



Γονίδια κληρονομούμενου καρκίνου μαστού και ωοθηκών



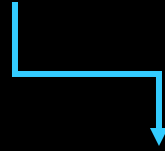
Χρήστος Κρούπης, MSc, PhD

*Καθηγητής Κλινικής Βιοχημείας -Μοριακής Διαγνωστικής
Αττικόν Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο,
Ιατρική Σχολή,
Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών*

Θεματολογία ομιλίας

- ◆ Κληρονομούμενος καρκίνος μαστού/ωοθηκών και σύνδεση με επιδιόρθωση DNA (ομόλογος ανασυνδυασμός)
- ◆ Γονίδια *BRCA1* και *BRCA2*
- ◆ Νέο *PALB2* γονίδιο – άλλα γονίδια
- ◆ Μέθοδοι ανίχνευσης μεταλλάξεων
- ◆ Αποτελέσματα γενετικής ανάλυσης στον ελληνικό πληθυσμό
- ◆ Αλγόριθμος γενετικής ανάλυσης
- ◆ Χρήση φαινοτύπου για ανίχνευση φορέων? *BRCA1*ness
- ◆ Στοχευμένες Θεραπευτικές επιλογές

25% των περιπτώσεων οικογενής (familial) καρκίνος



20 -40 % κληρονομούμενος (hereditary) καρκίνος

Συνολικά:

-7% των περιπτώσεων καρκίνου μαστού (BrCa)

-10% των περιπτώσεων καρκίνου ωοθηκών (OvCa)



Γενετικοί παράγοντες στον κληρονομούμενο Br/Ov Ca υψηλή/μέτρια διεισδυτικότητα

- ❖ **BRCA1 (1994)**
 - ❖ **BRCA2 (1995)**
- } (20-40% των περιπτώσεων)

Paul Broca, 1868
Traite des Tumeurs, Paris
(1^η αναφορά σε κληρονομούμενο
BrCa+μετάσταση)

❖ Συνδρομικές μορφές

- **p53** Li-Fraumeni
- **PTEN** Cowden
- **MLH1** Muir-Torre
- **STK/LKB1** Peutz-Jeghers
- **CDH1** Diffuse gastric/lobular BrCa

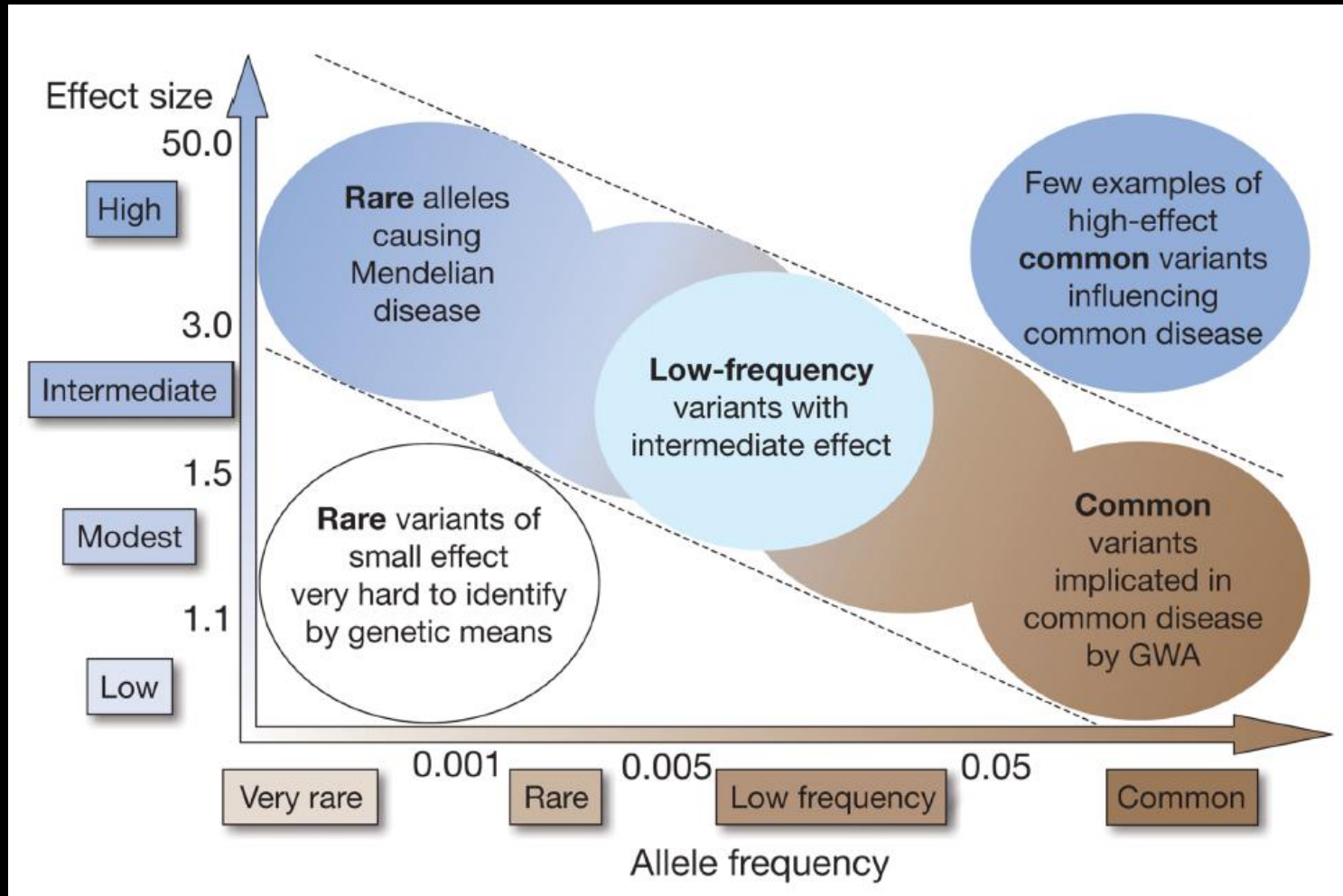
❖ Μέτριας διεισδυτικότητας γονίδια

- **ATM** Αταξία-Τηλαγγειεκτασία
- **CHEK2**
- **BRIP1**
- **PALB2 (2006)**

❖ Συνδυασμός συχνών αλληλίων χαμηλής διεισδυτικότητας (GWAS)

- ❖ *Common disease – common alleles*

Missing heritability



Manolio T. et al., *Nature* (2009), 461, 747

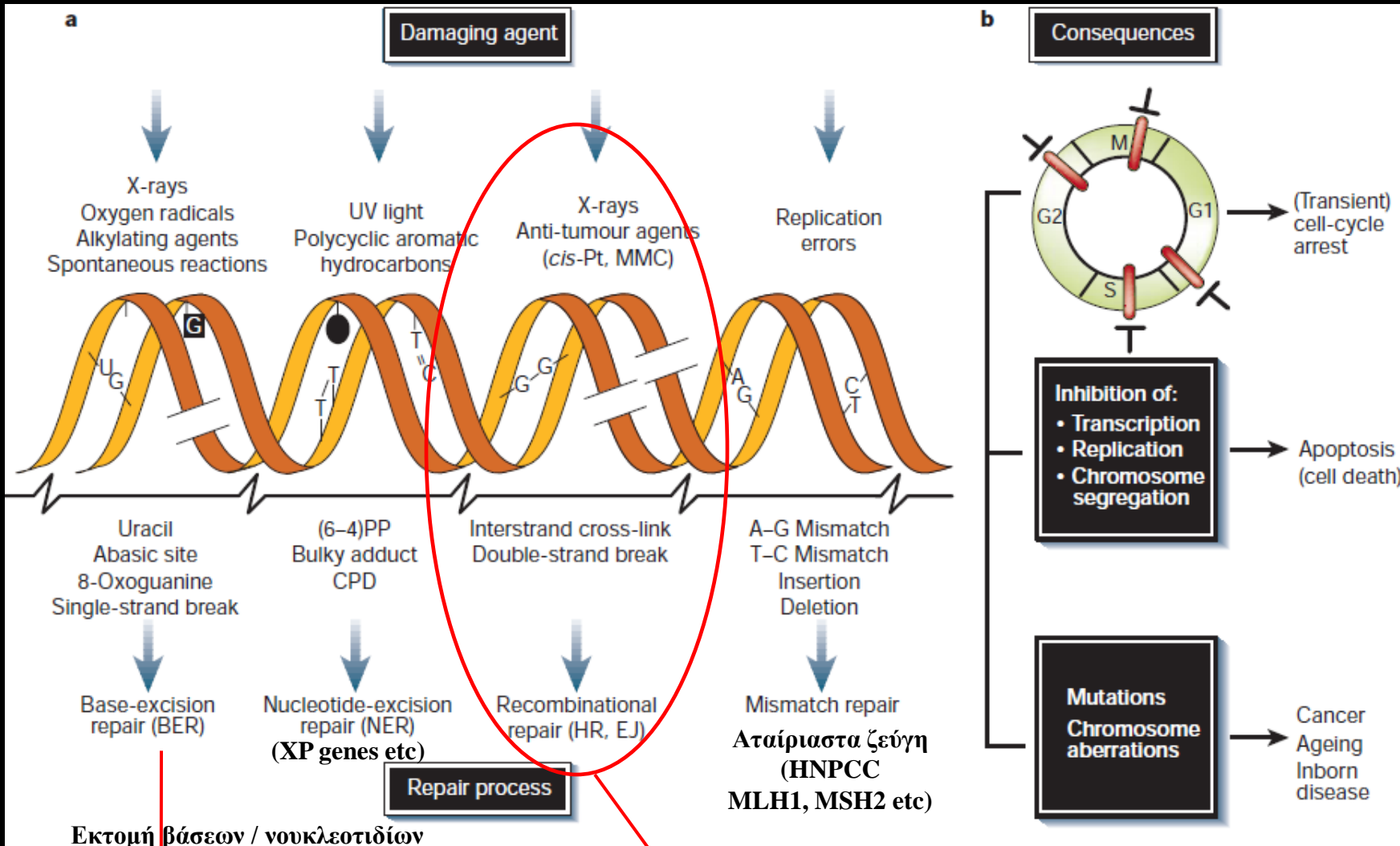
BRCA1/2, p53, PTEN *ATM, CHEK2, PALB2* *FGFR2* etc
RR > 5 **5 > RR > 1,5** **RR < 1,5**

Weitzel J.N. et al., *CA Cancer J Clin* (2011), 61, 327

Γονίδια κληρονομούμενου Br/Ov Ca

- Ογκοκατασταλτικά (Tumor suppressors)
- Κληρονόμηση μεταλλάξεων
 - Μεντελιανή Γενετική
 - Αυτοσωματικός επικρατών χαρακτήρας
 - Υπόθεση «δύο κτυπημάτων» κατά Knudson
- DNA repair-caretaker
- Γενικός ρόλος σε κάθε κύτταρο – παράδοξο: οι μεταλλάξεις τους συσχετίζονται κυρίως με καρκίνο μαστού και ωοθηκών στις γυναίκες
(αυξημένο φορτίο DNA βλαβών από μεταβολίτες οιστρογόνων?)

DNA Repair



+Νευρο-εκφυλιστικά νοσήματα

GG-NER & TCR

178 events/d/cell

Bohr V., pers. comm

8 DSB events/d/cell

Very toxic!

Hoeijmakers J., Nature (2001), 411, 366

DNA βλάβες για HR (Homologous Recombination) ή NHEJ

ICL

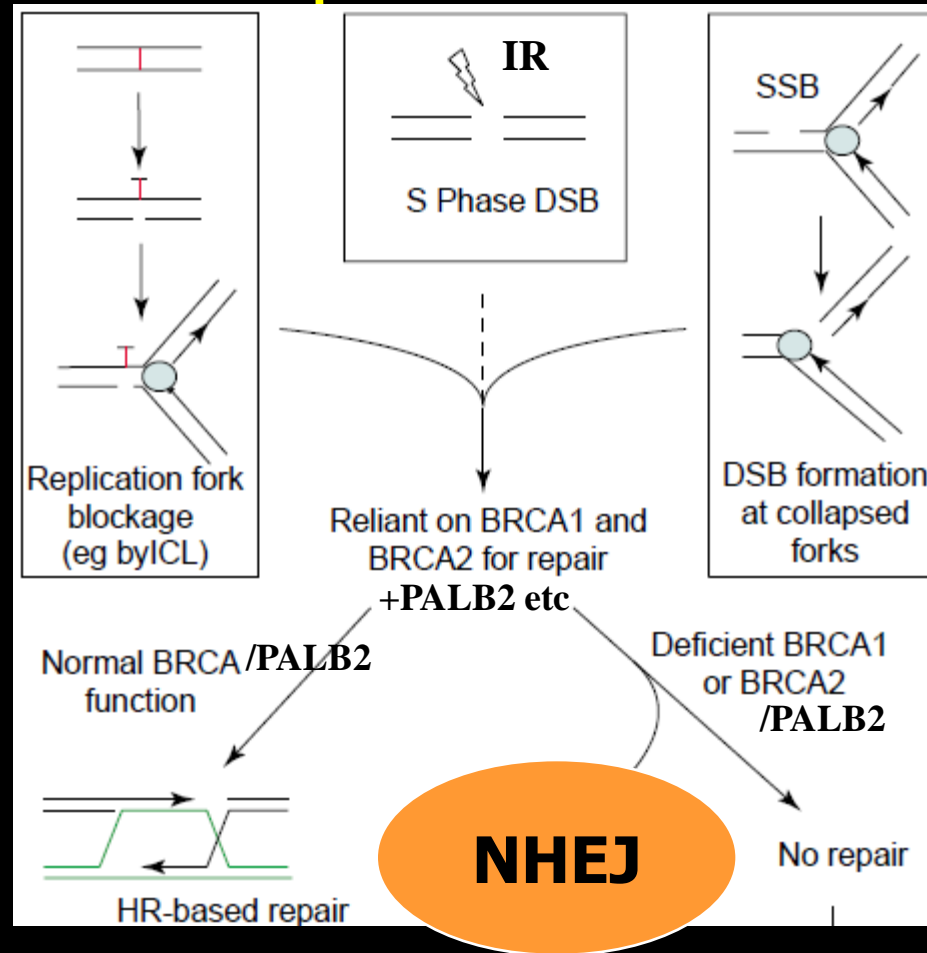
(Interstand Cross-Links)
Δίκλωνοι δεσμοί

Συνδυασμός για ICL:

NER και

TLS (error prone)

ή **HR**



DSB

(Double-Stranded
Breaks)

Απόπτωση ή
καρκινογένεση
(ανευπλοειδία)

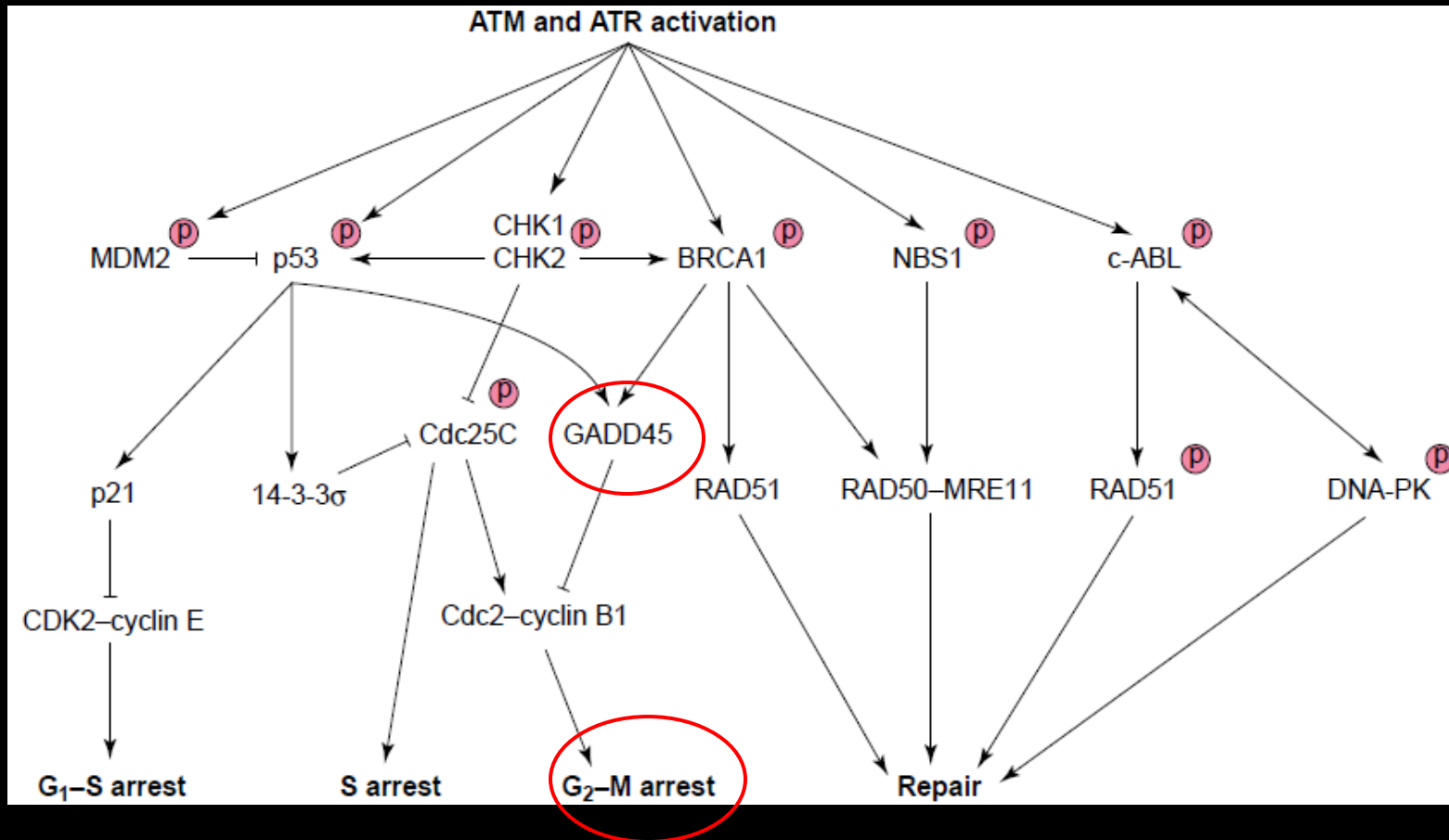
Non-Homologous End Joining

(error prone: συχνές απαλοιφές)

↗
συσσώρευση
μεταλλάξεων

DNA Damage Response (DDR)

BASC (BRCA1-Associated Surveillance Complex): Sensor/Regulator



Transducers

(Mediators)

Effectors

BRCA1 φωσφορυλιώνεται από ATM ± ATR (ATM and Rad3-related)
(αναλόγως της βλάβης?)

DSB DNA Damage Response: Chromatin Remodelling

ATM senses- CHEK2 phosphorylates
Ub “marks” στις ιστόνες που γειτνιάζουν στη βλάβη

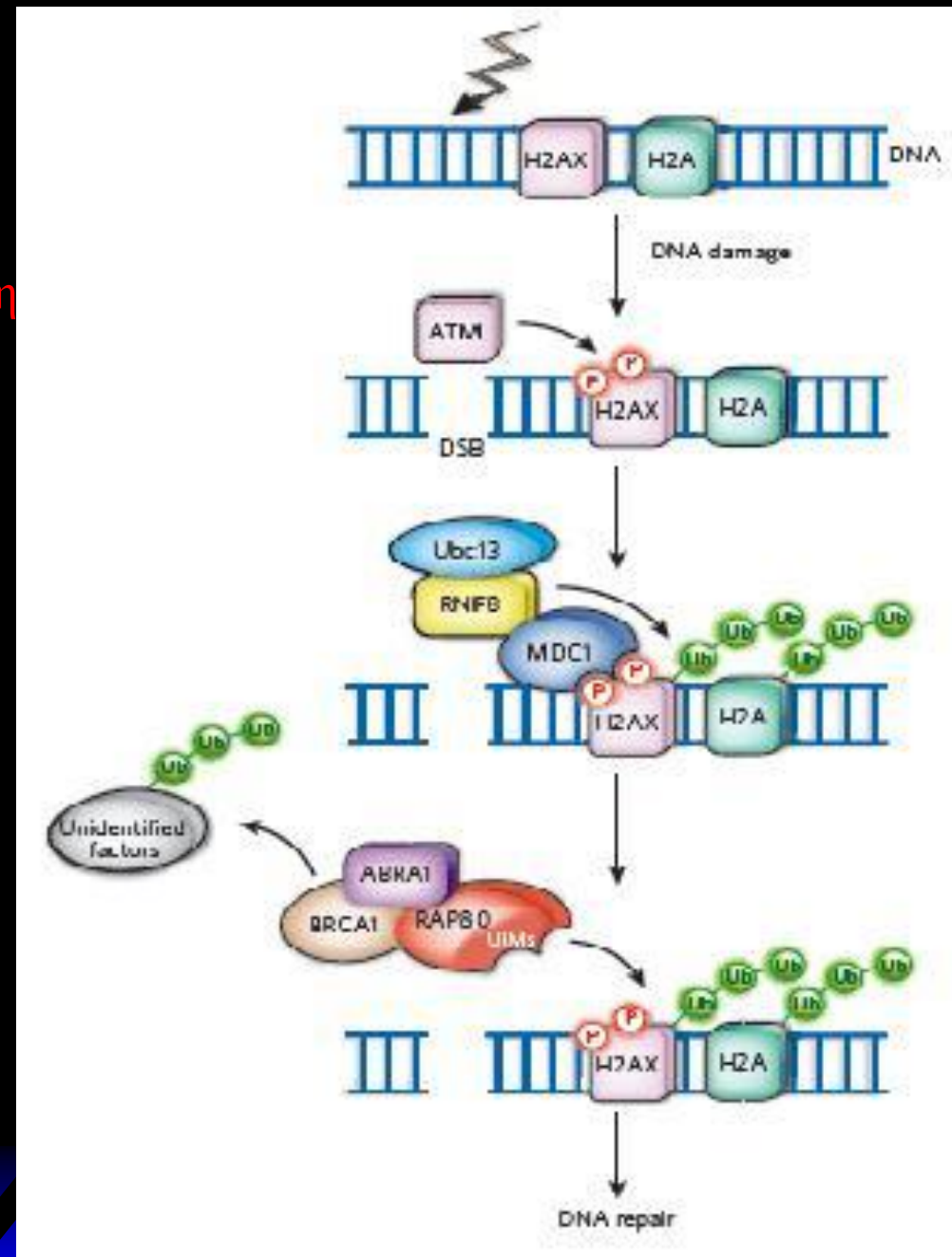
Mediator of DNA Damage Checkpoint 1 (MDC1)+
RING finger protein 8 (RNF8)

RAP80 (Receptor Associated Protein) με διπλό
Ub μοτίβο αλληλεπίδρασης (UIM)
«οδηγεί» ABRAXAS και BRCA1
(μέσω BRCT domain) στο DSB-
G2/M checkpoint control?
(*Science* 2007, 316, 1194-1205, 3 άρθρα)

BRCA1 με RING domain-BARD1
διαθέτει ενζυμική δραστηριότητα E3
λγάζσης

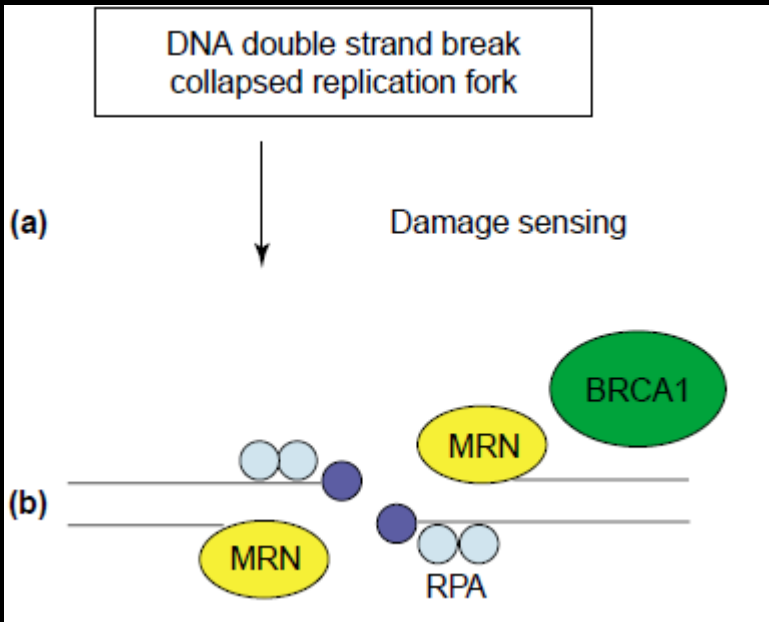
Μεταφέρει Lys-63 Ub αλυσίδες

Hoeller D. and Dikic I., Nature (2009), 458, 438
Bergink S. and Jentsch S., Nature (2009), 458, 461



Προετοιμασία DSB για HR

BRCA1 προσθέτει Ub στη CtIP (CtBP-Interacting Protein) και φέρνει:



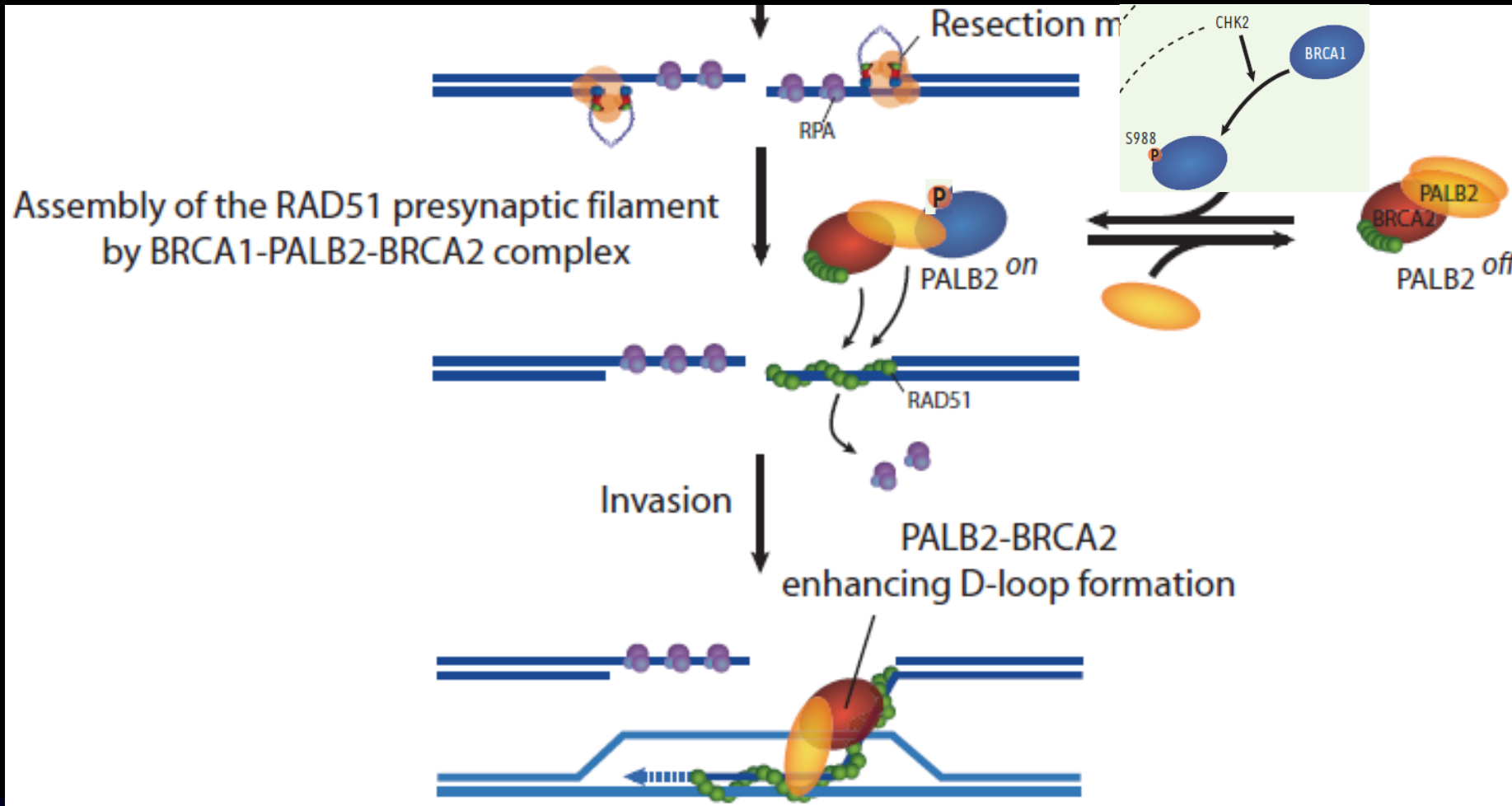
MRN complex = MRE11-RAD50-NBS1 (ή NBN)

MRE11 εξωνουκλεάση δημιουργεί 3'-SS άκρα και προωθεί HR (αντί NHEJ)

που δεσμεύονται από RPA = Replication Protein A

BRCA1 (S988 phosphorylated) αλληλεπιδρά με BRIP1 και PALB2

Οριστική στροφή προς HR



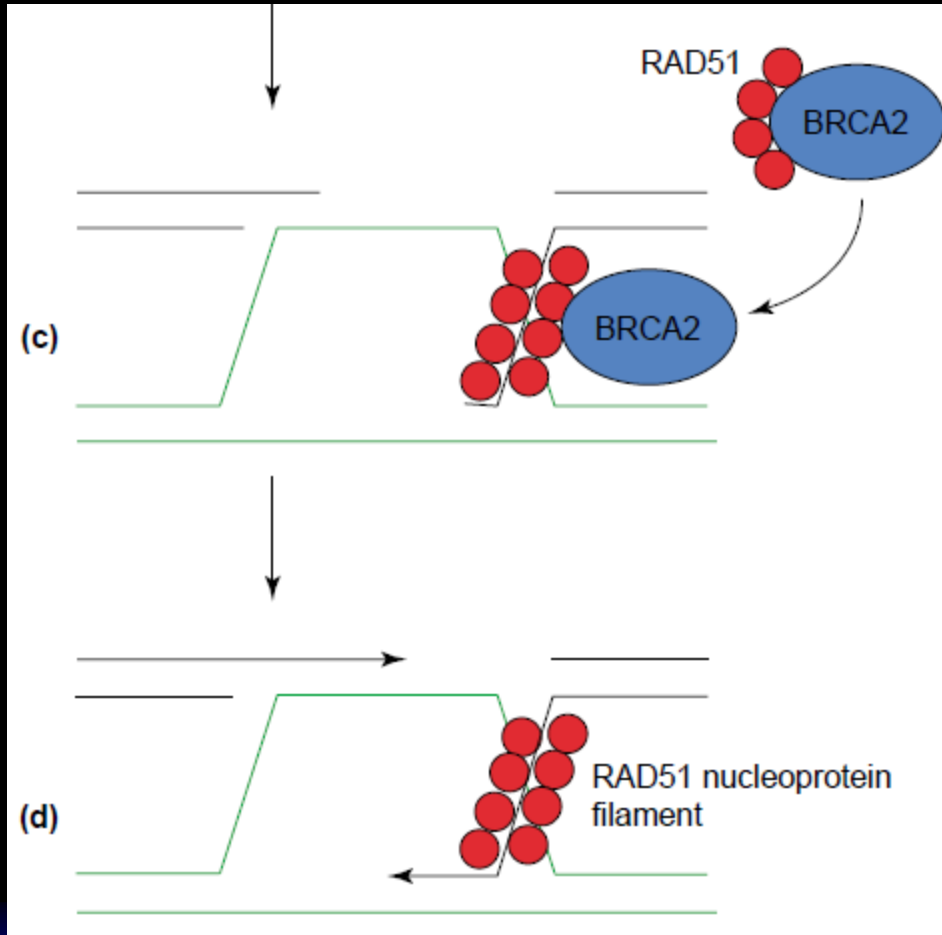
Διμερές
PALB2

53BP1 ↓

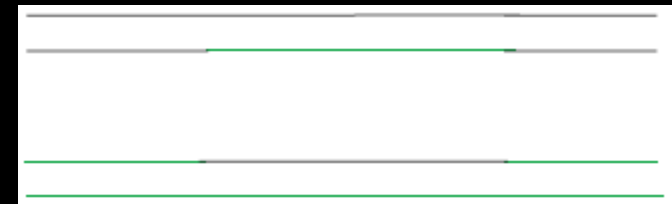
Buisson R. and J. Masson, NAR (2012), 40, 10312

Επίσης, de-ubiquitylating enzymes USP26 and USP37 βοηθούν (*Typas D. et al., NAR (2015), 43, 6919*)

Homologous Recombination (HR) in DSBs στη φάση S/G₂



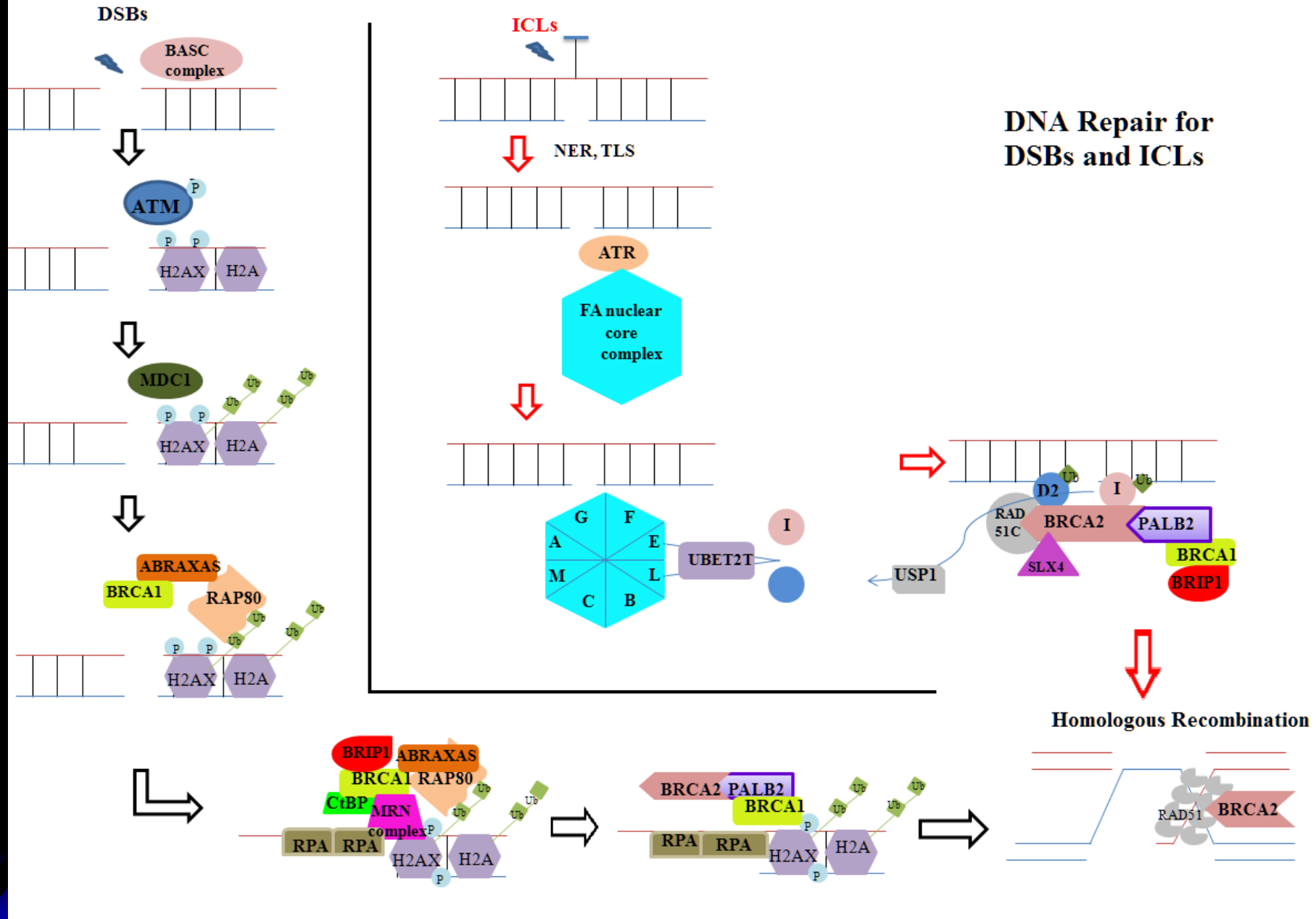
Αλληλεπίδραση BRCA2 με RAD51 μέσω των 8 BRC repeats (διώχνει RPA) και με το dsDNA μέσω TD (tower domain)



Error-free DNA repair!

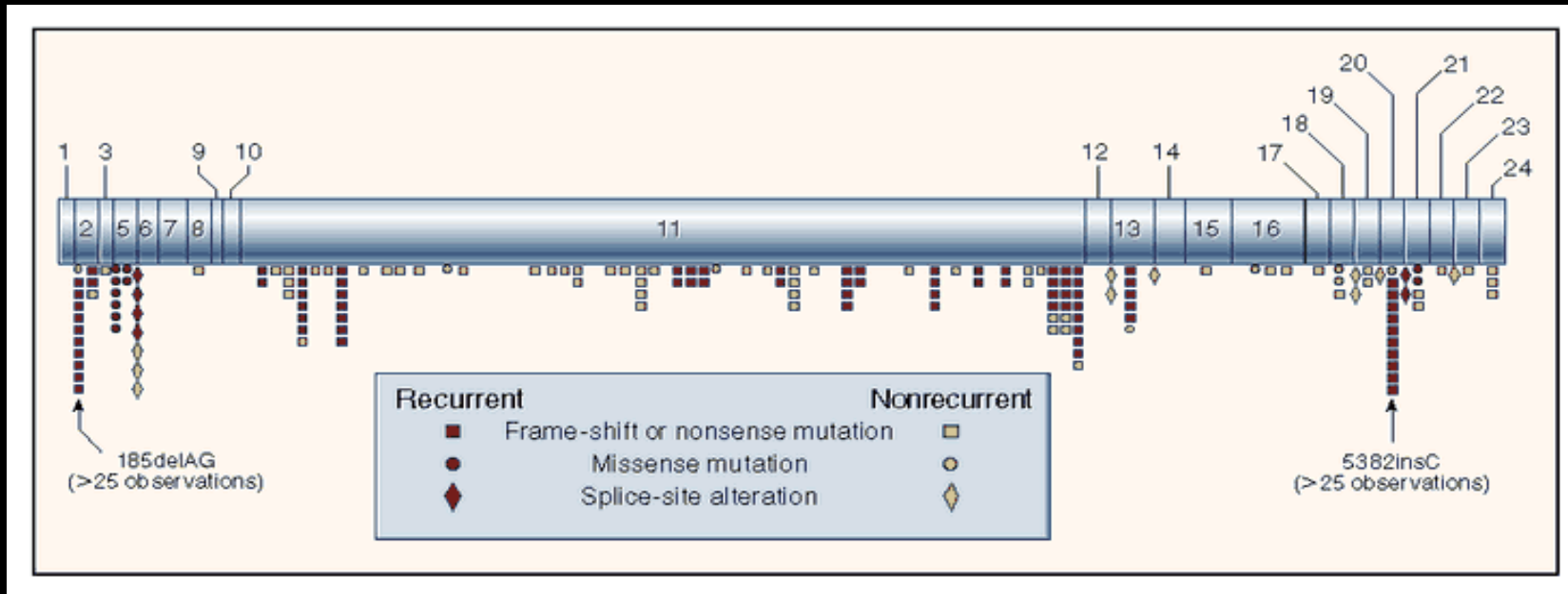
Strand invasion – Holliday junction

DNA Repair for DSBs and ICLs



HR test?

Διασπορά μεταλλάξεων στο *BRCA1* γονίδιο



Collins F., NEJM (1996), 334, 186

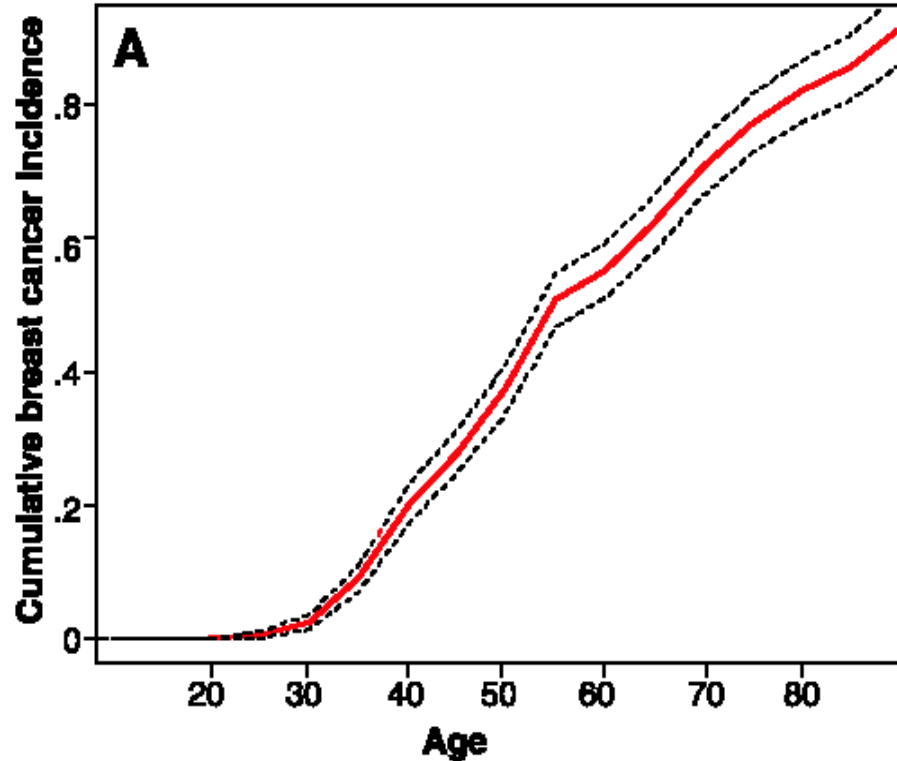
Ιδρυτικές (founder) μεταλλάξεις σε κλειστές κοινωνίες:

- Ασkenάζι Εβραίοι: 185delAG και 5382insC στο *BRCA1*
και 6174delT στο *BRCA2* (2,5%)

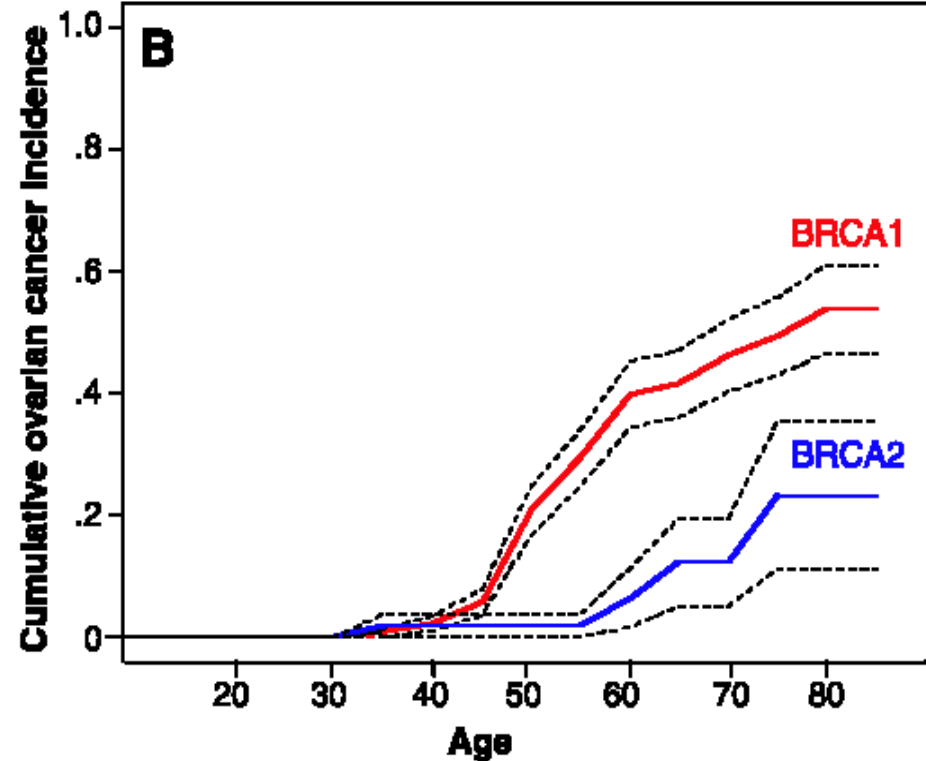
- Ισλανδοί : 999del5 στο *BRCA2* (0,6%)

Συχνότητα μεταλλάξεων στον γενικό πληθυσμό: 0,1-0,5%

Αθροιστικοί κίνδυνοι για φορείς *BRCA* μεταλλάξεων



για καρκίνο μαστού: 82%



για καρκίνο ωοθηκών: 54% (*BRCA1*)
23% (*BRCA2*)

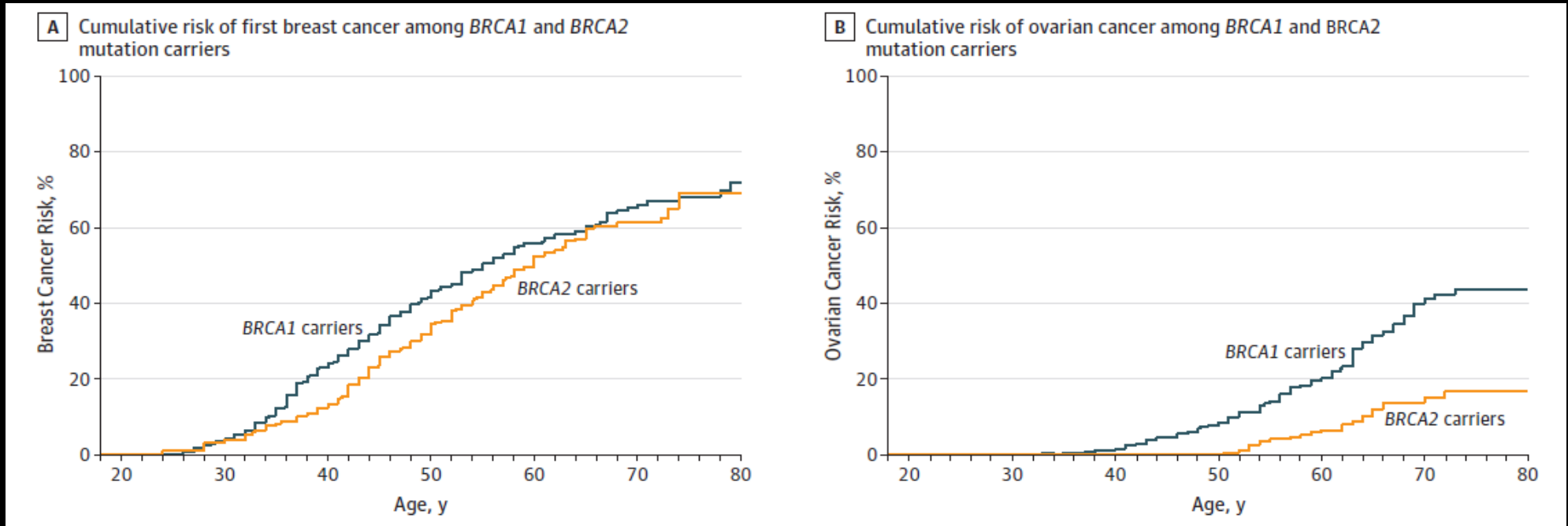
(n=1008 Ασθενάζι Εβραίοι BrCa ασθενείς + συγγενείς)

King M.C. et al., *Science* (2003), 302, 643

“*Decoding Annie Parker*” 2013 film

Νεώτερα δεδομένα

n= 6036 *BRCA1* φορείς και 3820 *BRCA2* φορείς



Καρκίνος μαστού (έως 80 ετών)

BRCA1: 72%

BRCA2: 69%

Καρκίνος ωοθηκών (έως 80 ετών)

BRCA1: 44%

BRCA2: 17%

Kutchenbaecker et al., JAMA (2017), 317, 2402

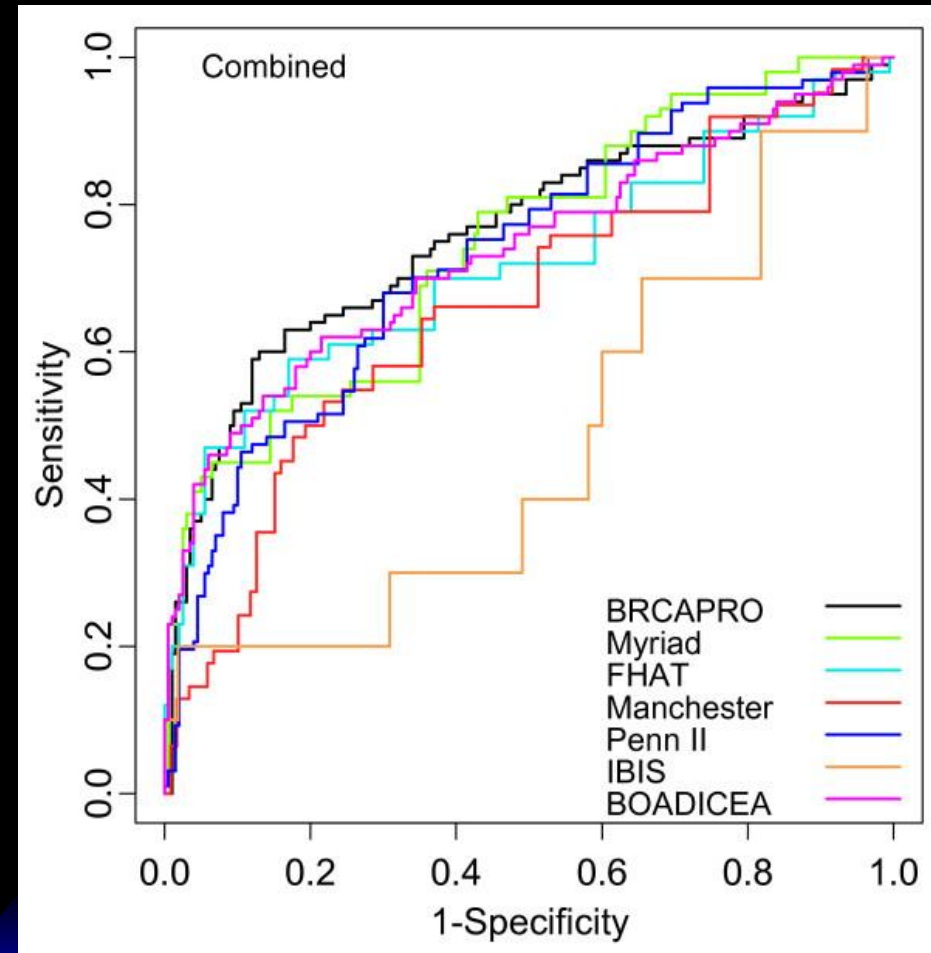
Μοντέλα πρόβλεψης με βάση το ιστορικό

Η γενετική ανάλυση είναι ακριβή και επίπονη εργασία!

Γενετική συμβουλευτική και έγγραφη συναίνεση πριν τη γενετική ανάλυση!

Software:

- ❖ BRCA Risk Calculator (Myriad)
- ❖ BOADICEA (Breast and Ovarian Analysis of Disease Incidence and Carrier Estimation Algorithm)
[-www.srl.com.ac.uk/genepi/boadicea](http://www.srl.com.ac.uk/genepi/boadicea)
Antoniou A. et al., J. Med Genet (2008), 45, 425
Lee A.J. et al., BJC (2014), 110, 535
- ❖ BRCARPO (CaGene 4.3 software)
- ❖ Penn (or Couch)
- ❖ IBIS
- ❖ FHAT (Family History Assessment Tool)
- ❖ Manchester Scoring Method



Κριτήρια επιλογής ασθενών (n=85)

Εργαστήριο Μοριακής Διαγνωστικής Δημοκρίτου και
Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας Πανεπ. Αθηνών
(υπό την αιγίδα της HeCOG)

Ελάχιστα κριτήρια με βάση το οικογενειακό ιστορικό (n=62):

- A) δύο ασθενείς συγγενείς πρώτου βαθμού με καρκίνο μαστού ή ωοθηκών πριν τα 50 έτη
- B) μία ασθενής πριν τα 50 έτη και ένας ασθενής-συγγενής ανεξαρτήτου ηλικίας
- i) είτε με αμφοτερόπλευρο καρκίνο μαστού
 - ii) είτε με καρκίνο ωοθηκών
 - iii) είτε με καρκίνο μαστού και ωοθηκών
 - iv) είτε άνδρας με καρκίνο μαστού

Συνήθως εμφανίζονται και άλλα είδη καρκίνου στα υπόλοιπα μέλη

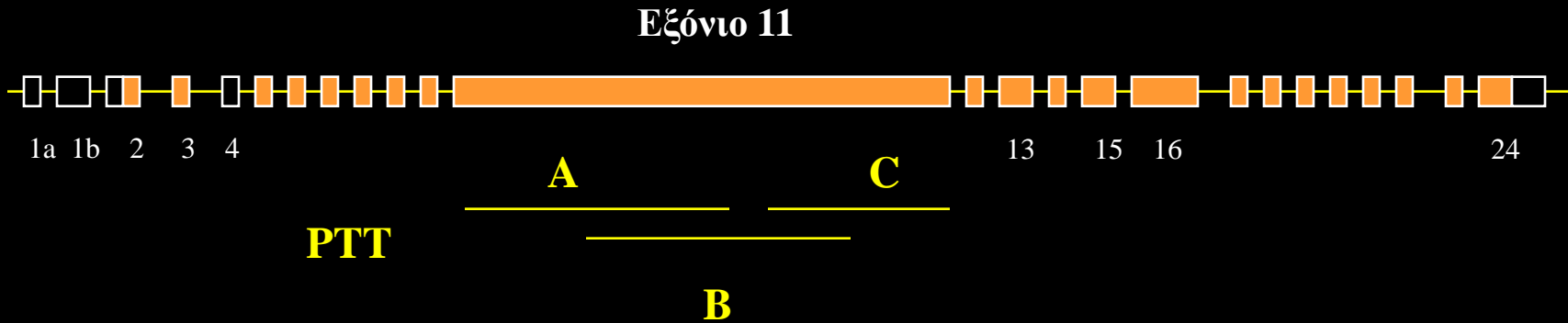
Πχ. μεταλλάξεις του *BRCA2* ενέχονται στον καρκίνο προστάτου ενώ μεταλλάξεις σε ομοζυγωτία στην κακοήγη αναιμία Fanconi σε μικρή ηλικία [Howlett N. et al., *Science* (2002), 297, 606]

Χωρίς οικογενειακό ιστορικό (n=23): χρήση φαινοτυπικών χαρακτηριστικών

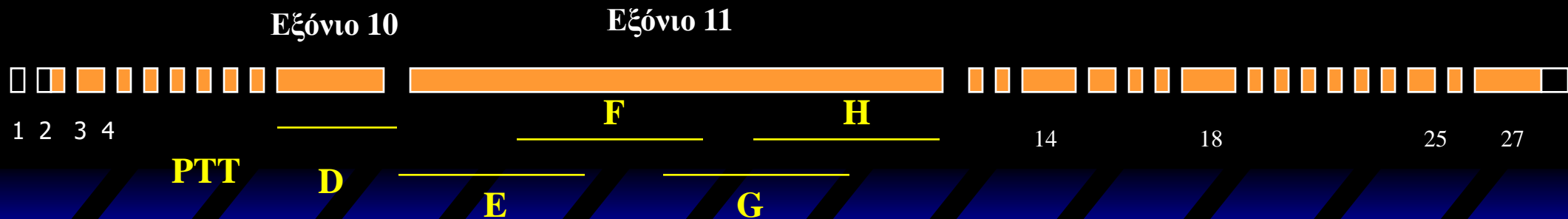
Μεγάλος αριθμός μεταλλάξεων στα *BRCA1/2* γονίδια (>1000)

87% μεταλλάξεις που οδηγούν σε συντμημένη πρωτεΐνη
(truncating μεταλλάξεις) → PTT

BRCA1



BRCA2



ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ *BRCA1* ΚΑΙ *BRCA2* ΣΤΟΝ ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΧΩΡΟ

1) Επιλογή και βελτιστοποίηση κατάλληλης μεθόδου:

Μεθοδολογία PTT στα μεγάλα εξόνια των δύο γονιδίων:

- εξόνιο 11 του *BRCA1* (61% του γονιδίου)
- εξόνια 10 και 11 του *BRCA2* (59% του γονιδίου)

DNA Sequencing στα μικρά εξόνια

2) Έλεγχος αξιοπιστίας και αναλυτικής ευαισθησίας της μεθόδου:

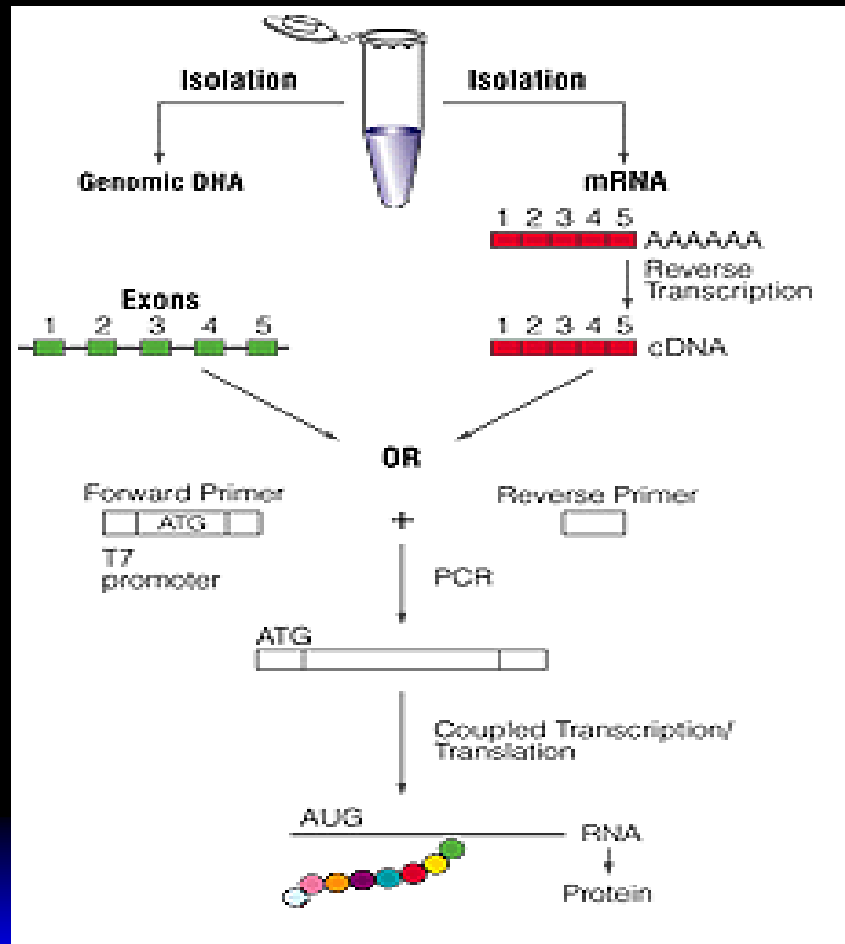
- με δείγματα μάρτυρες
- με σύγκριση με τη μέθοδο αναφοράς DNA Sequencing

3) Ταυτοποίηση μεταλλάξεων με τη μέθοδο DNA Sequencing στο
Εργαστήριο Μοριακής Διαγνωστικής του Δημοκρίτου

ABI 310 Genetic Analyser (Perkin Elmer, Applied Biosystems)

- 1) DNA ή RNA απομόνωση
- 2) PCR ή RT-PCR (ειδικός *forward primer*)
- 3) In vitro μεταγραφή/μετάφραση
- 4) Ανίχνευση σήματος

Protein Truncation Test (PTT)



Ιδανική μέθοδος για παθολογικές nonsense και frameshift μεταλλάξεις



SDS PAGE/Αυτοραδιογραφία ή Western Blot



Χαρακτηριστικά 5'-εκκινητού για PCR της μεθόδου PTT

- Θέση για κλωνοποίηση (προαιρετικά)
- Υποκινητή RNA πολυμεράσης (T7, T3 ή SP6)
- spacer
- Kozak αλληλουχία
- ATG κωδικόνιο αρχής
- Ακολουθία ειδική για το γονίδιο

cggatcctaatacgactcactataggacagaccacc ATG g – (gene specific)

←→
cloning

←→

T7 promoter

←→

Kozak

Αποτελέσματα γενετικής ανάλυσης με μεθοδολογία PTT σε Ελληνες ασθενείς με κληρονομούμενο καρκίνο μαστού/ωοθηκών (n=85)

Παθολογικές μεταλλάξεις

❖ *BRCA1* (n=6)

- 3741insA
- 1623del5
- 3099delT (καινούργια στη βιβλιογραφία)
- 3277insG (καινούργια στη βιβλιογραφία)
- R1203X
- 3896delT
- R1751X

❖ *BRCA2* (n=2)

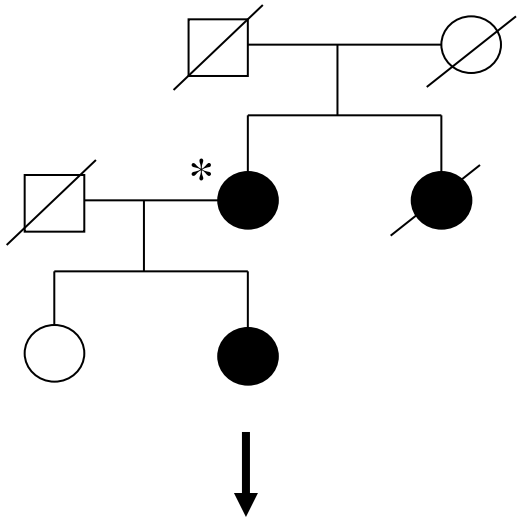
- 6631del5
- 2024del5

ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ 3277insG

νέα μετάλλαξη

Εξόνιο 11 – *BRCA1*

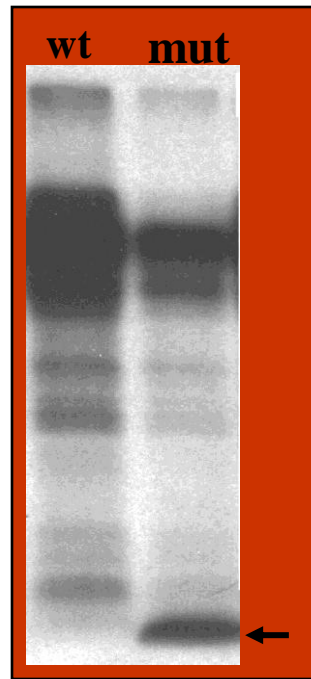
Οικογενειακό δένδρο



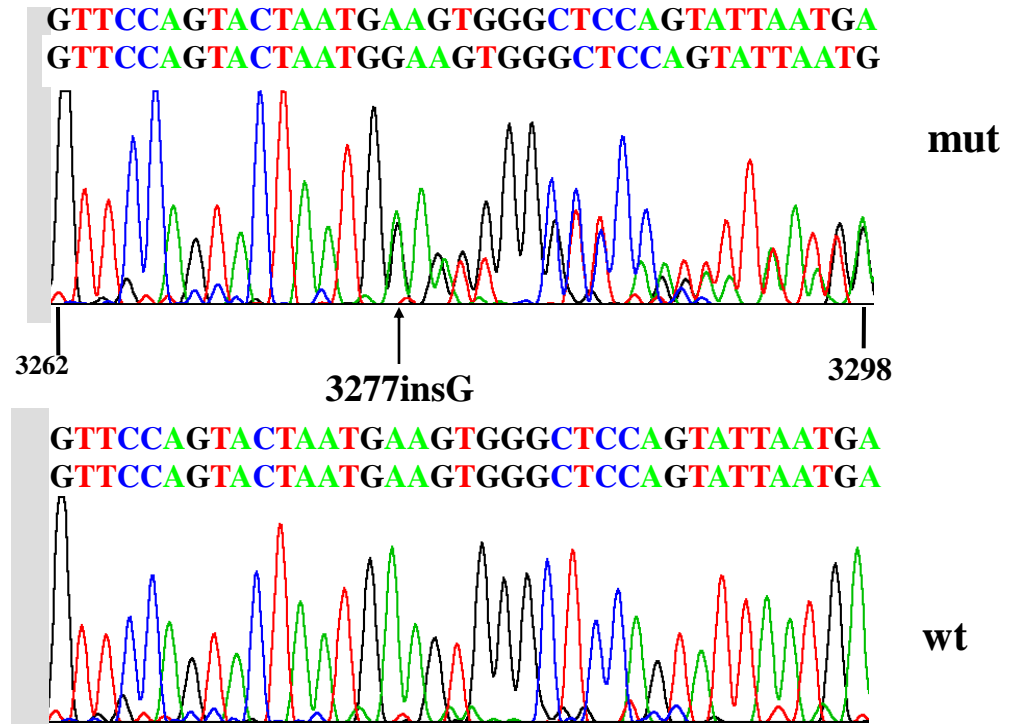
Ασθενής 145:

καρκίνος μαστού (σε ηλικία 62) και ωθηκών (σε ηλικία 72),
αδελφή με καρκίνο ωθηκών,
κόρη με καρκίνο ωθηκών (σε ηλικία 40)

PTT



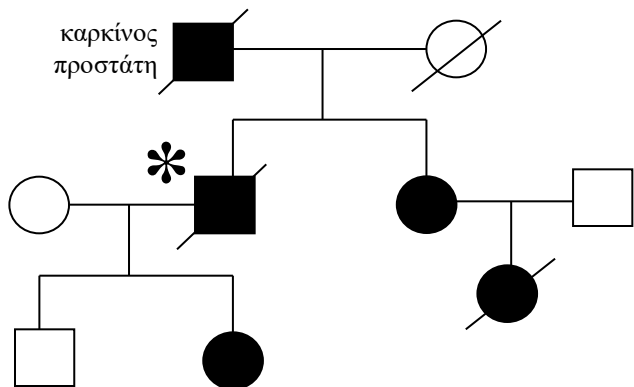
DNA Sequencing



ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ 2024del5

Εξόνιο 10 - *BRCA2*

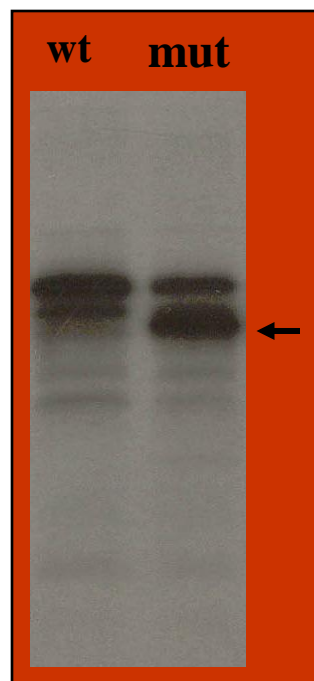
Οικογενειακό δένδρο



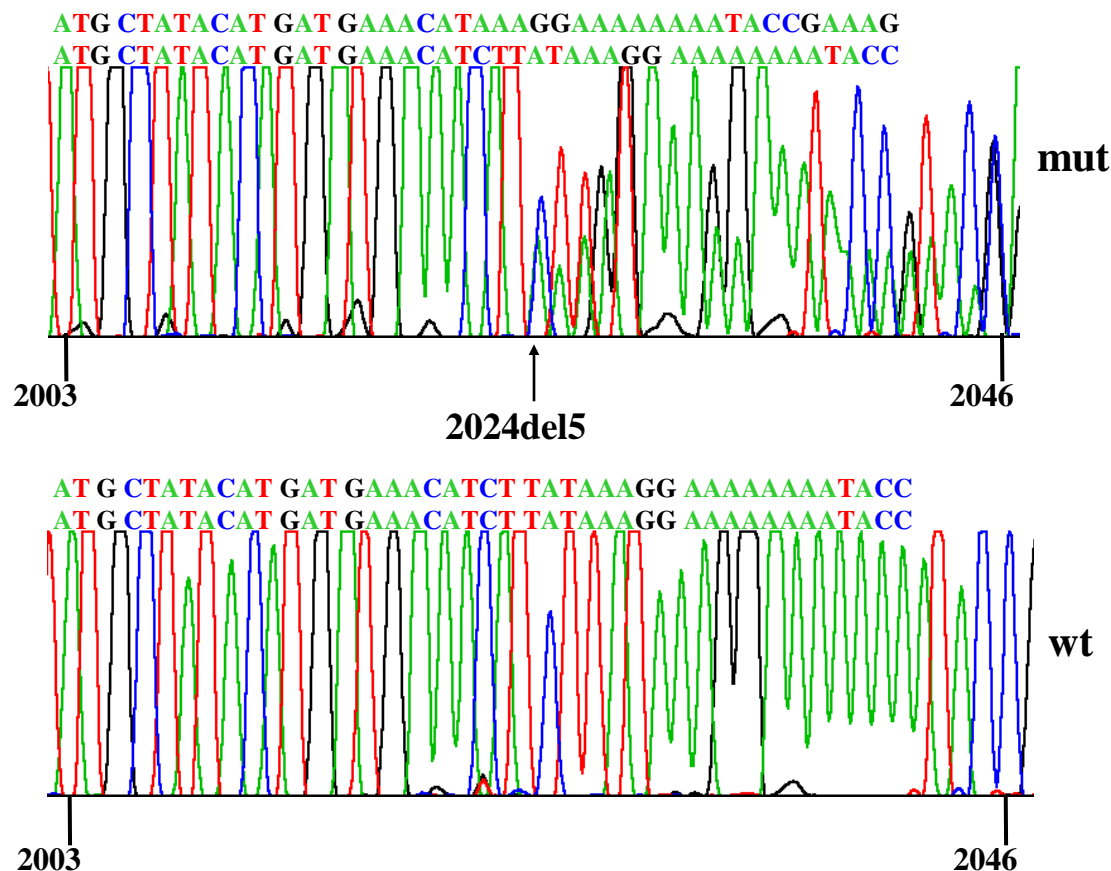
Ασθενής 144:

άνδρας με καρκίνο μαστού σε ηλικία 66
αδελφή με καρκίνο μαστού σε ηλικία 33
κόρη με καρκίνο μαστού σε ηλικία 39
ανηψιά με καρκίνο μαστού σε ηλικία 34
πατέρας με καρκίνο προστάτη

PTT



DNA Sequencing



Συνολικά Αποτελέσματα



Με μεθοδολογία PTT
(Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας)

8 παθογνωμικές μεταλλάξεις

Με DNA Sequencing σε άλλα εξόνια
(Δημόκριτος)

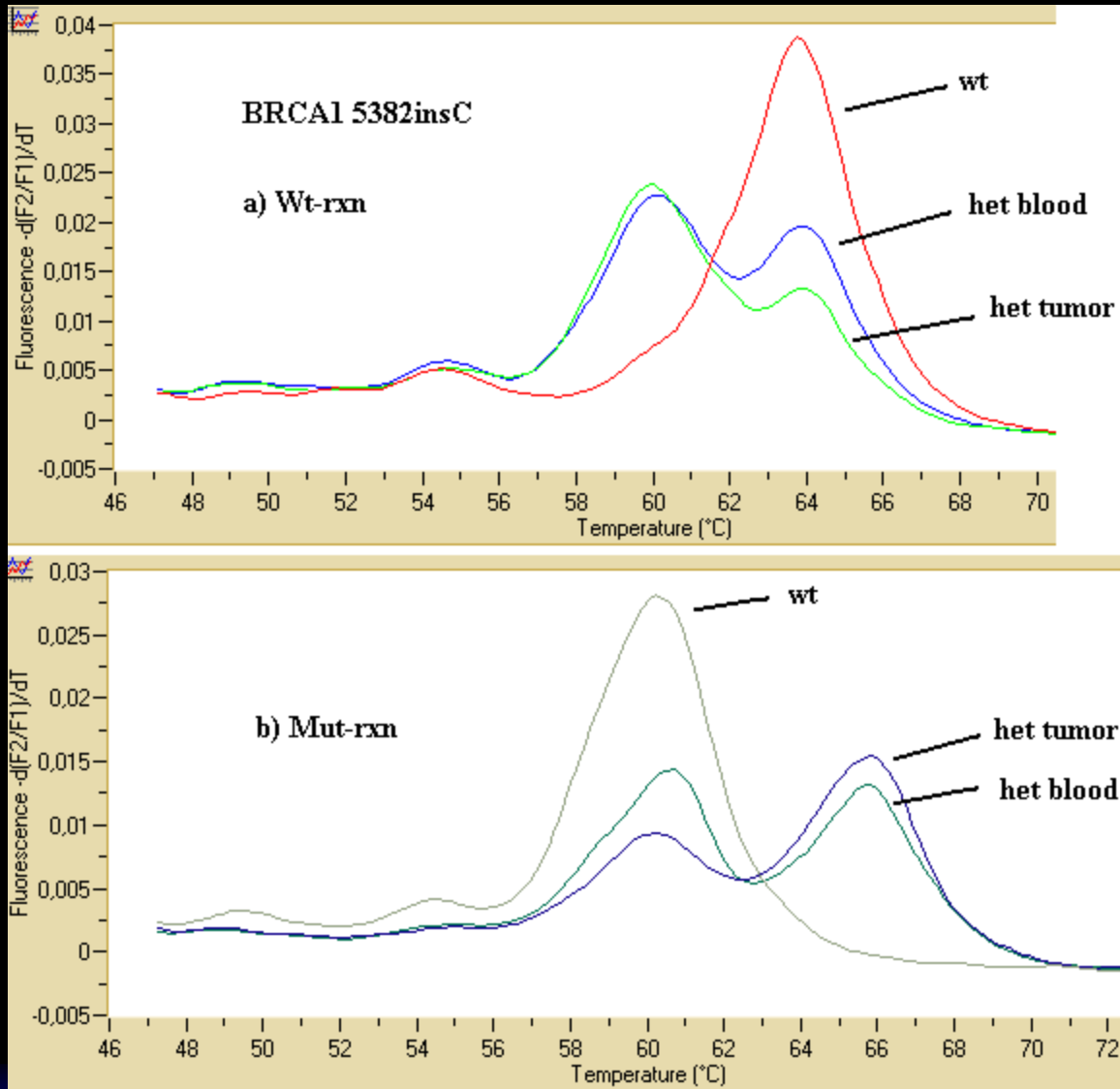
9 παθογνωμικές μεταλλάξεις
(5382insC *BRCA1* σε 6 οικογένειες)
[+3 παρανοηματικές?]

Σύνολο παθογνωμικών μεταλλάξεων: 17/85 (ποσοστό 20%)

Konstantopoulou I., Kroupis C. et al., Human Mutation (2000), 16, 272

Kroupis C. and Ladopoulou A. et al., Cancer Letters (2002), 185, 61

Ανίχνευση *BRCA1* 5382insC μετάλλαξης (εξόνιο 20) στο Light Cycler



Μεθοδολογία:

Real-time PCR / Melting Curve Analysis

BRCA1 wild-type (wt)
και δύο 5382insC ετεροζυγώτες (het)
(από περιφερικό αίμα και DNA από όγκο)

a) wt-rxn (wild-type sensor probe)

b) mut-rxn (5382insC mutant sensor probe)

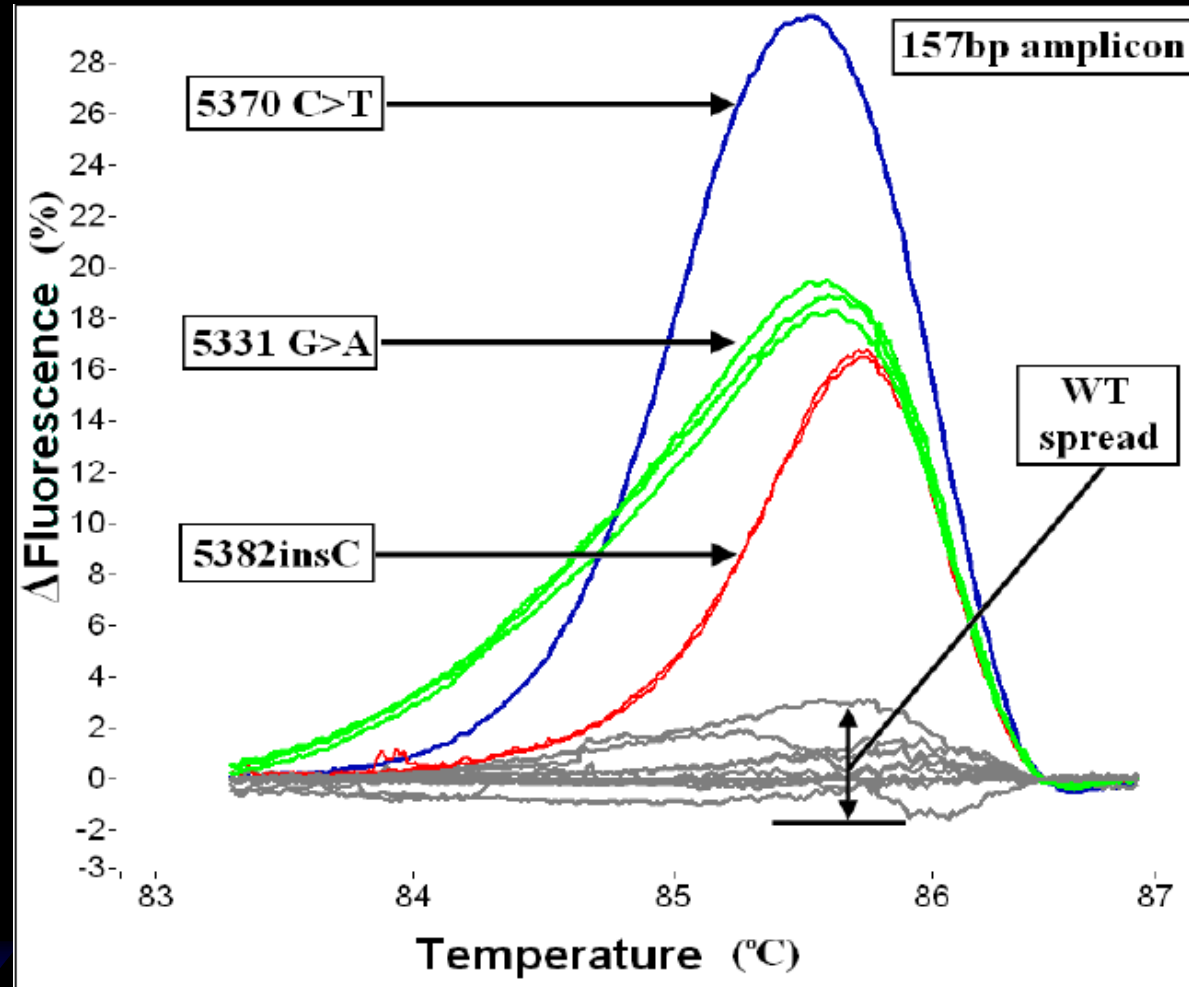
Σάρωση μεταλλάξεων στο εξόνιο 20 του *BRCA1*

High-Resolution Melting (HRM) στο Light Cycler / HR-1

+ G1738R (5331G>A)
+ R1751X (5370C>T)

Με χρωστική
LCGreen I

Να προηγείται στη
γενετική ανάλυση?



Επικαιροποίηση *BRCA* μεταλλάξεων στην Ελλάδα

760 Br/On Ca οικογένειες

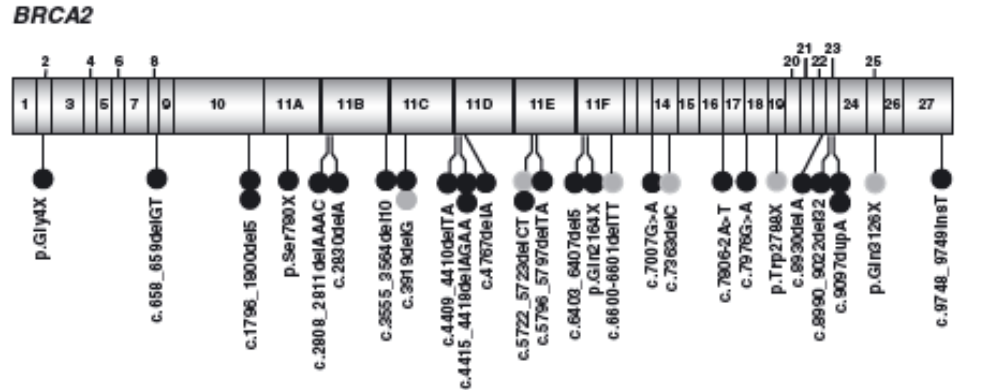
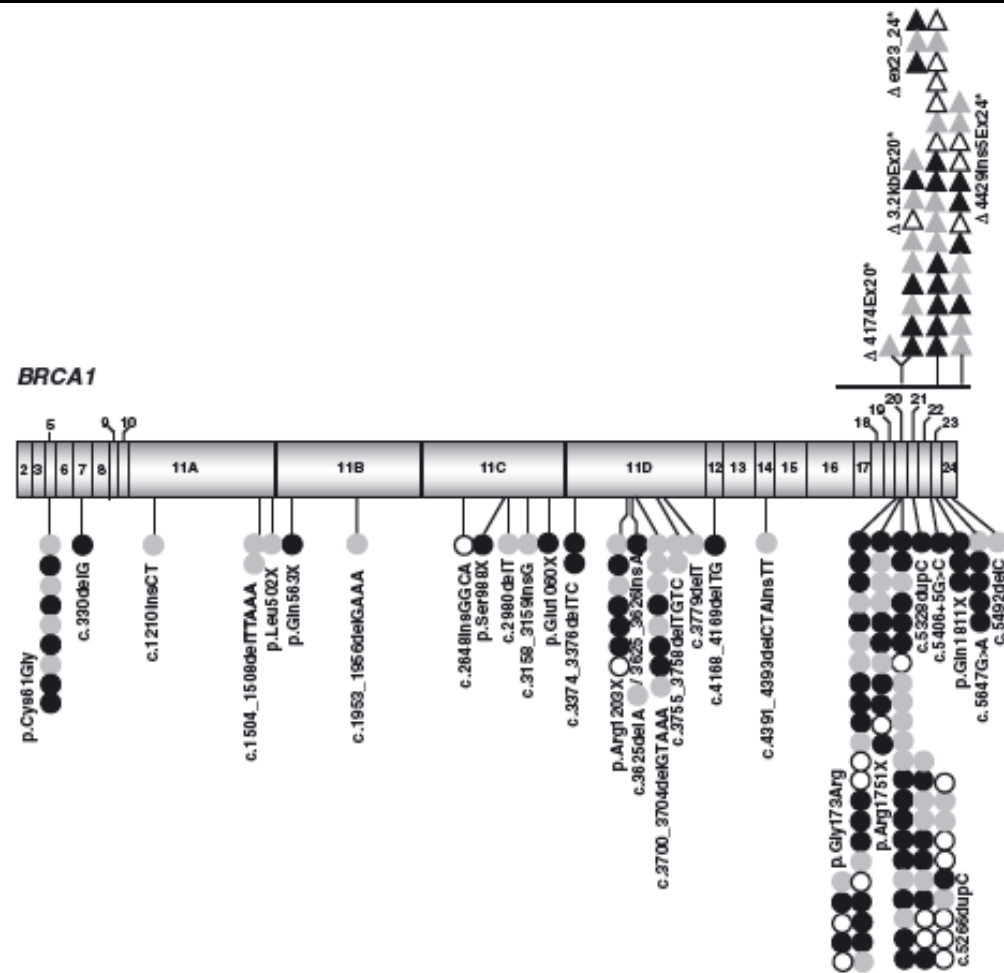


212 *BRCA*+ (28%!!!) μεταλλάξεις

181 *BRCA1* (85%) 31 *BRCA2* (15%)

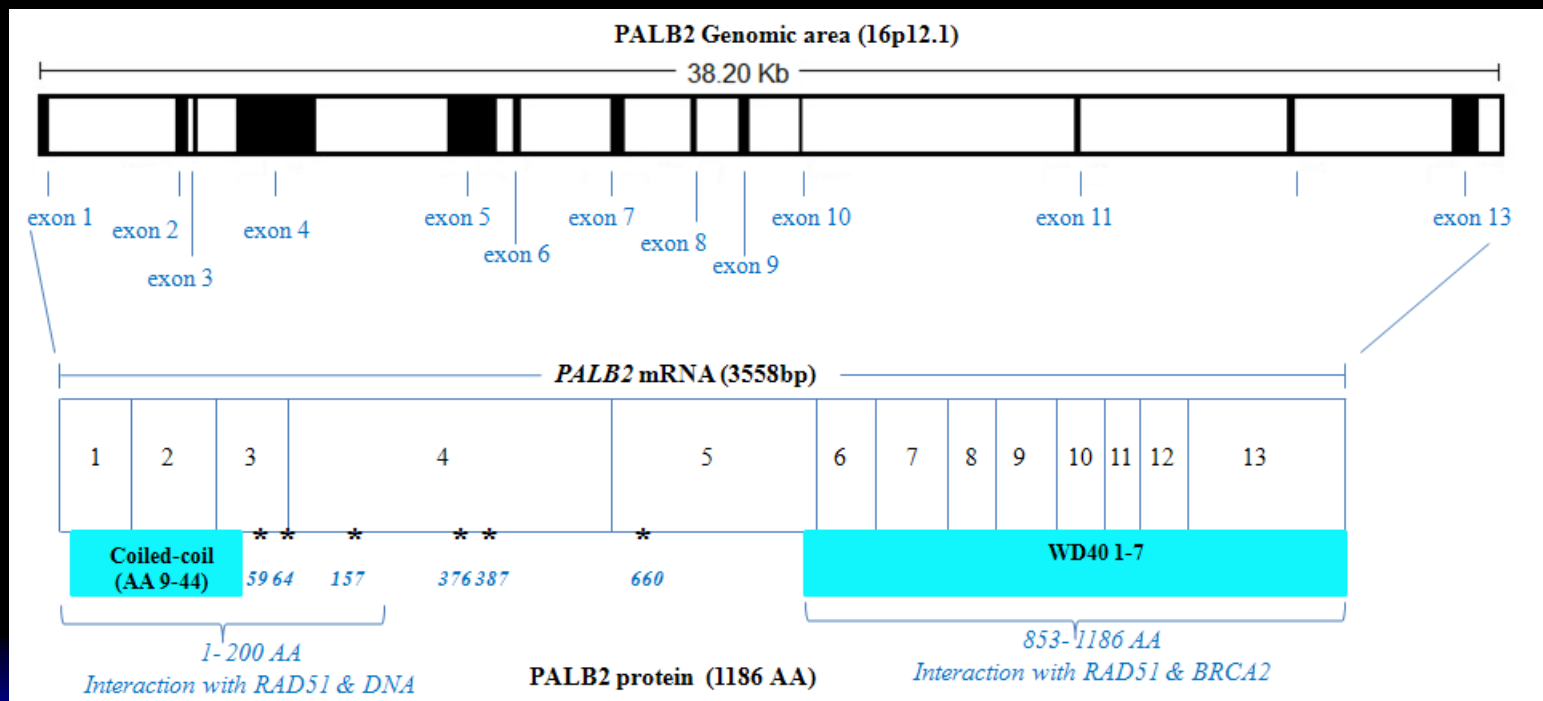
6 συχνές *BRCA1* μεταλλάξεις στο 58,5% των μεταλλάξεων (24% αναδιατάξεις)

Patient category (proband)	Percentage in cohort (n = 760)	Percentage of <i>BRCA1</i> carriers in each category	Percentage in <i>BRCA1</i> carriers (n = 181)	Percentage of <i>BRCA2</i> carriers in each category	Percentage in <i>BRCA2</i> carriers (n = 31)
Total	100 (760)	23.9 (181/760)	100 (181)	4.1 (31/760)	100 (31)
Family history	78.4 (597)	25.5 (152/597)	81.7 (152)	3.4 (20/597)	66.7 (20)
Early onset (<40 years)	44.2 (339)	28.3 (96/339)	51.6 (96)	2.7 (9/339)	30 (9)
Family history and early onset	36.1 (275)	29.5 (81/275)	43.5 (81)	1.4 (4/275)	13.3 (4)
Ovarian cancer	10 (76)	51.3 (39/76)	20.9 (39)	0	0
Breast and ovarian cancer	3 (23)	82.6 (19/23)	10.2 (19)	0	0
Male breast cancer	1.4 (11)	0	0	27.2 (3/11)	10 (3)



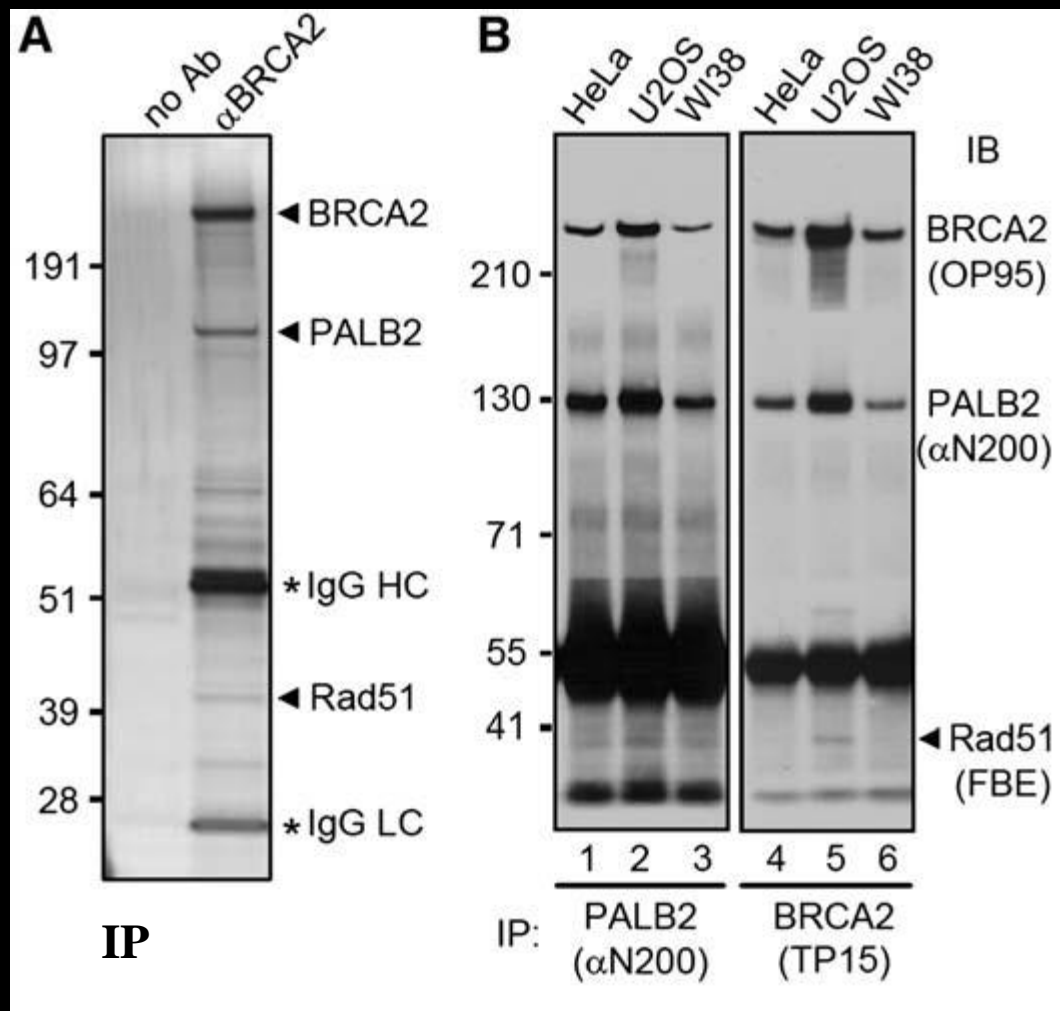
Γονίδιο *PALB2* (Xia B. et al., 2006)

- ❖ 16p12.1
- ❖ 13 εξόνια σε 38,2 Kb
- ❖ 3,5 Kb cDNA
- ❖ 1186 AA, 131 kDa, pI 6,4
- ❖ Εξόνια 4 και 5 αρκετά μεγαλύτερα από τα υπόλοιπα (65% του γονιδίου)



Ανακάλυψη PALB2 ως BRCA2 partner (Partner And Localizer of BRCA2)

συνεντοπισμός της
πρωτεΐνης BRCA2 σε
πυρηνικές δομές
χρωματίνης



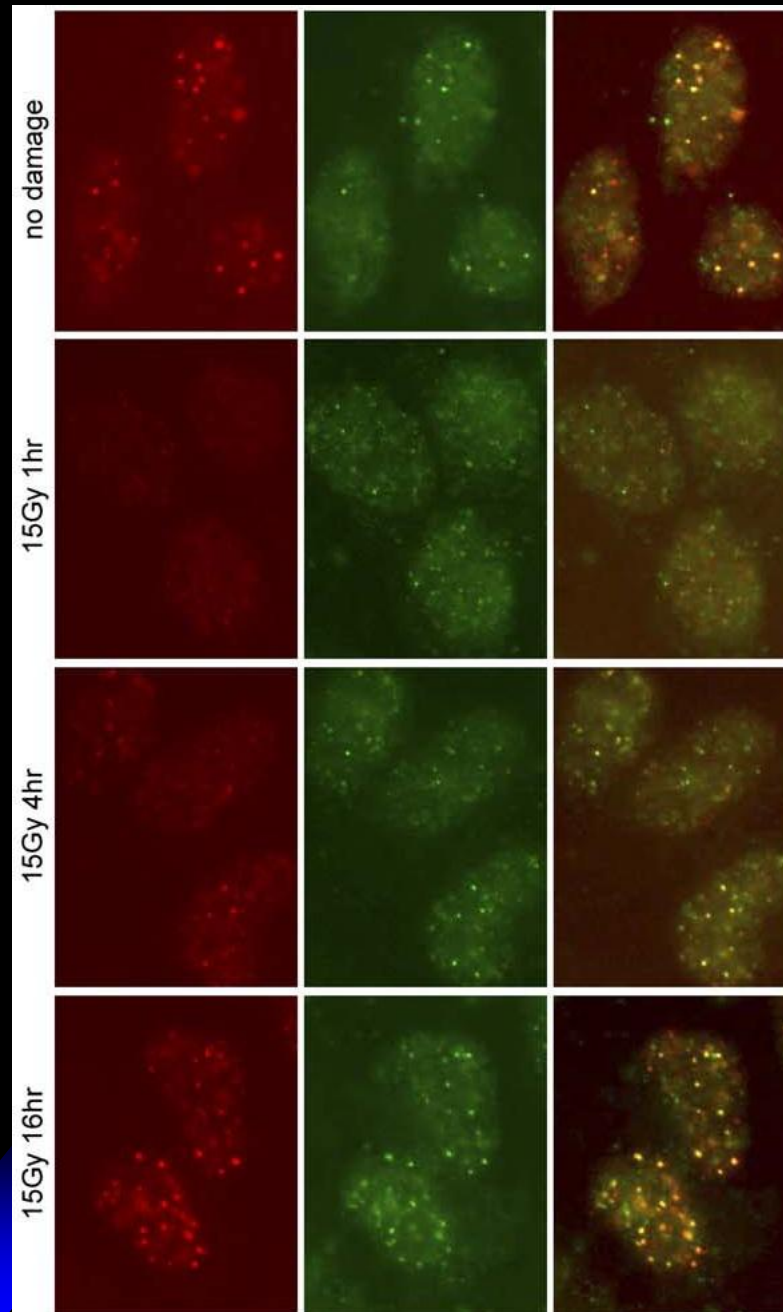
Πειράματα
ανοσοκαθίζησης
(IP)

HeLa
cells

BRCA2 PALB2 MERGE

BRCA2 partner

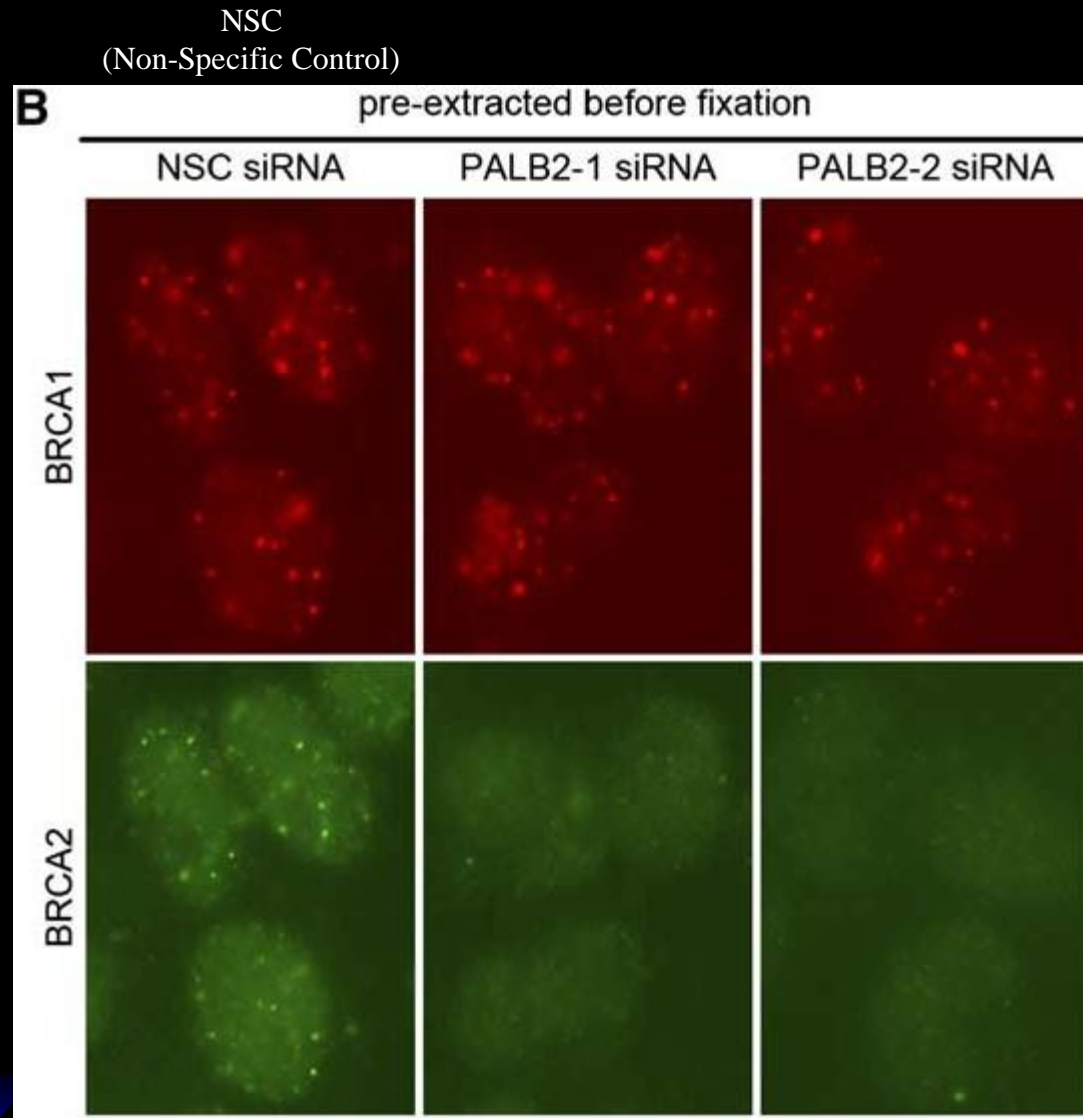
Ανοσοφθορισμός
σε U2OS κύτταρα
(osteosarcoma line)



Συνεντοπισμός PALB2
με BRCA2 σε πυρηνικές
δομές με ειδικό ρόλο
μετά από IR

Απώλεια BRCA2 από τις πυρηνικές δομές μετά από PALB-2 siRNA κατεργασία

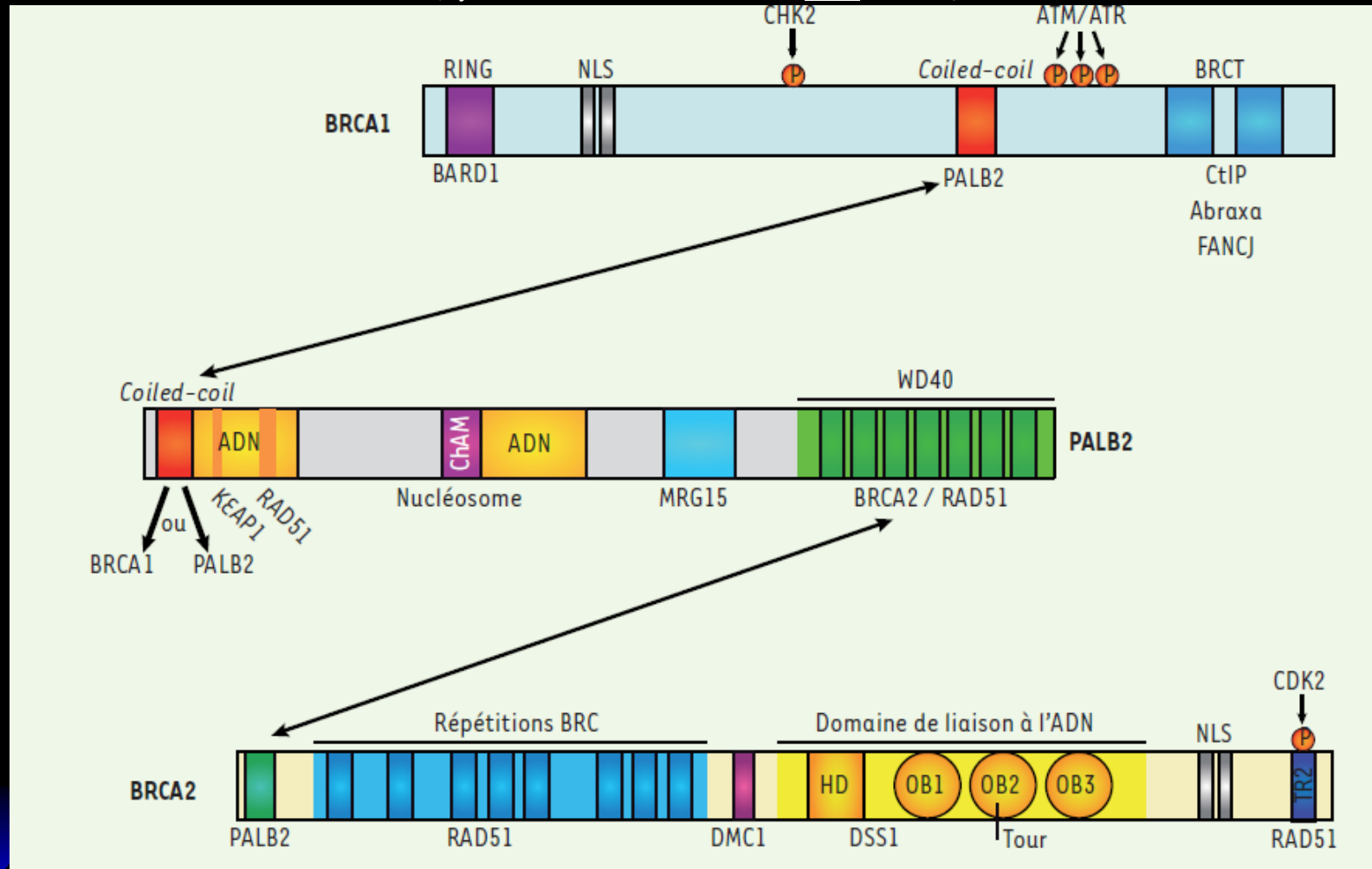
Με ανοσοφθορισμό



BRCA2
localizer

BRCA1-PALB2-BRCA2 Interaction

C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης PALB2 προσκολλάται στο N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης BRCA2 (Xia et al., *Mol Cell* 2006; 22, 719) → N-τελικό άκρο της PALB2 αλληλεπιδρά και με τη πρωτεΐνη BRCA1 (Sy S. et al., *PNAS* 2009, 106, 7155)



Συσχέτιση *PALB2* μεταλλάξεων με νοσήματα

Ανίχνευση *PALB2* παθογνωμικών μεταλλάξεων:

Σε ετεροζυγωτία:

- ❖ από ~1-2% έως 3-4% των *BRCA* neg (-) ασθενών με καρκίνο του μαστού (ή/και ωοθηκών)

Rahman N. et al., Nat Genet (2007), 39,165

Casadei S. et al., Cancer Res (2011), 71, 2222

Hellebrand H. et al., Hum Mut (2011), 32, E2176

Janatova M. et al., CEBP (2013), 22, 2323

- ❖ Καρκίνο μαστού στον άνδρα (~ 1%)
- ❖ Παγκρεατικό καρκίνο (~3-4%)

Jones S, et al., Science (2009),324, 217

Διαλληλικές μεταλλάξεις:

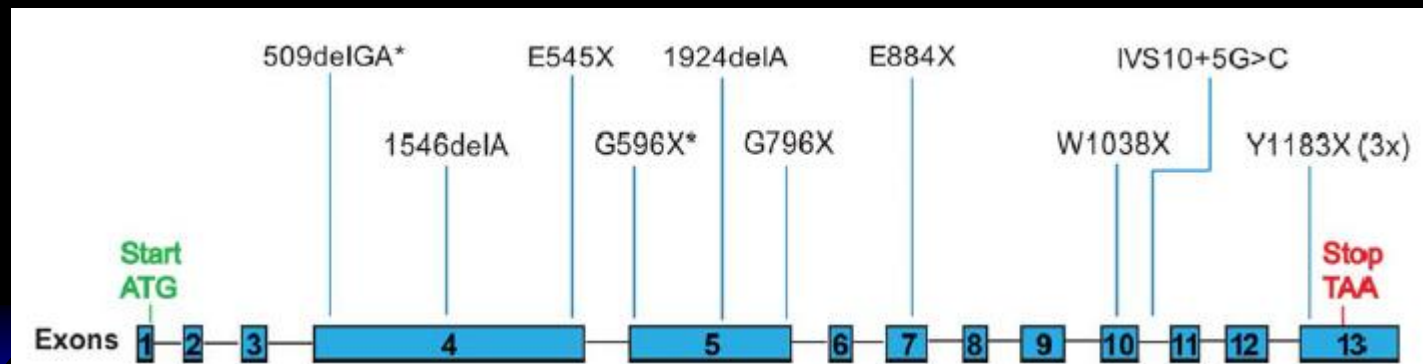
- ❖ σε ασθενείς με κακοήθη αναιμία Fanconi

❖ *Reid et al., Nat Genet (2007), 39,162*

Είδος και συχνότητα *PALB2* μεταλλάξεων

❖ Παθογνωμικές μεταλλάξεις σε όλη την έκταση του γονιδίου:

- ❖ Αλλαγής πλαισίου ανάγνωσης
- ❖ Εισαγωγή κωδικονίου τερματισμού (ακόμη και 3 αμινοξέα πριν το C-τελικό άκρο, Y1183X) [Rahman et al., Nat Genet (2007), 39, 165]
- ❖ Υπόλοιπες μεταλλάξεις: παρανοηματικές (λίγες?) [Tischkowitz M. et al., Hum Mut 33, 674 (WECARE)]
- ❖ Μεγάλες αναδιατάξεις με μέθοδο MLPA (απαλοιφές εξονίων 1-10, 7-11, 7-8, 9-10, dup 9-11) [Xia B. et al., Nat Genet 2007, 39, 159, Blanco A. et al., BRCT (2012), 132, 307, Janatova M. et al., CEBP (2013), 22, 2323]



Ιδρυτικές μεταλλάξεις σε 4 πληθυσμούς:

- ❖ Στους Γάλλους του Καναδά: Q775X [*Foulkes W. et al., BCR (2007), 9, R83*]
- ❖ Στους Πολωνούς/Ρώσους: R170fs (c.509_510delGA) [*Dansonka A. et al., BMC Med Genet (2010), 11,20, Noskowicz M. et al., Fam Cancer (2013)*]
- ❖ Στους Φινλανδούς: L531fs→stop 2,7% σε *BRCAneg* και 1% σε unselected female breast cancer, 40% risk by 70 y [*Erkko H. et al., Nature, (2007), 446, 316*]
- ❖ Στους Αυστραλούς: W1038X (c.3113G>A), 1% σε *BRCAneg* και 0,4% σε unselected female breast cancer, 91% risk by 70 y [*Southey M.C. et al., BCR (2010), 12, R109*]

Κίνδυνος ανάπτυξης BrCa σε φορείς *PALB2* μεταλλάξεων

Το 33% των φορέων *PALB2* μεταλλάξεων χωρίς οικογενειακό ιστορικό (ή το 58% με οικογενειακό ιστορικό 2 περιστατικών <50 ετών) θα αναπτύξουν καρκίνο του μαστού μέχρι την ηλικία των 70 ετών!

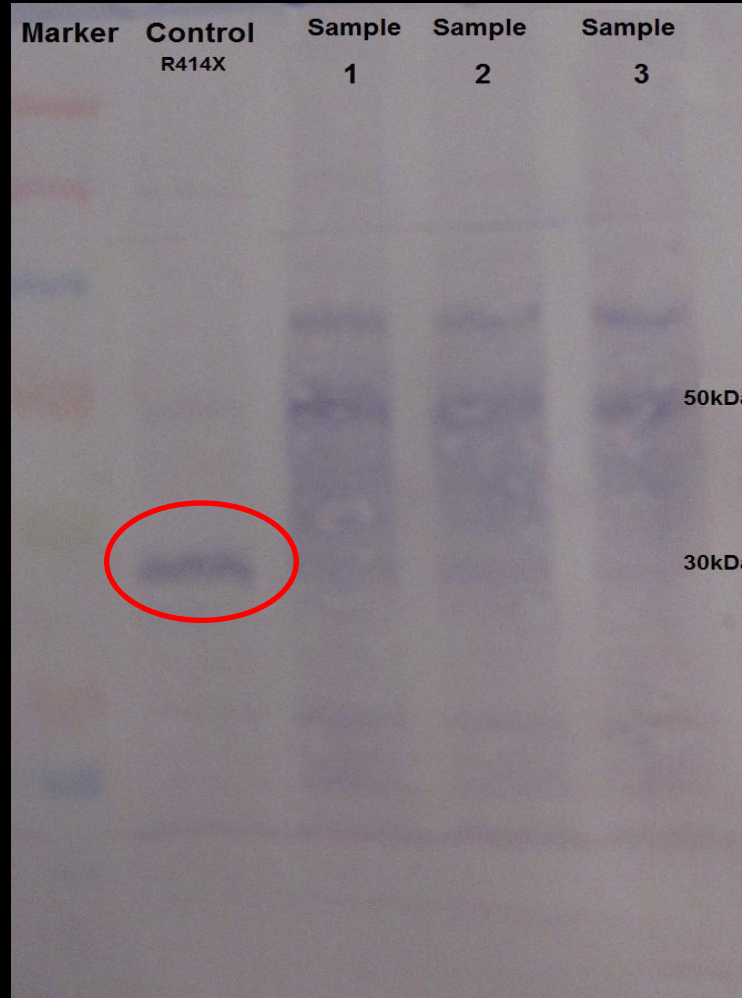
Antoniou A.C. et al., NEJM (2014), 371, 497

***Κίνδυνοι συγκρίσιμοι με BRCA μεταλλάξεις!
(PALB2 moderate risk gene of a “higher” order)***

Ιστοπαθολογικά δεδομένα μεταξύ BRCA1 και BRCA2

Ανάπτυξη ΡΤΤ στα μεγάλα εξόνια του *PALB2*

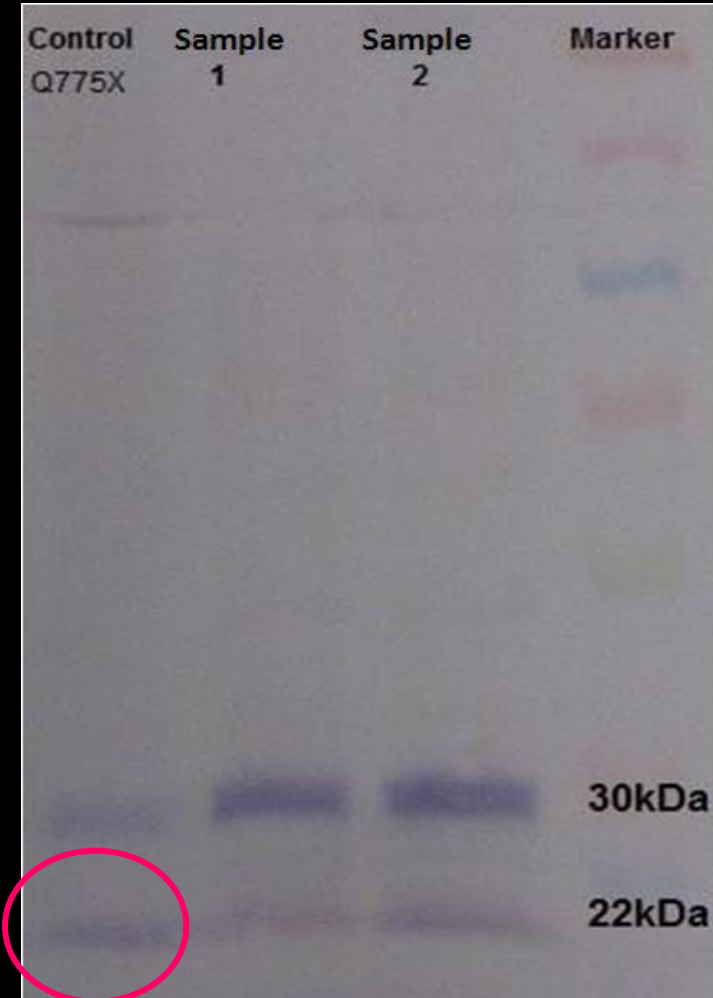
Εξόνιο 4



Control R414X

(δωρεά Prof. E. Imiyatov,
St. Petersburg, Russia)

Εξόνιο 5



Control Q775X

(δωρεά Prof. W. Foulkes,
Montreal, Canada)

Βιοτινυλιωμένη
λυσίνη

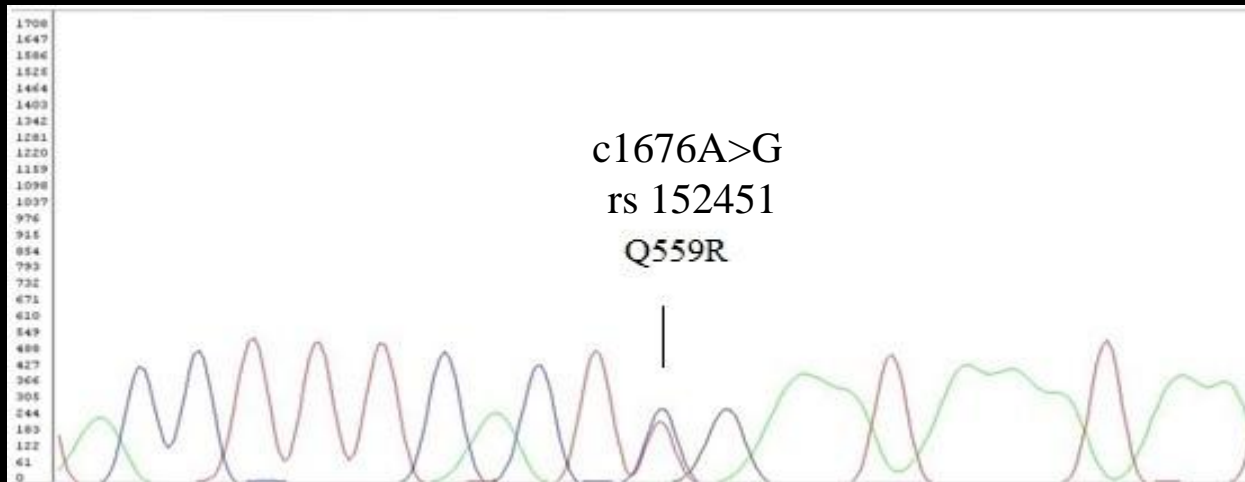
Transcend
(Promega)

PVDF μεμβράνες

Strep-ALP
Western Blue

Σύγκριση μεθόδου

- ◆ Συγκρινόμενη με το DNA Sequencing (στον γενετικό αναλυτή ABI 310 Sequencer) ήταν 100% ακριβής στην ανίχνευση παθογνωμικών μεταλλάξεων (n=47)
- ◆ Το DNA Sequencing στα εξόνια 4 και 5 ανίχνευσε την παρανοηματική c.1876A→G (Q559R) μετάλλαξη σε τρία δείγματα



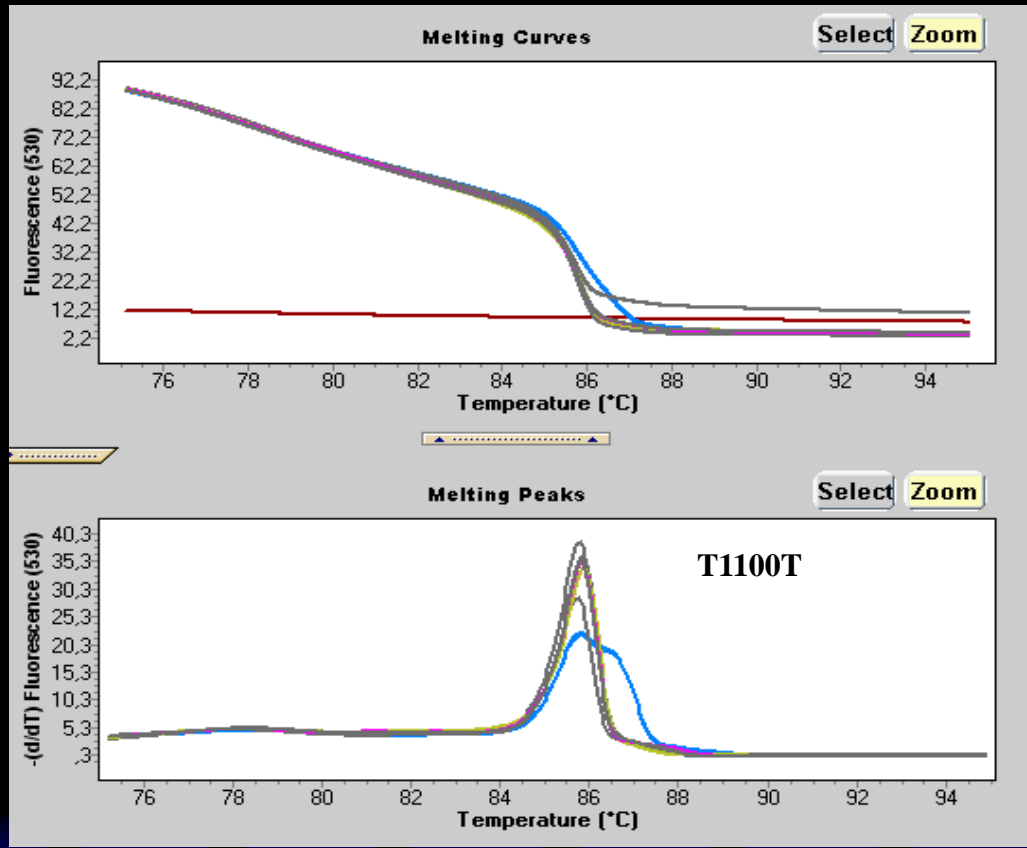
Poumpouridou N. et al., Clin Chem Lab Med (2009) 47, S166

- Χαρακτηρίζεται καλοήθη με βάση την ανάλυση με software (PolyPhen, Mutation taster, SIFT)
- Στην Αυστραλία OR 1,24
- Σε ομοζυγωτία βρέθηκε ότι σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο του μαστού (στη Χιλή)
- Αξιίζει περισσότερης διερεύνησης πιθανόν λόγω επιρροής στον μηχανισμό ματίσματος

Thompson E.R. et al., Breast Cancer Research (2015), 17,111

Ανάλυση HRM για τα υπόλοιπα *PALB2* εξόνια

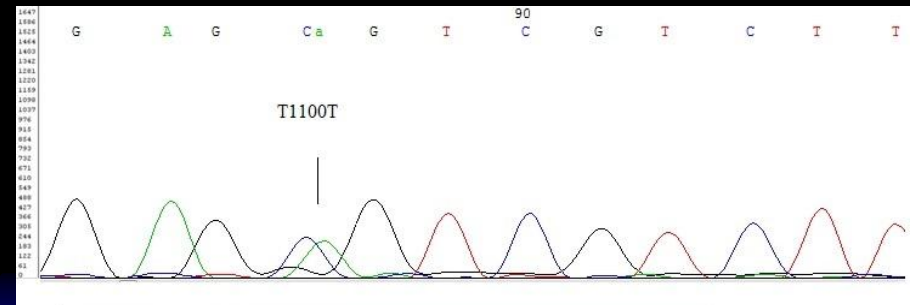
- Τα υπόλοιπα 11 μικρά εξόνια εξετάστηκαν με **High Resolution Melting (HRM)** στο LS32 παρουσία της χρωστικής LCGreenPlus (Idaho Technology, USA)



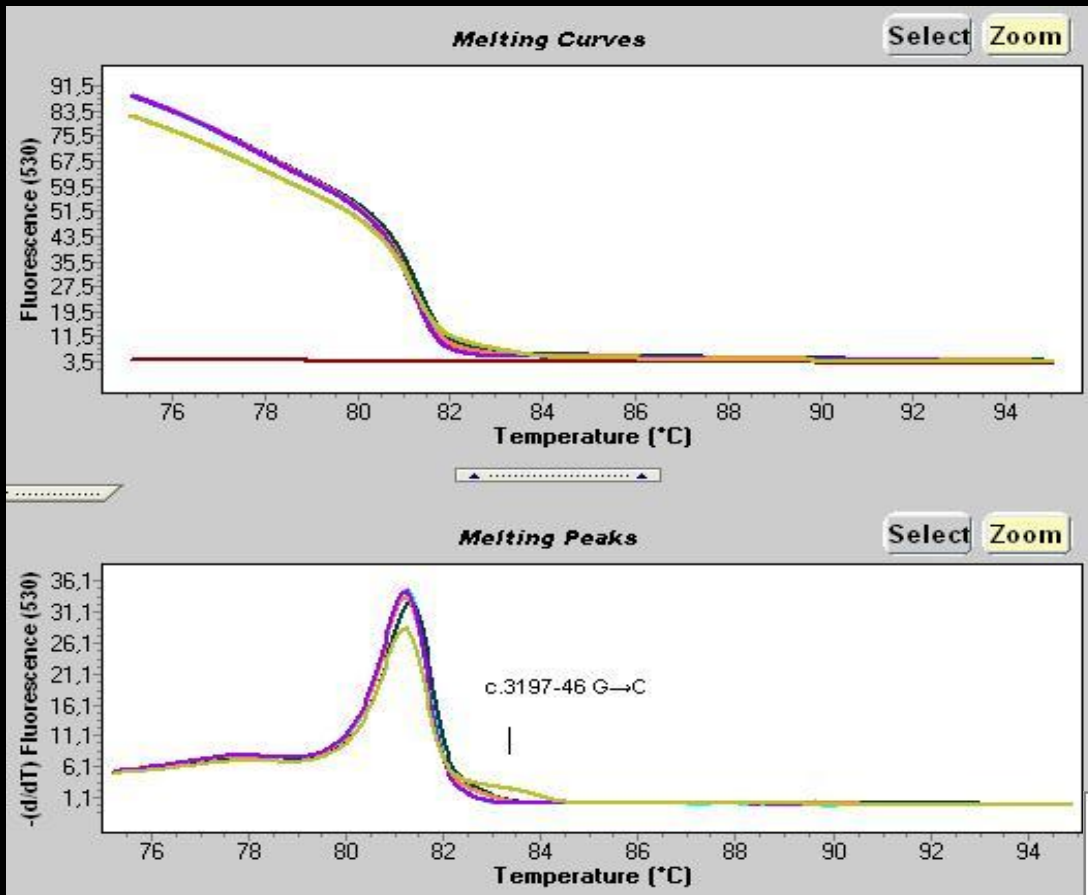
Εξόνιο 12 του *PALB2* γονιδίου

συνώνυμη μετάλλαξη
c.3500 T→G (T1100T)

σε 2 ασθενείς με μυελοειδή
καρκίνο του μαστού



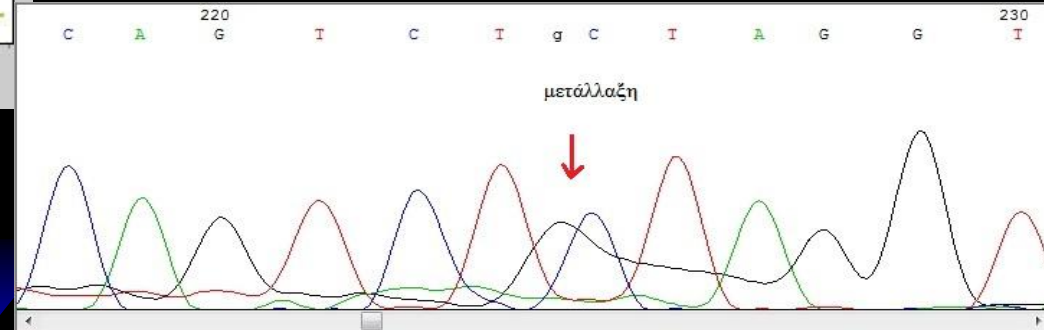
HRM ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



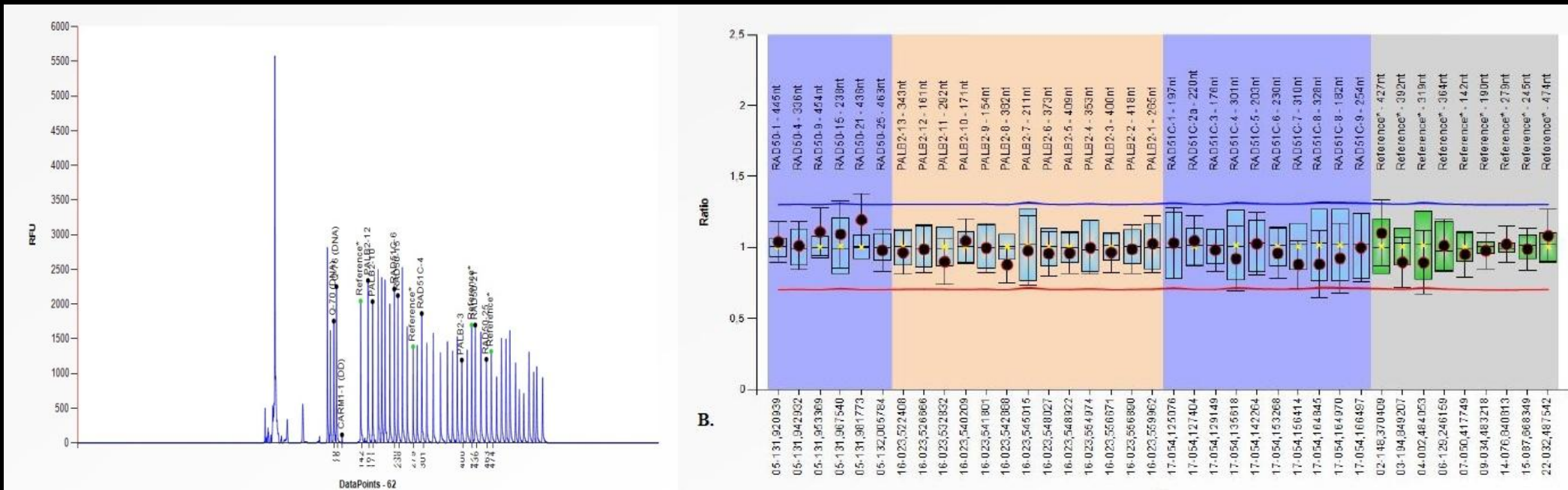
Καμπύλη τήξης για το εξόνιο 10

Δείγμα 43: αλλαγή στο ιντρόνιο πριν το εξόνιο 10 (δεν έχει ξαναφερθεί, χωρίς επιρροή στο μάτισμα σύμφωνα με το Fruitfly software)

Επιβεβαίωση μετάλλαξης με
DNA Sequencing

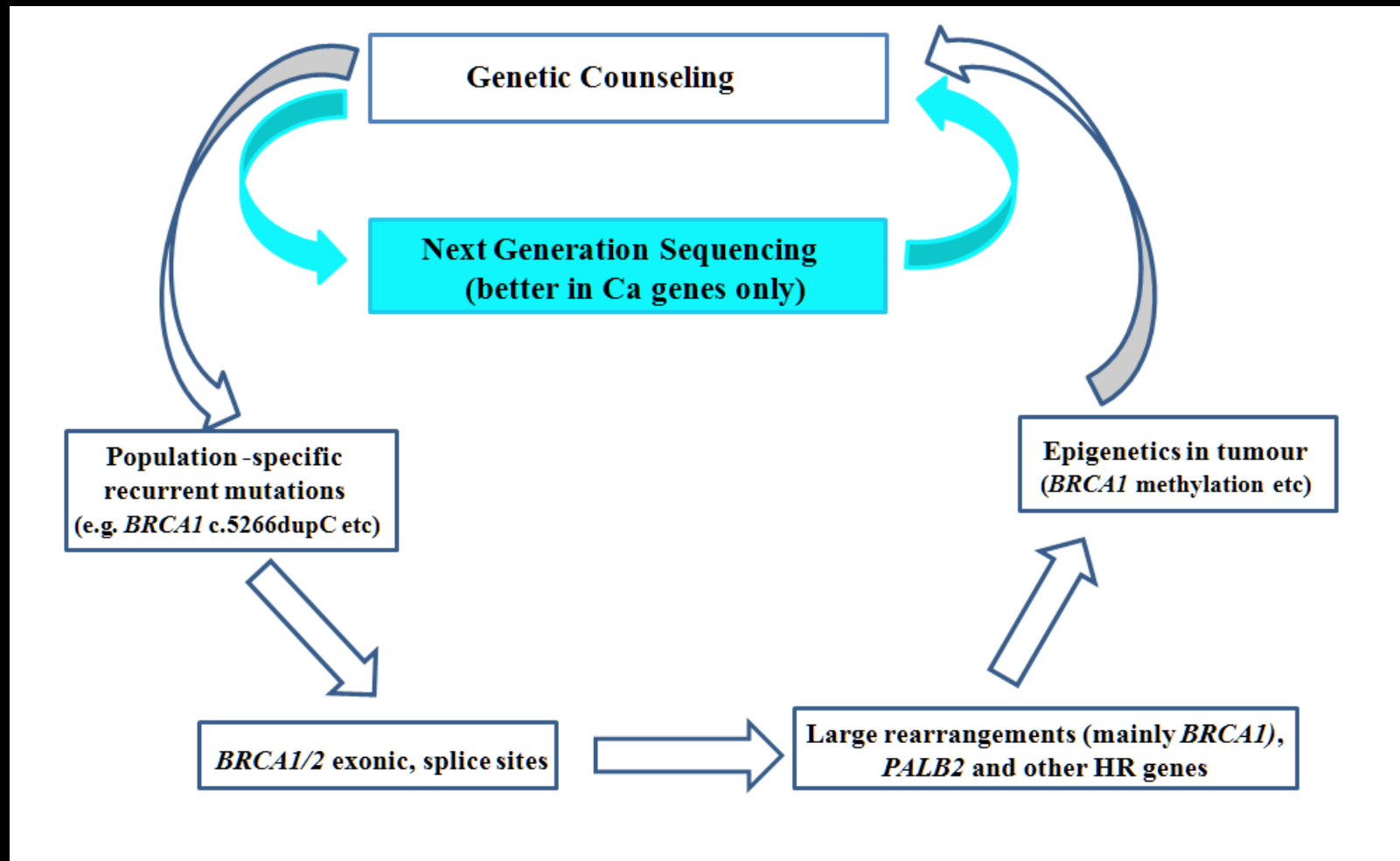


MLPA για μεγάλες *PALB2* αναδιατάξεις



Salsa MLPA probemix P260-A1 (MRC-Holland) στο ABI310 (Applied Biosystems) και ανάλυση θραυσμάτων με το Coffalyzer.Net software

Αλγόριθμος γενετικής ανάλυσης



Poumpouridou N. and C. Kroupis, *Clin Chem Lab Med* (2012), 50 (3), 423

Όχι DTC testing – διαπιστευμένα κατά ISO 15189 εργαστήρια

Multi-gene panels για NGS

Αρχικό κόστος εγκατάστασης της τεχνολογίας –

Κάθετη πτώση κόστους για τον ενδιαφερόμενο (από 3-4.000 \$!!)

Σχεδόν απόλυτη ισοδυναμία των δύο μεθόδων αναφορικά με τη BRCA γενετική ανάλυση

5-60 γονίδια

phenotype-
specific
panel

Broader panel:
all
Cancer genes

Understand your genetic risk
for breast and ovarian cancer

Color analyzes 19 genes—including BRCA1 and BRCA2—to help you understand your risk of developing breast and ovarian cancer. Purchase your Color Kit for \$199 (normally \$249).

Purchase Color for \$199

Invitae Common Hereditary Cancers Panel

Genetic testing for 42 genes that are associated with hereditary breast, ovarian, uterine, colorectal, gastric, and pancreatic cancers.

[VIEW TEST DETAILS](#)

GENES TESTED:

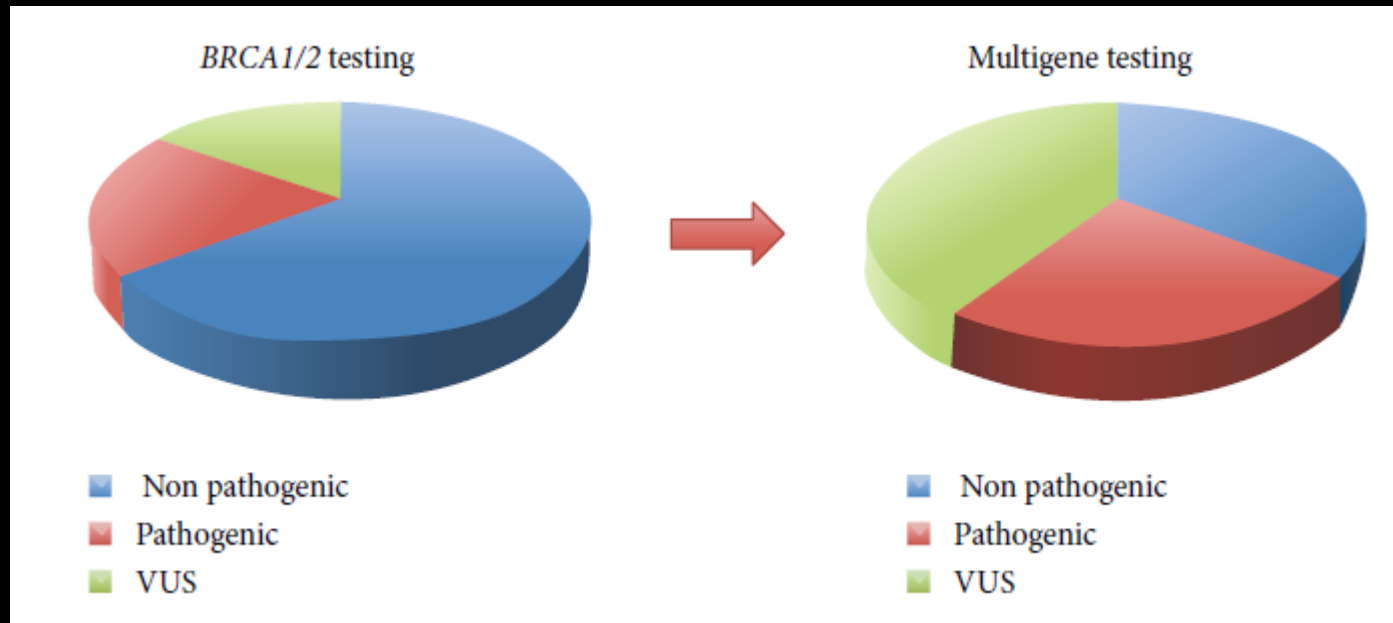
APC*	ATM	AXIN2	BARD1	BMPR1A*	BRCA1	BRCA2*
BRIP1	CDH1	CDKN2A*	CHEK2	DICER1	EPCAM	GREM1*
KIT	MEN1	MLH1*	MSH2*	MSH6	MUTYH	NBN
NF1	PALB2	PDGFRA	PMS2	POLD1	POLE	PTEN*
RAD50	RAD51C	RAD51D	SDHA	SDHB	SDHC	SDHD
SMAD4	SMARCA4	STK11	TP53*	TSC1	TSC2	VHL

Unexpected
findings:
Off-phenotypic
target

*Rare correlations,
de novo,
mosaic*

Αύξηση θετικών ευρημάτων και VUS

Variant of Unknown Significance



Toss A. et al., Biomed Res. Int. (2015), 341723

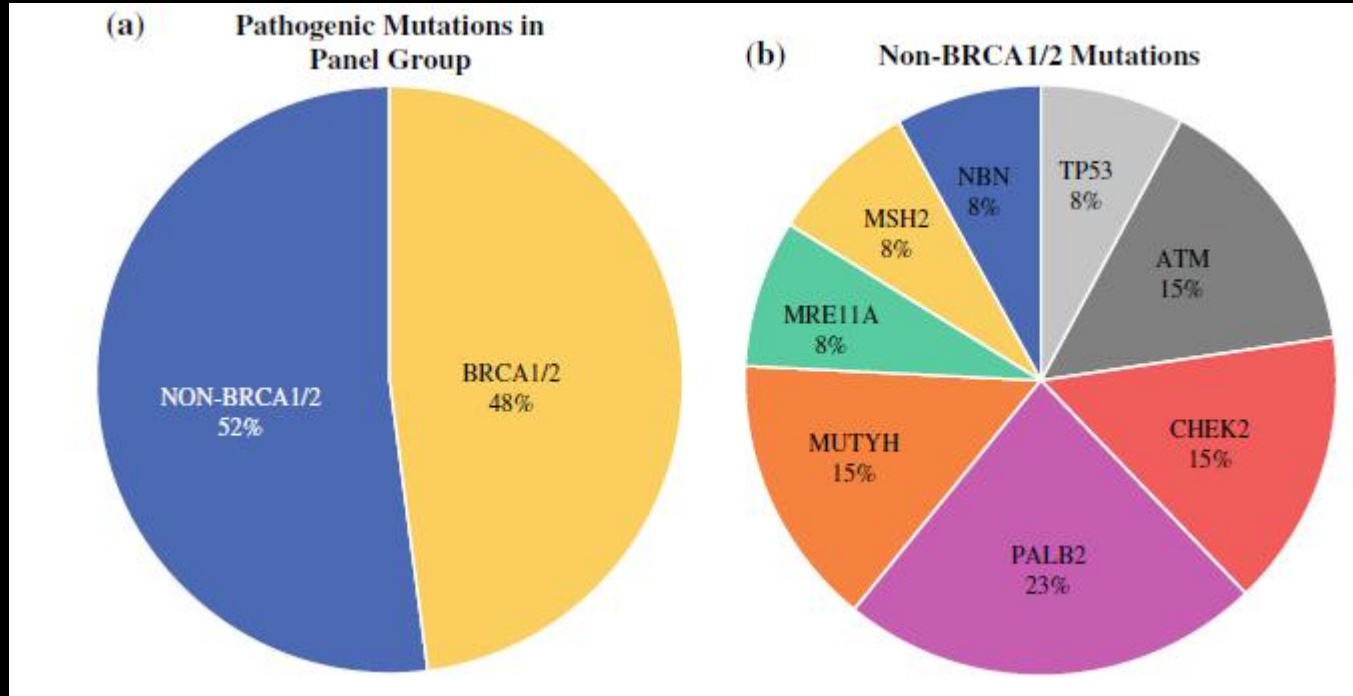
13% VUS *BRCA* testing

Frank T. et al., JCO (2010), 20, 480

<http://brcaexchange.org/>

Clinical Mgmt in centralized & specialized family cancer clinics with long term follow up by a multidisciplinary team – constantly update VUS databases (public?)

Νέο φάσμα μεταλλάξεων

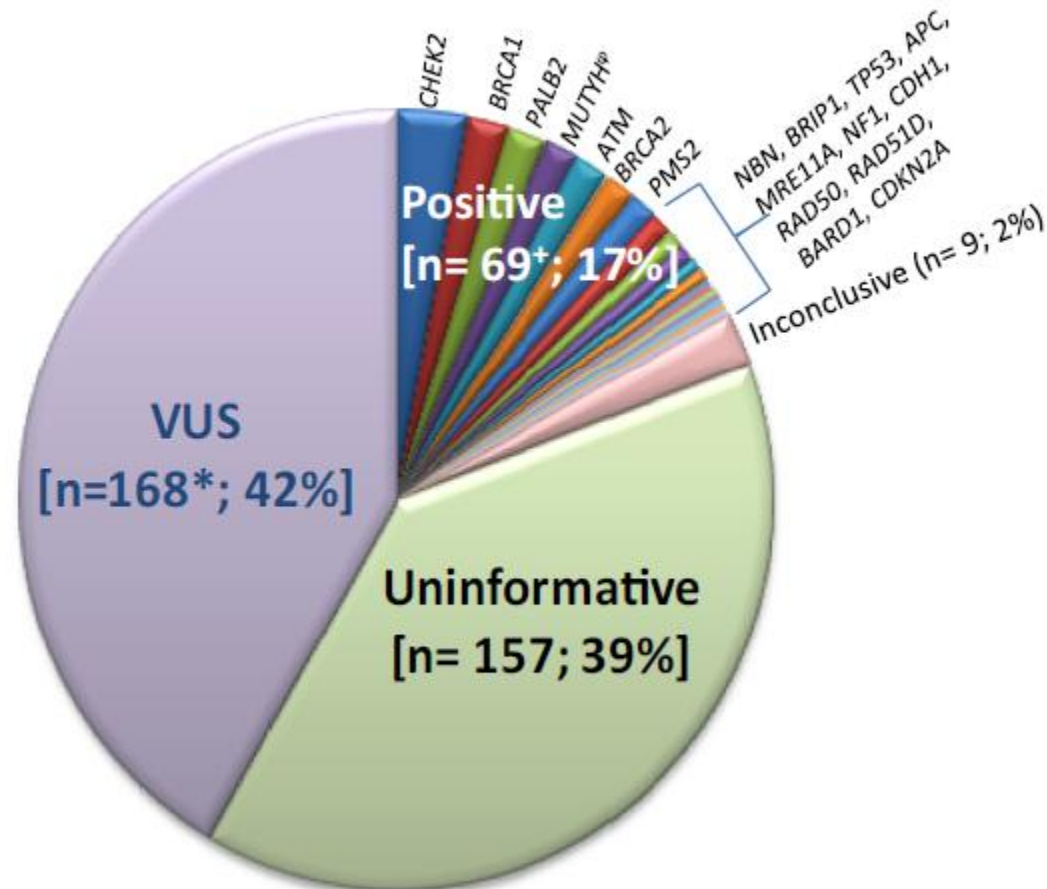


Karpoor N.S. et al., Ann Surg Onc (2015), 22, 3282

PALB2 το τρίτο γονίδιο

Uninformative cases

GENE	N	% of all Positives
CHEK2	12	17.4
BRCA1	7	10.1
PALB2	7	10.1
MUTYH ^{pp}	6	8.7
ATM	6	8.7
BRCA2	5	7.2
PMS2	5	7.2
NBN	4	5.8
BRIP1	3	4.3
p53	3	4.3
APC	2	2.9
MSH6	2	2.9
MRE11A	1	1.4
NF1	1	1.4
CDH1	1	1.4
RAD50	1	1.4
RAD51D	1	1.4
BARD1	1	1.4
CDKN2A	1	1.4



Whole exome
or genome Seq?

Όχι οικογενειακό ιστορικό?

3,6% των γυναικών με BrCa<40y που δεν έχουν οικογενειακό ιστορικό είναι φορείς *BRCA1* μετάλλαξης (Ellis D. et al, *J Med Genet* (2000), 37, 792)

«Κρυμμένο» οικογενειακό ιστορικό?

- «ατελής διεισδυτικότητα»
- μικρό μέγεθος οικογένειας
- κληρονόμηση μέσω των άρρενων μελών
- υιοθεσία

Ανάγκη να ανιχνευθούν όλοι οι υπάρχοντες φορείς!

Πρόγνωση, ενημέρωση απογόνων, κίνδυνος αμφοτερόπλευρου BrCa ή OνCa

Φαινοτυπικά στοιχεία που παραπέμπουν σε γενετική *BRCA1* ανάλυση

■ Βιολογικά χαρακτηριστικά του όγκου

- Ορμονικοί υποδοχείς (ER, PgR) αρνητ (-)
- Ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53
- Ογκογονίδιο c-erbB-2 αρνητ (-)
- Δείκτες πολλαπλασιασμού (+++)
 - **Ki-67**
 - S-φάση, PF
 - γιγαντοκύτταρα
- Πλοειδισμός (DNA ploidy)
- **Πρωτεΐνη BRCA1?**

Ανοσοϊστοχημεία (IHC)

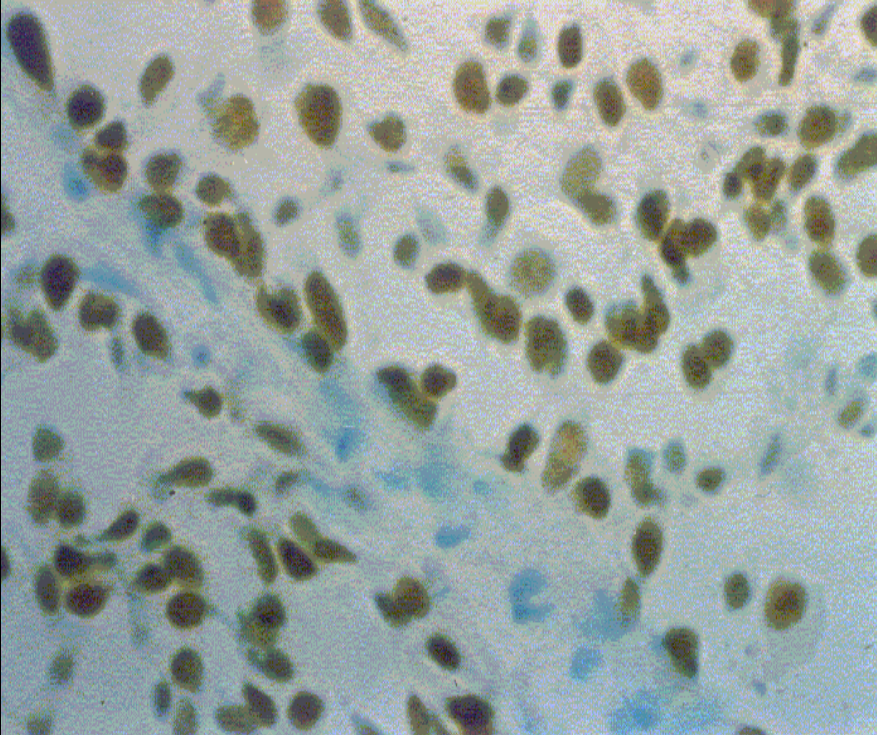
Κυτταρομετρία εικόνας
ή ροής (cytometry)

■ Ιστολογικά χαρακτηριστικά του όγκου

- Τύπος, grade, MI, λεμφαδενικές μεταστάσεις (+)
 - **Μυελοειδές καρκίνωμα μαστού**

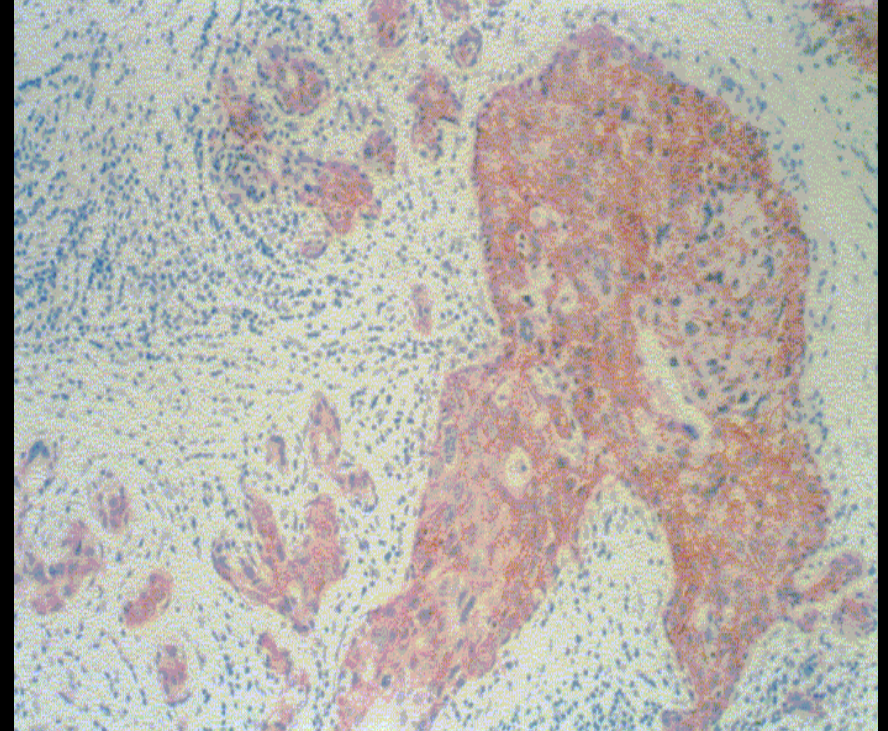
Ανοσοϊστοχημεία (IHC)

BRCA1-IHC



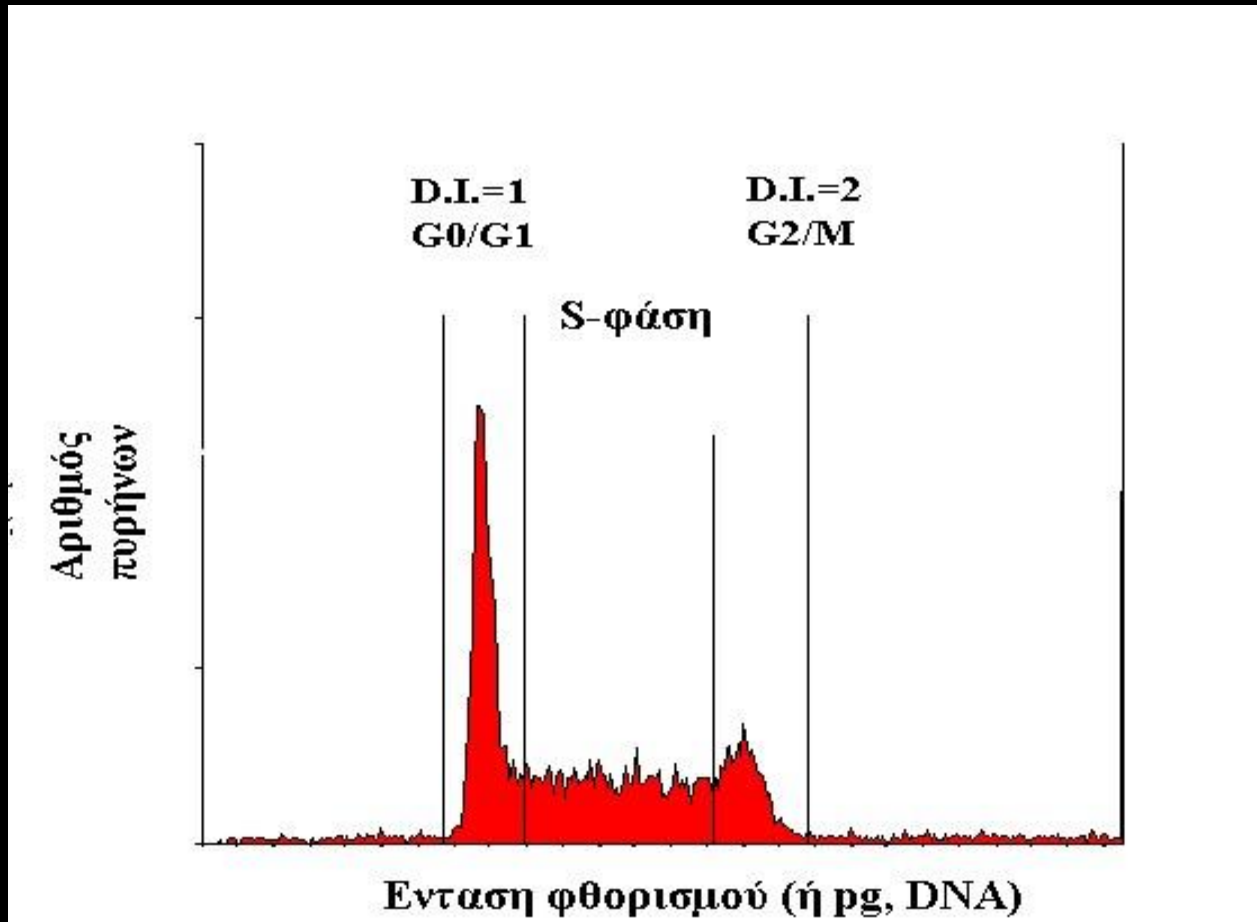
Πυρηνική χρώση
Ενζυμο: HRP
Χρωμογόνο: DAB
Χρώση υποβάθρου: Methyl green

c-erbB2-IHC



Μεμβρανική/κυτταροπλασματική χρώση
Ενζυμο: ALP
Χρωμογόνο: Fast Red
Χρώση υποβάθρου: Haematoxylin

Ιστόγραμμα φυσιολογικού πληθυσμού

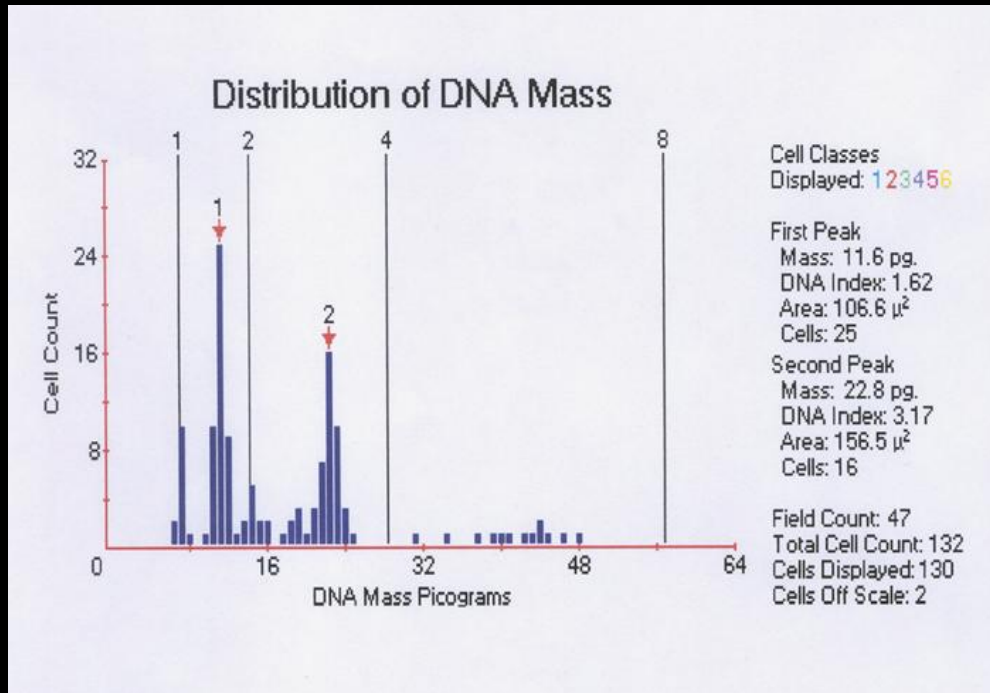


	<u>D.I.</u>
Διπλοειδικός:	0,9 –1,1
Τετραπλοειδικός:	1,9 –2,1
Ανευπλοειδικός:	1,2-1,8 >2,2

$$\text{DNA Index (D.I.)} = \frac{\text{Ποσότητα DNA της } G_0/G_1 \text{ φάσης των υπό εξέταση κυττάρων}}{\text{Ποσότητα DNA της } G_0/G_1 \text{ φάσης φυσιολογικών κυττάρων (αναφοράς)}}$$

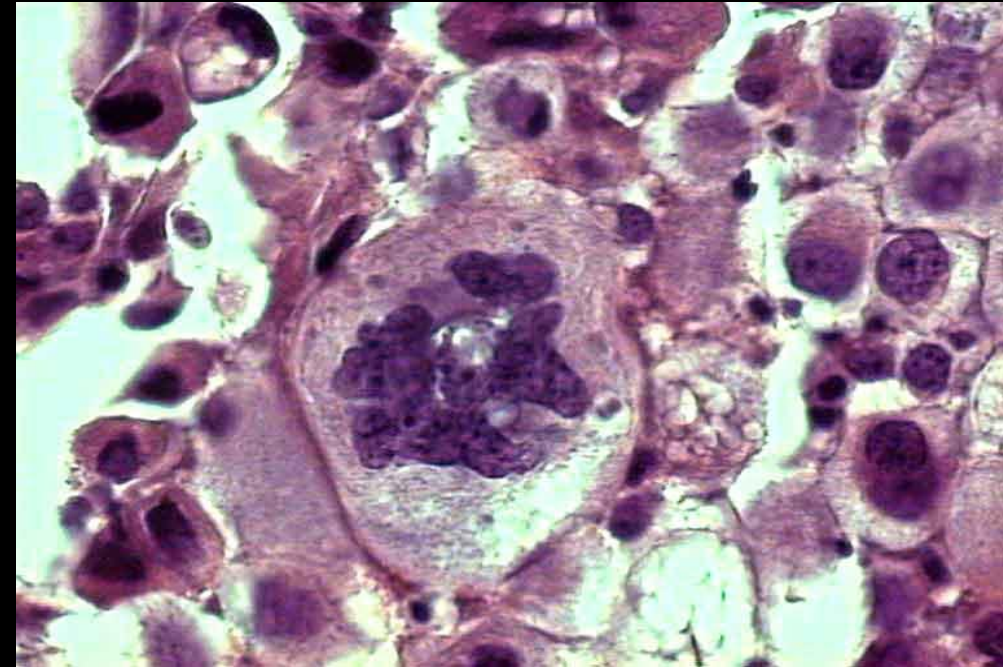
Ασθενείς χωρίς οικογενειακό ιστορικό

Ασθενής #71



Ιστόγραμμα DNA Πλοειδισμού

Ασθενής #64



Βαφή H&E (x 400)

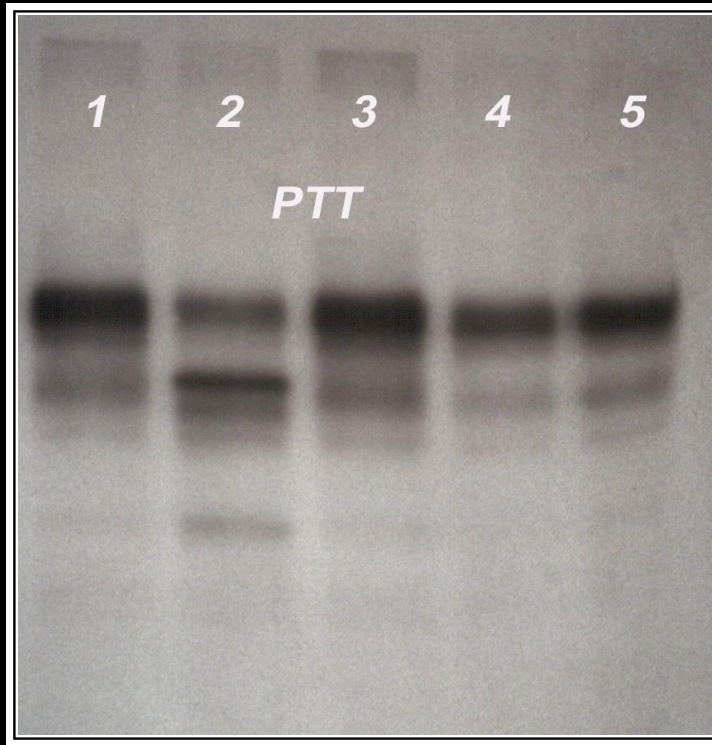
και τα δύο ER (-), c-erbB2 (-), Ki-67 (+++)

Ανευπλοειδικό (D.I.=1,62)
με έντονο πολλαπλασιασμό

Μυελοειδές, γιγαντοκύτταρα (D.I.= 49!!)

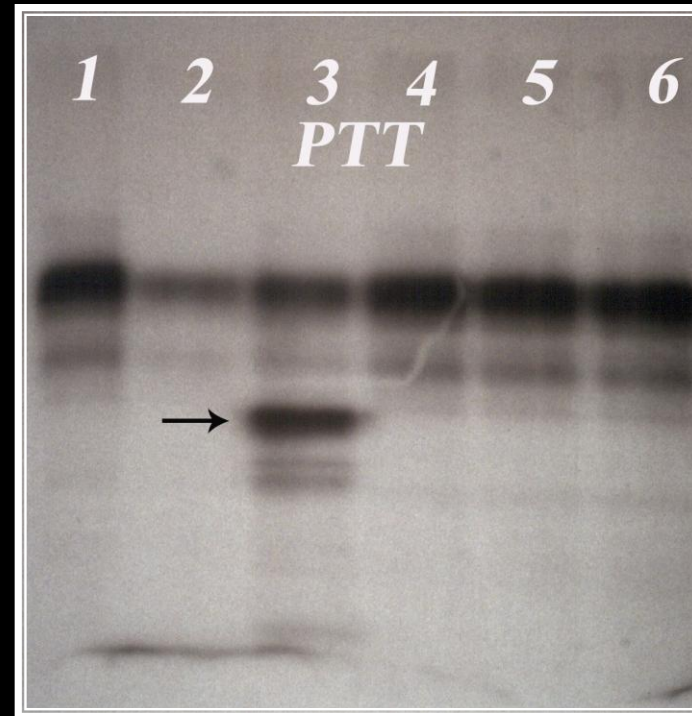
Μεταλλάξεις σε γυναίκες χωρίς οικογενειακό ιστορικό

Ασθενής #71



3896delT εξόνιο 11 *BRCA1*
Br/Ov Ca 47/48y

Ασθενής #64



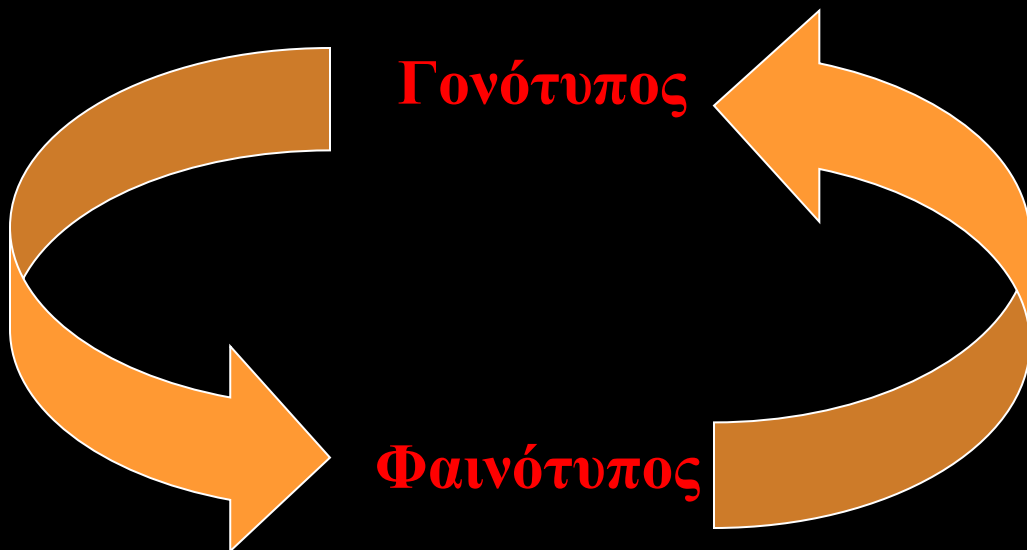
R1203X εξόνιο 11 *BRCA1*
BrCa 40y (υιοθετημένη)

Kroupis C., Lianidou E. et al., Breast J. (2003), 9, 260

Kroupis C., Lianidou E. et al., Clin. Genet. (2004), 65, 343

Transcriptional profiling

BRCA1 καρκινώματα



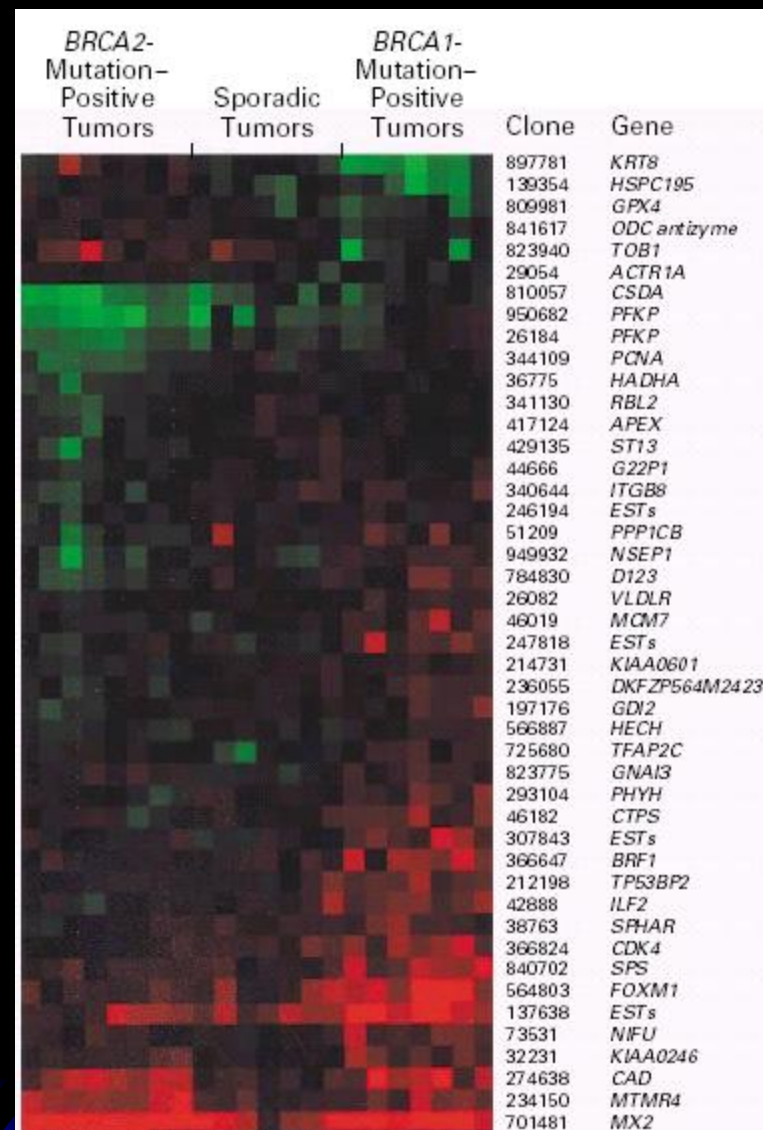
Με τεχνολογία cDNA μικροσυστοιχιών αναγνωρίστηκαν 176 γονίδια που εκφράζονται διαφορετικά στα BRCA1 καρκινώματα από τα αντίστοιχα BRCA2 και σποραδικά.

BRCA1 μοριακή «υπογραφή» στον όγκο?

BRCA1ness

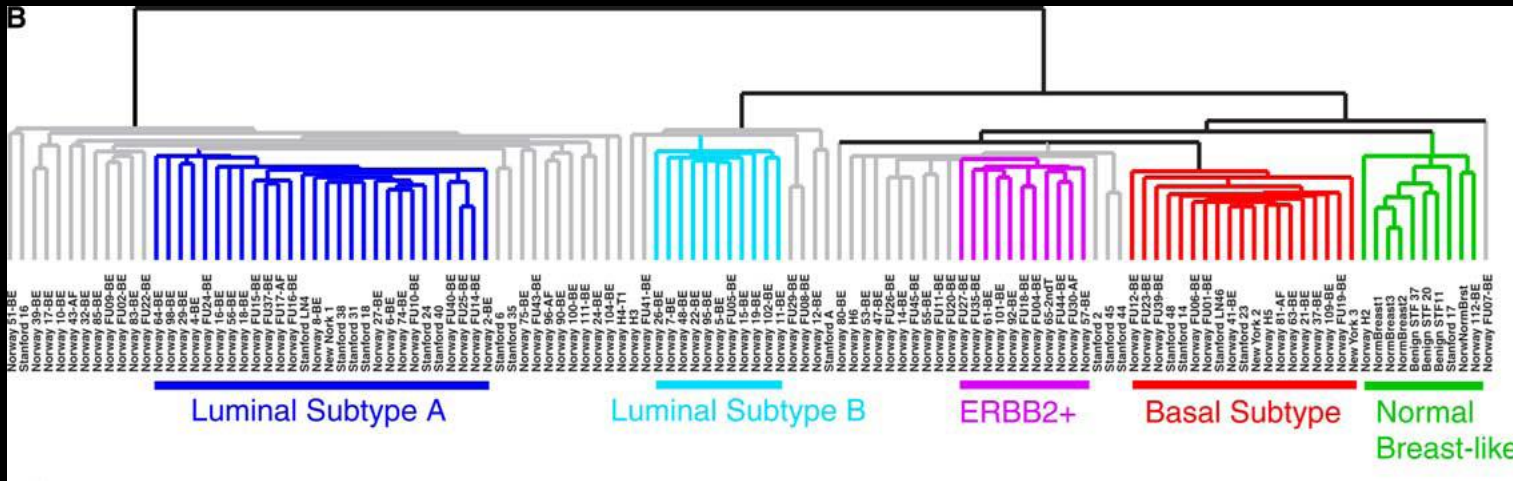
80% ανήκουν στην TNBC κατηγορία

Hedenfalk I. et al., NEJM (2001), 344, 539



TNBC=Triple-negative BrCa

Molecular Br Ca Subtyping



+5^{ος} τύπος: Claudin-low (EMT) σαν σαρκώματα <5%)

Αυλοκυτταρικός τύπος A και B
(συνήθως ER+)

8% Βασικοειδής
(15%)

Sorlie T. et al., Eur J Cancer (2004), 40, 2667

Lab Tests Online GR

Πηγή πληροφοριών για το ευρύ κοινό, σχετικά με εργαστηριακές εξετάσεις, από επιστήμονες των διαγνωστικών εργαστηρίων

www.labtestsonline.gr

Προγνωστική και προβλεπτική αξία των:

- Oncotype Dx (21 genes, RT-qPCR)
- Mammaprint (70 genes, microarray)
- PAM50 Arup Labs (50 genes, RT-qPCR)

Παρακολούθηση *BRCA* και HR-less φορέων

Έντονη παρακολούθηση των φορέων με μαστογραφία, υπερήχους και MRI
Ζητούμενο η έγκαιρη ανίχνευση ογκιδίων <1 cm

Προφύλαξη *BRCA* φορέων/ασθενών

Σύσταση για προφυλακτική αμφοτερόπλευρη μαστεκτομή ή/και σάλπιγγο-ωοθηκεκτομή
(ειδικά μετά τη τεκνοποίηση ή μετά τα 40 y)

Χημειοπροφύλαξη με ταμοξιφαίνη

[ίσως έχει αξία στην αποφυγή αμφοτερόπλευρου καρκίνου μαστού (69% μείωση)]

Πρόγνωση *BRCA* ασθενών

Μάλλον παρόμοια, δεν υπάρχει καλή συσχέτιση μεταξύ μεγέθους όγκου- λεμφαδένων
Προσοχή για αμφοτερόπλευρο καρκίνο μαστού /καρκίνο ωοθηκών!

Πιο συχνή παρακολούθηση CTCs?

Συμβατική χημειοθεραπεία σε *BRCA* και *HR-less* ασθενείς

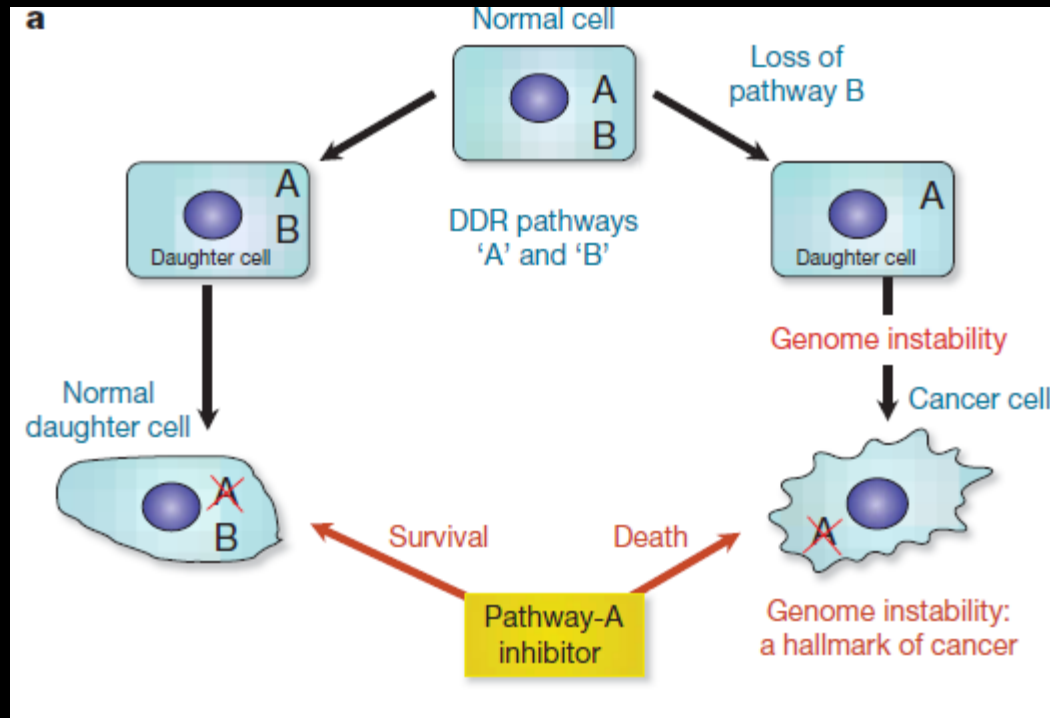
Απαραίτητη η επικουρική θεραπεία ακόμη με μικρούς όγκους και αρνητικούς λεμφαδένες!

1) Αυξημένη ευαισθησία σε παράγοντες που αυξάνουν το φορτίο των DNA βλαβών που αδυνατούν να αντιμετωπίσουν τα *BRCA*-/- κύτταρα του όγκου

«αλκυλιωτικοί» παράγοντες με πλατίνα π.χ. Cisplatin, carboplatin ή μιτομυκίνη C

2) Αντίσταση στις ταξάνες (Taxol, Taxotere)?

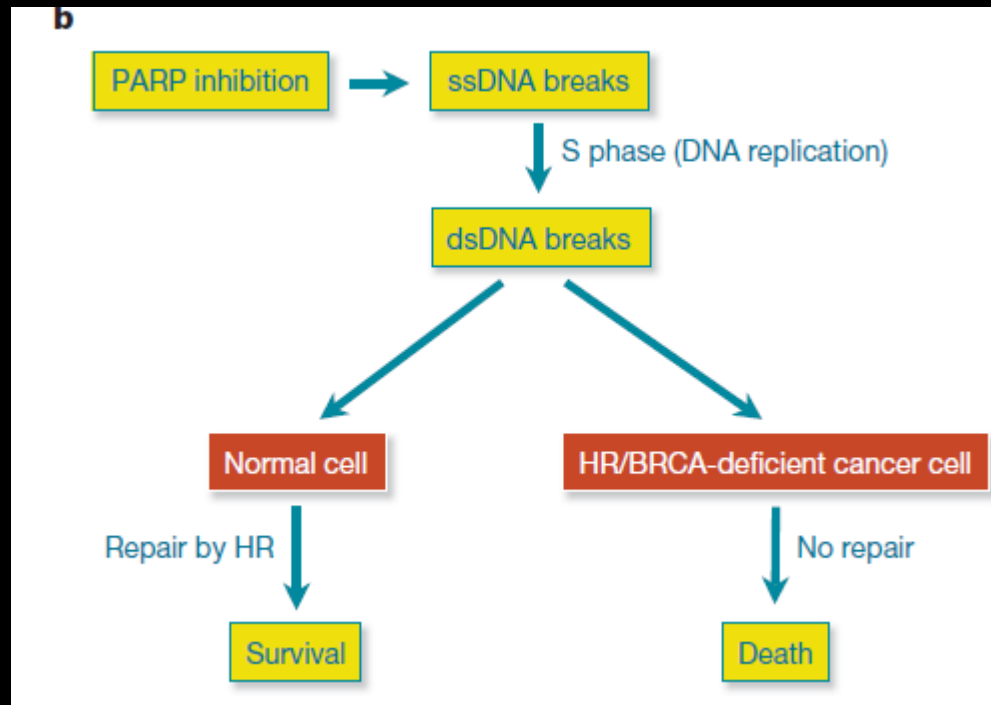
Σχεδιασμός καινούργιων «έξυπνων» θεραπευτικών



Jackson S.P. and J. Bartek, Nature (2009), 461, 1071

PARP αναστολείς (Poly (ADP Ribose) Polymerase 1

Ένζυμο με ρόλο στη **Base Excision Repair (BER)**: με υπόστρωμα NAD^+ , προσθέτει ADP ριβόζη σε ιστόνες (chromatin remodeling), XXCC1 κλπ (και παρέχει ενέργεια?)



Πρώτες παρατηρήσεις:

Bryant HE et al., Nature 2005, 434, 913

Farmer H., et al., ibid, 917

Synthetic lethality χάρη στη διπλή HR+BER ανεπάρκεια

μόνο στα καρκινικά κύτταρα

Jackson S.P. and J. Bartek, Nature (2009), 461, 1071

Litman R., et al., Anticancer Agents Med Chem (2008), 8, 426

Πρώτες δοκιμές με PARP αναστολείς

Οι αναστολείς είναι ανάλογα νικοτιναμιδίου:

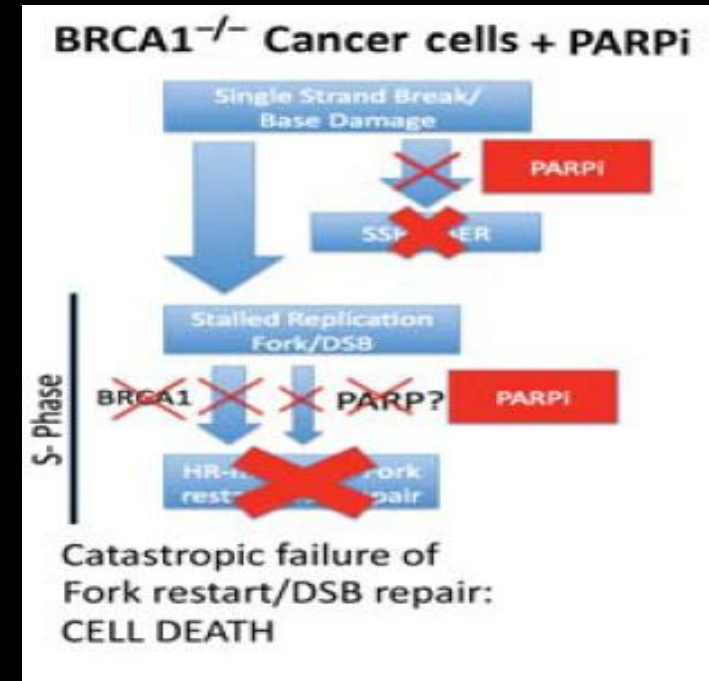
- Iniparib (BSI-201, 4-iodo-3-nitrobenzamide, BiPar Sciences) το πρώτο σε κλινική φάση III με mTNBC ασθενείς

O'Shaughnessy J. et al., NEJM (2011), 364, 205

- Olaparib (AZD2281, Astra-Zeneca)

Fong PC et al., NEJM (2009), 361, 123

Tutt A. et al., Lancet (2010), 376, 235 (σε BRCA mutation ασθενείς)



Aly A. and S. Ganesan.

J Mol Cell Biol (2011), 3, 66

Ίσως καλό ως chemo-sensitizer σε συνδυαστική θεραπεία?

Ως προφυλακτική αγωγή σε BRCA carriers ή BRCA1 μεθυλ (other HRless?)

Buisson R. et al., Nat Struct Mol Biol (2010) 17, 1247

Hellebrand H. et al., Hum Mut (2011), 32, E2176