

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΚΛΗΡΟΝΟΜΟΥΜΕΝΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Εφαρμογή στον κληρονομούμενο καρκίνο μαστού και ωοθηκών: γονίδια BRCA1/2

Χρήστος Κρούπης

*Λέκτορας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών
Εργαστήριο Κλινικής Βιοχημείας*

Μετά την ολοκλήρωση του Human Genome Project, προέκυψαν νέες προκλήσεις τόσο με την επαλήθευση των ευρημάτων του όσο και με τη στροφή είτε σε γονιδιώματα άλλων οργανισμών είτε σε επιμέρους ερωτήματα για διάφορα νοσήματα όπως πχ για τον καρκίνο, όπου σε αντίθεση με τα καρδιαγγειακά νοσήματα ή τις λοιμώξεις, η θνησιμότητα έχει παραμείνει σταθερή τα τελευταία 50 χρόνια [1]. Έτσι προέκυψε η ανάγκη για το **Cancer Genome Project** με το οποίο διαπιστώθηκε ότι λίγο περισσότερο από 1% από τα ευρεθέντα 25.000 κωδικοποιούντα γονίδια του ανθρώπινου οργανισμού ενέχονται στην παθογένεση του καρκίνου [2]. Σύμφωνα με την τελευταία καταγραφή, έχουν εντοπισθεί **355 «καρκινικά» γονίδια** σε όλα τα χρωμοσώματα (εκτός του Y) των οποίων οι μεταλλάξεις ή οι επιγενετικές τροποποιήσεις στο DNA αποτελούν βήματα καρκινογένεσης. Όσον αναφορά τις μεταλλάξεις, στο 90% αυτών των γονιδίων έχουν ανιχνευθεί σωματικές μεταλλάξεις (μόνο στα κύτταρα του όγκου), στο 20% μεταλλάξεις στη γαμετική σειρά (δηλαδή σε κάθε κύτταρο του ανθρώπινου οργανισμού) ενώ στο 10% των γονιδίων έχουν ανιχνευθεί και με τους δύο τρόπους.

Η πλειοψηφία των **66 γονιδίων** που ενέχονται στον **κληρονομούμενο καρκίνο** 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 τους, στη γαμετική σειρά, δρουν συνήθως με υπολειπόμενο τρόπο στο κυτταρικό επίπεδο και προσδίδουν προδιάθεση στους φορείς για καρκινογένεση συνήθως επιθηλιακής προέλευσης. Σε αντίθεση, η μεγάλη πλειοψηφία των γονιδίων που δίνουν σωματικές μεταλλάξεις (και μάλιστα συνήθως διαμεταθέσεις) ανήκουν στην κατηγορία των κινασών (είτε τυροσίνης είτε σερίνης/θρεονίνης), δρουν με τον επικρατούντα χαρακτήρα και έχουν συνήθως ως τελικό αποτέλεσμα λευκαϊμίες και λεμφώματα [2].

Τα πιο γνωστά από τα γονίδια του κληρονομούμενου καρκίνου, είναι τα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2* που ενέχονται στον κληρονομούμενο καρκίνο μαστού και ωοθηκών, το γονίδιο *APC* στην οικογενή αδενωματώδη πολυποδίαση (FAP) του παχέος εντέρου, τα γονίδια *MSH2*, *MLH1*, *MSH6*, *PMS1* και *PMS2* στον κληρονομούμενο μη-πολυποδιακό καρκίνο παχέος εντέρου, το γονίδιο *ATM* στην αταξία-τελεαγγειεκτασία, τα γονίδια *FANCA*-*G* στην κακοήθη αναιμία Fanconi, τα γονίδια *NF1/NF2* στη νευρινωμάτωση, το γονίδιο *RBI* στο ρετινοβλάστωμα, κλπ [3].

Γενικά στη Γενετική του κληρονομούμενου καρκίνου πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν τα κάτωθι:

α) επειδή τα γονίδια του κληρονομούμενου καρκίνου έχουν σημαντικό και γενικό ρόλο σε κάθε κύτταρο, 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 αναιμία Fanconi)

β) πέρα των 66 γονιδίων των οποίων οι μεταλλάξεις προσδίδουν ισχυρή προδιάθεση για καρκίνο και χαρακτηρίζονται από μεγάλο σχετικό κίνδυνο (relative risk) και **υψηλή διεισδυτικότητα (penetrance)** [μεγάλο ποσοστό φορέων τελικά νοσούν], υπάρχουν πολλά άλλα γονίδια με χαμηλό σχετικό κίνδυνο (RR=1,5-2,0) και **χαμηλή διεισδυτικότητα** που κληρονομούνται επίσης στη γαμετική σειρά και επιδρούν στις οικογένειες με **οικογενή καρκίνο** [4].

γ) Επίσης, 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 σε γονίδιο υψηλής διεισδυτικότητας [5]. Τροποποίηση του κινδύνου ενός γονιδίου υψηλής διεισδυτικότητας ή ακόμη και της ειδικότητας του σε συγκεκριμένο ιστό, μπορεί να προκαλέσει επίσης η θέση και το είδος της μετάλλαξης (allelic variance) καθώς και εξωγενείς μη-γενετικοί παράγοντες.

Κληρονομούμενος καρκίνος μαστού και ωοθηκών

Έχει υπολογισθεί ότι ένα ποσοστό της τάξεως του 5-7% των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού και ένα αντίστοιχο ποσοστό του 10% των περιπτώσεων του καρκίνου των ωοθηκών εντάσσονται στην κατηγορία 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 με υψηλή διεισδυτικότητα τα οποία ευθύνονται για την πλειονότητα των περιπτώσεων αυτών: το γονίδιο *BRCA1* (**BR**east **C**Ancer **S**usceptibility gene **1**) στο χρωμόσωμα 17 το οποίο ευθύνεται για το 45% των περιπτώσεων και το γονίδιο *BRCA2* στο χρωμόσωμα 13 για το 35%. Το υπόλοιπο 20% των περιπτώσεων κληρονομούμενου καρκίνου μαστού και ωοθηκών πιθανότατα οφείλεται κατά μεγάλο μέρος σε διάφορα σπάνια γονίδια υψηλής διεισδυτικότητας που δεν έχουν ανακαλυφθεί έως τώρα και κατά δεύτερο λόγο 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.

Οι πρωτεΐνες *BRCA1/2* είναι ογκοκατασταλτικές και έχουν ιδιαίτερο ρόλο στην επιδιόρθωση του DNA είτε με άμεσο είτε με έμμεσο τρόπο μέσω της αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες όπως πχ το Rad51 κλπ. 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 πρώιμη 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. 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% [6].

Γενετική ανάλυση γονιδίων BRCA1/2

Το γονίδιο *BRCA1* αποτελείται από 24 εξόνια εκ των οποίων τα 22 κωδικοποιούν cDNA 5,7 kb (GenBank accession number # U14680), ενώ το γονίδιο *BRCA2* από 27 εξόνια, εκ των οποίων τα 26 κωδικοποιούν cDNA 11 kb (GenBank # U43746). Συνεπώς, τα δύο γονίδια είναι εξαιρετικά μεγάλα (μεγαλύτερα του 90% των ανθρώπινων γονιδίων). Διαθέτουν δε, ένα ασυνήθιστα μεγάλο κεντρικό εξόνιο: το εξόνιο 11, το οποίο κωδικοποιεί το μεγαλύτερο ποσοστό της αντίστοιχης πρωτεΐνης (>50%). 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.

Μέθοδο 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 [7,8], 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 [9] ενώ στο BRCA2 δεν υπάρχουν πολλές τέτοιες μεταλλάξεις [5]. 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* 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 [10]. Στον Ελληνικό χώρο δεν έχει ανιχνευθεί μεγάλο ποσοστό τέτοιων μεταλλάξεων [11].

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 οικογενείας είτε λόγω ατελούς διεισδυτικότητας είτε λόγω μετάδοσης της μετάλλαξης μέσω των αρρένων μελών της οικογενείας -οι οποίοι δεν νοσούν απαραίτητα- είτε λόγω υιοθεσιών. Σε αυτή τη περίπτωση χρησιμοποιούνται 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 [12,13]. 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 [14]. 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.

Τροποποιητές κινδύνου για κληρονομούμενο καρκίνο μαστού και ωοθηκών

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* [5].

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Varmus H. The new era in cancer research. *Science* 2006;312:1162-5.
- [2] 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.

- [3] Fearon ER. Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer. *Science* 1997;278:1043-50.
- [4] Ponder BA. Cancer genetics. *Nature* 2001;411:336-41.
- [5] Narod SA. Modifiers of risk of hereditary breast and ovarian cancer. *Nat Rev Cancer* 2002;2:113-23.
- [6] King MC, Marks JH, Mandell JB. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science* 2003;302:643-6.
- [7] 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.
- [8] Kroupis C and Ladopoulou A*, 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.
- [9] 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.
- [10] Mazoyer S. Genomic rearrangements in the BRCA1 and BRCA2 genes. *Hum Mutat* 2005;25:415-22.
- [11] Belogianni I and Apeessos 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.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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.

(*Equally contributing first authors)