



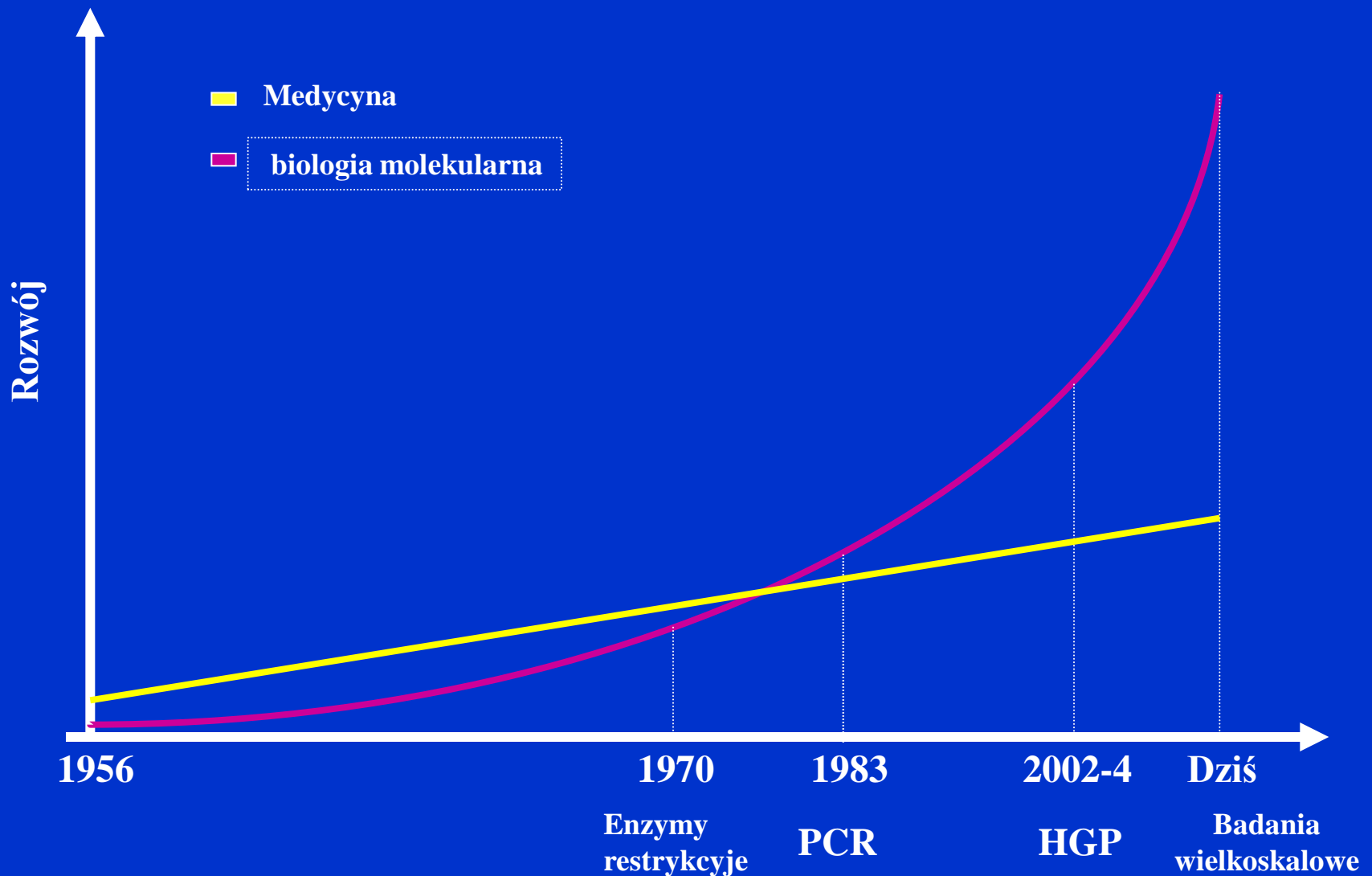
Diagnostyka molekularna umożliwia terapie spersonalizowane.

Janusz A. Siedlecki

Centrum Onkologii-Instytut,
Warszawa 2015



Rozwój medycyny i nauk podstawowych w ciągu ostatnich pięćdziesięciu lat



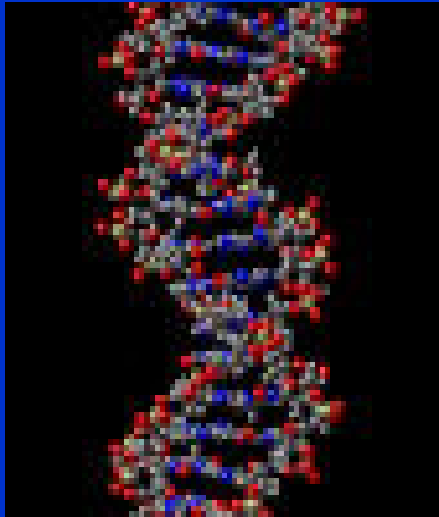


**W latach 90-tych pojawia się pojęcie
„medycyna molekularna”**

**U podstaw rozwoju większość chorób
leżą zaburzenia**

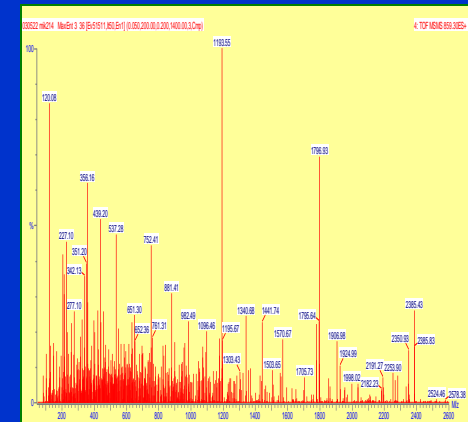
**genetyczno-molekularne będące
wynikiem predyspozycji genetycznych i
wpływu czynników środowiskowych**

Aby określić chorobę na poziomie molekularnym należy ustalić



Status genomu/genu

Status proteomu



Status środowiska/
mikrośrodowiska



Jakie narzędzia oferuje biologia molekularna

- ❖ Analiza zmian na poziomie chromosomu
- ❖ Ocena statusu genów
- ❖ Analiza zmian polimorficznych
- ❖ Analiza zmian w ekspresji genów
- ❖ Wykrywanie obcych transkryptów
- ❖ Wykrywanie zmian potranskrypcyjnych
- ❖ Wykrywanie zmian potranslacyjnych
- ❖ Wykrywanie zmian epigenetycznych
- ❖ Zmiany lokalizacyjne



Amplifikacja dowolnego fragmentu materiału genetycznego w pojedynczej komórce

Genom komórki ludzkiej liczy 3×10^9 nukleotydów

Założenie: Amplifikujemy kawałek o wielkości 300 nukleotydów, czyli 10^7 razy mniej niż cały genom.

W komórce znajduje się 6 pg DNA (6×10^{-12})

Ponieważ amplifikujemy 10^7 razy mniej czyli 6×10^{-19} g DNA

Przy 30 cyklach teoretycznie otrzymuje ponad 10^9 razy więcej materiału czyli 6×10^{-10} g

Tak więc po 30 cyklach otrzymuje się minimum 600 pg amplifikowanego fragmentu



Aby dysponować wystarczającą ilością materiału konieczną do przeprowadzenia dowolnej analizy amplifikowanego fragmentu należy amplifikować materiał genetyczny z co najmniej 100 komórek

W przypadku gdy zależy nam na analizie materiału z pojedynczej komórki należy zwiększyć liczbę cykli np. do 40 lub zastosować tzw. gniazdowy PCR



Prosta amplifikacja

pozwała na stwierdzenie obecności
amplifikowanego fragmentu

Można to wykorzystać do
badania obecności złącza
w translokowanych chromosomach



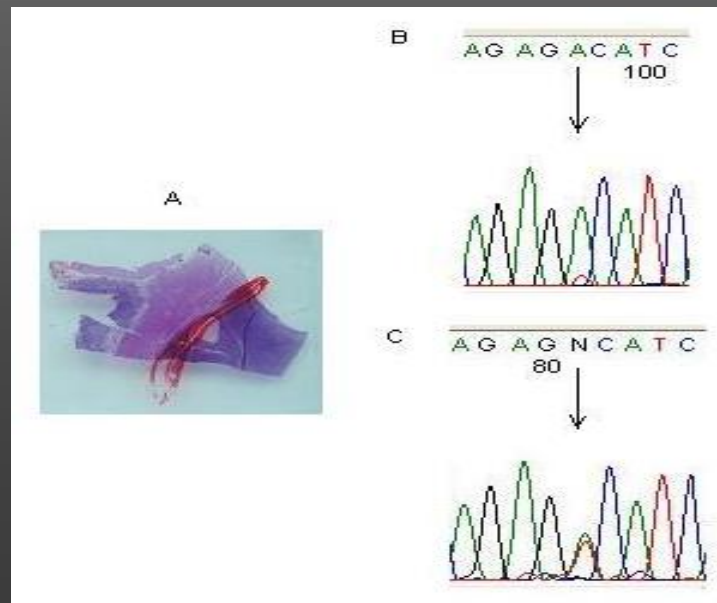
Wykrywanie mutacji

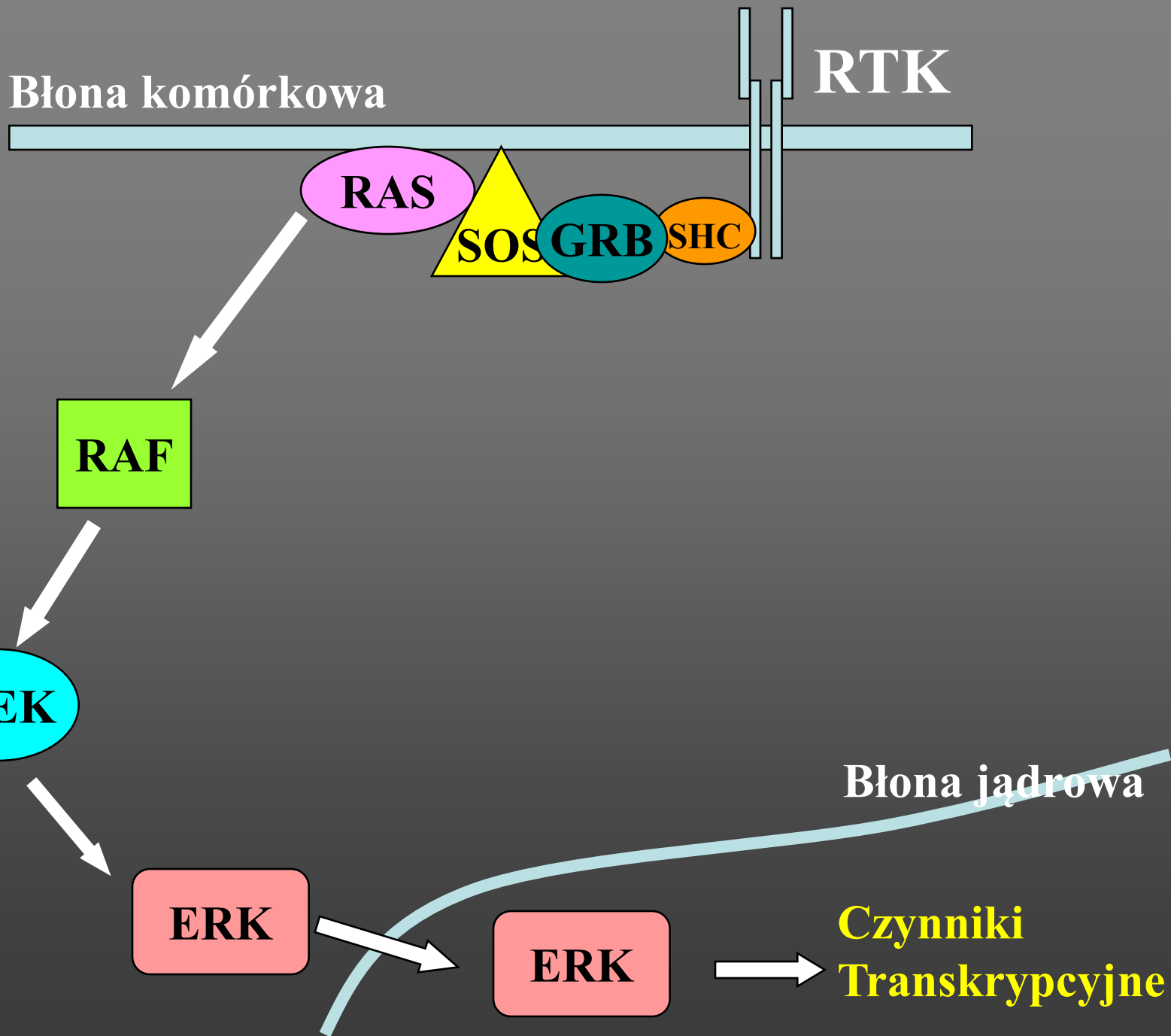
- ❖ **Badanie amplifikowanych fragmentów za pomocą enzymów restrykcyjnych (RFLP, PCR-RFLP)**
- ❖ **Badania zdolności do hybrydyzacji amplifikowanych fragmentów (heterodupleksy)**
- ❖ **Badanie zmian w ruchliwości jednoniciowych DNA amplifikowanego (SSCP) fragmentu**
- ❖ **Sekwencjonowanie**

Sekwencjonowane

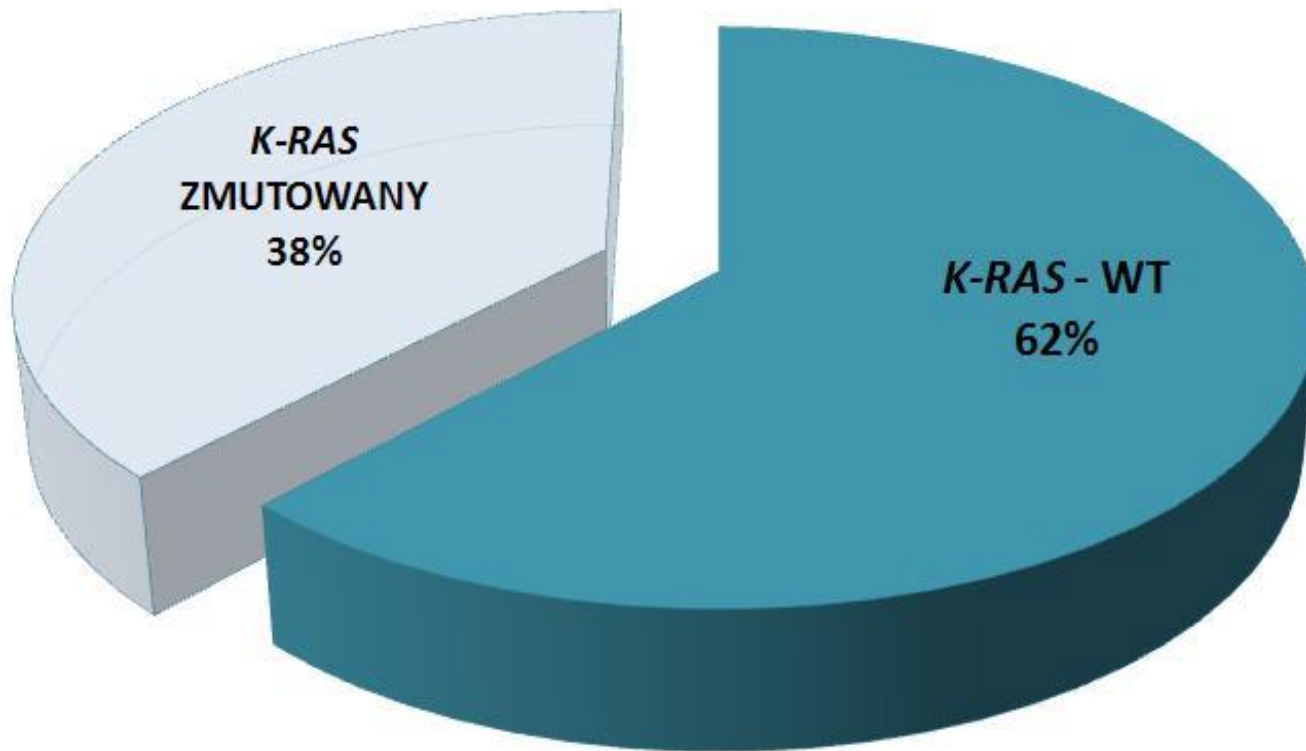
Wady i zalety:

- ❖ Jest podstawową metodą potwierdzającą obecność mutacji
- ❖ Jest metodą którą można w dużym stopniu zautomatyzować
- ❖ Jest metodą tanią
- ❖ Jest metodą szybka
- ❖ Wymaga jednak aby analizowany materiał miał dobrą jakość



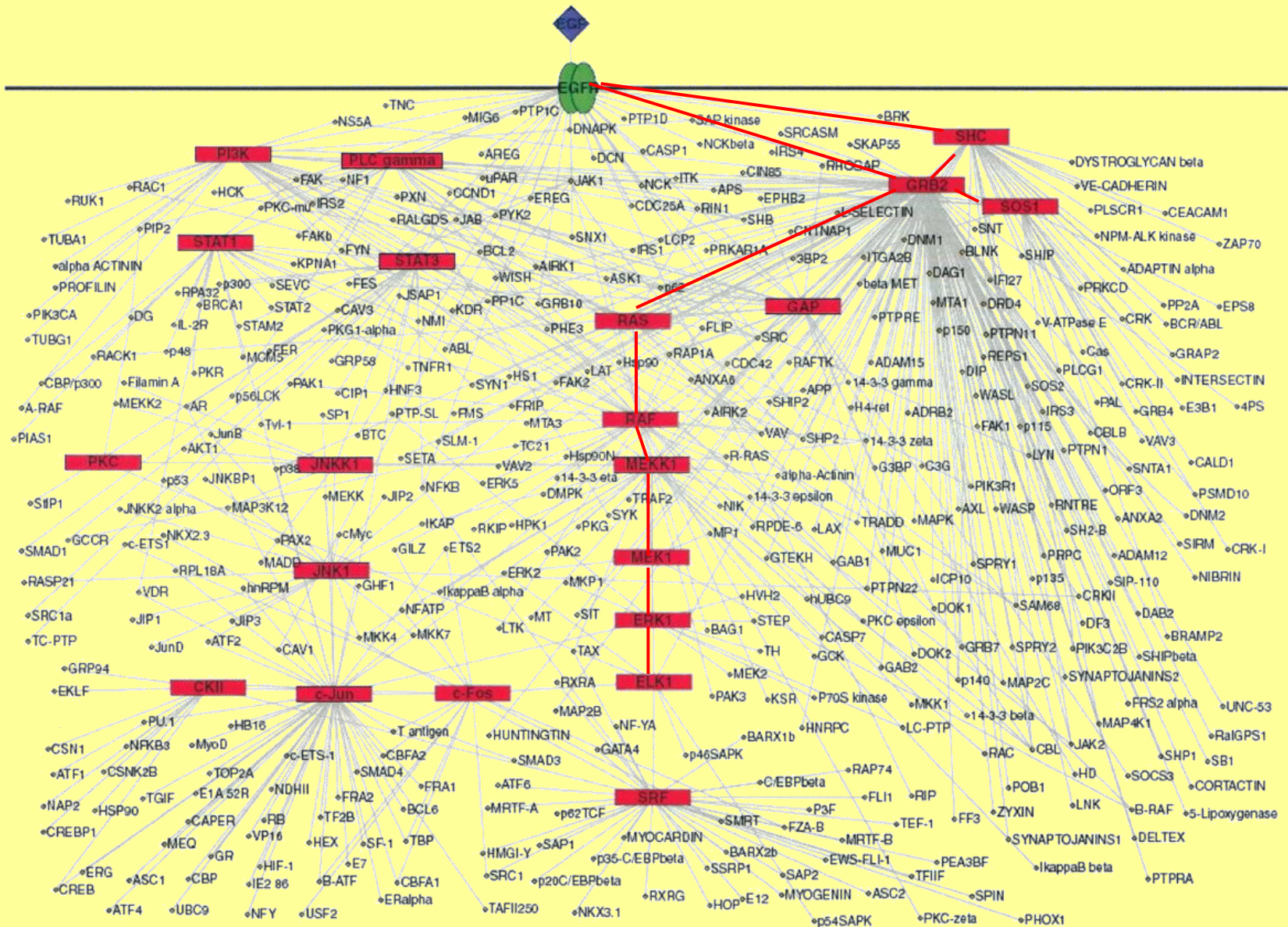


**Wyniki analizy molekularnej genu *K-RAS* u pacjentów z RJG (n = 800)
przebadanych w COI w Warszawie**





Szlaki sygnałowe EGFR



K-RAS

a dlaczego nie

H-RAS

czy



N-RAS

N-RAS



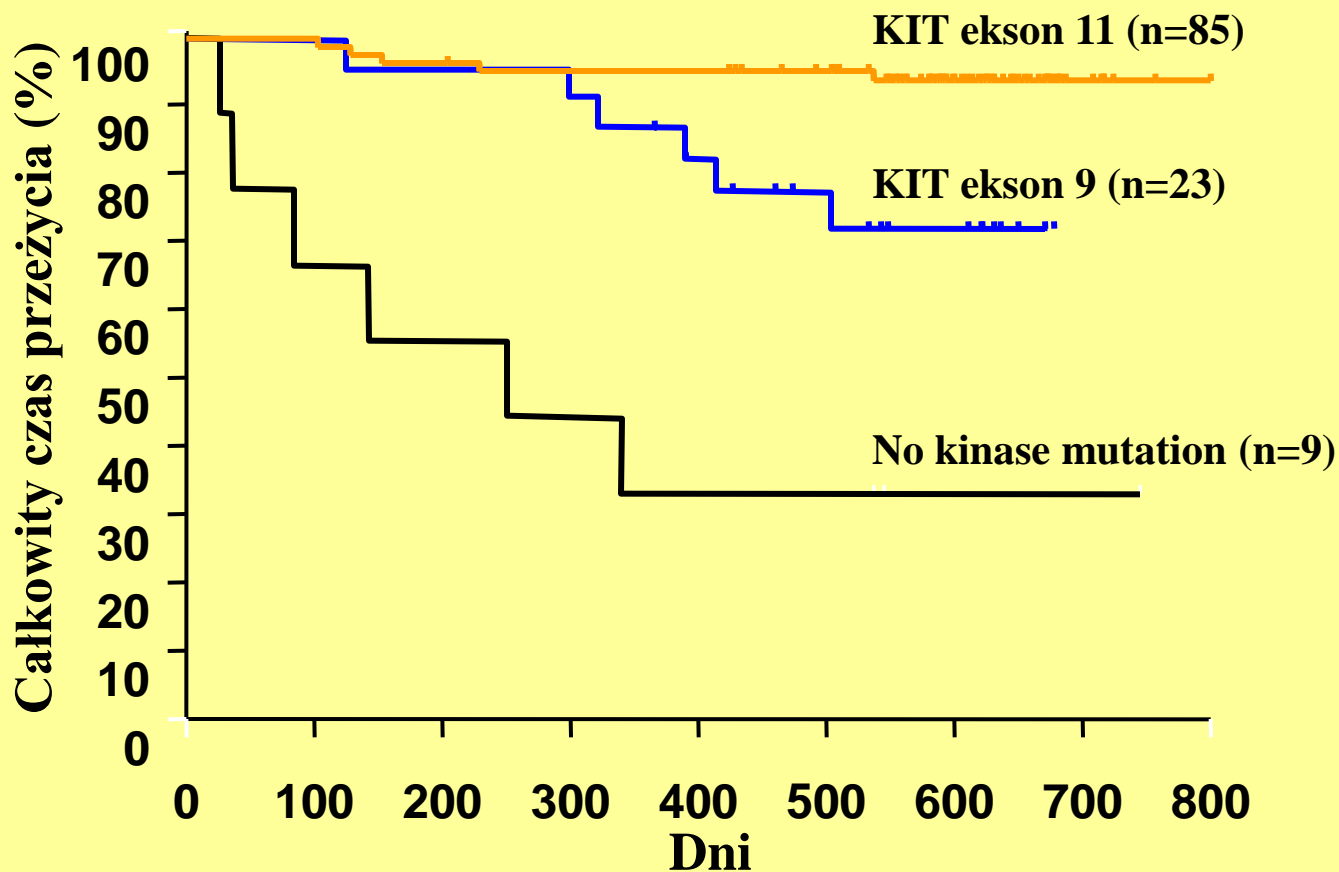
Mięsaki stromalne przewodu pokarmowego GIST

nowotwory podścieliska przewodu pokarmowego pochodzenia mezenchymalnego

Lokalizacja:

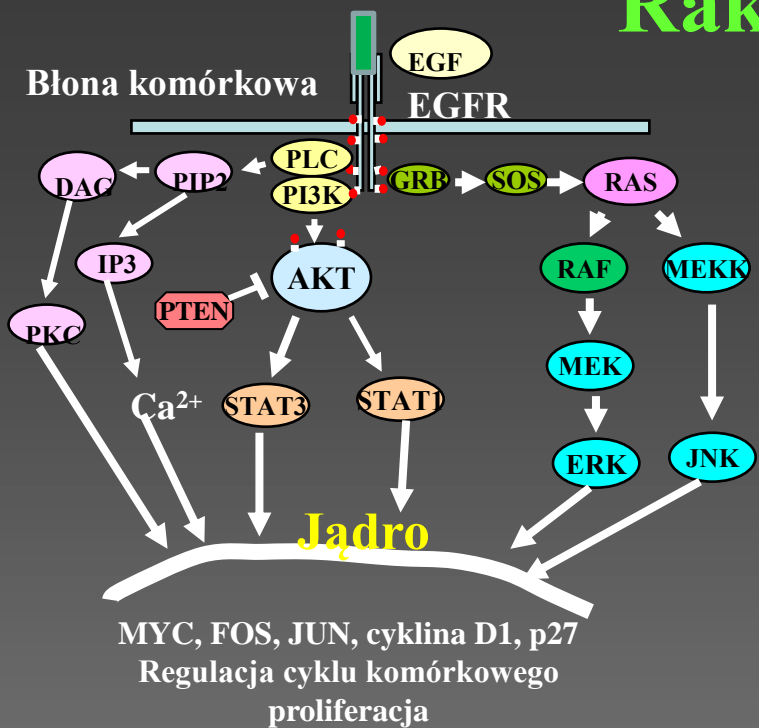
- ❖ 70% w żołądku
- ❖ 20-30% w jelicie cienkim
- ❖ <10% w przelyku, jelicie grubym oraz odbytnicy

Odpowiedź na leczenie imatinibem zależy od rodzaju mutacji w KIT/PDGFR





Rak Płuca



Zadziwiające okazało się że status genów RAS i BRAF nie ma znaczenia

15 % mutacji w genie RAS obserwuje się u zdrowych palaczy

Leki antyEGFR:

- ❖ Cetuksymab
- ❖ Panitumumab
- ❖ Erlotynib
- ❖ Gefitynib

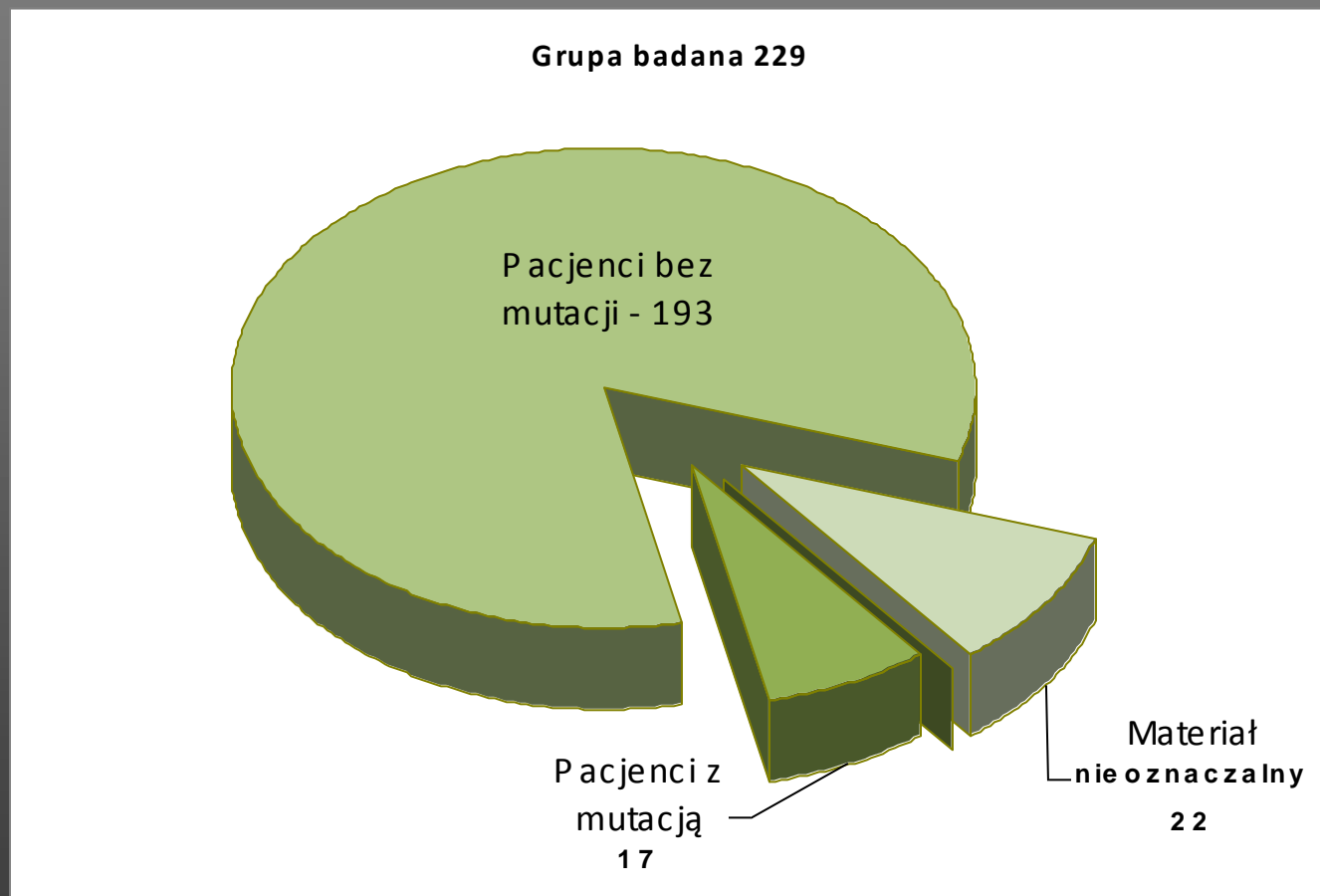
Warunkiem podawania leku antyEGFR jest obecność mutacji w eksonie 18, 19 i 21.

Mutacja w eksonie 20 jest mutacją wykluczającą ❖ Gefitynib

Mutacje w genie EGFR są obecne u 10-15% pacjentów rasy kaukaskiej i 35% u azjatów

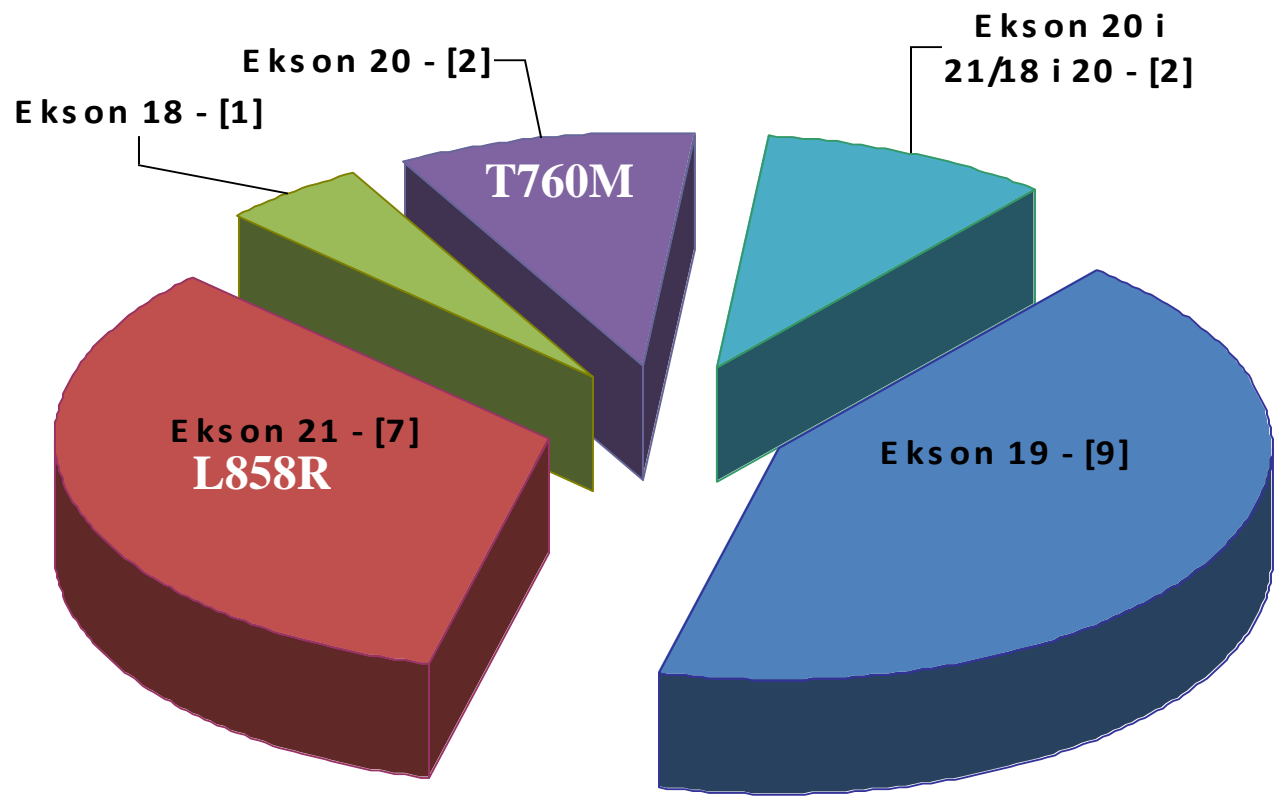


Wyniki badania mutacji w EGFR w niedrobnokomórkowym raku płuca



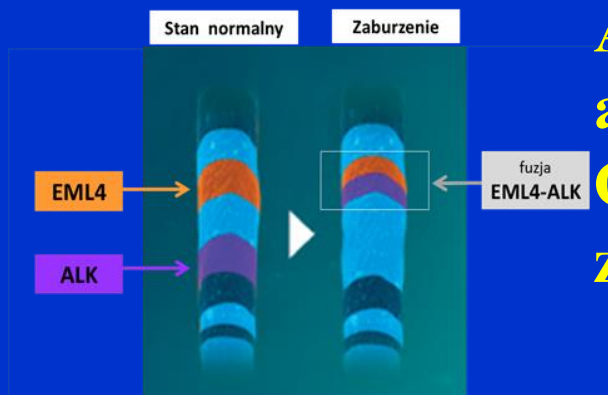


Wyniki badania mutacji w EGFR w niedrobnokomórkowym raku płuca

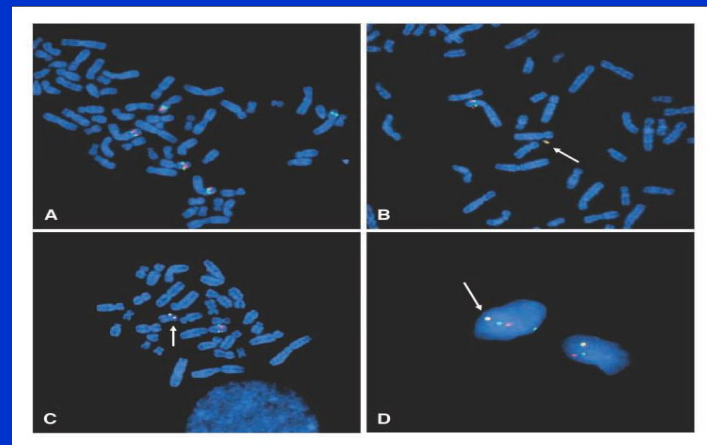
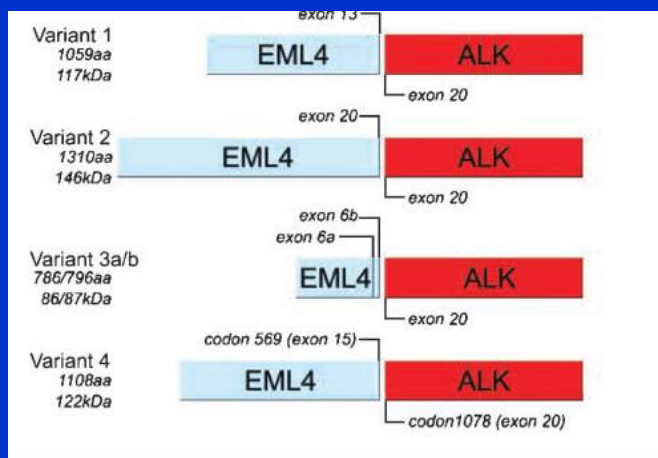




U 3-5% pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca stwierdza się obecność translokacji ALK/EML4



ALK jest receptorem błonowym o aktywności kinazy tyrozynowej
Obecność translokacji wykrywa się z użyciem metody FISH.

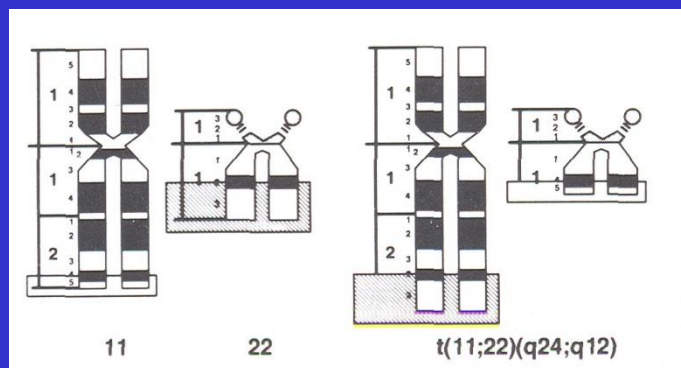


Podawanie selektywnego inhibitora ATPazowej aktywności receptora ALK – kryzotynibu prowadzi do 62% obiektywnych odpowiedzi



Mięsaki Ewinga

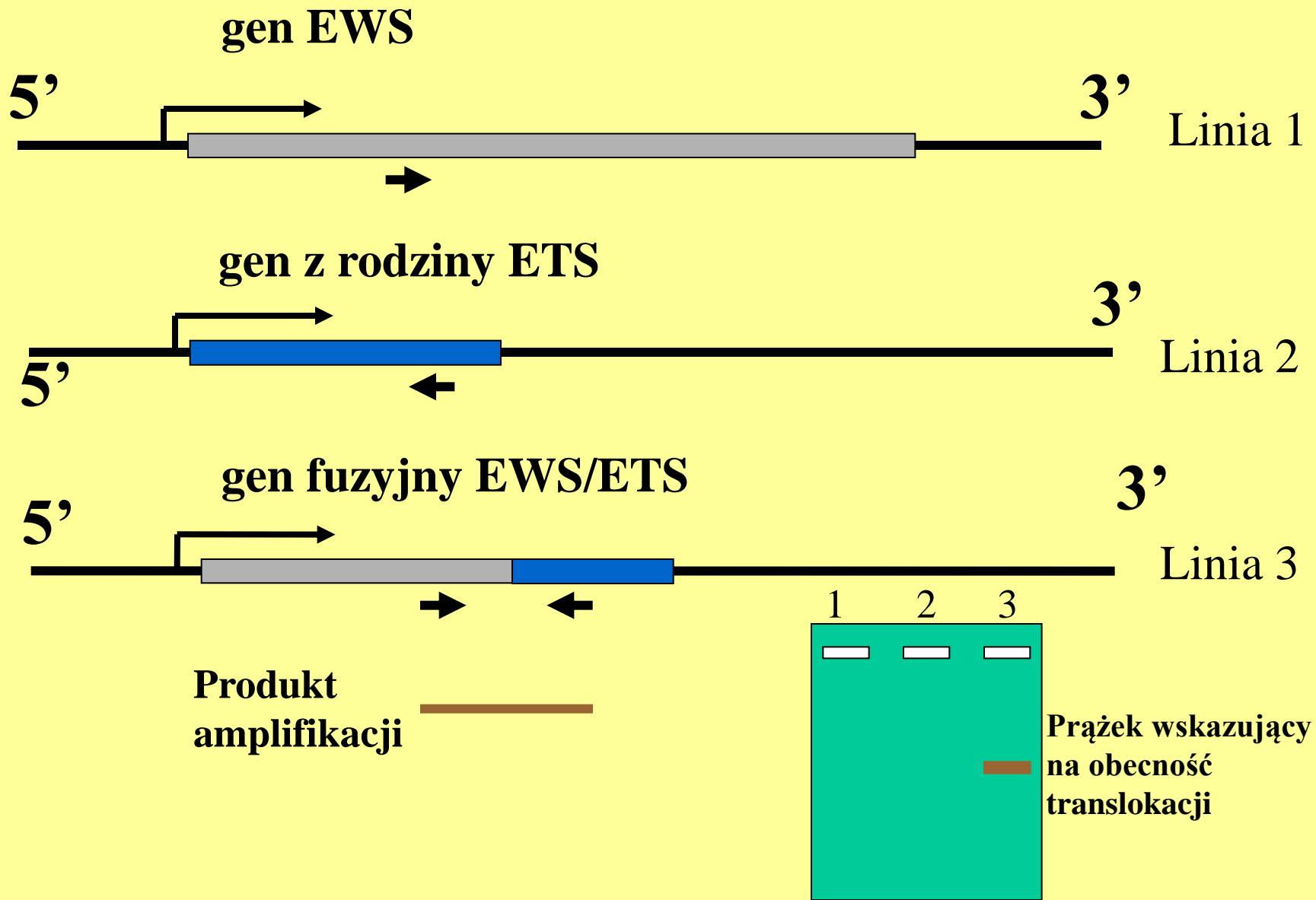
Tanslokacja $t(11;22)(q24;q12)$



W ponad 80% przypadków gen *EWS* ulega fuzji z genem kodującym czynnik transkrypcyjny *FLI-1*



Translokacja t(11;22)(q24;q12)





Mięsak jasnokomórkowy (CCS)

Translokacja $t(12;22)(q13;q12)$

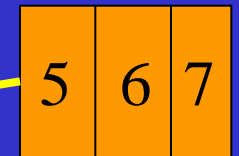
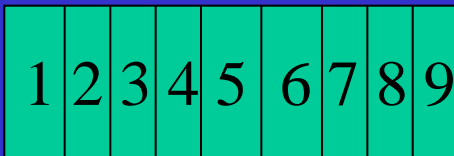
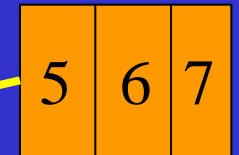
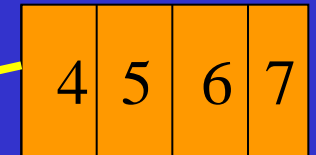
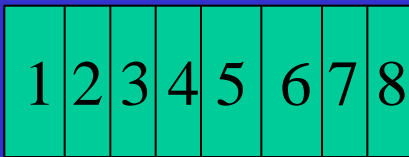
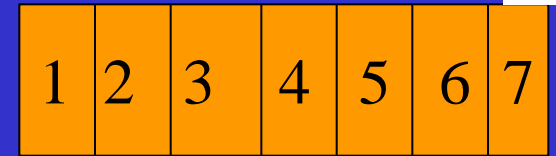
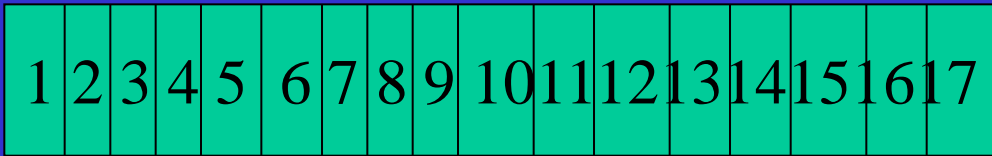
W ponad 70% przypadków następuje fuzja genu *EWS* z genem *ATF1*

EWS* eksony 7, 8 lub 9 z eksonami 3 lub 4 *ATF1

Inne obserwowane zmiany dotyczą też chromosomów 8q, 7p11, 9p, 1p36

EWS

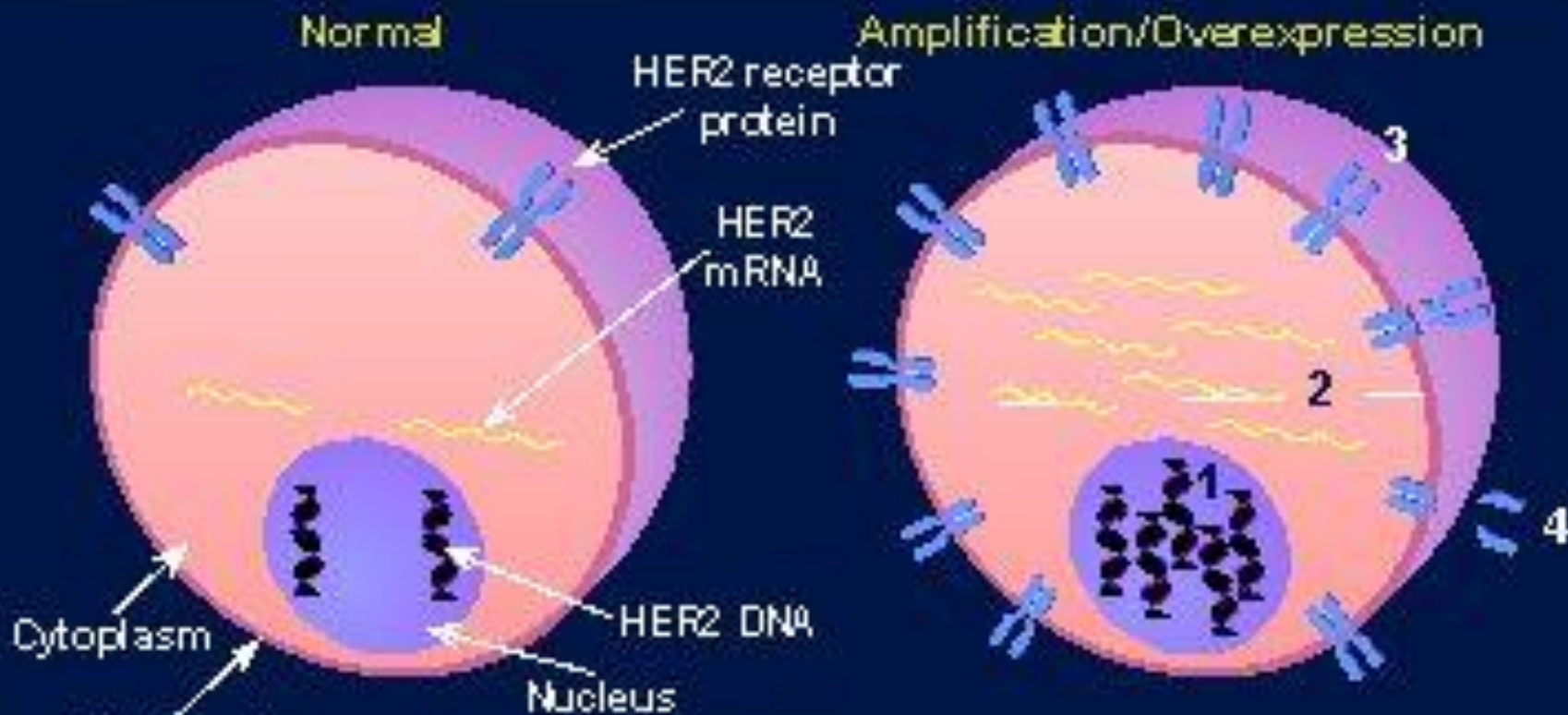
ATF1



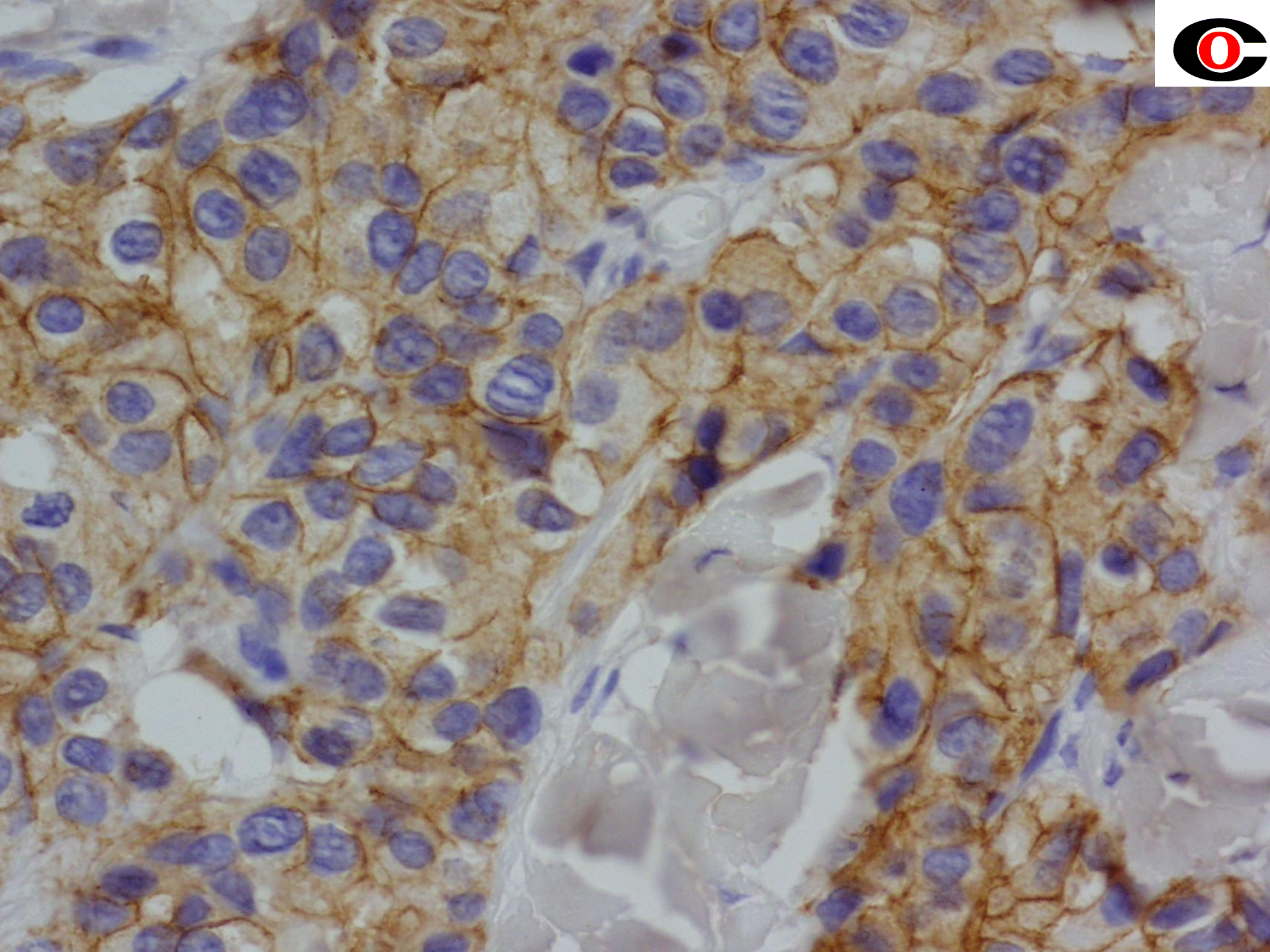
Chromosom 22

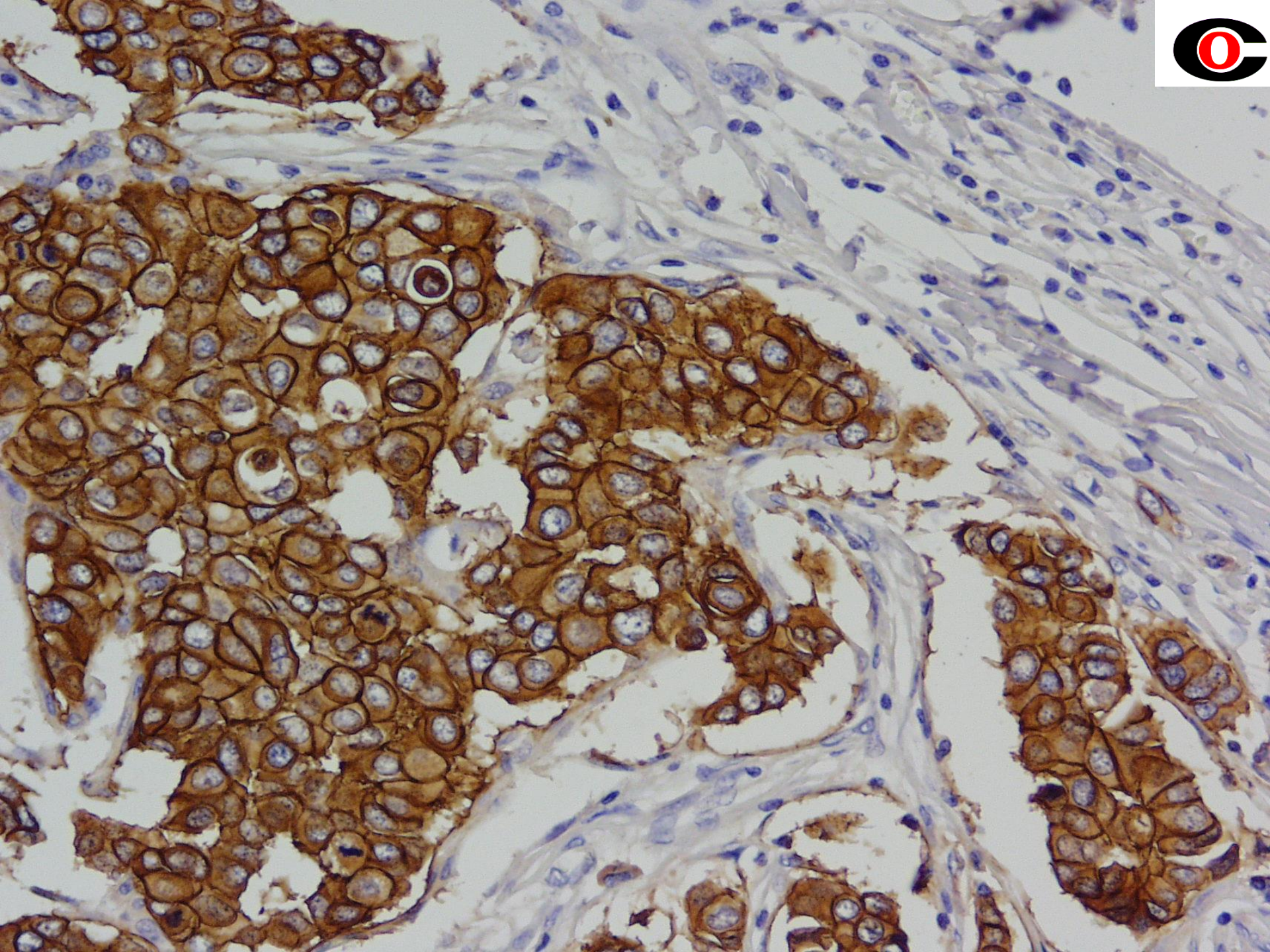
Chromosom 12

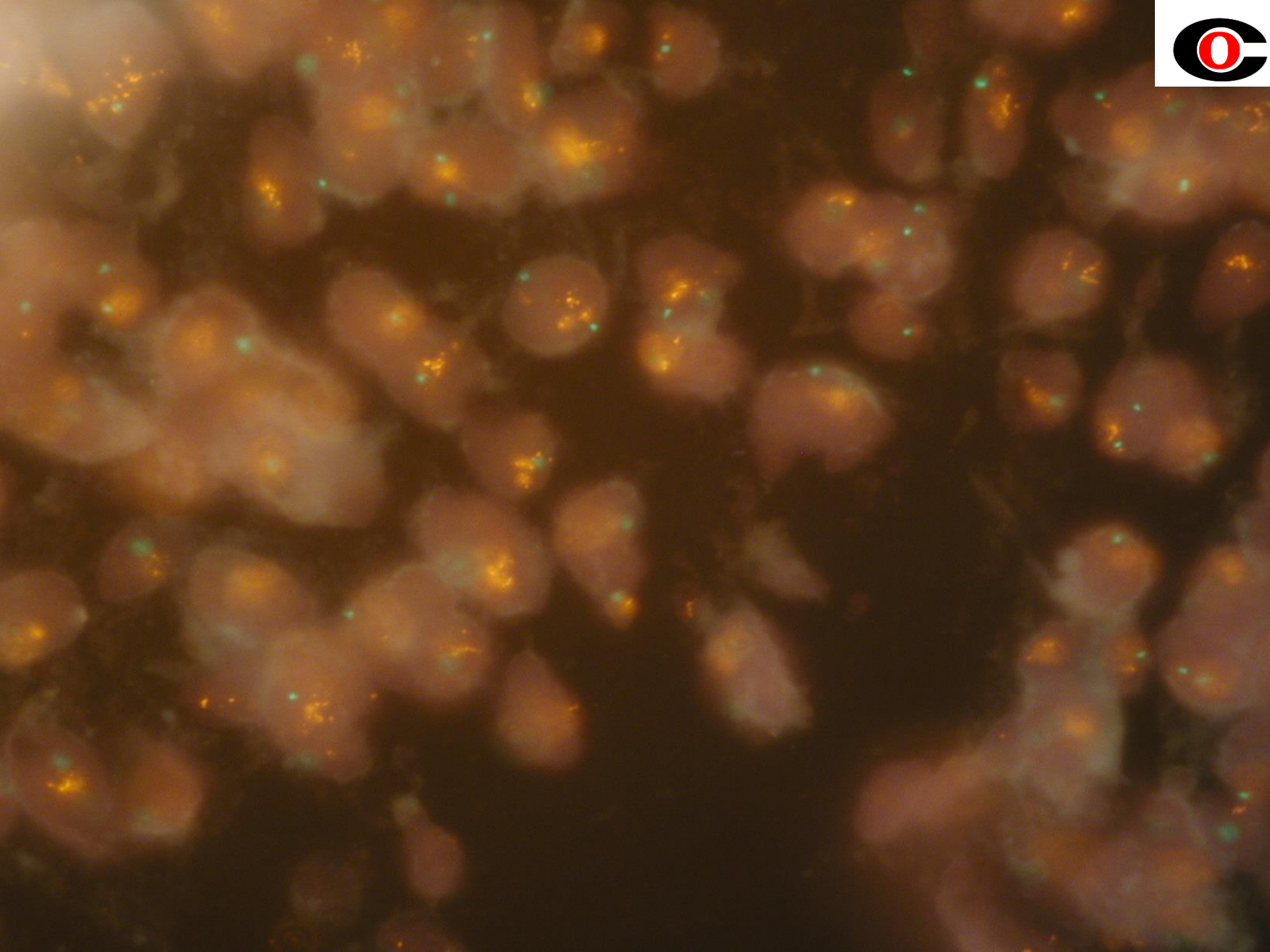
Możliwości oceny statusu HER2



- 1 = ↑ gene copy number
- 2 = ↑ mRNA transcription
- 3 = ↑ cell surface receptor or protein expression
- 4 = ↑ release of receptor extracellular domain









Specyficzność testu: marker - TYR

1 2 3 4 5 6

207 pz—



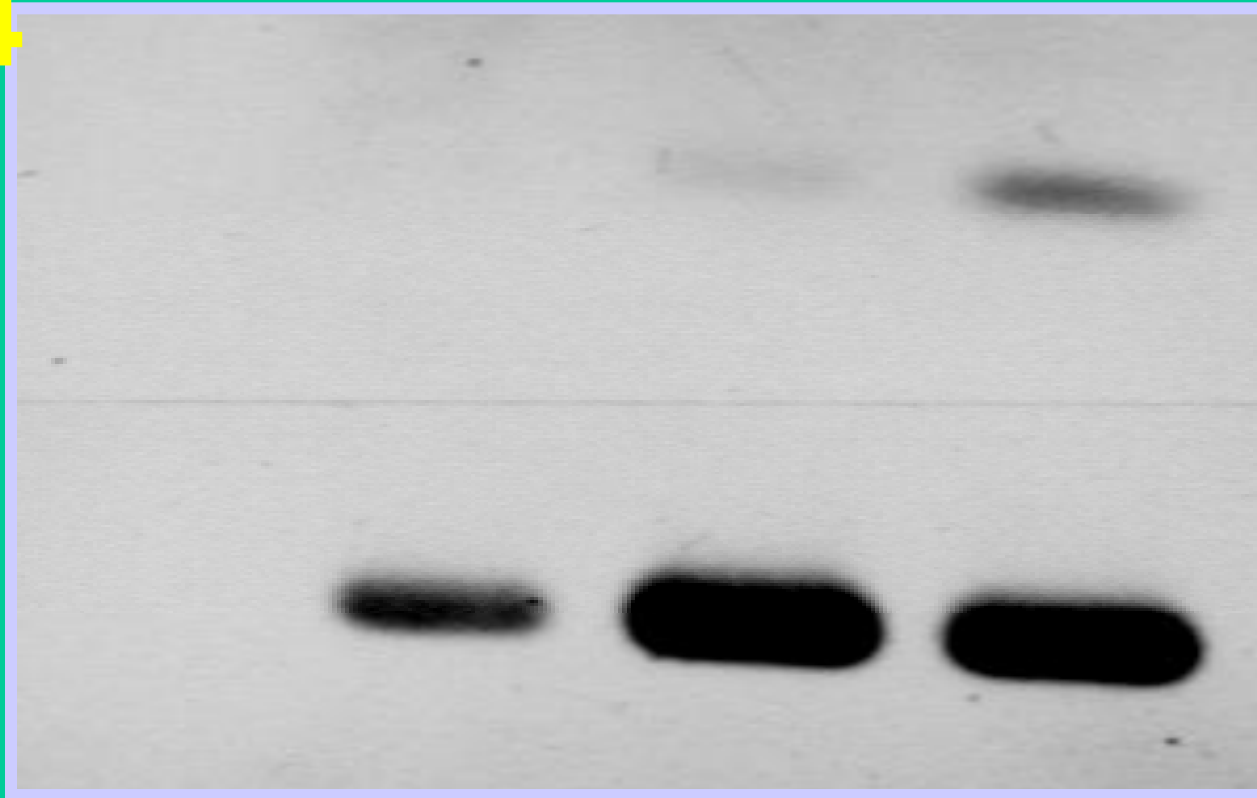
Czułość testu: marker - TYR

1

2

3

4



- 284 pz

- 207 pz

**Badania nad biologią
procesu nowotworowego
toczą się głównie w
laboratoriach naukowych**



**Dla celów diagnostycznych
laboratorium powinno posiadać
certyfikat laboratorium
diagnostycznego.**

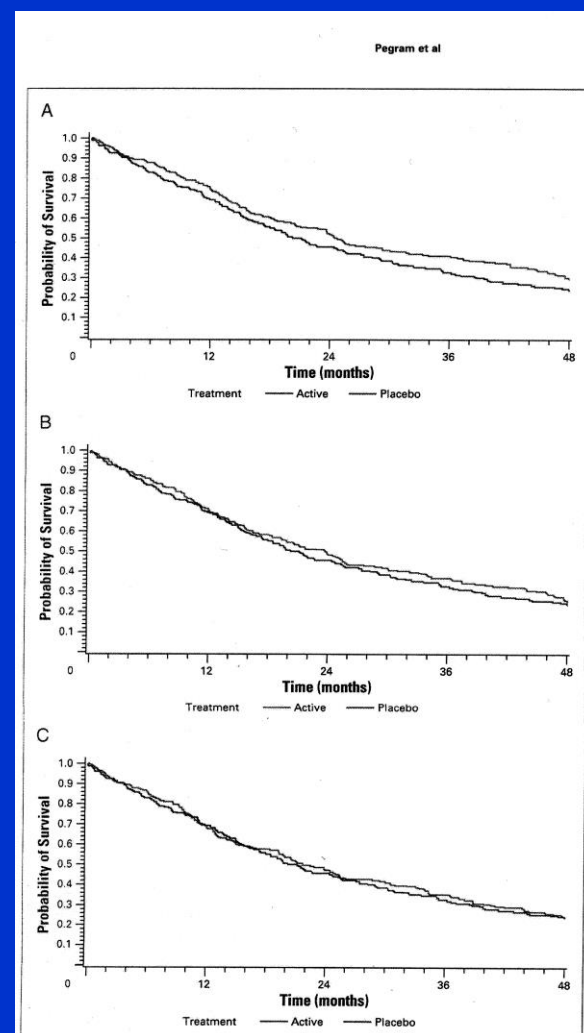
KRAJOWA IZBA DIAGNOSTÓW LABORATORYJNYCH



Symulacja wyników badania klinicznego III fazy

Założenie:

- ❖ Liczba pacjentów - 200
- ❖ Kontrola - 200
- ❖ Średnie przeżycie 22 miesiące
- ❖ Dodatkowe podawanie leku przedłuża życie do 27 mieś.
- ❖ Poprawia przeżycie czteroletnie o 5%



100%

50%

25%

Akredytacja Unii Europejskiej



CERTIFICATE OF PARTICIPATION
IN THE 2011 EXTERNAL QUALITY ASSESSMENT SCHEME
FOR KRAS

Molecular Biology Department
Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center and
Institute of Oncology
02-781 Warsaw
Poland

Score genotype: 10/10 (100%)
Average score genotype: 9.6/10 (96%)
Average score genotype (subscheme): 9.9/10 (99%)

Prof. Dr. Els Dequeker

12/03/2012

Prof. Dr. Han van Krieken

12/03/2012





**Dziękuję za
uwagę**

