

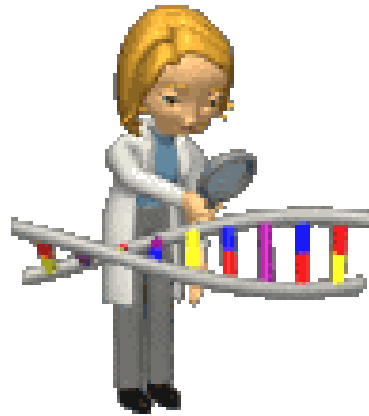
# Techniki biologii molekularnej przydatne w diagnostyce onkologicznej

Prof. Barbara Pieńkowska-Grela



Warszawa, 9 czerwca 2015

# **Badanie genetyczne w nowotworach**



**...polega na stwierdzeniu obecności  
i określeniu rodzaju zaburzeń genetycznych  
(mutacji, aberracji, itp)**

# Zmienność międzyosobnicza

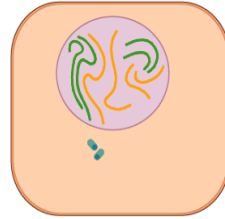




# Materiał genetyczny odziedziczony

## Prawidłowy kariotyp

Męski  
46,XY

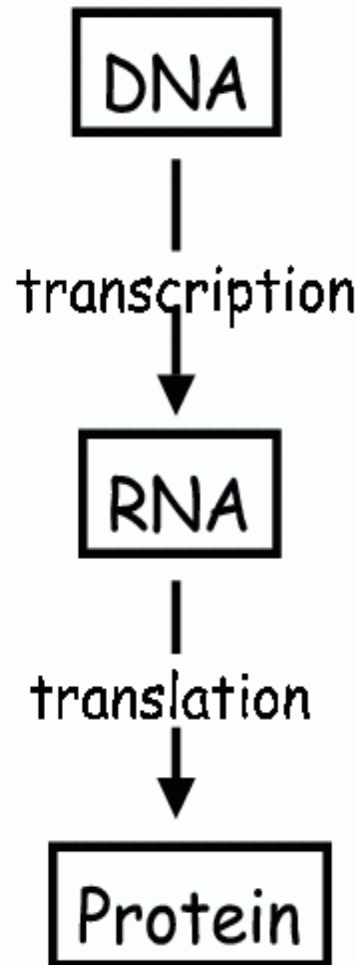
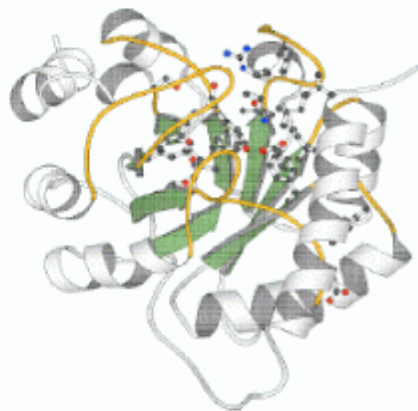
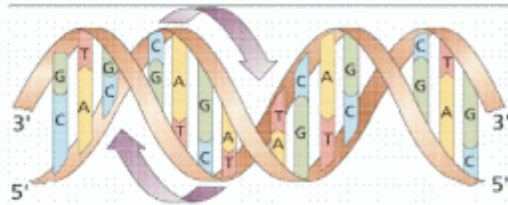


Żeński  
46,XX



Wszystkie komórki somatyczne zawierają  
**po dwie** kopie (allele) każdego genu:  
matczyną i ojcowską

# Central Dogma: DNA → RNA → Protein



CCTGAG

CCUGAG

**GENY**

GATGAA

**IGAUGAA**

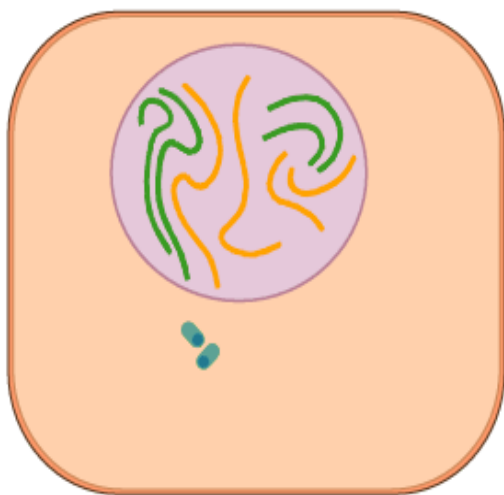
**FENOTYP**

# **GENETYCZNE ZMIANY NABYTE**

## **W KOMÓRKACH SOMATYCZNYCH**

# Błędy podziału komórki warunkowane są przez zaburzenia genetyczne

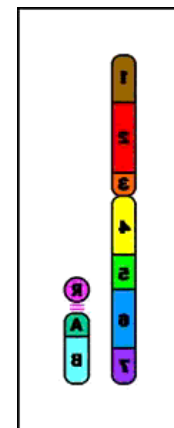
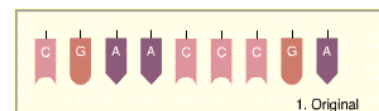
Podział komórki



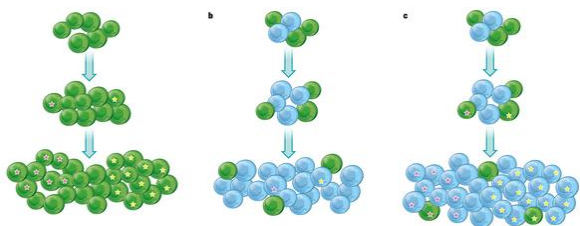
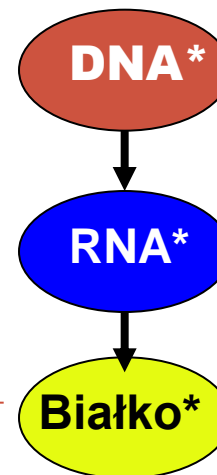
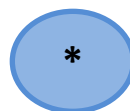
Synteza DNA



Mutacje/zaburzenia  
struktury DNA



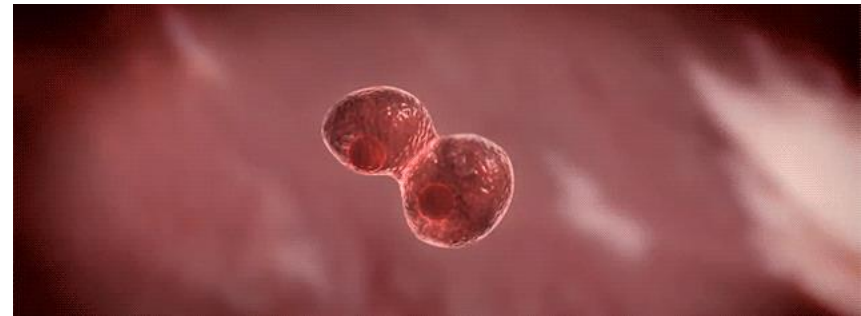
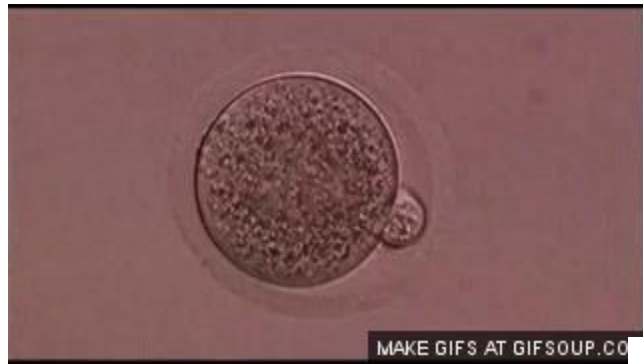
komórka  
o zmienionej fizjologii



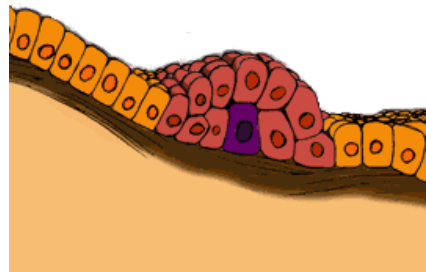
# Tempo podziałów

Komórka  
prawidłowa

Komórka  
nowotworowa



Tumor cells





# Diagnostyczne badanie genetyczne w nowotworach



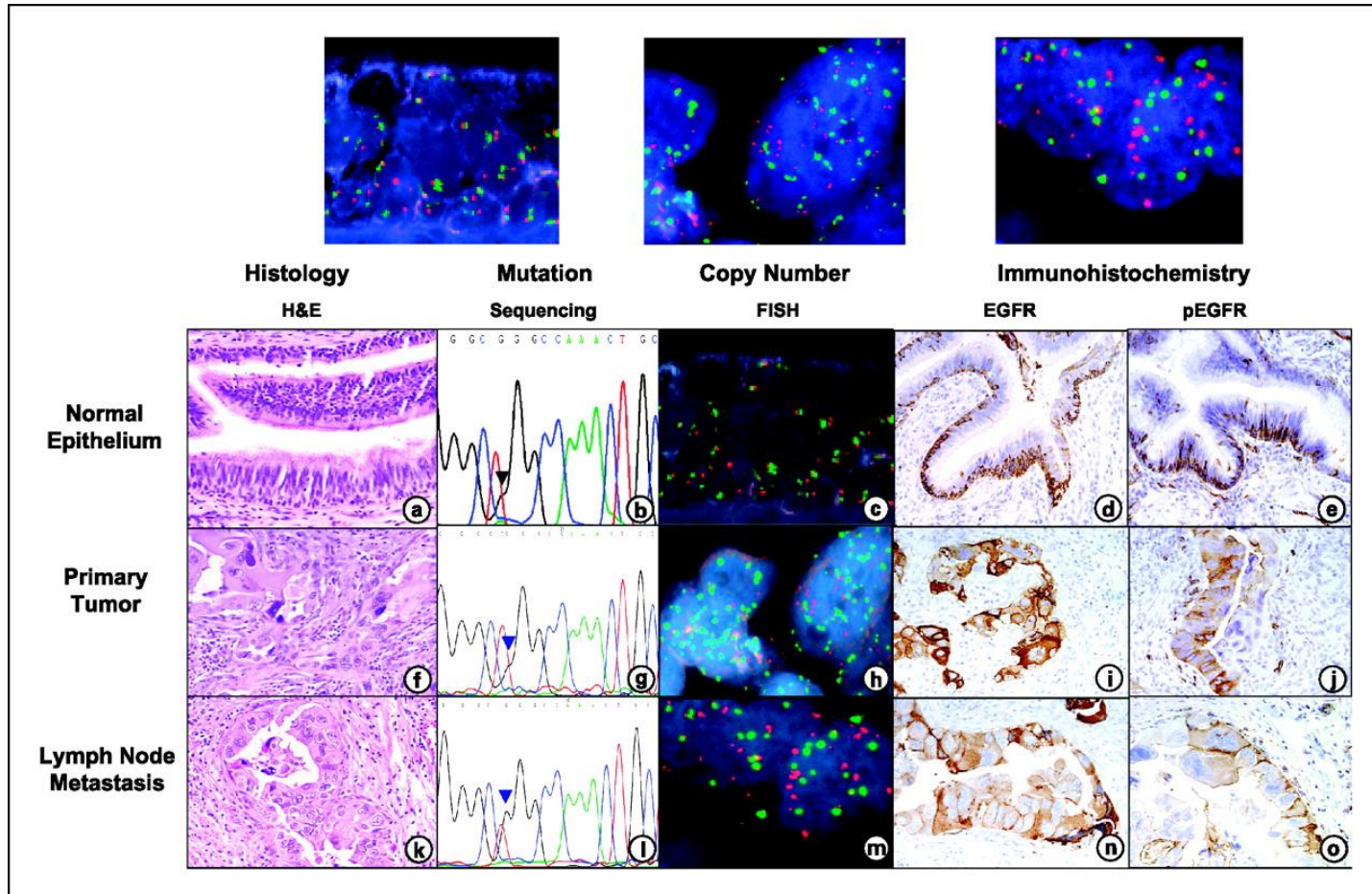
**polega detekcji zaburzeń genomowych,  
kluczowych dla określonego nowotworu,  
w komórkach  
nowotworowo zmienionej tkanki**

# Materiał do badania genetycznego: rola patologa

- Diagnostyka his-pat
- Ocena odsetka utkania nowotworowego w tkance (wycinek guza)
- Wskazanie obszaru analizy



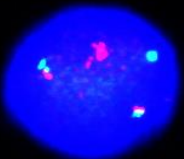
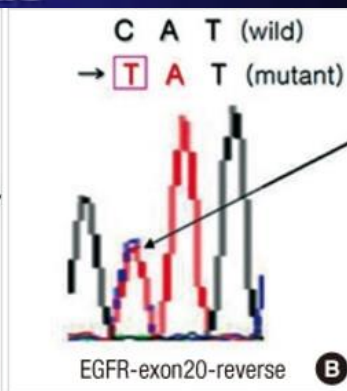
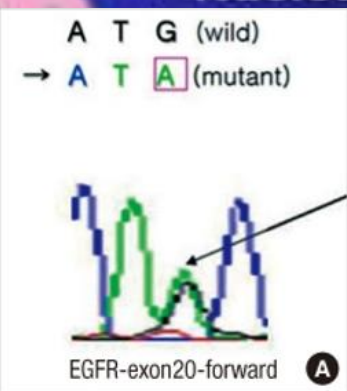
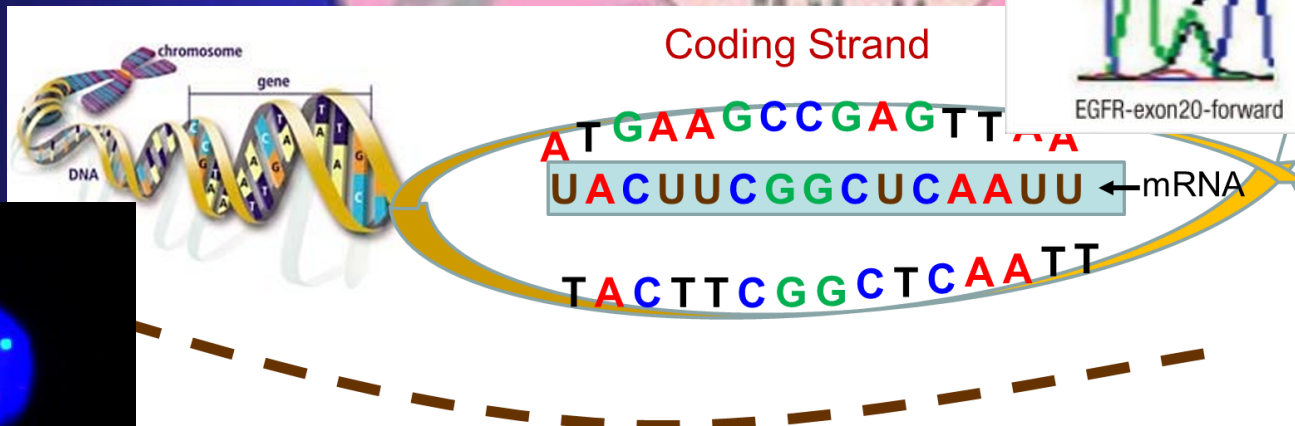
# Pełna DIAGNOSTYKA choroby nowotworowej



# Poziom detekcji zmian genetycznych

Human cell

Nucleus



# Cytogenetyka klasyczna

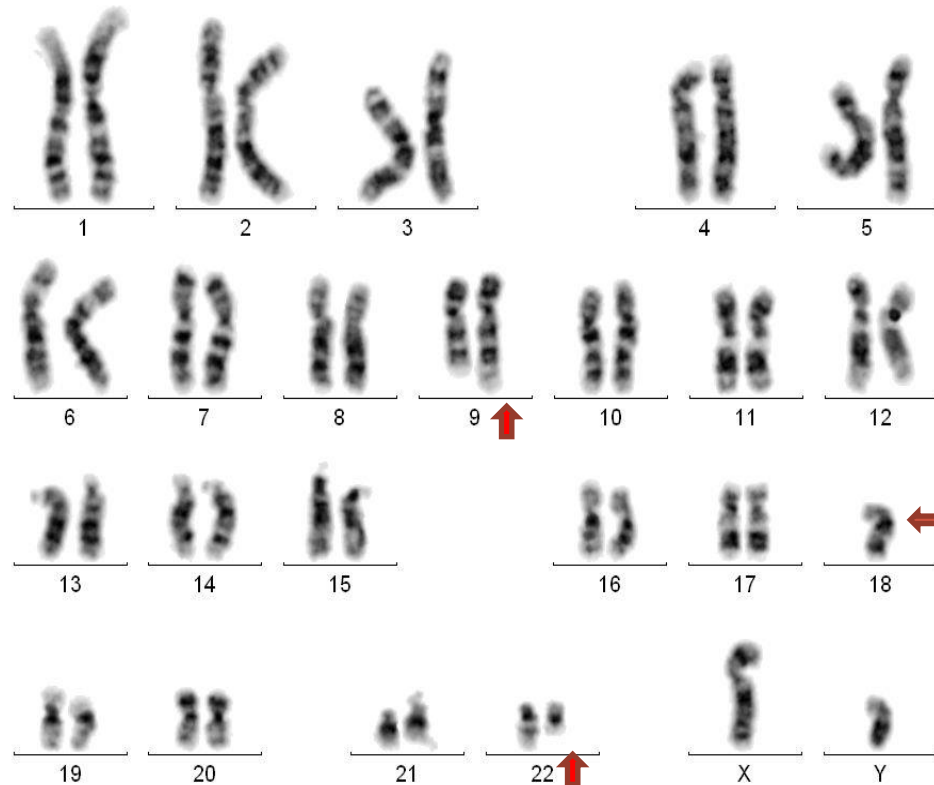
Organize the chromosomes into a karyotype!



1	2	3	4	5
6	7	8	9	10
11	12	13	14	15
16	17	18	19	20
		21	22	x y



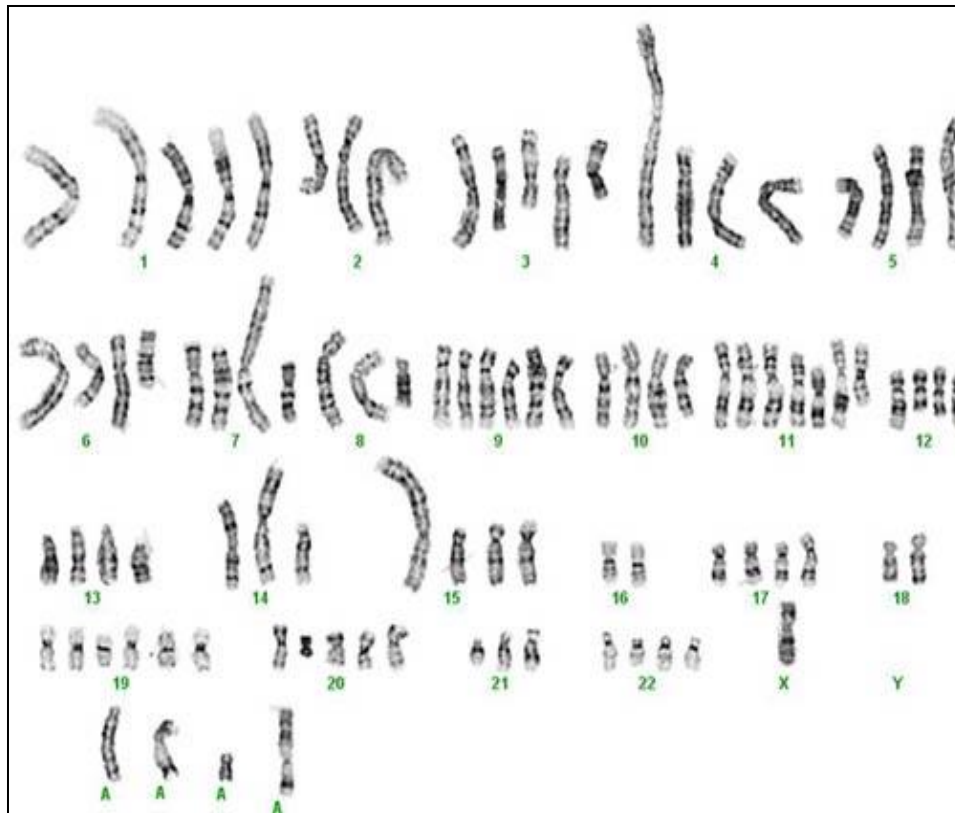
# Cytogenetyka klasyczna



**Badanie ujawnia zaburzenia liczby i struktury chromosomów**  
**45,XY,t(9;22)(q34;q11),-18**

# Kariotypy w guzach litych

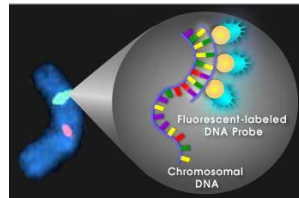
Brest ca.

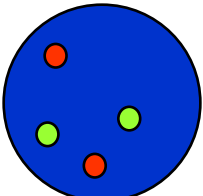


# Cytogenetyka molekularna

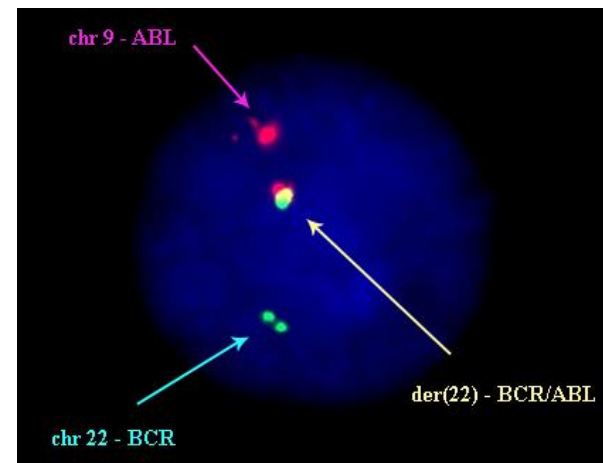
## FISH fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*

Wykrywanie zmian ILOŚCI KOPII i STRUKTURY GENÓW  
(materiału genetycznego w określonym fragmencie genomu  
- sonda DNA)



Norma  brak fuzji *BCR/ABL*

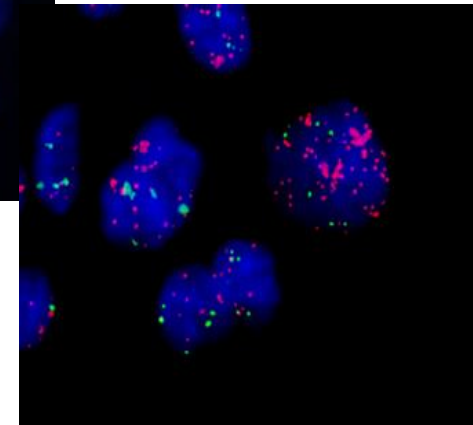
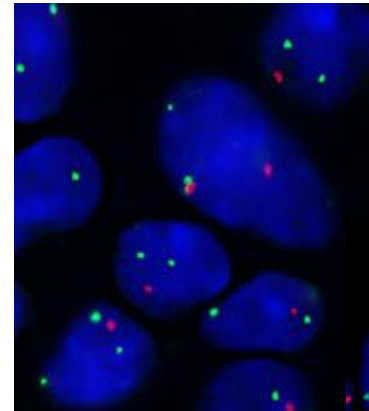
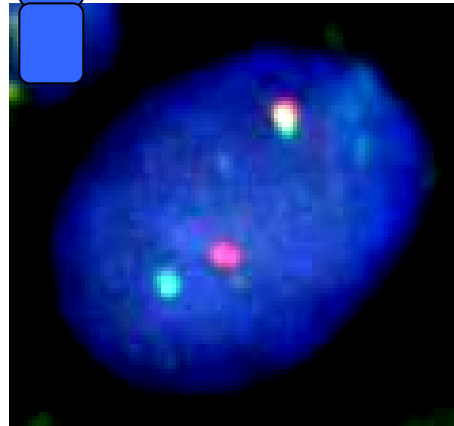
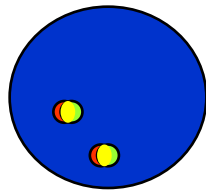
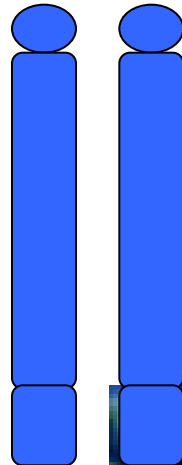
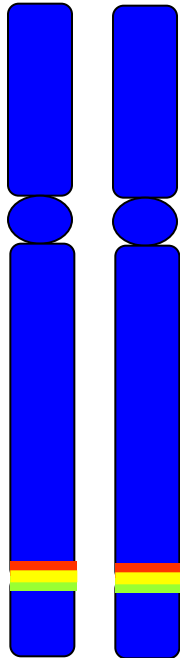
$t(9;22)$   $\longrightarrow$  fuzja *BCR/ABL*



# Zaburzenia statusu genów

**STRUKTURA** badanych genów

**LICZBA** kopii bad. genów



**Obecność rearanżacji badanego genu**

Delecja jednej kopii genu  
Powielenie genu/amplifikacja

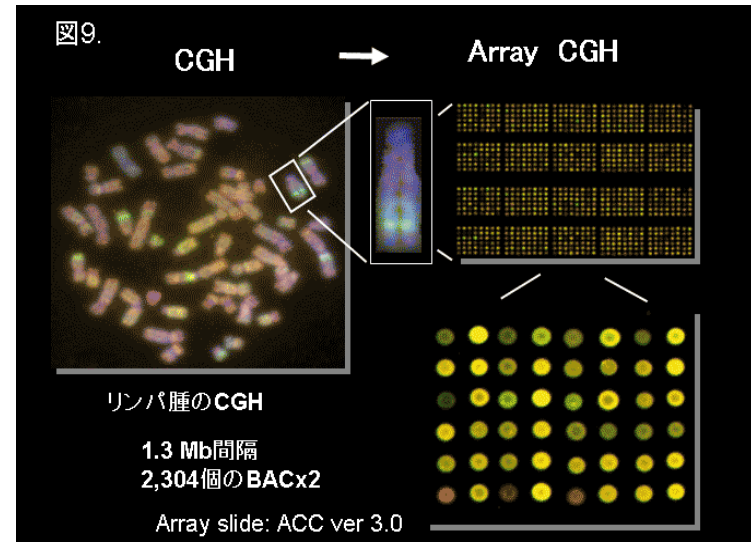
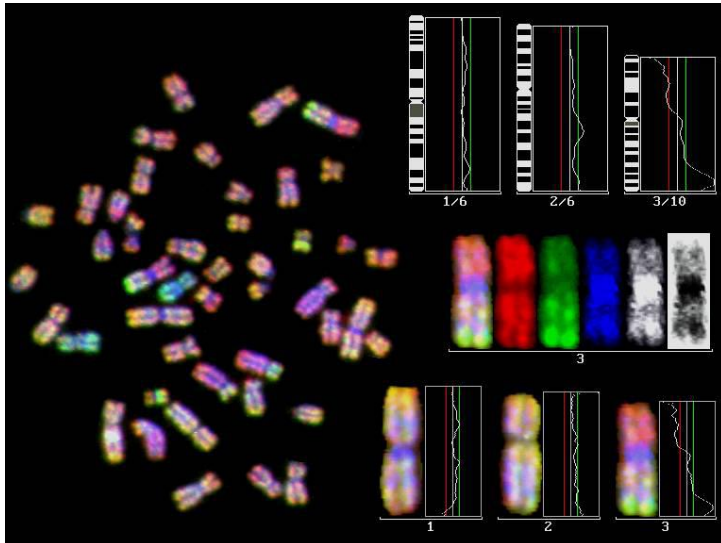
# Cytogenetyka molekularna

## aplikacje techniki FISH

### CGH /array CGH

### Porównawcza hybrydyzacja genomowa

Wykrywanie zmian ILOŚCI  
materiału genetycznego w całym genomie



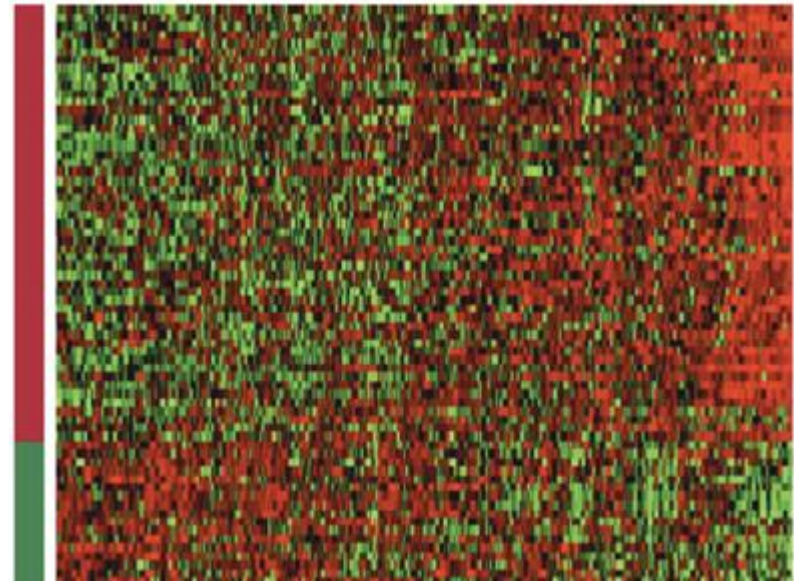


# **GEP (Gene Expression Profiling) Profil ekspresji genów**

Monitorowanie ekspresji poziomu tysięcy genów w równoległym oznaczeniu.

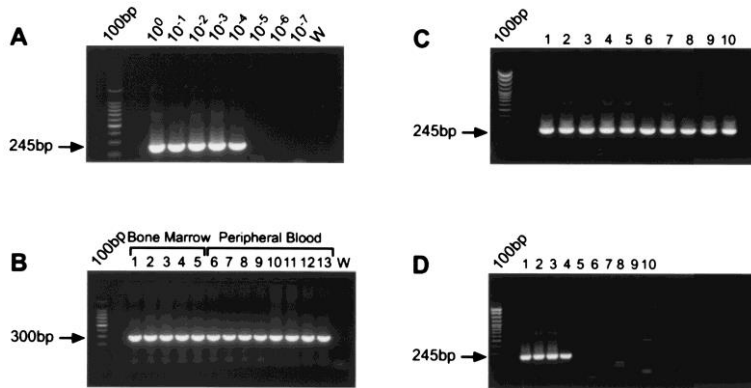
Badanie ekspresji genów z wykorzystaniem mikromacierzy pozwala ocenić stopień aktywacji genów: podwyższoną lub obniżoną

Mozaika kolorowych punktów jest punktem wyjścia do oceny **aktywności** genów w badanym materiale.

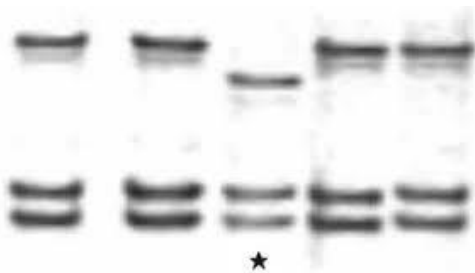


# Biologia molekularna

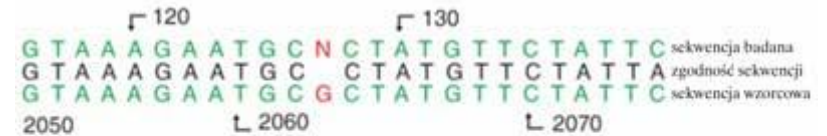
## Wykrywanie fuzji genowych



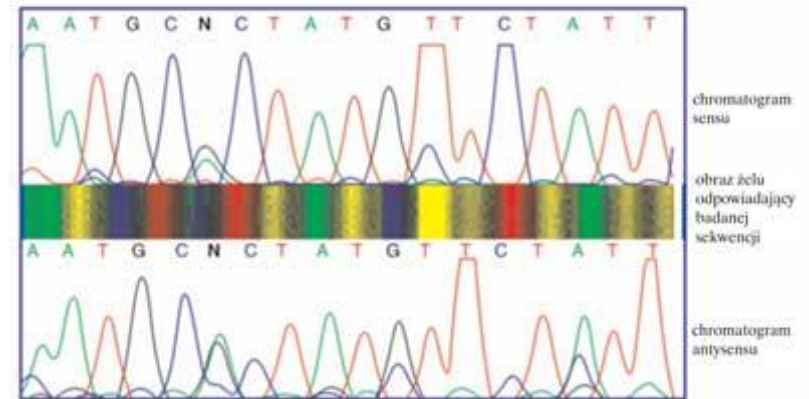
## Detekcja zmutowanych alleli genu



## Wykrywanie/określanie mutacji



porównanie sekwencji badanej – fragment eksonu 18 genu MLH1 do sekwencji wzorcowej z bazy danych – U07343 Gene Bank



porównanie chromatogramów sekwencyjnych sensu i antysensu sekwencji badanej – fragment eksonu 18 genu MLH1

# Techniki badań molekularnych pozwalają na:

- **detekcja znanych zaburzeń (fuzji, mutacji) w genie typowym dla danego nowotworu – rutynowa diagnostyka**
- wykrywanie i określanie nieznanymi mutacji

# Wykrywanie znanych mutacji

np. BRAF V600 w czerniaku czy EGFR w niedrobnokomórkowym raku płuca

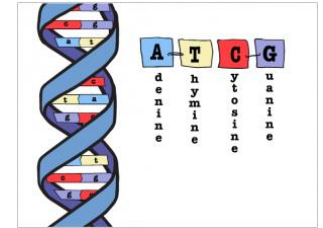
## PCR w czasie rzeczywistym ( *Real Time PCR* )

- Oznaczenia jakościowe
- Obecność konkretnej mutacji w badanym fragmencie / fragmentach genu
- Sonda fluorescencyjna komplementarna do analizowanego odcinka DNA (fragment genu ze spodziewana mutacją)
- **Odczyt:**
  - **jest mutacja –przyłączenie sondy -> fluorescencja+**
  - brak mutacji – brak przyłączenia -> fluorescencja -



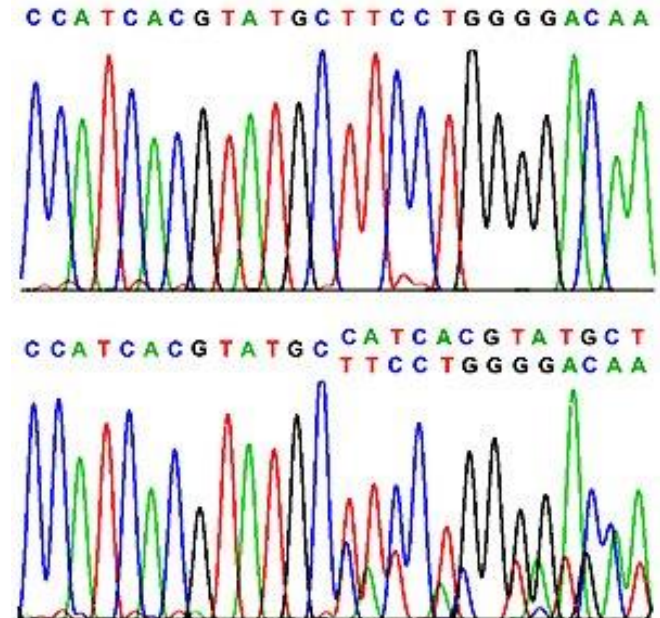
# Sekwencjonowanie i analiza sekwencji

Ustalenie kolejności nukleotydów w kwasach nukleinowych



Najbardziej czułą techniką wykrywania zmian w materiale genetycznym

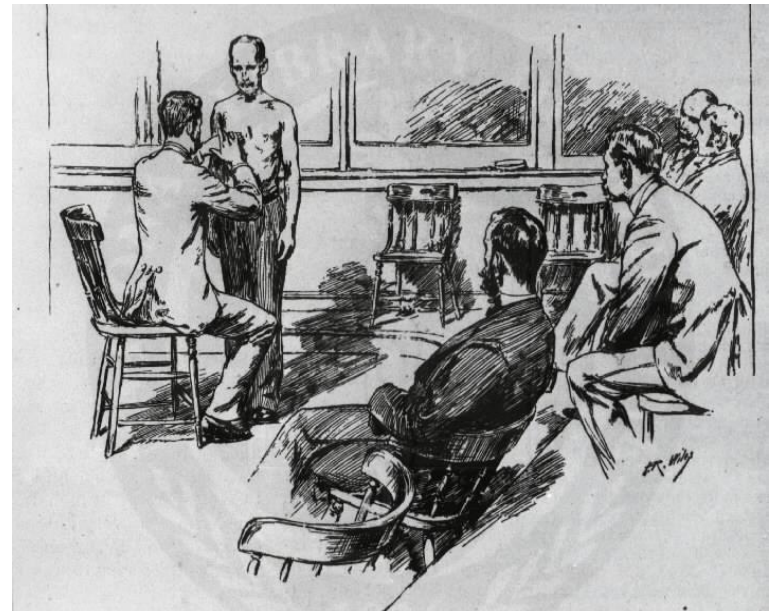
- umożliwia pełną charakterystykę zmian
- oceniane są sekwencje produktów PCR
- Analizy dokonuje się przy użyciu metod bioinformatycznych („krzemobiologia” , „*in silico*”)





# Cele badania genetycznego w nowotworach

- Ocena stanu obecnego pacjenta = diagnoza
- Ocena przyszłości pacjenta = prognoza
- Planowanie leczenia = terapia celowana
- Monitorowanie leczenia = reakcja na terapię



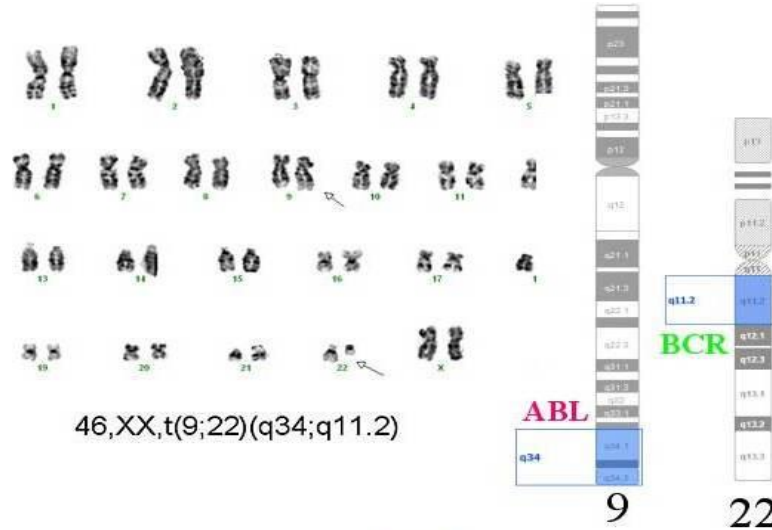
# Diagnostyka genetyczna w białaczkach

## **CEL:**

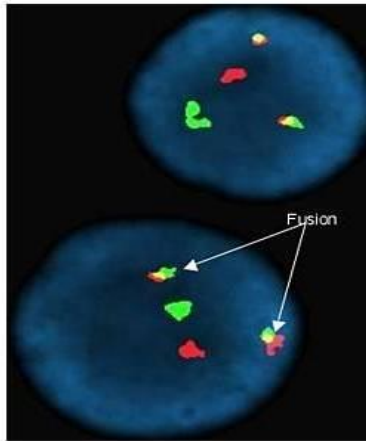
- **Diagnoza / czynniki prognostyczne  
-> Kariotyp, FISH**
- **Planowanie terapii -> Kariotyp, FISH**

# Analiza kariotypu i FISH

przewlekła białaczka szpikowa



Zmiana chromosomowa:  
**t(9;22)(q34;q11)**



Gen fuzyjny **BCR/ABL** ->  
białko fuzyjne **BCR/ABL**

1960

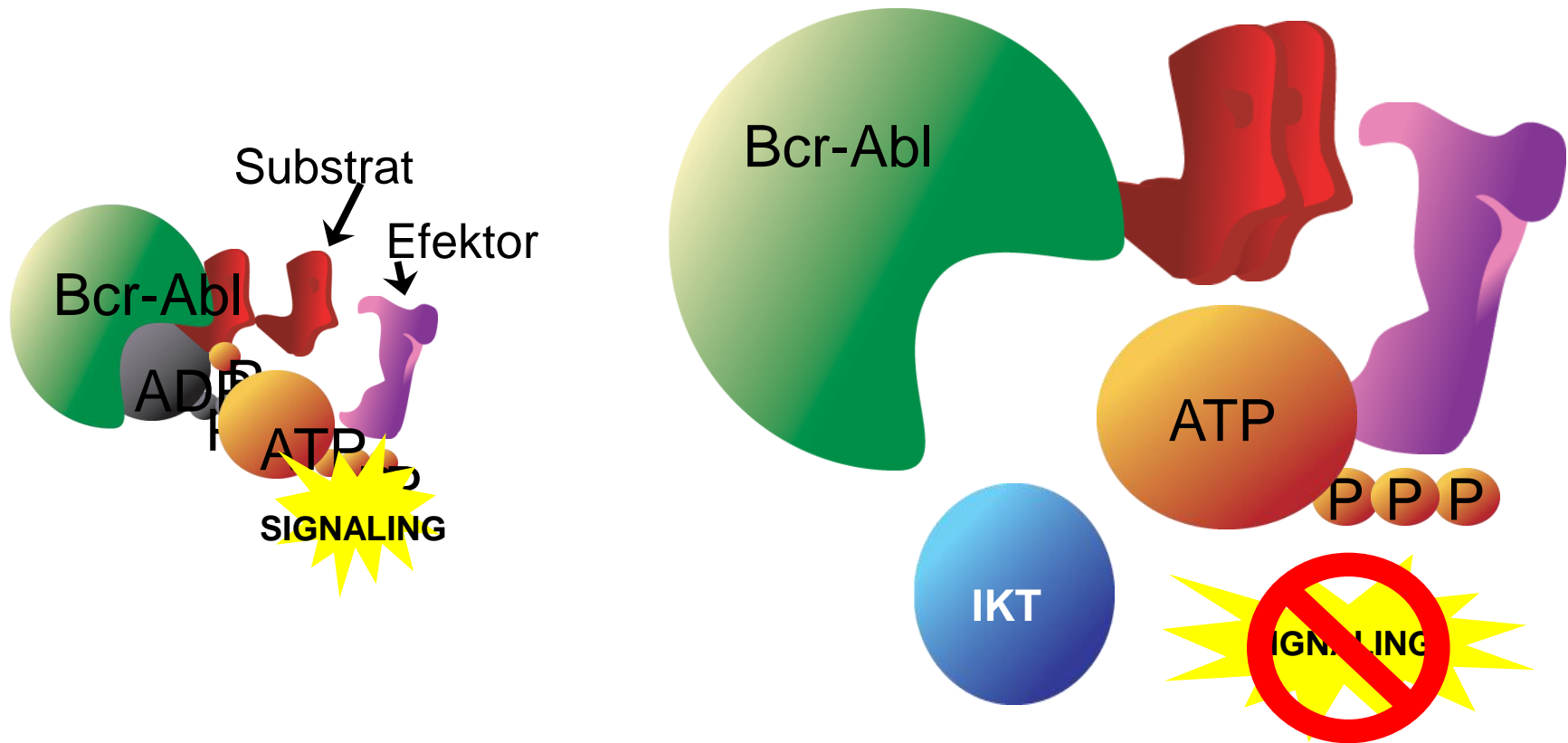
wykrycie chromosomu Ph w PBSz

1998-2001

zastosowanie Imatinibu

# Terapia celowana w PBSz:

Imatinib, Dasatinib, Nilotinib - inhibitory kinazy tyrozynowej *BCR/ABL*



## Skutek działania IKT

- ➡ blokuje miejsce odłączania aktywnego fosforu od cząsteczki ATP
- ➡ indukuje apoptozę komórek białaczkowych

# Diagnostyka genetyczna w guzach litych

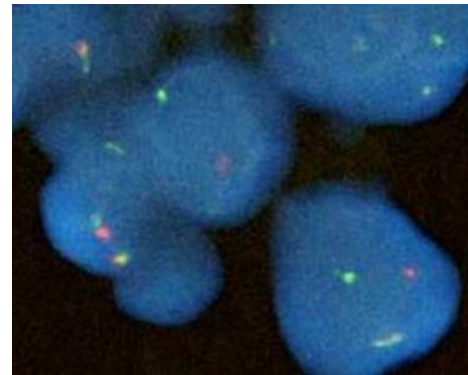
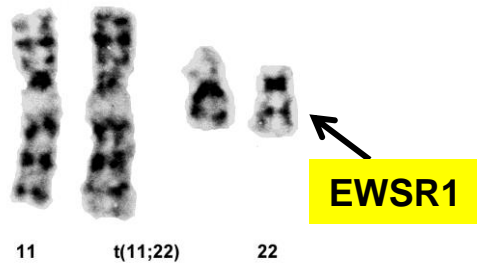
## **CEL:**

- 1. Diagnoza (uściślenie diagnozy / diagnoza różnicowa) ► FISH**
- 2. Planowanie terapii (leczenie celowane molekularnie) ► molekularne, FISH**



# BADANIE FISH

## Mięsak Ewinga różnicowanie z innymi mięsakami drobnokomórkowymi Rearanżacja EWSR1 $t(11;22)(q24;q11)$



**Obecność rearanżacji w badaniu FISH potwierdza diagnozę**

•Genomic structure of the EWS gene and its relationship to EWSR1, a site of tumor-associated chromosome translocation. Plougastel B, Zucman J, Peter M, Thomas G, Delattre O. *Genomics*. 1993 Dec;18(3):609-15

•Is the EWS/FLI-1 fusion transcript specific for Ewing sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumor? A report of four cases showing this transcript in a wider range of tumor types. Thorner P, Squire J, Chilton-MacNeil S, Marrano P, Bayani J, Malkin D, Greenberg M, Lorenzana A, Zielenska M. *Am J Pathol*. 1996 Apr;148(4):1125-38

•Ewing sarcoma/Primitive neuroectodermal tumour (PNET). Chapter XIV: Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone In World Health Organization Classification of Tumors. Ushigome S, Machinami R, Sorensen PH:. Edited by CDM Fletcher, KK Unni, F Mertens. Lyon, IARC Press, 2002, pp 298-300

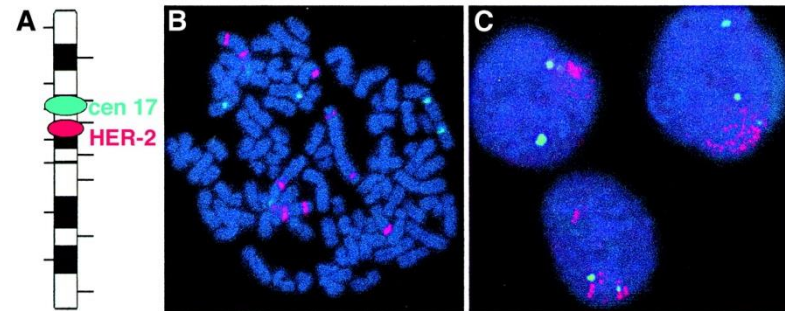
# BADANIE FISH

## Amplifikacja *HER-2* w raku piersi

**Obecność amplifikacji - agresywny przebieg choroby** większe prawdopodobieństwo nawrotu, krótszy czas przeżycia

**Leczenie celowane** blokuje szlaki sygnałowe związane z receptorami naskórkowego czynnika wzrostu onkogen *HER2/NEU* i zlokalizowanego na chromosomie 17

**Herceptyna** w przypadkach z nadekspresją (u 20% chorych, po niepowodzeniu leczenia antracyklinami)



Dual-color FISH w raku piersi *HER-2* gene (SpectrumOrange™) chromosome 17 centromer (SpectrumGreen™).

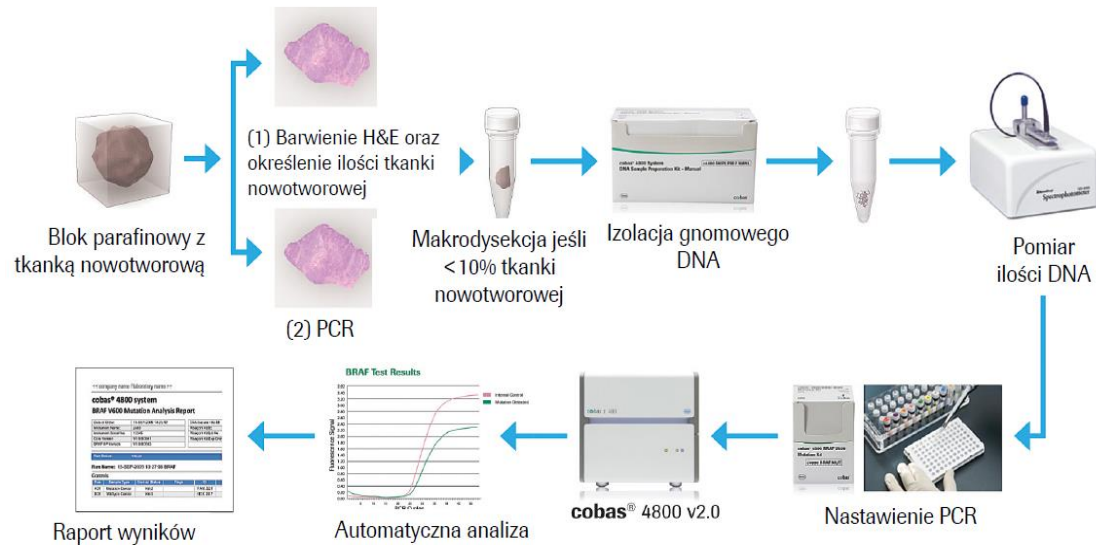
Varella-Garcia M The Oncologist 2003;8:45-58

**Obecność amplifikacji genu *HER2* w komórkach guza, stwierdzona w badaniu FISH, upoważnia do zastosowania leczenia anty-*HER2***

# Badanie molekularne w onkologii

## Wykrywanie ZNANYCH mutacji w badanej sekwencji DNA (genie/ezgonie)

### Przebieg oznaczenia obecności mutacji



- **Metody oparte na PCR**

- \* jakościowe -> wynik: poszukiwana sekwencja obecna/nieobecna

- \* Multiplex PCR - użycie dodatkowych starterów wykrywanie 2 lub więcej regionów DNA w jednej reakcji

- \* ilościowe -> wynik: liczba kopii poszukiwanej sekwencji na mililitr materiału

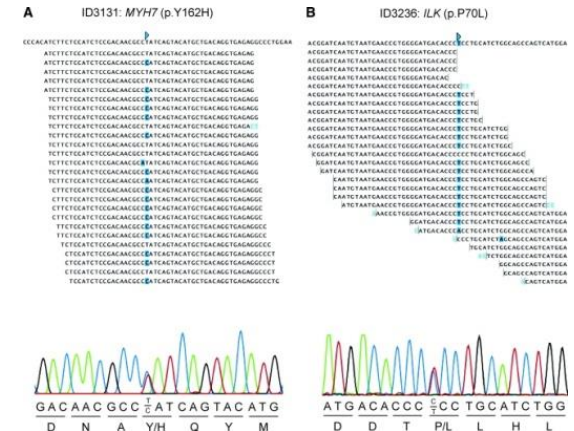
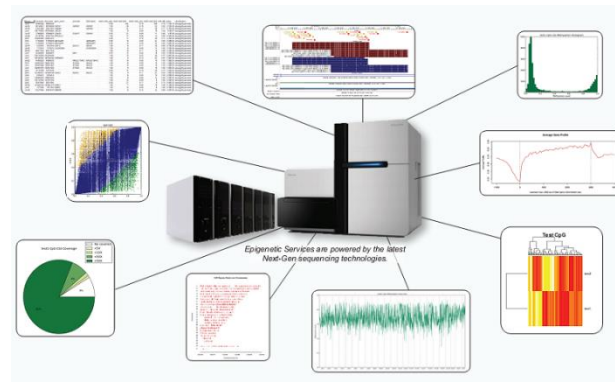
- \* sekwencjonowanie

# Badania molekularne cd.

- **Southern blotting** oraz **PCR-Multiplex** (delecje) czy ilościowe oznaczenie metodą PCR (duplikacje) Metody służące wyznaczeniu dużych rearanżacji genowych
- **RFLP** Analiza polimorfizmu długości miejsc restrykcyjnych (ang. restriction fragment length polymorphism –), stosowana w przypadku mutacji punktowych usytuowanych w obrębie miejsca restrykcyjnego (krótkiej sekwencji rozpoznawanej przez specyficzne enzymy restrykcyjne).
- **ASO** Metoda tworzenia sond w oparciu o oligonukleotydy allelo-specyficzne (ang. allele specific oligonucleotides -) oraz amplifikacja allelo-specyficzna (ang. allele-specific amplification – ASA) umożliwiają znalezienie zmian znajdujących się poza miejscem restrykcyjnym poprzez tworzenie odpowiednich sond oraz starterów odpowiadających allelowi zdrowemu i zmutowanemu.
- **SSCP** - badanie zmian konformacji jednoniciowego DNA (*single stranded conformational polymorphism*)
- **HET** - analiza heterodupleksów (*heteroduplex analysis*)
- **CMC** - chemiczne rozszczepianie niesparowań heterodupleksów – (*chemical mismatch cleavage*)
- **DHPLC** -wysokosprawna denaturująca chromatografia cieczowa (*Denaturing High-Performance Liquid Chromatography*)
- **DGGE** - elektroforeza na żelach z gradientem czynnika denaturującego (*denaturing gradient gel electrophoresis*)

# NGS sekwencjonowanie nowej generacji (Next-Generation Sequencing)

## Nowoczesna technologia sekwencjonowania

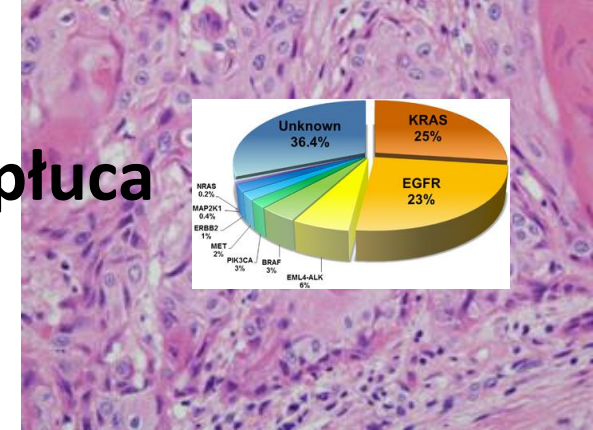


- szeroki wgląd w informację genetyczną (genom - DNA, transkryptom – RNA, epigenom – regulacja struktury i funkcji genomu)

Główna zasada technologii NGS przypomina sekwencjonowanie technologią Sangera  
badanie sygnałów poszczególnych zasady podczas resyntezy DNA matrycowego  
przygotowanie biblioteki DNA

# Zaburzenia genowe w niedrobnokomórkowym raku płuca

Zaburzenia molekularne o udowodnionym  
znaczeniu terapeutycznym w NDRP



Gen	Typ zmiany	Częstość występowania (%)	Inhibitor
<i>EGFR</i>	Mutacje w eksonach 18-21	10-20% raków gruczołowych	Gefitynib, erlotynib
<i>ALK</i>	Rearanżacja	3-5% raków gruczołowych	Kryzotynib

## LECZENIE CELOWANE MOLEKULARNIE

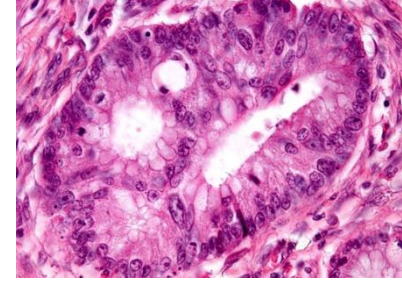
**Gefitynib i erlotynib** - inhibitory kinazy tyrozynowej EGFR  
Kwalifikacja chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca  
EGFR+ do leczenia inhibitorami

Konieczne oznaczenie **mutacji EGFR** przy kwalifikacji do leczenia  
którymkolwiek z inhibitorów

**Potwierdzenie obecności mutacji aktywującej w genie EGFR – nie tylko w eksonie 19 i 21 (tzw. common mutations), ale również w rzadszych lokalizacjach (ekson 18, 20)**



# Rak jelita grubego



Badanie IHC (**nie – molekularne**) dla wykazania ekspresji receptora nabłonkowego czynnika wzrostu (EGFR)

## **Badanie molekularne**

Przed rozpoczęciem leczenia wymagane jest potwierdzenie statusu genów RAS, tj. **wykluczenie mutacji w genach KRAS i NRAS (eksony 2,3,4)**



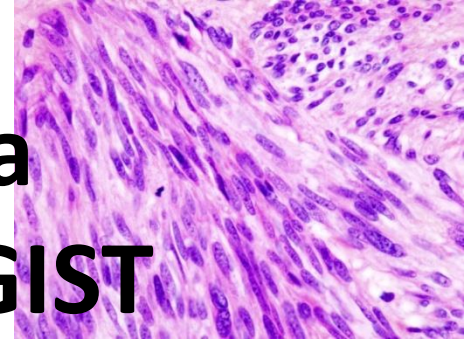
Leki dostępne: **CETUXYMAB**      **PANITUMUMAB**

przeciwciała monoklonalne, powoduje zahamowanie czynności receptora i może prowadzić do zmniejszenia ekspresji EGFR

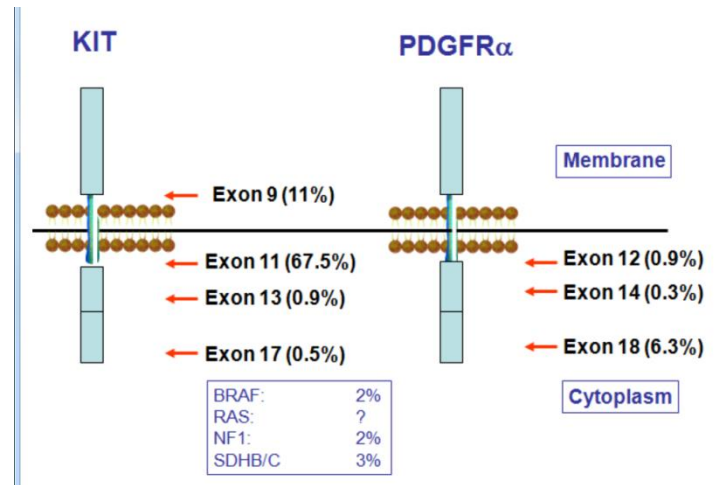
**Geny RAS (KRAS i NRAS) typu dzikiego tj. BEZ MUTACJI**



# Nowotwory podścieliska przewodu pokarmowego GIST

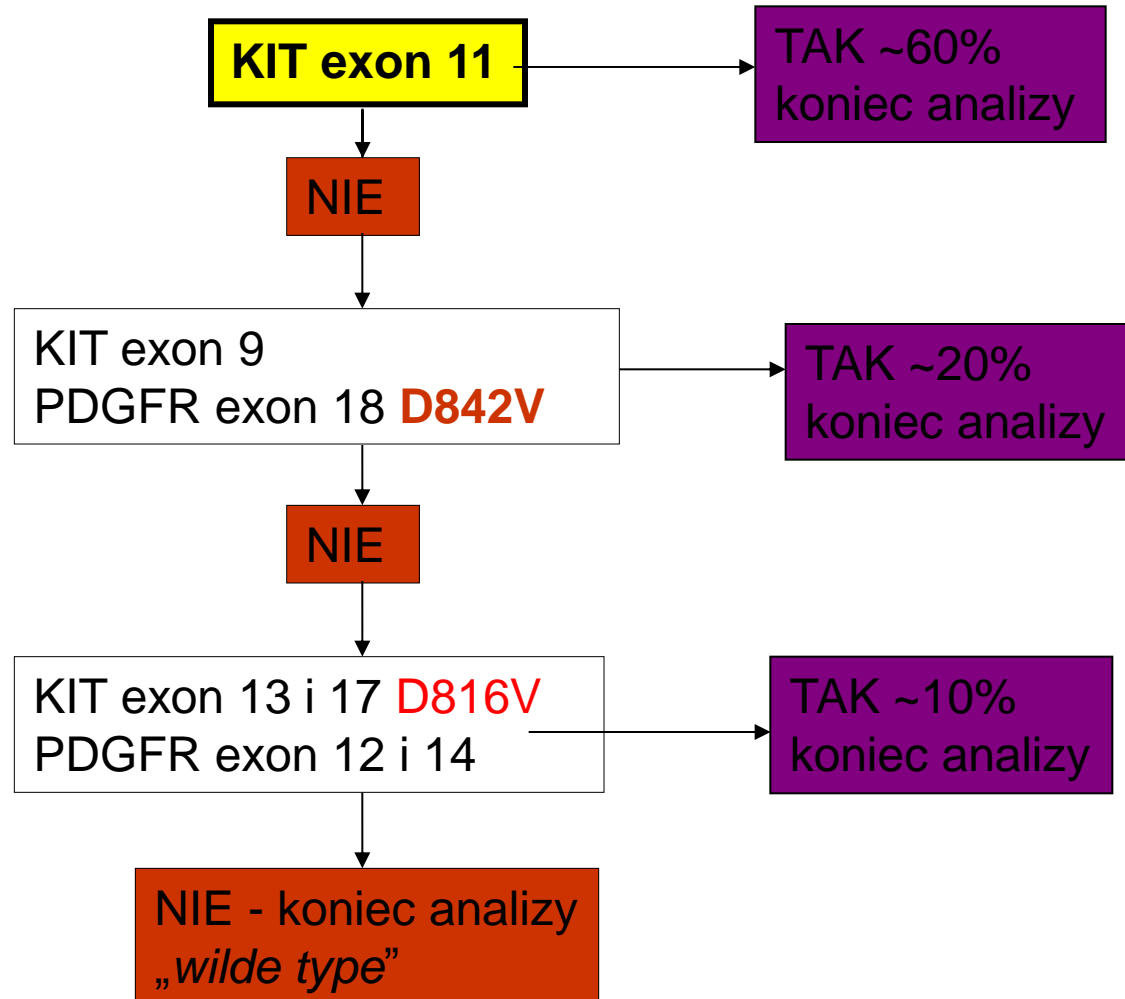


## MUTACJE PIERWOTNE aktywują geny **KIT** lub **PDGFRA**



Każda z tych mutacji prowadzi do niekontrolowanego wzrostu komórek

# Złożona analiza molekularna



# Ku pamięci

- Rutynowe badanie genetyczne w nowotworach polega na wykryciu (lub wykluczeniu) obecności oczekiwanych (zgodnie z diagnozą) zaburzeń genetycznych
- Materiałem do badania jest tkanka zmieniona nowotworowo (guz, biopsja zajętego szpiku)

# Ku pamięci (cd.)

- Stosowane techniki to:
  - Badanie molekularne (MUTACJE GENU) – guzy lite  
→ planowanie terapii
  - Badanie FISH (LICZBA KOPII, STRUKTURA GENU)  
białaczki, chłoniaki, guzy lite → diagnostyka,  
planowanie terapii
  - badanie kariotypu (CHROMOSOMY) cytogenetyka  
klasyczna – białaczki, chłoniaki -> diagnostyka

# Ku pamięci (cd.)

- Skuteczna diagnostyka choroby nowotworowej wymaga współdziałania specjalistów z wielu dziedzin, badanie genetyczne (molekularne) stało się istotnym narzędziem niezbędnym we współczesnym podejściu do leczenia
- Badanie genetyczne użyteczne klinicznie**  
**powinno zostać wykonane przez doświadczone laboratorium za pomocą zwalidowanych metod testowych**



Dziękuję za uwagę ...