

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟΥ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟΥ /  
ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ



***ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ BRIP1 ΣΕ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΕΣ ΜΕ  
ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΣΤΗΝ ΚΥΠΡΟ***

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ:** Δρ. ΚΥΡΙΑΚΟΣ ΚΥΡΙΑΚΟΥ  
Δρ. ΧΑΤΖΗΣΑΒΒΑΣ ΑΝΤΡΕΑΣ  
Δρ. ΛΟΙΖΙΔΟΥ ΜΑΡΙΑ

**ΥΠΕΥΘΥΝΟΙ ΚΑΘΗΓΗΤΕΣ:** ΚΟΥΡΕΤΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ  
ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ

**ΣΤΡΑΤΗ ΧΡΙΣΤΙΝΑ  
ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ  
ΙΟΥΝΙΟΣ 2010**

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Αυτή η εργασία εκπονήθηκε στο Ινστιτούτο Νευρολογίας και Γενετικής Κύπρου, στο τμήμα Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου και Μοριακής Παθολογίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Κυριάκο Κυριάκου που με δέχθηκε στο τμήμα του για να διεκπεραιώσω την διπλωματική μου εργασία.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Αντρέα Χατζησάββα και την Δρ. Μαρία Λοιζίδου για την βοήθεια και τις γνώσεις που μου πρόσφεραν κατά την διάρκεια της εργασίας μου καθώς και για την φιλική τους συμπεριφορά απέναντι μου.

Επίσης θέλω να ευχαριστήσω την Χριστίνα Φλουρή, την Ιωάννα Νεοφύτου και την Έβη Χάρκου για την βοήθεια και συμπαράσταση τους.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί το συχνότερο τύπο καρκίνου στις γυναίκες. Τα σημαντικότερα γονίδια που προδιαθέτουν στον καρκίνο του μαστού είναι το *BRCA1* και το *BRCA2*, τα οποία εξηγούν γύρω στο 16% του συνολικού αριθμού των περιστατικών κληρονομικού καρκίνου του μαστού. Πρόσφατα, ανακαλύφθηκε ότι παθογόνες μεταλλάξεις στο γονίδιο *BRIP1* συνδέονται με τον κληρονομικό καρκίνο του μαστού. Η συμβολή του γονιδίου *BRIP1* στον κληρονομικό καρκίνο του μαστού στον Κυπριακό πληθυσμό δεν έχει διερευνηθεί μέχρι στιγμής. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, φορείς παθογόνων μεταλλάξεων στο γονίδιο *BRIP1* έχουν αυξημένες πιθανότητες ανάπτυξης καρκίνου του μαστού. Σκοπός της μελέτης αυτής ήταν η διερεύνηση της συμβολής του γονιδίου *BRIP1* 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*. Η γενετική μελέτη του γονιδίου *BRIP1* 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 .....	5
1.1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ .....	5
1.1.1 Πολυσταδιακό μοντέλο καρκινογένεσης:.....	6
1.1.2 Ο καρκίνος είναι μια γενετική ασθένεια.....	7
1.1.3 Τύποι Καρκίνου και επιπολασμός .....	8
1.2 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ .....	10
1.2.1 Επίπτωση και θνησιμότητα.....	10
1.2.2 Επιδημιολογία και παράγοντες κινδύνου .....	12
1.2.3 Κληρονομικότητα και καρκίνος του μαστού.....	15
1.2.4 Γενετική Βάση κληρονομικού καρκίνου του μαστού.....	17
1.2.5 Fanconi Anemia .....	21
1.3 <i>BRIP1</i> .....	23
1.4 ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	25
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	26
2.1 Συμμετέχοντες στη μελέτη .....	26
2.2 Απομόνωση γενωμικού DNA .....	27
2.3 Σχεδιασμός εκκινητών .....	27
2.4 Polymerase chain reaction (PCR) / Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης .....	28
2.5 Ηλεκτροφόρηση τμημάτων DNA σε πηκτές αгарόζης.....	31
2.6 PCR purification .....	32
2.7 Μέθοδος αναφοράς ανάγνωσης DNA ακολουθίας (Cycle Sequencing).....	33
2.8 Μεθοδολογία ανάγνωσης DNA ακολουθίας .....	34
2.9 Καθαρισμός από ελεύθερα νουκλεοτίδια .....	36
2.10 Sequencer 3130 (Αυτόματος αναλυτής γενετικού υλικού) .....	36
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	38
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ .....	40
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	44

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Η πάθηση του καρκίνου πήρε το όνομα της από τον Ιπποκράτη ο οποίος πρώτος το 400 π.Χ. παρομοίασε τους κακοήθεις όγκους με την εικόνα του κάβουρα (καρκίνου). Ο καρκίνος είναι ένα πολυπαραγοντικό νόσημα που μπορεί να προσβάλλει κάθε ιστό και όργανο του σώματος. Χαρακτηρίζεται από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων και τη δυνατότητα τους να εισβάλουν σε άλλους ιστούς [1].

Σε αντίθεση με τους μονοκύτταρους οργανισμούς, οι οποίοι ανταγωνίζονται για την επιβίωσή τους, τα κύτταρα ενός πολυκύτταρου οργανισμού πρέπει να συνεργάζονται αρμονικά το ένα με το άλλο. Μια μόνο μετάλλαξη ενός κυττάρου είναι δυνατόν να οδηγήσει μετά από μια σειρά γεγονότων στην καταστροφή ολόκληρου του πληθυσμού. Η μετάλλαξη, ο συναγωνισμός και η φυσική επιλογή που λειτουργούν στους πληθυσμούς των σωματικών κυττάρων, είναι τα βασικά συστατικά του καρκίνου. Καρκίνος είναι η ασθένεια κατά την οποία τα μεταλλαγμένα κύτταρα αρχίζουν να “καλοπερνούν” σε βάρος των υπόλοιπων κυττάρων, αλλά στο τέλος καταστρέφουν ολόκληρη την κυτταρική κοινωνία και πεθαίνουν μαζί της [1].

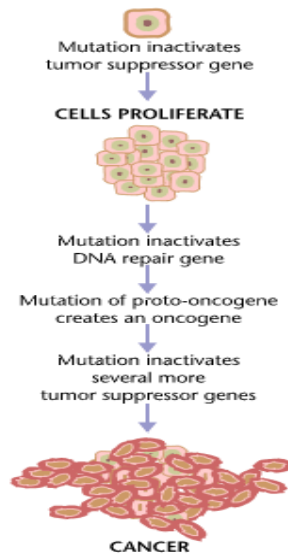
Πολύ συχνά, οι έλεγχοι που ρυθμίζουν τις κυτταρικές διαιρέσεις καταστρέφονται ή δυσλειτουργούν και έτσι ένα κύτταρο αρχίζει να αυξάνεται και να διαιρείται, ενώ ο ιστός δεν έχει ανάγκη για περισσότερα κύτταρα του συγκεκριμένου αυτού τύπου. Όταν οι απόγονοι του κυττάρου αυτού κληρονομήσουν την τάση να μην υπακούουν στις εντολές ρύθμισης της κυτταρικής διαίρεσης, τότε τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται συνεχώς. Η μάζα των ανεπιθύμητων αυτών κυττάρων ονομάζεται όγκος.

Όπως έχει προαναφερθεί, η εμφάνιση όγκου δηλαδή καρκίνου οφείλεται στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Ο οργανισμός μας φέρει ποικιλία κυττάρων που το κάθε ένα περιέχει στο πυρήνα του το γενετικό υλικό (DNA). Το DNA αποτελείται από γονίδια, και μπορεί να αντιγραφεί, να μεταγραφεί και να μεταφραστεί σε πρωτεΐνη. Οι πρωτεΐνες είναι υπεύθυνες για όλες τις λειτουργίες που διεξάγονται στον οργανισμό, όπως για παράδειγμα για την ανάπτυξη, τα χαρακτηριστικά του και τη συμπεριφορά του. Μέσα στο κύτταρο υπάρχουν

μηχανισμοί που διατηρούν το DNA στη σωστή κατάσταση έτσι ώστε τα γονίδια του να λειτουργούν και να μεταδίδουν μηνύματα στον σωστό χρόνο και χώρο. Κατά τη διαίρεση όμως του κυττάρου μπορεί να συμβούν μεταλλάξεις (αλλαγές) στα γονίδια, με αποτέλεσμα η πρωτεΐνη να μην εκφράζεται ή να εκφράζεται μια εντελώς διαφορετική πρωτεΐνη η οποία είτε δυσλειτουργεί είτε είναι αδρανής. Αν οι μεταλλάξεις αυτές γίνουν σε γονίδια τα οποία σχετίζονται με την ικανότητα του κυττάρου να φτάσει στη τελική διαφοροποίηση ή σε γονίδια που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό, τότε το κύτταρο δεν θα μπορεί να υπακούει στα μηνύματα και θα πολλαπλασιάζεται ανεξέλεγκτα με αποτέλεσμα τη δημιουργία όγκου. Τα κύτταρα του όγκου (καρκινικά κύτταρα) έχουν τη δυνατότητα να διασπείρονται σε άλλα σημεία του σώματος, να εγκαθίστανται εκεί και να αναπτύσσονται. Η διασπορά αυτή ονομάζεται μετάσταση. Για να μετατραπεί όμως ένα φυσιολογικό κύτταρο σε καρκινικό και να έχει αυτή την ικανότητα μετάστασης και διήθησης του σε παρακείμενο ιστό δεν αποτελεί διαδικασία ενός σταδίου αλλά είναι αποτέλεσμα πολλαπλών σταδιακών αλλαγών. [1,2,3]

### **1.1.1 Πολυσταδιακό μοντέλο καρκινογένεσης**

Το πολυσταδιακό μοντέλο καρκινογένεσης περιλαμβάνει τρία στάδια (εικόνα 1). Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιείται μετάλλαξη σε ένα μόνο κύτταρο, σε γονίδια που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση του κυττάρου και έτσι γίνεται γένεση σε ένα κύτταρο το οποίο έχει ικανότητα αυτοανανέωσης. Στο δεύτερο στάδιο γίνεται κλωνικός πολλαπλασιασμός των αρχικά μεταλλαγμένων κυττάρων με τη βοήθεια παραγόντων που προάγουν την μίτωση. Έτσι το κύτταρο συνεχίζει να διαιρείται και ξεπερνά των αριθμό διαιρέσεων που θα πραγματοποιούσε ένα μη καρκινικό κύτταρο με αποτέλεσμα το DNA να είναι επιρρεπείς σε λάθη λόγω γενωμικής αστάθειας με συνέπεια να συσσωρεύονται επιπλέον μεταλλάξεις. Από αυτά τα κύτταρα μόνο ένα θα αποκτήσει μια κρίσιμη μετάλλαξη η οποία θα το μετατρέψει σε προκαρκινικό. Στο τρίτο στάδιο το προκαρκινικό κύτταρο αποκτά επιπλέον μεταλλάξεις και γίνεται καρκινικό κύτταρο. Το πολυσταδιακό μοντέλο εξηγεί ότι μια και μόνο διαταραχή αδυνατεί να αποδιοργανώσει το κύτταρο (πολυπλοκότητα της ρύθμισης του κυττάρου). [4-10]



**ΕΙΚΟΝΑ 1:** Τα στάδια μετατροπής ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό. Μεταλλάξεις σε ογκοκατασταλτικά γονίδια, γονίδια επιδιόρθωσης λαθών και ογκογονίδια οδηγούν στη δημιουργία όγκου

### 1.1.2 Ο καρκίνος είναι μια γενετική ασθένεια

Για τη δημιουργία του καρκίνου, δύο ομάδες γονιδίων έχουν πολύ μεγάλη σημασία όπως αναφέρεται πιο κάτω:

- α. τα ογκογονίδια, τα οποία παρακάμπτουν τα σημεία ελέγχου της κυτταρικής διαίρεσης, και είναι δυνατό να μετατραπούν σε γονίδια που ευνοούν την ανάπτυξη του καρκίνου, προκαλώντας ανεξέλεγκτη κυτταρική. Η ανακάλυψη αυτή οδήγησε σε περαιτέρω έρευνα, με σκοπό να κατανοηθεί πληρέστερα ο τρόπος ανάπτυξης του καρκίνου και οι μέθοδοι προφύλαξης και θεραπείας.
- β. τα όγκο-κατασταλτικά γονίδια, τα οποία παρεμποδίζουν την ανεξέλεγκτη δράση των ογκογονιδίων. Τα όγκο-κατασταλτικά γονίδια έχουν την ικανότητα να παρεμποδίζουν την αύξηση των όγκων που προάγεται από τα ογκογονίδια. Τα γονίδια της ομάδος αυτής, περιλαμβανομένων των γονιδίων *rb* (retinoblastoma) και *p53*, έχουν προσελκύσει το έντονο ενδιαφέρον ως πιθανά μέσα ελέγχου του καρκίνου, αφού έχει αποδειχτεί ότι η εισαγωγή των γονιδίων αυτών στο γένωμα καλλιεργούμενων καρκινικών κυττάρων κατέστειλε την αύξηση τους [11].

Μια από τις βασικές θεωρίες στην γενετική του καρκίνου είναι η Knudson's two hit hypothesis. Οι παρατηρήσεις που οδήγησαν σε αυτή την μελέτη ειπώθηκαν κατά την διάρκεια επιδημιολογικών μελετών σε *rb* (retinoblastoma). Στην υπόθεση του αυτή ο Knudson αναφέρει ότι ένα παιδί, που έχει κληρονομήσει μια μετάλλαξη από τους γονείς του, έχει μεγαλύτερη πιθανότητα να πάθει μια δεύτερη μετάλλαξη που εύκολα θα οδηγήσει σε καρκινογένεση (σε σύγκριση με ένα παιδί που δεν έχει κληρονομήσει καμιά μετάλλαξη) [12].

### 1.1.3 Τύποι Καρκίνου και επιπολασμός

Οι καρκίνοι ταξινομούνται με βάση τον τύπο του ιστού από τον οποίο προέρχονται. Στον άνθρωπο παρατηρήθηκαν περισσότεροι από 200 διαφορετικοί τύποι καρκίνου οι οποίοι διαχωρίζονται στις εξής 4 κύριες κατηγορίες:

- α) τα καρκινώματα: είναι καρκίνοι των επιθηλιακών ιστών που καλύπτουν την επιφάνεια του σώματος και τις εσωτερικές κοιλότητες
- β) τα σάρκωματα: είναι καρκίνοι οι οποίοι ξεκινούν σε συνδετικούς ιστούς όπως στα οστά και στους μυς
- γ) τις λευχαιμίες: είναι καρκίνοι του αίματος
- δ) τα λεμφώματα: είναι καρκίνοι του λεμφικού ιστού [13]

Στις πλείστες ευρωπαϊκές χώρες όπως και στην Κύπρο, ο καρκίνος αποτελεί τη δεύτερη αιτία θανάτου. μετά τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Δυστυχώς, ο καρκίνος μπορεί να προσβάλει οποιαδήποτε ηλικία και αποτελεί τεράστιο 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 από τη νόσο.

Στην Κύπρο διαγνώζονται 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. Στον πίνακα 1 συνοψίζονται οι συνηθέστερες μορφές καρκίνου στην Κύπρο βάση στατιστικών του Αρχείου Καρκίνου [14].



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

*ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Συνηθέστερες μορφές καρκίνου στην Κύπρο μεταξύ 1998 και 2004. Στον πίνακα συνοψίζονται ο συνολικός αριθμός διαγνωσμένων περιστατικών ανά έτος βάση του Αρχείου Καρκίνου της Κυπριακής Δημοκρατίας.*

## 1.2 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

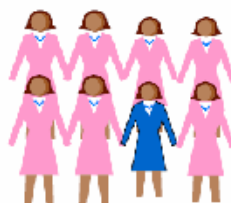
### 1.2.1 Επίπτωση και θνησιμότητα

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 (εικόνα 2) [14]. Τα τελευταία 50 χρόνια παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των περιστατικών καρκίνου του μαστού ανά το παγκόσμιο [15]. Παρόλο που η συχνότητά εμφάνισής καρκίνου του μαστού αυξάνεται σταθερά, το ποσοστό θνησιμότητας μειώνεται λόγω της έγκαιρης διάγνωσης και της ανάπτυξης αποτελεσματικότερων θεραπειών (εικόνα 4) [16].

Στην Ευρώπη διαγνώζονται γύρω στα 250,000 νέα περιστατικά καρκίνου του μαστού ενώ στις Ηνωμένες Πολιτείες ο ετήσιος αριθμός περιστατικών καρκίνου του μαστού ανέρχεται στις 175,000. Υπολογίζεται ότι περισσότερες από 165,000 γυναίκες με καρκίνο του μαστού πεθαίνουν ετησίως στην Ευρώπη ενώ ο αντίστοιχος αριθμός για τις ΗΠΑ ανέρχεται στις 44,000. Συνολικά περισσότερες από 400,000 γυναίκες πεθαίνουν από καρκίνο του μαστού ετησίως ανά το παγκόσμιο [16,17].

Ο καρκίνος του μαστού επηρεάζει μία στις εννέα γυναίκες στην Κύπρο. Το 2006 διαγνώσθηκαν περισσότερα από 400 νέα περιστατικά καρκίνου του μαστού, δηλαδή πάνω από ένα την ημέρα, και μεγάλος αριθμός υποτροπών (δεν υπάρχουν στατιστικά στοιχεία για το δεύτερο). Επίσης, σημειώνονται 90 θάνατοι το χρόνο από καρκίνο του μαστού, δηλαδή δύο θάνατοι κάθε εβδομάδα. Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί το συχνότερο τύπο καρκίνου στις γυναίκες και το 35% των νέων περιστατικών όλων των τύπων καρκίνου στην Κύπρο. Τα 2/3 των νέων περιστατικών εντοπίζονται σε γυναίκες άνω των 50 ετών. Ο καρκίνος του μαστού επηρεάζει και τον ανδρικό πληθυσμό σε πολύ χαμηλότερα ποσοστά. Για το έτος 2006 είναι καταγεγραμμένα οκτώ κρούσματα καρκίνου του μαστού σε άνδρες [14].

σύνολο γυναικείου  
πληθυσμού

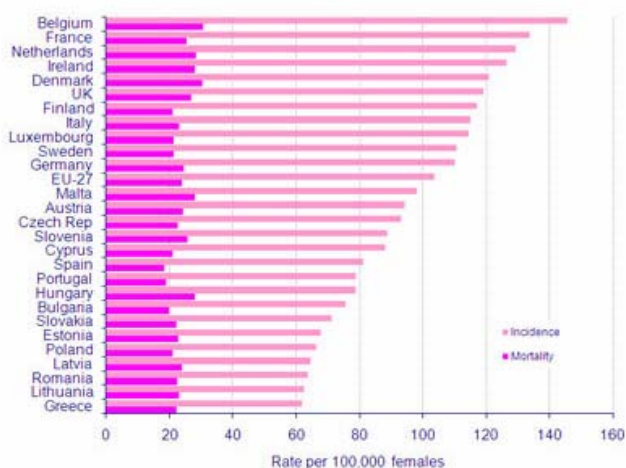


■ γυναίκες που πασχουν με καρκίνο του μαστού

■ υγιείς γυναίκες του πληθυσμού

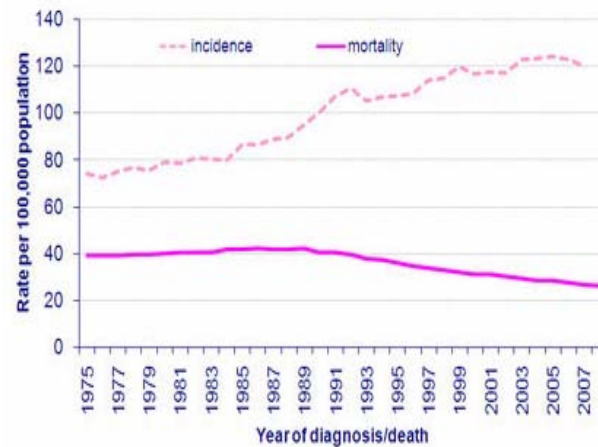
**ΕΙΚΟΝΑ 2:** Υπολογίζεται ότι 1 στις 8 γυναίκες θα αναπτύξει καρκίνο του μαστού κατά τη διάρκεια της ζωής της

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



**ΕΙΚΟΝΑ 3:** Επίπτωση και θνησιμότητα από καρκίνο του μαστού ανά χώρα της Ευρωπαϊκής Ένωσης ανά 100.000 γυναίκες [17]

Figure 1.4: Age standardised (European) incidence and mortality rates, breast cancer, females, GB, 1975-2008



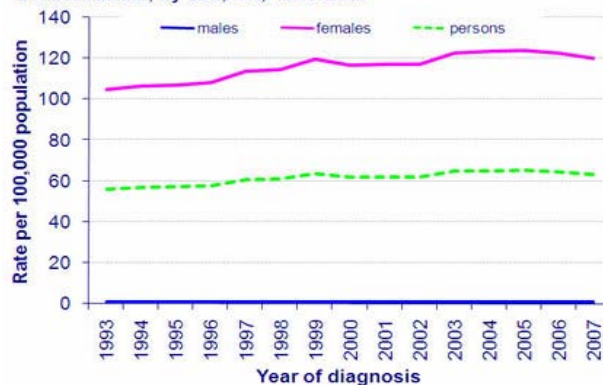
**ΕΙΚΟΝΑ 4:** Επίπτωση και θνησιμότητα από καρκίνο του μαστού ανά έτος [17]

### 1.2.2 Επιδημιολογία και παράγοντες κινδύνου

Όπως όλοι οι καρκίνοι, έτσι και ο καρκίνος του μαστού είναι ένα κατ' εξοχήν πολυπαραγοντικό νόσημα.. Δυστυχώς, ελάχιστα είναι γνωστά σχετικά με τα αίτια που προκαλούν καρκίνο του μαστού, παρά το γεγονός ότι έχουν εντοπιστεί αρκετοί παράγοντες κινδύνου [18]. Οι πιο σημαντικοί παράγοντες κινδύνου που συνδέονται με την εμφάνιση της νόσου είναι οι ακόλουθοι:

**Φύλο:** Το φύλο είναι ο ισχυρότερος παράγοντας κινδύνου για ανάπτυξη καρκίνου του μαστού. Ο καρκίνος του μαστού εμφανίζεται και στους άνδρες, είναι όμως πολύ συχνότερος στις γυναίκες (100 γυναίκες: 1 άνδρας) (εικόνα 5) [18].

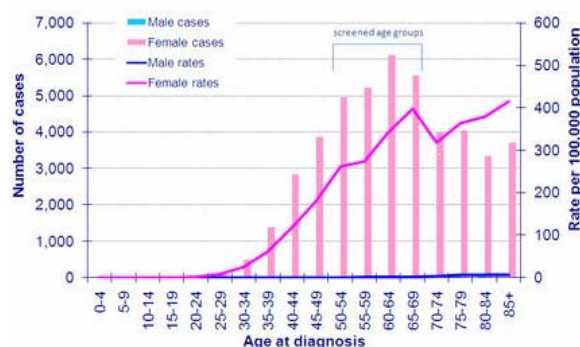
Figure 1.5: Age standardised (European) incidence rates, breast cancer, by sex, UK, 1993-2007



**ΕΙΚΟΝΑ 5:** Επίπτωση και θνησιμότητα σε άνδρες και γυναίκες ανά 100.000 κατά το χρονικό διάστημα 1993-2007[17]

Ηλικία: Ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του μαστού αυξάνεται σταθερά με την ηλικία. Ενδεικτικά ο ετήσιος κίνδυνος εμφάνισης στην ηλικία των 30 ετών είναι 1:6000 ενώ στην ηλικία των 80 ετών είναι μόνο 1:250.

Figure 1.1: Numbers of new cases and age specific incidence rates, by sex, breast cancer, UK 2007



**EIKONA 6:** 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[16]

Οικογενειακό ιστορικό: Οι γυναίκες που έχουν μία πρώτου βαθμού συγγενή (μητέρα, αδελφή, κόρη) με καρκίνο του μαστού έχουν αυξημένο κίνδυνο να αναπτύξουν τη νόσο. Εάν έχουν περισσότερες από μία συγγενή πρώτου βαθμού με καρκίνο του μαστού ο κίνδυνος αυξάνεται ακόμα περισσότερο [18].

Προηγούμενο ιστορικό καρκίνου: Το προσωπικό ιστορικό καρκίνου του μαστού αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου και στον άλλο μαστό. Ο κίνδυνος είναι 1% και 0,5% σε προεμμηνοπαυσιακές και μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες αντίστοιχα. Επίσης, προηγούμενο ιστορικό ενδομητριακού καρκίνωματος, καρκίνου ωοθηκών και καρκίνου του εντέρου αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού [18].

Αναπαραγωγή και ορμονικοί παράγοντες: Είναι γενικά αποδεκτό ότι οτιδήποτε επηρεάζει τη μακροχρόνια έκθεση στα οιστρογόνα, επηρεάζει τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού. Αριθμός μελετών έδειξε συσχέτιση μεταξύ της πρόωρης εμφάνισης έμμηνου ρήσης, της καθυστερημένης εμμηνόπαυσης και του καρκίνου του μαστού. Πιο συγκεκριμένα, η πρόωμη εμμηναρχή (10 έτη) και η καθυστερημένη εμμηνόπαυση (55 έτη) αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Η

πρώιμη εμμηναρχή είναι ασθενής παράγοντας κινδύνου ενώ η εμμηνόπαυση μετά τα 55 διπλασιάζει την επίπτωση καρκίνου μαστού σε σύγκριση με τις γυναίκες που είχαν εμμηνόπαυση πριν τα 45 έτη. Επομένως, η φυσική ή τεχνητή πρόωρη εμμηνόπαυση παρέχει προστασία ενάντια στην ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού. Όσο μεγαλύτερη είναι η αναπαραγωγική φάση μιας γυναίκας τόσο ψηλότερος ο κίνδυνος για καρκίνο του μαστού. Επίσης παρατηρήθηκε ότι γυναίκες που δεν έμειναν έγκυες έχουν ψηλότερο κίνδυνο για καρκίνο του μαστού σε σχέση με αυτές που τεκνοποίησαν. Όπως έχει προαναφερθεί, η μακροχρόνια έκθεση σε οιστρογόνα φαίνεται να αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης του καρκίνου του μαστού. Η χρήση εξωγενών οιστρογόνων και ειδικότερα η μακροχρόνια χρήση μετά την εμμηνόπαυση αυξάνει τον κίνδυνο για καρκίνο του μαστού [18].

Έκθεση σε ακτινοβολία: Η έκθεση σε υψηλές δόσεις ακτινοβολίας αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού. 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[18].

Τρόπος ζωής: Μελέτες κατέδειξαν ότι η παχυσαρκία, η έλλειψη άσκησης και η κατανάλωση οινοπνεύματος αυξάνουν τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού. Η παχυσαρκία αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού μετά την εμμηνόπαυση, μέσω της αύξησης των επιπέδων των οιστρογόνων. Επίσης, η κατανάλωση οινοπνευματώδων ποτών μπορεί να οδηγήσει στην αύξηση της συγκέντρωσης των οιστρογόνων στο αίμα και συνεπώς στην αύξηση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Η τακτική, έντονη άσκηση κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής ηλικίας μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο καρκίνου του μαστού μιας γυναίκας, μια και μπορεί να καθυστερήσει την έναρξη της έμμηνου ρύσεως, να επιμηκύνει τον χρόνο μεταξύ των περιόδων ή και να ελαττώσει τον αριθμό των εμμηνορυσιακών κύκλων, μειώνοντας έτσι την έκθεση της γυναίκας στα οιστρογόνα [18].

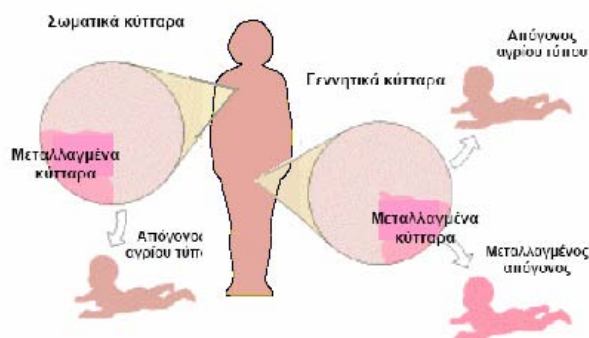
Όταν λέμε ότι ένα άτομο κινδυνεύει περισσότερο να εμφανίσει καρκίνο ή ότι έχει έναν παράγοντα κινδύνου, σημαίνει ότι πιθανόν να έχει κάποιο βαθμό ευπάθειας στην

ανάπτυξη της νόσου. Θα πρέπει όμως να σημειωθεί ότι οι παράγοντες κινδύνου δεν προβλέπουν με βεβαιότητα αν μια γυναίκα θα αναπτύξει καρκίνο του μαστού [11,12].

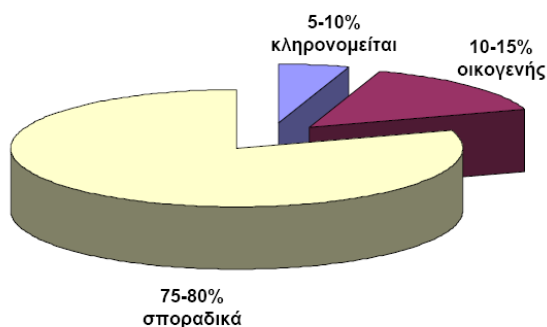
Αρκετές γυναίκες που έχουν εκτεθεί σε όλους τους παράγοντες κινδύνου δεν θα εκδηλώσουν τη νόσο, ενώ άλλες θα εμφανίσουν τελικά τη νόσο χωρίς να έχουν εκτεθεί σε κάποιο από τους γνωστούς παράγοντες κινδύνου για ανάπτυξη καρκίνου του μαστού. Ωστόσο, το να γνωρίζει μια γυναίκα ότι έχει αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού μπορεί να τη βοηθήσει να είναι περισσότερο προσεκτική σχετικά με την πραγματοποίηση τακτικών ελέγχων με μαστογραφία ή ακόμη να πάρει μέτρα για τη μείωση του κινδύνου, διότι πολλοί από αυτούς μπορούν να τροποποιηθούν ή να ελεγχθούν.

### **1.2.3 Κληρονομικότητα και καρκίνος του μαστού**

Ο οικογενής καρκίνος του μαστού αντιπροσωπεύει περίπου το 30% του συνόλου των περιστατικών καρκίνου του μαστού. Το υπόλοιπο 70% των περιστατικών είναι σποραδικά (και δεν κληρονομούνται). Ο κληρονομικός καρκίνος αποτελεί περίπου το 30% του οικογενούς καρκίνου, δηλ. το 10% του συνόλου των περιστατικών (εικόνα 8). Ο οικογενής καρκίνος είναι αποτέλεσμα ενός συνδυασμού περιβάλλοντος και σύνθετης γενετικής προδιάθεσης, ενώ ο κληρονομικός συνδέεται με 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 (εικόνα 7). 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 σχετίζεται με μεγάλο αριθμό γενετικών συνδρόμων. Το πιο γνωστό είναι το σύνδρομο του κληρονομικού καρκίνου μαστού/ωοθηκών που οφείλεται σε μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2* [19].



**ΕΙΚΟΝΑ 7:** Σποραδικός και κληρονομικός καρκίνος του μαστού. Μεταλλάξεις σε σωματικά κύτταρα δεν μεταφέρονται στην επόμενη γενιά, ενώ μεταλλάξεις στα γαμετικά κύτταρα έχουν 50% πιθανότητα να μεταφερθούν σε κάθε απόγονο



**ΕΙΚΟΝΑ 8:** Ποσοστά σποραδικού, κληρονομικού και οικογενούς καρκίνου του μαστού

Στις περιπτώσεις που ο καρκίνος οφείλεται σε καθαρά κληρονομικούς παράγοντες (γύρω στο 10% του συνόλου των περιστατικών), ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του μαστού είναι ιδιαίτερα υψηλός, 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. Η πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου εξαρτάται από το γονίδιο στο οποίο παρουσιάζεται η μετάλλαξη καθώς επίσης και από τις σύνθετες αλληλεπιδράσεις γονιδίων-περιβάλλοντος, οι οποίες είναι το αντικείμενο εκτεταμένης μελέτης στις μέρες μας.



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 [20].

#### **1.2.4 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 [15]. 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 [21]. Αναλυτικά οι 3 κατηγορίες γονιδίων που προδιαθέτουν στον καρκίνο του μαστού είναι:

- 1) τα γονίδια υψηλής-διεισδυτικότητας
- 2) τα γονίδια ενδιάμεσης διεισδυτικότητας
- 3) τα κοινά αλληλόμορφα γονίδια χαμηλής-διεισδυτικότητας

##### **1) Γονίδια υψηλής διεισδυτικότητας**

Η κατηγορία αυτή αποτελείται από τα γονίδια υψηλής διεισδυτικότητας για τον καρκίνο του μαστού, τα κυριότερα εκ των οποίων είναι το *BRCA1* και το *BRCA2*. Τα γονίδια αυτά κλωνοποιήθηκαν το 1994 και 1995 αντίστοιχα [22,23,24] και είναι υπεύθυνα για το μεγαλύτερο ποσοστό των περιπτώσεων κληρονομούμενου καρκίνου του μαστού ή/και ωοθηκών. Οι φορείς των μεταλλάξεων στα γονίδια αυτά έχουν ιδιαίτερα αυξημένες πιθανότητες ανάπτυξης καρκίνου του μαστού (10-20 πλάσιο κίνδυνο) ή των ωοθηκών σε σύγκριση με το γενικό πληθυσμό. Εκτιμάται ότι 6-7% των περιπτώσεων του καρκίνου του μαστού και 10% του καρκίνου των ωοθηκών οφείλονται σε μεταλλάξεις στα γονίδια προδιάθεσης στον καρκίνο[21].

Ο κληρονομικός καρκίνος του μαστού συσχετίζεται με μεγάλο αριθμό γενετικών συνδρόμων τα πιο γνωστά εκ των οποίων είναι το σύνδρομο Li-Fraumeni (μεταλλάξεις στο γονίδιο *TP53*), το σύνδρομο Cowden (μεταλλάξεις στο γονίδιο *PTEN*), το σύνδρομο Peutz-Jeghers (μεταλλάξεις στο γονίδιο *STK11*) και το σύνδρομο hereditary diffuse gastric cancer (μεταλλάξεις στο γονίδιο *CDH1*). Οι μεταλλάξεις στα γονίδια αυτά είναι σπάνιες και εξηγούν ένα μικρό ποσοστό του κληρονομικού καρκίνου του μαστού [21].

Υπολογίζεται ότι τα γονίδια υψηλής διεισδυτικότητας για τον καρκίνο του μαστού (*BRCA1*, *BRCA2*, *PTEN*, *STK11* και *CDH1*) εξηγούν γύρω στο 25% του συνολικού αριθμού του κληρονομικού καρκίνου του μαστού. Επομένως, το μεγαλύτερο ποσοστό του κληρονομικού καρκίνου του μαστού παραμένει ανεξήγητο και ίσως να υπάρχουν κ' άλλα γονίδια τα οποία να εξηγούν το υπόλοιπο ποσοστό [25].

## **2) Γονίδια ενδιάμεσης διεισδυτικότητας**

Τα γονίδια *CHEK2*, *ATM*, *BRIP1* και *PALB2* αποτελούν την ομάδα γονιδίων ενδιάμεσης διεισδυτικότητας για τον καρκίνο του μαστού. Κύριο χαρακτηριστικό αυτής της ομάδας γονιδίων είναι ότι σχηματίζουν σύμπλοκα με το *BRCA1* και το *BRCA2* και εμπλέκονται μαζί στο μονοπάτι επιδιόρθωσης του DNA.

Το *CHEK2* κωδικοποιεί μια κινάση η οποία φωσφορυλιώνει το *p53* και το *BRCA1* και ρυθμίζει την επιδιόρθωση του DNA [21]. Το *ATM* καταλαμβάνει κεντρικό ρόλο στην απάντηση των σπασιμάτων της διπλής έλικας του DNA, μέσω φωσφορυλίωση των *p53*, *BRCA1* και *CHEK2* [21]. Το *PALB2* δημιουργεί σύμπλοκο με το *BRCA2* και προάγει την τοποθέτηση και την σταθερότητα του *BRCA2* για επιδιόρθωση του DNA [26]. Το *BRIP1* κωδικοποιεί μια ελικάση η οποία συνδέεται στο DNA και αλληλεπιδρά με το *BRCA1* βοηθώντας στην επιδιόρθωση του DNA μέσω ομόλογου ανασυνδιασμού [27,28]

Τα γονίδια *CHEK2*, *ATM*, *BRIP1* και *PALB2* συμπεριφέρονται παρόμοια με τα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2* και παρουσιάζουν απώλεια του αλληλομόρφου άγριου τύπου στους καρκίνους που προκαλούν. Πρόσφατα, αποδείχθηκε ότι οι biallelic μεταλλάξεις στα *BRIP1* και *PALB2* αναιμίας Fanconi (FA-J και FA-N ) (πίνακας 2)

[30]. Οι φορείς μεταλλάξεων στα γονίδια αυτά έχουν διπλάσιο-τετραπλάσιο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού σε σχέση με το γενικό πληθυσμό [15].

Στο Ηνωμένο Βασίλειο 0.6% του γενικού πληθυσμού είναι ετερόζυγοι φορείς μεταλλαγών στο γονίδιο *CHEK2* (οι περισσότεροι από αυτούς φέρουν τη μεταλλαγή, 1100delC), 0.4% είναι ετερόζυγοι φορείς μεταλλαγών στο γονίδιο *ATM* και ποσοστό της τάξης του -0.1% φέρουν μεταλλάξεις στα γονίδια *BRIP1* ή *PALB2* [15].

Οι φορείς μεταλλάξεων στα γονίδια ενδιαμέσης διεισδυτικότητας για τον καρκίνο του μαστού έχουν κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού 6-10% στην ηλικία των 60 χρονών σε σύγκριση με το 3% του γενικού πληθυσμού, και τα γονίδια αυτά εξηγούν το 2,3% του κληρονομικού καρκίνου του μαστού σε σύγκριση με το 16% που εξηγείται από τα *BRCA1/2* [21].

**ΠΙΝΑΚΑΣ 2:** Γονίδια υψηλής και ενδιαμέσης διεισδυτικότητας για τον καρκίνο του μαστού[30]

Gene	Syndrome associated with gene	Breast cancer risk, relative risk (RR), or odds ratio (OR) (95% CI)	Mutation frequency in non-founder populations	Strategies for therapeutic targeting
<i>BRCA1</i>	Hereditary breast and ovarian cancer	Cumulative risk by 70 years is 65% (51–75%) (Antoniou et al. 2003)	$\approx 1/400$ ( $\approx 5\%$ of unselected breast cancer patients)	PARP-1/2 inhibitors, to target <i>BRCA1/2</i> deficient tumors which have already impaired DSB DNA repair (Bryant et al. 2005; Farmer et al. 2005)
<i>BRCA2</i>		Cumulative risk by 70 years is 45% (33–54%) (Antoniou et al. 2003)		
<i>TP53</i>	Li–Fraumeni syndrome	RR 18.1 (8.6–33.2) between 20 and 44 years (Garber et al. 1991)	<1/10,000 (<0.25% of unselected breast cancer patients) (Borresen et al. 1992; Sidransky et al. 1992)	Restoration of <i>TP53</i> expression (Friedman et al. 2007; Kim et al. 2007b)
<i>PTEN</i>	Cowden syndrome	Cumulative lifetime risk is 25–50% (Longy and Lacombe 1996; Starink et al. 1986)	<1/10,000	mTOR inhibition (Gligorov et al. 2007; Mosley et al. 2007)
<i>STK11</i>	Peutz–Jeghers syndrome	Cumulative risk by 70 years is 30–50% (Giardiello et al. 2000; Hearle et al. 2006; Lim et al. 2004)	<1/10,000	mTOR inhibition (Katajisto et al. 2007)
<i>CDH1</i>	Familial diffuse gastric cancer	RR 6.6 (5.9–7.3) (Pharoah et al. 2001)	<1/10,000	Up-regulation of E-Cadherin (encoded by <i>CDH1</i> ) might be beneficial for cancer treatment (Bocca et al. 2007; Gapter et al. 2008; Wang et al. 2008)
<i>ATM</i>	Ataxia-telangiectasia	RR 2.37 (1.51–3.78) (Renwick et al. 2006)	1/33–333 (FitzGerald et al. 1997; Swift et al. 1986; Thompson et al. 2005)	Activation of ATM (Brew et al. 2006; Krishnan et al. 2007)
<i>CHEK2</i>		OR 2.6 (1.3–5.4) for 1100delC mutation (Meijers-Heijboer et al. 2002)	1/100–200 in certain populations (Mehenni et al. 2006; Vahteristo et al. 2002; Weischer et al. 2007)	Selective inhibition could be used in chemoprevention (Zhou and Bartek 2004)
<i>NBS1</i>	Nijmegen Breakage syndrome	OR 3.1 (1.4–7.0) in Russian population; OR 9.7 (1.3–73.2) in Byelorussian population (Steffen et al. 2006), for 657del5 mutation	Probably rare in most other populations	
<i>RAD50</i>		OR 4.3 (1.5–12.5) for 687delT in Finnish (Heikkinen et al. 2006)	Not observed in other populations	
<i>BRIP1</i>	Fanconi anemia	RR 2.0 (1.2–3.2) (Seal et al. 2006)	<1/1,000	In cells deficient for the FA pathway, inhibition of ATM results in cell death (Garcia and Benitez 2008; Kennedy et al. 2007)
<i>PALB2</i>		RR 2.3 (1.4–3.9) (Rahman et al. 2007)	<1/1,000	

### 3) Κοινά αλληλόμορφα γονίδια χαμηλής-διδυσδυκτικότητας.

Η τρίτη κατηγορία αποτελείται από γονίδια χαμηλής διεισδυτικότητας τα οποία προκαλούν μικρή αύξηση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Μόνο ένας μικρός αριθμός γονιδίων χαμηλής διεισδυτικότητας έχει αναβρεθεί μέχρι σήμερα. Μερικά απ' αυτά είναι το *CASP8*, το *FGFR2*, το *TNRC9*, το *MAP3K1* και το *LSP1* [30].

Οι φορείς μεταλλάξεων σε γονίδια χαμηλής διεισδυτικότητας έχουν Οι φορείς μεταλλάξεων στα γονίδια αυτά έχουν 1.25-πλάσιο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού στους ετερόζυγους φορείς σε σχέση με το γενικό πληθυσμό

#### ΠΙΝΑΚΑΣ 3: Κατάλογος γονιδίων χαμηλής διεισδυτικότητας [30]

**Table 2** Low penetrance breast cancer susceptibility genes and loci

Gene or locus	Per allele odds ratio (95% CI)	Minor allele frequency in Northern Europeans	References
<i>FGFR2</i>	1.26 (1.23–1.30)	0.38	Easton et al. (2007)
<i>TOX3 (TNRC9)</i>	1.14 (1.09–1.20)	0.46	
<i>MAP3K1</i>	1.13 (1.09–1.18)	0.28	
<i>LSP1</i>	1.06 (1.02–1.11)	0.3	
Locus on 8q	1.06 (1.01–1.11)	0.4	
Locus on 2q35	1.11 (1.03–1.20)	0.11–0.52 in various populations	Stacey et al. (2007)
Locus on 16q12	1.27 (1.19–1.36)	0.30–0.54 in various populations	
Loci on 5p12	1.19 (1.13–1.26), higher for ER-positive tumors	0.20–0.31 in various populations	Stacey et al. (2008)
Locus on 6q22.33	1.41 (1.25–1.59)	0.21 in Ashkenazi Jews	Gold et al. (2008)
<i>TGFB1</i>	1.07 (1.02–1.13)	0.68	Cox et al. (2007a)
<i>CASP8</i> (protective)	0.89 (0.85–0.94)	0.13	

Genes describe the region where SNPs have been associated with breast cancer risk, and risks refer to specific SNPs (see references for details)

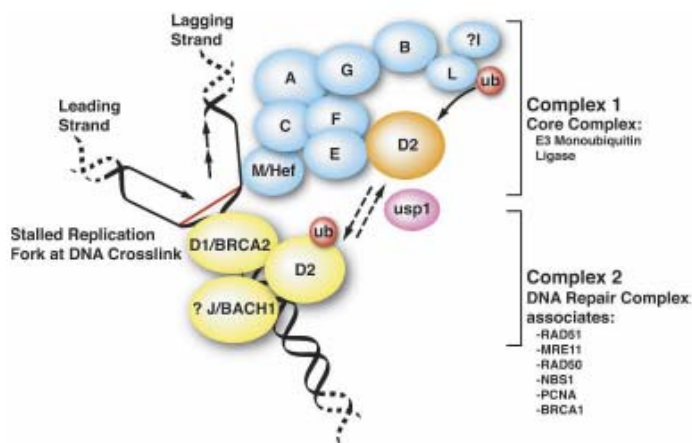
### 1.2.5 Fanconi Anemia

Τα γονίδια *PALB2*, *BRIP1* και *BRCA2* που προδιαθέτουν στον καρκίνου του μαστού ευθύνονται και για την ανάπτυξη αναιμίας Fanconi [31,32,33,34]. 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.

Η αναιμία Fanconi είναι μια σπάνια γενετική ασθένεια (κληρονομικό σύνδρομο) που χαρακτηρίζεται από την αποτυχία του μυελού των οστών (μη φυσιολογική μείωση

ερυθροκυττάρων και λευκοκυττάρων), διάφορες ανωμαλίες και υψηλή συχνότητα κακοηθιών [35]. Υπάρχουν 13 γονίδια που είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση αυτής της ασθένειας. Ως εκ τούτου, οι ασθενείς με Fanconi αναιμία παρουσιάζουν διαφορετικούς φαινοτύπους. Η αιτία της ασθένειας αυτής είναι η χρωμοσωμική αστάθεια λόγω της ύπαρξης μεταλλάξεων στα γονίδια αυτά [36]. Τα γονίδια που προκαλούν Fanconi αναιμία χωρίζονται σε τρεις ομάδες: 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 (*FANCD2*, *FANCI*). Όταν απουσιάζει έστω και μια από τις πρωτεΐνες της ομάδας I τότε η *FANCD2* και η *FANCI* δεν μπορούν να ουβικουτινιωθούν. Η ουβικουτινίωση 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 η βλάβη [35].

Οι πρωτεΐνες της ομάδας III είναι η *FANCD1/BRCA2*, η *FANCI/BRIP1* και η *FANCN/PALB2* δηλαδή οι πρωτεΐνες που εμπλέκονται στον κληρονομικό καρκίνο του μαστού. Οι πρωτεΐνες αυτές δρουν μετά από το ID complex αφού η έλλειψή τους δεν επηρεάζει την ουβικουτινίωση των πρωτεϊνών της ομάδας II. Το *PALB2* δημιουργεί σύμπλοκο με το *BRCA2* και το *BRCA1* ενώ το *BRIP1* δημιουργεί σύμπλοκο με το *BRCA1*, την *TOPBP1* (τοποισομεράση), το *MLH1* και το *PMS2*. Και τα 2 αυτά σύμπλοκα εμπλέκονται στην επιδιόρθωση του DNA μέσω ομόλογου ανασυνδιασμού [35,36].



**ΕΙΚΟΝΑ 9:** Τα γονίδια *PALB2*, *BRIP1* και *BRCA2* εμπλέκονται στο μονοπάτι της Fanconi αναιμίας [37]

### 1.3 BRIP1

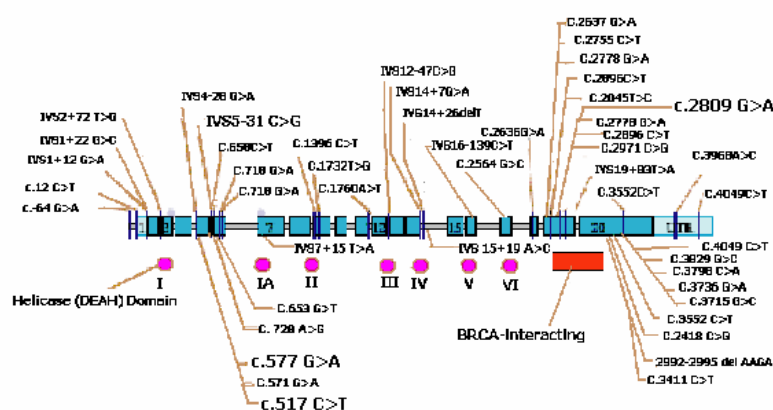
Το γονίδιο *BRIP1* (*BRCA1* interacting protein) γνωστό και ως *BACH* (*BRCA1*-associated carboxy-terminal helicase) και *FANCI* βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17q22 δίπλα από το γονίδιο *BRCA1* που βρίσκεται στο 17q21. Περιέχει 20 εξόνια και παρέχει τις οδηγίες για την κατασκευή μιας πρωτεΐνης με 1,249 αμινοξικά κατάλοιπα που εντοπίζεται στο πυρήνα και ανήκει στην οικογένεια των DEAH-ελικάσων. Τα κατάλοιπα 888-1,063 αλληλεπιδρούν με τις επαναλήψεις BRCT στο C-τελικό άκρο του *BRCA1* κατά τη διαδικασία της επιδιόρθωσης του DNA μέσω ομόλογου ανασυνδιασμού [27]. Η αλληλεπίδραση αυτή απαιτείται για τον έλεγχο της G2 φάσης του κυτταρικού κύκλου ως απάντηση στην βλάβη του DNA. Απαραίτητη για αυτή την αλληλεπίδραση είναι η φωσφορυλίωση της Ser 990 η οποία θα δώσει το ερέθισμα για την σύνδεση του *BRIP1* με το *BRCA1* [38]. Σημειώνεται ότι οι μεταλλάξεις που εμφανίζονται στις περιοχές BRCT είναι επαρκείς για να καταργήσουν την αλληλεπίδραση *BRCA1-BRIP1* in vivo [27]. Κάποιος μπορεί, επομένως, να υποθέσει ότι η εξασθένιση ή η απώλεια τέτοιας αλληλεπίδρασης, λόγω μεταλλαγών στο γονίδιο *BRIP1* που διαταράσσουν τη σταθερότητα ή /και την ικανότητα της πρωτεΐνης να συνδέεται με το *BRCA1*, προδιαθέτουν στην ανάπτυξη καρκίνου.

Το DNA βρίσκεται σε μορφή διπλής έλικας, και η πρωτεΐνη *BRIP1* η οποία περιέχει 7 διατηρημένες περιοχές ελικάσης (I, Ia, II, III, IV, V, VI) λειτουργεί ως ελικάση και συνδέεται με συγκεκριμένες περιοχές του DNA χωρίζοντας προσωρινά τα δύο σκέλη. Ξετυλίγοντας τα σκέλη κοντά στις περιοχές της DNA-βλάβης, επιτρέπει σε άλλες πρωτεΐνες (όπως η *BRCA1*) να συνδεθούν στις περιοχές αυτές. Με την επιδιόρθωση των λαθών στο DNA, η πρωτεΐνη *BRIP1* διαδραματίζει ρόλο στη διατήρηση της σταθερότητας των γενετικών πληροφοριών ενός κυττάρου και αποτρέπει τη συσσώρευση της γενετικής βλάβης στα κύτταρα που θα μπορούσε να προκαλέσει την ανεξέλεγκτη διαίρεση τους. Επίσης ελέγχει την κυτταρική ανάπτυξη και τη διαίρεση [39]. Μεταλλαγές μέσα σ' αυτές τις περιοχές ελικάσης αποδείχθηκε ότι παρεμποδίζουν την επιδιόρθωση σπασιμάτων διπλής-έλικας [40].

Επιπλέον το *BRIP1* λειτουργεί ως ATPάση και η υδρόλυση του ATP είναι σημαντική για την λειτουργία της *FANCI*.

Με βάση τις πιο πάνω λειτουργίες το γονίδιο *BRIP1* κατατάσσεται στη κατηγορία των ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Μια ομάδα ερευνητών διερεύνησε κατά πόσο παρατηρείται απώλεια ετεροζυγωτίας του γονιδίου *BRIP1* σε καρκινικό μαστικό ιστό. Η ανάλυση της ακολουθίας του DNA αποκάλυψε απώλεια του wild-type αλληλόμορφου γονιδίου στα κύτταρα όγκων, και κατά συνέπεια διατήρηση του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου γονιδίου, ενώ στα φυσιολογικά κύτταρα του μαστού παρατηρήθηκε απώλεια μόνο του ενός αλληλομόρφου με αποτέλεσμα την επικράτηση του wild-type. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι το γονίδιο *BRIP1* λειτουργεί ως ογκοκατασταλτικό [41]. Η συσσώρευση μεταλλάξεων στο γονίδιο *BRIP1* αυξάνει τον κίνδυνο καρκίνου του μαστού λόγω ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Συνολικά, τα στοιχεία προτείνουν ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο *BRIP1* μπορούν να εξηγήσουν ένα μικρό ποσοστό του κληρονομούμενου καρκίνου του μαστού [15].

Έγινε ένας αριθμός μελετών ανά το παγκόσμιο και διάφορες μεταλλάξεις ταυτοποιήθηκαν σε ασθενείς καρκίνου μαστού οι οποίες φαίνονται στην εικόνα 10 [32].



**ΕΙΚΟΝΑ 10:** Φαίνονται τα 20 εξόνια του γονιδίου *BRIP1/BACH1* με τις 46 ταυτοποιημένες γενετικές αλλαγές από τη Βιθεσδά (Maryland), Κίνα, Ιταλία και Κύπρο οι 7 περιοχές DEAH helicase καθώς και η περιοχή που αλληλεπιδρά με τη BRCT του *BRCA1* [41,42,43]



#### 1.4 ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η γενετική μελέτη του γονιδίου *BRIP1* σε οικογένειες με έντονο ιστορικό καρκίνου του μαστού που είναι αρνητικές σε μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1/2*. Η πρωτεΐνη που παράγεται από το γονίδιο *BRIP1* συνδέεται με το *BRCA1* και συμμετέχει στην επιδιόρθωση της DNA-βλάβης μέσω ομόλογου ανασυνδιασμού. Οι μεταλλάξεις που οδηγούν στην απώλεια λειτουργίας της πρωτεΐνης που παράγεται από το γονίδιο *BRIP1* οδηγούν σε αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού.

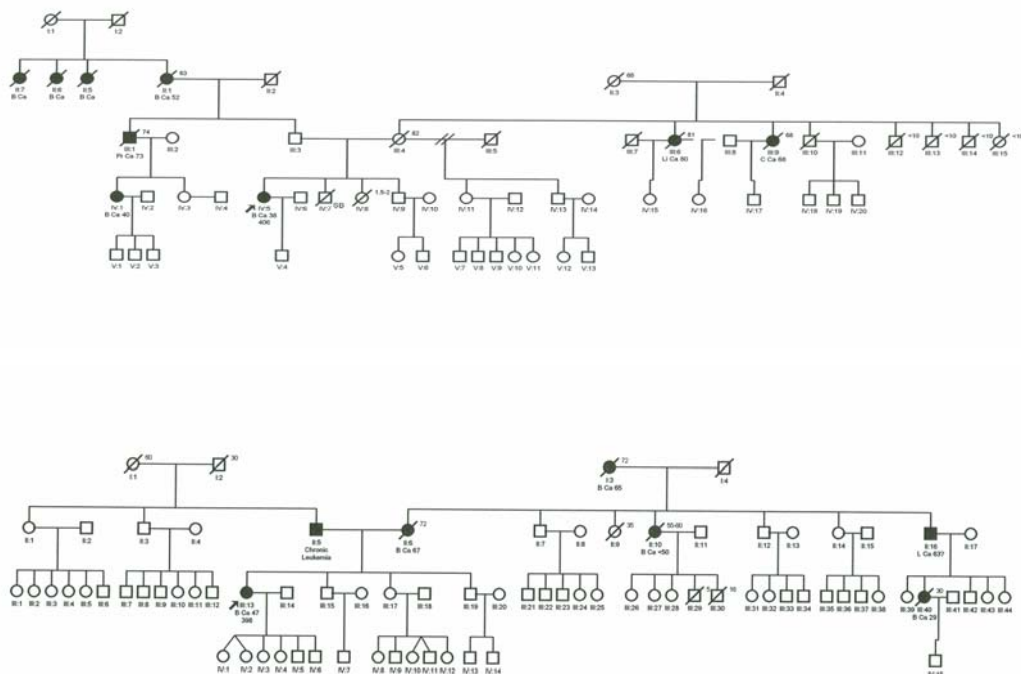
## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Συμμετέχοντες στη μελέτη

Στη μελέτη αυτή συμμετείχαν 21 γυναίκες με καρκίνο του μαστού ανεξαρτήτου ηλικίας οι οποίες είχαν βεβαρημένο οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού ή/και ωοθηκών. Οι γυναίκες αυτές προέρχονται από 21 διαφορετικές οικογένειες Ελληνοκυπριακής καταγωγής και ήταν αρνητικές για μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2*. Επιπλέον, οι συμμετέχοντες στη μελέτη έπρεπε να πληρούν τουλάχιστο 1 από τα ακόλουθα κριτήρια:

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

Στην εικόνα 11 φαίνονται παραδείγματα 2 γενεαλογικών δέντρων των ασθενών που μελετήθηκαν.



**ΕΙΚΟΝΑ 11:** Παραδείγματα γενεαλογικών δέντρων 2 εκ των ασθενών που μελετήθηκαν.

## 2.2 Απομόνωση γενωμικού DNA

Η απομόνωση του DNA έγινε από τα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος χρησιμοποιώντας τη μέθοδο φαινόλης-χλωροφορμίου, μια μέθοδο εκχύλισης υγρού-υγρού. Αρχικά, οι κυτταρικές και οι πυρηνικές μεμβράνες καταστρέφονται με τη συνδυασμένη δράση του SDS και της πρωτεΐνάσης K. Από τη λύση των μεμβρανών προκύπτουν κυρίως πρωτεΐνες, οι οποίες διαλύονται σε οργανικούς διαλύτες όπως τη φαινόλη και το χλωροφόρμιο. Το DNA είναι αδιάλυτο στην οργανική φάση και παραμένει στην υδατική φάση. Αφού κατακρημνιστεί, πλένεται, αποξηραίνεται και τελικώς επαναδιαλύεται σε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα.

Για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν τα ήδη απομονωμένα DNA τα οποία φυλάσσονταν σε συγκεντρώσεις των 10 ng/μl και σε θερμοκρασία 4°C στο εργαστήριο που πραγματοποιήθηκε η παρούσα εργασία.

## 2.3 Σχεδιασμός εκκινητών

Οι εκκινητές σχεδιαστήκαν ούτως ώστε να υβριδοποιούνται εκατέρωθεν των 20 εξονίων του γονιδίου *BRIP1* με τη χρήση του προγράμματος primer 3. Ο σχεδιασμός των εκκινητών έγινε με βάση τα ακόλουθα κριτήρια:

1. Το μέγεθος των εκκινητών δεν πρέπει να ξεπερνά τις 25 βάσεις
2. Η συμπληρωματική αλληλουχία των εκκινητών να βρίσκεται μόνο μια φορά στο ανθρώπινο γονιδίωμα
3. Οι εκκινητές να απέχουν τουλάχιστο 50 ζεύγη βάσεων από τις περιοχές ματίσματος.
4. Η θερμοκρασία τήξης ( $T_m$ ) όλων των εκκινητών να είναι παραπλήσια έτσι ώστε να υβριδοποιούνται αποτελεσματικά ανά ζεύγος αλλά και όλα τα ζεύγη μαζί στην ίδια θερμοκρασία.

Συνολικά σχεδιάστηκαν 21 ζεύγη εκκινητών (πίνακας 4).

**ΠΙΝΑΚΑΣ 4:** Όρια εξονίων του γονιδίου *BRIP1* καθώς και τα όρια των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν

Exon No	Begin	End	Size Bp	Primer F	Primer R
2	6856	6948	92	6773	7022
3	8488	8599	111	8417	8658
4	11164	11337	173	11085	11368
5	19139	19266	127	19075	19316
6	21175	21294	119	21104	21353
7	59638	59928	290	59557	60046
8	66921	67142	221	66818	67190
9	69096	69295	199	69031	69428
10	74666	74798	132	74611	74858
11	83971	84125	154	83919	84186
12	87390	87555	165	87273	87605
13	87994	88134	140	87939	88231
14	91833	91994	161	91777	92056
15	123804	123963	159	123718	124091
16	152332	152444	112	125196	125432
17	152332	152444	112	152209	152570
18	174883	174965	82	174814	175168
19	182230	182559	329	182134	182604
20	184255		844	184125	184598
				184538	185031
		185099		184927	185320

#### 2.4 Polymerase chain reaction (PCR) / Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η PCR με τη βοήθεια DNA πολυμεράσης χρησιμοποιείται για τη σύνθεση μεγάλου αριθμού αντιγράφων μιας αλληλουχίας DNA που βρίσκεται ανάμεσα στους εκκινητές οι οποίοι χρειάζονται για την έναρξη της σύνθεσης του DNA. Στη μελέτη αυτή η PCR χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση των 20 εξονίων του γονιδίου *BRIP1*.

Η τεχνική αυτή μπορεί να θεωρηθεί ανάλογη με την αντιγραφή του DNA, μια διαδικασία που λαμβάνει χώρα στα κύτταρα. Το αποτέλεσμα της PCR είναι το ίδιο με αυτό της αντιγραφής του DNA, παράγονται, δηλαδή, συμπληρωματικοί κλώνοι DNA από κάποιον ήδη υπάρχοντα κλώνο. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στη χρήση μιας

θερμοάντοχης 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 δίκλωνου DNA. Για το σκοπό αυτό, σχεδιάζονται κατάλληλα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, (εκκινητές) (βλ. 2.3), τα οποία είναι συμπληρωματικά με μια περιοχή που βρίσκεται πριν την επιθυμητή ακολουθία.

Η τεχνική της PCR χωρίζεται σε τρία στάδια:

- 1<sup>ο</sup> Στάδιο: Αποδιάταξη των κλώνων του DNA

Το δίκλωνο μόριο του DNA αποδιατάσσεται με θέρμανση σε θερμοκρασία 90-95 °C. Με αυτόν τον τρόπο, δημιουργούνται δυο μονόκλωνες αλυσίδες και το τμήμα που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί, μπορεί πλέον να χρησιμοποιηθεί για τα επόμενα στάδια. Κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου, σταματούν όλες οι ενζυμικές δραστηριότητες, όπως για παράδειγμα, η επιμήκυνση της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας.

- 2<sup>ο</sup> Στάδιο: Υβριδισμός

Η θερμοκρασία στο στάδιο αυτό μειώνεται στους 50-75 °C και τα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (εκκινητές), υβριδίζονται με τη συμπληρωματική περιοχή πάνω στο DNA εκμαγείο, μέσω δεσμών υδρογόνου. Η επιλογή της θερμοκρασίας υβριδισμού είναι πολύ σημαντική και εξαρτάται από τη σύσταση καθώς και από το μήκος των εκκινητών. Αν η επιλεγμένη θερμοκρασία δεν είναι η σωστή, είναι δυνατό να μην παραχθούν προϊόντα ή να παραχθούν παραπροϊόντα.

- 3<sup>ο</sup> Στάδιο: Πολυμερισμός

Στο στάδιο αυτό η DNA πολυμεράση χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο την μονόκλωνη αλυσίδα και αναγνωρίζοντας την ελεύθερη –OH ομάδα, συνθέτει τη συμπληρωματική αλυσίδα, προσθέτοντας νουκλεοτίδια στο 3' άκρο του εκκινητή. Η σύνθεση του DNA συνεχίζεται έως ότου οι δυο νεοσυντιθέμενες αλυσίδες επιμηκυνθούν τόσο ώστε να περιέχουν περισσότερα νουκλεοτίδια από το επιθυμητό τμήμα του DNA. Η διάρκεια του πολυμερισμού εξαρτάται από το μήκος της πολλαπλασιαζόμενης ακολουθίας. Η πολυμεράση που χρησιμοποιείται είναι θερμοάντοχη, ώστε να μπορεί να παραμείνει ενεργή παρά τις υψηλές θερμοκρασίες

των προηγούμενων σταδίων. Ο κύκλος αυτός επαναλαμβάνεται αρκετές φορές και παράγονται  $2^n$  μόρια DNA, όπου «n» είναι ο αριθμός των διεξαγόμενων κύκλων

Στους πίνακες που ακολουθούν, παρουσιάζονται αναλυτικά τα συστατικά του μίγματος που χρησιμοποιήθηκε στην κάθε μία από τις αντιδράσεις PCR (πίνακας 5), όπως επίσης οι συνθήκες PCR της κάθε αντίδρασης (πίνακας 6). Σημειώνεται ότι για κάθε αντίδραση PCR προστέθηκαν 3  $\mu$ l DNA συγκέντρωσης 10 ng/ $\mu$ l. Επιπλέον αναφέρεται ότι για την ενεργοποίηση της χρησιμοποιούμενης DNA πολυμεράσης, το αντιδρών μίγμα εκτέθηκε στους 94 °C για 10 λεπτά, πριν την έναρξη των κύκλων της PCR. Για την ολοκλήρωση της αντίδρασης, μετά το τέλος των κύκλων, το μίγμα της αντίδρασης παρέμεινε στους 72 °C για 7 λεπτά.

Οι αντιδράσεις έλαβαν χώρα σε πλάκες 96 θέσεων (96-well plates) ενώ οι μηχανές PCR που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής: Applied Biosystems Gene Amp, PCR System 9700, PCR System 2700.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 5:** Συστατικά του μίγματος της PCR για τη μελέτη του γονιδίου BRIP1

Συστατικό	Όγκος / 1X ( $\mu$ l)
DNA εκμαγείο 10 ng/ $\mu$ l	3
Εκκινητής νοηματικός ( <i>Forward</i> ) 10 Mm	1
Εκκινητής αντινοηματικός ( <i>Reverse</i> ) 10 mM	1
Μίγμα δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) 200 mM	4
Ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης 10X	2,5
DNA πολυμεράση (Taq) 5 units/ $\mu$ l	0,2
H <sub>2</sub> O	14,5
<b>Τελικός όγκος μίγματος</b>	<b>25</b>

**ΠΙΝΑΚΑΣ 6:** Συνθήκες της PCR για την μελέτη του γονιδίου BRIP1

Συνθήκες PCR		
<b>Αποδιάταξη κλώνων DNA</b>	Θερμοκρασία: 94 °C Χρόνος: 20 s	
<b>Υβριδισμός</b>	Θερμοκρασία: 55 °C Χρόνος: 20 s	Αριθμός κύκλων: 40
<b>Πολυμερισμός</b>	Θερμοκρασία: 72 °C Χρόνος: 20 s	

## 2.5 Ηλεκτροφόρηση τμημάτων DNA σε πηκτές αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση τμημάτων DNA σε πηκτές αγαρόζης γίνεται για τον διαχωρισμό κατά μέγεθος των προς μελέτη τμημάτων DNA. Η μέθοδος βασίζεται στη μετακίνηση των αρνητικά φορτισμένων μορίων DNA προς την κάθοδο, σε συνθήκες ουδέτερου pH. Η ταχύτητα μετακίνησης των τμημάτων DNA εξαρτάται από το μέγεθος τους, τη διαμόρφωση τους, τη συγκέντρωση της αγαρόζης στην πηκτή, το δυναμικό που εφαρμόζεται και τη σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος που χρησιμοποιείται.

Για την εφαρμογή της μεθόδου παρασκευάζονται πηκτές με τήξη αγαρόζης. Η αγαρόζη είναι ένας πολυσακχαρίτης υψηλού μοριακού μεγέθους. Πρόκειται για γραμμικό πολυμερές με βασική μονάδα την D-γαλακτόζυλο-3,6-άνυδρο-L-γαλακτόζη. Η αγαρόζη τήκεται με θέρμανση, παρουσία κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν πηκτές αγαρόζης 2% w/v για εξακρίβωση της επιτυχίας των PCR. Χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα TBE συγκέντρωσης 1X.

### Ρυθμιστικό διάλυμα TBE:

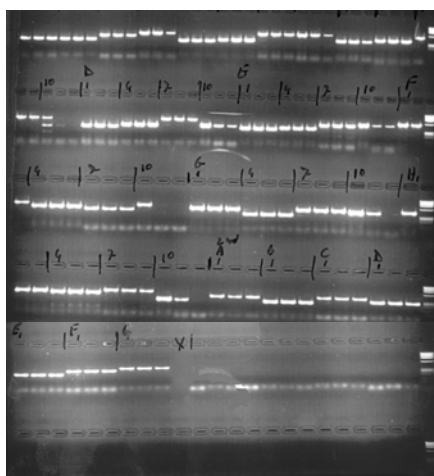
Tris Base	89 mM
Βορικό οξύ	89 mM
EDTA	2 mM (pH 8.0)

Για την παρασκευή της πηκτής αρχικά γίνεται διάλυση της αγαρόζης στο ρυθμιστικό διάλυμα με θέρμανση και κατά διαστήματα ανάδευση. Αφού το διάλυμα γίνει διανυγές, ακολουθεί η ελάττωση της θερμοκρασίας του μίγματος και η προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου  $C_{21}H_{20}BrN_3$  (EtBr). Στη συνέχεια το μίγμα αποχύνεται στο ειδικό πλαίσιο (στο οποίο έχουν ήδη τοποθετηθεί τα ειδικά «κτενάκια» για τον σχηματισμό των κελλίων), και αφήνεται να κρυώσει και να πήξει. Για την ηλεκτροφόρηση προστίθεται στη συσκευή διάλυμα TBE με συγκέντρωση ίδια με αυτή του ρυθμιστικού διαλύματος μέσα στο οποίο διαλύθηκε η αγαρόζη.

Αφού σχηματιστεί η πηκτή, αφαιρούνται τα ειδικά κτενάκια και τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης, όπου γίνεται η φόρτωση των δειγμάτων. Στο τελευταίο κελλί κάθε γραμμής δειγμάτων που φορτώνεται, εισάγεται ποσότητα γενετικού

σημειωτή φX174 DNA HaeIII Digest, ο οποίος αποτελείται από διαφορετικού μεγέθους τμήματα DNA, τα οποία είναι γνωστά από τον κατασκευαστή. Αυτό γίνεται για να εξακριβώνεται κάθε φορά ότι το μέγεθος των τμημάτων DNA που «διαβάζονται» έπειτα από τη φωτογράφιση παρουσία UV ακτινοβολίας, είναι το αναμενόμενο και ότι δεν έχει προκληθεί κάποια επιμόλυνση από άλλο τμήμα DNA διαφορετικού μεγέθους (εικόνα 12).

Η φωτογράφιση της πηκτής παρουσία UV ακτινοβολίας και ο διαχωρισμός των ζωνών των τμημάτων DNA επιτυγχάνεται λόγω της παρουσίας του EtBr στην πηκτή. Το EtBr είναι μια φθορίζουσα ένωση η οποία παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA. Έχει την ιδιότητα να απορροφά την υπεριώδη ακτινοβολία στα 302 και 366 nm και να επανεκπέμπει στην περιοχή του κόκκινου ορατού φάσματος. Η ένταση της ακτινοβολίας είναι ανάλογη της ποσότητας του DNA, ενώ το ελεύθερο EtBr φθορίζει πολύ λιγότερο από το σύμπλοκο DNA-EtBr. Για το λόγο αυτό μπορούν να ανιχνευθούν ακόμα και ελάχιστες ποσότητες DNA.



**ΕΙΚΟΝΑ 12:** Χαρακτηριστικό παράδειγμα πηκτής αгарόζης στην οποία φαίνονται τα προϊόντα της PCR

## 2.6 Καθαρισμός των προϊόντων της PCR (PCR purification)

Τα προϊόντα της PCR καθαρίστηκαν με τη χρήση των ενζύμων Exo I (εξονουκλεάση I) και SAP (αλκαλική φωσφατάση γαρίδων). Με τη μέθοδο αυτή αποφωσφορυλιώνονται τα dNTPs και οι εκκινητές που απέμειναν από τη αντίδραση της PCR με το ένζυμο SAP και διασπάται η μονή αλυσίδα του DNA με το ένζυμο Exo I. Για καθαρισμό 5μl PCR χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 1 U SAP και 5 U Exo I

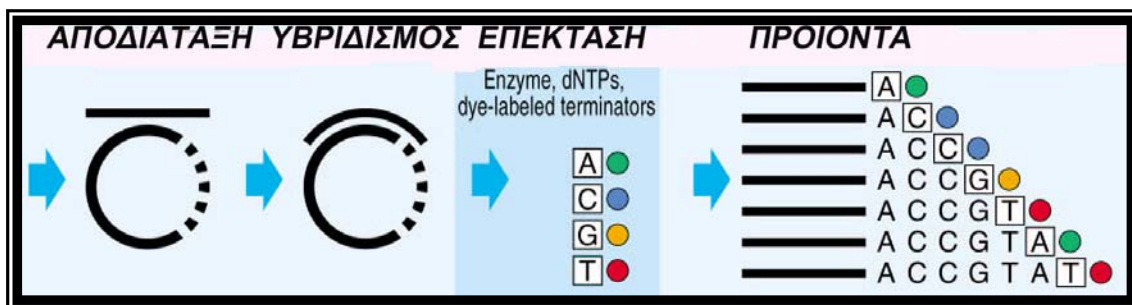
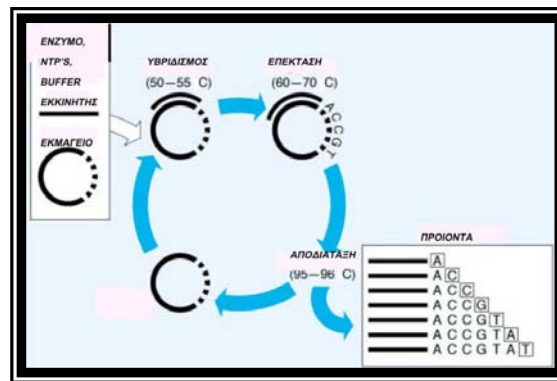


σε τελικό όγκο 7μl. Οι αντιδράσεις επώστηκαν στους 37°C για 30 λεπτά και ακολούθως έγινε απενεργοποίηση των ενζύμων στους 80°C για 15 λεπτά.

## **2.7 Μέθοδος αναφοράς ανάγνωσης DNA ακολουθίας (Cycle Sequencing)**

Ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας βασίζεται στη μέθοδο Sanger (ενζυμική μέθοδος), που αναπτύχθηκε στα τέλη της δεκαετίας του '70. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, χρησιμοποιείται η μία αλυσίδα του DNA ως μήτρα για τη σύνθεση μιας συμπληρωματικής αλυσίδας παρουσία συνηθισμένων νουκλεοτιδίων (τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοζιτών, dNTPs), αλλά και διδεόξυ αναλόγων τους (τριφωσφορικών 2',3'-διδεοξυριβονουκλεοζιτών, ddNTPs) σε καθορισμένη ποσότητα. Από τα ddNTPs απουσιάζει η ομάδα 3'-OH με αποτέλεσμα όταν ενσωματώνονται στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα του DNA, να δρουν ως σημεία λήξης, καθώς παρεμποδίζεται η προσθήκη του επόμενου νουκλεοτιδίου. Παρουσία του κατάλληλου εκκινητή αλλά και της DNA πολυμεράσης, συντίθενται τμήματα DNA που όλα ξεκινούν από το ίδιο σημείο, αλλά καταλήγουν σε διαφορετικά σημεία κατά μήκος της αλυσίδας του DNA.

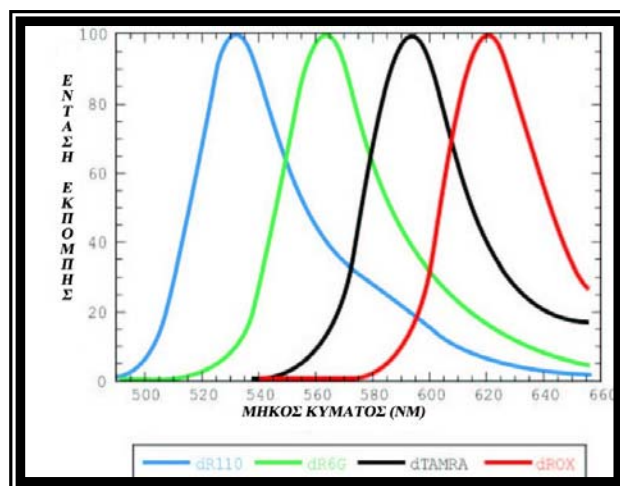
Σε ένα μίγμα αντίδρασης, όπου περιέχονται και τα τέσσερα dNTPs, προστίθεται μικρή και συγκεκριμένη ποσότητα ενός ddNTP. Πραγματοποιούνται τέσσερις αντιδράσεις, μία για κάθε ddNTP. Καθώς αρχίζει ο πολυμερισμός, τα διδεόξυ νουκλεοτίδια ανταγωνίζονται για τις θέσεις ενσωμάτωσης με το φυσιολογικό ανάλογό τους, με αποτέλεσμα μερικές φορές να ενσωματώνονται στην αλυσίδα και να επέρχεται λήξη του πολυμερισμού. Είναι σημαντική η ισορροπημένη αναλογία dNTPs και ddNTPs, ώστε σε κάθε θέση μέσα στην αλληλουχία-στόχο, να υπάρχουν ίσες πιθανότητες ενσωμάτωσης διδεόξυ-νουκλεοτιδίων. Στο τέλος, προκύπτουν τέσσερα μίγματα από σημασμένες αλυσίδες, τα μήκη των οποίων εξαρτώνται από τη σχετική θέση της συγκεκριμένης βάσης από το άκρο του DNA και ανάλογα με την αντίδραση, λήγουν σε A, G, T ή C.



**ΕΙΚΟΝΑ 13:** Ανάγνωση αλληλουχίας DNA με τη μέθοδο των θερμικών κύκλων (διασκευή από εγχειρίδιο ABI).

## 2.8 Μεθοδολογία ανάγνωσης DNA ακολουθίας

Στη συγκεκριμένη μελέτη η ανάγνωση της DNA ακολουθίας έγινε με τη μέθοδο των θερμικών κύκλων (Cycle Sequencing). Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, γίνεται αντίδραση PCR σε ένα προηγούμενα παραχθέν προϊόν PCR με έναν απλό εκκινητή και προσθήκη των τεσσάρων φθοριζόντων Big Dye Terminators στο ίδιο σωληνάριο. Πρόκειται για 4 ζεύγη φθοριζουσών χρωστικών που επισημαίνουν ανά δύο έκαστο από τα 4 ddNTP's που τερματίζουν τον εκάστοτε πολυμερισμό. Το ένα από τα δύο μέλη του κάθε ζεύγους είναι ίδιο για όλα τα νουκλεοτίδια: η 6-καρβόξυ-φλουορεσκεινή (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 τέλος η διχλωρο-[TAMRA] για το ddTTP (ή ddUTP), με μη αλληλοεπικαλυπτόμενα φάσματα εκπομπής (εικόνα 14).



**ΕΙΚΟΝΑ 14:** Φάσματα εκπομπής των τεσσάρων χρωστικών.

Το ένζυμο που χρησιμοποιείται είναι η DNA πολυμεράση AmpliTaq FS (Fluorescent sequencing) γενετικά τροποποιημένη σε δύο θέσεις (F667Y και G46D) ώστε να χρησιμοποιεί ομοιόμορφα τόσο τα dNTP's όσο και τα ddNTP's αλλά και να στερείται ενεργότητας 5'-3' ενδονουκλεάσης. Επίσης στην αντίδραση προστίθεται *rTth* πυροφωσφατάση για να απομακρύνει τα παραπροϊόντα PPi. Η αλληλουχία DNA των προϊόντων της PCR αναλύεται με χρήση ενός εκ των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την αρχική ενίσχυση. Τα συστατικά της αντίδρασης cycle sequencing καθώς και οι συνθήκες της αντίδρασης αναφέρονται στους πίνακες που ακολουθούν (πίνακες 7 και 8).

**ΠΙΝΑΚΑΣ 7:** Συστατικά της αντίδρασης Cycle Sequencing PCR.

Αντιδραστήριο	Όγκος (μl)
H <sub>2</sub> O	4
Ρυθμιστικό διάλυμα sequencing 5X	1
Εκκινητής (10mM)	1
Μίγμα RR	1
Προϊόν PCR	3
Τελικός όγκος	10

*ΠΙΝΑΚΑΣ 8: Πρόγραμμα Cycle Sequencing PCR.*

Στάδιο Cycle Sequencing PCR	Συνθήκες
Διαχωρισμός των κλώνων του PCR προϊόντος	95°C / 10 s
Υβριδισμός εκκινητού	55°C / 10 s
Επέκταση εκκινητού	60°C / 2 min
Διατήρηση	4°C
Αριθμός κύκλων	25

## 2.9 Καθαρισμός από ελεύθερα νουκλεοτίδια

Για τον καθαρισμό των προϊόντων του cycle sequencing χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος καθαρισμού ελεύθερων νουκλεοτιδίων. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στο διαχωρισμό των μορίων βάσει του μοριακού τους βάρους και περιλαμβάνει δύο στάδια. Αρχικά το ειδικό plate (96-well gel filtration column plates) φυγοκεντράται για 2 λεπτά στις 1500 rpm ώστε να σχηματιστούν 96 «κολώνες». Ακολούθως προστίθενται τα προϊόντα του Cycle Sequencing στις κολώνες και το ειδικό plate ξαναφυγοκεντράται για 2 λεπτά στις 1500 rpm και τα καθαρισμένα προϊόντα συλλέγονται σε δεύτερο plate.

Το ειδικό plate περιείχε gel με μικρούς πόρους και έτσι τα μικρού μοριακού βάρους μόρια (dNTPs, ddNTPs, εκκινητές) συγκρατούνται μέσα στους πόρους ενώ τα μεγάλου μοριακού βάρους μόρια (DNA) με την φυγοκέντρωση περνούν διαμέσου της στήλης και ακολούθως συλλέγονται.

## 2.10 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 φέρνει κάθε δείγμα σε επαφή με το ηλεκτρόδιο καθόδου που βρίσκεται στο ένα άκρο γυάλινου τριχοειδούς μήκους 37 cm και εσωτερικής διαμέτρου 50  $\mu$ m, ο οποίος περιέχει ειδικό πολυμερές. Το ηλεκτρόδιο ανόδου βρίσκεται στο άλλο άκρο του τριχοειδούς σωλήνα, εμβαπτισμένο μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα. Μέρος του δείγματος εισάγεται στον τριχοειδή σωλήνα ενώ παράλληλα υπάρχει ροή ρεύματος από την κάθοδο προς την άνοδο. Έπειτα το τελικό τμήμα του τριχοειδούς σωλήνα κοντά στην κάθοδο βυθίζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα και εφαρμόζεται ξανά ηλεκτρικό ρεύμα για τη συνέχιση της

ηλεκτροφόρησης. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται με τάση 15 kV στους 50°C με τη βοήθεια του ρυθμιστικού διαλύματος εργασίας 1X Genetic Analyzer με EDTA.

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 ολιγονουκλεοτιδίων. 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.

Ακολούθως οι αλληλουχίες στοιχήθηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Sequencher PC Software (GeneCodes Inc, USA) με φυσιολογικές αλληλουχίες από το διαδίκτυο (reference sequences).



**EIKONA 15:** Αυτόματος αναλυτής γενετικού υλικού (ABI 3130XL)

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αναλύθηκαν συνολικά 21 δείγματα DNA για την ύπαρξη μεταλλάξεων στο γονίδιο *BRIP1*. Τα δείγματα αυτά προέρχονταν από γυναίκες ασθενείς με καρκίνο του μαστού οι οποίες είχαν βεβαρημένο οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού ή/και ωοθηκών και ήταν αρνητικές για μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2*. Συνολικά, ενισχύθηκαν και αναλύθηκαν όλες οι κωδικές περιοχές (19 εξόνια) του γονιδίου *BRIP1* καθώς και όλες οι περιοχές ματίσματος.

Η γενετική ανάλυση του γονιδίου *BRIP1* οδήγησε στην ταυτοποίηση 8 αλλαγών. Οι δύο από αυτές βρίσκονται σε περιοχή ιντρονίων, μία στη 3' αμετάφραστη περιοχή, δύο στο εξόνιο 6, δύο στο εξόνιο 19 και μια στο εξόνιο 20. Από τις αλλαγές που βρίσκονται σε κωδικές περιοχές οι τέσσερις είναι παρανοηματικές (αλλαγή στο νόημα του κωδικονίου) και οι υπόλοιπες δύο είναι σιωπηλές λόγω εκφυλισμού του κώδικα. Όλες οι αλλαγές που ανευρέθηκαν στα δείγματα που μελετήθηκαν παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 9

**ΠΙΝΑΚΑΣ 9:** Οι αλλαγές που βρέθηκαν στο γονίδιο *BRIP1* από την ανάλυση των 21 δειγμάτων

Εξόνιο / ιντρόνιο	Αριθμός νουκλεοτιδίου*	Αριθμός νουκλ. mRNA**	Κωδικόνιο	Νουκλεοτιδική αλλαγή	Αλλαγή αμινοξέος	Χαρακτηρισμός αλλαγής	Τύπος αλλαγής	Συχνότητα
Ιντρόνιο 5	21144	-	-	C → G	-	IVS5-31 C>G	ιντρονίου	4/21
Εξόνιο 6	21184	517	172	C → T	p.Arg172Cys	c.517 C>T	παρανοηματική	1/21
Εξόνιο 6	21244	577	193	G → A	p.Val193 Ile	c.577G>A	παρανοηματική	1/21
Ιντρόνιο 9	69404	-	-	G → A	-	IVS9+109 G>A	ιντρονίου	4/21
Εξόνιο 19	182291	2637	879	G → A	p.Glu879Glu	c.2637 G>A	σιωπηλή	8/21
Εξόνιο 19	182409	2755	919	C → T	p.Pro919Ser	c.2755 C>T	παρανοηματική	10/21
Εξόνιο 20.2	184760	3411	1137	C → T	p.Tyr1137Tyr	c.3411 C>T	Σιωπηλή	8/21
3' UTR	185257	-	-	C → T	-	3' *216	3'UTR	11/21

\* Οι αριθμοί αντιστοιχούν στη αλληλουχία αναφοράς του γονιδίου *BRIP1*, NG\_007409

\*\* Οι αριθμοί αντιστοιχούν στο mRNA του γονιδίου *BRIP1*, NM\_032043

Στον πίνακα 10 παρουσιάζονται αναλυτικά οι 8 αλλαγές που βρέθηκαν στο γονίδιο *BRIP1* ανά ασθενή καθώς και ο χαρακτηρισμός τους ως ετερόζυγες ή ομόζυγες. Οι ασθενείς μπορεί να φέρουν την μετάλλαξη μόνο στο ένα από τα δύο αλληλόμορφα (ετερόζυγοι) ή να την φέρουν και στα δύο αλληλόμορφα (ομόζυγοι)

**ΠΙΝΑΚΑΣ 10:** Αναλυτικά οι 8 αλλαγές που βρέθηκαν στο γονίδιο *BRIP1* ανά ασθενή και ο χαρακτηρισμός τους ως ομόζυγες ή ετερόζυγες

Δείγμα	IVS5-31C>G	c.517C>T	c.577G>A	IVS9+109G>A	c.2637G>A	c.2755C>T	c.3411C>T	3'*216C>T
	6	6	6	9	19	19	20	20
204	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN
221	NN	NN	NN	NN	Nm	N m	NN	Nm
291	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN
309	NN	NN	NN	NN	Nm	Nm	Nm	Nm
376	Nm	NN	NN	NN	Nm	Nm	Nm	Nm
381	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN
395	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN
398	Nm	NN	NN	NN	Nm	Nm	Nm	Nm
405	NN	NN	NN	Nm	Nm	Nm	Nm	Nm
406	NN	NN	NN	NN	Nm	Nm	NN	Nm
424	NN	NN	NN	NN	NN	Nm	Nm	Nm
433	NN	NN	NN	NN	NN	Nm	NN	Nm
443	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN
446	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN
458	NN	NN	NN	Nm	Nm	Nm	Nm	Nm
483	NN	NN	NN	Nm	Nm	Nm	Nm	Nm
488	NN	NN	NN	NN	MM	MM	MM	MM
527	Nm	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN
540	Nm	NN	Nm	Nm	Nm	Nm	Nm	Nm
612	NN	Nm	NN	NN	NN	NN	NN	NN
650	NN	NN	NN	NN	NN	Nm	Nm	Nm
NN	17	20	20	17	12	8	11	8
Nm	4	1	1	4	8	12	9	12
MM	-	-	-	-	1	1	1	1

**NN:** άγριος τύπος

**Nm:** ετερόζυγες αλλαγές

**MM:** ομόζυγες αλλαγές

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Είναι γενικά αποδεχτό ότι ο καρκίνος του μαστού είναι μια γενετική ασθένεια. Υπάρχουν διάφορα γονίδια τα οποία συνδέονται με τον κληρονομικό καρκίνο του μαστού τα οποία διαχωρίζονται σε 3 κύριες κατηγορίες. (βλ. εισαγωγή 1.2.3). Τα σημαντικότερα γονίδια που προδιαθέτουν στον καρκίνο του μαστού είναι το *BRCA1* και το *BRCA2* τα οποία κατατάσσονται στην κατηγορία των γονιδίων υψηλής διεισδυτικότητας [15]. Τα γονίδια αυτά εξηγούν όμως μόνο το 16% του κληρονομικού καρκίνου [21]. Επομένως άτομα με κληρονομικό καρκίνο και αρνητικά σε μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2* πιθανόν να έχουν μεταλλάξεις σε γονίδια ενδιάμεσης διεισδυτικότητας όπως για παράδειγμα το *BRIP1*, το *PALB2* και το *CHEK2*.

Η συμβολή του γονιδίου *BRIP1* στον κληρονομικό καρκίνο του μαστού στον Κυπριακό πληθυσμό δεν έχει διερευνηθεί μέχρι στιγμής. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, φορείς παθογόνων μεταλλάξεων στο γονίδιο *BRIP1* έχουν αυξημένες πιθανότητες ανάπτυξης καρκίνου του μαστού. Σκοπός της μελέτης αυτής ήταν η διερεύνηση της συμβολής του γονιδίου *BRIP1* 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*.

Η γενετική ανάλυση οδήγησε στην ανεύρεση συνολικά 3 παρανοηματικών αλλαγών (c.517 C>T, c.577G>A και c.2755 C> T). Όλες οι παρανοηματικές αλλαγές έχουν βρεθεί και σε ασθενείς από άλλες χώρες καθώς και σε υγιείς μάρτυρες. Η βιβλιογραφία αναφέρει ότι η παρουσία των πιο πάνω αλλαγών δεν φαίνεται να συνδέεται με την εμφάνιση καρκίνου του μαστού.

Η παρανοηματική αλλαγή c.517 C>T (p.Arg172Cys) προκαλεί μετατροπή της αργινίνης στη θέση 172 σε κυστεΐνη στο εξόνιο 6 του γονιδίου *BRIP1* στην περιοχή ελικάσης (εικόνα 16). Η αλλαγή αυτή εντοπίστηκε μόνο σε ένα δείγμα. Σύμφωνα με



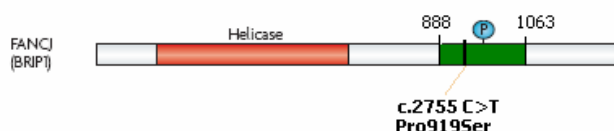
τον Lewis και τους συνεργάτες του, η αλλαγή αυτή δεν είναι παθογόνα μια και βρέθηκε και σε υγιείς μάρτυρες [42].

Η παρανοηματική αλλαγή c.577G>A (p.Val193Ile) προκαλεί τη μετατροπή της βαλίνης στη θέση 193 σε ισολευκίνη επίσης στο εξόνιο 6 του γονιδίου *BRIP1* (εικόνα 16). Η αλλαγή αυτή εντοπίστηκε μόνο σε ένα δείγμα. Υπάρχουν πολλές δημοσιευμένες μελέτες που να αποδεικνύουν ότι η αλλαγή αυτή δεν συνδέεται με την εμφάνιση καρκίνου του μαστού [27,41,42,44,45].

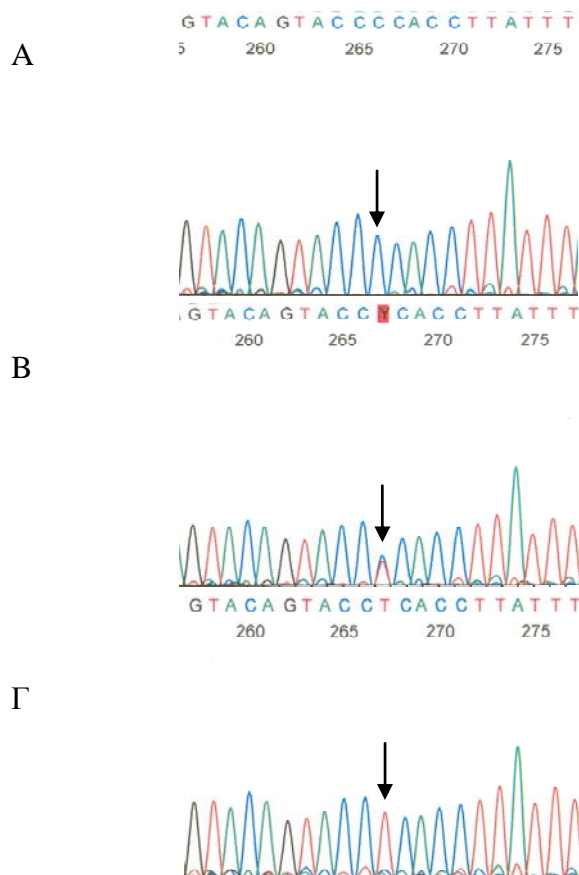


**EΙΚΟΝΑ 16:** Απεικόνιση των αλλαγών c.517 C>T και c.577G>A στην περιοχή ελικάσης του γονιδίου *BRIP1*

Η παρανοηματική αλλαγή c.2755 C>T (p.Pro919Ser) προκαλεί μετατροπή της προλίνης στη θέση 919 σε σερίνη στο εξόνιο 19 του γονιδίου *BRIP1* (εικόνα 18). Η Pro919 βρίσκεται στη περιοχή σύνδεσης του *BRIP1* γονιδίου με το *BRCA1* (BRCT) (888-1063) παράγοντας έτσι μια πιθανή περιοχή φωσφορυλίωσης (εικόνα 17). Η συσχέτιση τέτοιου πολυμορφισμού και ενός αυξανόμενου κινδύνου καρκίνου του μαστού από την ηλικία 50 ετών δεν είναι επιβεβαιωμένη, μέχρι στιγμής [27]. Μελέτη που έγινε στο Κυπριακό πληθυσμό κατέληξε ότι η συγκεκριμένη αλλαγή μπορεί να θεωρηθεί πολυμορφισμός μια και βρέθηκε σε μεγάλη συχνότητα σε δείγμα υγιών μαρτύρων [47].



**EΙΚΟΝΑ 17:** Απεικόνιση της αλλαγής c.2755 C>T στο γονίδιο *BRIP1* στην περιοχή σύνδεσης με το *BRCA1*



**ΕΙΚΟΝΑ 18:** Παράδειγμα αλληλούχισης της παρανοηματικής αλλαγής p.Pro919Ser A) άγριος τύπος B) ετερόζυγος φορέας Γ) ομόζυγος φορέας

Η γενετική ανάλυση οδήγησε στην ανεύρεση συνολικά δύο σιωπηλών αλλαγών (c.2637 G>A και c.3411 C>T). Οι δύο αυτές αλλαγές έχουν βρεθεί προηγουμένως τόσο σε ασθενείς από άλλες χώρες καθώς και σε υγιείς μάρτυρες [46]. Οι αλλαγές αυτές κατατάσσονται στους ουδέτερους πολυμορφισμούς και δεν θεωρούνται σημαντικές για την αύξηση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του μαστού (αφού δεν προκαλείται αλλαγή στο αμινοξύ και συνεπώς ούτε στη δομή της πρωτεΐνης).

Στα δείγματα που μελετήθηκαν βρέθηκαν επίσης 2 αλλαγές σε περιοχές ιντρονίων. Η αλλαγή IVS9+109 G>A βρίσκεται στο ιντρόνιο 9 και αντίστοιχα η αλλαγή IVS5-31 C>G στο ιντρόνιο 5. Οι αλλαγές που βρίσκονται στις περιοχές των ιντρονίων δίπλα από τα εξόνια μπορεί να επηρεάσουν το μάτισμα. Οι συγκεκριμένες όμως αλλαγές που βρέθηκαν στο γονίδιο *BRIP1* απέχουν αρκετά από τις περιοχές ματίσματος και συνεπώς είναι απίθανο να επηρεάζουν το μάτισμα.

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 *BRIP1*. Οι μελέτες αυτές δεν οδήγησαν στην ανεύρεση μεγάλων αναδιατάξεων στο γονίδιο *BRIP1* [27,41,42,44,45, 46]. 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 *BRIP1* στην Κύπρο.

Η γενετική μελέτη του γονιδίου *BRIP1* σε ελληνοκύπριες ασθενείς με καρκίνο του μαστού, δεν κατέδειξε ότι το συγκριμένο γονίδιο συμβάλλει σημαντικά 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.

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

1. Malin Dollinger, Ernest Rosenbaum, Greg Cable: Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ. Κάτοπτρο, 1992
2. B. Lewin: GENES VIII. Ακαδημαϊκές Εκδόσεις 2004
3. *Stryer*: Βιοχημεία I. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, 2006
4. Potter VR: A new protocol and its rationale for the study of initiation and promotion of carcinogenesis in rat liver. *Carcinogenesis* 1981, 2:1375-1379.
5. Miller DR, Viaje A, Aldaz CM, Conti CJ, Slaga TJ: Terminal differentiation-resistant epidermal cells in mice undergoing two-stage carcinogenesis. *Cancer Res* 1987, 47:1935-1940.
6. Trosko JE, Chang CC: Stem cell theory of carcinogenesis. *Toxicol Lett* 1989, 49:283-295.
7. Trosko JE, Chang CC, Medcalf A: Mechanisms of tumor promotion: potential role of intercellular communication. *Cancer Invest* 1983, 1:511-526.
8. Hennings H, Shores R, Wenk ML, Spangler EF, Tarone R, Yuspa SH: Malignant conversion of mouse skin tumours is increased by tumour initiators and unaffected by tumour promoters. *Nature* 1983, 304:67-69.
9. Koufos A, Hansen MF, Copeland NG, Jenkins NA, Lampkin BC, Cavenee WK: Loss of heterozygosity in three embryonal tumours suggests a common pathogenetic mechanism. *Nature* 1985, 316:330-334.
10. Marx J: Many gene changes found in cancer. *Science* 1989, 246:1386-1388.
11. Thomas D. Gelehrter, Francis S. Collins, David Ginsburg: Αρχές Ιατρικής Γενετικής. Πασχαλίδης, 2003

12. Knudson AG, Jr.: Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971, 68:820-823.
13. Rubin E. and Farber J. L. Pathology. J.B.Lippincott Company, 1998
14. Αρχείο Καρκίνου, Υπουργείο Υγείας, Κυπριακή Δημοκρατία
15. Stratton MR, Rahman N: The emerging landscape of breast cancer susceptibility. *Nat Genet* 2008, 40:17-22.
16. Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E: Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer* 2010, 46:765-781.
17. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P: Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005, 55:74-108.
18. Jonathan S. Berek, Nebille F. Hacker: Practical gynecologic oncology
19. Lynch HT, Lynch J, Conway T, Watson P, Feunteun J, Lenoir G, Narod S, Fitzgibbons R, Jr.: Hereditary breast cancer and family cancer syndromes. *World J Surg* 1994, 18:21-31.
20. Foulkes WD: Inherited susceptibility to common cancers. *N Engl J Med* 2008, 359:2143-2153.
21. Turnbull C, Rahman N: Genetic predisposition to breast cancer: past, present, and future. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2008, 9:321-345.
22. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W, et al.: A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994, 266:66-71.
23. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, Collins N, Gregory S, Gumbs C, Micklem G: Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 1995, 378:789-792.

24. Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, Nguyen K, Seal S, Tran T, Averill D, et al.: Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science* 1994, 265:2088-2090.
25. Seal S, Thompson D, Renwick A, Elliott A, Kelly P, Barfoot R, Chagtai T, Jayatilake H, Ahmed M, Spanova K, et al: Truncating mutations in the Fanconi anemia J gene BRIP1 are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles. *Nat Genet* 2006, 38:1239-1241.
26. Xia B, Sheng Q, Nakanishi K, Ohashi A, Wu J, Christ N, Liu X, Jasin M, Couch FJ, Livingston DM: Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. *Mol Cell* 2006, 22:719-729.
27. Cantor SB, Bell DW, Ganesan S, Kass EM, Drapkin R, Grossman S, Wahrer DC, Sgroi DC, Lane WS, Haber DA, Livingston DM: BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function. *Cell* 2001, 105:149-160.
28. Peng M, Litman R, Jin Z, Fong G, Cantor SB: BACH1 is a DNA repair protein supporting BRCA1 damage response. *Oncogene* 2006, 25:2245-2253.
29. Meijers-Heijboer H, van den Ouweland A, Klijn J, Wasielewski M, de Snoo A, Oldenburg R, Hollestelle A, Houben M, Crepin E, van Veghel-Plandsoen M, et al: Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2(\*)1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *Nat Genet* 2002, 31:55-59.
30. Campeau PM, Foulkes WD, Tischkowitz MD: Hereditary breast cancer: new genetic developments, new therapeutic avenues. *Hum Genet* 2008, 124:31-42.

31. Reid S, Schindler D, Hanenberg H, Barker K, Hanks S, Kalb R, Neveling K, Kelly P, Seal S, Freund M, et al: Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer. *Nat Genet* 2007, 39:162-164.
32. Levrán O, Attwooll C, Henry RT, Milton KL, Neveling K, Rio P, Batish SD, Kalb R, Velleuer E, Barral S, et al: The BRCA1-interacting helicase BRIP1 is deficient in Fanconi anemia. *Nat Genet* 2005, 37:931-933.
33. Levitus M, Waisfisz Q, Godthelp BC, de Vries Y, Hussain S, Wiegant WW, Elghalbzouri-Maghrani E, Steltenpool J, Rooimans MA, Pals G, et al: The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group J. *Nat Genet* 2005, 37:934-935.
34. Howlett NG, Taniguchi T, Olson S, Cox B, Waisfisz Q, De Die-Smulders C, Persky N, Grompe M, Joenje H, Pals G, et al: Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science* 2002, 297:606-609.
35. Wang W: Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins. *Nat Rev Genet* 2007, 8:735-748.
36. Ameziane N, van den Ouweland AM, Adank MA, Vijzelaar RN, Errami A, Dorsman JC, Joenje H, Meijers-Heijboer H, Waisfisz Q: Lack of large genomic deletions in BRIP1, PALB2, and FANCD2 genes in BRCA1/2 negative familial breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2009, 118:651-653.
37. Kennedy RD, D'Andrea AD: The Fanconi Anemia/BRCA pathway: new faces in the crowd. *Genes Dev* 2005, 19:2925-2940.
38. Yu X, Chini CC, He M, Mer G, Chen J: The BRCT domain is a phospho-protein binding domain. *Science* 2003, 302:639-642.

39. Hiom K: FANCI: solving problems in DNA replication. *DNA Repair (Amst)* 2010, 9:250-256.
40. Cantor S, Drapkin R, Zhang F, Lin Y, Han J, Pamidi S, Livingston DM: The BRCA1-associated protein BACH1 is a DNA helicase targeted by clinically relevant inactivating mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101:2357-2362.
41. Rutter JL, Smith AM, Davila MR, Sigurdson AJ, Giusti RM, Pineda MA, Doody MM, Tucker MA, Greene MH, Zhang J, Struwing JP: Mutational analysis of the BRCA1-interacting genes ZNF350/ZBRK1 and BRIP1/BACH1 among BRCA1 and BRCA2-negative probands from breast-ovarian cancer families and among early-onset breast cancer cases and reference individuals. *Hum Mutat* 2003, 22:121-128.
42. Lewis AG, Flanagan J, Marsh A, Pupo GM, Mann G, Spurdle AB, Lindeman GJ, Visvader JE, Brown MA, Chenevix-Trench G: Mutation analysis of FANCD2, BRIP1/BACH1, LMO4 and SFN in familial breast cancer. *Breast Cancer Res* 2005, 7:R1005-1016.
43. De Nicolo A, Tancredi M, Lombardi G, Flemma CC, Barbuti S, Di Cristofano C, Sobhian B, Bevilacqua G, Drapkin R, Caligo MA: A novel breast cancer-associated BRIP1 (FANCI/BACH1) germ-line mutation impairs protein stability and function. *Clin Cancer Res* 2008, 14:4672-4680.
44. Luo L, Lei H, Du Q, von Wachenfeldt A, Kockum I, Luthman H, Vorechovsky I, Lindblom A: No mutations in the BACH1 gene in BRCA1 and BRCA2 negative breast-cancer families linked to 17q22. *Int J Cancer* 2002, 98:638-639.



45. Karppinen SM, Vuosku J, Heikkinen K, Allinen M, Winqvist R: No evidence of involvement of germline BACH1 mutations in Finnish breast and ovarian cancer families. *Eur J Cancer* 2003, 39:366-371.
46. Guenard F, Labrie Y, Ouellette G, Joly Beuparlant C, Simard J, Durocher F: Mutational analysis of the breast cancer susceptibility gene BRIP1 /BACH1/FANCI in high-risk non-BRCA1/BRCA2 breast cancer families. *J Hum Genet* 2008, 53:579-591.
47. Loizidou MA, Cariolou MA, Neuhausen SL, Newbold RF, Bashiardes E, Marcou Y, Michael T, Daniel M, Kakouri E, Papadopoulos P, et al: Genetic variation in genes interacting with BRCA1/2 and risk of breast cancer in the Cypriot population. *Breast Cancer Res Treat* 2010, 121:147-156.