



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ-ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ»**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Κληρονομικός καρκίνος μαστού: νέα δεδομένα γενετικής
ανάλυσης με NGS»**

ΤΑΟΥΣΑΝΗ ΜΑΡΙΑ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ Π.Θ., Επιβλέπουσα

ΠΑΠΑΘΑΝΑΣΙΟΥ ΙΩΑΝΝΑ, ΕΠΙΚ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ Π.Θ., Μέλος

ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ, ΕΠΙΚ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ Π.Θ., Μέλος

ΛΑΡΙΣΑ, 2022



**UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF MEDICINE**



**POSTGRADUATE MASTER PROGRAM
“HUMAN GENETICS – GENETIC COUNSELING”**

**MASTER’S THESIS
« Hereditary breast cancer: new data
on genetic analysis with NGS »**

TAOUSANI MARIA

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ένας από τους συχνότερους τύπους καρκίνου παγκοσμίως είναι ο καρκίνος του μαστού και το 5-10% περίπου όλων των περιπτώσεων αφορούν στην κληρονομική μορφή του. Ο κληρονομικός καρκίνος του μαστού κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή τύπο και οφείλεται σε μεταλλάξεις γονιδίων της γαμετικής σειράς, και κυρίως των γονιδίων επιδιόρθωσης του DNA, όπως τα *BRCA1* και *BRCA2*, σε ποσοστά που κυμαίνονται από 45-72%. Ωστόσο, έχουν βρεθεί και άλλα γονίδια που συμβάλλουν στη γενετική προδιάθεση, όπως μεταξύ άλλων τα *TP53*, *PTEN*, *STK11*, *CDH1*, *ATM*, *CHEK2*, *PALB2*, *RAD51*, ενώ η μεγάλη πρόοδος στις τεχνολογίες μοριακής ανάλυσης των τελευταίων ετών έχει οδηγήσει στην ανακάλυψη νέων γενετικών μεταλλάξεων και γονιδίων προδιάθεσης για τον καρκίνο του μαστού.

Μία από τις πιο εξελιγμένες τεχνολογίες αποτελεί η μαζική παράλληλη αλληλούχιση ή Αλληλούχιση Νέας Γενιάς, NGS, η οποία έχει διαδραματίσει ενεργό ρόλο στην κλινική πράξη τις δύο τελευταίες δεκαετίες και με την οποία είναι εφικτή η ανίχνευση των μεταλλάξεων τόσο στα γονίδια προδιάθεσης της γαμετικής σειράς, όσο και σε σωματικές μεταλλάξεις, συμβάλλοντας στην κατανόηση της γενετικής του καρκίνου. Οι σύγχρονες πλατφόρμες NGS μπορούν να πραγματοποιήσουν την ανάλυση στοχευμένων πάνελ γονιδίων, αλληλούχιση ολόκληρων εξονίων (WES), καθώς και την αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος (WGS), με μεγάλη ακρίβεια και σε πολύ συντομότερο χρονικό διάστημα από την παλαιότερη τεχνολογία αλληλούχισης, τη μέθοδο Sanger, συμβάλλοντας αποτελεσματικά στη διάγνωση, πρόγνωση, παρακολούθηση και θεραπεία των ασθενών με καρκίνο του μαστού.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ανασκόπηση των πλέον πρόσφατων μελετών με NGS, οι οποίες αφορούν τόσο στην έρευνα για τη γενετική βάση του κληρονομικού καρκίνου του μαστού, όσο και στην έρευνα για νέες στοχευμένες θεραπείες που υπηρετούν την ιατρική ακριβείας.

Λέξεις- Κλειδιά: κληρονομικός καρκίνος μαστού, NGS, γονιδιακές μεταλλάξεις, γονιδιακά πάνελ, θεραπεία

SUMMARY

One of the most frequent types of cancer worldwide is breast cancer and approximately 5-10% of all cases are related to hereditary form. Hereditary breast cancer is an autosomal dominant cancer caused by mutations in germline genes, mainly the DNA repair genes, BRCA1 and BRCA2, in approximately 45-72% of all cases. However, other genes also have been found that contribute to genetic predisposition, such as *TP53*, *PTEN*, *STK11*, *CDH1*, *ATM*, *CHEK2*, *PALB2*, *RAD51*, while the great progress in molecular analysis technologies in recent years has led to the discovery of new mutations and breast cancer predisposition genes.

One of the most advanced technologies is Next Generation Sequencing, NGS, which has played an important role in clinical practice in the last two decades, which can detect mutations both in germline predisposition genes and somatic mutations, contributing to the understanding of cancer genetics. Modern NGS platforms can perform genetic analysis using targeted gene panels, or using whole exon sequencing (WES), as well as whole genome sequencing (WGS), with high accuracy and in a much shorter time than the older Sanger Sequencing method, and can effectively contribute to diagnosis, prognosis, monitoring and treatment of breast cancer patients.

The purpose of this Master's thesis is to review the most recent studies using NGS, which concern both research on the genetic basis of hereditary breast cancer, as well as research on new targeted therapies aiming to precision medicine.

Key words: hereditary breast cancer, NGS, gene panels, genetic testing, therapy

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	2
SUMMARY	3
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	5
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	6
Συνοτομογραφίες & Ακρωνύμια	7
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ.....	8
1.1 Γενικές πληροφορίες για τον καρκίνο του μαστού –Επιδημιολογία	8
1.2 Τύποι καρκίνου του μαστού και ιστολογικοί υπότυποι	11
1.3 Μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού	13
1.4 Γονίδια που εμπλέκονται στον καρκίνο του μαστού	14
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Ο ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	15
2.1 Ορισμός του κληρονομικού καρκίνου	15
2.2 Επιδημιολογία του κληρονομικού καρκίνου του μαστού.....	16
2.3 Γενετική βάση του κληρονομικού καρκίνου του μαστού.....	17
2.3.1. Υψηλής Διεισδυτικότητας γονίδια	18
2.3.2. Μέσης Διεισδυτικότητας γονίδια.....	21
2.3.3 Χαμηλής Διεισδυτικότητας γονίδια.....	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Η ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ NGS ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	24
3.1 Από την αλληλούχιση κατά Sanger στη νέα γενιά αλληλούχισης.....	24
3.2 Η τεχνολογία της μαζικής παράλληλης αλληλούχισης (NGS)	25
3.3 Εφαρμογές της τεχνολογίας NGS στην έρευνα για τον καρκίνο	27
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΠΡΟΣΦΑΤΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΜΕ NGS ΓΙΑ ΤΟΝ ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	30
4.1 Γενικές πληροφορίες – Μεθοδολογία βιβλιογραφικής ανασκόπησης.....	30
4.2 Στοχευμένη ανάλυση γονιδίων.....	31
4.3 Η προσέγγιση WES στον μη BRCA κληρονομικό καρκίνο του μαστού.....	42
4.4 Προσέγγιση WGS στον κληρονομικό καρκίνο του μαστού	49
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Η ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ NGS ΣΤΗΝ ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΝΕΩΝ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΣΤΟΧΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ.....	53
5.1 Κλινικές εφαρμογές της NGS και υπάρχουσες στοχευμένες θεραπείες στον καρκίνο του μαστού	53
5.2 Νεότερες μελέτες με NGS για την ανακάλυψη νέων θεραπευτικών στόχων	54
5.3 Μελλοντικοί στόχοι για την εφαρμογή ιατρικής ακριβείας στον καρκίνο του μαστού	59
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	60
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	62

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. 1. Ανατομία του γυναικείου μαστού (Gupta, Zhang and Huang, 2019).....	9
Εικόνα 1. 2. Μοντέλο εξέλιξης του καρκίνου του μαστού (Moulis and Sgroi, 2008).....	10
Εικόνα 1. 3. Νέα περιστατικά καρκίνου για το έτος 2020 και συνολικοί θάνατοι ανά τύπο καρκίνου (Πηγή:GLOBOCAN 2020).....	11
Εικόνα 1. 4. Βασικότεροι τύποι και ιστολογικοί υπότυποι των επιθηλιακών καρκινωμάτων του μαστού	12
Εικόνα 2. 1. Η κατά Knudson «υπόθεση των δύο χτυπημάτων» στον σποραδικό και τον κληρονομικό καρκίνο (Ekholm-Reed, 2004).....	15
Εικόνα 2. 2. Ποσοστά πιθανότητας εμφάνισης καρκίνου μαστού και ωοθηκών σε φορείς μεταλλαγμένων BRCA1/2 γονιδίων (Jimenez-Sainz & Jensen, 2021).....	16
Εικόνα 3. 1. Η μεθοδολογία των τεχνικών αλληλούχισης Sanger και NGS (Bunnik and Le Roch, 2013).....	25
Εικόνα 4. 1. Οι θέσεις των νέων μεταλλάξεων στα γονίδια BRCA1/2 που βρέθηκαν στη μελέτη των Santonocito et al. (2017).....	33
Εικόνα 4. 2. (a) BRCA1 και (b) BRCA2 παθογόνες γενετικές μεταλλάξεις που βρέθηκαν σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού στην Κρήτη (Apostolou et al., 2020).....	34
Εικόνα 4. 3. Μεταλλάξεις στα γονίδια BRCA1/2 που ανιχνεύτηκαν στη μελέτη των Rweyemamu et al. (2022).....	37
Εικόνα 4. 4. Τύποι μετάλλαξης που έχουν ανιχνευτεί σε Α. Σύνολο των υπό μελέτη γονιδίων και Β. Κάθε γονίδιο προδιάθεσης για τον καρκίνο του μαστού ξεχωριστά (Suszynska et al., 2019).....	38
Εικόνα 4. 5. Κάλυψη περιοχών εξονίων για τον έλεγχο 35 γονιδίων με εμπλοκή σε κληρονομικούς καρκίνους συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού κατά την αλληλούχιση 43 δειγμάτων ταυτόχρονα με χρήση NGS (Chan et al., 2020).....	39
Εικόνα 4.6. Απόλυτος (%) κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του μαστού σε σχέση με γενετικές μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα γονίδια προδιάθεσης και την ηλικία (Hu et al., 2021).....	41
Εικόνα 4. 7. Διάγραμμα χορδών που απεικονίζει τους συνδυασμούς δύο γενετικών μεταλλάξεων σε γονίδια προδιάθεσης για τον κληρονομικό καρκίνο του μαστού (Megid et al., 2022).....	42
Εικόνα 4. 8. Παθογόνες και πιθανώς παθογόνες μεταλλάξεις σε 18 γονίδια που προέκυψαν από τη μελέτη των Felicio et al. (2020).....	48
Εικόνα 4. 9. Στοίχιση αλληλουχίας του γονιδίου BRCA1 του ίδιου ασθενή με χρήση WGS (επάνω) και WES (κάτω) (Rossing et al., 2019).....	49
Εικόνα 4. 10: Σωματικές μεταλλάξεις σε 560 ασθενείς, φορείς γενετικών μεταλλάξεων σε γονίδια προδιάθεσης για καρκίνο του μαστού (Nik-Zainal et al., 2016).....	50
Εικόνα 4. 11: Σπάνιες δομικές διαγραφές σε 8 γονίδια με εμπλοκή στον καρκίνο του μαστού (Chen et al., 2021).....	52
Εικόνα 5.1: Μεταλλάξεις σε γονίδια 95 ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού σε σχέση με τον μοριακό υπότυπο του όγκου (Bruzas et al., 2021).....	56
Εικόνα 5.2: Εξατομικευμένη θεραπεία ασθενών βάσει του μοριακού προφίλ τους μετά από ανάλυση με NGS.....	58

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 2. 1. Κληρονομικά σύνδρομα στον καρκίνο του μαστού (Fostira et al., 2007).....	17
Πίνακας 3. 1. Μέσος απαιτούμενος χρόνος και σύγκριση αποτελεσμάτων γονοτύπησης των BRCA1/2 με τις μεθόδους NGS και Sanger (Park et al., 2017)	28
Πίνακας 4. 1. Ιδρυτικές μεταλλάξεις στα γονίδια BRCA1/2 σε Κρητικής καταγωγής ασθενείς με καρκίνο του μαστού (Apostolou et al., 2020)	35
Πίνακας 4. 2. Επικυρωμένες μεταλλάξεις DDR γονιδίων και κλινικά χαρακτηριστικά των όγκων του μαστού σε 13 φινλανδικές οικογένειες με ιστορικό κληρονομικού καρκίνου του μαστού (Maatta et al., 2016).....	43
Πίνακας 4. 3. Εκτίμηση σχετικού κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου του μαστού σε σχέση με τις μεταλλάξεις στα 4 γονίδια που εντοπίστηκαν στη μελέτη των Lu et al. και τον τύπο του καρκινώματος (Lu et al., 2019)	46
Πίνακας 5.1: Στοχευμένες θεραπείες που έλαβαν οι 30 ασθενείς της μελέτης των Bruzas et al.(2021), ανάλογα με τη μετάλλαξη και τα αντίστοιχα PFS	57

Συντομογραφίες & Ακρωνύμια

LOH: Απώλεια ετεροζυγωτίας

NST: Μη ειδικού τύπου καρκίνωμα

TNBC: Τριπλός αρνητικός καρκίνος του μαστού

ER: Υποδοχέας οιστρογόνου

PR: Υποδοχέας προγεστερόνης

HER2: Ανθρώπινος υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 2

VUS: Μεταλλάξεις αβέβαιης σημασίας

NGS: Αλληλούχιση επόμενης γενιάς

WES: Αλληλούχιση ολόκληρων εξονίων

WGS: Αλληλούχιση ολόκληρου γονιδιώματος

PCR: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

ctDNA: Καρκινικό κυκλοφορούν DNA

HRR: Επιδιόρθωση μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού

PARP: αναστολέας πολυμεράσης της (πολυ-ADP)ριβόζης

MMR: Επιδιόρθωση και διατήρηση του DNA

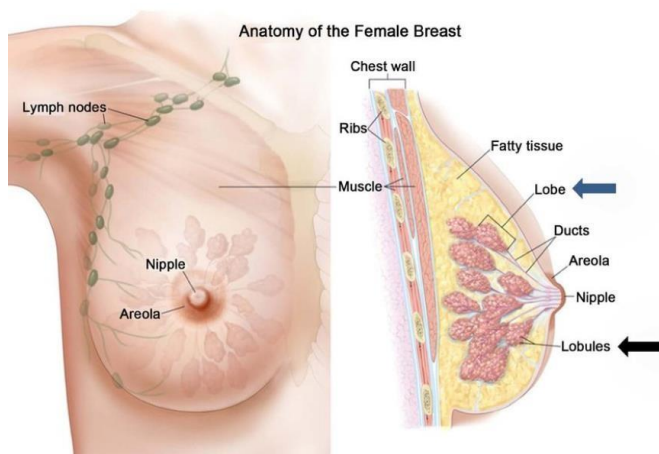
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

1.1 Γενικές πληροφορίες για τον καρκίνο του μαστού – Επιδημιολογία

Οι μαστοί αποτελούν εξωκρινείς ιδρωτοποιούς αδένες του δέρματος και επικουρικά γεννητικά όργανα καθώς η λειτουργία τους έγκειται στην παραγωγή γάλακτος στα θηλαστικά (Khan and Sajjad, 2020). Εντοπίζονται στο εμπρόσθιο θωρακικό τοίχωμα, έχουν σχήμα δισκοειδές και στις ενήλικες γυναίκες εκτείνονται μεταξύ της δεύτερης και έκτης πλευράς, σχηματίζοντας προς την κατεύθυνση της μασχάλης μια πυραμοειδή προεξοχή που ονομάζεται ουρά του Spence. Ιστολογικά αποτελούνται από 3 κύριες δομές, οι οποίες είναι ο μαζικός ή μαστικός αδένας, το δέρμα και το υποδόριο λίπος. Ο γυναικείος μαστός περιέχει περισσότερο αδενικό ιστό σε σχέση με τον ανδρικό μαστό και ο ιστός αυτός αποτελείται από το παρέγχυμα και το στρώμα (Pandya and Moore, 2011).

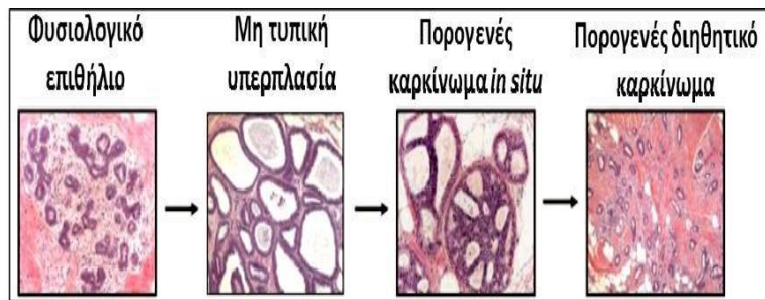
Ο μαζικός αδένας του κάθε μαστού αποτελείται από 15-20 λοβούς, οι οποίοι συγκρατούνται μεταξύ τους με ινώδεις ταινίες που ονομάζονται σύνδεσμοι του Cooper. Οι λοβοί περιέχουν 20-40 μικρότερους λοβούς, που ονομάζονται λόβια και είναι υπεύθυνα για την παραγωγή γάλακτος. Η σύνδεση των λοβών με τα λόβια πραγματοποιείται με τους γαλακτοφόρους πόρους, ο αριθμός των οποίων κυμαίνεται από 15 έως 25. Η λειτουργία των πόρων έγκειται στη μεταφορά γάλακτος προς τη θηλήη οποία περιβάλλεται από μία σκουρότερη περιοχή δέρματος, τη θηλαία άλω. Ο χώρος γύρω και μεταξύ των λοβών καταλαμβάνεται από λιπώδη ιστό (Gurta, Zhang and Huang, 2019). Οι μαστοί περιέχουν επίσης αιμοφόρα αγγεία, δίκτυο νεύρων καθώς και λεμφαδένες και λεμφικά αγγεία που συμβάλλουν στην ανοσολογική απόκριση του μαστού σε φλεγμονές και νεοπλασίες.

Ο μαστός διακρίνεται ανατομικά σε τεταρτημόρια: το άνω εσωτερικό, το κάτω εσωτερικό, το άνω εξωτερικό και το κάτω εξωτερικό τεταρτημόριο. Το μέγεθος, το σχήμα και η πυκνότητα του μαστού παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις μεταξύ των ατόμων, οφειλόμενες στον όγκο του υποδόριου λίπους μεταξύ των λοβών. Το άνω εξωτερικό τεταρτημόριο περιλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος του μαστού και αποτελείτο τμήμα στο οποίο ανιχνεύεται η πλειοψηφία των όγκων (Kumar et al, 2011).



Εικόνα 1. 1. Ανατομία του γυναικείου μαστού (Gupta, Zhang and Huang, 2019)

Ο καρκίνος του μαστού (ΚΜ) αποτελεί μια πολυπαραγοντική νόσο που επέρχεται μέσα από γενετικές ή/και επιγενετικές αλλαγές που έχουν ως αποτέλεσμα την απορρύθμιση της κυτταρικής διαφοροποίησης και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Rakha, Toss and Quinn, 2021). Οι γενετικές αυτές αλλαγές μπορεί να έχουν κληρονομικό χαρακτήρα (στο 5-10% των περιπτώσεων), να οφείλονται δηλαδή σε συγκεκριμένες μεταλλάξεις γονιδίων που κληρονομούνται με το μενδελικό μοντέλο, ενώ ένα ποσοστό περίπου 20–30% έχουν οικογενή χαρακτήρα, οφείλονται δηλαδή σε κληρονομική προδιάθεση χωρίς την ύπαρξη ακριβούς γενετικού παράγοντα. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού (70%) δεν υπάρχει κληρονομικότητα και οι περιπτώσεις αυτές χαρακτηρίζονται ως σποραδικές (Lacroix and Leclercq, 2005). Ο καρκίνος του μαστού προσβάλλει κυρίως τα επιθηλιακά κύτταρα του μαστικού αδένου - κατά ένα ποσοστό που αγγίζει το 95% - και αναπτύσσεται στους λοβούς (λοβιακό καρκίνωμα) ή τους γαλακτοφόρους πόρους (πορογενές καρκίνωμα), ενώ σπανιότερα μπορούν να αναπτυχθούν κακοήθειες και στον λιπώδη και συνδετικό ιστό του μαστού (Moullis and Sgroi, 2008). Στα αρχικά στάδια της νεοπλασματικής εξαλλαγής, εμφανίζονται τοπικές προκαρκινικές αλλοιώσεις, οι οποίες έχουν τη δυνατότητα εξαλλαγής σε διηθητικούς όγκους με αποτέλεσμα την τοπική επέκτασή τους ή/και τη δημιουργία γειτονικών μεταστάσεων στο δέρμα, τους μύες και τους λεμφαδένες, ενώ αργότερα μπορεί να δώσει απομακρυσμένες μεταστάσεις σε πνεύμονες, οστά, εγκέφαλο, ήπαρ και άλλα όργανα (Feng et al., 2018, Akram et al., 2017). Σύμφωνα με τους Δημητρακάκη και Κεραμόπουλο (2000) απαιτούνται περίπου 30 διαδοχικοί διπλασιασμοί, που χρονικά μεταφράζονται σε 7-8 χρόνια για τη δημιουργία όγκου με διάμετρο ενός εκατοστού.

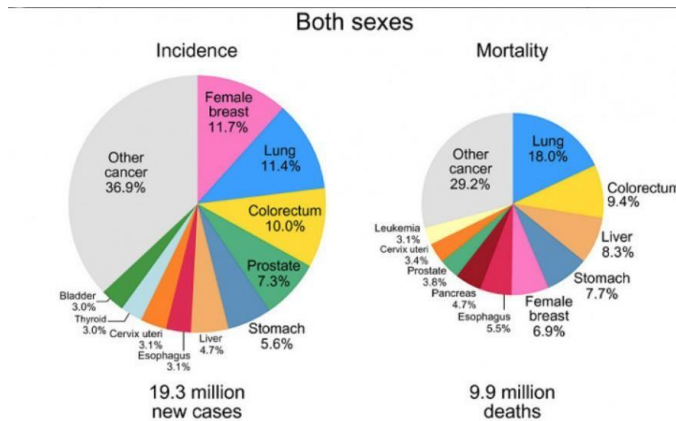


Εικόνα 1. 2. Μοντέλο εξέλιξης του καρκίνου του μαστού (Moulis and Sgroi, 2008)

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), ο καρκίνος του μαστού αποτελεί τον συχνότερο καρκίνο στο γυναικείο φύλο, ενώ κατά το έτος 2020 καταγράφηκαν 2,3 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις καρκίνου του μαστού παγκοσμίως καταλαμβάνοντας την πρώτη θέση ανάμεσα σε όλες τις περιπτώσεις καρκίνου και στα δύο φύλα, με ποσοστό 11,7%, ξεπερνώντας τις περιπτώσεις του καρκίνου του πνεύμονα, ενώ η συνολική θνησιμότητα άγγιξε το 7%. Επίσης, εκτιμάται από τον WHO, πως στα τέλη του 2020 ο αριθμός γυναικών εν ζωή με διαγνωσμένο καρκίνο του μαστού τα τελευταία 5 έτη ανήλθε σε 7,8 εκατομμύρια παγκοσμίως. Σπάνια, μπορεί να αναπτυχθεί καρκίνος του μαστού και στους άντρες, σε ποσοστό μικρότερο του 1% όλων των καρκίνων του μαστού. Στην Ελλάδα αναφέρθηκαν πάνω από 2.500 θάνατοι από καρκίνο του μαστού το 2020, ενώ το ποσοστό των νέων περιπτώσεων άγγιξε το 27,5% επί όλων των περιπτώσεων καρκίνου στις γυναίκες (World Health Organization, 2021).

Η ηλικία αποτελεί έναν από τους παράγοντες κινδύνου καθώς ο καρκίνος του μαστού αναπτύσσεται συχνότερα σε ηλικίες άνω των 60 ετών. Παρά το γεγονός αυτό, όμως, ο ΚΜ εμφανίζεται σε γυναίκες κάτω των 50 ετών σε ένα ποσοστό περίπου 25% (Lee and Reyna, 2014). Άλλοι παράγοντες κινδύνου για ανάπτυξη καρκίνου του μαστού περιλαμβάνουν το οικογενειακό ιστορικό, την παχυσαρκία, τη χρήση αλκοόλ και καπνού, θεραπείες ορμονικής αποκατάστασης καθώς και ιστορικό έκθεσης σε ακτινοβολίες (Harbeck and Gnant, 2017).

Η έγκαιρη διάγνωση της νόσου σε αρχικό στάδιο μέσω της μαστογραφίας αλλά και η θεαματική πρόοδος στις θεραπείες τα τελευταία έτη, έχουν επιφέρει μείωση στα ποσοστά θνησιμότητα για τον καρκίνο του μαστού. Η πτωτική αυτή τάση αγγίζει το ποσοστό του 2-4% ετησίως (World Health Organization, 2021).



Εικόνα1. 3. Νέα περιστατικά καρκίνου για το έτος 2020 και συνολικοί θάνατοι ανά τύπο καρκίνου (Πηγή: GLOBOCAN 2020)

1.2 Τύποι καρκίνου του μαστού και ιστολογικοί υπότυποι

Ο καρκίνος του μαστού διακρίνεται σε πλήθος ιστολογικών τύπων που βασίζονται στην τύπο και τη μορφολογία των κυττάρων και των εξωκυττάρων ιστών του όγκου. Η πρώτη μεγάλη διάκριση περιλαμβάνει τους επιθηλιακούς και μη επιθηλιακούς όγκους. Οι επιθηλιακοί όγκοι, γνωστοί ως αδenoκαρκινώματα του μαστού, αποτελούντο 95% των περιπτώσεων, ενώ οι μη επιθηλιακοί είναι πιο σπάνιοι όγκοι με κακή πρόγνωση και περιλαμβάνουν τα σαρκώματα και τα λεμφώματα του μαστού (Hoda and Hoda, 2020). Οι δύο βασικοί τύποι των επιθηλιακών όγκων είναι τα λοβιακά καρκινώματα που αναπτύσσονται στους λοβούς του μαστικού αδένου και τα πορογενή καρκινώματα που αναπτύσσονται στους γαλακτοφόρους πόρους. Οι επιθηλιακοί όγκοι διακρίνονται περαιτέρω σε μη διηθητικά καρκινώματα (in situ) και σε διηθητικά, τα οποία έχουν διηθήσει τη βασική μεμβράνη η οποία διαχωρίζει τον επιθηλιακό ιστό από τον υποκείμενο συνδετικό ιστό. Η περαιτέρω ιστολογική διάκριση των διηθητικών καρκινωμάτων του μαστού σε διάφορους υπότυπους βασίζεται στα κυτταρολογικά χαρακτηριστικά της νεοπλασματικής βλάβης καθώς και στο μοτίβο ανάπτυξής τους και περιλαμβάνει το πορογενές, το λοβιακό, το μικτού τύπου πορογενές-λοβιακό, τοσωληνοειδές, το μυελοειδές, το βλεννώδες, το θηλώδες και μικροθηλώδες καθώς και ακόμα σπανιότερους υπότυπους όπως είναι οι νευροενδοκρινείς, φυλλοειδείς, φλεγμονώδεις όγκοι, αλλά και η νόσος Paget (Makki, 2015).

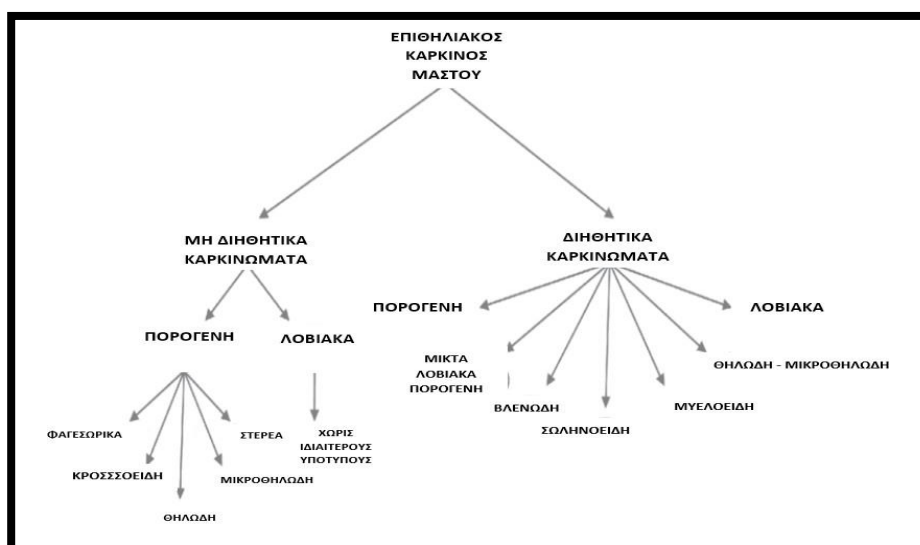
Τα διηθητικά καρκινώματα του μαστού μπορούν επίσης να διακριθούν ανάλογα με το βαθμό κακοήθειας που εμφανίζουν, ο οποίος εξαρτάται από τον βαθμό διαφοροποίησής τους από τα φυσιολογικά κύτταρα του επιθηλίου του μαστού, καθώς και από την επιθετικότητά τους. Οι 3 κατηγορίες στις οποίες κατατάσσονται οι εξής (Cancer.org, 2019):

- **Βαθμός κακοήθειας 1:** χαμηλός βαθμός κακοήθειας με καλώς διαφοροποιημένα κύτταρα, όπου τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσονται με βραδείς ρυθμούς και ομοιάζουν περισσότερο στα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα του μαστού
- **Βαθμός κακοήθειας 2:** μέτριος βαθμός κακοήθειας με κύτταρα μέτριας διαφοροποίησης, όπου τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν μέτρια επιθετικότητα και ατυπία σε σχέση με τα φυσιολογικά
- **Βαθμός κακοήθειας 3:** υψηλής κακοήθειας όγκοι χαμηλής διαφοροποίησης, όπου τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν μεγάλη επιθετικότητα και ατυπία, ομοιάζοντας ελάχιστα με τα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα του μαστού και οι οποίοι παρουσιάζουν ταχείς ρυθμούς ανάπτυξης και εξάπλωσης.

Επιπρόσθετα, ανάλογα με το σημείο εντόπισής τους, τα καρκινώματα του μαστού μπορούν να διακριθούν σε (Pic, 2021):

- πολυεστιακά, στην περίπτωση που εντοπίζονται εστίες της νόσου σε διάφορα σημεία αλλά στο ίδιο τεταρτημόριο του μαστού
- πολυκεντρικά, όταν εντοπίζονται εστίες της νόσου σε παραπάνω τεταρτημόρια, αλλά στον ίδιο μαστό
- αμφιτερόπλευρα, όταν εντοπίζονται εστίες της νόσου και στους δυο μαστούς.

Στο διάγραμμα που ακολουθεί αποτυπώνονται συνοπτικά οι κυριότεροι τύποι και ιστολογικοί υπότυποι του επιθηλιακού καρκίνου του μαστού, ενώ στη συνέχεια ακολουθεί αναλυτικότερη περιγραφή των τύπων αυτών.



Εικόνα 1. 4. Βασικότεροι τύποι και ιστολογικοί υπότυποι των επιθηλιακών καρκινωμάτων του μαστού

1.3 Μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού χαρακτηρίζεται από μεγάλη κυτταρική και μοριακή ετερογένεια και οι έρευνες των τελευταίων δεκαετιών, με την εξέλιξη των τεχνικών της μοριακής βιολογίας, έχουν οδηγήσει στην ταξινόμησή του σε μοριακούς υπότυπους, βάσει των οποίων μπορεί να προβλεφθεί η έκβαση της νόσου και να πραγματοποιηθεί διαχείριση της θεραπευτικής προσέγγισης. Παρά το γεγονός ότι έχουν προταθεί πρόσφατα 10 διαφορετικοί μοριακοί υπότυποι για τον καρκίνο του μαστού (Casey, Sweeney, Brown, & Kerin, 2016), δεν έχουν βρει ακόμα κλινική εφαρμογή και έως και σήμερα η επικρατούσα ταξινόμηση που χρησιμοποιείται στην κλινική πράξη διακρίνειτα καρκινώματα του μαστού σε 4 βασικούς μοριακούς υπότυπους. Η υποτύπωση αυτή βασίζεται στην παρουσία ή απουσία έκφρασης των όγκων σε υποδοχείς συγκεκριμένων πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από γονίδια που εμπλέκονται στον καρκίνο του μαστού καθώς και στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης. Η ταυτοποίηση των όγκων στους υπότυπους αυτούς βασίζεται επίσης στην τιμή του καρκινικού αντιγόνου Ki-67, που λαμβάνει μέρος στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, οι αυξημένες τιμές του οποίου οδηγούν σε ταχύτερη ανάπτυξη του όγκου ((Nahed and Shaimaa, 2016).

Οι επικρατέστεροι 4 μοριακοί υπότυποι του καρκίνου του μαστού είναι (Fragomeni, Sciallis & Jeruss, 2018, www.breastcancer.org, n.d.):

- ❖ **Λοβιακού τύπου A-Luminal A:** Τα κύτταρα των luminal όγκων ομοιάζουν με τα κύτταρα του αυλού των γαλακτοφόρων πόρων. Κύριο χαρακτηριστικό του υπότυπου luminal A είναι πως οι όγκοι αυτοί εκφράζουν τους υποδοχείς οιστρογόνων (ER) και προγεστερόνης (PR), δεν εκφράζουν όμως τους υποδοχείς του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα τύπου 2 (HER-2). Πρόκειται για όγκους με καλή διαφοροποίηση και χαμηλή τιμή Ki-67 που αντιπροσωπεύουν το 40% περίπου των διηθητικών όγκων του μαστού και έχουν καλή πρόγνωση.
- ❖ **Λοβιακού τύπου B-Luminal B:** πρόκειται για όγκους με χαμηλότερη διαφοροποίηση, πιο επιθετικούς και με χειρότερη πρόγνωση από τους Luminal A, οι οποίοι επίσης εκφράζουν τους υποδοχείς ER/PR, είναι δυνατόν όμως να εκφράζουν και τον υποδοχέα HER-2. Εμφανίζουν υψηλή τιμή Ki-67 και αντιπροσωπεύουν το 20% περίπου των διηθητικών όγκων του μαστού.
- ❖ **HER 2+ :** πρόκειται για όγκους που εκφράζουν τους υποδοχείς HER-2, όχι όμως τους ορμονικούς υποδοχείς ER/PR, ενώ οι τιμές Ki-67 ποικίλλουν. Εμφανίζουν χαμηλή διαφοροποίηση, μεγάλη επιθετικότητα και έχουν κακή πρόγνωση. Αντιπροσωπεύουν το 10-15% περίπου των διηθητικών όγκων του μαστού.

- ❖ **Basal like - Τριπλά αρνητικός (TNBC):** πρόκειται για όγκους άκρως επιθετικούς, με χαμηλά ποσοστά 5-ετούς επιβίωσης, που συνήθως δίνουν μεταστάσεις μέσα σε 3 χρόνια από τη διάγνωση. Τα κύτταρα των basal-like όγκων ομοιάζουν με τα βασικά κύτταρα, αυτά δηλαδή που βρίσκονται σε γεινίαση με τη βασική μεμβράνη. Οι όγκοι αυτοί χαρακτηρίζονται από την έλλειψη έκφρασης τόσο στους ER και PR υποδοχείς, όσο και στον υποδοχέα HER 2, εμφανίζουν υψηλές τιμές Ki-67 και αντιπροσωπεύουν το 15-20% των καρκίνων του μαστού.

1.4 Γονίδια που εμπλέκονται στον καρκίνο του μαστού

Τα δύο κυριότερα **ογκοκατασταλτικά** γονίδια που έχουν συνδεθεί με τον καρκίνο του μαστού είναι τα **BRCA1** και **BRCA2**, τα οποία ανήκουν στην κατηγορία των γονιδίων-φροντιστών και υπολογίζεται ότι ένα ποσοστό της τάξης του 60% των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού με γνωστές μεταλλάξεις οφείλεται σε αυτά τα γονίδια (Peleg Hasson, Menes and Sonnenblick, 2020).

Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια αυτά λαμβάνουν μέρος στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού μαζί με την πρωτεΐνη RAD51 με την οποία συντοποθετούνται στις θέσεις βλάβης. Μεταλλάξεις στα **BRCA1** και **BRCA2**, με συνοδό απώλεια της λειτουργίας τους, έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση γενετικών βλαβών και την ανάπτυξη καρκίνου. Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί πως η απενεργοποίηση και των 2 αλληλόμορφων του **BRCA1** στα γαμετικά κύτταρα δεν είναι συμβατή με τη ζωή και η απενεργοποίηση του γονιδίου στον καρκίνο αφορά πάντα στο ένα εκ των δύο αλληλόμορφων (Mehrgou & Akouchekian, 2016).

Άλλα **ογκοκατασταλτικά** γονίδια που εμπλέκονται στον κληρονομικό καρκίνο του μαστού λόγω μεταλλάξεών τους, είναι τα **PTEN, TP53, CDH1, STK11, CHEK2, PALB2, RAD51C, ATM, BARD1, MRE11, NBS1** και **BRIP1**. Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα περισσότερα από αυτά τα γονίδια έχουν άμεση ή έμμεση αλληλεπίδραση με τα **BRCA1** και **BRCA2** (Bradbury & Olopade, 2007, Apostolou & Fostira, 2013). Εκτός από τα γονίδια αυτά έχουν, επίσης, ανιχνευθεί νέοι γενετικοί τόποι στα γονίδια **FGFR2, TNRC9, MAP3K1, LSP1**, οι οποίοι σχετίζονται με τους καρκίνους μαστού/ωοθηκών (Shulman, 2008).

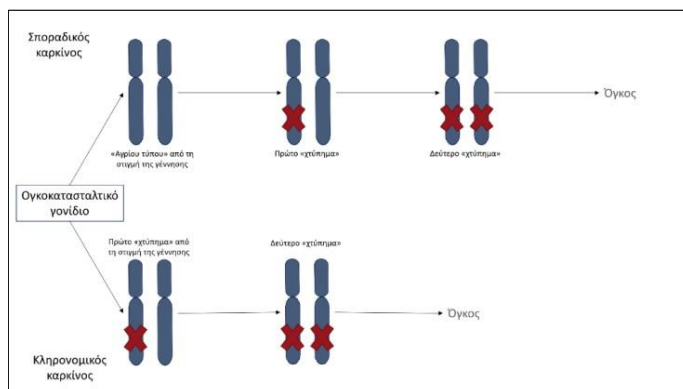
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Ο ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

2.1 Ορισμός του κληρονομικού καρκίνου

Οι περιπτώσεις καρκίνου του μαστού αφορούν στην πλειοψηφία τους σποραδικές μορφές καρκινογένεσης, οι οποίες είναι απόρροια της συσσώρευσης επίκτητων μεταλλάξεων σε γονίδια σωματικών κυττάρων. Σε αντίθεση με τη σποραδική μορφή καρκίνου του μαστού, ο κληρονομικός καρκίνος έχει ως βάση τη γαμετική μετάλλαξη σε κάποιο γονίδιο προδιάθεσης (germline mutation).

Η κατανόηση της έννοιας του κληρονομικού καρκίνου μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω της «υπόθεσης των δύο χτυπημάτων» που διατύπωσε ο Alfred Knudson το 1971 (Khial, 2008b). Σύμφωνα με αυτή, η καρκινογένεση προκαλείται έπειτα από την απενεργοποίηση και των 2 αλληλόμορφων ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου οδηγώντας σε απώλεια της ετεροζυγωτίας (LOH) (Hino & Kobayashi, 2017). Εάν η πρώτη μετάλλαξη (πρώτο χτύπημα) συμβεί κατά τη δημιουργία του ζυγωτού, τότε το άτομο που θα γεννηθεί φέρει ένα κληρονομούμενο μεταλλαγμένο αλληλόμορφο ογκοκατασταλτικού γονιδίου που έχει ως αποτέλεσμα την αποσιώπησή του κι επομένως το άτομο αυτό είναι πιο πιθανό να νοσήσει από καρκίνο καθώς θα απαιτείται μία σωματική μετάλλαξη για να απενεργοποιηθεί και το δεύτερο αλληλόμορφο (δεύτερο χτύπημα). Αντίθετα, στον σποραδικό καρκίνο, τα άτομα δεν φέρουν μετάλλαξη σε γονίδιο προδιάθεσης και όλα τα κύτταρα τους διαθέτουν αρχικά δύο φυσιολογικά αντίγραφα του συγκεκριμένου γονιδίου, οπότε απαιτούνται δύο σωματικές μεταλλάξεις ώστε να απενεργοποιηθούν και τα δύο αντίγραφα και να ξεκινήσει η ογκογένεση (Khial, 2008).

Ο κληρονομικός, επομένως, καρκίνος είναι απόρροια της απενεργοποίησης του ενός αλληλόμορφου ενός γονιδίου εξαιτίας μίας μετάλλαξης ή χρωμοσωμικής βλάβης σε γαμετικά κύτταρα, η οποία μεταβιβάζεται μενδελιακά στις επόμενες γενεές, σε συνδυασμό με την απενεργοποίηση και του δεύτερου αλληλόμορφου που μπορεί να οφείλεται σε μία σημειακή μετάλλαξη, σε μία απαλοιφή, σε απώλεια χρωμοσωμικού υλικού ή σε επιγενετική αποσιώπηση στα σωματικά κύτταρα (Alberts et al., 2002).

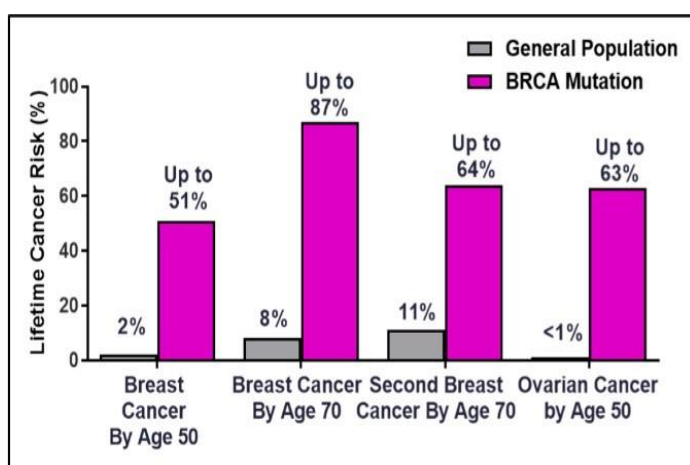


Εικόνα 2. 1. Η κατά Knudson «υπόθεση των δύο χτυπημάτων» στον σποραδικό και τον κληρονομικό καρκίνο (Ekholm-Reed, 2004).

2.2 Επιδημιολογία του κληρονομικού καρκίνου του μαστού

Ο κληρονομικός καρκίνος του μαστού αντιπροσωπεύει το περίπου 5%-10% όλων των περιστατικών καρκίνου του μαστού παγκοσμίως (www.cdc.gov, 2020) και αποτελεί έναν αυτοσωμικά επικρατή καρκίνο, που σημαίνει ότι ένα άτομο έχει 50% πιθανότητα να κληρονομήσει το μεταλλαγμένο γονίδιο από την μητέρα ή τον πατέρα του. Η πλειοψηφία των όγκων αυτών, σε ποσοστά που κυμαίνονται από 45-72% (National Cancer Institute, 2020) οφείλεται σε μεταλλάξεις των γονιδίων *BRCA1* και *BRCA2*, ενώ έχει βρεθεί πως οι γυναίκες με κληρονομούμενη μετάλλαξη σε κάποιο από αυτά τα γονίδια εμφανίζουν πιθανότητα νόσησης έως την ηλικία των 70 ετών σε ποσοστό που αγγίζει το 87%, σε αντίθεση με τον αντίστοιχο κίνδυνο στο γενικό πληθυσμό που εκτιμάται πως είναι περίπου 8% (Jimenez-Sainz & Jensen, 2021).

Η συχνότητα των *BRCA1/2* μεταλλάξεων ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των διαφόρων πληθυσμών. Για παράδειγμα, η ύπαρξη *BRCA1* μεταλλάξεων στις Η.Π.Α. ανέρχεται σε υψηλό ποσοστό της τάξης του 11%, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό στην Ιαπωνία είναι μόλις 2,6% (Abdulrashid et al., 2019). Μεταξύ των πληθυσμών παρατηρούνται επίσης διαφορές στην ύπαρξη και τη συχνότητα ιδρυτικών μεταλλάξεων των *BRCA1/2*. Ως ιδρυτικές, νοούνται οι μεταλλάξεις που ξεκινούν από τον κοινό πρόγονο (ιδρυτή) ενός μικρού, αρχικά, αριθμού ατόμων και καθώς πραγματοποιείται αύξηση του πληθυσμού, η μετάλλαξη εμφανίζεται σε μεγάλο ποσοστό του πληθυσμού αυτού. Σε πολλούς πληθυσμούς έχουν ανιχνευθεί ιδρυτικές μεταλλάξεις των *BRCA1/2*, με τους Εβραίους Ασκενάζι να κατέχουν το μεγαλύτερο ποσοστό αυτών, καθώς 1/40 άτομα φέρουν τις μεταλλάξεις αυτές (Ferri, 2022, σελ. 752-755).



Εικόνα 2. 2. Ποσοστά πιθανότητας εμφάνισης καρκίνου μαστού και ωοθηκών σε φορείς μεταλλαγμένων *BRCA1/2* γονιδίων (Jimenez-Sainz & Jensen, 2021)

2.3 Γενετική βάση του κληρονομικού καρκίνου του μαστού

Ο κληρονομικός καρκίνος του μαστού αποδίδεται σε μεταλλάξεις συγκεκριμένων γονιδίων προδιάθεσης, πολλά εκ των οποίων συνδέονται με εξαιρετικά σπάνια (με συχνότητα εμφάνισης περίπου 1/150.000 ανθρώπους) κληρονομικά καρκινικά σύνδρομα, όπως είναι το σύνδρομο Ataxia Telangiectasia, το σύνδρομο Cowden, το σ.Li-Fraumeni, το σ.Peutz-Jeghers και το σύνδρομο του κληρονομικού καρκίνου του στομάχου διάχυτου τύπου (Consensus Guideline on Genetic Testing for Hereditary Breast Cancer, 2019) (Πίνακας 1).

Τα γονίδια που εμπλέκονται στον κληρονομικό καρκίνο του μαστού ταξινομούνται σε υψηλής, ενδιάμεσης ή χαμηλής διεισδυτικότητας βάσει του σχετικού κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου. Η μετάλλαξη των γονιδίων υψηλής διεισδυτικότητας αυξάνει κατά περίπου 4 φορές τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου, ενώ μεταλλάξεις σε γονίδια χαμηλής διεισδυτικότητας αυξάνουν τον αντίστοιχο κίνδυνο κατά 2 φορές σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό. Η πιθανότητα καρκινογένεσης λόγω μεταλλάξεων σε γονιδιαμέτριας διεισδυτικότητας εκτιμάται πως είναι 2-4 φορές μεγαλύτερη (Tsaousis et al., 2019).

Πίνακας 2. 1. Κληρονομικά σύνδρομα στον καρκίνο του μαστού (Sokolenko and Imyanitov,2018)

ΣΥΝΔΡΟΜΟ	ΓΟΝΙΔΙΟ	ΤΥΠΟΙ ΚΑΡΚΙΝΟΥ
Κληρονομικός καρκίνος μαστού/ωοθηκών (HBOC) 1	BRCA1	Μαστού, ωοθηκών,παχέως εντέρου
Κληρονομικός καρκίνος μαστού/ωοθηκών (HBOC) 2	BRCA2	Μαστού, ωοθηκών,παγκρέατος, προστάτη
Li-Fraumeni	TP53	Μαστού, λευχαιμία,σάρκωμα, εγκεφάλου
Cowden	PTEN	Μαστού, ενδομητρίου,παγκρέατος, θυρεοειδούς, γαστρεντερικού
Ataxia Telangiectasia	ATM	Μαστού, ωοθηκών,λέμφωμα, λευχαιμία,μελάνωμα, στομάχου, σάρκωμα
Peutz-Jeghers	STK11	Μαστού, ωοθηκών,εντέρου, όρχεων, παγκρέατος,θυρεοειδούς
Γαστρικός καρκίνος διάχυτου τύπου	CDH1	Λοβιακός καρκίνος μαστού, γαστρικός

2.3.1. Υψηλής Διεισδυτικότητας γονίδια

➤ *BRCA1* και *BRCA2*

Τα *BRCA1* και *BRCA2* είναι ογκοκατασταλτικά γονίδια που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον καρκίνο του μαστού. Έχει βρεθεί πως οι μεταλλάξεις στα γονίδια αυτά ευθύνονται για τις περισσότερες από τις μισές περιπτώσεις κληρονομικού καρκίνου του μαστού και συγκεκριμένα ο κίνδυνος ογκογένεσης σε μία γυναίκα που φέρει μετάλλαξη *BRCA1* ή *BRCA2* στα κύτταρα της γαμετικής σειράς ανέρχεται κατά μέσο όρο στο ποσοστό του 60% και του 55% αντίστοιχα (Kwong, Chen and Shin, 2016).

Το *BRCA1* βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17, στο μεγάλο βραχίονα (17q21) και κωδικοποιεί την πυρηνική πρωτεΐνη BRCA1. Η πρωτεΐνη αυτή αποτελείται από 1863 αμινοξέα και το μεγαλύτερο μέρος της κωδικοποιείται από το εξόνιο 11. Πρόκειται για μία εξαιρετικά σημαντική πρωτεΐνη, καθώς εμπλέκεται στην επιδιόρθωση του DNA, τη γονιδιωματική σταθερότητα, στη ρύθμιση της μεταγραφής, στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, στην ουβικιτίνωση των πρωτεϊνών και τη βιογένεση των miRNAs (Barnes, 1999, Hawsawi et al., 2019, Raimundo et al. 2020).

Το *BRCA2* έχει μεγαλύτερο μέγεθος από το *BRCA1*, βρίσκεται στο χρωμόσωμα 13 και συγκεκριμένα στη θέση 13q12, αποτελείται από 27 εξόνια, κωδικοποιώντας την πρωτεΐνη BRCA2, η οποία αποτελείται από 3418 αμινοξέα. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον ομόλογο ανασυνδυασμό, τόσο κατά την επιδιόρθωση του DNA αλλά και κατά τη διάρκεια της μείωσης (Hawsawi et al., 2019).

Οι μεταλλάξεις που μπορούν να εντοπιστούν στο γονίδιο *BRCA1* έχουν μεγάλο εύρος και έχουν ανακαλυφθεί περισσότερες από 1600 έως σήμερα (Gorodetska, Kozeretska and Dubrovska, 2019). Η συνηθέστερη αιτία απενεργοποίησης του *BRCA1* είναι οι σημειακές μεταλλάξεις, όμως έχει ανιχνευθεί και η ύπαρξη μεγάλων γονιδιακών αναδιατάξεων σε όλο το μήκος των γονιδίων αυτών, οι οποίες – σε ένα μεγάλο ποσοστό – είναι αποκλειστικές για την οικογένεια που τις φέρει. Οι πιο συχνές μεταλλάξεις ανιχνεύονται στο εξόνιο 11, όπου κωδικοποιείται το μεγαλύτερο μέρος της BRCA1 καθώς και οι θέσεις δέσμησης πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τη BRCA1, όπως είναι η c-Myc, οι Rad50 και Rad51, η BRCA2 και η PALB2. Οι μεταλλάξεις αυτές έχουν σχετιστεί με υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης κληρονομικού καρκίνου του μαστού με κακή πρόγνωση και ανάπτυξη μεταστατικών όγκων (Pandey, 2015). Επίσης έχουν ανιχνευτεί παρανοηματικές μεταλλάξεις με κλινική σημασία σε δύο λειτουργικές περιοχές της BRCA1, την περιοχή RING και την περιοχή BRCT. Η ιδρυτική μετάλλαξη 185delAG στις περιοχές RING και BRCT έχει ανιχνευθεί σε πληθυσμούς Εβραίων Ασκενάζι και συνδέεται με υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού (Gorodetska, Kozeretska and Dubrovska, 2019).

Στο γονίδιο *BRCA2* έχουν ανακαλυφθεί περισσότερες από 1800 μεταλλάξεις (Godet and Gilkes, 2017). Οι μεταλλάξεις αυτές αφορούν διαγραφές και παρανοηματικές μεταλλάξεις καθώς και μεταλλάξεις μετατόπισης πλαισίου, οι οποίες οδηγούν σε πρόωρα κωδικόνια λήξης και στην κωδικοποίηση μη λειτουργικής πρωτεΐνης. Σε πληθυσμούς Εβραίων Ασκενάζι έχει ανακαλυφθεί η πιο συχνή μετάλλαξη του *BRCA2*, που αφορά μετατόπιση πλαισίου στο εξόνιο 11 (6174delT), ενώ έχει βρεθεί πως μεταλλάξεις στο *BRCA2* σχετίζονται τόσο με την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού, ωθηκών και προστάτη, όσο και άλλων τύπων καρκίνου όπως είναι για παράδειγμα οι όγκοι της ουροδόχου κύστεως, του στομάχου και του παγκρέατος (Gorodetska, Kozeretska and Dubrovnska, 2019).

Καθώς οι μεταλλάξεις και οι γονιδιακές αναδιατάξεις στα *BRCA1/2* οδηγούν σε λειτουργικές ελλείψεις, επιφέρεται εν τέλει η δυσλειτουργία των πρωτεϊνών *BRCA1* και *BRCA2*, επηρεάζοντας την επιδιόρθωση του DNA, τη γονιδιωματική σταθερότητα και συντελώντας στη νεοπλασματική εξαλλαγή των κυττάρων (Walsh et al., 2006).

Οι κληρονομικές μεταλλάξεις στο *BRCA1* οδηγούν συνήθως σε βασικού τύπου (basal-like) όγκους του μαστού, χαμηλής διαφοροποίησης, υψηλού σταδίου και κακής πρόγνωσης, οι οποίοι παρουσιάζουν τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του τριπλά-αρνητικού καρκίνου του μαστού σε ένα ποσοστό που αγγίζει το 80% (Turner and Reis-Filho, 2006). Επίσης, χαρακτηρίζονται από ατυπία των μυελικών χαρακτηριστικών, υψηλούς δείκτες πολλαπλασιασμού, λεμφοκυτταρικές διηθήσεις και διεισδυτικά όρια (Godet and Gilkes, 2017). Οι κληρονομικοί όγκοι του μαστού που οφείλονται σε μεταλλάξεις στο *BRCA2* ομοιάζουν με τον σποραδικό καρκίνο, καθώς δεν εμφανίζουν συγκεκριμένα κλινικά χαρακτηριστικά (Mateju et al., 2010). Ωστόσο, υπάρχουν μελέτες που έχουν δείξει πως οι ασθενείς με μεταλλάξεις στο *BRCA2*, εμφανίζουν μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης ετερόπλευρου καρκίνου του μαστού, θετικού στους οιστρογονικούς υποδοχείς (Godet and Gilkes, 2017). Έχει επίσης βρεθεί πως οι ασθενείς με κληρονομικές μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1/2*, εμφανίζουν καρκίνο του μαστού σε νεότερη ηλικία, με επιθετικότερη νόσο και χειρότερη πρόγνωση σε σχέση με ασθενείς που φέρουν σωματικές μεταλλάξεις στα συγκεκριμένα γονίδια (Mylavarapu, Das and Roy, 2018).

➤ ***TP53* και σύνδρομο Li-Fraumeni**

Το γονίδιο *TP53* εδράζεται στο χρωμόσωμα 17 και κωδικοποιεί την πρωτεΐνη P53, μία πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη, η οποία εμπλέκεται σε πληθώρα μοριακών λειτουργιών, όπως είναι η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, η απόπτωση, η αγγειογένεση και η επιδιόρθωση των βλαβών του DNA. Γενετικές απαλοιφές και απώλεια της ετεροζυγωτίας στο χρωμόσωμα 17, οδηγούν σε μεταλλάξεις (κυρίως αντι-νοηματικές) της πρωτεΐνης P53 με αποτέλεσμα την αναστολή της φυσιολογικής δραστηριότητας της πρωτεΐνης και την ογκογένεση (Vogelstein, Lane and Levine, 2000). Το σπάνιο καρκινικό σύνδρομο Li-Fraumeni (LFS), το οποίο κληρονομείται με επικρατή αυτοσωμικό τρόπο, οφείλεται σε μετάλλαξη του *TP53* και έχει βρεθεί πως

αντιπροσωπεύει το περίπου 1% των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού. Έχει, επίσης, δειχθεί πως ο κίνδυνος εμφάνισης πρώιμης νόσου εξαιτίας του LFS είναι κατά 60 φορές μεγαλύτερος σε σχέση με το γενικό πληθυσμό και το 3-8% γυναικών κάτω των 30 ετών με διαγνωσμένο καρκίνο του μαστού, φέρουν μετάλλαξη *TP53* (Kwong, Chen and Shin, 2016).

➤ ***PTEN* – σύνδρομο Cowden**

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *PTEN* εδράζεται στο χρωμόσωμα 10, στη θέση 10q23.3 και η απενεργοποίησή του συσχετίζεται με πολλούς καρκίνους συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού. Το *PTEN* κωδικοποιεί την ομώνυμη πρωτεΐνη, η οποία ανήκει στην οικογένεια των φωσφατασών και η οποία διαδραματίζει βασικό ρόλο στην αναστολή της ογκογόνου δράσης της πρωτεΐνης PI3K. Μεταλλάξεις του γονιδίου *PTEN* οδηγούν σε απώλεια της λειτουργίας της PTEN με άμεσο αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μεταγωγής σημάτων μέσω του μονοπατιού PI3K/AKT επιτείνοντας τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την καρκινογένεση (Zhang et al., 2013).

Το μεταλλαγμένο γονίδιο κληρονομείται με επικρατή, αυτοσωμικό τρόπο και η μετάλλαξη αυτή ευθύνεται για το καρκινικό σύνδρομο Cowden (CS) (Kwong et al., 2016). Έχει δειχθεί πως το περίπου 85% των γυναικών με το σύνδρομο αυτό, θα νοσήσουν κάποια στιγμή στη ζωή τους από καρκίνο του μαστού (Robinson and Cohen, 2006).

➤ ***ATM* - σύνδρομο Ataxia Telangiectasia (AT)**

Το γονίδιο *ATM* εδράζεται στο χρωμόσωμα 11 και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 3056 αμινοξέων. Πρόκειται για μία κινάση, η οποία διαδραματίζει ρόλο στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και επίσης συμμετέχει στους μηχανισμούς ελέγχου των βλαβών του DNA. Άτομα που φέρουν μεταλλάξεις και στα δύο αλληλόμορφα, νοσούν από το σπάνιο σύνδρομο Ataxia Telangiectasia, το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε πλήθος διαταραχών όπως παρεγκεφαλιδική αταξία, οφθαλμοδερματική τελαγγειεκτασία, ανοσοανεπάρκεια, και καρκίνο λεμφοειδούς κυρίως προέλευσης. Η κληρονομία του μεταλλαγμένου γονιδίου στις επόμενες γενεές πραγματοποιείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο και έχει δειχθεί πως τα άτομα που είναι ετερόζυγα για τη μετάλλαξη αυτή, δεν εμφανίζουν τον φαινότυπο του συνδρόμου AT, διατρέχουν όμως αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση καρκίνου του μαστού. Φορείς διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού (Bernstein & Concannon, 2017).

➤ ***STK11* - Σύνδρομο Peutz-Jeghers**

Το γονίδιο *STK11* είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο που εδράζεται στο χρωμόσωμα 19p13.3 και κωδικοποιεί μια κινάση σερίνης/θρεονίνης που διαδραματίζει ρόλο στη ρύθμιση της πολικότητας των κυττάρων και του κυτταρικού κύκλου. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό, οι οποίες κληρονομούνται με επικρατή αυτοσωμικό τρόπο, μπορεί να οδηγήσουν στο σπάνιο

καρκινικό σύνδρομο Peutz-Jeghers, στα κλινικά χαρακτηριστικά του οποίου ανήκει – μεταξύ άλλων – ο αυξημένος κίνδυνος ανάπτυξηςκαρκίνου του μαστού, συνήθως σε νεότερες ηλικίες κάτω των 50 ετών (Daniell et al.,2017).

➤ ***CDH1* -σύνδρομο γαστρικού καρκίνου διάχυτου τύπου**

Οι μεταλλάξεις στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο *CDH1* συσχετίζονται με το κληρονομικό σύνδρομο του γαστρικού καρκίνου διάχυτου τύπου, το οποίο κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο. Το *CDH1* βρίσκεται στο χρωμόσωμα16 και κωδικοποιεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, την e-cadherin, η οποία εμπλέκεταιστην σύνδεση των κυττάρων. Εκτός από τον κίνδυνο ανάπτυξης γαστρικού καρκίνου,οι γυναίκες που έχουν κληρονομήσει το μεταλλαγμένο γονίδιο *CDH1* διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση λοβιακού καρκίνου του μαστού, σε κάποια στιγμή τηςζωής τους, με την πιθανότητα αυτή να αγγίζει το ποσοστό του 50% (Corso et al., 2020).

2.3.2. Μέσης Διεισδυτικότητας γονίδια

➤ ***PALB2* και *RAD51C*- αναιμία Fanconi**

Το *PALB2* είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο που εδράζεται στο χρωμόσωμα 16p12.1 και κωδικοποιεί μία πυρηνική πρωτεΐνη, η οποία έχει βρεθεί πως αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες *BRCA1* και *BRCA2* κατά τον ομόλογο ανασυνδυασμό και την επιδιόρθωσηθραύσεων και βλαβών του DNA. Τα άτομα που φέρουν μεταλλάξεις και στα δύο αλληλόμορφα πάσχουν από το σπάνιο κληρονομικό σύνδρομο FA (αναιμία Fanconi), το οποίο κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο και του οποίου ο φαινότυπος παρουσιάζει δυσλειτουργία του μυελού των οστών καθώς και αύξηση τουκινδύνου καρκινογένεσης, κυρίως στο μαστό και στο πάγκρεας. Οι γυναίκες που φέρουν το μεταλλαγμένο *PALB2* σε ένα από τα δύο αλληλόμορφα διατρέχουν διπλάσιο κίνδυνο για εμφάνιση καρκίνου του μαστού σε σχέση με το γενικό πληθυσμό (Neromuceno et al., 2017). Έχει, επίσης ανακαλυφθεί πως οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *RAD51C* οδηγούν στο σύνδρομο της αναιμίας Fanconi καθώς και στον αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού. Το *RAD51C* είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17 και κωδικοποιεί μία πυρηνική πρωτεΐνη, την *RAD51*, η οποία αποτελείται από 376 αμινοξέα και εμπλέκεται στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA μέσω του ομόλογου ανασυνδυασμού. Η ύπαρξη μεταλλάξεων στο *RAD51C* έχει συνδεθεί με τον κληρονομικό καρκίνο του μαστού, σε μικρότερο όμως βαθμό από τις μεταλλάξεις των *BRCA1* και *BRCA2* (Vaz et al., 2010).

➤ ***CHEK2***

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *CHEK2* εδράζεται στο χρωμόσωμα 22 και κωδικοποιεί την ομόνυμη πρωτεΐνη. Η *CHEK2* είναι μια κινάση σερίνης/θρεονίνης, ο ρόλος της οποίας έγκειται στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου καθώς και στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA. Η απώλεια της λειτουργίας του λόγω μεταλλάξεων, έχει συσχετιστεί με διάφορους τύπους καρκίνου, ειδικότερα με τον καρκίνο του μαστού (Bell et al., 2007). Οι φορείς του μεταλλαγμένου *CHEK2* εμφανίζουν διπλάσιο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού και φαίνεται πως ευθύνονται για το 1% των περιπτώσεων στις γυναίκες και για το περίπου 9% των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού στους άνδρες. Ωστόσο, οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *CHEK2* είναι εξαιρετικά σπάνιες σε σχέση με τις αντίστοιχες των *BRCA1/2* και τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των όγκων που προκαλούν ομοιάζουν με αυτά του σποραδικού καρκίνου του μαστού (Narod & Lynch, 2007).

➤ ***BARD1***

Το *BARD1* είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο, το οποίο έχει δείχθει πως εμπλέκεται στον καρκίνο του μαστού, καθώς η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί αλληλεπιδρά με την *BRCA1* κατά την επιδιόρθωση των βλαβών του DNA μέσω της δημιουργίας του ετεροδιμερούς συμπλόκου *BARD1- BRCA1*. Παρότι θεωρείται μέσης προς χαμηλής διεισδυτικότητας γονίδιο για ανάπτυξη καρκίνου του μαστού, νεότερες μελέτες έχουν δείξει συσχέτιση της ετερόζυγης μετάλλαξής του με υψηλού βαθμού κακοήθειας όγκους, όπως είναι ο τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού (Śniadecki et al., 2020).

➤ **Τα γονίδια MMR**

Τα γονίδια του συστήματος MMR (Mismatch Repair) είναι τα *MSH2*, *MLH1*, *MSH6*, *PMS2* και *EPCAM*. Το σύστημα MMR είναι υπεύθυνο για την επιδιόρθωση βλαβών κατά τη διαδικασία της αντιγραφής του DNA αλλά και του ομόλογου ανασυνδυασμού. Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια MMR αποτελούν τα βασικά συστατικά αυτού του συστήματος επιδιόρθωσης βλαβών του DNA και εμφανίζουν αλληλεπιδράσεις ως ετεροδιμερή σχηματίζοντας σύμπλοκα. Οι ασθενείς που παρουσιάζουν βλάβη σε κάποιες από αυτές τις πρωτεΐνες θα εμφανίσουν μεταλλάξεις μετατόπισης πλαισίου ανάγνωσης σε κωδικές και μη κωδικές μικροδορυφορικές περιοχές, που μπορεί εν τέλει να οδηγήσουν σε φαινότυπο υψηλής μικροδορυφορικής αστάθειας (Baretti & Le, 2018). Η μικροδορυφορική αστάθεια σχετίζεται τόσο με σποραδικούς όσο και με κληρονομικούς καρκίνους, όπως είναι το σύνδρομο Lynch, ένα επικρατές κληρονομούμενο σύνδρομο καρκίνου του παχέος εντέρου στο οποίο έχουν ανακαλυφθεί περισσότερες από 50 ιδρυτικές μεταλλάξεις στα γονίδια MMR (Ponti et al. 2015).

Όσον αφορά στον καρκίνο του μαστού, έχει δείχθει σε μελέτες η σύνδεση μεταξύ μεταλλάξεων στα γονίδια MMR και στον HER+ καρκίνο του μαστού σε ποσοστό που αγγίζει το 3% των περιπτώσεων (Sajjadi et al., 2021).

2.3.3 Χαμηλής Διεσδυτικότητας γονίδια

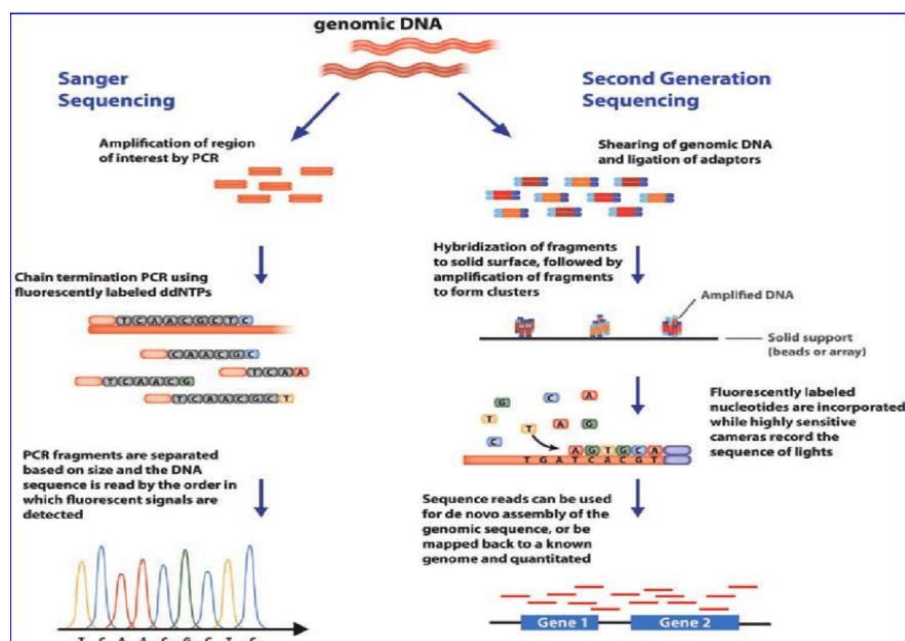
Τα τελευταία χρόνια έχουν επίσης ανιχνευθεί γονίδια χαμηλής διεσδυτικότητας, με χαμηλό δηλαδή κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Συνήθως πρόκειται για γονίδια, οι σημειακές μεταλλάξεις των οποίων βρίσκονται σε μη κωδικές περιοχές και ο μηχανισμός καρκινογένεσης βασίζεται στην ενεργοποίηση γονιδίων που προάγουν τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, σε αντίθεση με τις μεταλλάξεις των γονιδίων υψηλής και μέσης διεσδυτικότητας που οδηγούν στην απενεργοποίηση της επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA. Λόγω του χαμηλού κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου οφειλόμενου σε μεταλλάξεις των γονιδίων αυτών, η ανίχνευσή τους δεν αποτελεί, προς το παρόν, μέρος της κλινικής αξιολόγησης των ασθενών με καρκίνο του μαστού (Shiovitz and Korde, 2015).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Η ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ NGS ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

3.1 Από την αλληλούχιση κατά Sanger στη αλληλούχιση νέας γενιάς (NGS)

Η αλληλούχιση του DNA υπήρξε ορόσημο στις βιοιατρικές επιστήμες καθώς επετεύχθη η αποκωδικοποίηση ολόκληρου του ανθρώπινου γονιδιώματος και συνέβαλλε σε σημαντικές ανακαλύψεις στους τομείς της βιολογίας και της ιατρικής. Η επικρατέστερη μέθοδος αλληλούχισης, από τα τέλη της δεκαετίας του 1970 έως και μερικά χρόνια πριν, υπήρξε η μέθοδος αλληλούχισης κατά Sanger, με την οποία πραγματοποιήθηκε η πρώτη ολοκληρωμένη αλληλούχιση του ανθρώπινου γονιδιώματος (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004). Πρόκειται για μια ενζυμική μέθοδο αλληλούχισης κατά την οποία χρησιμοποιούνται τροποποιημένα δεοξυριβονουκλεοτίδια, τα διδεοξυριβονουκλεοτίδια (ddNTPs), τα οποία διαθέτουν υδρογόνο αντί υδροξυλίου στο 3' άκρο τους και προκαλούν τερματισμό της επιμήκυνσης της υπό μελέτη αλυσίδας DNA κατά την ενσωμάτωσή τους μέσω της DNA πολυμεράσης. Όταν, λοιπόν, προστεθεί ένα ddNTP κατά τη διαδικασία σύνθεσης της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, είναι αδύνατος ο σχηματισμός φωσφοδιεστερικού δεσμού με το επόμενο dNTP, διακόπτοντας τη διαδικασία σύνθεσης και με αυτό τον τρόπο γίνεται γνωστή η αλληλουχία του αρχικού προϊόντος (Shendure et al., 2011). Η μέθοδος Sanger υπέστη πολλές βελτιώσεις μέσα στα χρόνια που ακολούθησαν από την ανακάλυψή της και το 1998 κυκλοφόρησε στην αγορά το πρώτο αυτόματο σύστημα ανάλυσης αλληλουχίας βάσεων που περιλάμβανε τη χρήση φθορίζουσών χρωστικών για τη σήμανση των ddNTP's καθώς και τη χρήση τριχοειδών σωλήνων για τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης. Παρά τις διαρκείς βελτιώσεις, όμως, η μέθοδος Sanger έχει πολλούς περιορισμούς, όπως είναι η αδυναμία ταυτόχρονης αλληλούχισης μεγάλων τμημάτων DNA, καθώς έχει τη δυνατότητα αλληλούχισης τμημάτων DNA, όχι μεγαλύτερα των 1000 βάσεων ανά αντίδραση. Επίσης, με τη μέθοδο Sanger δεν είναι δυνατόν να πραγματοποιηθούν περισσότερες από 384 αντιδράσεις ταυτόχρονα, γεγονός που την καθιστά εξαιρετικά χρονοβόρα σαν μέθοδο και με αρκετά μεγάλο κόστος για τις περιπτώσεις αλληλούχισης μεγαλύτερων τμημάτων DNA (Slatko et al., 2018, Bunnik & Le Roch, 2013). Τα μειονεκτήματα αυτά της μεθόδου της Sanger καθώς και η απαίτηση για την αλληλούχιση ολόκληρου του ανθρώπινου γονιδιώματος σε σύντομο χρονικό διάστημα και με χαμηλότερο κόστος, οδήγησαν στην ανάπτυξη νέων τεχνολογιών αλληλούχισης του DNA, όπως είναι η αλληλούχιση νέας γενιάς (Next Generation Sequencing – NGS) που κυκλοφόρησε για πρώτη φορά το 2005. Με τη χρήση της τεχνολογίας NGS κατέστη δυνατή η αλληλούχιση του πλήρους γονιδιώματος σε λίγες μόνο ημέρες (σε αντίθεση με τη μέθοδο Sanger που απαιτούσε αρκετά χρόνια για αυτή τη διαδικασία) και με σημαντικά χαμηλότερο κόστος, καθώς η μαζική παράλληλη αλληλούχιση πλήθους γονιδίων στην ίδια εφαρμογή μειώνει το κόστος αλληλούχισης ανά γονίδιο (van Dijk et al., 2014). Με την NGS είναι δυνατή η πραγματοποίηση τεράστιου αριθμού αντιδράσεων ταυτόχρονα (σε ορισμένες

περιπτώσεις είναι δυνατόν να παραχθούν περισσότερες από ένα δισεκατομμύριο αναγνώσεις μικρού μήκους σε κάθε κύκλο ανάλυσης του γενετικού αναλυτή), καθώς και αλληλούχισης μεγάλων τμημάτων DNA, δίνοντας αξιόπιστα αποτελέσματα ταχύτερα με αποτέλεσμα την τεράστια συμβολή της νέας αυτής τεχνολογίας στην κατανόηση και μελέτη γενετικών ασθενειών όπως ο καρκίνος καθώς και στη διάγνωση, πρόγνωση και εξατομικευμένη θεραπεία ασθενών με καρκίνο, όπως θα αναλυθεί στα επόμενα κεφάλαια της παρούσας διπλωματικής εργασίας.



Εικόνα 3. 1. Η μεθοδολογία των τεχνικών αλληλούχισης Sanger και NGS (Bunnik and Le Roch, 2013)

3.2 Η τεχνολογία της μαζικής παράλληλης αλληλούχισης (NGS)

Κατά την αλληλούχιση με τεχνικές NGS, μπορούν να εφαρμοστούν διάφορες μεθοδολογίες ανάλογα με τις απαιτήσεις της μελέτης. Ως υπόστρωμα δύναται να χρησιμοποιηθεί γενωμικό DNA, mRNA (αγγελιοφόρο RNA), ncRNA (μη κωδικό RNA) και γενικότερα νουκλεϊκά και ριβονουκλεϊκά μόρια που έχουν ληφθεί έπειτα από ειδικές διαδικασίες (Kulski, 2016). Τα βασικά βήματα που ακολουθούνται κατά τη μέθοδο NGS είναι τα ακόλουθα ((Shendure et al., 2011, Shendure & Ji, 2008):

- Κατακερματισμός του DNA-Προετοιμασία εκμαγείου: Αρχικά, πραγματοποιείται η διάσπαση του DNA σε μικρά τμήματα, μεγέθους περίπου 100-300 βάσεων, με χρήση διαφόρων μεθόδων, όπως είναι η ενζυμική πέψη ή μηχανικές μέθοδοι, με αποτέλεσμα τη δημιουργία θρυμματισμένων εκμαγείων. Οι στοχευμένες

αλληλουχίες DNA που επιθυμείται να αλληλουχηθούν εξάγονται με τη μέθοδο του υβριδισμού, η οποία περιλαμβάνει τη χρήση συμπληρωματικών -ως προς την αλληλουχία- ανιχνευτών. Ακολούθως, η ενίσχυση των στοχευμένων τμημάτων DNA μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με χρήση PCR σε γαλάκτωμα (emulsion PCR) με τη βοήθεια πολλών ζευγών εκκινητών, είτε με την τεχνική της ενίσχυσης στερεής-φάσης (solid-phase amplification). Τα εκμαγεία συνήθως ακινητοποιούνται σε μια στερεή επιφάνεια ούτως ώστε να είναι δυνατή η πραγματοποίηση μεγάλου πλήθους αντιδράσεων αλληλούχισης ταυτόχρονα.

- Δημιουργία της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης: στοχεύει στην εξειδίκευση τουκάθε τμήματος DNA, μέσω της κατάλληλης τροποποίησής του, ώστε να είναι δυνατή η αναγνώριση και ο εντοπισμός του κάθε αντίστοιχου τμήματος στο πληροφοριακό σύστημα που χρησιμοποιείται.
- Αλληλούχιση: Για τη διαδικασία της αλληλούχισης, η γονιδιωματική βιβλιοθήκη που δημιουργήθηκε, φορτώνεται σε κάποια από τις υπάρχουσες πλατφόρμες αλληλούχισης, που θα περιγραφούν στη συνέχεια, οι οποίες παρουσιάζουν διαφορές ως προς τον τρόπο που πραγματοποιείται η διαδικασία, αλλά και διαφορετικά προγράμματα αλληλούχισης. Στις διάφορες μεθόδους που χρησιμοποιούνται ανήκει ο κυκλικός αντιστρεπτός τερματισμός, η αλληλούχιση μέσω αντίδρασης λιγάσης, η πυροαλληλούχιση, η αλληλούχιση με σύνθεση βασισμένη στην πολυμαράση καθώς και η αλληλούχιση μέσω σύνδεσης με ολιγονουκλεοτίδια. Το τελικό αποτέλεσμα κάθε μεθόδου είναι η μαζική παράλληλη αλληλούχιση όλων των τμημάτων DNA και οι πληροφορίες που συλλέγονται αναλύονται στη συνέχεια με χρήση λογισμικού βιοπληροφορικής.
- Βιοπληροφορική ανάλυση δεδομένων: Πραγματοποιείται σύγκριση των πληροφοριών που συλλέχθηκαν από την διαδικασία της αλληλούχισης με αλληλουχία αναφοράς του γονιδιώματος του ανθρώπου ώστε να ανιχνευθούν και να προσδιοριστούν τυχόν μεταλλάξεις σε όλο το μήκος των υπό μελέτη στοχευμένων αλληλουχιών.

Υπάρχουν αρκετές διαθέσιμες πλατφόρμες NGS που κυκλοφορούν στην αγορά, η κάθε μία από τις οποίες χρησιμοποιεί διαφορετική προσέγγιση για την επίτευξη μαζικής, ταχείας και αποτελεσματικής αλληλούχισης (Kanzi et al., 2020). Η πρώτη πλατφόρμα NGS αναπτύχθηκε από την 454 Life Sciences και κυκλοφόρησε το έτος 2005 χρησιμοποιώντας την τεχνολογία της πυροαλληλούχισης, εμφανίζοντας όμως τα μειονεκτήματα του υψηλού κόστους και της

χαμηλής ακρίβειας κατά την αλληλούχιση ομοπολυμερών περιοχών. Ακολούθησε η πλατφόρμα Solexa/Illumina, το 2006, η οποία κυριαρχεί μέχρι και σήμερα στην αγορά. Η τεχνολογία που χρησιμοποιείται στην εν λόγω πλατφόρμα περιλαμβάνει τη χρήση σημασμένων, φθορίζοντων νουκλεοτιδίων τερματισμού της αλυσίδας και έχει πολύ μεγάλη απόδοση σε συνδυασμό με χαμηλό κόστος. Υπάρχουν αρκετά επιμέρους μηχανήματα αλληλούχισης της Illumina, για χρήση αναλόγων των απαιτήσεων, όπως είναι τα NextSeq 500, HiSeq 2500, 3000, 4000, και HiSeqX, το MiSeq καθώς και η νεότερη τεχνολογία TruSeq με δυνατότητα αλληλούχισης πολύπλοκων και μεταθέσιμων στοιχείων. Το 2007 κυκλοφόρησε η τρίτη πλατφόρμα NGS από την Applied Biosystems, με την ονομασία SOLID, η οποία βασίζεται στη μέθοδο αλληλούχισης μέσω σύνδεσης με ολιγονουκλεοτίδια, η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλή ακρίβεια, χαμηλό κόστος αλλά μικρή ταχύτητα σε σχέση άλλες NGS πλατφόρμες. Μία ακόμα πλατφόρμα NGS, που κυκλοφόρησε το έτος 2010, είναι η PGM από την Ion Torrent, όπου η ανίχνευση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών πραγματοποιείται από τις μεταβολές του pH στο διάλυμα περιβάλλοντος που συσχετίζονται με τον αριθμό των ενσωματωμένων νουκλεοτιδίων και χαρακτηρίζεται από εξαιρετικά υψηλή ταχύτητα αλληλούχισης.

3.3 Εφαρμογές της τεχνολογίας NGS στην έρευνα για τον καρκίνο

Η αλληλούχιση νέας γενιάς εφαρμόζεται όλο και περισσότερο τα τελευταία χρόνια στις γονιδιακές έρευνες για τον καρκίνο. τις τελευταίες δεκαετίες. Χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό νέων και σπάνιων μεταλλάξεων που προκαλούν καρκινογένεση, για τον εντοπισμό φορέων μετάλλαξης των οικογενών και κληρονομικών μορφών του καρκίνου και για να παράσχει τη μοριακή βάση του κάθε όγκου ώστε να επιλεγθεί η κατάλληλη στοχευμένη θεραπεία για τον ασθενή. Φαίνεται, λοιπόν, πως η κλινική χρησιμότητα της NGS όσον αφορά στη διάγνωση, πρόγνωση, θεραπεία και πρόβλεψη της θεραπευτικής ανταπόκρισης των ασθενών με καρκίνο είναι ιδιαίτερα σημαντική.

Οι γονιδιωματικές μεταβολές στον καρκίνο εμφανίζουν μεγάλη πολυπλοκότητα, περιλαμβάνοντας σημειακές μεταλλάξεις (SNPs), δομικές παραλλαγές, ελλείψεις ή μικρές παρεμβολές. Οι εφαρμογές ανάλυσης του συνόλου του γονιδιώματος (WGS- whole genome sequence) και της ανάλυσης ολόκληρων εξονίων (WES – whole exome sequence) μέσω της τεχνολογίας NGS έχουν οδηγήσει στην ανακάλυψη πολλών εκ των μεταβολών αυτών στον καρκίνο (Imperial et al., 2019), ενώ οι έρευνες συνεχίζονται με αμείωτο ρυθμό. Με την NGS μπορεί επίσης να αναλυθεί ολόκληρο το μεταγράφημα (RNA-seq), με αποτέλεσμα την ποσοτικοποίηση των προφίλ έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στον καρκίνο, αλλά και την ανίχνευση εναλλακτικών ματισμάτων (Wang, Gerstein and Snyder, 2009). Επιπρόσθετα, με χρήση διαφόρων τεχνικών που βασίζονται στην τεχνολογία NGS, όπως είναι οι τεχνικές Bisulfite-Seq και ChIP-seq, είναι δυνατή η μελέτη επιγενετικών αλλοιώσεων, τροποποιήσεων των ιστονών και αλλαγών στη μεθυλίωση του DNA που συμβάλλουν στην καρκινογένεση

(Wold and Myers, 2007). Με το συνδυασμό των τεχνικών NGS και τη χρήση των εργαλείων βιοπληροφορικής είναι, λοιπόν, δυνατή η αποκρυπτογράφηση του γονιδιώματος του καρκίνου με απώτερο στόχο την εξατομικευμένη θεραπεία των ασθενών με καρκίνο.

Από το 2005 και μετά, με την εμφάνιση της τεχνολογίας NGS, επετεύχθη ο εντοπισμός νέων γονιδίων υπεύθυνων για την κληρονομική προδιάθεση του καρκίνου του μαστού, πλην των δύο πολυμελετημένων, υψηλής διείσδυσης γονιδίων, *BRCA1/2*. Στα νέα αυτά γονίδια συμπεριλαμβάνονται τα *BARD1* και *RAD51C*, που αναλύθηκαν σε προηγούμενο κεφάλαιο και τα οποία αλληλεπιδρούν με τα *BRCA1/2* συμμετέχοντας στην επιδιόρθωση του DNA, με αποτέλεσμα οι μεταλλάξεις στα γονίδια αυτά να αυξάνουν σημαντικά τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού. Επομένως, η ταυτόχρονη γονιδιωματική μελέτη πολλαπλών γονιδίων (μαζί με τα γονίδια *BRCA1/2*) και ο εντοπισμός μεταλλάξεων με χρήση των νέων τεχνολογιών NGS οδηγεί σε αύξηση της εκτίμησης κινδύνου για καρκίνο του μαστού σε γυναίκες με κληρονομική προδιάθεση, γεγονός που καταδεικνύει τη σημαντικότητα της NGS στην πρόληψη του καρκίνου του μαστού (Walsh et al., 2010).

Παρ' όλες όμως τις νέες ανακαλύψεις για γονίδια και γενετικούς τόπους που εμπλέκονται στον κληρονομικό καρκίνο του μαστού, ο στοχευμένος μοριακός γενετικός έλεγχος των μεταλλάξεων στα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2* εξακολουθεί να αποτελεί, έως και σήμερα, τον βασικό έλεγχο στον κληρονομικό καρκίνο του μαστού. Καθώς τα γονίδια αυτά είναι πολύ μεγάλα σε μέγεθος, ο μοριακός έλεγχος μεταλλάξεων σε αυτά θα πρέπει να είναι πλήρης και να καλύπτει όλες τις πιθανές μεταλλάξεις. Με την τεχνολογία NGS, αυτό έχει καταστεί εφικτό και σε πολύ συντομότερο χρόνο σε σχέση με την μέθοδο Sanger. Σε έρευνα των Park et al (2016), μελετήθηκαν οι μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1/2* 12 ασθενών με διεισδυτικό καρκίνο του μαστού, τόσο με χρήση NGS, όσο και με χρήση της μεθόδου Sanger. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν πως με τη χρήση NGS εντοπίστηκαν μεταλλάξεις με παρόμοια ακρίβεια με αυτή της μεθόδου Sanger, σε πολύ συντομότερο όμως χρονικό διάστημα, καθώς ο μέσος χρόνος για την αλληλούχιση ήταν 6 ημέρες με την NGS, σε αντίθεση με τη Sanger που ο μέσος χρόνος ήταν 22 ημέρες (Πίνακας 2).

Πίνακας 3. 1. Μέσος απαιτούμενος χρόνος και σύγκριση αποτελεσμάτων γονοτύπησης των *BRCA1/2* με τις μεθόδους NGS και Sanger (Park et al., 2017)

ΧΡΟΝΟΣ ΚΑΙ ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗ	Sanger	NGS
ΜΕΣΟΣ ΧΡΟΝΟΣ (ΗΜΕΡΕΣ)	22	6.5
<i>BRCA1</i>		
ΧΩΡΙΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ	9	10

ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ	1	1
VUS	2	1
<i>BRCA2</i>		
ΧΩΡΙΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ	8	11
ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ	1	1
VUS	3	0

VUS: γονίδια αβέβαιης κλινικής σημασίας (Variant of Uncertain Significance)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΠΡΟΣΦΑΤΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΜΕ NGS ΓΙΑ ΤΟΝ ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

4.1 Γενικές πληροφορίες – Μεθοδολογία βιβλιογραφικής ανασκόπησης

Η τεχνολογία NGS χρησιμοποιείται ευρέως σε μελέτες για τον καρκίνο, καθώς διαθέτει την ικανότητα ανίχνευσης μεγάλου αριθμού μεταλλαγών σε πολλά γονίδια ταυτοχρόνως. Η ανάλυση του μοριακού τοπίου ενός όγκου μπορεί να παρέχει την εικόνα της ετερογένειάς του καθώς και χρήσιμες κλινικά πληροφορίες όσον αφορά στη διάγνωση, πρόγνωση αλλά και πρόβλεψη της ανταπόκρισης στη θεραπεία των ασθενών (Kandoth et al., 2013). Επιπρόσθετα, με τη χρήση της τεχνολογίας NGS, μπορούν να εντοπιστούν και να ανακαλυφθούν νέα γονίδια που εμπλέκονται στην καρκινογένεση. Με αυτήν την τεχνική, λοιπόν, κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας που αναπτύχθηκε η NGS, κατέστη δυνατή όχι μόνο η στοχευμένη αλληλούχιση ενός ή περισσότερων γνωστών γονιδίων που εμπλέκονται στον καρκίνο του μαστού, αλλά και η αλληλούχιση ολόκληρων γονιδιωμάτων, μεταγράφων και εξονίων, για την ταυτοποίηση τυχόν νέων γονιδίων και μεταλλάξεων που ευθύνονται για την προδιάθεση ανάπτυξης καρκίνου του μαστού.

Η προσέγγιση της στοχευμένης ανάλυσης γονιδίων με NGS για τον κληρονομικό καρκίνο του μαστού, είναι αυτή που χρησιμοποιείται στις εξετάσεις γονιδιακών πάνελ, όπως ειπώθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο και αφορούν στα γνωστά γονιδιαυψηλής διεισδυτικότητας, όπως τα *BRCA1/2*, *TP53*, *ATM*, *STK11*, *CDH1*, καθώς και σε άλλα μέσης διεισδυτικότητας γονίδια στον καρκίνο του μαστού. Παρόλο, όμως, το γεγονός ότι πρόκειται για γονίδια που έχουν μελετηθεί διεξοδικά, οι μελέτες και οι έρευνες για ανακάλυψη νέων πιθανών μεταλλάξεων στα γονίδια αυτά που ευθύνονται για τον κληρονομικό καρκίνο μαστού, συνεχίζονται με αμείωτο ενδιαφέρον με χρήση της τεχνικής NGS.

Η προσέγγιση με αλληλούχιση όλων των εξονίων του γονιδιώματος (WES - Whole Exome Sequencing), για την ανίχνευση μεταλλάξεων και τον εντοπισμό νέων γονιδίων που πιθανώς εμπλέκονται στον καρκίνο του μαστού, αποτελεί μια ιδιαίτερα αποτελεσματική διαδικασία καθώς εστιάζει στις περιοχές του γονιδιώματος όπου πραγματοποιείται η κωδικοποίηση των πρωτεϊνών, δηλαδή στα εξόνια (Luo et al., 2021).

Συγκριτικά με την προσέγγιση της στοχευμένης ανάλυσης γονιδίων, η WES προσφέρει μια πολύ πιο ολοκληρωμένη έρευνα και ανάλυση των γονιδιακών τόπων και για αυτό το λόγο χρησιμοποιείται κατά κόρον για την ταυτοποίηση σπάνιων γενετικών παραλλαγών που εμφανίζουν συσχέτιση με τη νόσο (Kiezun et al., 2012). Εμφανίζει, όμως, το μειονέκτημα του περιορισμού της ανάλυσης στα εξόνια, με αποτέλεσμα την παράλειψη μεταλλαγών σε μη κωδικοποιητικές, ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων, όπως για παράδειγμα γενετικές

μεταλλάξεις στον υποκινητή του γονιδίου TERT, οι οποίες έχουν σχετιστεί με τον κίνδυνο κληρονομικού καρκίνου (Horn et al., 2013).

Η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος (WGS-Whole Genome Sequencing), με τη χρήση της τεχνικής NGS, αποτελεί την πιο ολοκληρωμένη και πληρέστερη προσέγγιση για τον χαρακτηρισμό του γονιδιωματικού προφίλ και την ανακάλυψη παραλλαγών τόσο στις κωδικοποιητικές όσο και στις μη κωδικοποιητικές περιοχές των γονιδίων (Cirulli and Goldstein, 2010). Παρ'όλες όμως τις τεράστιες δυνατότητες της WGS, οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί για τον κληρονομικό καρκίνο του μαστού είναι λιγοστές (σύμφωνα με τη πηγή δεδομένων pubmed), πιθανότατα λόγω του μεγάλου κόστους της συγκεκριμένης μεθόδου, της απαίτησης για μεγάλη ποσότητα αρχικού υλικού για την ανάλυση, καθώς και των δυσκολιών που εμφανίζει στην επικύρωση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων λόγω του πολύ μεγάλου αριθμού παραγόμενων αποτελεσμάτων από την ανάλυση (Guan et al, 2012).

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, πραγματοποιήθηκε ανασκόπηση των πιο πρόσφατων μελετών με χρήση NGS για τον κληρονομικό καρκίνο του μαστού με αναζήτηση της σχετικής βιβλιογραφίας στη βάση δεδομένων pubmed, για το χρονικό διάστημα 2016-2022, με έμφαση σε ερευνητικά άρθρα της τελευταίας τριετίας.

Οι λέξεις κλειδιά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν «hereditary breast cancer» AND «NGS studies» OR «WES» OR «WGS» Σχετικά άρθρα αναζητήθηκαν επίσης με χειροκίνητη σάρωση στις παραπομπές των άρθρων που επιλέχθηκαν μετά την αρχική αναζήτηση. Η παρουσίαση των μελετών γίνεται με το διαχωρισμό τους στις κατηγορίες που αναφέρθηκαν παραπάνω, δηλαδή την προσέγγιση της στοχευμένης ανάλυσης γονιδίων, την προσέγγιση με ανάλυση WES και την προσέγγιση με ανάλυση WGS, ενώ για τις μεγαλύτερες μελέτες εξ αυτών πραγματοποιείται αναλυτικότερη παρουσίαση των αποτελεσμάτων τους.

4.2 Στοχευμένη ανάλυση γονιδίων

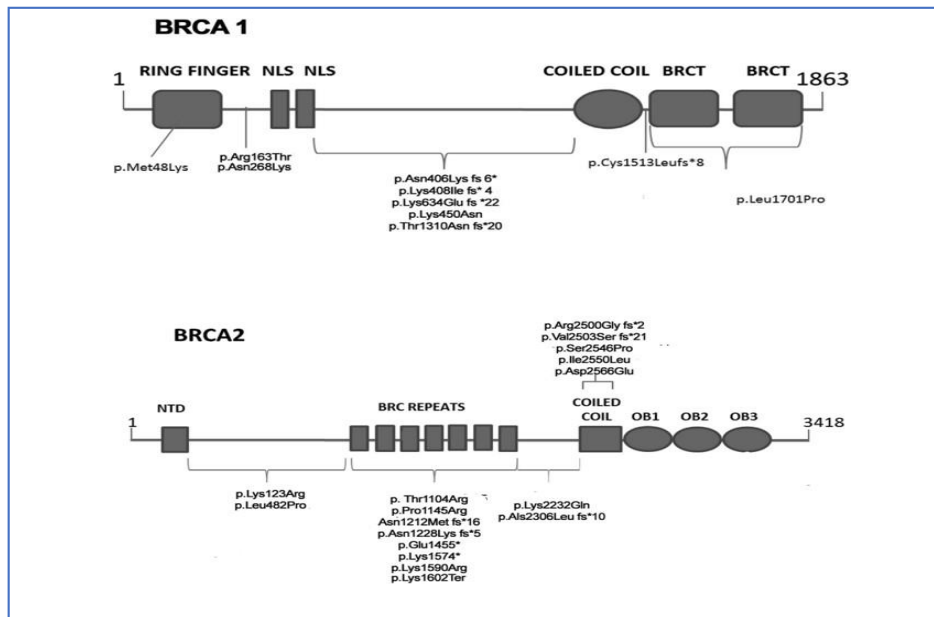
4.2.1 Μελέτες που αφορούν τη στοχευμένη ανάλυση των *BRCA1/2*

Με την έλευση της τεχνολογίας NGS κατέστη δυνατή η πλήρης αλληλούχιση και η ανίχνευση παραλλαγών στα γονίδια *BRCA1/2*, σε ταχύτατο χρόνο και με μεγάλη ευαισθησία, παρά το μεγάλο μέγεθος των γονιδίων αυτών. Όπως ειπώθηκε και προηγούμενα, έχει δειχθεί σε μελέτες (Park et al, 2016), η ανωτερότητα της μεθόδου NGS στην ανίχνευση μεταλλάξεων σε αυτά τα δύο γονίδια έναντι της μεθόδου Sanger και ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχει βασιστεί σε αυτή την τεχνολογία για εύρεση και ταυτοποίηση νέων παραλλαγών στα *BRCA1/2* σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού σε άτομα υψηλού κινδύνου για ανάπτυξη κληρονομικού καρκίνου στο μαστό. Αξίζει στο σημείο αυτό, να γίνει αναφορά σε δύο μελέτες που

πραγματοποιήθηκαν το 2012, παρά το γεγονός ότι η χρονολογία αυτή βρίσκεται εκτός του χρονολογικού εύρους της παρούσας ανασκόπησης. Οι Hernan et al., (2012), ανέπτυξαν μια μέθοδο αλληλούχισης των *BRCA1/2* με χρήση PCR μεγάλης εμβέλειας (LR-PCR, long range PCR) και NGS και μελέτησαν δείγματα σε άτομα με κληρονομική προδιάθεση καρκίνου του μαστού. Με τη μέθοδο αυτή, κατάφεραν να αλληλουχήσουν κομμάτια DNA μεγέθους από 3000-15.300 βάσεις, τα οποία περιλάμβαναν όλα τα κωδικοποιά εξόνια καθώς και τις πλευρικές θέσεις ματίσματος και να εντοπίσουν τις μεταλλάξεις. Την ίδια χρονιά (2012), οι Ozcelic et al., χρησιμοποιώντας την ίδια μέθοδο αλληλούχισης ολόκληρες τις γονιδιωματικές περιοχές των *BRCA1/2*, ταυτοποιώντας όλες τις γνωστές προδιαθεσιακές μεταλλάξεις, σε μια ομάδα ασθενών με οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού, ενώ επιπρόσθετα εντόπισαν μεταλλάξεις σε ιντρόνια και αμετάφραστες περιοχές των γονιδίων αυτών.

Στις πιο πρόσφατες μελέτες, οι Jouali et al. (2016), πραγματοποίησαν την πρώτη μελέτη με NGS για τον κληρονομικό καρκίνο του μαστού στο Μαρόκο, αναλύοντας το DNA 15 ασθενών από 68 μαροκινές οικογένειες με κληρονομική προδιάθεση και ανίχνευσαν 4 μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1/2* σε 6 οικογένειες. Συγκεκριμένα, ανιχνεύθηκαν 3 μεταλλάξεις που είχαν και στο παρελθόν εντοπιστεί σε άλλες μελέτες, η μετάλλαξη c.2126insA στο *BRCA1* και οι μεταλλάξεις c.1310_1313delAAGA και c.7235insG στο *BRCA2*, ενώ ανιχνεύθηκε επίσης μία νέα μετάλλαξη μετατόπισης πλαισίου ανάγνωσης (c.3453delT) στο *BRCA1*, η οποία δεν είχε αναφερθεί έως τότε σε καμία μελέτη.

Σε μελέτη των Santonocito et al. (2017), αναλύθηκαν με NGS τα γονίδια *BRCA1/2* από 1.400 Καυκάσιους ασθενείς στην Ιταλία, με κληρονομικότητα καρκίνου του μαστού και εντοπίστηκαν μεταλλάξεις στο 28.9 των ασθενών, εκ των οποίων οι 29 εμφάνιζαν νέες μεταλλάξεις (Εικόνα 4.1). Η πλειοψηφία των μεταλλάξεων αυτών ήταν μεταλλάξεις χωρίς νόημα (nonsense mutations) ή αφορούσαν αλλαγές του πλαισίου ανάγνωσης, όπου στην *in silico* ανάλυση που ακολούθησε βρέθηκε πως οι μεταλλάξεις αυτές οδηγούσαν σε πρόωρο κωδικόνιο λήξης. Τα ευρήματα αυτής της μελέτης επιβεβαιώνουν τη μεγάλη σημασία της NGS στη γονοτύπηση των *BRCA1/2* ασθενών και ατόμων με κληρονομική προδιάθεση για καρκίνο, με στόχο την καλύτερη διαχείριση στη διάγνωση, παρακολούθηση και θεραπεία τους (Zelli et al., 2020).



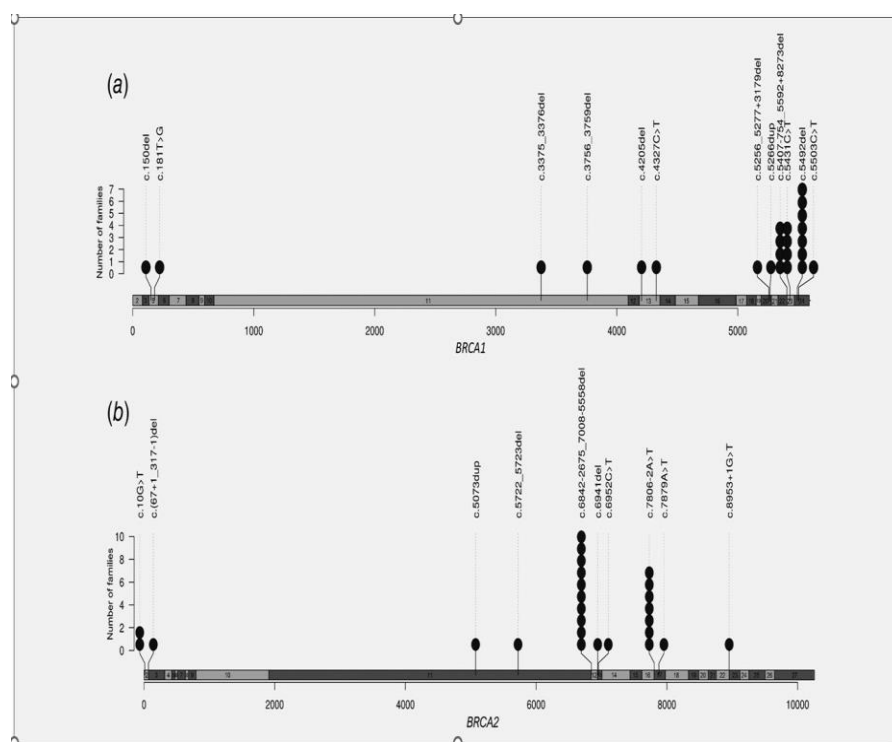
Εικόνα 4. 1. Οι θέσεις των νέων μεταλλάξεων στα γονίδια *BRCA1/2* που βρέθηκαν στη μελέτη των Santonocito et al. (2017).

Σε μια άλλη πρόσφατη σχετικά μελέτη των Manickam et al (2018), οι ερευνητές πραγματοποίησαν ανάλυση των εξονίων των *BRCA1/2* με χρήση NGS, σε 50.726 ενήλικες εθελοντές, με σκοπό να εντοπίσουν παθογόνες μεταλλάξεις στα γονίδια αυτά. Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας έδειξαν πως το ποσοστό των φορέων μετάλλαξης στα *BRCA1/2* άγγιξε το 0.5%, υψηλότερο κατά 5 φορές από αυτό που έως τότε είχε αναφερθεί, υπογραμμίζοντας τη σημαντικότητα του προληπτικού ελέγχου σε όλον τον πληθυσμό, για γαμετικές μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA* με στόχο την μείωση της θνητότητας και θνησιμότητας εξαιτίας του κληρονομικού καρκίνου του μαστού.

Η μελέτη των Rizza et al., (2020) αφορούσε μία 68-χρονη ασθενή στην Ιταλία, με οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού, η οποία είχε αναπτύξει αμφοτερόπλευρο καρκίνο μαστού στα 54 έτη, ο οποίος θεραπεύτηκε με ογκεκτομή και χημειοθεραπεία. Δεκατέσσερα έτη αργότερα, η ασθενής νόσησε εκ νέου με διηθητικό πορογενές καρκίνωμα στον αριστερό μαστό και η ανάλυση με NGS της μελέτης αυτής ανέδειξε μία νέα μεγάλη αναδιάταξη στο γονίδιο *BRCA1* (διαγραφή c.2817_4716) σε μέρος του εξονίου 11 και σε ολόκληρη την αλληλουχία των εξονίων 11, 12 και 14. Σύμφωνα με τους ερευνητές, η σημαντικότητα της ανακάλυψης αυτής έγκειται στο γεγονός ότι τα εξόνια 11-13 καλύπτουν το 65% της αλληλουχίας του γονιδίου *BRCA1* και σε αυτά πραγματοποιείται η κωδικοποίηση δύο αλληλουχιών πυρηνικού εντοπισμού (NLS) και επίσης αποτελούν θέσεις σύνδεσης πρωτεϊνών όπως η RB, cMyc, Rad50 και Rad51, ο ρόλος των οποίων είναι ογκοκατασταλτικός.

Η έλλειψη, λοιπόν, μεγάλου μέρους της αλληλουχίας στις περιοχές αυτές σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού καταδεικνύει τη σημαντικότητα των συγκεκριμένων εξονίων στην ογκοκατασταλτικό ρόλο του γονιδίου *BRCA1* (πηγή: ENIGMA).

Μία μεγάλη μελέτη πραγματοποιήθηκε στην Ελλάδα το 2020, από τους Apostolou et al., η οποία αφορούσε στη μελέτη του πληθυσμού της Κρήτης (συμμετοχή 304 ασθενών με καρκίνο του μαστού) για την εύρεση γενετικών μεταλλάξεων στα γονίδια *BRCA1/2* της βλαστικής σειράς με χρήση της τεχνολογίας NGS. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ένα μεγάλο εύρος μεταλλάξεων που αφορούσε σε ποσοστό 48% στο γονίδιο *BRCA1* και σε ποσοστό 52% στο γονίδιο *BRCA2* (εικόνα 4.2). Από αυτές τις μεταλλάξεις, μία μετάλλαξη στο *BRCA1* (c.5492del) και 2 μεταλλάξεις στο *BRCA2* (Δexons 12 and 13 and c.7806-2A>T), αποτελούν περίπου τις μισές όλων των μετάλλαξεων που βρέθηκαν και δείχνουν πως πρόκειται για ιδρυτικές μεταλλάξεις, με τους φορείς των μεταλλάξεων αυτών να μοιράζονται τον ίδιο απλότυπο (πίνακας 4.1).



Εικόνα 4. 2. (a) *BRCA1* και (b) *BRCA2* παθογόνες γενετικές μεταλλάξεις που βρέθηκαν σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού στην Κρήτη (Apostolou et al., 2020)

Επίσης, αξίζει να σημειωθεί πως η μετάλλαξη c.7806-2A>T που βρέθηκε στο *BRCA2* αποτελεί μία νέα μετάλλαξη, η οποία πιθανολογείται πως προκαλεί μη φυσιολογικό μάτισμα (Apostolou et al., 2012).

Οι πληροφορίες και τα αποτελέσματα που πηγάζουν από την μελέτη των Apostolou et al., καταδεικνύουν την ανάγκη γενετικού ελέγχου ευρύτερου ποσοστού ενός πληθυσμού που φέρει ιδρυτικές μεταλλάξεις στα BRCA1/2, όπως είναι τα άτομα με κρητική καταγωγή.

Πίνακας 4. 1. Ιδρυτικές μεταλλάξεις στα γονίδια BRCA1/2 σε Κρητικής καταγωγής ασθενείς με καρκίνο του μαστού (Apostolou et al., 2020)

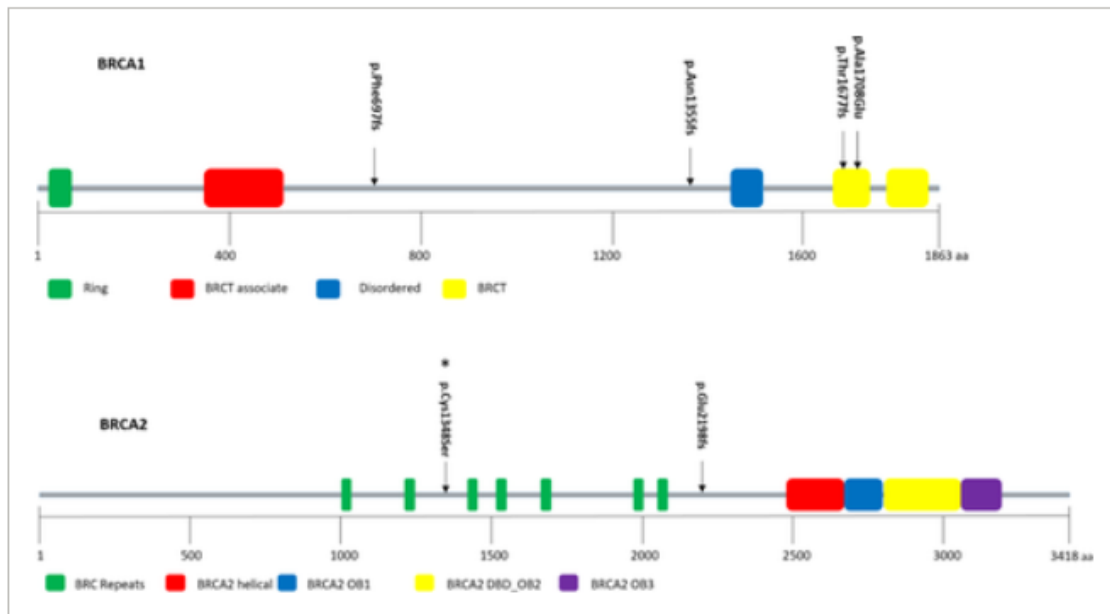
ΓΟΝΙΔΙΟ	ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ	ΚΑΤΑΓΩΓΗ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΩΝ	ΑΠΛΟΥΤΥΠΟΣ	ΧΡΟΝΙΚΟ ΔΙΑΣΤΗΜΑ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ
BRCA1	c.5431C>T p.(Gln1811Ter)	ΚΡΗΤΗ	4	“172–115–235–170–196” 2.82 Mb	30 γενεές 750 χρόνια
BRCA2	c.6842-2675_7008-5558del p.(Gly2881_Arg336del)	ΡΕΘΥΜΝΟ ΗΡΑΚΛΕΙΟ	10	“160–155–227–228” 1.34 Mb	29 γενεές 725 χρόνια
BRCA2	c.7806-2A>T	ΧΑΝΙΑ	7	“172–115–235–170–196” 2.82 Mb	32 γενεές 800 χρόνια

Σκοπός της μελέτης των Peker Eyübođlu et al. (2020), ήταν η ανακάλυψη νέων παραλλαγών στα γονίδια BRCA1/2, αναλύοντας τις αλληλουχίες των γονιδίων 113 ασθενών με κληρονομικό καρκίνο του μαστού με χρήση της τεχνολογίας NGS. Βρέθηκαν 31 μεταλλάξεις στο BRCA2 και 21 μεταλλάξεις στο BRCA1 σε ποσοστό 41.6% των ασθενών, εκ των οποίων η μία αναφέρεται για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία. Πρόκειται για την παθογόνο μετάλλαξη c.8680C>G στο BRCA2. Σημαντικό εύρημα της μελέτης αυτής είναι πως οι ασθενείς με τις ευρεθείσες μεταλλάξεις, εμφάνιζαν κατά 12% μικρότερο μήκος τελομερών σε σχέση με τις ασθενείς χωρίς BRCA1/2 μεταλλάξεις, γεγονός που καταδεικνύει την ανάγκη πραγματοποίησης ευρύτερων μελετών ως προς τη συσχέτιση των μεταλλάξεων στα BRCA1/2 και του μήκους των τελομερών και την επίδραση της συσχέτισης αυτής στον κίνδυνο εμφάνισης κληρονομικού καρκίνου του μαστού και την έκβαση της νόσου.

Οι Huszno et al. (2021), πραγματοποίησαν μελέτη με σκοπό την ανεύρεση και αξιολόγηση μεταλλάξεων αβέβαιης κλινικής σημασίας (VUS) στα γονίδια BRCA1/2. Για το σκοπό αυτό αναλύθηκαν οι αλληλουχίες των γονιδίων 2 ασθενών με κληρονομικό καρκίνο του μαστού χρησιμοποιώντας την τεχνολογία NGS και συγκεκριμένα την πλατφόρμα Ion Torrent. Οι

ερευνητές ανακάλυψαν δύο VUS: την παραλλαγή c.3454G>A στο *BRCA1* σε 64-χρονη ασθενή με διεισδυτικό καρκίνωμα του μαστού υπότυπου Luminal A και την παραλλαγή c.2374T>C στο *BRCA2* σε 33-χρονη ασθενή με διεισδυτικό καρκίνωμα του μαστού υπότυπου Luminal B. Οι συγγραφείς τονίζουν στα συμπεράσματά τους πως η διαχείριση των ασθενών με VUS θα πρέπει να βασίζεται στο οικογενειακό ιστορικό τους καθώς και στα κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου που εμφανίζουν και συστήνουν επίσης τον τακτικό έλεγχο ασθενών με VUS στα *BRCA1/2*, καθώς οι παραλλαγές αυτές μπορεί εν τέλει να παρουσιάζουν ιδιαίτερη κλινική σημασία για την έκβαση της νόσου αλλά και για την κατάλληλη θεραπευτική αγωγή.

Οι Rweyemamu et al. (2022) πραγματοποίησαν μελέτη για εύρεση παθολογικών γενετικών μεταλλάξεων στα *BRCA1/2* σε 100 ασθενείς με καρκίνο του μαστού στην Τανζανία χρησιμοποιώντας την τεχνολογία NGS. Οι συγγραφείς πραγματοποίησαν την αλληλούχηση ολόκληρων των συγκεκριμένων γονιδίων λαμβάνοντας δείγμα από αίμα των ασθενών και ερευνώντας για παραλλαγές νουκλεοτιδίων (SNVs) καθώς και πολυμορφισμούς αριθμού αντιγράφων (CNVs). Σε 5 από τους 100 ασθενείς βρέθηκαν μεταλλάξεις στο *BRCA1*, ενώ σε μία ασθενή βρέθηκε παθογόνα μετάλλαξη στο *BRCA2* καθώς και μία παραλλαγή αβέβαιης κλινικής σημασίας (Εικόνα 4.3). Πρόκειται για μεταλλάξεις μετατόπισης πλαισίου ή αντικατάστασης αμινοξέως (c.212+1G>A, c.4065_4068del, c.2090del, c.5030_5033del, c.5123C>A, c.6591_6592del) στα εξόνια 4, 10, 16, 17 του *BRCA1* και στο εξόνιο 11 του *BRCA2* (Εικόνα 4.3). Πολυμορφισμοί αριθμού αντιγράφων δεν βρέθηκαν σε καμία από τις ασθενείς. Οι συγγραφείς αναφέρουν επίσης πως οι 5 από τις 6 ασθενείς με τις *BRCA* μεταλλάξεις ανέπτυξαν τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού σε ηλικία κάτω των 50 ετών. Παρά το γεγονός ότι δεν βρέθηκε κάποια νέα μετάλλαξη, η μελέτη αυτή ανέδειξε τη συσχέτιση των γενετικών μεταλλάξεων στα *BRCA1/2* με την ανάπτυξη επιθετικού τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού σε μικρή ηλικία, όπως επίσης και το γεγονός της παρουσίας περισσότερων μεταλλάξεων στο γονίδιο *BRCA1* σε σχέση με το *BRCA2* σε κληρονομικούς καρκίνους του μαστού.



Εικόνα 4. 3. Μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1/2* που ανιχνεύθηκαν στη μελέτη των *Rweyemamu et al.* (2022)

4.2.2 Μελέτες που αφορούν τη στοχευμένη ανάλυση γονιδίων πλην των *BRCA1/2*

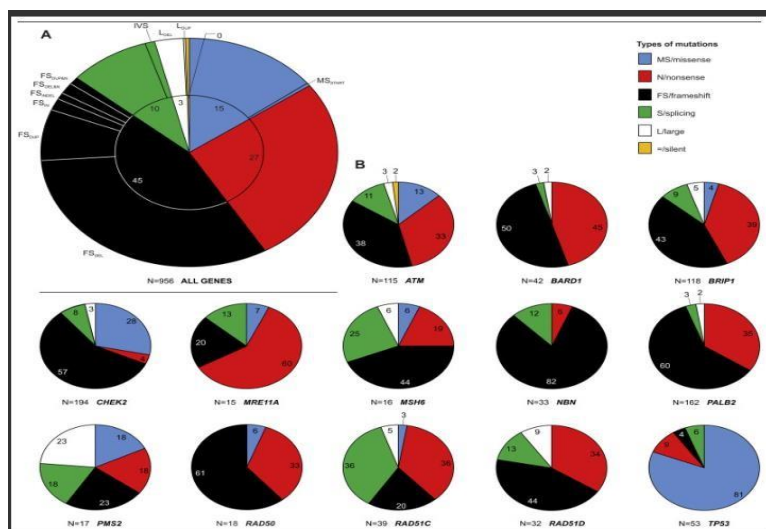
Εκτός από τα γονίδια προδιάθεσης *BRCA1/2* στον κληρονομικό καρκίνο του μαστού, έχουν ενοχοποιηθεί και άλλα γονίδια, όπως αυτά που αναφέρθηκαν στο κεφάλαιο 2.3 της παρούσας εργασίας, η αλληλούχιση των οποίων περιλαμβάνεται σε εμπορικά διαθέσιμα γονιδιακά πάνελ ελέγχου για τον καρκίνο του μαστού και πολλές μελέτες έχουν καταδείξει την αναγκαιότητα του ελέγχου αυτού.

Σε μελέτη των *Tung et al.* (2016), ελέγχθηκαν για μεταλλάξεις 25 γονίδια, με χρήση NGS, που έχουν βρεθεί ότι πιθανώς εμπλέκονται στον καρκίνο του μαστού, χρησιμοποιώντας δείγματα από 488 ασθενείς με καρκίνο του μαστού, με ή χωρίς οικογενειακό ιστορικό. Στα αποτελέσματα της μελέτης συμπεριλαμβάνεται η εύρεση μεταλλάξεων στο 10% περίπου των ασθενών, εκ των οποίων το 4% οφείλεται σε γονίδια πλην των *BRCA1/2*.

Σε μία μεγάλη μελέτη των *Tedaldi et al.* (2017), ελέγχθηκε μία ομάδα 94 γονιδίων, που φαίνεται ότι εμπλέκονται σε κληρονομικούς καρκίνους, σε 227 ασθενείς με καρκίνο του μαστού και οικογενειακό ιστορικό, χρησιμοποιώντας την τεχνολογία NGS. Σε 48 ασθενείς ανιχνεύθηκαν παθογόνες μεταλλάξεις των *BRCA1/2* ενώ σε 17 ασθενείς ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις σε λιγότερο διεισδυτικά γονίδια, όπως για παράδειγμα στα *PALB2*, *ATM*, *BRIP1*, *RAD51D*, *MSH6*, *PPM1D*, *RECQL4*, *ERCC3*, *TSC2*, *SLX4*. Η πλειοψηφία των καρκίνων ανήκαν στην κατηγορία των πορογενών διηθητικών καρκινωμάτων, μέτριας και χαμηλής διαφοροποίησης. Ο μοριακός υπότυπος των καρκινωμάτων των ασθενών με μη *BRCA* μεταλλάξεις ανήκε στους

Luminal A και Luminal B1 σε ποσοστό άνω του 50%, ενώ οι BRCA όγκοι ανήκαν στην κατηγορία των τριπλά αρνητικών κατά ένα υψηλό ποσοστό της τάξης του 35%. Η συσχέτιση των κλινικών χαρακτηριστικών της ομάδας ατόμων με τις μεταλλάξεις σε γονίδια πλην των BRCA1/2, έδειξε πως οι ασθενείς με τις μεταλλάξεις αυτές διατρέχουν πολύ υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού, γεγονός που δείχνει πως τα πρωτόκολλα επιτήρησης ατόμων με οικογενειακό ιστορικό θα μπορούσαν να βελτιωθούν με την εφαρμογή μιας ευρύτερης γονιδιακής ανάλυσης.

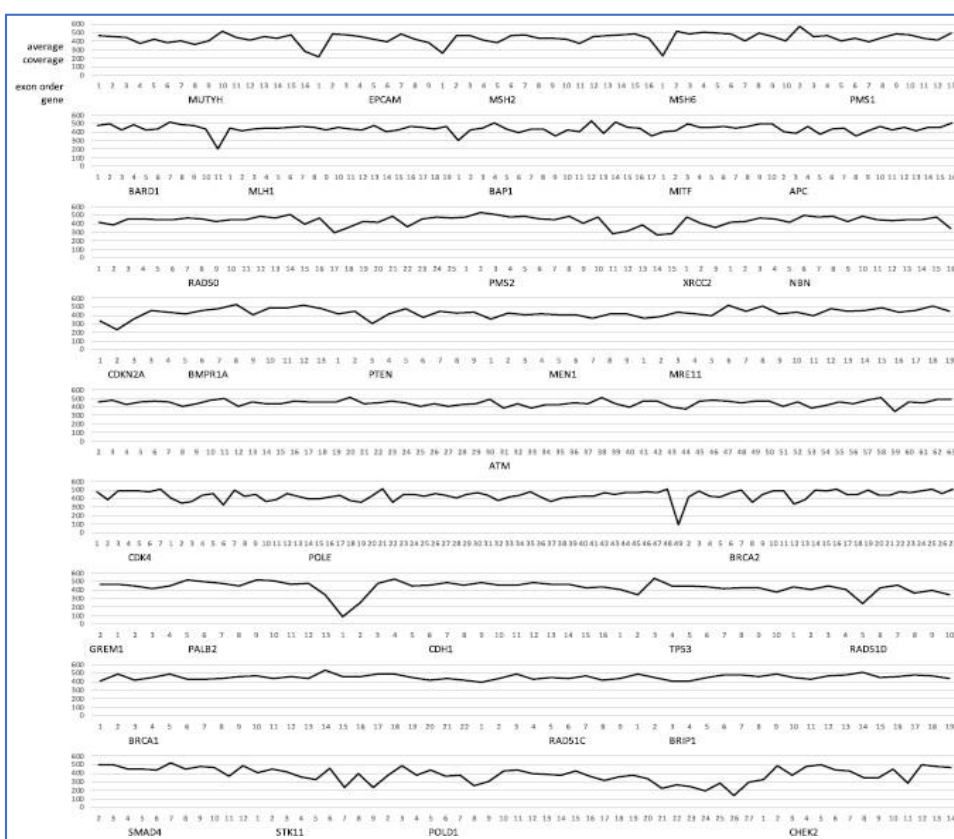
Σε μια πρόσφατη μεγάλη μετα-ανάλυση των Suszynska et al., το 2019, αξιολογήθηκαν τα αποτελέσματα μελετών που ελήφθησαν από 48 μελέτες με NGS σε πάνελ 37 γονιδίων προδιάθεσης για τον κληρονομικό καρκίνο του μαστού. Οι συγγραφείς της μετα-ανάλυσης ομαδοποίησαν τις μεταλλάξεις που βρέθηκαν στις μελέτες αυτές σε σχέση με τον τύπο της μετάλλαξης για κάθε γονίδιο (εικόνα 4.4). Συνολικά, το 45% των μεταλλάξεων οφείλονται σε αλλαγές πλαισίου ανάγνωσης, το 27% σε μεταλλάξεις χωρίς νόημα, το 15% σε παρανοηματικές μεταλλάξεις (missense), το 10% σε μεταλλάξεις ματίσματος, ενώ το 3% των μεταλλάξεων οφείλεται σε μεγάλες γονιδιακές αναδιατάξεις. Οι συγγραφείς, στα συμπεράσματά τους, επισήμαναν επίσης πως είναι αρκετά μεγάλος ο αριθμός των μη BRCA γονιδίων που σχετίζονται με υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού και ειδικά το *CDKN2A* φαίνεται πως εμπλέκεται σε συγκρίσιμα επίπεδα με το *BRCA2* (Suszynska et al., 2019).



Εικόνα 4. 4. Τύποι μετάλλαξης που έχουν ανιχνευτεί σε Α. Σύνολο των υπό μελέτη γονιδίων και Β. Κάθε γονίδιο προδιάθεσης για τον καρκίνο του μαστού ξεχωριστά (Suszynska et al., 2019)

Η μεγάλη συμβολή της τεχνολογίας NGS στις μελέτες για τον καρκίνο, φαίνεται και στη μελέτη των Chan et al. (2020), οι οποίοι ανέπτυξαν και επικύρωσαν ένα πάνελ 35 γονιδίων για τον έλεγχο 8 διαφορετικών κληρονομικών καρκίνων, συμπεριλαμβανομένου του κληρονομικού καρκίνου του μαστού, με χρήση NGS. Το πάνελ των γονιδίων αυτών συμπεριλαμβάνει τα: *APC*,

ATM, BAP1, BARD1, BMP1A, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CDK4, CDKN2A, CHEK2, EPCAM, GREM1, MEN1, MITF, MLH1, MRE11A, MSH2, MSH6, MUTYH, NBN, PALB2, PMS1, PMS2, POLD1, POLE, PTEN, RAD50, RAD51C, RAD51D, SMAD4, STK11, TP53 και *XRCC2*, ανιχνεύοντας μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς και μικρές διαγραφές/ενθέσεις, μήκους από 15-25 βάσεις, που εδράζονται σε κωδικοποιές αλληλουχίες του DNA, πλησίον γνωστών περιοχών ματίσματος και περιβαλλουσών αλληλουχιών των γονιδίων – στόχων (εικόνα 4.5). Η ευαισθησία και η εξειδίκευση του συγκεκριμένου πάνελ ανέρχεται στο 99.9% και 100% αντίστοιχα, σε ένα εύρος 4820 μεταλλάξεων, καταδεικνύοντας τη σημαντικότητα της χρήσης της μεθόδου NGS για τον ευρύ γονιδιακό έλεγχο μεταλλάξεων και την πρόληψη του κληρονομικού καρκίνου γενικότερα και ειδικότερα του καρκίνου του μαστού.



Εικόνα 4. 5. Κάλυψη περιοχών εξονίων για τον έλεγχο 35 γονιδίων με εμπλοκή σε κληρονομικούς καρκίνους συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού κατά την αλληλούχιση 43 δειγμάτων ταυτόχρονα με χρήση NGS (Chan et al., 2020)

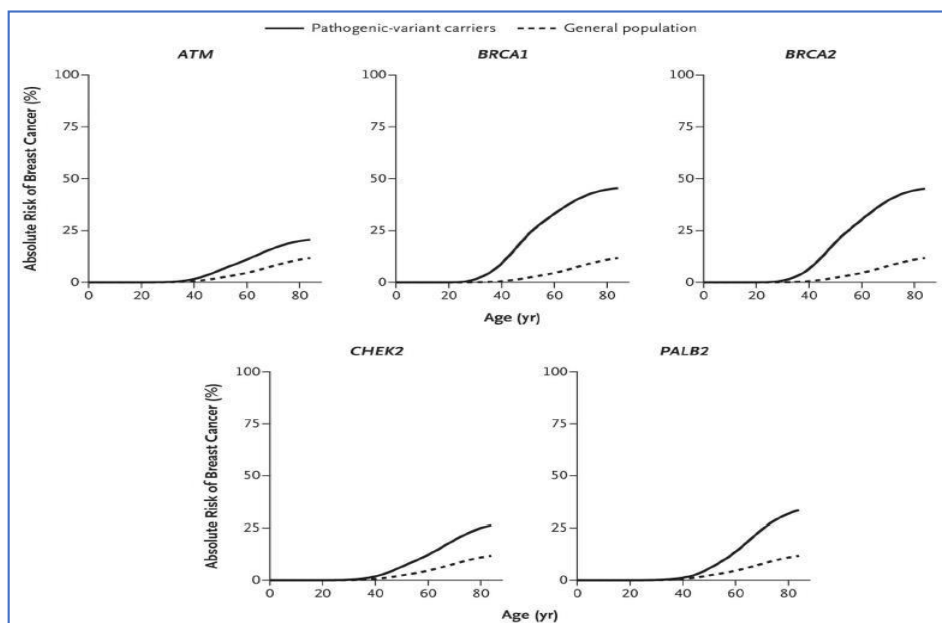
Οι Yoo et al. (2020) πραγματοποίησαν ανάλυση NGS σε πάνελ γονιδίων προδιάθεσης για τον καρκίνο του μαστού σε 120 ασθενείς αρνητικούς σε *BRCA* μεταλλάξεις. Σε 4 από αυτούς τους ασθενείς, οι οποίοι είχαν οικογενειακό ιστορικό της νόσου, βρέθηκαν παθογόνες μεταλλάξεις στα γονίδια *MSH2*, *CHEK2*, *PMS2* και *PALB2*. Οι μεταλλάξεις στα *MSH2* (c.256G>T,

p.Glu86*) και *PALB2* (c.3351-1G>C) αναφέρονται για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία και προκαλούν είτε πρόωρο τερματισμό της μετάφρασης, είτε λάθη κατά τη διάρκεια του ματίσματος και για το λόγο αυτό συγκαταλέγονται στις παθογόνες παραλλαγές σύμφωνα με τα κριτήρια του ACMG (American College of Medical Genetics). Το 2021 πραγματοποιήθηκε επίσης μία μελέτη από τους Ece Solmaz et al., στην Τουρκία, όπου αναλύθηκε πάνελ γονιδίων με χρήση NGS σε 188 ασθενείς με κληρονομικό μη BRCA καρκίνο του μαστού. Στα ευρήματα της μελέτης συγκαταλέγονται 18 μεταλλάξεις στα γονίδια *CHEK2*, *PALB2*, *ATM* και *TP53* εκ των οποίων οι 3 είναι νέες μεταλλάξεις που αναφέρονται για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία. Πρόκειται για δύο μεταλλάξεις στο *PALB2* (c.470C>A και c.3483delT) και μία μετάλλαξη στο *ATM* (c.8923G>T) (Eco Solmaz et al., 2021).

Έχει βρεθεί πως οι ετεροζυγώτες φορείς μεταλλάξεων στο γονίδιο *ATM* της βλαστικής σειράς διατρέχουν 5 έως 9 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού, ειδικότερα σε μικρότερες ηλικίες κάτω των 50 ετών (Choi, Kirps και Kurzrock, 2016). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει πως το *ATM* αποτελεί το δεύτερο πιο συχνό μεταλλαγμένο γονίδιο – έπειτα από το *CHEK2* – σε ασθενείς με μη BRCA κληρονομικό καρκίνο του μαστού και έως σήμερα έχουν ανευρεθεί περισσότερες από 170 παρανοηματικές μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό (Jerzak, Mancuso and Eisen, 2018). Σε μία πολύ πρόσφατη μελέτη (Parenti et al., 2021), ανακαλύφθηκε σε 34-χρονη γυναίκα από την Ιταλία με κληρονομικό καρκίνο του μαστού, μία νέα μετάλλαξη του *ATM*, με χρήση της τεχνικής NGS και της πλατφόρμας Illumina MiSeq, η οποία αφορά τη διαγραφή των εξονίων 19-27.

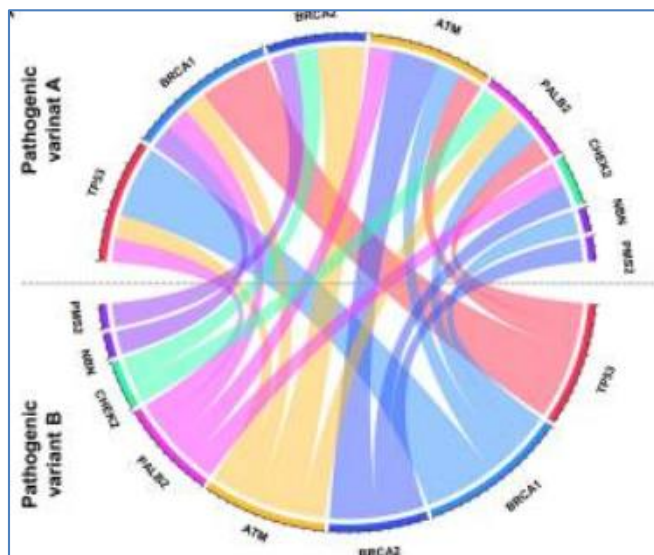
Το 2021 δημοσιεύτηκε από τους Hu et al., μία πολύ μεγάλη μελέτη κατά την οποία ερευνήθηκε ο κίνδυνος για ανάπτυξη καρκίνου του μαστού σε σχέση με γενετικές μεταλλάξεις σε 28 γονίδια προδιάθεσης, μεταξύ των οποίων ήταν τα *ATM*, *BARD1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CDH1*, *CHEK2*, *NF1*, *PALB2*, *PTEN*, *RAD51C*, *RAD51D* και *TP53*.

Η μελέτη αφορούσε σε 32.247 γυναίκες ασθενείς με καρκίνο του μαστού και σε 32.544 υγιείς γυναίκες και πραγματοποιήθηκε με στοχευμένη αλληλούχιση των συγκεκριμένων γονιδίων με χρήση της NGS πλατφόρμας HiSeq 4000 της Illumina. Βρέθηκαν παθογόνες μεταλλάξεις στο περίπου 5% των ασθενών και στο 1.6% των υγιών ατόμων, με τις *BRCA1/2* μεταλλάξεις να συνδέονται με τον υψηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού (σχετικός κίνδυνος 7.62), ενώ ακολουθούν οι μεταλλάξεις στο *PALB2* (σχετικός κίνδυνος 3.83). Οι μεταλλάξεις στα *ATM*, *CDH1* και *CHEK2* βρέθηκε να συνδέονται περισσότερο με τους HER2+ όγκους, ενώ οι μεταλλάξεις στα *BARD1*, *RAD51C* και *RAD51D* φαίνεται πως αυξάνουν τον κίνδυνο ανάπτυξης basal-like και τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού (Hu et al., 2021).



Εικόνα 4.6. Απόλυτος (%) κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του μαστού σε σχέση με γενετικές μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα γονίδια προδιάθεσης και την ηλικία (Hu et al., 2021)

Οι Megid et al. (2022) δημοσίευσαν μία πολύ πρόσφατη μεγάλη μελέτη που διεξήχθη στη Βραζιλία σε 1.156 γυναίκες ασθενείς με κληρονομικό καρκίνο του μαστού. Στη μελέτη αυτή αναλύθηκαν στοχευμένα με NGS οι αλληλουχίες 12 γονιδίων (*BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *CDH1*, *PALB2*, *PTEN*, *STK11*, *ATM*, *BRIP1*, *CHEK2*, *NBN* και *PMS2*) που εμπλέκονται στον κληρονομικό καρκίνο του μαστού, για την εύρεση παθολογικών και πιθανώς παθολογικών μεταλλάξεων. Σε ποσοστό 19.5% των ασθενών ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις με την πλειοψηφία να ανήκει στα γονίδια *TP53*, *BRCA1* και *BRCA2*, ακολουθούμενα από τα *ATM*, *PALB2*, και *CHEK2A*. Σημαντικό εύρημα της έρευνας ήταν η ανίχνευση φορέων δύο ή περισσότερων κληρονομικών μεταλλάξεων σε ένα ποσοστό της τάξης του 1.2%. Στην εικόνα 4.7 φαίνονται οι συνδυασμοί των μεταλλαγμένων γονιδίων που ανιχνεύτηκαν στους συγκεκριμένους ασθενείς. Οι φορείς με μεταλλάξεις στα *BRCA1/2* και στο *TP53* εμφάνισαν καρκίνο του μαστού σε ηλικία μικρότερη των 40 ετών, ανεξάρτητα από το ποιο ήταν το δεύτερο μεταλλαγμένο γονίδιο, ενώ αντίθετα, οι φορείς με μεταλλάξεις στο *ATM* ανέπτυξαν καρκίνο σε ηλικία μεγαλύτερη των 40 ετών. Παρά το γεγονός ότι το ποσοστό των φορέων με 2 ή περισσότερες γενετικές μεταλλάξεις σε γονίδια προδιάθεσης για τον καρκίνο του μαστού ήταν μικρό, η μελέτη αυτή καταδεικνύει την αναγκαιότητα πραγματοποίησης ευρύτερων μελετών ώστε να διερευνηθεί η πιθανή συνεργιστική δράση των μεταλλάξεων αυτών και η επίδρασή της στην έκβαση της νόσου.



Εικόνα 4.7. Διάγραμμα χορδών που απεικονίζει τους συνδυασμούς δύο γαμετικών μεταλλάξεων σε γονίδια προδιάθεσης για τον κληρονομικό καρκίνο του μαστού (Megid et al., 2022)

Τέλος, σε πολύ πρόσφατα δημοσιευμένη μελέτη, (Castillo-Guardiola et al., 2022), πραγματοποιήθηκε η εφαρμογή ενός αλγόριθμου για την προτεραιοποίηση της σημαντικότητας των μεταλλάξεων αβέβαιης κλινικής σημασίας (VUS) στον κληρονομικό καρκίνο του μαστού, οι οποίες ανιχνεύονται κατά την στοχευμένη αλληλούχιση με NGS του πάνελ των γνωστών γονιδίων προδιάθεσης (*CHEK2*, *BRIP1*, *ATM*, *PALB2* κ.α.) Για την μελέτη αυτή, αναλύθηκαν 138 δείγματα από Ισπανικές οικογένειες με οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού και εντοπίστηκαν 12 παθογόνες και 70 αβέβαιης κλινικής σημασίας μεταλλάξεις. Με την εφαρμογή του αλγόριθμου, βρέθηκε πως 19 από τις 70 VUS (ποσοστό 27%) έχρηζαν περαιτέρω διερεύνησης και μία από αυτές, η c.3402+3A > C στο ιντρόνιο 23 του γονιδίου *ATM*, αποδείχθηκε πως έχει επιβλαβή επίδραση στη διαδικασία του ματίσματος, έπειτα από περαιτέρω mRNA ανάλυση.

4.3 Η προσέγγιση WES στον μη BRCA κληρονομικό καρκίνο του μαστού

Τα τελευταία χρόνια, πολλές μελέτες έχουν ασχοληθεί με τον εντοπισμό νέων μεταλλάξεων και παραγόντων που εμπλέκονται στον κληρονομικό καρκίνο του μαστού, καθώς οι μεταλλάξεις στα γνωστά γονίδια προδιάθεσης εξηγούν λιγότερες από τις μισές περιπτώσεις ασθενών (Kuligina et al., 2019), με τη βοήθεια της τεχνολογίας NGS και συγκεκριμένα της τεχνικής WES, με την οποία πραγματοποιείται η αλληλούχιση ολόκληρων των εξονίων, προσφέροντας πληροφορίες για σχεδόν όλες τις αλληλουχίες κωδικοποιού DNA. Η προσέγγιση WES, λοιπόν, θεωρείται κατάλληλη για τη γενετική μελέτη του καρκίνου και ειδικότερα για την έρευνα και την ανίχνευση νέων γονιδίων που διαδραματίζουν σημαντικό

ρόλο στον κληρονομικό καρκίνο του μαστού (Zelli et al., 2019).

Το 2016, οι Maatta et al., πραγματοποίησαν μία μελέτη για τον εντοπισμό σπάνιων μεταλλάξεων σε μη BRCA κληρονομικό καρκίνο του μαστού, ελέγχοντας 13 Φιλανδικές οικογένειες με γνωστό οικογενειακό ιστορικό, χρησιμοποιώντας την τεχνική WES. Στη μελέτη αυτή, ανιχνεύθηκαν και επικυρώθηκαν περισσότερες από 18 παραλλαγές που αφορούν στο κυτταρικό δίκτυο απόκρισης και επιδιόρθωσης της βλάβης του DNA (DNA Damage Response and Repair System – DDR). Τα αποτελέσματα της μελέτης (Πίνακας 4.2), έδειξαν ότι η εμφάνιση πολλαπλών παραλλαγών σε DDR γονίδια χρήζει ευρύτερων μελετών καθώς φαίνεται πως σχετίζονται με την προδιάθεση για ανάπτυξη καρκίνου του μαστού σε οικογένειες υψηλού κινδύνου.

Οι Tavera-Tapia et al. (2016) μελέτησαν την αλληλουχία εξονίων με WES σε μία Ισπανική οικογένεια με ιστορικό μη BRCA καρκίνου του μαστού και εντόπισαν μία νέα μετάλλαξη του γονιδίου *ATM* στη βλαστική κυτταρική σειρά (c.5441delT· p.Leu1814Trpfs*14). Στη συνέχεια, όπως αναφέρεται στην ίδια μελέτη, ανέλυσαν το συγκεκριμένο γονίδιο σε μία ομάδα 392 οικογενειών στην Ισπανία με κληρονομικό μη BRCA καρκίνο, όπου στα αποτελέσματα καταγράφηκε επικράτηση της συγκεκριμένης μετάλλαξης του *ATM* στο 1.94% των ασθενών που μελετήθηκαν, γεγονός που υποδηλώνει τη σημαντικότητα του ελέγχου αυτού του γονιδίου σε ισπανικές οικογένειες με μη-BRCA καρκίνο του μαστού (Tavera-Tapia et al, 2016).

Πίνακας 4. 2. Επικυρωμένες μεταλλάξεις DDR γονιδίων και κλινικά χαρακτηριστικάτων όγκων του μαστού σε 13 Φιλανδικές οικογένειες με ιστορικό κληρονομικού καρκίνου του μαστού (Maatta et al., 2016)

Μετάλλαξη	Ιστολογικός υπότυπος/Βαθμός κακοήθειας	ΜοριακόςΥπότυπος
<i>AKT2</i> c.148C>A	Πορογενές, 2	ER+, PR+,HER2-
<i>ATM</i> c.2572T>C <i>ATM</i> c.3161C>G	Πορογενές, 3	ER+, PR+,HER2+
<i>ATM</i> c.5558A>T	Πορογενές, 1	ER+, PR+,HER2-
<i>CDKN2A</i> c.496C>T <i>RADI</i> c.341G>A	Πορογενές, 2	ER-, PR-,HER2+
<i>CDKN2A</i> c.496C>T <i>RBL2</i> c.1723G>C	BC: Ductal, 2	ER+,PR+,HER2-
<i>CDKN2A</i> c.496C>T <i>MYC</i> c.77A>G	Λοβιακό, άγνωστο	ER+, PR-,HER2-
<i>MYC</i> c.77A>G	Πορογενές, 2	ER+, PR+,HER2-

<i>PLAU</i> c.43G>T	Mucinous, 2	ER+, PR+,HER2-
<i>RADI</i> c.341G>A	Λοβιακό, 2	ER+, PR+,HER2-
<i>RADI</i> c.341G>A <i>RAD52</i> c.538G>A	Πορογενές, 2	ER+, PR+,HER2-
<i>RAD52</i> c.538G>A	Λοβιακό, 2 , Πορογενές, 2	ER+, PR+,HER2-
<i>RBL2</i> c.1723G>C	Πορογενές, 2,3, Λοβιακό, 2	ER+, PR+,HER2-
<i>WNT3A</i> c.277G>A	Πορογενές, 3	ER+, PR+,HER2-
<i>WNT10A</i> c.337C>T	Πορογενές, 2	ER+, PR+,HER2-

Σε μία άλλη μελέτη, οι Hamdi et al. (2018), πραγματοποίησαν αλληλούχιση WES σε επτά οικογένειες Τυνησίων, με οικογενειακό ιστορικό μη BRCA καρκίνο του μαστού. Πρόκειται για την πρώτη μελέτη με τεχνική WES σε πληθυσμό Τυνησίων, κατά την οποία εντοπίστηκαν 12 νέες παραλλαγές υψηλού κινδύνου, αλλά και 4 νέα υποψήφια γονίδια για εμπλοκή στον καρκίνο του μαστού, τα *MMS19*, *DNAH3*, *POLK* και *KATB6*. Σε μία άλλη μελέτη των Torrezan et al, επίσης το 2018, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική WES για την ανίχνευση γενετικών μεταλλάξεων σε 17 ασθενείς με καταγωγή από τη Βραζιλία και με ιστορικό οικογενειακού καρκίνου του μαστού, αρνητικού σε μεταλλάξεις γνωστών γονιδίων προδιάθεσης, όπως τα *BRCA1/2*, *TP53* και *CHEK2*. Αρχικά, οι συγγραφείς πραγματοποίησαν έλεγχο σε 27 γνωστά γονίδια προδιάθεσης και εντόπισαν παθογόνες μεταλλάξεις στα γονίδια *ATM* και *BARD1* σε δύο ασθενείς. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης στους υπόλοιπους 15 ασθενείς έδειξαν ένα μεγάλο αριθμό σπάνιων μεταλλάξεων και έπειτα από προτεραιοποίηση, επικύρωση με ανάλυση NGS και σύγκριση με παλαιότερες μελέτες WES, οι ερευνητές κατέληξαν σε 12 υποψήφια γονίδια για εμπλοκή στον κληρονομικό καρκίνο του μαστού, μεταξύ των οποίων είναι τα *ERCC1*, *SXL4*, *NOTCH2*, *ERBB2*, *MST1R* και *RAF1*.

Μια άλλη μελέτη (Girard et al., 2018), που έλαβε χώρα στη Γαλλία, εξετάστηκε η αλληλουχία 113 γονιδίων επιδιόρθωσης του DNA με χρήση WES, σε 1.721 γυναίκες με διηθητικό πορογενές ή λοβιακό καρκίνωμα του μαστού, μη BRCA, οι οποίες είχαν αδελφή με την ίδια νόσο. Στα αποτελέσματα της μελέτης, εκτός των γνωστών μεταλλάξεων σε γονίδια όπως τα *PALB2*, *ATM* και *CHEK2*, συμπεριλαμβάνονται νέες παθογόνες μεταλλάξεις που αναφέρονται για πρώτη φορά και αφορούν στα γονίδια *FANCI*, *MAST1*, *POLH* και *RTEL1*. Οι Weitzel et al. (2019), ανέλυσαν, επίσης, τις αλληλουχίες εξονίων με WES σε περισσότερες από 1000

γυναίκες με ισπανική καταγωγή, πάσχουσες από μη BRCA κληρονομικό καρκίνο του μαστού. Στα αποτελέσματα της μελέτης δείχθηκε πως το 4.5% των γυναικών αυτών είναι φορείς παθογόνου μετάλλαξης στα γονίδια *CHEK2*, *PALB2*, *ATM*, *TP53*, *BRIP1*, *CHD1* και *NF1* και επιπρόσθετα, οι πιο συχνές μεταλλάξεις εντοπίστηκαν στα *PALB2* και *CHEK2*, επιβεβαιώνοντας τον σημαντικό τους ρόλο στην ανάπτυξη μη BRCA καρκίνου του μαστού.

Επίσης, σε μελέτη των Kuligina et al. (2019), αναλύθηκε δείγμα λευκοκυτταρικού DNA, με την τεχνολογία WES, σε 49 ασθενείς ρωσικής καταγωγής. Οι ασθενείς αυτοί είχαν οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού, χωρίς όμως την εμφάνιση γνωστών σλαβικών ιδρυτικών μεταλλάξεων στα *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2* και *NBS1*. Η μελέτη αυτή κατέδειξε μία νέα σπάνια μετάλλαξη στο γονίδιο *USP39*, το οποίο κωδικοποιεί μία πεπτιδάση, ειδική της ουβικουιτίνης, η οποία ρυθμίζει ογκοκατασταλτικά γονίδια, όπως για παράδειγμα το *CHEK2*, η συσχέτιση της οποίας με τον κληρονομικό καρκίνο του μαστού χρήζει περαιτέρω μελέτης.

Το 2019, οι Lu et al., πραγματοποίησαν στις Η.Π.Α. μία μεγάλη μελέτη για τον εντοπισμό νέων γονιδίων που ενδεχομένως εμπλέκονται στον κληρονομικό καρκίνο του μαστού με διεξοδική και σε βάθος ανάλυση των χαρακτηριστικών των όγκων, με χρήση WES. Σε αυτή τη μελέτη συμμετείχαν 11.416 ασθενείς με επιβεβαιωμένη νόσο καθώς και 3.988 υγιή άτομα ως μάρτυρες. Ο όγκος των δεδομένων που παρήχθησαν από τη μελέτη, όσον αφορά στις παθογόνες παραλλαγές γονιδίων, ήταν τεράστιος. Εντοπίστηκαν 4 γονίδια που εμπλέκονται σημαντικά στον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού, τα *PALB2*, *ATM*, *CHEK2* και *MSH6* (Πίνακας 4.3). Το *MSH6* αποτελεί ένα νέο γονίδιο προδιάθεσης στον καρκίνο του μαστού και ανήκει στην κατηγορία MMR γονιδίων (επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA). Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *PALB2* φαίνεται πως συσχετίζονται με τον μεγαλύτερο κίνδυνο ογκογένεσης στο μαστό, ενώ οι μεταλλάξεις στα *ATM* και *CHEK2* (ιδιαίτερα η ιδρυτική μετάλλαξη c.1100delC) βρέθηκε πως αυξάνουν κατά 2 με 3 φορές τον κίνδυνο αυτό. Μεταλλάξεις στο γονίδιο *MSH6* (όπως η c.2945delC) φαίνεται πως συνδέονται με μέτριο κίνδυνο ογκογένεσης. Οι ερευνητές συνέδεσαν επίσης τα γονίδια αυτά με τον τύπο καρκίνου του μαστού, όπως φαίνεται και στον πίνακα 4.3. Οι μεταλλάξεις στο *PALB2* συνδέονται περισσότερο με πορογενή διηθητικά καρκινώματα του μαστού, με θετικούς ορμονικούς υποδοχείς, ενώ οι μεταλλάξεις στο *MSH6* συνδέονται περισσότερο με μέτριο κίνδυνο ανάπτυξης διηθητικού λοβιακού καρκινώματος. Συγκεκριμένα, οι μεταλλάξεις στα *ATM* και *CHEK2* φαίνεται πως συνδέονται εξίσου τόσο με λοβιακά όσο και με πορογενή διηθητικά καρκινώματα, θετικά σε ορμονικούς υποδοχείς, ενώ και τα 4 γονίδια συσχετίζονται με πρόωρη έναρξη καρκίνου του μαστού. Όσον αφορά σε άλλα γονίδια που μελετήθηκαν από τους συγγραφείς, τα *RAD50*, *MRE11* και *CDKN2A* δεν συσχετίστηκαν με ιδιαίτερα αυξημένο κίνδυνο, ενώ επιπρόσθετα δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ των γονιδίων *BRIP1*, *RAD51C*, *RAD51D*, *MSH2* και *PMS2* και της ανάπτυξης καρκίνου του μαστού. Επίσης, το γονίδιο *TP53*, γνωστό για την εμπλοκή του στο σύνδρομο Li-Fraumeni, δεν φάνηκε να αυξάνει

τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού σε σημαντικό βαθμό (Lu et al., 2019).

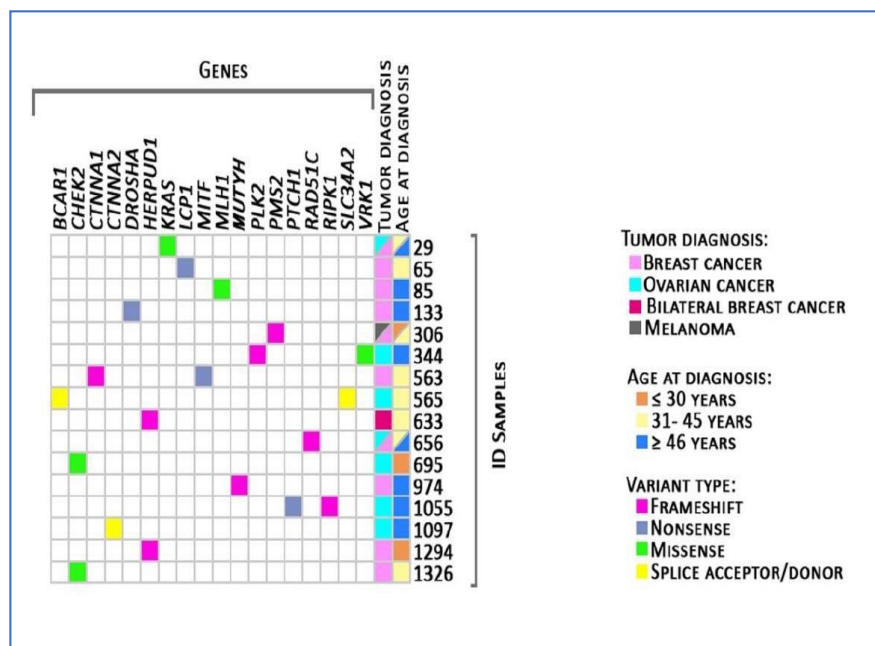
Πίνακας 4. 3. Εκτίμηση σχετικού κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου του μαστού σε σχέση με τις μεταλλάξεις στα 4 γονίδια που εντοπίστηκαν στη μελέτη των Lu et al. και τον τύπο του καρκινώματος (Lu et al., 2019)

ΓΟΝΙΔΙΟ	ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΑ (ΣΥΝΟΛΟ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ)	ΣΧΕΤΙΚΟΣ ΚΙΝΔΥΝΟΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ
<i>ATM</i>	79 (11512)	2.97
<i>CHEK2</i>	110 (13553)	2.19
<i>MSH6</i>	65 (17362)	2.59
<i>PALB2</i>	61 (15532)	5.53
ΠΟΡΟΓΕΝΕΣ ΔΙΗΘΗΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ		
<i>ATM</i>	41 (6659)	2.67
<i>CHEK2</i>	60 (7190)	2.11
<i>MSH6</i>	27 (10670)	1.79
<i>PALB2</i>	45 (9466)	6.91
ΛΟΒΙΑΚΟ ΔΙΗΘΗΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ		
<i>ATM</i>	6 (738)	3.5
<i>CHEK2</i>	8 (960)	2.49
<i>MSH6</i>	7 (1180)	4.23
<i>PALB2</i>	1 (1131)	1.34
ER+ , PR+ , HER2-		
<i>ATM</i>	23 (2959)	3.39
<i>CHEK2</i>	33 (3152)	2.66
<i>MSH6</i>	13 (4724)	1.95
<i>PALB2</i>	17 (4220)	5.87
ΤΡΙΠΛΑ ΑΡΝΗΤΙΚΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ		
<i>ATM</i>	3 (1321)	0.99
<i>CHEK2</i>	3 (1470)	0.51
<i>MSH6</i>	7 (2222)	2.25
<i>PALB2</i>	11 (1936)	8.27

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει μία μελέτη των Glentis et al. (2019), η οποία αφορά στην ανάλυση της αλληλουχίας εξονίων σε 52 άτομα 17 Ελληνικών οικογενειών, όπου τουλάχιστον ένας από τους ασθενείς ήταν αρνητικός για μεταλλάξεις στα γνωστά γονίδια προδιάθεσης για [46]

καρκίνο του μαστού. Έπειτα από την αρχική ανάλυση, ανιχνεύτηκαν παθογόνες μεταλλάξεις στο γονίδιο *BARD1* (*BARD1*:p.Trp91*), το οποίο κωδικοποιεί μια λιγάση που εμφανίζει αλληλεπίδραση με το γονίδιο *BRCA1*, καθώς και στο γονίδιο *MEN1* (*MEN1*:p.Glu260Lys) που εμπλέκεται στο σύνδρομο πολλαπλής ενδοκρινικής νεοπλασίας. Στην ίδια μελέτη εντοπίστηκαν σπάνιες παραλλαγές σε δύο νέα γονίδια, το *MDM1*, το οποίο κωδικοποιεί μια πυρηνική πρωτεΐνη και στο γονίδιο *NBEAL1*, το οποίο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε διάφορους μοριακούς μηχανισμούς, όπως είναι η απόπτωση και η σηματοδότηση υποδοχέων. Επίσης, στην ίδια μελέτη, εντοπίστηκε μία παρανοηματική μετάλλαξη στο γονίδιο *SETBP1*, το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που δεσμεύεται στο πυρηνικό ογκογονίδιο *SET* και η οποία, σύμφωνα με τους συγγραφείς θα μπορούσε να επιφέρει βλαβερές επιπτώσεις (Glentis et al., 2019).

Το 2020, οι Felicio et al., δημοσίευσαν μία μελέτη που διεξήχθη στη Βραζιλία και η οποία περιλάμβανε την ανάλυση του DNA, με την τεχνική WES, 52 γυναικών με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης κληρονομικού καρκίνου του μαστού, χωρίς μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1/2* και *TP53*. Η WES ανίχνευσε αρχικά πάνω από 2 εκατομμύρια μεταλλάξεις στο γονιδίωμα των ασθενών αυτών, ενώ στη συνέχεια – ακολουθώντας μία συγκεκριμένη ροή εργασιών που περιγράφεται στη συγκεκριμένη μελέτη – οι ερευνητές κατέληξαν στον εντοπισμό 19 μοναδικών παθογόνων μεταλλάξεων σε 18 γονίδια (Εικόνα 4.8) σε ποσοστό 30.8% των ασθενών. Οι 14 από αυτές τις μεταλλάξεις αφορούσαν μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας, ενώ οι υπόλοιπες 5 ήταν παρανοηματικές μεταλλάξεις. Ανάμεσα στα γονίδια που εντοπίστηκαν, ήταν τα γνωστά γονίδια προδιάθεσης για τον κληρονομικό καρκίνο του μαστού *RAD51C* και *CHEK2*, καθώς και γονίδια *MLH1*, *PMS2*, *DROSHA* και *SLC34A2*, τα οποία εμπλέκονται σε διάφορους άλλους τύπους καρκίνου (Felicio et al., 2020). Επίσης, στην ίδια μελέτη ανιχνεύτηκαν 92 μεταλλάξεις αγνώστου κλινικής σημασίας σε γονίδια επιδιόρθωσης του DNA, όπως είναι τα *POLQ*, *RAD54L* και *FAN1*.



Εικόνα 4. 8. Παθογόνες και πιθανώς παθογόνες μεταλλάξεις σε 18 γονίδια που προέκυψαν από τη μελέτη των Felicio et al. (2020)

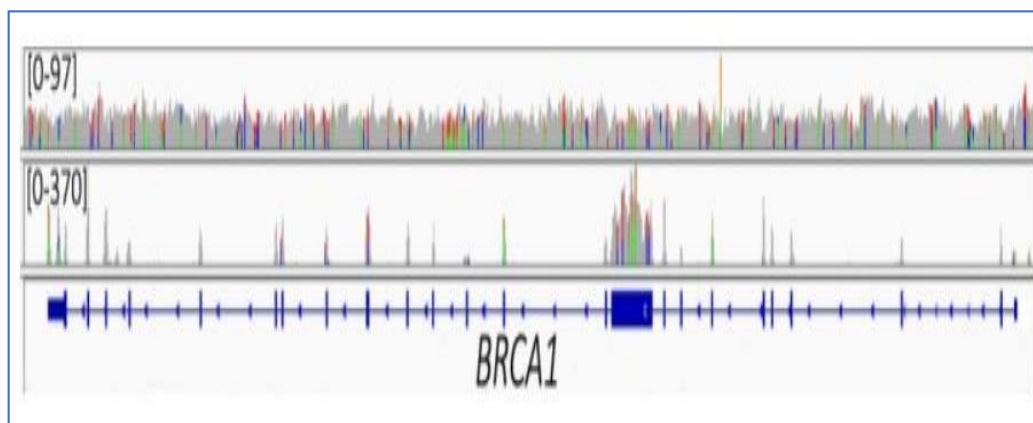
Μία μεγάλη μελέτη πραγματοποιήθηκε από τους Helgadottir et al. (2021) στη Σουηδία, όπου αναλύθηκαν οι αλληλουχίες εξονίων σε γονίδια 59 ασθενών από 24 οικογένειες με ιστορικό καρκίνου του μαστού, με χρήση της τεχνικής WES. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν παθογόνες μεταλλάξεις στα γνωστά γονίδια προδιάθεσης για καρκίνο του μαστού, *BRIP1* και *PALB2*, αλλά και 22 υψηλού κινδύνου μεταλλάξεις σε νέα γονίδια που πιθανώς διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του νόσου. Πρόκειται για τα γονίδια *FANCM* και *RAD54L*, τα οποία συμμετέχουν στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA και στον ομόλογο ανασυνδυασμό αντίστοιχα. Η μελέτη αυτή καταδεικνύει τη χρησιμότητα της ανάλυσης WES για την εύρεση νέων πιθανών γονιδίων και μεταλλάξεων που εμπλέκονται στον κληρονομικό καρκίνο του μαστού και την ανάγκη για ευρύτερες μελέτες που αφορούν στα γονίδια αυτά.

Στην πρόσφατη μελέτη των Liu et al. (2022), μελετήθηκε η αλληλουχία εξονίων, με χρήση WES, σε τρεις μη BRCA οικογένειες με ιστορικό καρκίνου του μαστού στη Σουηδία. Οι ασθενείς των συγκεκριμένων οικογενειών είχαν επίσης βρεθεί αρνητικοί σε μεταλλάξεις 64 γονιδίων που περιλαμβάνονται στα συνήθη τεστ γονιδιακών πάνελ για τον κληρονομικό καρκίνο του μαστού. Σκοπός, των ερευνητών ήταν η ανακάλυψη νέων γονιδιακών μεταλλάξεων που πιθανώς εμπλέκονται στη νόσο, καταλήγοντας σε υποψήφια πιθανά γονίδια όπως είναι τα *UBASH3A*, *MYH13*, *UTP11L* και *PAX7*. Στη συνέχεια, οι ερευνητές αξιολόγησαν τις μεταλλάξεις στα γονίδια αυτά μελετώντας την πρωτεϊνική τους έκφραση. Ωστόσο, τα αποτελέσματα δεν έδειξαν να υπάρχει ιδιαίτερη συσχέτιση μεταξύ των μεταλλάξεων αυτών και των σηματοδοτικών μονοπατιών που σχετίζονται με καρκινογένεση,

οδηγώντας τους συγγραφείς στο συμπέρασμα ότι οι μελέτες με WES για την ανακάλυψη νέων γονιδίων που εμπλέκονται στον καρκίνο του μαστού εμπεριέχουν μεγαλύτερες προκλήσεις από ότι πιστευόταν αρχικά. Αντίθετα, σε μία επίσης πολύ πρόσφατη μελέτη με χρήση WES (BenAyed-Guerfali et al., 2022), οι ερευνητές ανακάλυψαν παθολογικές παραλλαγές σε 5 νέα γονίδια (*EP300*, *KMT2C*, *RHPN2*, *HSPG2* και *CCR3*) σε ασθενείς με κληρονομικό μη BRCA καρκίνο του μαστού στην Τυνησία. Παρότι απαιτούνται ευρύτερες μελέτες για να αποδειχθεί η εμπλοκή των γονιδίων αυτών στον κληρονομικό καρκίνο του μαστού και η συσχέτισή τους με την έκβαση της νόσου, η μελέτη αυτή δείχνει τη χρησιμότητα της τεχνικής WES ως προς την ανακάλυψη νέων παθογόνων μεταλλαγών σε γονίδια.

4.4 Προσέγγιση WGS στον κληρονομικό καρκίνο του μαστού

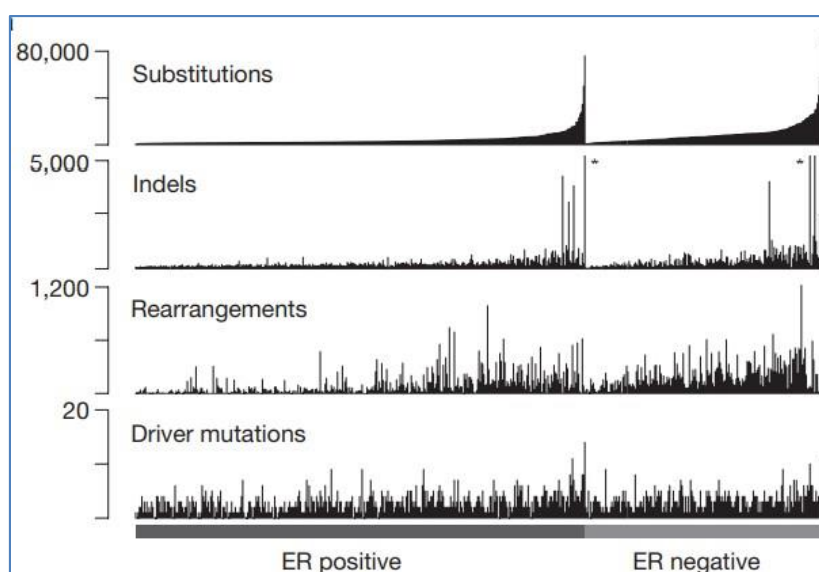
Τα τελευταία χρόνια η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος (WGS) για τη μελέτη του καρκίνου έχει κερδίσει έδαφος έναντι των άλλων μεθόδων που βασίζονται στην αλληλούχιση νέας γενιάς, καθώς μπορεί να αναλύσει γρήγορα και με ακρίβεια όλες τις περιοχές του γονιδιώματος, κωδικοποιητικές και μη και να παράξει δεδομένα πολύ υψηλής απόδοσης (Zelli et al., 2020). Σύμφωνα με μία μελέτη (Rossing et al., 2019), η οποία εξέτασε τη συμβολή της WGS στη μελέτη του καρκίνου του μαστού, οι συγγραφείς κατέληξαν στα συμπεράσματά τους πως η WGS έχει τη δυνατότητα να αντικαταστήσει εντελώς την WES και τις άλλες τεχνικές NGS, λόγω της υπεροχής της στο εύρος κάλυψης (Εικόνα 4.9), καθώς και της δυνατότητάς της στην ανίχνευση διαγραφών και ενθέσεων, διαγραφών τμημάτων εσονίων, δομικών παραλλαγών, επαναλαμβανόμενων DNA μοτίβων και πολυμορφισμούς στον αριθμό αντιγράφων του γονιδίου.



Εικόνα 4. 9. Στοίχιση αλληλουχίας του γονιδίου *BRCA1* του ίδιου ασθενή με χρήση WGS (επάνω) και WES (κάτω) (Rossing et al., 2019)

Όσον αφορά στον κληρονομικό καρκίνο του μαστού, οι μελέτες με WGS βρίσκονται σε αρκετά

πρόωρο στάδιο ώστε να μπορέσει να επιβεβαιωθεί στην κλινική πράξη η σημαντικότητα των ευρημάτων τους. Σε μία μεγάλη μελέτη των Nik-Zainal et al. (2016), αναλύθηκαν με WGS τα γονιδιώματα 560 καρκινικών όγκων, με στόχο την κατανόηση της διαδικασίας με την οποία πραγματοποιούνται σωματικές μεταλλάξεις σε φορείς γενετικών ιδρυτικών μεταλλάξεων σε γονίδια προδιάθεσης για τον καρκίνο του μαστού. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης αποκάλυψαν έναν μεγάλο αριθμό γονιδιακών αναδιατάξεων, αντικαταστάσεων, διαγραφών και προσθηκών, καταδεικνύοντας την πιθανή συσσώρευση σωματικών μεταλλάξεων λόγω μίας ιδρυτικής μετάλλαξης.

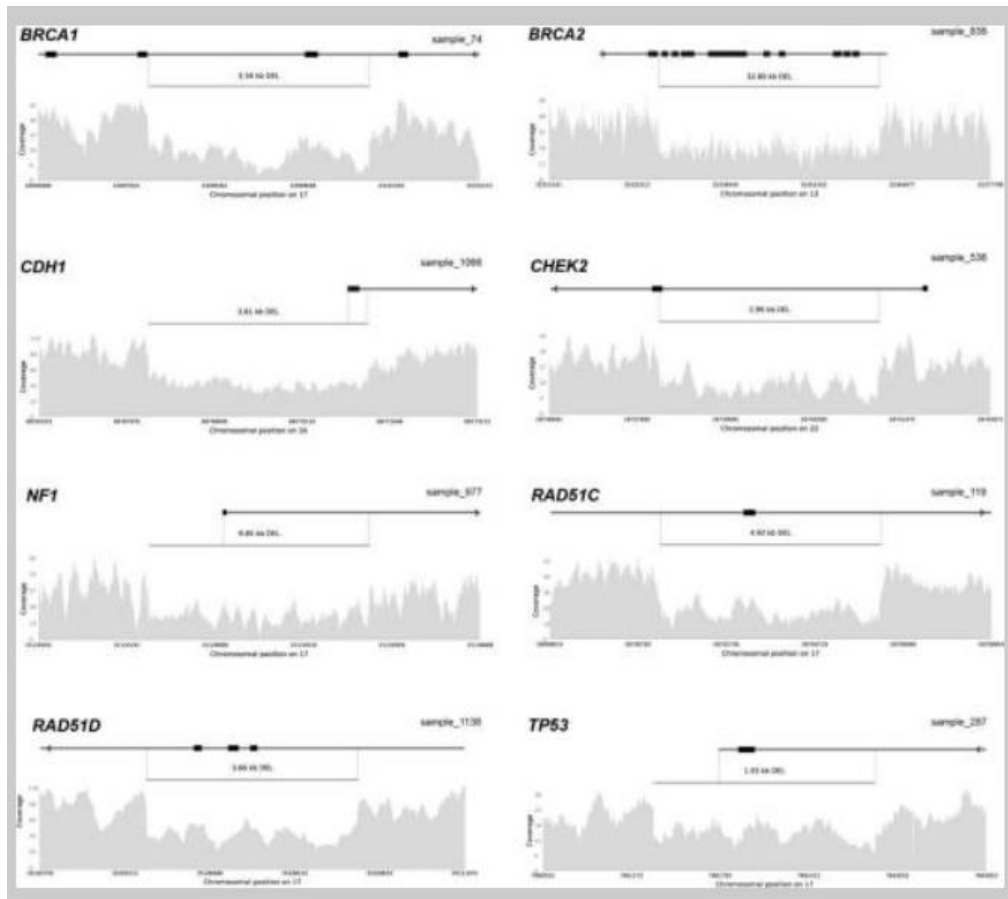


Εικόνα 4. 10: Σωματικές μεταλλάξεις σε 560 ασθενείς, φορείς γενετικών μεταλλάξεων σε γονίδια προδιάθεσης για καρκίνο του μαστού (Nik-Zainal et al., 2016)

Σε μία άλλη μεγάλη, πιο πρόσφατη μελέτη των Nones et al. (2019), αναλύθηκαν και συγκρίθηκαν 78 ζεύγη, αποτελούμενα από DNA όγκων και DNA βλαστικών κυττάρων, ασθενών με οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού, οι οποίοι έφεραν παθογόνες μεταλλάξεις στα *BRCA1* ή *BRCA2* καθώς και από ασθενείς που δεν έφεραν μεταλλάξεις *BRCA*. Η αντιστοιχισμένη ανάλυση πραγματοποιήθηκε με WGS, με την πλατφόρμα Illumina X-Ten και οι συγγραφείς επιβεβαίωσαν την απενεργοποίηση και των δύο αλληλόμορφων γονιδίων που εμπλέκονται στον κληρονομικό καρκίνο του μαστού, μέσω της κληρονομικής μετάλλαξης στη γαμετική κυτταρική σειρά και μιας σωματικής μετάλλαξης, όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο 3 της παρούσας εργασίας. Η απώλεια της λειτουργίας των γονιδίων *BRCA1/2* και *PALB2*, που εντοπίστηκε στους ασθενείς, συσχετίστηκε με επιπλέον συσσώρευση σωματικών μεταλλάξεων καθώς και ελαττωματικό ομόλογο ανασυνδυασμό. Φάνηκε, επίσης, σύμφωνα με τους συγγραφείς πως 13 από τους υπό μελέτη όγκους (μη *BRCA*) εμφάνιζαν δομικές αναδιατάξεις οι οποίες οδηγούσαν σε ενισχύσεις ογκογονιδίων και παθογόνες μεταλλάξεις στα

γονίδια *TP53*, *ABM* και *CHEK2*, ενώ είχαν επίσης τη δυνατότητα να οδηγήσουν σε *BRCA* παραλλαγές. Συμπερασματικά, η συγκεκριμένη μελέτη κατέδειξε την μεγάλη σημασία που έχει η προσέγγιση της WGS ανάλυσης – με την αντιστοιχισμένη ανάλυση, σε ζεύγη, του DNA της γαμετικής κυτταρικής σειράς και του όγκου - στη ανακάλυψη υποκείμενων γενετικών αιτιών και μηχανισμών γονιδιωματικής αστάθειας που διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στον κληρονομικό καρκίνο του μαστού, με απώτερο στόχο την κλινική εφαρμογή των ευρημάτων στην εξατομικευμένη θεραπεία των ασθενών (Nones et al., 2019).

Τέλος, στην πρόσφατη μελέτη των Chen et al. (2021), αναλύθηκαν οι αλληλουχίες 10 γονιδίων από 1.340 ασθενείς στην Αφρική, τα οποία εμπλέκονται στον κληρονομικό καρκίνο του μαστού, χρησιμοποιώντας την τεχνική WGS, με σκοπό της ανεύρεση δομικών διαγραφών σε περιοχές αυτών των γονιδίων. Από τις 16 διαγραφές που βρέθηκαν στα ιντρόνια των γονιδίων αυτών, το 75% θεωρείται από τους συγγραφείς πως έχει σημαντική κλινική σημασία, καθώς οι διαγραφές αυτές οδηγούν στην απώλεια ρυθμιστικών στοιχείων και εν τέλει στην απενεργοποίηση της έκφρασης των γονιδίων. Επίσης, ανιχνεύθηκαν διαγραφές στις κωδικοποιές περιοχές 8 γονιδίων (Εικόνα 4.11), οι 5 εκ των οποίων αφορούν σε σπάνιες διαγραφές στα εξής γονίδια: *BRCA1* (3.34 kb, σε 3 εξόνια), *BRCA2* (32.8Kb, σε 9 εξόνια), *RAD51C* (4.92Kb, σε ένα εξόνιο), *RAD51D* (3.66Kb, σε 3 εξόνια) και *TP53* (1.55Kb, σε ένα εξόνιο). Οι διαγραφές αυτές είναι πιθανό να έχουν ιδιαίτερη κλινική σημασία, καθώς είναι δυνατόν να αναστείλουν τη λειτουργία των συγκεκριμένων γονιδίων. Τα ευρήματα της μελέτης αυτής είναι πολύ σημαντικά, καθώς είναι η πρώτη μεγάλη μελέτη που πραγματοποιείται με WGS για την ανεύρεση δομικών διαγραφών και η επαλήθευση αυτών των ευρημάτων σε μελλοντικές έρευνες θα οδηγήσει σε νέα δεδομένα γενετικών αναλύσεων για τον καρκίνο του μαστού.



Εικόνα 4. 11: Σπάνιες δομικές διαγραφές σε 8 γονίδια με εμπλοκή στον καρκίνο του μαστού (Chen et al., 2021)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Η ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ NGS ΣΤΗΝ ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΝΕΩΝ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΣΤΟΧΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

5.1 Κλινικές εφαρμογές της NGS και υπάρχουσες στοχευμένες θεραπείες στον καρκίνο του μαστού

Τα τελευταία χρόνια, η μεγάλη ανάπτυξη της τεχνολογίας NGS έχει οδηγήσει στην εφαρμογή της στην έρευνα για τον καρκίνο, καθώς χρησιμοποιείται – εκτός από τη διάγνωση ασθενών - για τον εντοπισμό νέων και σπάνιων μεταλλάξεων, για τον προσδιορισμό πληθυσμού ατόμων με κληρονομική προδιάθεση για καρκίνο, καθώς και για την εύρεση της κατάλληλης στοχευμένης και εξατομικευμένης θεραπείας για τον κάθε ασθενή. Μέσω ενός μόνο δείγματος βιοψίας καρκινικού όγκου, μπορεί να πραγματοποιηθεί η ανίχνευση όλων των γονιδιακών αλλαγών με την τεχνολογία NGS, δίνοντας πολύτιμες πληροφορίες για το είδος του όγκου και καθίσταται δυνατή η όσο το δυνατόν πιο αποδοτική εξατομικευμένη θεραπεία (Garraway, 2013). Η κλινική εφαρμογή της NGS δύναται επίσης να περιλαμβάνει και δείγματα υγρής βιοψίας, καθώς μπορεί να ανιχνεύσει μεταλλάξεις και στο εξωκυττάριο κυκλοφορούν DNA. Η υγρή βιοψία αποτελεί μια μη-επεμβατική μέθοδο με την οποία μπορεί να αναλυθεί το καρκινικό DNA που έχει απομονωθεί από το πλάσμα αίματος καρκινοπαθών, καθώς κομμάτια DNA από συμπαγείς όγκους μπορούν να αποβληθούν (λόγω απόπτωσης ή νέκρωσης) καταλήγοντας στην κυκλοφορία του αίματος των ασθενών (ctDNA- circulating tumor DNA). Μελέτες δείχνουν πως η ανίχνευση μεταλλάξεων στην αλληλουχία του ctDNA μπορεί να λειτουργήσουν ως βιοδείκτες για τη διάγνωση, πρόγνωση αλλά και θεραπευτική προσέγγιση ασθενών με καρκίνο, όπως επίσης και για την εκτίμηση της πιθανότητας ανταπόκρισης στα διάφορα θεραπευτικά σχήματα με στόχο την επιλογή του κατάλληλου εξατομικευμένου σχήματος (Chen and Zhao, 2019).

Οι κλινικές εφαρμογές της NGS στους κληρονομικούς καρκίνους είναι επίσης σημαντικές, τόσο στη διάγνωση και εκτίμηση κινδύνου, όσο και στην επιλογή θεραπείας. Με δεδομένο, μάλιστα, ότι η ανίχνευση γενετικών αλλαγών απαιτεί μικρότερο βάθος αλληλουχίας, καθώς οι αλληλομορφικές παραλλαγές των γονιδίων αποτελούν συνήθως το 50% ή το 100%, δύναται να συμπεριληφθεί σε μία και μόνο ανάλυση από μία βιοψία ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων-στόχων, όπως είναι για παράδειγμα τα *BRCA1*, *BRCA2*, *CDH1*, *PTEN*, *TP53*, *STK11*, *PALB2* και *ATM* (Bunnell et al., 2017).

Όσον αφορά στις έρευνες για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού, πολλά από τα γονίδια τα οποία αναλύονται με NGS, συμμετέχουν – μέσω του ομόλογου ανασυνδυασμού - στο μονοπάτι της επιδιόρθωσης του DNA (HRR - homologous recombination repair), όπου μεταξύ αυτών βρίσκονται τα *BRCA1/2*, τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες που διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο

στο HRR. Στη βάση των γενετικών μεταλλάξεων στα δύο αυτά γονίδια στον καρκίνο του μαστού, έχουν ανακαλυφθεί και χρησιμοποιηθεί ως μονοθεραπείες οι αναστολείς PARP (αναστολέα πολυμεράσης της (πολυ-ADP)ριβόζης), καθώς τα καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιούν επίσης το HRR για επιδιόρθωση των βλαβών στο DNA τους. Οι αναστολείς PARP εμποδίζουν τη διαδικασία της επιδιόρθωσης με αποτέλεσμα τη θανάτωση των καρκινικών κυττάρων. Έως σήμερα, δύο φαρμακευτικά σκευάσματα, το Olaparib και το Talazoparib που ανήκουν στην κατηγορία PARP, έχουν εγκριθεί για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού που οφείλεται σε μεταλλάξεις των BRCA (Cortesi, Rugo and Jackisch, 2021).

5.2 Νεότερες μελέτες με NGS για την ανακάλυψη νέων θεραπευτικών στόχων

Η ανακάλυψη νέων θεραπευτικών στόχων και η εξατομίκευση της θεραπείας για τον κάθε ασθενή με καρκίνο του μαστού είναι ο απώτερος σκοπός της γονιδιωματικής έρευνας του καρκίνου. Με την έλευση της τεχνολογίας NGS έχουν πραγματοποιηθεί –και συνεχίζουν να πραγματοποιούνται με αμείωτο ρυθμό – μελέτες που προσπαθούν να συμβάλλουν στην ανακάλυψη νέων θεραπειών αλλά και στην πρόβλεψη της ανταπόκρισης στη θεραπεία του κάθε ασθενή ξεχωριστά, ανάλογα με το μοριακό προφίλ του όγκου.

Στη μελέτη των Zhao et (2017), στόχος ήταν ο εντοπισμός συγκεκριμένων μεταλλάξεων που οδηγούν σε δυσλειτουργία του ομόλογου ανασυνδυασμού και η σχέση τους με την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα. Για τον λόγο αυτό αναλύθηκαν με την τεχνική WGS, δείγματα καρκινικών όγκων από 93 ασθενείς με καρκίνο του μαστού προχωρημένου σταδίου. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως οι ασθενείς με δυσλειτουργία και ανεπάρκεια του ομόλογου ανασυνδυασμού λόγω μεταλλάξεων σε γονίδια που διαδραματίζουν ρόλο στο HR, επωφελούνται από τη θεραπεία με πλατίνα, επιμηκύνοντας το προσδόκιμο ζωής τους.

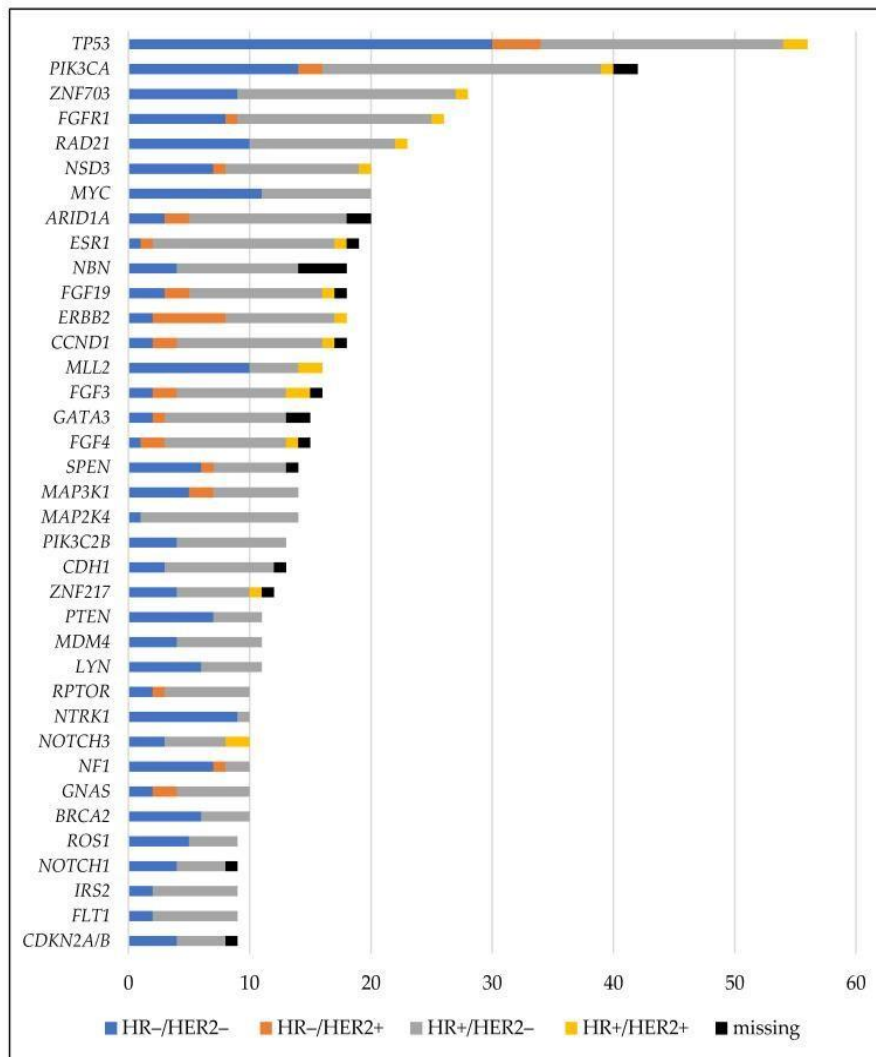
Σε μία άλλη μελέτη, επίσης το 2017, των Davies et al, αναλύθηκαν με WGS 640 καρκινικοί όγκοι από ασθενείς με κληρονομικό καρκίνο του μαστού. Σε 11 από αυτούςτους ασθενείς ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις σε γονίδια επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA (MMR), όπως είναι τα *MSH2*, *MSH6*, *MLH1*, *PMS2*. Καθώς έχει βρεθεί πως οι καρκίνοι με ανεπάρκεια στο σύστημα MMR είναι ευαίσθητοι στη θεραπεία με αναστολείς σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος (PD-1), καθίσταται σαφές πως η WGS ανάλυση προς τον εντοπισμό των συγκεκριμένων μεταλλάξεων – αν και σπάνιων – μπορεί να συνεισφέρει στην αποτελεσματική θεραπεία των ασθενών αυτών (Davies et al., 2017).

Στη μελέτη των Guerrero-Zetere et al. (2018), αναλύθηκαν με NGS δείγματα DNA όγκων από 68 ασθενείς με ER+ καρκίνο του μαστού, οι οποίοι εμφάνιζαν αντίσταση στην προεγχειρητική

νεοεπικουρική θεραπεία με letrozole. Στους συγκεκριμένους ασθενείς εντοπίστηκαν μεταλλάξεις γονιδίων οι οποίες ευθύνονται για την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα E2F4. Στη συνέχεια της μελέτης, μετά τη χορήγηση CDK4/6 αναστολέων, όπως το Palbociclib, μειώθηκε η έκφραση των 18 από τα 20 γονίδια που στοχεύουν τον E2F4, ενώ δείχτηκε πως η πολύμηνη αγωγή με Palbociclib προεγχειρητικά, οδηγεί στην αποσιώπηση της έκφρασης όλων των γονιδίων αυτών και άρα στην αναστολή ενεργοποίησης του E2F4 στους ασθενείς με αντίσταση στη θεραπεία με letrozole, καταδεικνύοντας μία ακόμα φορά τη σημαντικότητα της ανάλυσης με NGS στη θεραπευτική προσέγγιση ασθενών.

Η αλληλούχιση NGS σε συνδυασμό με την ανάλυση της έκφρασης πρωτεϊνών αποτελεί το θέμα της μελέτης των Hempel et al. (2020), που έχει ως σκοπό την ανίχνευση γενετικών γονιδιακών παραλλαγών σε 324 γονίδια 41 ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν πως 27 από τους 41 ασθενείς είχαν περισσότερες από μία γονιδιακές μεταλλάξεις, ενώ οι πιο συχνές αφορούσαν στα γονίδια *PIK3CA* και *ERBB2* (σε 14 και 11 ασθενείς αντίστοιχα). Η προτεινόμενη θεραπεία για αυτούς τους ασθενείς είναι το πρόσφατα εγκεκριμένο φάρμακο με την ονομασία Alpelisib, το οποίο ενδείκνυται για ER+/PR+ μεταστατικούς όγκους του μαστού με μεταλλάξεις στα *PIK3CA* και *ERBB2* (Hempel et al., 2020).

Μία άλλη μεγάλη και πρόσφατη μελέτη των Bruzas et al. (2021), αφορά στη σύγκριση της στοχευμένης θεραπευτικής προσέγγισης – καθοδηγούμενη από την ανάλυση NGS- ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού σε σχέση με την παραδοσιακή θεραπεία με χημειοθεραπευτικά μέσα. Στη μελέτη αυτή έλαβαν μέρος 95 ασθενείς, οι όγκοι των οποίων αναλύθηκαν με τη μέθοδο NGS (αλληλούχιση 324 γονιδίων) και ανιχνεύτηκαν συνολικά 1461 μεταλλάξεις – τουλάχιστον 3 γενετικές μεταλλάξεις στον κάθε ασθενή. Οι περισσότερες από αυτές αφορούσαν στα γονίδια *TP53*, *PIK3CA*, *ZNF703*, *FGFR1* και *RAD21* (Εικόνα 5.1).



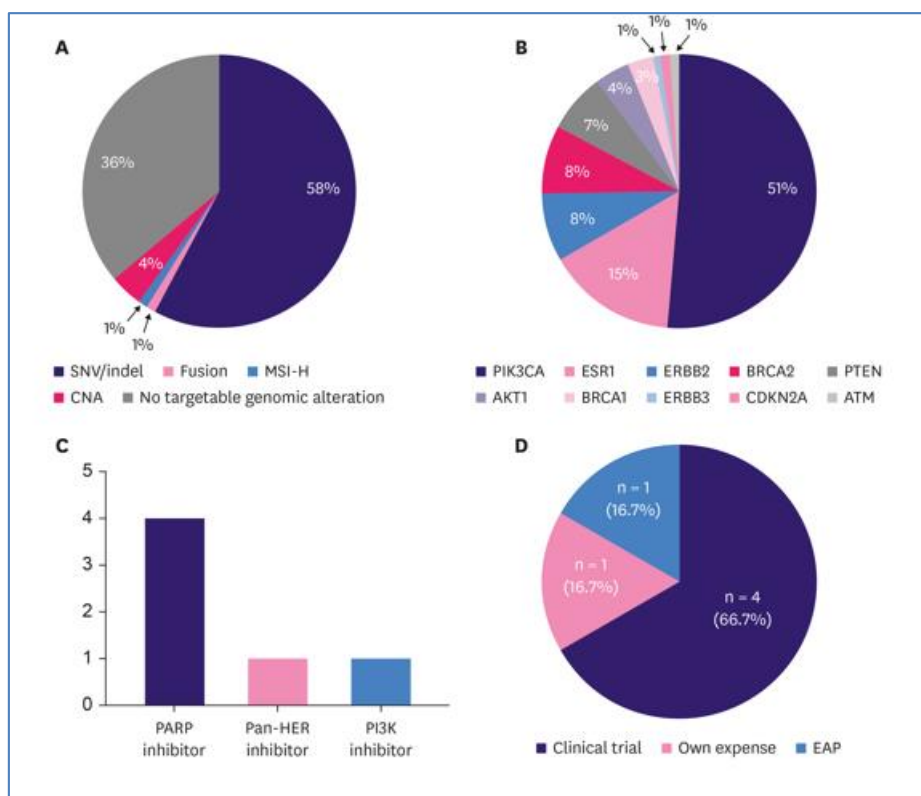
Εικόνα 5.1: Μεταλλάξεις σε γονίδια 95 ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού σε σχέση με τον μοριακό υπότυπο του όγκου (Bruzas et al., 2021)

Από τους 95 ασθενείς, οι 30 έλαβαν στοχευμένη θεραπεία, ανάλογα με τις γονιδιακές τους μεταλλάξεις, ενώ οι υπόλοιποι 65 έλαβαν την κλασική χημειοθεραπεία. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν πως περίπου το 40% των ασθενών που έλαβαν στοχευμένη θεραπεία ωφελήθηκαν από αυτή με την αναλογία της επιβίωσης χωρίς εξέλιξη της νόσου υπό τη στοχευμένη θεραπεία προς την επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου υπό χημειοθεραπεία, να είναι μεγαλύτερη του 1.3 (αναλογία PFS) (Πίνακας 5.1). Επίσης, ενώ η μονοετής επιβίωση των ασθενών που έλαβαν την κλασική χημειοθεραπεία ήταν μόλις 22.7%, το αντίστοιχο ποσοστό επιβίωσης των ασθενών που έλαβαν στοχευμένη θεραπεία, μετά την ανάλυση NGS, άγγιξε το 63%.

Πίνακας 5.1: Στοιχειμένες θεραπείες που έλαβαν οι 30 ασθενείς της μελέτης των Bruzas et al.(2021), ανάλογα με τη μετάλλαξη και τα αντίστοιχα PFS

Μεταλλαγμένο Γονίδιο	Μοριακός Υπότυπος Όγκου	NGS-Based Therapy	Αναλογία PFS
<i>PIK3CA</i>	HR+HER2-	Everolimus + exemestan	22.00
<i>ERBB2</i>	HR+HER2-	Docetaxel + trastuzumab + pertuzumab	6.50
<i>AKT1</i>	HR-HER2-	Everolimus + exemestan	6.50
<i>FGFR1</i>	HR-HER2-	Pazopanib	1.63
<i>PTEN</i>	HR+HER2+	Everolimus + fulvestrant	6.50
<i>FGFR1</i>		Pazopanib	2.60
<i>ERBB2</i>	HR-HER2+	Trastuzumab emtansine	4.22
<i>PIK3CA</i>	HR+HER2-	Everolimus + exemestan	3.25
<i>CD274, CD273</i>	HR-HER2+	Pembrolizumab + nab-paclitaxel	2.00
<i>AKT3</i>	HR-HER2-	Everolimus	1.63
<i>CCND1</i>	HR-HER2-	Palbociclib + letrozol	1.50
<i>PALB2</i>	HR+HER2-	Olaparib	1.35
<i>PIK3CA</i>	HR-HER2-	Everolimus + exemestan	1.35
<i>ERBB2</i>	HR+HER2-	Lapatinib + capecitabine	0.97
<i>CCND1</i>	HR+HER2-	Palbociclib + fulvestrant	0.88
<i>ESR1</i>	HR+HER2-	Fulvestrant	0.76
<i>PTEN</i>	HR-HER2+	Everolimus	0.76
<i>PIK3CA</i>	HR-HER2+	Everolimus + exemestan	0.76
<i>FGFR1</i>	HR-HER2-	Pazopanib	0.17
<i>CCND1</i>	HR+HER2-	CDK4/6 inhibitor + exemestan	0.17
<i>PTEN</i>	HR+HER2-	Everolimus + exemestan	0.04

Τέλος, οι Suh et al. (2022), πραγματοποίησαν πρόσφατα μία πολύ ενδιαφέρουσα μελέτη σχετικά με τη κλινική εφαρμογή των γενετικών εξετάσεων με NGS στην ιατρική πράξη. Η μελέτη περιλάμβανε 137 ασθενείς με προχωρημένο ή μεταστατικό καρκίνο του μαστού στην Κορέα, οι οποίοι εξετάστηκαν για γαμετικές γονιδιακές μεταλλάξεις με NGS πάνελ τεστ. Το 92% των ασθενών εμφάνιζε γονιδιακές μεταλλάξεις, ενώ στο 62% των ασθενών (81 ασθενείς), οι μεταλλάξεις αυτές ήταν δυνητικά στοχεύσιμες (Εικόνα 5.2A). Η πλειοψηφία των στοχεύσιμων μεταλλάξεων βρέθηκε στα εξής γονίδια: *PIK3CA*, *ESR1*, *ERBB2*, *BRCA2*, *PTEN*, *AKT1* και *BRCA1* (Εικόνα 5.2B). Από αυτούς τους ασθενείς, μόνο το 7.4% (6 ασθενείς) έλαβαν στοχευμένη θεραπεία. Συγκεκριμένα, 4 ασθενείς με *BRCA* μεταλλάξεις έλαβαν αναστολείς PARP, ένας ασθενής με *ERBB2* μετάλλαξη έλαβε Neratinib και ένας ασθενής με μετάλλαξη στο *PIK3CA* έλαβε θεραπεία με αναστολέα PI3K (Εικόνα 5.2C). Οι υπόλοιποι ασθενείς με στοχεύσιμες μεταλλάξεις δεν έλαβαν κάποια στοχευμένη θεραπεία, είτε λόγω έλλειψης της κατάλληλης αγωγής, είτε λόγω αδυναμίας εισαγωγής σε κλινικές δοκιμές, είτε λόγω οικονομικής αδυναμίας. Συμπερασματικά, η μελέτη αυτή καταδεικνύει τη μεγάλη χρησιμότητα της μεθόδου NGS στην στοχευμένη και εξατομικευμένη θεραπεία των ασθενών με καρκίνο του μαστού, αλλά και την αδυναμία πλήρους εφαρμογής της στην κλινική πράξη.



Εικόνα 5.2: Εξατομικευμένη θεραπεία ασθενών βάσει του μοριακού προφίλ τους μετά από ανάλυση με NGS A. Στοχεύσιμες και μη γενετικές μεταλλάξεις B.Μεταλλαγμένα γονίδια C. Στοχευμένες θεραπείες D. Πρόσβαση ασθενών σε στοχευμένες θεραπείες (Suh et al., 2022)

5.3 Μελλοντικοί στόχοι για την εφαρμογή της ιατρικής ακριβείας στον καρκίνο του μαστού

Η εφαρμογή της ιατρικής ακριβείας, στα πλαίσια της ογκολογίας, βασίζεται τόσο στην ανάλυση του γονιδιώματος του ασθενούς όσο και στην ανάλυση του καρκινικού γονιδιώματος, ώστε να μπορέσει ο θεράπων ιατρός να βρει την κατάλληλη θεραπεία για τον κάθε ασθενή εξατομικευμένα (Kumar-Sinha και Chinnaiyan, 2018). Τα ευρήματα από τις μελέτες με NGS, ειδικότερα από τις WES και WGS μελέτες που έχουν προκύψει τα τελευταία χρόνια, είναι πολλά υποσχόμενα ως προς την επίτευξη ενός ολοκληρωμένου καταλόγου ο οποίος θα περιλαμβάνει μεταλλάξεις τόσο στις κωδικοποιητικές όσο και στις μη κωδικοποιητικές περιοχές των γονιδίων, όπως για παράδειγμα υποκινητές και ενισχυτές. Μεγάλη μελλοντική πρόκληση, αλλά και επιτακτική ανάγκη, αποτελεί η πλήρης χαρτογράφηση του μοριακού τοπίου του καρκίνου του μαστού, συμπεριλαμβανομένης και της κληρονομικής μορφής του, ώστε να συνδεθούν οι μεταλλάξεις του γονιδιώματος με τις διαταραχές στη ρύθμιση ολόκληρου του μοριακού δικτύου, με στόχο την ανάπτυξη νέας γενιάς, στοχευμένων φαρμάκων. Για την επίτευξη αυτού του στόχου, θεωρείται απαραίτητη η περαιτέρω ανάπτυξη και βελτίωση της τεχνολογίας NGS καθώς και των υπολογιστικών συστημάτων βιοπληροφορικής, ώστε να συμπεριλαμβάνει εργαλεία πλήρους χαρτογράφησης και επεξεργασίας του γονιδιώματος (Kyrochristos, Ziogas & Roukos, 2018).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η πρόσφατη πρόοδος στις νέες τεχνολογίες αλληλούχισης, όπως η NGS, έχει οδηγήσει σε πλήθος ερευνών και ανακαλύψεων επάνω στην ιατρική γενετική έρευνα για τον κληρονομικό καρκίνο του μαστού. Αρκετές μελέτες οδήγησαν στην ανακάλυψη νέων μεταλλάξεων και αναδιατάξεων στα γονίδια προδιάθεσης *BRCA1* και *BRCA2* μετά από στοχευμένη αλληλούχιση με τη μέθοδο NGS των δύο αυτών γονιδίων σε ασθενείς με οικογενειακό ιστορικό, ενώ έχει δειχθεί το πλεονέκτημα της χρήσης NGS σε σχέση με την παλαιότερη μέθοδο Sanger για την ταυτοποίηση *BRCA* μεταλλάξεων όσον αφορά στην ευαισθησία, στο κόστος και τον χρόνο. Ο κατά πολύ μειωμένος χρόνος για την ταυτοποίηση μεταλλάξεων στα *BRCA* που απαιτείται με την NGS σε σχέση με τη Sanger είναι ιδιαίτερα σημαντικός, καθώς συμβάλλει στην ταχύτερη λήψη αποφάσεων σχετικά με την θεραπευτική προσέγγιση ασθενών από τους κλινικούς ιατρούς και την ταχύτερη ενδεχόμενη έναρξη θεραπείας με αναστολείς PARP, οι οποίοι έχουν εγκριθεί για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού που οφείλεται σε μεταλλάξεις των *BRCA*.

Οι μελέτες και οι αναλύσεις στοχευμένων γονιδίων με τη χρήση της NGS δεν περιορίζονται όμως μόνο στα δύο αυτά συχνότερα γονίδια προδιάθεσης, αλλά μπορούν να συμπεριλάβουν πάνελ πολλών επιλεγμένων γονιδίων, οι οποίες εκτός από τον εντοπισμό παραλλαγών σε ασθενείς με οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού, έχουν οδηγήσει στην ανακάλυψη νέων μεταλλάξεων σε γονίδια όπως για παράδειγμα τα *CDKN2A*, *ATM*, *CHEK2*, *PALB2*, *RAD51* που φαίνεται πως διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην γενετική βάση του κληρονομικού καρκίνου του μαστού.

Πολύ σημαντικές στην έρευνα για τον κληρονομικό καρκίνο του μαστού, έχει δειχθεί ότι είναι οι αναλύσεις WES και WGS, που βασίζονται στην αλληλούχιση νέας γενιάς. Οι τεχνολογίες αυτές αποτελούν ένα ισχυρό εργαλείο ώστε να κατανοηθούν σε βάθος οι μηχανισμοί που λειτουργούν στους κληρονομικούς καρκίνους, συνδέοντας τις γενετικές μεταλλάξεις στα γαμετικά κύτταρα με τη συσσώρευση σωματικών μεταλλάξεων και την επακόλουθη καρκινογένεση. Στις μελέτες με χρήση WES και WGS, που αναφέρθηκαν στην παρούσα εργασία, αποκαλύφθηκε ένας μεγάλος αριθμός μεταλλαγών σε πλήθος γονιδίων, αναφορικά με τον καρκίνο του μαστού, αλλά και μεγάλη ετερογένεια ανάμεσα στις μελέτες, σε σχέση με τα αναλυμένα γονίδια και τον τρόπο επεξεργασίας των δεδομένων, γεγονός που καταδεικνύει την ανάγκη δημιουργίας περισσότερο τυποποιημένων ροών εργασίας στις γονιδιακές αναλύσεις ασθενών με οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού. Επίσης, καθώς οι αναλύσεις NGS παράγουν ένα τεράστιο αριθμό δεδομένων, είναι πολύ σημαντική η αποτελεσματική διαχείρισή τους και η επιλογή των κατάλληλων εργαλείων για την ανάλυσή τους, ώστε να παράγονται τα βέλτιστα αποτελέσματα.

Ειδικότερα, στις περιπτώσεις ανίχνευσης μεταλλάξεων με άγνωστη κλινική σημασία, η

εφαρμογή ειδικών αλγορίθμων προτεραιοποίησης είναι κρίσιμης σημασίας.

Τέλος, φαίνεται πως η συμβολή της τεχνολογίας NGS είναι άκρως σημαντική στην εφαρμογή της ιατρικής ακριβείας στην ογκολογία. Η γονιδιακή NGS ανάλυση ασθενών με καρκίνο του μαστού έχει οδηγήσει στην εύρεση και επιλογή στοχευμένων θεραπειών, αντί των συμβατικών μέχρι πρότινος χημειοθεραπειών - ιδιαίτερα σε μεταστατικούς καρκίνους – με αποτέλεσμα την επιμήκυνση του προσδόκιμου ζωής των ασθενών αυτών. Με τη συνεχή βελτίωση των NGS τεχνικών και των εργαλείων βιοπληροφορικής, είναι δυνατόν στο μέλλον να ενισχυθεί και να συμπληρωθεί ο κατάλογος των γονιδίων προδιάθεσης και των παραλλαγών που εμπλέκονται στον κληρονομικό καρκίνο του μαστού, γεγονός που θα βοηθήσει τόσο στην πρόληψη του συγκεκριμένου καρκίνου όσο και στη στοχευμένη εξατομικευμένη θεραπεία του.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abdulrashid, K., AlHussaini, N., Ahmed, W. and Thalib, L. (2019). Prevalence of BRCA mutations among hereditary breast and/or ovarian cancer patients in Arab countries: systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*, [online] 19(1). doi:10.1186/s12885-019-5463-1.
2. Akram, M., Iqbal, M., Daniyal, M. and Khan, A.U. (2017). Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biological Research*, 50(1). doi:10.1186/s40659-017-0140-9.
3. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: *The Molecular Genetics of Cancer*, vol. 23, 4th edn. New York and London: G.S. Taylor & Francis Group; 2002.
4. Apostolou, P. and Fostira, F. (2013). Hereditary Breast Cancer: The Era of New Susceptibility Genes. *BioMed Research International*, [online] 2013, pp.1–11. doi:10.1155/2013/747318.
5. Apostolou, P., Fostira, F., Kouroussis, C., Kalfakakou, D., Delimitsou, A., Agelaki, S., Androulakis, N., Christodoulou, C., Kalbakis, K., Kalykaki, A., Sanidas, E., Papadimitriou, C., Vamvakas, L., Georgoulas, V., Mavroudis, D., Yannoukakos, D., Konstantopoulou, I. and Saloustros, E. (2020). BRCA1 and BRCA2 germline testing in Cretan isolates reveals novel and strong founder effects. *International Journal of Cancer*, 147(5), pp.1334–1342. doi:10.1002/ijc.32903.
6. Barnes (1999). Expression and function of BRCA1 and BRCA2 in familial and sporadic breast cancer. *Histopathology*, 34(2), pp.170–174. doi:10.1046/j.1365-2559.1999.00619.x.
7. Baretti, M., & Le, D. T. (2018). DNA mismatch repair in cancer. *Pharmacology and Therapeutics*, 189, 45–62. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.04.004>
8. Bell, D.W., Kim, S.H., Godwin, A.K., Schiripo, T.A., Harris, P.L., Haserlat, S.M., Wahrer, D.C.R., Haiman, C.A., Daly, M.B., Niendorf, K.B., Smith, M.R., Sgroi, D.C., Garber, J.E., Olopade, O.I., Marchand, L.L., Henderson, B.E., Altshuler, D., Haber, D.A. and Freedman, M.L. (2007). Genetic and functional analysis of CHEK2 (CHK2) variants in multiethnic cohorts. *International Journal of Cancer*, 121(12), pp.2661–2667. doi:10.1002/ijc.23026.
9. BenAyed-Guerfali, D., Kifagi, C., BenKridis-Rejeb, W., Ammous-Boukhris, N., Ayedi, W., Khanfir, A., Daoud, J. and Mokdad-Gargouri, R. (2022). The Identification by Exome Sequencing of Candidate Genes in BRCA-Negative Tunisian Patients at a High Risk of Hereditary Breast/Ovarian Cancer. *Genes*, 13(8), p.1296. doi:10.3390/genes13081296.
10. Bernstein, J. L., & Concannon, P. (2017). ATM, radiation, and the risk of second primary breast cancer. *International Journal of Radiation Biology*, 93(10), 1121–1127. <https://doi.org/10.1080/09553002.2017.1344363>
11. Bruzas, S., Kuemmel, S., Harrach, H., Breit, E., Ataseven, B., Traut, A., Rüländ, A., Kostara, A., Chiari, O., Dittmer-Grabowski, C. and Reinisch, M. (2021). Next-Generation Sequencing-Directed Therapy in Patients with Metastatic Breast Cancer in Routine Clinical Practice. *Cancers*, 13(18), p.4564. doi:10.3390/cancers13184564.
12. Bunnell, A. E., Garby, C. A., Pearson, E. J., Walker, S. A., Panos, L. E., & Blum, J. L. (2017). The Clinical Utility of Next Generation Sequencing Results in a

Community-Based Hereditary Cancer Risk Program. *Journal of Genetic Counseling*, 26(1), 105–112. <https://doi.org/10.1007/s10897-016-9985-2>

13. Cancer.org. (2019). [online] Available at: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/breast-cancer-grades.html>.
14. Castillo-Guardiola, V., Rosado-Jiménez, L., Sarabia-Meseguer, M.D., Marín-Vera, M., Macías-Cerrolaza, J.A., García-Hernández, R., Zafra-Poves, M., Sánchez-Henarejos, P., Moreno-Locubiche, M.Á., Cuevas-Tortosa, E., Arnaldos-Carrillo, M., Ayala de la Peña, F., Alonso-Romero, J.L., Noguera-Velasco, J.A. and Ruiz-Espejo, F. (2022). Next step in molecular genetics of hereditary breast/ovarian cancer: Multigene panel testing in clinically actionable genes and prioritization algorithms in the study of variants of uncertain significance. *European Journal of Medical Genetics*, 65(4), p.104468. doi:10.1016/j.ejmg.2022.104468.
15. Chan, W., Lee, M., Yeo, Z.X., Ying, D., Grimaldi, K.A., Pickering, C., Yang, M.M.S., Sundaram, S.K. and Tzang, L.C.H. (2020). Development and validation of next generation sequencing based 35-gene hereditary cancer panel. *Hereditary Cancer in Clinical Practice*, 18(1). doi:10.1186/s13053-020-00141-2.
16. Chen, M. and Zhao, H. (2019). Next-generation sequencing in liquid biopsy: cancer screening and early detection. *Human Genomics*, 13(1). doi:10.1186/s40246-019-0220-8
17. Chen, Z., Guo, X., Long, J., Ping, J., Li, B., Fadden, M.K., Ahearn, T.U., Stram, D.O., Shu, X.-O., Jia, G., Figueroa, J., Adjei, R., Afriyie, L., Adjei, A., Dedey, F., Vanderpuye, V., Okyne, V., Ohene Oti, N., Tay, E. and Adu-Aryee (2021). Discovery of structural deletions in breast cancer predisposition genes using whole genome sequencing data from > 2000 women of African-ancestry. *Human Genetics*, 140(10), pp.1449–1457. doi:10.1007/s00439-021-02342-8.
18. Chial, H. (2008) Tumor suppressor (TS) genes and the two-hit hypothesis. *Nature Education* 1(1):177
19. Choi, M., Kipps, T. and Kurzrock, R. (2016). ATM Mutations in Cancer: Therapeutic Implications. *Molecular Cancer Therapeutics*, [online] 15(8), pp.1781–1791. doi:10.1158/1535-7163.mct-15-0945.
20. Cirulli, E.T. and Goldstein, D.B. (2010). Uncovering the roles of rare variants in common disease through whole-genome sequencing. *Nature Reviews Genetics*, 11(6), pp.415–425. doi:10.1038/nrg2779.
21. Consensus Guideline on Genetic Testing for Hereditary Breast Cancer. (2019). [online] Available at: <https://www.breastsurgeons.org/docs/statements/Consensus-Guideline-on-Genetic-Testing-for-Hereditary-Breast-Cancer.pdf>
22. Corso, G., Figueiredo, J., De Angelis, S.P., Corso, F., Girardi, A., Pereira, J., Seruca, R., Bonanni, B., Carneiro, P., Pravettoni, G., Guerini Rocco, E., Veronesi, P., Montagna, G., Sacchini, V. and Gandini, S. (2020). E-cadherin deregulation in breast cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, [online] 24(11), pp.5930–5936. doi:10.1111/jcmm.15140.
23. Cortesi, L., Rugo, H.S. and Jackisch, C. (2021). An Overview of PARP Inhibitors for the Treatment of Breast Cancer. *Targeted Oncology*, [online] 16(3), pp.255–282. doi:10.1007/s11523-021-00796-4.
24. Daniell, J., Plazzer, J.-P., Perera, A. and Macrae, F. (2017). An exploration of genotype-phenotype link between Peutz-Jeghers syndrome and STK11: a review.

- Familial Cancer, 17(3), pp.421–427. doi:10.1007/s10689-017-0037-3.
25. Davies, H., Morganella, S., Purdie, C.A., Jang, S.J., Borgen, E., Russnes, H., Glodzik, D., Zou, X., Viari, A., Richardson, A.L., Børresen-Dale, A.-L., Thompson, A., Eyfjord, J.E., Kong, G., Stratton, M.R. and Nik-Zainal, S. (2017). Whole-Genome Sequencing Reveals Breast Cancers with Mismatch Repair Deficiency. *Cancer Research*, 77(18), pp.4755–4762. doi:10.1158/0008-5472.can-17-1083.
 26. Ece Solmaz, A., Yeniay, L., Gökmen, E., Zekioglu, O., Haydaroglu, A., Bilgen, I., ... Onay, H. (2021). Clinical Contribution of Next-Generation Sequencing Multigene Panel Testing for BRCA Negative High-Risk Patients With Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer*. doi:10.1016/j.clbc.2021.04.002
 27. Ehemann, C.R., Shaw, K.M., Ryerson, A.B., Miller, J.W., Ajani, U.A. and White, M.C. (2009). The Changing Incidence of In situ and Invasive Ductal and Lobular Breast Carcinomas: United States, 1999-2004. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 18(6), pp.1763–1769. doi:10.1158/1055-9965.epi-08-1082.
 28. Ekholm-Reed, Susanna. (2004). THE ROLE OF CYCLIN E IN CELL CYCLE REGULATION AND GENOMIC INSTABILITY.
 29. ENIGMA. <https://enigmaconsortium.org/library/general-documents/enigma-classification-criteria/>
 30. Farid Moinfar (2007). *Essentials of diagnostic breast pathology : a practical approach*. Berlin ; New York: Springer.
 31. Felicio, P.S., Grasel, R.S., Campacci, N., Paula, A.E., Galvão, H.C.R., Torrezan, G.T., Sabato, C.S., Fernandes, G.C., Souza, C.P., Michelli, R.D., Andrade, C.E., Barros, B.D.D.F., Matsushita, M.M., Revil, T., Ragoussis, J., Couch, F.J., Hart, S.N., Reis, R.M., Melendez, M.E. and Tonin, P.N. (2020). Whole-exome sequencing of non-BRCA1/BRCA2 mutation carrier cases at high-risk for hereditary breast/ovarian cancer. *Human Mutation*, 42(3), pp.290–299.
 32. Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., Ji, X., Liu, W., Huang, B., Luo, W., Liu, B., Lei, Y., Du, S., Vuppalapati, A., Luu, H.H., Haydon, R.C., He, T.-C. and Ren, G. (2018). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & Diseases*, 5(2), pp.77–106.
 33. Ferri, F.F. (2022). *Ferri's Clinical Advisor 2022*. S.L.: Elsevier (p.752-755)
 34. Fragomeni, S.M., Sciallis, A. and Jeruss, J.S. (2018). Molecular Subtypes and Local-Regional Control of Breast Cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 27(1), pp.95–120. doi:10.1016/j.soc.2017.08.005.
 35. Garraway, Levi A. and Lander, Eric S. (2013). Lessons from the Cancer Genome. *Cell*, [online] 153(1), pp.17–37. doi:10.1016/j.cell.2013.03.002.
 36. Girard, E., Eon-Marchais, S., Olasso, R., Renault, A., Damiola, F., Dondon, M., Barjhoux, L., Goidin, D., Meyer, V., Le Gal, D., Beauvallet, J., Mebirouk, N., Lonjou, C., Coignard, J., Marcou, M., Cavaciuti, E., Baulard, C., Bihoreau, M., Cohen-Haguenaer, O. and Leroux, D. (2018). Familial breast cancer and DNA repair genes: Insights into known and novel susceptibility genes from the GENESIS study, and implications for multigene panel testing. *International Journal of Cancer*, 144(8), pp.1962–1974. doi:10.1002/ijc.31921.
 37. Glentis, S., Dimopoulos, A.C., Rouskas, K., Ntritsos, G., Evangelou, E., Narod, S.A., Mes-Masson, A.-M., Foulkes, W.D., Rivera, B., Tonin, P.N., Ragoussis, J. and

- Dimas,A.S. (2019). Exome Sequencing in BRCA1- and BRCA2-Negative Greek Families Identifies MDM1 and NBEAL1 as Candidate Risk Genes for Hereditary Breast Cancer. *Frontiers in Genetics*, 10. doi:10.3389/fgene.2019.01005.
38. Godet, I. and M. Gilkes, D. (2017). BRCA1 and BRCA2 mutations and treatment strategies for breast cancer. *Integrative Cancer Science and Therapeutics*, [online] 4(1). doi:10.15761/icst.1000228.
 39. Gorodetska, I., Kozeretska, I. and Dubrovska, A. (2019). BRCA Genes: The Role in Genome Stability, Cancer Stemness and Therapy Resistance. *Journal of Cancer*, 10(9), pp.2109–2127. doi:10.7150/jca.30410.
 40. Guan, Y.-F., Li, G.-R., Wang, R.-J., Yi, Y.-T., Yang, L., Jiang, D., Zhang, X.-P. and Peng, Y.(2012). Application of next-generation sequencing in clinical oncology to advance personalized treatment of cancer. *Chinese Journal of Cancer*, 31(10), pp.463–470. doi:10.5732/cjc.012.10216.
 41. Guerrero-Zotano, A.L., Stricker, T.P., Formisano, L., Hutchinson, K.E., Stover, D.G., Lee, K.-M., Schwarz, L.J., Giltane, J.M., Estrada, M.V., Jansen, V.M., Servetto, A., Gavilá, J., Perez-Fidalgo, J.A., Lluch, A., Llombart-Cussac, A., Bayar, M.A., Michiels, S., André, F., Arnedos, M. and Guillem, V. (2019). Correction: ER+ Breast Cancers Resistant to Prolonged Neoadjuvant Letrozole Exhibit an E2F4 Transcriptional Program Sensitive to CDK4/6 Inhibitors. *Clinical Cancer Research*, 25(4), pp.1431– 1431. doi:10.1158/1078-0432.ccr-18-4270.
 42. Gupta, A., Zhang, H. and Huang, J. (2019). The Recent Research and Care of Benign Breast Fibroadenoma: Review Article. *Yangtze Medicine*, 03(02), pp.135–141. doi:10.4236/ym.2019.32013.
 43. Hamdi, Y., Boujemaa, M., Ben Rekaya, M., Ben Hamda, C., Mighri, N., El Benna, H., Mejri, N., Labidi, S., Daoud, N., Naouali, C., Messaoud, O., Chargui, M., Ghedira, K., Boubaker, M.S., Mrad, R., Boussen, H. and Abdelhak, S. (2018). Family specific genetic predisposition to breast cancer: results from Tunisian whole exome sequenced breast cancer cases. *Journal of Translational Medicine*, 16(1). doi:10.1186/s12967-018-1504-9.
 44. Harbeck, N. and Gnant, M. (2017). Breast cancer. *The Lancet*, [online] 389(10074), pp.1134–1150. doi:10.1016/s0140-6736(16)31891-8.
 45. Hawsawi, Y.M., Al-Numair, N.S., Sobahy, T.M., Al-Ajmi, A.M., Al-Harbi, R.M., Baghdadi, M.A., Oyouni, A.A. and Alamer, O.M. (2019). The role of BRCA1/2 in hereditary and familial breast and ovarian cancers. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 7(9). doi:10.1002/mgg3.879.
 46. Helgadottir, H.T., Thutkawkorapin, J., Lagerstedt-Robinson, K. and Lindblom, A. (2021). Sequencing for germline mutations in Swedish breast cancer families reveals novel breast cancer risk genes. *Scientific Reports*, [online] 11(1), p.14737. doi:10.1038/s41598-021-94316-z.
 47. Hempel, D., Ebner, F., Garg, A., Trepotec, Z., Both, A., Stein, W., Gaumann, A., Güttler, L., Janni, W., DeGregorio, A., Hempel, L. and Milani, V. (2020). Real world data analysis of next generation sequencing and protein expression in metastatic breast cancer patients. *Scientific Reports*, 10(1). doi:10.1038/s41598-020-67393-9.
 48. Hernan, I.; Borràs, E.; de Sousa Dias, M.; Gamundi, M.J.; Mañé, B.; Llord, G.; Agúndez, J.A.; Blanca, M.; Carballo, M. Detection of Genomic Variations in BRCA1 and BRCA2 Genes by Long-Range PCR and Next-Generation Sequencing. (2012).

- The Journal of Molecular Diagnostics, [online] 14(3), pp.286–293. doi:10.1016/j.jmoldx.2012.01.013.
49. Hino, O., & Kobayashi, T. (2017). Mourning Dr. Alfred G. Knudson: the two-hit hypothesis, tumor suppressor genes, and the tuberous sclerosis complex. *Cancer Sci*, 108(1), 5-11. doi:10.1111/cas.13116
50. Hoda, S.A. and Hoda, R.S. (2020). Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. *American Journal of Clinical Pathology*, 154(6), pp.869–869. doi:10.1093/ajcp/aqaa163.
51. Hoda, S.A. and Kaplan, R.E. (2013). World Health Organization (WHO) Classification of Breast Tumours, 4th ed. *The American Journal of Surgical Pathology*, 37(2), pp.309–310. doi:10.1097/pas.0b013e318273b19b.
52. Horn, S., Figl, A., Rachakonda, P.S., Fischer, C., Sucker, A., Gast, A., Kadel, S., Moll, I., Nagore, E., Hemminki, K., Schadendorf, D. and Kumar, R. (2013). TERT Promoter Mutations in Familial and Sporadic Melanoma. *Science*, 339(6122), pp.959–961. doi:10.1126/science.1230062.
53. Hu, C., Hart, S.N., Gnanaolivu, R., Huang, H., Lee, K.Y., Na, J., Gao, C., Lilyquist, J., Yadav, S., Boddicker, N.J., Samara, R., Klebba, J., Ambrosone, C.B., Anton-Culver, H., Auer, P., Bandera, E.V., Bernstein, L., Bertrand, K.A., Burnside, E.S. and Carter, B.D. (2021). A Population-Based Study of Genes Previously Implicated in Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 384(5), pp.440–451. doi:10.1056/nejmoa2005936.
54. Huszno, J., Pigłowski, W., Mazur, M., Pamuła-Piłat, J., Zajkiewicz, A., Kierzkowska, A. and Wojciechowska, M. (2021). BRCA1/BRCA2 variants of uncertain significance in clinical practice: A case report. *Molecular and Clinical Oncology*, 15(5). doi:10.3892/mco.2021.2385.
55. Ilić, I. (2021). Multifocality, Multicentricity, and Bilaterality of Breast Cancer. *Breast Cancer - Evolving Challenges and Next Frontiers*. doi:10.5772/intechopen.96489.
56. Imperial, R., Nazer, M., Ahmed, Z., Kam, A.E., Pluard, T.J., Bahaj, W., Levy, M., Kuzel, T.M., Hayden, D.M., Pappas, S.G., Subramanian, J. and Masood, A. (2019). Matched Whole-Genome Sequencing (WGS) and Whole-Exome Sequencing (WES) of Tumor Tissue with Circulating Tumor DNA (ctDNA) Analysis: Complementary Modalities in Clinical Practice. *Cancers*, 11(9), p.1399. doi:10.3390/cancers11091399.
57. International Human Genome Sequencing Consortium (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, 431(7011), pp.931–945. doi:10.1038/nature03001.
58. Jerzak, K.J., Mancuso, T. and Eisen, A. (2018). Ataxia–telangiectasia gene (ATM) mutation heterozygosity in breast cancer: a narrative review. *Current Oncology*, 25(2), p.176. doi:10.3747/co.25.3707.
59. Jimenez-Sainz, J. and Jensen, R.B. (2021). Imprecise Medicine: BRCA2 Variants of Uncertain Significance (VUS), the Challenges and Benefits to Integrate a Functional Assay Workflow with Clinical Decision Rules. *Genes*, [online] 12(5), p.780. doi:10.3390/genes12050780.
60. Jouali, F., Laarabi, F.-Z., Marchoudi, N., Ratbi, I., Elalaoui, S.C., Rhaissi, H., Fekkak, J. and Sefiani, A. (2016). First application of next-generation sequencing in

- Moroccan breast/ovarian cancer families and report of a novel frameshift mutation of the BRCA1 gene. *Oncology Letters*, [online] 12(2), pp.1192–1196. doi:10.3892/ol.2016.4739.
61. Kandoth, C., McLellan, M.D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., Xie, M., Zhang, Q., McMichael, J.F., Wyczalkowski, M.A., Leiserson, M.D.M., Miller, C.A., Welch, J.S., Walter, M.J., Wendl, M.C., Ley, T.J., Wilson, R.K., Raphael, B.J. and Ding, L. (2013). Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*, [online] 502(7471), pp.333–339. doi:10.1038/nature12634.
 62. Kanzi, A.M., San, J.E., Chimukangara, B., Wilkinson, E., Fish, M., Ramsuran, V. and de Oliveira, T. (2020). Next Generation Sequencing and Bioinformatics Analysis of Family Genetic Inheritance. *Frontiers in Genetics*, 11. doi:10.3389/fgene.2020.544162.
 63. Khan, Y.S. and Sajjad, H. (2020). *Anatomy, Thorax, Mammary Gland*. [online] PubMed. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547666/>.
 64. Kiezun, A., Garimella, K., Do, R., Stitzel, N.O., Neale, B.M., McLaren, P.J., Gupta, N., Sklar, P., Sullivan, P.F., Moran, J.L., Hultman, C.M., Lichtenstein, P., Magnusson, P., Lehner, T., Shugart, Y.Y., Price, A.L., de Bakker, P.I.W., Purcell, S.M. and Sunyaev, S.R. (2012). Exome sequencing and the genetic basis of complex traits. *Nature Genetics*, 44(6), pp.623–630. doi:10.1038/ng.2303.
 65. Kuligina, E.S., Sokolenko, A.P., Bizin, I.V., Romanko, A.A., Zagorodnev, K.A., Anisimova, M.O., Krylova, D.D., Anisimova, E.I., Mantseva, M.A., Varma, A.K., Hasan, S.K., Ni, V.I., Koloskov, A.V., Suspitsin, E.N., Venina, A.R., Aleksakhina, S.N., Sokolova, T.N., Milanović, A.M., Schürmann, P. and Prokofyeva, D.S. (2019). Exome sequencing study of Russian breast cancer patients suggests a predisposing role for USP39. *Breast Cancer Research and Treatment*, 179(3), pp.731–742. doi:10.1007/s10549-019-05492-6.
 66. Kumar, V., Abbas K., A., Fausto, N., & Mitchell N., R. (2011). *ROBBINS Βασική Παθολογική Ανατομία 8η ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΠΑΡΗΣΙΑΝΟΥ Α.Ε.*
 67. Kumar-Sinha, C. and Chinnaiyan, A.M. (2018). Precision oncology in the age of integrative genomics. *Nature Biotechnology*, 36(1), pp.46–60. doi:10.1038/nbt.4017.
 68. Kwong, A., Chen, J. and Shin, V.Y. (2016). A new paradigm of genetic testing for hereditary breast/ovarian cancers. *Hong Kong Medical Journal*. doi:10.12809/hkmj154634.
 69. Kyrochristos, I.D., Ziogas, D.E. and Roukos, D.H. (2018). Dynamic genome and transcriptional network-based biomarkers and drugs: precision in breast cancer therapy. *Medicinal Research Reviews*, 39(3), pp.1205–1227. doi:10.1002/med.21549.
 70. Lacroix, M. and Leclercq, G. (2005). The ‘portrait’ of hereditary breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 89(3), pp.297–304. doi:10.1007/s10549-004-2172-4.
 71. Lee, C. and Reyna, C. (2014). Breast cancer in young women: special considerations in multidisciplinary care. *Journal of Multidisciplinary Healthcare*, p.419. doi:10.2147/jmdh.s49994.
 72. Liu, Y., Helgadottir, H.T., Kharaziha, P., Choi, J., López-Giráldez, F., Mane, S.M., Höiom, V., Juhlin, C.C., Larsson, C. and Bajalica-Lagercrantz, S. (2022). Whole-

- Exome Sequencing of Germline Variants in Non-BRCA Families with Hereditary Breast Cancer. *Biomedicines*, [online] 10(5), p.1004. doi:10.3390/biomedicines10051004.
73. Lu, H.-M., Li, S., Black, M.H., Lee, S., Hoiness, R., Wu, S., Mu, W., Huether, R., Chen, J., Sridhar, S., Tian, Y., McFarland, R., Dolinsky, J., Davis, B.T., Mexal, S., Dunlop, C. and Elliott, A. (2019). Association of Breast and Ovarian Cancers With Predisposition Genes Identified by Large-Scale Sequencing. *JAMA Oncology*, [online] 5(1), pp.51– 57. doi:10.1001/jamaoncol.2018.2956.
74. Luo, R., Chong, W., Wei, Q., Zhang, Z., Wang, C., Ye, Z., Abu-Khalaf, M.M., Silver, D.P., Stapp, R.T., Jiang, W., Myers, R.E., Li, B., Cristofanilli, M. and Yang, H. (2021). Whole-exome sequencing identifies somatic mutations and intratumor heterogeneity in inflammatory breast cancer. *npj Breast Cancer*, [online] 7(1), pp.1– 8. doi:10.1038/s41523-021-00278-w.
75. Määttä, K., Rantapero, T., Lindström, A., Nykter, M., Kankuri-Tammilehto, M., Laasanen, S.-L. and Schleutker, J. (2016). Whole-exome sequencing of Finnish hereditary breast cancer families. *European Journal of Human Genetics*, 25(1), pp.85–93. doi:10.1038/ejhg.2016.141.
76. Makki, J. (2015). Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. *Clinical Medicine Insights: Pathology*, [online] 8, p.CPath.S31563. doi:10.4137/cpath.s31563.
77. Manickam, K., Buchanan, A.H., Schwartz, M.L.B., Hallquist, M.L.G., Williams, J.L., Rahm, A.K., Rocha, H., Savatt, J.M., Evans, A.E., Butry, L.M., Lazzeri, A.L., Lindbuchler, D.M., Flansburg, C.N., Leeming, R., Vogel, V.G., Lebo, M.S., Mason-Suares, H.M., Hoskinson, D.C., Abul-Husn, N.S. and Dewey, F.E. (2018). Exome Sequencing-Based Screening for BRCA1/2 Expected Pathogenic Variants Among Adult Biobank Participants. *JAMA Network Open*, 1(5), p.e182140. doi:10.1001/jamanetworkopen.2018.2140.
78. Mateju, M., Stribrna, J., Zikan, M., Kleibl, Z., Janatova, M., Kormunda, S., Novotny, J., Soucek, P., Petruzalka, L. and Pohlreich, P. (2010). Population-based study of BRCA1/2 mutations: Family history based criteria identify minority of mutation carriers. *Neoplasma*, 57(3), pp.280–285. doi:10.4149/neo_2010_03_280.
79. Megid, T.B.C., Barros-Filho, M.C., Pisani, J.P. and Achatz, M.I. (2022). Double heterozygous pathogenic variants prevalence in a cohort of patients with hereditary breast cancer. *Frontiers in Oncology*, 12. doi:10.3389/fonc.2022.873395.
80. Mehrgou A, Akoucheqian M. (2016). The importance of BRCA1 and BRCA2 genes mutations in breast cancer development. *Med J Islam Repub Iran*. PMID: 27493913; PMCID: PMC4972064.
81. Moulis, S. and Sgroi, D.C. (2008). Re-evaluating early breast neoplasia. *Breast Cancer Research*, 10(1). doi:10.1186/bcr1853.
82. Mylavarapu, S., Das, A. and Roy, M. (2018). Role of BRCA Mutations in the Modulation of Response to Platinum Therapy. *Frontiers in Oncology*, [online] 8. doi:10.3389/fonc.2018.00016.
83. Nahed, A.S. and Shaimaa, M.Y. (2016). Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer molecular subtype. *Cancer Biology & Medicine*, 13(4), p.496. doi:10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0066.
84. Narod, S.A. and Lynch, H.T. (2007). CHEK2 Mutation and Hereditary Breast

- Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 25(1), pp.6–7. doi:10.1200/jco.2006.08.8229.
85. Nepomuceno, T.C., De Gregoriis, G., Bastos de Oliveira, F.M., Suarez-Kurtz, G., Monteiro, A.N. and Carvalho, M.A. (2017). The Role of PALB2 in the DNA Damage Response and Cancer Predisposition. *International Journal of Molecular Sciences*, [online] 18(9). doi:10.3390/ijms18091886.
 86. Nik-Zainal, S., Davies, H., Staaf, J., Ramakrishna, M., Glodzik, D., Zou, X., Martincorena, I., Alexandrov, L.B., Martin, S., Wedge, D.C., Van Loo, P., Ju, Y.S., Smid, M., Brinkman, A.B., Morganella, S., Aure, M.R., Lingjærde, O.C., Langerød, A., Ringnér, M. and Ahn, S.-M. (2016). Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature*, [online] 534(7605), pp.47–54. doi:10.1038/nature17676.
 87. Nones, K., Johnson, J., Newell, F., Patch, A.M., Thorne, H., Kazakoff, S.H., de Luca, X.M., Parsons, M.T., Ferguson, K., Reid, L.E., McCart Reed, A.E., Srihari, S., Lakis, V., Davidson, A.L., Mukhopadhyay, P., Holmes, O., Xu, Q., Wood, S., Leonard, C. and Beesley, J. (2019). Whole-genome sequencing reveals clinically relevant insights into the aetiology of familial breast cancers. *Annals of Oncology*, 30(7), pp.1071–1079. doi:10.1093/annonc/mdz132.
 88. Ozcelik, H., Shi, X., Chang, M.C., Tram, E., Vlasschaert, M., Di Nicola, N., Kiselova, A., Yee, D., Goldman, A., Dowar, M., Sukhu, B., Kandel, R. and Siminovitch, K. (2012). Long-Range PCR and Next-Generation Sequencing of BRCA1 and BRCA2 in Breast Cancer. *The Journal of Molecular Diagnostics*, [online] 14(5), pp.467–475. doi:10.1016/j.jmoldx.2012.03.006.
 89. Pandey, A. (2015). BRCA1 Gene's EXON 11 and Breast Carcinoma: A Mutational Hot Spot for Familial Patients and Prone to Metastases in Northern India. *Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 05(02). doi:10.4172/2161-0681.1000219.
 90. Pandya, S. and Moore, R., 2011. Breast Development and Anatomy. *Clinical Obstetrics & Gynecology*, 54(1), pp.91-95.
 91. Parenti, S., Rabacchi, C., Marino, M., Tenedini, E., Artuso, L., Castellano, S., Carretta, C., Mallia, S., Cortesi, L., Toss, A., Barbieri, E., Manfredini, R., Luppi, M., Trenti, T. and Tagliafico, E. (2021). Characterization of New ATM Deletion Associated with Hereditary Breast Cancer. *Genes*, 12(2), p.136.
 92. Park, H.S., Park, S.-J., Kim, J.Y., Kim, S., Ryu, J., Sohn, J., Park, S., Kim, G.M., Hwang, I.S., Choi, J.-R. and Kim, S.I. (2017). Next-generation sequencing of BRCA1/2 in breast cancer patients: potential effects on clinical decision-making using rapid, high-accuracy genetic results. *Annals of Surgical Treatment and Research*, [online] 92(5), pp.331–339. doi:10.4174/astr.2017.92.5.331
 93. Peker Eyüboğlu İ, Yenmiş G, Bingöl EN, Yüksel Ş, Tokat F, Özbek P, Güllü Amuran G, Yakıcıer C, Akkiprik M. (2020). Next-Generation Sequencing Identifies BRCA1 and/or BRCA2 Mutations in Women at High Hereditary Risk for Breast Cancer with Shorter Telomere Length. *OMICS*.
 94. Peleg Hasson, S., Menes, T. and Sonnenblick, A. (2020). Comparison of Patient Susceptibility Genes Across Breast Cancer: Implications for Prognosis and Therapeutic Outcomes. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*, Volume 13, pp.227–238. doi:10.2147/pgpm.s233485.
 95. Ponti, G., Castellsagué, E., Ruini, C., Percesepe, A., & Tomasi, A. (2015). Mismatch repair genes founder mutations and cancer susceptibility in Lynch syndrome. *Clinical Genetics*, 87(6), 507–516. <https://doi.org/10.1111/cge.12529>

96. Rakha, E., Toss, M. and Quinn, C. (2021). Specific cell differentiation in breast cancer: a basis for histological classification. *Journal of Clinical Pathology*, 75(2), pp.76–84. doi:10.1136/jclinpath-2021-207487.
97. Rizza, R., Hackmann, K., Paris, I., Minucci, A., De Leo, R., Schrock, E., ... Concolino, P. (2018). Novel BRCA1 Large Genomic Rearrangements in Italian Breast/Ovarian Cancer Patients. *Molecular Diagnosis & Therapy*. doi:10.1007/s40291-018-0376-2
98. Robinson, S. and Cohen, A.R. (2006). Cowden disease and Lhermitte–Duclos disease: an update. *Neurosurgical Focus*, 20(1), pp.1–6. doi:10.3171/foc.2006.20.1.7.
99. Rossing, M., Sørensen, C.S., Ejlersen, B. and Nielsen, F.C. (2019). Whole genome sequencing of breast cancer. *Apmis*, [online] 127(5), pp.303–315. doi:10.1111/apm.12920.
100. Rweyemamu, L.P., Gültaşlar, B.K., Akan, G., Dharsee, N., Namkinga, L.A., Lyantagaye, S.L., Yazıcı, H. and Atalar, F. (2022). Breast cancer in East Africa: Prevalence and spectrum of germline SNV /indel and CNVs in BRCA1 and BRCA2 genes among breast cancer patients in Tanzania. *Cancer Medicine*. doi:10.1002/cam4.5091.
101. Sajjadi, E., Venetis, K., Piciotti, R., Invernizzi, M., Guerini-Rocco, E., Haricharan, S. and Fusco, N. (2021). Mismatch repair-deficient hormone receptor-positive breast cancers: Biology and pathological characterization. *Cancer Cell International*, 21(1). doi:10.1186/s12935-021-01976-y
102. Santonocito, C., Scapaticci, M., Guarino, D., Bartolini, A., Minucci, A., Concolino, P., ... Capoluongo, E. (2017). Identification of twenty-nine novel germline unclassified variants of BRCA1 and BRCA2 genes in 1400 Italian individuals. *The Breast*, 36, 74–78. doi:10.1016/j.breast.2017.09.007
103. Shendure, J. A., Porreca, G. J., Church, G. M., Gardner, A. F., Hendrickson, C.L., Kieleczawa, J., & Slatko, B. E. (2011). Overview of DNA sequencing strategies. *Current Protocols in Molecular Biology*, 7-
104. Shiovitz, S. and Korde, L.A. (2015). Genetics of Breast cancer: a Topic in Evolution. *Annals of Oncology*, [online] 26(7). doi:10.1093/annonc/mdv022.
105. Shulman, L.P. (2008). Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Yearbook of Obstetrics, Gynecology and Women's Health*, 2008, pp.18–20. doi:10.1016/s1090-798x(08)79098-2.
106. Slatko, B. E., Gardner, A. F., & Ausubel, F. M. (2018). Overview of Next Generation Sequencing technologies (and bioinformatics) in cancer. *Molecular Biology*, 122(1), 1–15. <https://doi.org/10.1002/cpmb.59>. Overview
107. Śniadecki, M., Brzeziński, M., Darecka, K., Klasa-Mazurkiewicz, D., Poniewierza, P., Krzeszowiec, M., Kmiec, N. and Wydra, D. (2020). BARD1 and Breast Cancer: The Possibility of Creating Screening Tests and New Preventive and Therapeutic Pathways for Predisposed Women. *Genes*, 11(11), p.1251. doi:10.3390/genes11111251.
108. Sokolenko, Anna & Imyanitov, Evgeny. (2018). Molecular Diagnostics in Clinical Oncology. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 5. 76. 10.3389/fmolb.2018.00076.
109. Suh, K.J., Kim, S.H., Kim, Y.J., Shin, H., Kang, E., Kim, E.-K., Lee, S., Woo, J.W., Na, H.Y., Ahn, S., Jang, B.-S., Kim, I.A., Park, S.Y. and Kim, J.H. (2022). Clinical Application of Next-Generation Sequencing in Patients With Breast Cancer: Real-

110. Suszynska, M., Klonowska, K., Jasinska, A.J. and Kozlowski, P. (2019). Large-scale meta-analysis of mutations identified in panels of breast/ovarian cancer-related genes - Providing evidence of cancer predisposition genes. *Gynecologic Oncology*, [online] 153(2), pp.452–462. doi:10.1016/j.ygyno.2019.01.027.
111. Tavera-Tapia, A., Pérez-Cabornero, L., Macías, J.A., Ceballos, M.I., Roncador, G., de la Hoya, M., Barroso, A., Felipe-Ponce, V., Serrano-Blanch, R., Hinojo, C., Miramar-Gallart, M.D., Urioste, M., Caldés, T., Santillan-Garzón, S., Benitez, J. and Osorio, A. (2016). Almost 2% of Spanish breast cancer families are associated to germline pathogenic mutations in the ATM gene. *Breast Cancer Research and Treatment*, 161(3), pp.597–604. doi:10.1007/s10549-016-4058-7.
112. Tedaldi, G., Tebaldi, M., Zampiga, V., Danesi, R., Arcangeli, V., Ravegnani, M., Cangini, I., Pirini, F., Petracci, E., Rocca, A., Falcini, F., Amadori, D. and Calistri, D. (2017). Multiple-gene panel analysis in a case series of 255 women with hereditary breast and ovarian cancer. *Oncotarget*, [online] 8(29). doi:10.18632/oncotarget.16791.
113. Torrezan, G.T., de Almeida, F.G. dos S.R., Figueiredo, M.C.P., Barros, B.D. de F., de Paula, C.A.A., Valieris, R., de Souza, J.E.S., Ramalho, R.F., da Silva, F.C.C., Ferreira, E.N., de Nóbrega, A.F., Felicio, P.S., Achatz, M.I., de Souza, S.J., Palmero, E.I. and Carraro, D.M. (2018). Complex Landscape of Germline Variants in Brazilian Patients With Hereditary and Early Onset Breast Cancer. *Frontiers in Genetics*, [online] 9. doi:10.3389/fgene.2018.00161.
114. Tsaousis, G.N., Papadopoulou, E., Apessos, A., Agiannitopoulos, K., Pepe, G., Kampouri, S., Diamantopoulos, N., Floros, T., Iosifidou, R., Katopodi, O., Koumariou, A., Markopoulos, C., Papazisis, K., Venizelos, V., Xanthakis, I., Xepapadakis, G., Banu, E., Eniu, D.T., Negru, S. and Stanculeanu, D.L. (2019). Analysis of hereditary cancer syndromes by using a panel of genes: novel and multiple pathogenic mutations. *BMC Cancer*, 19(1). doi:10.1186/s12885-019-5756-4.
115. Tung, N., Lin, N.U., Kidd, J., Allen, B.A., Singh, N., Wenstrup, R.J., Hartman, A.-R., Winer, E.P. and Garber, J.E. (2016). Frequency of Germline Mutations in 25 Cancer Susceptibility Genes in a Sequential Series of Patients With Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 34(13), pp.1460–1468. doi:10.1200/jco.2015.65.0747.
116. Turner, N.C. and Reis-Filho, J.S. (2006). Basal-like breast cancer and the BRCA1 phenotype. *Oncogene*, 25(43), pp.5846–5853. doi:10.1038/sj.onc.1209876.
117. van Dijk, E.L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y. and Thermes, C. (2014). Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in Genetics*, [online] 30(9), pp.418–426. doi:10.1016/j.tig.2014.07.001.
118. Vaz, F., Hanenberg, H., Schuster, B., Barker, K., Wiek, C., Erven, V., Neveling, K., Endt, D., Kesterton, I., Autore, F., Fraternali, F., Freund, M., Hartmann, L., Grimwade, D., Roberts, R.G., Schaal, H., Mohammed, S., Rahman, N., Schindler, D. and Mathew, C.G. (2010). Mutation of the RAD51C gene in a Fanconi anemia-like disorder. *Nature Genetics*, 42(5), pp.406–409. doi:10.1038/ng.570.
119. Vogelstein, B., Lane, D. and Levine, A.J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature*, 408(6810), pp.307–310. doi:10.1038/35042675.
120. Walsh T, Lee MK, Casadei S, Thornton AM, Stray SM, Pennil C, Nord AS, Mandell JB, Swisher EM, King MC: Detection of inherited mutations for breast and ovarian cancer using genomic capture and massively parallel sequencing. *Proceedings*

of the National Academy of Sciences of the United States of America 2010, 107(28):12629-12633

121. Walsh, T., Casadei, S., Coats, K.H., Swisher, E., Stray, S.M., Higgins, J., Roach, K.C., Mandell, J., Lee, M.K., Ciernikova, S., Foretova, L., Soucek, P. and King, M.-C. (2006). Spectrum of Mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2, and TP53 in Families at High Risk of Breast Cancer. *JAMA*, 295(12), p.1379. doi:10.1001/jama.295.12.1379.
122. Wang, Z., Gerstein, M. and Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, 10(1), pp.57–63. doi:10.1038/nrg2484.
123. Weitzel, J.N., Neuhausen, S.L., Adamson, A., Tao, S., Ricker, C., Maoz, A., Rosenblatt, M., Nehoray, B., Sand, S., Steele, L., Unzeitig, G., Feldman, N., Blanco, A.M., Hu, D., Huntsman, S., Castillo, D., Haiman, C., Slavin, T. and Ziv, E. (2019). Pathogenic and likely pathogenic variants in PALB2, CHEK2, and other known breast cancer susceptibility genes among 1054 BRCA-negative Hispanics with breast cancer. *Cancer*, 125(16), pp.2829–2836. doi:10.1002/cncr.32083.
124. Wold, B. and Myers, R.M. (2007). Sequence census methods for functional genomics. *Nature Methods*, 5(1), pp.19–21. doi:10.1038/nmeth1157.
125. World Health Organization (2021). Breast cancer. [online] www.who.int. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>.
126. www.breastcancer.org. (n.d.). Molecular Subtypes of Breast Cancer. [online] Available at: <https://www.breastcancer.org/types/molecular-subtypes>.
127. www.cdc.gov. (2020). Hereditary Breast Cancer and BRCA Genes | Bring Your Brave | CDC. [online] Available at: https://www.cdc.gov/cancer/breast/young_women/bringyourbrave/hereditary_breast_cancer/index.htm.
128. Yoo, J., Lee, G.D., Kim, J.H., Lee, S.N., Chae, H., Han, E., Kim, Y. and Kim, M. (2020). Clinical Validity of Next-Generation Sequencing Multi-Gene Panel Testing for Detecting Pathogenic Variants in Patients With Hereditary Breast-Ovarian Cancer Syndrome. *Annals of Laboratory Medicine*, [online] 40(2), pp.148–154. doi:10.3343/alm.2020.40.2.148.
129. Zelli, V., Compagnoni, C., Cannita, K., Capelli, R., Capalbo, C., Di Vito Nolfi, M., Alesse, E., Zazzeroni, F. and Tessitore, A. (2020). Applications of Next Generation Sequencing to the Analysis of Familial Breast/Ovarian Cancer. *High-Throughput*, 9(1), p.1. doi:10.3390/ht9010001.
130. ZHANG, H.-Y., LIANG, F., JIA, Z.-L., SONG, S.-T. and JIANG, Z.-F. (2013). PTEN mutation, methylation and expression in breast cancer patients. *Oncology Letters*, [online] 6(1), pp.161–168. doi:10.3892/ol.2013.1331.
131. Zhao, E.Y., Shen, Y., Pleasance, E., Kasaian, K., Leelakumari, S., Jones, M., Bose, P., Ch'ng, C., Reisle, C., Eirew, P., Corbett, R., Mungall, K.L., Thiessen, N., Ma, Y., Schein, J.E., Mungall, A.J., Zhao, Y., Moore, R.A., Den Brok, W. and Wilson, S. (2017). Homologous Recombination Deficiency and Platinum-Based Therapy Outcomes in Advanced Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 23(24), pp.7521–7530. doi:10.1158/1078-0432.ccr-17-1941.
132. Δημητρακάκης Κ, Κεραμόπουλος Α, από το βιβλίο « Καρκίνος Μαστού και μοριακή Βιολογία», (2000) σελ.5.