

Γεφυρώνοντας μεγάλα ομικά, γενετικά και ιατρικά δεδομένα για την ευρεία εφαρμογή της Ιατρικής Ακριβείας στην Ελλάδα

ΠΑΡΑΔΟΤΕΟ Π4.2

«Αναφορά λειτουργικής ανάλυσης VUS σπανίων νοσημάτων - παρουσίαση σε συνέδριο»

| | |
|--------------------------|--|
| Φορέας | Πανεπιστήμιο Πατρών |
| Τύπος Παραδοτέου | Παρουσίαση σε συνέδριο |
| Τίτλος Παραδοτέου | <i>Αναφορά λειτουργικής ανάλυσης VUS σπανίων νοσημάτων -παρουσίαση σε συνέδριο</i> |
| Ενότητα Εργασίας | EE4: Λειτουργική ανάλυση παραλλαγών αγνώστου κλινικής σημασίας (VUS) |

Π4.2: Αναφορά λειτουργικής ανάλυσης VUS σπανίων νοσημάτων - παρουσίαση σε συνέδριο

Ενότητα Εργασίας ΕΕ4: Λειτουργική ανάλυση παραλλαγών αγνώστου κλινικής σημασίας

1. Σύντομη Περιγραφή:

Το παρόν παραδοτέο περιγράφει τις δράσεις και τα ευρήματα λειτουργικής ανάλυσης παραλλαγών αγνώστου κλινικής σημασίας (variants of uncertain significance, VUS) με στόχο την ανάπτυξη μεθοδολογιών που θα επιτρέπουν την κλινική επισημείωση και κατηγοριοποίηση των παραλλαγών αναφορικά με την παθογονικότητά τους σε σχέση με την εκδήλωση σπανίων νοσημάτων. Στα πλαίσια του έργου πραγματοποιήθηκαν πειράματα για τη λειτουργική μελέτη παραλλαγών συσχετιζόμενων με τρεις σπάνιες νοσολογικές οντότητες: σπάνιους κληρονομικούς καρκίνους που οφείλονται σε ανεπάρκεια ομόλογου ανασυνδυασμού και τα σχετιζόμενα με αυτό γενετικά νοσήματα όπως η Αναιμία Fanconi, το γενετικό σύνδρομο μικροκεφαλικού πρωτογενούς νανισμού Meier-Gorlin, καθώς και σύνδρομο πρωτοπαθούς δυσκινησίας των κροσσών (Primary Cilia Dyskinesia, PCD), και ιδιαίτερα συνδρόμων που οδηγούν σε νευρολογικά συμπτώματα και υδροκεφαλία, όπως το RGMC (Reduced Generation of Multiple Motile Cilia). Αναπτύχθηκαν ερευνητικά πρωτόκολλα τόσο σε κυτταρικά συστήματα όσο και σε βλαστοκύτταρα και κατάλληλα πειραματόζωα με στόχο τη λειτουργική ανάλυση της παθογονικότητας παραλλαγών αγνώστου σημασίας (VUS) που ανευρίσκονται σε ασθενείς και εδράζονται σε γονίδια σχετιζόμενα με τα σπάνια αυτά νοσήματα.

Οι εργασίες του συγκεκριμένου παραδοτέου παρουσιάστηκαν σε επιστημονικό συνέδριο το Δεκέμβριο του 2025 ως αναρτημένη παρουσίαση (πόστερ) και συμπεριελήφθησαν σε δύο διεθνείς δημοσιεύσεις σε περιοδικά υψηλής εμβέλειας (EMBO Reports και Nature Communications), όπως αναφέρονται κατωτέρω. Η παρουσίαση σε συνέδριο αποτελεί παραδοτέο του έργου και επισυνάπτεται στο τέλος της αναφοράς.

Παρουσίαση σε συνέδριο

Valentini Tzimogianni, Ioanna Papadionysiou, Eirini Veltsou, Stavros Taraviras, Zoi Lygerou (2025) Study of variants of uncertain clinical significance in homologous recombination genes. Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology Conference 2025, Athens, Greece.

Διεθνείς δημοσιεύσεις

Arbi M, Skamnelou M, Koufoudaki M, Bakali M, Bournaka S, Zitouni S, Tsaridou S, Karayel O, Vasilopoulou C, Tsika A, Giakoumakis N, Preza O, Spyroulias G, Mann M, Bettencourt-Dias M, Taraviras S, Lygerou Z, Arbi, M., Skamnelou, M., Koufoudaki, L. *et al.* McIDAS localizes to centrioles and controls centriole numbers through PLK4-dependent phosphorylation. **EMBO Rep** (2026). <https://doi.org/10.1038/s44319-026-00697-5>

Badra-Fajardo N, Karydi E, Bayona-Feliu A, Gómez-González B, Preza O, Arbi M, Kalogeropoulou A, Rantala J, Taraviras S, Aguilera A and Lygerou Z. FANCD2 restrains fork progression and prevents fragility at early origins upon re-replication, **Nature Communications**, 2026, in press, DOI:10.1038/s41467-026-68966-4



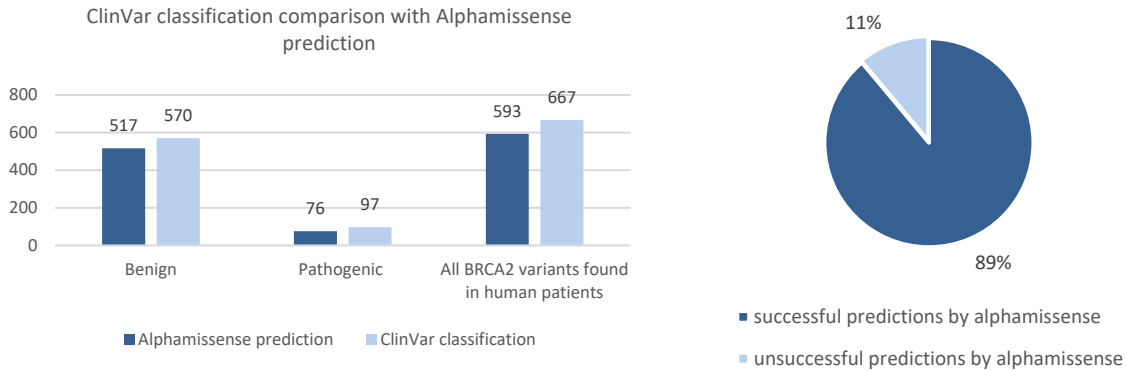
2. Λειτουργική ανάλυση παραλλαγών αγνώστου κλινικής σημασίας που εδράζονται σε γονίδια ομόλογου ανασυνδυασμού και συνδέονται με σπάνιες μορφές κληρονομικού καρκίνου και αναιμία

Στα πλαίσια της παρούσας ενότητας εργασίας, μελετήθηκαν παραλλαγές που εντοπίζονται σε γονίδια που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού. Τα γονίδια αυτά εμπλέκονται στον κληρονομικό καρκίνο μαστού, ωοθηκών, παγκρεάτος και προστάτη καθώς και σε σπάνιες κληρονομικές μορφές αναιμίας και/ή αταξίας, όπως το σύνδρομο Αναιμία Fanconi (Fanconi Anemia, FA) και Αταξία Τηλαγγειεκτασία (Ataxia Telangiectasia, AT). Μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας στα γονίδια των προαναφερθέντων νοσημάτων οδηγούν σε αδυναμία επιδιόρθωσης διπλών θραύσεων στο DNA με ομόλογο ανασυνδυασμό, επιδιόρθωσης διακλωνικών συνδέσεων των ελίκων του DNA καθώς και της απόκρισης του κυττάρου στο αντιγραφικό στρες και στην ύπαρξη βλαβών στο DNA. Άτομα με παθογόνες παραλλαγές και στα δύο αλληλόμορφα των εμπλεκόμενων γονιδίων πάσχουν από τα ανωτέρω σπάνια γενετικά νοσήματα. Παράλληλα όγκοι με ανεπάρκεια στα γονίδια του ομόλογου ανασυνδυασμού λόγω μεταλλάξεων γαμετικής ή σωματικής σειράς στα ανωτέρω γονίδια έχει βρεθεί ότι μπορούν να ωφεληθούν από την χορήγηση αναστολέων του ενζύμου PARP¹. Η σπανιότητα των νοσημάτων δεν επιτρέπει την κατηγοριοποίηση της πλειονότητας των παραλλαγών που ανευρίσκονται σε ασθενείς με βάση τους τρέχοντες αλγορίθμους κατάταξης, με αποτέλεσμα να κατηγοριοποιούνται ως άγνωστης κλινικής σημασίας. Η μεγαλύτερη ομάδα των παραλλαγών άγνωστης κλινικής σημασίας αφορά παραλλαγές που οδηγούν σε αντικατάσταση ενός αμινοξέος από ένα άλλο στην παραγόμενη πρωτεΐνη (παρανοηματικές παραλλαγές, missense). Λειτουργικές μελέτες σε κυτταρικά συστήματα, σε συνδυασμό με νέους αλγορίθμους ανάλυσης, μπορούν να βοηθήσουν στην πρόβλεψη παθογονικότητας και να καθοδηγήσουν την κλινική διαχείριση προς όφελος των ασθενών.

Το πιο μελετημένο γονίδιο που σχετίζεται τόσο με κληρονομικές μορφές καρκίνου (σε ετεροζυγωτία) όσο και με αναιμία Fanconi (σε ομοζυγωτία, Fanconi anemia complementation group D1) είναι το γονίδιο BRCA2. Αρχικά χρησιμοποιήσαμε αυτό το γονίδιο για τον έλεγχο των αναπτυσσόμενων ροών ανάλυσης. Σε αυτά τα πλαίσια, όλες οι έως σήμερα γνωστές παθογόνες και μη παθογόνες παραλλαγές που έχουν καταγραφεί στις κωδικοποιές περιοχές του γονιδίου Brca2 και οδηγούν σε αλλαγή αμινοξέος αντλήθηκαν από διεθνείς βάσεις δεδομένων, και πραγματοποιήθηκε πρόβλεψη παθογονικότητας με τη χρήση του εργαλείου τεχνητής νοημοσύνης Alphamissense. Όπως φαίνεται στο *σχήμα 1*, το Alphamissense πρόβλεψε σωστά περίπου το 89% του συνόλου των έως τώρα γνωστών παραλλαγών του BRCA2.

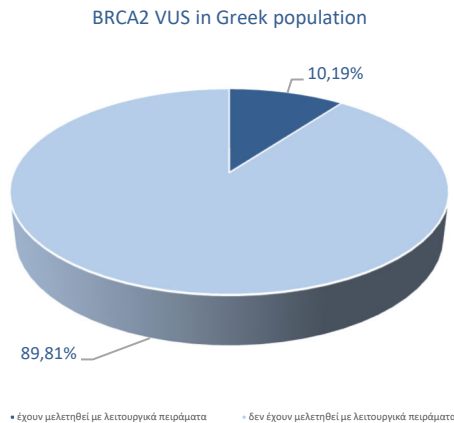
Παραδοτέο 4.2

“Αναφορά λειτουργικής ανάλυσης VUS σπανίων νοσημάτων -παρουσίαση σε συνέδριο”.



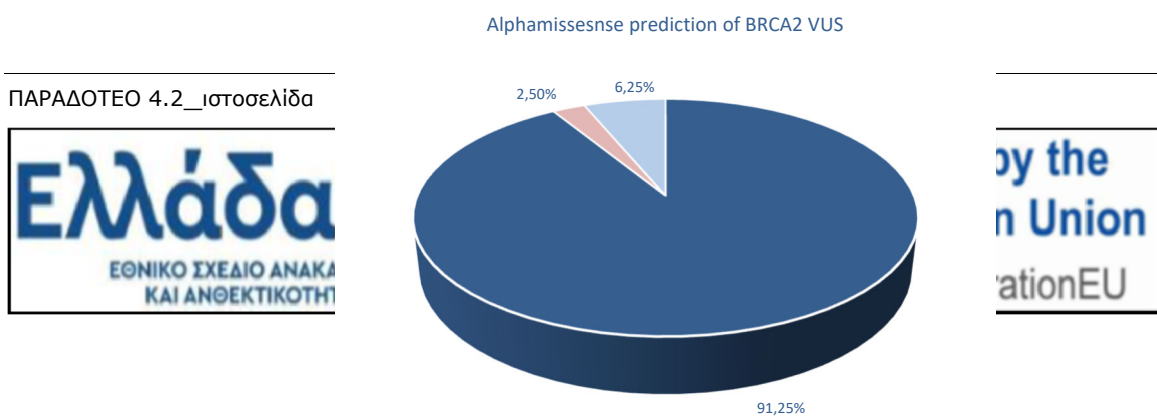
Σχήμα 1. Σύγκριση πρόβλεψης παθογονικότητας από το Alphasense με την επίσημη κατηγοριοποίηση παραλλαγών βάσει ClinVar.

Στη συνέχεια, αντλήθηκαν οι παραλλαγές αγνώστου κλινικής σημασίας του συγκεκριμένου γονιδίου που έχουν βρεθεί στον ελληνικό πληθυσμό από τη βάση δεδομένων CanVas². Ανατρέχοντας σε λειτουργικά πειράματα σάρωσης³ (βλέπε επίσης παραδοτέο 4.1) διαπιστώσαμε ότι ένα περίπου 10% έχει επανακατηγοριοποιηθεί μέσω λειτουργικών πειραμάτων (σχήμα 2).



Σχήμα 2. VUS παραλλαγές του BRCA2 στον ελληνικό πληθυσμό.

Για τις παραλλαγές που παραμένουν μη μελετημένες βρέθηκε η πρόβλεψη παθογονικότητας μέσω Alphasense. Υπολογίστηκε ότι οι περισσότερες εξ αυτών (>90%) προβλέπεται ότι είναι μη παθογόνες (σχήμα 3).

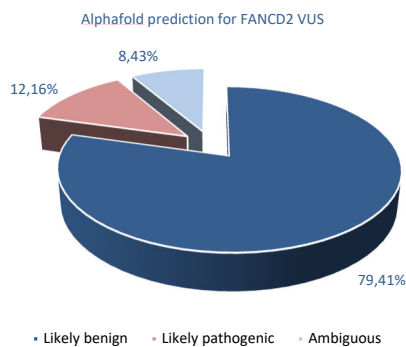


Σχήμα 3. Πρόβλεψη παθογονικότητας των BRCA2 VUS από το Alphamissense.

Στη συνέχεια, επεκτείνοντας τη μελέτη στα λιγότερο μελετημένα γονίδια, εστιαστήκαμε στο γονίδιο FANCD2. Πρόσφατες μελέτες αναδεικνύουν τον κομβικό ρόλο του στο μονοπάτι του ομόλογου ανασυνδυασμού, ενώ η σπανιότητα του συσχετιζόμενου γενετικού νοσήματος (Fanconi anemia complementation group D2) δεν έχει επιτρέψει την ανάδειξη των λειτουργικά σημαντικών περιοχών του γονιδίου.

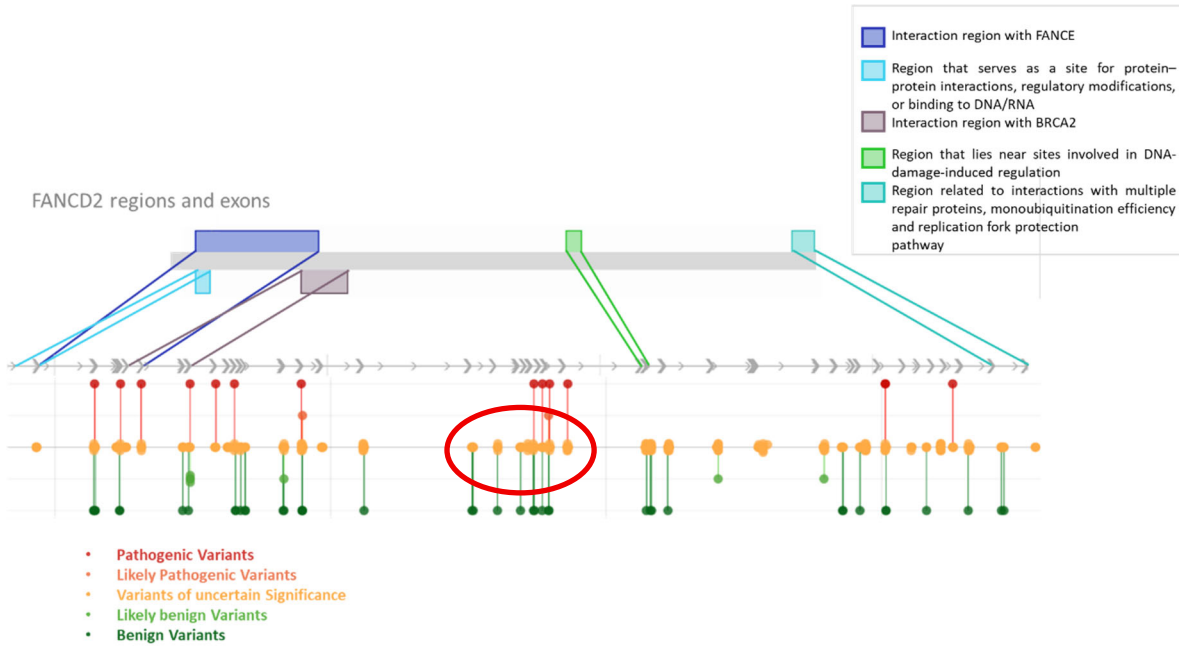
Αντλώντας όλες τις παραλλαγές του γονιδίου που έχουν βρεθεί έως σήμερα σε ασθενείς από την ClinVar, υπολογίστηκε ότι περίπου το 97% αυτών (πάνω από 800 παραλλαγές που ανευρίσκονται σε ασθενείς) παραμένουν άγνωστης κλινικής σημασίας. Το εύρημα αυτό καταδεικνύει την ανάγκη ανάλυσης της λειτουργικής επίπτωσης των παραλλαγών αυτών για την ορθή κλινική διαχείριση των ασθενών και των μελών της οικογενείας τους.

Πραγματοποιήσαμε ανάλυση πρόβλεψης με τη χρήση του εργαλείου Alphamissense, η οποία έδειξε ότι ένα σημαντικό ποσοστό αυτών (~12%) προβλέπονται ως παθογόνες (σχήμα 4).



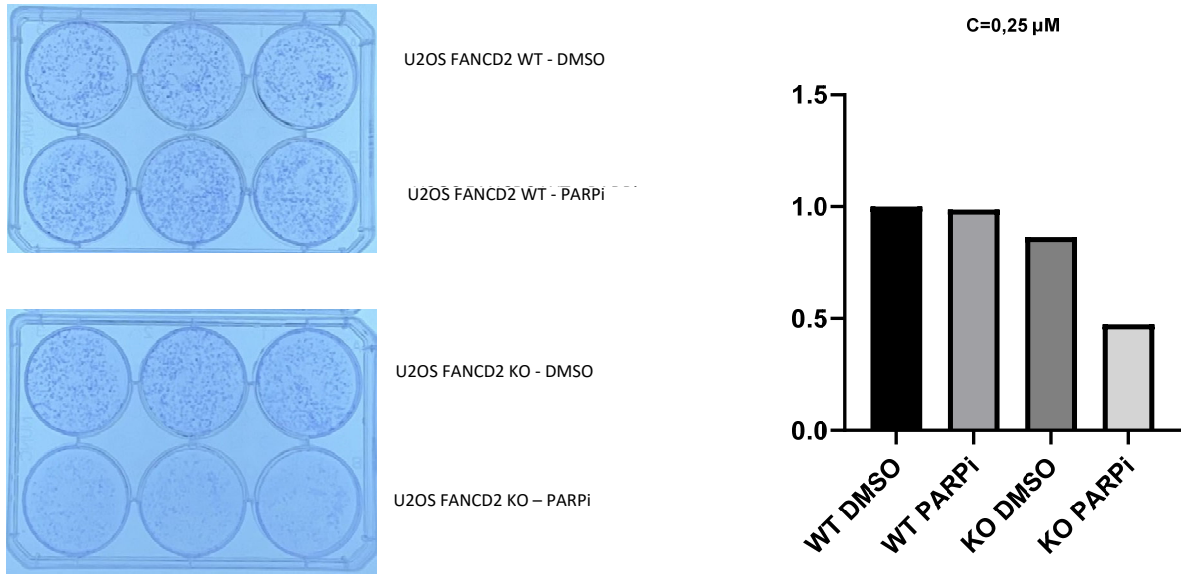
Σχήμα 4. Πρόβλεψη παθογονικότητας των παραλλαγών άγνωστης κλινικής σημασίας του FANCD2 από το Alphamissense.

Η διαγραμματική απεικόνιση των παραλλαγών πάνω στην πρωτεΐνη (Σχήμα 5), φανέρωσε μια περιοχή ενδιαφέροντος μεταξύ των εξωνίων 19 και 25, η οποία εμφανίζει παθογόνες παραλλαγές και ένα μεγάλο αριθμό παραλλαγών άγνωστης κλινικής σημασίας, ενώ παραμένει ακαθόριστης λειτουργικότητας. Ανάλυση των παραλλαγών σε σχέση τόσο με την προβλεπόμενη όσο και πειραματικά μελετημένη τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης ανέδειξε πιθανή εμπλοκή της περιοχής αυτής στη σταθεροποίηση του λειτουργικού συμπλόκου όπου συμμετέχει το FANCD2, γεγονός που συνηγορεί υπέρ πιθανής παθογονικότητας παραλλαγών στην περιοχή αυτή.



Σχήμα 5. Διαγραμματική απεικόνιση των λειτουργικών δομών της πρωτεΐνης FANCD2, καθώς και της θέσης των παραλλαγών του γονιδίου.

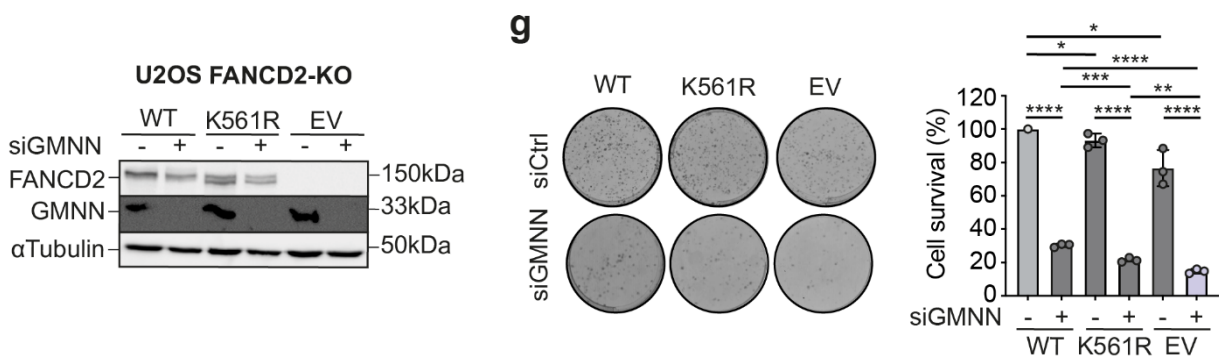
Στη συνέχεια, αναπτύξαμε ένα κυτταρικό σύστημα για τη λειτουργική ανάλυση παραλλαγών στο FANCD2. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε κυτταρική σειρά από επιθηλιακά κύτταρα καρκίνου οστεοσαρκώματος (U2OS) από την οποία είχαν αφαιρεθεί με γενετική τροποποίηση και τα δύο αλληλόμορφα του γονιδίου FANCD2 (FANCD2 Knock-out/KO). Ως σειρά ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η ίδια σειρά, μετά από διαμόλυνση με ιό που φέρει το φυσιολογικό γονίδιο FANCD2. Πραγματοποιήθηκε κλωνογονική διαδικασία, κατόπιν χορήγησης αναστολέων του ενζύμου PARP. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι κύτταρα με μη λειτουργικό FANCD2 είναι εκλεκτικά ευαίσθητα σε αναστολείς του ενζύμου PARP, εμφανίζοντας σχέσεις συνθετικής θνησιμότητας. Όπως φαίνεται από τα παρακάτω πειράματα (Εικόνα 6), η χορήγηση PARPi σε συνδυασμό με την απουσία έκφρασης του γονιδίου FANCD2 οδηγεί σε σημαντική μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων και σε αδυναμία δημιουργίας κλώνων.



Εικόνα 6. Κλωνογονική διαδικασία U2OS FANCD2 KO κυττάρων κατόπιν χορήγησης PARPi

Παράλληλα, αναπτύξαμε κυτταρικά συστήματα που επιτρέπουν τη μελέτη της λειτουργικότητας της πρωτεΐνης FANCD2 ως απάντηση στο αντιγραφικό στρες. Όπως φαίνεται στην εικόνα 7, κύτταρα με έλλειμμα στο FANCD2 (U2OS FANCD2 KO) εμφανίζουν συνθετική θνησιμότητα με την αποσιώπηση του γονιδίου GMNN που οδηγεί σε αντιγραφικό στρες. Αυτό καταδεικνύεται από την αδυναμία σχηματισμού κλώνων των κυττάρων U2OS FANCD2 KO που έχουν διαμολυνθεί με έναν άδειο ιικό φορέα έκφρασης (empty vector, EV) σε σχέση με τα κύτταρα που έχουν διαμολυνθεί με ιό που εκφράζει την πρωτεΐνη FANCD2 αγρίου τύπου (WT).

Χρησιμοποιήσαμε το κυτταρικό αυτό σύστημα για να ελέγξουμε τη λειτουργικότητα μεταλλαγμένης μορφής της πρωτεΐνης FANCD2 στην οποία αλλάζει ένα αμινοξύ στη θέση 561 από λυσίνη σε αργινίνη (K561R). Όπως φαίνεται στην εικόνα 7, η μετάλλαξη K561R που εισήχθει μέσω ιών στη κυτταρική σειρά FANCD2 KO δεν είναι εξίσου ικανή με την πρωτεΐνη αγρίου τύπου να αυξήσει την κλωνογονική ικανότητα των κυττάρων. Οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι η παρανοηματική μετάλλαξη K561R οδηγεί σε παραγωγή μιας μεταλλαγμένης μορφής της FANCD2 πρωτεΐνης που δεν είναι πλήρως λειτουργική, συνηγορώντας υπερ της παθογονικότητάς της. Τα πειράματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με προηγούμενα πειράματα που έχουν δείξει ότι το συγκεκριμένο αμινοξύ υφίσταται ουβικοιτινιλίωση, και άρα η αλλαγή από λυσίνη σε αργινίνη, παρά το ότι δεν επηρεάζει το φορτίο και άλλες φυσικοχημικές ιδιότητες της πρωτεΐνης, οδηγεί σε μια πρωτεΐνη με μειωμένη λειτουργικότητα.



Εικόνα 7. Κλωνογονική διαδικασία U2OS FANCD2 KO κυττάρων που εκφράζουν την πρωτεΐνη FANCD2 και μεταλλαγμάτων αυτής, κατόπιν αποσιώπησης του γονιδίου GMNN

Αριστερά: Ανάλυση Western για τις πρωτεΐνες FANCD2, GMNN και α -τουμπουλίνη (ως μάρτυρα ισοφόρτωσης), σε κύτταρα U2OS στα οποία και τα δύο αλληλόμορφα του FANCD2 έχουν αδρανοποιηθεί μέσω CRISPR, και τα οποία έχουν διαμολυνθεί με λεντιικούς φορείς που εκφράζουν την πρωτεΐνη FANCD2 αγρίου τύπου (WT), την πρωτεΐνη FANCD2 που φέρει την παρνοηματική μετάλλαξη K561R και τον άδειο ιικό φορέα ως μάρτυρα (empty vector EV). Τα κύτταρα έχουν υποστεί αποσιώπηση με τη χρήση siRNA ειδικών για την GMNN (siGMNN +), ή μη ειδικών siRNA μαρτύρων (siGMNN -).

Δεξιά: Κλωνογονική δοκιμασία των ως άνω κυτταρικών σειρών και σχετική ποσοτικοποίηση (% cell survival)

Συμπεραίνουμε ότι τα κυτταρικά συστήματα που αναπτύχθηκαν είναι κατάλληλα για το λειτουργικό χαρακτηρισμό παραλλαγών αγνώστου κλινικής σημασίας στο γονίδιο FANCD2. Συνδυαστική χρήση και των δύο μεθοδολογικών προσεγγίσεων που αναπτύχθηκαν (ευαισθησία σε αναστολείς PARP και συνθετική θνησιμότητα υπό αντιγραφικό στρες) διευκολύνει την κλινική εφαρμογή (κλινικό όφελος χορήγησης αναστολέων PARP και/ή κίνδυνος εμφάνισης αναιμίας Fanconi), ενώ ενδέχεται να οδηγήσει στην ανακάλυψη παραλλαγών που θα διαχωρίζουν αυτούς τους ρόλους, οι οποίες θα έχουν σημαντικό ερευνητικό ενδιαφέρον.

3. Λειτουργική ανάλυση παραλλαγών αγνώστου κλινικής σημασίας που εδράζονται σε γονίδια σχετιζόμενα με το Σύνδρομο Meier-Gorlin.

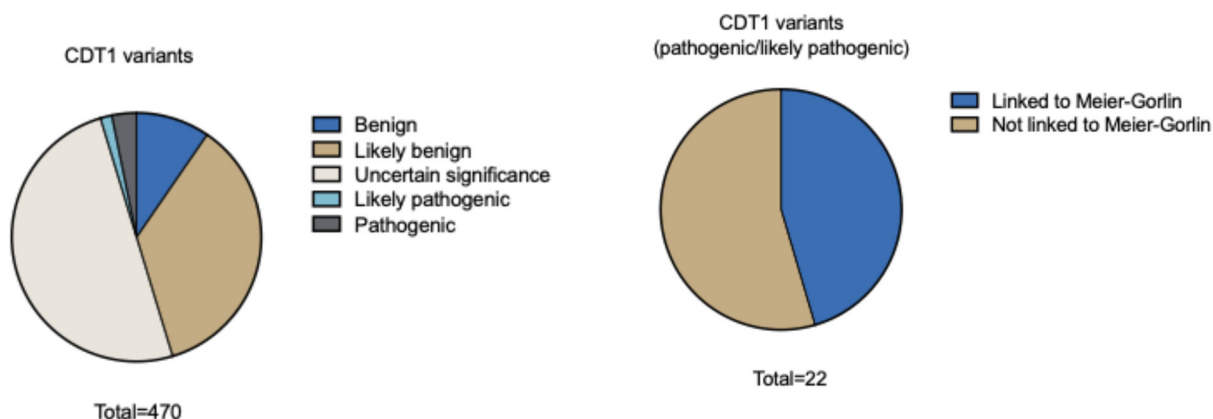
Το Σύνδρομο Meier-Gorlin (MGS) αποτελεί μια σπάνια, αυτοσωματική υπολειπόμενη διαταραχή, που εντάσσεται στο φάσμα των μικροκεφαλικών πρωτογενών νανισμών. Μέχρι σήμερα, έχουν περιγραφεί λιγότερες από 100 περιπτώσεις εμφάνισης της νόσου, ωστόσο η ανάπτυξη νέων τεχνολογιών έχει συνεισφέρει στην διεύρυνση, τόσο του γενετικού, όσο και του φαινοτυπικού προφίλ του συνδρόμου. Κλινικά, το MGS χαρακτηρίζεται από χαμηλό ανάστημα, και διάφορες σκελετικές ανωμαλίες, όπως η μικρωτία, η υποπλασία της επιγονατίδας, αλλά και η εμφάνιση μικροκεφαλίας. Σε μοριακό επίπεδο, οι περισσότερες παραλλαγές που έχει βρεθεί να σχετίζονται με το νόσημα, βρίσκονται σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες βασικές για την αντιγραφή του γενετικού υλικού. Μέχρι σήμερα, παραλλαγές σε τουλάχιστον 13 γονίδια έχουν συσχετιστεί με το σύνδρομο, μεταξύ των οποίων τα ORC1, ORC4, ORC6, CDC6, CDT1, GMNN, MCM3, MCM5, MCM7, CDC45, GINS2, GINS3 και DONSON. Οι περισσότερες από αυτές τις πρωτεΐνες διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη συναρμολόγηση και ενεργοποίηση της αντιγραφικής μηχανής, γεγονός που υπογραμμίζει τον κεντρικό ρόλο των διαταραχών της αντιγραφής του DNA στην παθογένεια του MGS^{4,5}.

Η ακριβής αντιγραφή του γενετικού υλικού αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την διατήρηση της γονιδιωματικής σταθερότητας των κυττάρων, με σκοπό την ομαλή επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό τους. Κατά την διάρκεια της ύστερης μίτωσης και της φάσης G1 του κυτταρικού κύκλου, στις θέσεις έναρξης της αντιγραφής στρατολογείται το σύμπλοκο ORC, στο οποίο προσδένονται οι πρωτεΐνες CDC6 και CDT1. Τα μόρια αυτά, συνεισφέρουν στην στρατολόγηση των ελικασών MCM2-7 πάνω στο DNA υπό την μορφή 2 ετεροεξαμερών συμπλόκων. Αυτή η πρωτεϊνική διάταξη αποτελεί το προ-αντιγραφικό σύμπλοκο (pre-replication complex, pre-RC), και η διαδικασία αυτή, που ονομάζεται αδειοδότηση, εξασφαλίζει την ενεργοποίηση των θέσεων έναρξης της αντιγραφής κατά την φάση S. Στην φάση αυτή, περαιτέρω παράγοντες στρατολογούνται στις θέσεις έναρξης, όπως η πρωτεΐνη CDC45 και το σύμπλοκο GINS, ενεργοποιώντας τις ελικάσες για την αποπερίελιξη της διπλής έλικας του DNA. Με την παρουσία επιπρόσθετων μορίων, διαμορφώνεται τελικά η αντιγραφική μηχανή, η οποία εκκινεί την διαδικασία διπλασιασμού του γενετικού υλικού από τις θέσεις έναρξης αντιγραφής⁶.

Ένα μεγάλο ποσοστό των μεταλλάξεων που σχετίζονται με το MGS αφορά πρωτεΐνες που συμμετέχουν άμεσα στην αδειοδότηση των θέσεων έναρξης της αντιγραφής, όπως οι υπομονάδες του ORC, οι CDC6, CDT1 και οι πρωτεΐνες MCM. Παράλληλα, έχουν εντοπιστεί παραλλαγές και σε πρωτεΐνες-ρυθμιστές των παραπάνω μορίων, όπως η πρωτεΐνη Geminin, που προσδένεται στον CDT1 κατά τις φάσεις S και G2, καταστέλλοντας φαινόμενα έκτοπης αδειοδότησης του DNA⁷. Αυτό έχει οδηγήσει στο επικρατέστερο μοντέλο, σύμφωνα με το οποίο το σύνδρομο Meier-Gorlin οφείλεται σε μειωμένη ικανότητα αποτελεσματικής φόρτωσης ή ενεργοποίησης των ελικασών MCM, που έχει ως αποτέλεσμα την μείωση των αδειοδοτημένων θέσεων έναρξης αντιγραφής⁵.

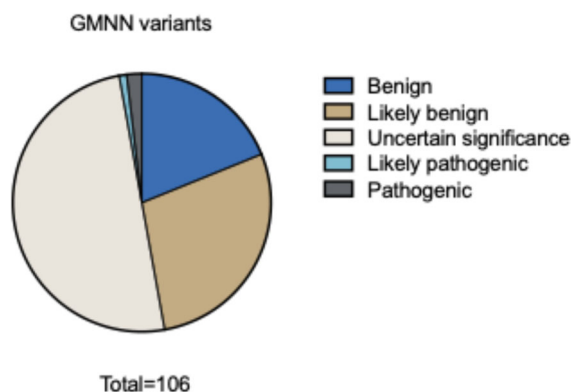
Λαμβάνοντας δεδομένα από την βάση δεδομένων NCBI-ClinVar, παρατηρήθηκε ότι για το γονίδιο CDT1 έχουν εντοπιστεί 470 παραλλαγές, το 50% εκ των οποίων αποτελούν παραλλαγές άγνωστης σημασίας. Από το σύνολο των παθογόνων και πιθανώς

παθογόνων παραλλαγών, το 45% έχει συσχετιστεί κλινικά με το σύνδρομο Meier-Gorlin (Εικόνα 8).



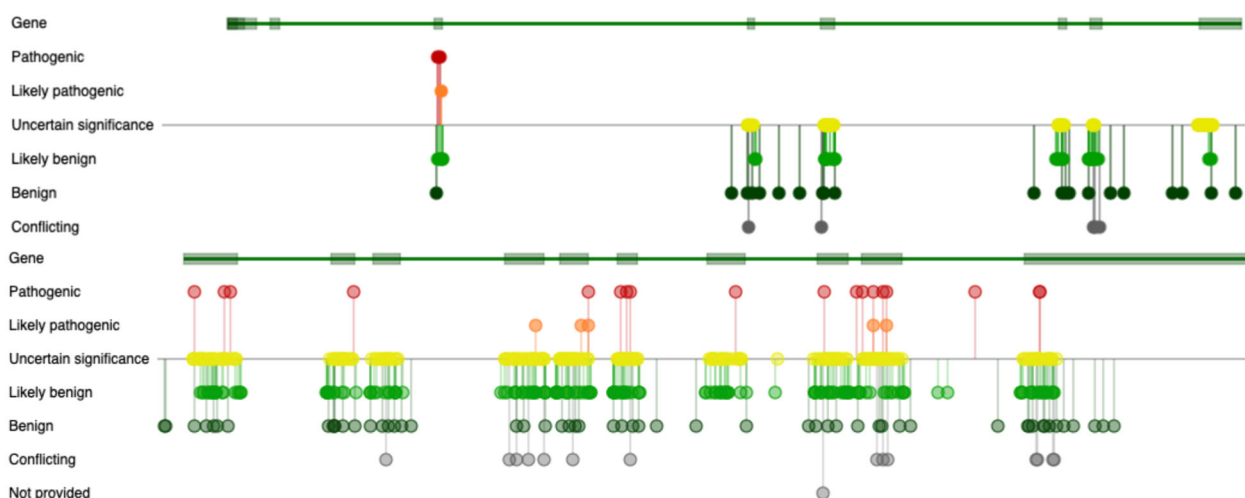
Εικόνα 8 Κατηγοριοποίηση παραλλαγών στο γονίδιο CDT1 βάσει ClinVar. Απεικόνιση του συνόλου των παραλλαγών (αριστερά), και του ποσοστού των παθογόνων και πιθανώς παθογόνων παραλλαγών που έχουν συσχετιστεί με το Meier-Gorlin (δεξιά).

Αντιστοίχως, για το γονίδιο GMNN, λαμβάνοντας δεδομένα από την βάση ClinVar, έχουν εντοπιστεί 106 παραλλαγές, το ήμισυ των οποίων είναι παραλλαγές άγνωστης σημασίας. Από τις παραλλαγές αυτές, μόνο 3 έχουν χαρακτηριστεί ως παθογόνες ή πιθανώς παθογόνες, και όλες τους έχουν συσχετιστεί με το σύνδρομο Meier-Gorlin (Εικόνα 1.2).



Εικόνα 9. Κατηγοριοποίηση παραλλαγών στο γονίδιο GMNN βάσει ClinVar. Απεικόνιση του συνόλου των παραλλαγών που έχουν εντοπιστεί στο γονίδιο.

Παρότι αρκετές παραλλαγές έχουν εντοπιστεί στα 2 γονίδια, ένα μικρό ποσοστό αυτών έχουν κατηγοριοποιηθεί ως παθογόνες. Παράλληλα, η επίδραση των υπαρχόντων παραλλαγών σε κυτταρικό επίπεδο είναι άγνωστη, για τις περισσότερες εξ’ αυτών. Από την χωρική κατάταξη των παραλλαγών που έχουν εντοπιστεί στο γονίδιο *GMNN* είναι εμφανές ότι η αμινοτελική περιοχή του γονιδίου, που φέρει μια αλληλουχία Destruction Box, που είναι υπεύθυνη για την πρωτεόλυση της Geminin, παίζει σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της νόσου⁸. Αντίστοιχα για το γονίδιο *CDT1*, οι περισσότερες παθογόνες παραλλαγές εντοπίζονται σε εξώνια, και ειδικότερα κοντά στις περιοχές αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης με την Geminin^{8,9}. Ο συσχετισμός της θέσης των παθογόνων παραλλαγών με τις λειτουργικές περιοχές των γονιδίων, παρέχει ενδείξεις για το πώς επηρεάζουν οι παραλλαγές τις εκάστοτε πρωτεΐνες, και κατ’ επέκταση, συμβάλει στην κατανόηση του ρόλου τους στην εμφάνιση της νόσου.



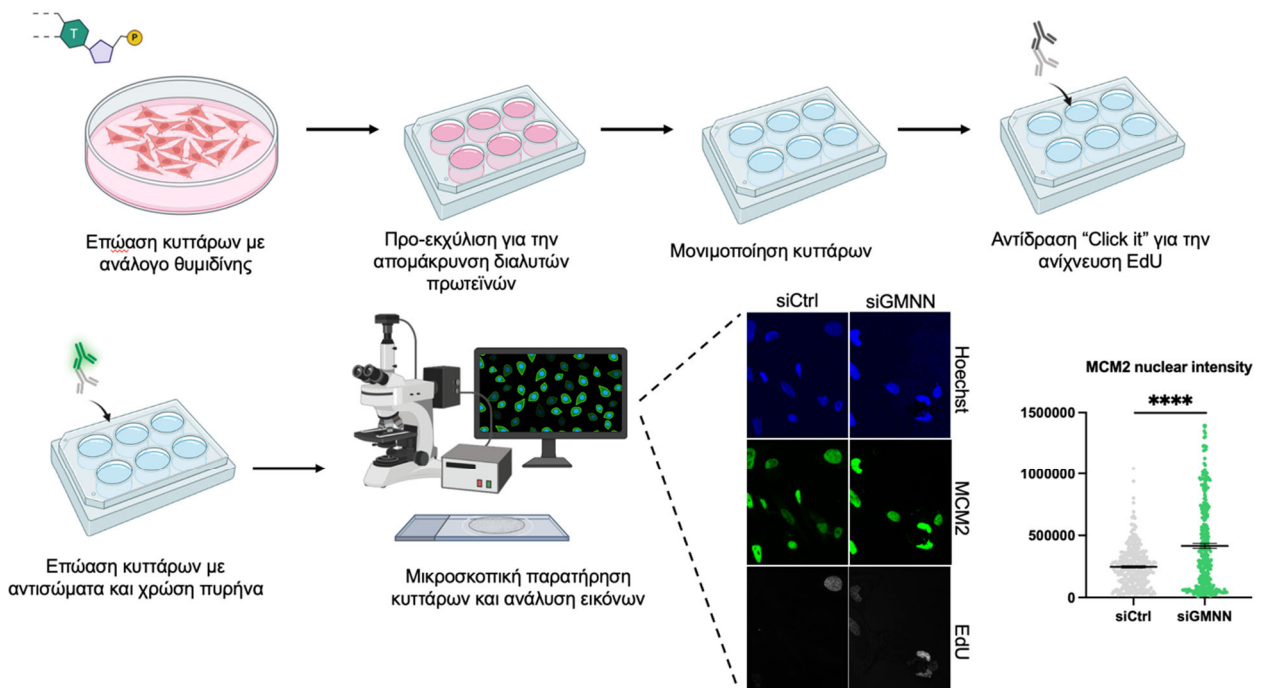
Εικόνα 10. Χωρική κατάταξη των παραλλαγών που έχουν εντοπιστεί στο γονίδιο της Geminin (πάνω) και στο γονίδιο του CDT1 (κάτω). Οι παραλλαγές χρωματίζονται, ανάλογα με την κατάταξή τους (NCBI-ClinVar).

Με σκοπό την αποσαφήνιση της λειτουργικότητας παραλλαγών που σχετίζονται με το σύνδρομο Maier-Gorlin και της επίδρασης που έχουν στην παθοφυσιολογία του νοσήματος, αναπτύξαμε πειραματικά πρωτόκολλα που αξιολογούν την πρόοδο της αντιγραφής, εστιάζοντας στην ταχύτητα και ακεραιότητα της διαδικασίας, και στην ικανότητα στρατολόγησης των ελικασών MCM κατά την αδειοδότηση.

Το πρώτο πειραματικό πρωτόκολλο αφορά δοκιμασία ικανότητας πρόσδεσης των ελικασών MCM στο DNA (εικόνα 11). Με δεδομένο ότι το σύνδρομο Maier-Gorlin έχει συσχετιστεί με προβλήματα στην αδειοδότηση της αντιγραφής, η κυτταρική αυτή δοκιμασία μπορεί να εκτιμήσει άμεσα την παθογονικότητα παραλλαγών αγνώστου κλινικής σημασίας στα γονίδια που σχετίζονται με το νόσημα. Ειδικότερα, ανθρώπινα κύτταρα επιστρώνονται και επωάζονται με το ανάλογο θυμιδίνης EdU για την παρακολούθηση της αντιγραφής. Στη συνέχεια πραγματοποιείται προ-εκχύλιση των κυττάρων, για απομάκρυνση των διαλυτών πρωτεϊνών και διατήρηση μόνο των πρωτεϊνών που βρίσκονται δεσμευμένες στη χρωματίνη. Με χρήση αντισωμάτων έναντι κάποιων εκ των υπομονάδων των ελικασών MCM (όπως η MCM2 στην εικόνα 11), και με χρήση της χημείας Click It για την ανίχνευση του EdU, προσδιορίζεται τόσο η

ικανότητα στρατολόγησης των ελικασών MCM, όσο και εάν η στρατολόγηση πραγματοποιείται στην ορθή φάση του κυτταρικού κύκλου. Με το ως άνω πρωτόκολλο είναι δυνατή η ανίχνευση τόσο υποαδειοδότησης (μειωμένη στρατολόγηση πρωτεϊνών MCM), όσο και υπεραδειοδότηση (αυξημένη στρατολόγηση) ή έκτοπη αδειοδότηση, φαινόμενα που έχουν όλα συσχετιστεί με αντιγραφικό στες και ενδέχεται να οδηγούν σε παθολογία.

Πειράματα με χρήση siRNA που αναστέλλουν την Geminin επιβεβαιώνουν την λειτουργικότητα του πρωτοκόλλου, και την ικανότητα ανίχνευσης φαινομένων έκτοπης αδειοδότησης (Εικόνα 11).



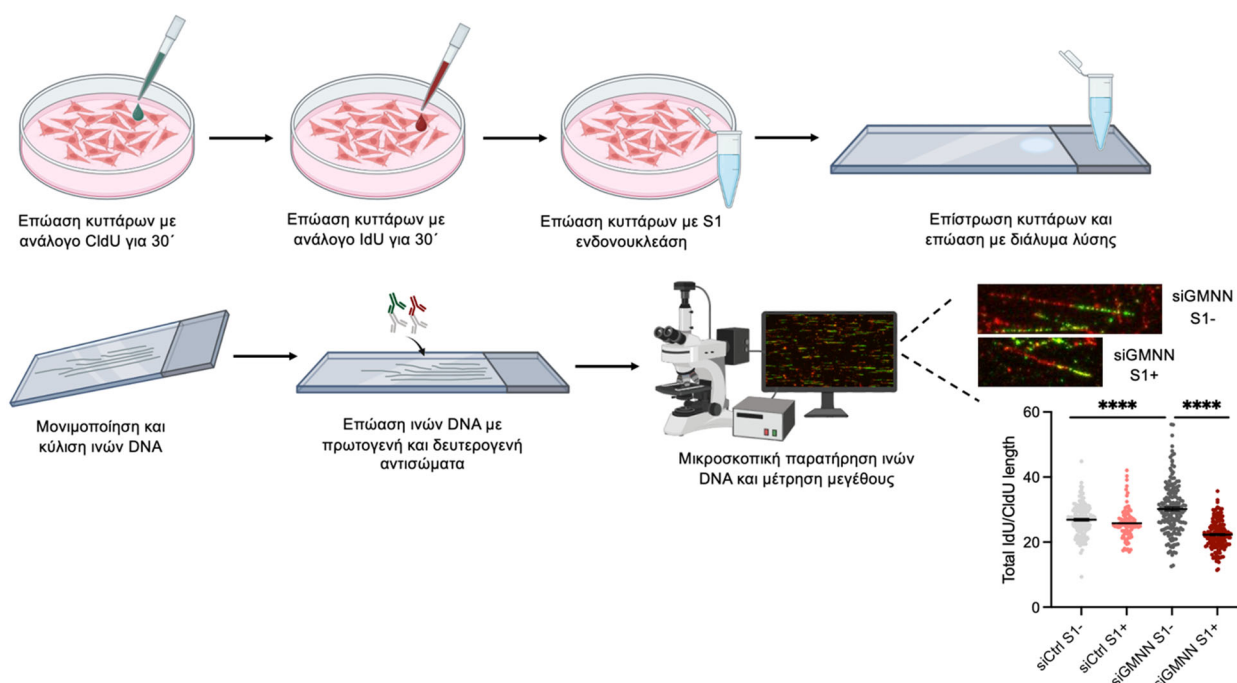
Εικόνα 11 Διαγραμματική απεικόνιση της δοκιμασίας ικανότητας πρόσδεσης των ελικασών MCM στο DNA.

Αντιπροσωπευτικές εικόνες και διάγραμμα που αναπαριστά την πυρηνική ένταση φθορισμού της πρωτεΐνης MCM2, έπειτα από απαλοιφή της Geminin σε κύτταρα U2OS.

Με σκοπό να μπορεί να μελετηθεί η επίδραση συγκεκριμένων παραλλαγών στην συνολική πορεία της αντιγραφής, αναπτύχθηκε ένα πειραματικό πρωτόκολλο που βασίζεται στην ανάλυση ινών DNA (εικόνα 12).

Συνοπτικά, κύτταρα επωάζονται σειριακά με 2 ανάλογα θυμιδίνης για την παρακολούθηση της προόδου της αντιγραφής. Έπειτα από την επώαση, ως προαιρετικό

βήμα, τα κύτταρα επώάζονται με την ενδονουκλεάση S1, η οποία δημιουργεί τομές σε τμήματα μονόκλωνου DNA, για την ταυτοποίηση πιθανών ασυνεχειών στην αντιγραφική διαδικασία. Τα κύτταρα έπειτα λύνονται και τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρους, όπου με τη χρήση κατάλληλης κλίσης οι ίνες του DNA μετακινούνται κατά μήκος της αντικειμενοφόρου. Έπειτα από χρήση αντισωμάτων έναντι των 2 αναλόγων και μικροσκοπική παρατήρηση των δειγμάτων, υπολογίζεται το μήκος των ιών DNA. Οι πληροφορίες για το μήκος των ιών παρέχουν ενδείξεις για την ταχύτητα της αντιγραφικής μηχανής, και σε συνδυασμό με την χρήση της S1 ενδονουκλεάσης, παρέχουν επίσης πληροφορίες για την ακεραιότητα των νέο-αντιγραμμένων τμημάτων DNA που προκύπτουν. Στην αντίστοιχη πειραματική διάταξη με την εικόνα 11., η απαλοιφή της πρωτεΐνης Geminin οδηγεί στην αύξηση της ταχύτητας των αντιγραφικών διχαλών, καταδεικνύοντας την διαταραχή της διαδικασίας της αντιγραφής. Παράλληλα, η επώαση των κυττάρων με την ενδονουκλεάση S1 παρέχει πληροφορίες για την ύπαρξη ασυνεχειών στην αντιγραφική θηλιά, έπειτα από διαταραχή της Geminin. Οι πληροφορίες αυτές ενισχύουν σημαντικά τον χαρακτηρισμό του λειτουργικού προφίλ αυτών των κυττάρων.



Εικόνα 12. Διαγραμματική απεικόνιση του πρωτοκόλλου ανάλυσης ιών DNA. Αντιπροσωπευτικές εικόνες και διάγραμμα που αναπαριστά το μήκος των ιών DNA, έπειτα από απαλοιφή της Geminin σε κύτταρα U2OS.

Συμπερασματικά, στη συγκεκριμένη ενότητα εργασίας αναπτύχθηκαν πειραματικά πρωτόκολλα σε κυτταρικά συστήματα για τη λειτουργική ανάλυση παραλλαγών που σχετίζονται με το Σύνδρομο Meier-Gorlin, ένα σπάνιο αναπτυξιακό νόσημα που αποδίδεται σε διαταραχές της αδειοδότησης της αντιγραφής του DNA. Η μελέτη επικεντρώνεται στις πρωτεΐνες CDT1 και Geminin, για τις οποίες μεγάλο ποσοστό των γενετικών παραλλαγών παραμένει λειτουργικά μη χαρακτηρισμένο. Μέσω δοκιμασιών

πρόσδεσης των ελίκασών MCM στο χρωματίνη και ανάλυσης ινών DNA, αξιολογείται τόσο η ικανότητα αδειοδότησης των θέσεων έναρξης της αντιγραφής όσο και η δυναμική και ακεραιότητα της αντιγραφικής διαδικασίας. Τα πειραματικά πρωτόκολλα που εγκαθιδρύθηκαν θα συμβάλλουν στη σύνδεση γενετικών ευρημάτων με συγκεκριμένους μοριακούς μηχανισμούς και στην πληρέστερη κατανόηση της παθοφυσιολογίας του συνδρόμου.

4. Λειτουργική ανάλυση παραλλαγών αγνώστου κλινικής σημασίας που εδράζονται σε γονίδια σχετιζόμενα με Πρωτοπαθή δυσκινησία κροσσών (PCD) και το Σύνδρομο RGMC.

Η Πρωτοπαθής Δυσκινησία των Κροσσών (Primary Cilia Dyskinesia, PCD) είναι μια σπάνια γενετική διαταραχή όπου οι κινητοί κροσσοί, οι οποίοι φυσιολογικά εξασφαλίζουν την ομαλή κίνηση υγρών στην επιφάνεια επιθηλιακών κυττάρων σε διάφορους ιστούς (αναπνευστικό επιθήλιο, κοιλίες του εγκεφάλου, ώτα, γεννητικό σύστημα), αδυνατούν να κινηθούν σωστά. Κύριο σύμπτωμα των σπάνιων αυτών νοσημάτων είναι οι χρόνιες λοιμώξεις του αναπνευστικού και βρογχιεκτασίες, συχνά συνοδευόμενες από δυσλειτουργία σε άλλους ιστούς και όργανα, όπως υδροκεφαλία, στειρότητα και προβλήματα στην ακοή. Η RGMC (Reduced Generation of Multiple Motile Cilia) αποτελεί μια ιδιαίτερα σοβαρή υποκατηγορία της PCD, η οποία δεν οφείλεται απλώς στην ακινησία των κροσσών, αλλά στη δραστική έλλειψη του αριθμού τους, λόγω μεταλλάξεων σε γονίδια όπως το γονίδιο MCIDAS και GEMC1, που είναι καθοριστικά για τον πολλαπλασιασμό των κεντριολίων και τη δημιουργία πολλαπλών κροσσών. Σε αντίθεση με την κλασική μορφή της νόσου, οι ασθενείς με RGMC σπάνια εμφανίζουν αναστροφή των σπλάχνων (*situs inversus*), αλλά διατρέχουν πολύ υψηλότερο κίνδυνο για εμφάνιση υδροκεφάλου, νευρολογικών προβλημάτων και σοβαρής υπογονιμότητας, καθιστώντας την έγκαιρη διάγνωση μέσω γενετικού ελέγχου και τη νευρολογική παρακολούθηση επιβεβλημένες.

Η διερεύνηση της πρωτοπαθούς δυσκινησίας των κροσσών παρουσιάζει σημαντικές προκλήσεις, καθώς η κλινική εικόνα είναι συχνά ατελής, και απαιτείται ακριβής γενετική ταυτοποίηση για τη διαφοροδιάγνωση. Παρά την πρόοδο των γενετικών αναλύσεων, ένα μεγάλο μέρος των παραλλαγών στα γονίδια *GMNC* (γνωστό και ως *GEMC1*) και *MCIDAS* (άμεσα συνδεδεμένα με την υδροκεφαλία) παραμένει ταξινομημένο στη βάση ClinVar ως VUS (Variants of Uncertain Significance), στερούμενο πειραματικής τεκμηρίωσης.

Η παρούσα μελέτη χρησιμοποιεί μια συνδυαστική στρατηγική λειτουργικής ανάλυσης παραλλαγών στο γονίδιο *MCIDAS*, το κύριο γονίδιο που έχει συνδεθεί με την RGMC, χρησιμοποιώντας κυτταρικά συστήματα, βλαστοκύτταρα που διαφοροποιούνται *in vitro* προς την πολυκροσσωτή σειρά, αλλά και *in vivo* συστήματα σε ζώα μοντέλα. Στόχος είναι να διερευνηθεί η λειτουργικότητα μεταλλαγμένων μορφών της πρωτεΐνης MCIDAS και η ικανότητά τους να εμφανίζουν συγκεκριμένους φαινοτύπους (όπως ο εντοπισμός στο κυτταρόπλασμα) και να επάγουν συγκεκριμένες λειτουργίες όπως ο πολλαπλασιασμός των κεντριολίων και η επαγωγή της δημιουργίας πολυκροσσωτών επενδυματικών κυττάρων.

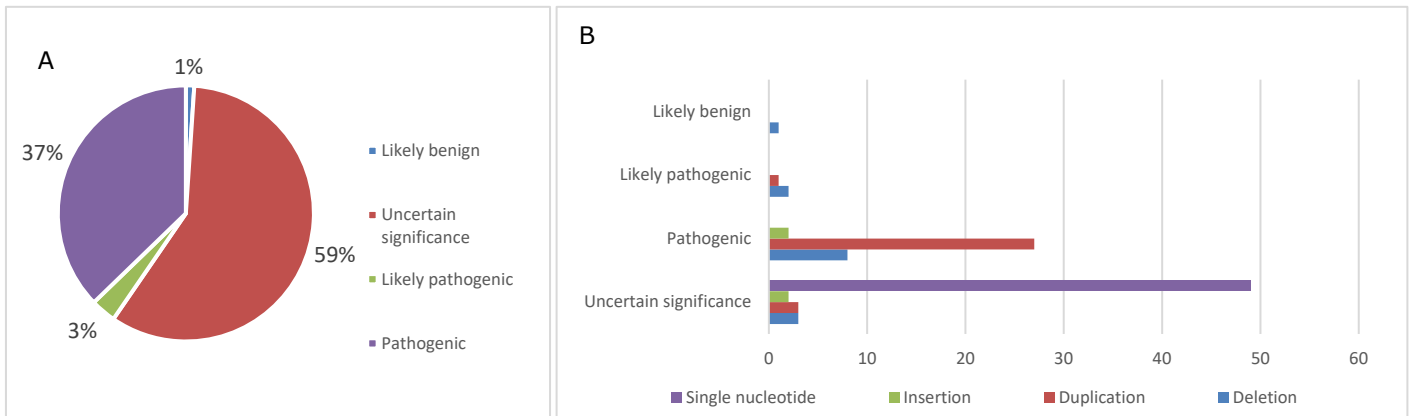
Παραδοτέο 4.2

“Αναφορά λειτουργικής ανάλυσης VUS σπανίων νοσημάτων -παρουσίαση σε συνέδριο”.

Page 16 of 23

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ανάλυση της κατανομής των παραλλαγών των γονιδίων *GMNC* και *MCIDAS* που έχουν εντοπιστεί σε ασθενείς, με δεδομένα της βάσης ClinVar (NCBI).

Αναφορικά με το γονίδιο *GMNC*, από το σύνολο των 94 καταγεγραμμένων παραλλαγών που έχουν ανιχνευθεί σε ασθενείς, το 37% ταξινομείται ως παθογόνες, το 3% ως πιθανώς παθογόνες και μόλις 1% ως πιθανώς μη παθογόνες. Η πλειοψηφία των παραλλαγών (59%) κατηγοριοποιούνται ως παραλλαγές αβέβαιης κλινικής σημασίας VUS (Εικόνα 1A). Στη συνέχεια, αναλύθηκε ο τύπος της παραλλαγής (variation type) για κάθε κατηγορία κλινικής σημασίας. Στις παθογόνες παραλλαγές, ο κυρίαρχος τύπος ήταν διπλασιασμός, ενώ η πιθανώς μη παθογόνος παραλλαγή ήταν έλλειψη. Στις παραλλαγές VUS, το 27% ήταν σημειακή παραλλαγή που στην πλειονότητά τους οδηγεί σε αλλαγή αμινοξέος (missense), ενώ μόλις το 3% ήταν διπλασιασμός και έλλειψη (Εικόνα 13).



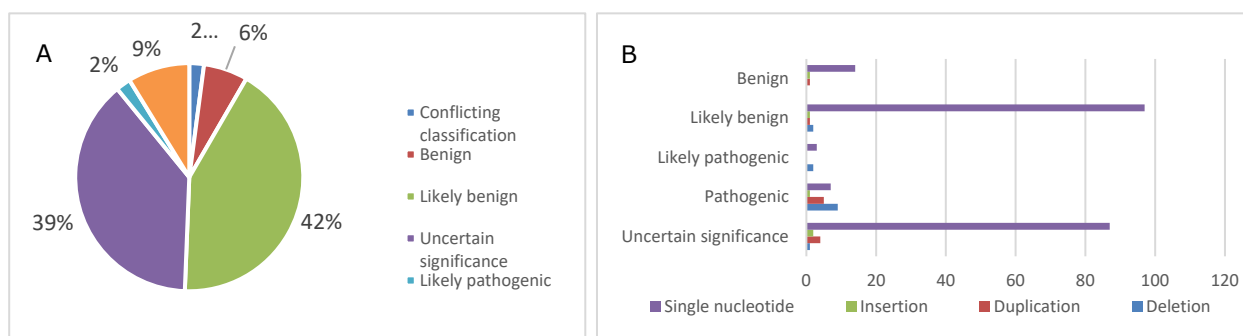
Εικόνα 13 -Κατανομή των γενετικών παραλλαγών του γονιδίου *GMNC* βάσει της ταξινόμησης ClinVar. (Α) Ποσοστιαία κατανομή των παραλλαγών ανάλογα με την κλινική τους σημασία (Β) Ταξινόμηση των παραλλαγών ανά τύπο μεταλλαγής (Variation type).

Για το γονίδιο *MCIDAS*, από τις 239 καταγεγραμμένες παραλλαγές, περίπου οι μισές είναι πιθανώς μη παθογόνες (42%) ή μη παθογόνες (6%). Περίπου 11% έχουν καταγραφεί ως παθογόνες (9%) ή πιθανώς παθογόνες (2%). Ένα μεγάλο ποσοστό (39%) κρίνεται ως παραλλαγές αβέβαιης σημασίας (VUS) καθόλο το μήκος του γονιδίου του *MCIDAS*. Αναλύοντας τον τύπο της παραλλαγής για κάθε κατηγορία κλινικής σημασίας, στις παθογόνες παραλλαγές βρέθηκε η έλλειψη ως κυρίαρχος τύπος, ακολουθούμενη από την σημειακή μετάλλαξη. Στις παραλλαγές VUS, όπως και στις μη παθογόνες, η σημειακή μετάλλαξη ήταν ο επικρατέστερος τύπος με κύριες τις αλλαγές ενός νουκλεοτιδίου που οδηγούν σε αλλαγή ενός αμινοξέος (παρανοηματικές παραλλαγές, missense).

Παραδοτέο 4.2

“Αναφορά λειτουργικής ανάλυσης VUS σπανίων νοσημάτων -παρουσίαση σε συνέδριο”.

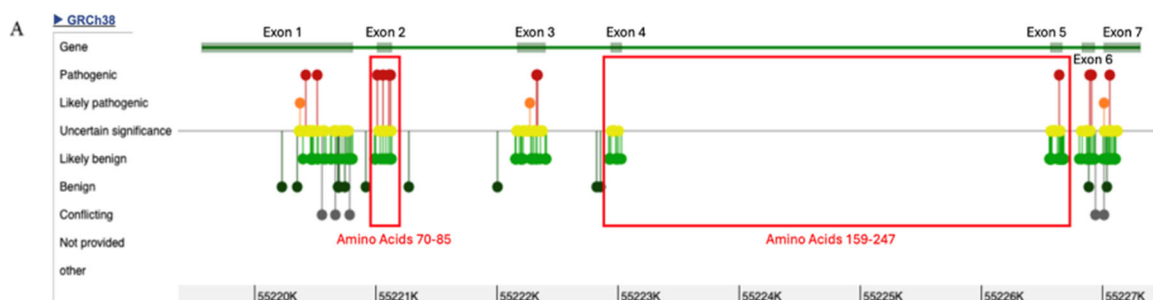
Page 17 of 23



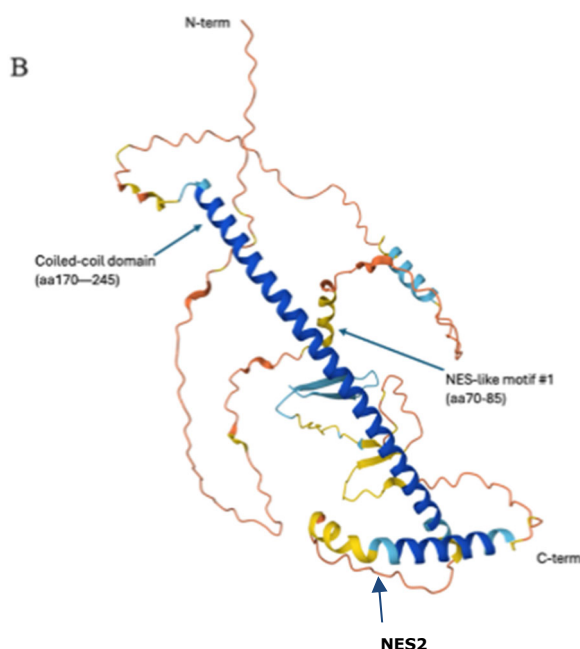
Εικόνα 14 -Κατανομή των γενετικών παραλλαγών του γονιδίου MCIDAS

(Α) Ποσοστιαία κατανομή των παραλλαγών ανάλογα με την κλινική τους σημασία **(Β)** Ταξινόμηση των παραλλαγών ανά τύπο μεταλλαγής (Variation type).

Οι σημειακές παραλλαγές που οδηγούν σε αλλαγή αμινοξέος (missense) αποτελούν τη συνηθέστερη κατηγορία στις παραλλαγές άγνωστης σημασίας (VUS) τόσο στο γονίδιο *GMNC* όσο και στο *MCIDAS*, γεγονός που καθιστά δύσκολη την πρόβλεψη της επίδρασής τους στη λειτουργικότητα της κάθε πρωτεΐνης χωρίς πειραματικά δεδομένα. Η ανάλυσή μας αποκάλυψε μια εκτεταμένη συστάδα παραλλαγών αβέβαιης σημασίας, η οποία ξεκινά από τη θέση 171 και εκτείνεται σε όλο το μήκος της επικράτειας σπειροειδούς σπειράματος (αμινοξέα 159–247), καθώς και μία συστάδα παραλλαγών μεταξύ των θέσεων 70-85 (εικόνα 15A). Βιοπληροφορική ανάλυση έδειξε ότι στις περιοχές 70-85 και στο τέλος της περιοχής του σπειροειδούς σπειράματος (αμινοξέα 234-243) εντοπίζονται αλληλουχίες που μπορεί να δρουν ως αλληλουχίες εξόδου από τον πυρήνα (Nuclear Export Signals, NES). Η τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης, όπως προβλέπεται από το εργαλείο τεχνητής νοημοσύνης AlphaFold, και η θέση των προβλεπόμενων αλληλουχιών εξόδου από τον πυρήνα NES1 και NES2 φαίνονται στην εικόνα 14B.



ΠΑΡΑΔΟΤΕΟ 4.2_ιστοσελίδα

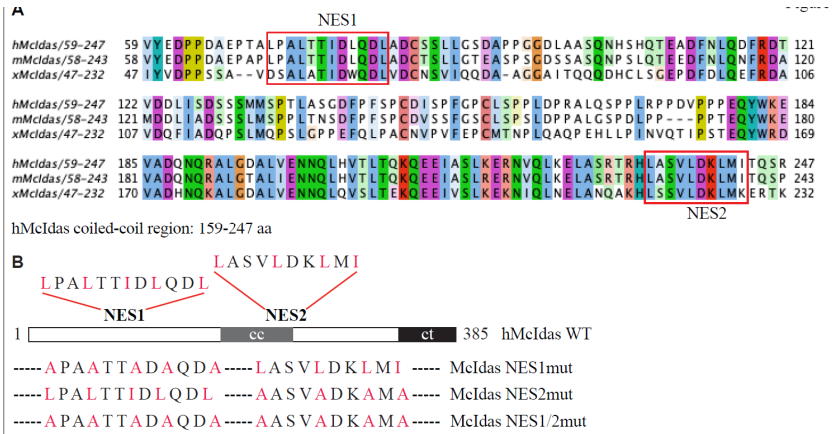


Εικόνα 14 - Γενετική και δομική χαρτογράφηση των παραλλαγών που εντοπίζονται σε ασθενείς και εδράζονται εντός του γονιδίου MCIDAS

(Α) Οργάνωση του γονιδίου MCIDAS (Εξόνια 1-7) με επισήμανση των κρίσιμων περιοχών αμινοξέων (70-85 και 159-247, 234-243) που σχετίζονται με VUS και παθογόνες παραλλαγές.

(Β) Τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης, όπου υποδεικνύονται το coiled-coil domain και τα NES1 και NES2.

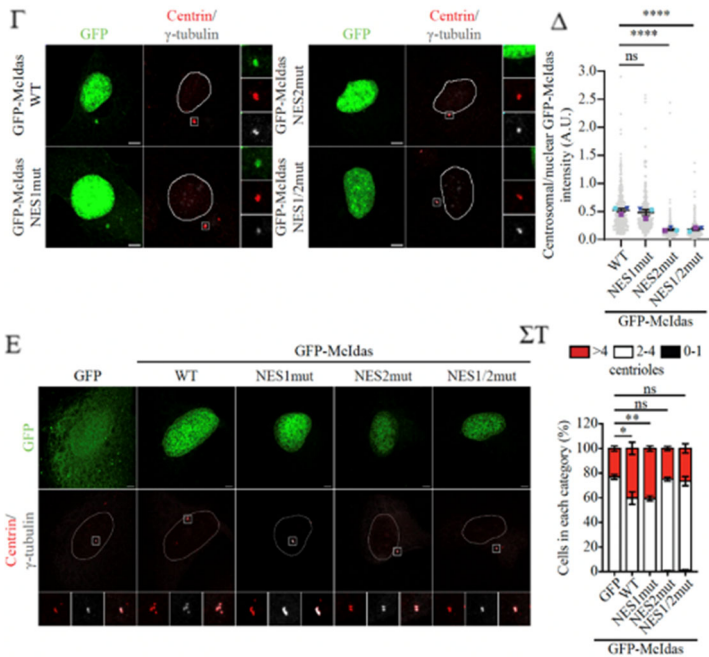
Προκειμένου να διεξάγουμε μια ολοκληρωμένη λειτουργική ανάλυση, προχωρήσαμε στην εργαστηριακή κατασκευή στοχευμένων μεταλλαγμάτων των περιοχών που περιλαμβάνουν παραλλαγές αγνώστου κλινικής σημασίας και συμπίπτουν με τα προβλεπόμενα μοτίβα εξόδου από τον πυρήνα (NES-like motifs). Η στρατηγική αυτή επιλέχθηκε για να διαπιστώσουμε εάν παραλλαγές στις περιοχές αυτές μπορεί να προκαλούν αδυναμία εξόδου της McIdas από τον πυρήνα, εντοπισμού της στα κεντριόλια και πολλαπλασιασμού των κεντριολίων. Για το σκοπό αυτό μεταλλάγματα στις δύο NES περιοχές κατασκευάστηκαν αντικαθιστώντας συγκεκριμένες λευκίνες και ισολευκίνες στις δύο περιοχές ενδιαφέροντος με αλανίνες. Κατασκευάστηκαν τρεις μεταλλαγμένες μορφές της πρωτεΐνης (NES1, NES2 και ο συνδυασμός NES1/2, εικόνα 15). Τα cDNA των μεταλλαγμένων μορφών εισήχθησαν σε φορείς έκφρασης για την παραγωγή πρωτεϊνών συντηγμένων με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη και διαμολύνθηκαν κύτταρα U2OS με λιποσώματα. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν φορείς που εξέφραζαν την πρωτεΐνη McIdas αγρίου τύπου συντηγμένη με GFP, και μόνο την πρωτεΐνη GFP. Εξετάστηκε η ικανότητα των πρωτεϊνών να εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα (δεν δίχνεται) και στα κεντριόλια καθώς και η ικανότητα των μεταλλαγμάτων να επάγουν αύξηση του αριθμού των κεντριολίων, όπως η πρωτεΐνη αγρίου τύπου (εικόνα 16).



Εικόνα 15 – Περιοχές ενδιαφέροντος και μεταλλάγματα.

(Α) Πολλαπλή στοίχιση των αμινοξικών αλληλουχιών των ορθόλογων πρωτεϊνών McIdas στον άνθρωπο, το ποντίκι και το βάτραχο

(Β) Τα μεταλλάγματα που κατασκευάστηκαν στο μοτίβο NES1, στο μοτίβο NES2 και στα δύο μαζί (NES1/2)



Εικόνα 16 – Λειτουργική ανάλυση μεταλλαγμάτων McIdas σε κυτταρικά συστήματα .

(Γ) Απεικόνιση κυττάρων που εκφράζουν την άγριου τύπου πρωτεΐνη (WT) και τα μεταλλάγματα NES1mut, NES2mut και το διπλό μετάλλαγμα NES1/2mut. Η McIdas (πράσινο - GFP) εντοπίζεται στον πυρήνα και στα κεντριόλια. Τα κεντριόλια σημαίνονται με Centrin/γ-tubulin (κόκκινο/λευκό). Μεταλλαγμένες μορφές στην περιοχή NES1 συμπεριφέρονται όπως η πρωτεΐνη άγριου τύπου, ενώ μορφές μεταλλαγμένες στην περιοχή NES2 δεν εντοπίζονται στα κεντριόλια (Δ) Ποσοτική ανάλυση της έντασης GFP-McIdas μεταξύ κεντροσωματίου και πυρήνα. (Ε) Ικανότητα της πρωτεΐνης McIdas και των μεταλλαγμάτων της να επάγουν αύξηση του αριθμού των κεντριολίων (ΣΤ) Ποσοστό κυττάρων ανάλογα με τον αριθμό των κεντριολίων που διαθέτουν (0-1, 2-4, >4). Η πρωτεΐνη άγριου τύπου, καθώς και το μετάλλαγμα NES1 οδηγεί σε αύξηση του αριθμού κεντριολίων, ενώ το μετάλλαγμα NES2 έχει απωλέσει αυτή την ικανότητα.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 16, μετάλλαξη της περιοχής NES2 οδηγεί σε απώλεια της ικανότητας του McIDAS να εντοπίζεται στα κεντριόλια και να επάγει την αύξηση του αριθμού των κεντριολίων στο κυτταρικό σύστημα λειτουργικής ανάλυσης που αναπτύχθηκε. Αντίθετα, το μετάλλαγμα στην περιοχή NES1 συμπεριφέρεται όπως η πρωτεΐνη αγρίου τύπου. Συμπεραίνουμε ότι παραλλαγές στην περιοχή NES2 είναι πιθανό να είναι παθογόνες, ενώ δεν υπάρχουν ενδείξεις παθογονικότητας για τις παραλλαγές αβέβαιης σημασίας στην περιοχή NES1, οι οποίες βάση της λειτουργικής ανάλυσης στο κυτταρικό σύστημα που αναπτύχθηκε, ταξινομηθούν ως πιθανά αβλαβείς (likely benign, για παράδειγμα η παραλλαγή I77V, η οποία ανευρίσκεται σε ασθενείς).

Με δεδομένους τους πολλαπλούς ρόλους της πρωτεΐνης MCIDAS στη διαφοροποίηση των επενδυματικών κυττάρων και τη δημιουργία πολλαπλών κροσσών, οι οποίοι συνδέονται άμεσα με το φαινότυπο υδροκεφαλίας και νευρολογικών διαταραχών των ασθενών, προχωρήσαμε στην ανάπτυξη περαιτέρω πειραματικών πρωτοκόλλων που να μπορούν να μελετήσουν το ρόλο των μεταλλαγμάτων του MCIDAS σε συστήματα που να προσομοιάζουν στο μέγιστο δυνατό βαθμό τη φυσιολογική λειτουργία της πρωτεΐνης.

Αναπτύχθηκαν πειραματικά πρωτόκολλα υπερέκφρασης που επιτρέπουν τη λειτουργική επικύρωση των VUS παραλλαγών του γονιδίου *MCIDAS* σε βλαστοκύτταρα σε καλλιέργεια, τα οποία διαφοροποιούνται προς την επενδυματική μοίρα και σε ζώα μοντέλα. Τα πρωτόκολλα αυτά βασίζονται στην εισαγωγή εξωγενούς McIDAS (αγρίου τύπου ή μεταλλαγμένης) σε κυτταρικά και ζωικά συστήματα, προκειμένου να ελεγχθεί η ικανότητά της να καθοδηγεί τη διαφοροποίηση προς την επενδυματική μοίρα και τη βιογένεση πολλαπλών λειτουργικών κροσσών. Ως ζώα μοντέλα χρησιμοποιήθηκαν μύες με αιμορραγική υδροκεφαλία, ενώ η έκφραση των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος έγινε δυνατή μέσω ηλεκτροδιαμόλυνσης φορέων έκφρασης. Η υπερέκφραση της άγριου τύπου πρωτεΐνης επάγει στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης του επενδυματικού μεταγραφικού παράγοντα p73, του αριθμού των κεντριολίων, τα οποία σημαίνονται με τον δείκτη Pericentrin και του αριθμού των κροσσών, οι οποίοι σημαίνονται με το δείκτη acetylated tubulin (ACT) σε περικοιλιακά κύτταρα του εγκεφάλου μύων.

Μέσω αυτού του *in vivo* συστήματος, κλινικές παραλλαγές που αποτυγχάνουν να αναπαράγουν τα επίπεδα ενεργοποίησης της WT McIDAS στην υπερέκφραση, μπορούν να κατηγοριοποιούνται ως παθογόνες.

=

5. Βιβλιογραφία

1. Loibl S et al. (2024) ESMO Guidelines Committee. Electronic address: clinicalguidelines@esmo.org. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2024 Feb;35(2):159-182. doi: 10.1016/j.annonc.2023.11.016. Epub 2023 Dec 13. PMID: 38101773.
2. <http://ithaka.rrp.demokritos.gr/CanVaS>
3. 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>
4. Nielsen-Dendoroff, E., Ruegg, M. S. G., & Bicknell, L. S. (2023). The expanding genetic and clinical landscape associated with Meier-Gorlin syndrome. *European Journal of Human Genetics*, *31*(8), 859–868. <https://doi.org/10.1038/s41431-023-01359-z>
5. Yang, R., Hunker, O., Kim, J., & Bleichert, F. (2026). Molecular impacts of Meier–Gorlin syndrome mutations on human origin licensing. *Journal of Biological Chemistry*, *302*(2), 111100. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2025.111100>
6. Fragkos, M., Ganier, O., Coulombe, P., & Méchali, M. (2015). DNA replication origin activation in space and time. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *16*(6), 360–374. <https://doi.org/10.1038/nrm4002>
7. Ballabeni, A., Melixetian, M., Zamponi, R., Masiero, L., Marinoni, F., & Helin, K. (2004). Human Geminin promotes pre-RC formation and DNA replication by stabilizing CDT1 in mitosis. *The EMBO Journal*, *23*(15), 3122–3132. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600314>
8. Benjamin, J. M., Torke, S. J., Demeler, B., & McGarry, T. J. (2004). Geminin Has Dimerization, Cdt1-binding, and Destruction Domains That Are Required for Biological Activity. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(44), 45957–45968. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407726200>
9. De Marco, V., Gillespie, P. J., Li, A., Karantzelis, N., Christodoulou, E., Klompmaker, R., Van Gerwen, S., Fish, A., Petoukhov, M. V., Iliou, M. S., Lygerou, Z., Medema, R. H., Blow, J. J., Svergun, D. I., Taraviras, S., & Perrakis, A. (2009). Quaternary structure of the human Cdt1-Geminin complex regulates DNA replication licensing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(47), 19807–19812. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905281106>

6. Παρουσίαση σε Συνέδριο

Study of variants of uncertain clinical significance in homologous recombination genes

Valentini Tzimogianni¹, Ioanna Papadionysiou¹, Eirini Veltsou¹, Stavros Taraviras², Zoi Lygerou¹

¹Molecular Genetics Unit, General Biology Department, Medical School, University of Patras, Greece

² Department of Physiology, School of Medicine, University of Patras, Greece.

DNA damage caused by homologous recombination (HR) deficiency has been linked to certain types of neoplasms. A PARP inhibitor (PARPi) can effectively target tumors with HR deficit caused by germline or somatic mutations. In cancer patients, genetic analysis of HR genes can reveal variants of uncertain clinical significance (VUS). Further study of these variants is required to reclassify them, unravel gene function, and provide new insights into structure-function relationships.

In this context, we studied the pathogenicity prediction of VUS in key HR genes, such as BRCA1 and BRCA2, using AI-based tools (eg AlphaMissense), and compared predictions to functional studies that screen many random mutations in crucial protein domains. This analysis validated Alphamissense as an accurate predictor of variant pathogenicity and allowed the analysis of variants identified in the Greek population.

Many genes involved in the HR pathway remain poorly studied, amongst them FANCD2, which was recently shown to play a crucial role in replication fork protection. Bioinformatic analysis revealed ~600 missense VUS observed in patients. Using Alphamissense, the majority are classified as benign/likely benign, ~60 variants as pathogenic, whereas 45 remain ambiguous. For predicting patient response to PARPi, a direct assay of PARPi sensitivity conferred by variants in HR genes is required. To that end, we set up clonogenic assays using U2OS cells bearing a knock-out of FANCD2 and showed increased sensitivity upon PARPi administration. This assay can thus be used for disease modeling, by introducing selected FANCD2 variants from patients, to study their effect on PARPi sensitivity and analyze molecular pathways.

Through this study, we aim to reclassify FANCD2 VUS according to their PARPi sensitivity, enabling a more refined characterization of the gene and its role in HR, as well as supporting informed clinical management and genetic counseling.



Study of Variants of Uncertain Clinical Significance in Homologous Recombination genes

Valentini Tzimogianni¹, Ioanna Papadionysiou¹, Eirini Veltsou¹, Stavros Taraviras², Zoi Lygerou¹

¹Molecular Genetics Unit, General Biology Department, Medical School, University of Patras, Greece
² Department of Physiology, School of Medicine, University of Patras, Greece

Introduction

Double strand breaks

Resection

Stable strand invasion

DNA damage due to homologous recombination deficiency has been associated with various neoplasms, such as breast, ovarian, pancreatic, and prostate cancer. Tumors with HR impairment—whether from inherited or acquired mutations—can be selectively targeted using PARP inhibitors (PARPi). In clinical cancer genetics, testing of HR-related genes often uncovers variants of uncertain significance (VUS). Additional research on these variants is essential to refine their classification, clarify their biological roles, and deepen our understanding of the relationship between gene structure and function. PARP inhibition causes the accumulation of DNA damage. Cancer cells with homologous recombination (HR) deficiency cannot repair damage effectively, leading to excessive DNA breaks and ultimately cell death through synthetic lethality.

Apart from single variants, many genes involved in HR also remain poorly studied, amongst them FANCD2. Nowadays, AI-based tools that predict the pathogenicity of VUS have been developed. In this study, we present the comparison of AlphaMissense prediction with the results of functional assays for key proteins of the HR pathway. In addition, through this study, we aim to reclassify FANCD2 VUS based on their response to PARP inhibitors. This will improve our understanding of FANCD2 function in homologous recombination and support more informed clinical decision-making and genetic counseling.

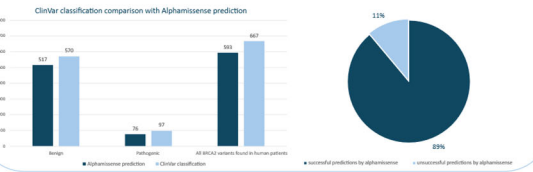
Normal cell: Repair of double-strand breaks via HR pathway and cell survival.

HR-deficient cancer cell: Accumulation of genomic instability and cell death.

Results

1. Comparison of BRCA2 variants' pathogenicity prediction by AlphaMissense and functional studies

BRCA2 is a key component of the homologous recombination pathway, with many variants recorded to date in the Greek and non-Greek populations. For all pathogenic and benign variants of the gene found in cancer patients, we recorded the prediction of AlphaMissense. This comparison showed that for 89% of the total number of BRCA2 variants, AlphaMissense predicted the correct classification.



2. BRCA2 VUS in the Greek population

AlphaMissense seems to be a powerful and valid tool for predicting the pathogenicity of variants. We extracted all BRCA2 VUS recorded to date in the Greek population from CanVas. Of these, only those shown in the table below (~10,20%) have been studied through functional assays. It appears that for all variants between exons 15 and 26 (the studied region), their pathogenicity has been predicted, which coincides with the pathogenicity prediction of AlphaMissense.

