

Přehled postupů v diagnostice nádorových onemocnění technikami molekulární biologie

O.Topolčan, M.Pesta

Lékařská Fakulta UK v Plzni a FN Plzeň

Témata přednášky

- Imunoanalýza a onkologie
- DNA a nádory
- Parametry molekulární biologie
- Metody stanovení
- Využití
 - V diagnostice
 - Volbě a monitoraci léčby
- Výzkum x rutinní praxe
- Perspektivy

Využití imunoanalytických metod v onkologii

Současný stav

- Screening – ne
- Časná diagnostika – Ca prostaty
- Dif. diagnostika - Ca prostaty , Ca vaječníků ,
chorioepiteliom, Ca varlat
- Follow up nádoru

Limitace vyšetření

- Senzitivita a specificita
- Konkurence zobrazovacích technik
- Genetika

- Všechna nádorová onemocnění jsou způsobena abnormalitami v sekvenci DNA
- Během života je DNA v lidských buňkách vystavena účinku mutagenům a také chybám při replikaci, které způsobují změny v sekvenci DNA buňky
- Náhodně může jedna z těchto somatických mutací změnit funkci genů spjatých s kontrolou buněčné proliferace, diferenciace a apoptózy
- Pokud jedinec zdědí mutaci v jedné alele kritických genů od rodičů, nastává nádorové onemocnění dříve a s větší pravděpodobností

- Genetické změny, způsobující expresi pozměněných proteinů, proteinů v jiném množství, nebo těch, které se již na tomto stupni ontogeneze neexprimují, mohou vest k vzniku nádorového onemocnění

Imunoanalýza měří proteiny

Molekulární biologie zejména DNA, RNA

Dominantní mutace protoonkogenů

Změny ve struktuře genu →

syntéza abnormálního genového produktu (onkoproteinu)

- bodové mutace, delece
- genové translokace – vznik zkrácených nebo fúzních genů s abnormální funkcí

Změny ovlivňující regulaci genové exprese →

nepřiměřená produkce strukturně nezměněné formy normálního proteinu podporující růst

- inserce retrovirů se silnými retrovirovými promotory
- genové amplifikace – abnormální transkripci

Recesivní mutace antionkogenů

Dvouzásahová teorie →

- pro vývoj nádoru je nutná ztráta funkce obou alel příslušného tumor supresorového genu
- ztráta heterozygosity (LOH)

Metody molekulární biologie se využívají

Diagnostika

- Screeningová vyšetření - kolorektálního karcinomu (K-Ras, SEPT9), karcinom prostaty (DD3)
- Potvrzení nebo upřesnění diagnózy onkologických onemocnění (karcinom prsu, HNPCC, FAP)
- Detekci onemocnění u asymptomatických osob umožňuje určení kauzální mutace u hereditárních genetických onemocnění

Metody molekulární biologie se využívají

Diagnostika

- Detekce minimální zbytkové choroby
 - (hematoonkologie)
- Určení relapsu onemocnění (hematoonkologická onemocnění)
- Predikce účinnosti léčby (kolorektální karcinom, Kras NSCLC EGFR)
- Určení prognózy (Karcinu prsu mamaprint, Oncoprint)
- Cirkulují nádorové buňky, cirkulující DNA

Techniky molekulární genetiky používané k diagnostice

Metody přímé diagnostiky

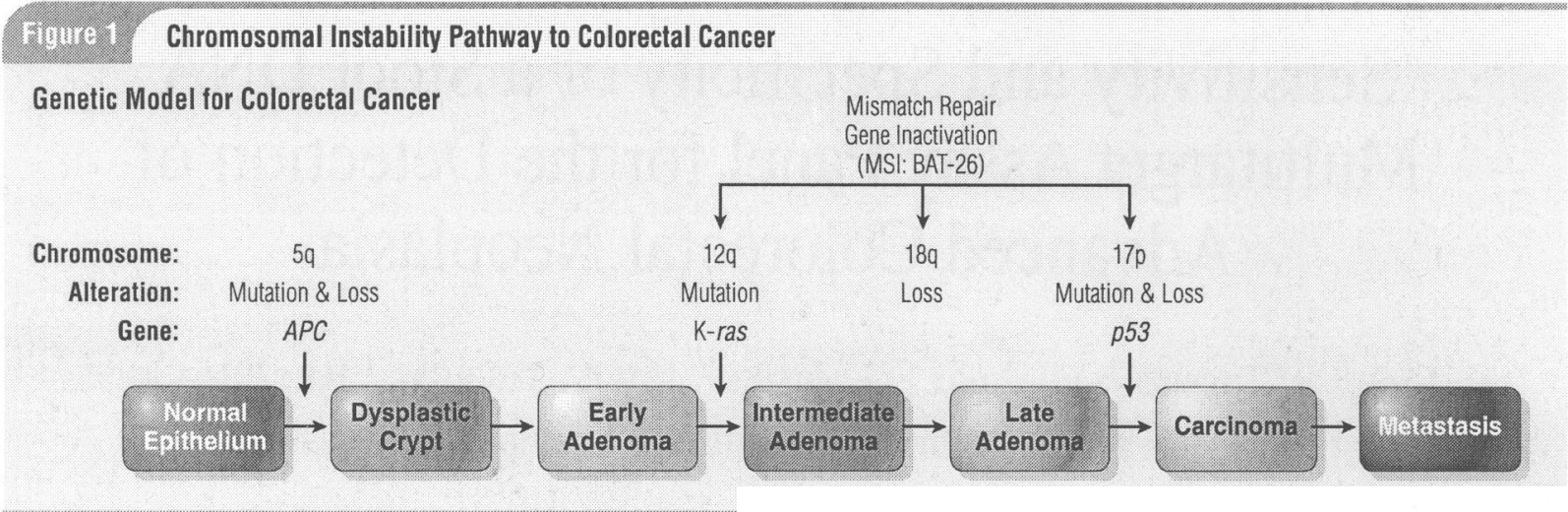
- SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)
- DGGE (Denaturing Gradient Gel Electroforesis)
- PTT (Protein Truncation Test)
- sekvenování ds DNA

Metody nepřímé diagnostiky

- PCR (Polymerase Chain Reaction)
- PCR RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Screeningová vyšetření kolorektálního karcinomu

- ◆ multitarget assay panel (MTAP) - detekci mutací v buňkách střevní sliznice uvolněných do stolice probandů



Adapted with permission from Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal cancer. *Cell* 1990;61:753-760.
Abbreviations: MSI = microsatellite instability; APC = adenomatous polyposis coli

Table 1 Multitarget Assay Panel Mutations

Gene	Mutation
K-ras	k12p.1, k12p.2, k13p.2
APC	876-2, 1306-2, 1309, 1312-1, 1367, 1378, 1379-3, 1450, 1465-8, 1554
p53	175p.2, 245p.1, 245p.2, 248p.1, 248p.2, 273p.1, 273p.2, 282p.1

Abbreviation: APC = adenomatous polyposis coli

Screeningové vyšetření karcinomu prostaty

- Detekce buněk karcinomu prostaty prostřednictvím mRNA genu DD3^{PCA3} v moči
- lncRNA obsahuje velké množství stop-codonů → nevzniká protein
- Funkce není známa
- Zvýšená exprese DD3 se vyskytuje u více jak 95 % případů primárního karcinomu prostaty
- Neexprimuje se v normální tkáni a u jiných malignit

OSNA

(One Step Nucleic Acid Amplification)

- Konvenční peroperační analýza SNLN
- Nevýhoda cca 15 -20 % falešná negativita
- OSNA – rychlá amplifikace mRNA CK 19
- Vyšetření trvá 15 -20 minut
- Rozliší makrometastázu, mikrometastázu a uzlinu bez postižení.
- Má 95,6 % senzitivitou
- 96,7 % specificitou.



Metody molekulární biologie se využívají

Léčba

- Volba a optimalizaci léčby
- Monitoraci léčby
- Predikce efektu léčby
- Prognóza onemocnění

Cílená léčba – blokace EGFR (produktu onkogenu)

- **EGFR (ErbB-1)** receptor epidermálního růstového faktoru
 - Ligandy pro epidermální růstový faktor: EGF nebo TGF α → aktivují monomerní molekulu → dimer → aktivace intracelulární tyrosin kinazové activity
 - Patologická aktivita: amplifikací EGFR1 nebo vysokou polyzomií chromozómu 7 → preferenční odpověď na EGFR1 inhibici

Blokace: anti-EGFR moAb **cetuximabu, panitumumab**

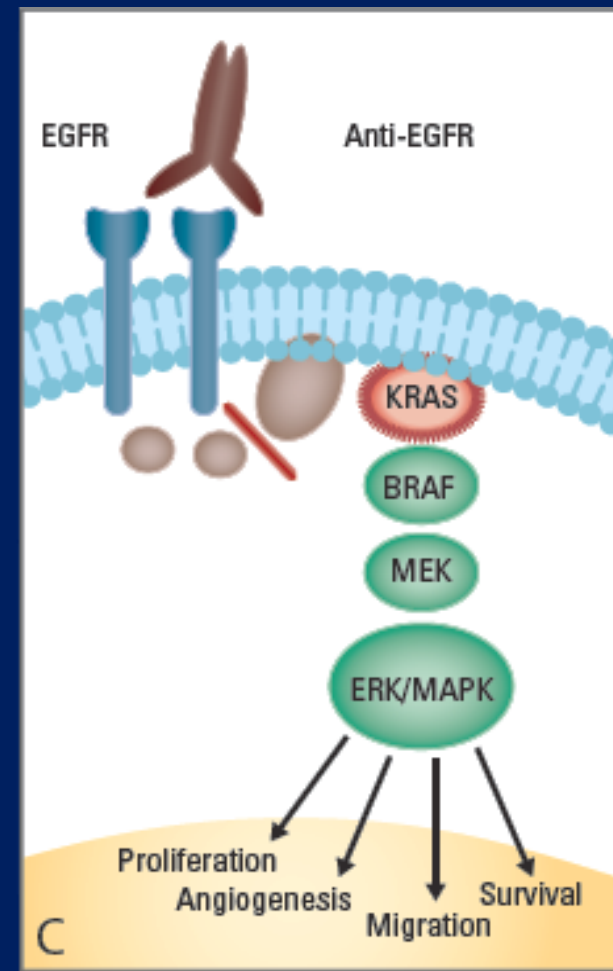
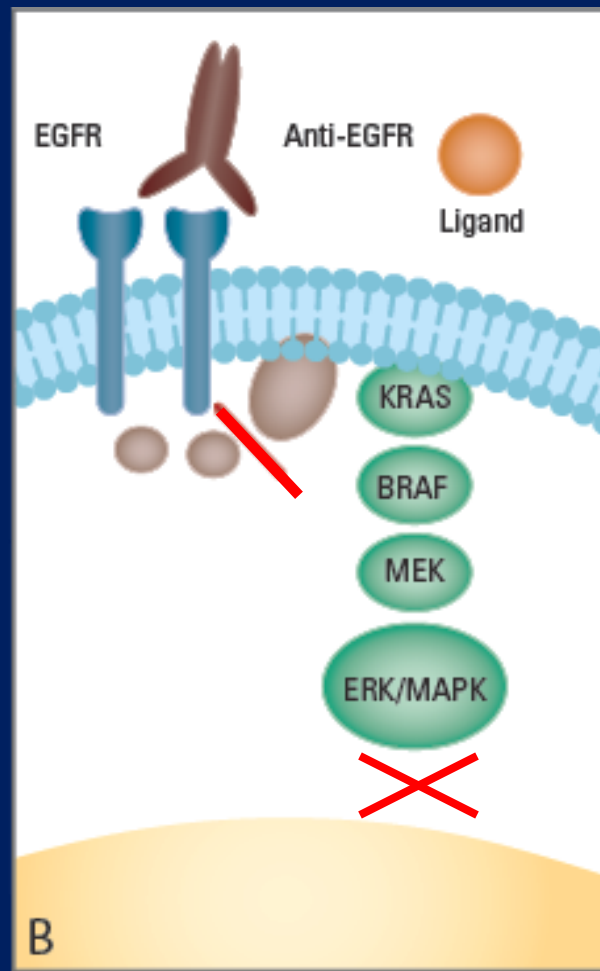
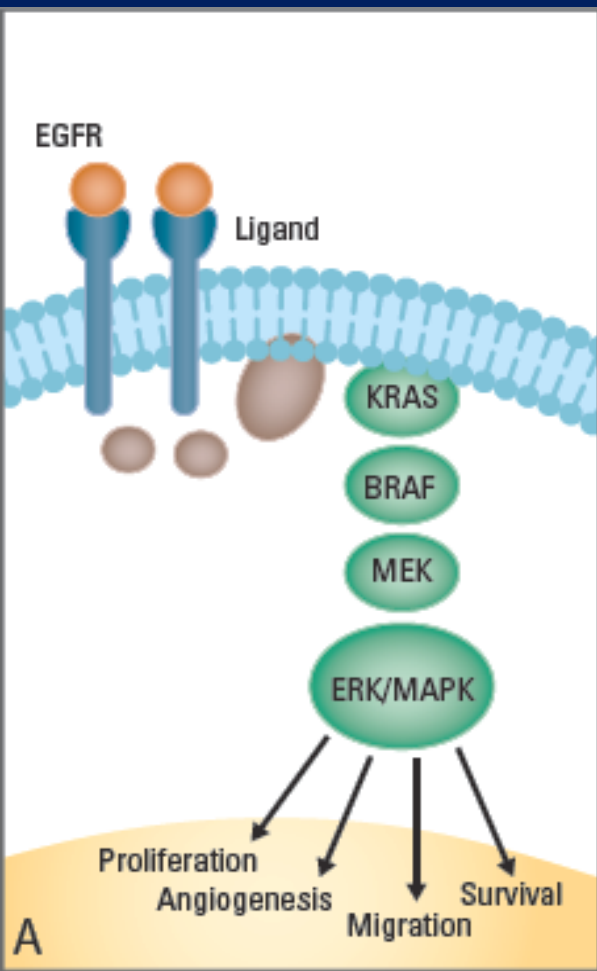
- léčba pokročileho a metastatickeho kolorektálního karcinomu

Prediktor účinnosti: **wild type genu KRAS (vyžadován)**
wild type genu BRAF (doporučen)

znalost přítomnosti EGFR receptorů (doporučena)

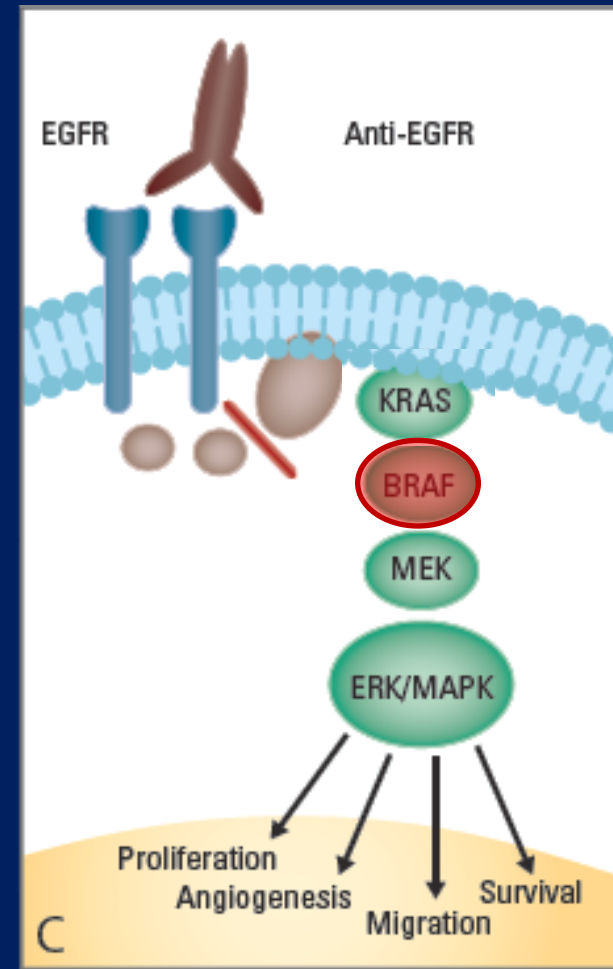
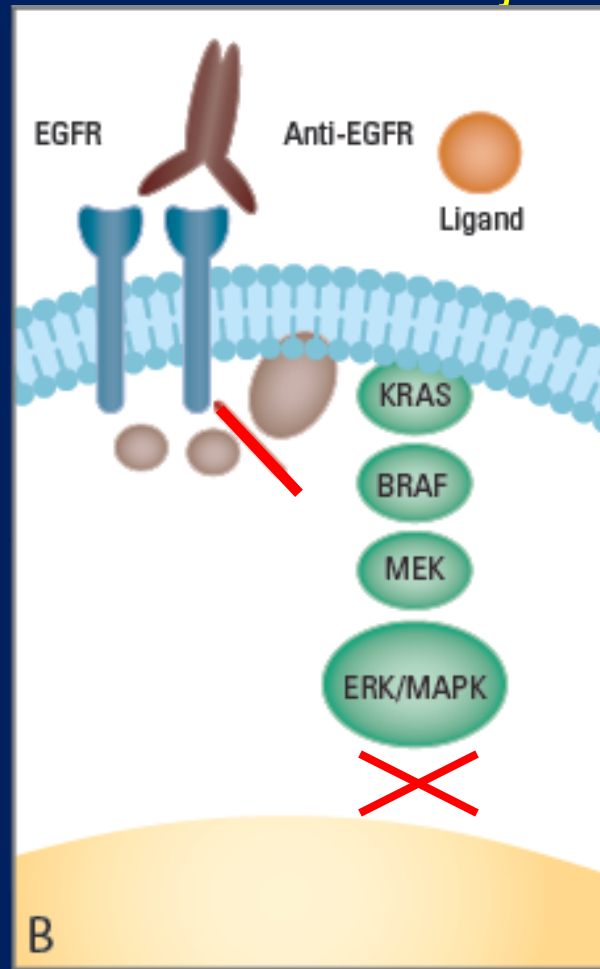
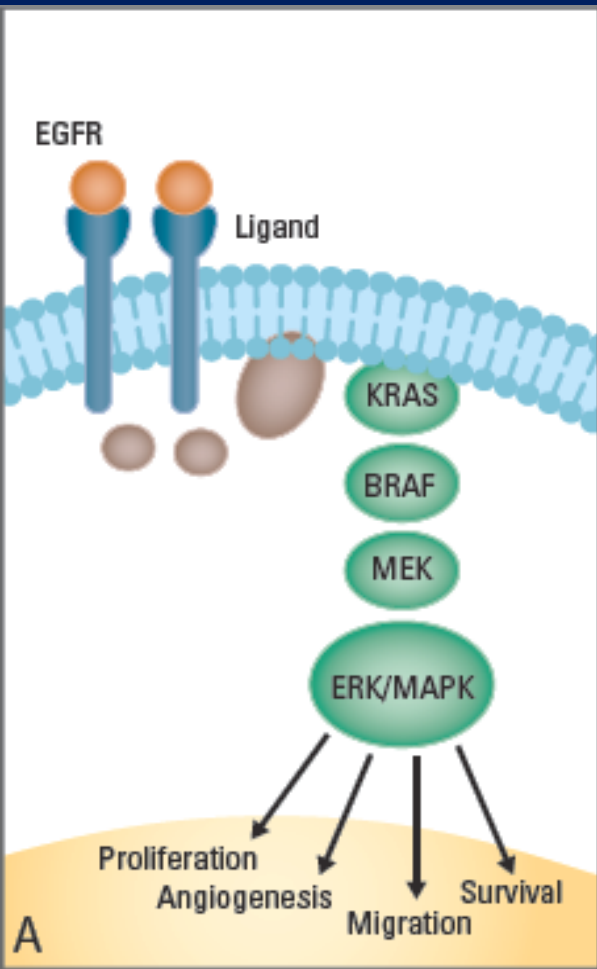
Prediktor účinnosti anti-EGFR moAb : wild type genu KRAS

- **K-ras** (Kirstein rat sarkoma virus) 12p12.1
Proonkogen K-ras kóduje GTPázu
Nejčastěji mutace kodonu 12, 13, 61 → **kontinuální aktivace**



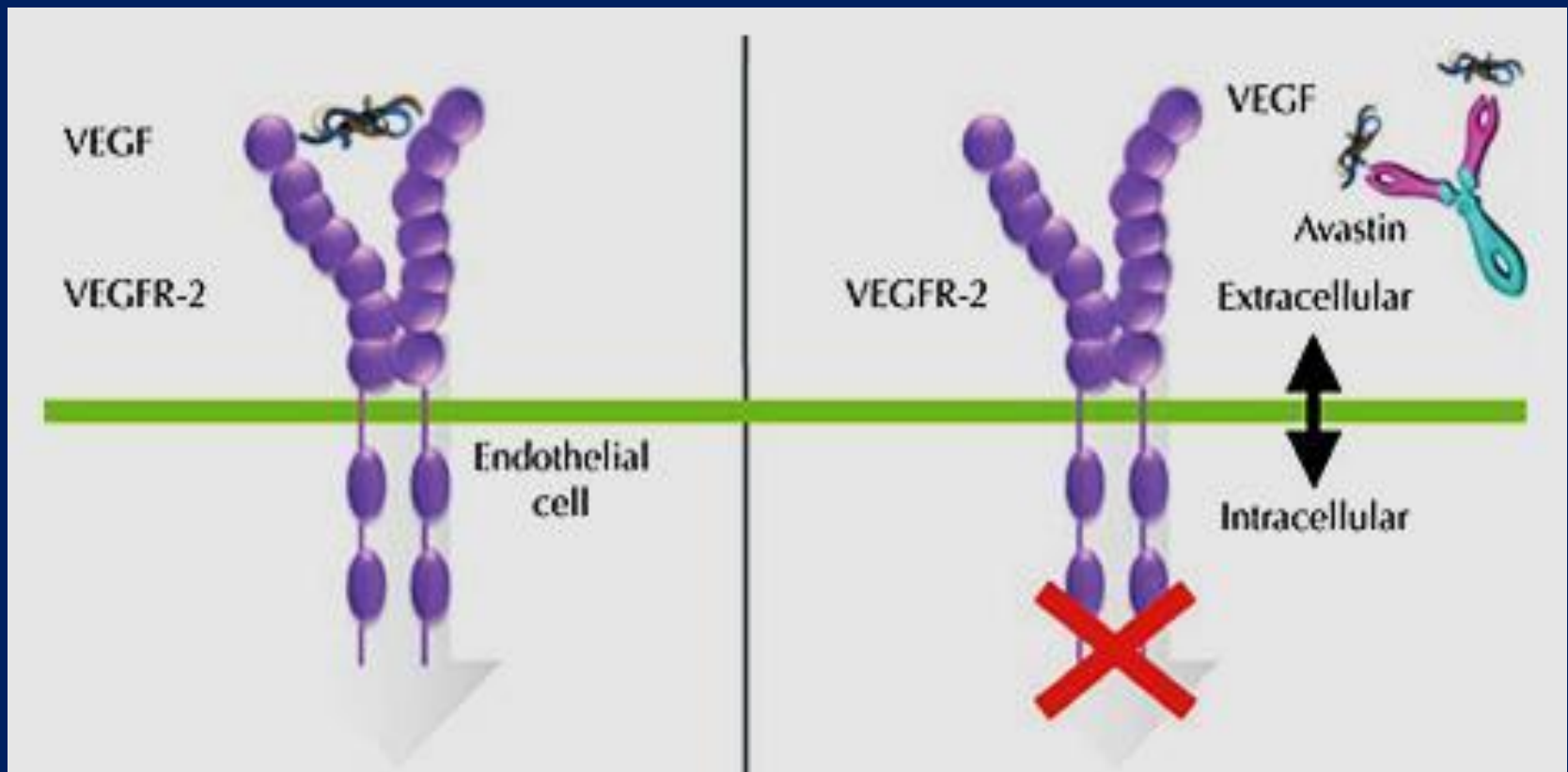
Prediktor účinnosti anti-EGFR moAb : wild type genu BRAF

- **BRAF** (RAS-associated factor)
 - Mutován u 5% kolorektálních karcinomů - V600E
 - Je známo více než 30 mutací aktivujících BRAF



Cílená léčba – Inaktivace VEGFR neutralizací VEGF

- Neutralizace ligandu anti-VEGF humanizovanou MoAb **bevacizumab** (Avastin)



Prediktor účinnosti: **není**

Cílená léčba – nízkomolekulární inhibitor TK - Sorafenib

- Sorafenib malý nízkomolekulární inhibitor molekul s tyrosin kinázovou aktivitou:
VEGFR, PDGFR, Raf kináz (C-Raf a B-Raf)

B-Raf inhibice :wild-type B-Raf i mutant B-Raf

Prediktor účinnosti: **není**

ADJUVANTNI SYSTEMOVA LEČBA KARCINOMU TLUSTEHO STŘEVA

Strategie léčby

TNM

I → operace

II → operace (v případě Nx následuje chemoterapie)

III → operace + vždy chemoterapie

IV → resekce, nebo indukční terapie a pak resekce, nebo paliativní léčba

ADJUVANTNI SYSTEMOVA LEČBA KARCINOMU TLUSTEHO STŘEVA

Stadium III (jakekoliv T, N1, N2, M0, Dukes´C)

- chirurgie: široka excize s anastomozou
- adjuvantni chemoterapie: (6 měsíců)
 - kolon: 5-FU+/-LV n. kapecitabin* n. FOLFOX n. FLOX n. XELOX
 - rektum: 5-FU+/-LV + RT n. kapecitabin + radioterapie

Testování typu K-RAS onkogenu u resekatů s nadorem klinického stadia III automaticky, u ostatních stadii (zejména st. IV) na vyžádání onkologa.



coloPrint®

ColoPrint

[About ColoPrint](#)

[ColoPrint Ordering Information](#)

[Symphony Profile](#)

[Why Symphony](#)

[TargetPrint](#)

[MammaPrint](#)

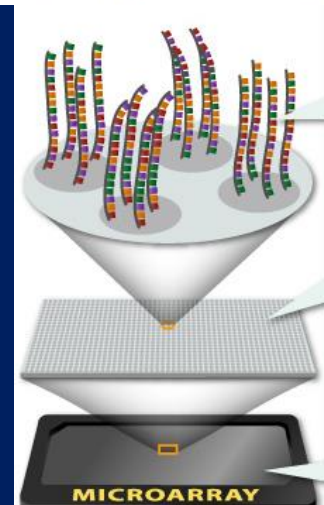
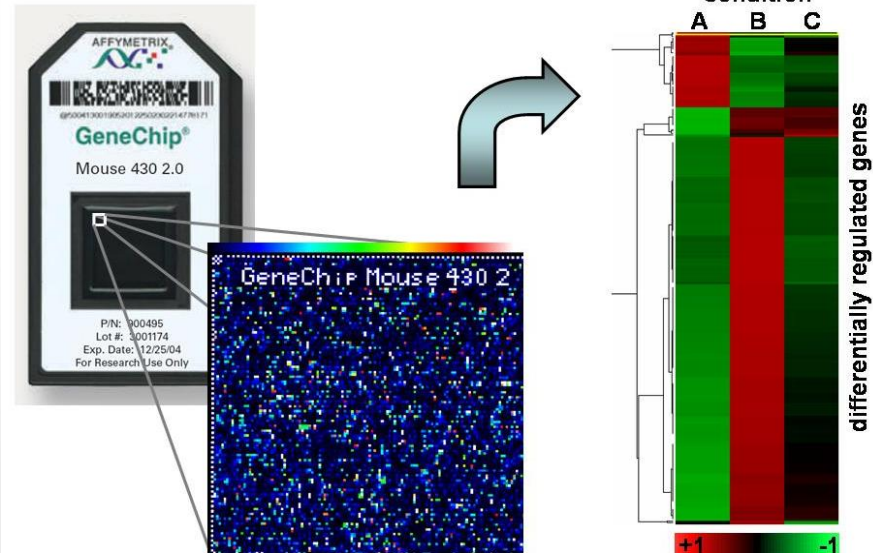
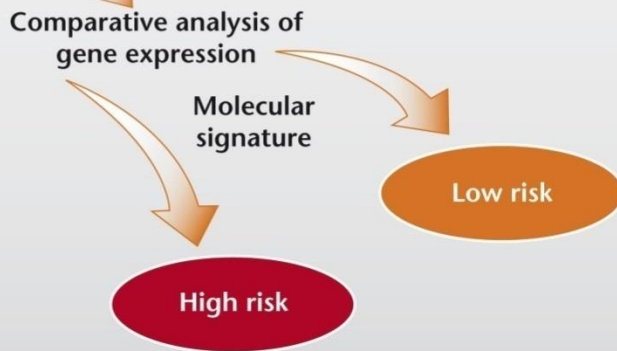
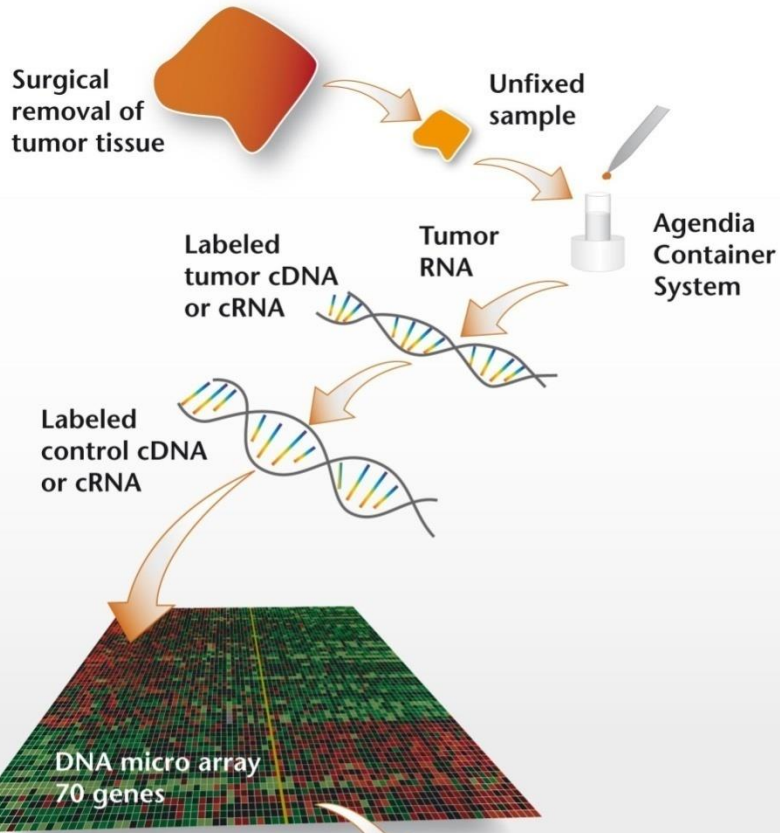
[BluePrint](#)

[TheraPrint](#)

ColoPrint®: Enables Physicians and Patients to Embrace their Treatment Decisions with Confidence

Going Beyond Clinical Factors to Clearly Stratify ALL Stage II patients

A key challenge for colon cancer management is to determine the risk of relapse for patients with stage II colon cancer and to decide if these patients should get adjuvant treatment or not. Existing US guidelines



Chronická myeloidní leukemie (CML) stanovení fúzního genu BCR-ABL

Vzniká na podkladě fúzního genu BCR-ABL
Filadelfský chromozóm (Ph) – reciproká
translokace $t(9;22)(q34;q11)$ – molekulární
marker (95% případů)

Diagnostické vyšetření transkriptu BCR-ABL

- Provádí se z leukemických buněk periferní krev nebo kostní dřeň
- RT-PCR: potvrzuje přítomnost fúzního genu BCR-ABL a určuje typ přestavby: major, minor, mikro nebo jiné raritní přestavby

Národní referenční laboratoř pro ČR v rámci mezinárodního projektu EUTOS for CML (ELN – European LeukemiaNet)
vedoucí Mgr. Kateřina Machová Poláková, Ph.D.

Molekulární monitorování hladiny transkriptu BCR-ABL

- Provádí se v pravidelných intervalech z leukocytů periferní krve
- real-time RT-PCR transkriptu BCR-ABL
- Potvrzení BCR-ABL negativity - nested RT-PCR

Nádorové onemocnění	Mutace v genu
Retinoblastom	Rb1
Li-Fraumeni syndrom	TP53
Hereditární karcinom prsu a ovarií	BRCA1, BRCA2
Neurofibromatóza typ 1 a 2	NF1, NF2
Wilmsův tumor	WT1
Familiární adenomatózní polypóza	APC
Hereditární nepolyp. kolorektální karcinom	hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2
Von Hippel-Lindau syndrom	VHL
Mnohočetná endokrinní neoplázie typ 1 a 2	MEN1, MEN2
Ataxia teleangiectasia	ATM

Familiární forma karcinomu prsu

V roce 1994 gen BRCA1 (BREAST CANCER 1) locus: 17q21
Gen kóduje protein o velikosti 1863 AMK

Defekt významně zvyšuje pravděpodobnost onemocněním
nádorem prsu a vaječníků

Účastní regulaci buněčného cyklu, reparace DNA a udržování
stability genomu

Mutace v těchto genech 10x zvyšují riziko onemocnění proti
populačnímu průměru

Vstupuje do interakce s řadou komplexních proteinů účastnících
se reparace poškozené DNA (MRE11/RAD50/Nbs1, SWI/SNF,
BACH1).

Familiární forma karcinomu prsu

1995 objeven gen BRCA2 (BREAST CANCER 2)
locus:13q12.3 Gen kóduje protein o velikosti 3418 AMK

Defekt významně zvyšuje pravděpodobnost onemocněním nádorem prsu a vaječnicků

Účasní regulaci buněčného cyklu, reparace DNA a udržování stability genomu

Nádory prsu vzniklé na podkladě zárodečné mutace v BRCA2 genu se fenotypicky neliší od sporadických forem onemocnění, častější je však vznik druhostranného nádoru prsu a nižší věk v době diagnózy onemocnění

Rizika vzniku nádorů onemocnění u nosiček a nosičů BRCA1/2 mutací

	BRCA1 + Riziko vzniku U %	BRCA 2 + Riziko vzniku U %
Ca prsu do 40 let	19	40 -85
Ca prsu do 70 let	Až 85	60 -85
Metachromní Ca prsu	37 -52	
Ca ovarii	40 - 60	Až 27
Ca děložního hrdla	30	
Ca prsu muž	6	6

Rizika vzniku nádorů onemocnění u nosiček a nosičů BRCA1/2 mutací

	BRCA1 + Riziko vzniku	BRCA 2 + Riziko vzniku
Ca žaludku		2,6 x
Ca žlučníku a žlučových cest		5 x
Ca pankreatu	2,3 x	3,5 x
Ca kolorecta	4,0 x	4,0 x
Ca prostaty	3,3 x	4,5 x

Indikace ke genetickému vyšetření (podezření na hereditární formu)

- Jakýkoli lékař poslat pacienta na specializované pr.
- Genetická konzultace na odd. lékařské genetiky
- Vytvořen 4 generační rodokmen
- Lékař se snaží potvrdit údaje z lékařské dokumentace
- K testování je nutný souhlas pacienta

Indikace ke genetickému vyšetření

MOÚ Brno

- opakovaný výskyt nádorů prsu a/nebo vaječníků v rodině (dva a více případů v přímé linii)
- opakovaný výskyt nádorů tlustého střeva a dělohy v rodině (dva a více případů v linii)
- opakovaný výskyt jiných typů nádorů, kombinace různých nádorových onemocnění, obzvláště pokud se vyskytly v mladém věku
- výskyt nádoru prsu u muže

Indikace ke genetickému vyšetření

MOÚ Brno

- ženy s ojedinělým výskytem nádoru prsu nebo vaječníků před 35 rokem věku
- ženy s nádorem prsu a vaječníků v jakémkoliv věku
- nádor střeva nebo nádor dělohy před 35 rokem věku
- nádor střeva a dělohy u pacientky v kterémkoliv věku
- vícečetný výskyt zhoubných nádorů kůže, alespoň jednou pod 50 let

Indikace ke genetickému vyšetření MOÚ Brno

- vícečetný výskyt zhoubných nádorů kůže, alespoň jednou pod 50 let

Mikro RNA

miRNA regulují až jednu třetinu lidských genů. Geny regulované pomocí miRNA jsou nejen součástí procesu onkogeneze, podílejí se také na nádorové invazivitě, diseminaci nebo lékové rezistenci

Malé (24nt) a stabilní molekuly

- časný záchyt
- predikce léčby
- Prognóza onemocnění

Mikro RNA

Regulují expresi genů na post-transkripční úrovni a uplatňují se v řadě buněčných procesů.

Post-transkripční regulace genové exprese vede

- buď k degradaci cílové mRNA,
- nebo k represi její translace a následně poklesu hladin jejího proteinového produktu

Charakter mikro RNA

- Onkogen *miR-21* , *mi-155*
- Nádorový supresor (*miR-15a* a *miR 16-1*), *let-7*



Innovative Medicines Initiative

- IMI webinar on the 11th Call topic 'Blood-based biomarker assays for personalised tumour therapy: value of latest circulating biomarkers'.
- Please note that the topic presentation can be downloaded from <http://www.imi.europa.eu/events/2013/12/03/imis-11th-call-webinars>

- Dear Colleagues,
 - It is my pleasure to invite you to the third **Up Close and Personalized, International Congress on Personalized Medicine**, which will take place **26-29 June, 2014 in Prague, Czech Republic**.
 - Following the great success of the previous meetings in Florence and Paris, the main focus of the third Up Close and Personalized Congress is to examine the essential clinical, genomic, proteomic, metabolomic, pharmacogenomic, biomarker data and imaging necessary to predict, prevent and treat major medical conditions concerning metabolism (diabetes and obesity), and cancer. We will be to explore bio-informatic tools, algorithms, artificial intelligence techniques, decision support systems and other new platforms for disease diagnosis, prediction and better tailoring treatment modeling to the individual patient. Furthermore, we will discuss policy issues such as barriers for implementing Personalized Medicine, health and quality assurance. On behalf of the Scientific and Organizing Committee I look forward to welcoming you to what promises to be an exciting and fruitful event.
 - **Eddy Karnieli, MD**
 - Congress Chairman
- [WWW. 2014.upcp.org](http://WWW.2014.upcp.org)

IAD 2014 Plzeň
6-8. dubna 2014

Interpretace imunoanalytických metod

Kontrola kvality v imunoanalýza

Molekulární biologie

Endokrinologie

Perzonalisovaná medicína

Varia



The 9th International Conference of
Anticancer Research
Porto Carras Grand Resort, Sithonia,
Halkidiki, Greece,
6 to 10 October, 2014.

[www.iiar-anticancer.org /conference/](http://www.iiar-anticancer.org/conference/)

Děkuji za pozornost!

Kritéria k testování genů BRCA1 a BRCA2

V rodokmenu:

U familiárního výskytu nádorů

- Alespoň 3 příbuzní s karcinomem prsu/ovaria, bez věkové limitace
- 2 příbuzní s nádorem prsu/ovaria, alespoň jeden dg. pod 50 let.

U sporadických forem

- Bilaterální nádor prsu nebo bilaterální nádor ovaria, první dg. pod 50 let
- Duplicita nádoru prsu a ovaria bez věkové limitace
- Unilaterální nádor prsu nebo ovaria do 35–40 let
- Nádor prsu u muže bez věkové limitace
- Medulární karcinom
- ER-, PR-, ErbB2- karcinom prsu

Komerčně dostupné analytické sety

- APTIMA (Genprobe, USA) **PROGENSA PCA3**

Schváleno FDA jako test umožňující detekci DD3/PCA3 ve vzorku moči, na základě kterého by měla být v případě positivity indikována opakovaná biopsie v případě negativní předešlé.

<http://www.gen-probe.com>

Princip: amplifikace mRNA DD3/PCA3 a detekce amplikonu - Transcription Mediated Amplification (TMA) a Hybridization Protection Assay (HPA)

- **uPM3TM** (DignoCure, Kanada)

- Nucleic acid sequence based amplification (NASBA)

ADJUVANTNI SYSTEMOVA LEČBA KARCINOMU TLUSTEHO STŘEVA

Strategie léčby

TNM

I → operace

II → operace (v případě Nx následuje chemoterapie);

III → operace + vždy chemoterapie

IV → resekce, nebo indukční terapie a pak resekce, nebo paliativní léčba

Stadium 0 (Tis, N0, M0)

- adjuvantni chemoterapie: není indikována

Stadium I (T1-2, N0, M0, Dukes´A)

- adjuvantni chemoterapie: není indikována

Stadium II (T3-4, N0, M0, Dukes´B)

- kolon pT3, N0, M0: adjuvantni chemoterapie: **není indikována**

ADJUVANTNI SYSTEMOVA LEČBA KARCINOMU TLUSTEHO STŘEVA

Stadium II (T3-4, N0, M0, Dukes´B)

- rektum: pT3, N0, M0: adjuvantni chemoterapie: (6 měsíců)
- kolon: pT4, N0, M0 a pT3, N0, M0 high risk podskupina*: 5-FU+/-LV n. kapecitabin* n. FOLFOX n. FLOX n. XELOX*

Pokud je zvažována adjuvantni chemoterapie FUFA ve II. klinickem stadiu, je vhodné molekulární vyšetření **mikrosatelitové instability (MSI)**, resp. **MMR (mismatch repair)** v nádorové tkáni.

Pacienti II. Klinického stadia s defektem MMR (dMMR , tedy MSI-high) nemají prospěch z adjuvantni chemoterapie na bázi 5-FU

- rektum: chemoterapie 5-FU/LV n.kapecitabin + radioterapie
- neoadjuvantni chemoterapie + radioterapie:
- rektum: 5-FU nebo kapecitabin