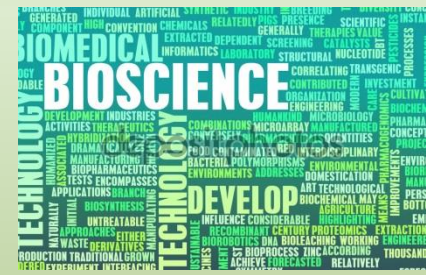




ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΣΤ' ΕΞΑΜΗΝΟΥ

Τμήμα Ιατρικών Εργαστηρίων
Τ.Ε.Ι. Αθήνας



Μάθημα 12^ο

Κυτταρική Βιολογία (νανομετρικό μέγεθος) - Βιοδείκτες

Διδάσκων

Δρ. Ιωάννης Δρίκος

Απόφοιτος Ιατρικής Σχολής Ιωαννίνων (ΠΙ)

Απόφοιτος Βιολογίας, ΑΠΘ

Διδάκτωρ Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ)

Ειδ. Παιδιατρικής

email: johndrikos@yahoo.com, idrikos@teiath.gr



Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό
Ίδρυμα Αθήνας

Μηχανισμοί γενετικών αλλοιώσεων

- ✓ Αρκετές ασθένειες με χαρακτηριστικότερο παράδειγμα τον καρκίνο, **ξεκινούν όταν συμβούν μικρές αλλαγές (μεταλλάξεις) στην αλληλουχία του DNA.**
- ✓ Αυτές οι αλλαγές **μπορεί να αφορούν την αλλαγή μιας βάσης** στην αλληλουχία των γονιδίων ή ακόμη και περισσότερες από **μία βάσεις που καθορίζουν ένα κωδικονίου** και οδηγούν στην επιλογή **ενός διαφορετικού αμινοξέος** στην πολυπεπτιδική αλυσίδα.
- ✓ Σε ορισμένες περιπτώσεις **η απώλεια από το γονιδίωμα** ενός μεγάλου αριθμού βάσεων DNA που περιέχει αρκετά γονίδια, **οδηγεί στο σχηματισμό νέων γονιδίων** και στη σύνθεση νέων μη φυσιολογικών πρωτεϊνών.
- ✓ Τέτοιες αλλαγές, ανεξάρτητα από το μέγεθός τους, καλούνται **«Γενετικές τροποποιήσεις – αλλοιώσεις» (genetic alterations).**
- ✓ Στην διαδικασία αξιολόγησης του μηχανισμού εμφάνισης νοσημάτων **η παρουσία γενετικών και επιγενετικών αλλοιώσεων** πρέπει να εξετάζονται από κοινού, όπως οι δύο όψεις του ίδιου νομίσματος.

Τι χρειάζεται να γίνει για να αλλάξει ένα κύτταρο λειτουργία;

➤ Ένα κύτταρο που αλλάζει (π.χ. καρκινικό κύτταρο) είναι **ένα «αδίστακτο» κύτταρο που διαφεύγει από τους νόμους και τους κανόνες** που διέπουν την κυτταρική ζωή και λειτουργία.

➤ Τα αλλαγμένα κύτταρα είναι σε θέση να ταξιδέψουν μέσα στο σώμα και να εγκατασταθούν σε ένα διαφορετικό όργανο, **κατάσταση γνωστή ως μετάσταση**.

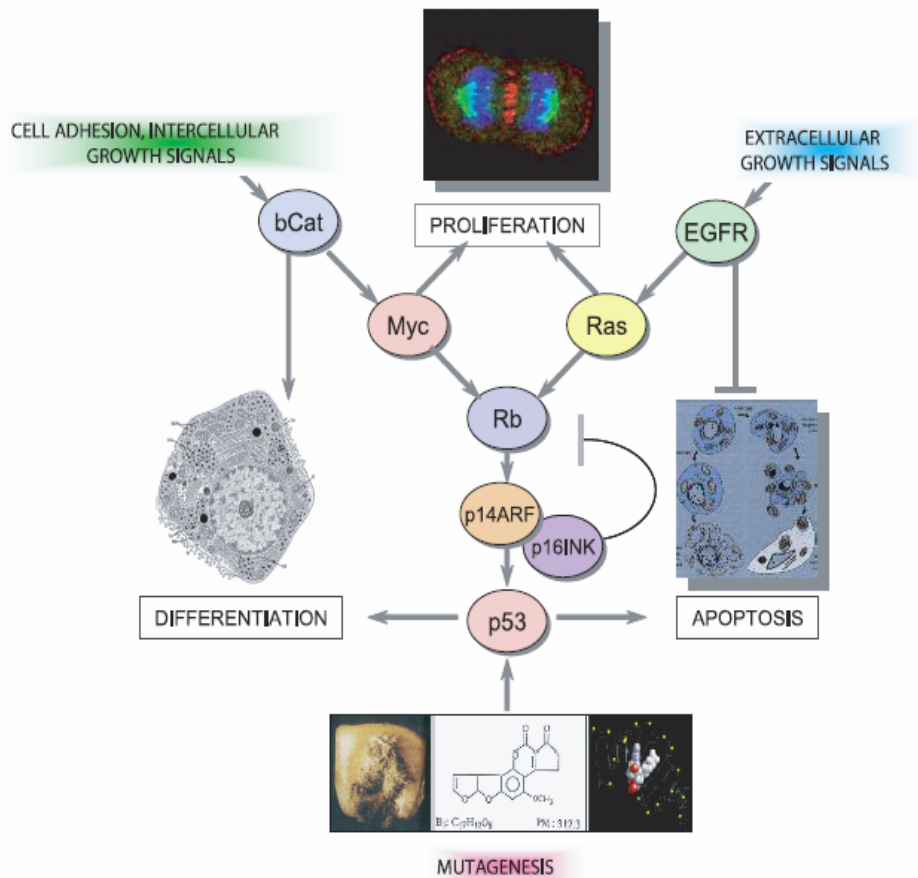
Πρόσφατες πειραματικές μελέτες έχουν εντοπίσει τον ελάχιστο αριθμό βημάτων που απαιτούνται για την ανάπτυξη ενός κυττάρου σε καρκινικό:

✓ Το πρώτο είναι ότι τα κύτταρα θα πρέπει να λάβουν κατάλληλα σήματα.

✓ Το δεύτερο τα κύτταρα να αναπτύξουν προβλήματα κατά αντιγραφή του DNA ή να ενεργοποιήσουν ενδοκυτταρικά μονοπάτια καταστροφής του DNA (αποπτωτικοί μηχανισμοί, μεταλλάξεις στο RB1 γονίδιο του ρετινοβλαστώματος και το γονίδιο TP53, που παράγει την πρωτεΐνη p53).

✓ Το τρίτο είναι ότι τα φυσιολογικά κύτταρα διαιρούνται περιορισμένα, σε σταθερούς αριθμούς. Με άλλα λόγια, τα κύτταρα έχουν έναν μετρητή που αποτρέπει την αναπαραγωγή του DNA πέρα από ένα ορισμένο αριθμό, έχοντας προκαθορισμένο αριθμό φορών.

Cancer Box



Η εικόνα απεικονίζει τις 3 διαφορετικές φάσεις της ζωής ενώ κυττάρου: τη διαίρεση (κορυφαία), τη διαφοροποίηση (αριστερά) και τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο κυττάρων (δεξιά).

• Η **κυτταρική προσκόλληση ενεργοποιείται** μέσω των beta - Catenin και τα ενδοκυτταρικά σήματα της ενεργοποίησης συγκλίνουν στο γονίδιο RB1 (ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου).

• Η **εξωκυττάρια ανάπτυξη σημάτων, πραγματοποιείται μέσω των ειδικών κυτταρικών υποδοχέων** με δραστηριότητα τυροσίνης κινάσης (RTK) και μέσω του γονιδίου (RAS).

• Στο κάτω μέρος του σχήματος υπάρχει το **μόριο ελέγχου της κυτταρικής διαίρεσης: η πρωτεΐνη p53**. Το γονίδιο TP53, που κωδικοποιεί την p53, είναι συχνά ο στόχος περιβαλλοντικών μεταλλαξιογόνων παραγόντων, όπως για παράδειγμα η αφλατοξίνη.

Οι γενετικές αλλοιώσεις και η συμβολή τους στην εμφάνιση νοσημάτων

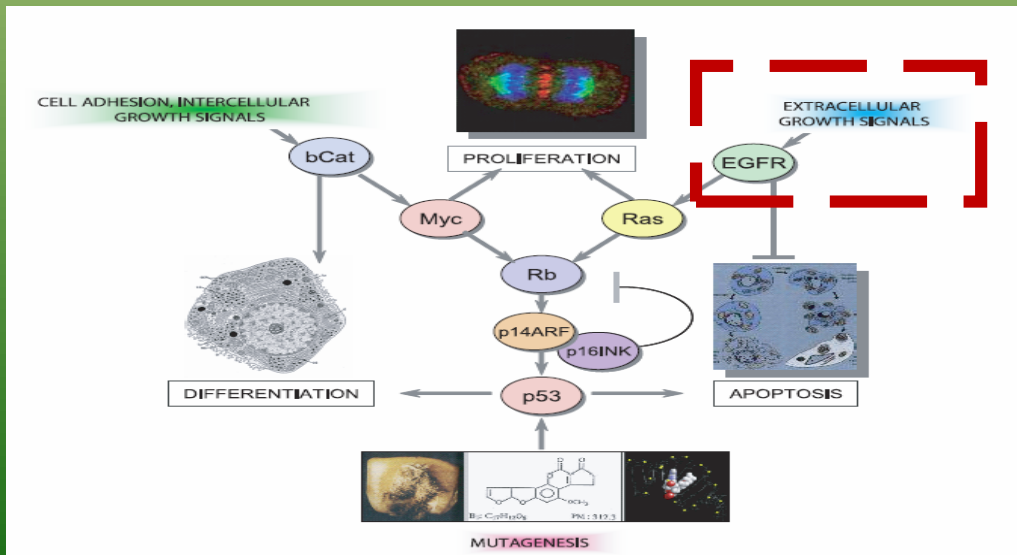
- ✓ **Οι γενετικές αλλαγές** είναι ο ακρογωνιαίος λίθος ασθενειών όπως ο καρκίνος.
- ✓ **Περίπου 300 διαφορετικά γονίδια έχει δειχθεί ότι εμφανίζουν μεταλλάξεις** και σχετίζονται με την εξέλιξη του ανθρώπινου καρκίνου.
- ✓ **Σχεδόν 20 με 30 γονίδια φαίνεται να είναι μεταλλαγμένα σχεδόν σε οποιοδήποτε τύπο καρκίνου.**
- ✓ **Αυτά τα γονίδια είναι «κύρια γονίδια»** και ελέγχουν πολύ βασικές κυτταρικές λειτουργίες απαραίτητες για τον έλεγχο της κυτταρικής διαίρεσης.
- ✓ Οι πρώτες μεταλλάξεις εξ' ορισμού έχουν συνδεθεί με τον καρκίνο πριν από την ανάπτυξη μιας βλάβης.
- ✓ Σε αρκετές περιπτώσεις **οι προσδιοριζόμενες μεταλλάξεις μπορεί να είναι καλοί δείκτες ανταπόκρισης σε θεραπευτικά σχήματα** και μπορεί να βοηθήσουν να γίνει η επιλογή της κατάλληλης θεραπείας που έχει τις μεγαλύτερες πιθανότητες επιτυχίας.

✓ Μεταλλάξεις **στον υποδοχέα EGF (EGFR)** βρίσκονται σε **20-40%** των καρκίνων του πνεύμονα σε μη καπνιστές.

✓ Αυτές οι μεταλλάξεις ενεργοποιούν τον υποδοχέα, δημιουργώντας **ένα σταθερό σήμα πολλαπλασιασμού** των κυττάρων.

✓ Το σήμα μπορεί **να μπλοκαρισθεί από μικρά ανασταλικά φάρμακα** όπως το gefitinib (Iressa) και το erlotinib (Tarceva).

✓ Αυτά τα φάρμακα έχουν ενδιαφέρουσες θεραπευτικές επιδράσεις σε ασθενείς με μεταλλάξεις του EGFR, αλλά **είναι ελάχιστα αποτελεσματικά στους περισσότερους ασθενείς που δεν φέρουν τις μεταλλάξεις.**



❖ Κύτταρα πολλών καρκίνων συσσωρεύουν μεταλλάξεις σε ένα ποσοστό σημαντικά υψηλότερο από ό, τι τα φυσιολογικά κύτταρα “Mutator Phenotype”

Ογκοκατασταλτικό γονίδιο TP53 : ένα παράδειγμα των κοινών γενετικών αλλαγών (1)

- ✓ Το πιο καλά μελετημένο γονίδιο είναι το TP53, **το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p53**, μια όγκοκατασταλτική πρωτεΐνη η οποία είναι μεταλλαγμένη περίπου στο ήμισυ του συνόλου των ανθρώπινων καρκίνων.
- ✓ **Έχουν εντοπιστεί πάνω από περίπου 24000 μεταλλάξεις του γονιδίου TP53** οι οποίες εν δυνάμει σχετίζονται με κάθε τύπο καρκίνου στον άνθρωπο.
- ✓ Οι περισσότερες από αυτές **εμπίπτουν μέσα σε ένα τμήμα της πρωτεΐνης που δεσμεύεται με το DNA**, εμποδίζοντας την p53 να ρυθμίσει αρκετές δεκάδες άλλων γονιδίων.
- ✓ Οι κύριες μεταλλάξεις είναι μεταλλάξεις αντικατάστασης **που μπορούν να διαταράξουν την αναδίπλωση της πρωτεΐνης με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η δέσμευση στο DNA** και να επάγεται η απώλεια λειτουργίας.

Ογκοκατασταλτικό γονίδιο TP53 : ένα παράδειγμα των κοινών γενετικών αλλαγών (2)

- ✓ Το στοιχείο αυτό έχει περιορισμένο αντίκτυπο στην κλινική αξιολόγηση διότι οι ίδιες πληροφορίες θα μπορούσαν να συναχθούν από άλλους δείκτες υπό εξέταση όπως το μέγεθος του όγκου, η επέκταση του σε σχέση με τους λεμφαδένες κτλ.
- ✓ Ωστόσο **μεταλλάξεις στο TP53 μπορούν να βοηθήσουν στην διάκριση μεταξύ των όγκων** από τους παθολόγους όταν φαίνονται ίδιοι.
- ✓ Μετάλλαξη λοιπόν **στο γονίδιο TP53 επιτρέπει την ταυτοποίηση των όγκων που βρίσκονται σε υψηλό κίνδυνο εξέλιξης** μεταξύ των όγκων που ταξινομούνται από τον παθολογοανατόμο ως «καλής πρόγνωσης».
- ✓ Είναι επομένως δυνατό **να διακριθούν εκείνοι οι ασθενείς που χρειάζονται πιο επιθετική θεραπεία.**
- ✓ Ανίχνευση τέτοιων μεταλλάξεων στο πλάσμα μπορεί να αξιοποιηθεί για την έγκαιρη ανίχνευση του καρκίνου.

ONCOGENES

PDGF Codes for platelet-derived growth factor. Involved in glioma (a brain cancer)

EGFR Codes for the receptor for epidermal growth factor. Involved in glioblastoma (a brain cancer) and breast cancer

HER-2 or ERBB2. Codes for a growth factor receptor. Involved in breast, salivary gland and ovarian cancers

RET Codes for a growth factor receptor. Involved in thyroid cancer

KRAS Involved in lung, ovarian, colon and pancreatic cancers

NRAS Involved in leukaemias

MYC1 Involved in leukaemias and breast, stomach and lung cancers

NMYC Involved in neuroblastoma (a nerve cell cancer) and glioblastoma

LMYC Involved in lung cancer

BCL2 Codes for a protein that normally blocks cell suicide. Involved in follicular B cell lymphoma

CCND1 or PRAD1 Codes for cyclin D1, a stimulatory component of the cell cycle clock. Involved in breast, head and neck cancers

CTNB1 Codes for beta-catenin, involved in liver cancers

MDM2 Codes for an antagonist of the p53 tumor suppressor protein. Involved in sarcomas (connective tissue cancers) and other cancers

TUMOUR SUPPRESSOR GENES

APC Involved in colon and stomach cancers

DPC4 Codes for a relay molecule in a signalling pathway that inhibits cell division. Involved in pancreatic cancer

NF-1 Codes for a protein that inhibits a stimulatory (Ras) protein. Involved in neurofibroma and pheochromocytoma (cancers of the peripheral nervous system) and myeloid leukemia

NF-2 Involved in meningioma and ependymoma (brain cancers) and schwannoma (affecting the wrapping around peripheral nerves)

CDKN2A or MTS1 Codes for the p16 protein, a braking component of the cell cycle clock.

Involved in a wide range of cancers

RB1 Codes for the pRB protein, a master brake of the cell cycle. Involved in retinoblastoma and bone, bladder, small cell lung and breast cancer

TP53 Codes for the p53 protein, which can halt cell division and induce abnormal cells to kill themselves. Involved in a wide range of cancers

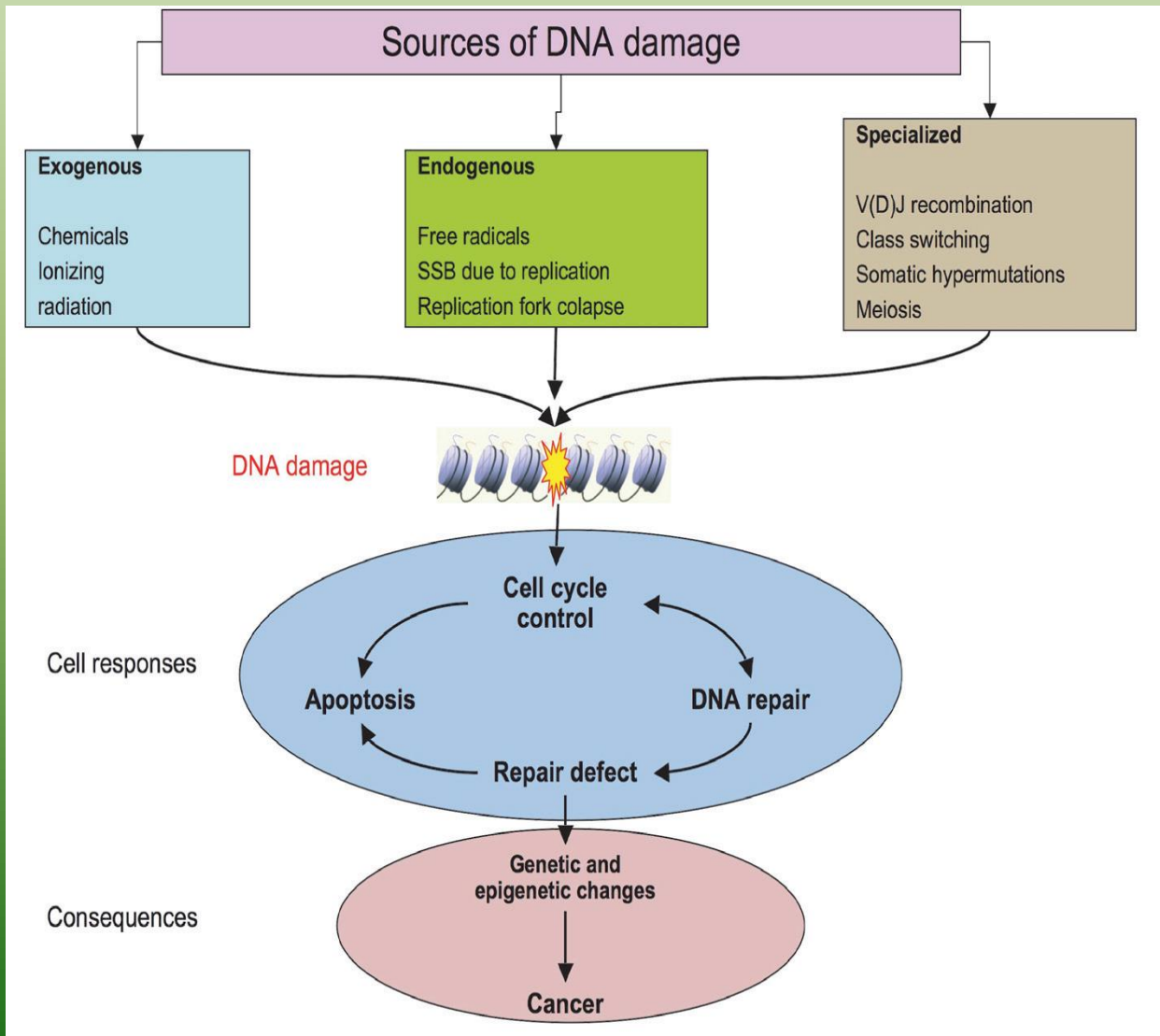
WT1 Involved in Wilms' tumour of the kidney

BRCA1 Involved in breast and ovarian cancers

BRCA2 Involved in breast cancer

VHL Involved in renal cell cancer

Μηχανισμοί βλαβών στο γενετικό υλικό και μηχανισμοί επιδιόρθωσης (DNA Damage- DNA repair)



✓Ακόμα και υπό κανονικές κυτταρικές συνθήκες, **το γονιδιακό DNA βρίσκεται υπό συνεχή πίεση για βλάβες στο DNA** τόσο από ενδογενείς όσο και εξωγενείς παράγοντες.

✓**Η επιδιόρθωση του DNA αντιπροσωπεύει ένα οπλοστάσιο** ρυθμίσεων για τα κύτταρα, με στόχο να επιτύχουν την γονιδιωματική ακεραιότητα

✓ Το πρώτο βήμα της διαδικασίας επισκευής μιας βάση περιλαμβάνει την αναγνώριση μιας τροποποιημένης βάσης στο DNA από τα ένζυμα που ανιχνεύουν βλάβες ή στρεβλώσεις στην έλικα του DNA.

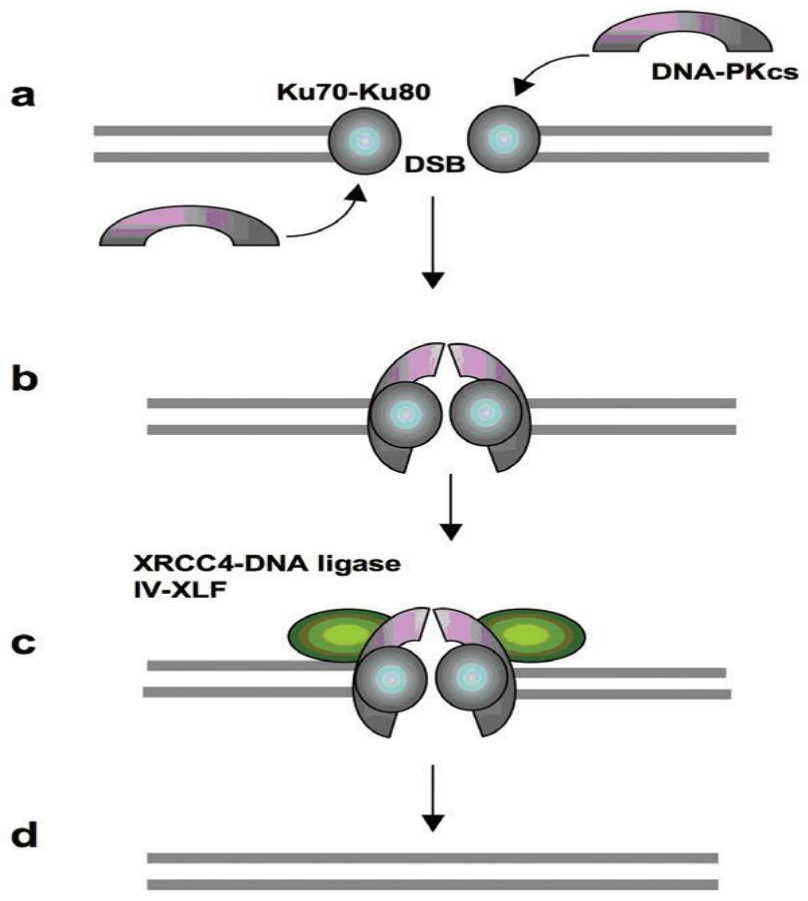
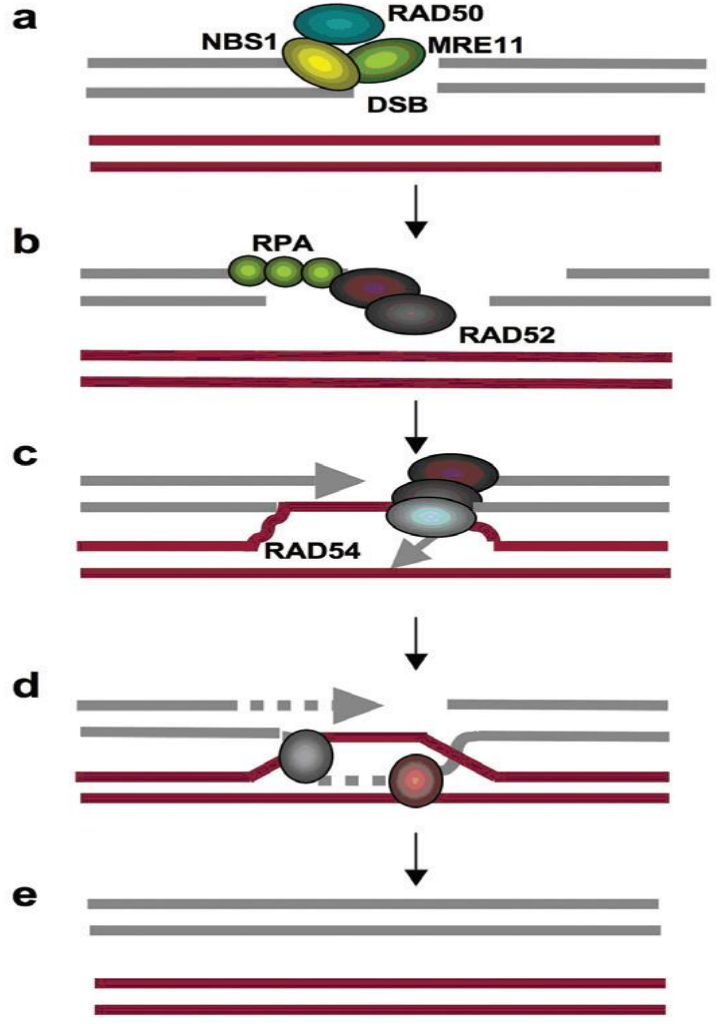
✓ Την αναγνώριση ακολουθεί η αποκοπή και η επισκευή των νουκλεοτιδίων.

✓ Το στάδιο αυτό ακολουθείται που ακολουθείται από την αποκοπή του DNA και την ολοκλήρωση της διαδικασίας επιδιόρθωσης.

✓ Η διαδικασία εκτομής νουκλεοτιδίων μπορεί να συμβεί σε περιοχές που δεν μεταγράφονται (Μη-κωδικοποιησες περιοχές).

DNA double-strand breaks

- ✓ Τα **DSBs** είναι αναμφισβήτητα το πιο επικίνδυνο είδος αλλοιώσεων του DNA που δημιουργούνται συνεχώς κατά τη διάρκεια ζωής ενός κυττάρου.
- ✓ Τα **DSBs** προκύπτουν από τα δύο εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες και χαρακτηρίζονται από μια σημαντική απώλεια της ακεραιότητας του γονιδιώματος καθώς μπορούν να οδηγήσουν σε επαγωγή μετάλλαξης, ογκογόνο μετασχηματισμό ή κυτταρικό θάνατο.
- ✓ Τα κύτταρα των θηλαστικών μπορεί να υπόκεινται σε τουλάχιστον **10 000 διαφορετικές αλλοιώσεις κάθε μέρα**, οι οποίες μπορούν κάλλιστα να αντιπροσωπεύουν μια χαμηλή θεραπευτική προοπτική.
- ✓ Υπάρχουν δύο βασικοί τύποι επιδιόρθωσης του DNA, η **επιδιόρθωση με ομόλογο ανασυνδυασμό (HR)** και με **μη ομόλογο ανασυνδυασμό (NHEJ)**.

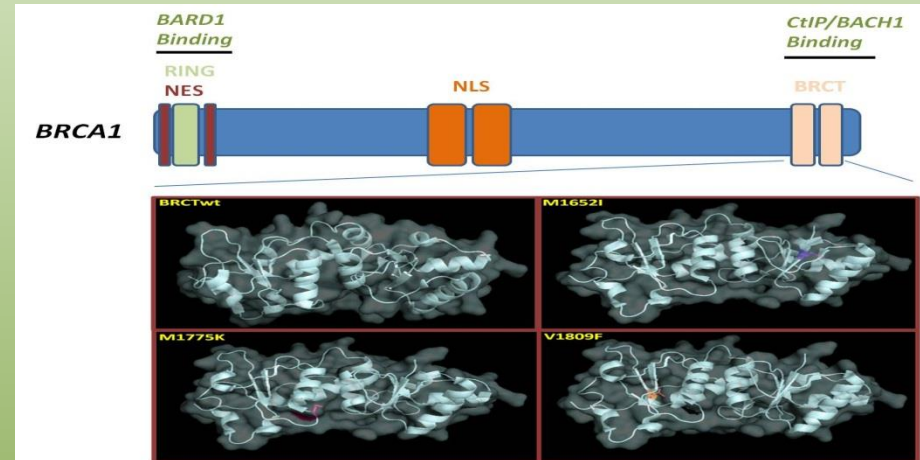
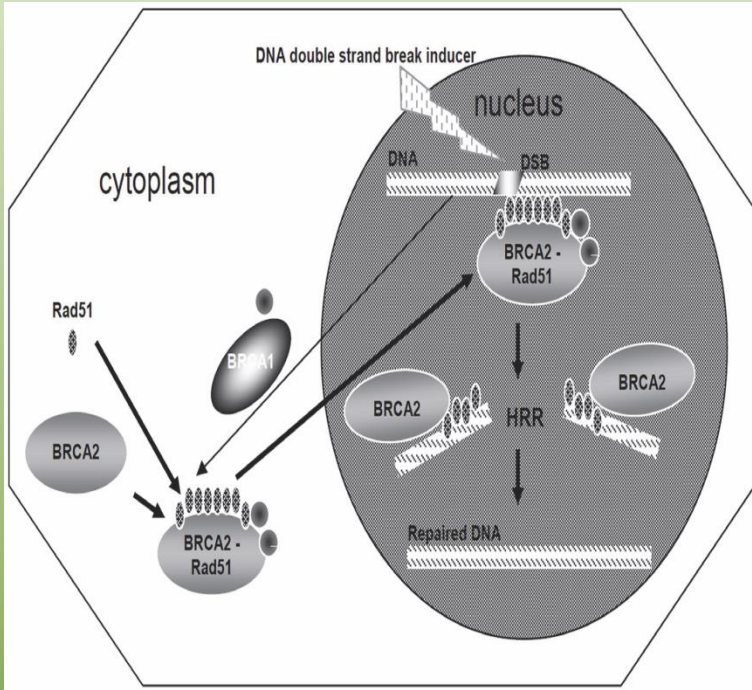
A**NHEJ****B****Homology-directed repair**

Μονοπάτια επιδιόρθωσης του DNA. Σε μη ομόλογο ανασυνδυασμό το κτεροδιμερές (NHEJ), δεσμεύεται σε ένα ελεύθερο άκρο DNA (DSB) και οριοθετεί την διαμόρφωση του συμπλόκου DNA-PKcs. Στη συνέχεια, το διμερές XRCC4 / λιγάση IV συνδέεται με καθένα από τα άκρα του DNA. Άλλες πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε αυτή την διαδικασία, περιλαμβάνουν το σύμπλοκο MRE11 / Rad50 / Nbs1 (XRS2). Σε ομόλογο ανασυνδυασμό (HR), τα DSB αναγνωρίζονται από το σύμπλεγμα MRN (ένα σύμπλεγμα MRE11, RAD50 και NBS1) και ακολουθεί εκτομή των άκρων του DNA επιτρέποντας τη σύνδεση των RPA, RAD51 και RAD52 στο μονόκλωνο DNA.

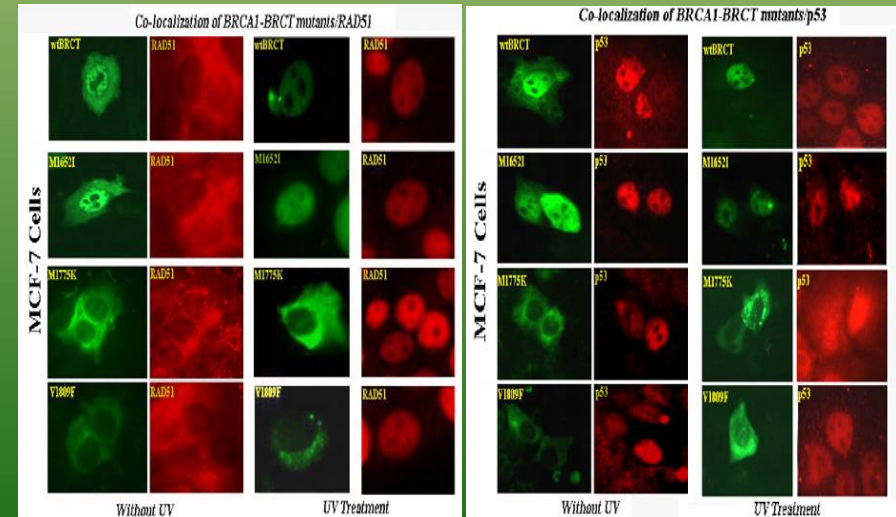
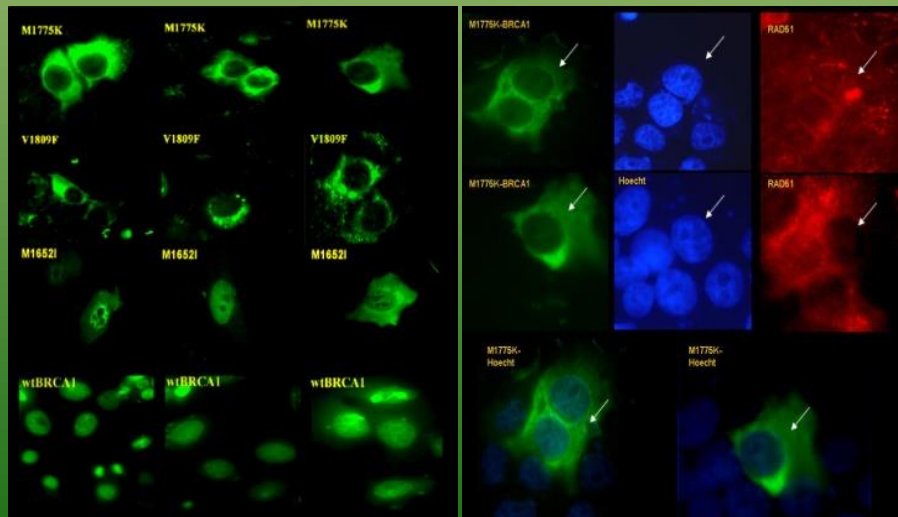
Gene	Cellular phenotype	Mouse-knockout phenotype
Non-Homologous end-joining (NHEJ)		
<i>Ku70</i>	Radiosensitivity, impaired V(D)J recombination	Radiosensitivity, SCID phenotype, T-cell tumours, growth retardation
<i>Ku80</i>	Radiosensitivity, impaired V(D)J recombination	Radiosensitivity, SCID phenotype, T-cell tumours, growth retardation
<i>DNA-PKcs</i>	Radiosensitivity, impaired V(D)J recombination	Radiosensitivity, SCID phenotype, T-cell tumours
<i>XRCC4</i>	Radiosensitivity, impaired V(D)J recombination	Embryonic lethality, apoptosis of post-mitotic neurons
<i>LIG4 (Ligase IV gene)</i>	Radiosensitivity, impaired V(D)J recombination	Embryonic lethality, apoptosis of post-mitotic neurons
Homology-directed repair (HDR)		
<i>ATM</i>	Radiosensitivity, chromosomal instability, radioresistant DNA synthesis	Radiosensitivity, T-cell tumours, neurological dysfunction, growth retardation, infertility
<i>BRCA1</i>	Not viable	Embryonic lethality
<i>BRCA2</i>	Not viable	Embryonic lethality
<i>RAD51</i>	Not viable, chromosomal aberrations	Embryonic lethality
<i>RAD52</i>	Impaired homologous recombination	Moderate impairment of homologous recombination
<i>RAD54</i>	Radiosensitivity, MMC sensitivity, impaired homologous recombination	Radiosensitivity
<i>XRCC2</i>	Radiosensitivity	Embryonic lethality, chromosomal instability
NHEJ and HDR combined		
<i>MRE11</i>	Not viable, chromosomal instability	-
<i>RAD50</i>	Not viable	Embryonic lethality

Κυτταρικοί φαινότυποι και φαινότυποι σε ποντίκια Knock out που σχετίζονται με μεταλλάξεις στα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA

Ο ρόλος των BRCA1 και RAD51 στην απώλεια της ικανότητας επιδιόρθωσης του DNA



Molecular modeling analysis of the BRCA1-BRCT mutants and BRCA1-BRCTwt.



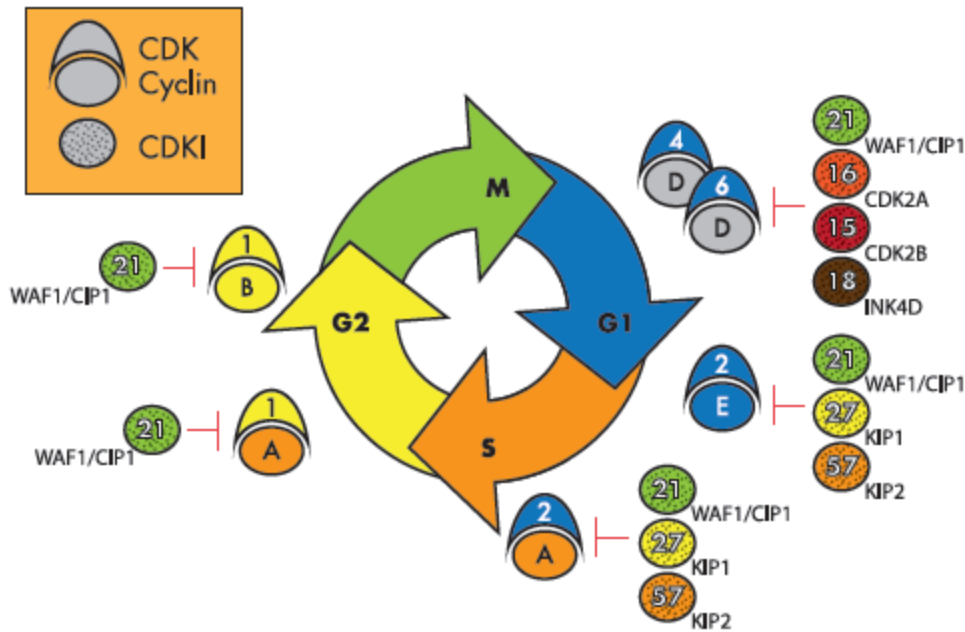
Μόρια που ελέγχουν την πορεία του κυτταρικού κύκλου

- ✓ Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων διενεργείται μέσα σε μια σειρά στάδια που συλλογικά **ονομάζονται κυτταρικός κύκλος**.
- ✓ Ο κυτταρικός κύκλος μπορεί να διακριθεί **σε δύο φάσεις κάθε μια από τις οποίες έχει διακριτά μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά**.
- ✓ Την φάση M («Μίτωση»), κατά τη διάρκεια της οποίας γίνεται η διαίρεση των κυττάρων και η κατανομή του γενετικού υλικού,
- ✓ Και την **μεσόφαση η οποία διακρίνεται στις φάσεις G1, S («σύνθεση»)** όπου γίνεται η αντιγραφή του γενετικού υλικού και την φάση **G2 που προηγείται της μίτωσης**.
- ✓ Ο έλεγχος της κυτταρικής διαίρεσης είναι κρίσιμης σημασίας να φυσιολογική ιστική δομή και λειτουργία.

Ρυθμιστικά γονίδια του κυτταρικού κύκλου που συνήθως τροποποιούνται στις περιπτώσεις ανθρώπινων καρκίνων

Gene (chromosome)	Product	Type of alteration	Role in cell cycle	Involvement in cancer
p53 (17p13)	p53	Mutations, deletions	Control of p21, 14-3-3σ, etc.	Altered in over 50% of all cancers
CDKN2A (9p22)	p16 and p19arf	Mutations, deletions, hypermethylation	Inhibition of CDK4 and 6	Altered in 30-60% of all cancers
RB1 (13q14)	pRb	Deletions	Inhibition of E2Fs	Lost in retinoblastomas, altered in 5-10% of other cancers.
CCND1	Cyclin D1	Amplification	Progression into G1	10-40% of many carcinomas
CDC25A, CDC25B	cdc25	Overexpression	Progression in G1, G2	10-50% of many carcinomas
KIP1	p27	Down-regulation	Progression in G1/S	Breast, colon and prostate cancers

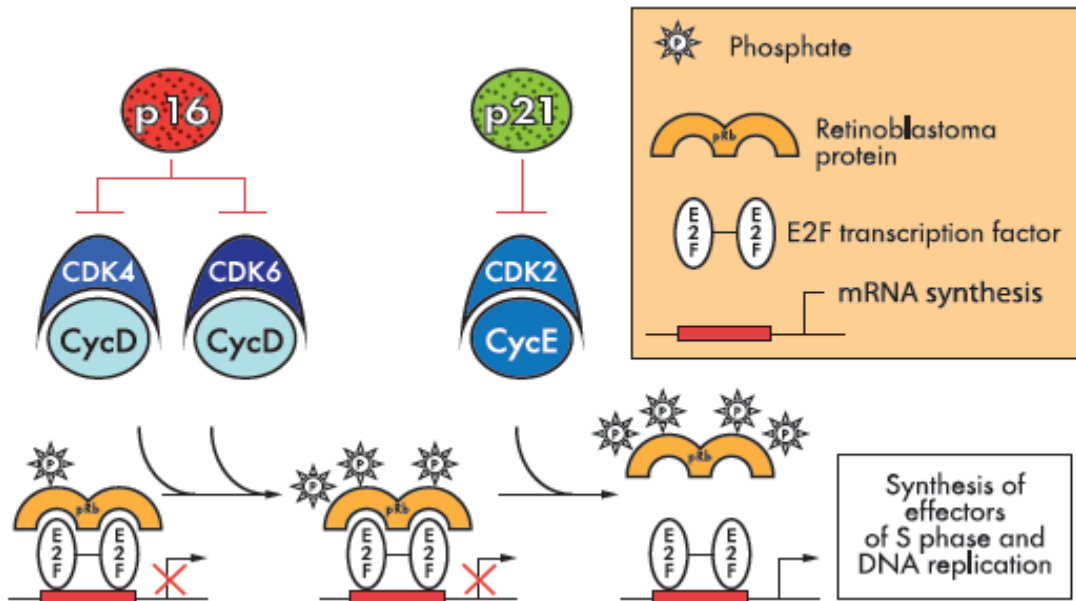
Η πρόοδος στα διάφορα στάδια του κυτταρικού κύκλου είναι κυρίως ελεγχόμενη από τις κυκλίνες, που συνδέονται με τις κινάσες και τους αντίστοιχους αναστολείς του κυτταρικού κύκλου. Το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος (RB) και η p53 είναι τα σημαντικότερα ογκοκατασταλτικά γονίδια που εμπλέκονται στα σημεία ελέγχου της μετάβασης μεταξύ των σταδίων G1/S.



Η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου εξαρτάται από τη διαδοχική ενεργοποίηση και απενεργοποίηση των συμπλοκών κυκλίνης / CDK.

Αυτή η διαδικασία απαιτεί:

- ✓τη σύνθεση των κυκλινών,
- ✓το σχηματισμό ενός συμπλόκου μεταξύ μιας ειδικής κυκλίνης και της CDK,
- ✓και την τροποποίηση της CDK ώστε να μετατρέψει το ένζυμο σε μια ενεργό μορφή.



Η δραστηριότητα του ενζύμου μπορεί να διαταραχθεί από ένα συγκεκριμένο αναστολέα τον CDK1.

Κυτταρικός θάνατος - απόπτωση

- ✓ **Ο όρος <<απόπτωση>> αναφέρεται σε έναν τύπο κυτταρικού θανάτου** που λαμβάνει χώρα τόσο φυσιολογικά ή σε απόκριση σε εξωτερικά ερεθίσματα, συμπεριλαμβανομένων των ακτινογραφιών και των αντικαρκινικών φαρμάκων.
- ✓ **Η απόπτωση χαρακτηρίζεται από διακριτές μορφολογικές αλλαγές** διαφορετικές από εκείνες που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της νέκρωσης, οι οποίες ακολουθούν μια ισχαιμική ή τοξική βλάβη.
- ✓ **Η απόπτωση ρυθμίζεται από διάφορα διακριτά μονοπάτια σηματοδότησης** και η απορρύθμιση της μπορεί να οδηγήσει σε **διαταραγμένη ανάπτυξη των κυττάρων** και έτσι να συμβάλει στην καρκινογένεση.
- ✓ **Η επιλεκτική επαγωγή κυτταρικής απόπτωσης** σε καρκινικά κύτταρα είναι μεταξύ των σημερινών στρατηγικών για την ανάπτυξη νέων θεραπειών του καρκίνου.

Οι βιοδείκτες και η σημασία τους στην θεραπευτική αντιμετώπιση

✓ Ένας ιδανικός βιοδείκτης πρέπει να έχει 100% ευαισθησία και ειδικότητα.

✓ Δηλαδή, ο καθένας ασθενής με την ασθένεια να έχει θετική αντίδραση και ο καθένας χωρίς την ασθένεια να έχει αρνητική αντίδραση.

✓ Κανένας από τους διαθέσιμους βιοδείκτες σήμερα δεν έχει επιτύχει 100% ευαισθησία και ειδικότητα.

✓ Το ειδικό προστατικό αντιγόνο (PSA), σήμερα είναι ο καλύτερος βιοδείκτης του ορού για τον εντοπισμό του καρκίνου του προστάτη, έχει υψηλή ευαισθησία (μεγαλύτερη από 90%), αλλά χαμηλή ειδικότητα (περίπου 25%), γεγονός που οδηγεί πολλούς άνδρες σε βιοψία χωρίς ανιχνεύσιμο καρκίνο του προστάτη.

✓ Ο βιοδείκτης για τον καρκίνο του μαστού CA15.3, έχει μόνο 23% ευαισθησία και 69% ειδικότητα και είναι χρήσιμος μόνο για την παρακολούθηση της θεραπείας του προχωρημένου καρκίνου του μαστού.

Table 1 – Biological roles of oncological predictive biomarkers (modified from Kalia 2013).

Malignancy	Predictive biomarker (mutated gene or receptor)	Gene abnormality	Type of drug therapy	Biological role of biomarker
Chronic myeloid leukemia (CML)	BCR-ABL	Translocation. Chromosome abnormality	imatinib dasatinib nilotinib bosutinib ponatinib	BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor
Colorectal (CRC)	EGFR, K-ras G13D, B-raf V600E DPD UGT 1A1	gene expression gene mutation gene mutation deficiency genotyping	imatinib cetuximab, panitumumab	Signaling protein downstream of primary target — EGFR. K-ras
Breast	No mutated gene, (estrogen receptor) ER/PR gene expression	None	tamoxifen. aromatase inhibitor fulvestrant	Primary target Drug metabolism (positive predictive and prognostic biomarkers)
Breast	BRCA1/2 HER2/neu (Erb-B2)	Mutation, deletion Gene amplification	olaparib trastuzumab trastuzumab- emtansine	Predictive and prognostic biomarkers
NSCLC	EGFR ERCC RRM 1 K-ras TS EML4-Alk	gene expression gene expression, gene expression, gene mutation gene expression gene mutation	gefitinib erlotinib Platinum Biological roles of oncological biomarkers. agents	DNA repair Downstream of primary target
Melanoma	BRAF	Mutation	Vemurafenib, dabrafenib	Targets downstream MapK kinases

BCR-ABL, The tyrosine kinase BCR-ABL is the fusion product of a reciprocal chromosome translocation between chromosomes 9 and 22, known as the Philadelphia (Ph) chromosome;

BRAF, BRAF is a human gene that makes a protein called B-Raf;

BRCA 1/2, BRCA1 and BRCA2 are human genes that produce tumor suppressor proteins;

B-raf V600E, B-Raf is a 766-amino acid, regulated signal transduction serine/threonine-specific protein kinase. BRAF V600E is a determinant of sensitivity to proteasome inhibitors;

CML, chronic myeloid leukemia;

CRC, colorectal cancer;

DPD, dihydropyrimidine dehydrogenase;

EGFR, epidermal growth factor receptor;

EML4-Alk, echinoderm microtubule-associated protein-like 4-anaplasticlymphoma kinase;

ER/PR, estrogen receptor/progesterone receptor;

ERCC, Excision repair-cross complementation group;

ERCC, excision cross complementing

HER2/neu (Erb-B2), human epidermal growth factor receptor type;

K-ras G₁₃D, The G13D mutation results in an amino acid substitution at position 13 in KRAS, from a glycine (G) to an aspartic acid (D);

MGMT, methylguanine methyl transferase;

NSCLC, non-small-cell lung cancer;

RRM 1, ribonucleotide reductase;

TPMT, thiopurine methyl transferase;

TS, thymidylate synthase;

UGT 1A1, uridine glucuronyltransferase.

Καρκίνος του παχέος εντέρου

Πέντε βιοδείκτες του καρκίνου του παχέος εντέρου θεωρούνται «αναδυόμενοι βιοδείκτες»:

- 1) έκφραση του γονιδίου EGFR,
- 2) μετάλλαξη G13D στο γονίδιο K-ras,
- 3) η γονιδιακή μετάλλαξη V600E του B-raf,
- 4) η ανεπάρκεια της αφυδρογονάσης της διυδροπυριμιδίνης.
- 5) και ο γονότυπος UGT 1A1 I.

✓Ο K-ras είναι ο μόνος έξυπνος βιοδείκτης που αξιολογεί την θεραπεία με αντι-EGFR μονοκλωνικά αντισώματα στο καρκίνο του παχέος εντέρου.

✓Περίπου το 40% των καρκίνων του παχέος εντέρου είναι θετικοί σε μεταλλάξεις στο γονίδιο K-ras (στα κωδικόνια 12,13, 61) και αυτοί οι τύποι είναι ανθεκτικοί σε αντι-EGFR μονοκλωνικά αντισώματα (cetuximab και panitumumab).

Καρκίνος του μαστού

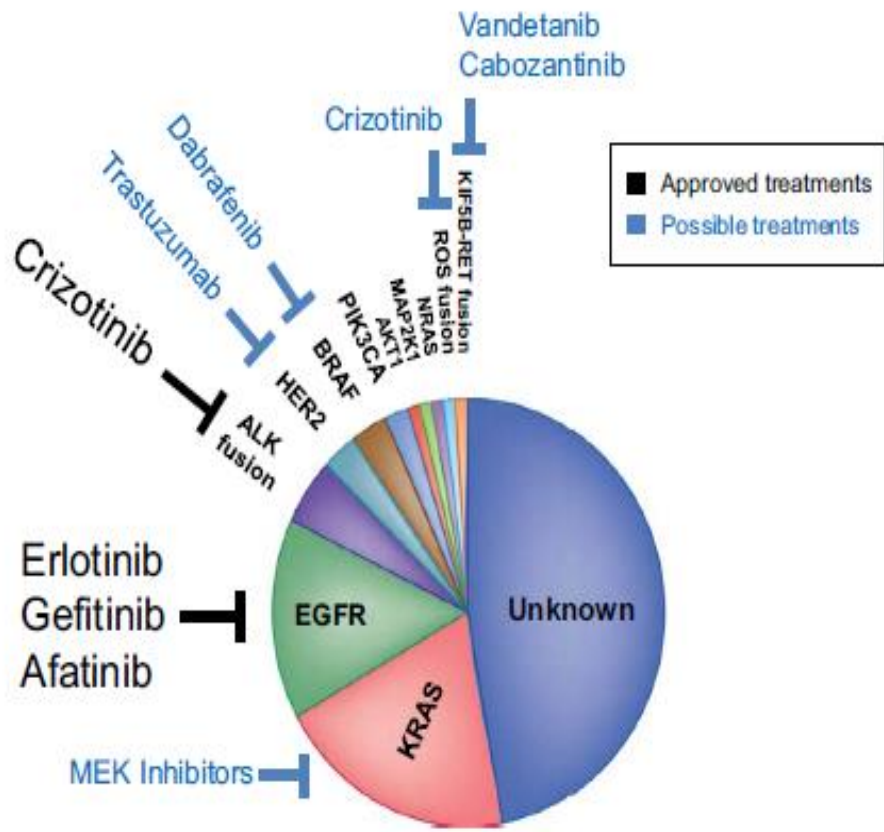
Τέσσερις είναι οι κυριότεροι βιοδείκτες του καρκίνου του μαστού:

- 1) έκφραση του υποδοχέα των οιστρογόνων και της προγεστερόνης (ER & PR),
- 2) ο HER2 (neu) (Erb-B2),
- 3) ο Oncotype Dx (21-gene RT-pcR),
- 4) το CYP2D6 genotyping (Cytochrome P450)

✓Οι υποδοχείς οιστρογόνων και προγεστερόνης είναι αμφότεροι προγνωστικοί βιοδείκτες.

✓Οι HER2 - αρνητικοί όγκοι δεν ανταποκρίνονται στην τραστοζουμάμπη.

✓Οι HER2-θετικοί όγκους (με υπερέκφραση του γονιδίου HER2) βρίσκονται στο 20% των γυναικών με καρκίνο του μαστού



✓Ο προσδιορισμός των μεταλλάξεων των αντίστοιχων γονιδίων μπορεί να οδηγήσει στην έρευνα νέων συγκεκριμένων φαρμάκων ειδικών για το εκάστοτε μοριακό μονοπάτι δίνοντας την κατάλληλη «προσωπική» αντικαρκινική θεραπεία

Μοριακά υποσύνολα του αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα και η ευαισθησία τους σε στοχευμένες θεραπείες. Στο συγκεκριμένο γράφημα φαίνονται μεταλλάξεις σε δείγματα αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα. **Οι θεραπείες που χρησιμοποιούνται σήμερα επισημαίνονται με μαύρο (μαύρο) ενώ τα μόρια που έχουν αποδειχθεί ότι είναι δραστικά έναντι συγκεκριμένων μεταλλάξεων φαίνονται με κυανό (μπλε).**

Drug	Approval year	Gene	Type of marker	Type of testing	Referenced subgroup
Ado-trastuzumab emtansine	2013	<i>ERBB2</i>	Efficacy	Required	HER2 protein overexpression or gene amplification positive
Afatinib	2013	<i>EGFR</i>	Efficacy	Required	<i>EGFR</i> exon 19 deletion or exon 21 substitution (L858R) mutation positive
Anastrozole	1995	<i>ESR1, PGR</i>	Efficacy	Informative	Hormone receptor positive
Arsenic trioxide	2000	<i>PML/RARA</i>	Efficacy	Required	<i>PML/RARα</i> (t(15;17)) gene expression positive
Bosutinib	2012	<i>BCR-ABL</i>	Efficacy	Required	Philadelphia chromosome (t(9;22)) positive
Brentuximab vedotin	2011	<i>TNFRSF8</i>	Efficacy	Informative	CD30 positive
Busulfan	1954	<i>BCR-ABL</i>	Efficacy	Actionable	Ph chromosome negative
Cetuximab)	2004	<i>EGFR</i>	Efficacy	Required	EGFR protein expression positive
Cetuximab	2004	<i>KRAS</i>	Efficacy	Required	<i>KRAS</i> codon 12 and 13 mutation negative
Crizotinib	2011	<i>ALK</i>	Efficacy	Required	<i>ALK</i> gene rearrangement positive
Dabrafenib	2013	<i>BRAF</i>	Efficacy	Required	<i>BRAF</i> V600E mutation positive
Dasatinib	2006	<i>BCR-ABL</i>	Efficacy	Required	Philadelphia chromosome (t(9;22)) positive; T315I mutation positive
Denileukin diftitox	1999	<i>IL2RA</i>	Efficacy	Required	CD25 antigen positive
Erlotinib	2004	<i>EGFR</i>	Efficacy	Required	EGFR protein expression positive
Erlotinib	2004	<i>EGFR</i>	Efficacy	Required	<i>EGFR</i> exon 19 deletion or exon 21 substitution (L858R) positive
Everolimus	2009	<i>ERBB2</i>	Efficacy	Actionable	HER2 protein overexpression negative
Everolimus	2009	<i>ESR1</i>	Efficacy	Actionable	Oestrogen receptor positive
Exemestane	1999	<i>ESR1</i>	Efficacy	Informative	Oestrogen receptor positive
Fulvestrant	2002	<i>ESR1</i>	Efficacy	Required	Oestrogen receptor positive
Ibritumomab tiuxetan	2002	<i>MS4A1</i>	Efficacy	Informative	CD20 positive
Imatinib	2003	<i>KIT</i>	Efficacy	Required	c- <i>KIT</i> D816V mutation negative
Imatinib	2003	<i>BCR-ABL</i>	Efficacy	Required	Philadelphia chromosome (t(9;22)) positive
Imatinib	2003	<i>PDGFRB</i>	Efficacy	Required	<i>PDGFR</i> gene rearrangement positive
Imatinib	2003	<i>FIP1L1/PDGFRα</i>	Efficacy	Required	FIP1L1/PDGFRα fusion kinase (or CHIC2 deletion) positive
Lapatinib	2007	<i>ERBB2</i>	Efficacy	Required	HER2 protein overexpression positive
Letrozole	1997	<i>ESR1, PGR</i>	Efficacy	Actionable	Hormone receptor positive
Nilotinib	2007	<i>BCR-ABL</i>	Efficacy	Required	Philadelphia chromosome (t(9;22)) positive
Ofatumumab	2009	<i>MS4A1</i>	Efficacy	Informative	CD20 positive
Omacetaxine	2012	<i>BCR-ABL</i>	Efficacy	Required	BCR-ABL T315I

Drug	Approval year	Gene	Type of marker	Type of testing	Referenced subgroup
Panitumumab	2006	<i>EGFR</i>	Efficacy	Required	EGFR protein expression positive
Panitumumab	2006	<i>KRAS</i>	Efficacy	Required	<i>KRAS</i> Codon 12 and 13 mutation negative
Pertuzumab	2012	<i>ERBB2</i>	Efficacy	Required	HER2 protein overexpression positive
Ponatinib	2012	<i>BCR-ABL</i>	Efficacy	Actionable	Philadelphia chromosome (<i>t(9;22)</i>) positive, <i>BCR-ABL</i> T315I mutation
Rituximab	1997	<i>MS4A1</i>	Efficacy	Informative	CD20 positive
Tamoxifen	1977	<i>ESR1</i> , <i>PGR</i>	Efficacy	Actionable	Hormone receptor positive
Tositumomab	2003	<i>MS4A1</i>	Efficacy	Informative	CD20 antigen positive
Trametinib	2013	<i>BRAF</i>	Efficacy	Required	<i>BRAF</i> V600E/K mutation positive
Trastuzumab	1998	<i>ERBB2</i>	Efficacy	Required	HER2 protein overexpression positive
Tretinoin	1995	<i>PML/RARA</i>	Efficacy	Required	<i>PML/RARα</i> (<i>t(15;17)</i>) gene expression positive
Vemurafenib	2011	<i>BRAF</i>	Efficacy	Required	<i>BRAF</i> V600E mutation positive
CapedTABine	1998	<i>DPYD</i>	Toxicity	Actionable	DPD deficient
Cisplatin	1978	<i>TPMT</i>	Toxicity	Actionable	TPMT intermediate or poor metabolizers
Dabrafenib	2013	<i>G6PD</i>	Toxicity	Actionable	G6PD deficient
Fluorouracil	2000	<i>DPYD</i>	Toxicity	Actionable	DPD deficient
Irinotecan	1996	<i>UGT1A1</i>	Toxicity	Actionable	<i>UGT1A1</i> *28 allele carriers
Mercaptopurine	1953	<i>TPMT</i>	Toxicity	Recommended	TPMT intermediate or poor metabolizers
Nilotinib	2007	<i>UGT1A1</i>	Toxicity	Actionable	<i>UGT1A1</i> *28 allele homozygotes
Pazopanib	2009	<i>UGT1A1</i>	Toxicity	Actionable	(TA)7/(TA)7 genotype (<i>UGT1A1</i> *28/*28)
Rasburicase	2002	<i>G6PD</i>	Toxicity	Required	G6PD deficient
Tamoxifen	1977	<i>F5</i>	Toxicity	Actionable	Factor V Leiden carriers
Tamoxifen	1977	<i>F2</i>	Toxicity	Actionable	Prothrombin mutation G20210A
Thioguanine	1966	<i>TPMT</i>	Toxicity	Actionable	TPMT poor metabolizer

Συμπεράσματα

Η πρόοδος της φαρμακογονιδιωματικής και η επιλογή της κατάλληλης θεραπευτικής αντιμετώπισης έχει μέχρι σήμερα καθυστερήσει:

(i) λόγω της έλλειψης μελετών με μεγάλο αριθμό από δείγματα,

(ii) λόγω της έλλειψης από τυποποιημένες δοκιμασίες για εις βάθος μοριακό χαρακτηρισμό των περιπτώσεων και

(iii) λόγω της ένταξης και ανάλυσης των δεδομένων σε διαφορετικά επίπεδα ανάλυσης.

✓ Οι τεχνολογικές εξελίξεις έχουν οδηγήσει σε μια άνευ προηγουμένου αύξηση στην κατανόηση των μοριακών χαρακτηριστικών των ασθενών και των κυττάρων του όγκου.

✓ Ένας σημαντικός περιορισμός στην χρήση στοχευμένων φαρμάκων είναι ότι οι περισσότερες απαντήσεις είναι παροδικές και οι όγκοι αποκτούν ανοχή στα φάρμακα μέσω γενετικών και μη γενετικών μηχανισμών.

✓ Η ακόμη καλύτερη κατανόηση των μοριακών μηχανισμών εξέλιξης της νόσου θα οδηγήσει σε πιο ακριβής διαστρωμάτωση των ασθενών.

✓ Ο καθορισμός της απόκρισης κάθε υποκατηγορίας όγκου ή ασθένειας σε στοχευμένη θεραπεία είναι μια πρόκληση.

✓ Επιπλέον, αν και επί του παρόντος οι εγκεκριμένες στοχευμένες θεραπείες και κλινικές μελέτες επικεντρώνονται στην μεταβλητότητα μεταξύ ασθενών, η αξιολόγηση της ανομοιογένειας ενός όγκου θα γίνεται ολοένα και πιο σημαντική στο μέλλον.

Τέλος οι νεώτερες συνεχώς εξελισσόμενες τεχνολογίες μπορεί επίσης να διευκολύνουν:

- (i) τη χρήση μη επεμβατικών τεχνικών (π.χ. υγρό βιοψίας) ακόμη και για την ταξινόμηση των όγκων
- (ii) την διάκριση σε διακριτούς μοριακούς υποτύπους,
- (ii) την παρακολούθηση της νόσου και την ανταπόκριση στη θεραπεία και
- (iii) τον προσδιορισμό των κατάλληλων βιοδεικτών.