

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟΥ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟΥ / ΜΟΡΙΑΚΗΣ
ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ



**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ PALB2 ΣΕ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΕΣ ΜΕ
ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΣΤΗΝ
ΚΥΠΡΟ**

ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ:

Δρ. ΑΝΤΡΕΑΣ ΧΑΤΖΗΣΑΒΒΑΣ
Δρ. ΜΑΡΙΑ ΛΟΙΖΙΔΟΥ
Δρ. ΚΥΡΙΑΚΟΣ ΚΥΡΙΑΚΟΥ

ΥΠΕΥΘΥΝΟΙ ΚΑΘΗΓΗΤΕΣ:

Δρ. ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΜΑΤΘΙΟΠΟΥΛΟΣ
Δρ. ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ

**ΗΒΗ ΧΑΡΚΟΥ
ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2010**

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Ινστιτούτο Γενετικής και Νευρολογίας και συγκεκριμένα στο τμήμα του Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου/Μοριακής Παθολογίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Κυριάκο Κυριάκου που με δέχτηκε στο εργαστήριο του για να πραγματοποιήσω την πτυχιακή μου εργασία και το γεγονός ότι μου έδωσε την ευκαιρία να συμμετάσχω στην ερευνητική δραστηριότητα του τμήματος.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ. Αντρέα Χατζησάββα και την Δρ. Μαρία Λοϊζίδου για την υπομονή, την κατανόηση, την καθοδήγηση και τις γνώσεις που μου προσέφεραν καθ' όλη τη διάρκεια της παραμονής μου στο Ινστιτούτο.

Επιπρόσθετα δεν θα μπορούσα να ξεχάσω τις ερευνήτριες του εργαστηρίου Χριστίνα Φλουρή και Ιωάννα Νεοφύτου καθώς επίσης και την συμφοιτήτρια μου Χριστίνα Στρατή όπου με τη βοήθεια, το χαμόγελο και τα αστεία τους έκαναν ακόμα πιο φιλικό και ευχάριστο το περιβάλλον.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Ματθιόπουλο για την όλη καθοδήγηση του στην πτυχιακή μου εργασία.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του μαστού είναι ο συχνότερος τύπος καρκίνου στο γυναικείο πληθυσμό και ο δεύτερος σε θνησιμότητα μετά τον καρκίνο του πνεύμονα. Τα σημαντικότερα γονίδια που προδιαθέτουν στον καρκίνο του μαστού είναι το *BRCA1* και το *BRCA2*, τα οποία εξηγούν γύρω στο 20% του συνολικού αριθμού των περιστατικών κληρονομικού καρκίνου του μαστού. Πρόσφατα, ανακαλύφθηκε ότι παθογόνες μεταλλάξεις στο γονίδιο *PALB2* συνδέονται με τον κληρονομικό καρκίνο του μαστού. Η συμβολή του γονιδίου *PALB2* στον κληρονομικό καρκίνο του μαστού στον Κυπριακό πληθυσμό δεν έχει διερευνηθεί μέχρι στιγμής. Σκοπός της παρούσας έρευνας είναι η διερεύνηση της συμβολής του γονιδίου *PALB2* στον κληρονομικό καρκίνο του μαστού στην Κύπρο. Μέσω μοριακής γενετικής ανάλυσης, αναλύθηκαν συνολικά 21 δείγματα γυναικών, ελληνοκυπριακής καταγωγής, οι οποίες είχαν βεβαρημένο οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού και ήταν αρνητικές για μεταλλάξεις στα γονίδια υψηλής διεισδυτικότητας *BRCA1* και *BRCA2*. Η γενετική μελέτη του γονιδίου *PALB2* σε ελληνοκύπριες ασθενείς με καρκίνο του μαστού, δεν κατέδειξε ότι το συγκριμένο γονίδιο συμβάλλει στην ανάπτυξη κληρονομικού καρκίνου του μαστού στην Κύπρο. Σημειώνεται ότι ο αριθμός των δειγμάτων που μελετήθηκαν είναι πολύ μικρός ώστε να μπορούν να εξαχθούν τελειωτικά συμπεράσματα σχετικά με τη συμβολή του γονιδίου αυτού στον κληρονομικό καρκίνο του μαστού στην Κύπρο. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό είναι αρκετά σπάνιες και πιθανόν η μελέτη επιπλέον ασθενών / οικογενειών να οδηγήσει στην ανεύρεση παθογόνων μεταλλάξεων και στον Κυπριακό πληθυσμό.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Καρκίνος	1
1.1.1 Ιστορικά.....	1
1.1.2 Καρκίνος μια πολυπαραγοντική και πολυσταδιακή διαδικασία.....	2
1.1.2.1 Πολυσταδιακό μοντέλο της καρκινογένεσης.....	3
1.1.3 Μοριακή γενετική του καρκίνου.....	4
1.2 Καρκίνος του μαστού.....	7
1.2.1 Επιπτώσεις και θνησιμότητα καρκίνου του μαστού.....	7
1.2.2 Μορφολογία μαστού και καρκίνου του μαστού	9
1.2.3 Επιδημιολογία και παράγοντες κινδύνου	11
1.2.4 Σποραδικός και κληρονομικός καρκίνος του μαστού.....	14
1.2.5 Γενετική Βάση κληρονομικού καρκίνου του μαστού.....	15
1.2.5.1 Γονίδια υψηλής-διδυσδυκτικότητας.....	16
1.2.5.2 Γονίδια ενδιάμεσης διδυσδυκτικότητας.....	16
1.2.5.3 Κοινά αλληλόμορφα χαμηλής-διδυσδυκτικότητας.....	17
1.2.6 Anemia Fanconi.....	17
1.3 PALB2	19
1.4 ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	22
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	23
2.1 Επιλογή ασθενών	23
2.2 Απομόνωση DNA.....	24
2.3 Σχεδιασμός εκκινητών	25
2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης(PCR).....	25
2.5 Ηλεκτροφόρηση τμημάτων DNA σε πηκτές αγαρόζης	27
2.6 Καθαρισμός PCR προϊόντων	29
2.7 Κυκλική αλληλούχιση (cycle sequencing).....	29
2.8 Μεθοδος καθαρισμού προϊόντων κυκλικής αλληλούχισης από ελεύθερα νουκλεοτίδια	32
2.9 Αυτόματος αναλυτής γενετικού υλικού	33
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	35
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	38
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	42

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Καρκίνος

Καρκίνος είναι ο γενικός όρος που περιγράφει την ανώμαλη ανάπτυξη των κυττάρων. Είναι ένα πολυπαραγοντικό νόσημα που μπορεί να προσβάλλει κάθε ιστό και όργανο του σώματος. Χαρακτηρίζεται από ανεξέλεγκτη διαίρεση και πολλαπλασιασμό χωρίς προγραμματισμό και εξάπλωση των μη φυσιολογικών κυττάρων ενός οργάνου ή ιστού. Τα καρκινικά κύτταρα, δηλαδή, δεν ακολουθούν το φυσιολογικό δρόμο της γήρανσης και του κυτταρικού θανάτου, αλλά συνεχίζουν να αναπτύσσονται ανεξέλεγκτα σχηματίζοντας μια μάζα που ονομάζεται όγκος (Weinberg, 2007).

Ο καρκίνος δεν είναι μεμονωμένη ασθένεια, ούτε προέρχεται από μεμονωμένη αιτία, αλλά ούτε και αντιμετωπίζεται με ένα και μοναδικό τρόπο. Υπάρχουν πολλοί και διαφορετικοί τύποι καρκίνου, οι οποίοι είναι δυνατό να προσβάλλουν σχεδόν οποιοδήποτε σημείο του σώματος και έχουν διαφορετικό τρόπο αντιμετώπισης και θεραπείας (Weinberg, 2007).

1.1.1 Ιστορικά

Τα πρώτα ιστορικά στοιχεία που υποδηλώνουν την παρουσία καρκίνου εντοπίστηκαν σε απολιθωμένα ανθρώπινα οστά και καταγράφηκαν σε αρχαία κείμενα. Συγκεκριμένα, μετά από μελέτες που έγιναν σε μούμιες, βρέθηκαν αλλοιώσεις στην περιοχή του αυχένα και της κεφαλής, οι οποίες σχετίζονται με την παρουσία ενός τύπου καρκίνου των οστών, του οστεοσαρκώματος (Nerlich et al, 2006).

Η παλαιότερη γραπτή αναφορά περιστατικού με καρκίνο ανακαλύφθηκε σε πάπυρο στην αρχαία Αίγυπτο που χρονολογείται γύρω στο 1600 π.Χ., στον οποίο αναφέρονται οκτώ περιστατικά καρκίνου του μαστού τα οποία αντιμετωπίστηκαν με καυτηριασμό. Η λέξη καρκίνος χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στην αρχαία Ελλάδα και αναφέρεται στο ζώο καρκίνο (κάβουρα), του οποίου τα πόδια τοποθετούνται αντιδιαμετρικά στο σώμα του. Ο όρος αποδίδεται από τον Ιπποκράτη, που έζησε τον 4ο αιώνα π.Χ. (Olson et al, 2002).

Από τα παραπάνω στοιχεία, γίνεται αντιληπτό ότι ο καρκίνος δεν είναι ασθένεια του 20^{ου} αιώνα αλλά αντίθετα εντοπίζεται σε παλαιότερες περιόδους.

Φυσικά στις μέρες μας ο καρκίνος αποτελεί ένα κοινωνικοοικονομικό πρόβλημα σε ολόκληρο τον κόσμο. Παρόλο που τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει τεράστια άλματα στη

θεραπεία αυτής της νόσου, πολλοί ασθενείς και ειδικότερα ασθενείς με μεταστατικό νόσημα καταλήγουν στον θάνατο από τη νόσο.

Στην Κύπρο διαγνώνονται γύρω στα 2000 καινούργια περιστατικά καρκίνου ετησίως. Ο συχνότερος τύπος καρκίνου στους άνδρες είναι ο καρκίνος του προστάτη ενώ στις γυναίκες ο καρκίνος του μαστού. Στην Εικόνα 1 συνοψίζονται οι συνηθέστερες μορφές καρκίνου στην Κύπρο βάση στατιστικών του Αρχείου Καρκίνου.

	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005
Μαστός	273	281	292	280	281	345	371	386
Προστάτης	147	154	243	216	223	220	296	307
Έντερο	177	194	209	182	190	200	240	261
Πνεύμονας	110	128	152	145	149	144	146	155
Κύστη	137	119	122	99	101	111	108	111
Total	1576	1553	1673	1588	1697	1811	1961	2082

Εικόνα 1: Παρουσίαση των συνηθέστερων μορφών καρκίνου στην Κύπρο μεταξύ 1998 και 2004 και του συνολικού αριθμού περιστατικών ανά έτος (Αρχείο Καρκίνου Κυπριακής Δημοκρατίας).

1.1.2 Καρκίνος μια πολυσταδιακή διαδικασία

Φυσιολογικά, τα κύτταρα του οργανισμού αναπτύσσονται και διαιρούνται, ώστε να προκύπτουν από αυτά θυγατρικά κύτταρα και να διατηρείται η ακεραιότητα του οργανισμού. Κάθε κύτταρο στον πυρήνα του περιέχει 23 ζεύγη χρωμοσωμάτων. Ανάμεσα σε κάθε ζεύγος περιστρέφεται η διπλή έλικα του DNA που αποτελεί το γενετικό κώδικα της ζωής. Το DNA ρυθμίζει και μεταβιβάζει τα γενετικά χαρακτηριστικά από τους προγόνους στους απογόνους. Τα χρωμοσώματά αποτελούνται από χιλιάδες γονίδια τα οποία στέλλουν εκατομμύρια μηνύματα που υπαγορεύουν στον οργανισμό πώς θα αναπτυχθεί, πώς θα λειτουργήσει και πώς θα συμπεριφερθεί.

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες τα γονίδια λειτουργούν κανονικά στέλλοντας τα σωστά μηνύματα. Έτσι παραμένουμε σε καλή φυσική κατάσταση και τα πάντα λειτουργούν όπως πρέπει. Ενόσω το γενετικό υλικό αυτοαναπαράγεται καθώς διαιρείται το κύτταρο, υπάρχουν πολλές πιθανότητες δημιουργίας λάθους κατά την

αντιγραφή, το οποίο αν δεν επιδιορθωθεί οδηγεί στη δημιουργία γονιδιακής μετάλλαξης. Τα μεταλλαγμένα γονίδια αρχίζουν να στέλλουν λανθασμένα μηνύματα και τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα με αποτέλεσμα τη δημιουργία όγκου (Weinstein, 1980).

Η μη ελεγχόμενη ανάπτυξη ενός όγκου έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή του περιβάλλοντα υγιούς ιστού. Η εξάπλωση του όγκου μέσω του αίματος ή του λεμφικού συστήματος μετά από ενίσχυση της αγγειογένεσης μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη δευτερογενών όγκων ή μεταστάσεων σε άλλα όργανα ή ιστούς.

Η μετατροπή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό δεν αποτελεί διαδικασία ενός σταδίου αλλά είναι αποτέλεσμα πολλαπλών σταδιακών αλλαγών που μπορεί να διαρκέσουν δύο, τρεις ή και περισσότερες δεκαετίες, γι' αυτό και ο καρκίνος αποτελεί ένα χρόνια πρόβλημα που μπορεί να συνδεθεί με πολλαπλές μεταλλάξεις (Μαργαρίτης et al, 2004).

1.1.2.1 Πολυσταδιακό μοντέλο της καρκινογένεσης

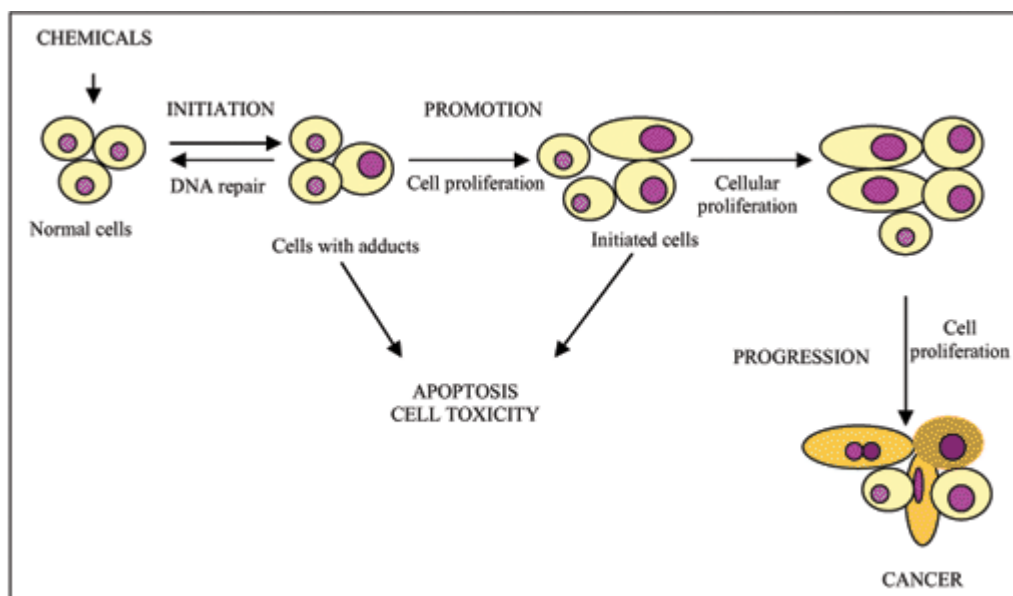
Το πολυσταδιακό μοντέλο της καρκινογένεσης περιλαμβάνει τρία στάδια: την έναρξη, την προαγωγή και την πρόοδο (Εικόνα 2) (Farber, 1984).

Κατά την έναρξη προκαλείται μια μετάλλαξη σε ένα μόνο κύτταρο. Αυτή η μετάλλαξη (αλλαγή) στο DNA μπορεί να προκληθεί είτε τυχαία κατά την αντιγραφή του DNA είτε μετά από επίδραση μιας καρκινογόνου ουσίας, εισερχόμενης στον οργανισμό. Επίσης έκθεση σε ακτινοβολία καθώς επίσης και συγκεκριμένοι ιοί κατά την διάρκεια του κύκλου ανάπτυξης τους, μπορούν να προκαλέσουν μεταλλάξεις στο DNA. Η μετάλλαξη μπορεί να προκαλέσει καρκινογένεση άμεσα ή έμμεσα όταν προκληθεί σε ογκογονίδια, πρωτο-ογκογονίδια ή ογκοκατασταλτικά γονίδια καθώς επίσης και σε γονίδια που εμπλέκονται σε μηχανισμούς υπεύθυνους για την επιδιόρθωση βλαβών στο DNA. Αυτό το στάδιο δεν είναι αντιστρέψιμο αφού οφείλεται σε γενετικές κυτταρικές αλλαγές. Αν η μετάλλαξη αυτή συμβεί στα γαμετικά κύτταρα ενός ατόμου τότε είναι δυνατόν να περάσει στις επόμενες γενεές.

Μετά τη δημιουργία μετάλλαξης στο δεύτερο στάδιο ακολουθεί κλωνικός πολλαπλασιασμός των αρχικά μεταλλαγμένων κυττάρων με την επίδραση παραγόντων που προάγουν την μίτωση, οδηγώντας ουσιαστικά στην εγκαθίδρυση στο DNA. Το κύτταρο συνεχίζει να διαιρείται και ξεπερνά τον αριθμό διαιρέσεων που θα πραγματοποιούσε ένα μη καρκινικό κύτταρο. Το προ-καρκινικό κύτταρο είναι

πλέον επιρρεπές σε λάθη λόγω γενωμικής αστάθειας έτσι υπάρχει αυξημένη πιθανότητα συσσώρευσης επιπλέον λαθών.

Η πρόοδος είναι το τελευταίο μη αντιστρέψιμο στάδιο της καρκινογένεσης. Τα κύτταρα που βρίσκονται στο στάδιο αυτό αποκτούν την ικανότητα επέκτασης, μετάστασης και αγγειογένεσης (Potter, 1981; Miller et al, 1987; Trosko et al, 1983; Trosko and Chang 1989).



Εικόνα 2: Απεικόνιση του πολυσταδιακού μοντέλου της καρκινογένεσης (Oliveira, 2007)

1.1.3 Μοριακή γενετική του καρκίνου

Ο καρκίνος είναι ένα πολυγονιδιακό νόσημα όπου συμμετέχουν αθροιστικά κληρονομούμενες ή/και επίκτητες μεταλλάξεις σε διάφορα γονίδια, τα οποία μπορεί να ανήκουν σε διάφορες λειτουργικές κατηγορίες (Foulkes et al, 2008). Η μετάλλαξη η οποία προκαλεί την έναρξη της αλυσίδας των γενετικών αλλαγών και οδηγεί σε ειδικούς τύπους καρκίνου φαίνεται ότι παρουσιάζει ειδικότητα ως προς το είδος του γονιδίου και τον τύπο του ιστού.

Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός ρυθμίζεται μέσω μηχανισμών που καθορίζουν αν τα κύτταρα θα προχωρήσουν στον κυτταρικό κύκλο και θα διαφοροποιηθούν ή αν θα προχωρήσουν σε απόπτωση. Κατά την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου υπάρχουν σημεία στα οποία εμπλέκονται διάφορα γονίδια ρυθμιστές. Αλλοίωση της δομής ή και απώλεια ρύθμισης της λειτουργίας των γονιδίων ρυθμιστών μπορεί να απορυθμίσει την ομαλή εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και να οδηγήσει σε

ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων και συνεπώς σε καρκίνο (Poehlmann and Roessner, 2010).

Είναι γνωστές τέσσερις κύριες ομάδες γονιδίων, που σχετίζονται με τον καρκίνο:

A) τα πρωτο-ογκογονίδια,

B) τα ογκογονίδια

Γ) τα ογκοκατασταλτικά γονίδια και

Δ) τα γονίδια τα οποία διατηρούν την ακεραιότητα του γονιδιώματος.

Τα γονίδια αυτά δρουν σε διάφορες φάσεις της κυτταρικής διαίρεσης.

Πρωτο-ογκογονίδια: είναι φυσιολογικά γονίδια του κυττάρου. Η φυσιολογική λειτουργία των πρωτο-ογκογονιδίων φαίνεται να σχετίζεται με τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων, δεδομένου ότι οι πρωτεΐνες τις οποίες παράγουν είναι αυξητικοί παράγοντες, υποδοχείς αυξητικών παραγόντων και ορμονών, καθώς επίσης πρωτεΐνες υπεύθυνες για τη μεταφορά ερεθισμάτων από τη μεμβράνη στον πυρήνα και πυρηνικοί παράγοντες μεταγραφής. Ουσιαστικά δρουν επιταχύνοντας την φυσιολογική κυτταρική ανάπτυξη κατά τη G1 φάση του κυτταρικού κύκλου (Pall, 1981).

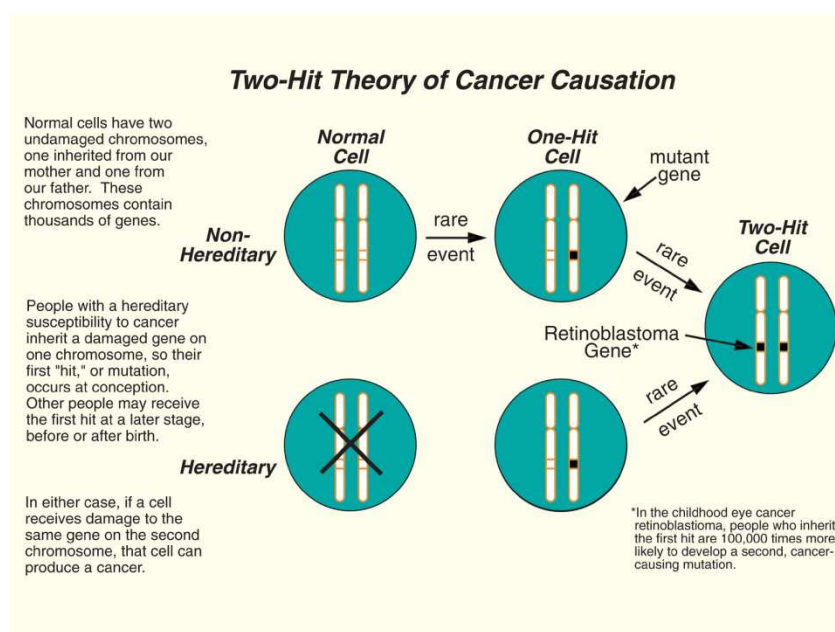
Ογκογονίδια: είναι είτε μεταλλαγμένες μορφές φυσιολογικών πρωτο-ογκογονιδίων είτε γονίδια ογκογόνων ιών με ικανότητα μεταμόρφωσης του κυττάρου ξενιστή. Τα γονίδια αυτά συμμετέχουν σε οδούς που ρυθμίζουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, την κυτταρική διαίρεση και την διαφοροποίηση. Η δράση των ογκογονιδίων διαφέρει από αυτή των πρωτο-ογκογονιδίων, δεδομένου ότι τα ογκογονίδια μετά την ενεργοποίησή τους έχουν την ικανότητα να μεταμορφώνουν φυσιολογικά κύτταρα σε καρκινικά. Μετάλλαξη στο ένα μόνο αλληλόμορφο είναι ικανή να οδηγήσει σε καρκινογένεση κάτι που δεν ισχύει με τα ογκοκατασταλτικά γονίδια (Knudson, 1985).

Ογκοκατασταλτικά γονίδια: είναι ομάδα γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που ελέγχουν και ρυθμίζουν την κυτταρική αύξηση και τον πολλαπλασιασμό.

Συμμετέχουν σε ενδοκυτταρικές οδούς μετάδοσης πληροφοριών οι οποίες καθιστούν τα κύτταρα ικανά να αντιλαμβάνονται και να επεξεργάζονται σήματα αναστολής της αύξησής τους, σηματοδοτώντας ακριβώς πριν την S φάση του κυτταρικού κύκλου, κατά την οποία συμβαίνει αναδιπλασιασμός του DNA. Η απώλεια της λειτουργίας

τους μπορεί να οδηγήσει σε κακοήγη φαινότυπο (Spandidos, 2007). Η ιδέα ύπαρξης ογκοκατασταλτικών γονιδίων απεδείχθη κατά πρώτο με το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος (*Rb*) (Bookstein and Lee, 1991).

Η μελέτη του κληρονομούμενου καρκίνου βοήθησε τους επιστήμονες να κατανοήσουν τους μηχανισμούς της καρκινογένεσης. Το 1971, ο Knudson, στηριζόμενος σε επιδημιολογικά δεδομένα του ρετινοβλαστώματος, διατύπωσε την υπόθεση για τη βάση του καρκίνου (Εικόνα 3). Σύμφωνα με την υπόθεση αυτή, τα ογκοκατασταλτικά γονίδια εμφανίζουν υπολειπόμενη ογκογενετική δράση και επομένως, αντίθετα με τα ογκογονίδια που δρουν ως επικρατή, απαιτείται μετάλλαξη ή έλλειψη και στα δυο αλληλόμορφα του γονιδίου προκειμένου να κατασταλεί η φυσιολογική δράση τους (Knudson, 1971).



Εικόνα 3 : Υπόθεση του Knudson για τη βάση του καρκίνου (Knudson, 1971).

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια μπορούν να διαχωριστούν σε δύο κύριες κατηγορίες: τα γονίδια «φύλακες» (gatekeepers) και τα γονίδια «φροντιστές» (caretakers).

Τα γονίδια «φύλακες» αναστέλλουν άμεσα την αύξηση του όγκου ή προωθούν τον κυτταρικό θάνατο (van Heemst et al, 2007). Αδρανοποίηση αυτών των γονιδίων έχει ως αποτέλεσμα την άμεση εμφάνιση και προώθηση του καρκίνου. Ένα από τα σημαντικότερα γονίδια αυτής της κατηγορίας είναι το *TP53* που ρυθμίζει την

έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, στην απόπτωση, στην επιδιόρθωση DNA και στην αγγειογένεση (Oliveira et al, 2005).

Τα γονίδια «φροντιστές» κωδικοποιούν παράγοντες που σταθεροποιούν το γένωμα και τα χρωμοσώματα παρεμποδίζοντας τη συσσώρευση μεταλλάξεων κατά την αντιγραφή. Ανεπαρκής λειτουργία των γονιδίων αυτών οδηγεί σε αύξηση των μεταλλάξεων και χρωμοσωμική αστάθεια με αποτέλεσμα την ανάπτυξη καρκίνου (Kinzler and Vogelstein, 1996).

Γονίδια διατήρησης της ακεραιότητας του γονιδιώματος: Η δράση αυτής της ομάδας γονιδίων συνίσταται στην επιδιόρθωση βλαβών στο DNA μετά τον αναδιπλασιασμό του, στη G2 φάση του κυτταρικού κύκλου. Τα γονίδια αυτά εξασφαλίζουν την πιστή αντιγραφή του DNA κατά τον αναδιπλασιασμό.

1.2.Καρκίνος του μαστού

1.2.1.Επίπτωση και θνησιμότητα

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί το συνηθέστερο τύπο καρκίνου στις γυναίκες. Εκτιμάται ότι 1 στις 8 γυναίκες θα αναπτύξει καρκίνο του μαστού κατά τη διάρκεια της ζωής της. Ο καρκίνος του μαστού είναι 100 φορές πιο διαδεδομένος στις γυναίκες παρά στους άντρες παρά το γεγονός ότι στους άντρες αντιμετωπίζεται σε μικρότερο βαθμό λόγω καθυστερημένης διάγνωσης (Αρχείο καρκίνου, Υπουργείο Υγείας, Κυπριακή Δημοκρατία).

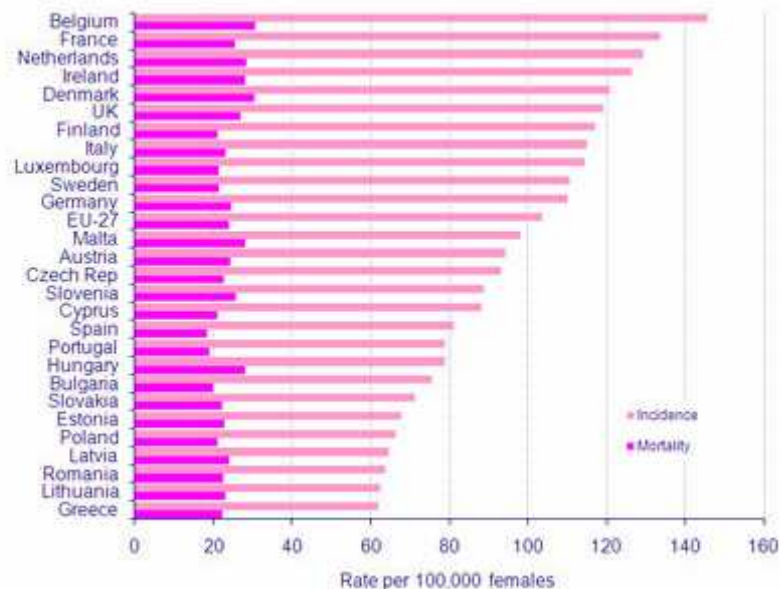
Στην Ευρώπη διαγνώζονται γύρω στα 361,000 νέα περιστατικά καρκίνου του μαστού ενώ στις Ηνωμένες Πολιτείες ο ετήσιος αριθμός περιστατικών καρκίνου του μαστού ανέρχεται στις 230,000 (Parkin et al, 2005). Υπολογίζεται ότι γύρω στις 129,000 γυναίκες με καρκίνο του μαστού πεθαίνουν ετησίως στην Ευρώπη (Εικόνα 4) (Ferlay et al, 2010). Συνολικά περισσότερες από 400,000 γυναίκες πεθαίνουν από καρκίνο του μαστού ετησίως ανά το παγκόσμιο (Parkin et al, 2005).

Τα νέα περιστατικά καρκίνου του μαστού καταλαμβάνουν το 27,3% του συνολικού αριθμού των καρκίνων στις γυναίκες στην Ευρώπη ετησίως ενώ αντίστοιχα στη Βόρεια Αμερική το 31.3% (Parkin et al, 2005).

Περισσότερα από τα μισά περιστατικά καρκίνου του μαστού εμφανίζονται σε βιομηχανικά αναπτυγμένες χώρες. Αντίθετα τα ποσοστά εμφάνισης καρκίνου του μαστού είναι χαμηλά στο μεγαλύτερο μέρος της Αφρικής (περίπου 30 ανά 100.000 άτομα), με εξαίρεση τη Νότια Αφρική, και στο μεγαλύτερο μέρος της Ασίας. Το χαμηλότερο ποσοστό περιστατικών καρκίνου του μαστού παρατηρείται στην κεντρική Αφρική (16.5 ανά 100.000 άτομα) (Parkin et al, 2005).

Σημειώνεται ότι παρ' όλο που στις εύπορες και αναβαθμισμένες περιοχές ανά το παγκόσμιο παρατηρούνται περισσότερα περιστατικά καρκίνου, υπάρχει μικρότερη θνησιμότητα λόγω έγκαιρης διάγνωσης και θεραπείας.

Figure 1.3 Age standardised (European) incidence and mortality rates, female breast cancer in EU-27 countries, 2008 estimates



Εικόνα 4: Επίπτωση και θνησιμότητα από καρκίνο του μαστού ανά χώρα της Ευρωπαϊκής Ένωσης ανά 100.000 γυναίκες (Parkin et al, 2005)

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί τον πιο συχνό τύπο καρκίνου στις κύπριες γυναίκες και το 35% των νέων περιστατικών όλων των τύπων καρκίνου στην Κύπρο. Επηρεάζει μία στις εννέα κύπριες γυναίκες με περίπου 400 νέα περιστατικά κάθε χρόνο. Τα 2/3 των νέων περιστατικών εντοπίζονται σε γυναίκες άνω των 50 ετών. Επίσης, σημειώνονται 90 θάνατοι το χρόνο από καρκίνο του μαστού, δηλαδή δύο θάνατοι κάθε εβδομάδα. Το 2006 διαγνώστηκαν περισσότερα από 400 νέα περιστατικά καρκίνου του μαστού, δηλαδή πάνω από ένα την ημέρα. Ο καρκίνος του

μαστού επηρεάζει και τον ανδρικό πληθυσμό σε πολύ χαμηλότερα ποσοστά. Το έτος 2006 καταγράφηκαν οκτώ περιστατικά καρκίνου του μαστού σε άνδρες στην Κύπρο (Αρχείο Καρκίνου, Υπουργείο Υγείας, Κυπριακή Δημοκρατία).

1.2.2 Μορφολογία μαστού και καρκίνου του μαστού

Εσωτερικά ο μαστός αποτελείται από το μαστικό ή μαζικό αδένα και το περιμαστικό λίπος. Το περιμαστικό λίπος είναι συνέχεια του υποδόριου λίπους το οποίο όμως είναι αφθονότερο στην πρόσθια περιοχή του μαστού, ανάμεσα στο δέρμα και το μαστικό αδένα. Ο μαστικός αδένας σε γυναίκα μη κυοφορούσα βρίσκεται πίσω από την θηλαία άλω και μόλις που υπερβαίνει τα όριά της. Ο μαστικός αδένας αποτελείται από λοβούς όπου παράγεται το γάλα και τους γαλακτοφόρους πόρους που μεταφέρουν το γάλα στους γαλακτοφόρους κόλπους. Οι γαλακτοφόροι κόλποι είναι ανευρύσματα των πόρων τα οποία λειτουργούν ως αποθήκη του γάλακτος, το οποίο και απελευθερώνουν μετά από πίεση της θηλής από το βρέφος (Εικόνα 4) (Boron and Boulpaep, 2003)

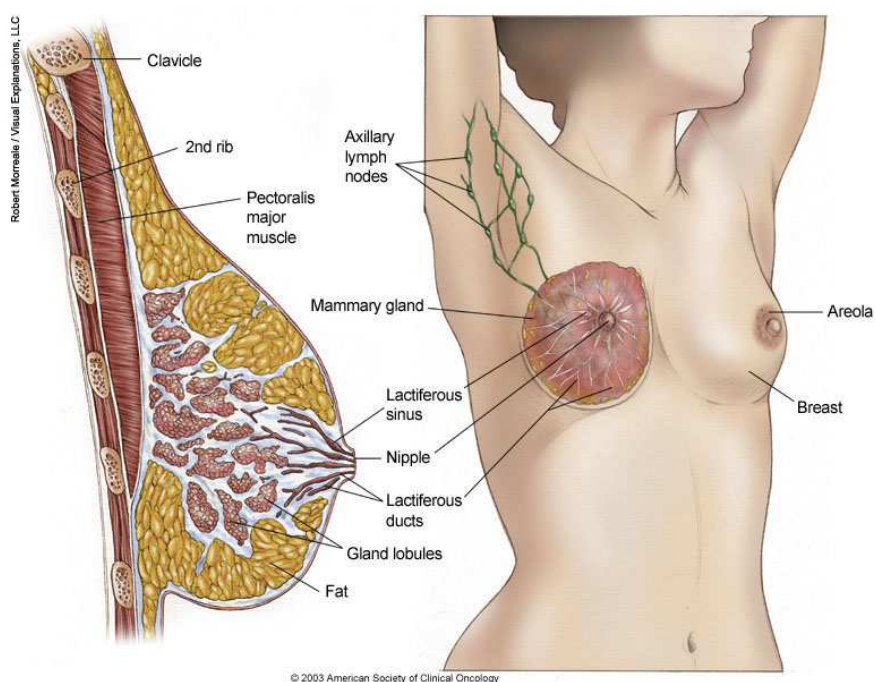
Δύο είναι οι ιστολογικοί τύποι του καρκίνου του μαστού που προεξάρχουν και αποτελούν το 90% των κακοήθων όγκων. Είναι το πορογενές και το λοβιακό καρκίνωμα του μαστού.

A) Το πορογενές καρκίνωμα προέρχεται από τα κύτταρα των τελικών πόρων του μαζικού αδένα και μπορεί να είναι διηθητικό ή μη διηθητικό (*in situ*). Σημειώνεται ότι το πορογενές διηθητικό καρκίνωμα ανάλογα με το βαθμό διείσδυσης διακρίνεται σε grade I, II και III. Το μη διηθητικό (*in situ*) καρκίνωμα δεν διαπερνά την μεμβράνη έτσι αν αφαιρεθεί σωστά θεωρείται τελείως ιάσιμο. Μεγάλο ποσοστό καρκίνου ξεκινά ως μη διηθητικό (*in situ*) και με την πάροδο του χρόνου εξελίσσεται σε διηθητικό. Το πορογενές διηθητικό καρκίνωμα αποτελεί τον πιο κοινό τύπο καρκίνου του μαστού. Υπάρχουν σπάνιες περιπτώσεις που το *in situ* καρκίνωμα, για άγνωστους λόγους, παραμένει στην μορφή που είναι για πολλά χρόνια χωρίς να εξελιχθεί σε πορογενές διηθητικό (Tavassoli and Devilee, 2003; Kumar et al., 2005).

B) το λοβιακό καρκίνωμα διακρίνεται επίσης σε διηθητικό ή μη διηθητικό. Σημειώνεται ότι το λοβιακό *in situ* (LCIS) είναι μια προκαρκινωματώδης κατάσταση αλλά από μόνο του δεν είναι αληθινό καρκίνωμα. Ο συνδυασμός του LCIS με το διηθητικό καρκίνο, που ανευρίσκεται σε ποσοστό 20-25%, δημιουργεί ένα πρωτοπαθή όγκο του μαστού (Tavassoli and Devilee, 2003; Kumar et al., 2005).

Άλλοι πιο σπάνιοι καρκίνοι του μαστού η νόσος Paget, ο φλεγμονώδης καρκίνος του μαστού, ο καρκίνος κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης ή της γαλακτοφορίας, ο αμφιτερόπλευρος καρκίνος του μαστού, το σάρκωμα και το λέμφωμα κ.α (Lippman et al, 2004).

Ο καρκίνος του μαστού πρώιμου σταδίου αναφέρεται στην περίοδο που ο καρκίνος περιορίζεται μόνο στο μαστό. Στη συνέχεια ενδέχεται να εξαπλωθεί στους γειτονικούς ιστούς του θωρακικού τοιχώματος (στην οποία περίπτωση, χαρακτηρίζεται ως τοπικά προχωρημένος) ή σε άλλα σημεία του σώματος (οπότε και αναφέρεται ως μεταστατικός καρκίνος του μαστού). Ο καρκίνος του μαστού συχνά εξαπλώνεται διαμέσου των λεμφαγγείων στους λεμφαδένες της μασχάλης (Devitt et al, 1967).



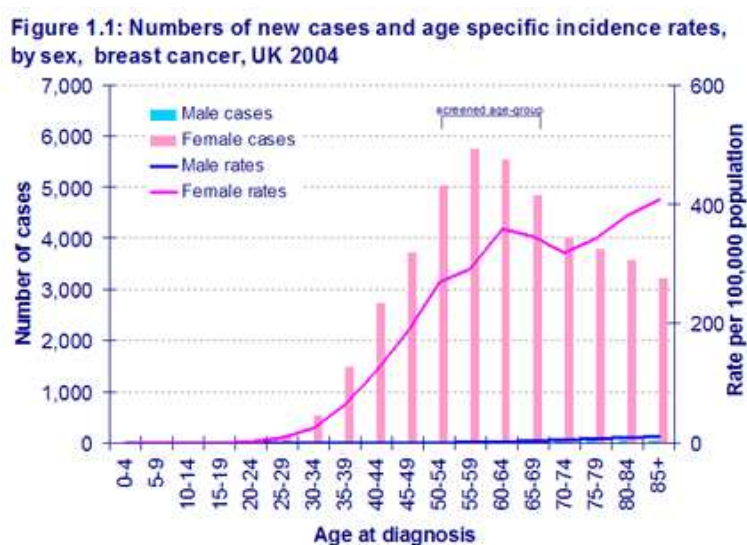
Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση της εσωτερικής και εξωτερικής μορφολογίας του μαστού (American Society of clinical Oncology, 2003)

1.2.3 Επιδημιολογία και παράγοντες κινδύνου

Υπάρχουν πολλοί παράγοντες κινδύνου που προδιαθέτουν στον καρκίνο του μαστού μια και όπως έχει προαναφερθεί είναι μια πολυπαραγοντική ασθένεια. Οι πιο σημαντικοί παράγοντες κινδύνου που συνδέονται με την εμφάνιση της νόσου είναι οι ακόλουθοι:

Φύλο: Το φύλο είναι ο κυριότερος παράγοντας κινδύνου για ανάπτυξη καρκίνου του μαστού. Ο καρκίνος του μαστού εμφανίζεται και στους άνδρες, είναι όμως πολύ συχνότερος στις γυναίκες με αναλογία 100 γυναίκες: 1 άνδρας (Berek and Hacker, 1994).

Ηλικία: Η πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου του μαστού αυξάνεται σταθερά με την ηλικία. Πριν τα 25 χρόνια ζωής ο καρκίνος του μαστού είναι σπάνιος (1% του συνολικού αριθμού περιστατικών καρκίνου) ενώ μετά τα 30 χρόνια ζωής παρουσιάζεται μια ραγδαία αύξηση των περιστατικών (Εικόνα 5)(Stratton and Rahman, 2008). Ενδεικτικά ο ετήσιος κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του μαστού στην ηλικία των 30 ετών είναι 1:6000 ενώ στην ηλικία των 80 ετών είναι μόνο 1:250.



Εικόνα 5: Επίπτωση καρκίνου του μαστού σε σχέση με την ηλικία. Οι ηλικίες μεταξύ 50-70 χρονών θεωρούνται οι πιο κρίσιμες για την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού (Ferlay et al, 2010)

Αναπαραγωγή και ορμόνες: τα περιστατικά καρκίνου του μαστού αυξάνονται με την ηλικία και ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του μαστού διπλασιάζεται κάθε 10 χρόνια περίπου μέχρι η γυναίκα να φθάσει στην εμμηνόπαυση όταν και ο κίνδυνος ανάπτυξης της ασθένειας μειώνεται κατά πολύ. Βάση αυτών των δεδομένων οι επιστήμονες οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα ότι οι αναπαραγωγικές ορμόνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην αιτιολογία του καρκίνου του μαστού (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 1996). Αν και δεν είναι διασαφηνισμένος ο ρόλος όλων των ορμονών του αναπαραγωγικού συστήματος στην καρκινογένεση του μαστού οι ενδείξεις υποδεικνύουν ότι η υπερβολική έκθεση σε οιστρογόνα παίζει ένα σημαντικό ρόλο.

Αριθμός μελετών έδειξε συσχέτιση μεταξύ της πρόωρης εμφάνισης έμμηνου ρήσης, της καθυστερημένης εμμηνόπαυσης και του καρκίνου του μαστού. Συγκεκριμένα, γυναίκες που εμφανίζουν έμμηνη ρήση στην ηλικία των 10 ετών και γυναίκες που αργούν να εμφανίσουν εμμηνόπαυση έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού. (Berkey et al., 1999; Kelsey and Horn-Ross, 1993). Επίσης η φυσική ή τεχνητή πρόωρη εμμηνόπαυση προστατεύει ενάντια στην ανάπτυξη καρκίνου του μαστού. Γυναίκες που υποβάλλονται σε ωοθηκεκτομή μειώνουν σημαντικά τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού (McPherson et al., 2000).

Επίσης μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της χρήσης αντισυλληπτικών χαπιών (οιστρογόνα, προγεστερόνη) με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού (Dumitrescu and Cotarla, 2005). Η γαλακτοφορία δεν έχει δείξει να επηρεάζει σημαντικά την εμφάνιση καρκίνου του μαστού όμως έχει βρεθεί συσχέτιση μεταξύ της πρώτης εγκυμοσύνης και του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του μαστού (McPherson et al., 2000).

Όσο πιο μικρή είναι μια γυναίκα κατά την πρώτη της εγκυμοσύνη, τόσο πιο μειωμένος είναι ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Όταν μια γυναίκα αποκτήσει το πρώτο της παιδί πριν τα 20 της χρόνια, έχει 50% μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού σε σχέση με μια γυναίκα που έχει αποκτήσει το παιδί της μετά τα 30 της χρόνια (Pike et al, 1983).

Πυκνότητα μαστών: Η πυκνότητα των μαστών αποτελεί παράγοντα κινδύνου για τη νόσο. Οι μαστοί που έχουν μεγάλο ποσοστό πόρων και λοβών εμφανίζονται πυκνότεροι στην μαστογραφία. Αυξημένη πυκνότητα των μαστών αποτελεί ένδειξη αυξημένου κινδύνου για καρκίνο του μαστού. Ο καρκίνος του μαστού σχεδόν πάντοτε αναπτύσσεται στους λοβούς ή στους πόρους του μαστού και όχι στο λιπώδη ιστό του αδένα. Για το λόγο αυτό οι μαστοί που είναι πλούσιοι σε λοβούς, έχουν περισσότερη πιθανότητα να παρουσιάσουν καρκίνο (Byrne et al, 1995; Boyd et al, 1995).

Δίαιτα και παχυσαρκία: Η παχυσαρκία είναι ένας άλλος γνωστός παράγοντας κινδύνου για καρκίνο του μαστού. Οι παχύσαρκες γυναίκες έχουν αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο του μαστού τόσο κατά την περίοδο πριν όσο και μετά την εμμηνόπαυση. Η παχυσαρκία αυξάνει τα επίπεδα των οιστρογόνων και της ινσουλίνης στον οργανισμό. Η ενεργοποίηση των οιστρογόνων πριν καθώς και μετά την εμμηνόπαυση γίνεται στον λιπώδη ιστό. Το φυσιολογικό ποσοστό λιπώδους ιστού βοηθάει στην ορμονική ισορροπία του οργανισμού. Αντίθετα το επιπλέον λίπος προκαλεί μεγαλύτερη ενεργοποίηση των οιστρογόνων με αποτέλεσμα ο μαστός, που είναι οιστρογόνο-ευαίσθητος ιστός να εκτίθενται σε περισσότερη υποκίνηση οιστρογόνου στις παχύσαρκες γυναίκες και να αυξάνεται ο κίνδυνος για καρκίνο του μαστού (Berek and Hacker, 1994).

Έκθεση σε ακτινοβολία: Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας αύξησης του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου του μαστού είναι η έκθεση σε ακτινοβολία. Τα καλύτερα στοιχεία που συνδέουν την ακτινοβολία με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού προέρχονται από τις γυναίκες οι οποίες επέζησαν από τις εκρήξεις ατομικών βομβών. Ανάμεσα στις γυναίκες αυτές, παρατηρήθηκαν αυξημένα περιστατικά καρκίνου του μαστού (Berek and Hacker, 1994).

Οικογενειακό ιστορικό: Το οικογενειακό ιστορικό αποτελεί ένα βασικό παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση καρκίνου του μαστού. Επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν ότι γυναίκες συγγένειας πρώτου βαθμού με γυναίκες που ανέπτυξαν καρκίνο του μαστού, έχουν διπλάσια πιθανότητα εμφάνισης της νόσου σε σχέση με γυναίκες του γενικού πληθυσμού. Όσο περισσότεροι στενοί συγγενείς μια γυναίκας έχουν αναπτύξει καρκίνο του μαστού, και όσο πιο νωρίς έχουν αναπτύξει την ασθένεια αυτή στη ζωή τους, τόσο περισσότερο αυξάνονται οι πιθανότητες να αναπτύξει η ίδια

καρκίνο του μαστού. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι άνθρωποι κληρονομούν την προδιάθεση η οποία αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου, και όχι την ίδια την ασθένεια (Foulkes, 2008).

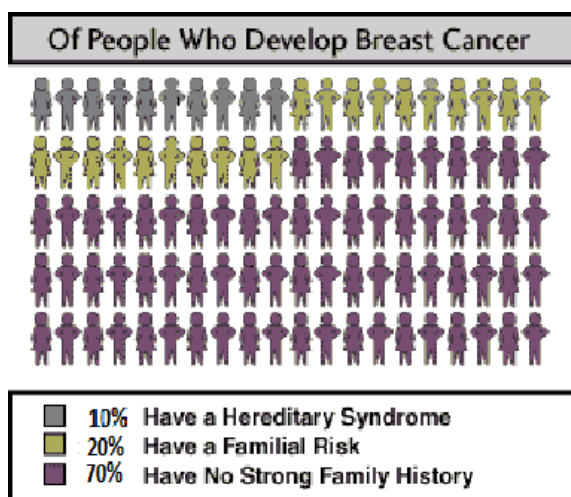
1.2.4 Σποραδικός και κληρονομικός καρκίνος του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού διακρίνεται σε οικογενή και σποραδικό. Ο οικογενής καρκίνος του μαστού αντιπροσωπεύει περίπου το 30% του συνόλου των περιστατικών. Ο κληρονομικός καρκίνος αποτελεί περίπου το 30% του οικογενούς καρκίνου, δηλαδή το 10% του συνόλου των περιστατικών. Το υπόλοιπο 70%, των περιστατικών είναι σποραδικά (και δεν κληρονομούνται) (Εικόνα 6).

Οικογενής καρκίνος του μαστού ορίζεται εκείνος όπου υπάρχει εμφάνιση δύο περιστατικών καρκίνου του μαστού σε τρεις γενεές, χωρίς όμως καθαρό τρόπο μεταβίβασης, ενώ ως κληρονομικός ορίζεται εκείνος ο τύπος που χαρακτηρίζεται από έναν κλασικό τύπο κληρονομικότητας σε τρεις γενεές (κόρη, μητέρα, γιαγιά). Ο κληρονομικός καρκίνος του μαστού οφείλεται σε μια συγκεκριμένη μετάλλαξη σε κάποιο γονίδιο, η οποία κληρονομείται κατά τον αυτοσωμικό επικρατή τρόπο, δηλ. η μετάλλαξη κληρονομείται από την μητέρα ή τον πατέρα και είναι το κύριο αίτιο πρόκλησης του καρκίνου. Το άτομο είναι ετεροζυγώτης ως προς το συγκεκριμένο γονίδιο. Όταν σε ένα συγκεκριμένο σωματικό κύτταρο το φυσιολογικό αλληλόμορφο αδρανοποιηθεί μετά από τυχαία διαδικασία (διαγραφή, αντικατάσταση) τότε η απώλεια ετεροζυγωτίας οδηγεί σε βιαλληλική αδρανοποίηση του γονιδίου. (Lynch, 1994).

Ο κληρονομικός καρκίνος του μαστού σχετίζεται με αριθμό γενετικών συνδρόμων. Το πιο γνωστό από αυτά είναι το σύνδρομο του κληρονομικού καρκίνου μαστού/ωοθηκών που συνδέεται με μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2*. Φορείς μεταλλάξεων στα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2* έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού ο οποίος κυμαίνεται από ~50% μέχρι την ηλικία των 50 ετών και φτάνει στο ~80% στην ηλικία των 70 ετών. Με άλλα λόγια 5 στις 10 γυναίκες που φέρουν μετάλλαξη σε ένα από τα γονίδια υψηλής διεισδυτικότητας, θα αναπτύξουν καρκίνο του μαστού μέχρι την ηλικία των 50 ετών και 8 στις 10 μέχρι την ηλικία των 70 ετών (Stratton and Rahman, 2008).

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι άνθρωποι, κληρονομούν την προδιάθεση η οποία αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου, και όχι την ίδια την ασθένεια. Συνεπώς δεν αναπτύσσουν καρκίνο όλοι οι άνθρωποι που κληρονομούν μεταλλάξεις στα γονίδια προδιάθεσης (Foulkes, 2008).



Εικόνα 6: Ποσοστά σποραδικού, κληρονομικού και οικογενούς καρκίνου του μαστού (διασκευή από Kari Danziger, 2000)

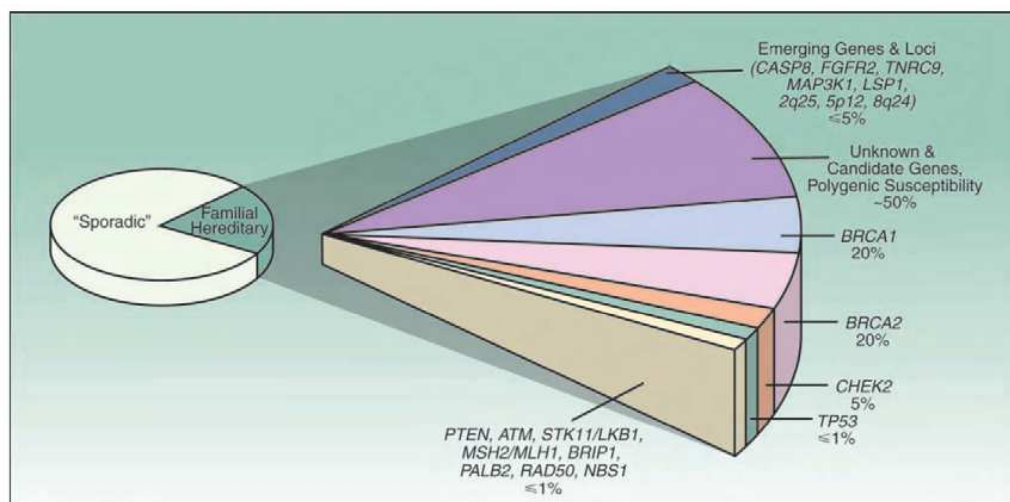
1.2.5 Γενετική βάση κληρονομικού καρκίνου του μαστού

Τα τελευταία 20 χρόνια έχουν διεξαχθεί εκτεταμένες μελέτες με στόχο την ανεύρεση γονιδίων που προδιαθέτουν στον καρκίνο του μαστού. Οι έρευνες αυτές οδήγησαν στην ανεύρεση γονιδίων υψηλής, ενδιάμεσης και χαμηλής διεισδυτικότητας, οι φορείς των οποίων έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου (Stratton and Rahman, 2008).

Πιο συγκεκριμένα, τα γονίδια προδιάθεσης στον καρκίνο του μαστού διαχωρίστηκαν σε 3 κατηγορίες ανάλογα με τη διεισδυτικότητά και τη δια βίου επικινδυνότητα για καρκίνο του μαστού ανάμεσα στους φορείς μεταλλάξεων τους (Turnbull and Rahman, 2008). Αναλυτικά έχουν αναγνωριστεί και κατηγοριοποιηθεί 3 τάξεις ευπαθών αλληλίων-γονιδίων (Εικόνα 7) που προδιαθέτουν στο καρκίνου του μαστού με διαφορετικά επίπεδα κινδύνου και διάδοσης στον πληθυσμό:

- 1) τα γονίδια υψηλής-διεισδυτικότητας
- 2) τα γονίδια ενδιάμεσης διεισδυτικότητας

3) κοινά αλληλόμορφα χαμηλής-διδυστικότητα



Εικόνα 7: Γονίδια που προδιαθέτουν στον καρκίνο του μαστού (Olorade et al., 2008)

1.2.5.1 Γονίδια υψηλής διεισδυτικότητας

Τα κυριότερα γονίδια υψηλής διεισδυτικότητας για τον καρκίνο του μαστού είναι το *BRCA1* και το *BRCA2*. Τα γονίδια αυτά ανακαλύφθηκαν μέσα από μελέτες γενετικής χαρτογράφησης σύνδεσης και κλωνοποιήθηκαν την τελευταία δεκαετία του 20^{ου} αιώνα (Miki et al 1994; Wooster et al 1994, Wooster et al, 1995). Μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια είναι υπεύθυνες για το μεγαλύτερο ποσοστό περιστατικών κληρονομούμενου καρκίνου του μαστού ή/και ωοθηκών.

Άλλα γονίδια υψηλής διεισδυτικότητας για τον καρκίνο του μαστού όπως το *TP53* (σύνδρομο Li-Fraumeni), το γονίδιο *PTEN* (σύνδρομο Cowden), το γονίδιο *STK11* (σύνδρομο Peutz-Jeghers), το γονίδιο *CDH1* (σύνδρομο hereditary diffuse gastric cancer) εξηγούν ένα μικρό πολύ μικρό ποσοστό του κληρονομικού καρκίνου του μαστού.

Συνολικά τα γονίδια υψηλής διεισδυτικότητας εξηγούν γύρω στο 16-25% του οικογενειακού καρκίνου του μαστού (Oldenburg and Meijers-Heijboer, 2007).

1.2.5.2 Γονίδια ενδιάμεσης διεισδυτικότητας

Τα τελευταία πέντε χρόνια ανακαλύφθηκαν γονίδια ενδιάμεσης διεισδυτικότητας για τον καρκίνο του μαστού. Αναλυτικά τα γονίδια *CHEK2*, *ATM*, *BRIP1* και *PALB2* αποτελούν την ομάδα των γονιδίων ενδιάμεσης διεισδυτικότητας. Οι φορείς μεταλλάξεων στα γονίδια ενδιάμεσης διεισδυτικότητας έχουν διπλάσιο-τετραπλάσιο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού σε σχέση με το γενικό πληθυσμό (Stratton and Rahman, 2008).

Τα γονίδια *CHEK2*, *ATM*, *BRIP1* και *PALB2* εμπλέκονται στο μονοπάτι επιδιόρθωσης του DNA σχηματίζοντας σύμπλοκα με τα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2*. Πρόσφατα, αποδείχθηκε ότι οι βιαλληλικές μεταλλάξεις στα γονίδια *BRIP1* και *PALB2* (FA-J και FA-N αντίστοιχα) προκαλούν αναιμία τύπου Fanconi (Campeau, et al, 2008).

1.2.5.3 Κοινά αλληλόμορφα χαμηλής-διεισδυτικότητας

Μέχρι σήμερα έχει βρεθεί ένας μικρός αριθμός γονιδίων χαμηλής διεισδυτικότητας. Παραδείγματα αυτής της κατηγορίας γονιδίων αποτελούν τα *CASP8*, *FGFR2*, *TNRC9*, *MAP3K1* και το *LSPI*. Υπολογίζεται ότι οι ετεροζυγώτες φορείς συγκεκριμένων αλλαγών στα γονίδια αυτά έχουν 1.25-πλάσιο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού σε σχέση με το γενικό πληθυσμό (Stratton and Rahman, 2008).

1.2.6 Αναιμία Fanconi

Η Fanconi αναιμία είναι ένα σπάνιο γενετικό σύνδρομο το οποίο χαρακτηρίζεται από χρωμοσωμική αστάθεια, προοδευτική απόρριψη μυελού των οστών (μη φυσιολογική μείωση ερυθροκυττάρων και λευκοκυττάρων), υπερευαισθησία σε παράγοντες που προκαλούν crosslinking και συνεπώς σπάσιμο της διπλής έλικας του DNA, υψηλή συχνότητα κακοηθειών (Taniguchi and D'Andreas, 2006).

Τα γονίδια *PALB2*, *BRIP1* και *BRCA2* που προδιαθέτουν στον καρκίνο του μαστού ευθύνονται και για την ανάπτυξη αναιμίας Fanconi . Συγκεκριμένα, μεταλλάξεις στο ένα αλληλόμορφο των γονιδίων αυτών οδηγούν σε αυξημένες πιθανότητες εμφάνισης καρκίνου του μαστού, ενώ μεταλλάξεις και στα 2 αλληλόμορφα των γονιδίων αποτελούν την αιτία ανάπτυξης της αναιμίας Fanconi (Reid et al, 2007; Levran et al, 2005; Levitus et al, 2005).

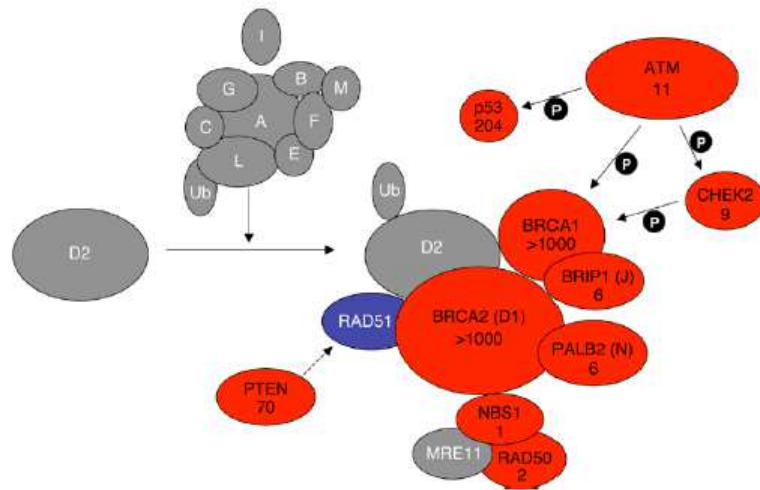
Τα γονίδια που προκαλούν Fanconi αναιμία χωρίζονται σε τρεις ομάδες (Εικόνα 8):

Η ομάδα I περιλαμβάνει 8 γονίδια (*FANCA*, *-B*, *-C*, *-E*, *-F*, *-G*, *-L*, *-M*), τα οποία δημιουργούν ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο γνωστό ως core complex, το οποίο προσδένεται στη περιοχή του DNA όπου υπάρχει βλάβη και αναγκάζει την ουβικουτινίωση των πρωτεϊνών της ομάδας II.

Η ομάδα II περιλαμβάνει τα γονίδια *FANCD2* και *FANCI*. Όταν απουσιάζει έστω και μια από τις πρωτεΐνες του πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου I οι πρωτεΐνες της ομάδας II δεν μπορούν να ουβικουτινυλωθούν. Η ουβικουτινυλίωση του *FANCD2* εξαρτάται από την ουβικουτινίωση του *FANCI* και αντίστροφα. Οι πρωτεΐνες της ομάδας II δημιουργούν το ID complex το οποίο μετατοπίζεται στην περιοχή της χρωματίνης όπου υπάρχει σπάσιμο της διπλής έλικας του DNA.

Η ομάδα III περιλαμβάνει τα γονίδια *FANCD1/BRCA2*, *RAD51*, *FANCI/BRIP1* και *FANCN/PALB2*. Οι πρωτεΐνες αυτές ενεργοποιούνται από το ID complex. Ενεργοποίηση του συμπλόκου της ομάδας III γίνεται και μέσω άλλων μονοπατιών. Οι παράγοντες *ATM* και *CHEK2* ενεργοποιούνται μετά από βλάβη στο DNA έτσι με τη σειρά τους ενεργοποιούν τον παράγοντα *BRCA1* φωσφορυλιώνοντας τον (Shen et al, 2007).

Κατά την ενεργοποίηση του συμπλόκου, το *PALB2* δημιουργεί σύμπλοκο με το *BRCA2* και το *BRCA1* και προκαλεί τη συσσώρευση του *BRCA2* στη χρωματίνη ενώ το *BRIP1* (δράση ελικάσης) δημιουργεί σύμπλοκο με το *BRCA1*, την *TOPBP1* (τοποισομεράση), το *MLH1* και το *PMS2*. Και τα 2 αυτά σύμπλοκα εμπλέκονται στον ομόλογο ανασυνδιασμό κατά την επιδιόρθωση του DNA.

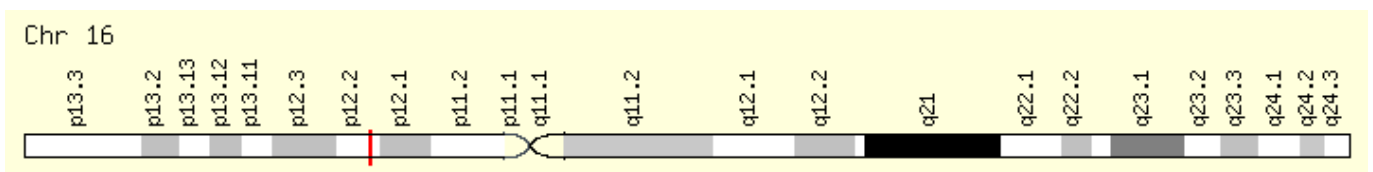


Εικόνα 8: Πρωτεΐνες που εμπλέκονται στον κληρονομικό καρκίνο και στην Αναιμία Fanconi (Walsh and King, 2007)

1.3 PALB2

Το γονίδιο *PALB2* (Xia et al, 2006) ή αλλιώς *FANCN* καθώς αναφέρεται και από τα αρχικά του (Partner and localizer of *BRCA2*) αλληλεπιδρά απευθείας στο *BRCA2* και παίζει σημαντικό ρόλο στην επιδιόρθωση του σπασίματος της διπλής έλικας του DNA με ομόλογο ανασυνδιασμό.

Το *PALB2* εντοπίζεται στο γενετικό τόπο 16p12 (εικόνα 9) και αποτελείται από 13 εξόνια (Xia et al, 2007; Reid et al, 2007). Η πρωτεΐνη του *PALB2* αποτελείται από 1,186 αμινοξέα και η μοριακή της μάζα κυμαίνεται περίπου στα 130kD (Xia et al, 2007). Στο αμινοτελικό άκρο περιέχει μια δομή coiled coil ενώ στο καρβοξυτελικό άκρο τέσσερις επαναλήψεις της WD40 δομής.



Εικόνα 9: Το χρωμόσωμα 16 και η θέση του γονιδίου *PALB2* (Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology)

Η πρωτεΐνη *PALB2* λειτουργεί ως πρωτεΐνη κριώματος για τη μορφοποίηση του συμπλόκου *BRCA1-PALB2-BRCA2* (Shirley et al, 2009). Οι πρωτεΐνες κριώματος είναι κρίσιμοι ρυθμιστές πολλών βασικών σηματοδοτικών μονοπατιών. Αλληλεπιδρούν με πολλά μέλη σηματοδοτικών μονοπατιών ρυθμίζοντας τη μεταβίβαση του σήματος και βοηθώντας στον εντοπισμό μορίων-πρωτεϊνών σε συγκεκριμένες περιοχές του κυττάρου. Συγκεκριμένα η πρωτεΐνη *PALB2* βοηθά στον εντοπισμό της *BRCA2* στη χρωματίνη.

Η *PALB2* αποτελεί γέφυρα σύνδεσης των πρωτεϊνών *BRCA*, καθώς οι επαναλήψεις WD-40 στο καρβοξυτελικό άκρο αλληλεπιδρούν με το αμινοτελικό άκρο του *BRCA2* ενώ το αμινοτελικό coiled coil μοτίβο αλληλεπιδρά με το coiled coil μοτίβο του *BRCA1* (Zhang et al, 2009).

Μετά από βλάβη στο DNA η πρωτεΐνη *BRCA1* φωσφορυλιώνεται στον πυρήνα από τις *ATM* και *CHEK2* καθώς επίσης και από άλλα μόρια. Αξίζει να επισημάνουμε ότι με αυτόν τον τρόπο το *BRCA1* λειτουργεί ως σημείο ελέγχου κατά την βλάβη του DNA και προαγωγέας της κυτταρικής επιβίωσης με την επιδιόρθωση DNA (Sy et al, 2009).

Η *BRCA1* σταθεροποιεί την *PALB2* στα σημεία που το DNA έχει υποστεί βλάβη προωθώντας έτσι τη συσσώρευση της στα σημεία αυτά (Sy et al, 2009). Δεν χρειάζεται να προηγηθεί συσσώρευση *BRCA1* για να υπάρχει συνεχής εντοπισμός του *PALB2* στα σημεία με βλάβη. Ο ρόλος του *BRCA1* είναι απλά να βοηθά στη σταθεροποίηση του *PALB2* στα συγκεκριμένα σημεία. Η *PALB2* με τη σειρά της εντοπίζει την *BRCA2* στα σημεία βλάβης και έτσι το σύμπλοκο των τριών πρωτεϊνών δεσμεύεται στη χρωματίνη. Η πρωτεΐνη *BRCA2* βοηθά στον πολυμερισμό του παράγοντα *RAD51* στη μονή αλυσίδα του DNA ώστε να πραγματοποιήσει ομόλογο ανασυνδιασμό. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των τριών πρωτεϊνών συμβαίνει και υπάρχει συνεχώς μέσα στο πυρήνα και είναι ανεξάρτητη από τις σηματοδοτήσεις βλαβών στο DNA παρ'όλα αυτά η σηματοδότηση λόγω βλαβών στο DNA προκαλεί τον εντοπισμό του συμπλόκου στα σημεία βλάβης.

Οποιαδήποτε μετάλλαξη στα σημεία επαφής των τριών πρωτεϊνών ή ακόμα σε άλλες θέσεις έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της ικανότητας μορφοποίησης του

συμπλόκου και άρα την ελαττωματική επιδιόρθωση με ομόλογο ανασυνδιασμό. Έτσι αυτοί οι τρεις παράγοντες χαρακτηρίζονται μέσα από αυτή τη δράση τους ογκοκατασταλτικά και παρουσιάζουν παρόμοιο φαινότυπο σε ασθενείς με μεταλλάξεις στις πρωτεΐνες αυτές.

Το *PALB2* σχετίζεται τόσο με το καρκίνο του μαστού όσο και του παγκρέατος. Αποτελεί το δεύτερο πιο κοινό μεταλλαγμένο γονίδιο στον κληρονομικό καρκίνο του παγκρέατος μετά το *BRCA2* (Jones et al., 2009). Η εμπλοκή του γονιδίου *PALB2* στον κληρονομικό καρκίνο του μαστού μελετήθηκε εκτεταμένα σε διάφορες χώρες. Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται οι παθογόνες μεταλλάξεις που ανεβρέθησαν ανά το παγκόσμιο στο γονίδιο *PALB2*.

Πίνακας 1: Κατάλογος παθογόνων μεταλλάξεων στο γονίδιο *PALB2* (McInerney et al, 2009)

Country	Author	Whole gene screened	Truncating mutations detected	Cases	Controls	
UK	Rahman	Yes	2386G>T 2982insT 3113G>A 3116delA 3549C>G	10/923	0/1084	Familial
China	Cao	Yes	751C>T 1050_1051del AAinsTCT	3/360	0/864	Familial
Canada	Foulkes	Yes	2323 C>T	1/50 2/356	0/6440	Familial Early onset
Spain	Garcia	Yes	1056_1057delGA	1/95		Familial
USA	Tishkowitz	Yes	229delT	1/68		Familial
South Africa	Sluiter	Yes	697delG	1/48		Early onset
Iceland	Gunnarsson	No		0/61 0/638		Familial Unselected
Finland	Erkko	Yes	1592delT	3/113 18/1918	6/2501	Familial Unselected
Finland	Heikkinen	No	1592delT	19/947 8/1274	2/1079	Familial Unselected
Ireland	BIGGS	No	2386G>T 2982insT 3113G>A 3116delA 3549C>G Screened	0/192		Familial/early onset

1.4 ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η γενετική μελέτη του γονιδίου *PALB2* σε οικογένειες με έντονο ιστορικό καρκίνου του μαστού που είναι αρνητικές σε μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1/2*. Η πρωτεΐνη *PALB2* είναι σημαντική για τον εντοπισμό του *BRCA2* στη χρωματίνη και στις νουκλεϊνικές δομές καθώς και για την πραγμάτωση ομόλογου ανασυνδιασμού στο μονοπάτι ανταπόκρισης σε βλάβη DNA. Οι μεταλλάξεις που επηρεάζουν την λειτουργία της πρωτεΐνης *PALB2* μπορεί να εμπλέκονται στον κληρονομικό καρκίνο του μαστού, αυξάνοντας τον κίνδυνο εμφάνισης του.

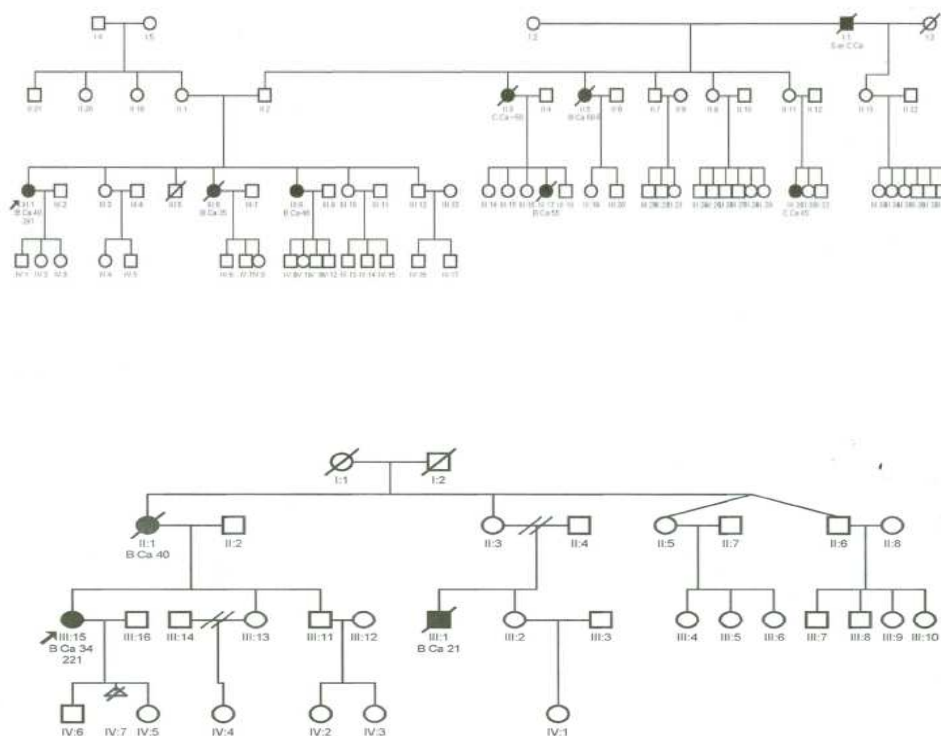
2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Επιλογή ασθενών

Στην παρούσα μελέτη συμμετέχουν 21 γυναίκες με καρκίνο του μαστού ανεξαρτήτου ηλικίας οι οποίες έχουν βεβαρημένο ιστορικό καρκίνου του μαστού ή/ και ωοθηκών στην οικογένειά τους. Οι γυναίκες αυτές προέρχονται από διαφορετικές οικογένειες Ελληνοκυπριακής καταγωγής και είναι αρνητικές για μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2*. Επιπλέον, οι συμμετέχοντες στη μελέτη πληρούν τουλάχιστο 1 από τα ακόλουθα κριτήρια:

- 1) Έχουν τουλάχιστον ένα συγγενή πρώτου βαθμού με καρκίνο του μαστού ή/και ωοθηκών.
- 2) Έχουν διαγνωστεί με καρκίνο του μαστού πριν τα 40 χρόνια ζωής τους

Στην Εικόνα 10 φαίνονται παραδείγματα γενεαλογικών δέντρων δυο ασθενών που έλαβαν μέρος στη μελέτη.



Εικόνα 10: Παραδείγματα γενεαλογικών δέντρων εκ των 2 ασθενών που μελετήθηκαν

2.2 Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του DNA γίνεται από τα λεμφοκύτταρα του περιφερειακού αίματος ασθενών χρησιμοποιώντας τη μέθοδο φαινόλης-χλωροφορμίου, μια μέθοδο εκχύλισης υγρού-υγρού. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην λύση των ερυθρών κυττάρων με την εφαρμογή ρυθμιστικού διαλύματος RBC (Red Blood Cell lysis solution), στην απομόνωση των λευκών από τα ερυθρά αιμοσφαίρια με φυγοκέντρηση και τέλος στη λύση των λεμφοκυττάρων με τη χρήση ρυθμιστικού WBC (White Blood Cell lysis solution) σε συνδυασμό με πρωτεΐνωση K. Από τη λύση των μεμβρανών προκύπτουν κυρίως πρωτεΐνες, οι οποίες διαλύονται σε οργανικούς διαλύτες όπως τη φαινόλη και το χλωροφόρμιο, το DNA παραμένει στην υδατική φάση και έτσι διαχωρίζεται από τις πρωτεΐνες.

Η διαδικασία απομόνωσης πραγματοποιείται σε δύο μέρες. Τη πρώτη μέρα δείγμα αίματος παραλαμβάνεται από τον ασθενή. Ποσότητα αίματος μεταφέρεται σε σωληνάκι τύπου erpendorf των 15ml. Προστίθενται μέχρι τα 15ml ρυθμιστικό διάλυμα RBC και ανακινείται. Ακολουθεί επώαση για τουλάχιστο μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 4500 rpm. Δημιουργείται το ίζημα (pellet) στον πυθμένα του σωλήνα και χύνεται το υπερκείμενο διάλυμα. Προστίθεται ξανά ρυθμιστικό διάλυμα RBC και επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία μέχρι την εμφάνιση ενός καθαρού άσπρου ιζήματος. Αφού χυθεί το τελευταίο υπερκείμενο διάλυμα προστίθενται 4ml ρυθμιστικού διαλύματος WBC με 10ml πρωτεΐνωση K, εφαρμόζεται έντονη ανακίνηση μέχρι τη πλήρη διάλυση του ιζήματος και αφήνεται να επωαστεί όλη τη νύχτα στους 55⁰C. Κατά την δεύτερη μέρα, στο διάλυμα προστίθενται 4ml διαλύματος φαινόλης/ χλωροφορμίου και αφού ανακινηθεί καλά, φυγοκεντρείται για 15 λεπτά στις 4500 rpm. Κατά τη φυγοκέντρηση δημιουργούνται δύο φάσεις. Η πάνω φάση μεταφέρεται σε καινούργιο σωληνάκι τύπου erpendorf όπου και προστίθενται 4ml χλωροφόρμιο. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 4500 rpm. Η πάνω φάση συλλέγεται ξανά σε καινούργιο σωληνάκι τύπου erpendorf όπου και προστίθενται 10ml παγωμένης αιθανόλης. το διάλυμα ανακινείται ελαφρώς ώστε να γίνουν εμφανείς οι άσπρες ίνες του DNA και φυγοκεντρείται για 15 λεπτά στις 4500 rpm. Αφού κατακρημνιστεί το DNA πλένεται, αποξηραίνεται και τελικά επαναδιαλύεται σε υδατικό διάλυμα.

Τα δείγματα DNA που χρησιμοποιούνται στην παρούσα εργασία ήταν ήδη απομονωμένα και φυλαγμένα σε συγκεντρώσεις των 10 ng/μl και σε θερμοκρασία 4⁰ C στο εργαστήριο που πραγματοποιήθηκε η παρούσα εργασία.

2.3 Σχεδιασμός εκκινητών

Οι εκκινητές σχεδιάζονται με σκοπό την υβριδοποίηση τους, εκατέρωθεν των 13 εξονίων του γονιδίου *PALB2* κατά την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης.

Ο σχεδιασμός έγινε με τη βοήθεια των προϊσταμένων του τμήματος Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου/ Μοριακής Παθολογίας χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Primer 3. Χρησιμοποιούνται συνολικά 18 ζεύγη εκκινητών για την ενίσχυση όλων των εξονίων του γονιδίου *PALB2*.

Exon No	Begin	End	Size bp	Primer F	Primer R
1	5201	5248	47	5015	5323
2	8229	8288	59	8179	
3	8406	8508	102		8568
4	10024	11496	1472		
4,1				9883	10335
4,2				10237	10691
4,3				10590	11065
4,4				10955	11409
4,5				11312	11605
5	15889	16718	829		
5,1				15835	16257
5,2				16191	16653
5,3				16473	16818
6	17083	17154	71	17017	17229
7	19961	20122	161	19902	20216
8	22264	22349	85	22215	22417
9	23228	23389	161	23189	23522
10	24880	24996	116	24832	25077
11	32267	32354	87	32218	32450
12	38346	38494	148	38234	38555
13	42689	42899	210	42598	42997

Πίνακας 2: Όρια εξονίων του γονιδίου *PALB2* καθώς και τα όρια των εκκινητών που χρησιμοποιούνται

2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στη χρήση μιας θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης, η οποία χρησιμοποιεί, ως εκμαγείο, μονόκλωνο τμήμα DNA, για τη σύνθεση ενός νέου συμπληρωματικού κλώνου. Προκειμένου να δράσει η πολυμεράση, είναι απαραίτητη η ύπαρξη ενός μικρού τμήματος DNA, του εκκινητή, συμπληρωματικό προς την επιθυμητή ακολουθία (Εικόνα 11). Αφού πραγματοποιηθεί υβριδοποίηση του DNA με τον εκκινητή η DNA πολυμεράση προσθέτει νουκλεοτίδια συμπληρωματικά προς το DNA εκμαγείο επεκτείνοντας την

συμπληρωματική αλυσίδα με κατεύθυνση 5' προς 3'. Συνολικά συντίθεται ένας μεγάλος αριθμός αντιγράφων μιας αλληλουχίας DNA που βρίσκεται ανάμεσα στους εκκινητές.

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης γίνεται με σκοπό την εκλεκτική ενίσχυση των 13 εξονίων του γονιδίου *PALB2*.

Για την πραγμάτωση κάθε αντίδρασης PCR χρησιμοποιούνται τα εξής:

30ng γονιδιωματικού DNA

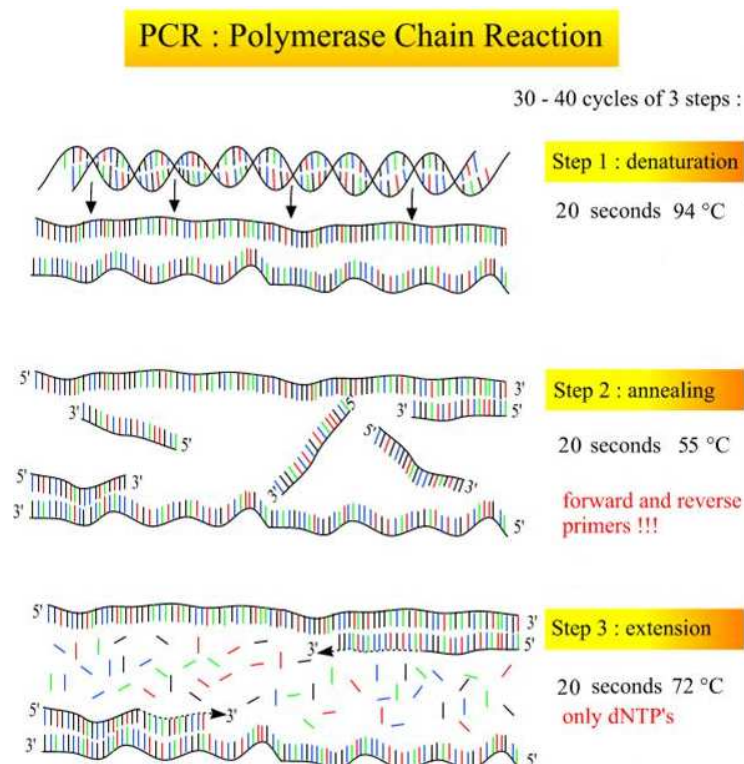
0.25 mM των αντίστοιχων εκκινητών για το εξόνιο (νοσηματικού και αντινοσηματικού)

Κατάλληλο ρυθμιστικό που περιέχει *Tris-Cl*, *KCl*, $(NH_4)_2SO_4$, 15 mM *MgCl_2* σε pH 8.7, σε συγκέντρωση 1X

0,25 mM dNTPs (*dATP*, *dCTP*, *dGTP*, *dTTP*)

1 unit Taq DNA πολυμεράσης (Applied Biosystems)

Και ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 25μl



Εικόνα 11: Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (PCR) (διασκευή από Andy Viestraete, 1999)

Η διαδικασία της ενίσχυσης του DNA στόχου πραγματοποιείται στους θερμοκυκλοποιητές Applied Biosystems Gene Amp PCR System 9700 και PCR System 2700 με το κατάλληλο πρόγραμμα εναλλαγής επιλεγόμενων θερμοκρασιών σε συγκεκριμένους χρόνους. Η ενίσχυση μιας αλυσίδας DNA στόχου περιλαμβάνει τα εξής στάδια (Εικόνα 11):

1) στο πρώτο στάδιο πραγματοποιείται αποδιάταξη της διπλής έλικας του DNA στους 94⁰C για 20sec δηλαδή το δίκλωνο DNA ξετυλίγεται και διαχωρίζεται σε δύο μονόκλωνες αλυσίδες όπου λειτουργούν ως μήτρα για υβριδοποίηση των εκκινητών.

2) στο δεύτερο στάδιο πραγματοποιείται η υβριδοποίηση των εκκινητών στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο 5' άκρο των DNA στόχων (55⁰C για 20sec)

3) στο τρίτο στάδιο η θερμοανθεκτική taq πολυμεράση τοποθετεί συμπληρωματικά dNTPs δίπλα από τους εκκινητές και επεκτείνεται η συμπληρωματική αλυσίδα του DNA στόχου με κατεύθυνση 5' προς 3' άκρο. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται στους 72⁰C (βέλτιστη θερμοκρασία δράσης taq πολυμεράσης) για 20sec.

Τα στάδια αυτά αποτελούν ένα κύκλο και η ίδια διαδικασία πραγματοποιείται για 40 κύκλους μόνο, ώστε να μην υπάρξουν φαινόμενα plateau κατά τα οποία δημιουργούνται παραπροϊόντα λόγω εξάντλησης υλικών και αλλοίωσης της πολυμεράσης.

Σημειώνεται ότι για την ενεργοποίηση της DNA πολυμεράσης, το αντιδρών μίγμα εκτίθεται στους 94 °C για 10 λεπτά, πριν την έναρξη των κύκλων της PCR και για την ολοκλήρωση της αντίδρασης, μετά το τέλος των κύκλων, το μίγμα της αντίδρασης παρέμεινε στους 72 °C για 7 λεπτά.

2.5 Ηλεκτροφόρηση τμημάτων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

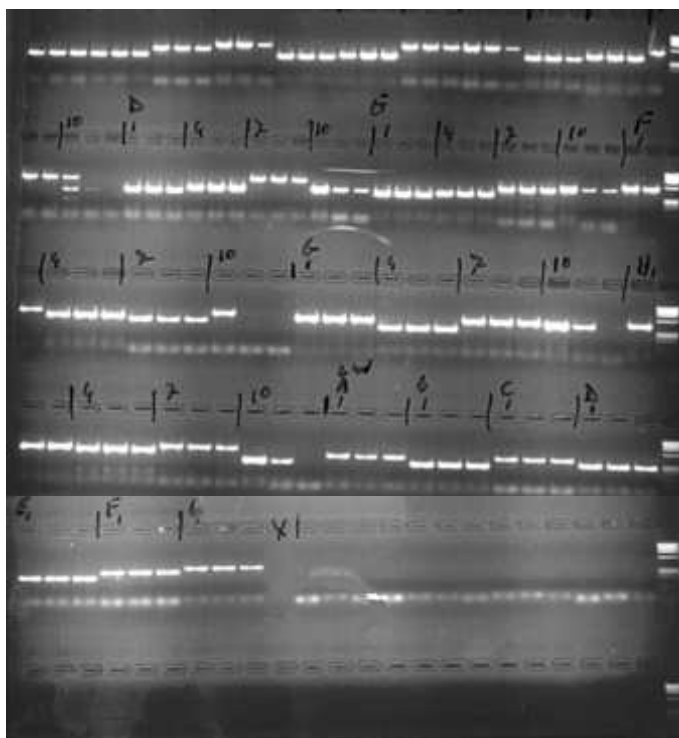
Η ηλεκτροφόρηση είναι μια ηλεκτροχημική μέθοδος διαχωρισμού ηλεκτρικά φορτισμένων σωματιδίων (συνήθως πρωτεϊνικής ή νουκλεϊνικής φύσεως) από ένα μίγμα τους. Η ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης στηρίζεται στον διαχωρισμό των ηλεκτρικά φορτισμένων τμημάτων του DNA με σκοπό το διαχωρισμό τους βάση μεγέθους. Τα αρνητικά φορτισμένα μόρια DNA μετά από εφαρμογή δυναμικού κινούνται προς την κάθοδο, σε συνθήκες ουδέτερου pH. Η ταχύτητα μετακίνησης των τμημάτων DNA εξαρτάται από το μέγεθος τους, τη

διαμόρφωση τους, τη συγκέντρωση της αгарόζης στην πηκτή, το δυναμικό που εφαρμόζεται και τη σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος που χρησιμοποιείται.

Το πήκτωμα αгарόζης που χρησιμοποιείται στην παρούσα μελέτη είναι 2% w/v και παράγεται με διάλυση 2gr αгарόζης (σε σκόνη) σε 100ml ρυθμιστικό διάλυμα TBE (βορικό οξύ, Tris Base, EDTA), θέρμανση και κατά διαστήματα ανάδευση. Αφού η αгарόζη λιώσει και γίνει διαυγής ψύχεται και προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο, μια φθορίζουσα καρκινογόνος χρωστική ουσία η οποία ενσωματώνεται στο δίκλωνο μόριο των προϊόντων της PCR. Η χρωστική αυτή απορροφά την υπεριώδη ακτινοβολία στα 302 και 366 nm και επανεκπέμπει στην περιοχή του κόκκινου ορατού φάσματος, έτσι κάνει εμφανή τη διάκριση των ζωνών κατά την έκθεσή τους σε UV ακτινοβολία. Στη συνέχεια το μίγμα αποχύνεται στο ειδικό πλαίσιο (στο οποίο έχουν ήδη τοποθετηθεί οι ειδικές χτένες για τον σχηματισμό πηγαδιών), και αφήνεται να κρυσώσει και να πήξει. Μετά την πήξη του πηκτώματος αφαιρούνται τα χτενάκια και το πήκτωμα τοποθετείται σε συσκευή που εφαρμόζεται δυναμικό. Το πήκτωμα καλύπτεται με το ρυθμιστικό διάλυμα TBE και φορτώνονται τα δείγματα στα πηγαδάκια που έχουν δημιουργηθεί από την αφαίρεση των χτενών. Στο τελευταίο πηγαδάκι κάθε γραμμής δειγμάτων φορτώνεται ποσότητα γενετικού σημειωτή φX174 DNA HaeIII Digest, ο οποίος αποτελείται από διαφορετικού μεγέθους τμήματα DNA, τα οποία είναι γνωστού μεγέθους. Ο γενετικός σημειωτής χρησιμοποιείται για την εξακρίβωση του μεγέθους των τμημάτων DNA που πολλαπλασιάστηκαν.

Τέλος πραγματοποιείται φωτογράφιση της πηκτής παρουσία UV ακτινοβολίας όπου παρατηρούνται οι ζώνες στο πήκτωμα. Σημειώνεται ότι όσο αυξημένη είναι η ένταση της ακτινοβολίας τόσο μεγαλύτερη ποσότητα DNA υπάρχει άρα τόσο πιο φωτεινή είναι και η ζώνη.

Η ηλεκτροφόρηση γίνεται για να συμπεράνουμε αν η PCR έχει δουλέψει, αν έχει ενισχυθεί το σωστό τμήμα DNA στην αντίδραση και αν έχουν προκληθεί επιμολύνσεις στα δείγματα.



Εικόνα 12: Παράδειγμα πηκτής αγαρόζης όπου παρουσιάζονται τα προϊόντα PCR μαζί με το μάρτυρα στη δεξιά πλευρά της φωτογραφίας

2.6. Καθαρισμός PCR προϊόντων

Τα προϊόντα PCR κάθε αντίδρασης καθαρίζονται με μια ενζυματική μέθοδο, γνωστή ως ExoSap. Αυτή η μέθοδος καθαρισμού βασίζεται στη δράση της εξωνουκλεάσης (ExoI) ως ένζυμο διάσπασης της μονόκλωνης αλυσίδας των εκκινητών που δεν χρησιμοποιούνται κατά την αντίδραση της PCR και του SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) ως ένζυμου αποφωσφορυλίωσης των μη χρησιμοποιημένων dNTPs. Για καθαρισμό 5μl PCR χρησιμοποιούνται συνολικά 1 U SAP και 5 U EXO I σε τελικό όγκο 7μl. Το πρόγραμμα για την ενεργοποίηση των ενζύμων περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

37⁰C για 30min (θερμοκρασία μέγιστης δράσης των ενζύμων)

80⁰C για 15min (αδρανοποίηση ενζύμων).

2.7.Κυκλική αλληλούχιση (cycle sequencing)

Σύμφωνα με την αρχή της μεθόδου, σε μια αναπτυσσόμενη αλυσίδα DNA ενσωματώνονται τυχαία 2',3'-διδεοξυνουκλεοτίδια (ddNTPs) μέσω των 5'-φωσφορικών ομάδων τους (όπως και τα dNTPs) όμως δεν έχουν την 3'OH ομάδα που

είναι απαραίτητη για τη δημιουργία φωσφοδιεστερικού δεσμού με επόμενο νουκλεοτίδιο. Έτσι η ανάπτυξη της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας σταματά τη στιγμή που δεσμεύεται το ddNTP. Παρουσία του κατάλληλου εκκινητή αλλά και της DNA πολυμεράσης, συντίθενται τμήματα DNA όπου ξεκινούν από το ίδιο σημείο, αλλά καταλήγουν σε διαφορετικά σημεία κατά μήκος της αλυσίδας του DNA. Είναι σημαντική η ισορροπημένη αναλογία dNTPs και ddNTPs, ώστε σε κάθε θέση μέσα στην αλληλουχία-στόχο, να υπάρχουν ίσες πιθανότητες ενσωμάτωσης διδεόξυ-νουκλεοτιδίων. Κάθε διαφορετικό ddNTP είναι σημασμένο με διαφορετική φθορίζουσα ουσία.

Στο πείραμα χρησιμοποιούνται καθαρισμένα προϊόντα PCR, εκκινητές F ή R και διάλυμα BigDye Terminator (Applied Biosystems) το οποίο περιέχει ddNTPs, dNTPs και Amplitaq FS. Πρόκειται για 4 ζεύγη φθορίζουσών χρωστικών που επισημαίνουν ανά δύο το κάθε ένα από τα 4 ddNTP's που τερματίζουν της επέκταση της συγκεκριμένης αλυσίδας. Το ένα από τα δύο μέλη του κάθε ζεύγους είναι ίδιο για όλα τα νουκλεοτίδια:

η *6-καρβόξυ-φλουορεσκεΐνη (6-FAM)*

ενώ το δεύτερο στο οποίο και μεταφέρεται η ενέργεια φθορισμού είναι:

η *διχλωρο-[R6G]* για το ddATP,

η *διχλωρο-[ROX]* για το ddCTP,

η *διχλωρο-[R110]* για το ddGTP (ή ddITP) και

η *διχλωρο-[TAMRA]* για το ddTTP (ή ddUTP)

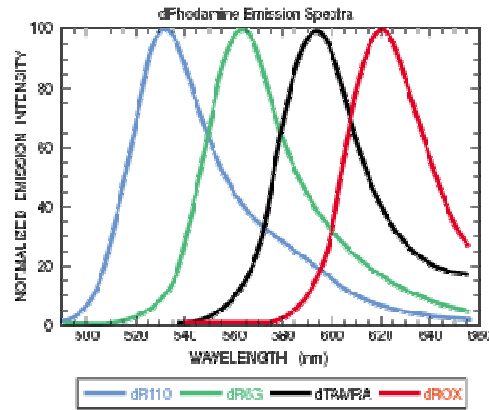
Τα μόρια αυτά εκπέμπουν σε διαφορετικό μήκος κύματος (Εικόνα 13) έτσι οι βάσεις εμφανίζονται με διαφορετικό χρώμα στην εικόνα του χρωματογραφήματος:

A (αδερίνη) = πράσινο

T (θυμίνη) = κόκκινο

C (κυτοσίνη) = μπλε

G (γουανίνη) = μαύρο



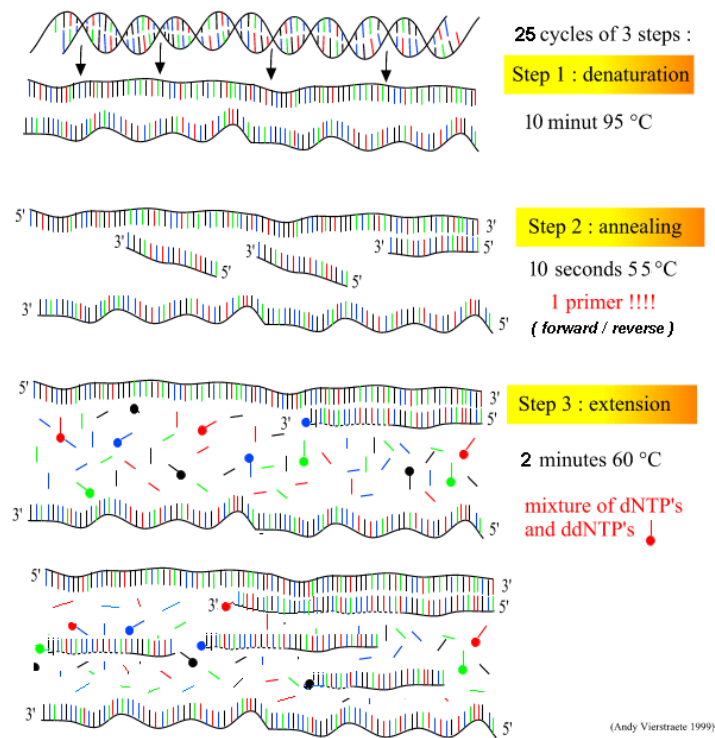
Εικόνα 13: Φάσμα εκπομπής των τεσσάρων ουσιών που χρησιμοποιούνται στην κυκλική αλληλούχιση

Το ένζυμο που χρησιμοποιείται για την επέκταση της αλυσίδας είναι μια γενετικά τροποποιημένη DNA πολυμεράση AmpliTaq FS (Fluorescent sequencing). Η τροποποίηση έχει γίνει σε δύο θέσεις (F667Y και G46D) ώστε το ένζυμο να χρησιμοποιεί ομοιόμορφα τόσο τα dNTP's όσο και τα ddNTP's αλλά και να στερείται ενεργότητας 5'-3' ενδονουκλεάσης για να μην πραγματοποιεί διόρθωση μετά τη σύνθεση. Επίσης στην αντίδραση προστίθεται *rTth* πυροφωσφατάση για να απομακρύνει τα παραπροϊόντα PPI. Στο δείγμα προστίθεται επίσης το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα sequencing 5X και ddH₂O.

Το πρόγραμμα για τη κυκλική αλληλούχιση έχει ως εξής (Εικόνα 14):

- 1) 95⁰C για 10sec (αποδιάταξη της διπλής έλικας)
- 2) 55⁰C για 10sec (ιβρυδοποίηση αλληλουχίας στόχου με εκκινητές)
- 3) 60⁰C για 2min (επέκταση των νεοσυντιθέμενων αλυσίδων)

Για 25 επαναλαμβανόμενους κύκλους



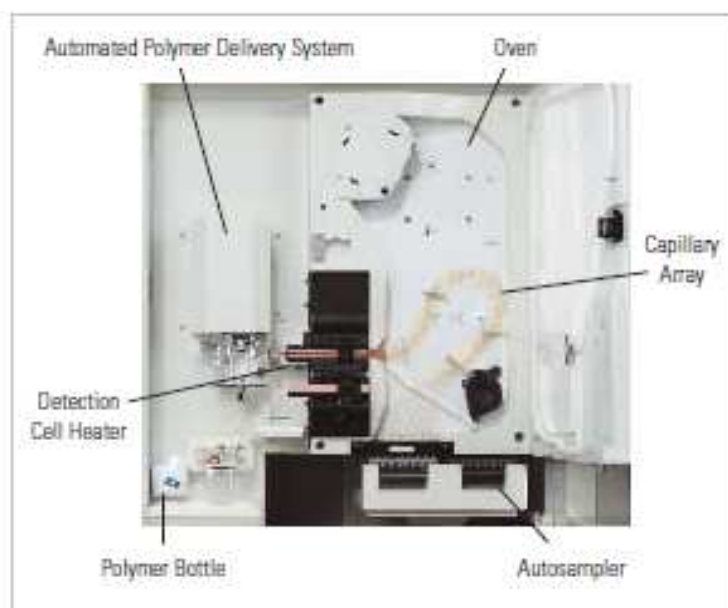
Εικόνα 14: Παρουσίαση διαδικασίας μεθόδου κυκλικής αλληλούχησης (διασκευή από Andy Viestraete, 1999)

2.8. Μέθοδος καθαρισμού των προϊόντων κυκλικής αλληλούχησης από ελεύθερα νουκλεοτίδια

Πραγματοποιείται καθαρισμός των προϊόντων κυκλικής αλληλούχησης με τη χρήση 96-Well Gel Filtration Column Plates με σκοπό την απομάκρυνση των εκκινητών, των ελεύθερων dNTPs και ddNTPs. Η μέθοδος βασίζεται σε διαχωρισμό βάσει μοριακού βάρους των συστατικών στο δείγμα. Το plate διαθέτει gel με μικρούς πόρους όπου δεσμεύει τα μικρού μοριακού βάρους μόρια (dNTPs, ddNTPs, εκκινητές) και αφήνει να περάσουν τα μεγάλου μοριακού βάρους μόρια (DNA). Η διαδικασία περιλαμβάνει δύο στάδια. Αρχικά το ειδικό plate (96-Well Gel Filtration Column Plate) φυγοκεντρείται για 2 λεπτά στις 1500 rpm ώστε να σχηματιστούν 96 κολώνες. Μετά προστίθενται τα προϊόντα της κυκλικής αλληλούχησης στις κολώνες και ακολουθεί φυγοκέντρωση για 2 λεπτά στις 1500 rpm όπου και απομακρύνονται τα μικρού μοριακού βάρους μόρια και τα καθαρισμένα προϊόντα συλλέγονται σε δεύτερο plate.

2.9.Αυτόματος αναλυτής γενετικού υλικού (Genetic Analyzer 3130XL)

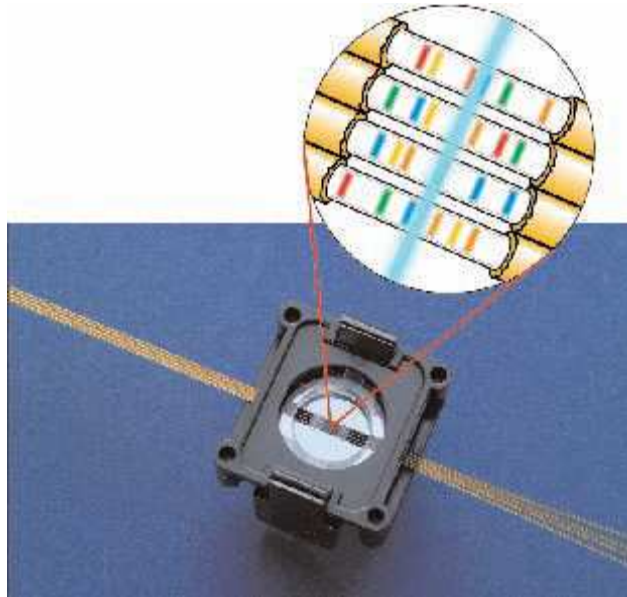
Για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής ακολουθίας με το γενετικό αναλυτή ABI Prism 3130XL (εικόνα 15), τα δείγματα τοποθετούνται στον ειδικό δίσκο αυτόματου δειγματολήπτη του μηχανήματος. Ο αυτόματος δειγματολήπτης φέρει ένα τριχοειδές σύστημα στο οποίο κάθε δείγμα έρχεται σε επαφή με το ηλεκτρόδιο καθόδου που βρίσκεται στο ένα άκρο του τριχοειδούς σωλήνα όπου από εκεί εισάγεται το ειδικό πολυμερές το οποίο χωρίζει τα μόρια με βάση το μοριακό τους βάρος. Κατά την ηλεκτροφόρηση το άκρο του τριχοειδούς στην κάθοδο βυθίζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα. Το ηλεκτρόδιο ανόδου βρίσκεται στο άλλο άκρο του τριχοειδούς σωλήνα, εμβαπτισμένο μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα. Το ρυθμιστικό διάλυμα διατηρεί τις κατάλληλες συνθήκες στο τριχοειδές ώστε να είναι δυνατή η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων μετά από εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται με τάση 15 kV στους 50°C με τη βοήθεια του ρυθμιστικού διαλύματος 1X Genetic Analyzer με EDTA.



Εικόνα 15: Φωτογραφία του αυτόματου αναλυτή γενετικού υλικού (εγχειρίδιο *ABI Genetic Analyzer 3130XL*)

Όταν τα νουκλεοτίδια φτάσουν στο ειδικό σημείο του τριχοειδούς σωλήνα (36 cm) όπου βρίσκεται ο ανιχνευτής («παράθυρο»), τότε μέσω της εκπομπής λέιζερ διεγείρεται ο φθορισμός των επισημασμένων με χρωστική νουκλεοτιδίων (Εικόνα 16). Η διέγερση και εκπομπή του δείγματος που περνάει από το «παράθυρο» παρακολουθείται συνεχώς από κατάλληλο ανιχνευτή (CCD κάμερα) που μεταφέρει

το σήμα σε ειδικό λογισμικό που «διαβάζει» το DNA βάση προς βάση. Συνήθως η ηλεκτροφόρηση του κάθε δείγματος διαρκεί 35 min και διαβάζονται με ευκολία 500 βάσεις.



Εικόνα 16 : Φωτογραφία του ανιχνευτή και σχηματική αναπαράσταση της ανίχνευσης μέσα στους τριχοειδείς σωλήνες (εγχειρίδιο *ABI Genetic Analyzer 3130XL*)

Τα δεδομένα-αλληλουχίες στοιχίζονται χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Sequencer PC Software (GeneCodes Inc, USA) με αλληλουχίες άγριου τύπου από το διαδίκτυο (reference sequences). Οι αλληλουχίες παρουσιάζονται υπό μορφή ηλεκτροφορεγράμματος με έγχρωμες κορυφές και από πάνω το αντίστοιχο γράμμα της βάσης. Οι αλληλουχίες των δειγμάτων συγκρίνονται με τις αλληλουχίες αναφοράς του γονιδίου *PALB2* ώστε να ανιχνευτεί η ύπαρξη ομόζυγης ή ετερόζυγης γενετικής ποικιλομορφίας.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αναλύθηκαν συνολικά 21 δείγματα DNA για την ύπαρξη αλλαγών στο γονίδιο *PALB2*. Τα δείγματα αυτά προέρχονται από γυναίκες που πάσχουν από καρκίνο του μαστού και έχουν βεβαρημένο οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού ή/και ωοθηκών αλλά ήταν αρνητικές για μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2*. Συνολικά, ενισχύθηκαν και αλληλουχήθηκαν τα 13 εξόνια του γονιδίου *PALB2* καθώς επίσης και όλες οι περιοχές ματίσματος.

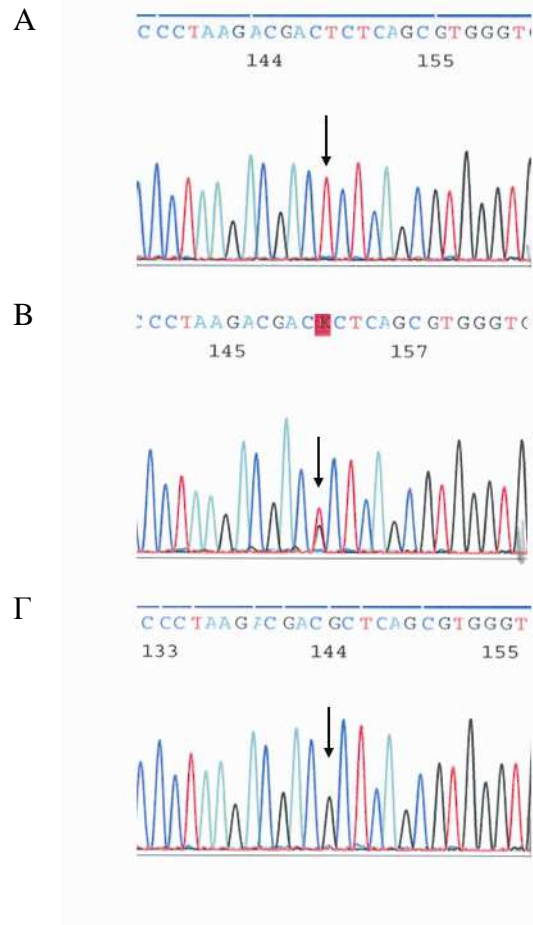
Εντοπίστηκαν συνολικά 8 αλλαγές στο γονίδιο *PALB2* (εικόνες 18,19). Οι δυο από αυτές εντοπίζονται στο εξόνιο 4, μια στο εξόνιο 5, μια στο εξόνιο 7, μια στο εξόνιο 9 και μια στο εξόνιο 12 ενώ μια βρίσκεται σε περιοχή ιντρονίου και μια στη 5'αμετάφραστη περιοχή. Πέντε αλλαγές χαρακτηρίζονται ως παρανοηματικές αφού παρατηρείται αλλαγή του αμινοξέος ενώ μια χαρακτηρίζεται ως σιωπηλή αφού παρατηρείται διατήρηση του ίδιου αμινοξέος παρά την αλλαγή του ενός νουκλεοτιδίου στο τρινουκλεοτίδιο κωδικοποίησης του αμινοξέος (εκφυλισμός γενετικού κώδικα). Οι αλλαγές που ανευρέθηκαν στα δείγματα που μελετήθηκαν παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3: Αλλαγές που βρέθηκαν στο γονίδιο *PALB2* από την ανάλυση των 21 δειγμάτων

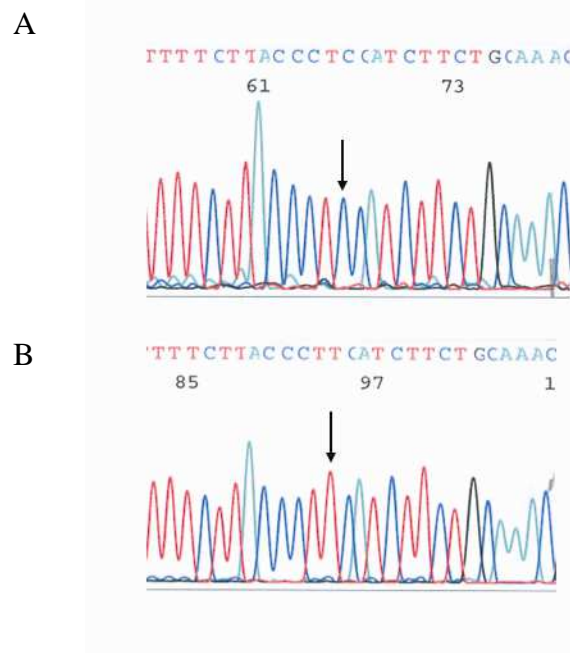
Εξόνιο / ιντρόνιο	Αριθμός νουκλεοτιδίου*	Αριθμός νουκλ. mRNA**	Κωδικόνιο	Νουκλεοτιδική αλλαγή	Αλλαγή αμινοξέος	Χαρακτηρισμός αλλαγής	Τύπος αλλαγής	Συχνότητα
5'UTR	5154	-	-	G → A	-	-47G>A	5' UTR	1/21
Ιντρόνιο 3	9966	-	-	A → C	-	IVS3-58 A>C	Ιντρονίου	3/21
Εξόνιο 4	11220	1408	470	A → G	p.Thr470Ala	c.1408 A>G	Παρανοηματική	1/21
Εξόνιο 4	11488	1676	559	A → G	p.Gln559Arg	c.1676 A>G	Παρανοηματική	4/21
Εξόνιο 5	16218	2014	672	G → C	p.Glu672Gln	c.2014 G>C	Παρανοηματική	3/21
Εξόνιο 7	19964	2590	864	C → T	p.Pro864Ser	c.2590 C>T	Παρανοηματική	1/21
Εξόνιο 9	23386	2993	998	G → A	p.Gly998Glu	c.2993 G>A	Παρανοηματική	2/21
Εξόνιο 12	38444	3300	1100	T → G	p.Thr1100Thr	c.3300 T>G	Σιωπηλή	3/21

* Οι αριθμοί αντιστοιχούν στη αλληλουχία αναφοράς του γονιδίου *PALB2*, NG_007406.1

** Οι αριθμοί αντιστοιχούν στο mRNA του γονιδίου *PALB2*, NM_024675



Εικόνα 18: Παράδειγμα αλληλούχησης της παρανοηματικής αλλαγής p.Thr1100Thr
 Α) άγριος τύπος Β) ετερόζυγος φορέας Γ) ομόζυγος φορέας



Εικόνα 19: Παράδειγμα αλληλούχησης της σιωπηλής αλλαγής p.Gly998Glu Α) άγριος τύπος
 Β) ομόζυγος φορέας

Οι περισσότερες αλλαγές ήταν ετερόζυγες αλλά υπήρχαν και ομόζυγες αλλαγές σε κάποια δείγματα. Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται αναλυτικά οι αλλαγές που βρέθηκαν στο γονίδιο *PALB2* ανά ασθενή καθώς και ο χαρακτηρισμός τους ως ετερόζυγες ή ομόζυγες

Πίνακας 4: Παρουσίαση των αλλαγών στο γονίδιο *PALB2* που βρέθηκαν σε κάθε ασθενή και χαρακτηρισμός τους ως ομόζυγες ή ετερόζυγες

Δείγμα	-47 G>A	IVS3-58 A>C	c.1408 A>G	c.1676A>G	c.2014G>C	c.2590 C>T	c.2993 G>A	c.3300 T>G
204	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN
221	NN	Nm	NN	Nm	Nm	NN	Nm	Nm
291	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN
309	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN
376	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN
381	NN	NN	NN	Nm	NN	Nm	NN	NN
395	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN
398	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN
405	NN	Nm	NN	Nm	Nm	NN	NN	Nm
406	NN	MM	NN	MM	MM	NN	MM	MM
424	NN	NN	Nm	NN	NN	NN	NN	NN
433	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN
443	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN
446	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN
458	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN
483	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN
488	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN
527	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN
540	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN
612	Nm	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN
650	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NN	20	18	20	17	18	20	19	18
Nm	1	2	1	3	2	1	1	2
MM	0	1	0	1	1	0	1	1

Με NN συμβολίζονται οι άγριου τύπου ως προς τη συγκεκριμένη αλλαγή

Με Nm συμβολίζονται οι ετερόζυγοι προς την συγκεκριμένη αλλαγή

Με MM συμβολίζονται οι ομόζυγοι ως προς την συγκεκριμένη αλλαγή

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στον Κυπριακό πληθυσμό, οι μοριακές μελέτες που έχουν δημοσιευτεί μέχρι σήμερα έχουν εστιαστεί στη μελέτη των γονιδίων υψηλής διεισδυτικότητας *BRCA1* και *BRCA2* σε ασθενείς με βεβαρημένο οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού ή/και ωοθηκών (Loizidou et al, 2009). Τα γονίδια αυτά μελετώνται και σε διαγνωστικό επίπεδο έτσι ώστε να ενημερώνεται η οικογένεια του εκάστοτε ασθενούς που πληρεί τα κριτήρια για γενετικό έλεγχο για το βαθμό κινδύνου κληρονομησης της νόσου. Τα γονίδια αυτά όμως εξηγούν μόνο το 16% του κληρονομικού καρκίνου. Επομένως άτομα με κληρονομικό καρκίνο και αρνητικά σε μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2* πιθανόν να έχουν μεταλλάξεις σε γονίδια ενδιάμεσης διεισδυτικότητας (βλ. Εισαγωγή 1.2.5.2). Σε αυτές τις περιπτώσεις η έρευνα για την αιτία του κληρονομικού καρκίνου στους συγκεκριμένους ασθενείς πρέπει να εστιαστεί αλλού.

Σκοπός της μελέτης αυτής ήταν η διερεύνηση της συμβολής του γονιδίου *PALB2* (γονίδιο ενδιάμεσης διεισδυτικότητας) στον κληρονομικό καρκίνο του μαστού στην Κύπρο, μέσω μοριακής γενετικής ανάλυσης. Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης αναλύθηκαν συνολικά 21 δείγματα γυναικών, ελληνοκυπριακής καταγωγής, οι οποίες είχαν βεβαρημένο οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού και ήταν αρνητικές για μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2*. Σημειώνεται ότι η συμβολή του γονιδίου *PALB2* στον κληρονομικό καρκίνο του μαστού στον Κυπριακό πληθυσμό δεν έχει διερευνηθεί μέχρι στιγμής.

Η γενετική ανάλυση οδήγησε στην ανεύρεση συνολικά πέντε παρανοηματικών αλλαγών (c.1408A>G, c.1676A>G, c.2014G>C, c.2590C>T και c.2993G>A) στο γονίδιο *PALB2* εκ των οποίων οι τέσσερις έχουν βρεθεί ξανά και σε ασθενείς από άλλες χώρες. Η βιβλιογραφία αναφέρει ότι οι παρανοηματικές αλλαγές c.1676A>G, c.2014G>C, c.2590C>T και c.2993G>A δεν φαίνεται να συνδέονται με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού (Erkko et al, 2007; Cao et al, 2009; Sluiter et al, 2009; Papi et al, 2010). Σημειώνεται ότι η παρανοηματική αλλαγή c.1408A>G δεν έχει αναφερθεί σε άλλους πληθυσμούς.

Πιο αναλυτικά, η παρανοηματική αλλαγή c.1676A>G (p.Gln559Arg) στο εξόνιο 4 του γονιδίου *PALB2* προκαλεί μετατροπή της γλουταμίνης στη θέση 559 σε αργινίνη. Η αλλαγή αυτή εντοπίστηκε σε 4 ασθενείς. Έχει αποδειχθεί από πολλές ερευνητικές ομάδες ότι η αλλαγή αυτή δεν είναι παθογόνα αφού βρέθηκε σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων υγιών μαρτύρων (Erkko et al, 2007; Cao et al, 2009; Sluiter et al, 2009; Papi et al, 2010).

Η παρανοηματική αλλαγή c.2014G>C (p.Glu672Gln) στο εξόνιο 5 του γονιδίου *PALB2* προκαλεί μετατροπή του γλουταμινικού οξέος στη θέση 672 σε γλουταμίνη. Η αλλαγή αυτή εντοπίστηκε σε 3 ασθενείς. Σύμφωνα με τον Sluiter και τους συνεργάτες του καθώς επίσης την Papi και τους συνεργάτες της, η αλλαγή αυτή δεν είναι παθογόνα μια και βρέθηκε και σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων υγιών μαρτύρων (Sluiter et al, 2009; Papi et al, 2010).

Η παρανοηματική αλλαγή c.2590C>T (p.Pro864Ser) στο εξόνιο 7 του γονιδίου *PALB2* προκαλεί την μετατροπή της προλίνης στη θέση 864 σε σερίνη. Η αλλαγή αυτή εντοπίστηκε σε μια ασθενή. Σύμφωνα με την Papi και τους συνεργάτες της η αλλαγή αυτή δεν είναι παθογόνα μια και βρέθηκε και σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων υγιών μαρτύρων (Papi et al, 2010).

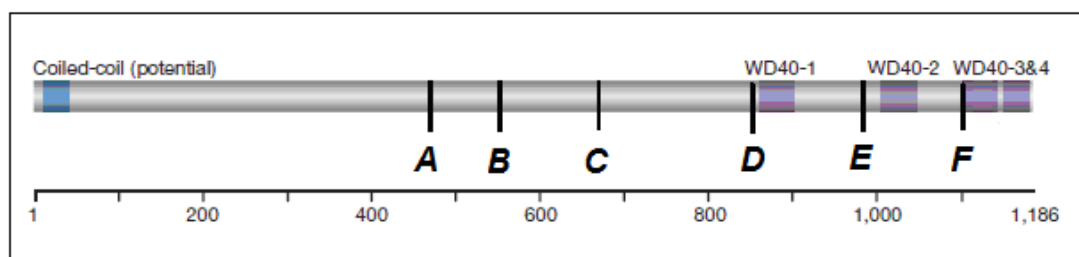
Η παρανοηματική αλλαγή c.2993G>A (p.Gly998Glu) στο εξόνιο 9 του γονιδίου *PALB2* προκαλεί την μετατροπή της γλυκίνης στη θέση 998 σε γλουταμινικό οξύ. Η αλλαγή αυτή εντοπίστηκε σε 2 ασθενείς. Έχει αποδειχθεί από πολλές ερευνητικές ομάδες ότι η αλλαγή αυτή δεν είναι παθογόνα μια και βρέθηκε και σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων υγιών μαρτύρων (Erkko et al, 2007; Cao et al, 2009; Sluiter et al, 2009; Papi et al, 2010).

Η γενετική ανάλυση έδειξε την ύπαρξη της παρανοηματικής αλλαγής c.1408A>G (p.Thr470Ala) σε ετεροζυγωτία. Η αλλαγή αυτή βρίσκεται στο εξόνιο 4 του γονιδίου *PALB2* και προκαλεί μετατροπή της θρεονίνης στη θέση 470 σε αλανίνη. Η αμινοξική αλλαγή που προκαλείται είναι δραστική [αλλαγή του αμινοξέος από πολικό υδρόφιλο (θρεονίνη) σε μη πολικό υδρόφοβο (αλανίνη)] και μάλιστα σε κρίσιμο σημείο της πρωτεΐνης *PALB2*, γεγονός που μας επιτρέπει να πιστεύουμε ότι αξίζει περαιτέρω έρευνα για να διαπιστωθεί κατά πόσο είναι παθογόνα η όχι. Σημειώνεται ότι η αλλαγή αυτή δεν έχει αναφερθεί ξανά στη διεθνή βιβλιογραφία και

ότι ανευρέθηκε σε μια ασθενή με βεβαρημένο ιστορικό καρκίνου του μαστού στην οικογένειά της. Ο χαρακτηρισμός μιας παρανοηματικής μετάλλαξης ως κλινικά σημαντικής πρέπει να γίνεται πολύ προσεκτικά. Στο παρόν στάδιο και χωρίς να έχουν διεξαχθεί λειτουργικές μελέτες η παρανοηματική αλλαγή c.1408 A>G κατατάσσεται στην κατηγορία των μη ταξινομημένων παραλλαγών (unclassified variants).

Η γονοτύπωση του γονιδίου *PALB2* οδήγησε στην ανεύρεση και μιας σιωπηλής αλλαγής (c.3300T>G) η οποία έχει ανευρεθεί ξανά σε ασθενείς από άλλες χώρες καθώς και σε υγιείς μάρτυρες (Erkko et al, 2007; Sluiter et al, 2009; Papi et al, 2010). Η αλλαγή αυτή κατατάσσεται στους ουδέτερους πολυμορφισμούς και δεν θεωρείται σημαντική για την αύξηση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του μαστού (αφού δεν προκαλείται αλλαγή στο αμινοξύ και συνεπώς ούτε στη δομή της πρωτεΐνης).

Επίσης ανευρέθηκαν δυο αλλαγές ιντρονίων, η -47G<A στην 5' UTR περιοχή και η IVS3-58 G>A στο ιντρόνιο 3 του γονιδίου *PALB2*. Οι αλλαγές που βρίσκονται στις περιοχές των ιντρονίων δίπλα από τα εξόνια μπορεί να επηρεάσουν το μάτισμα. Οι συγκεκριμένες όμως αλλαγές απέχουν αρκετά από τις περιοχές ματίσματος οπότε και η πιθανότητα να επηρεάζουν τη διαδικασία του ματίσματος είναι απομακρυσμένη. Οι αλλαγές αυτές μπορούν να θεωρηθούν ως σπάνιοι πολυμορφισμοί.



Εικόνα 18: Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεΐνης *PALB2* και των αλλαγών που ανευρέθηκαν στον Κυπριακό πληθυσμό (διασκευή από Erkko et al, 2007)

Συμβολισμοί : A→ p. Thr470Ala B→ p. Gln559Arg C→ p. Glu672Gln
D→ p. Pro864Ser E→ p. Gly998Glu F→ p. Thr1100Thr

Εκτός από τις σημειακές μεταλλάξεις είναι καλό να διερευνούνται τα δείγματα και για την ύπαρξη μεγάλων γενωμικών αναδιατάξεων. Μέχρι στιγμής ελάχιστες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στη μελέτη τέτοιου είδους μεταλλάξεων στο γονίδιο *PALB2*. Οι μελέτες αυτές δεν οδήγησαν στην ανεύρεση μεγάλων αναδιατάξεων στο γονίδιο

PALB2 [Foulkes et al, 2007; Pylkas et al, 2008, Ameziane et al 2009]. Κάθε πληθυσμός παρουσιάζει ιδιαιτερότητες και για το λόγο αυτό είναι επιτακτική η μελέτη σε τοπικό επίπεδο. Σε μεταγενέστερο στάδιο το εργαστήριο όπου εκπονήθηκε η παρούσα μελέτη, θα διερευνήσει το ενδεχόμενο ύπαρξης μεγάλων αναδιατάξεων στο γονίδιο *PALB2* στην Κύπρο.

Με βάση τη γενετική μελέτη της παρούσας πτυχιακής που διεξάχθηκε στο γονίδιο *PALB2* σε ελληνοκύπριες ασθενείς με καρκίνο του μαστού δείχθηκε ότι το συγκεκριμένο γονίδιο δεν συμβάλλει σημαντικά στην ανάπτυξη κληρονομικού καρκίνου του μαστού στην Κύπρο. Σημειώνεται όμως ότι ο αριθμός των δειγμάτων που μελετήθηκαν είναι πολύ μικρός ώστε να μπορούν να εξαχθούν τελειωτικά συμπεράσματα σχετικά με τη συμβολή του γονιδίου αυτού στον κληρονομικό καρκίνο του μαστού στην Κύπρο. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό είναι αρκετά σπάνιες και πιθανόν η μελέτη επιπλέον ασθενών / οικογενειών να οδηγήσει στην ανεύρεση παθογόνων μεταλλάξεων και στον Κυπριακό πληθυσμό.

Η μελέτη των γονιδίων που προδιαθέτουν στον καρκίνο του μαστού είναι πολύ σημαντική, διότι αποκτώντας γνώση γι' αυτά θα μπορέσουν να προσαρμοσθούν καλύτερα, εξατομικευμένες θεραπείες στους ασθενείς και συχνότερος έλεγχος στους συγγενείς. Επίσης μελλοντικός στόχος θεραπείας των γενετικών ασθενειών είναι η γονιδιακή θεραπεία, η οποία όμως προϋποθέτει τη καλή μελέτη των γονιδίων και των μοριακών μηχανισμών που ευθύνονται για την ασθένεια.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

American Society of clinical Oncology, 2003, <http://www.asco.org/>

Ameziane N, van den Ouweland AM et al (2009) "Lack of large genomic deletions in BRIP1, PALB2, and FANCD2 genes in BRCA1/2 negative familial breast cancer" Breast Cancer Res Treat **118**(3):651-3.

Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology
<http://atlasgeneticsoncology.org/>

Berkey, C. S., Frazier, et al(1999). Adolescence and breast carcinoma risk. Cancer **85**, 2400-2409.

Berek J.S., Hacker N F. (1994)"Practical gynecologic oncology"(2nd edition), Baltimore: Williams & Wilkins.

Bookstein, R. and W. H. Lee (1991). "Molecular genetics of the retinoblastoma suppressor gene." Crit Rev Oncog **2**(3): 211-27.

Boron, W., and Boulpaep, E. L. (2003) Medical Physiology, Saunders

Boyd, N. F., Byng, J. W. et al (1995). Quantitative classification of mammographic densities and breast cancer risk: results from the Canadian National Breast Screening Study. J Natl Cancer Inst **87**, 670-675..

Byrne, C., Schairer, C. et al(1995). Mammographic features and breast cancer risk: effects with time, age, and menopause status. J Natl Cancer Inst **87**,1622-1629.

Campeau, P. M., W. D. Foulkes, et al. (2008). "Hereditary breast cancer: new genetic developments, new therapeutic avenues." Hum Genet **124**(1): 31-42.

Cao, A. Y., J. Huang, et al. (2009). "The prevalence of PALB2 germline mutations in BRCA1/BRCA2 negative Chinese women with early onset breast cancer or affected relatives." Breast Cancer Res Treat **114**(3): 457-62.

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (1996). "Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies.." Lancet **347**(9017): 1713-27.

Devitt J.E et al, (1967)The Clinical Stages of Breast Cancer-What Do They Mean?Canad. Med. Ass. J. **97**, 1257

Dumitrescu, R. G., and Cotarla, I. (2005). Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005? J Cell Mol Med **9**, 208-221.

Erkko, H., B. Xia, et al. (2007). "A recurrent mutation in PALB2 in Finnish cancer families." Nature **446**(7133): 316-9.

- Farber E. (1984)"Chemical carcinogenesis: a current biological perspective." Carcinog **5**(1):1-5
- Ferlay, J., D. M. Parkin, et al. (2010). "Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008." Eur J Cancer **46**(4): 765-81.
- Foulkes WD, Ghadirian P et al (2007) "Identification of a novel truncating PALB2 mutation and analysis of its contribution to early-onset breast cancer in French-Canadian women." Breast Cancer Res. **9**(6):R83.
- Foulkes, W. D. (2008). "Inherited susceptibility to common cancers." N Engl J Med **359**(20): 2143-53.
- Jones, S., R. H. Hruban, et al. (2009). "Exomic sequencing identifies PALB2 as a pancreatic cancer susceptibility gene." Science **324**(5924): 217.
- Kelsey, J. L., and Horn-Ross, P. L. (1993). Breast cancer: magnitude of the problem and descriptive epidemiology. Epidemiol Rev **15**, 7-16.
- Kinzler K.W, Vogelstein B.(1996) " Lessons from hereditary colon cancer". Cell, **87**: 159–170
- Knudson, A. G., Jr. (1971). "Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma." Proc Natl Acad Sci U S A **68**(4): 820-3.
- Knudson AG JR. Hereditary cancer. (1985) "Oncogenes and antioncogenes". Cancer Res **45**:1437-43,
- Kumar, V., Abbas, A. K., and Fausto, N. (2005). "Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease", Elsevier Inc.
- Lippman JR, Morrow M, et al (2004). "Diseases of the Breast". (3rd edition), Lippincott Williams & Wilkins.
- Levitus M, Waisfisz Q, et al (2005) "The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group J". Nat Genet, **37**:934-93
- Levrán O, Attwooll C, et al(2005) "The BRCA1-interacting helicase BRIP1 is deficient in Fanconi anemia". Nat Genet, **37**:931-933.
- Loizidou MA, Michael, T et al, (2009) "DNA-repair genetic polymorphisms and risk of breast cancer in Cyprus". Breast Cancer Res Treat **115**, 623-627.
- Lynch, H. T., J. Lynch, et al. (1994). "Hereditary breast cancer and family cancer syndromes." World J Surg **18**(1): 21-31.
- McInerney N.M, Miller Z.N. et al, (2009)"Evaluation of variants in the CHEK2, BRIP1 and PALB2 genes in an Irish breast cancer cohort"_Breast Cancer Res Treat. **121**(1):203-10

- McPherson, K., Steel, C. M., and Dixon, J. M. (2000). "ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics". Bmj **321**, 624-628.
- Miki, Y., J. Swensen, et al. (1994). "A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1." Science **266**(5182): 66-71.
- Miller DR, Viaje A, et al (1987), "Terminal differentiation-resistant epidermal cells in mice undergoing two-stage carcinogenesis". Cancer Res **47**:1935-1940.
- Nerlich, A. G., H. Rohrbach, et al. (2006). "Malignant tumors in two ancient populations: An approach to historical tumor epidemiology." Oncol Rep **16**(1): 197-202.
- Oldenburg, R. A., Meijers-Heijboer, H.(2007). Genetic susceptibility for breast cancer: How many more genes to be found? Crit Rev Oncol Hematol **63**, 125-149
- Oliveira, A. M., J. S. Ross, et al. (2005). "Tumor suppressor genes in breast cancer: the gatekeepers and the caretakers." Am J Clin Pathol **124 Suppl**: S16-28.
- Oliveira P, Colaço A et al, (2007)."Chemical carcinogenesis"An.Acad.Bras.Ciênc **79**(4)
- Olopade, O. I., Grushko, T. A., Nanda, R., and Huo, D. (2008). Advances in breast cancer: pathways to personalized medicine. Clin Cancer Res **14**, 7988-7999.
- Olson J. (2002). "Bathsheba's breast - Women, cancer & history".Johns Hopkins University JHUP.
- Pall ML.(1981) "Gene-amplification model of carcinogenesis". Proc Natl Acad Sci U S A. **78**(4):2465-8
- Papi, L., A. L. Putignano, et al. (2010). "A PALB2 germline mutation associated with hereditary breast cancer in Italy." Fam Cancer **9**(2): 181-5.
- Parkin, D. M., F. Bray, et al. (2005). "Global cancer statistics, 2002." CA Cancer J Clin **55**(2): 74-108.
- Pike, M. C., M. D. Krailo, et al. (1983). "Hormonal' risk factors, 'breast tissue age' and the age-incidence of breast cancer." Nature **303**(5920): 767-70.
- Poehlmann A. and Roessner A. (2010) "Importance of DNA damage checkpoints in the pathogenesis of human cancers" Pathol Res Pract. 1618-0631
- Potter VR (1981)"A new protocol and its rationale for the study of initiation and promotion of carcinogenesis in rat liver". Carcinog., **2**:1375-1379.
- Pylkos K, Erkkö H. et al (2008) "Analysis of large deletions of BRCA1, BRCA2 and PALB2 genes" BMC Cancer: **26**(8):146

Reid S, Schindler D, et al(2007) "Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer". Nat Genet, **39**:162-164.

Shen, W. H., A. S. Balajee, et al. (2007). "Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity." Cell **128**(1): 157-70.

Shirley M, Michael S.Y et al (2009) "PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair" Medical Sciences **106**(17):7155-7160

Sluiter, M., S. Mew, et al. (2009). "PALB2 sequence variants in young South African breast cancer patients." Fam Cancer **8**(4): 347-53.

Spandidos, D. A. (2007). "Oncogenes and tumor suppressor genes as paradigms in oncogenesis." J BUON **12 Suppl 1**: S9-12.

Stratton, M. R. and N. Rahman (2008). "The emerging landscape of breast cancer susceptibility." Nat Genet **40**(1): 17-22.

Sy, S. M., M. S. Huen, et al. (2009). "PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(17): 7155-60.

Taniguchi T. and D'Andreas, A.D (2006) Blood **107**,4223-4233

Tavassoli, F.A. and Devilee, P. (2003). Pathology and Genetics - Tumours of the Breast and Female Genital Organs. IARC Press.

Trosko JE, Chang CC (1989)"Stem cell theory of carcinogenesis. Toxicol Lett, **49**:283-295.

Trosko JE, Chang CC, et al (1983)"Mechanisms of tumor promotion: potential role of intercellular communication". Cancer Invest, **1**:511-526

Turnbull, C. and N. Rahman (2008). "Genetic predisposition to breast cancer: past, present, and future." Annu Rev Genomics Hum Genet **9**: 321-45.

van Heemst, D., P. M. den Reijer, et al. (2007). "Ageing or cancer: a review on the role of caretakers and gatekeepers." Eur J Cancer **43**(15): 2144-52.

Walsh T. and King MC. (2007) "Ten genes for inherited breast cancer" Cancer Cell **11** Weinberg (2007) "The biology of Cancer" Garland Science, Taylor and Francis Group, LLC

Weinstein, I. B. (1980). "Cell culture systems for studying multifactor interactions in carcinogenesis." Dev Toxicol Environ Sci **8**: 149-64.

Wooster, R., G. Bignell, et al. (1995). "Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2." Nature **378**(6559): 789-92.

Wooster, R., S. L. Neuhausen, et al. (1994). "Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13." Science **265**(5181): 2088-90.

Xia, B., J. C. Dorsman, et al. (2007). "Fanconi anemia is associated with a defect in the BRCA2 partner PALB2." Nat Genet **39**(2): 159-61.

Zhang, F., J. Ma, et al. (2009). "PALB2 links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-damage response." Curr Biol **19**(6): 524-9.

Αρχείο Καρκίνου, Υπουργείο Υγείας, Κυπριακή Δημοκρατία

Μαργαρίτης Λ.Χ, Γαλανόπουλος Β.Κ, et al. (2004) "Βιολογίας κυττάρου" (4^η έκδοση), εκδόσεις Λίτσα.

.