

***RAD50:N MERKITYS PERINNÖLLISESSÄ  
RINTASYÖPÄALTTIUDESSA***

**Aune Aho**

**Syventävien opintojen kirjallinen työ**

**Tampereen yliopisto**

**Lääketieteen yksikkö**

**Syöpägenetiikan tutkimusryhmä**

**Helmikuu 2014**

---

Tampereen yliopisto

Lääketieteen yksikkö

Syöpägenetiikan tutkimusryhmä

## AHO AUNE: *RAD50*:N MERKITYS PERINNÖLLISESSÄ RINTASYÖPÄALTTIUDESSA

Kirjallinen työ, 54 s.

Ohjaajat: LT ja perinnöllisyyslääketieteen el, ihotautien ja allergologian evl Satu-Leena Laasanen, FT ja genetiikan professori Johanna Schleutker

Marraskuu 2013

Avainsanat: karsinogeneesi, geeni, mutaatio, MRN-kompleksi, *BRCA1/2*

---

Rintasyöpä on suomalaisten naisten yleisin syöpä. Noin 75 % syöivistä on satunnaisesti ilmaantuvia eli ei-perinnöllisiä ja noin 25 % perinnöllisiä. Vain osa perinnölliseen rintasyöpäalttiuteen liittyvistä geeneistä tunnetaan.

*BRCA1/2* -mutaatiot selittävät vain noin 20 % korkeasta perinnöllisestä rintasyöpäriskistä suomalaisessa väestössä. Lisäksi tunnetaan useita harvinaisia geenejä, jotka vaikuttavat yhdessä *BRCA1*:n ja *BRCA2*:n kanssa, mutta eivät kuitenkaan riittävästi selitä taustaltaan epäselviä rintasyöpätapauksia. Nykykäsityksen mukaan perinnöllisen rintasyövän taustalta löytyy korkean ja keskinkertaisen rintasyöpäriskin geenien lisäksi runsas joukko matalan riskin geenejä, joiden vaikutus keskenään sekä interaktiot korkeamman riskin geenien kanssa lisäävät rintasyöpäalttiutta.

Työssä tutkittiin *RAD50*- mutaatioiden merkitystä suomalaisväestön korkeassa perinnöllisessä rintasyöpäalttiudessa. Korkean rintasyöpäesiintyvyyden suvuista kerätyistä potilasnäytteistä etsittiin ituradassa olevia *RAD50*-geenin muutoksia sekvensoimalla sen 25 eksonia ja eksoni-introni -raja-alueet.

*RAD50*:stä löydettiin seitsemän mutaatiota, joista kolme oli aiemmin raportoimattomia. Vain yksi mutaatioista, 1544A>G, oli aminohappoa vaihtava. Tämä löytyi yhdeltä potilaalta ja neljältä kontrollipotilaalta eikä sen arveltu lisäävän rintasyöpäriskiä. *RAD50*-muutosten tarkemman merkityksen arvioimiseksi vaaditaan lisää tutkimuksia eikä selvästi perinnöllistä rintasyöpäalttiutta lisääviä mutaatioita löydetty.

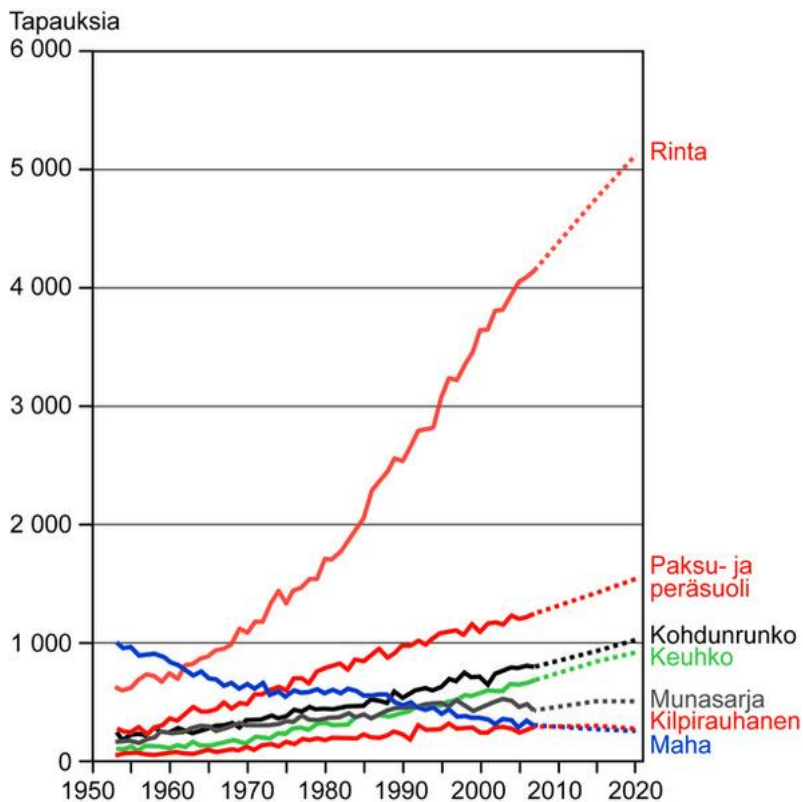
# SISÄLLYS

1 JOHDANTO	1
1.1 Miten syöpä kehittyy	2
1.1.1 Karsinogeneesi	2
1.1.2 Syövän kehittymiseen osallistuvat geenit	4
1.1.3 Onkogeenit	7
1.1.4 Kasvunrajoitegeenit	8
1.1.5 Apoptoosin välttäminen	9
1.1.6 Rajaton solujen jakautuminen	9
1.1.7 Angiogeneesi	10
1.1.8 Invaasio ja leviäminen muualle elimistöön	10
1.2 Rintasyöpien periytyvyys	12
1.3 Miksi perinnöllistä rintasyöpää tutkitaan?	17
1.4 <i>RAD50</i> :n rooli syöpäalitiuden synnyssä	18
1.4.1 DSB ja sen korjausmekanismit	18
1.4.2 MRN-kompleksi	20
1.4.3 MRN-kompleksin toiminta DNA:n kaksoisjuosteaurion korjaamisessa	23
1.5 <i>RAD50</i> -muutokset ja syöpäalitiuus - aikaisemmat tutkimukset	24
1.5.1 <i>RAD50</i> -muutosten vaikutus syöpäalitiuteen	24
1.5.2 <i>RAD50</i> ja rintasyöpä	26
1.6 Tutkimuksen tarkoitus	33

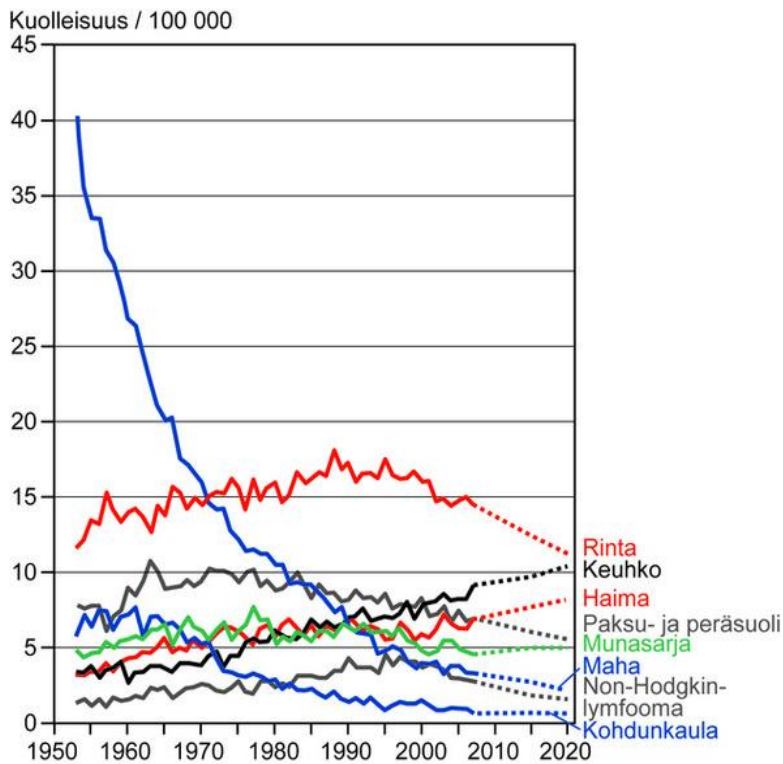
2 AINEISTO JA MENETELMÄT	34
2.1 Aineisto	34
2.2 Menetelmät	36
2.2.1 Geenin monistus PCR-reaktiolla	36
2.2.2 PCR-tuotteiden puhdistus EXOSAP-menetelmällä	39
2.2.3 Sekvensointi-PCR	40
2.2.4 In silico – analyysi	42
2.2.5 MiRNA-tietokanta	43
3 TULOKSET	43
4 POHDINTA	45
5 LÄHTEET	48

# 1 JOHDANTO

Rintasyöpä on suomalaisten naisten yleisin syöpä. Vuonna 2011 Suomessa todettiin 4873 uutta rintasyöpää, mikä vastaa 32,6 %:a kaikista kyseisenä vuonna diagnosoiduista syövistä. Rintasyövän ilmaantuvuus oli vuonna 2011 96,7/100 000. Ilmaantuvuus on kasvanut 1,3 % viimeisen 10 vuoden aikana ja sen on ennustettu edelleen nousevan (kuva 1). Rintasyöpäkuolleisuus kuitenkin pienenee jatkuvasti. Vuonna 2010 rintasyöpään kuoli 887 naista (kuva 2). (Suomen syöpärekisteri 2013)



Kuva 1. Suomalaisten naisten uudet syöpätapaukset Suomessa vuosina 1950–2011 (ikävakioitu ilmaantuvuus ja ennustettu trendi) (Suomen syöpärekisteri 2013)



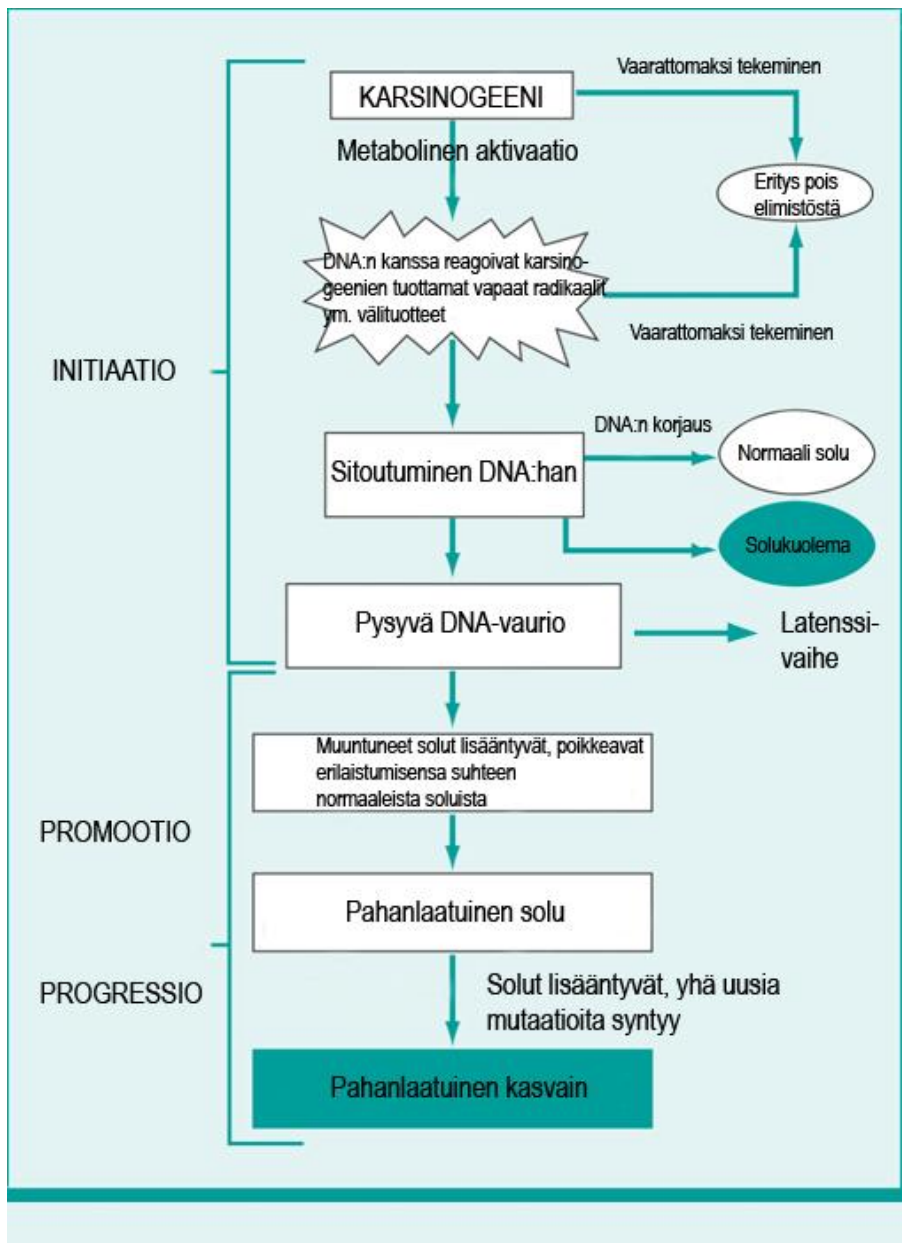
Kuva 2. Suomalaisen naisten ikävakiointu kuolleisuus yleisimpiin syöpiin vuosina 1950–2011 sekä ennustettu trendi (Suomen syöpärekisteri 2013)

## 1.1 Miten syöpä kehittyi?

### 1.1.1 Karsinogeneesi

Syövällä tarkoitetaan pahanlaatuista kasvainta. Syöpäsolut ovat monoklonaalisia eli peräisin yhdestä muuntuneesta solusta. Syövän kehittyminen on hidas ja monivaiheinen prosessi ja vaatii lukuisien solujen kasvua säätelevien geenien mutaatioita. (Martin de Civetta ja Civetta 2011)

Initiaatio- eli aloitusvaiheessa karsinogeeni aiheuttaa soluun mutaation. Jos elimistö ei kykene korjaamaan vauriota, se altistaa solun uusille mutaatioille. Suorat karsinogeenit, kuten alkyloivat aineet (alkyyli-ryhmä kiinnittyy DNA:han ja solun jakautuminen estyy), altistavat syövälle. Epäsuorat karsinogeenit (aromaattiset hiilivedyt, atsovärit, eräät kasvi- ja eläinkunnan tuotteet, hyönteismyrkyt ja sienilääkkeet) muuttuvat vaarallisiksi elimistön aineenvaihdunnan tuloksena. Soluvauriot ovat pysyviä ja siirtyvät solun jakautuessa tytärsoluihin. UV-säteily, ionisoiva säteily sekä jotkin virukset ja bakteerit voivat myös altistaa syövän kehittymiselle. Aloitusvaihetta saattaa seurata pitkä latenssi- eli lepovaihe, ennen kuin varsinainen syöpäkasvain kehittyy. Pahanlaatuisen kasvaimen syntyyn tarvitaan myös promoottoreiksi eli edistäjiksi kutsuttuja yhdisteitä (erilaiset esterit, hormonit, fenolit ja lääkkeet). Promoottorit kiihdyttävät solujen jakautumista, jolloin haitallinen mutaatio yleistyy. Muuntuneet solut lisääntyvät ja niiden perimässä tapahtuu yhä uusia spontaaneja mutaatioita. Promootiovaihetta täytyy aina edeltää initiaatio, mutta promootio ei aina aiheuta syöpää. Promootiovaiheen loppua kutsutaan progressio- eli etenemisvaiheeksi. Mutaatiot lisääntyvät ja solut muuttuvat yhä pahanlaatuisemmiksi. Monet syöpäsolut tuottavat telomeraasia, joka estää kromosomien päissä olevien DNA-jaksojen eli telomeerien lyhenemisen. Normaaleissa soluissa telomeerit lyhenevät jokaisen solunjakautumisen jälkeen mikä rajoittaa jakautumista. Kliinisesti voidaan lopulta havaita paikallisen syövän (carcinoma in situ) muuttuvan invasiiviseksi eli ympäröiviin kudoksiin tunkeutuvaksi karsinoomaksi, joka voi pahimmassa tapauksessa lähettää etäpesäkkeitä muualle elimistöön. (Duodecim Syöpätaudit 2007, Robbins & Cotran Pathologic basis of disease 2010)



Kuva 3. Kemiallinen karsinogeneesi (Robbins & Cotran Pathologic basis of disease 2010)

### 1.1.2 Syövän kehittymiseen osallistuvat geenit

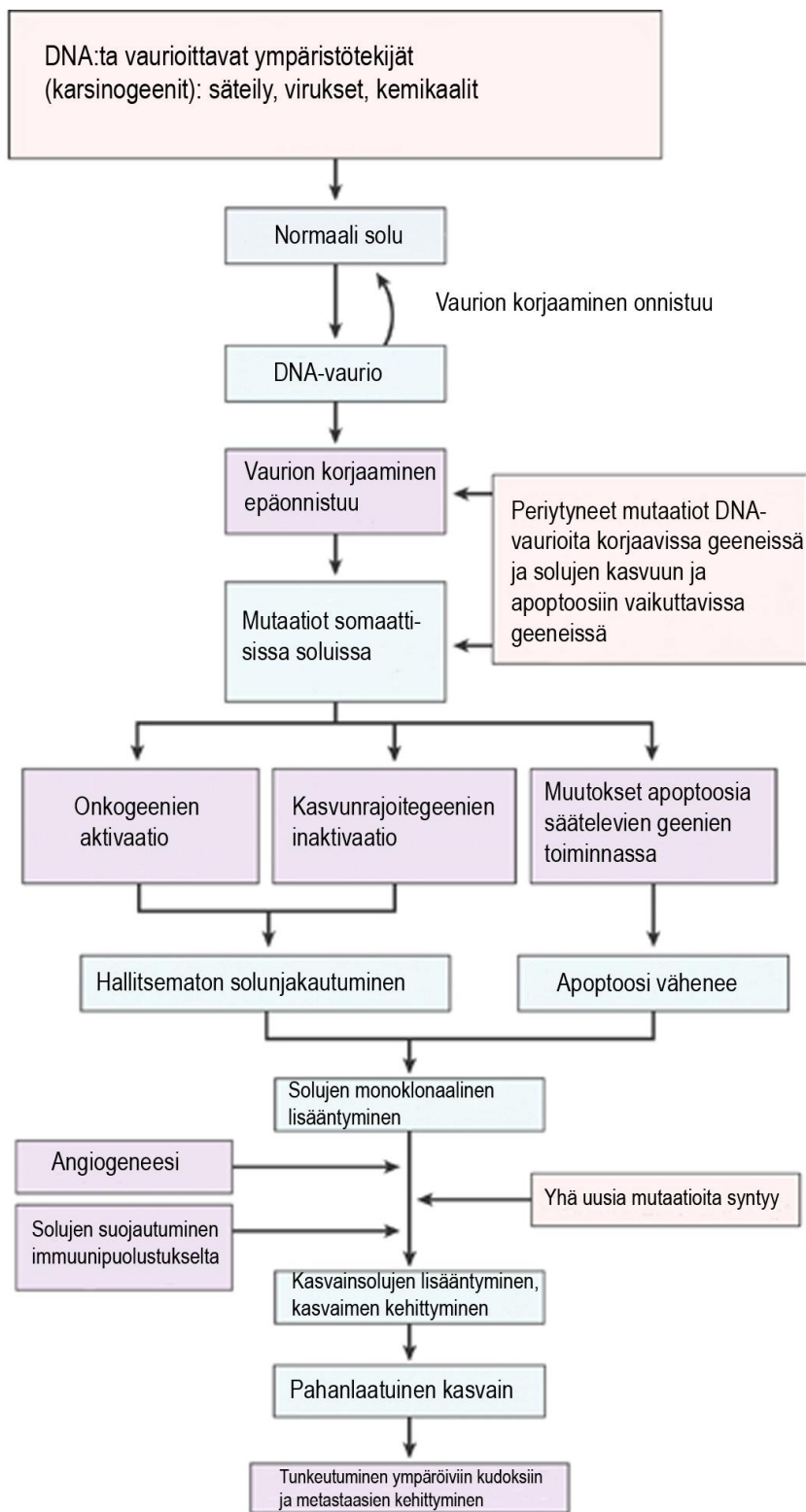
Syövän syntyyn vaikuttavia geenejä on useita satoja. Syövän kehittymiselle altistavat DNA-vauriot kohdistuvat syöpägeneiksi kutsuttuihin geeneihin. Näitä ovat proto-onkogeenit (syöpägeenin esiaste),



kasvunrajoitegeenit eli tuumorisuppressorigeenit, apoptoosia eli ohjelmoitua solukuolemaa säätelevät geenit ja DNA-vaurioita korjaavat geenit. Osa geneistä on syöpäspesifisiä ja niiden mutaatiot liittyvät vain tiettyyn syöpätyyppiin. Toisten geenien mutaatiot voivat altistaa useampien erilaisten syöpien synnylle. Mutaatiot häiritsevät geenin normaalia toimintaa ja solulle voi kehittyä seuraavia ominaisuuksia, jotka lisäävät sen pahanlaatuisuutta:

1. Kyky tuottaa omia kasvusignaaleja (proto-onkogeneenien aktivoituminen onkogeneiksi)
2. Kyky vastustaa elimistön kasvua rajoittavia signaaleja (kasvunrajoitegeenit)
3. Kyky välttää apoptoosi (apoptoosia säätelevät geenit)
4. Rajoittamaton solujen jakautuminen (telomeraasi)
5. Angiogeneesi eli verisuonien uudismuodostus
6. Tunkeutuminen ympäröiviin kudoksiin ja leviäminen muualle elimistöön eli metastasointi

(Duodecim Syöpätaudit 2007, Robbins & Cotran Pathologic basis of disease 2010)



Kuva 4. Syövän kehittyminen (Robbins & Cotran Pathologic basis of disease 2010)

### 1.1.3 Onkogeenit

Proto-onkogeenit ovat elimistön normaaleja geenejä. Proto-onkogeenin toisen alleelin mutaation seurauksena syöpäsolussa syntyy onkogeeni, joka ilmentää tiettyä onkoproteiinia. Onkoproteiinit toimivat mm. kasvutekijöinä, kasvutekijäreseptoreina ja solunsisäisinä signaalinvälittäjinä. Lisäksi ne stimuloivat ympäröivissä kudoksissa kasvutekijöiden muodostumista ja voivat osallistua solusyklin säätelyyn. Normaalit kasvutekijät tarvitsevat elimistöstä oikeanlaisia signaaleja toimiakseen.

Onkoproteiinit edistävät solun kasvua riippumatta ulkoisista tekijöistä ja ovat vastustuskykyisiä kasvua hidastaville signaaleille. Monet syöpäsolut tuottavat omia kasvutekijöitä ja voivat näin lisääntyä ilman ympäröivästä kudoksesta tulevia kasvusignaaleja. Onkoproteiinit voivat toimia myös kasvutekijäreseptoreina. Normaaleista reseptoreista poiketen onkoproteiinit stimuloivat taukoamatta solun jakautumista riippumatta siitä, onko niihin sitoutunut kasvutekijä vai ei. Muun muassa *FGF3*-proto-onkogeenin (fibroblast growth factor 3) ja *FLT3* (MS-like tyrosine kinase 3) – kasvutekijäreseptorin mutaatiot altistavat rintasyövälle. Signaalinvälittäjinä toimivista onkogeeneistä tunnetuin on *RAS*-onkogeeni, mutta sen merkitys rintasyövässä on hyvin vähäinen. (Robbins & Cotran Pathologic basis of disease 2010)

Kasvutekijöiden ja solun sisäisten signaalinvälittäjien toiminnan tuloksena solu siirtyy solusykliin ja lopulta jakautuu. Sykliinistä riippuvat kinaasit (CDK = cyclin dependent kinases) sitoutuvat sykliiniin, aktivoituvat ja säätelevät solusyklin kulkua. Sykliinejä ja CDK:ja koodaavien geenien mutaatioiden seurauksena syöpäsolut pystyvät lisääntymään hallitsemattomasti. Erityisesti *sykliini-D:n* ja harvemmin *sykliini-E:n* mutaatiot lisäävät rintasyöpäriskiä. Solusyklissä on tarkistuspisteitä (checkpoints), joissa varmistetaan solun perimäaineksen eheys ennen seuraavaan vaiheeseen siirtymistä. *RAD-* ja *ATM* (ataxia telangiectasia mutated)- proteiineilla on tärkeä osa DNA-vaurioiden havaitsemisessa. Nämä proteiinit saavat aikaan solusyklin pysähtymisen, mikä antaa aikaa vaurion korjaamiseen. (Robbins & Cotran Pathologic basis of disease 2010)

#### 1.1.4 Kasvunrajoitegeenit

Kasvunrajoitegeenit koodaavat kasvua rajoittavia proteiineja. Kasvua rajoittavat proteiinit toimivat mm. transkriptiotekijöinä (DNA:n kopioiminen RNA:ksi), signaalinvälittäjinä, solusyklin säätelijöinä ja kasvutekijäreseptoreina sekä havaitsevat DNA-vaurioita. Proteiinit poistavat perimältään virheellisen solun väliaikaisesti tai pysyvästi solusyklistä. Jos elimistö ei pysty korjaamaan mutaatiota, seuraa apoptoosi. Kasvunrajoitegeenin molempien alleelien mutaation seurauksena geenin toiminta häiriintyy ja mahdollistaa solujen hallitsemattoman jakautumisen. Nykykäsityksen mukaan useimpiin syöpiin liittyy solusyklin kulkua säätelevän proteiinin toiminnan häiriö. Sääteleyproteiinit estävät erilaisilla mekanismeilla perimältään vaurioituneen solun etenemisen solusyklistä. Sääteleygeenien mutaatioiden seurauksena proteiinien toiminta häiriintyy ja vialliset solut voivat edetä solusyklistä. Näin haitallinen mutaatio yleistyy elimistössä edistäen syövän syntymistä. (Robbins & Cotran Pathologic basis of disease 2010)

Tärkeimpiä solusykliä sääteleviä proteiineja ovat RB (retinoblastoma protein) ja p53 (proteiin 53). RB pysäyttää sykliini-E:n tuotannon ja estää siten DNA:n kahdentumiselle välttämättömän sykliini-E-CDK2 – kompleksin muodostumisen (Poznic 2009). Somaattiset *RB*-mutaatiot lisäävät alttiutta useille syöville. p53-proteiinia koodaavan *TP53*:n (tumor protein 53) somaattiset mutaatiot ovat yleisimpiä syöpäalttiutta lisääviä mutaatioita ja niitä tavataan useimmissa syövässä (Olivier, Hollstein & Hainaut 2010). *TP53*-mutaatio on erityisen yleinen aggressiivisimmassa ja vaikeimmin hoidettavassa rintasyöpätyypissä, joka on sekä estrogeeni-, progesteroni- että HER2-negatiivinen (Walerych ym. 2012). Kun solun DNA:ssa todetaan mutaatio, p53 aktivoituu ja pysäyttää solusyklin hetkellisesti tai pysyvästi. Jos vaurio korjaantuu, solu palaa solusykliin. Jos mutaatio on pysyvä, p53 ajaa vaurioituneen solun apoptoosiin (ohjelmoitu solukuolema). p53 on siis välittäjäproteiini, joka korjaa DNA-vaurion, pysäyttää solusyklin tai saa aikaan apoptoosin. Perinnöllinen *TP53*- mutaatio aiheuttaa Li-fraumeni – syndrooman, johon liittyy 25-kertainen riski syövän kehittymiseen nuorella iällä. Myös periytyvään Cowdenin syndroomaan, jossa on kohonnut rintakasvainten riski, liittyy *PTEN* (phosphatase and tensin homologue) kuuluu kasvunrajoitegeeneihin. (Robbins & Cotran Pathologic basis of disease 2010)

### **1.1.5 Apoptoosin välttäminen**

Apoptoosi on monimutkainen signaalikaskadi, jossa elimistö tuhoaa hallitusti sille haitallisia soluja. Syöpäsolujen apoptoosia säätelevissä geneissä on mutaatioita ja geenien ilmentyminen on poikkeavaa. Apoptoosia edistävien geenien ilmentyminen vähenee ja estävien geenien ilmentyminen kasvaa, solukuolemaa edistävien proteiinien toiminta heikkenee (sytokromi-c:n tuotanto vähenee ja apoptoosia välittävän solun pintaproteiini-CD95:n määrä vähenee) ja apoptoosia välittävät signaalijärjestelmät lakkaavat toimimasta. Näin syöpäsolut pystyvät välttämään ohjelmoidun solukuoleman. (Robbins & Cotran Pathologic basis of disease 2010, Sankari ym. 2012)

### **1.1.6 Rajaton solujen jakautuminen**

Elimistön normaalien solujen jakautumiskyky on rajallinen. Jokaisen solunjakautumisen jälkeen telomeerit eli kromosomien päissä olevat DNA-jaksot lyhenevät ja kromosomit muuttuvat epävakaammiksi, mikä lisää syöpäriskiä. Tietyissä pisteissä elimistö tunnistaa lyhyet telomeerit virheenä solun perimässä, minkä seurauksena solu poistuu solusyklistä. Syöpäsolut tuottavat runsaasti telomeraasientsyymiä, joka rakentaa telomeereja uudelleen ja mahdollistaa solujen loputtoman jakautumisen. (Artandi & DePinho 2010, Günes & Lenhard 2013, Robbins & Cotran Pathologic basis of disease 2010)

### **1.1.7 Angiogeneesi**

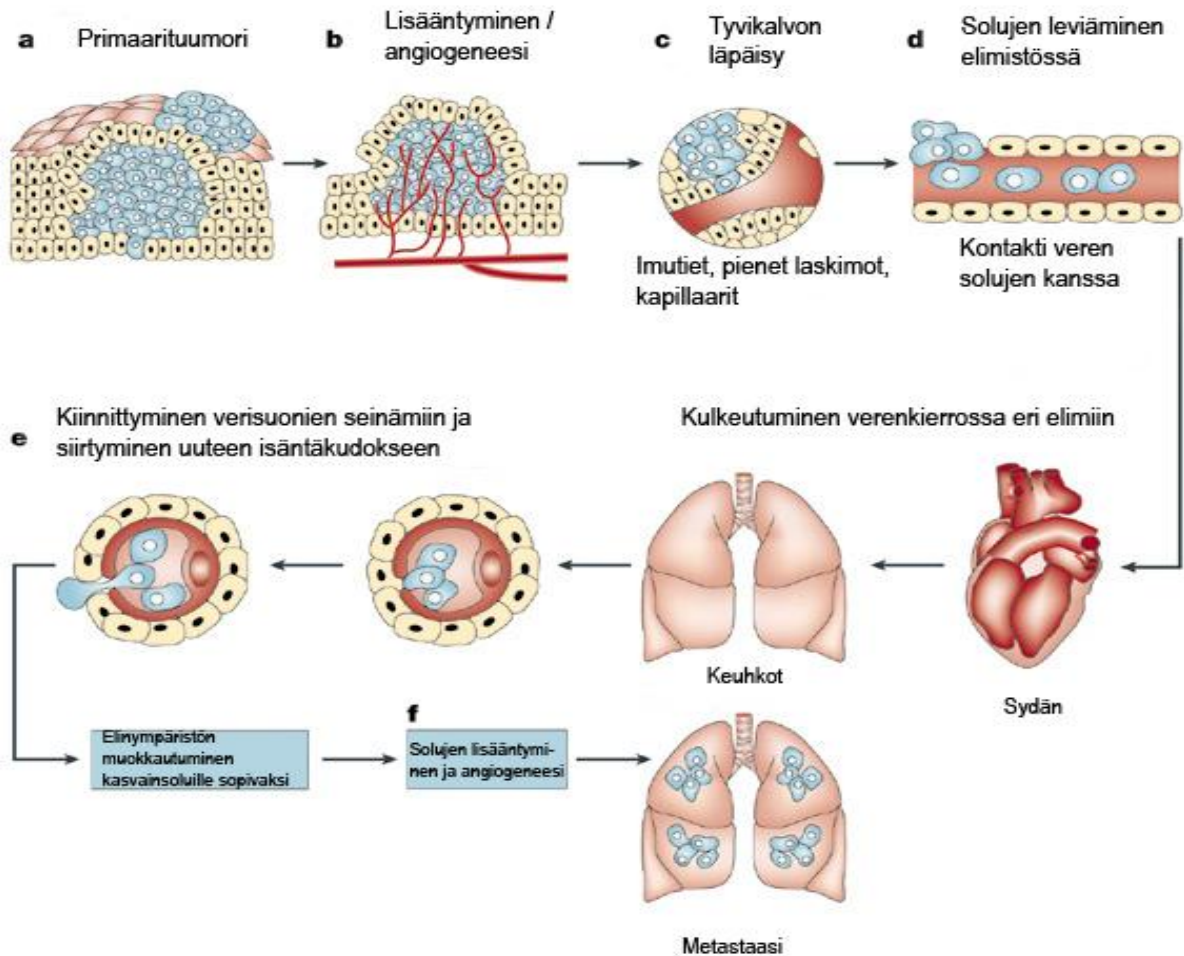
Yksi syöpäkasvaimen elinehto on riittävä verenkierto, jotta solut saavat happea ja ravintoa ja pystyvät jakautumaan. Lisäksi verisuonet mahdollistavat syöpäsolujen leviämisen muualle elimistöön. (Gomes ym. 2012, Moserle & Casanovas 2013, Robbins & Cotran Pathologic basis of disease 2010) Verisuonet muodostuvat kahdella tavalla: 1) Kasvainsolukkoa ympäröivien kudosten verisuonista haarautuu uusia kapillaareja eli hiussuonia. 2) Luuytimen kantasolut erilaistuvat epiteelisoluiksi, joista muodostuu kasvainta ravitsevia uudissuonia. (Robbins & Cotran Pathologic basis of disease 2010) Syöpäsolut ja elimistön puolustusjärjestelmän solut tuottavat angiogeneesiä edistäviä proteiineja. Uudismuodostusta estävien proteiinien määrä vähenee. VEGF (vascular endothelial growth factor) ja sen reseptorit (VEGFR) ovat keskeisessä roolissa angiogeneesissä. (Claesson-Welsh & Welsh, Gomes ym. 2012, Moserle & Casanovas 2013) VEGF edistää verisuonien ja imusuonien kasvua ja lisää verisuonien läpäisevyyttä. Se lisää tyvikalvoa hajottavien entsyymien määrää, mikä helpottaa kasvainsolujen pääsyä verenkiertoon, ja vahvistaa syöpäsolujen kiinnittymistä toisiinsa. VEGF:llä on myös suoria kudoksen sisäisiä, syöpäsolujen menestymistä edistäviä vaikutuksia. (Moserle & Casanovas 2013)

### **1.1.8 Invaasio ja leviäminen muualle elimistöön**

Syöpäsoluja vapautuu verenkiertoon päivittäin valtavia määriä, mutta ne tuhoutuvat herkästi ja metastaaseja eli etäpesäkkeitä kehittyä harvoin. Metastaasit syntyvät rintasyövässä ja muissakin syövässä yhdestä ainoasta jakautuvasta solusta ja aiheuttavat suurimman osan syöpäkuolemista. (Fidler 2003)

Ennen kuin pahanlaatuiset solut pääsevät verisuoniin ja leviävät elimistössä, niiden on läpäistävä soluväliaine (ECM = extra cellular matrix). Alussa syöpäsolujen väliset tiiviit liitokset löystyvät. Tämä johtuu soluja soluväliaineeseen kiinnittävien proteiinien sekä soluväliliitosten proteiinien (rintasyövässä E-kadheriini) vähenemisestä. Seuraavaksi proteaasit eli proteiineja hajottavat entsyymit

alkavat tuhota soluvälitilan sidekudosta ja tyvikalvoa. Hajoamistuotteet edistävät solujen kasvua ja leviämistä. Kolmannessa vaiheessa syöpäsolut vaeltavat hajoanneen ECM:n läpi, läpäisevät tyvikalvon ja tunkeutuvat verisuonistoon. Pahanlaatuisten solujen ja verihiutaleiden aggregoituminen eli kerääntyminen yhtenäiseksi massaksi vähentää solujen mekaanista hajoamista ja suojaa soluja elimistön puolustusmekanismeilta. Solurykelmä kiinnittyy usein ensimmäisenä vastaan tulevan kudoksen hiussuoniin ja invaasio tapahtuu käänteisesti uudelleen. (Robbins & Cotran Pathologic basis of disease 2010) Pahanlaatuiset solut voivat levitä myös kaukaisempiin kudoksiin. Eri kasvaintyypeillä on niille ominaisia leviämisaikoja, joihin vaikuttavat sekä kasvainsolujen että vastaanottavan kudoksen ominaisuudet. Usein isäntäkudoksessa syöpäsolujen kiinnittymistä edistävät molekyylit, kuten kasvutekijät ja endoteelisolujen reseptorit, ovat samanlaisia kuin niiden alkuperäisessä kasvupaikassa. (Fidler 2003) Esimerkiksi rintasyöpäsoluista on löydetty runsaasti CXCR4- ja CCR7-reseptoreita, joihin sitoutuvia molekyylejä on paljon rintasyövälle tyypillisissä leviämisaikoissa, kuten luustossa ja maksassa. Jos tunkeutuminen soluväliaineeseen onnistuu ja syöpäsolut pystyvät välttämään uuden isäntäkudoksen puolustuskeinot, syntyy metastaasi. Joskus etäpesäke säilyy kudoksessa inaktiivisena mikrometastaasina hyvinkin kauan ja alkaa kasvaa ja aiheuttaa oireita vasta vuosien kuluttua. Näin on kuvattu tapahtuvan rintasyövässäkin: Tuumori on hoidettu menestyksekkäästi ja muutaman kymmenen vuoden kuluttua löydetään primaarikasvaimen metastaasi. (Robbins & Cotran Pathologic basis of disease 2010)



Kuva 5. Metastaasin kehittyminen (Fidler 2003)

## 1.2 Rintasyöpien periytyvyys

Rintasyövistä valtaosa, noin 75 %, on satunnaisesti ilmaantuvia eli ei-perinnöllisiä. Satunnaisesti ilmaantuvaan rintasyöpään sairastuminen riippuu olennaisesti ympäristötekijöistä eikä sairastuneen potilaan suvussa ole kohonnutta syöpäilmaantuvuutta. (Prado ym. 2009) Altistavia tekijöitä on monia. Tärkein riskitekijä on naissukupuoli. Vain noin 1 % rintasyövistä todetaan miehillä (Comet ym. 2009). Toinen merkittävä riskitekijä on pitkittynyt altistuminen korkeille estrogeenitasoille (Mitrunen ja Hirvonen 2003). Pitkittynyttä estrogeenialtistusta aiheuttavat aikainen menarke, myöhäinen

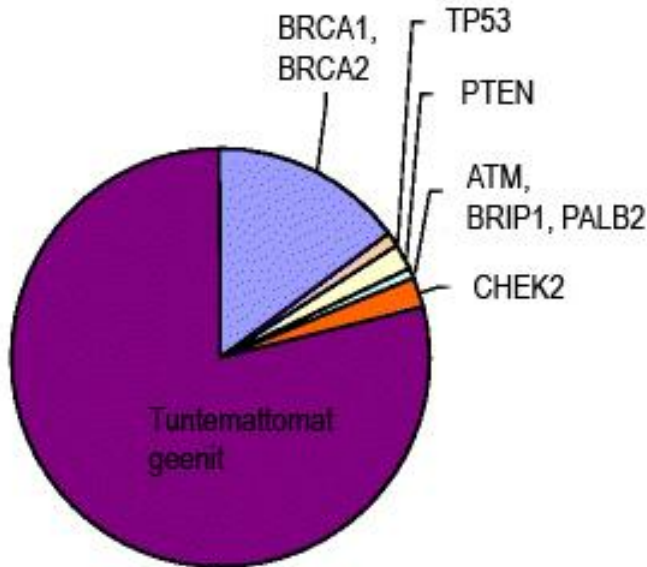


menopausi, alhainen pariteetti ja korkea ensisynnytyksikä sekä hormonaalisen ehkäisyyn käyttö ja vaihdevuosien hormonikorvaushoito. Myös metabolinen oireyhtymä lisää rintasyöpäriskiä (Capasso ym. 2010). Muita altistavia tekijöitä ovat ionisoiva säteily ja jotkin myrkylliset kemikaalit. Laajassa ruotsalaisessa tutkimuksessa rintasyövän ilmaantuvuushuippu oli 65-vuoden iässä. Satunnaisesti ilmaantuvaa ja perinnöllistä rintasyöpää ei tutkimuksessa eroteltu. (Beiki ym. 2012)

Noin 25 % kaikista rintasyövistä on perinnöllisiä (Antoniou & Easton 2006). Siihen viittaavia piirteitä ovat syövän varhainen ilmaantumisikä, bilateraallinen eli molemmanpuoleinen rintasyöpä sekä syövän esiintyminen lähisukulaisilla ja useassa sukupolvessa (Eeles 1999). Syövän synnyn taustalla on periytyvä alttius ja ympäristötekijöiden merkitys on vähäinen. Valtaosa tunnetuista rintasyövän alttiusgeeneistä periytyy noudattaen autosomaalista dominanttia eli vallitsevaa periytymismallia (van der Groep, van der Wall & van Diest 2010), missä syöpäalttiuden periytymiseen tarvitaan muutos vain toiselta vanhemmalta perityssä geenissä.

Alttiusgeenit voidaan jakaa kolmeen ryhmään sen mukaan, kuinka merkittävästi ne vaikuttavat rintasyöpäalttiuteen ja kuinka yleisiä ne ovat väestössä: 1) Harvinaisiin, korkeaan rintasyöpäriskiin liittyviin geeneihin, joihin kuuluvat mm. *BRCA1* (breast cancer 1), *BRCA2* (breast cancer 2) ja *TP53*. 2) Harvinaisiin, keskinkertaiseen rintasyöpäriskiin liittyviin geeneihin, joihin kuuluvat mm. *ATM* (ataxia telangiectasia mutated), *BRIP1* (BRCA1-interacting protein 1), *CHEK2* (checkpoint kinase 2), *PALB2* (partner and localizer of BRCA2) ja *RAD50* (human homolog of *Saccharomyces cerevisiae RAD50*). 3) Geeneihin, joissa esiintyvät yhden nukleotidin polymorfismit (SNP:t eli yhden emäksen monimuotoisuudet) ovat erittäin yleisiä koko väestössä - sekä rintasyöpäpotilailla että terveillä henkilöillä. Tällaisia ovat muun muassa *FGFR2* (fibroblast growth factor receptor 2), *TNRC9* (trinucleotide repeat-containing 9), ja *MAP3KI* (mitogen activated protein 3 kinase) (Antoniou ym. 2008, Douglas ym. 2007). SNP:t lisäävät rintasyöpäalttiutta vain vähän, mutta koska alleelit ovat hyvin yleisiä, niiden vaikutus rintasyöpäalttiuteen on merkittävä. (Stratton & Rahman 2008, Turnbull & Rahman 2008) Englanninkielisessä kirjallisuudessa korkeasta perinnöllisestä rintasyöpäalttiudesta (ryhmä 1) käytetään nimitystä ”hereditary breast cancer” eli perinnöllinen rintasyöpä ja

keskinkertaisesta perinnöllisestä rintasyöpäalttiudesta (ryhmä 2) nimitystä ”familial breast cancer” eli perheittäin esiintyvä rintasyöpä, mutta vastaavat termit eivät ole vakiintuneet suomen kieleen.



Kuva 6. Rintasyövän alttiusgeenejä ja niiden suhteelliset osuudet (van der Groep, van der Wall & van Diest 2011)

Vain osa perinnölliseen rintasyöpäalttiuteen liittyvistä geeneistä tunnetaan. *BRCA1/2* -mutaatiot selittävät noin 20 % korkeasta perinnöllisestä rintasyöpäriskistä suomalaisessa väestössä (Vehmanen ym. 1997) ja 5-10 % kaikista rintasyöivistä (Eerola ym. 2002). *BRCA*-mutaatiot ovat yleisesti väestössä harvinaisia (esiintyvyys noin 0.1 %) ja useita mutaatioita on todettu vain yksittäisissä perheissä. Mutaatioilla on kuitenkin korkea penetranssi eli hyvin suuri osa kantajista sairastuu syöpään. *BRCA1* ja *BRCA2* ovat kasvunrajoitegeenejä ja *BRCA1-BRCA2-RAD51* – proteiini-kompleksilla on keskeinen rooli DNA:n kaksoisjuosteaurioiden korjaamisessa. Proteiineilla on muitakin perimän vakautta edistäviä tehtäviä ja niiden toiminnan häiriytyminen altistaa syövän synnylle. Mutaatiot aiheuttavat kantajalleen 10–20-kertaisen suhteellisen rintasyöpäriskin. *BRCA1* – muutokseen liittyvä sairastumisriski on suuri erityisesti nuorella iällä (alle 40-vuotiaana), kun taas *BRCA2*-mutaatioihin liittyvä sairastuvuus kasvaa tasaisemmin iän myötä (Turnbull & Rahman 2008). 40- ja 50-vuotiaalla *BRCA1*-mutaation kantajalla on suurempi riski (19,1 % ja 50,8 %) sairastua rintasyöpään kuin samanikäisellä *BRCA2*-mutaation kantajalla (vastaavat luvut 12 % ja 46 %). Vanhempana tilanne on

päinvastainen: 60-vuotiaalla *BRCA1*-mutaation kantajalla on 54,2 %:n ja 70-vuotiaalla 85 %:n riski sairastua rintasyöpään, kun vastaavat luvut *BRCA2*-mutaation kantajalla ovat 61 % ja 86 %. *BRCA1*-mutaatioihin liittyvät rintasyövät ovat tyypillisesti huonosti erilaistuneita ja estrogeeni-, progesteroni- ja HER2-negatiivisia. *BRCA2*-kasvaimissa ei ole havaittu mitään tunnusomaisia histologisia ominaisuuksia. *BRCA1/2*-muutokset lisäävät myös munasarjasyöpäalittiutta ja *BRCA2*-mutaatiot haimasyövän ja Fanconin anemian riskiä. (Petrucci, Daly & Feldman 2011)

Muita tunnettuja korkean perinnöllisen rintasyöpäriskin syndroomia ovat *TP53*-mutaatiosta aiheutuva Li Fraumenin syndrooma (Li & Fraumeni 1969, Malkin ym. 1990, Melhem-Bertrandt ym. 2011), *PTEN*-mutaatioihin liittyvä Cowdenin oireyhtymä (Starink ym. 1986, Singh ym. 2011) ja *STK11*-mutaatioista aiheutuva Peutz-Jeghers -syndrooma (Giardiello ym. 2000, Kilic-Okman ym. 2008). Diffuusi mahasyöpä – oireyhtymän taustalla olevat *CDHI*- mutaatiot lisäävät riskiä sairastua lobulaariseen rintasyöpään (Keller ym. 1999, Masciari ym. 2007). Kaikki edellä kuvatut oireyhtymät ovat hyvin harvinaisia ja selittävät vain pienen osan perinnöllisistä rintasyöpätapauksista.

Korkeaan rintasyöpäalittiuteen liittyvien geenimutaatioiden lisäksi tunnetaan useita geenejä, joiden mutaatiot aiheuttavat keskinkertaisen rintasyöpäalittiuden. Näistä tunnetuimpia ovat *CHEK2* ja *ATM*, joiden merkitys perinnöllisessä rintasyöpäalittiudessa on osoitettu useissa tutkimuksissa (Adank ym. 2011, Desrichard ym. 2011, Kuusisto ym. 2011, Prokopcova ym. 2007, Pylkäs ym. 2007, Thorstenson ym. 2003). Muita keskinkertaiseen rintasyöpäriskiin liitettyjä geenejä ovat *BRIPI* ja *PALB2* (Seal ym. 2006, Rahman ym. 2007). Myös *RAD50* kuuluu tähän ryhmään – tunnetut *RAD50*-muutokset kuvataan tarkemmin kappaleessa 1.5.2. Mutaatiot edellä mainituissa geneissa ovat myös harvinaisia ja selittävät vain osaa perinnöllisestä rintasyöpäalittiudesta.

Usein perinnöllisessä rintasyövässä altistava geenivirhe jää epäselväksi. Nykykäsityksen mukaan perinnöllisen rintasyövän taustalla on korkean ja keskinkertaisen rintasyöpäriskin geenien lisäksi runsas joukko matalan rintasyöpäriskin geenejä, jotka mahdollisesti interaktoivat sekä keskenään että korkeamman riskin geenien kanssa (ns. polygeeninen periytymismalli). Useiden mutaatioiden vaikutus

summautuu siten, että yhteisvaikutus perinnölliseen rintasyöpäpäättiuteen on todennäköisesti huomattava. Polygeeninen periytymismalli on ollut vilkkaan tutkimuksen kohteena viimeaikaisissa perinnöllisen rintasyövän tutkimuksissa. (Antoniou ym. 2001, Antoniou ym. 2002, Antoniou & Easton 2006, Bradbury & Olopade 2007, Easton 1999, Nathanson, Wooster & Weber 2001, Ripperger ym. 2009, Stratton & Rahman 2008, Vehmanen ym. 1997).

Polygeenisen perinnöllisen rintasyöpäpäättiuden mallia puoltavat lukuisat seikat: 1) Rintasyöpäriski on kaksi kertaa suurempi syöpää sairastavan ensimmäisen asteen sukulaisella kuin normaaliväestössä. Ympäristötekijöiden vaikutus on epätodennäköinen, sillä kaksostutkimuksissa on havaittu, että samamunaisilla kaksosilla rintasyöpäriski on selvästi korkeampi kuin erimunaisilla kaksosilla (Antoniou & Easton 2006, Stratton & Rahman 2008, Turnbull & Rahman 2008). Lisäksi on todettu, että suhteellinen rintasyöpäriski on samamunaisilla kaksosilla niin korkea, etteivät pelkät korkean rintasyöpäriskin geeneihin liittyvät muutokset selitä sitä. 2) Rintasyövän ja geenimuutosten yhteydestä on luotu useita matemaattisia malleja ja on todettu, että parhaiten toimivat mallit, joihin on yhdistetty polygeenistä rintasyöpäpäättiutta kuvaava komponentti (Antoniou ym. 2004). 3) On tutkittu, liittyykö lisääntynyt rintasyöpäpäättiäis vain jonkin tietyn alueen geenien mutaatioihin (linkage studies). Tällaista yhteyttä ei toistaiseksi ole löydetty. 4) Rintasyöpäpotilaiden syöpäriski vaihtelee fenotyypin (menopausi-ikä, rintakudoksen tiheys) mukaan, mikä osoittaa, että taustalla on todennäköisesti muitakin rintasyöpäpäättiuteen vaikuttavia geenejä. 5) *BRCA1/2*-kantajien rintasyöpäpäättiäis ei ole samanlainen. Tästä voidaan päätellä, että muutkin geneettiset tekijät vaikuttavat potilaiden syöpäpäättiuteen. 6) Tutkimuksissa on jo löydetty joitakin keskinkertaiseen rintasyöpäriskiin liittyviä geenejä (*CHEK2*, *ATM*). Tämän perusteella on arvioitu, että perinnölliseen rintasyöpäpäättiuteen vaikuttavia geenejä on useampia, mutta geenejä ja niiden mutaatioita ei vielä ole tunnistettu. (Antoniou & Easton 2006)

### 1.3 Miksi perinnöllistä rintasyöpää tutkitaan?

Kaikkien rintasyöpää sairastavien potilaiden geenitestaaminen ei ole kannattavaa, koska vain hyvin pieneltä osalta löytyy rintasyöpäriskiä merkittävästi lisäävä mutaatio. Niissä suvuissa, joista löytyy syöväälle altistava geenivirhe, on myös terveiden, riskissä olevien lähisukulaisten prediktiivinen eli ennustava geenitutkimus perinnöllisyysneuvonnan jälkeen mahdollista. Geenivirheen kantajille voidaan tehdä syöpäriskiä tehokkaasti pienentäviä leikkaustoimenpiteitä (rintojen poisto, munasarjojen poisto). Kaikille syöpäalttiusergeenin kantajille suositellaan luonnollisesti tehostettua syöpäseurantaa (rintojen säännöllinen tutkiminen, ultraäänitutkimus, mammografia, magneettitutkimukset) huomioiden rintasyövän lisäksi kyseiseen geenivirheeseen liittyvien muiden syöpien kohonneet riskit. Niissä suvuissa, joissa arvioidaan olevan korkea perinnöllinen rintasyöpäriski, mutta joista ei löydy rintasyöväälle altistavaa perintötekijävirhettä, ohjataan kaikki kohonneessa rintasyöpäriskissä olevat henkilöt tehostettuihin syöpäseurantoihin. (Eerola ym. 2002, Petrucelli, Daly & Feldman 1998, Practical genetic counselling 2004, Robson & Offit 2007). Arvion syövän perinnöllisyydestä ja mahdollisista geenitutkimuksista tekee perinnöllisyyslääkäri, jonka vastaanotolle tulisi ohjata ne potilaat, joilla epäillään korkeaa perinnöllistä rintasyöpäriskiä. Perinnöllisyysneuvonnassa arvioidaan, täytyvätkö suvussa korkean perinnöllisen rintasyöpäriskin kriteerit ja mihin syöpäalttiussyndroomaan suvun syöpäkirjo sopii sekä tehdään päätökset syöpäriskiä tarkentavista geenitutkimuksista.

Nykykäytännön mukaan *BRCA1*- ja *BRCA2*-mutaatiotutkimusta tarjotaan potilaalle, jos jokin Lundin kriteereistä täyttyy (taulukko 1). Kriteerien katsotaan täyttyvän myös, jos samalla henkilöllä on diagnosoitu sekä rinta- että munasarjasyöpä tai jos sairastunut henkilö on mies. *BRCA1/2*-muutosten lisäksi kliinisessä työssä tutkitaan valikoiduista suvuista myös muita kappaleessa 1.2 esitettyjä harvinaisia korkean perinnöllisen rintasyöpäalttiuden geenejä. Valtaosassa korkean perinnöllisen rintasyöpäriskin suvuista ei löydy syöpäalttiutta selittävää geenimutaatiota. Uusien rintasyöpäalttiuteen liittyvien mutaatioiden löytyminen toisi lisää työvälineitä kliiniseen työhön korkean perinnöllisen rintasyöpäriskin potilaiden tunnistamiseksi. Matalan tai keskinkertaisen riskin yksilöiden systemaattinen seulonta on tällä hetkellä perusteetonta, koska niihin liittyvien mutaatioiden kliininen merkitys on epäselvä. Mutaatioiden vaikutukset voivat summautua ja myös ympäristötekijöillä on

vaikutusta muuntuneen geenin ilmentymiseen. Keskin kertaisen rintasyöpäriskin geenivirheistä tarvitaan lisää tutkimustuloksia.

*Taulukko 1. Lundin kriteerit*

1	Neljällä 1. asteen sukulaisella todettu rinta- tai munasarjasyöpä,
2	Kolmella 1. asteen sukulaisella todettu rinta- tai munasarjasyöpä ja näistä yksi alle 50 vuoden iässä
3	Kahdella 1. asteen sukulaisella todettu rinta- tai munasarjasyöpä, joista toinen alle 40 vuoden iässä
4	Yhdellä 1. asteen sukulaisella todettu rinta- tai munasarjasyöpä alle 30-vuotiaana

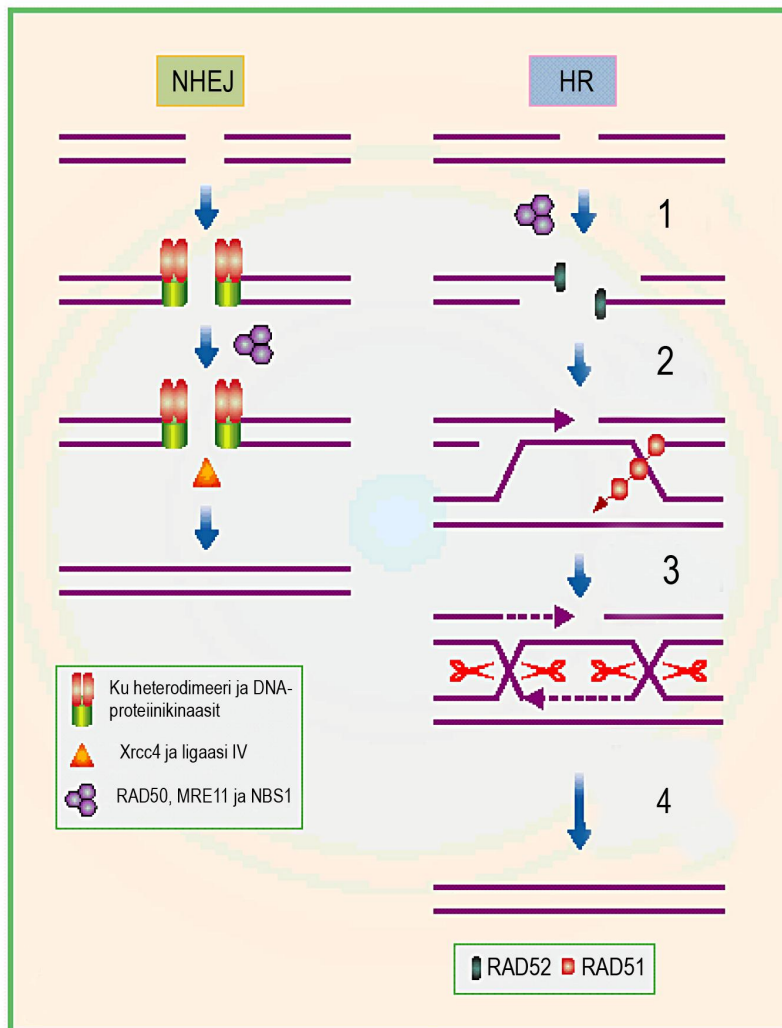
## **1.4 RAD50:n rooli syöpäalitiuden synnyssä**

### **1.4.1 DSB ja sen korjausmekanismit**

DNA:n kaksoisjuosteen katkeaminen (DSB = DNA double strand break) on yksi haitallisimpia DNA-vaurioita. DSB:n voivat aiheuttaa lukuisat ulkoiset tekijät, kuten ionisoiva säteily, kemikaalit, syövän hoidossa käytetyt lääkkeet ja happiradikaalit, sekä ulkoisista tekijöistä riippumattomat tapahtumat kuten DNA:n kahdentumis- eli replikaatiovirheet. Kaksoisjuoste katkeaa myös normaalisti suku solujen vähennysjakaantumisen eli meiosisin ja somaattisten solujen jakautumisen eli mitosisin aikaisen tekijänvaihdon eli rekombinaation yhteydessä. DSB:t lisäävät ihmisen syöpäalitiutta ja elimistön normaaleissa soluissa onkin tehokkaita mekanismeja, jotka pyrkivät korjaamaan kaksoisjuostevauriot. (Khanna & Jackson 2001, Jackson 2002)

Ongelmat DSB:n korjaamisessa aiheuttavat perimään epävakautta kromosomimuutosten kautta. Korjausvirhe voi aiheuttaa translokaatioita eli perintöaineksen siirtymistä tai vaihtumista kromosomien välillä sekä johtaa aneuploidiaan eli poikkeavuuksiin kromosomien lukumäärässä. Trisomiassa samasta kromosomista esiintyy kolme kopiota, monosomiassa kromosomeja on vain yksi. Näiden muutosten seurauksena kromosomiin saattaa syntyä uusia onkogeenejä koodaavia geenijaksoja tai vastaavasti tuumorisuppressoria koodaava geenialue saatetaan menettää. Edellä kuvatut tapahtumat altistavat syöväälle ja kaksoisjuosteaurioiden onkin esitetty jollakin tavalla olevan osallisena kaikkien syöprien synnyssä. (Khanna & Jackson 2001)

DSB voidaan korjata kahdella tavalla (kuva 7): 1) Ihmisellä on diploidi perimä eli jokaisesta ihmisen kromosomista on soluissa kaksi kopiota. Kopioita kutsutaan sisarkromatideiksi, jotka ovat keskenään lähes identtisiä. Erot kromatidien välillä johtuvat siitä, että toinen peritään äidiltä ja toinen isältä. Homologisella rekombinaatiolla (HR) tarkoitetaan monimutkaista entsyymien säätelemää prosessia, jossa DNA:ta monistava entsyymi, DNA-polymeraasi, käyttää mallina vahingoittuneen kromosomin sisarkromatidia ja korjaa tämän avulla DSB:n. 2) Suora korjaaminen (NHEJ = non-homologic end-joining) on HR:lle vastakkainen korjausmekanismi. Siinä katkenneiden juosteiden päät liitetään suoraan toisiinsa eikä malli-DNA:ta tarvita. Suorassa korjaamisessa syntyy usein pieniä häviämiä eli deleetioita ja NHEJ onkin virheille alttiimpi korjausmekanismi kuin HR. HR ja NHEJ ovat toisiaan täydentäviä korjausmekanismeja ja molemmilla on roolinsa kaksoisjuosteaurioiden korjaamisessa. (Khanna & Jackson 2001, Jackson 2002)



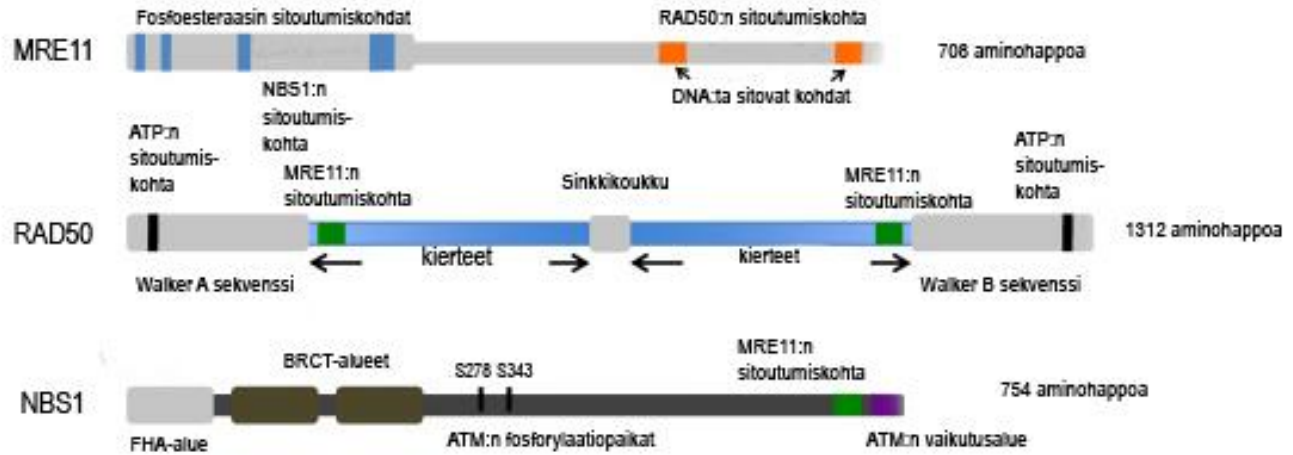
*Kuva 7.* DSB:n korjaaminen. NHEJ:ssa katkenneen kaksoisjuosteen päät liitetään suoraan toisiinsa. HR:ssa toisilleen lähes identtiset sisarkromatidit katkaistaan (1) ja vaurioituneen kaksoisjuosteen päät liitetään ehjään kromatidiin (2). Tämän jälkeen DNA-polymeraasi rakentaa uudet juosteet templaatti- eli malli-DNA:n avulla (3). Korjausprosessin lopussa juosteiden välille muodostuneet sillat katkaistaan (4) ja tuloksena on ehjä DNA:n kaksoisjuoste. (Khanna & Jackson 2001)

### 1.4.2 MRN-kompleksi

DSB:n korjaaminen on monimutkainen tapahtuma, johon osallistuu lukuisia eri proteiineja. RAD50 kuuluu MRN-proteiinikompleksiin (MRE11-RAD50-NBS1), joka on merkittävässä osassa DNA:n



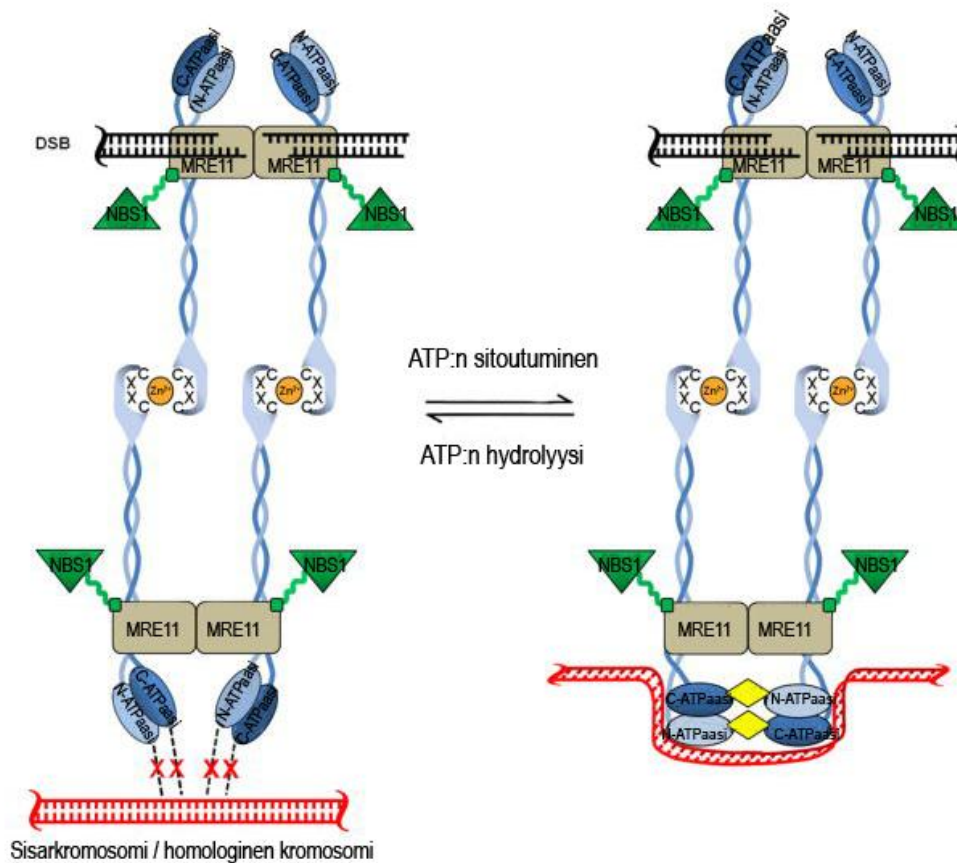
kaksoisjuosteaurioiden korjaamisessa. RAD50:n sekä muiden MRN-kompleksin muodostavien proteiinien yksinkertaistettu, lineaarinen rakenne esitetään kuvassa 8 (Borde & Cobb 2009).



*Kuva 8.* MRN-kompleksin proteiinien rakenne. MRE11-proteiiniin (Meiotic recombination 11) on merkitty fosfoesteraasia (entsyymi joka irrottaa poteinista fosfaattiryhmän) sitovat kohdat sekä DNA:ta sitovat kohdat. Lisäksi kuvassa näkyvät RAD50:tä ja NBS1:tä sitovat kohdat. RAD50:n N-terminaalinen Walker A -sekvenssi sekä C-terminaalinen Walker B -sekvenssi muodostavat yhdessä ATP:tä sitovan alueen (ABC = ATP-binding cassette). Näiden alueiden väliin jää noin 575 aminohapon pituinen alue, joka muodostaa kaksi kierrettä (coiled coil), joita erottaa toisistaan sinkkikoukkuksi (zinc hook) nimetty CXXC-sekvenssi. Lisäksi kuvaan on merkitty kohdat, joista RAD50 kiinnittyy MRE11:een. Kaksi RAD50-proteiinia voi koukun välityksellä kiinnittyä toisiinsa saman MRN-kompleksin tai kahden eri MRN-kompleksin välillä. NBS1-proteiiniin (Nijmegen breakage syndrome 1) on merkitty ATM:n (ataxia-telangiectasia-mutated) fosforylaatiokohdat (fosfaattiryhmän kiiinnittyminen), ATM:n kanssa vuorovaikutuksessa olevat kohdat sekä MRE11:n sitoutumiskohta. FHA (filamentous hemagglutinin) ja BRCT (BRCA1 C Terminus domain) ovat alueita, joiden avulla NBS1 sitoo MRN-kompleksiin muita DSB:n korjausprosessiin osallistuvia proteiineja. (Borde & Cobb 2009)

MRE11 sitoo kompleksin DSB:n päihin sekä ehjään DNA:han. Proteiinilla on sekä endonukleasiaktiivisuus (DNA-nukleotidien liittäminen juosteeseen) että eksonukleasiaktiivisuus (DNA-nukleotidien poistaminen juosteesta). (Lamarche, Orazio & Weitzman 2010) ATP:n sitoutuminen MRN-kompleksiin saa aikaan nukleasiaktiivisuuden muutoksen (Williams ym. 2010). Nukleasit muokkaavat DNA:ta siten, että DSB:n korjaamiseen osallistuvat entsyymit tunnistavat vahingoittuneen DNA:n ja solu poistuu solusyklistä korjauksen ajaksi (Borde & Cobb 2009).

RAD50-molekyylit sitoutuvat MRE11:een. Lisäksi kaksi MRN-kompleksia voi sitoutua toisiinsa RAD50:n sinkkikoukkujen (CXXC-sekvenssit) välityksellä, mikä mahdollistaa useiden MRN-kompleksien kerääntymisen DSB:n ympärille. Tämä edistää vaurioituneen ja ehjän kaksoisjuosteen kiinnittymistä toisiinsa. (Lamarche, Orazio & Weitzman 2010). Myös ATP:n sitoutuminen ja hydrolyysi aiheuttavat MRE11:ssä ja RAD50:ssä rakennemuutoksia, jotka edesauttavat MRN-kompleksin sitoutumista DNA:han (Lammens ym. 2011). NBS1 aktivoi korjausproteiineja (mm. ATM), ohjaa paikalle solusykliä sääteleviä proteiineja ja edesauttaa MRN-kompleksin sitoutumista DNA:han. (Lamarche, Orazio & Weitzman 2010) MRN-kompleksin rakenne ja kahden kompleksin sitoutuminen toisiinsa sekä DNA:han esitetään kuvassa 9.



*Kuva 9.* MRN-kompleksin rakenne ja kahden kompleksin sitoutuminen toisiinsa. MRE11 on MRN-kompleksin ydinproteiini, joka sitoo kompleksin ehjään ja vaurioituneeseen DNA:han. Kompleksin ydin koostuu kahdesta MRE11-proteiinista, joihin vastaavasti sitoutuu kaksi RAD50- sekä kaksi NBS1-proteiinia. (Lamarche, Orazio & Weitzman 2010)

### 1.4.3 MRN-kompleksin toiminta DNA:n kaksoisjuosteaurion korjaamisessa

MRN-kompleksi osallistuu homologiseen rekombinaatioon ja suoraan korjaukseen (Borde ja Cobb 2009, Lamarche, Orazio & Weitzman 2010, Williams, Lees-Miller & Tainer 2010, Lavin 2007, Langerak & Russell 2011). Lisäksi kompleksi toimii DNA:n replikaatiossa ja solusyklin säätelyssä (Borde ja Cobb 2009, Lavin 2007). Kompleksin rooli HR:ssa on merkittävämpi kuin NHEJ:ssa.

Homologinen rekombinaatio on monimutkainen entsyymien säätelemä tapahtuma. DNA:n kaksoisjuosteen katketessa MRN-kompleksi havaitsee vaurion ja sitoutuu DNA:han MRE11:n välityksellä. Sitouduttuaan DNA:han MRN sitoo juosteiden päät toisiinsa. Tämän jälkeen solusyklin tarkistuspisteitä aktivoiviin proteiinikinaaseihin (PIKK = PI 3 –kinase related proteins) kuuluva ATM sitoutuu kompleksiin. Sitoutuminen johtaa ATM:n autofosforylaatioon (fosfaattiryhmän kiinnittyminen proteiiniin) ja aktivaatioon, mikä johtaa useiden solusyklin kulkuun vaikuttavien proteiinien, kuten Chk1:n ja Chk2:n (checkpoint-kinaasit 1 ja 2) sekä p53:n, fosforylaatioon ja aktivaatioon. Näiden tapahtumien seurauksena solusykli pysähtyy ja saadaan aikaa DSB:n korjaamiseen. (Langerak ja Russell 2011) ATM:n aktivoituminen saa aikaan myös muiden HR:n etenemistä edistävien proteiinien (NBS1, BRCA1) fosforylaation (Khanna & Jackson 2001).

Suorassa korjaamisessa DSB:n tunnistava proteiini on Ku-heterodimeeri (kahden erilaisen molekyylin muodostama yhdiste), joka sitoutuu vapaisiin DNA:n päihin. Ku-heterodimeerin sitoutuminen tuo paikalle DNA-proteiinikinaasit (DNA-PK:t) sekä edelleen XRcc4:n (X-ray repair cross-complementing protein 4) ja DNA-ligaasi IV:n, jotka yhdessä liittävät DNA-juosteet toisiinsa (kuva 7). MRN-kompleksi voi muokata DNA:n vapaita päitä ennen liittämistä ja siten osallistua suoraan korjaamiseen. (Khanna & Jackson 2001)

## 1.5 *RAD50*-mutaatiot ja syöpäaalttius - aikaisemmat tutkimukset

### 1.5.1 *RAD50* -mutaatioiden vaikutus syöpäaalttiuteen

Syöpäsoluissa on useissa tutkimuksissa havaittu poikkeavaa MRN-kompleksin ilmenemistä. Suurin osa tutkimuksista on kuitenkin keskittynyt *NBS1*-muutoksiin ja *MRE11*:n ja *RAD50*:n tutkiminen on jäänyt vähemmälle huomiolle. (Dzikiewicz-Krawczyk 2008) MRN-kompleksilla on keskeinen rooli DSB:n korjaamisessa. Tämän lisäksi kompleksi osallistuu DNA:n replikaatioon, meioosin aikaiseen ja somaattiseen rekombinaatioon, solusyklin tarkistuspisteiden säätelemiseen sekä apoptoosin mekanismeihin. Ottaen huomioon kompleksin moninaiset tehtävät on ymmärrettävää, että rakennemuutokset missä tahansa MRN-kompleksin proteiineissa voivat heikentää kompleksin toimintaa ja altistaa erilaisten kromosomimuutosten kautta syövän kehittymiselle.

Hohl ym. tutkimuksessa aiheutettiin *S. Cerevisiae* -hiivan *RAD50*-geeniin mutaatio in vivo (elävässä organismissa tehty tutkimus), mistä seurasi *RAD50*-molekyylin kierteisen osan lyheneminen. MRN-kompleksin toiminta huononi muun muassa HR:ssa ja suorassa korjaamisessa. Tutkimus todisti, että *RAD50*:n virheellinen rakenne voi vaikuttaa merkittävästi MRN-kompleksin toimintaan. (Hohl ym. 2011) Brooks ym. tutkivat useiden ATM-kaskadin proteiinien sekä *RAD50*-muutosten vaikutusta rintakudoksen sädeherkkyyteen ja havaitsivat, että *RAD50*-haplotyyppi HAP5 herkisti soluja ionisoivalle säteilylle ja lisäsi rintasyöpäriskiä (Brooks ym. 2012). Lisäksi *RAD50*:n tiedetään vuorovaikuttavan *BRCA1*:n kanssa, mikä saattaa myös vaikuttaa syöpäaalttiuteen. (Zhong, Chen ja Li 1999)

Saksalaisessa tutkimuksessa (Waltes ym. 2008) potilaalla oli todettu NBS:n kaltainen synnynnäinen sairaus (Nijmegen breakage syndrome –like disorder). NBS on harvinainen autosomaalisesti (muussa kuin sukupuolikromosomissa) resessiivisesti (peittyvästi) periytyvä sairaus, jossa *NBS1*-mutaatio aiheuttaa kromosomimuutosten kautta erilaisia kasvuhäiriöitä, immuunipuutostiloja ja poikkeavan

sädeherkkyyden sekä altistaa syövän, erityisesti lymfooman, synnylle (Demuth & Degweed 2007). Tutkimuksen potilas muistutti fenotyypiltään NBS-potilasta, mutta ei ollut sairastunut lymfoomaan eikä kärsinyt immuunipuutostiloista 23-ikävuoteen mennessä. Potilaan *NBS1*-geenistä ei löydetty tautia selittäviä mutaatioita, mutta *RAD50*-geenistä löydettiin kaksi muutosta, joista toinen oli peritty isältä ja toinen äidiltä. Mutaatioista seuraavan *RAD50*-puutoksen todettiin aiheuttavan kromosomien epävakautta ja lisäävän solujen sädeherkkyyttä sekä heikentävän DNA-vaurioiden korjaamista. Myös solusyklin tarkistuspisteiden aktivaatiossa ilmeni ongelmia. (Walters ym. 2009)

Zhong ym. tutkimuksessa tuotettiin in vitro (elävän organismin tai solun ulkopuolella) normaalia *RAD50*-geenistä rakenteeltaan poikkeavia klooneja ja tutkittiin näiden vaikutusta MRN-kompleksin toimintaan. Tutkimuksessa havaittiin, että *RAD50*-puutos aiheutti MRE11:n ja NBS1:n määrän vähenemistä ja heikensi MRN-kompleksin toimintaa. Tämä altisti solut ionisoivan säteilyn vaikutuksille ja aiheutti kromosomien epävakautta. Lisäksi havaittiin, että ATM:stä riippuva DNA-vaurion korjaaminen heikentyi. (Zhong ym. 2005)

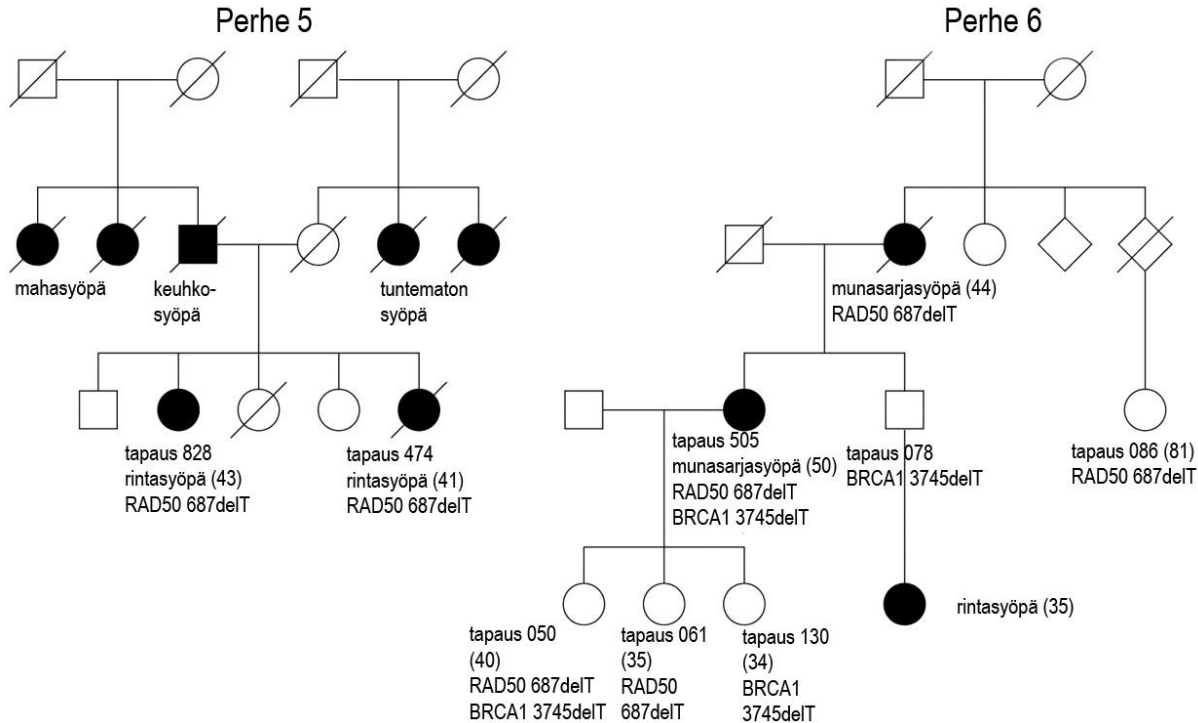
MRN-kompleksin ilmeneminen on erilaista syöpäsoluissa ja tavallisissa soluissa, minkä on havaittu vaikuttavan syöpäkasvaimen sytostaattiherkkyyteen. Amerikkalaisessa tutkimuksessa (Abuzeid ym. 2009) havaittiin, että adenovirusvektorin perimään liitetty viallinen *RAD50*-geenin sinkkikoukku koodaava osa lisäsi sisplatiini-sytostaatin eli solunsalpaajan tehoa syöpäsolujen tuhoamisessa. Intialaisessa tutkimuksessa (Kavitha ym. 2010) etoposidi-sytostaatti vähensi MRN-proteiinien määrää ja telomeraasiaktiivisuutta rintasyövässä. Tehoon vaikutti annettu solunsalpaaja-annos ja hoidon kesto. Thaimalaisessa tutkimuksessa (Hsu ym. 2007) todettiin, että *MRN*-kompleksin SNP:t altistavat rintasyövälle. Riski sairastua syöpään oli sitä suurempi mitä useampi kompleksin geeni oli virheellinen. *RAD50*:n alleeli, joka lisäsi eniten rintasyöpäriskiä, oli yleinen terveilläkin naisilla. On mahdollista, että *RAD50*-mutaatioiden vaikutus välittyy muiden *MRN*-kompleksin geenien kautta ja mutaatiot lisäävät syöpäalttiutta ainoastaan, jos muissakin *MRN*-geeneissä on tietyt muutokset.

### 1.5.2 *RAD50* ja rintasyöpä

Heikkinen ym. (2003) tutkimuksessa sekvensoitiin ituradasta kaikkien *MRN*-kompleksiin kuuluvien geenien koodaavat alueet 151:ltä pohjoissuomalaisen rintasyöpä- ja/tai munasarjasyöpäperheen potilaalta. Perheet jaettiin korkean (76), keskinkertaisen (52) ja pienen riskin (23) perheisiin ja potilaiden piti täyttää yksi tai useampia seuraavista kriteereistä: a) 2-3 tai useampia rinta- ja/tai munasarjasyöpiä 1. tai 2. asteen sukulaisella, b) aikainen alkamisikä (< 35), c) bilateraalin rintasyöpä tai d) useita kasvaimia samalla yksilöllä.

Useimmissa korkean riskin perheissä (76 perhettä, joista 11 *BRCA1/2*-positiivisia) oli kolme tai useampia rinta- ja/tai munasarjasyöpätapauksia. Uusia mutaatioita löytyi seitsemän kappaletta, joista neljä oli *RAD50*-muutoksia (204C→T, 280A→C, 671G→A, 687delT). *RAD50* 687delT oli ainoa, jonka arvioitiin olevan yhteydessä lisääntyneeseen perinnölliseen rintasyöpäalttiuteen. Muutosta ei löytynyt kontrollipopulaatiosta. Koska mutaatiota löytyi syöpäsuvuissa sekä terveiltä että sairailta yksilöiltä, näyttäisi siltä, että kyseinen *RAD50*-alleeli liittyy matalaan rintasyöpäriskiin. Mutaatioiden jakautuminen syöpäsuvuissa esitetään kuvassa 10. Heikkisen ym. tutkimus oli ensimmäinen, jossa löydettiin yhteys *RAD50* 687delT-muutoksen ja perinnöllisen rintasyöpäalttiuden välillä.

## RAD50 657delT



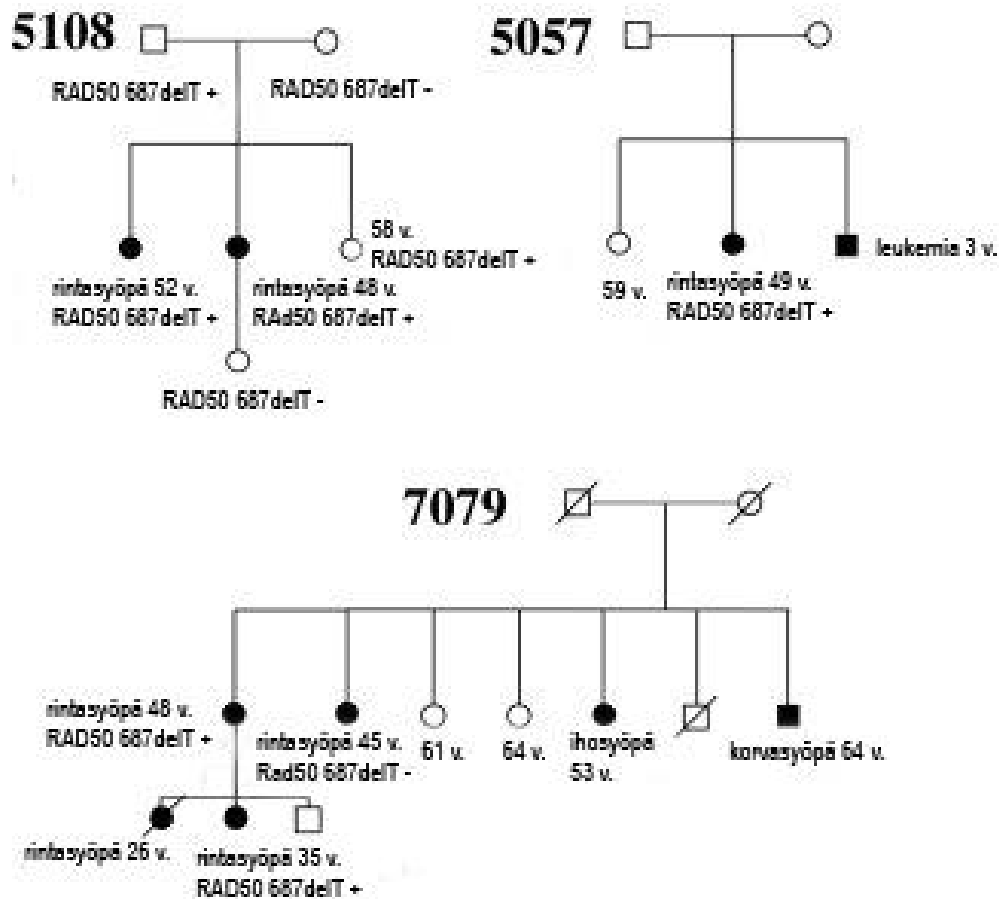
Kuva 10. *RAD50* 687delT-muutoksen jakautuminen syöpäsuvuissa. Perheessä 5 oli kaksi 687delT-positiivista naista. Toisella potilaalla oli diagnosoitu rintasyöpä 43-vuotiaana ja hänen edesmenneellä siskollaan 41-vuotiaana. Perheessä 6 oli viisi 687delT-positiivista potilasta. Näistä kahdella naisella oli diagnosoitu munasarjasyöpä (44- ja 50-vuotiaana) ja kolme naista oli terveitä (40-, 35- ja 81-vuotiaita). Lisäksi toinen munasarjasyöpää sairastavista potilaista oli *BRCA1* 3745delT -positiivinen.

Heikkinen ym. (2006) tutkivat kolmen tunnetun *RAD50*-muutoksen (*RAD50* 687delT, *RAD50* Ile94Leu, *RAD50* Arg224His) sekä yhden *NBS1*-muutoksen esiintymistä 317 suomalaisella potilaalla sekä *RAD50* 687delT:n esiintymistä 512 ulkomaalaisella (Norja, Ruotsi, Islanti) rintasyöpäpotilaalla. Syövän esiintyminen suvussa ei vaikuttanut potilaiden valintaan. Suomalaisaineistossa 70/317 potilaalla oli perinnöllinen rintasyöpä (rinta- ja/tai munasarjasyöpä 1. tai 2. asteen sukulaisella). *RAD50* 687delT oli merkittävästi yleisempi rintasyöpäpotilailla (8/317) kuin kontrolleilla (6/1000). *RAD50* 687delT-positiivisista potilaista kahdella oli perinnöllinen rintasyöpä. Lopuista kuudesta potilaasta kahdella oli suvussa muita syöpiä ja neljän suvussa ei ollut syöpää. Ulkomaalaisilta potilailta mutaatiota ei löydetty. Voidaan siis päätellä, että *RAD50* 687delT lisää rintasyöpäriskiä ja on nimenomaan suomalaiselle väestöpohjalle ominainen mutaatio (founder-mutaatio). *RAD50* Ile94Leu-mutaatiota ei löytynyt ja *RAD50* Arg224His-muutoksen esiintyvyydessä ei ollut merkitsevää eroa

rintasyöpäpotilaiden ja kontrollien välillä. Yhdeltä rintasyöpäpotilaalta löytyi uusi *RAD50*-mutaatio (*RAD50* IVS3-1G>A). Potilas oli sairastunut syöpään 56-vuotiaana ja suvussa oli useita rintasyöpätapauksia. Vastaavaa mutaatiota ei havaittu kontrollipopulaatiossa. Mutaatio aiheuttaa yhden emäsparin häviämisen johtaen ennenaikaisen lopetuskodonin muodostumiseen. *RAD50* IVS3-1G>A aiheuttaa perimään epävakautta ja lisää syöpäalttiutta.

Tommiska ym. (2006) tutkivat *RAD50*:n osuutta perinnöllisessä rintasyöpäalttiudessa 590 suomalaisella ja 702 englantilaisella potilaalla. 46 suomalaisen ja 435 englantilaisen potilaan *RAD50*-geenin koko koodaava alue ja eksoni-intronirajat sekvenssoitiin. *RAD50* 687delT- ja 1048C>T-muutosta etsittiin kaikilta suomalaisilta potilailta ja kontroleilta. 1048C>T-mutaatiota etsittiin edellisten lisäksi 267 englantilaiselta potilaalta ja 786 kontrollilta. Perinnölliseksi rintasyöpäksi luettiin tapaukset, joissa vähintään yhdellä potilaan ensimmäisen asteen sukulaisella oli todettu rintasyöpä. 435 suomalaisista potilaista oli *BRCA1/2*-negatiivisia ja 155:llä *BRCA*-mutaatiot eivät olleet tiedossa. Kaikki englantilaiset potilaat olivat *BRCA1/2*-negatiivisia. Suomalaisten ja englantilaisten potilaiden tulokset erosivat. Kolmelta suomalaiselta potilaalta ja yhdeltä kontrollilta löytyi *RAD50* 687delT-muutos. Mutaatiopositivisten rintasyöpäperheiden sukupuut on esitetty kuvassa 11. Lisäksi suomalaisilta löydettiin yksi intronisen eli koodaamattoman alueen muutos. Englantilaisesta aineistosta löytyi 11 koodaavan alueen mutaatiota, joista yhdeksän oli aminohappoa vaihtavia. Lisäksi löydettiin seitsemän intronisen alueen muutosta. Yksi koodaavan alueen muutoksista oli uusi, proteiinin katkaiseva mutaatio (1048C>T; Q350X), joka löytyi yhdeltä englantilaiselta potilaalta. 1048C>T-positiivisella naisella diagnosoitiin bilateraalin rintasyöpä 43-vuotiaana. Potilaan sisar sairastui rintasyöpään 73-vuotiaana, mutta hänellä ei ollut kyseistä mutaatiota. Potilaan äidillä todettiin munasarjasyöpä 55-vuotiaana ja isän tädillä rintasyöpä 50-vuotiaana.





Kuva 11. Mutaatioposiitivisten rintasyöpäperheiden sukupuut

*RAD50* 687delT esiintyi sekä kontrolliryhmässä että rintasyöpäpotilailla. Muutoksen arveltiin liittyvän matalaan rintasyöpäriskiin. Toisena vaihtoehtona esitettiin, ettei mutaatiolla olisi lainkaan vaikutusta rintasyöpäalttiuteen. 1048C>T löytyi vain yhdeltä rintasyöpäpotilaalta eikä sen merkityksestä perinnöllisessä rintasyöpäalttiudessa voinut pelkästään tämän tutkimuksen perusteella tehdä laajempia päätelmiä. Muiden koodaavan alueen aminohappoa vaihtavien muutosten arveltiin jollain tavalla vaikuttavan geenin toimintaan, mutta ei juurikaan lisäävän rintasyöpäriskiä. Intronialueen muutosten ei uskottu vaikuttavan rintasyöpäalttiuteen. Kokonaisuudessaan *RAD50*:n osuus perinnöllisessä rintasyöpäalttiudessa arvioitiin hyvin vähäiseksi.

Bartkova ym. (2008) tutkivat MRN-kompleksin proteiinien rakennepoikkeavuuksia rintasyöpäkudoksessa. Kolmesta noin 1000 kudoksenäytteen ryhmästä tutkittiin *MRE11*:n, *RAD50*:n ja *NBS1*:n ilmentymistä. Jokaisessa ryhmässä noin 2/3 rintasyövästä oli perinnöllisiä ja loput satunnaisesti ilmaantuvia. Suurin osa potilaista oli *BRCA1/2*-negatiivisia. MRN-kompleksin rakennepoikkeamia löytyi vain vähän (*RAD50*: 3 %, *MRE11*: 7 % ja *NBS1*: 10 %), mutta niiden arvioitiin olevan nimenomaan rintasyöväälle tyypillisiä. MRN-poikkeavuuksia oli enemmän perinnöllisessä rintasyövässä ja erityisesti *BRCA1/2*-positiivisissa syövässä. *RAD50*-muutoksia oli merkitsevästi enemmän perinnöllisessä kuin satunnaisesti ilmaantuvassa rintasyövässä. Kahdeksalla potilaalla kaikkien kolmen geenin ilmentyminen oli poikkeavaa. Näiden potilaiden näytteistä sekvensoitiin kaikkien MRN-kompleksin geenien koodaavat alueet sekä introni-eksonirajat ja etsittiin ituradan mutaatioita. Potilaat olivat *BRCA1/2*-negatiivisia. Kaikki *RAD50*-muutokset olivat tunnettuja polymorfismeja tai intronialueen normaalivariantteja. Tutkimustulosten valossa näyttäisi kuitenkin siltä, että *RAD50*-muutokset voivat lisätä sekä suoraan että MRN-kompleksin muiden proteiinien kautta välittyvien vaikutusten kautta perinnöllistä rintasyöpäalttiutta.

Ranskalaisessa tutkimuksessa (Uhrhammer, Delort & Bignon 2009) etsittiin *RAD50* 687delT – mutaatiota sekä uusia *RAD50*-muutoksia 618 ranskalaiselta perinnöllistä rintasyöpää sairastavalta potilaalta. Vähintään yhden seuraavista kriteereistä oli täytyttävä: a) vähintään kolmella sukulaisella rinta- tai munasarjasyöpä, joista ainakin kaksi ensimmäisen asteen sukulaisilla, b) kahdella sukulaisella rinta- tai munasarjasyöpä, joista toinen bilateraalin tai diagnosoitu ennen 40 vuoden ikää tai c) kahdella sukulaisella rintasyöpä, joista ainakin toinen miehellä. Kaikilta potilailta ja kontrolleilta etsittiin *RAD50* 687delT-muutosta. Lisäksi 231 potilaalta sekvensoitiin koko *RAD50*-geeni. *RAD50* 687delT-mutaatiota tai uusia rintasyöpäalttiutta lisääviä muutoksia ei löytynyt potilailta eikä kontrolleilta.

Caon ym. (2010) artikkelissa raportoitiin tuloksia tutkimuksesta, jossa etsittiin *RAD50* 687delT-muutosta kiinalaisilta perinnöllistä rintasyöpää sairastavilta potilailta (vähintään yhdellä 1. tai 2. asteen

sukulaisella rinta- ja/tai munasarjasyöpä tai rintasyöpä diagnosoitu alle 35-vuotiaana). Yhdelläkään potilaalla tai kontrollilla ei ollut 687delT-mutaatiota tai muita rintasyöpäältä lisääviä muutoksia.

Mosor ym. (2010) etsivät 280 puolalaiselta rintasyöpäpotilaalta muutoksia *RAD50*:n eksoneista 3,4,5 ja 7. Sukuhistoriaa tai *BRCA1/2*-mutaatioita ei otettu huomioon. Tutkimuksessa löydettiin neljä aminohappoa vaihtavaa mutaatiota (379G>S, 577C>T, 695C>A, 943G>T), joista yhden (*RAD50* 577C>T) arvioitiin olevan mahdollisesti haitallinen. Muutos löytyi vain yhdeltä rintasyöpäpotilaalta eikä sen vaikutusta rintasyöpäältätiuteen voitu arvioida. Mitään aiemmin raportoiduista, rintasyöpäältätiutta lisäävistä muutoksista ei löydetty.

Kaikki aiemmat tutkimukset vahvistavat oletusta, että *RAD50* 687delT on ainoastaan suomalaisessa väestössä esiintyvä muutos eikä vaikuta muissa populaatioissa satunnaisesti ilmaantuviin syöpiin tai perinnölliseen rintasyöpäältätiuteen. Tutkimusten keskeisimmät tulokset esitetään taulukossa 2.

Taulukko 2 Keskeisimmät tiedot RAD50-tutkimuksista

Tutkimus	1) potilaat 2) kontrollit	Löydetyt RAD50-mutaatiot	Tulosten merkitys
Heikkinen ym. 2003	1) 151 suomalaista syöpäperhettä 2) 1 000 tervettä kontrollia (192:lta etsittiin löydettyjä, mahdollisesti syöpäriskisiä lisääviä mutaatioita)	ex 2: 204C→T ex 3: 280A→C ex 5: 671G→A ex 5: 687delT (→ proteiinin rakenne muutos)	Ensimmäinen tutkimus, jossa löydettiin yhteys RAD50 687delT-mutaation ja perimöllisen rintasyöpäalttiuden välillä
Heikkinen ym. 2006	1) 317 pohjoissuomalaista rintasyöpäpotilasta ja 130 ruotsalaista, 136 norjalaista sekä 246 islantilaisista rintasyöpäpotilasta 2) 1 000 tervettä kontrollia	suomalaiset: RAD50 687delT, RAD50 Arg224His, uutena RAD50 IVS3→1G>A ulkomaalaiset: -	RAD50 687delT suomalainen founder mutaatio RAD50 IVS3-1G>A lisää syöpäalttiutta.
Tommiska ym. 2006	1) 590 suomalaista rintasyöpäpotilasta, 702 englantilaista rintasyöpäpotilasta 2) 560 tervettä suomalaista kontrollia, 786 tervettä englantilaista kontrollia	suomalaiset: RAD50 687delT ja yksi intronialueen mutaatio englantilaiset: 1048 C>T, 280 A>C, 373 G>A, 577 C>T, 671 G>A, 695 C>A, 943 G>T 980 G>A, 2177 G>A, 2525 T>C, 204 C>T, 3879 C>T ja 6 intronialueen mutaatiota	RAD50 687delT liitettiin matalaan rintasyöpäriskiin Muiden muutosten ei juurikaan arvioitu vaikuttava syöpäriskiin ja RAD50-mutosten osuus rintasyöpäalttiudessa arvioitiin vähäiseksi
Uhrhammer, Delort & Bignon 2009	1) 618 ranskalaista rintasyöpäpotilasta 2) 513 tervettä kontrollia	-	-
Cao ym. 2010	1) 192 kiinalaista rintasyöpäpotilasta 2) 192 tervettä maista	-	-
Mosor ym. 2010	1) 280 puolalaista rintasyöpäpotilasta 2) 328 tervettä kontrollia	ex4: 379G>S, V127I ex5: 577C>T, R193W ex5: 695C>A, A232D ex7: 943G>T, V315L	RAD50 577C>T:n arvioitiin olevan mahdollisesti haitallinen, vaikutusta rintasyöpäalttiuteen ei voitu luotettavasti arvioida

## 1.6 Tutkimuksen tarkoitus

*BRCA1/2*-mutaatiot selittävät vain noin 20 % perinnöllisistä rintasyövistä myös Suomessa. Lisäksi tunnetaan useita harvinaisia geenejä, jotka vaikuttavat yhdessä *BRCA1*:n ja *BRCA2*:n kanssa, mutta eivät kuitenkaan riittävästi selitä taustaltaan epäselviä korkean perinnöllisen rintasyövän tapauksia. Tutkimuksen tarkoituksena oli arvioida *RAD50*-mutaatioiden merkitystä suomalaisväestön korkeassa perinnöllisessä rintasyöpäalttiudessa. Korkean rintasyöpäesiintyvyyden suvuista kerätyistä potilasnäytteistä etsittiin ituradassa olevia *RAD50*-muutoksia sekvensoimalla sen 25 eksonia sekä eksoni-introni -raja-alueet. Uusien rintasyöpäalttiusgeenien löytyminen mahdollistaisi niiden tutkimuksen hyödyntämisen tulevaisuudessa suuren riskin yksilöihin kohdistuvassa perinnöllisyysneuvonnassa, hoidon suunnittelussa ja toteutuksessa sekä ennaltaehkäisevien leikkaushoitojen harkinnassa. Perinnöllisen rintasyöpäalttiuden tutkiminen voi tuoda vastauksia myös ei-perinnöllisen rintasyövän kehittymisen taustalla piileviin tekijöihin.

## 2 AINEISTO JA MENETELMÄT

### 2.1 Aineisto

Tutkimuksen aineisto koostui 82:sta korkean perinnöllisen rintasyöpäriskin vuoksi Tampereen yliopistollisen sairaalan perinnöllisyyspoliklinikalla välillä tammikuu 1997 ja toukokuu 2008 käyneestä potilaasta, joilta ei ole löytynyt *BRCA1/2*-mutaatioita (taulukko 3).

Tutkimukseen valittujen potilaiden piti täyttää jokin seuraavista kriteereistä: 1) Potilaalla tai hänen ensimmäisen asteen sukulaisellaan on ollut rintasyöpä tai munasarjasyöpä alle 30-vuoden iässä tai 2) potilaan kahdella ensimmäisen asteen sukulaisella on ollut rintasyöpä ja/tai munasarjasyöpä ja ainakin toinen syövästä on diagnosoitu ennen 40 vuoden ikää tai 3) potilaan kolmella ensimmäisen asteen sukulaisella on ollut rintasyöpä ja/tai munasarjasyöpä ja ainakin yksi syövästä on diagnosoitu ennen 50 vuoden ikää tai 4) potilaan neljällä tai useammalla ensimmäisen asteen sukulaiselta on diagnosoitu rintasyöpä ja/tai munasarjasyöpä missä tahansa iässä tai 5) samalla potilaalla on ollut sekä rinta- että munasarjasyöpä.

Edellä mainittujen kriteerien perusteella aineistoon valikoitui 65 rintasyöpäpotilasta, yksi munasarjasyöpäpotilas ja viisi potilasta, joilla on todettu sekä rinta- että munasarjasyöpä. Lopuilla 11:llä ei itsellään ole todettu syöpää. Kontrolleina käytettiin Suomen punaisen ristin kautta saatuja terveiltä naisilta otettuja 384:ää verinäytettä.

Taulukko 3 Tutkimusaineisto

Potilaiden lkm (n = 82)	Rinta 57	Bil.rinta 8	Ovario 1	R ja O 5	Terve 11
<b>Ikä dg-hetkellä (rinta/ovario)</b>	n=57	n=16 <sup>1</sup>	n=1	n=10 <sup>2</sup>	-
< 30 v.	13	0	0	1	-
< 40 v.	11	2	0	2	-
< 50 v.	15	7	0	2	-
≥ 50 v.	18	7	1	5	-
<b>Rintasyövän histologia</b>	n=57	n=16 <sup>1</sup>	-	n=5	-
Duktaalinen	41	8	-	5	-
Intraduktaalinen	2	2	-	0	-
Lobulaarinen	9	3	-	0	-
Papillaarinen	1	0	-	0	-
Medullaarinen	1	0	-	0	-
Tuntematon	3	3	-	0	-
<b>Duktaaliset karsinomat, joista gradus tiedossa</b>	n=38	n=6	-	n=5	-
gradus 1	7	3	-	0	-
gradus 2	14	3	-	3	-
gradus 3	17	0	-	2	-
<b>Estrogeenireseptorit tiedossa</b>	n=51	n=11	-	n=4	-
ER+	35	10	-	2	-
ER-	16	1	-	2	-
<b>Progesteronireseptorit tiedossa</b>	n=50	n=11	-	n=4	-
PR+	30	10	-	2	-
PR-	20	1	-	2	-
<b>HER2 tiedossa</b>	n=46	n=11	-	n=4	-
HER2+	14	1	-	1	-
HER2-	32	10	-	3	-
<b>Ovariosyövän histologia</b>	-	-	n=1	n=5	-
Seröösi	-	-	0	0	-
Endometrioidi	-	-	0	2	-
Musinoosi	-	-	0	1	-
Kirkassolu	-	-	0	2	-
Muu	-	-	0	0	-
Tuntematon	-	-	1	0	-
<b>Sairastuneet 1. asteen sukulaiset</b>	n=57	n=8	n=1	n=5	n=11
≥2	25	3	1	0	5
≥1	24	4	0	0	6
0	8	1	0	5	0
<b>Sairastuneet 2. asteen sukulaiset</b>	n=57	n=8	n=1	n=5	n=11
≥2	5	0	0	0	4
≥1	11	1	0	0	0
0	41	7	1	5	7

Rinta: rintasyöpä, Bil.rinta: bilateraalin rintasyöpä, Ovario: munasarjasyöpä, R ja O: rinta- ja ovariosyöpä, ER=estrogeenireseptori, PR= progesteronireseptori, HER2: Human epidermal growth factor receptor 2, <sup>1</sup>kahdeksan potilasta, joilla bilateraalin rintasyöpä - yhteensä 16 syöpätapausta, <sup>2</sup>viisi potilasta, joilla sekä rinta- että munasarjasyöpä, yhteensä 10 syöpää

## 2.2 Menetelmät

### 2.2.1 Geenin monistus PCR-reaktiolla

PCR-reaktio (polymeraasiketjureaktio) on hyvin altis kontaminaatiolle. Työssä käytetään suodattimella varustettuja pipettejä ja reaktiossa tarvittavat aineet yhdistetään ja näytteet ja reaktioseos pipetoidaan näytelevylle vetokaapissa. Tutkittava DNA eristettiin rintasyöpöpotilailta saaduista verinäytteistä. *RAD50*:n alukesekvenssit tilattiin Sigma-Aldrich -firmalta. Alukkeet valmistettiin toiselta tutkimusryhmältä saatujen tietojen perusteella (Tommiska ym. 2006).

PCR-reaktiossa DNA-juosteen osasta monistetaan miljoonia kopioita käyttäen hyväksi DNA-polymeraasientsyymiä. DNA-polymeraasi käyttää mallina toista DNA-juostetta ja rakentaa mallin avulla identtisen juosteen. Entsyymi ei voi aloittaa rakentamista tyhjästä, vaan tarvitsee toimiakseen alukkeet. Alukkeiden avulla voidaan rajata monistettava alue. PCR-reaktio koostuu kolmesta eri vaiheesta, joita toistetaan monta kertaa, ja vie aikaa noin kaksi tuntia. Syklin alussa korkea lämpötila saa aikaan DNA:n kaksoisjuosteen aukeamisen (denaturaatio), mikä mahdollistaa alukkeiden kiinnittymisen. Lämpötilaa laskettaessa alukkeet kiinnittyvät niiden emäsjärjestystä vastaaviin kohtiin DNA-juosteessa (alukkeiden kiinnittymisvaihe eli annealing). Alukeparikohtaiset lämpötilat esitetään taulukossa 4. Kiinnittymisen jälkeen lämpötilaa nostetaan jälleen ja DNA-polymeraasi rakentaa komplementaarisen juosteen mallin avulla (pidentymisvaihe eli elongaatio). Reaktiossa käytetään lämmön kestävä DNA-polymeraasia (HotStartTaq), joka ei hajoa korkeissa lämpötiloissa ja mahdollistaa siten automatisoidun PCR-ohjelman käyttämisen. Denaturaatio, alukkeiden kiinnittyminen ja juosteen rakentaminen toistuvat sykleinä siten, että tuloksena on halutun DNA-pätkän eksponentiaalinen monistuminen. (Lynch & Brown 1990)



PCR-ohjelman kulku:

1. alkudenaturaatio: 95 °C, 10 minuuttia
2. denaturaatio: 95 °C, 30 sekuntia
3. kiinnittyminen: alukeparikohtainen lämpötila (taulukko 4), 30 sekuntia
4. elongaatio: 72 °C, 45 sekuntia
5. Vaiheet 2-4 toistetaan 34 kertaa
6. loppuelongaatio: 72 °C, 5 minuuttia
7. loppujäähdytys 4 °C:een

PCR-reaktion tarvittavat tuotteet:

- 10x HotStart PCR puskuri (Fermentas)
- MgCl<sub>2</sub> (magnesiumkloridi 25 mmol/l) 1,5 µl
- dNTP mix (dinukleotidisekoitus) 0,5 µl
- eksonin for-aluke (konsentraatio 10 µmol/l) 1,5 µl
- eksonin rev-aluke (konsentraatio 10 µmol/l) 1,5 µl
- HotStartTaq-entsyymi 0,15 µl
- DNA 50–100 ng
- H<sub>2</sub>O, seoksen kokonaistilavuus 25 µl

Aineista valmistetaan seos, joka pipetoidaan näytelevyn kuoppiin. Seoksen lisäämisen jälkeen kuoppiin laitetaan kunkin 82 potilaan DNA:ta sekä neljään kuoppaan steriiliä vettä. Jokaista eksonia kohden pipetoidaan yksi näytelevy. Näytelevyn valmistamisen jälkeen DNA monistetaan automaattisella PCR-ohjelmalla. Käytetty PCR-laite oli Bio-Rad Tetrad®2 Peltier thermal cycler (Bio-Rad Laboratories Headquarters, Hercules, CA, USA).

Taulukko 4. Alukekohtaiset kiinnittymis- eli annealing-lämpötilat

<b>Eksoni</b>	<b>Annealing lämpötila (°C)</b>	<b>tuotteen koko (emäsparit)</b>
RAD50_eksoni1	57, 60	245
RAD50_eksoni2	57, 60	225
RAD50_eksoni3	57, 60	296
RAD50_eksoni4	57, 60	385
RAD50_eksoni5	57, 60	388
RAD50_eksoni6	57, 60	300
RAD50_eksoni7	57, 60	360
RAD50_eksoni8	57, 60	359
RAD50_eksoni9	57	386
RAD50_eksoni10	57	300
RAD50_eksoni11	60	289
RAD50_eksoni12	60	300
RAD50_eksoni13	60	386
RAD50_eksoni14	60	300
RAD50_eksoni15	60	366
RAD50_eksoni16	57	387
RAD50_eksoni17	57, 60	245
RAD50_eksoni18	60	293
RAD50_eksoni19	60	307
RAD50_eksoni20	60	296
RAD50_eksoni21	60	325
RAD50_eksoni22	60	284
RAD50_eksoni23	60	249
RAD50_eksoni24	60	248
RAD50_eksoni25	60	294

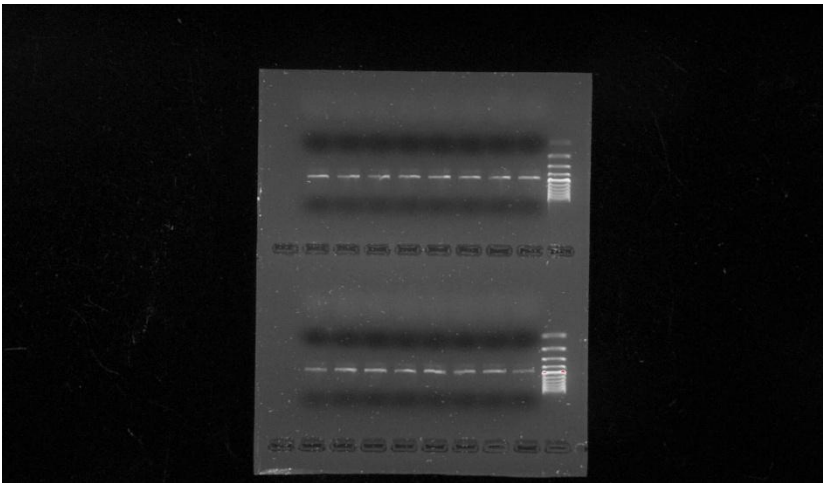
Reaktion jälkeen PCR-tuotteiden riittävyys varmistetaan agarosigeelielektroforeesilla.

Geelielektroforeesissa agarosigeeliin kytketään sähkökenttä, jossa geelillä olevat DNA-näytteet liikkuvat kohti positiivisesti varautunutta elektrodia eri nopeuksilla riippuen niiden koosta.

Agarosijauhe ja puskuriaine (TBE = tris-borate-EDTA) sekoitetaan dekanterilasiin ja sulatetaan mikroaaltouunissa. Syntynyt geeli (pitoisuus 1,5 %) jäädytetään noin 60 asteeseen. Kun geeli on jäähtynyt, siihen lisätään väriainetta (SYBRSafe, käyttölaimeenos 1:10 000 agarosigeeliliuokseen).

Värjäyksen jälkeen geeli kaadetaan tarjottimelle ja lisätään tarvittava määrä kampoja. Geelin annetaan jähmettyä tarjottimella noin 30 minuuttia ennen näytteiden lisäämistä. Geelille pipetoitavat näytteet valmistetaan PCR-tuotteista, jotka valitaan satunnaisesti levyn 82 näytteestä. Näyte ja näytepuskuri

(loading dye) sekoitetaan keskenään. Jähmettyneestä geelistä poistetaan kammat ja näytteet pipetoidaan syntyneisiin kuoppiin. Reunimmaiseksi pipetoidaan kokomarkkeri, jonka muodostamien viivojen perusteella voidaan määrittää monistuneen DNA-pätkän koko. Kuoppien täyttämisen jälkeen elektroforeesilaitte käynnistetään ja näytteitä ajetaan 120–150 voltin jännitteellä noin 30 minuutin ajan. Elektroforeesin jälkeen geeli kuvataan UV-valossa. UV-valon avulla nähdään onko PCR-reaktio onnistunut eli onko DNA-fraktio monistunut riittävästi (kuva 12).



*Kuva 12.* Näkymä geelistä UV-valokammiossa, kun PCR-reaktio on onnistunut (oikeassa reunassa vertailunäyte ja siitä vasemmalle monistuneiden PCR-tuotteiden muodostamat viivat).

### 2.2.2 PCR-tuotteiden puhdistus EXOSAP-menetelmällä

EXOSAP-menetelmässä PCR-tuotteesta poistetaan entsyymaattisesti ylimääräiset nukleotidit ja alukkeet. Puhdistamiseen käytetään kahta reagenssia: Alkalista fosfataasia, joka tuhoaa nukleotidit, ja eksonukleaasi I:tä, joka pilkkoo jäljelle jääneet yksijuosteiset alukkeet.

ExoSAP-sekoitus valmistetaan yhdistämällä seuraavat tilavuudet reagensseja ja steriiliä vettä:

- eksonukleaasi I (konsentraatio 20 U/l) 0,025 µl

- alkalinen fosfataasi (SAP = Shrimp Alkaline Phosphatase, konsentraatio 1 U/ $\mu$ l) 0,250  $\mu$ l
- steriili H<sub>2</sub>O 9,725  $\mu$ l

Seos valmistetaan ja säilytetään jäähauteessa ja käytetään mahdollisimman nopeasti. 25  $\mu$ l:aan PCR-näytettä lisätään 10  $\mu$ l seosta, minkä jälkeen puhdistus suoritetaan +37 celsiusasteessa ja viisi minuuttia +95 celsiusasteessa käytettyjen entsyymien inaktivoimiseksi. Puhdistetut tuotteet säilytetään jääviileäkaapissa tai pakastettuina.

### 2.2.3 Sekvensointi-PCR

Rintasyövälle altistavia geenivirheitä etsittiin suoralla sekvensoinnilla. Suorassa sekvensoinnissa hyödynnetään DNA-polymeraasia ja normaaleista nukleotideista rakenteeltaan poikkeavia dideoksinukleotideja. DNA-polymeraasi ei pysty jatkamaan juosteen rakentamista dideoksinukleotidin jälkeen, mikä pysäyttää synteessin. DNA:ta syntetisoidaan neljässä erillisessä koeputkessa, joissa kussakin on kaikkia normaaleja nukleotideja sekä suhteessa pieni määrä yhtä dideoksinukleotidia. Synteesi pysähtyy aina dideoksidinukleotidin jälkeen tietyn emäksen kohdalla, ja syntyy erimittaisia DNA:n paloja. Erimittaiset palat erotellaan geelielektroforeesilla ja niiden koosta voidaan päätellä emäsjärjestys. Automaattisessa sekvensoinnissa nukleotidit on merkitty fluoresoivaa valoa tuottavalla aineella. Sekvensointipalvelussa PCR-tuotteet luetaan kapillaarielektroforeesin aikana geeliltä fluoresoivaa valoa tunnistavalla CCD-kameralla (Charge-Coupled Device). Laite tunnistaa kunkin dideoksinukleotidin sen lähettämän fluoresoivan valon perusteella ja tuottaa kromatogrammin, josta nähdään DNA-pätkän emäsjärjestys. (Dorit ym. 2001, solunetti.fi)

Tutkimuksessa sekvensoitiin koko *RAD50* -geenin koodaava alue sekä eksoni-intronirajat. Sekvensointiin tarvitaan tislattua vettä, puhdistettua PCR-tuotetta, oligonukleotidialuke (for/rev), kaikkia neljää deoksiribonukleosiditriposfaattia (G, A, T, C) sekä kaikkia neljää dideoksiribonukleosiditriposfaattia, jotka on kukin merkitty eriväristä fluoresoivaa valoa tuottavalla aineella (BigDye-entsyymi). Määrät ovat seuraavat:

- 2,5 x puskuri 3  $\mu$ l (ABI PRISM®BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit)
- aluke (for / rev), konsentraatio 0,8  $\mu$ M 2  $\mu$ l
- BigDye-entsyymi 1  $\mu$ l
- tislattu vesi 1  $\mu$ l
- puhdistettu PCR-tuote 3  $\mu$ l

Seos valmistetaan jäähauteessa edellä kuvatuista reagensseista. Seos ja puhdistettu PCR-tuote pipetoidaan PCR-levyn kuoppiin. Tämän jälkeen näytteet sekoitetaan huolellisesti ja ajetaan automaattisella sekvensointi-PCR -ohjelmalla, jonka kesto on noin kolme tuntia. Jokaisesta näytteestä tehdään reaktiot sekä for- että rev-suuntaan. Sekvensointi-PCR -ohjelman kulku:

1. denaturaatio: 96 °C, 30 sekuntia
2. kiinnittyminen: 50 °C, 20 sekuntia
3. elongaatio: 60 °C, 4 minuuttia
4. Vaiheet 1-3 toistetaan 26 kertaa
5. loppujäähdytys 11 °C:een

Sekvensointi-PCR:n jälkeen tuotteet saostetaan. Jokaiseen näytelevyn kuoppaan pipetoidaan absoluuttista etanolihydroksidia (EtOH) ja natriumasetaattia (NaAC). Levyjä pidetään huoneenlämmössä 10 minuuttia ja sentrifugoidaan 30 minuuttia nopeudella 3500 rpm (kierrosta / minuutti). Ensimmäisen sentrifugoinnin jälkeen levyjen neste imeytetään paperiin ja levy sentrifugoidaan paperin päällä ylösalaisin minuutin ajan nopeudella 2 000 rpm (kierrosta minuutissa). Toisen sentrifugoinnin jälkeen kuoppiin pipetoidaan 100  $\mu$ l 70-prosenttista etaanolihydroksidia ja sentrifugoidaan vielä 10 minuuttia nopeudella 3 500 rpm. Lopuksi neste imeytetään paperiin ja sentrifugoidaan levy vielä kerran ylösalaisin minuutin ajan nopeudella 200 rpm. Edellä kuvatuilla menetelmillä saadaan sekvensointi-PCR -tuote saostumaan kuoppien pohjalle.

Saostamisen jälkeen tuotteet liuotetaan formamidiin ja toimitetaan COFA:n (Core facilities and research services) sekvensointipalveluun (ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer).

COFA:lta saadut sekvensointitulokset analysoidaan Sequencher v.4.7. software – ohjelmalla (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA).

#### 2.2.4 In silico – analyysi

Aminohappoa vaihtavien muutosten vaikutusta proteiinin rakenteeseen ja toimintaan tarkasteltiin in silico -analyysin avulla. In silico -analyysissä luodaan tietokoneavusteisesti malli proteiinimolekyylistä. Mallin avulla arvioidaan miten proteiinia koodaavan geenin mutaatio vaikuttaa proteiinin rakenteeseen ja toimintaan.

Tiettyä proteiinia koodaavan geenin mutaatio voi vaikuttaa proteiinin toimintaan monella tavalla. Mutaatio voi vaikuttaa proteiinin signaali-peptidin rakenteeseen ja siten aiheuttaa proteiinin virheellisen lokalisaation ja toiminnan solussa. Mutaatio voi muuttaa proteiinin kolmiulotteista rakennetta ja siten vaarantaa proteiinin stabiliteetin; aminohapon vaihtuminen voi johtaa muun muassa sähköisten vuorovaikutusten ja peptidiketjujen välisten vuorovaikutusten muuttumiseen ja tätä kautta estää tai muuttaa proteiinin toimintaa tai johtaa proteiinin hajoamiseen. Geenimuutos voi johtaa myös proteiinin lisääntyneeseen kasautumiseen ja sitä kautta heikentää proteiinin toimintaa. *RAD50*:stä löydettyjen aminohappoa vaihtavien muutosten vaikutuksia arvioitiin Pathogenic-Or-Not-Pipeline -ohjelman (PON-P) avulla. PON-P käyttää hyväkseen useita mallinnusmenetelmiä, joissa arvioidaan mutaation vaikutusta edellä kuvattuihin proteiinin ominaisuuksiin. PON-P:iin syötetään geenimuutosta koskevat tarvittavat tiedot, joiden perusteella ohjelma muodostaa arvion mutaation vaikutuksesta proteiinin toimintaan. (Thusberg & Vihinen 2009)

### 2.2.5 MiRNA-tietokanta

Mikro-RNA (miRNA) – molekyylit estävät mRNA:n (lähetti-RNA) emäsjärjestyksen luentaa ja proteiinin rakentumista (translaatio) eli osallistuvat geenien ilmentymisen säätelyyn. MiRNA-molekyylien ilmentyminen syöpäsoluissa on usein poikkeavaa, mikä altistaa syövän synnylle. MiRNA:t lisäävät onkoproteiinien muodostumista ja vähentävät kasvunrajoitegeenien ilmentymistä, minkä seurauksena syöpäsolujen jakaantuminen kiihtyy, apoptoosi estyy ja angiogeneesi ja tunkeutuminen ympäröiviin kudoksiin lisääntyy. (Robbins & Cotran Pathologic basis of Disease 2010) MiRNA-tietokannan avulla voidaan tarkistaa, onko *RAD50*:stä löydettyjen muutosten kohdalla perimässä tunnettuja mikro-RNA – molekyylejä. (miRBase)

## 3 TULOKSET

*RAD50*:stä löydettiin seitsemän mutaatiota, joista kolme oli uusia (taulukko 5). Uusien muutosten kohdalla perimässä ei ollut tunnettuja miRNA-molekyylejä. Vain yksi mutaatioista, 1544A>G, oli aminohappoa vaihtava. Muutos löytyi yhdeltä potilaalta, jolla todettiin rintasyöpä 39-vuotiaana, ja jolla oli yksi syöpään sairastunut ensimmäisen asteen sukulainen. Mutaatiolla ei ollut vaikutusta proteiinin rakenteeseen in silico –analyysissä. Muutos löytyi myös neljältä kontrollipotilaalta eikä sen siten arvioitu lisäävän rintasyöpäriskiä. 1544A>G oli ainoa *RAD50*:n koodaavan alueen ja aminohappoa vaihtava muutos. Proteiinia koodaavan alueen muutokset altistavat todennäköisimmin taudille, minkä vuoksi 1544A>G oli ainoa muutos, joka analysoitiin myös kontrolleilta. Taulukossa 6 esitetään uusien *RAD50*-mutaatiopositivisten potilaiden syöpätyypit ja suvussa esiintyvät syöpätapaukset.

*Taulukko 5* Tutkimuksessa löydetyt *RAD50*-mutaatiot

Mutaatio	Vaikutus proteiiniin	Kantajapotilaat	Kantajakontrollit	P-arvo	OR; 95 % CI
1544A>G <sup>1</sup>	Asp515Gly	1/82	4/384	1.000	1.17;-0.13-10.63
2398-32A>G <sup>1</sup>	-	1/82	ei analysoitu	-	-
3475+33C>G <sup>1</sup>	-	1/82	ei analysoitu	-	-
551+19G>A	-	36/82	ei analysoitu	-	-
2719-31A>G	-	1/82	ei analysoitu	-	-
3164+49G>C	-	3/82	ei analysoitu	-	-
3475+24A>G	-	9/82	ei analysoitu	-	-

OR= odds ratio = todennäköisyysuhde, CI = confidence interval = luottamusväli, <sup>1</sup>= uudet mutaatiot

*Taulukko 6* Uusien *RAD50*-mutaatioposiivisten potilaiden syöpätyypit ja suvussa esiintyvät syöpätapaukset

Perheen tunnistenumero	Mutaatio	Syöpätyyppi (diagnoosi-ikä)	Histologia, aste	Reseptoristatus	Suvun muut syövät (diagnoosi-ikä)
257	1544A>G	rinta (39)	lobulaarinen, II	ER+, PR+, HER2-	rinta (69)
110	2398-32A>G	rinta (26)	duktaalinen, II	ER+, PR+, HER2+	rinta (48) eturauhanen (64) tuntematon (84)
225	3475+33C>G	rinta (43)	duktaalinen, I	ER+, PR+, HER2-	rinta x2 (52, 77) munuainen (64)

rinta= rintasyöpä; eturauhanen= eturauhassyöpä; tuntematon= syöpä, jossa primaarituumori tuntematon; munuainen=munuaiassyöpä ER=estrogenireseptori; PR= progesteronireseptori; HER2= Human epidermal growth factor receptor 2; lobulaarinen= rauhasperäinen rintasyöpä; duktaalinen= tiehytperäinen rintasyöpä. **Potilaan sisaruksilla tai heidän lapsillaan todetut syövät. Potilaan isän puoleisessa suvussa diagnosoidut syövät.**



## 4 POHDINTA

Tutkimuksessa selvitettiin *RAD50*- mutaatioiden merkitystä perinnöllisessä rintasyöpäalttiudessa suomalaisessa väestössä etsimällä korkean rintasyöpäesiintyvyyden suvuista kerätyistä potilasnäytteistä ituradassa olevia *RAD50*-geenin mutaatioita sekvensoimalla sen 25 eksonia sekä eksoni-introni -raja-alueet. *RAD50*:stä löydettiin seitsemän muutosta, joista kolme oli uusia. Vain yksi niistä, 1544A>G, oli aminohappoa vaihtava. Muutos löytyi yhdeltä potilaalta ja neljältä terveeltä naiselta eikä sen arvioitu lisäävän rintasyöpäriskiä.

*RAD50*:stä on löydetty kolmessa aiemmassa tutkimuksessa *RAD50* 687delT-muutos, jonka on esitetty olevan suomalainen perustaja- eli founder-mutaatio. Se on liitetty matalaan perinnölliseen rintasyöpäriskiin (Heikkinen ym. 2003, Heikkinen ym. 2006, Tommiska ym. 2006). Omassa tutkimuksessamme emme löytäneet *RAD50* 687delT-mutaatiota keneltäkään. Myöskään toista Heikkinen ym. vuonna 2006 löytämää muutosta, *RAD50* IVS3-1G>A, jonka arvioitiin lisäävän perinnöllistä rintasyöpäalttiutta, emme tutkimuksessa löytäneet. Suomalaisväestön ulkopuolella tehdyissä tutkimuksissa ei ole löytynyt *RAD50* 687delT-mutaatiota (Cao ym. 2010, Delort & Bignon 2009, Mosor ym. 2010, Uhrhammer 2009). Suomalainen väestö on kehittynyt pienestä alueelle muuttaneesta perusväestöstä ja muuttoliike Suomeen ja täältä pois on ollut vähäistä, jolloin väestöön on rikastunut tietyt alkuperäisväestössä esiintyneet perimän muutokset. Muutosten ilmenemisessä on asutushistoriasta johtuen myös alueellisia eroja ja jotkut mutaatioista ovat rikastuneet vain tietyille alueille Suomessa. (Sarantaus ym. 2000) Oma tutkimusaineistomme koostui rajallisesta määrästä pirkanmaalaisia potilaita, joten eroavaisuudet mutaatioiden esiintymisessä aikaisempiin kotimaisiin tutkimuksiin verrattuna voivat selittää, miksi tutkimuksessa ei löydetty aiemmin suomalaiseksi perustajamutaatioksi arvioitua *RAD50* 687delT-muutosta.

*RAD50*-muutokset heikentävät MRN-kompleksin toimintaa DSB:n korjaamisessa (Brooks ym. 2012, Hohl ym. 2011, Waltes ym. 2009, Zhong ym. 2005). Lisäksi on havaittu, että MRN-kompleksin ilmeneminen on erilaista syöpäsoluissa ja tavallisissa soluissa, mikä vaikuttaa syöpäkasvaimen sytostaattiherkkyyteen ja lisää syöpäalttiutta (Abuzeid ym. 2009, Kavitha ym. 2010, Hsu ym. 2007). Joidenkin sytostaattien vaikutus välittyy siis ainakin osittain MRN-kompleksin proteiinien ilmenemisen kautta. Tietoa proteiineja koodaavien geenien mutaatioista voisi käyttää hyväksi hoidon suunnittelussa ja kehittää tehokkaita keinoja sekä syövän ehkäisyyn että jo puhjenneen sairauden hoitoon. Sopivan virus- tai muun vektorin eli geenikuljettajan avulla pystyttäisiin ehkä korvaamaan perimässä oleva virheellinen geeni virheettömällä, jolloin haitallisen geenituotteen ilmeneminen solussa vähenee ja syöpää ei pääse kehittymään.

*BRCA1/2*-mutaatiot ja tunnetut keskinkertaiseen rintasyöpäriskiä liittyvät geenimutaatiot (Stratton & Rahman 2008, Turnbull & Rahman 2008) selittävät vain osan perinnöllisestä rintasyövästä. Nykykäsityksen mukaan perinnöllisen rintasyövän taustalla on useita matalaan rintasyöpäriskiä liittyviä geenejä, jotka vuorovaikuttavat sekä keskenään että korkean riskien geenien kanssa, ja joiden mutaatioiden yhteisvaikutus perinnölliseen rintasyöpäalttiuteen on todennäköisesti huomattava. (Antoniou ym. 2001, Antoniou ym. 2002, Antoniou & Easton 2006, Bradbury & Olopade 2007, Easton 1999, Nathanson, Wooster & Weber 2001, Ripperger ym. 2009, Startton & Rahman 2008, Vehmanen ym. 1997). Valtaosa näistä geenimuutoksista on vielä tuntemattomia, eikä tässäkään tutkimuksessa löytynyt merkittävää rintasyöpäriskiä lisäävää geenivirhettä. Tutkimuksessa todettiin yksittäisiä *RAD50*-muutoksia, joiden merkityksen tarkempi arviointi edellyttää vielä lisätutkimuksia.

Nykyiset tavat arvioida perinnöllistä rintasyöpäriskiä eivät ole riittävän tarkkoja eikä kohdennettua perinnöllisyysneuvontaa voida tarjota muille kuin naisille, joilla on korkea perinnöllinen rintasyöpäriski (Pharoah ym. 2008). Polygeeniseen periytymiseen pohjautuvat mallit osoittavat, että jos kaikki rintasyöpägeenit löydetään, 50 %:lta korkean riskin yksilöistä löytyisi 88 % rintasyövästä. Jos taas käytetään nykyisiä malleja, vastaava luku on 62 %. Korkean riskin potilaisiin kohdistetut interventiot voivat potentiaalisesti vähentää rintasyöpäkuolleisuutta 75 %:lla. (Pharoah ym. 2002) Uusien mutaatioiden tunnistaminen auttaa geneettisten riskiprofiilien luomisessa. Tietoa voidaan

käyttää hyväksi syövän ennaltaehkäisyssä ja tarjota yksilöllistä, geneettiseen riskiprofiiliin perustuvaa perinnöllisyysneuvontaa ja seuranta. Nykyiset koko väestöön kohdistuvat edulliset rintasyövän seulontamenetelmät (mammografia) voidaan kohdistaa paremmin ja keskittää kalliimpia ja tarkempia menetelmiä korkea riskin yksilöiden seulontaan Naiset, joilla syöpäriski on vähäinen, voidaan turvallisesti sulkea perinnöllisyysneuvonnan ulkopuolelle. Tulevaisuudessa voidaan ollaan tilanteessa, jossa seulonnan, perinnöllisyysneuvonnan ja ennaltaehkäisevien hoitojen avulla suurin osa syöivistä pystytään estämään. Geenitesteistä tulee yhtä mutkaton asia kuin verensokerin tai tulehdusarvojen mittaamisesta ja vain hyvin pieni osa alkavista kasvaimista pääsee koskaan kehittymään metastaaseja lähettäväksi rintasyöväksi. Lisäksi perinnöllisen rintasyöpäalttiuden tutkiminen voi tuoda vastauksia myös ei-perinnöllisen rintasyövän kehittymisen taustalla piileviin tekijöihin.

## 5 LÄHTEET

Abuzeid WM, Jiang X, Shi G, Wang H, Paulson D, Araki K, et al. Molecular disruption of RAD50 sensitizes human tumor cells to cisplatin-based chemotherapy. *J Clin Invest* 2009 Jul;119(7):1974-1985.

Adank MA, Jonker MA, Kluijft I, ym. CHEK2\*1100delC homozygosity is associated with a high breast cancer risk in women. *J Med Genet* 2011;48:860-3.

Antoniou AC ja Easton DF. Models of genetic susceptibility to breast cancer. *Oncogene* 2006;25:5898-905.

Antoniou AC, Pharoah PD, McMullan G, Day NE, Ponder BA ja Easton D. Evidence for further breast cancer susceptibility genes in addition to BRCA1 and BRCA2 in a population-based study. *Genet Epidemiol* 2001;21:1-18.

Antoniou AC, Pharoah PD, McMullan G, ym. A comprehensive model for familial breast cancer incorporating BRCA1, BRCA2 and other genes. *Br J Cancer* 2002;86:76-83.

Antoniou AC, Spurdle AB, Sinilnikova OM, ym. Common breast cancer-predisposition alleles are associated with breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Am J Hum Genet* 2008;82:937-48.

Antoniou AC, Pharoah PP, Smith P, Easton DF. The BOADICEA model of genetic susceptibility to breast and ovarian cancer. *Br J Cancer* 2004 Oct 18;91(8):1580-1590

Artandi SE, DePinho RA. Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis* 2010 Jan;31(1):9-18.

Bartkova J, Tommiska J, Oplustilova L, ym. Aberrations of the MRE11-RAD50-NBS1 DNA damage sensor complex in human breast cancer: MRE11 as a candidate familial cancer-predisposing gene. *Mol Oncol* 2008;2:296-316.

Beiki O, Hall P, Ekblom A, Moradi T. Breast cancer incidence and case fatality among 4.7 million women in relation to social and ethnic background: a population-based cohort study. *Breast Cancer Res* 2012 Jan 6;14(1):R5.

Borde V ja Cobb J. Double functions for the Mre11 complex during DNA double-strand break repair and replication. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41:1249-53.

Bradbury AR ja Olopade OI. Genetic susceptibility to breast cancer. *Rev Endocr Metab Disord* 2007;8:255-67.

Brooks JD, Teraoka SN, Reiner AS, ym. Variants in activators and downstream targets of ATM, radiation exposure, and contralateral breast cancer risk in the WECARE study. *Hum Mutat* 2012;33:158-64.

Cancer stat fact sheets, Finland – Breast. Finnish Cancer Registry.  
<http://stats.cancerregistry.fi/stats/fin/vfin0021i0.html>

Cao AY, Hu Z, Yin WJ, Jin W ja Shao ZM. Some common mutations of RAD50 and NBS1 in western populations do not contribute significantly to Chinese non-BRCA1/2 hereditary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010;121:247-9.

Capasso I, Esposito E, Pentimalli F, ym. Metabolic syndrome affects breast cancer risk in postmenopausal women: National Cancer Institute of Naples experience. *Cancer Biol Ther* 2011;10:1240-3.

Claesson-Welsh L, Welsh M. VEGFA and tumour angiogenesis. *J Intern Med* 2013 Feb;273(2):114-127.

Comet B, Cutuli B, Penault-Llorca F, Bonnetterre J, Belkacemi Y. Male breast cancer: a review. *Bull Cancer* 2009 Feb;96(2):181-189.

Demuth I ja Digweed M. The clinical manifestation of a defective response to DNA double-strand breaks as exemplified by Nijmegen breakage syndrome. *Oncogene* 2007;26:7792-8.

Desrichard A, Bidet Y, Uhrhammer N ja Bignon YJ. CHEK2 germline mutation contribution to hereditary breast cancer in non-BRCA-mutated families. *Breast Cancer Res* 2011;13:R119.

Dorit RL, Ohara O, Hwang CB, Kim JB, Blackshaw S. Direct DNA sequencing of PCR products. *Curr Protocol Mol Biol* 2001 Nov; Chapter 15:Unit 15.2.

Duodecim. Syöpätaudit 2007, s. 16-74, 484-508.

Dzikiewicz-Krawczyk A. The importance of making ends meet: mutations in genes and altered expression of proteins of the MRN complex and cancer. *Mutat Res* 2008;659:262-73.

Easton DF. How many more breast cancer predisposition genes are there?. *Breast Cancer Res* 1999;1:14-7.

Easton DF, Pooley KA, Dunning AM, ym. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature* 2007;447:1087-93.

Eeles RA. Screening for hereditary cancer and genetic testing epitomised by breast cancer. *Eur J Cancer* 1999;35:1954–62

Eerola H, Aittomaki K, Asko-Seljavaara S, Nevanlinna H, von Smitten K. Hereditary breast cancer and handling of patients at risk. *Scand J Surg* 2002;91(3):280-287.

Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 2003 Jun;3(6):453-458.

Giardiello FM, Brensinger JD, Tersmette AC, ym. Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome. *Gastroenterology* 2000;119:1447-53.

Gomes FG, Nedel F, Alves AM, Nor JE, Tarquinio SB. Tumor angiogenesis and lymphangiogenesis: tumor/endothelial crosstalk and cellular/microenvironmental signaling mechanisms. *Life Sci* 2013 Feb 7;92(2):101-107.

Gunes C, Rudolph KL. The role of telomeres in stem cells and cancer. *Cell* 2013 Jan 31;152(3):390-393.

Kumar V, Abbas A, Fausto N, Aster J. The Breast ja Neoplasia. Kirjassa: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Eight Edition. Philadelphia: Saunders Elsevier 2010, s. 259-327, 1073-79.

Harper P. General aspects of genetic counseling. Kirjassa: Practical genetic counseling, sixth edition. London: Edward Arnold 2004, s. 3-145.

Heikkinen K, Karppinen SM, Soini Y, Makinen M ja Winqvist R. Mutation screening of Mre11 complex genes: indication of RAD50 involvement in breast and ovarian cancer susceptibility. *J Med Genet* 2003;40:e131.

Heikkinen K, Rapakko K, Karppinen SM, ym. RAD50 and NBS1 are breast cancer susceptibility genes associated with genomic instability. *Carcinogenesis* 2006;27:1593-9.

Hohl M, Kwon Y, Galvan SM, ym. The Rad50 coiled-coil domain is indispensable for Mre11 complex functions. *Nat Struct Mol Biol* 2011;18:1124-31.

Hsu HM, Wang HC, Chen ST, Hsu GC, Shen CY ja Yu JC. Breast cancer risk is associated with the genes encoding the DNA double-strand break repair Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16:2024-32.

Jackson SP. Sensing and repairing DNA double strand breaks. *Carcinogenesis* 2002;23:687-696.

Kavitha CV, Choudhary B, Raghavan SC, Muniyappa K. Differential regulation of MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) complex subunits and telomerase activity in cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010 Sep 3;399(4):575-580.

Keller G, Vogelsang H, Becker I, ym. Diffuse type gastric and lobular breast carcinoma in a familial gastric cancer patient with an E-cadherin germline mutation. *Am J Pathol* 1999;155:337-42.

Khanna Kum Kum ja Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Gen* 2001;27:247-254.

Kilic-Okman T, Yardim T, Gucer F, Altaner S ja Yuce MA. Breast cancer, ovarian gonadoblastoma and cervical cancer in a patient with Peutz-Jeghers Syndrome. Arch Gynecol Obstet 2008;278:75-7.

Kumar V, Abbas A, Fausto N, Aster J. The Breast ja Neoplasia. Kirjassa: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Eight Edition. Philadelphia: Saunders Elsevier 2010, s. 259-327, 1073-79.

Kuusisto KM, Bebel A, Vihinen M, Schleutker J ja Sallinen SL. Screening for BRCA1, BRCA2, CHEK2, PALB2, BRIP1, RAD50, and CDH1 mutations in high-risk Finnish BRCA1/2-founder mutation-negative breast and/or ovarian cancer individuals. Breast Cancer Res 2011;13:R20.

Lamarche BJ, Orazio NI ja Weitzman MD. The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance. FEBS Lett 2010;584:3682-95.

Lammens K, Bemeleit DJ, Mockel C, ym. The Mre11:Rad50 structure shows an ATP-dependent molecular clamp in DNA double-strand break repair. Cell 2011;145:54-66.

Langerak P ja Russell P. Regulatory networks integrating cell cycle control with DNA damage checkpoints and double-strand break repair. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2011;366:3562-71.

Lavin MF. ATM and the Mre11 complex combine to recognize and signal DNA double-strand breaks. Oncogene 2007;26:7749-58.

Li FP ja Fraumeni JF, Jr. Rhabdomyosarcoma in children: epidemiologic study and identification of a familial cancer syndrome. J Natl Cancer Inst 1969;43:1365-73.

Lynch J ja Brown J. The polymerase chain reaction: current and future clinical applications. J Med Genet 1990; 27: 2-7.

Malkin D, Li FP, Strong LC, ym. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. Science 1990;250:1233-8.

Masciari S, Larsson N, Senz J, ym. Germline E-cadherin mutations in familial lobular breast cancer. J Med Genet 2007;44:726-31.

Melhem-Bertrandt A, Bojadzieva J, Ready KJ, Obeid E, Liu DD, Gutierrez-Barrera AM, et al. Early onset HER2-positive breast cancer is associated with germline TP53 mutations. Cancer 2012 Feb 15;118(4):908-913.

miRBase. <http://www.mirbase.org/>

Mitrunen K ja Hirvonen A. Molecular epidemiology of sporadic breast cancer. The role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism. Mutat Res 2003;544:9-41.

Moserle L, Casanovas O. Anti-angiogenesis and metastasis: a tumour and stromal cell alliance. J Intern Med 2013 Feb;273(2):128-137.

- Mosor M, Ziolkowska-Suchanek I, Roznowski K, Baranowska M, Januszkiewicz-Lewandowska D ja Nowak J. RAD50 gene mutations are not likely a risk factor for breast cancer in Poland. *Breast Cancer Res Treat* 2010;123:607-9.
- Nathanson KL, Wooster R ja Weber BL. Breast cancer genetics: what we know and what we need. *Nat Med* 2001;7:552-6.
- Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010 Jan;2(1):a001008.
- Petrucci N, Daly MB, Feldman GL. *BRCA1* and *BRCA2* Hereditary Breast and Ovarian Cancer. Gene Reviews 1998 Sep 4 [viimeinen päivitys 2011 Jan 20].
- Pharoah PD, Antoniou A, Bobrow M, Zimmern RL, Easton DF, Ponder BA. Polygenic susceptibility to breast cancer and implications for prevention. *Nat Genet* 2002 May;31(1):33-36.
- Pharoah PD, Antoniou AC, Easton DF, Ponder BA. Polygenes, risk prediction, and targeted prevention of breast cancer. *N Engl J Med* 2008 Jun 26;358(26):2796-2803.
- Poznic M. Retinoblastoma protein: a central processing unit. *J Biosci* 2009 Jun;34(2):305-312.
- Prado A, Andrades P ja Parada F. Recent developments in the ability to predict and modify breast cancer risk. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2010;63:1581-7.
- Prokopcova J, Kleibl Z, Banwell CM ja Pohlreich P. The role of ATM in breast cancer development. *Breast Cancer Res Treat* 2007;104:121-8.
- Pukkala E, Sankila R, Rautalahti M. Naisten uusien syöpätapausten vuosittain todettu määrä vuosina 1982-2009 ja ennustettu tapausmäärä vuoteen 2027 asti. Syöpä Suomessa 2011. Suomen syöpäyhdistyksen julkaisu nro 82. <http://www.cancer.fi/syoparekisteri/tilastot/grafiikkaa-syopa-suomessa-2011-j/naisten-uusien-syopatapausten-vu/>
- Pylkas K, Tommiska J, Syrjakoski K, ym. Evaluation of the role of Finnish ataxia-telangiectasia mutations in hereditary predisposition to breast cancer. *Carcinogenesis* 2007;28:1040-5.
- Rahman N, Seal S, Thompson D, ym. PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. *Nat Genet* 2007;39:165-7.
- Ripperger T, Gadzicki D, Meindl A ja Schlegelberger B. Breast cancer susceptibility: current knowledge and implications for genetic counselling. *Eur J Hum Genet* 2009;17:722-31.
- Robson M ja Offit K. Clinical practice. Management of an inherited predisposition to breast cancer. *N Engl J Med* 2007;357:154-62.
- Sankari SL, Masthan KM, Babu NA, Bhattacharjee T, Elumalai M. Apoptosis in cancer--an update. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012;13(10):4873-4878.



Sarantaus L, Huusko P, Eerola H, Launonen V, Vehmanen P, Rapakko K, et al. Multiple founder effects and geographical clustering of BRCA1 and BRCA2 families in Finland. *Eur J Hum Genet* 2000 Oct;8(10):757-763.

Seal S, Thompson D, Renwick A, ym. Truncating mutations in the Fanconi anemia J gene BRIP1 are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles. *Nat Genet* 2006;38:1239-41.

Silva E, Gatalica Z, Snyder C, Vranic S, Lynch JF ja Lynch HT. Hereditary breast cancer: part II. Management of hereditary breast cancer: implications of molecular genetics and pathology. *Breast J* 2008;14:14-24. (EI TULOSETTU)

Singh G, Odriozola L, Guan H, Kennedy CR ja Chan AM. Characterization of a novel PTEN mutation in MDA-MB-453 breast carcinoma cell line. *BMC Cancer* 2011;11:490.

Starink TM, van der Veen JP, Arwert F, ym. The Cowden syndrome: a clinical and genetic study in 21 patients. *Clin Genet* 1986;29:222-33.

[solunetti.fi/fi/solubiologia/sangerin\\_menetelma/2/](http://solunetti.fi/fi/solubiologia/sangerin_menetelma/2/)

Stratton MR ja Rahman N. The emerging landscape of breast cancer susceptibility. *Nat Genet* 2008;40:17-22.

Suomen Syöpärekisteri, [www.syoparekisteri.fi](http://www.syoparekisteri.fi), päivitetty 06.08.2012

Thorstenson YR, Roxas A, Kroiss R, ym. Contributions of ATM mutations to familial breast and ovarian cancer. *Cancer Res* 2003;63:3325-33.

Thusberg J ja Vihinen M. Pathogenic or not? And if so, then how? Studying the effects of missense mutations using bioinformatics methods. *Hum Mutat* 2009;30:703-14.

Tommiska J, Seal S, Renwick A, ym. Evaluation of RAD50 in familial breast cancer predisposition. *Int J Cancer* 2006;118:2911-6.

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

Uhrhammer N, Delort L ja Bignon YJ. Rad50 c.687delT does not contribute significantly to familial breast cancer in a French population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18:684-5.

van der Groep P, van der Wall E, van Diest PJ. Pathology of hereditary breast cancer. *Cell Oncol (Dordr)* 2011 Apr;34(2):71-88.

Vehmanen P, Friedman LS, Eerola H, ym. Low proportion of BRCA1 and BRCA2 mutations in Finnish breast cancer families: evidence for additional susceptibility genes. *Hum Mol Genet* 1997;6:2309-15.

Walerych D, Napoli M, Collavin L, Del Sal G. The rebel angel: mutant p53 as the driving oncogene in breast cancer. *Carcinogenesis* 2012 Nov;33(11):2007-2017.

Waltes R, Kalb R, Gatei M, ym. Human RAD50 deficiency in a Nijmegen breakage syndrome-like disorder. *Am J Hum Genet* 2009;84:605-16.

Williams GJ, Lees-Miller SP ja Tainer JA. Mre11-Rad50-Nbs1 conformations and the control of sensing, signaling, and effector responses at DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)* 2010;9:1299-306.

Zhong H, Bryson A, Eckersdorff M ja Ferguson DO. Rad50 depletion impacts upon ATR-dependent DNA damage responses. *Hum Mol Genet* 2005;14:2685-93.

Zhong Q, Chen CF, Li S, ym. Association of BRCA1 with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response. *Science* 1999;285:747-50.