και να συυπολογίζουν την πιθανότητα ύπαρξης μετάλλαξης και στα υπόλοιπα γονίδια που προδιαθέτουν για καρκίνο μαστού (όπως π.χ. στα γονίδια *PALB2*, *BRIP1*, *RAD51C* κ.λπ.). Στην Ελλάδα μετά την έγγραφη συγκατάθεση του ασθενούς κατά τη γενετική συμβουλευτική, καλό είναι να προηγείται η ανάλυση του εξονίου 20 στο γονίδιο *BRCA1* καθώς και η πλειονότητα των μεταλλάξεων αφορά τις μεταλλάξεις 5382insC και G5331A (G1738R) στο εξόνιο αυτό και έχουν αναπτυχθεί γρήγορες μέθοδοι για την αξιόπιστη ανίχνευσή τους [41,42].

### Μελλοντικές εξελίξεις στην γενετική/επιγενετική ανάλυση κληρονομούμενου καρκίνου μαστού ή/και ωοθηκών

Με την έλευση των μεθόδων Next Generation Sequencing και με την ευκολία που παρέχουν, είναι πολύ πιθανό να συμπληρωθεί το ποσοστό οικογενειών με κληρονομούμενο καρκίνο μαστού ή/και ωοθηκών με ανιχνεύσιμη μετάλλαξη έως και το 100%: θα εντοπίζονται σε άλλα γονίδια της DNA επιδιόρθωσης με ομόλογο ανασυνδυασμό (εκτός αυτών που προαναφέρθηκαν εκτενώς). Οι μεταλλάξεις τους μπορεί να είναι παθογενετικές αλλά μπορεί και να ανευρεθούν περιπτώσεις με συνδυασμό υπομορφικών μεταλλάξεων σε πολλά από τα γονίδια με τελικό αποτέλεσμα πάντα έλλειμμα στον ομόλογο ανασυνδυασμό. Ίσως και η επιγενετική μελέτη μπορεί να βοηθήσει σημαντικά καθώς υποκινητές σε ορισμένα από τα γονίδια πιθανότατα θα ανευρεθούν μεθυλιωμένοι.

### Βιβλιογραφία

- Hirshfield KM, Rebbeck TR, Levine AJ. Germline mutations and polymorphisms in the origins of cancers in women. *J Oncol* 2010;2010: 297671.
- Campeau PM, Foulkes WD, Tischkowitz MD. Hereditary breast cancer: new genetic developments, new therapeutic avenues. *Hum Genet* 2008;124: 31-42.
- Walsh T, King MC. Ten genes for inherited breast cancer. *Cancer Cell* 2007;11: 103-5.
- Xia B, Sheng Q, Nakanishi K, et al. Control of *BRCA2* cellular and clinical functions by a nuclear partner, *PALB2*. *Mol Cell* 2006;22: 719-29.
- Oliver AW, Swift S, Lord CJ, Ashworth A, Pearl LH. Structural basis for recruitment of *BRCA2* by *PALB2*. *EMBO Rep* 2009;10: 990-6.
- Sy SM, Huen MS, Chen J. *PALB2* is an integral component of the *BRCA* complex required for homologous recombination repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106: 7155-60.
- Livingston DM. Cancer. Complicated supercomplexes. *Science* 2009;324: 602-3.
- Rahman N, Seal S, Thompson D, et al. *PALB2*, which encodes a *BRCA2*-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. *Nat Genet* 2007;39: 165-7.
- Silvestri V, Rizzolo P, Zanna I, et al. *PALB2* mutations in male breast cancer: a population-based study in Central Italy. *Breast Cancer Res Treat* 2010.
- Jones S, Hruban RH, Kamiyama M, et al. Exomic sequencing identifies *PALB2* as a pancreatic cancer susceptibility gene. *Science* 2009;324: 217.
- Xia B, Dorsman JC, Ameziane N, et al. Fanconi anemia is associated with a defect in the *BRCA2* partner *PALB2*. *Nat Genet* 2007;39: 159-61.
- Reid S, Schindler D, Hanenberg H, et al. Biallelic mutations in *PALB2* cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer. *Nat Genet* 2007;39: 162-4.
- Patel KJ. Fanconi anemia and breast cancer susceptibility. *Nat Genet* 2007;39: 142-3.
- Erkko H, Xia B, Nikkila J, et al. A recurrent mutation in *PALB2* in Finnish cancer families. *Nature* 2007;446: 316-9.
- Foulkes WD, Ghadirian P, Akbari MR, et al. Identification of a novel truncating *PALB2* mutation and analysis of its contribution to early-onset breast cancer in French-Canadian women. *Breast Cancer Res* 2007;9: R83.
- Garcia MJ, Fernandez V, Osorio A, et al. Analysis of *FANCB* and *FANCN/PALB2* Fanconi Anemia genes in *BRCA1/2*-negative Spanish breast cancer families. *Breast Cancer Res Treat* 2008.

17. Pylkas K, Erkko H, Nikkila J, Solyom S, Winqvist R. Analysis of large deletions in BRCA1, BRCA2 and PALB2 genes in Finnish breast and ovarian cancer families. *BMC Cancer* 2008;8: 146.
18. Tischkowitz M, Xia B, Sabbaghian N, et al. Analysis of PALB2/FANCN-associated breast cancer families. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104: 6788-93.
19. Cao AY, Huang J, Hu Z, et al. The prevalence of PALB2 germline mutations in BRCA1/BRCA2 negative Chinese women with early onset breast cancer or affected relatives. *Breast Cancer Res Treat* 2008.
20. Poupouridou N, Tsionou C, Spanos N, Dimas C, Kroupis C. Genetic analysis of PALB2 gene in BRCA (-) Greek patients with hereditary breast and ovarian cancer. *Clin Chem Lab Med* 2009;47: 5166.
21. Kroupis C, Lianidou E, Goutas N, et al. Atypical medullary breast carcinoma in a family carrying the 5382insC BRCA-1 mutation. *Breast J* 2003;9: 260-2.
22. Kroupis C, Lianidou E, Goutas N, et al. Genetic counseling of medullary breast cancer patients. *Clin Genet* 2004;65: 343-4.
23. Kroupis C\* and Ladopoulou A\*, Konstantopoulou I, 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 contributing first authors).
24. Meindl A, Hellebrand H, Wiek C, et al. Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. *Nat Genet* 2010;42: 410-4.
25. Akbari MR, Tonin P, Foulkes WD, et al. RAD51C germline mutations in breast and ovarian cancer patients. *Breast Cancer Res* 2010;12: 404.
26. Zheng Y, Zhang J, Hope K, et al. Screening RAD51C nucleotide alterations in patients with a family history of breast and ovarian cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010.
27. Moldovan GL, D'Andrea AD. How the fanconi anemia pathway guards the genome. *Annu Rev Genet* 2009;43: 223-49.
28. de Winter JP, Joenje H. The genetic and molecular basis of Fanconi anemia. *Mutat Res* 2009;668: 11-9.
29. Hoeller D, Dikic I. Targeting the ubiquitin system in cancer therapy. *Nature* 2009;458: 438-44.
30. Bergink S, Jentsch S. Principles of ubiquitin and SUMO modifications in DNA repair. *Nature* 2009;458: 461-7.
31. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 2009;461: 1071-8.
32. Levy-Lahad E. Fanconi anemia and breast cancer susceptibility meet again. *Nat Genet* 2010;42: 368-9.
33. Sorlie T. Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. *Eur J Cancer* 2004;40: 2667-75.
34. Hennessy BT, Gonzalez-Angulo AM, Stemke-Hale K, et al. Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. *Cancer Res* 2009;69: 4116-24.
35. Lakhani SR, Reis-Filho JS, Fulford L, et al. Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype. *Clin Cancer Res* 2005;11: 5175-80.
36. Tutt A, Ashworth A. Can genetic testing guide treatment in breast cancer? *Eur J Cancer* 2008;44: 2774-80.
37. Litman R, Gupta R, Brosh RM, Jr., Cantor SB. BRCA-FA pathway as a target for anti-tumor drugs. *Anticancer Agents Med Chem* 2008;8: 426-30.
38. Lord CJ, Ashworth A. Targeted therapy for cancer using PARP inhibitors. *Curr Opin Pharmacol* 2008;8: 363-9.
39. Antoniou AC, Cunningham AP, Peto J, et al. The BOADICEA model of genetic susceptibility to breast and ovarian cancers: updates and extensions. *Br J Cancer* 2008;98: 1457-66.
40. Panchal SM, Ennis M, Canon S, Bordeleau LJ. Selecting a BRCA risk assessment model for use in a familial cancer clinic. *BMC Med Genet* 2008;9: 116.
41. Kroupis C, Christopoulos K, Devetzoglou M, Tsiagas I, Lianidou ES. Asymmetric real-time PCR detection of BRCA1 5382insC mutation by melting curve analysis in the LightCycler. *Clin Chim Acta* 2008;390: 141-4.
42. Vorkas PA, Christopoulos K, Kroupis C, Lianidou ES. Mutation scanning of exon 20 of the BRCA1 gene by high-resolution melting curve analysis. *Clin Biochem* 2009.

## ΝΕΟΙ ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΓΝΩΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

A. Σκορίλας

*Αναπλ. Καθηγητής Κλινικής Βιοχημείας, Τομέας Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών*

Με την ολοκλήρωση του προγράμματος αποκρυπτογράφησης του ανθρώπινου γονιδιώματος άνοιξε ο δρόμος για συστηματικότερη μελέτη του ρόλου των διάφορων νέων γονιδίων ή των μεταβολών της έκφρασής τους σε ποικίλες παθολογικές καταστάσεις και ιδιαίτερα στον καρκίνο. Το γεγονός αυτό οδηγεί στη δυνατότητα ανίχνευσης όχι μόνο νέων προγνωστικών ή και διαγνωστικών δεικτών, αλλά και σε νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις με βάση τα βιολογικά χαρακτηριστικά του κάθε ασθενή.