



Νεώτερα Δεδομένα και Προκλήσεις στον Κληρονομούμενο καρκίνο μαστού και ωοθηκών



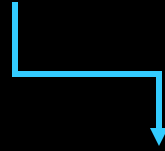
Χ. Κρούπης, MSc, PhD, EurClinChem
Βιοχημικός-Μοριακός Βιολόγος

*Επίκουρος Καθηγητής Κλινικής Βιοχημείας -Μοριακής Διαγνωστικής
Αττικόν Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο
Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών*

Θεματολογία ομιλίας

- ◆ Κληρονομούμενος καρκίνος μαστού/ωοθηκών και σύνδεση με επιδιόρθωση DNA (ομόλογος ανασυνδυασμός)
- ◆ Γονίδια *BRCA1* και *BRCA2*
- ◆ Νέο *PALB2* γονίδιο
- ◆ Μέθοδοι ανίχνευσης μεταλλάξεων
- ◆ Αποτελέσματα γενετικής ανάλυσης στον ελληνικό πληθυσμό
- ◆ Αλγόριθμος γενετικής ανάλυσης
- ◆ 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

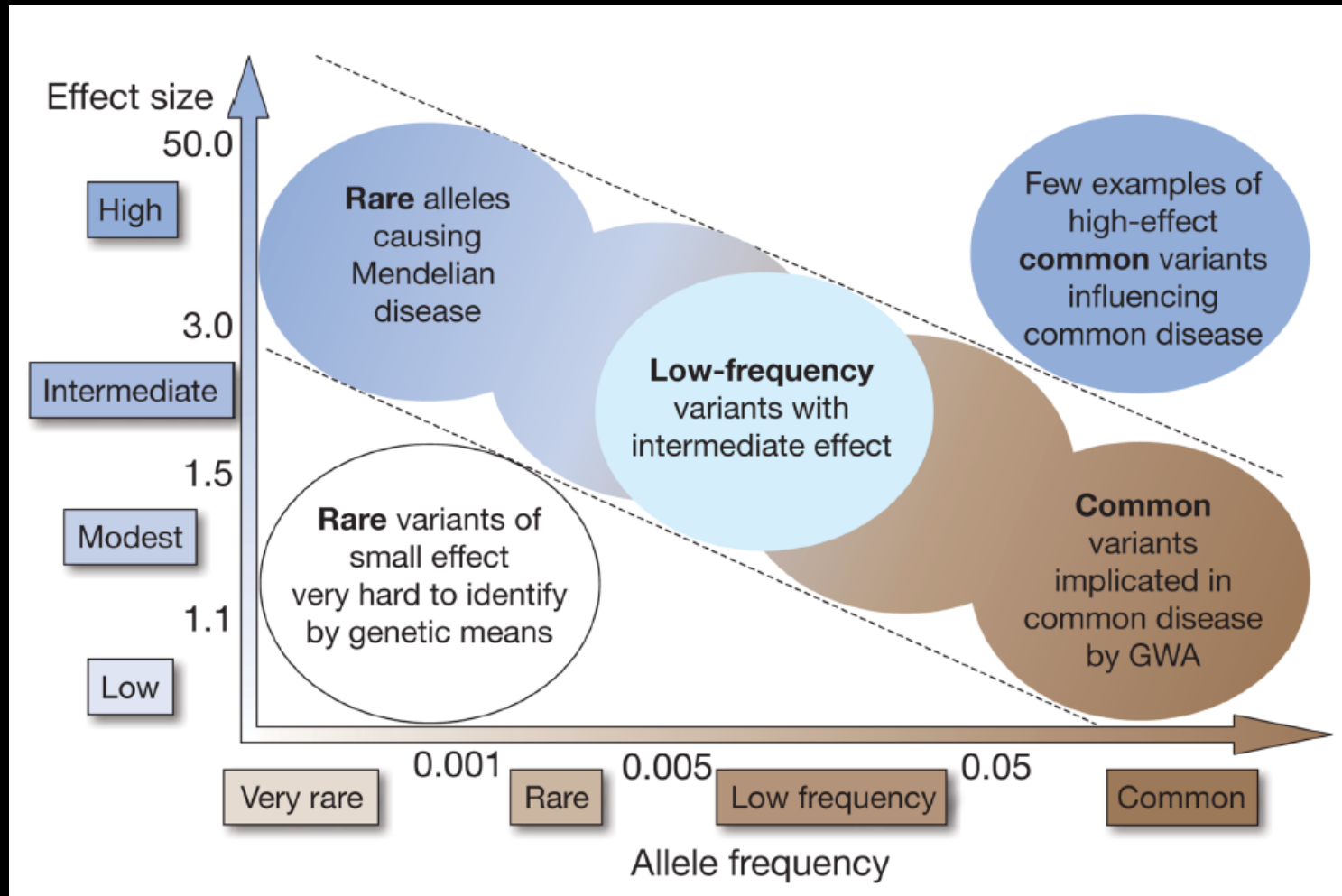
❖ Μέτριας διεισδυτικότητας γονίδια

- **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

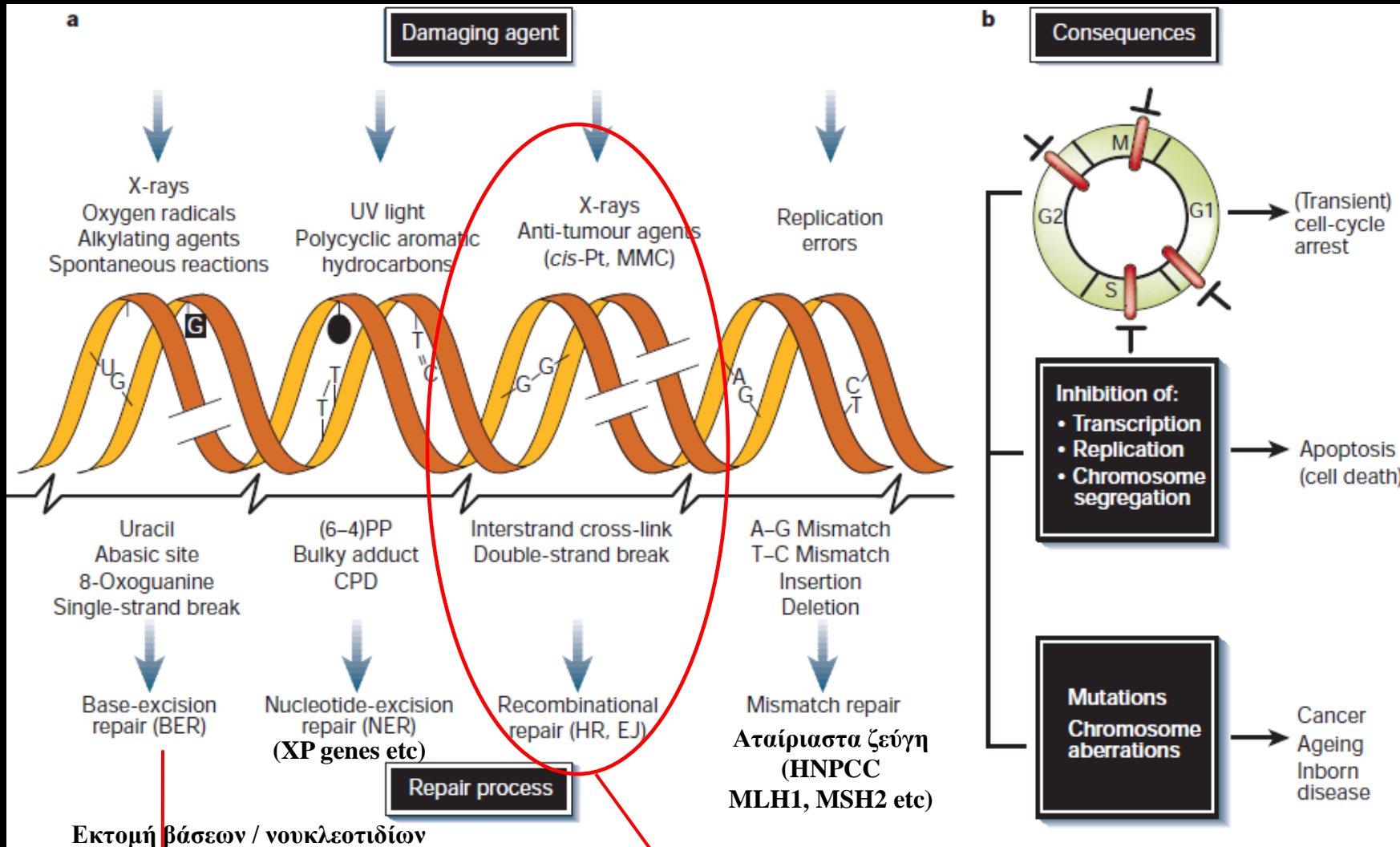
BRCA1/2, p53, PTEN *ATM, CHEK2, PALB2* *FGFR2* etc
RR > 5 **5 > RR > 1,5** **RR < 1,5**

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 ή NHEJ

ICL

(Interstand Cross-Links)

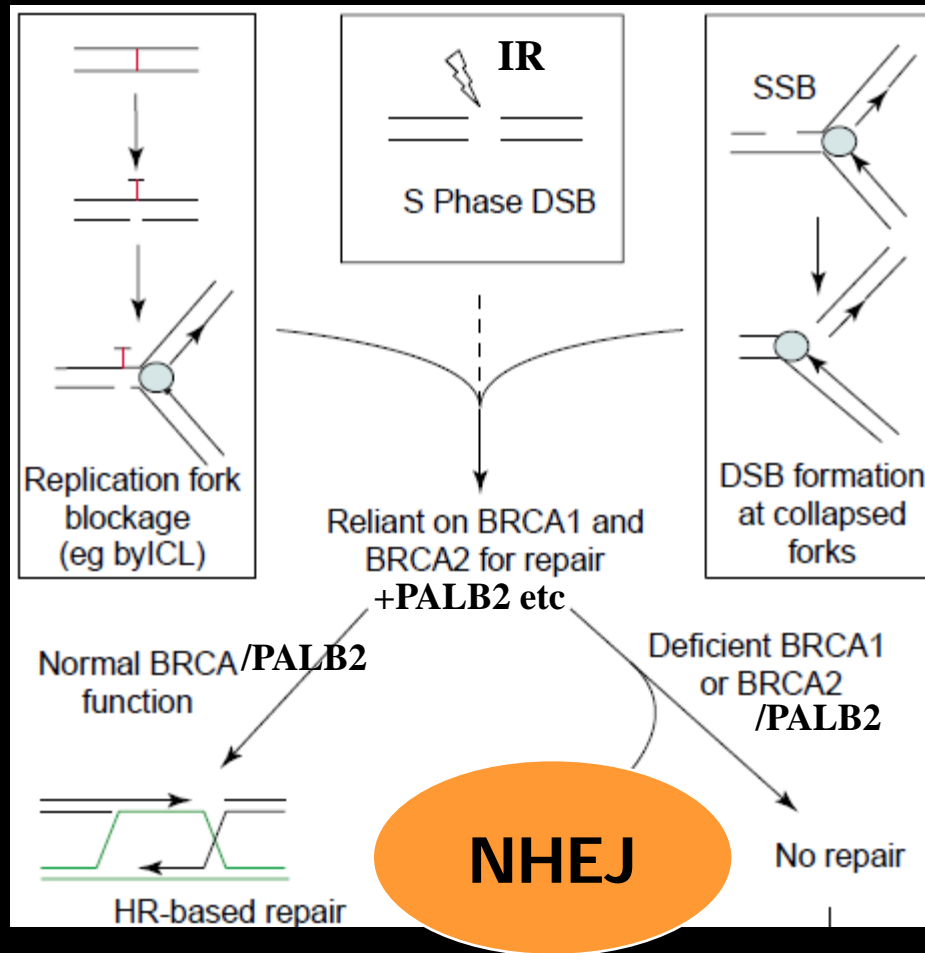
Δίκλωνοι δεσμοί

Συνδυασμός για ICL:

NER και

TLS (error prone)

ή HR



Απόπτωση ή
καρκινογένεση
(ανευπλοειδία)

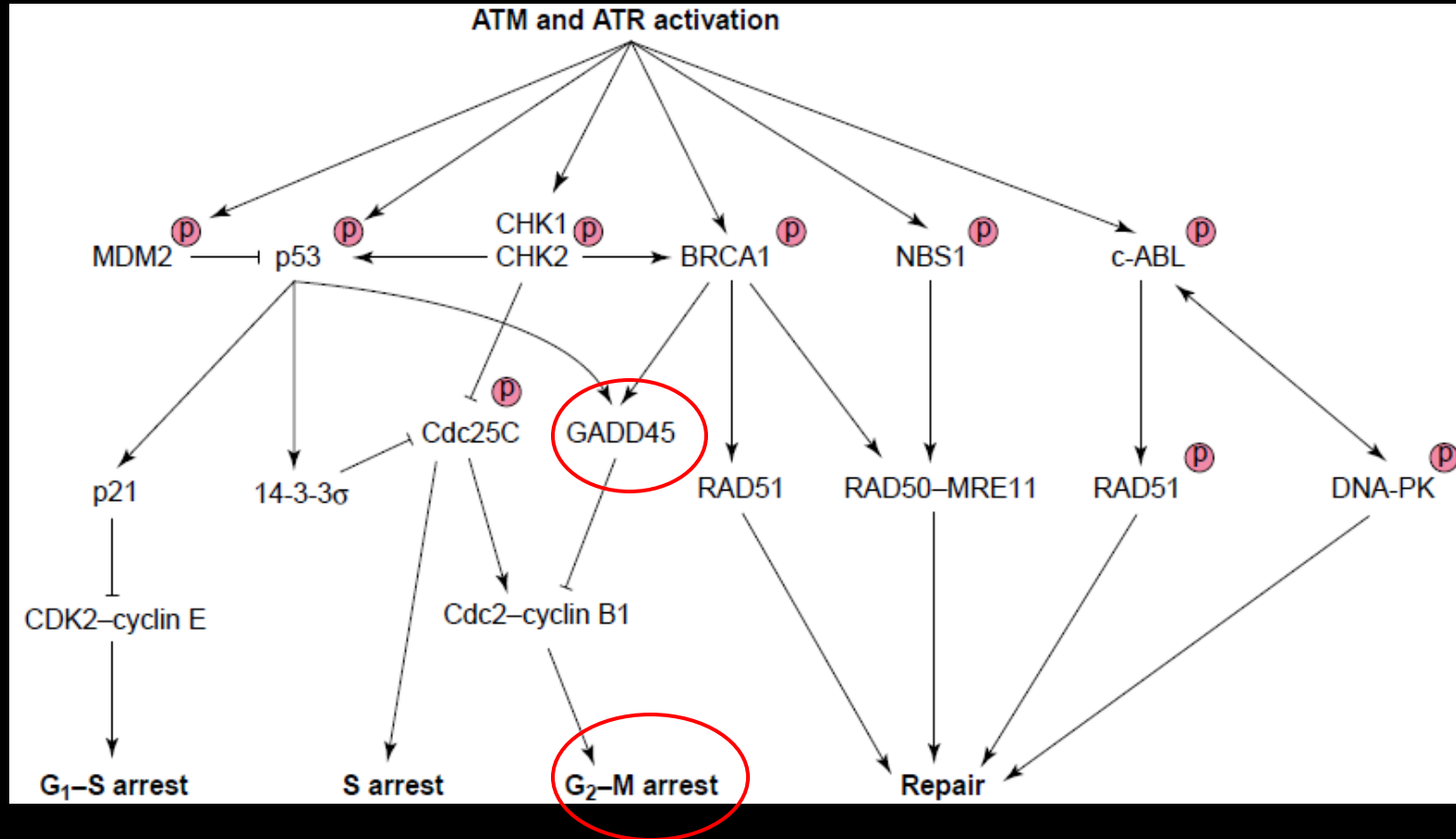
Non-Homologous End Joining

(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)

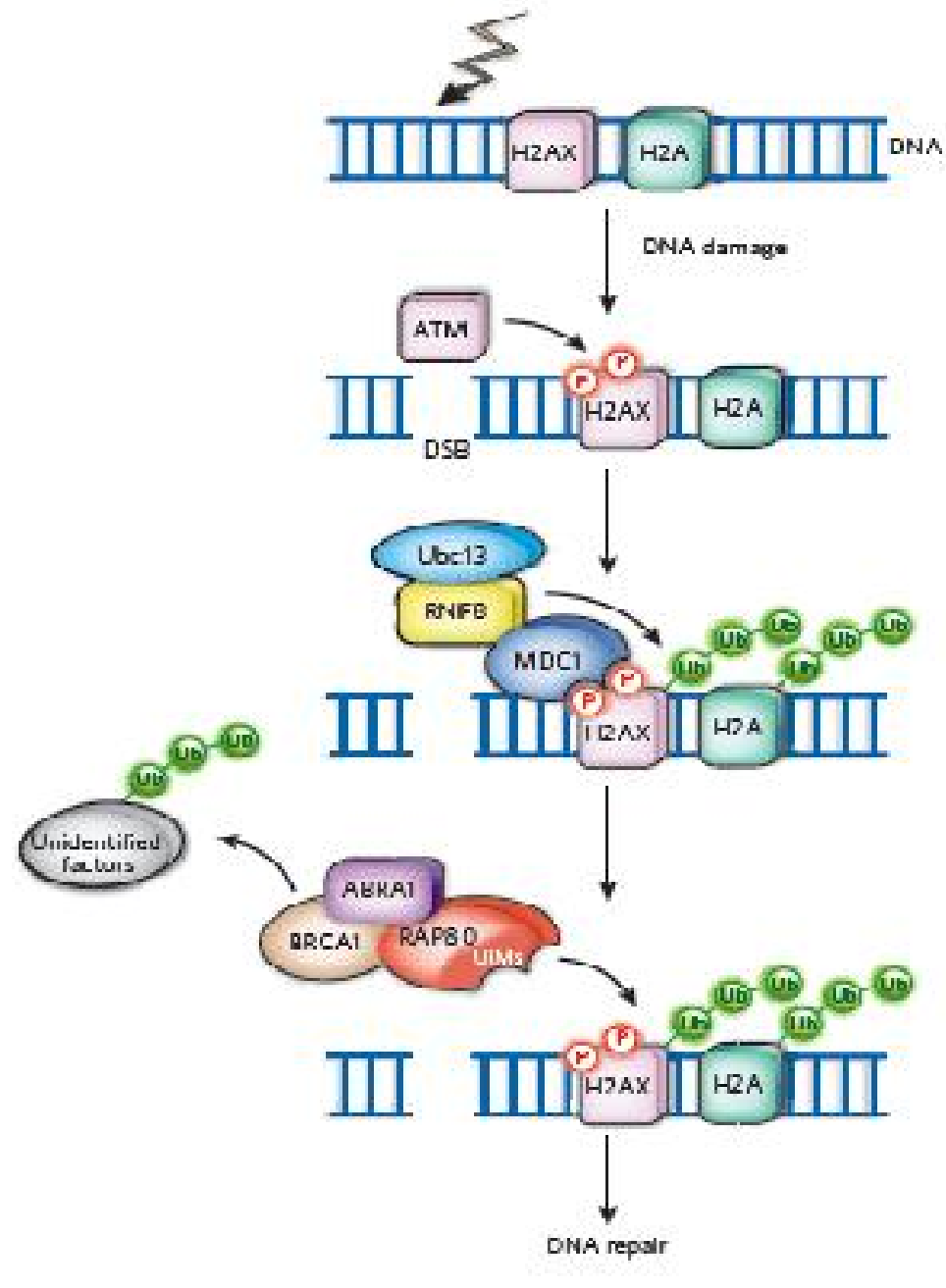
RAP80 (Recceptor Associated Protein) με διπλό
Ub μοτίβο αλληλεπίδρασης (UIM)
«οδηγεί» ABRAXAS και BRCA1
(μέσω BRCT domain) στο DSB-
G2/M checkpoint control?
(*Science* 2007, 316, 1194-1205, 3 άρθρα)

BRCA με RING domain-BARD1
διαθέτει ενζυμική δραστηριότητα E3
λγάσης

Μεταφέρει Lys-63 Ub αλυσίδες

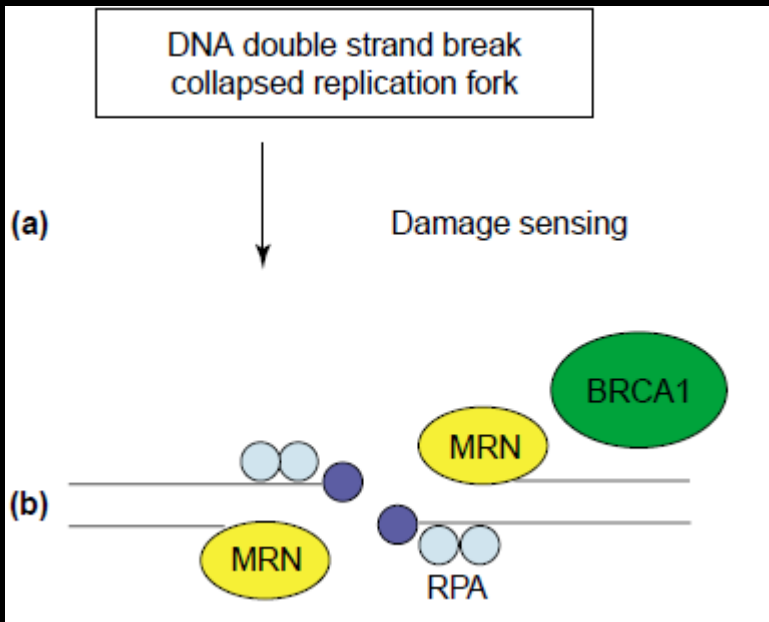
Hoeller D. and Dikic I., Nature (2009), 458, 438

Bergink S. and Jentsch S., Nature (2009), 458, 461



Προετοιμασία DSB για HR

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



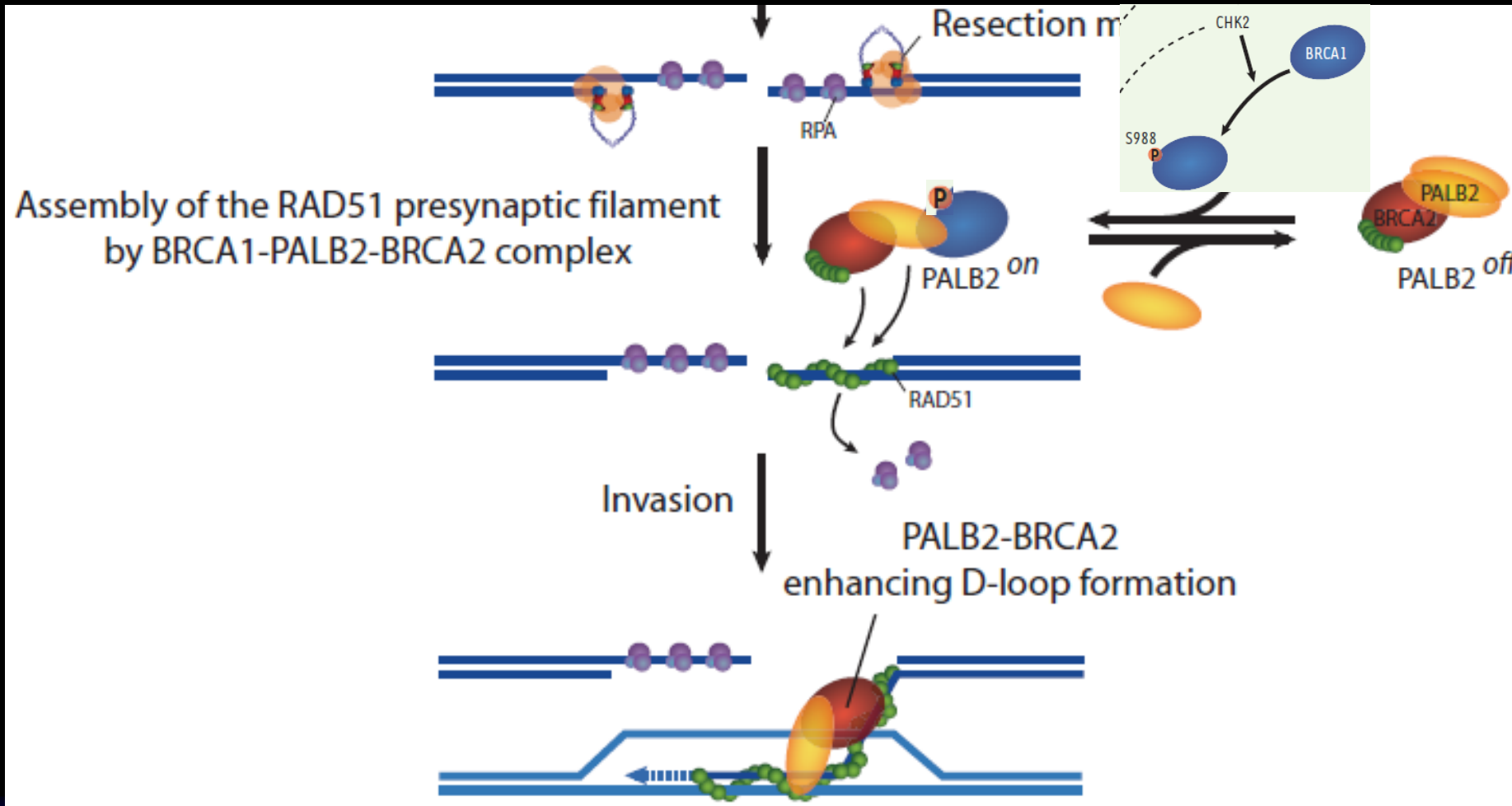
MRN complex = MRE11-RAD50-NBS1

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



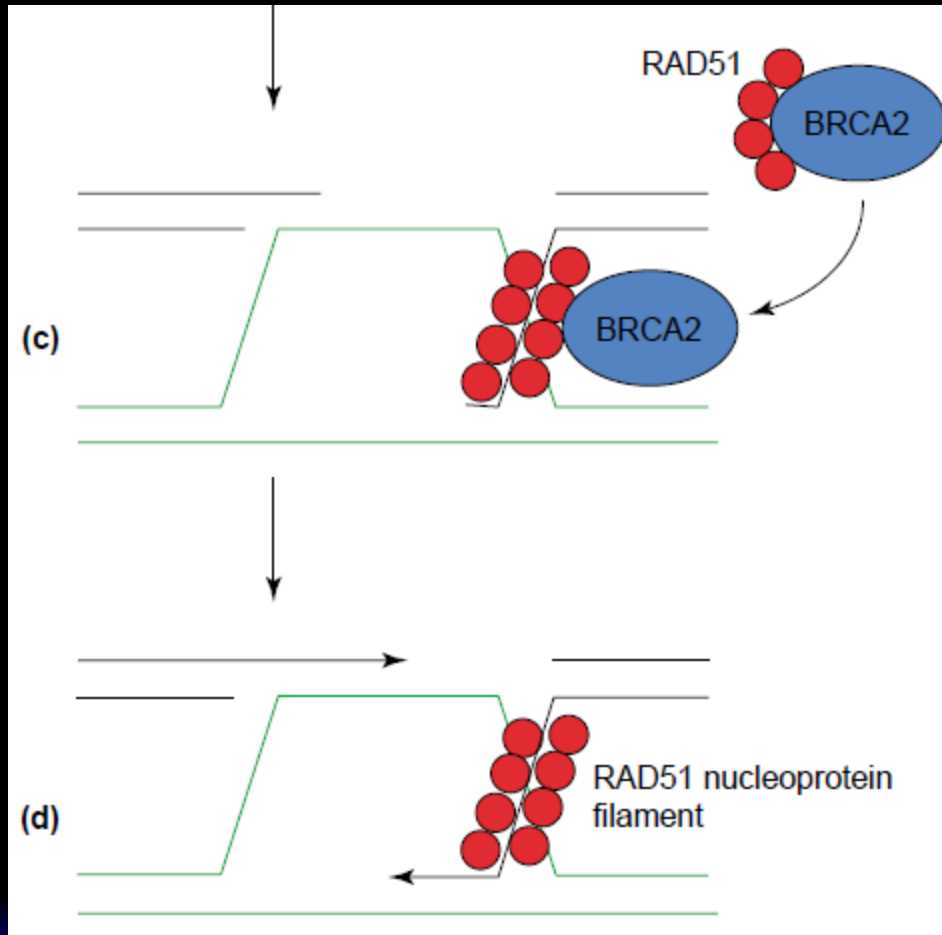
Διμερές
PALB2

53BP1 ↓

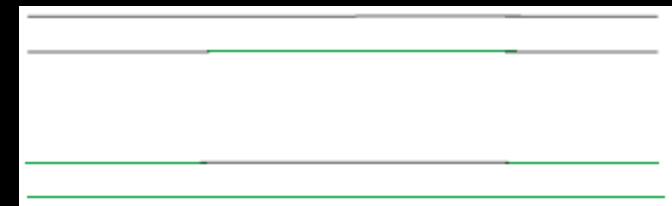
Buisson R. and J. Masson, NAR (2012), 40, 10312

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



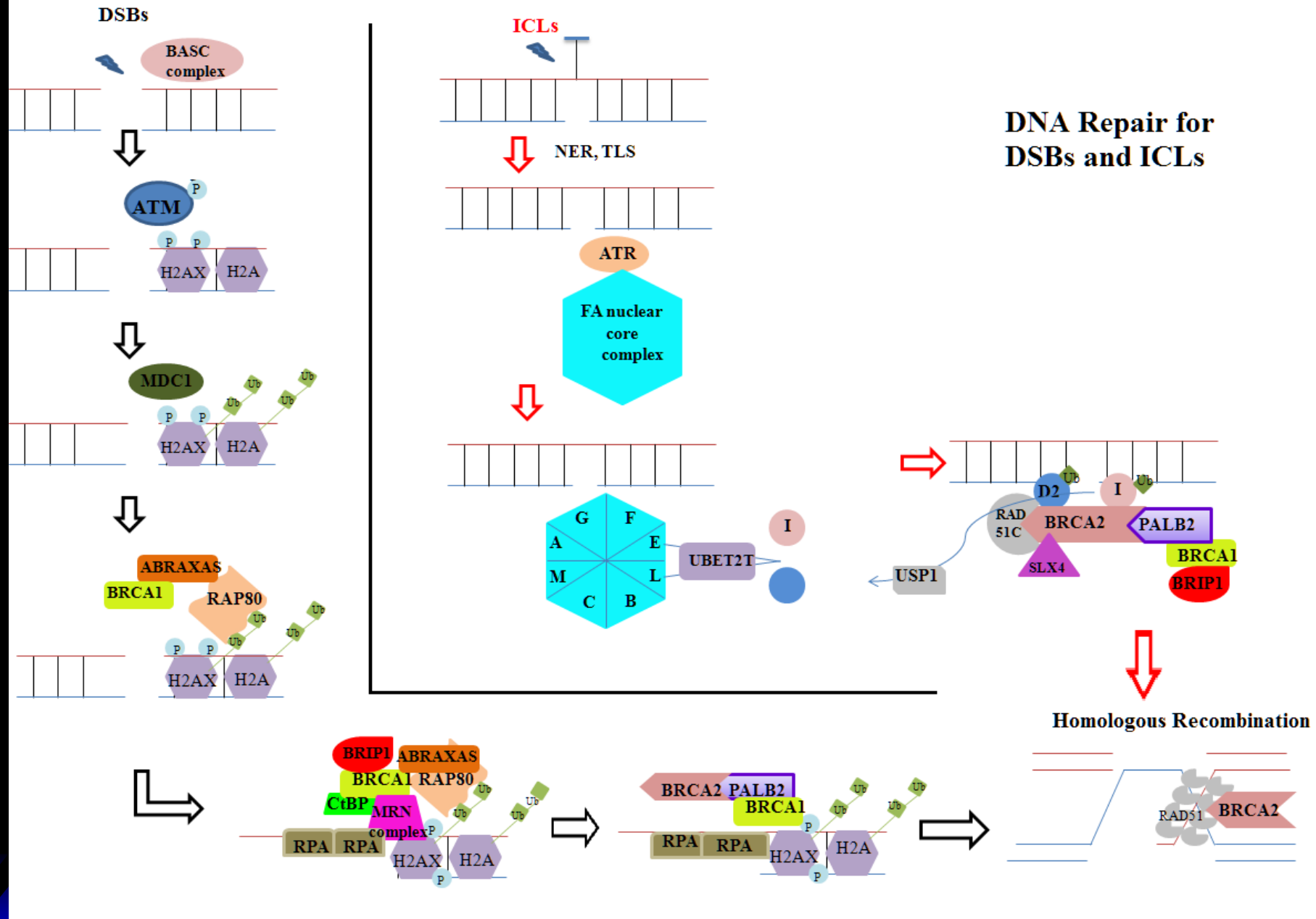
Αλληλεπίδραση BRCA2 με RAD51 μέσω των 8 BRC repeats (διώχνει RPA) και με το dsDNA μέσω TD (tower domain)



Error-free DNA repair!

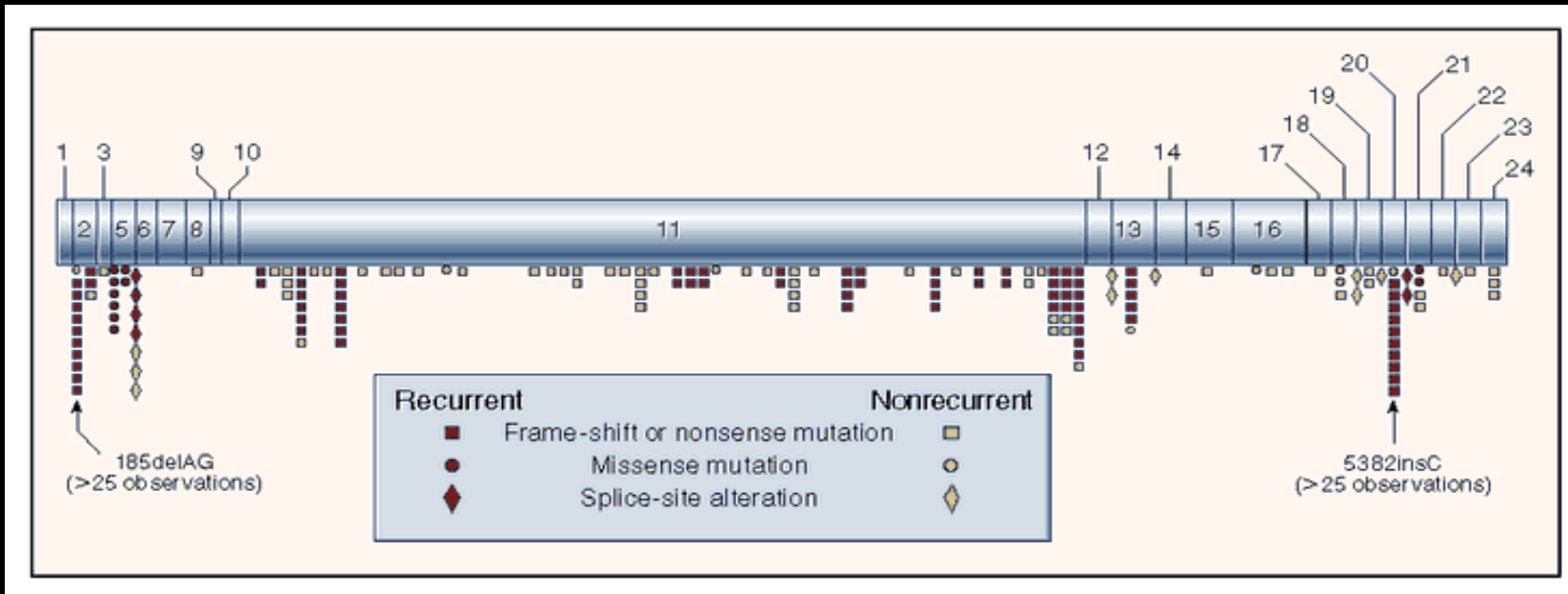
Strand invasion – Holliday junction

DNA Repair for DSBs and ICLs



HR test?

Διασπορά μεταλλάξεων στο γονίδιο *BRCA1*



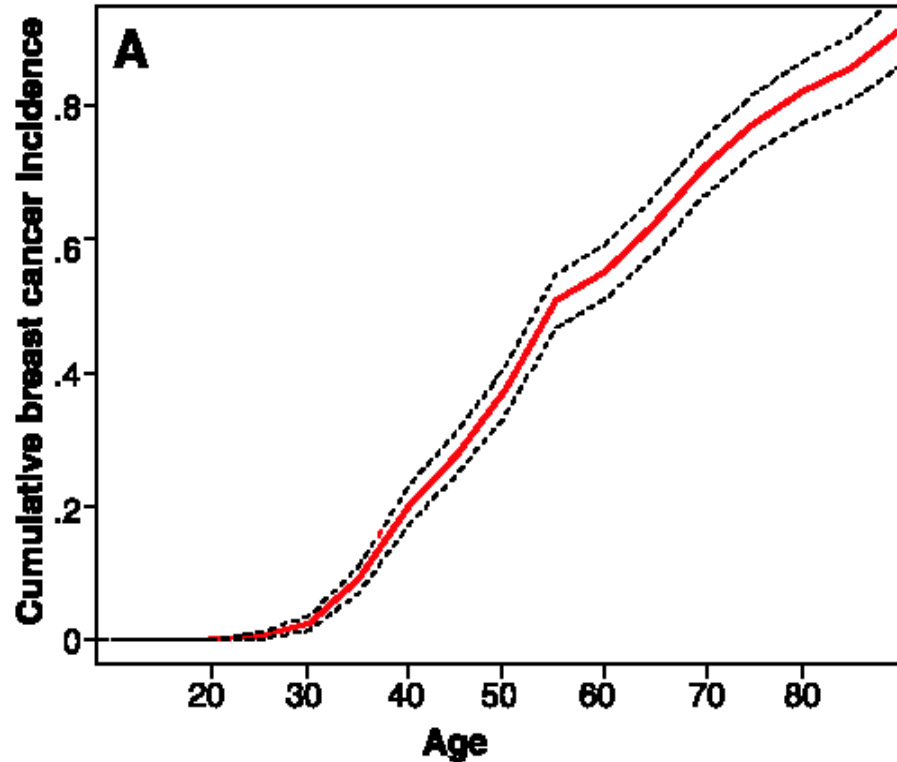
Collins F., NEJM (1996), 334, 186

Ιδρυτικές (founder) μεταλλάξεις σε κλειστές κοινωνίες:

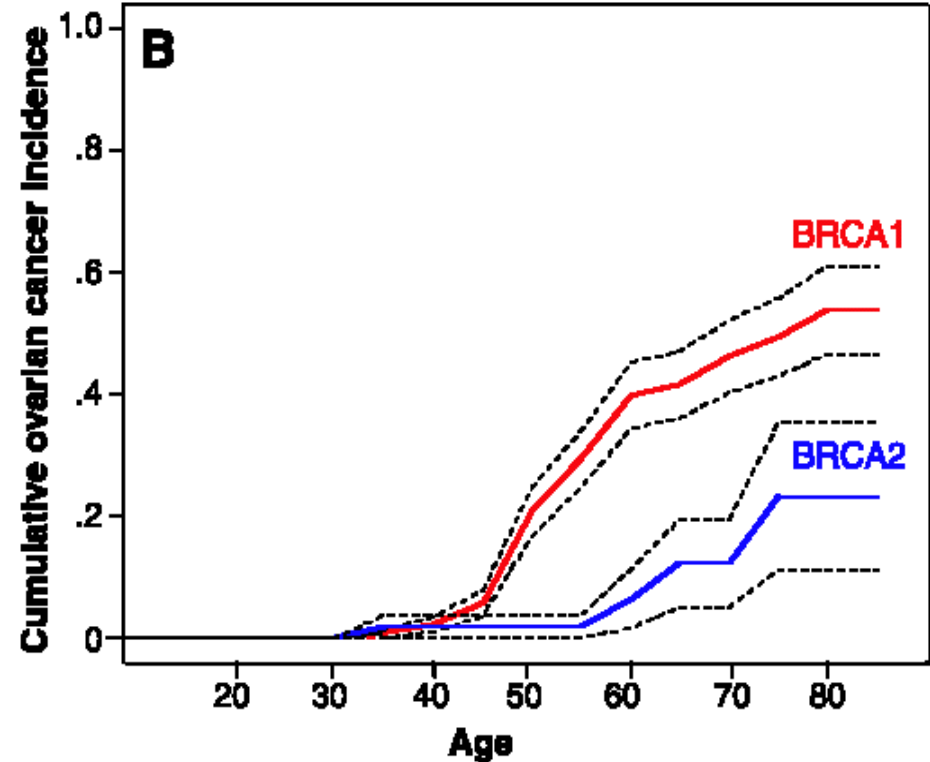
- Ασkenάζι Εβραίοι: 185delAG και 5382insC στο *BRCA1* και 6174delT στο *BRCA2* (2,5%)
- Ισλανδοί : 999del5 στο *BRCA2* (0,6%)

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

Αθροιστικοί κίνδυνοι για φορείς *BRCA* μεταλλάξεων



για BrCa: 82%



για OvCa: 54% (*BRCA1*)
23% (*BRCA2*)

(n=1008 Ασθενάζι Εβραίοι BrCa ασθενείς + συγγενείς)

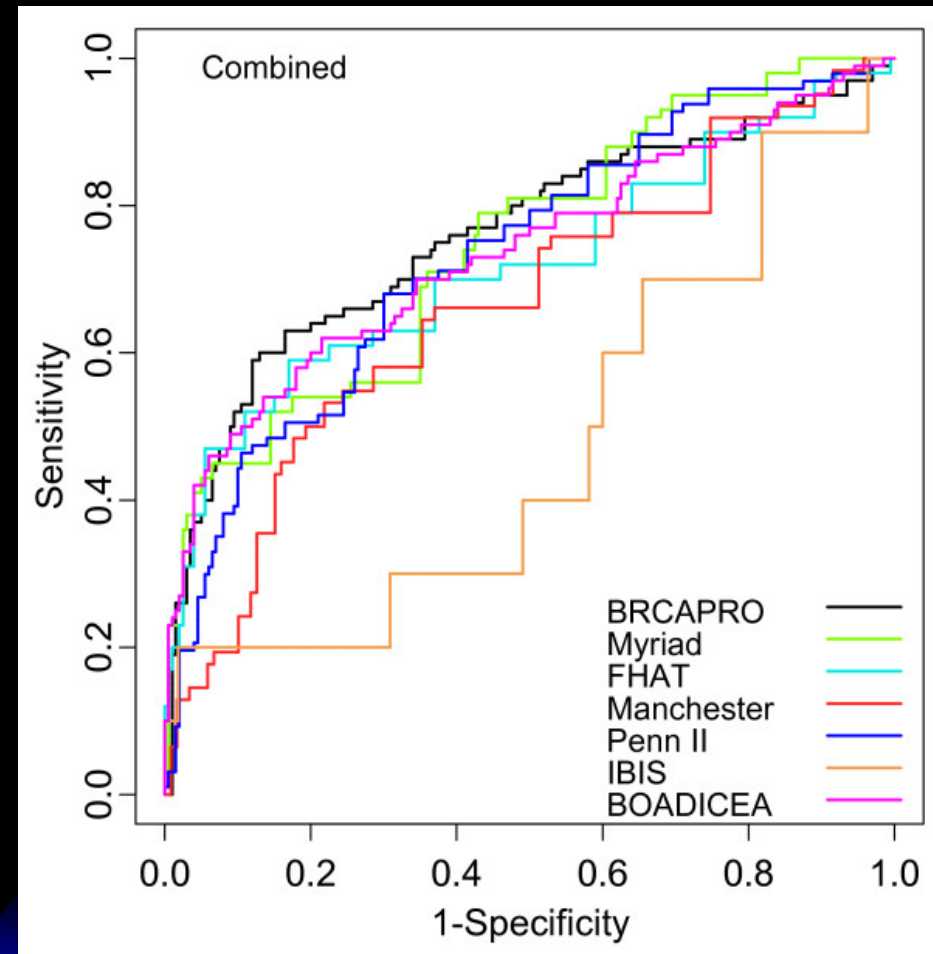
Μοντέλα πρόβλεψης με βάση το ιστορικό

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)
Antonίου 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

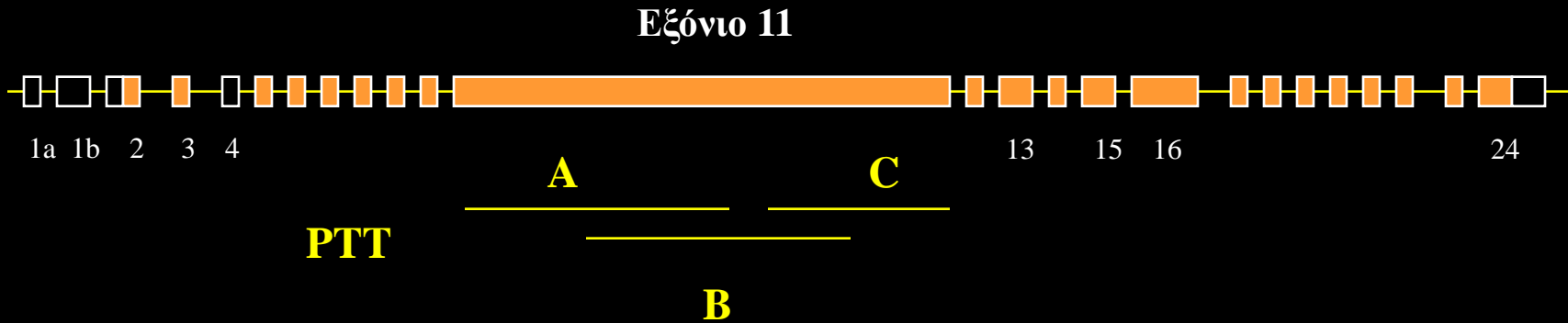
Πχ. μεταλλάξεις του *BRCA2* ενέχονται στον καρκίνο προστάτου ενώ μεταλλάξεις σε ομοζυγωτία στην κακοήγη αναιμία Fanconi σε μικρή ηλικία [Howlett N. et al., *Science* (2002), 297, 606]

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

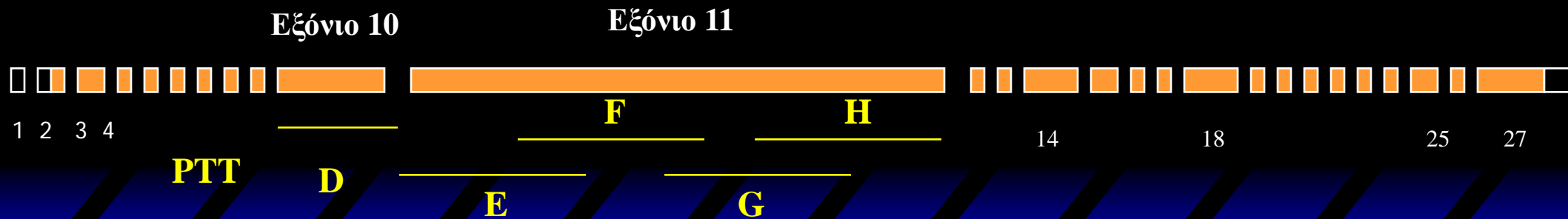
Μεγάλος αριθμός μεταλλάξεων στα γονίδια *BRCA1/2* (>1000)

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:

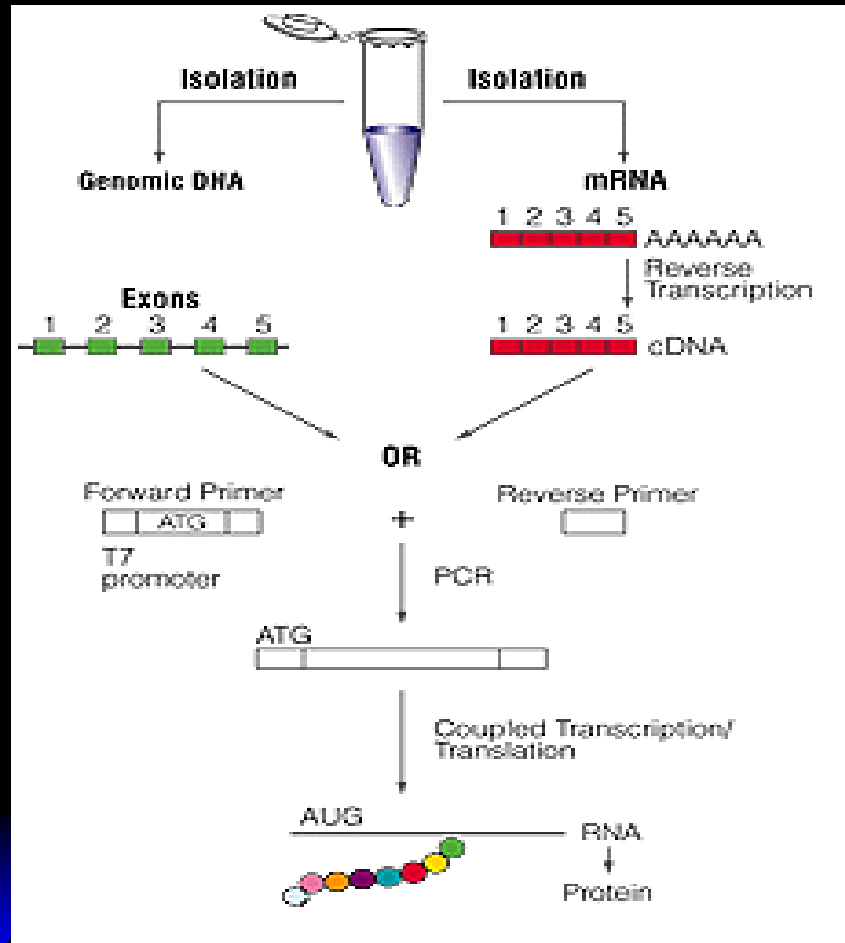
- με δείγματα μάρτυρες
- με σύγκριση με τη μέθοδο αναφοράς DNA Sequencing

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

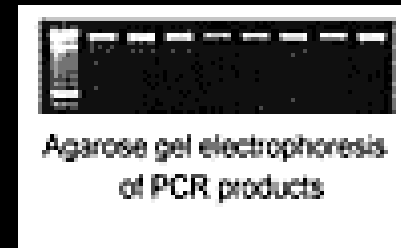
ABI 310 Genetic Analyser (Perkin Elmer, Applied Biosystems)

- 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



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

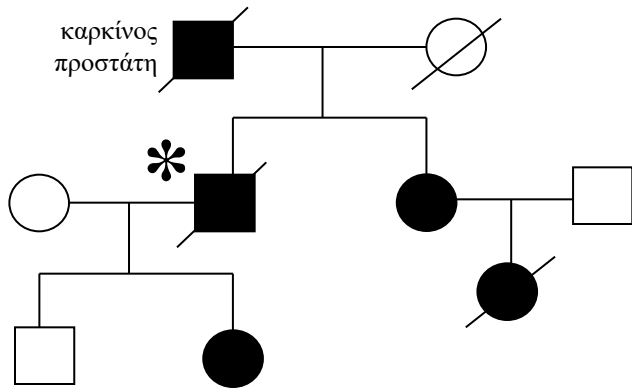
❖ *BRCA2* (n=2)

- 6631del5
- 2024del5

ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ 2024del5

Εξόνιο 10 - *BRCA2*

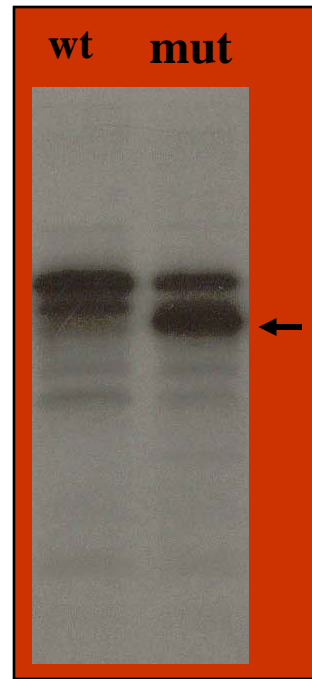
Οικογενειακό δένδρο



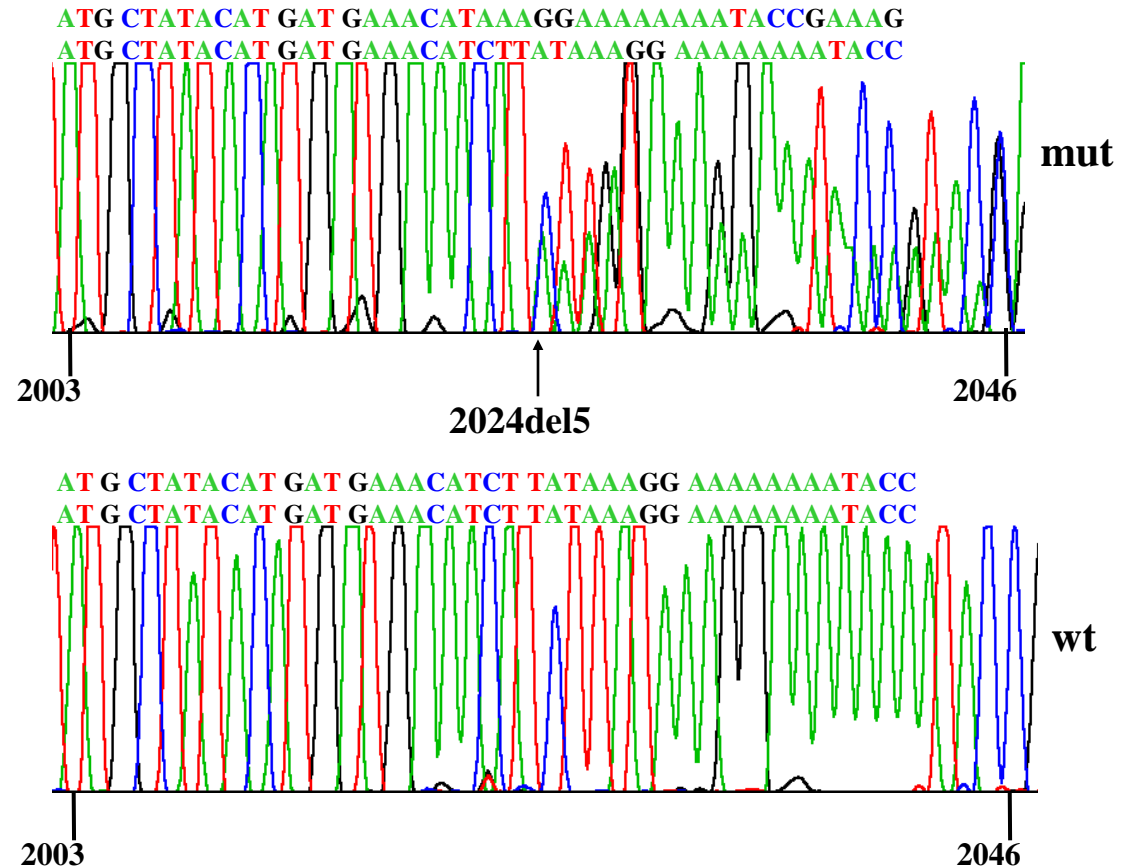
Ασθενής 144:

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?]

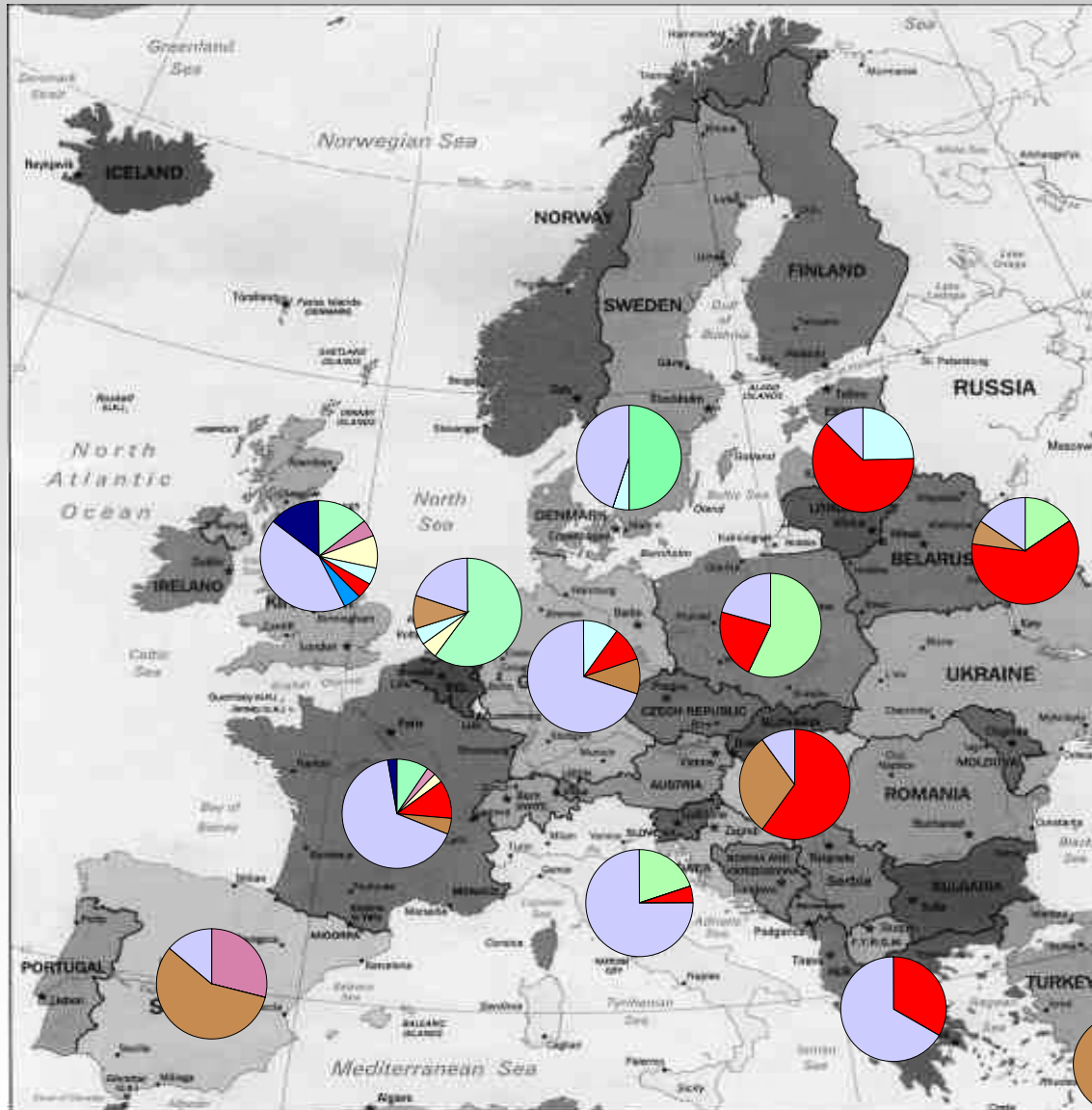
Σύνολο παθογνωμικών μεταλλάξεων: 17/85 (ποσοστό 20%)

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

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



Η ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ 5382insC *BRCA1* συχνή στον Ελληνικό χώρο



country-specific founder mutations

3452del4

3875del4

Cys61Gly

5382insC

185delAG

4446CtoT

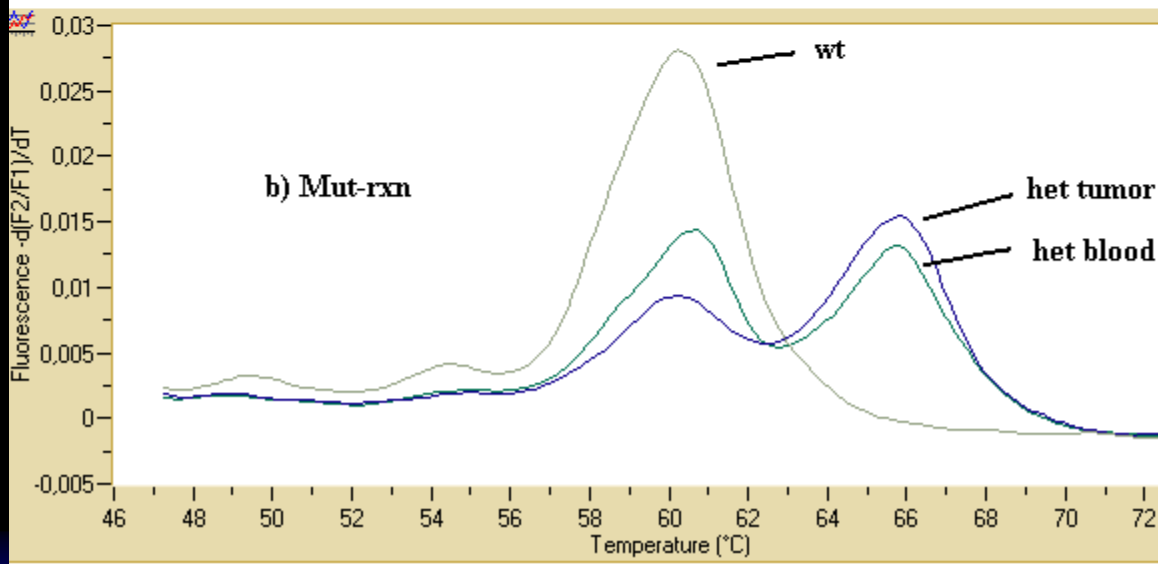
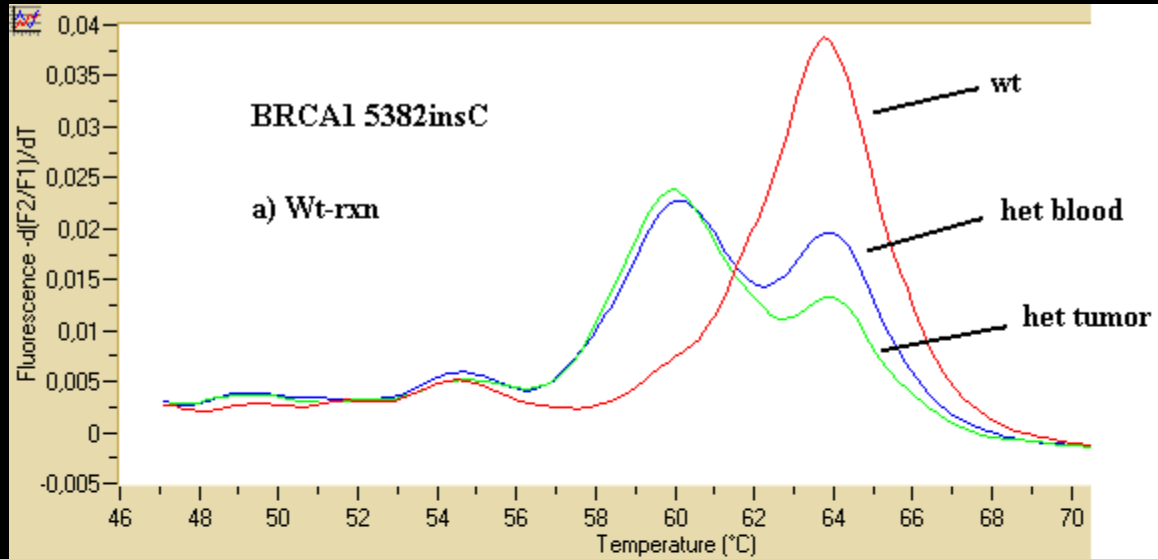
others

4184del4

BRCA1

Israel

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)

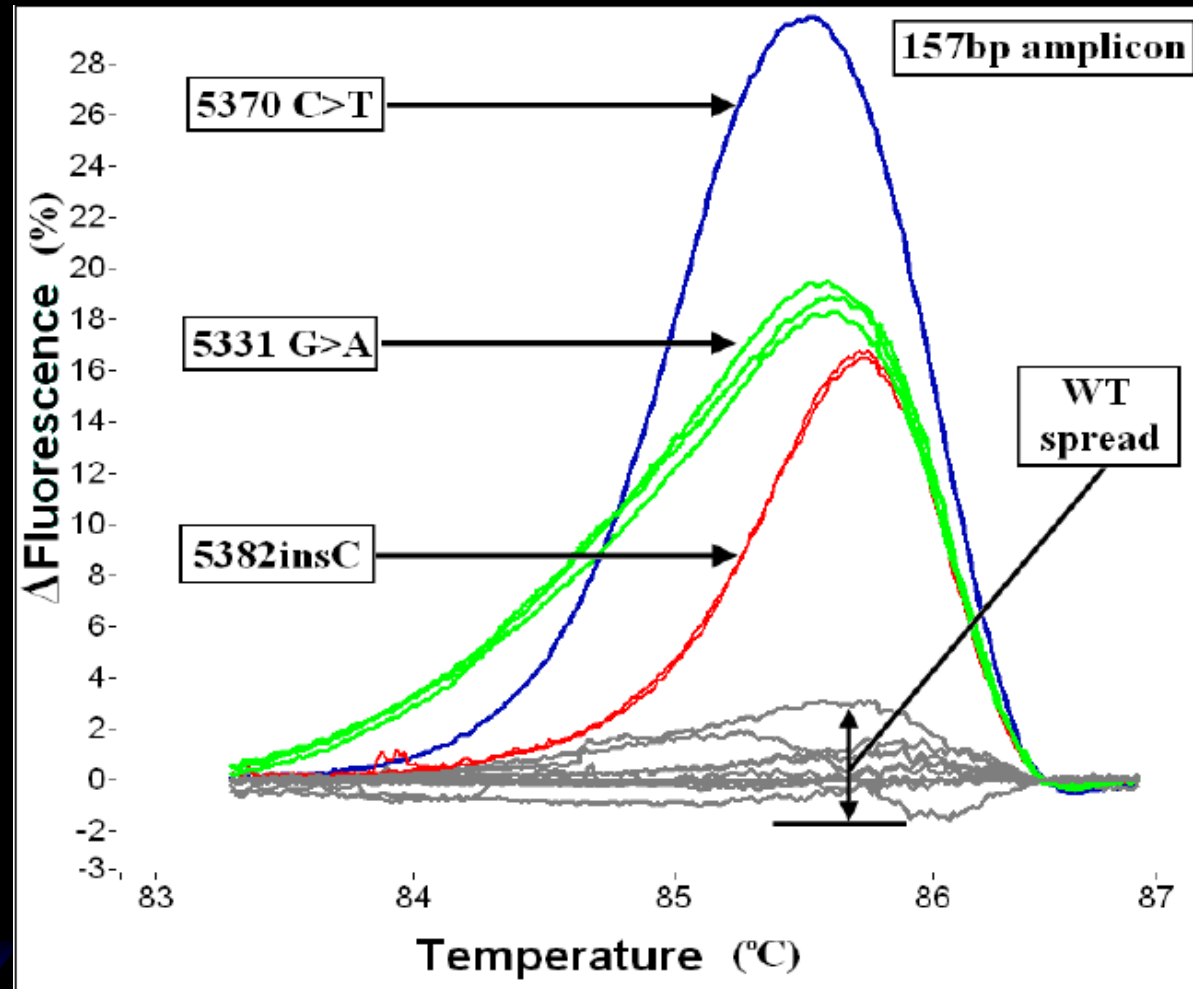
Σάρωση μεταλλάξεων στο εξόνιο 20 του *BRCA1*

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



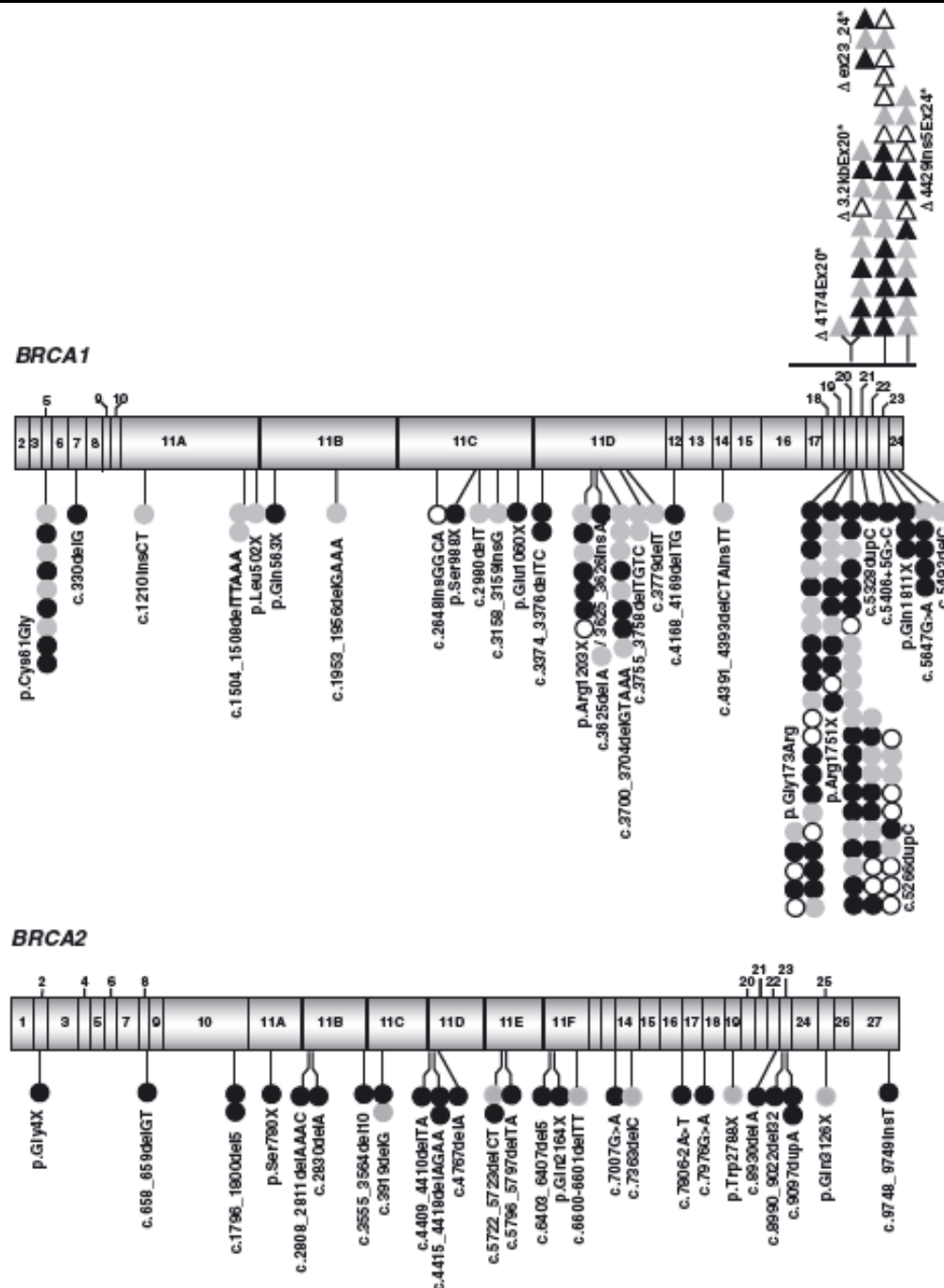
212 BRCA+ (28% !!!)

181 BRCA1 (85%)

31 BRCA2 (15%)

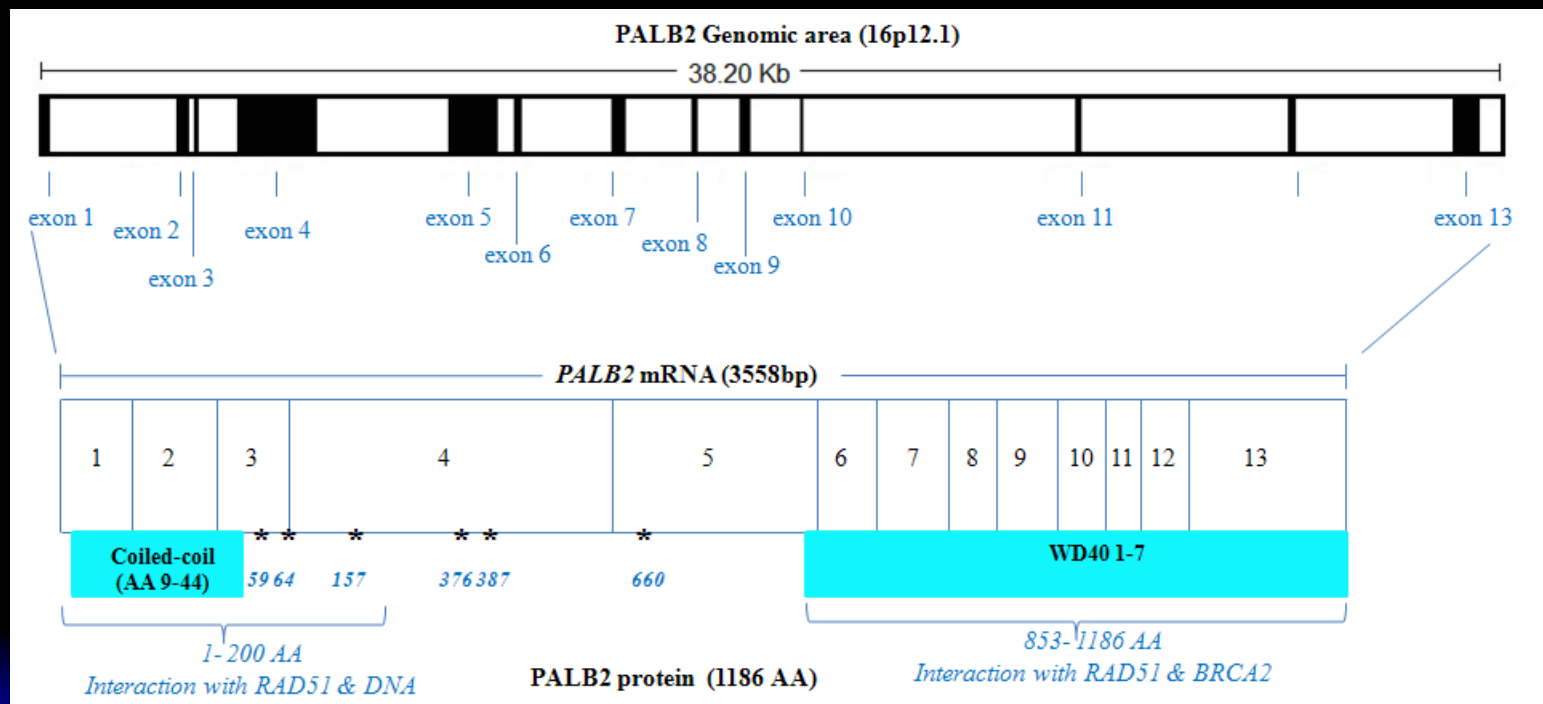
6 συχνές BRCA1 μεταλλάξεις στο 58,5% των μεταλλάξεων (24% αναδιατάξεις)

Patient category (proband)	Percentage in cohort (n = 760)	Percentage of BRCA1 carriers in each category	Percentage in BRCA1 carriers (n = 181)	Percentage of BRCA2 carriers in each category	Percentage in BRCA2 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)



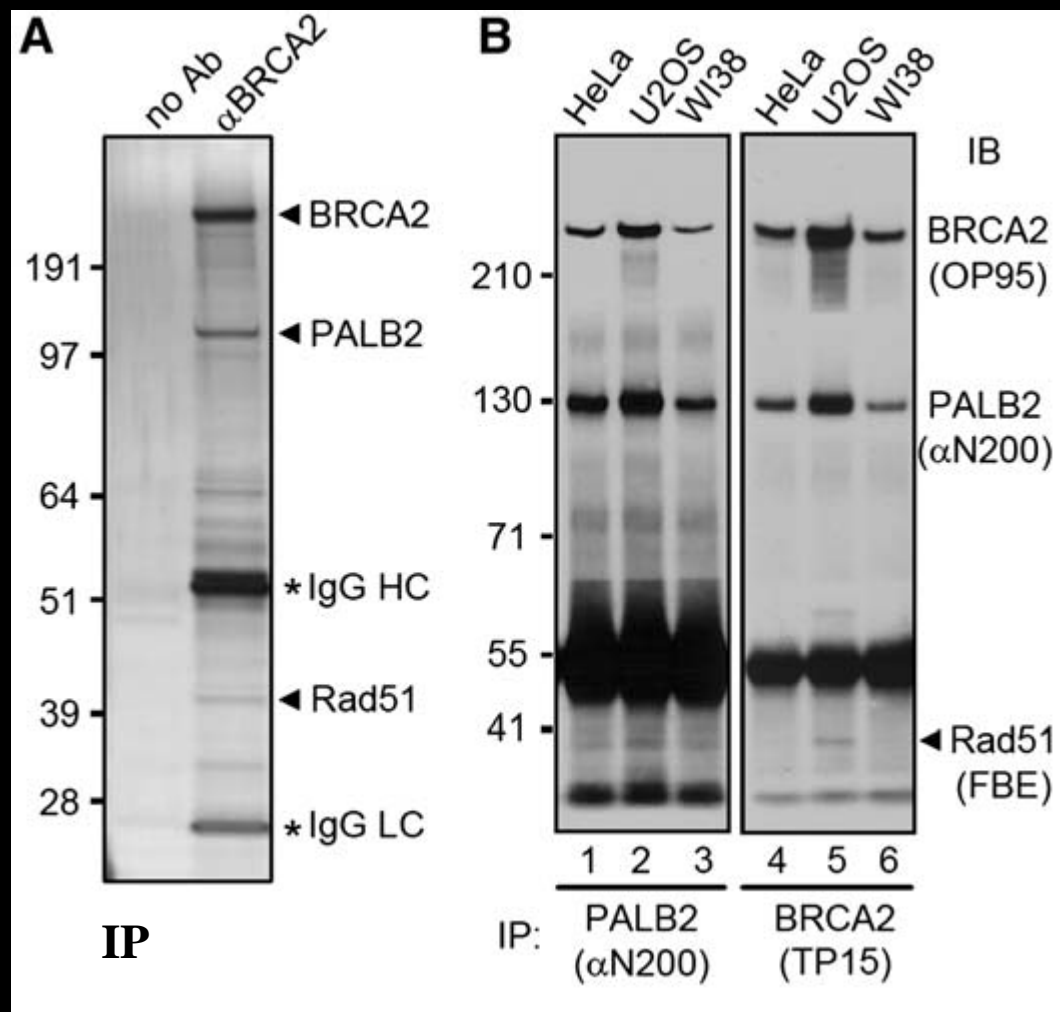
Γονίδιο *PALB2* (Xia B. et al., 2006)

- ❖ 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



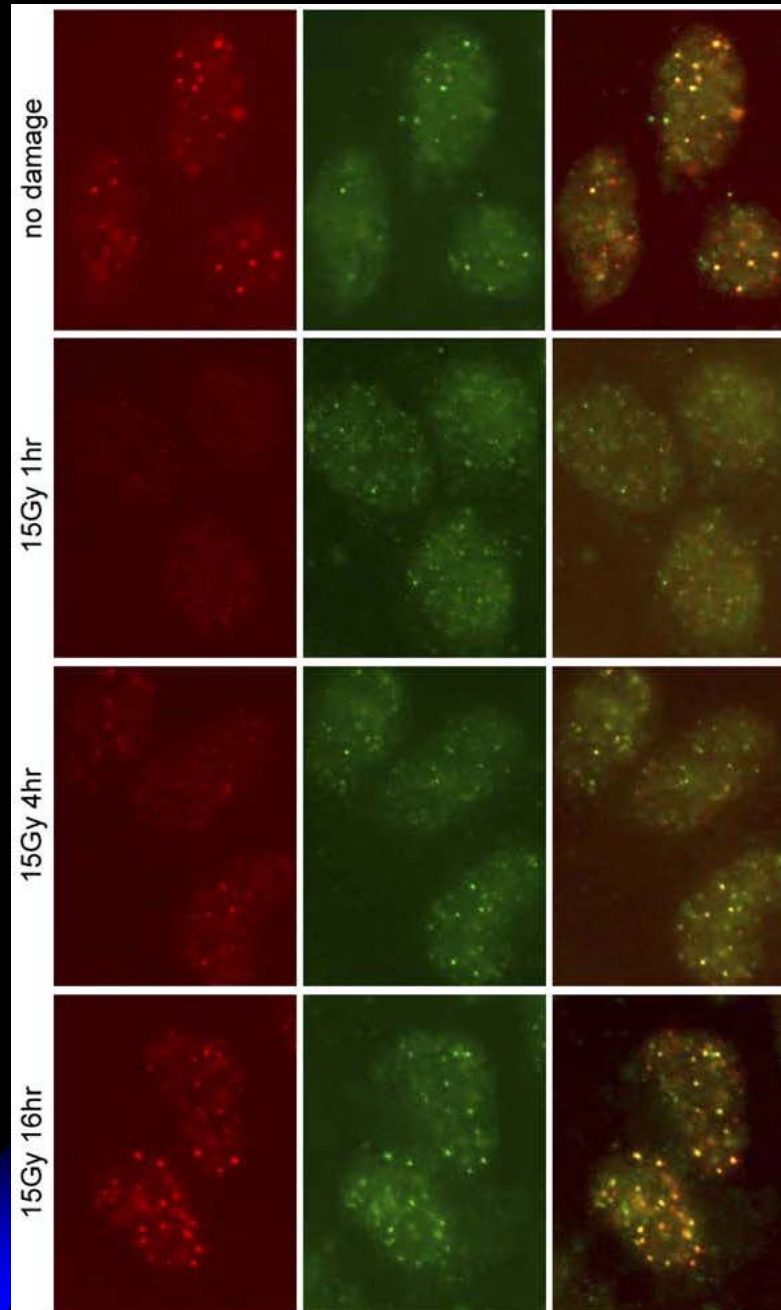
Πειράματα
ανοσοκαθίζησης
(IP)

HeLa
cells

BRCA2 PALB2 MERGE

BRCA2 partner

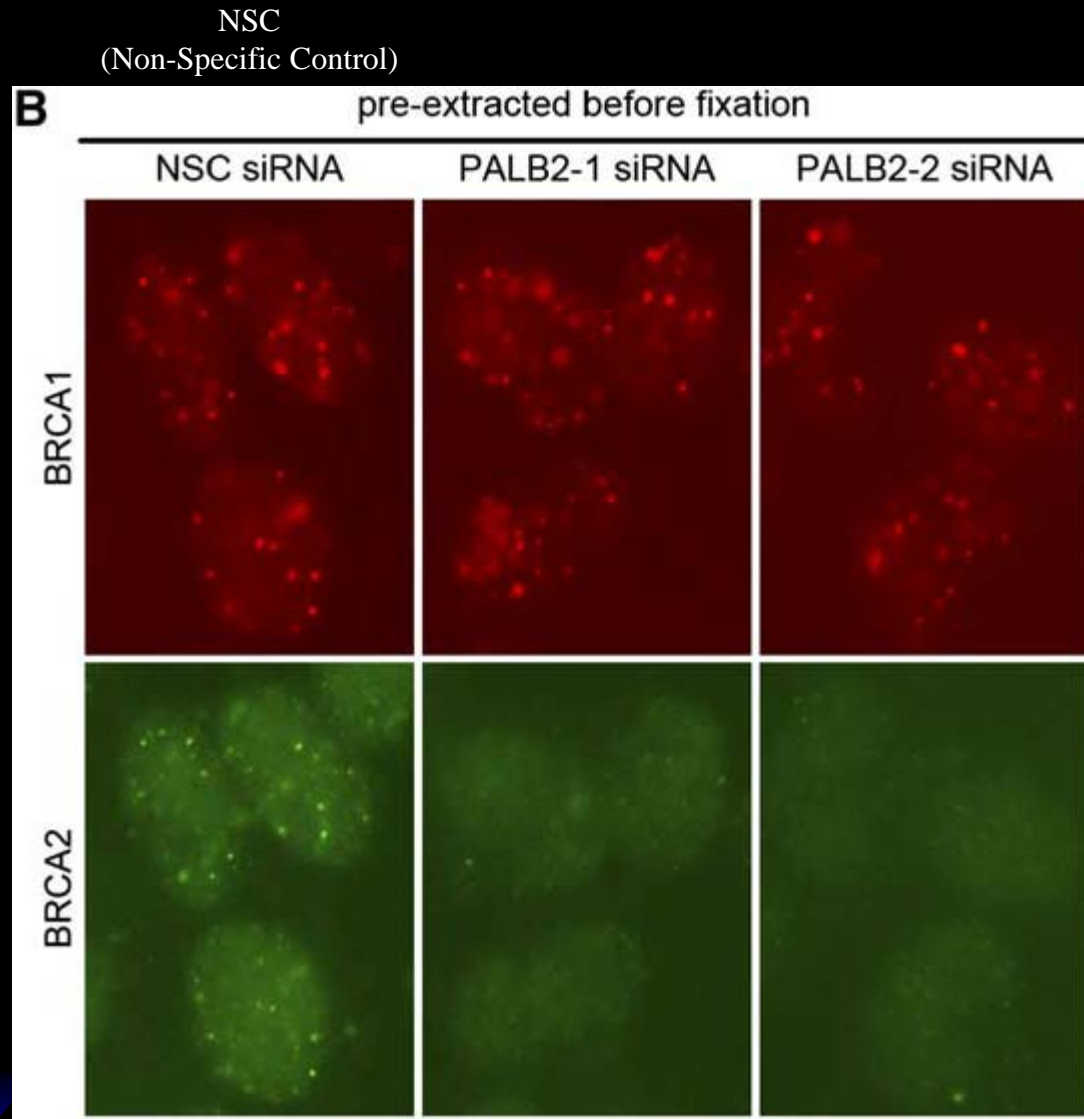
Ανοσοφθορισμός
σε U2OS κύτταρα
(osteosarcoma line)



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

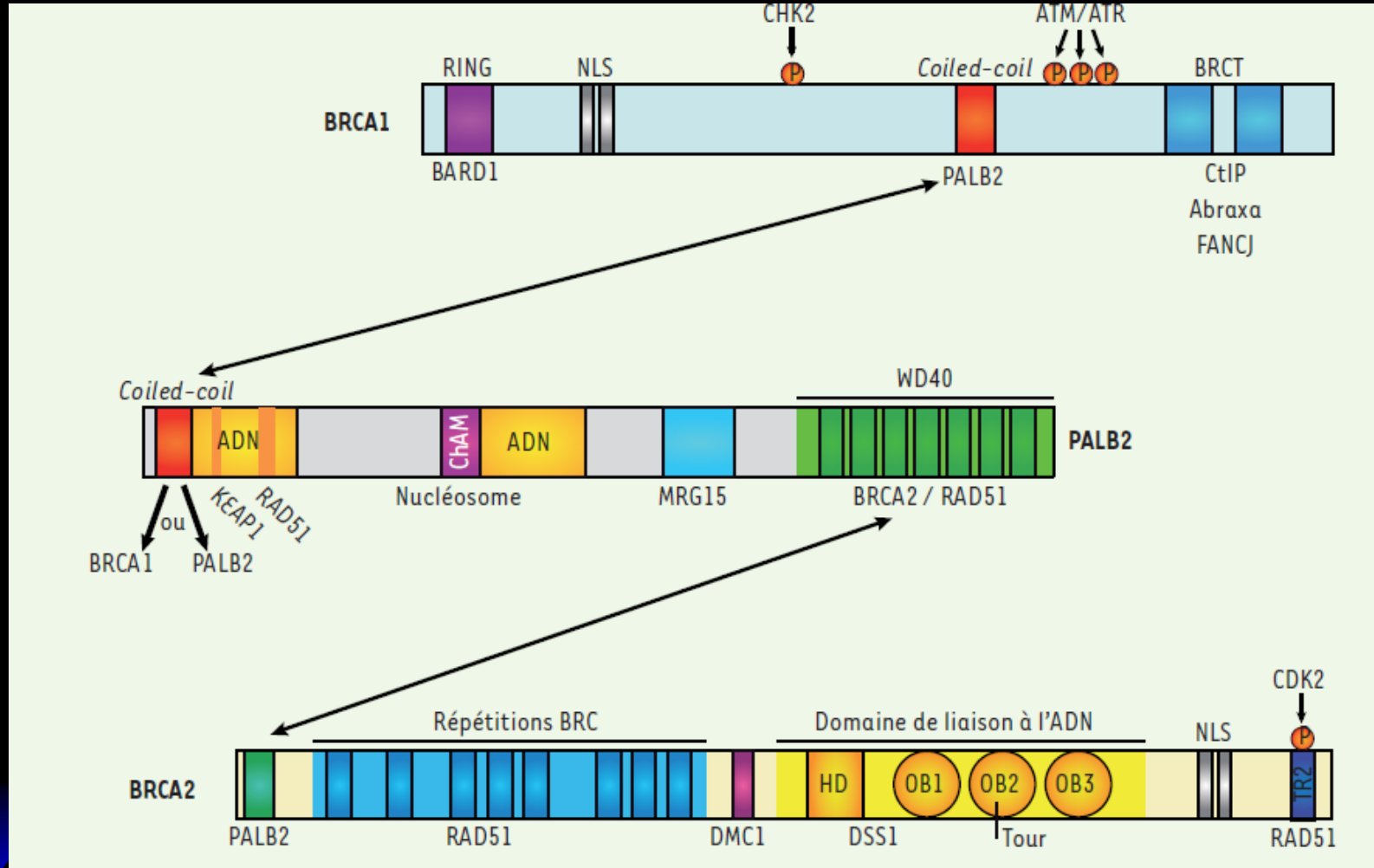
Με ανοσοφθορισμό



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:

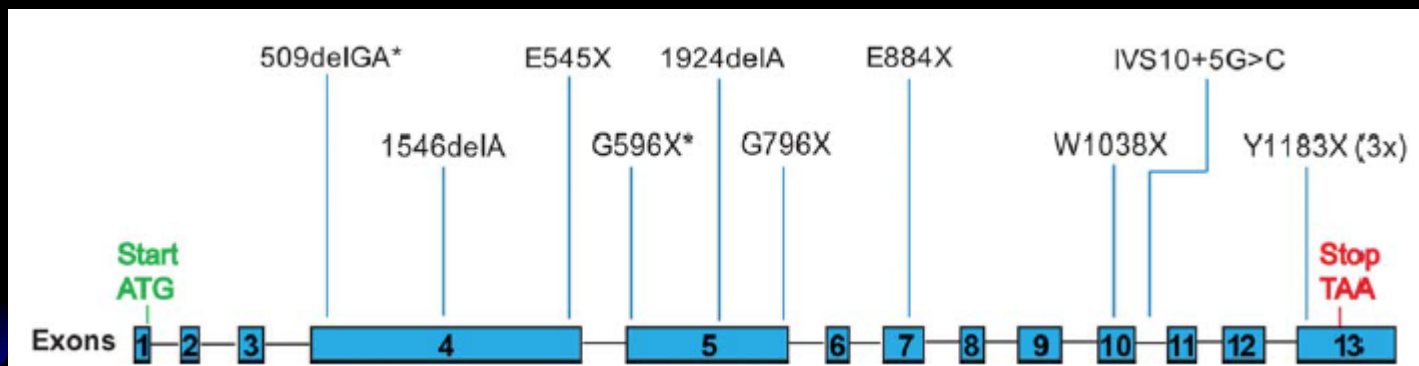
- ❖ σε ασθενείς με κακοήθη αναιμία Fanconi

❖ *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 BRCA neg 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 BRCA neg 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

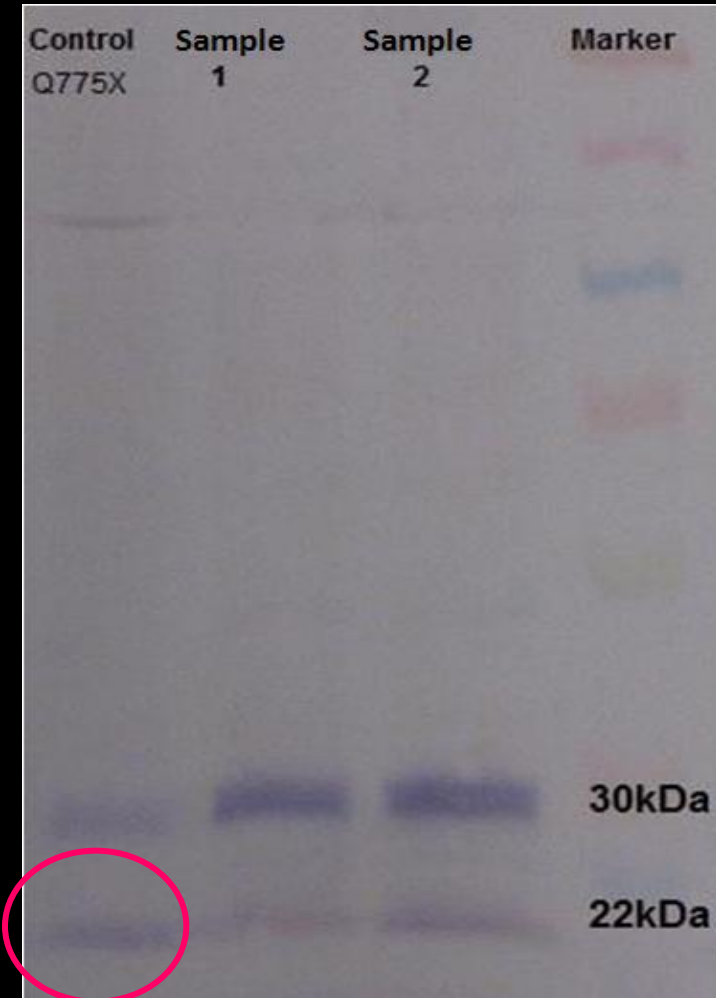
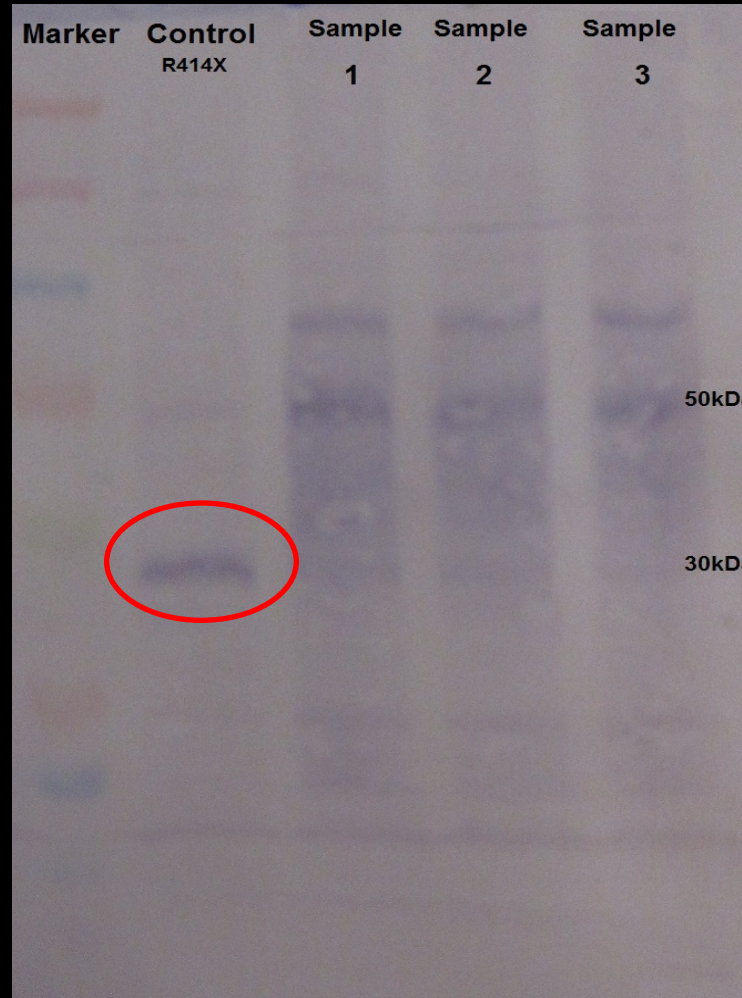
***Κίνδυνοι συγκρίσιμοι με BRCA μεταλλάξεις!
(PALB2 moderate risk gene of a “higher” order)***

Ιστοπαθολογικά δεδομένα μεταξύ BRCA1 και BRCA2

Ανάπτυξη ΡΤΤ στα μεγάλα εξόνια του *PALB2*

Εξόνιο 4

Εξόνιο 5



Βιοτινυλιωμένη
λυσίνη

Transcend
(Promega)

PVDF μεμβράνες

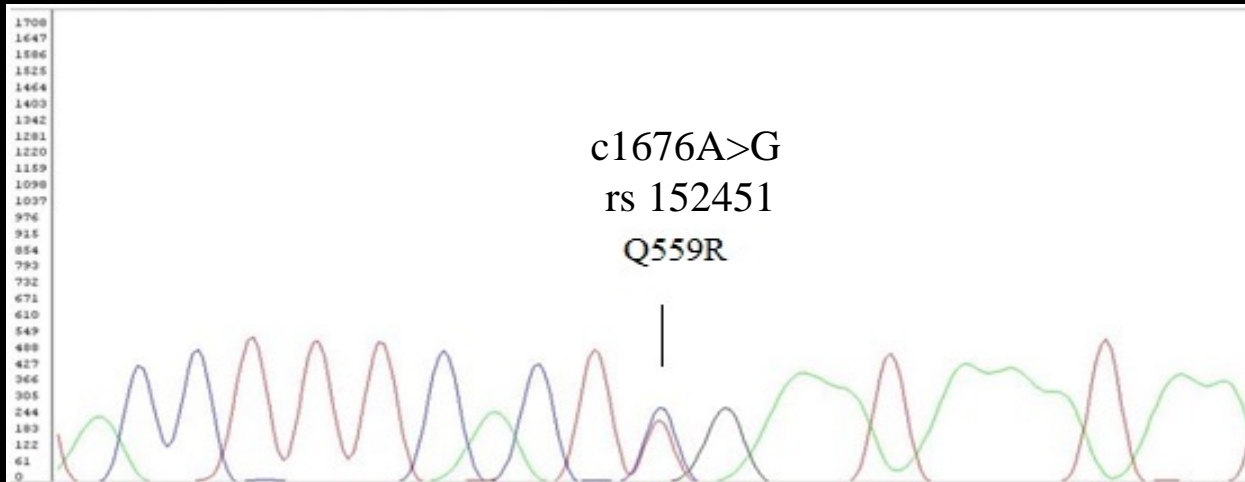
Strep-ALP
Western Blue

Control R414X
(δωρεά Prof. E. Imiyatov,
St. Petersburg, Russia)

Control Q775X
(δωρεά Prof. W. Foulkes,
Montreal, Canada)

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



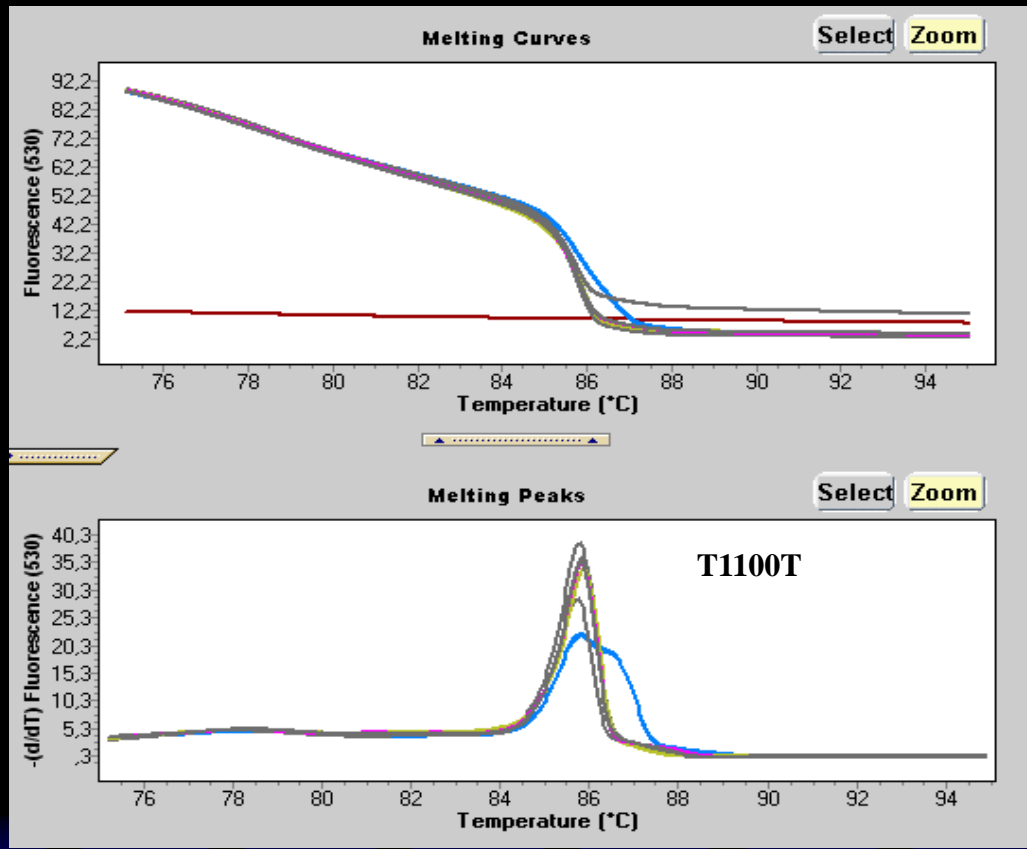
Poumpouridou N. et al., Clin Chem Lab Med (2009) 47, S166

- 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

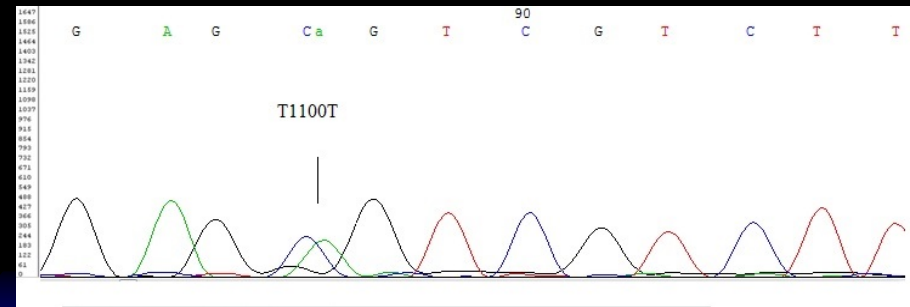
Ανάλυση HRM για τα υπόλοιπα εξόνια PALB2

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

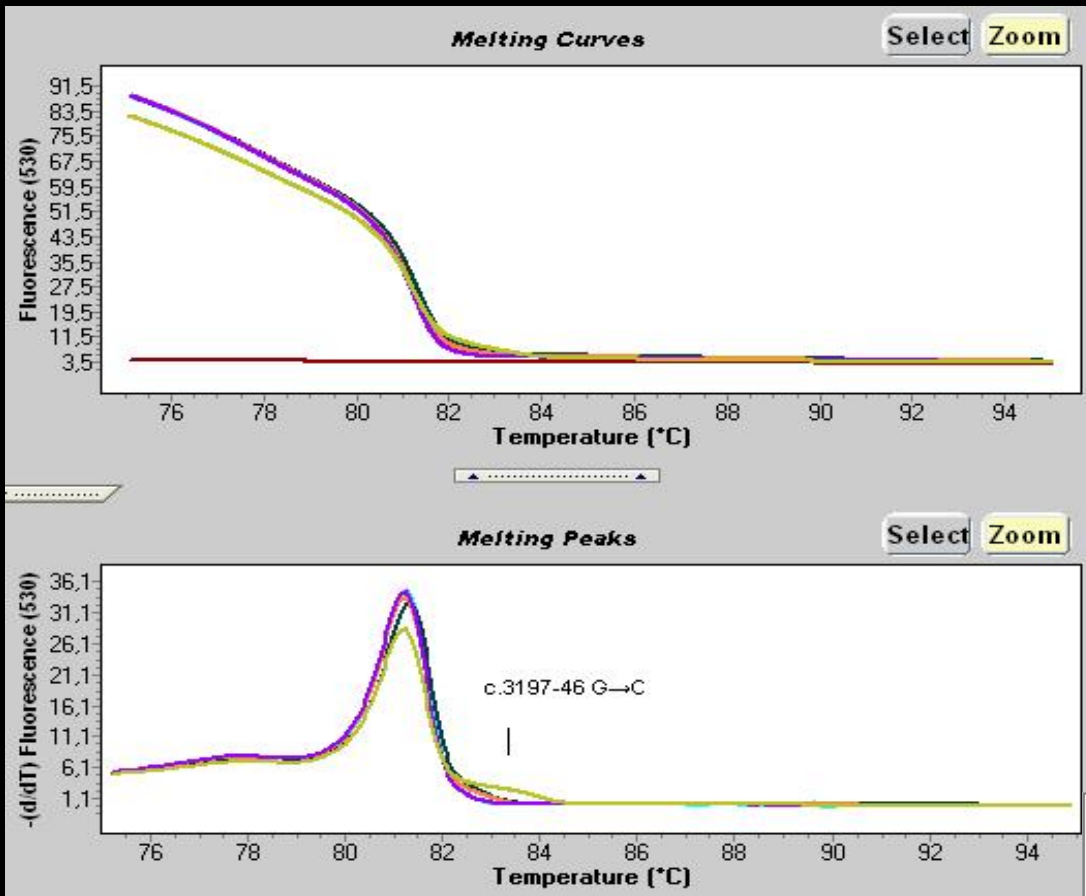


Εξόνιο 12 του PALB2

συνώνυμη μετάλλαξη
c.3500 T→G (T1100T)
σε 2 ασθενείς με μυελοειδή
καρκίνο του μαστού



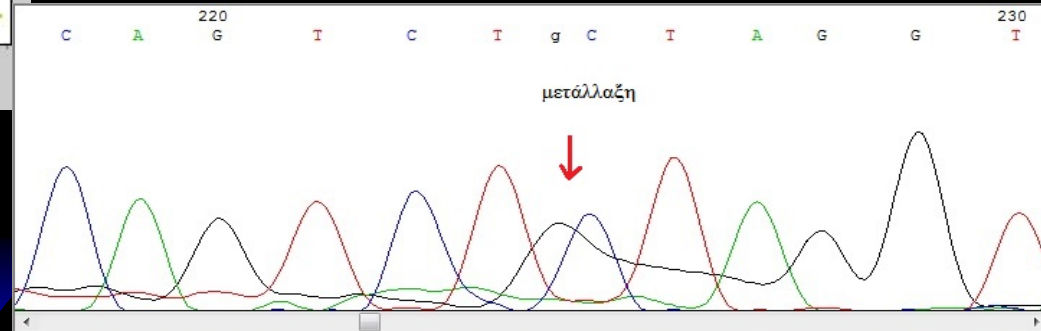
HRM ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



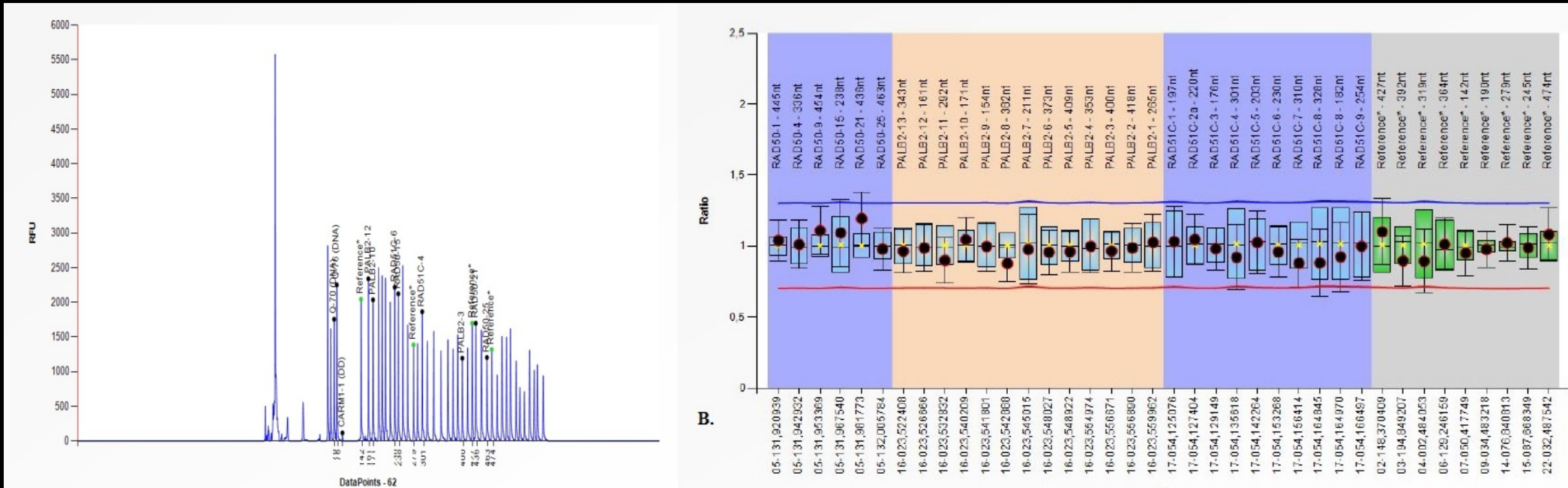
Καμπύλη τήξης για το εξόνιο 10

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

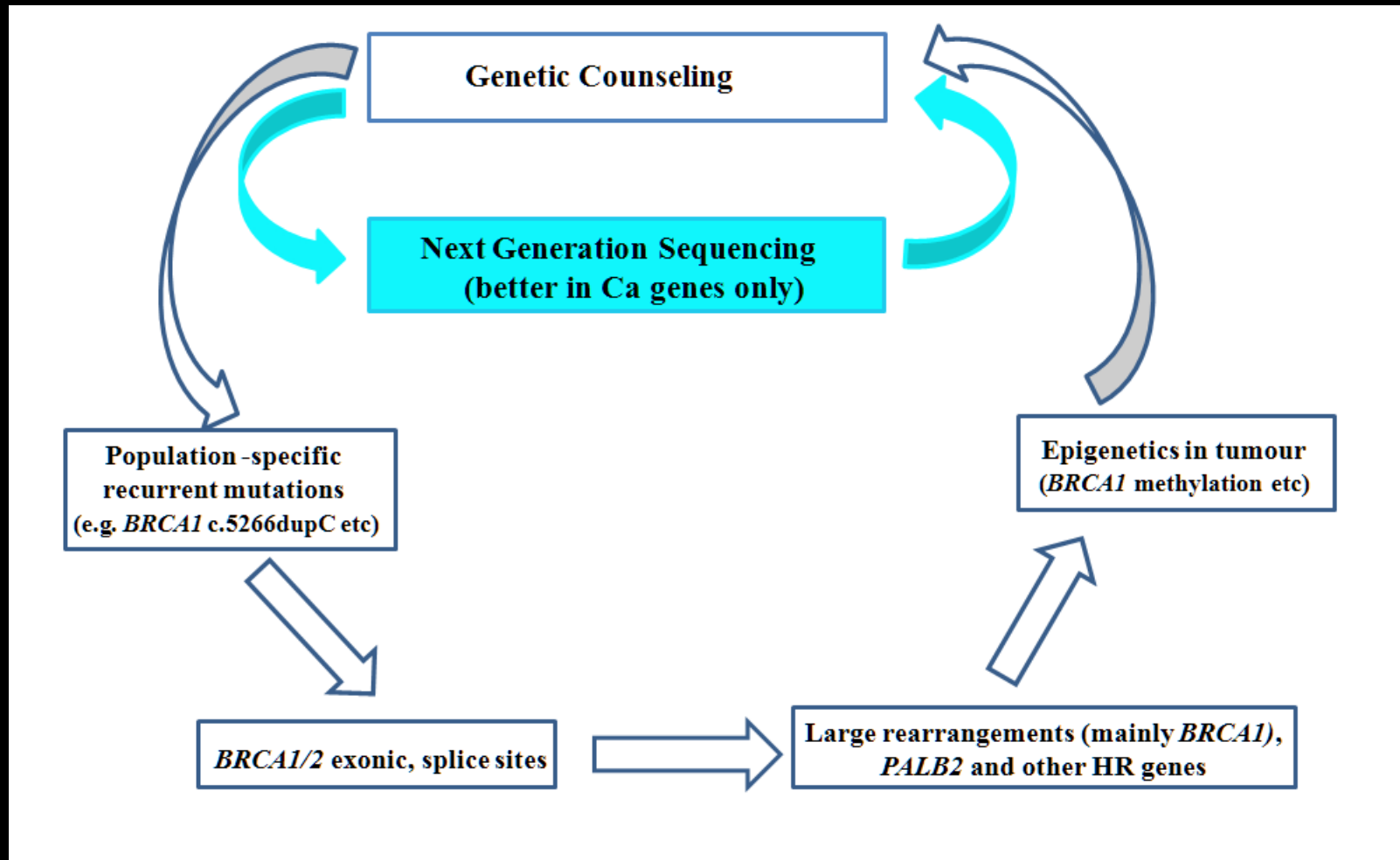


MLPA για μεγάλες PDLB2 αναδιατάξεις



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

The image shows a screenshot of a website advertisement for genetic testing. The top part is a teal banner with the text "Understand your genetic risk for breast and ovarian cancer" and "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)." Below this is a pink button that says "Purchase Color for \$199". The bottom part of the screenshot shows the "Invitae Common Hereditary Cancers Panel" with a description: "Genetic testing for 42 genes that are associated with hereditary breast, ovarian, uterine, colorectal, gastric, and pancreatic cancers." There is a blue button that says "VIEW TEST DETAILS". Below the description is a section titled "GENES TESTED:" followed by a grid of 42 gene names in individual boxes.

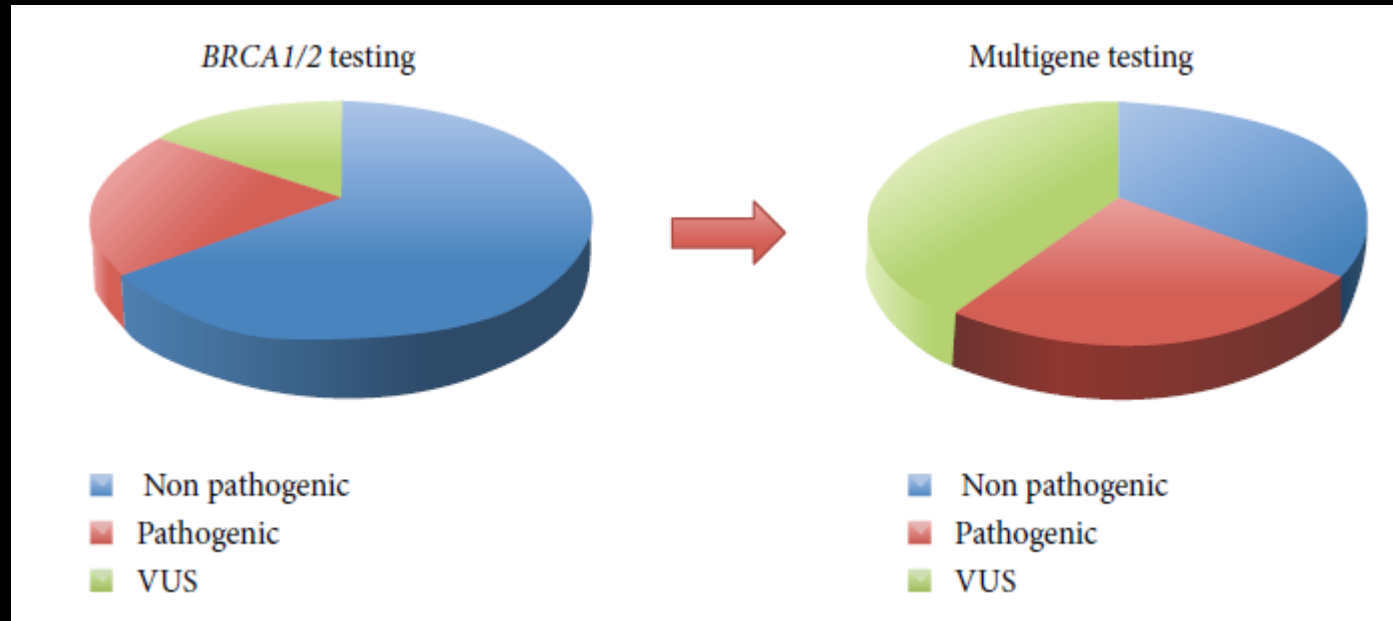
APC*	ATM	AXIN2	BARD1	BMPR1A*	BRCA1	BRCA2*
BRIP1	CDH1	CDKN2A*	CHEK2	DICER1	EPCAM	GREM1*
KIT	MEN1	MLH1*	MSH2*	MSH6	MUTYH	NBN
NF1	PALB2	PDGFRA	PMS2	POLD1	POLE	PTEN*
RAD50	RAD51C	RAD51D	SDHA	SDHB	SDHC	SDHD
SMAD4	SMARCA4	STK11	TP53*	TSC1	TSC2	VHL

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

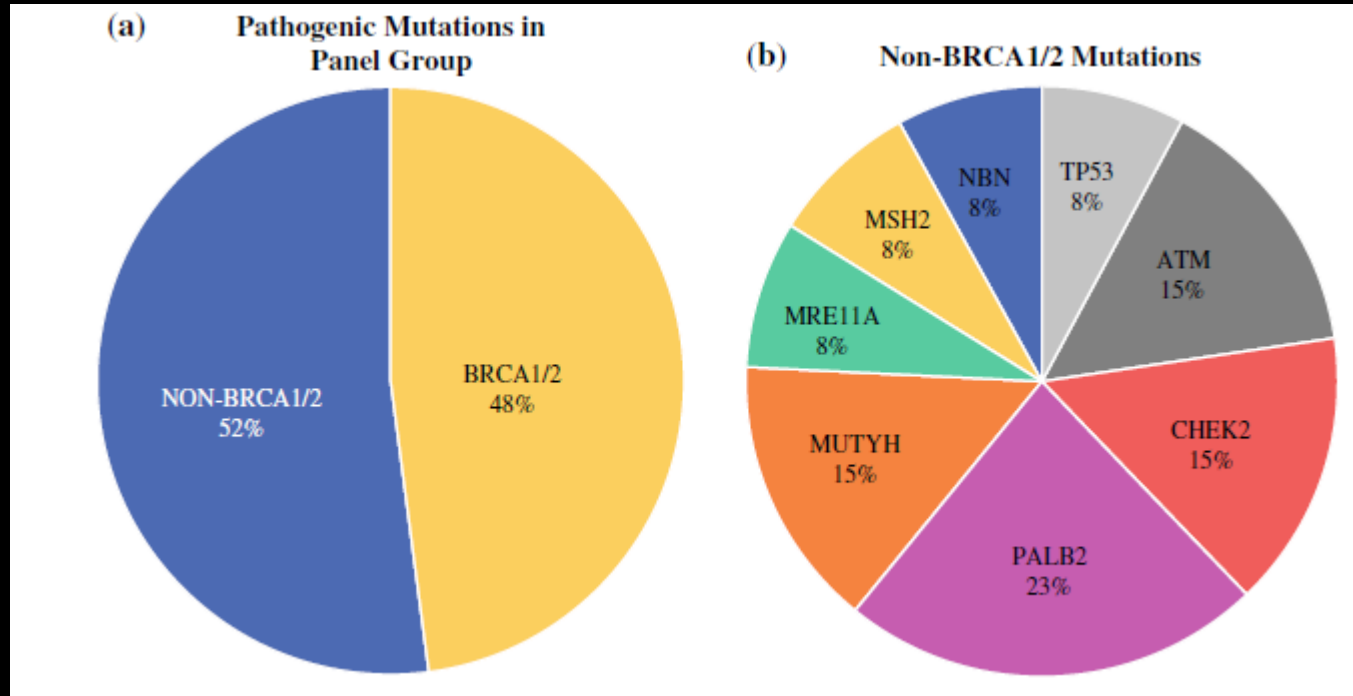
13% VUS BRCA testing

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

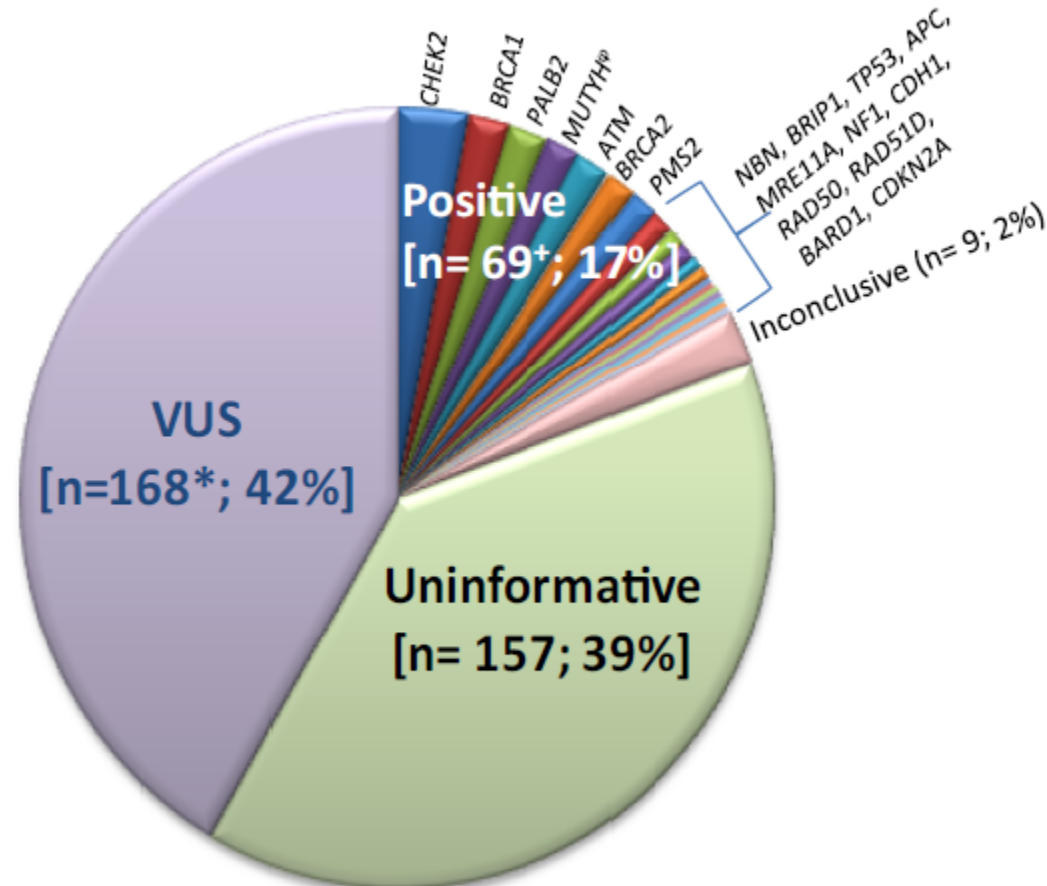


Karpoor N.S. et al., Ann Surg Onc (2015), 22, 3282

PALB2 το τρίτο γονίδιο

Uninformative cases

GENE	N	% of all Positives
CHEK2	12	17.4
BRCA1	7	10.1
PALB2	7	10.1
MUTYH ^{sp}	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

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 *BRC*A και *HR*-less ασθενείς

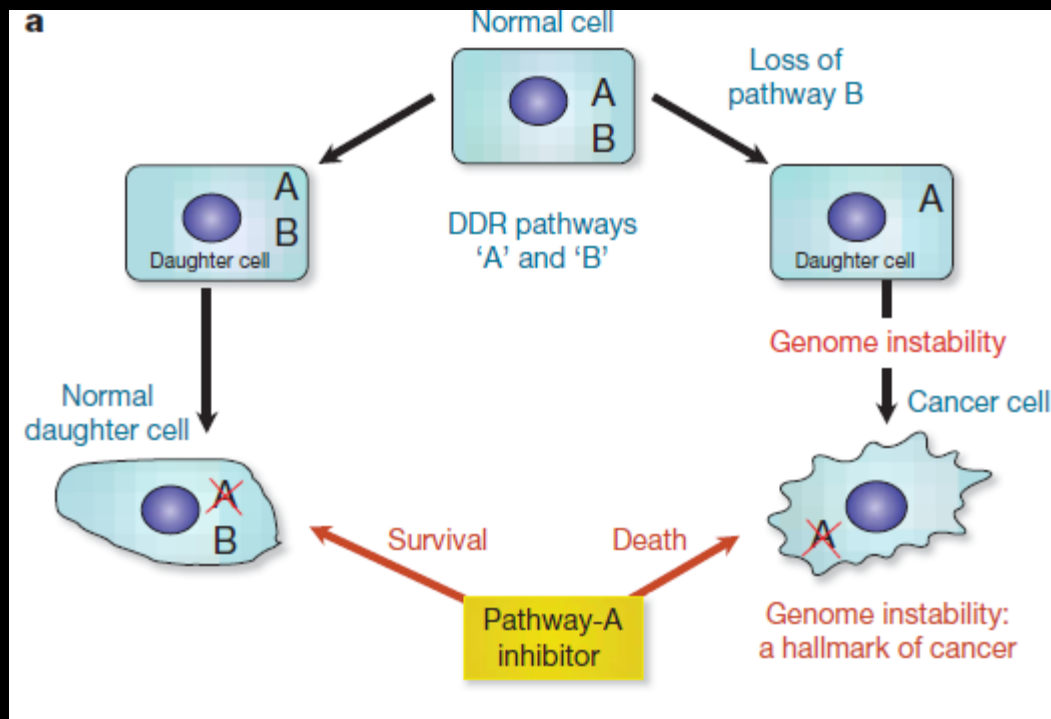
Απαραίτητη η επικουρική θεραπεία ακόμη με μικρούς όγκους και αρνητικούς λεμφαδένες!

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

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

2) Αντίσταση στις ταξάνες (Taxol, Taxotere) ?

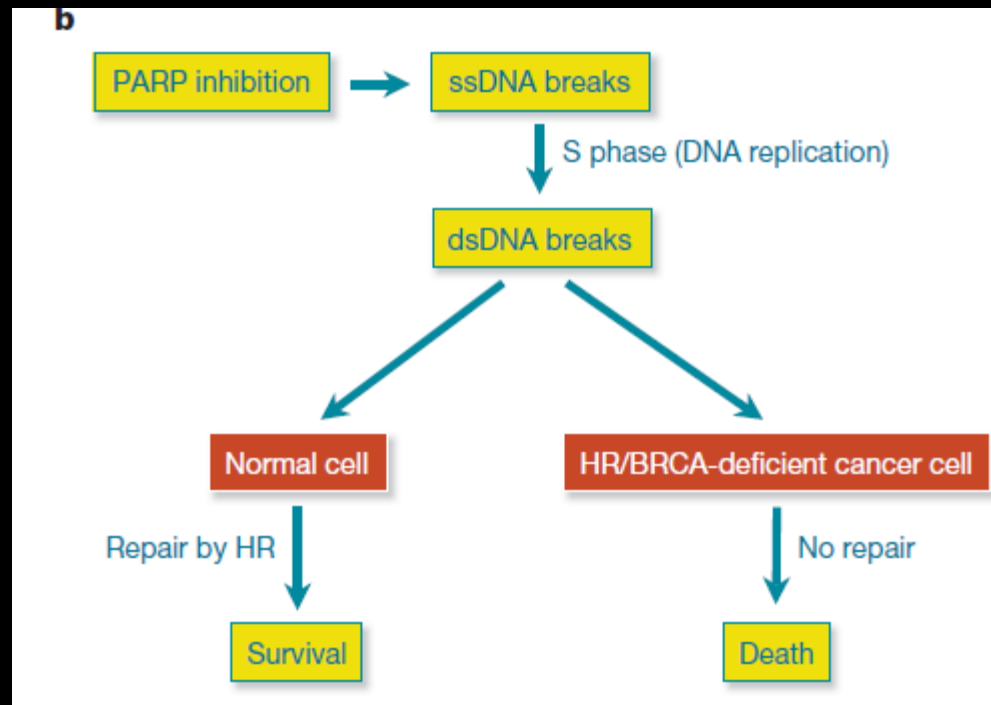
Σχεδιασμός καινούργιων «έξυπνων» θεραπευτικών



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:

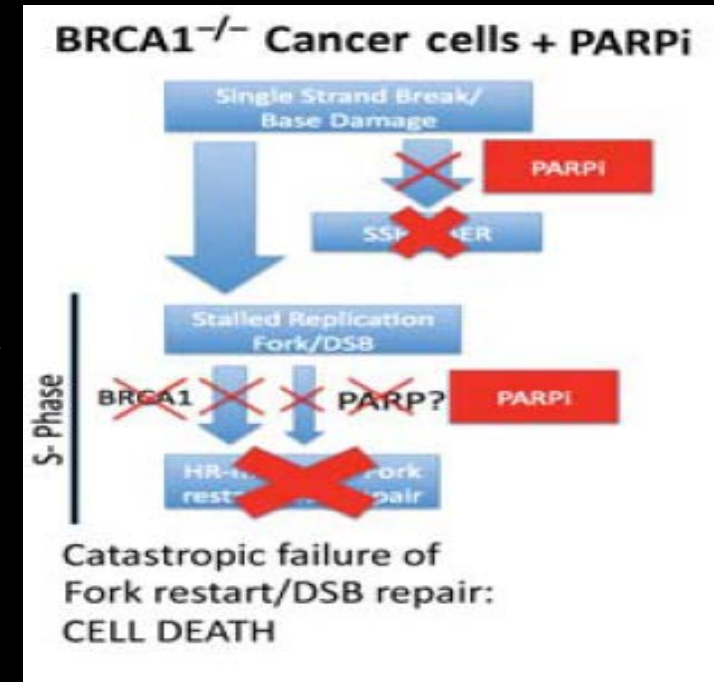
- Iniparib (BSI-201, 4-iodo-3-nitrobenzamide, BiPar Sciences) το πρώτο σε κλινική φάση III με mTNBC ασθενείς

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