

## ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ-ΠΑΡΑΔΟΤΕΟ (4.1)

---

**Αναφορά λειτουργικής ανάλυσης παραλλαγών άγνωστης κλινικής σημασίας οικογενούς καρκίνου μαστού - παρουσίαση σε συνέδριο.**

# GoMedPrecision

#### 4.1 «Αναφορά λειτουργικής ανάλυσης VUS οικογενούς καρκίνου μαστού - παρουσίαση σε συνέδριο»

Ενότητας Εργασίας ΕΕ4: Λειτουργική ανάλυση παραλλαγών αγνώστου κλινικής σημασίας

Στα πλαίσια της ενότητας εργασίας ΕΕ4, μελετώνται παραλλαγές άγνωστης κλινικής σημασίας (VUS) με λειτουργική ανάλυση της παθογονικότητας σε κατάλληλα κυτταρικά συστήματα. Η ανάλυση αυτή συμβάλει στον χαρακτηρισμό των παραλλαγών που ανευρίσκονται στον ελληνικό πληθυσμό καθώς και στην πιστοποίηση της ορθότητας των προβλεπτικών μοντέλων που αναπτύσσονται από το έργο. Το παρόν παραδοτέο αφορά παραλλαγές που αφορούν γονίδια που εμπλέκονται στον οικογενή καρκίνο μαστού/ωθηκών. Μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας σε γονίδια που εμπλέκονται στην επιδιόρθωση διπλών θραύσεων στο DNA μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού συσχετίζονται με την εμφάνιση κληρονομικού καρκίνου μαστού/ωθηκών (ΕΕ3). Κύρια γονίδια που εμπλέκονται στον ομόλογο ανασυνδυασμό και συσχετίζονται με κληρονομικό καρκίνο μαστού-ωθηκών είναι τα BRCA1 και BRCA2.

Τα αποτελέσματα του παρόντος παραδοτέου παρουσιάστηκαν στα πλαίσια προφορικής παρουσίασης στο παρακάτω συνέδριο:

14<sup>ο</sup> Συνέδριο Πανελλήνιας Ένωσης Βιολόγων (ΠΕΒ), 20-22 Δεκεμβρίου 2024, Ευγενίδειο Ίδρυμα, Αθήνα

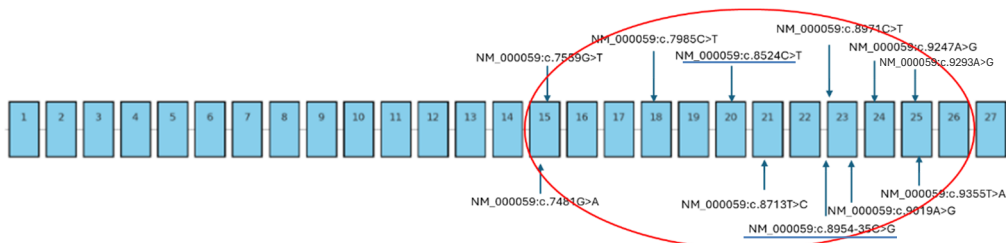
Τίτλος παρουσίασης: Γονιδιωματική Αστάθεια στον Καρκίνο: από τη μοριακή κατανόηση στην Ιατρική Ακρίβειας

Ομιλητής: Ζωή Λυγερού

#### Μελέτες λειτουργικής ανάλυσης του γονιδίου BRCA2

Μια πρόσφατη έρευνα<sup>2</sup> παρουσιάζει μια εκτεταμένη ανάλυση των μονονουκλεοτιδικών παραλλαγών (SNVs) στα εξώνια 15–26 του γονιδίου BRCA2, που κωδικοποιούν την επικράτεια πρόσδεσης στο DNA της πρωτεΐνης Brca2, όπου εντοπίζονται οι περισσότερες γνωστές παθογόνες μεταλλάξεις. Χρησιμοποιήθηκε μέθοδος επεξεργασίας γονιδιώματος με CRISPR–Cas9 σε απλοειδή ανθρώπινα κύτταρα HAP1, με στόχο τη μαζική εισαγωγή και αξιολόγηση ενός μεγάλου αριθμού πιθανών παραλλαγών σε αυτό το τμήμα του γονιδίου. Για το σκοπό αυτό δημιουργήθηκε βιβλιοθήκη παραλλαγών, η οποία εισήχθη στα κύτταρα με το σύστημα CRISPR–Cas9. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν και συλλέχθηκαν την 5<sup>η</sup> και την 14<sup>η</sup> μέρα. Η επιβίωση των κυττάρων που έφεραν κάθε παραλλαγή αξιολογήθηκε με βαθιά αλληλούχηση του ενδογενούς BRCA2 γονιδίου στα επιζώντα κύτταρα, συγκρίνοντας τη σχετική συχνότητα κάθε παραλλαγής μεταξύ των δύο χρονικών σημείων (5<sup>η</sup> και 15<sup>η</sup> ημέρα). Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν και οι μελετώμενες παραλλαγές κατηγοριοποιήθηκαν ως παθογόνες, μη παθογόνες ή αβέβαιης κλινικής σημασίας.

Χρησιμοποιήσαμε τη βάση δεδομένων CanVas<sup>3</sup> (EE1 και 3) για την εύρεση παραλλαγών άγνωστης κλινικής σημασίας στον γονίδιο BRCA2 που έχουν εντοπιστεί στον ελληνικό πληθυσμό (πίνακας 1). Ενευρέθηκαν συνολικά 108 παραλλαγές άγνωστης κλινικής σημασίας στη βάση δεδομένων CanVas που έχουν εντοπιστεί στον ελληνικό πληθυσμό. Οι παραλλαγές αυτές ελέγχθηκαν ως προς τον προσδιορισμό της παθογονικότητά τους σε λειτουργικά πειράματα<sup>2</sup>. Περίπου 1 στις 10 παραλλαγές (11 από τις 108 παραλλαγές) βρέθηκε ότι έχουν αναλυθεί λειτουργικά<sup>2</sup> (Πίνακας 1α). Διαπιστώθηκε ότι για όλες τις παραλλαγές που ενευρίσκονται στον ελληνικό πληθυσμό και εντοπίζονται μεταξύ του 15<sup>ου</sup> και 26<sup>ου</sup> εξωνίου (την περιοχή που έχει μελετηθεί στην δημοσιευμένη έρευνα<sup>2</sup>) έχει επιτευχθεί πρόβλεψη παθογονικότητας βάση λειτουργικής ανάλυσης (πίνακας 1α, δεύτερη στήλη). Από τις 11 αυτές παραλλαγές, οι 2 δείχθηκε λειτουργικά ότι είναι παθογόνες, ενώ οι 9 αβλαβείς. Η εικόνα 1 δείχνει διαγραμματικά πού εντοπίζονται οι παραλλαγές άγνωστης κλινικής σημασίας που έχουν εντοπιστεί στον ελληνικό πληθυσμό για τις οποίες λειτουργική ανάλυση οδήγησε στην κατηγοριοποίησή τους ως παθογόνες (υπογραμμισμένες) ή αβλαβείς.



**Εικόνα 1.** Σχηματική απεικόνιση των εξωνίων του γονιδίου BRCA2, καθώς της θέσης των παραλλαγών άγνωστης κλινικής σημασίας που απαντώνται στον ελληνικό πληθυσμό και έχουν μελετηθεί με λειτουργικά πειράματα. Οι παραλλαγές που κατηγοριοποιούνται ως παθογόνες είναι υπογραμμισμένες.

Διαπιστώνεται ότι οι πλειονότητα των παραλλαγών άγνωστης κλινικής σημασίας που ελέγχθηκαν λειτουργικά επανακατηγοριοποιήθηκαν ως αβλαβείς (9 στις 11). Το εύρημα αυτό είναι σύμφωνο με προηγούμενες μελέτες που έχουν δείξει ότι η πλειονότητα των παραλλαγών άγνωστης κλινικής σημασίας επανακατηγοριοποιούνται τελικά ως αβλαβείς.

Χρησιμοποιήσαμε το πρόγραμμα Alphasense (βλέπε EE2) για την πρόβλεψη της παθογονικότητας των παρανοηματικών παραλλαγών άγνωστης κλινικής σημασίας που ενευρίσκονται στον ελληνικό πληθυσμό και έχουν ελεγχθεί λειτουργικά (Πίνακας 1, 3<sup>η</sup> στήλη). Με βάση το πρόγραμμα Alphasense, οι περισσότερες παραλλαγές άγνωστης κλινικής σημασίας προβλέπεται ότι είναι αβλαβείς (8 από τις 11), και η πρόβλεψη συμφωνεί με την λειτουργική ανάλυση. Δύο παραλλαγές προβλέπεται ότι έχουν ασαφή παθογονικότητα, εκ των οποίων η μία είναι παθογόνος βάση της λειτουργικής ανάλυσης και η άλλη αβλαβής. Τέλος, η δεύτερη παραλλαγή που κατηγοριοποιείται ως παθογόνος βάση της λειτουργικής ανάλυσης δεν αποτελεί παρανοηματική αλλαγή και δεν μπορεί να αναλυθεί με το πρόγραμμα Alphasense.

Διαπιστώνεται τέλος ότι το μεγαλύτερο μέρος των απαντώντων BRCA2 VUS του ελληνικού πληθυσμού εντοπίζεται εκτός της εξεταζόμενης περιοχής της δημοσιευμένης έρευνας και παραμένουν μη μελετημένες (Πίνακας 1β και Εικόνα 2).

Το γεγονός αυτό υπογραμμίζει την ανάγκη ανάπτυξης νέων προσεγγίσεων λειτουργικής ανάλυσης παραλλαγών άγνωστης κλινικής σημασίας ή/και προβλεπτικών μοντέλων για το γονίδιο Brca2.

### BRCA2 VUS στον ελληνικό πληθυσμό



**Εικόνα 2.** Διαγραμματική απεικόνιση του ποσοστού των παραλλαγών άγνωστης κλινικής σημασίας στο γονίδιο BRCA2 που έχουν ανευρεθεί στον ελληνικό πληθυσμό και έχουν μελετηθεί λειτουργικά

**Πίνακας 1α.** Καταγραφή των παραλλαγών άγνωστης κλινικής σημασίας στο γονίδιο BRCA2 που έχουν βρεθεί στον ελληνικό πληθυσμό και έχουν μελετηθεί λειτουργικά (στήλη 2) και πρόβλεψη παθογονικότητας αυτών με το πρόγραμμα Alphasense (στήλη 3).

BRCA2 VUS in CanVas	Prediction of pathogenicity according to functional study	Alphasense prediction
NM_000059:c.8524C>T	Pathogenic strong	0.509-ambiguous
NM_000059:c.9355T>A	Benign strong	0.108-likely benign
NM_000059:c.8954-35C>G	Pathogenic strong	
NM_000059:c.7985C>T	Benign strong	0.047- likely benign
NM_000059:c.9293A>G	Benign strong	0.091-likely benign
NM_000059:c.8971C>T	Benign strong	0.203-likely benign
NM_000059:c.7481G>A	Benign strong	0.211-likely benign
NM_000059:c.7559G>T	Benign strong	0.477-ambiguous
NM_000059:c.9247A>G	Benign strong	0.133-likely benign
NM_000059:c.9019A>G	Benign moderate	0.352-likely benign
NM_000059:c.8713T>C	Benign strong	0.244-likely benign

Παραδοτέο 4.1: “Αναφορά λειτουργικής ανάλυσης VUS οικογενούς καρκίνου μαστού - παρουσίαση σε συνέδριο”.

**Πίνακας 1β.** Καταγραφή των παραλλαγών άγνωστης κλινικής σημασίας στο γονίδιο BRCA2 που έχουν βρεθεί στον ελληνικό πληθυσμό και δεν έχουν συμπεριληφθεί σε λειτουργική μελέτη

NM_000059:c.68-42T>C
NM_000059:c.4443_4444insGAAACA
NM_000059:c.1219C>G
NM_000059:c.9614C>T
NM_000059:c.9613_9614delinsCT
NM_000059:c.1964C>G
NM_000059:c.3404A>G
NM_000059:c.7977-34T>C
NM_000059:c.5851_5854delAGTT
NM_000059:c.5851_5854delAGTT
NM_000059:c.1342C>T
NM_000059:c.3413A>T
NM_000059:c.7806-42C>A
NM_000059:c.28A>G
NM_000059:c.7402G>A
NM_000059:c.710A>G
NM_000059:c.632-4_632-3del
NM_000059:c.5200G>A
NM_000059:c.426-7A>G
NM_000059:c.794-43G>A
NM_000059:c.4574A>G
NM_000059:c.8954-3C>G
NM_000059:c.7402G>A
NM_000059:c.1127T>G
NM_000059:c.4268C>A
NM_000059:c.425+37A>G
NM_000059:c.8754+50A>G
NM_000059:c.2533C>T
NM_000059:c.9613_9614delGCinsCT
NM_000059:c.1012G>A
NM_000059:c.6937+51A>G
NM_000059:c.7054C>A
NM_000059:c.3413A>T
NM_000059:c.569C>T
NM_000059:c.2144G>C
NM_000059:c.3413A>T
NM_000059:c.1127T>G
NM_000059:c.9118-28T>C

GOMEDPRECISION\_ΠΑΡΑΔΟΤΕΟ 4.1\_ 1 10 24



Παραδοτέο 4.1: “Αναφορά λειτουργικής ανάλυσης VUS οικογενούς καρκίνου μαστού - παρουσίαση σε συνέδριο”.

NM_000059:c.9785A>C
NM_000059:c.2496G>T
NM_000059:c.4574A>G
NM_000059:c.13T>C
NM_000059:c.8331+38G>A
NM_000059:c.6008T>C
NM_000059:c.3122G>C
NM_000059:c.316+32A>G
NM_000059:c.244A>C
NM_000059:c.6613G>A
NM_000059:c.6319C>G
NM_000059:c.8331+38G>A
NM_000059:c.7559G>T
NM_000059:c.244A>C
NM_000059:c.9863C>T
NM_000059:c.2701C>G
NM_000059:c.9293A>G
NM_000059:c.794-45A>G
NM_000059:c.5432A>C
NM_000059:c.5432A>C
NM_000059:c.8331+38G>A
NM_000059:c.2753A>G
NM_000059:c.4443_4444insGAAACA
NM_000059:c.517-30T>C
NM_000059:c.9614C>T
NM_000059:c.1022G>A
NM_000059:c.7976+35C>A
NM_000059:c.1022G>A
NM_000059:c.632-4_632-3del
NM_000059:c.5663A>G
NM_000059:c.7007+24A>G
NM_000059:c.6942A>G
NM_000059:c.9614C>T
NM_000059:c.992A>T
NM_000059:c.6929C>T
NM_000059:c.67+51C>A
NM_000059:c.316+33C>G
NM_000059:c.2144G>C
NM_000059:c.7436-45T>C
NM_000059:c.2045T>A

GOMEDPRECISION\_ΠΑΡΑΔΟΤΕΟ 4.1\_ 1 10 24



NM_000059:c.77C>T
NM_000059:c.68-42T>C
NM_000059:c.9863C>T
NM_000059:c.6938-19T>C
NM_000059:c.68-16T>C
NM_000059:c.7976+35C>A
NM_000059:c.3136G>A
NM_000059:c.1012G>A
NM_000059:c.7806-48A>G
NM_000059:c.631+47A>G
NM_000059:c.9649-37A>C
NM_000059:c.3404A>G
NM_000059:c.7481G>A
NM_000059:c.9863C>T
NM_000059:c.9293A>G
NM_000059:c.4584C>G
NM_000059:c.5349_5351del
NM_000059:c.5487G>T
NM_000059:c.1444C>T

### Μελέτες λειτουργικής ανάλυσης του γονιδίου BRCA1

Σε έρευνα<sup>4</sup> που δημοσιεύθηκε το 2018 πραγματοποιήθηκαν λειτουργικά πειράματα στα απλοειδή κύτταρα HAP1 μέσω γενετικής τροποποίησης αυτών με CRISPR/Cas9 με σκοπό την πρόβλεψη παθογονικότητας 3.893 παραλλαγών άγνωστης κλινικής σημασίας του γονιδίου BRCA1, οι οποίες εντοπίζονται στα πιο κρίσιμα για τη λειτουργία του γονιδίου εξόνια, και συγκεκριμένα στο εξόνιο 15 έως και 2<sup>ο</sup>.

Χρησιμοποιήσαμε τη βάση δεδομένων Canvas για την εύρεση των απαντώμενων στον ελληνικό πληθυσμό παραλλαγών άγνωστης κλινικής σημασίας στο γονίδιο Brca1 (Πίνακας 2). Ανευρέθησαν 67 παραλλαγές άγνωστης κλινικής σημασίας

Διαπιστώθηκε ότι μόνο μια παραλλαγή που παραμένει άγνωστης κλινικής σημασίας περιλαμβάνεται στις παραλλαγές που μελετήθηκαν λειτουργικά (εικόνα 4) . Η παραλλαγή αυτή κατηγοριοποιείται ως αβλαβής βάση λειτουργικής ανάλυσης. Το πρόγραμμα πρόβλεψης παθογονικότητας alphasense αντίθετα την κατηγοριοποιεί ως πιθανά παθογόνο. Περεταίρω ανάλυση είναι απαραίτητη για την κατηγοριοποίηση των παραλλαγών που παραμένουν άγνωστης κλινικής σημασίας και ανευρίσκονται στον ελληνικό πληθυσμό.

Παραδοτέο 4.1: “Αναφορά λειτουργικής ανάλυσης VUS οικογενούς καρκίνου μαστού - παρουσίαση σε συνέδριο”.

BRCA1 VUS in CanVas	Prediction of pathogenicity according to functional study	Alphamissense prediction
NM_007294:c.4993G>A	Benign	0.958-likely pathogenic
NM_007294:c.5467+21_5467+22insT	-	
NM_007294:c.430A>T	-	
NM_007294:c.*45del	-	
NM_007294:c.5050_5051del	-	
NM_007294:c.1881C>G	-	
NM_007294:c.1881C>G	-	
NM_007294:c.4096+38_4096+41del	-	
NM_007294:c.4060_4062del	-	
NM_007294:c.3116C>T	-	
NM_007294:c.1881C>G	-	
NM_007294:c.135-50C>G	-	
NM_007294:c.5277+48_5277+49insGTATTCCACTCC	-	
NM_007294:c.4096+28C>T	-	
NM_007294:c.3868A>G	-	
NM_007294:c.-19-23T>C	-	
NM_007294:c.-19-27T>G	-	
NM_007294:c.2923C>A	-	
NM_007294:c.4987-27A>C	-	
NM_007294:c.5332+51T>C	-	
NM_007294:c.5129G>A	-	
NM_007294:c.5129G>A	-	
NM_007294:c.1881C>G	-	
NM_007294:c.2215A>G	-	
NM_007294:c.135-40A>T	-	
NM_007294:c.3424G>C	-	
NM_007294:c.-19-23T>C	-	
NM_007294:c.-19-27T>G	-	
NM_007294:c.1881C>G	-	
NM_007294:c.441+28T>C	-	
NM_007294:c.1881C>G	-	
NM_007294:c.4391C>T	-	
NM_007294:c.3868A>G	-	
NM_007294:c.4987-38G>C	-	
NM_007294:c.4481A>G	-	
NM_007294:c.4358-28T>C	-	
NM_007294:c.5406+5 G>C	-	

Παραδοτέο 4.1: “Αναφορά λειτουργικής ανάλυσης VUS οικογενούς καρκίνου μαστού - παρουσίαση σε συνέδριο”.

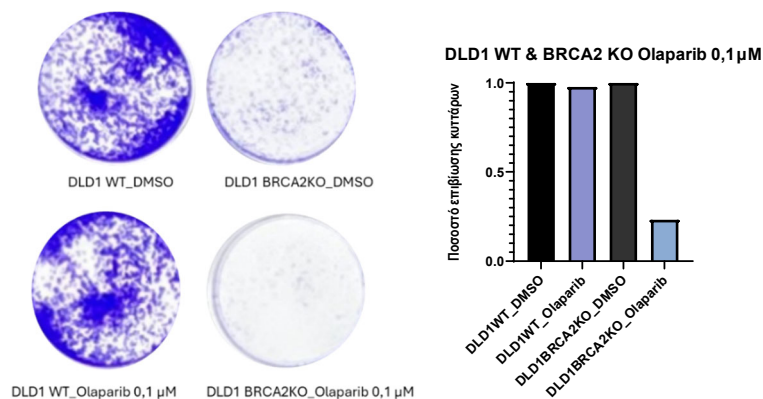
NM_007294:c.5406+5 G>C	-
NM_007294:c.5406+5 G>C	-
NM_007294:c.3868A>G	-
NM_007294:c.302-51C>G	-
NM_007294:c.1291T>A	-
NM_007294:c.548-37C>A	-
NM_007294:c.442-8C>G	-
NM_007294:c.548-34T>C	-
NM_007294:c.594-34T>C	-
NM_007294:c.-19-23T>C	-
NM_007294:c.-19-27T>G	-
NM_007294:c.135-23C>A	-
NM_007294:c.1839G>T	-
NM_007294:c.5194-30T>C	-
NM_007294:c.135-40A>T	-
NM_007294:c.5278-36A>G	-
NM_007294:c.4676-25A>G	-
NM_007294:c.3367G>T	-
NM_007294:c.2632G>A	-
NM_007294:c.671-49T>G	-
NM_007294:c.3192T>C	-
NM_007294:c.1881C>G	-
NM_007294:c.1881C>G	-
NM_007294:c.1881C>G	-
NM_007294:c.2561C>T	-
NM_007294:c.4993G>A	-
NM_007294:c.2666C>T	-
NM_007294:c.5191G>A	-
NM_007294:c.594-34T>C	-
NM_007294:c.4096+28C>T	-

**Πίνακας 2.** Καταγραφή των παραλλαγών άγνωστης κλινικής σημασίας στο γονίδιο BRCA1 που έχουν βρεθεί στον ελληνικό πληθυσμό.

## Κυτταρικά συστήματα λειτουργικής ανάλυσης των γονιδίων BRCA1 και BRCA2

Από τα παραπάνω αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι υπάρχει ανάγκη για περαιτέρω μελέτη παραλλαγών άγνωστης κλινικής σημασίας στα γονίδια BRCA1 και BRCA2 που απαντώνται στον ελληνικό πληθυσμό. Για τον σκοπό αυτό αναζητήσαμε κατάλληλα κυτταρικά συστήματα, για την μελέτη παραλλαγών των γονιδίων BRCA1 και BRCA2.

Για τη μελέτη του γονιδίου BRCA2 επιλέχθηκαν οι κυτταρικές σειρές DLD1 BRCA2 (-/-) και H1299 shBRCA2<sup>1</sup>, οι οποίες καλλιεργήθηκαν με σκοπό αρχικά να ελεγχθεί η καταλληλότητά τους ως μοντέλα για την συγκεκριμένη μελέτη, μέσω της ευαισθησίας τους σε αναστολείς του ενζύμου PARP. Τα αποτελέσματα κλωνογονικής διαδικασίας τόσο σε DLD1 BRCA2(-/-) όσο και σε DLD1 WT κατόπιν συνεχούς επώασης με τον αναστολέα Parp Olaparib έδειξαν ευαισθησία, όπως φαίνεται και από το διάγραμμα επιβίωσης των κυττάρων (Εικόνα 1).



**Εικόνα 1.** Κλωνογονική δοκιμασία σε DLD1 BRCA2 KO (Knock Out) και DLD1 WT (Wild Type) κύτταρα, κατόπιν συνεχούς επώασης σε Parp αναστολέα

Παράλληλα δοκιμάστηκαν μέθοδοι προσδιορισμού της λειτουργικότητας του μονοπατιού του ομόλογου ανασυνδυασμού με τη χρήση μοριακών δεικτών και ανοσοφθορισμό. Συγκεκριμένα αναλύθηκαν οι εξής δείκτες: γH2AX, RPA, 53BP1, Rad51. Βάση της ανάλυσης αυτής, η δοκιμασία επιβίωσης παρουσία αναστολέων PARP κρίθηκε η βέλτιστη μέθοδος λειτουργικού προσδιορισμού για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης.

Επόμενος στόχος είναι η εισαγωγή παραλλαγών άγνωστης κλινικής σημασίας στο γονίδιο BRCA2 στα κύτταρα και η μελέτη της επίδρασης αυτών στη λειτουργικότητα του γονιδίου, με τη χρήση της δοκιμασίας ευαισθησίας στους αναστολείς PARP, μια γρήγορη και ευαίσθητη μέθοδο λειτουργικής εκτίμησης, που έχει επιπλέον κλινική σημασία για την επιλογή θεραπείας.

### Βιβλιογραφία

1. Zimmer J, Tacconi EMC, Folio C, Badie S, Porru M, Klare K, Tumiatu M, Markkanen E, Halder S, Ryan A, Jackson SP, Ramadan K, Kuznetsov SG, Biroccio A, Sale JE, Tarsounas M. Targeting BRCA1 and BRCA2 Deficiencies with G-Quadruplex-Interacting Compounds. *Mol Cell*. 2016 Feb 4;61(3):449-460. doi: 10.1016/j.molcel.2015.12.004. Epub 2015 Dec 31. PMID: 26748828; PMCID: PMC4747901.
2. Huang, H., Hu, C., Na, J. *et al*. Functional evaluation and clinical classification of BRCA2 variants. *Nature* **638**, 528–537 (2025). <https://doi.org/10.1038/s41586-024-08388-8>
3. <http://ithaka.rpp.demokritos.gr/CanVaS/genes>

Παραδοτέο 4.1: “Αναφορά λειτουργικής ανάλυσης VUS οικογενούς καρκίνου μαστού - παρουσίαση σε συνέδριο”.

4. Findlay, G.M., Daza, R.M., Martin, B. *et al.* Accurate classification of *BRCA1* variants with saturation genome editing. *Nature* **562**, 217–222 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0461-z>

---

GOMEDPRECISION\_ΠΑΡΑΔΟΤΕΟ 4.1\_ 1 10 24

