

# Využití čipových technologií v onkologii

Dr. Martin Trbušek

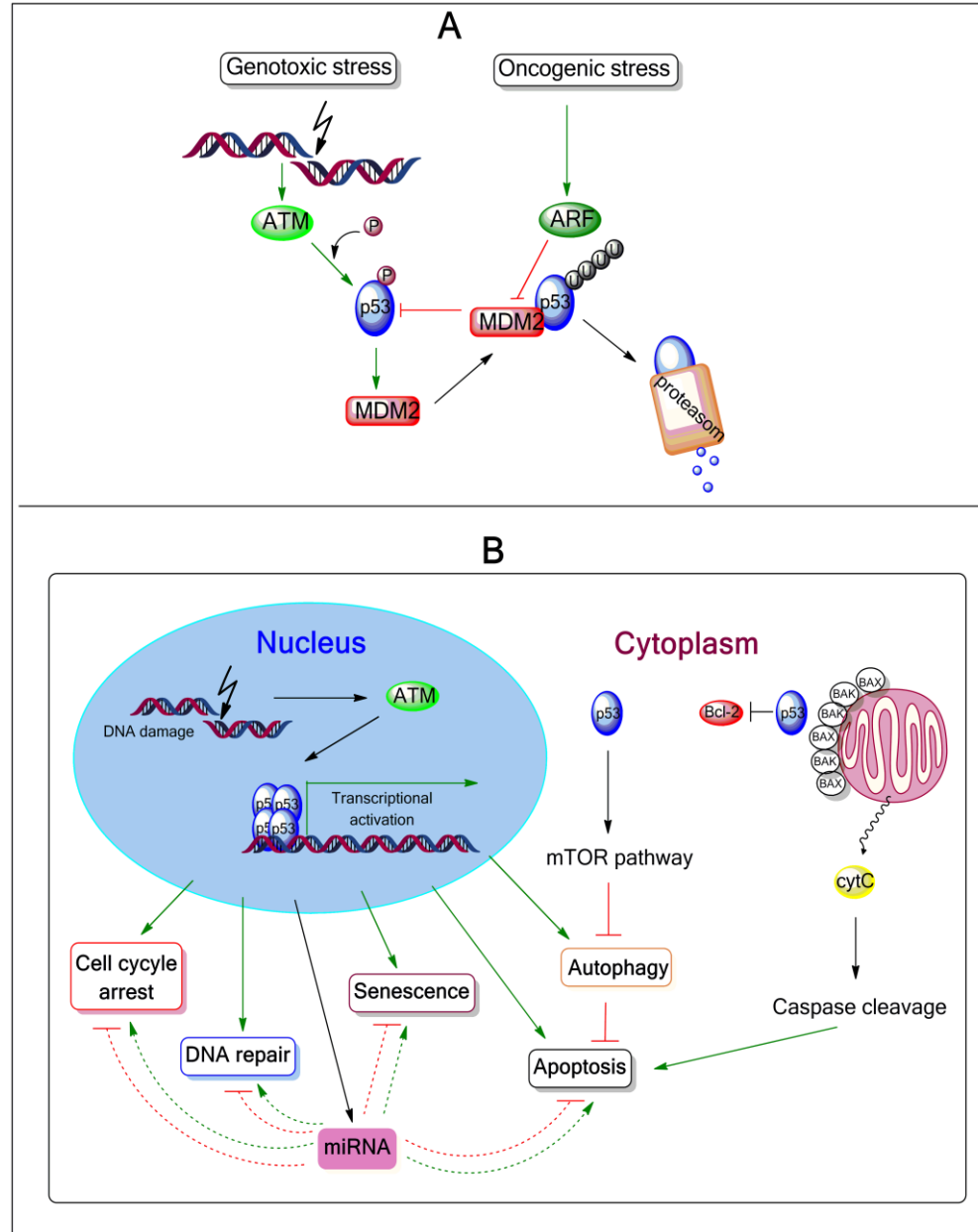
Fakultní nemocnice Brno

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

## DNA damage response (DDR)

Bartkova et al, Nature 2005

DNA damage response as a  
candidate anti-cancer barrier  
in early human tumorigenesis.



# 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**

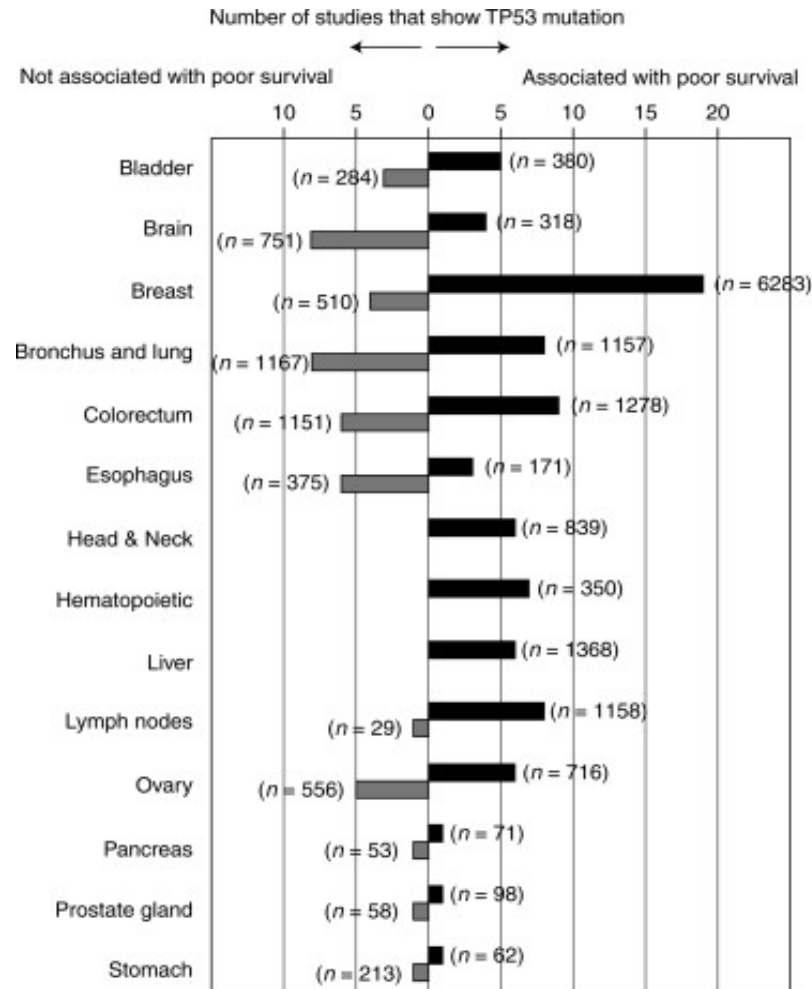
**Selekce nových rezistentních klonů léčbou**

# 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...

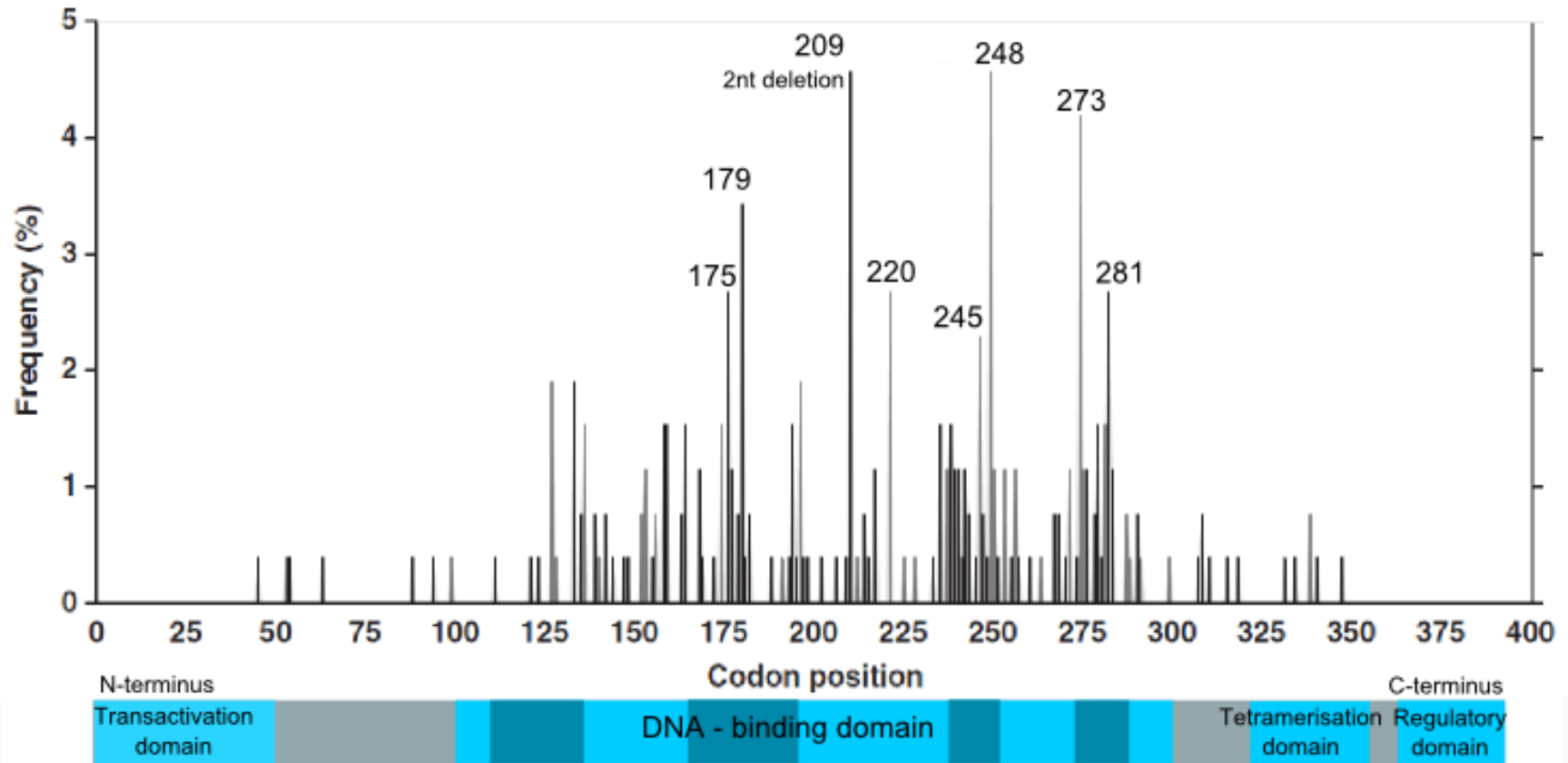
(Prognostický význam mutací p53 u nádorů)



Převzato od:

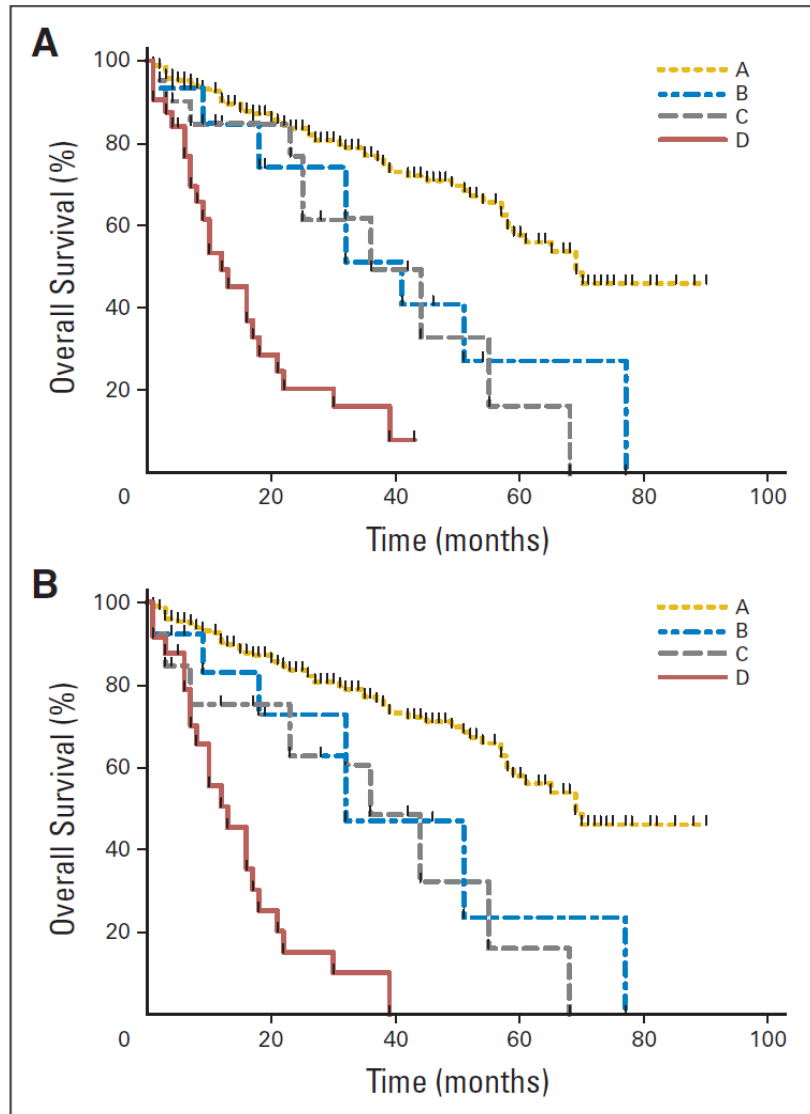
Robles AI, Harris CC: Clinical outcomes and correlates of TP53 mutations and cancer. Cold Spring Harb Perspect Biol 2010; 2: a001016

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



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

# p53 mutace a přežití CLL pacientů



**Fig. A: all mutations**

**Fig. B: mutation + del(17p)**

**A: wt-p53**

**MS: 69 months**

**B: nonmissense p53 mutations**

**MS: 36 months**

**C: p53 missense out of DBMs**

**MS: 41 months**

**D: p53 missense in DBMs**

**MS: 12 months**

**(D) vs. (C) P=0.009**

**(D) vs. (B) P=0.002**

**Trbusek et al., JCO 2011**

# 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**

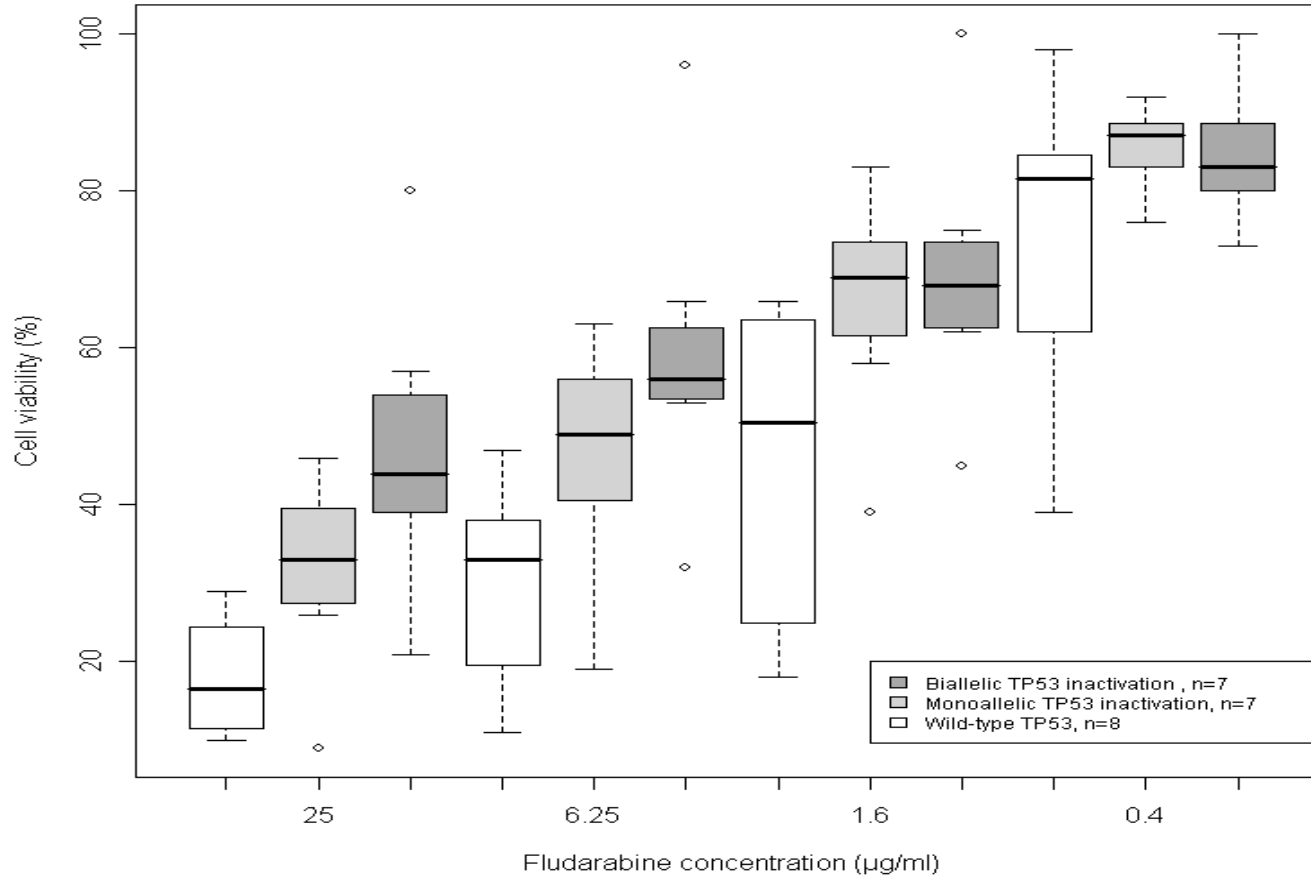
**AlloSCT**



# TP53 abnormality a *in vitro* odpověď na fludarabin

**WST-1  
Assay**

**48 h**



# 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

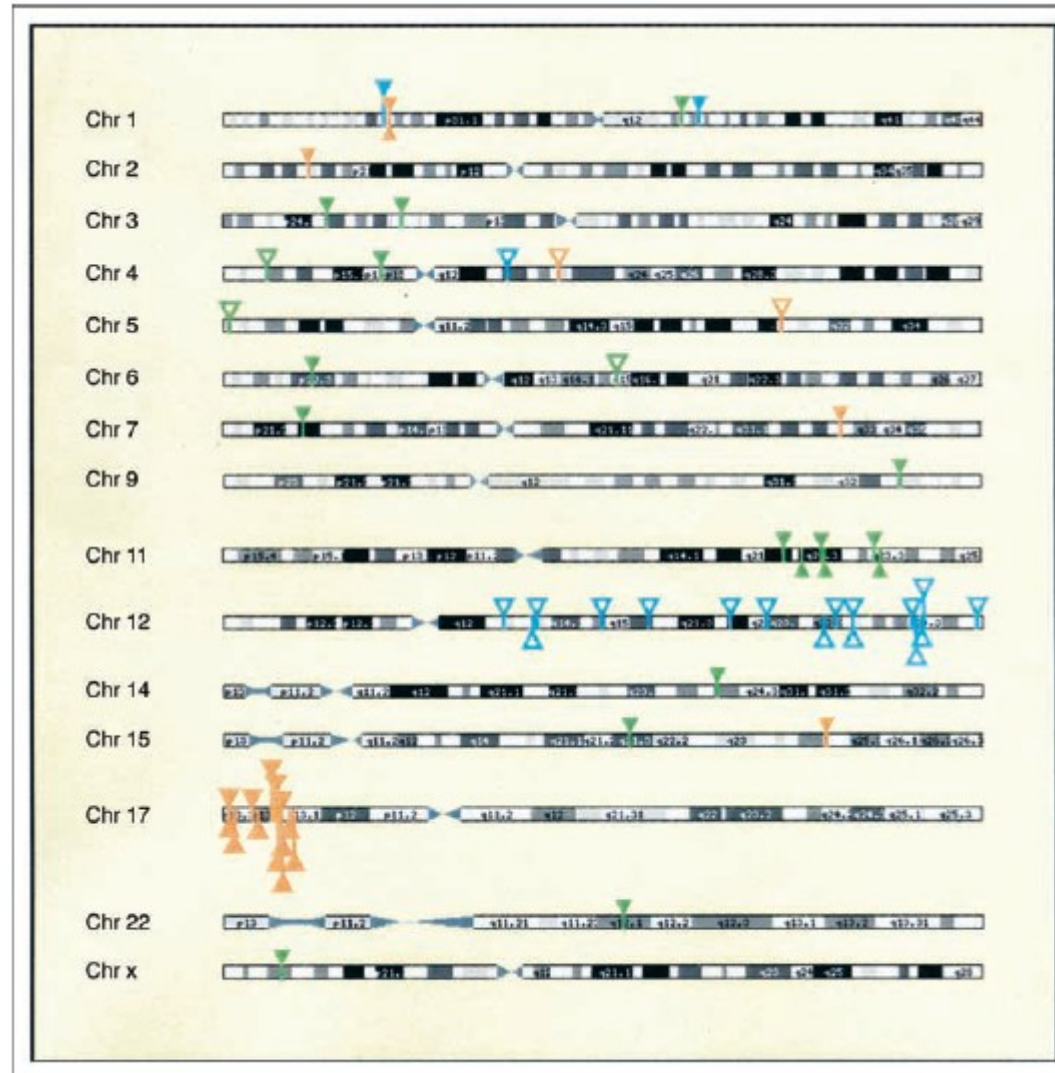
Překryv CLL/MCL; fenotyp dle flow-cytometrie (CLL = CD5+, CD19+)

### Metastázy nejasného původu

Schválený komerční kit (FDA) založený na analýze genové exprese

# Využití III

## Analýza genové exprese ve vztahu ke genomickým aberacím



**CLL**

**Del13q14**  
**Del11q22-23**  
**Del17p13**  
**Trizomie 12**

**Velmi dobrá korelace**

**Gene dosage effect**  
**Class predictor**

**Haslinger et al.,**  
**JCO 2004**

## **Využití IV: 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 V: 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 VI: Micro RNA v onkogenezi

Lagos-Quintana M et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. **Science 2001; 294:853-8**

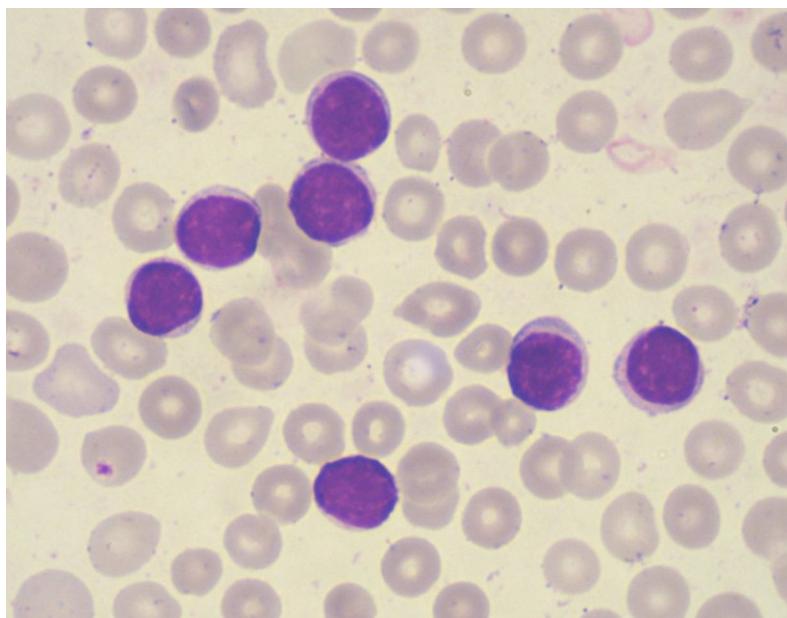
**25 397 publikací; regulace exprese kódujících genů**

Calin GA et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia.  
**NEJM 2005;353:1793-801.**

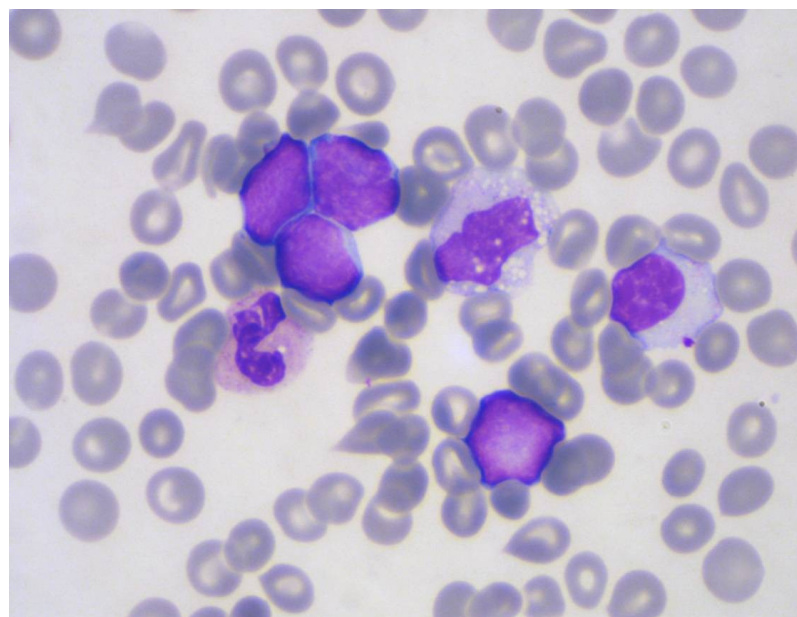


## Využití VII: Studium nádorové transformace

### CLL



### Lymfoblastický relaps



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

**Vyvstává tak důležitost genetické charakterizace vzorku.**

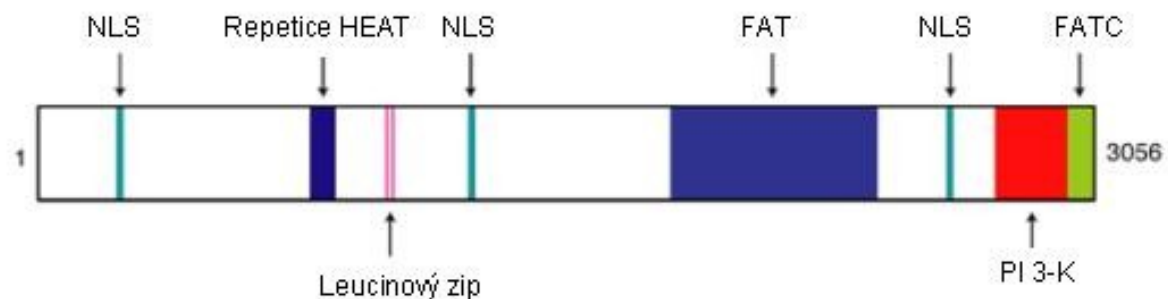
# Využití VIII: Resekvenace velkých genů

62 exonů

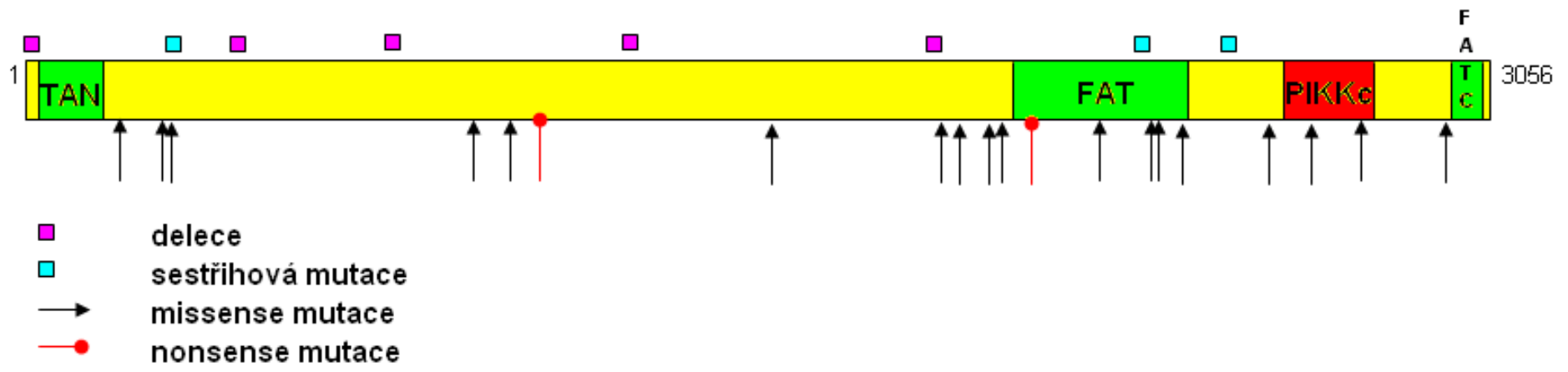
3 056 AK

~ 350 kDa

Např. ATM

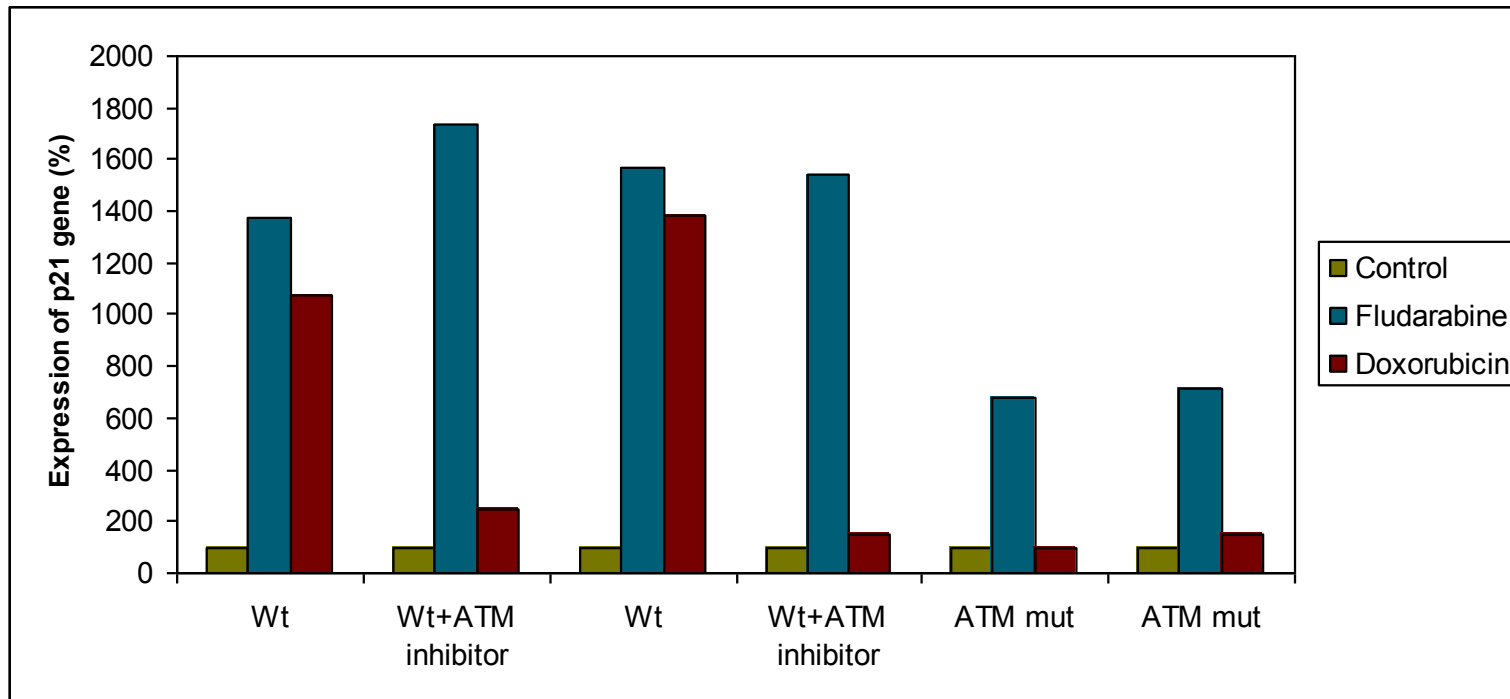


# Spektrum a lokalizace ATM mutací na IHOK, FN Brno



+ polymorfismy !!

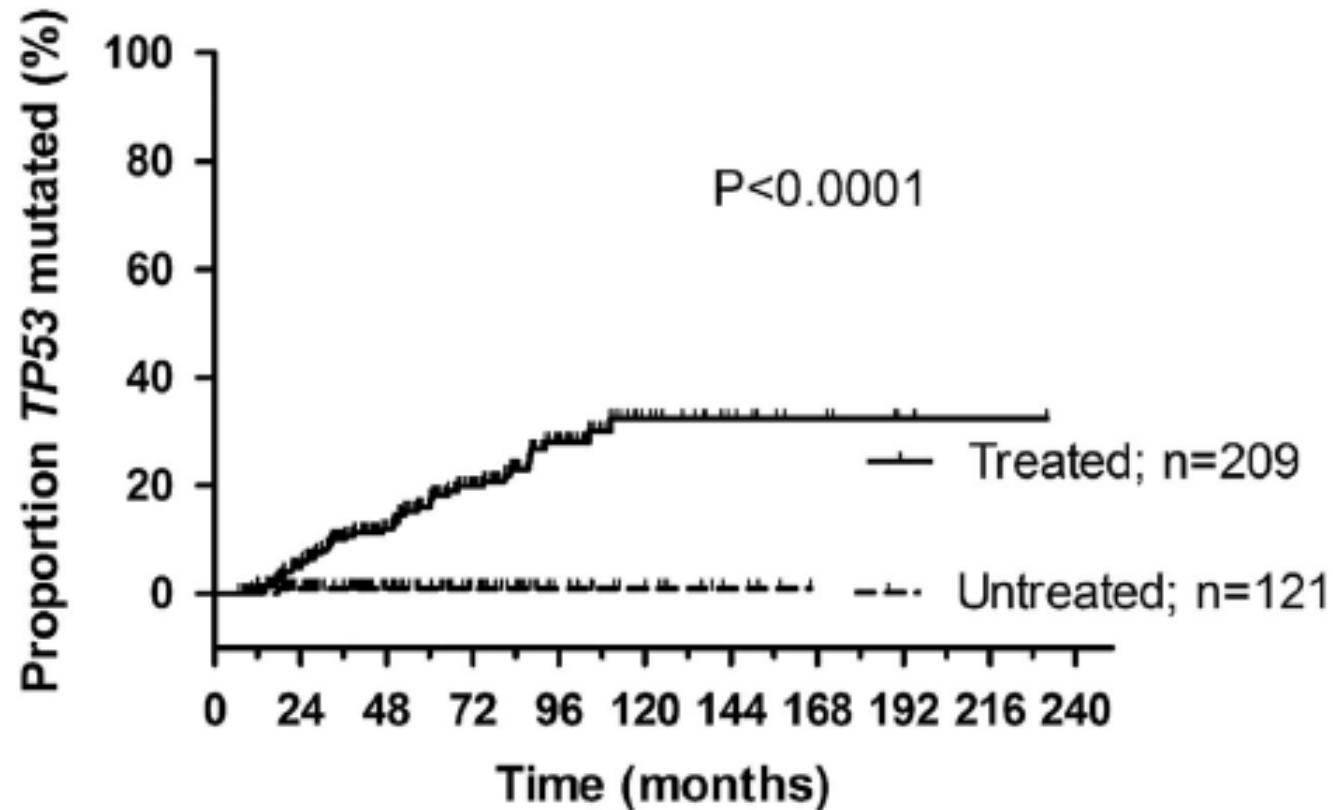
# Korelace s funkčním stavem mutovaného proteinu



# Využití IX: Sekvenování nové generace s vysokou citlivostí (Ultra-deep NGS)

**Příklad: selekce mutací v genu *TP53* u pacientů  
s chronickou lymfocytární leukémií v průběhu terapie**

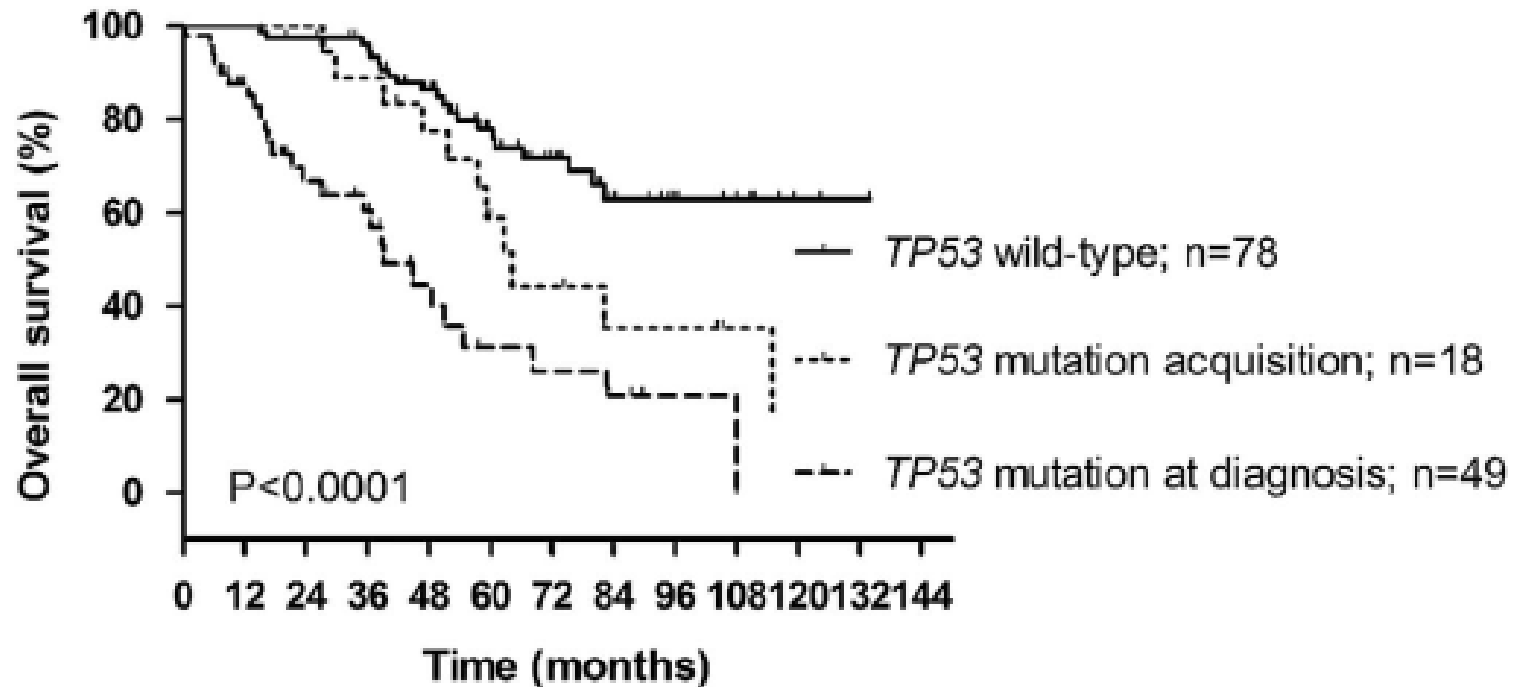
# Selekce mutací *TP53* v průběhu onemocnění



1/121 neléčených pacientů  
43/209 léčených pacientů

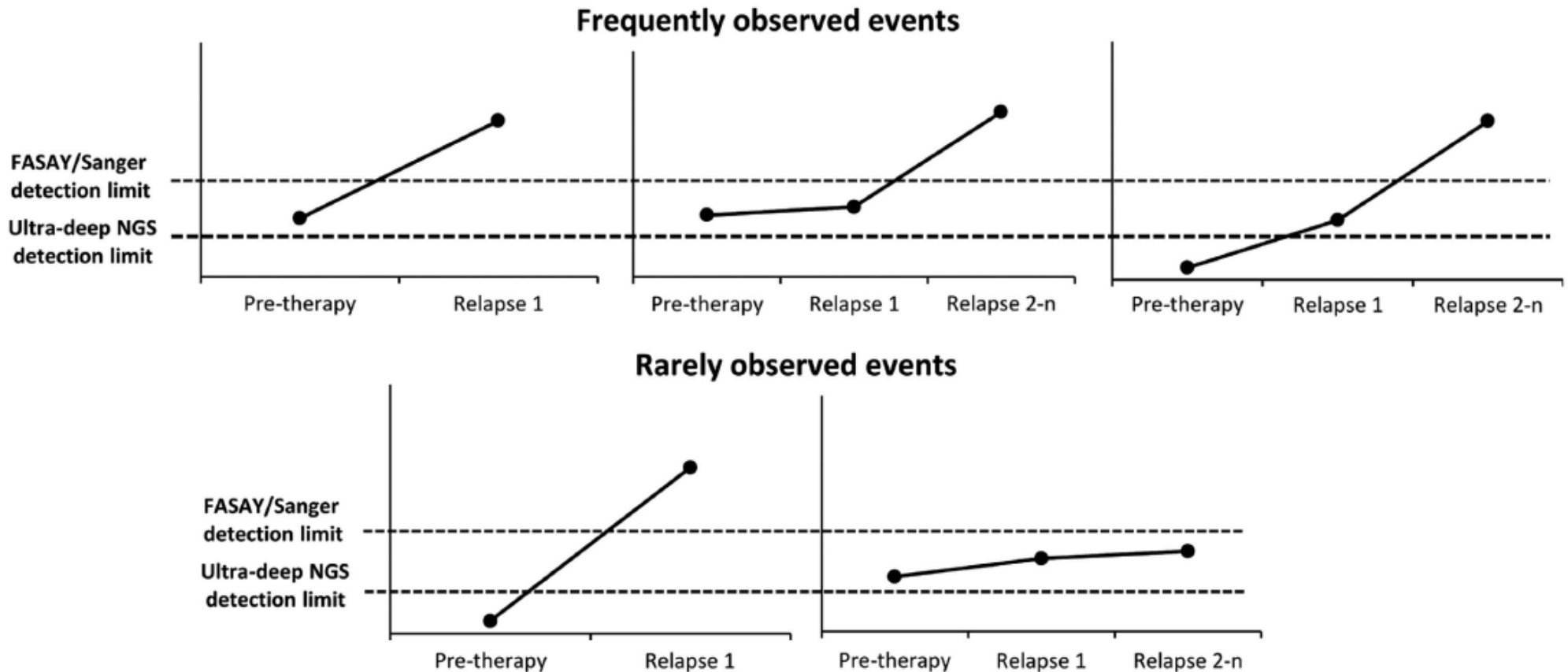
Riziko 1% vs. 17% po 5-ti letech;  $P < 0,001$

# Negativní dopad nových mutací na přežití



Malčíková et al., Leukemia 2015

# Více a méně pravděpodobné scénáře selekce mutací v *TP53*



Malčíková et al., Leukemia 2015

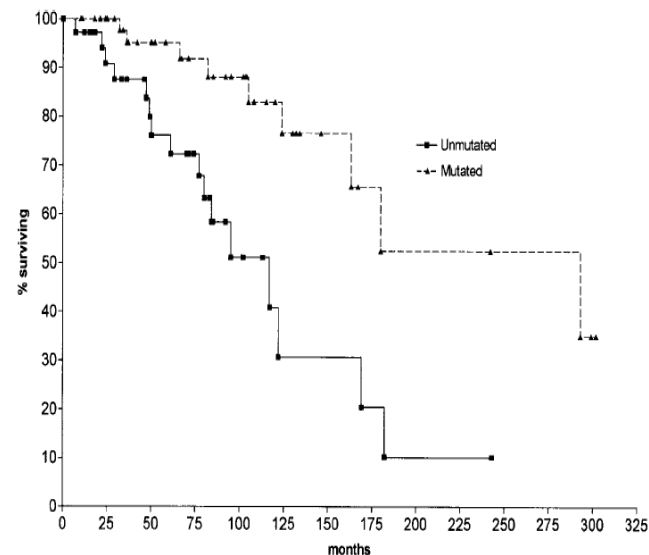


# CLL jako model pro microarray analýzu

## 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)

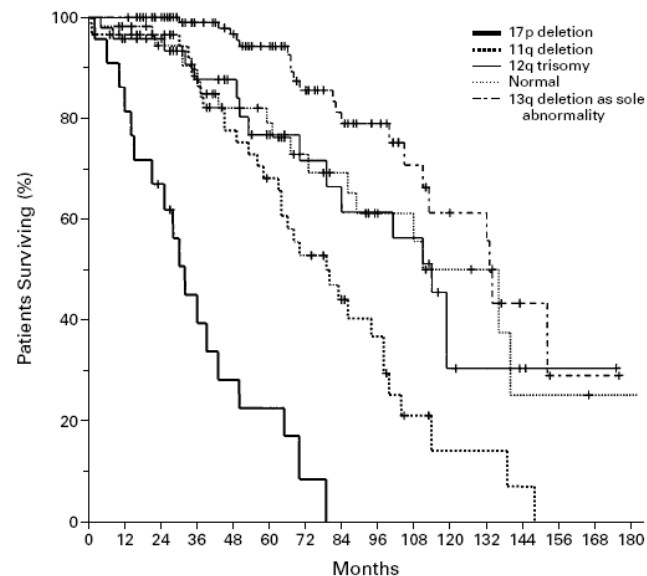
## Přítomnost cytogenetických abnormalit

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

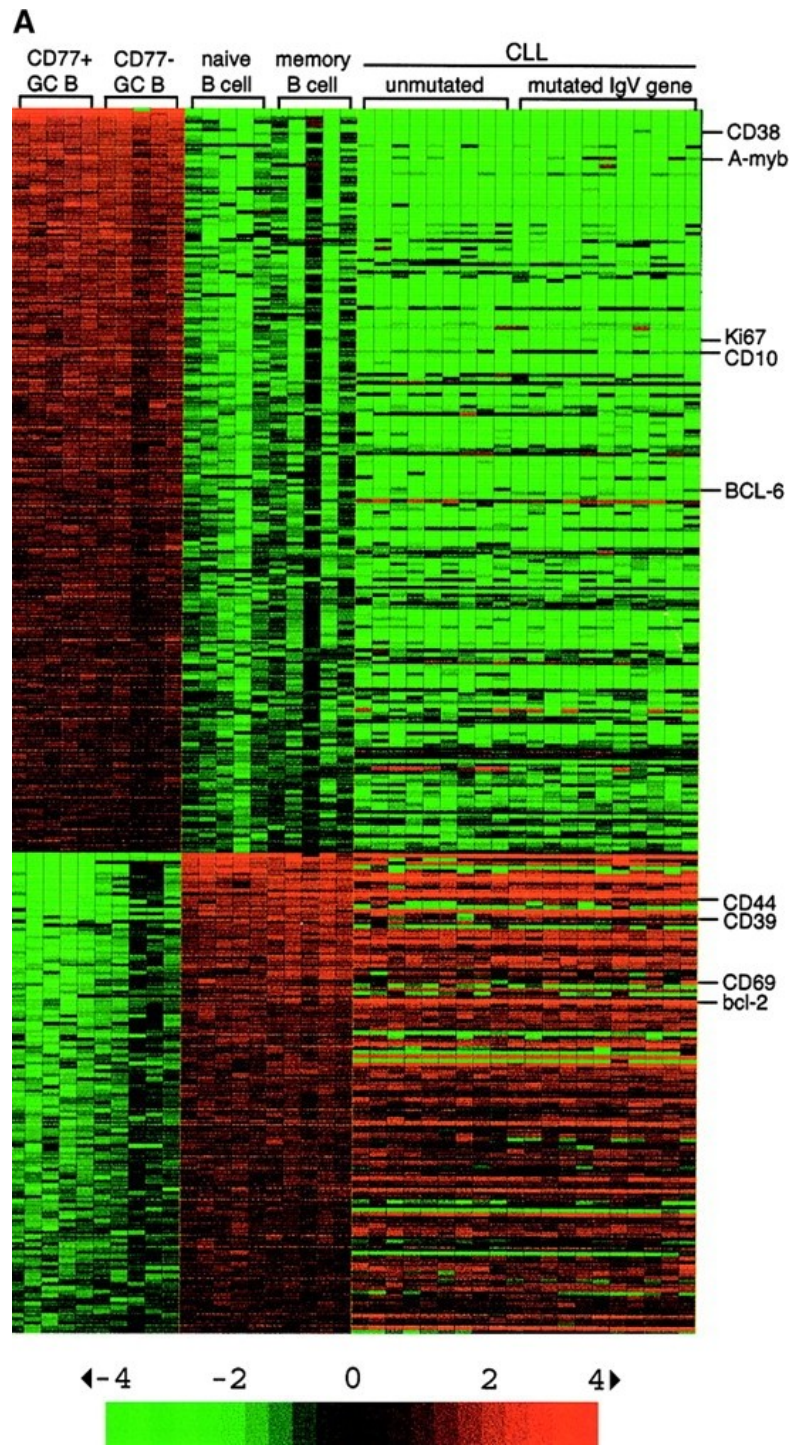
**Klein U et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogenous phenotype related to memory B cells.**

**J Exp Med 2001; 194:1625-38**

**Identifikace genu ZAP-70 asociovaného s nemutovaným IgVH**

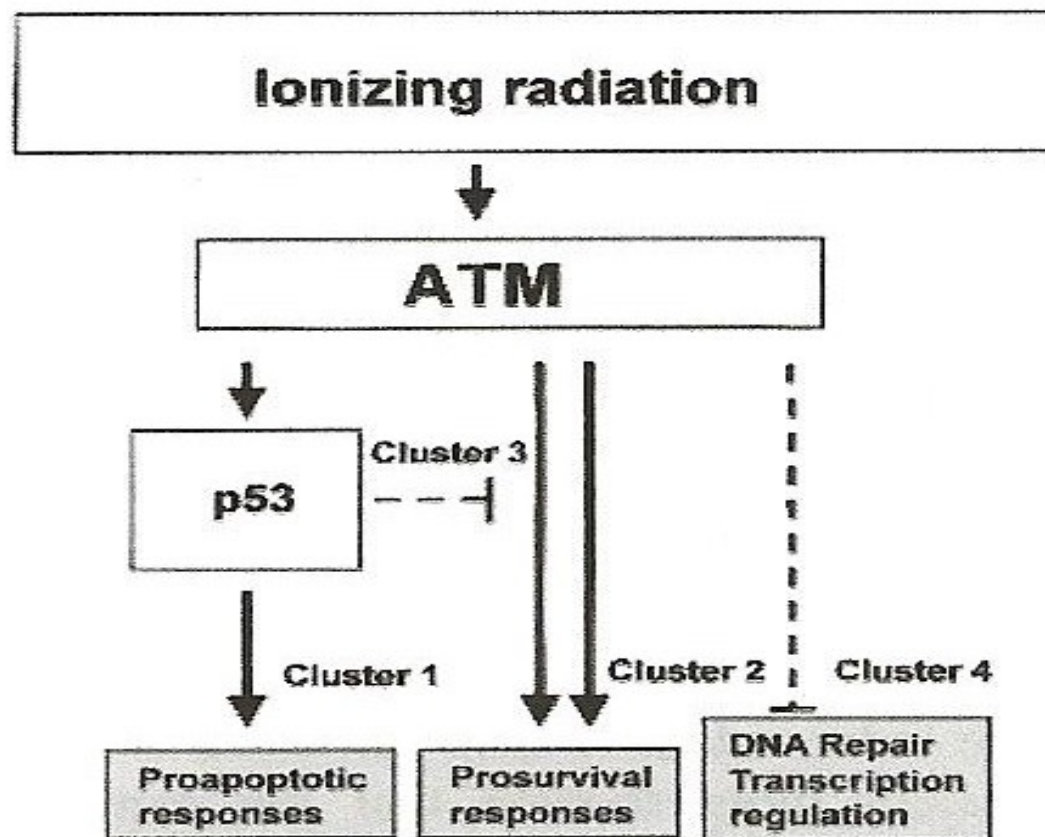
**Letestu R et al. Evaluation of ZAP-70 expression by flow cytometry in chronic lymphocytic leukemia: A multicentric international harmonization process.**

**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](mailto:mtrbusek@fnbrno.cz)**