

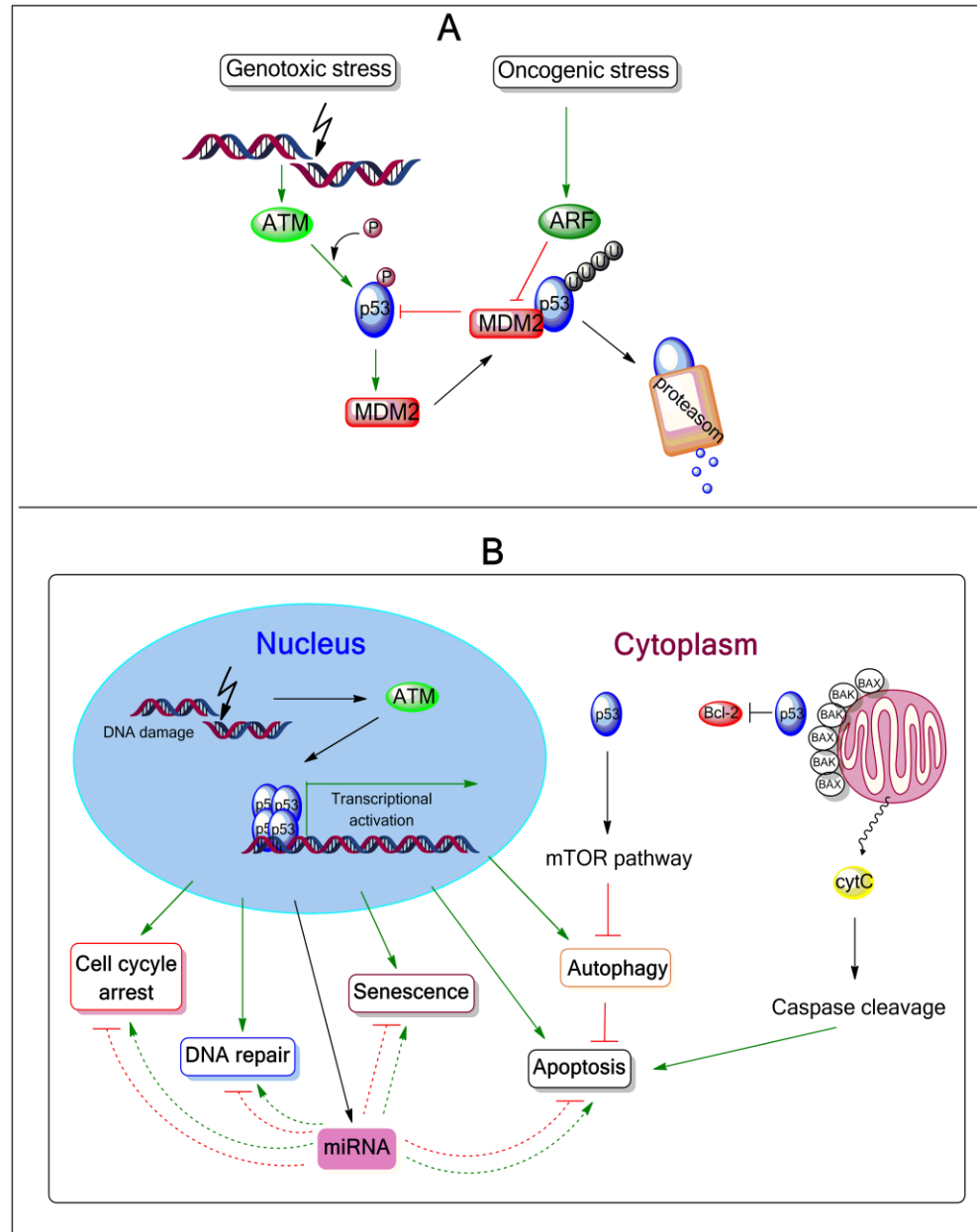
Využití čipových technologií v onkologii

Dr. Martin Trbušek

Fakultní nemocnice Brno

Od premaligních lézí k rakovině je pěkně dlouhá cesta.....

DNA damage response (DDR)



Základní společné rysy nádorových buňky

Deregulace buněčného cyklu (**narušení kontrolního bodu G1/S**)

Únik před apoptózou (programovanou buněčnou smrtí)

Mutace v genech pro opravy DNA

Zajištění dostačující opravy DNA (**zejména v G2 / M-fázi buněčného cyklu**)

Invazivita v primární tkáni

Angiogeneze

Metastázování

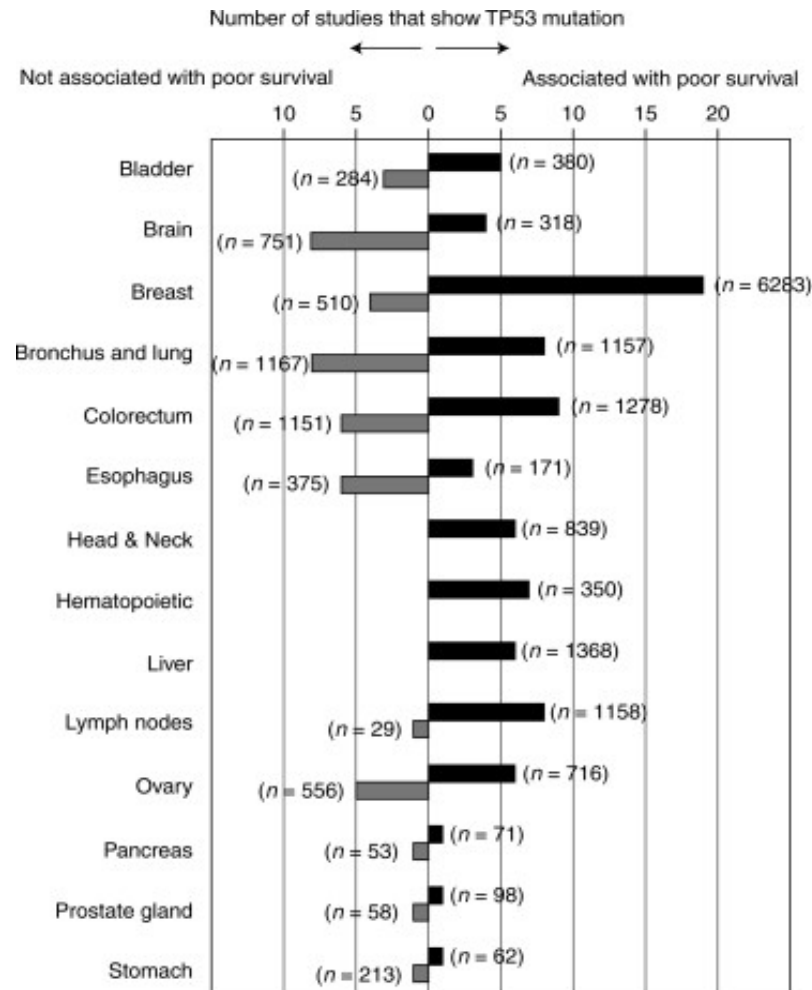
Selekce nových rezistentních klonů léčbou

Základní náležitosti pro microarrays

- **Originalita tématu (anticipace výsledků)**
- **Solidní analýza vzorku (% nádorových buněk)**
Imunohistochemie, flow-cytometrie
(např. ZAP-70/T-lymf. a B-CLL)
- **Zpracování vzorku**
Brát v úvahu možnost nechtěného ovlivnění genové exprese
Sortovat či nesortovat buňky? (hlavně ne obojí

Na problémy stačí jeden gen...

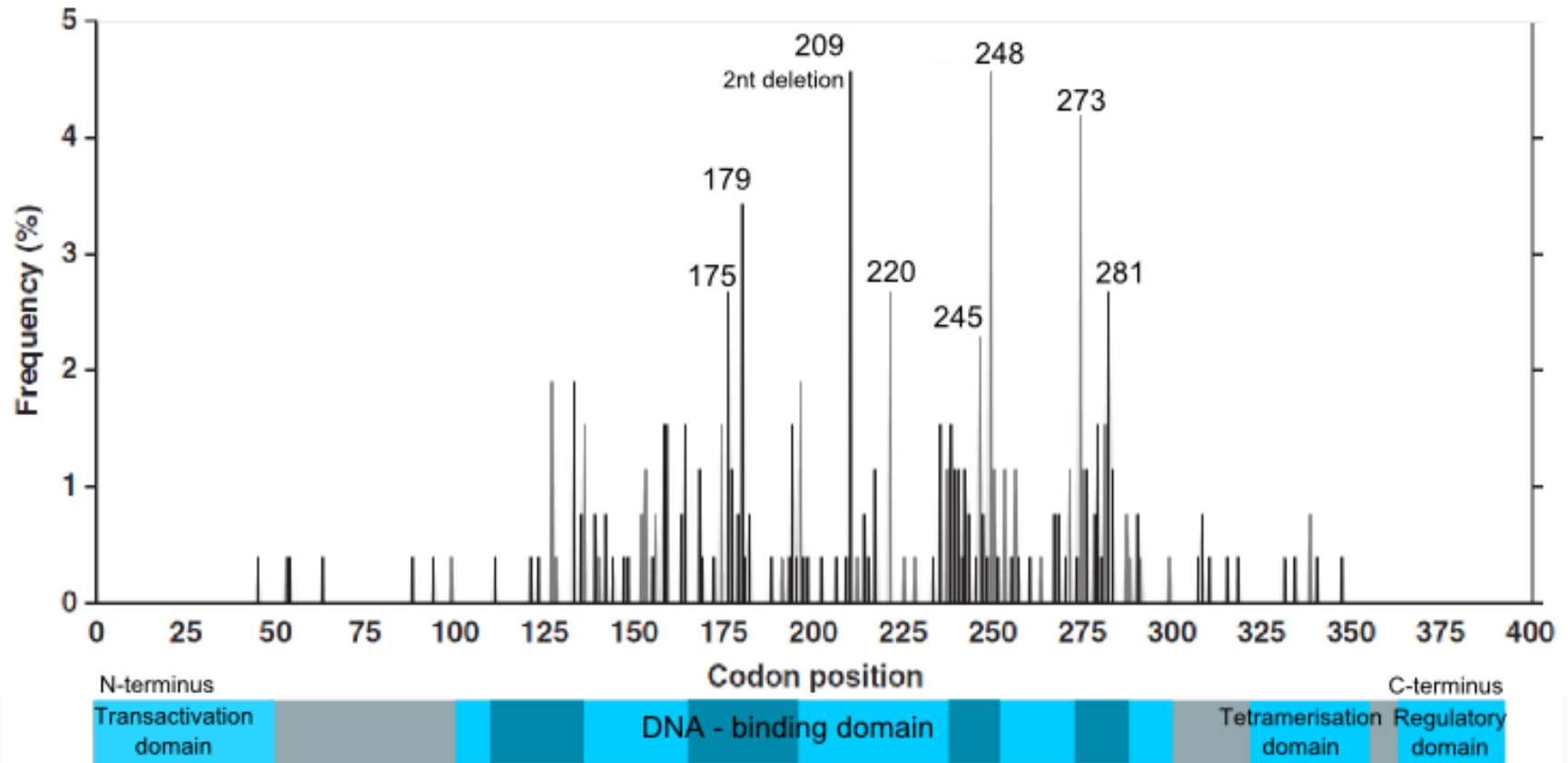
(Prognostický význam mutací p53 u nádorů)



Převzato od:

Robles AI, Harris CC: Clinical outcomes and correlates of TP53 mutations and cancer. Cold Spring Harb Perspect Biol 2010; 2: a001016

p53 mutace: diametrálně rozdílný fenotyp - LOF, DNE, GOF -



Zenz et al., Leukemia 2010
268 p53 mutations in CLL

A léčba nám analýzu určitě neusnadní.....

Kdeže jeden lék.....

Místo něj máme „portfolio písmen a jejich kombinací:“

A, AF

CLB, R-CLB

R, RF

F, MTX, Bend

FC, FCR

CHOP

R-CHOP

VAD

OFA

R-Dex

OFA-Dex

AlloSCT

Využití I: Změna genové exprese v maligní transformaci

Můžeme očekávat změnu GE u stovek až tisíců genů

Anticipace dle genetických defektů

Inaktivace tumor-supresorových genů

- **Mutace v p53:** transk. faktor, deregulace b.c., apoptózy, oprav DNA
- **Mutace v Rb, p16:** deregulace buněčné fáze G1/S

akcelerace proliferace

Amplifikace onkogenů

- **Cyklin D1, MDM2, N-MYC;** dominantní vliv na proliferaci

Zvážit „cílenou informaci“ oproti „maximální informaci“

Předchůdci microarrays to nemuseli řešit

- **SAGE, differential display, fágové knihovny**

My ano

- **Selekční čipy vs. Celogenomové čipy**

Využití II: Molekulární klasifikace nádorů

- „Velké nádory“ mají své jasné (spolu)pachatele

Charakteristické translokace

Chronická myeloidní leukémie t(9;22) BCR-ABL

Mantle cell lymfom t(11;14) Cyklin D1/IgH

Folikulární lymfom t(14;18) Bcl-2/IgH

Burkittův lymfom t(8;14) c-Myc/IgH

Charakteristické delece

Chronická lymfocytární leukémie del 13q, del 11q, del 17p

Překryv CLL/MCL

Metastázy nejasného původu

Schválený komerční kit (FDA) založený na analýze genové exprese

Využití III: Testování léčiv na nádorových buňkách

To už může být o poznání přehlednější situace – většina léčiv má „dobře čitelný“ efekt na buňky

Největší světový skříník – National Cancer Institute

60 dobře definovaných buněčných linií, desítky tisíc látek

Koncept tzv. syntetické letality

Nové možnosti při využití „next-generation sequencing“

Určitě existuje prostor pro cílené analýzy

Základem je dobrá charakterizace linií / primárních buněk

Je dobré mít korelaci s cytogenetikou (aCGH) a mutacemi

klíčových genů (p53)

Využití IV: Testování účinku léčiv v klinické praxi

Metodicky extrémně náročné (rozdíly v léčbě mezi pracovišti,
krátkodobé vs. dlouhodobé účinky apod.)

Rozhodování, zda je vhodná adjuvantní chemoterapie u
pacientů s nádorem prsu, stádia II a III
(komerční kit schválený FDA)

Van't Veer et al. Gene expression profiling predict outcome of breast
cancer. Nature 2002;415:530-6.

Využití V: Micro RNA v onkogenezi

- Lagos-Quintana M et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs.

Science 2001; 294:853-8

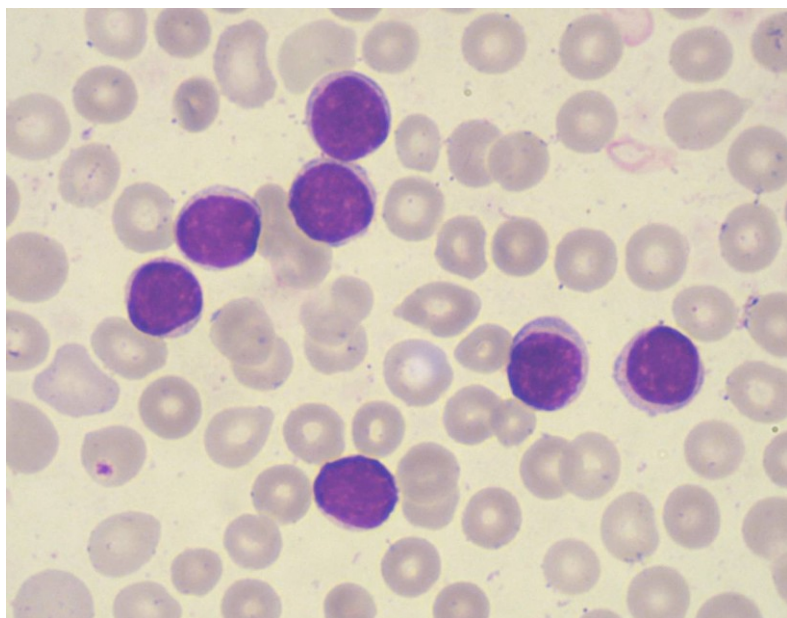
9 600 publikací; regulace exprese kódujících genů

- Calin GA et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia.

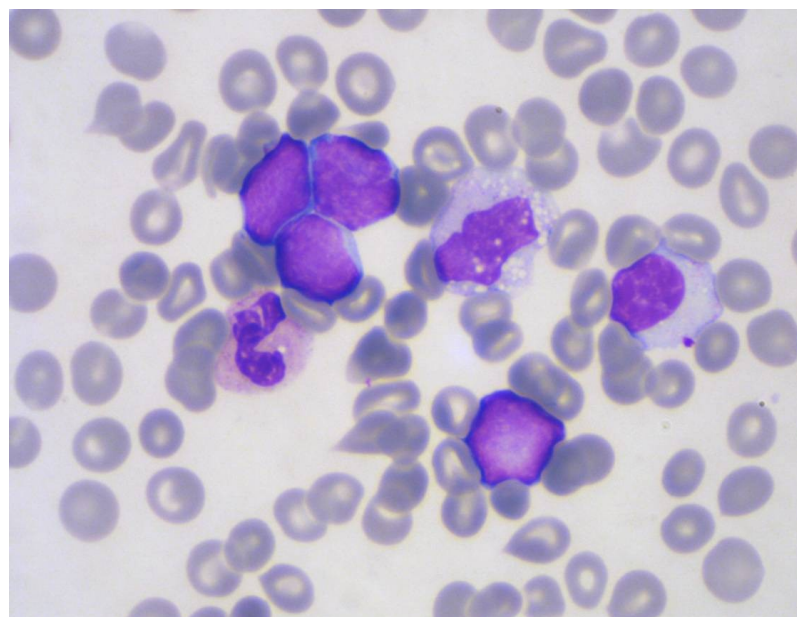
NEJM 2005;353:1793-801.

Využití VI: Studium nádorové transformace

CLL



Lymfoblastický relaps



**Transformace nebude primárně způsobená změnou genové exprese,
ale bude důsledkem nových genetických abnormalit.**

Vyvstává tak důležitost genetické charakterizace vzorku.

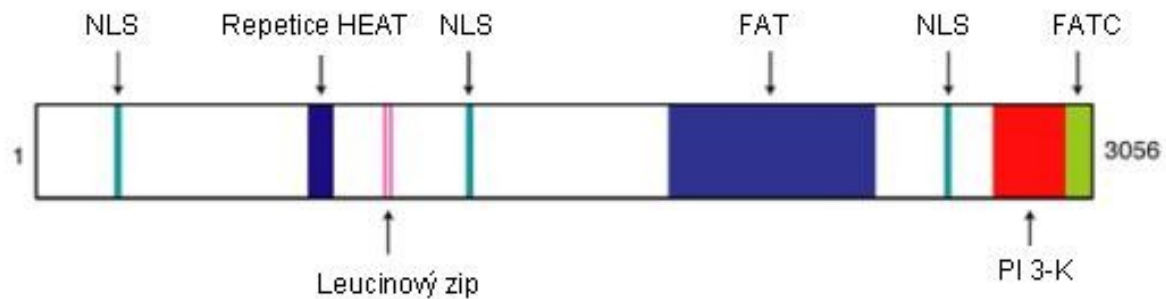
Využití VII: Resekvenace velkých genů

62 exonů

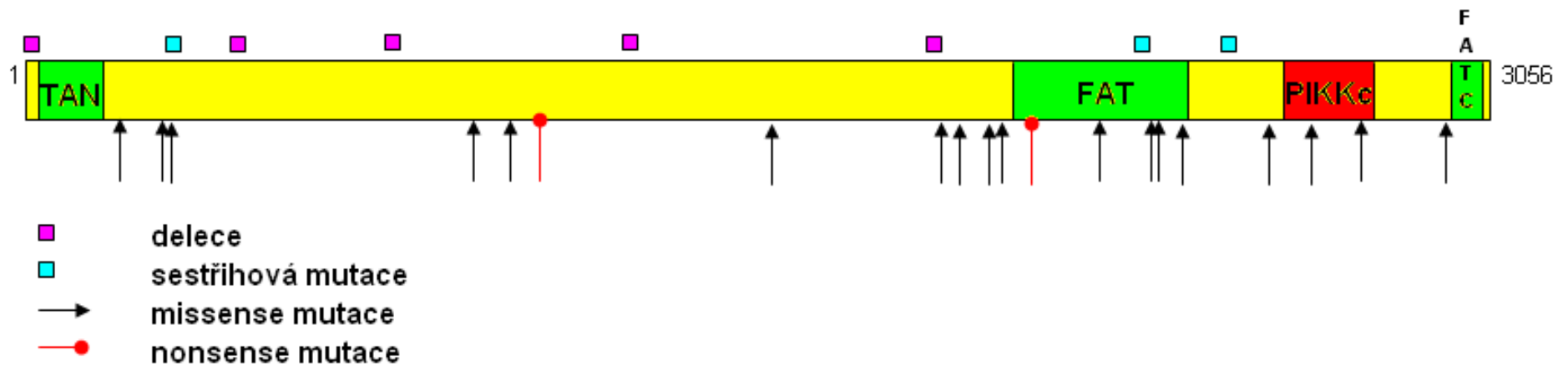
3 056 AK

~ 350 kDa

Např. ATM



Spektrum a lokalizace ATM mutací na IHOK, FN Brno



+ polymorfismy !!

Table 2. ATM mutations identified in CLL patients.

Patient	ATM gene mutation				ATM analysis		11q-	Overall ATM status
	Nucleotide change	Amino acid change	Type	Origin	ATM function	ATM level		
P1	c.875C>G	p.Pro292Arg	ms	n.a.	norm	null	yes	dysfunction
	c.7375C>T	p.Arg2459Cys	ms	n.a.				
P2	c.902-1G>T	p.Ala302fs	fs [#]	n.a.	def	null	no	dysfunction
P3	c.2950C>G	p.Gln984Glu	ms	som				
	c.4724G>A	p.Arg1575His	ms	germ	def	null	yes	dysfunction
	c.6820G>A	p.Ala2274Thr	ms	germ				
P4	c.3057T>G	p.Phe1025Leu	ms	som	def	pos	yes	dysfunction
P5	c.3250C>T	p.Gln1084*	ns	n.a.	norm	pos	yes	dysfunction
P6	c.5789A>T	p.Asp1930Val	ms	som	norm	null	yes	dysfunction
P7	c.6101G>C	p.Arg2034Pro	ms	som	NA	null	yes	dysfunction
P8	c.6559G>T	p.Glu2187*	ns	som	def	null	yes	dysfunction
P9	c.7280T>C	p.Leu2427Pro	ms	n.a.	def	pos	yes	dysfunction
P10	c.7463G>A	p.Cys2488Tyr	ms	germ	def	pos	yes	dysfunction
P11	c.8194T>G	p.Phe2732Val	ms	som	def	pos	yes	dysfunction
P12	c.8668C>G	p.Leu2890Val	ms	som	def	pos	no	dysfunction
	c.9023G>A	p.Arg3008His	ms	som				
P13	c.9022C>T	p.Arg3008Cys	ms	som	def	pos	no	dysfunction
P14	c.3_21del	p.Met1?	fs	som	def	pos	yes	dysfunction
	c.2329_2332del	p.Arg777fs	fs	som				
P15	c.877A>T	p.Lys293Tyr	ms	som	def	null	yes	dysfunction
P16	c.1402_1403del	p.Lys468fs	fs	som	norm	null	yes	dysfunction
P17	c.3802del	p.Val1268*	fs	n.a.	NA	null	no	dysfunction
	c.5748_5750del	p.Met1916delinsIle	if	n.a.				
P18	c.7996A>G	p.Thr2666Ala	ms	som	def	null	yes	dysfunction
P19	c.5044G>C	p.Asp1682His	ms	som	def	pos	yes	dysfunction
P20	c.6185C>T	p.Ala2062Val	ms	som	def	pos	yes	dysfunction
P21	c.7089+1del	p.Asn2326_Lys2363del	if [#]	som	def	pos	yes	dysfunction
P22	c.7515+1_2del	p.Arg2506_Asn2543del	if [#]	n.a.	def	null	yes	dysfunction

Cohort I: patients P1-P18. Cohort II: patients P19-P22.

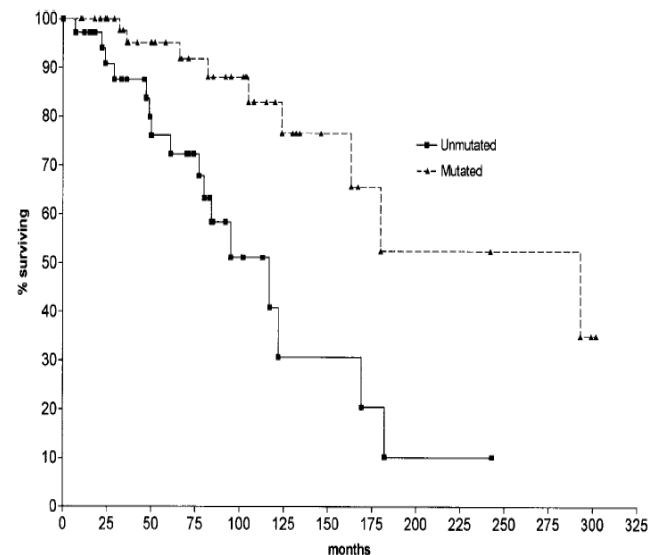
Legend: * stop codon, , ms - missense, ns – nonsense, fs – frameshift, if – in-frame, # splicing mutation (skipping of exon confirmed by cDNA analysis), n.a. - not analyzed, NA - not analyzed due to presence of *TP53* defect, germ - germline, som - somatic, def - defective, norm - normal, pos - positive

CLL jako model pro microarray analýzu

Mutační status variabilní oblasti těžkého řetězce Ig genu (*IgVH*)

nemutovaný *IgVH* – 98-100% homologie se zárodečnou linií – horší prognóza – přežití 8-9 let

mutovaný *IgVH* – < 98% homologie se zárodečnou linií – lepší prognóza – přežití ~ 25 let



(Hamblin et al., Blood 1999)

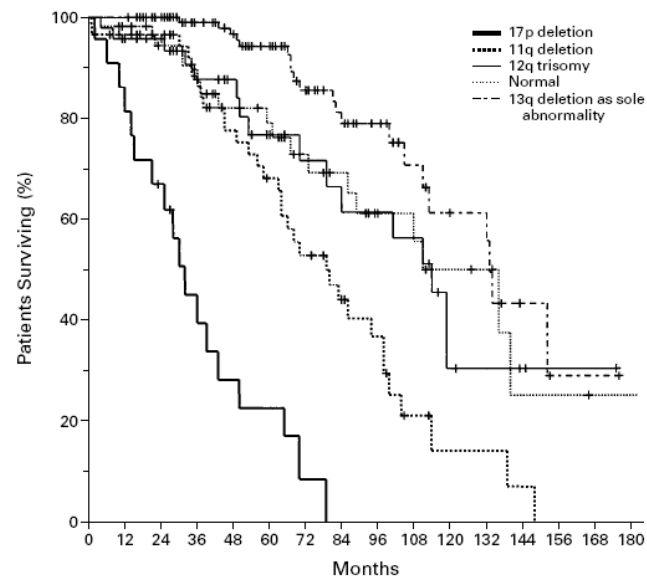
Přítomnost cytogenetických abnormalit

del 13q14 – nejlepší prognóza

trizomie 12 – střední prognóza

del 11q22-23 (*ATM* lokus) – špatná prognóza

del 17p13 (*TP53* lokus) – nejhorší prognóza



(Döhner et al., NEJM 2000)

CLL jako model pro microarray analýzu

- Klein U et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogenous phenotype related to memory B cells.

J Exp Med 2001; 194:1625-38

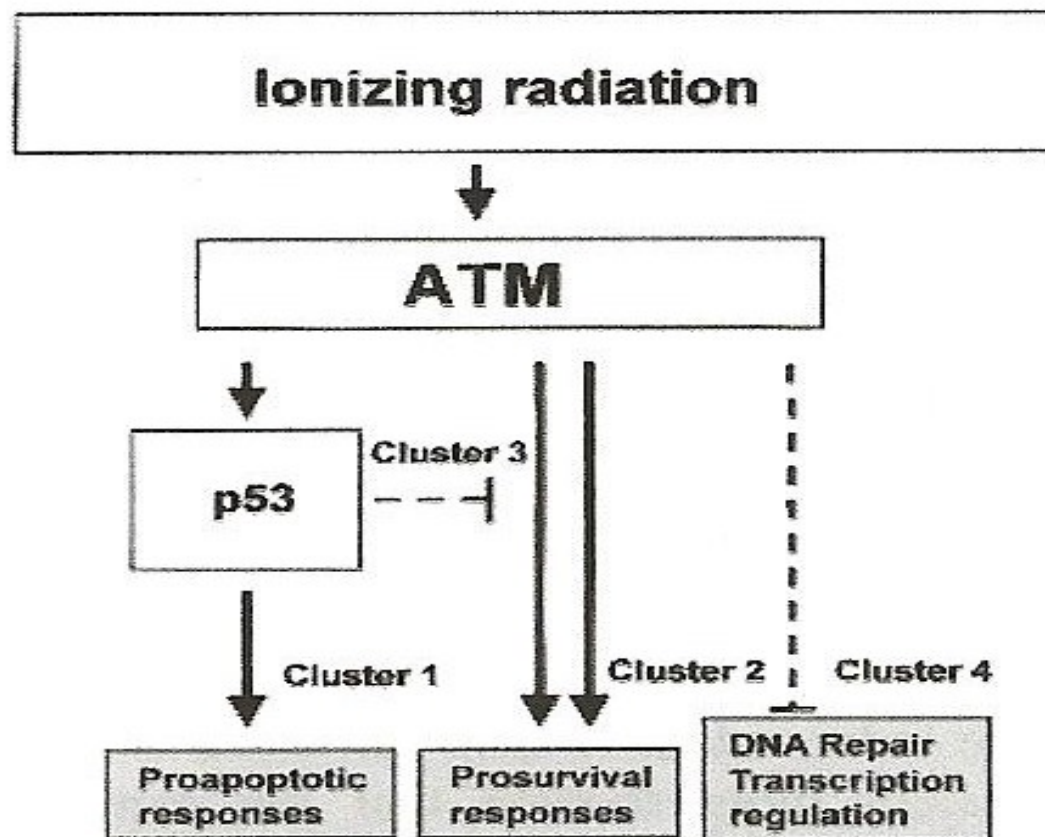
Identifikace genu ZAP-70 asociovaného s nemutovaným IgVH

- Letestu R et al. Evaluation of ZAP-70 expression by flow cytometry in chronic lymphocytic leukemia: A multicentric international harmonization process.

Cytometry B Clin Cytom 2006;70:309-14

CLL jako model pro microarray analýzu ATM-p53

Od genů k
procesům...



Cesta k úspěchu s microarrays - 1. část

- 1) K těmto metodikám přistoupit až po několika letech práce v laboratoři (min. 2-3 roky); to se týká zejména GEP
- 2) Být si jistý, že opravdu chci dělat *microarrays*
- 3) Důkladně projít PubMed pro studované téma a anticipovat nejbližší možné výsledky!!!
- 4) Nenápadně zjistit, zda je náš vedoucí „v obraze“ – jeho pomoc budeme potřebovat!
- 5) Mít k dispozici doprovodné metodiky, které určitě budeme potřebovat (real-time PCR, Western blot)
- 6) Mít k dispozici funkční tým, kde každý něco opravdu UMÍ

Cesta k úspěchu s microarrays – 2. část

7) Mít velmi dobře charakterizované vzorky

(mutace není delece apod.)

8) Před započítím experimentování se spojit s velmi dobrým statistikem (konzultovat mj. velikost souboru)

9) Neukvapovat se po prvních *pozitivních* výsledcích

10) Pokud se dostaneme až k psaní manuskriptu, dát jej přečíst co nejvíce (relevantním) lidem

11) Připomínky *reviewers* brát vážně

Takže děkuji za pozornost

mtrbusek@fnbrno.cz



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky