

**Γενετική Καρκίνου:  
Κληρονομούμενος καρκίνος μαστού και ωοθηκών  
*BRCA1* και *BRCA2* γονίδια**

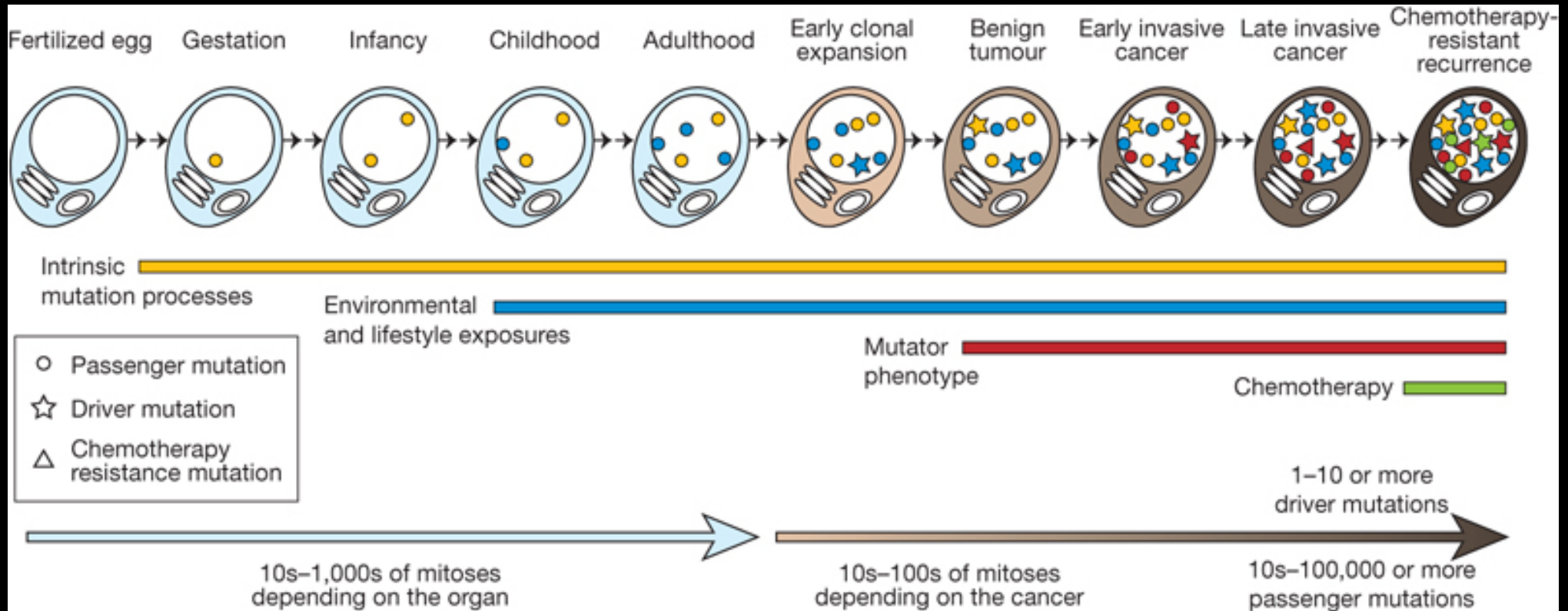
X. Κρούπης, MSc, PhD  
Βιοχημικός-Μοριακός Βιολόγος

*Επίκουρος Καθηγητής Κλινικής Βιοχημείας και Μοριακής Διαγνωστικής  
Αττικών Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο  
Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών*

# Τμήματα ομιλίας

- ◆ Γενετική Καρκίνου
- ◆ Καρκίνος παχέος εντέρου
- ◆ Δοκιμασία Πρόωρου τερματισμού της πρωτεϊνοσύνθεσης (PTT)
- ◆ Κληρονομούμενος καρκίνος μαστού και ωοθηκών
- ◆ Γονίδια *BRCA1* και *BRCA2*
- ◆ Νέο *PALB2* γονίδιο
- ◆ Ανίχνευση μεταλλάξεων στον ελληνικό πληθυσμό

# Πορεία καρκινογένεσης



+CNVs (losses difficult to detect)  
+ epigenetics + viruses + mitochondria

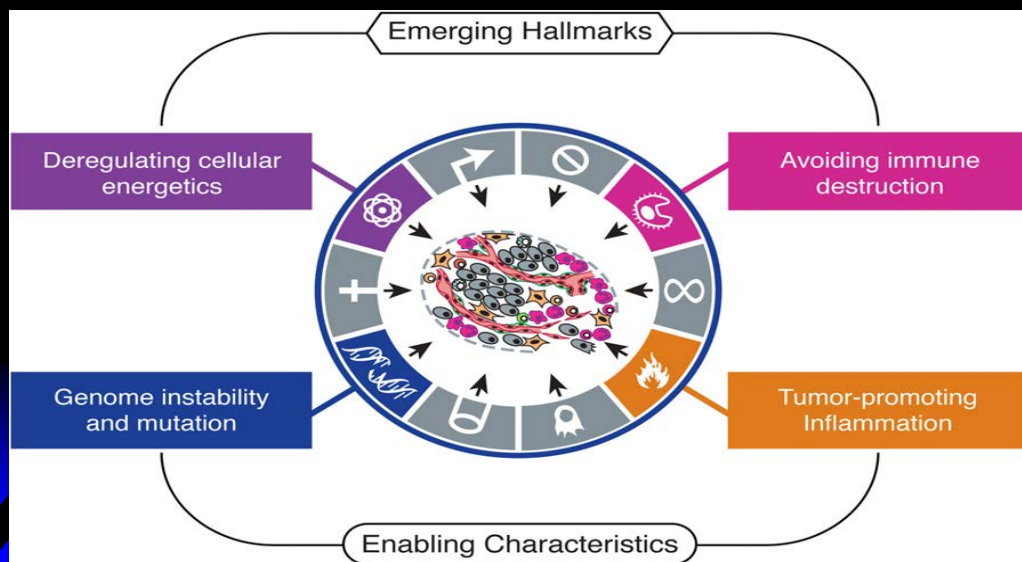
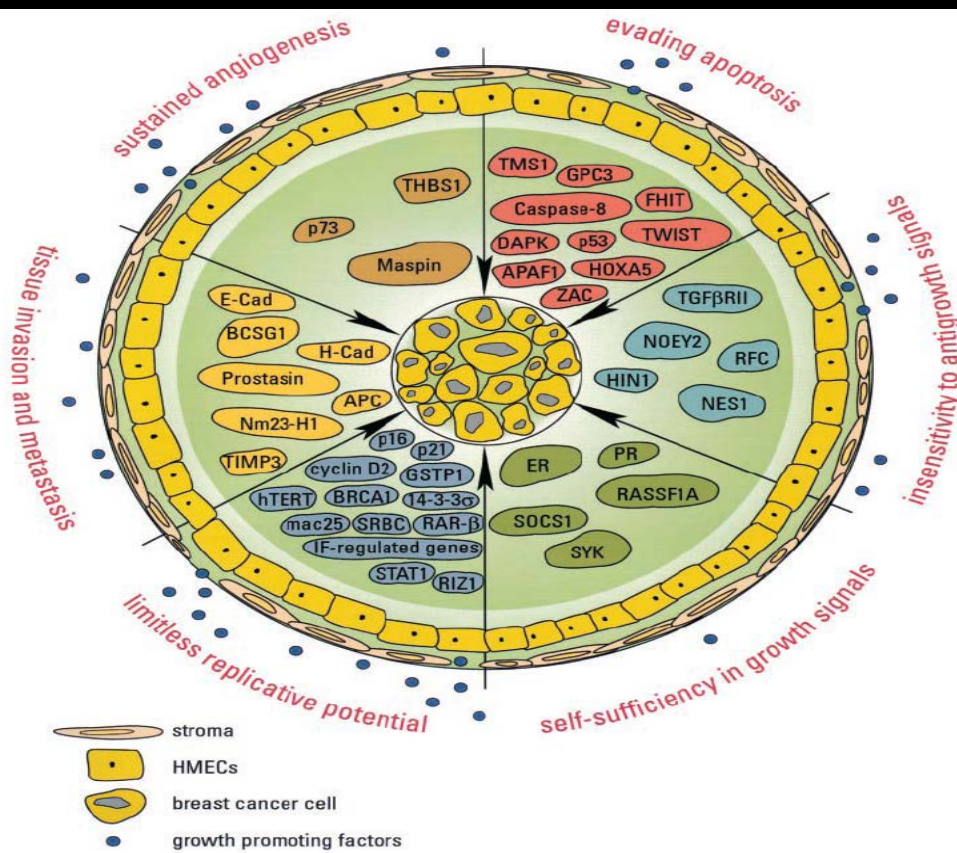
-DNA repair

Passenger >> driver mutations

Stratton, M.R. et al., Nature (2009), 458, 719

# Μοντέλο καρκινογένεσης Hanahan-Weinberg

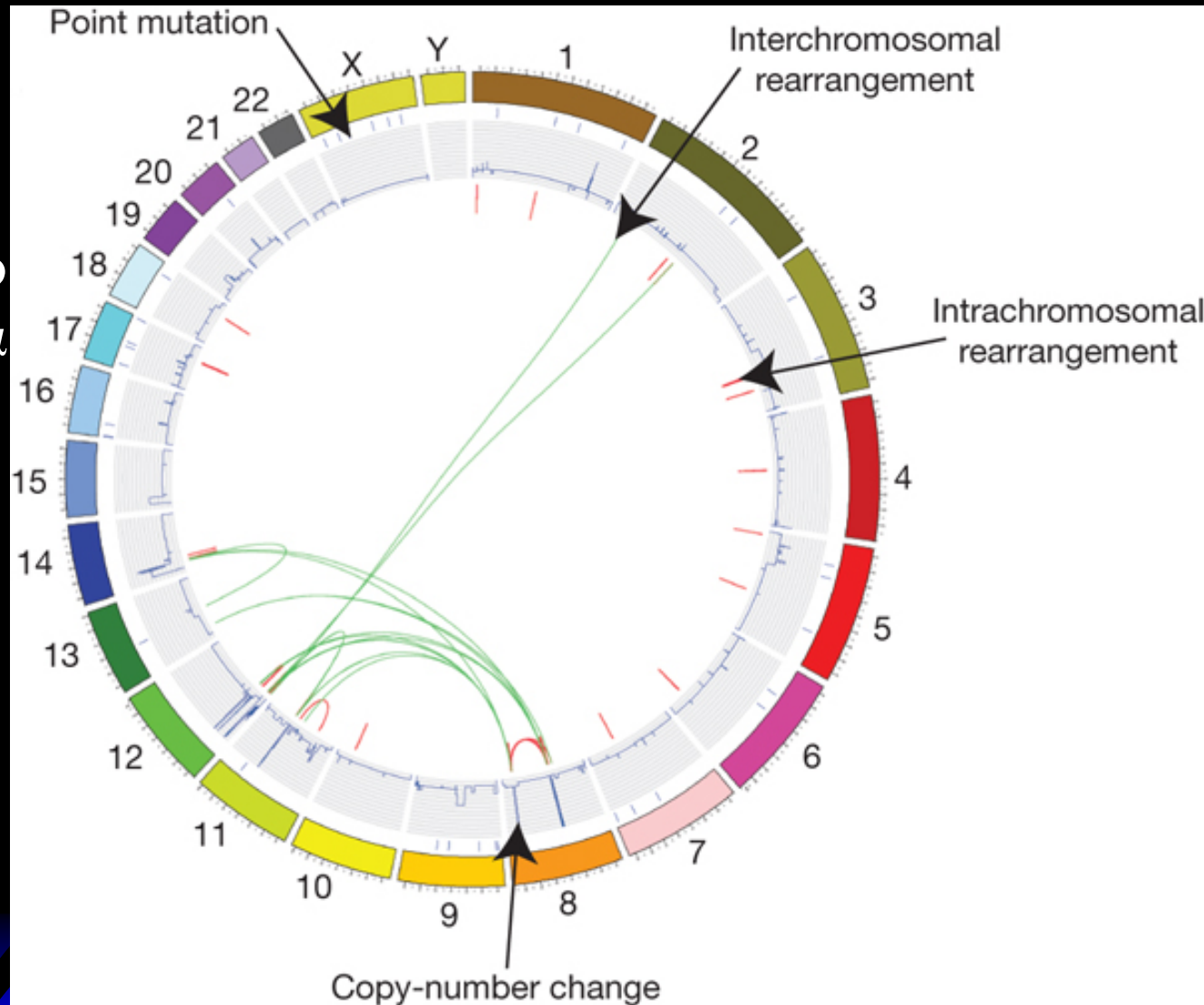
- 1) Ικανότητα διατήρησης συνεχούς πολλαπλασιασμού
- 2) Απώλεια ελέγχου πολλαπλασιασμού
- 3) Αθανατοποίηση - παράβλεψη σημάτων διαφοροποίησης
- 4) Αποφυγή απόπτωσης
- 5) Δυνατότητα αγγειογένεσης
- 6) Παραβίαση αρχιτεκτονικής ιστού (διήθηση-μικρομετάσταση)



Weinberg R.A., *The Biology of Cancer* (2006)  
 Hanahan D. and Weinberg R.A.,  
*Cell* (2000), 100, 57  
*Cell*, (2011), 144, 646

# Είδη Μεταλλάξεων σε μια καρκινική σειρά

Χρωμοσωματικό  
Ιδεόγραμμα



# Πόσες μεταλλάξεις απαιτούνται για την καρκινογένεση?

*Sjoblom et al. Science 2006, 314, 266*

(ομάδα Kinzler and Vogelstein στο Johns Hopkins University)

**Big Science!**

**13.023** κωδικοποιούντα γονίδια από CCDS Database

120.839 εξόνια σε 11 BrCa καρκινώματα

135.483 ζευγάρια εκκινητών

3 εκατομμύρια PCR προϊόντα

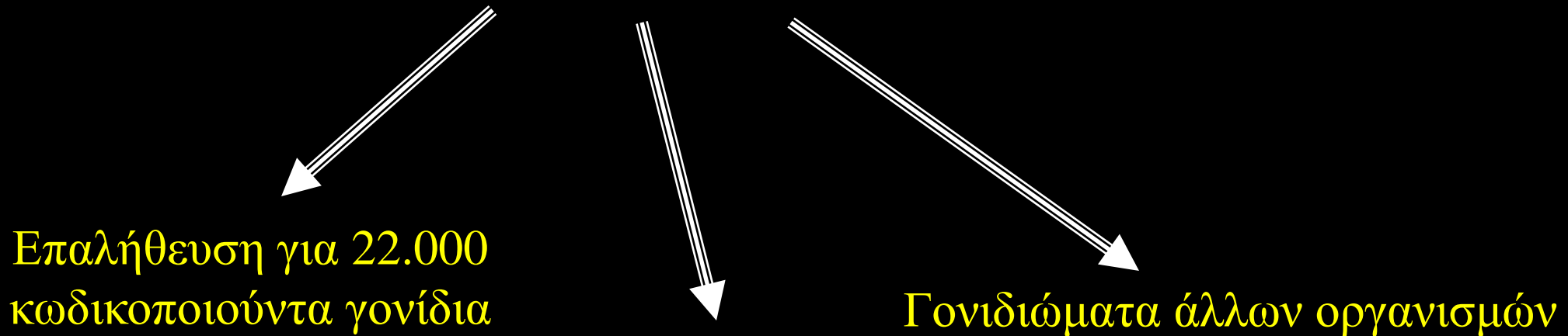
465 MB συνολική καρκινική DNA αλληλούχιση

**122** γονίδια ενέχονται στον καρκίνο μαστού

<b>Breast cancers</b>	<b>Mutations</b>
HCC1008	23
HCC1954	9
HCC38	11
HCC1143	6
HCC1187	11
HCC1395	23
HCC1599	10
HCC1937	5
HCC2157	16
HCC2218	19
Hs578T	4
<b>Average</b>	<b>12</b>

**Μέσος όρος 12 μεταλλαγμένα γονίδια για κάθε καρκίνο μαστού**

# Human Genome Project



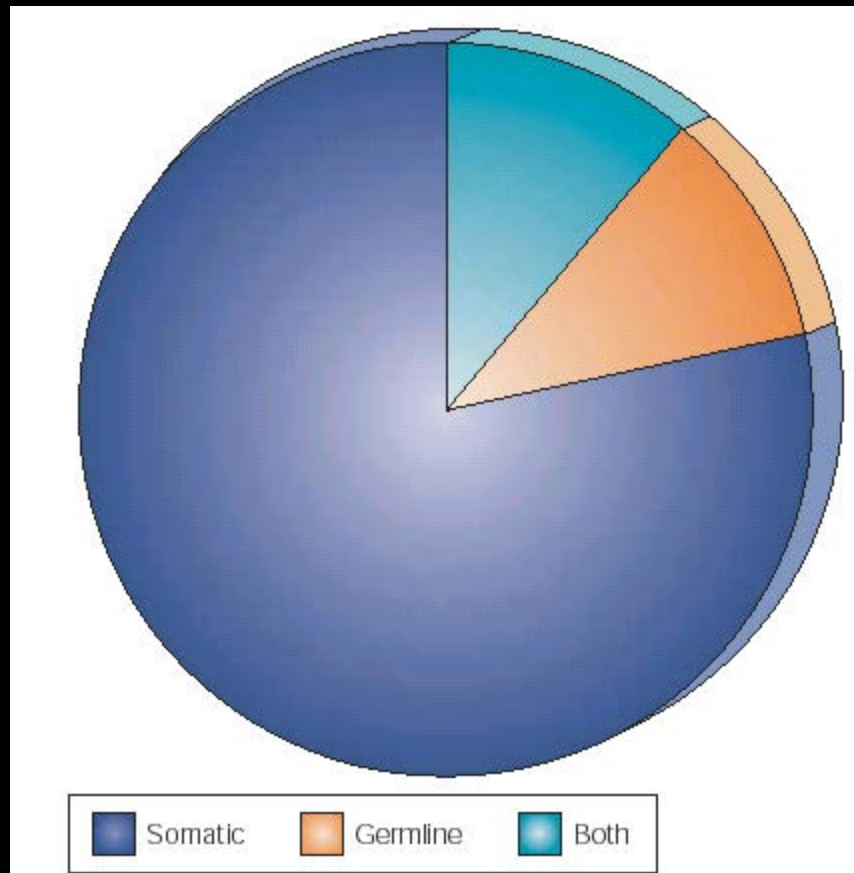
“age-adjusted mortality rate for cancer is about the same as it was 50 years ago”

*Varmus H. Science (2006), 312, 1162*

# Cancer Genome Project

<http://cancer.sanger.ac.uk/census> (2016)

572 Καρκινικά γονίδια (>2% των συνολικών γονιδίων)



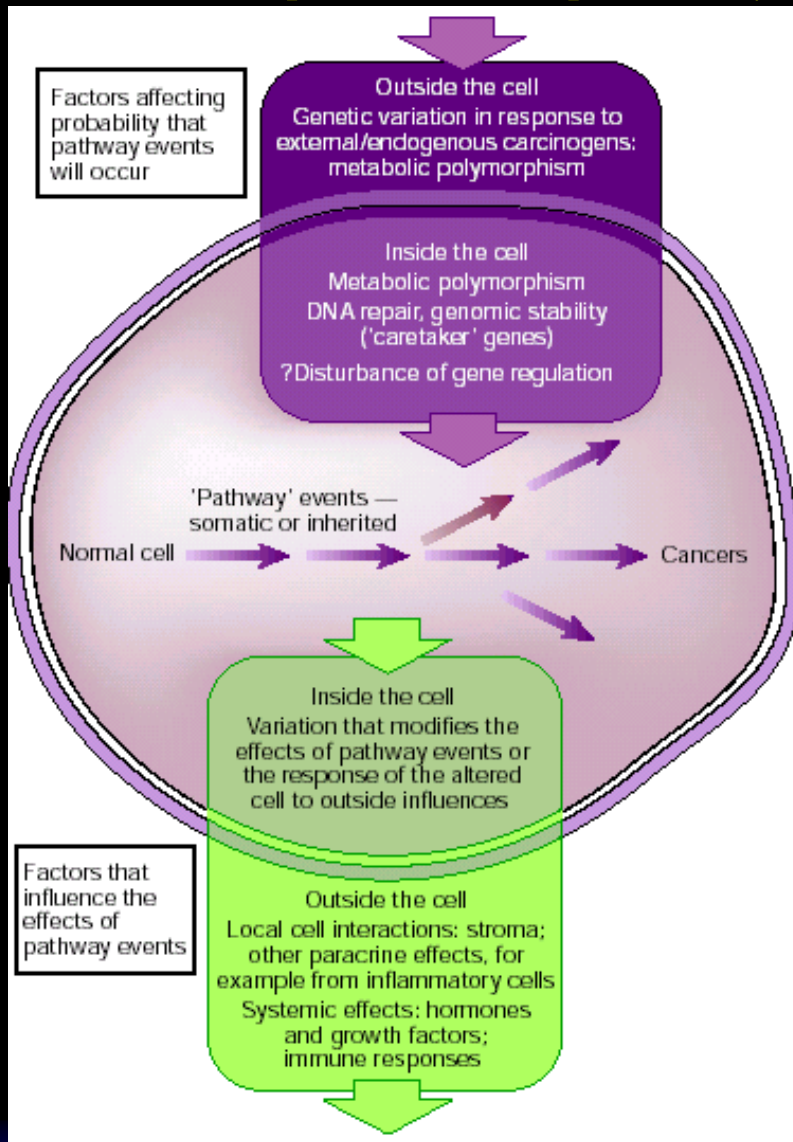
90% genes with somatic mutations  
+  
20% genes with germline mutations  
(10% common in both ways)

Επιγενετικές τροποποιήσεις

*Futreal P.A. et al., Nature Reviews Cancer (2004), 4, 177*



# Τροποποιητικά γονίδια (modifier genes)



## Αλληλεπίδραση γονιδίων και περιβάλλοντος:

Αντίδραση σε ραδιενέργεια, ηλιακή ακτινοβολία, τοξικά χημικά και ρυπαντές (π.χ. αμίαντος), σε φάρμακα, στο καπνό τσιγάρου, σε αλκοόλ, σε ελεύθερες ρίζες, σε πρόσθετα τροφίμων (φυτοορμόνες, τοξίνες κλπ)

## Μεταβολικοί πολυμορφισμοί:

κυτοχρώματος P450, της μεταφοράς της γλουταθειόνης (GST) και της N-ακετύλο μεταφοράς (NAT)

## Παρακρινή αλληλεπίδραση:

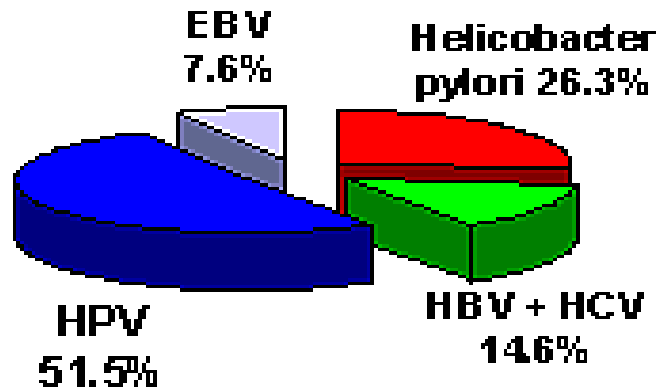
των καρκινικών κυττάρων με τα γεινιάζοντα κύτταρα άλλου τύπου π.χ. των επιθηλιακών κυττάρων με τα μεσεγχυματικά κύτταρα ή το «στρώμα»

## Ηλικία και ανοσολογικό σύστημα

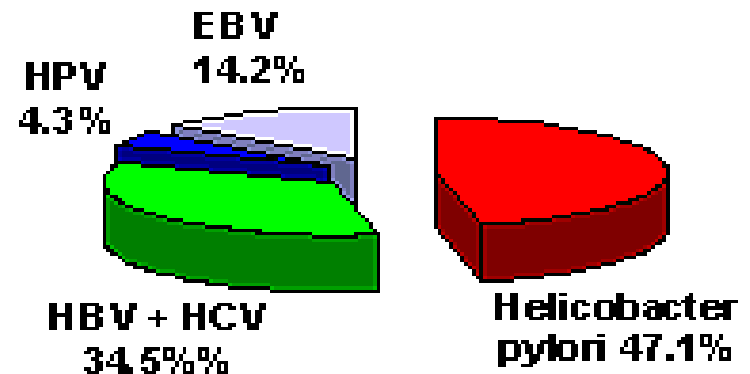
*Ponder B. Nature (2001), 411, 336*

# Καρκινογόνοι λοιμώδεις παράγοντες

1 006 544 = 19.9% of total cancer incidence in females



1 025 524 = 17.7% of total cancer incidence in males



Αιτία καρκίνου στο ~20% των περιπτώσεων  
(ιοί στο 15%, στο υπόλοιπο ~5% **Ελικοβακτηρίδιο pylori**  
στον καρκίνο στομάχου)

# Ιοί και καρκίνος

<b>Virus</b>	<b>Tumor</b>	<b>Non-tumor</b>	<b>Γονίδια</b>
<b>HPV</b>	Καρκίνος τραχήλου μήτρας κλπ	Μυρμηγκιές	E6, E7
<b>EBV</b>	Λέμφωμα Burkitt (+ελονοσία?), PTLD Ρινοφαρυγγικό Ca, Hodgkin's λέμφωμα	Μονο-πυρήνωση	EBNA1, EBERs, c-myc
<b>HHV-8</b>	Σάρκωμα Kaposi	Castleman's	LANA
<b>HTLV-1</b>	T-cell Λευχαιμία		Tax
<b>HBV, HCV</b>	Ηπατοκυτταρικό Ca (HCC)	Ηπατίτιδα, Κίρρωση	?

**Άμεσος ρόλος:** παρουσία σε βιοψίες όγκων, εξαλλαγή καλλιιεργειών, συνεχής έκφραση ιϊκών γονιδίων ή τροποποιημένων γονιδίων ξενιστή, επιδημιολογικά δεδομένα

# Έμμεσος ρόλος ιών στην καρκινογένεση

- ◆ Ανοσοκαταστολή (π.χ. HIV και μη-Hodgkin's λέμφωμα)
- ◆ Πρόληψη απόπτωσης (π.χ. μετά από UV)
- ◆ Συνπαράγοντες σε άλλη ιική μόλυνση
- ◆ Φλεγμονή και οξειδωτικό stress (HBV?)

*Υπάρχει μολυσματικός αιτιολογικός παράγων στη παιδική λευχαιμία?  
Shetland islands? HMTV?*

*Ρετροϊοί στη γονιδιακή θεραπεία οδήγησαν σε λευχαιμία ασθενών με SCID λόγω ενσωμάτωσης κοντά στο LMO2 ογκογονίδιο (chr. 11)*

# Ογκογονίδια (oncogenes)

“gain of function”

Μεταλλαγμένες ή ενεργοποιημένες μορφές φυσιολογικών γονιδίων:

- ◆ εκκρινόμενοι αυξητικοί παράγοντες (π.χ. *sis-PDGF*)
- ◆ μεμβρανικοί υποδοχείς (π.χ. *ERBB2*)
- ◆ πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη ενδοκυττάρια μετάδοση σημάτων (signal transduction π.χ. *RAS*)
- ◆ μεταγραφικοί παράγοντες ή άλλες πυρηνικές πρωτεΐνες που δεσμεύονται στο DNA (π.χ. *MYC, JUN*)
- ◆ μέλη του δικτύου των κυκλινών ή των εξαρτημένων από τις κυκλίνες κινασών, μορίων δηλαδή που ενέχονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου.

# Ενεργοποίηση ογκογονιδίων

- ❖ ποιοτικά με σημειακή μετάλλαξη (π.χ. κωδικονίου 12, 13 ή 61 του *RAS* γονιδίου, V599E μετάλλαξη *BRAF* ογκογονιδίου)
- ❖ ποσοτικά (υπερμορφική μετάλλαξη: δημιουργία πολλών αντιγράφων ενός φυσιολογικού γονιδίου π.χ. του *ERBB2*)
- ❖ μετά από χρωμοσωματική διαμετάθεση (translocation) και
  - ❖ i) ένθεση ενός φυσιολογικού γονιδίου σε έντονα μεταγραφόμενη περιοχή όπως π.χ. το *MYC* στη περιοχή της βαριάς αλύσου των ανοσοσφαιρινών στο λέμφωμα του Burkitt ή
  - ❖ ii) δημιουργία χμαιοτικού προϊόντος όπως η νεομορφική μετάλλαξη *BCR-ABL* του χρωμοσώματος της Φιλαδέλφειας στη χρόνια μυελογενή λευχαιμία (CML)
- ❖ μόλυνση:
  - ❖ i) με DNA ογκογόνο ιό όπως οι HPV, EBV που μέσω της ενσωμάτωσής τους στο ανθρώπινο γονιδίωμα εκφράζουν δικές τους πρωτεΐνες – ογκογονίδια ή
  - ❖ ii) με RNA ιούς, τους ρετροϊούς που μέσω της μεταγωγής έχουν αποκτήσει ενεργοποιημένα ογκογονίδια ομόλογα των ανθρωπίνων τα οποία και εκφράζουν μετά από σύντηξη με πρωτεΐνες του ξενιστή

# Απενεργοποίηση Ογκοκατασταλτικών (tumor suppressors) “loss of function”

- ◆ απώλεια ολόκληρου του χρωμοσώματος μέσω μιτωτικού μη-διαχωρισμού (nondisjunction)
- ◆ είτε με μιτωτικό ανασυνδυασμό μέσω επιχιασμού (crossover)
- ◆ είτε με απαλοιφή τμήματος του χρωμοσώματος που περιλαμβάνει το γονίδιο
- ◆ είτε με κάποια σημειακή μετάλλαξη
- ◆ είτε με απενεργοποίηση του γονιδίου μέσω επιγενετικού μηχανισμού π.χ. μεθυλίωσης

Απώλεια της ετεροζυγωτίας με τους 3 πρώτους μηχανισμούς  
(loss of heterozygosity, LOH)

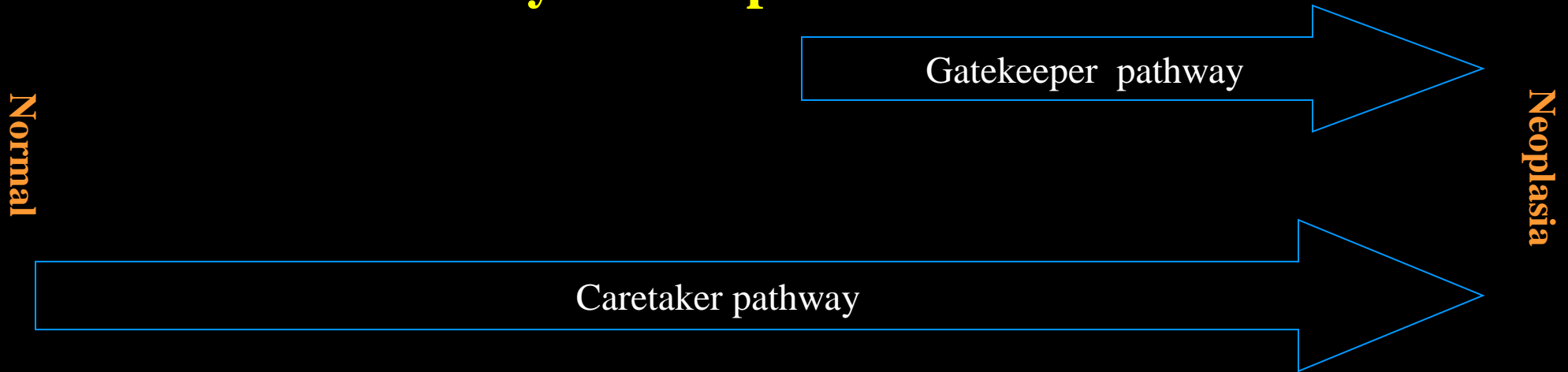
# Χαρακτηριστικά γονιδίων κληρονομούμενου καρκίνου

- ◆ κυρίως επιθηλιακοί καρκίνοι
- ◆ κυρίως Ογκοκατασταλτικά γονίδια
  - [εκτός ογκογονιδίων: **RET** (MEN2A/B), **MET** (PRC) και **CDK4** (melanoma)]
- ◆ Υπολειπόμενος χαρακτήρας σε κυτταρικό επίπεδο
- ◆ Επικρατών τρόπος κληρονόμησης (Knudson two-hit hypothesis)
- ◆ Προσδίδουν προδιάθεση για καρκίνο στους φορείς μεταλλάξεων
  - νεώτερη ηλικία έναρξης καρκίνου – πολλαπλοί όγκοι
- ◆ Gatekeepers ή DNA repair caretakers



# Hereditary cancer genes: high risk

## Different Pathways to neoplasia: different relative risk



Mutation of a caretaker-gene allele

RR= 5-50

Mutation of 2nd caretaker-gene allele leads to *genetic instability*

Mutation of a gatekeeper-gene allele

RR  $\geq$  1000

Mutation of 2nd gatekeeper-gene allele leads to *tumour initiation*

*Kinzler K.W. and Vogelstein B. Nature (1997), 386, 761*

Μικροδορυφορική αστάθεια (**microsatellite instability, MIN**)

# 89 Γονίδια Κληρονομούμενου Καρκίνου

<http://cancer.sanger.ac.uk/census> (2016)

## Γονίδιο

*BRCA1 / BRCA2*

## Σύνδρομο

Κληρονομούμενος Καρκίνος μαστού και ωοθηκών

*APC*

*MUTYH*

Συγγενής πολυποδίαση

Familial Adenomatous Poliposis (FAP) of Colon

*MSH2, MLH1,*

*MSH6, PMS1, PMS2*

Hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC)

*ATM*

Αταξία-Τελαγγειεκτασία (Ataxia-Telangiectasia Mutated)

*FANCA-P*

Αναιμία Fanconi

*NF1/NF2*

Νευρινωμάτωση (NeuroFibromatosis)

*RB1*

RetinoBlastoma

p53

Li-Fraumeni

# Ιστοειδικότητα των γονιδίων Κληρονομούμενου Καρκίνου

Αν και γενικού ρόλου, προτίμηση για όγκους σε συγκεκριμένους ιστούς (+μερικούς άλλους)

π.χ. **BRCA1** κυρίως καρκίνος μαστού και ωθηκών

ωστόσο **BRCA2** εκτός Ca μαστού: Παγκρεατικός καρκίνος

Επίσης: **BRCA2** μεταλλάξεις σε ομοζυγωτία → Αναιμία Fanconi!

*Howlett N et al., Science (2002), 297, 606*

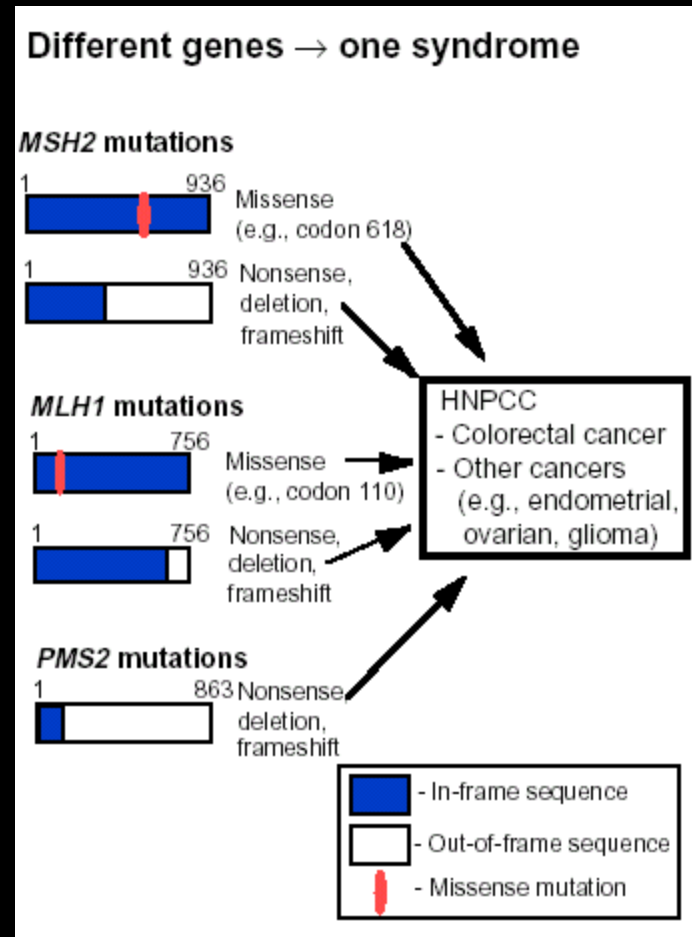
Γονίδια κληρονομούμενου καρκίνου αν και στο **ίδιο μονοπάτι**, διαφορετική ιστοειδικότητα:

**RB1** ρετινοβλάστωμα

**P16** μελάνωμα

# Γενετική Ετερογένεια Κληρονομούμενου Καρκίνου

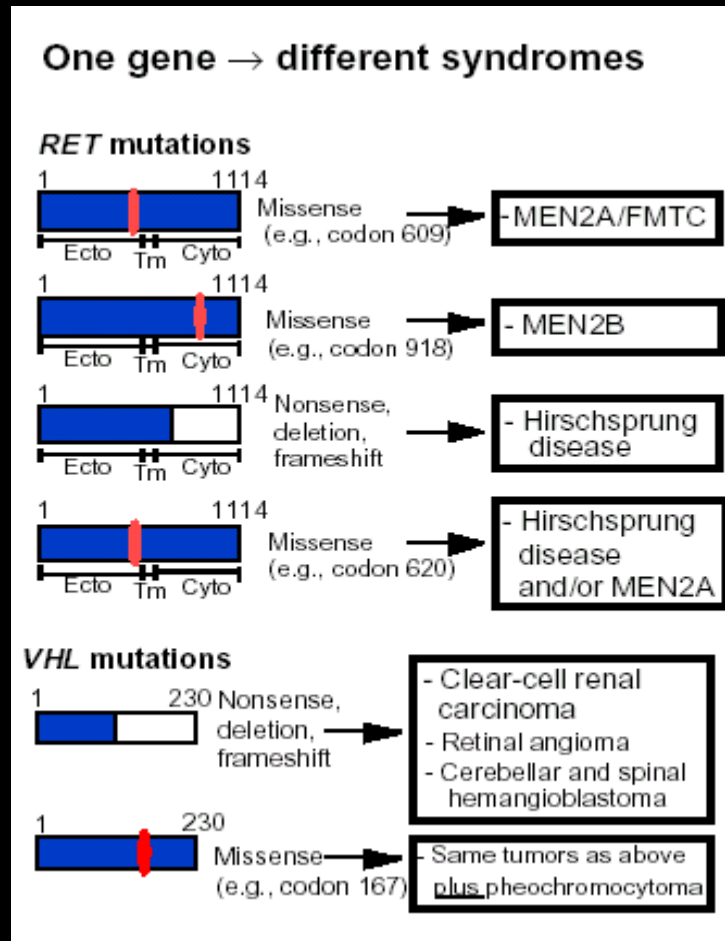
5 γονίδια ανεξαρτήτως  
είδους μεταλλάξεως  
*MSH2, MLH1,*  
*MSH6, PMS1, PMS2*



Fearon E.R., *Science* (1997), 278, 1043

# Τροποποίηση κινδύνου (Risk Modification)

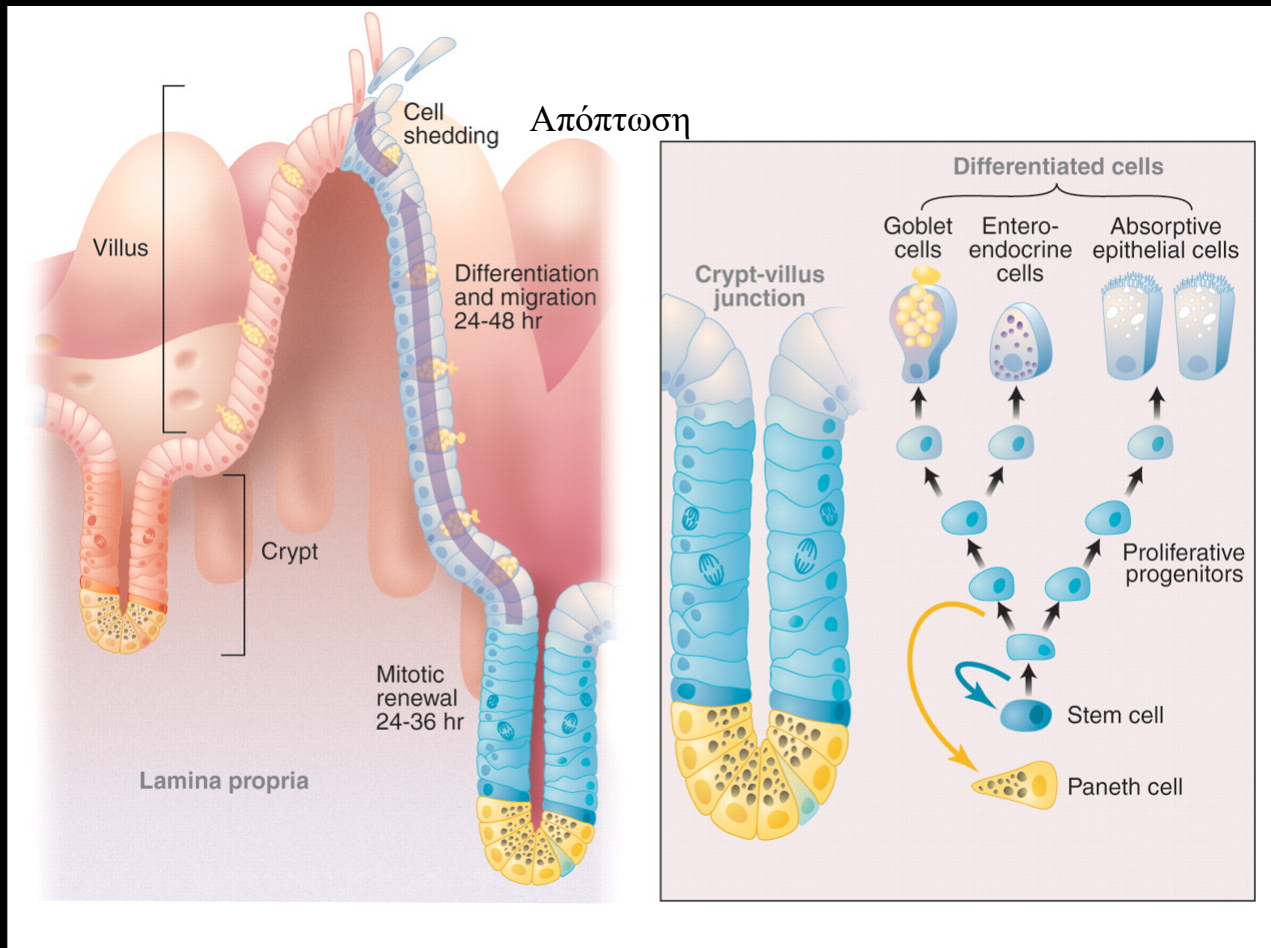
1) Allelic variation  
(αναλόγως θέσεως και είδους μετάλλαξης)



2) Τροποποιητικά γονίδια

3) Αλληλεπίδραση με το περιβάλλον

# Είδη κυττάρων στις κρύπτες του εντέρου



## Διαφοροποίηση σε:

- Εντεροκύτταρα (~90%)
- Εντεροενδοκρινή κύτταρα
- Βλεννοκύτταρα Goblet
- Paneth κύτταρα (εκκρίνουν αντιμικροβιακούς παράγοντες)

Αυτοανανέωση των βλαστικών κυττάρων

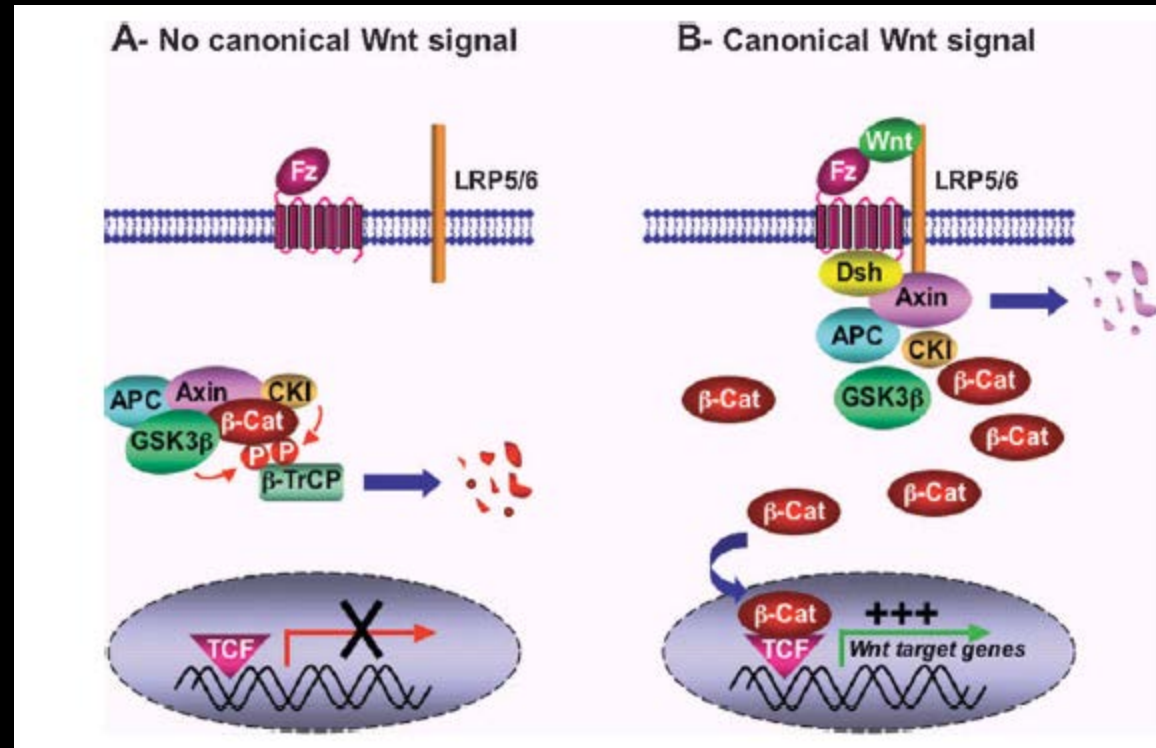
Ολόκληρο το εντερικό επιθήλιο ανανεώνεται εντός 5 ημερών  
1400 εντεροκύτταρα αποπτώνουν ανά ημέρα

# Wnt – APC – $\beta$ -Catenin

Frizzled (G-coupled Wnt receptor)

Destruction complex for  $\beta$ -catenin (P- and Ub- marked)

TCF/LEF (T-cell factor/Lymphoid Enhancing factor)



Wingless-type + Integration

Destruction for Axin (through Dishevelled)

*π.χ. myc*

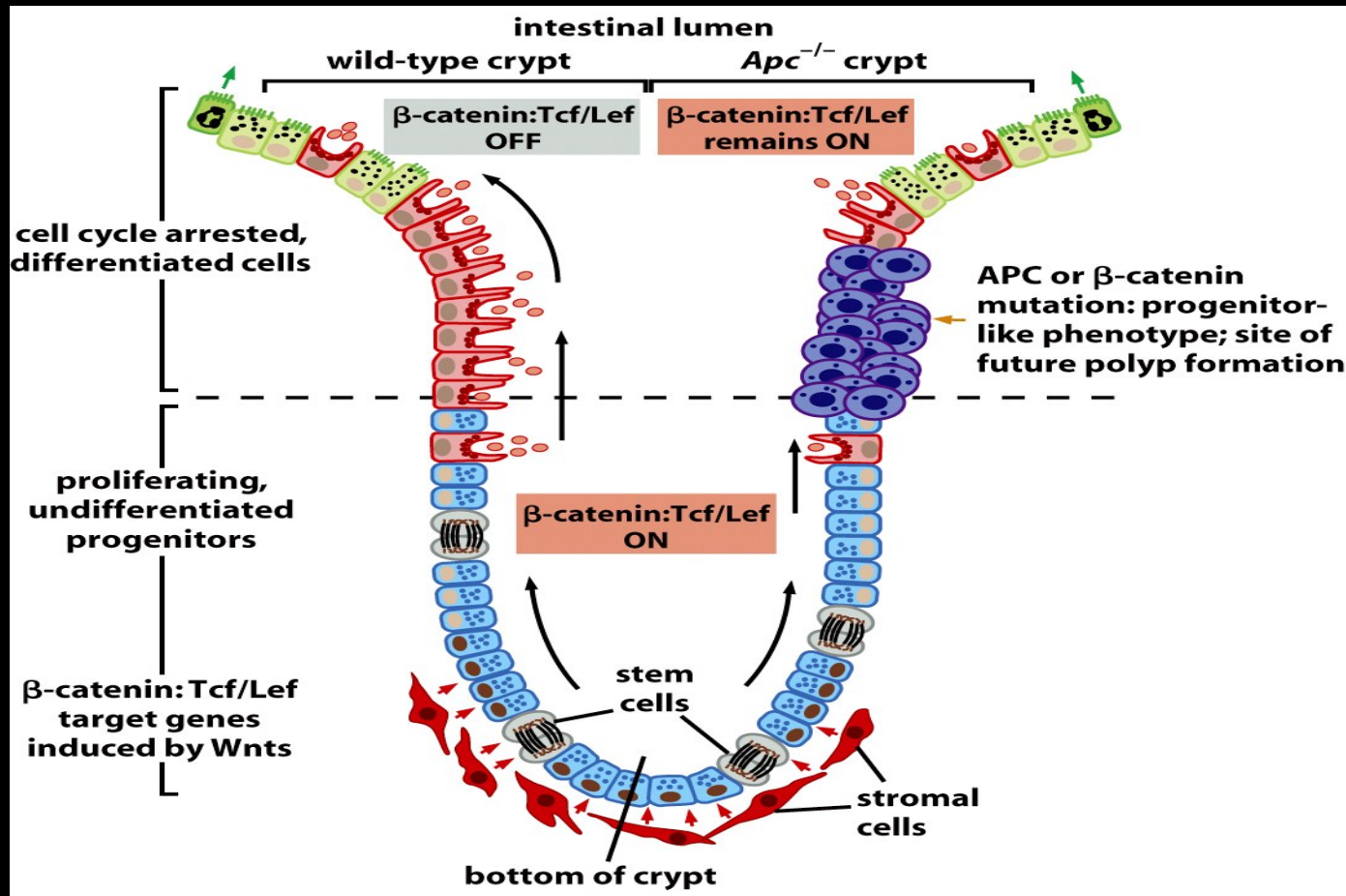
*Pinto D. and Clevers H., Biol Cell (2005), 97, 185*

«εναρκτήριο» χτύπημα: πυρηνική κατενίνη – δημιουργία εστιών εκτροπής

Αλληλεπίδραση με E-cadherin για διακυτταρική προσκόλληση

Αλληλεπίδραση με EB1 που συνδέει μικροσωληνίσκους στη μιτωτική άτρακτο

# Δημιουργία πολύποδα στο παχύ έντερο



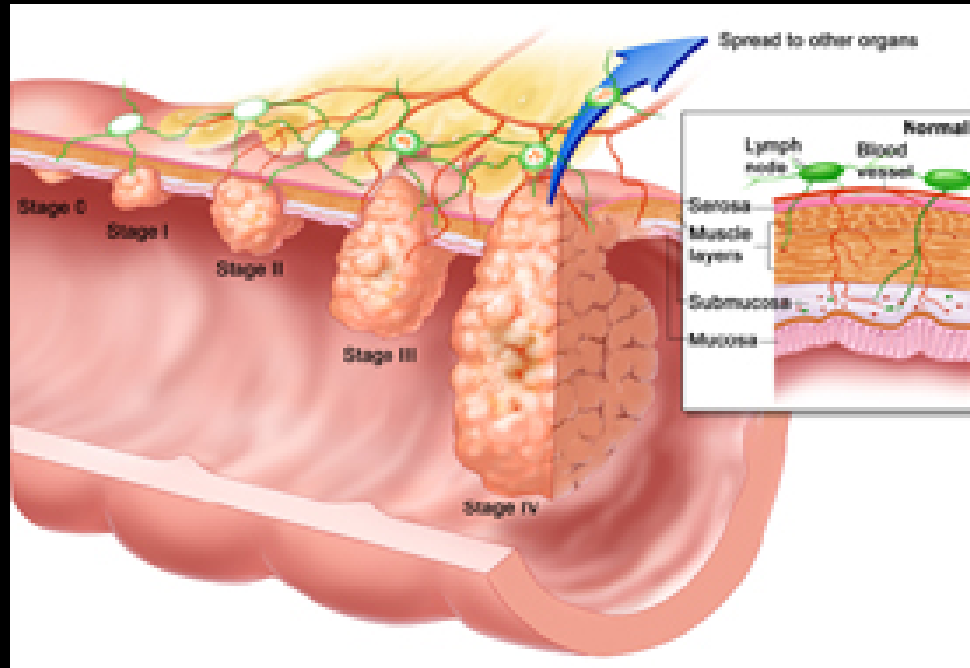
Υπερπλασία

Εστίες εκτροπής  
(aberrant crypt foci)

Εναρκτήριο «χτύπημα»: απώλεια APC →  
Συνεχής λειτουργία  $\beta$ -Catenin-TCF/LEF



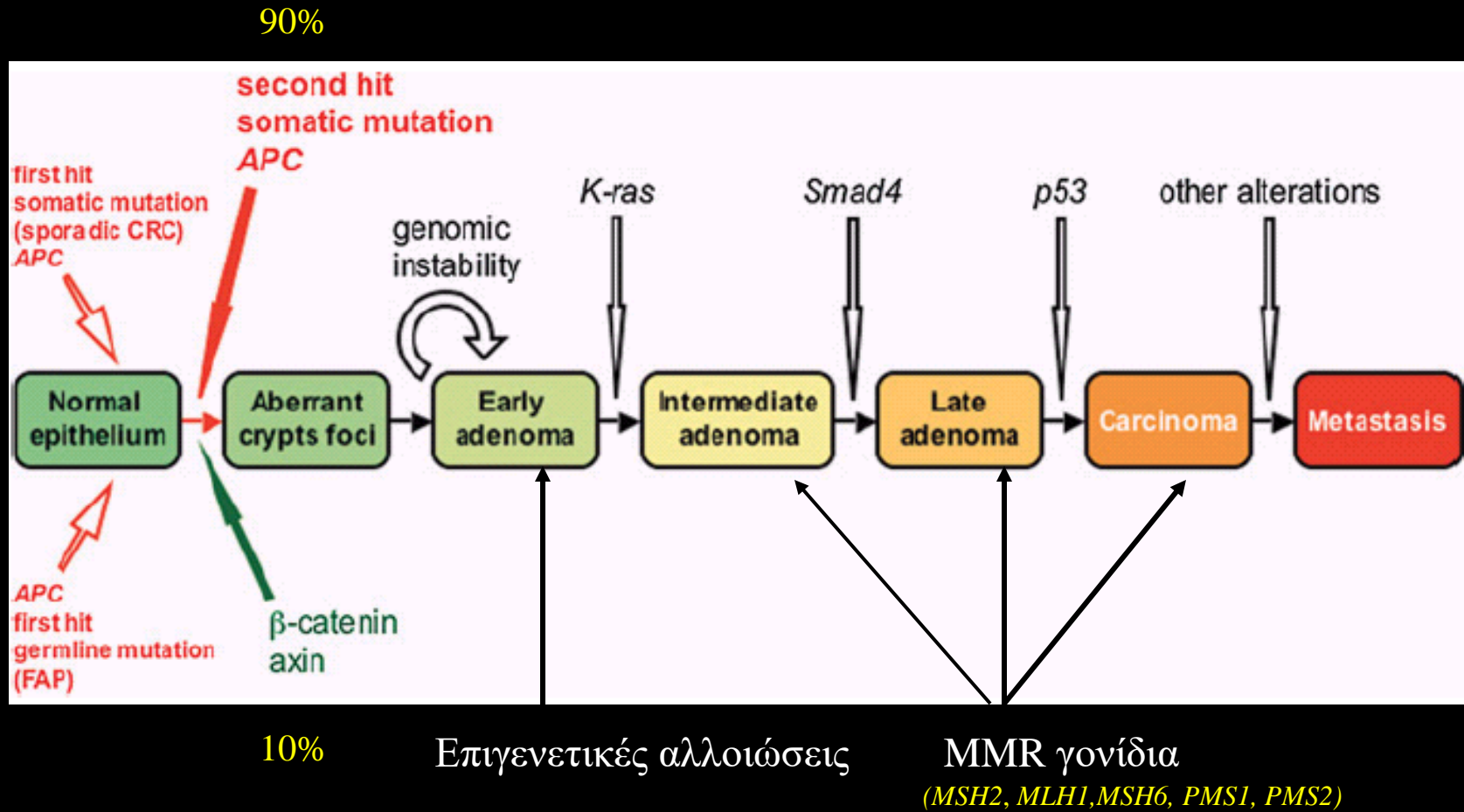
# Καρκινογένεση στο παχύ έντερο



~20ετής διαδικασία

Πολύποδας → Αδένωμα → Καρκίνωμα → Μετάσταση

# Μοντέλο καρκινογένεσης στο παχύ έντερο



*Fearon ER and Vogelstein B. Cell (1990), 61, 759*

Πλήρης ιστοπαθολογικός χαρακτηρισμός και εντοπισμός μοριακής αλλοίωσης σε κάθε διακριτό στάδιο της καρκινογένεσης

# Μέθοδος πρόωρου τερματισμού της πρωτεϊνοσύνθεσης (Protein truncation test, PTT)

ανιχνεύει μεταλλάξεις στη κωδικοποιούσα περιοχή που οδηγούν σε συντμημένα πρωτεΐνη (truncating):

- μη νοηματικές μεταλλάξεις (εισαγωγή κωδικονίου τερματισμού)
- μεταλλάξεις αλλαγής πλαισίου ανάγνωσης (ενθέσεις, απαλοιφές)

δεν ανιχνεύει:

- παρανοηματικές ή σιωπηρές μεταλλάξεις (κωδικοποιούσα περιοχή)
- ρυθμιστικές ή μεταλλάξεις ιντρονίων (μη κωδικοποιούσα περιοχή)

# Mutation paradigm

**Normal:** THE BIG RED DOG RAN OUT

**Missense:** THE BIG RAD DOG RAN OUT

**Nonsense:** THE BIG RED .

**Insertion:** THE BIG RED ZDO GRA NOU

**Deletion:** THE BIG RED DRA NOU T

# Παραδείγματα μεταλλάξεων

Normal:

ATG CAG CAG CAG TTT TTA CGT AAC CCG DNA  
Met Gln Gln Gln Phe Leu Arg Asn Pro Amino acid

Missense:

ATG CAG CAG CAG TTT TCA CGT AAC CCG DNA  
Met Gln Gln Gln Phe Ser Arg Asn Pro Amino acid

Nonsense:

ATG CAG CAG CAG TTT TGA CGT AAC CCG DNA  
Met Gln Gln Gln Phe STOP Amino acid

Frameshift:  
delete 1bp

ATG CAG CAG CAG TTT TAC GTA ACC CG DNA  
Met Gln Gln Gln Phe Tyr Val Thr Arg Amino acid

Silent:

ATG CAG CAG CAG TTT TTG CGT AAG CCG DNA  
Met Gln Gln Gln Phe Leu Arg Asn Pro Amino acid

# Στάδια μεθόδου ΡΤΤ

- Απομόνωση DNA ή RNA
- PCR ή RT-PCR και ηλεκτροφόρηση DNA σε αγαρόζη
- *In vitro* μεταγραφή και μετάφραση
- Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και ανίχνευση σήματος

# ΡΤΤ

Απομόνωση DNA ή RNA



PCR ή RT-PCR



DNA Ηλεκτροφόρηση



In vitro μεταγραφή/μετάφραση

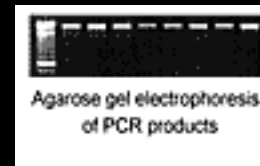
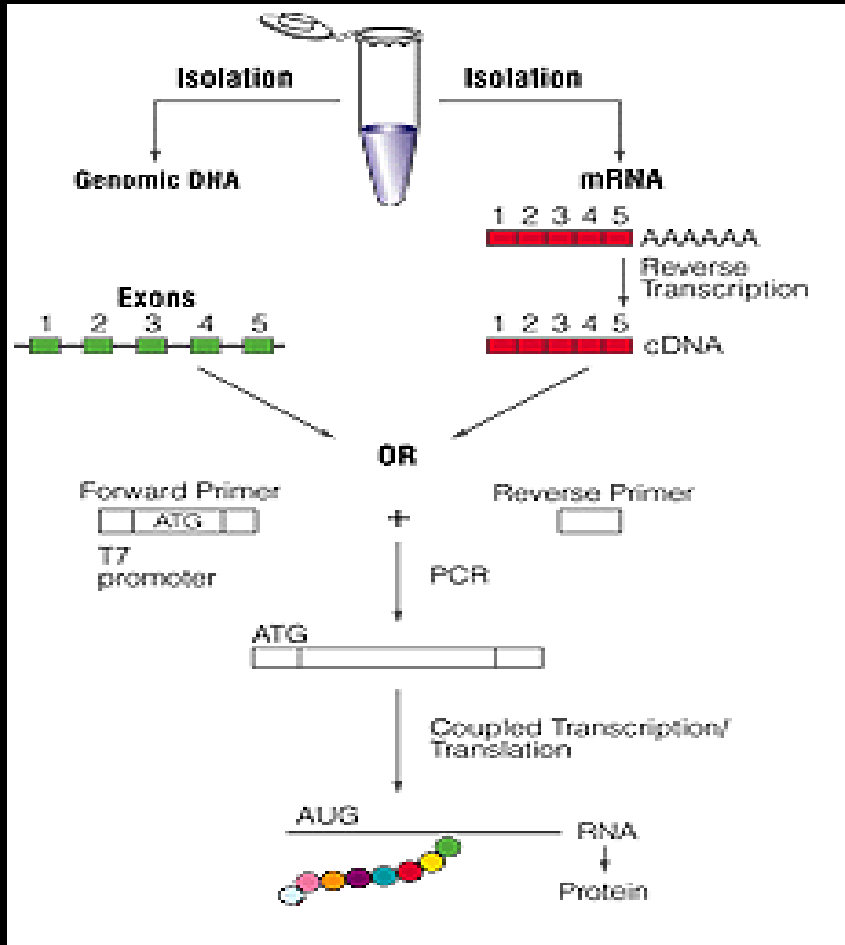


SDS-PAGE Ηλεκτροφόρηση



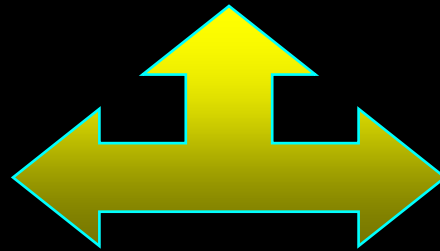
Ανίχνευση σήματος

# PTT





Χωρισμός γονιδίου προς μελέτη σε κομμάτια 1-2 kb  
με αλληλεπικάλυψη 200-300 βάσεων



Μεγάλα εξόνια

↓  
Απομόνωση DNA  
από περιφερικό αίμα

↓  
PCR

Πολλά μικρά εξόνια

↓  
Απομόνωση RNA  
από ιστό ή φρέσκο αίμα

↓ cDNA

RT - PCR

⇒ nested PCR ?

# Χαρακτηριστικά 5'-εκκινητού για PCR της μεθόδου PTT

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

cggatcctaatacgactcactataggacagaccacc ATG g – (gene specific)

←→  
cloning

←→

T7 promoter

←→

Kozak

# Ηλεκτροφόρηση DNA σε αγαρόζη

## Έλεγχος προϊόντων PCR για:

- απαλοιφές
- διπλασιασμούς
- ελαττωματικά ματίσματα RNA

## In vitro μεταγραφή

RNA πολυμεράση (T7, SP6 ή T3)

## In vitro μετάφραση

1-1,5 hr, 30-37° C

- Rabbit reticulocyte lysate
- Wheat germ lysate

# SDS-PAGE Ηλεκτροφόρηση σε 12-15% πολυακρυλαμίδιο

**Επισήμανση**

Ραδιενεργό  
Αμινοξύ

Βιοτινυλιωμένη  
Λυσίνη

Φθορίζον  
Αμινοξύ

**Ανίχνευση**

Φθορισμογραφία  
Αυτοραδιογραφία

Western blot

χρώμα

χημειοφωταύγεια

**Χρόνος**

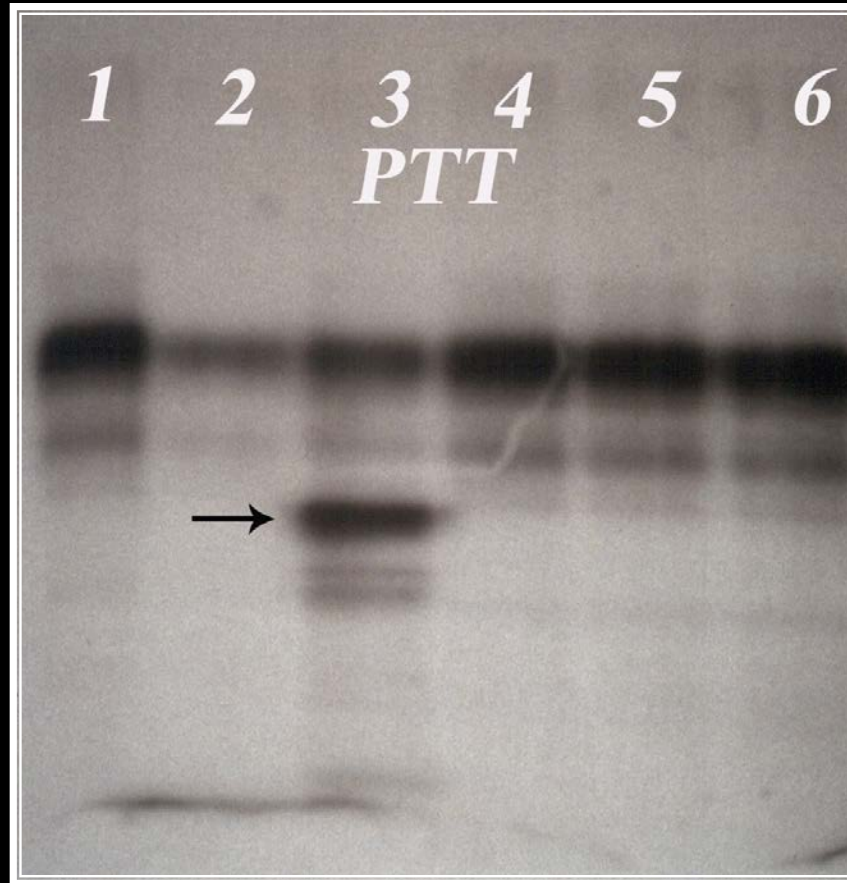
1-2 ημέρες

ώρες

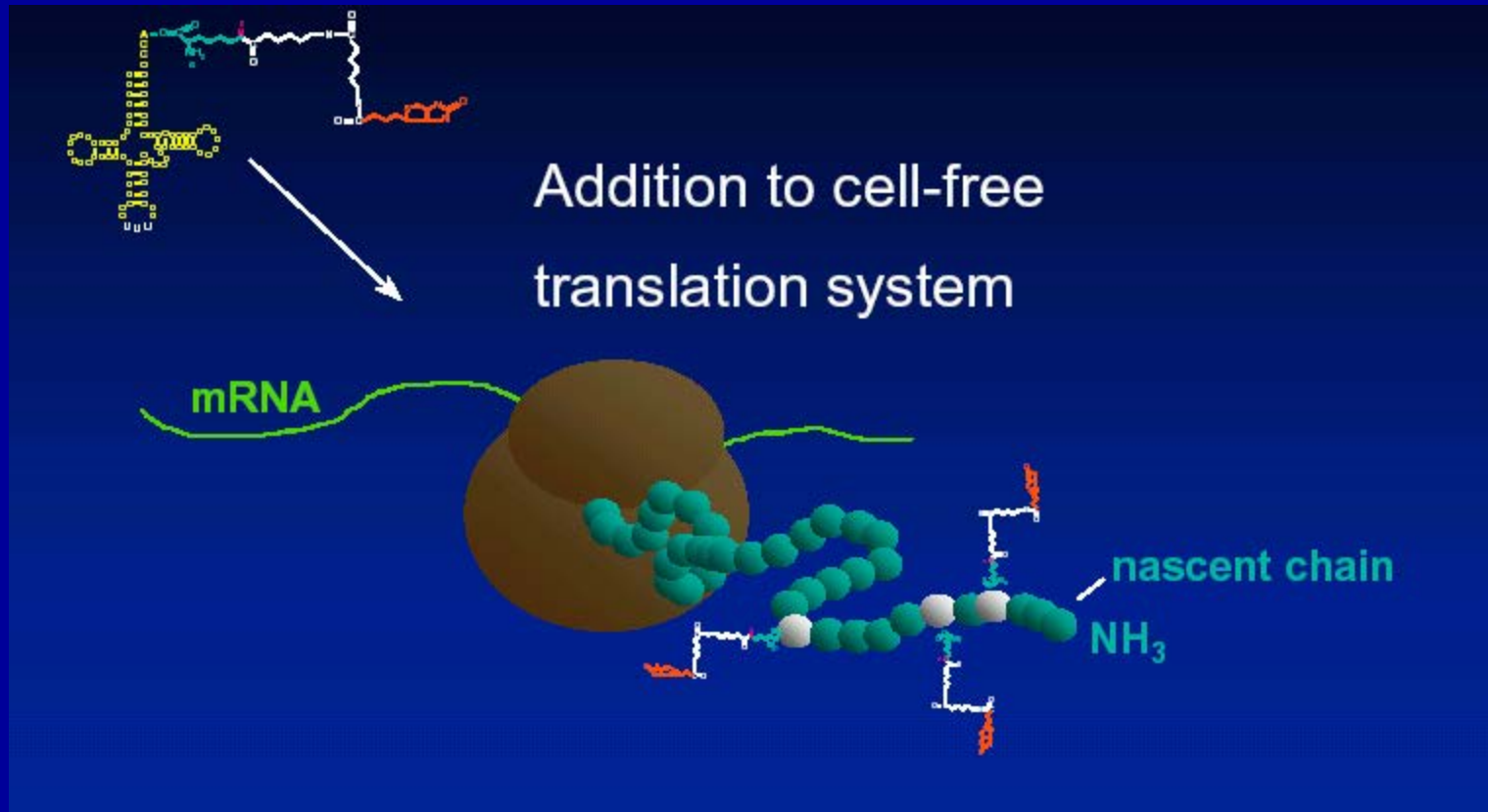
άμεσο



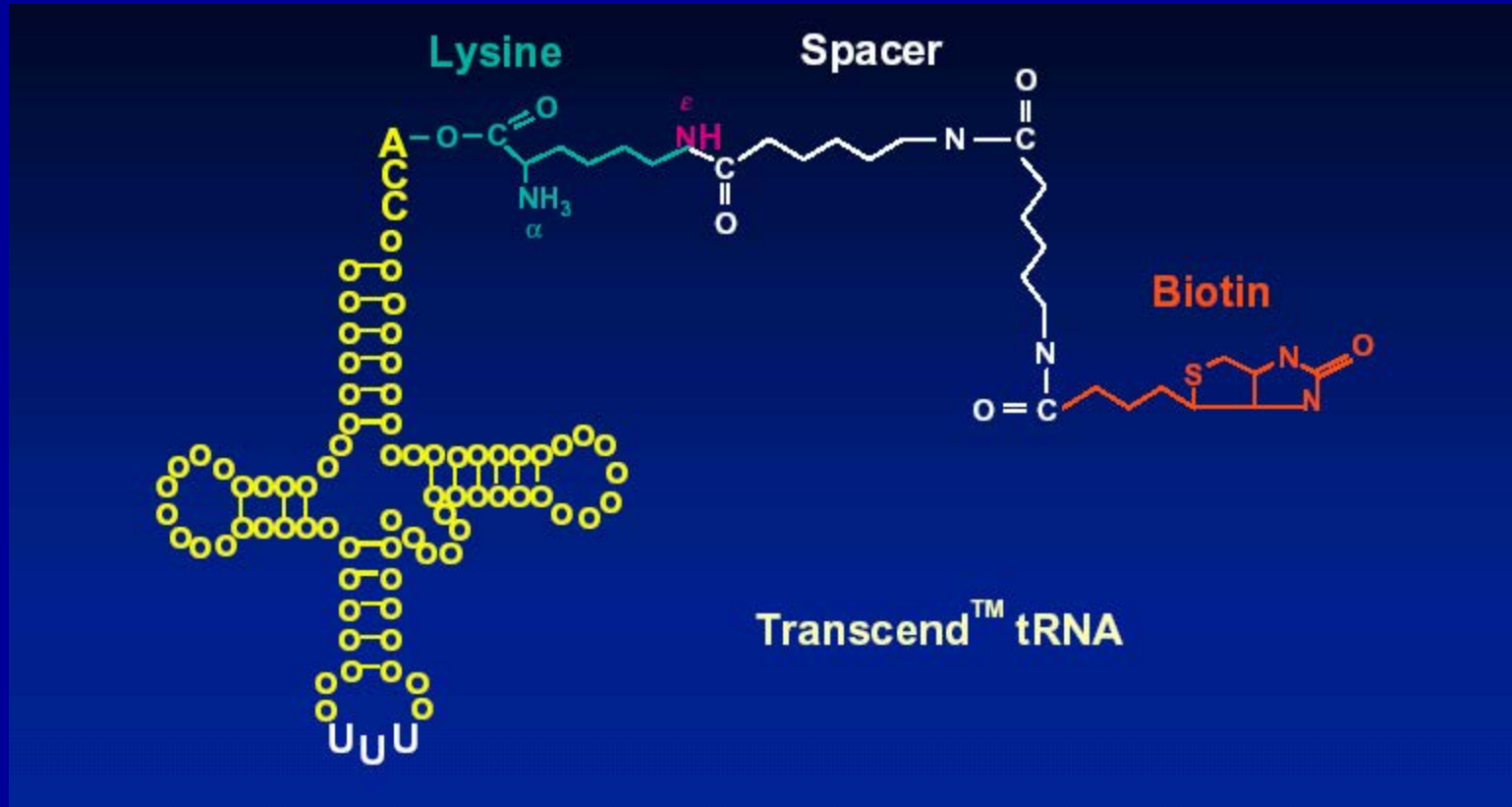
# Παράδειγμα ΡΤΤ



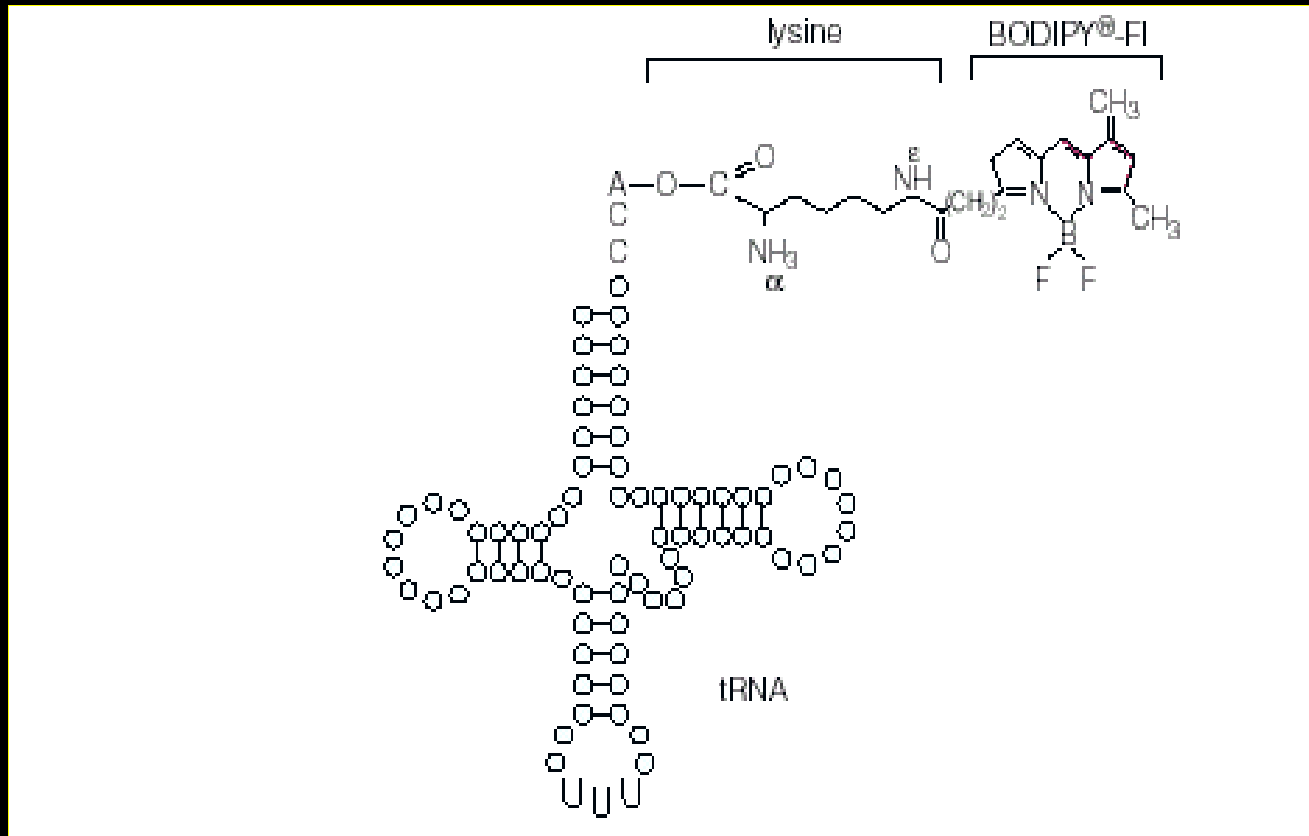
# Μετάφραση



# Βιοτινυλιωμένο tRNA

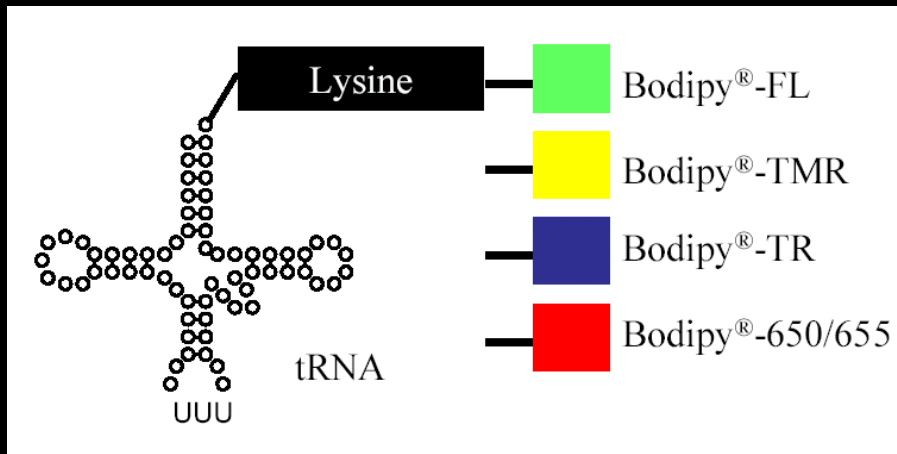


# Fluoro-PTT

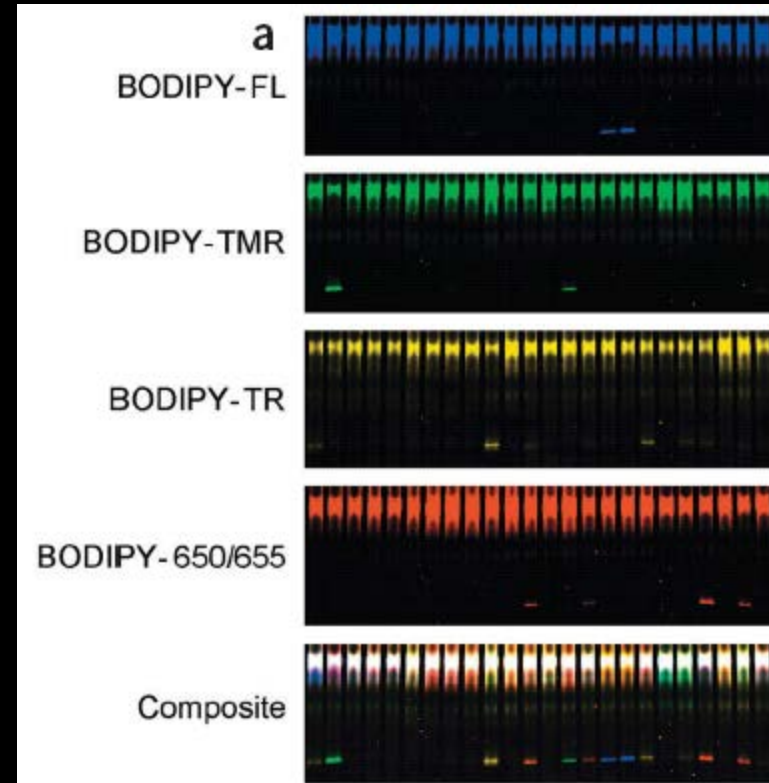




# Multi color Fluoro-PTT




Ξεκίνηση από RNA?



*Traverso G. et al, Nature Biotechnology (2003), 9, 1093*

<b>Νόσημα</b>	<b>% truncating Μεταλλάξεων</b>	<b>Γονίδιο</b>
Duchenne Μυϊκή Δυστροφία (DMD)	>95%	DMD
Συγγενής πολυποδίαση (FAP)	>95%	APC
Νόσος πολυκυστικών νεφρών	95%	PKD1
Αταξία-τηλεαγγειεκτασία	90%	ATM
Κληρονομούμενος καρκίνος μαστού- ωοθηκών	86%	BRCA1
Κληρονομούμενος καρκίνος μαστού	86%	BRCA2
Emery-Dreifuss Μυϊκή Δυστροφία	80%	EMD
Αναιμία Fanconi	80%	FANCA
Κληρονομούμενος μη-πολυποδιακός καρκίνος παχέος εντέρου, τύπος 1	80%	hMSH2
Κληρονομούμενος μη-πολυποδιακός καρκίνος παχέος εντέρου, τύπος 2	70%	hMLH1
Νευροινωμάτωση τύπος 1	50%	NF1
Νευροινωμάτωση τύπος 2	65%	NF2
Σύνδρομο Hunter	50%	IDS

# Πλεονεκτήματα μεθόδου RFLP

- ✓ Παθολογική αξία των μεταλλάξεων που ανιχνεύει
  - ✓ Screening μεταλλάξεων σε μεγάλο τμήμα γονιδίου
  - ✓ Εύκολος εντοπισμός της μετάλλαξης στο DNA Sequencing
  - ✓ Ευαισθησία μεθόδου
- 

# Μειονεκτήματα Μεθόδου ΡΤΤ

## Ψευδώς αρνητικές αντιδράσεις

- Μετάλλαξη στην αρχή ή το τέλος του τμήματος που μεταφράζεται
- Μετάλλαξη στο 5' ή 3' άκρο του γονιδίου
- Μετάλλαξη στο ATG κωδικόνιο
- Μετάλλαξη στις περιοχές των εκκινητών
- Nonsense mediated decay

## Ψευδώς θετικές αντιδράσεις

σπάνιες

# Εξελίξεις στη μέθοδο PTT

- **Multiplex PTT**
- **PTT με IEF ή ELISA**
- **Yeast PTT**
- **Λειτουργική δοκιμασία (Ενζυμική δραστηριότητα, δέσμευση σε άλλη πρωτεΐνη ή DNA binding domain)**
- **myc-tag στον 5'-εκκινητή (ή και HA-tag στον 3' εκκινητή!)**

**ATG GAA CAA AAA TTA ATA TCG GAA GAG GAT TTG AAT-gene**

**M E Q K L I S E E D L N**



**Myc-tag**