

Využití čipových technologií v onkologii

Dr. Martin Trbušek

Fakultní nemocnice Brno

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 „kvalitní“ opravy DNA (**zejména v G2 / M-fázi buněčného cyklu**)

Invazivita v primární tkáni

Angiogeneze

Metastázování

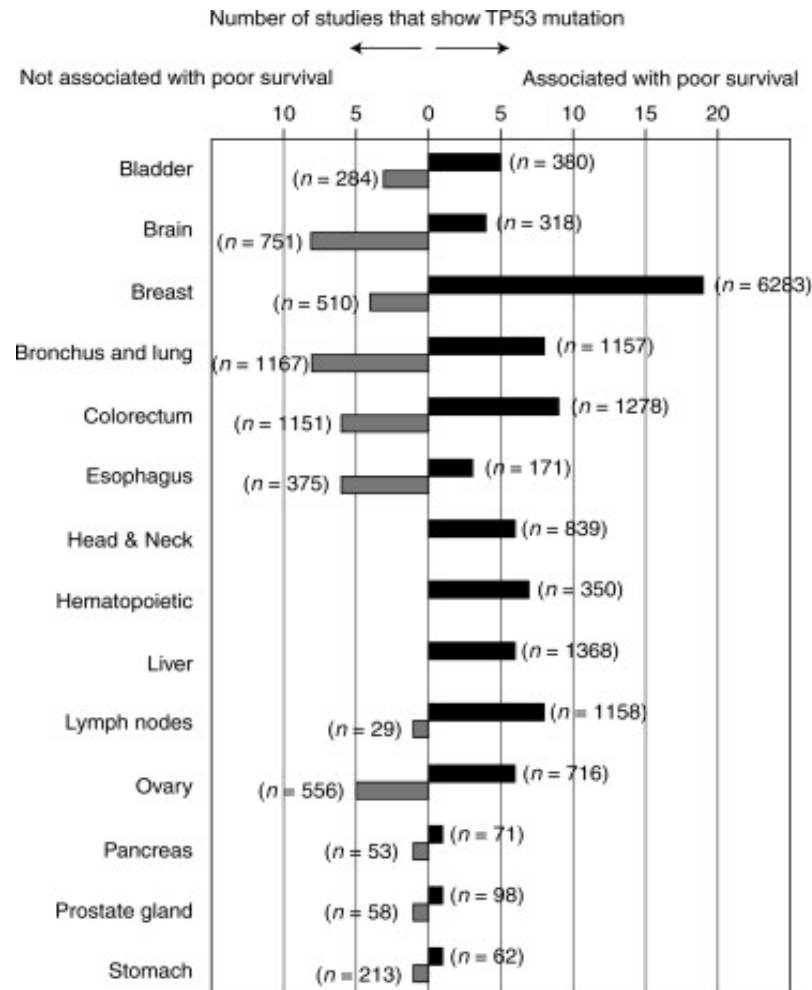
Selekce nových rezistentních klonů léčbou

Základní náležitosti pro microarrays

- **Originalita tématu (anticipace výsledků)**
- **Solidní analýza vzorku (% nád. buněk)**
Imunohistochemie, flow-cytometrie
(např. ZAP-70/T-lymf. u 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

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

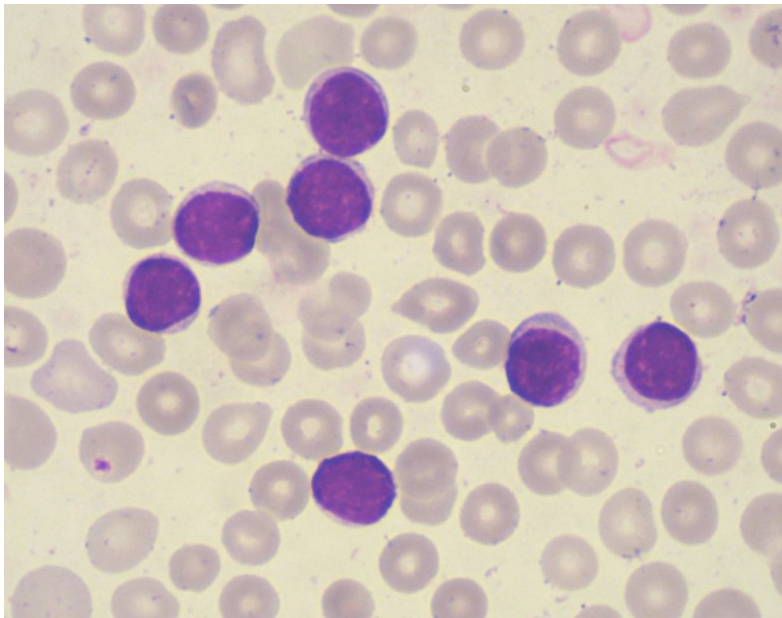
9 600 publikací; regulace exprese kódujících genů

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

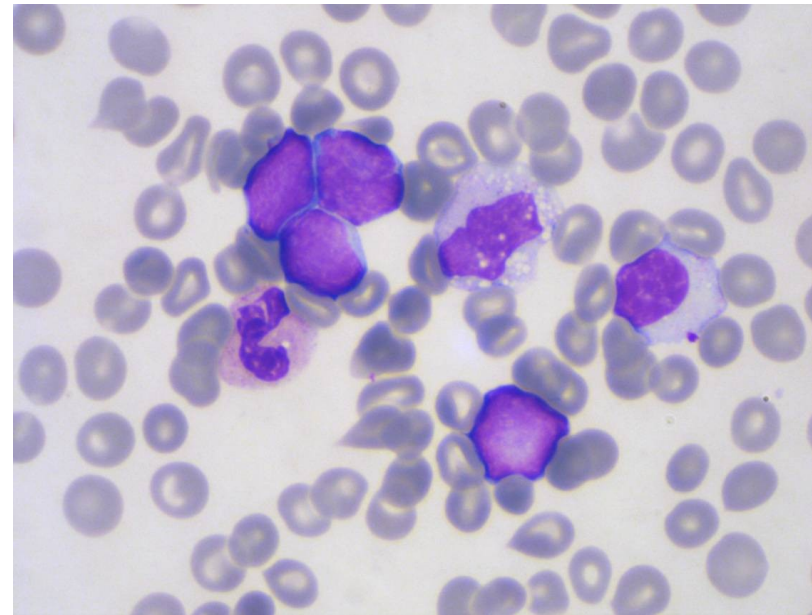
NEJM 2005;353:1793-801.

Využití VI: Studium nádorové transformace

CLL



Lymfoblastický relaps



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

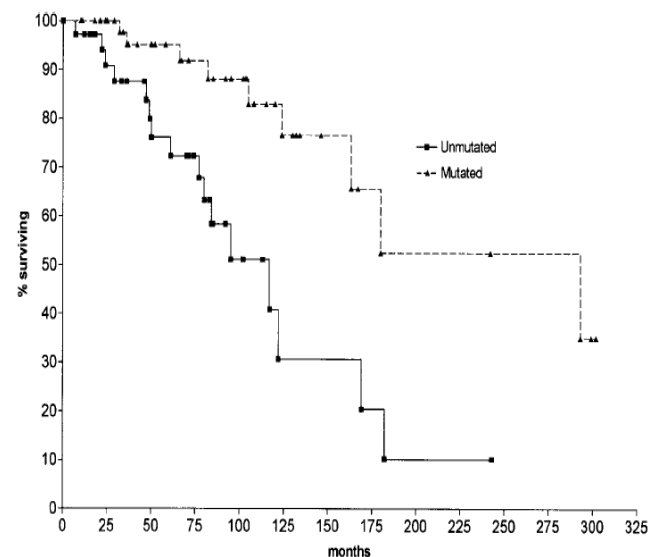
Vyvstává tak důležitost genetické charakterizace vzorku.

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)

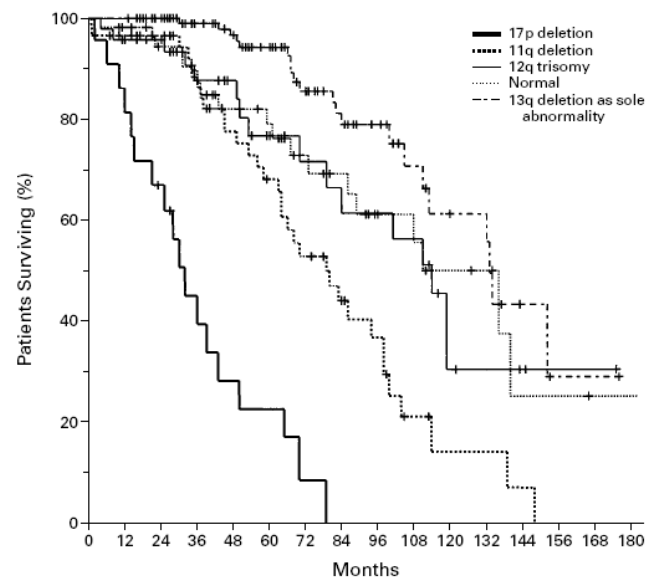
Přítomnost cytogenetických abnormalit

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

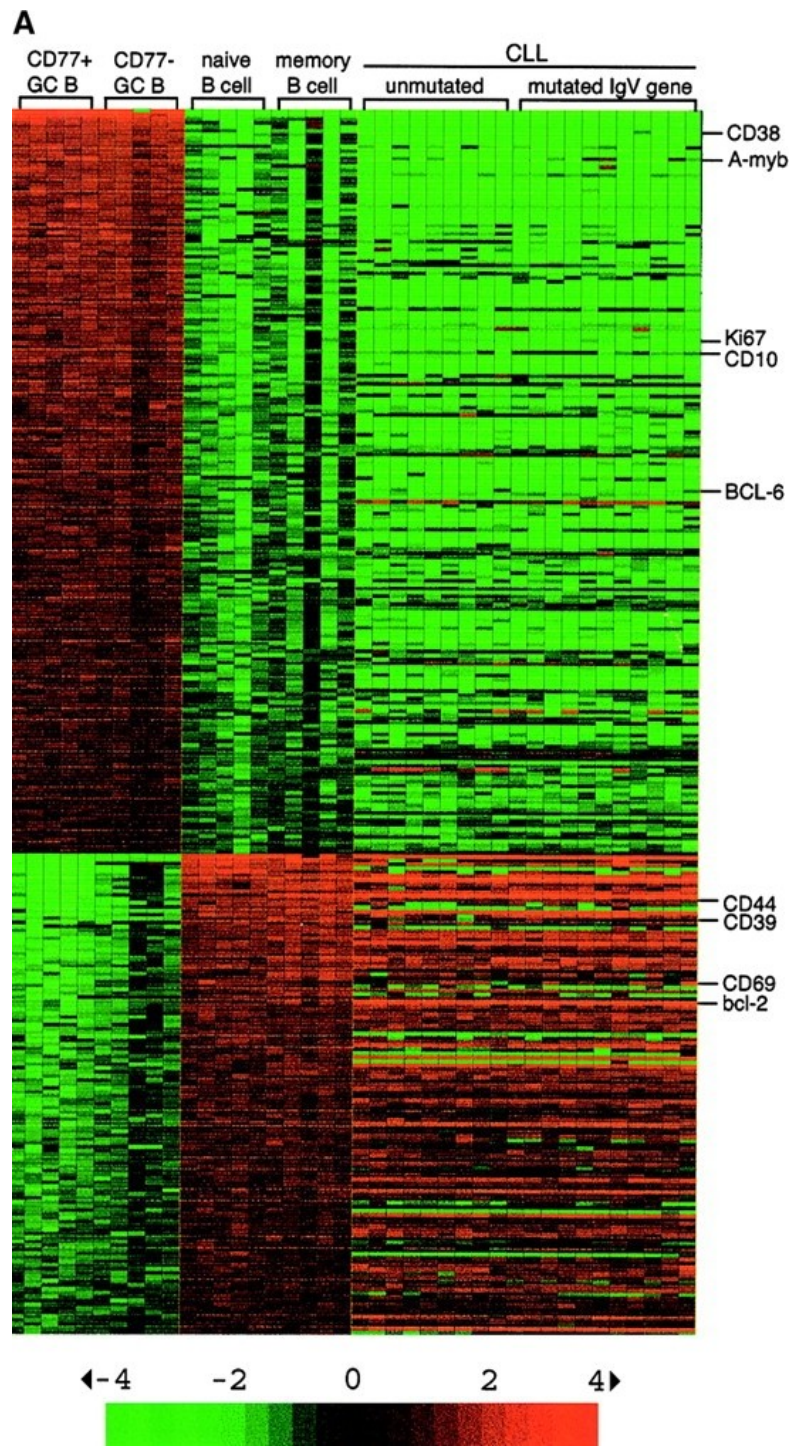
- Klein U et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogenous phenotype related to memory B cells.

J Exp Med 2001; 194:1625-38

Identifikace genu ZAP-70 asociovaného s nemutovaným IgVH

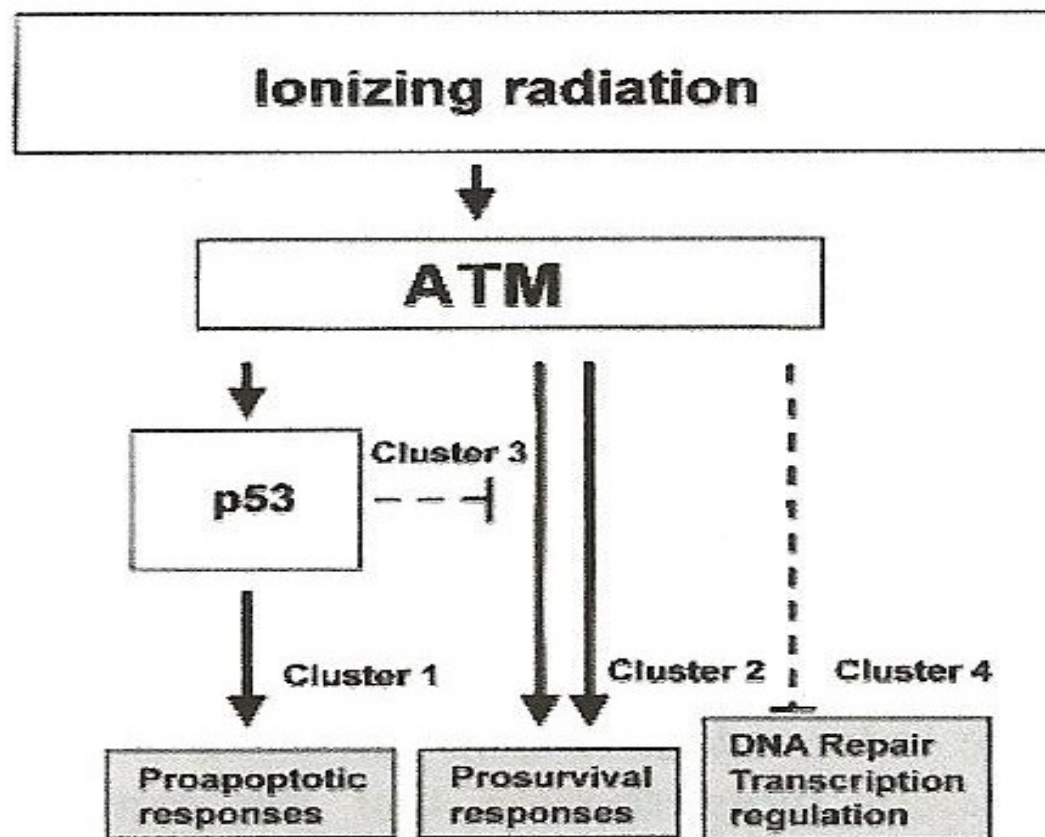
- Letestu R et al. Evaluation of ZAP-70 expression by flow cytometry in chronic lymphocytic leukemia: A multicentric international harmonization process.

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