

C7188 Úvod do molekulární medicíny 1/12

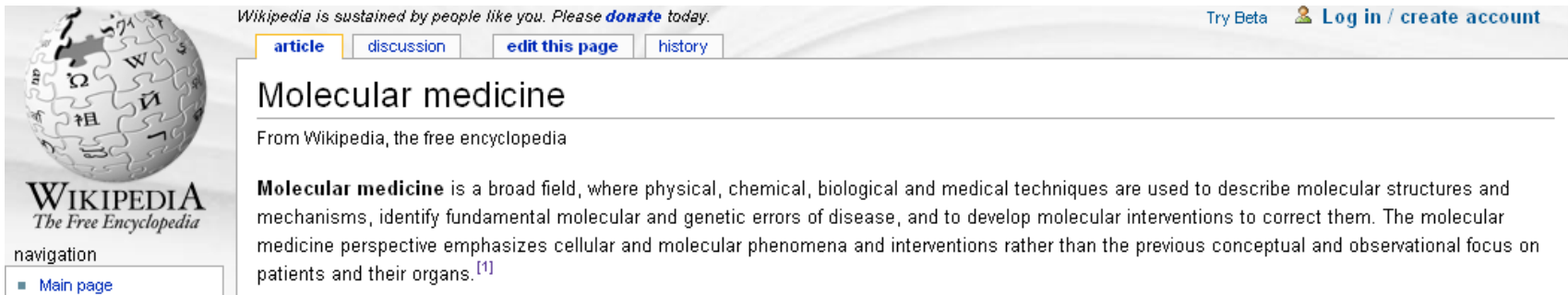


Definice
Historie
Obsah kurzu

prof. RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.
Masarykův onkologický ústav
Lékařská fakulta Masarykovy univerzity
CEITEC



Vymezení pojmu MOLEKULÁRNÍ MEDICÍNA



The screenshot shows the Wikipedia article for 'Molecular medicine'. At the top, it says 'Wikipedia is sustained by people like you. Please [donate](#) today.' and has links for 'Try Beta', 'Log in / create account', 'article', 'discussion', 'edit this page', and 'history'. The article title is 'Molecular medicine' and it is described as 'From Wikipedia, the free encyclopedia'. The main text states: 'Molecular medicine is a broad field, where physical, chemical, biological and medical techniques are used to describe molecular structures and mechanisms, identify fundamental molecular and genetic errors of disease, and to develop molecular interventions to correct them. The molecular medicine perspective emphasizes cellular and molecular phenomena and interventions rather than the previous conceptual and observational focus on patients and their organs.^[1]'

[1] Massoud TF, Gambhir SS, Trends in Molecular Medicine, 2007

MOLECULAR MEDICINE is

a branch of medicine that develops ways to diagnose and treat disease by understanding the way genes, proteins, and other cellular molecules work. Molecular medicine is based on research that shows how certain genes, molecules, and cellular functions may become abnormal in diseases such as cancer.

according to National Cancer Institute (NCI)

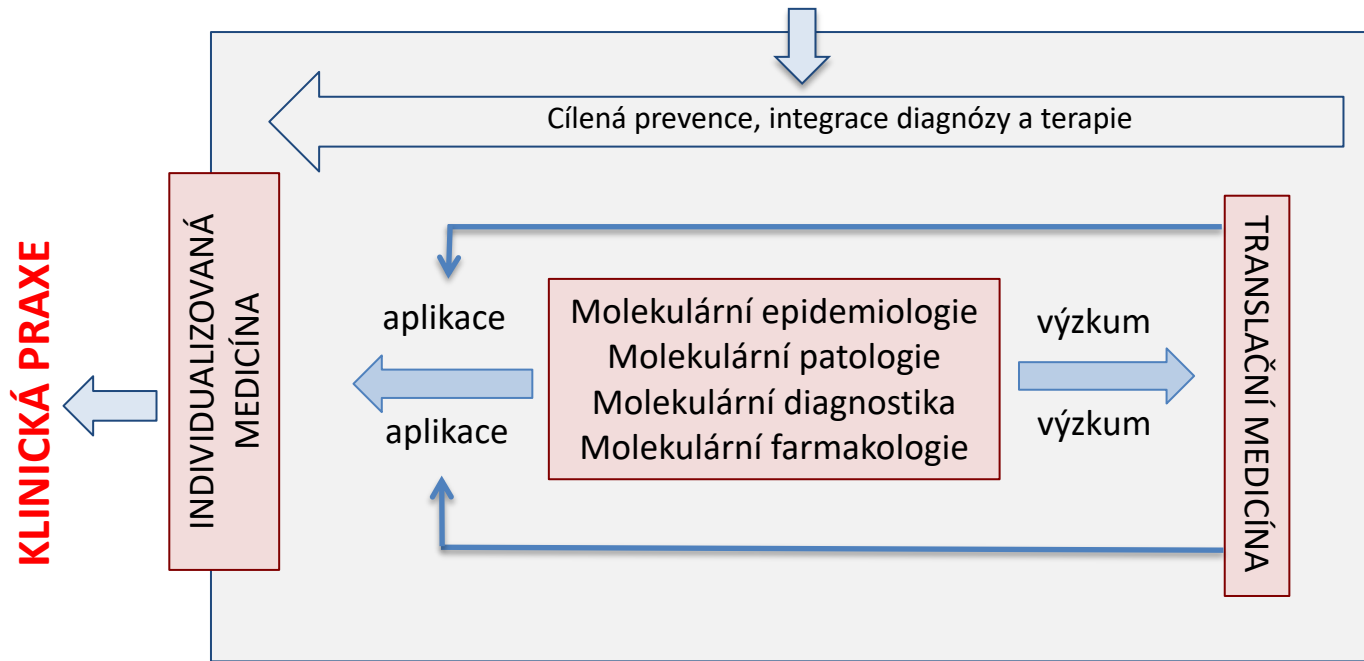
Molekulární medicína je obor založený na aplikaci poznatků a metod molekulární biologie do klinické medicíny vedoucí k cílené prevenci a vyššímu stupni integrace diagnózy a terapie.

Molekulární medicína je širší pojem, nesprávně synonymicky používané pojmy:


- ~ Personalizovaná medicína ~ individualizovaná medicína ~ „adresná“ medicína
- ~ Translační medicína („from bench to bedside“)

Zahrnuje obory jako farmakogenetika/genomika, nutrigenetika/genomika, ale také mikrobiologickou DNA diagnostiku, prenatální diagnostiku,...

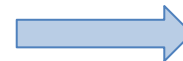
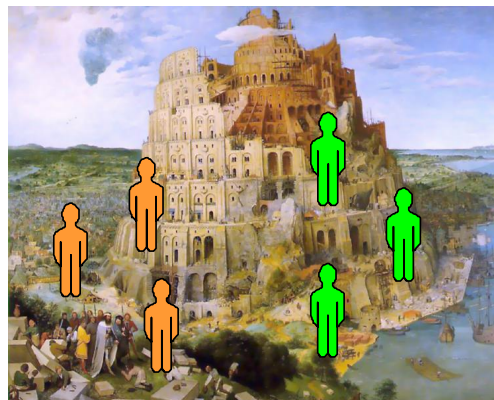
MOLEKULÁRNÍ MEDICÍNA



Pouze ilustrace
Myšleno pouze
jako stavba,
nikoliv
EU parlament!

 molekulární biolog

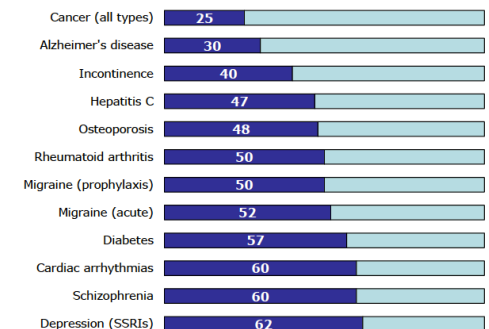
 lékař



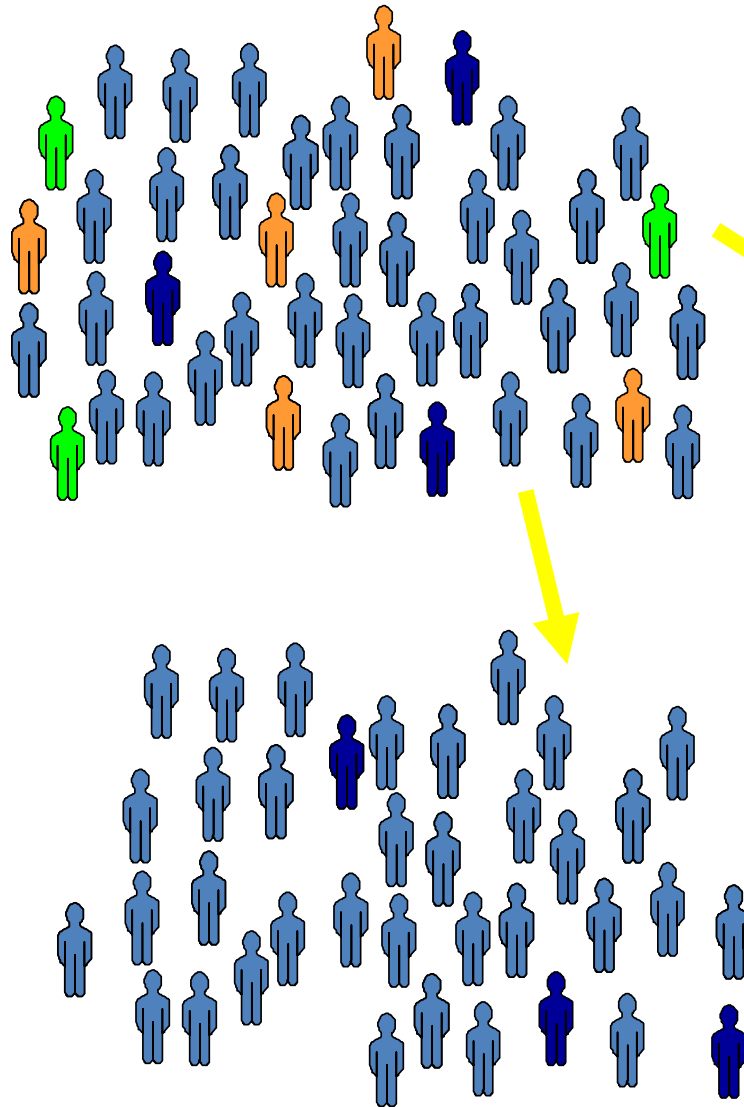
Koncepce a hlavní náplň oboru MOLEKULÁRNÍ MEDICÍNA

- 1) Identifikace individuálních genetických dispozic ke konkrétním chorobám a formulace preventivních opatření (molekulární epidemiologie, např. nutrigenomika)
- 2) Aplikace molekulárně-biologických metod do klinické diagnostiky (mikrobiologická DNA diagnostika, prenatální diagnostika,...)
- 3) Zdokonalení diagnostiky a přesnější formulace nozologických jednotek zohledňující jejich molekulární patologii
- 4) Identifikace nových terapeutických cílů (molekulárních struktur buňky) co nejvíce specifických pro dané onemocnění
- 5) Příprava léčiv nové generace (21st century therapeutics, cílená léčba, buněčná terapie, genová terapie,...)
- 6) Individualizace léčby na základě genetického pozadí jedince
- 7) Zdokonalení a zrychlení transferu technologií z laboratoří k lůžku pacienta (from bench to bedside)
- 8) Bioetika a právo

INTEGRACE DIAGNÓZY A TERAPIE!!!

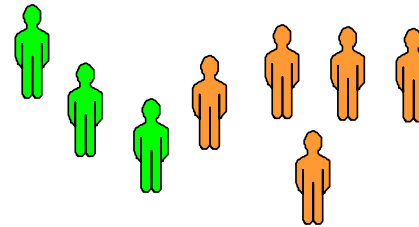


Pacienti se stejnou diagnózou



INTEGRACE DIAGNÓZY A TERAPIE

Pacienti odpovídající na léčbu
bez znaků závažné toxicity



~~Dogma JEDNA NEMOC=JEDNA LÉČBA~~

Pacienti neodpovídající na léčbu
nebo vykazující závažnou toxicitu

Zrušení dogmatu JEDNA NEMOC=JEDNA LÉČBA

Nosologická jednotka je dnes definována jako **konkrétní příčina, která vede k rozvoji typického souboru příznaků**. Tato „konkrétní“ příčina ovšem v naprosté většině případů není definována na molekulární úrovni.

Neexistují dva naprosto stejné případy těžé nemoci

Jen velmi malá část lidských nemocí má jednoduchou, dokonce jedinou příčinu (některé dědičné nemoci a závažné infekce)

I zde - hemofilie, tuberkulóza a AIDS kolísají individuální příznaky tak značně, že je nutné hovořit pouze o celkovém klinickém obrazu

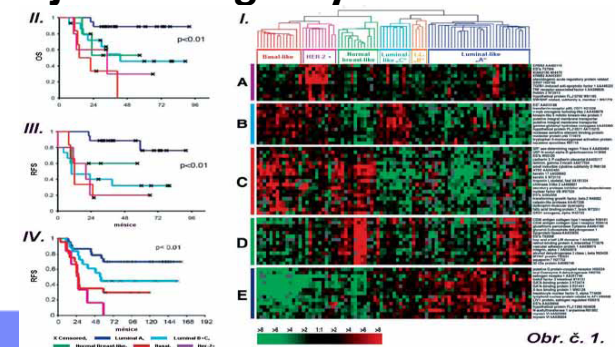
Sorlie et al, PNAS, 2001

1. Genetické dispozice ovlivňují průběh téměř všech nemocí

2. Mohou existovat rozdílné molekulární podtypy v rámci jedné diagnózy

Existuje pět molekulárních podtypů karcinomu prsu

Příklad molekulární klasifikace karcinomu prsu



Zrušení dogmatu JEDNA NEMOC=JEDNA LÉČBA

Nejsou dvě léčby stejné = účinky jednoho léčiva se liší v závislosti na genetickém pozadí jedince = farmakogenetika, farmakagenomika

Volba správné terapie nikoliv pouze na základě diagnózy, ale také vzhledem ke schopnosti organismu nakládat s příslušnou látkou (vliv genetiky, vliv prostředí – interakce složek potravy)

Farmakokinetika – např. metabolická schopnost organismu (CYP2D6, DPD)

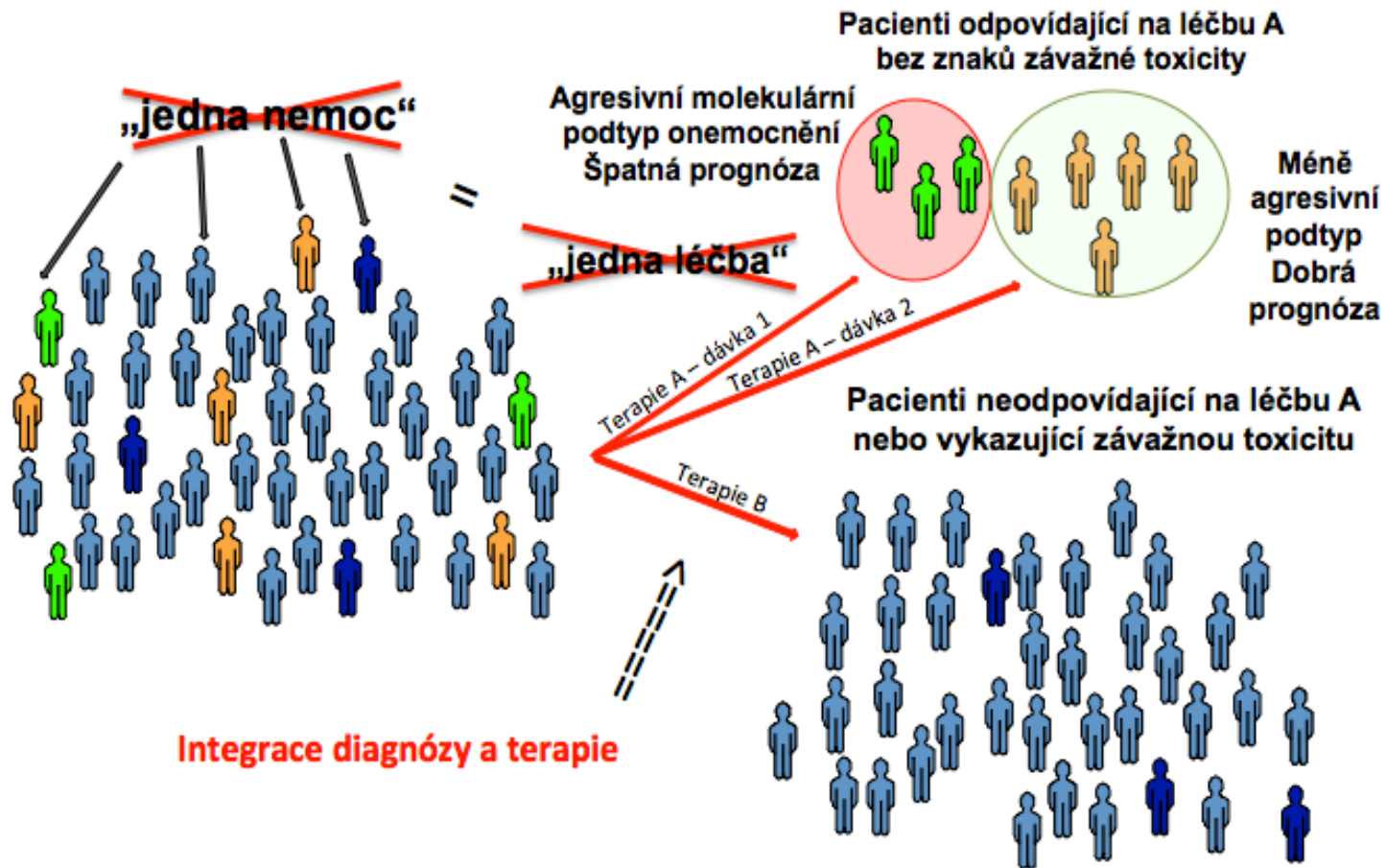
→ toxicita, rezistence

Farmakodynamika – přítomnost molekulárních změn

→ rezistence

Předpoklad farmakogenetiky a farmakogenomiky:

Genetické změny (prediktivní markery) spojené s fenotypy toxicity a rezistence jsou předem identifikovatelné.



INTEGRACE DIAGNÓZY A TERAPIE!!!



Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Drug Discovery

Proč je investováno tolik financí do výzkumu a vývoje v oblasti MOLEKULÁRNÍ MEDICÍNY?



***„If it were not for the great variability among individuals,
Medicine might be a Science not an Art“***

Sir William Osler, The Principles and Practice of Medicine, 1892

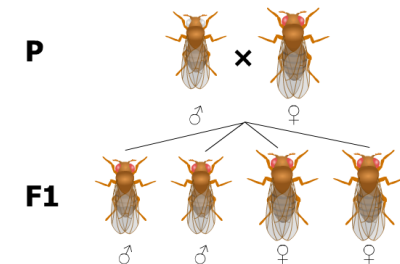
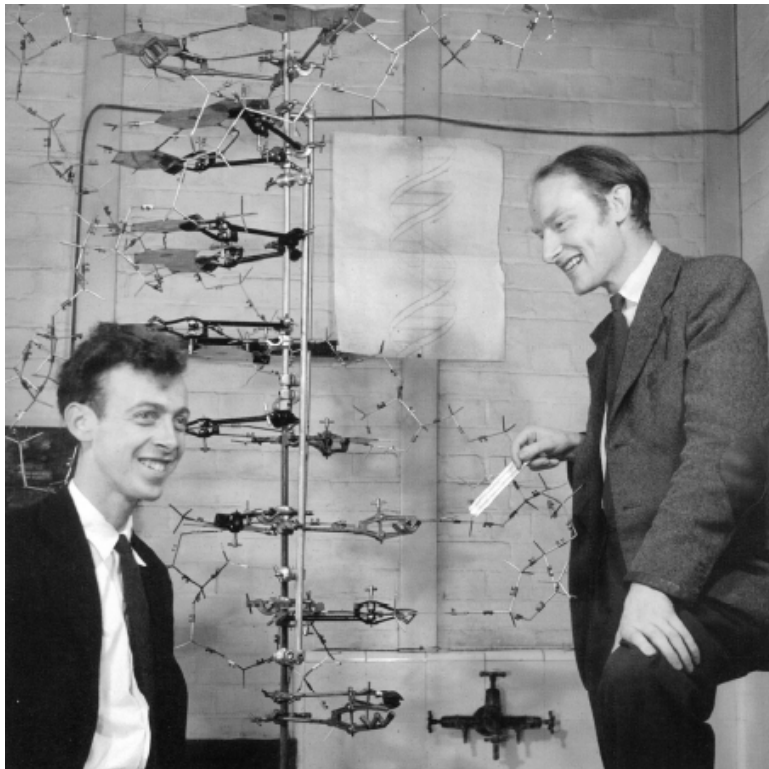
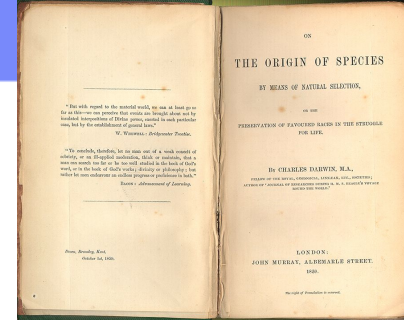
Table 1.2 Molecular medicine and some Nobel Prize winners (1958–2004)^a

Year	Recipients	Subject
1958	G W Beadle, E L Tatum and J Lederberg	Regulation and genes, and genetic recombination in bacteria
1959	S Ochoa, A Kornberg	<i>In vitro</i> synthesis of nucleic acids
1962	J D Watson, F Crick, M H F Wilkins	Structure of DNA
1965	F Jacob, A L Woff, J Monod	Genetic control enzyme and virus synthesis
1968	R W Holley, H B Khorana, M W	of the genetic code
1975	D Baltimore, H Temin and R Dul	riptase and oncogenic viruses
1978	W Arber, D Nathans, H D Smith	lonucleases
1980 ^a	P Berg and W Gilbert, F Sanger	st recombinant DNA molecule and DNA sequencing
1989	J M Bishop, H E Varmus	
1989 ^a	S Altman, T R Cech	es
1993	R Roberts, P Sharp	
1993 ^a	K Mullis and M Smith	Polymerase chain reaction (PCR) and site directed mutagenesis
1995	E Lewis, C Nüsslein-Volhard, E Wieschaus	Genetic mechanisms in early embryonic development
2001	L H Hartwell, R T Hunt, P M Nurse	Key regulators of the cell cycle
2002	S Brenner, J E Sulston, H R Horvitz	Genetic regulation of organ development and programmed cell death
2004	R Axel, L B Buck	Sense of smell including the genes involved in the olfactory system

^aNobel Prize in Chemistry; all others Nobel Prize in Physiology or Medicine.

Historie molekulární medicíny – „počátky“

1715 Giovanni Battista Morgagni, 1858 Rudolf Virchow
 1859 Charles Darwin, 1865 Gregor Mendel,
 1910 Thomas Hunt Morgan, 1944 Barbara McClintok



1949 – Linus Pauling – pojem Molekulární onem.
 1953 – James D. Watson a Francis Crick
 – sekundární struktura DNA

Nobelova cena – 1962

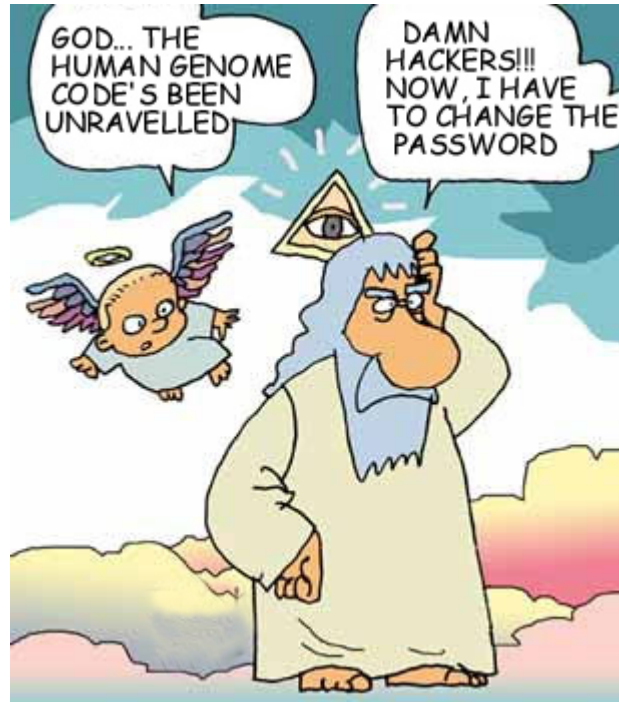
1957 – Francis Crick a George Gamov
 CENTRÁLNÍ DOGMA molekulární biologie

1966 – Marshall Nirenberg, Heinrich Mathaei a Severo Ochoa rozluštili genetický kód



Marshall Nirenberg

Nobelova cena 1968



Paul Berg

1970 David Baltimore izoloval enzym reverzní transkriptázu z RNA retroviru

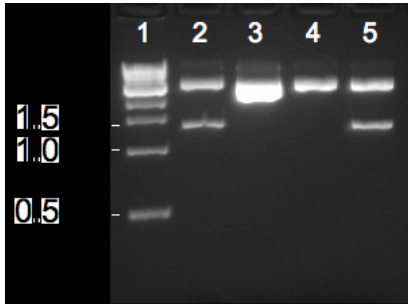
1972 Paul Berg vytvořil první rekombinantní molekulu DNA

1974 Paul Berg navrhuje v Science dobrovolné moratorium na techniky rekombinantní DNA

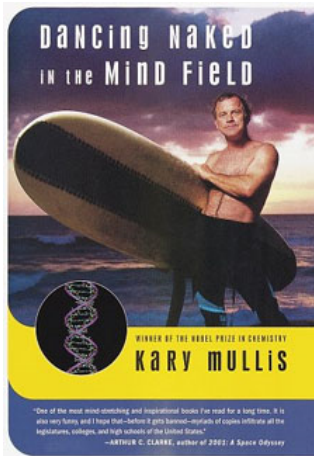
1974 Frederick Sanger zavedl metodu sekvenace DNA

1976 První biotechnologická společnost založená v Kalifornii GENENTECH, Inc – první lék připravený in vitro pomocí genového inženýrství – lidský inzulin uvedený na trh 1982

1978 David Botstein zavedl metodu polymorfizmu délky restričních fragmentů (restriction fragment length polymorphisms-RFLP)
 Zásadní metoda pro identifikaci jednonukleotidových polymorfizmů (SNPs)



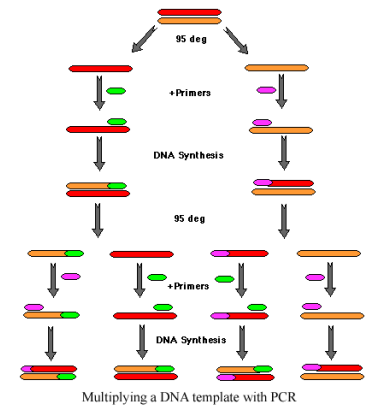
EcoR1 – GAATTC
 Restriční endonukleázy



1983 Kary Mullis v Cetus Corporation zavedl polymerázovou řetězovou reakci (PCR)

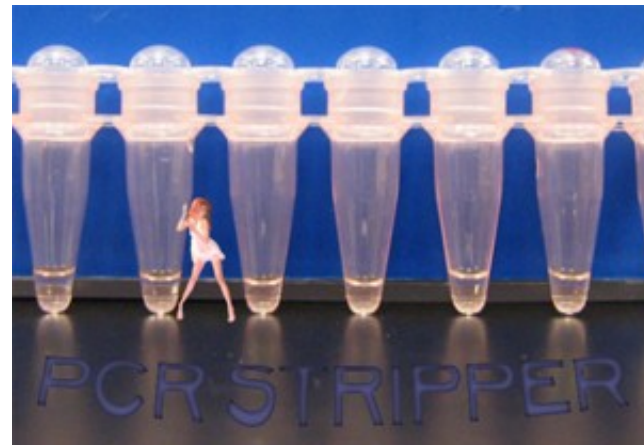


Kary Mullis s hvězdou seriálu CSI: Las Vegas
 Marg Helgenberger



The PCR Song

There was a time when to amplify DNA,
You had to grow tons and tons of tiny cells.
Then along came a guy named Dr. Kary Mullis,
Said you can amplify in vitro just as well.
Just mix your template with a buffer and some primers,
Nucleotides and polymerases, too.
Denaturing, annealing, and extending.
Well it's amazing what heating and cooling and heating will do.
PCR, when you need to detect mutations.
PCR, when you need to recombine.
PCR, when you need to find out who the daddy is.
PCR, when you need to solve a crime.
(repeat chorus)



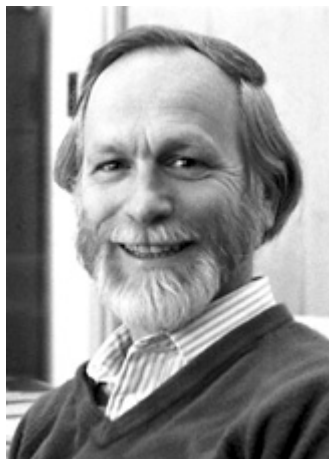
Historie molekulární medicíny – moderní éra 1980s-2000s

Geny a nádorová onemocnění

1910 Peyton Rous popsal význam viru v etiologii sarkomu kuřat
Rous Sarcoma Virus (RSV)

Počátkem osmdesátých let, byl klonován segment DNA z nádorové linie močového měchýře, který vykazoval schopnost indukovat neoplastickou transformaci v jiných buňkách
=ONKOGEN

Nobelova cena, 1989



J. Michael Bishop



Harold E. Varmus

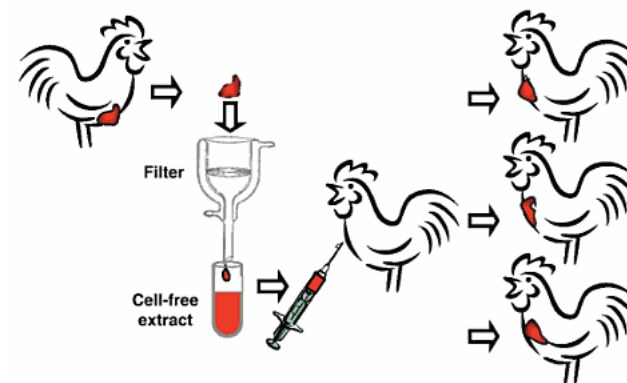
Onkogeny jsou defektní formy proto-onkogenů (RSV)

Nádorové supresory

2001- Nobelova cena
 L Hartwell, R Hunt, P Nurse
 regulátory buněčného cyklu



Peyton Rous,
 Nobelova cena 1966



Historie molekulární medicíny – moderní éra 1980s-2000s

Mutační analýza

Počátkem devadesátých let se objevují automatické sekvenátory (příliš nákladné)

Nejpoužívanější jsou stále metody založené na PCR

RFLP – polymorfismus délky restrikčních fragmentů

SSCP – polymorfismus konformace jednořetězcové DNA

DGGE – elektroforéza v gradientovém denaturačním gelu

Na trhu se objevují komerční DNA kity – diagnostika

Genová terapie

1987 – první rekombinantní DNA vakcína pro hepatitidu B, vytvořená inzercí segmentu virové DNA do kvasinkového vektoru

1990 – první podání genové terapie (retrovirové vektory s funkčním enzymem) u pacientky s ADA imunodeficiencí

Klinická studie se SCID X1 imunodeficiencí u 14 dětí (u 2 došlo k rozvoji ALL)

Vývoj nových virových i nevirálních vektorů

S. Altman a T. Cech – objev Ribozymů

1997 – Ian Wilmut – TVŮRCE DOLLY



Ovečka Dolly (1997-2004)



Somatická buňka dospělé ovce byla sloučena s neoplodněným enukleovaným oocytem jiné ovce



Makak Neti a Ditto
Autor Don Wolf, 1997

Historie molekulární medicíny – moderní éra 1980s-2000s

Polymorfizmy DNA

Za geneticky polymorfní je považován znak s nejméně dvěma geneticky podmíněnými variantami v jedné populaci, které se nachází v takových frekvencích, že i zřídka má frekvenci alespoň 1%.

Mezi lidmi je přibližně 99,9% shoda v sekvenci DNA

Zbývajících 0,1% nás činí jedinečnými (jak vypadáme, nemoci, kterými budeme trpět, ...)

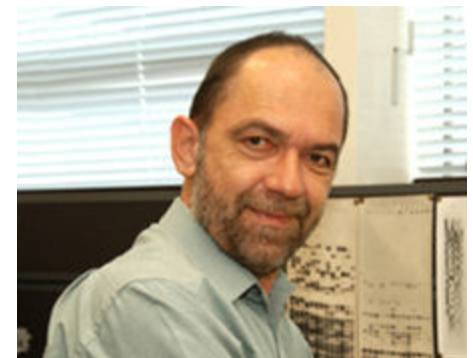
Bodové (single-nucleotide polymorphism SNP, vyslovuj *snip*)

Frekvence přibližně jeden 1 SNP na 1kb DNA sekvence

Repetitivních sekvencí (satelity, mikrosatelity – počty repetice)

1985 – **DNA fingerprinting** – komplexnost polymorfizmů satelitů umožňuje vytvořit unikátní DNA profil jedince

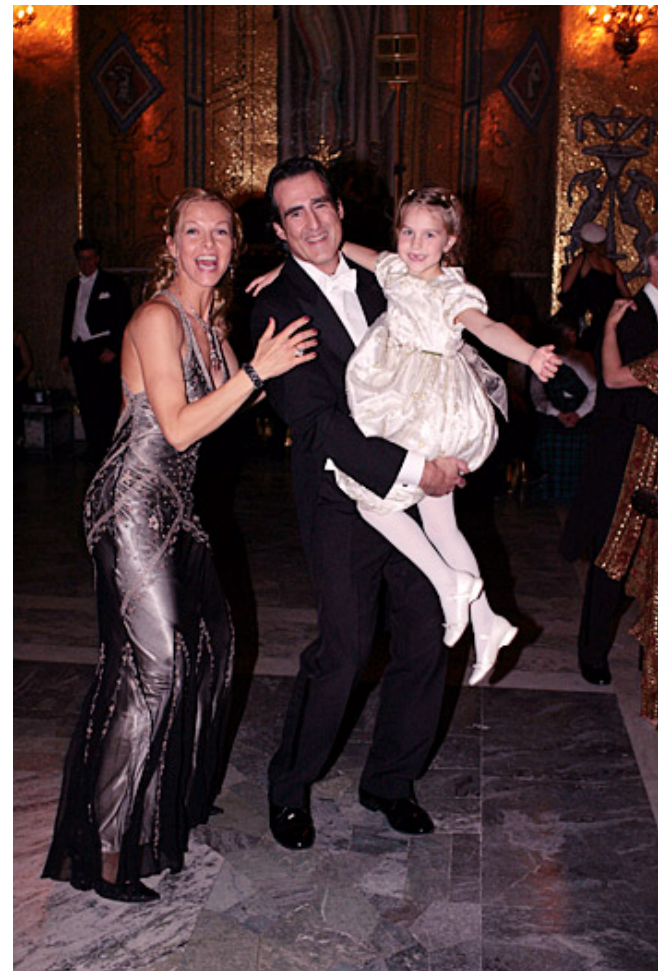
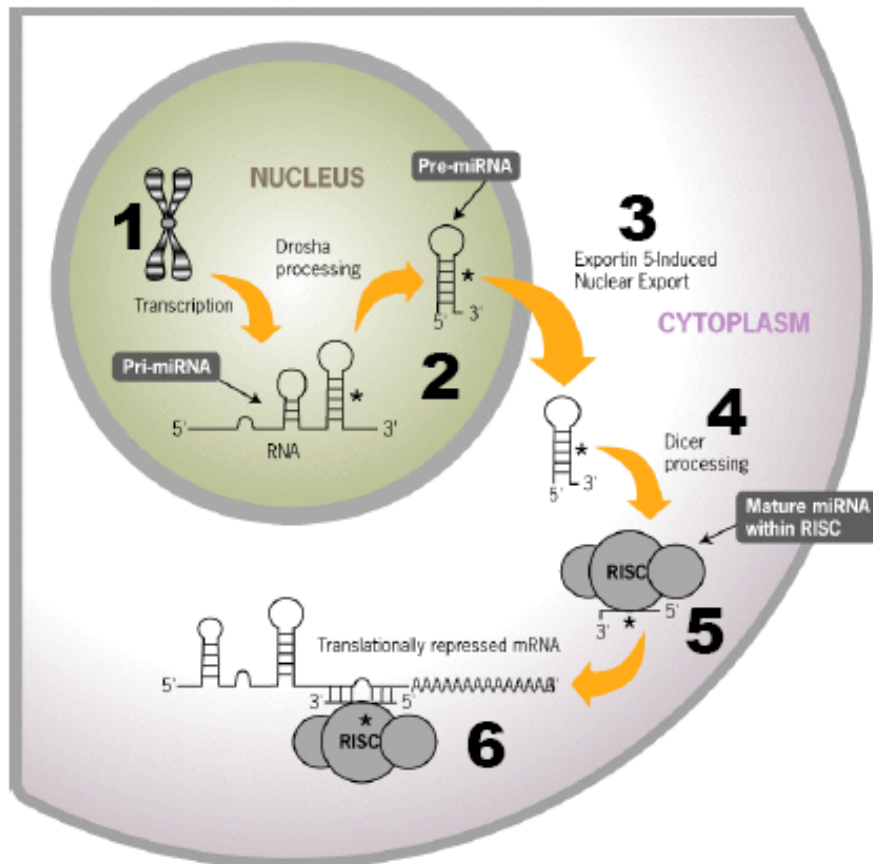
1987 – poprvé uznán DNA fingerprinting jako důkaz u soudu
počátek forezní molekulární biologie



Sir Alec Jeffreys

DNA polymorfizmy jsou genetickým pozadím souvisejícím mimo jiné také s dispozicemi k civilizačním chorobám a léčebnou odpovědí .

1998 – objev RNA INTERFERENCE Craig Mello a Andy Fire u C. Elegans –NOVÝ NÁSTROJ GENOVÉ TERAPIE



Craig Mello na slavnostním banketu po udělení Nobelových cen za rok 2006.

HUMAN GENOME PROJECT

1985-1990: diskuse o sekvenování lidského genomu

– “nebezpečné” - “nesmyslné” - “nemožné”

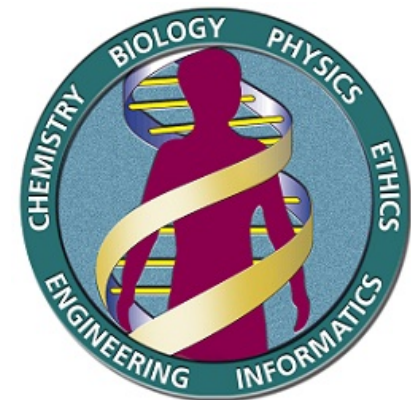
1988-1990: Založen HUMAN GENOME PROJECT (HGP)

20 laboratoří z USA, Velké Británie, Japonska, Francie, Německa a Číny
Asi 2800 lidí, vedoucí: Francis Collins, NIH

Mezinárodní spolupráce: HUGO (Human Genome Organisation)

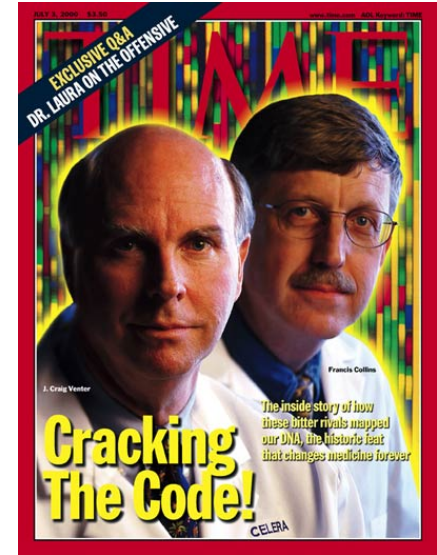
Cíle:

- genetická mapa lidského genomu
- fyzická mapa: marker každých 100 kbp
- sekvenování modelových organismů (E. coli, S. cerevisiae, C. elegans, Drosophila, myš)
- objevit všechny lidské geny (předpokl. 60-80 tisíc)
- sekvenování celého lidského genomu (3000 Mbp) do r. 2005 s rozpočtem 3 bil. USD



Květen 1998 „Discovery can't wait“

- Craig Venter zakládá soukromou biotechnologickou společnost **CELERA GENOMICS, Inc.** a vyhlašuje záměr sekvenovat celý lidský genom za 3 roky a 300 mil. USD metodou *whole-genome shotgun*, *několik desítek zaměstnanců (sponzorováno Applied Biosystems)*
- V té době výsledek práce HGP: sekvenováno cca 4 % lidského genomu.



Celera Genomics & akad. spolupracovníci publikují draft genomu *Drosophila melanogaster* (cca 2/3 z 180 Mbp)

- ... *whole-genome shotgun lze použít i pro velké genomy*
- ... **Lidský genom: závod mezi Human Genome Project a Celera Genomics**

Únor 2001 - Remíza

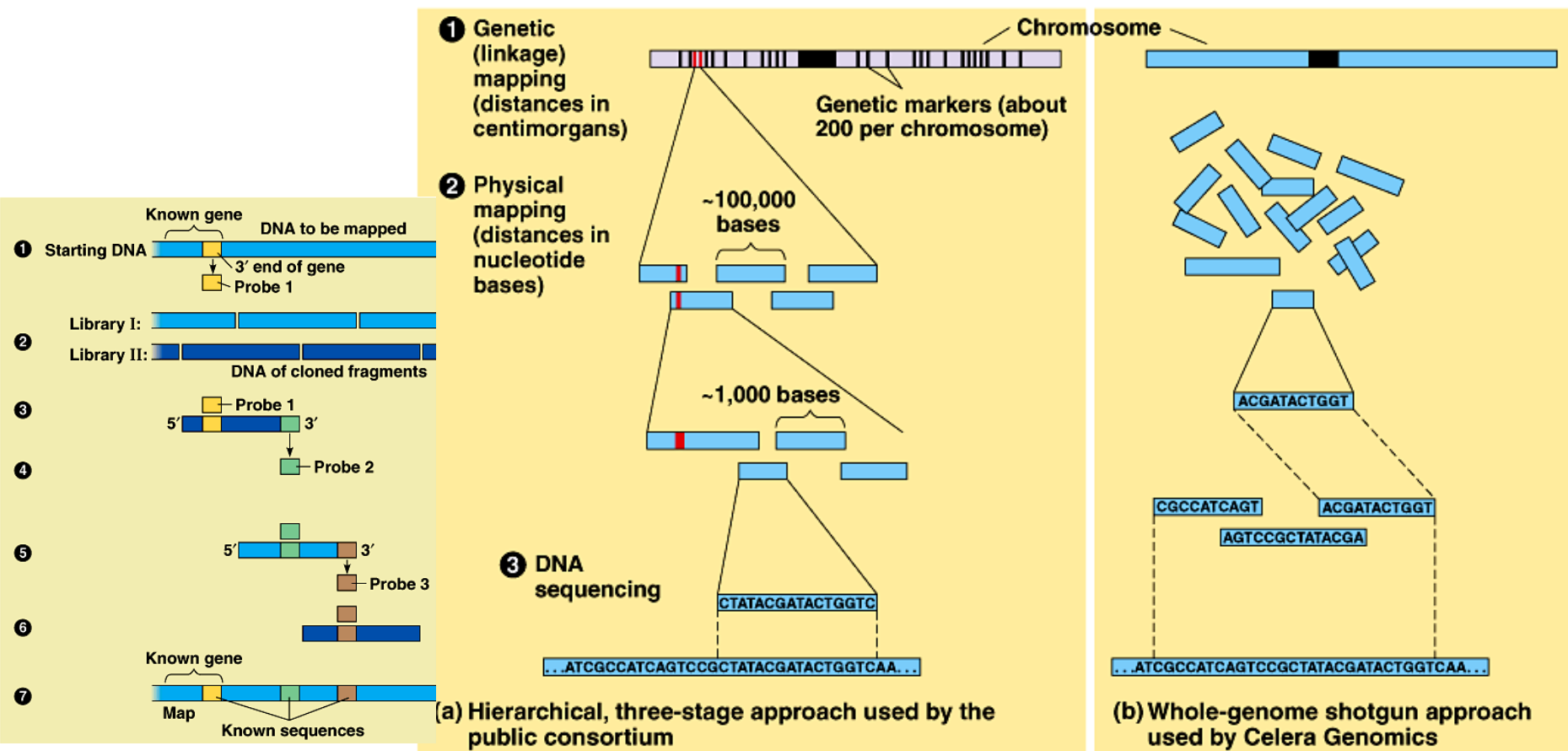
HGP publikuje draft lidského genomu v časopisu Nature 15.2.2001.

Celera Genomics publikuje svou sekvenci lidského genomu v Science 16.2.2001.

Srovnání přístupu veřejného konsorcia a Celera Genomics

Clone-by-clone

Whole-genome shotgun



Pracovníci veřejného konsorcia byli zavázáni tzv. Bahamskou deklarací, která stanovila, že se výsledky sekvenování musí do 24 hod. vystavit veřejně na internetu, aby všechna pracoviště mohla využít výsledků ostatních. Tato data ovšem využívali i pracovníci Celery, kteří ovšem nebyli Bahamskou deklarací vázáni a své výsledky nezveřejňovali.



Craig Venter

Září 2007, 10 mil. USD

32 million DNA fragmentů, 20 billionu bazí

Total variants: 4.1 million

3.1 million SNPs

4000 genů mělo pozměněné proteinové produkty

Venter netrpí CF ani Huntigtonovou chorobou

OPEN ACCESS Freely available online

PLoS BIOLOGY

The Diploid Genome Sequence of an Individual Human

Samuel Levy^{1*}, Granger Sutton¹, Pauline C. Ng¹, Lars Feuk², Aaron L. Halpern¹, Brian P. Walenz¹, Nelson Axelrod¹, Jiaqi Huang¹, Ewen F. Kirkness¹, Gennady Denisov¹, Yuan Lin¹, Jeffrey R. MacDonald², Andy Wing Chun Pang², Mary Shago², Timothy B. Stockwell¹, Alexia Tsiamouri¹, Vineet Bafna³, Vikas Bansal³, Saul A. Kravitz¹, Dana A. Busam¹, Karen Y. Beeson¹, Tina C. McIntosh¹, Karin A. Remington¹, Josep F. Abril⁴, John Gill¹, Jon Borman¹, Yu-Hui Rogers¹, Marvin E. Frazier¹, Stephen W. Scherer², Robert L. Strausberg¹, J. Craig Venter¹

1 J. Craig Venter Institute, Rockville, Maryland, United States of America, 2 Program in Genetics and Genomic Biology, The Hospital for Sick Children, and Molecular and Medical Genetics, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada, 3 Department of Computer Science and Engineering, University of California San Diego, La Jolla, California, United States of America, 4 Genetics Department, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain



James D. Watson

Říjen 2007

Méně než 1 mil. USD

Publikován v GeneBank

Trvalo méně než 2 měsíce

Následovaly sekvenační analýzy dalších jedinců z různých etnik, které přinesly podstatné informace o interpersonálních rozdílech ve struktuře genomů.

Nové technologie založené na principu masivního paralelního sekvenování *next-generation* DNA sequencing technology



Roche
**454 Genome/
Sequencer**
platform

Srpen 2009

Nature Biotechnology

Published online: 10 August 2009 | doi:10.1038/nbt.1561

Single-molecule sequencing of an individual human genome

Dmitry Pushkarev^{1,2}, Norma F Neff^{1,2} & Stephen R Quake¹

Recent advances in high-throughput DNA sequencing technologies have enabled order-of-magnitude improvements in both cost and throughput. Here we report the use of single-molecule methods to sequence an individual human genome. We aligned billions of 24- to 70-bp reads (32 bp average) to ~90% of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) reference genome, with 28× average coverage. Our results were obtained on one sequencing instrument by a single operator with four data collection runs. Single-molecule sequencing enabled analysis of human genomic information without the need for cloning, amplification or ligation. We determined ~2.8 million single nucleotide polymorphisms (SNPs) with a false-positive rate of less than 1% as validated by Sanger sequencing and 99.8% concordance with SNP genotyping arrays. We identified 752 regions of copy number variation by analyzing coverage depth alone and validated 27 of these using digital PCR. This milestone should allow widespread application of genome sequencing to many aspects of genetics and human health, including personal genomics.

top ↗



Solexa
Illumina



SOLiD
Applied
Biosystems

Délka projektu: 8 týdnů

48 000 USD (Venter 10 MUSD -> HUGO: 3 000 MUSD)

Paralelní sekvenování miliónů sekvencí, celkem 100 – 3000 Mb/run, jednotlivé sekvence dlouhé 20 – 400 bp

VYUŽITÍ GENOMICKÝCH DAT PRO TERAPEUTICKÉ PLÁNOVÁNÍ V ONKOLOGII

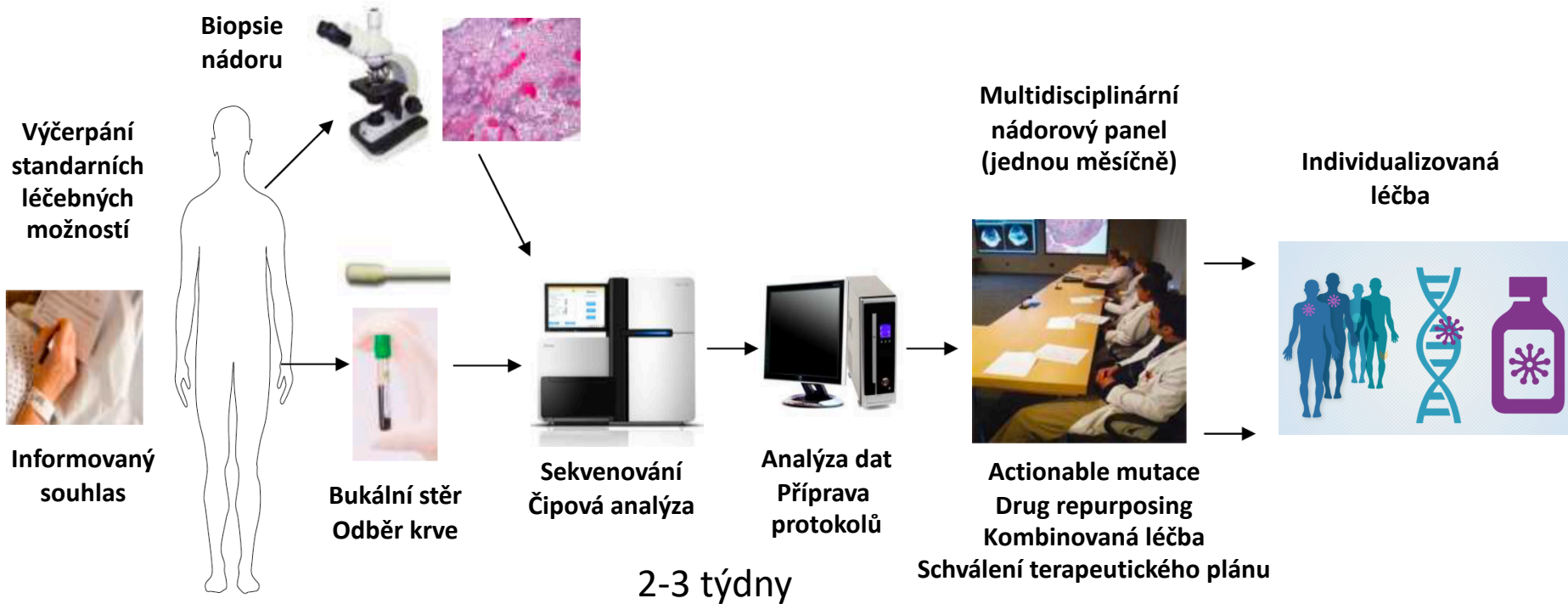
Ondřej Slabý

*Středoevropský technologický institut, Masarykova univerzita
Ústav biochemie a experimentální onkologie, 1. LF Univerzity Karlovy
Masarykův onkologický ústav*



**1. LÉKAŘSKÁ
FAKULTA**
Univerzita Karlova

Schéma programu

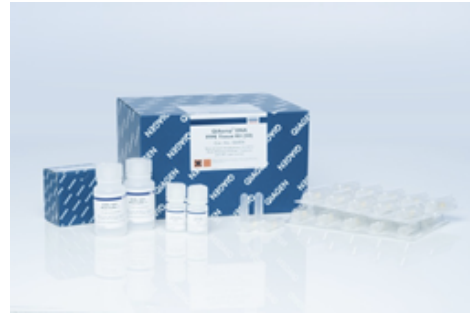


Workflow WES a analýzy fúzních genů

Cíl: nalezení driverových mutací a fúzí s významem pro terapeutické plánování



Biopsie – tumor (FFPE, tkáň)
Periferní krev

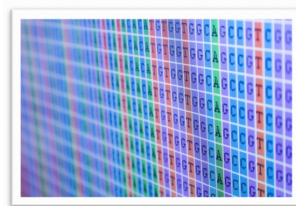


Izolace DNA – tumor, krev
Izolace RNA – tumor



Kontrola množství a kvality
DNA/RNA
Reparace DNA z FFPE
Ošetření RNA DNázou

Vyhledávání
“driverových” mutací
– missense,
inzercí/delecí



Bioinformatická
analýza



Sekvenace
NextSeq

Příprava knihoven – WES
(germinální, somatický)
TruSeq Exome Kit

Příprava knihoven – fúze
TruSight RNA Pan-Cancer
Panel

Cílená terapie

THE UNIVERSITY OF TEXAS
MD Anderson
Cancer Center

COSMIC
Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer



Výsledky celoxomového sekvenování: ukázka protokolu



SOMATIC EXOME ANALYSIS

Patient code: KD1055
Diagnosis: Metastatic ependymoma of third ventricle
Material: DNA isolated from the FFPE sample
Sample quality: 100% of cancer cells
Date of biopsy: 11.5.2017
Date of sequencing: 21.7.2017

Method: Whole exome sequencing
Library preparation: Truseq Exome kit (Illumina)
Sequencing device: NextSeq (Illumina)*

Gene	Variant (c.DNA/protein)	AF (%)	Therapeutic
<i>FGFR1</i>	c.1371C>A/p.N457K	42	Nitinib
<i>PTPN11</i>	c.205G>A/p.E69K	47,4	MAPK inhibitors
<i>FGF10</i>	c.68_70delGCT/p.C23delC	5,8	Nitinib
<i>CHD2</i>	c.4165dupA/p.M1388fs	6	-
<i>ATR</i>	c.2320delA/ p.1774fs*5	6,9	(SFT)

AF= allelic frequency

Results are divided into the following sections:

1) Variant found

- Protein function
- Diseases (germlinal exome)/cancers (somatic exome)
- Variant description (localization of mutation in protein structure – if available, associated phenotypes according to available databases). Prediction algorithms results (in novel variants or variants of uncertain significance).
- Therapeutic possibilities
- Additional comments (if relevant)

* Additional information (sequencing platform, information about the sequencing run, bioinformatic workflow and variant filtering system) are listed at the end of the protocol.

1) c.1371C>A/p.N457K variant was found in the *FGFR1* gene

i) Fibroblast growth factor receptor 1 is in humans coded by the *FGFR1* gene. It is a tyrosine-protein kinase that acts as cell-surface receptor for fibroblast growth factors and plays an essential role in the regulation of embryonic development, cell proliferation, differentiation and migration. Required for normal mesoderm patterning and correct axial organization during embryonic development, normal skeletogenesis and normal development of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal system. Phosphorylates PLCG1, FRS2, GAB1 and SHB. Ligand binding leads to the activation of several signalling cascades. Activation of PLCG1 leads to the production of the cellular signalling molecules diacylglycerol and Inositol 1,4,5-trisphosphate.

transform cell lines, implicating it is a driver mutation (Greulich et al, 2011; Yoon et al, 2004; Rand et al, 2005).

In the COSMIC database is variant described as “pathogenic” found in patients with gliomas, medulloblastomas and neuroblastoma.

iv) Fibroblast growth factor receptor 1 can be targeted directly by nintedanib, pazopanib, ponatinib and regorafenib or indirectly by MAPK inhibitors/ PI3K, Akt, mTOR inhibitors.

2) c.205G>A/p.E69K variant was found in the *PTPN11* gene

i) Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11 (PTPN11, also known as PTP-1D, SHP-2 or PTP-2C) is in humans coded by the *PTPN11* gene. Acts downstream of various receptor and cytoplasmic protein tyrosine kinases to participate in the signal



GERMINAL EXOME ANALYSIS

Patient code: KD1055
Diagnosis: Metastatic ependymoma of third ventricle
Material: DNA isolated from the peripheral blood
Date of sequencing: 21.7.2017

Method: Whole exome sequencing
Library preparation: Truseq Exome kit (Illumina)
Sequencing device: NextSeq (Illumina)*

Results:

Gene	Variant (c.DNA/protein)	MAF (%)	Therapeutic plan
<i>EGFR</i>	c.1562G>A/p.R521K	27,6	(Cetuximab)
<i>KDR</i>	c.1416A>T/p.Q472H	23,5	Axitinib, cabozantinib, nintedanib, pazopanib, ponatinib, ramucirumab, regorafenib, sorafenib, sunitinib, vandetanib, lenvatinib, midostaurin/ MAPK inhibitors
<i>PIK3CA</i>	c.1173A>G/p.I391M	7,7	PI3K/AKT/mTOR-inhibitors
<i>BARD1</i>	c.1518_1519delinsCA	-	PARP-inhibitors/Epigenetic treatment
<i>TP53</i>	c.98C>G/p.P33R	71,5	-

Variants in *EGFR*, *PIK3CA* and *BARD1* are heterozygous. Variants in *KDR* and *TP53* are homozygous. MAF=minor allelic frequency - european

Results are divided into the following sections:

1) Variant found

- Protein function
- Diseases (germlinal exome)/cancers (somatic exome) described in association with relevant gene
- Variant description (localization of mutation in protein structure – if available, associated phenotypes according to available databases). Prediction algorithms results (in novel variants or variants of uncertain significance).
- Therapeutic possibilities
- Additional comments (if relevant)

* Additional information (sequencing platform, information about the sequencing run, bioinformatic workflow and variant filtering system) are listed at the end of the protocol.

Sequencing platform:

Whole exome sequencing (Truseq Exome kit, Illumina) was performed on the NextSeq (Illumina) device using NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2 (150 cycles) (Illumina) cartridge.

Information about the sequencing run

The patient was sequenced on the 21st of July 2017 together with the following patients: OB0305 and 1059. The overall number of reads was 163.608.416. 88,3% of the target region was covered at least 20 times. DNA was obtained from the FFPE sample of metastatic ependymoma. DIN was 5,7.

Bioinformatic workflow:

Alignment (GRCh37): BWA. Sambalaster, Samtools Sambamba
 Quality Control: PicardTools CollectHsMetrics, FastQC, (MultiQC)
 Variant Calling: Mutect, VarDict, Scalpel (Somatic)
 VarDict + GATK HaplotypeCaller (Germline)
 Annotation: Oncotator (CancerGeneCensus, Familial Cancer Database, Cosmic, Clinvar), Annovar refGene, 1000 genomes, esp6500, ExAC, dbSNP147+ Foundation One and MD Anderson.

Variant filtering system:

- Exonic (coding) and adjacent intronic (splicing) regions
- Nonsynonymous variants, frameshift/nonframeshift insertions and deletions, stopgain, stoploss and splicing variants
- Variants according to COSMIC, MD Anderson, Cancer gene census (1500 genes) and ClinVar databases
- Manual validation – Alamut software
- Impact of variants according to prediction algorithms – PolyPhen-2, SIFT
- Potential significance for a therapeutic plan
- Whole dataset (exome) evaluated: yes

Note on methodology:

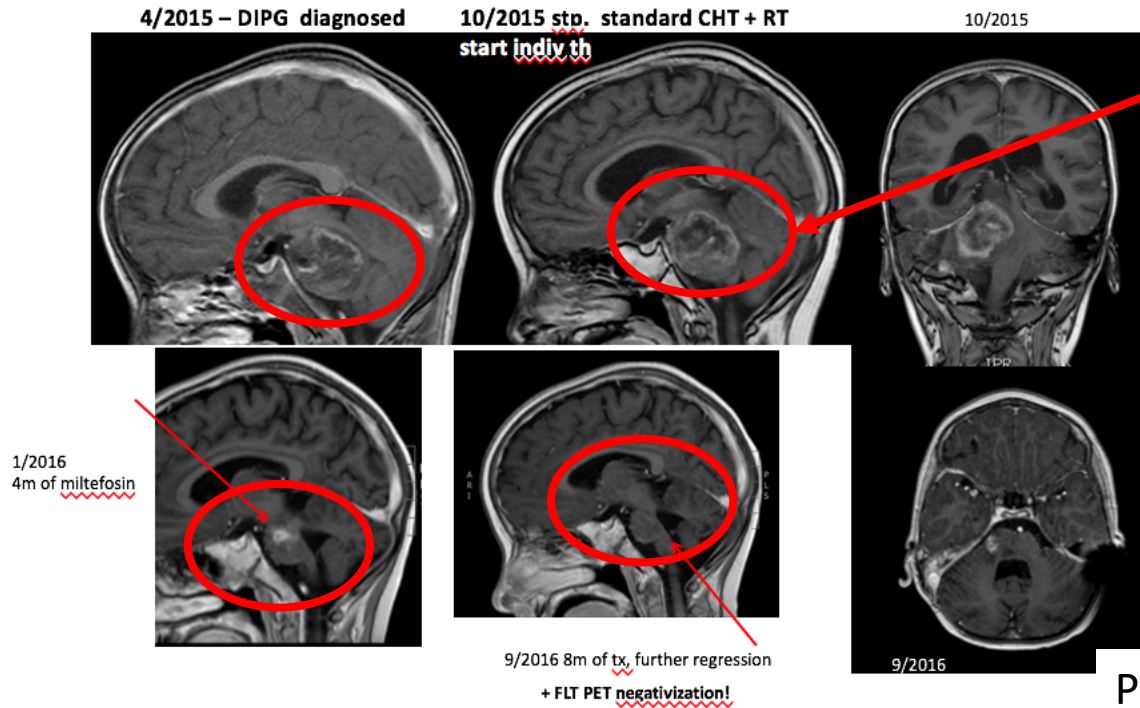
Not all the variants found are listed. Variants in the presented protocol were selected according to mentioned filtering system by specialists. Variants found are listed in the protocol supplement (basic filter used – exonic and splicing variants only, synonymous variants excluded, European MAF up to 10%). The technical parameters of the method do not guarantee 100% coverage of all sequenced genes. Mutations in other (insufficiently covered, not evaluated, not analyzed) predisposing genes and changes that cannot be detected at present levels of knowledge and technical possibilities cannot be excluded.

Protocol created by Mgr. Hana Nosková, Ph.D.
 Email: hana.noskova@ceitec.muni.cz
 Phone: +420 728 840 567

Protocol revised by doc. RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.

Kazuistika 1 – somatická mutace

5-letý chlapec s difúzním pontinným gliomem (DIPG), histologie AA-GBM, Ki67 – 60%
Sekvenačně nalezena aktivační mutace E545K v genu PI3K vedoucí k hypereaktivitě signalizace PI3K/AKT (miltefosine/impavido jediný schválený Akt inhibitor)



miltefosine

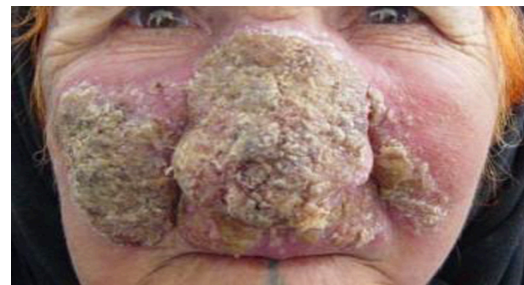
1/2016
4m of miltefosin

9/2016 8m of tx, further regression
+ FLT PET negativization!

Miltefosine

Leishmaniasis

Po 17 měsících
trvající stabilizace
negativizace na PETu



**DRUG
REPURPOSING!**

Kazuistika 2 – zárodečná mutace

Chlapec s infantilní myofibromatózou s mnohočetným viscerálním postižením

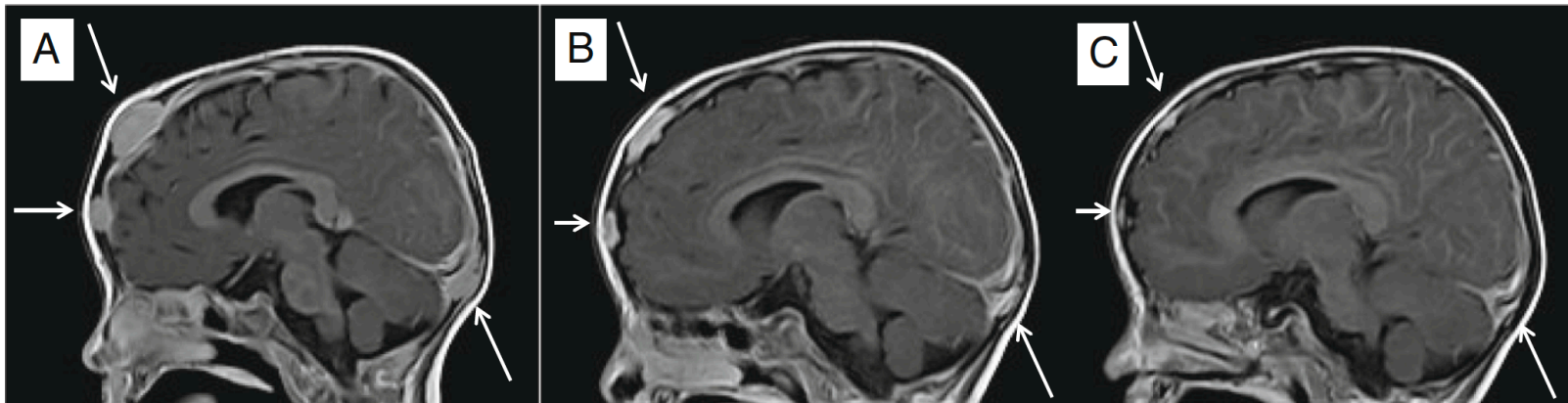
Progrese po dvou liniích standardní chemoterapie (A)

Sekvenačně: **germinální (aktivační) mutace 1681 C>A v genu PDGFRB** v

heterozygotním stavu, mutace byla popsána jako kauzální u několika rodin s IM*

Sunitinib + metronomic VBL: Po 2 měsících (B) po 6 měsících (C) léčby

Po jednom roce léčby stále trvající odpověď...



* Cheung YH, Gayden T, Campeau PM, LeDuc CA, Russo D, Nguyen V-H, et al. A recurrent PDGFRB mutation causes familial infantile myofibromatosis. *Am J Hum Genet.* 2013;92:996–1000.

Take home

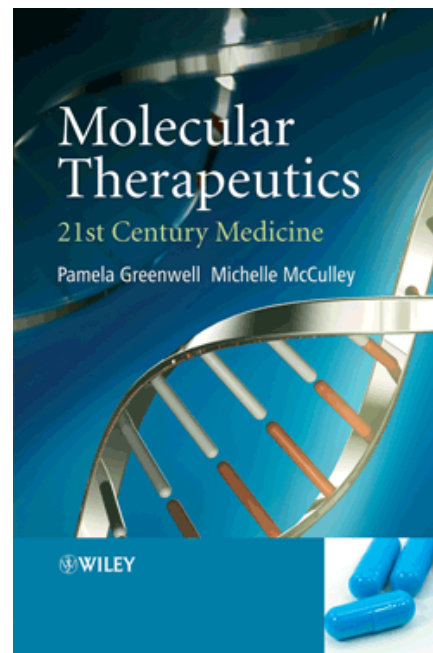
- 1) Co je molekulární medicína?
- 2) Co znamená spojení „integrace diagnózy a terapie“?
- 3) Jaké jsou důvody a následky individualizace léčby?
- 4) Jaké milníky v historii molekulární biologie umožnily vznik oboru molekulární medicína a jaké nejnovější poznatky její rychlý vývoj v posledních letech?



Náplň příští přednášky

Molekulární patologie nádorových onemocnění – buněčný cyklus, apoptóza, genetická nestabilita nádorů, rizikové faktory, angiogeneze, tvorba metastáz, mikroRNA, nádor jako komplexní tkáň, histopatologická klasifikace nádorů, mechanismus účinku vybraných léčiv, invazivita/chemorezistence – příklady kolorektálního karcinomu, mamárního karcinomu a glioblastomu

Doporučená literatura



Dotazy?

