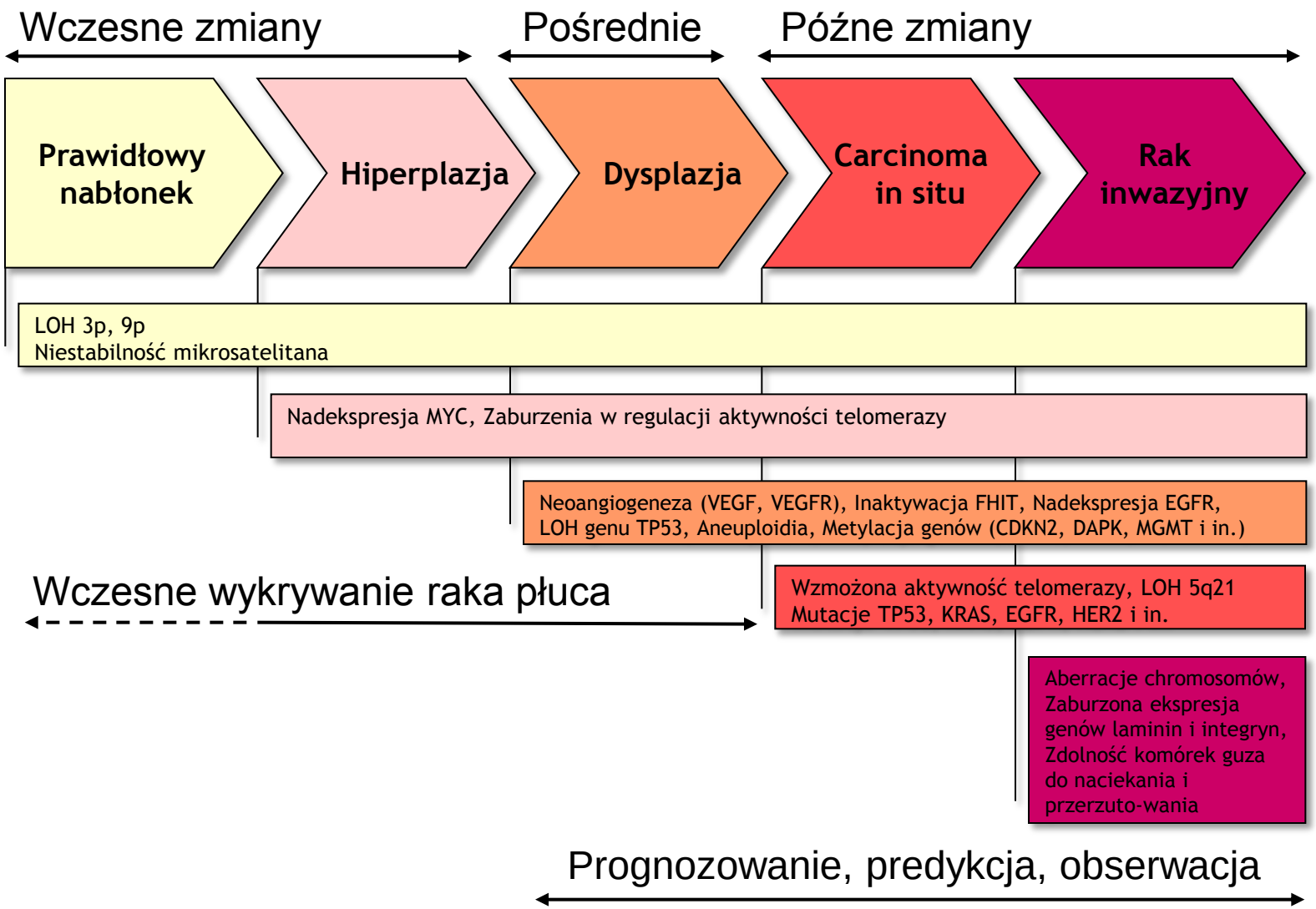
Nowoczesne metody diagnostyki molekularnej raka płuca

prof. Joanna Chorostowska-Wynimko

Zakład Genetyki i Immunologii Klinicznej
Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie

Sekwencyjność występowania zaburzeń molekularnych w niedrobnokomórkowym raku płuca



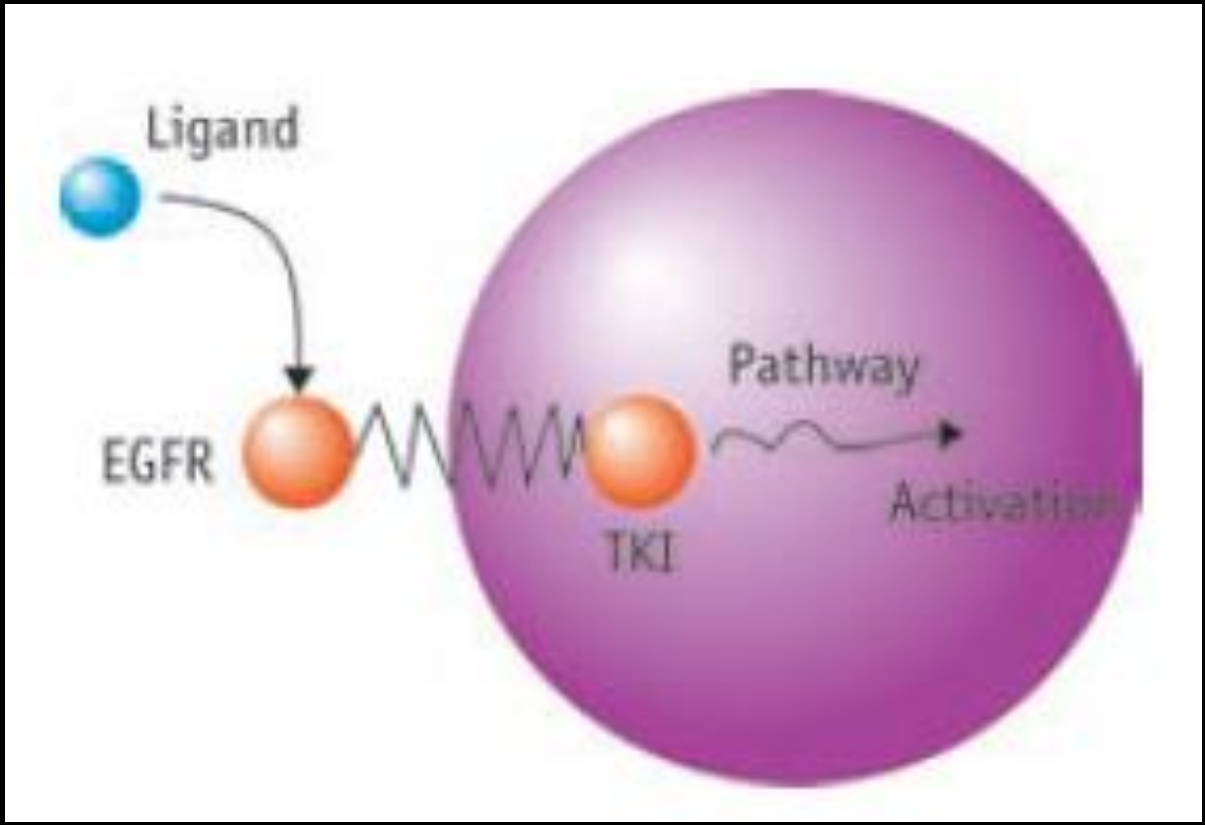
Chorostowska-Wynimko, Skronski & Szpechcinski, Onkologia Info, 2011.

Markery predykcyjne w NDRP o potwierdzonej wartości klinicznej

- mutacje somatyczne genu EGFR
- rearanżacje genu ALK (gen fuzyjny EML4-ALK)

Kryteria kliniczne nie mają wartości predykcyjnej

EGFR - receptor naskórkowego czynnika wzrostu



JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY
ASCO SPECIAL ARTICLE

American Society of Clinical Oncology Provisional Clinical Opinion: Epidermal Growth Factor Receptor (*EGFR*) Mutation Testing for Patients With Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer Considering First-Line EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor Therapy

Vicki Leigh Keedy, Sarah Temin, Mark R. Somerfield, Mary Beth Beasley, David H. Johnson, Lisa M. McShane, Daniel T. Milton, John R. Strawn, Heather A. Wakelee, and Giuseppe Giaccone

„On the basis of available evidence thus far, mutation analysis has proven to be the most reliable methodology to evaluate for EGFR alterations that correlate with response to TKI inhibitor sensitivity or PFS."

JCO 2011, 59, 2121

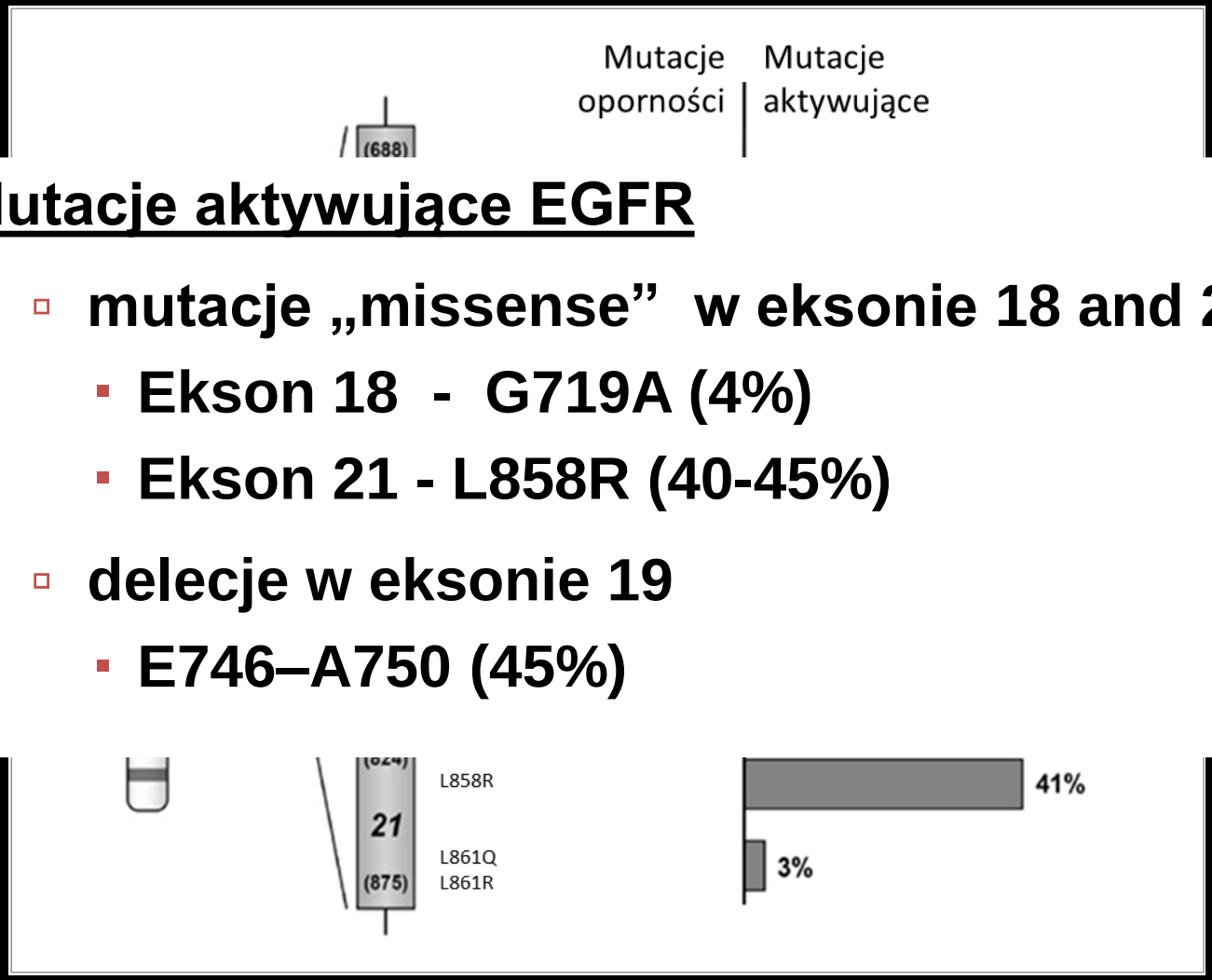
Jacek Jassem[1], Wojciech Biernat[1], Maciej Bryl[2], Joanna Chorostowska-Wynimko[3], Rafał Dziadziuszko[1], Paweł Krawczyk[4], Radzisław Kordek[5], Dariusz M. Kowalski[6], Maciej Krzakowski[6], Włodzimierz Olszewski[6], Tadeusz Orłowski[3], Rodryg Ramlau[2], Witold Rzyman[1]

[1]Gdański Uniwersytet Medyczny
[2]Wielkopolskie Centrum Pulmonologii i Torakochirurgii w Poznaniu
[3]Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie
[4]Uniwerystet Medyczny w Lublinie
[5]Uniwersytet Medyczny w Łodzi
[6]Centrum Onkologii — Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie

Rola systemowych metod leczenia u chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca i złośliwego międzybłoniaka opłucnej: uaktualnione zalecenia ekspertów

The role of systemic therapies of non-small cell lung cancer and malignant pleural mesothelioma: updated expert recommendations

„Nowotwory Journal of Oncology" 2014; 64, 1: 61–75

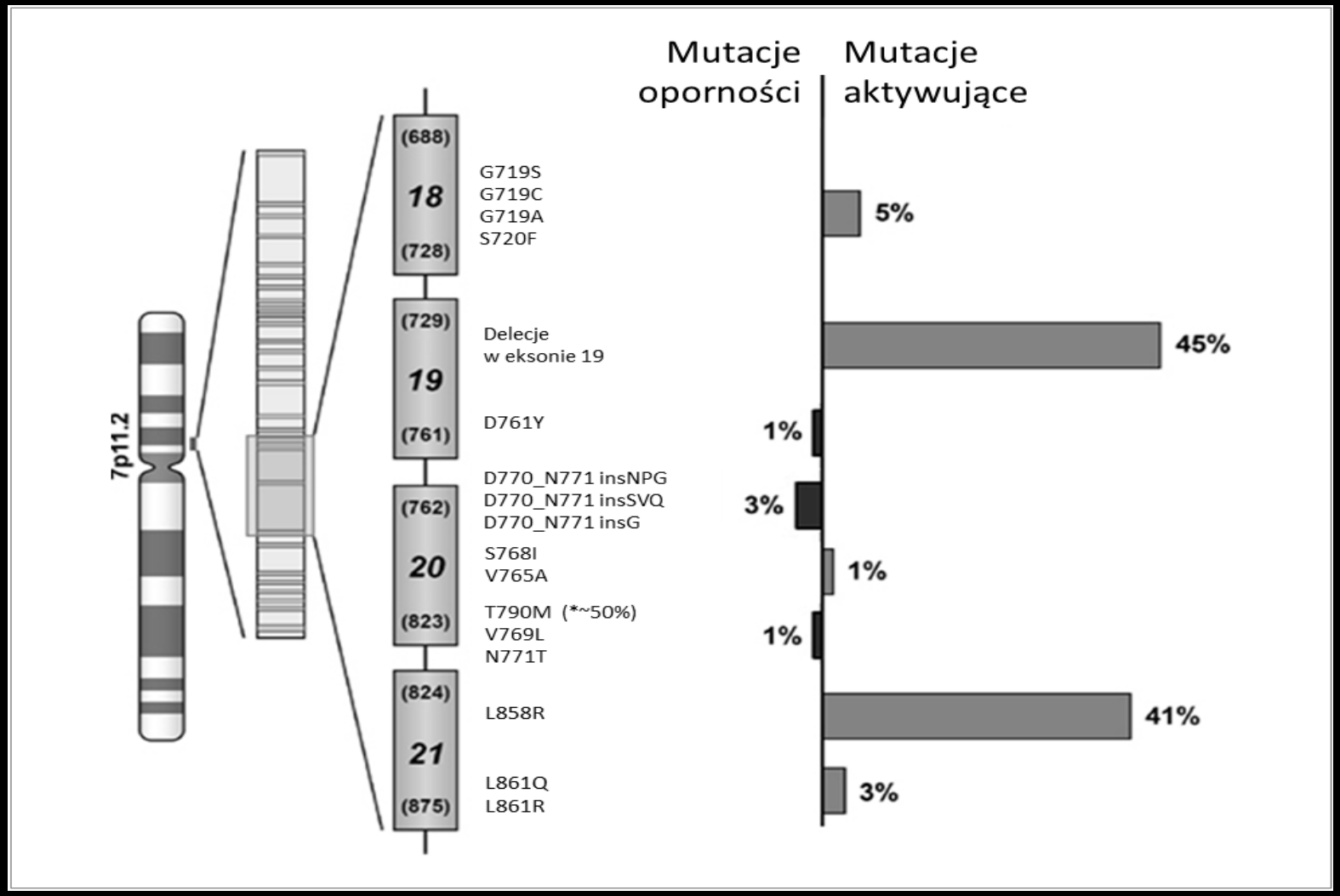


Mutacje aktywujące EGFR

- mutacje „missense” w eksonie 18 and 21
  - Ekson 18 - G719A (4%)
  - Ekson 21 - L858R (40-45%)
- delecje w eksonie 19
  - E746–A750 (45%)

Skronski M i wsp. Pneumonologia i Alergologia Polska 2014 (w druku)

Mutacje oporności



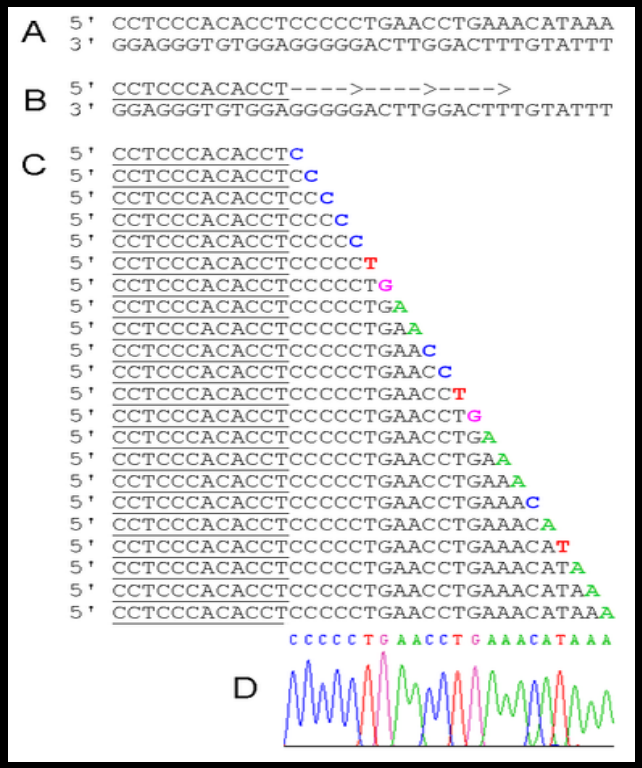
Skronski M i wsp. Pneumonologia i Alergologia Polska 2014 (w druku)

Materiał diagnostyczny

- Materiał resekcyjny
- Materiał biopsyjny
- Materiał parafinowany
- Materiał świeżo mrożony

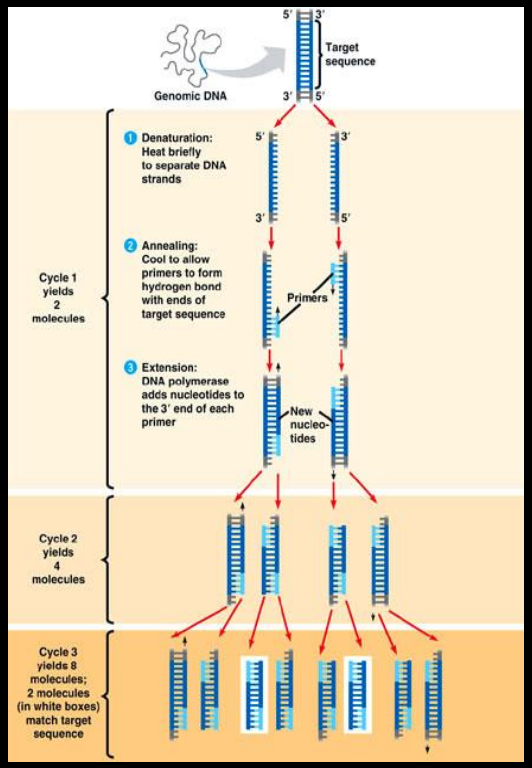
Metody diagnostyczne

Analiza sekwencji DNA



bezpośredni odczyt sekwencji DNA, czyli kolejności zasad G, T, C i A

Real-time PCR + specyficzne sondy



Logarytmiczny przyrost ilości produktu łańcuchowej reakcji polimerazy podczas kolejnych cykli

Sekwencjonowanie

⇧ Wykrywa wszystkie warianty mutacji (rzadkie, nieznane)

⇩ Czasochłonna

⇩ Niższa czułość

⇩ Komórkowość preparatu ≥ 50%

Specyficzne sondy molekularne (real-time PCR)

⇧ Wysoka czułość

⇧ Komórkowość preparatu ≥ 5-20%

⇧ Szybka

⇩ wykrywa określone mutacje

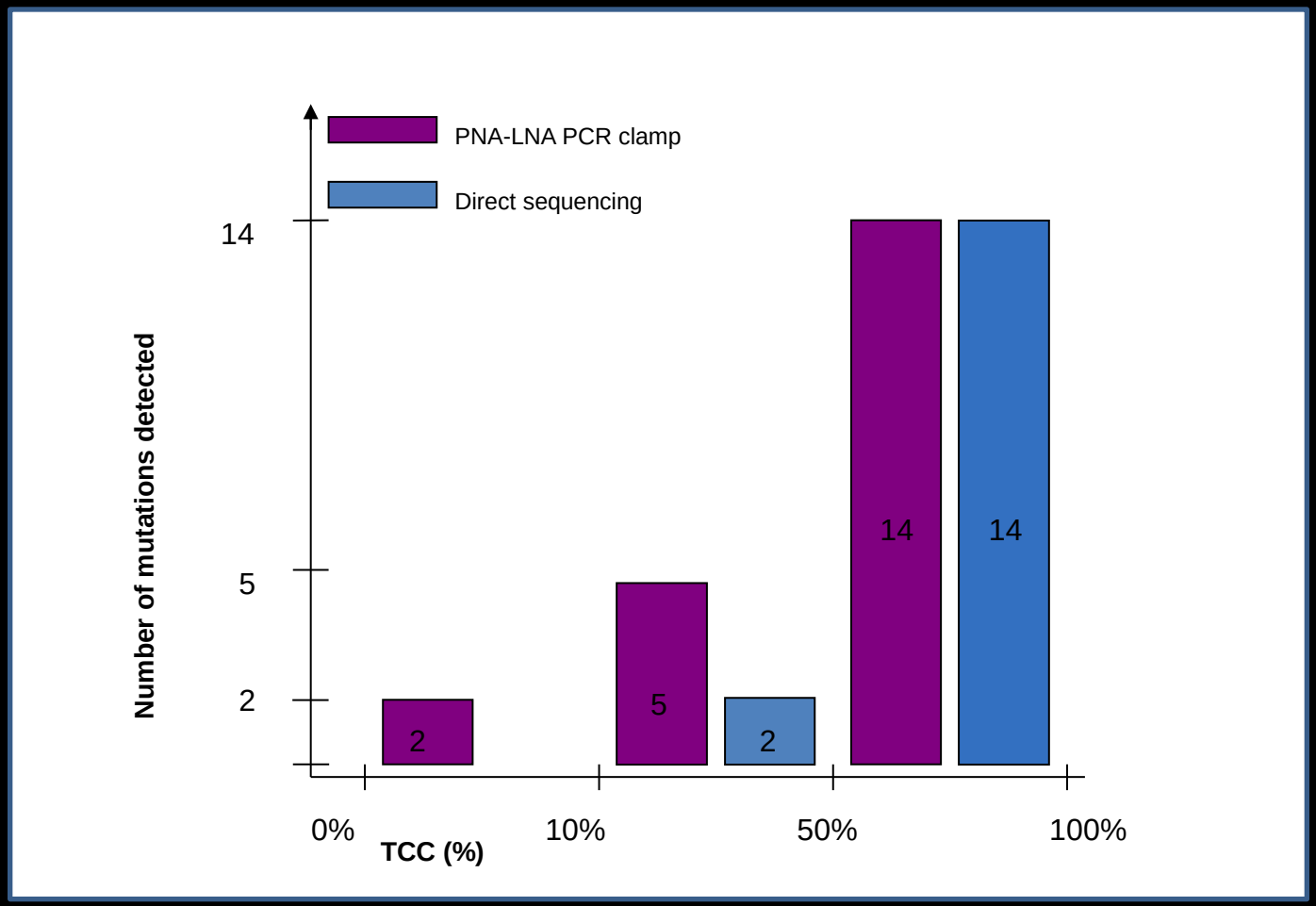
⇩ cena ?

>50%

Technika	Czułoś (% zmutow	Identyfikowane mutacje
Sekwencjonowanie metodą Sangera	max ok. 20%	Znane i nowe
Sondy hydrolizujace (real-time PCR)	5-10%	Tylko znane
pirosekwencjonowanie	5%	Znane i nowe
PCR-SSCP	5%	Znane i nowe
dHPLC	5%	Znane i nowe
PCR-RFLP	5%	Tylko znane
Scorpion ARMS	1%	Tylko znane
PNA-LNA PCR clamp	1%	Tylko znane *

PNA-LNA PCR clamp
Unikalna możliwość bezpośredniego sekwencjonowania produktu reakcji
detekcja znanych i nowych, bądź rzadkich mutacji

Dobór metody diagnostycznej kluczowy dla wiarygodności wyniku



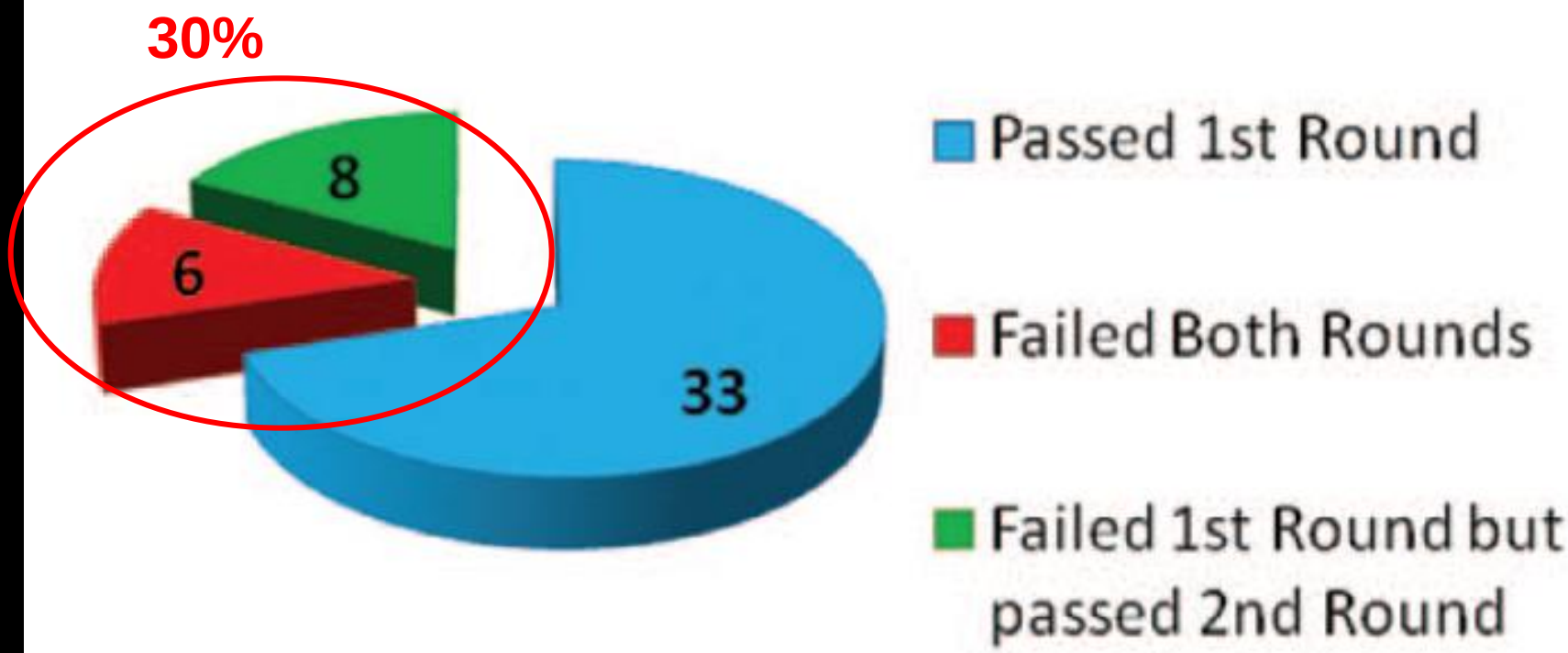
Skroński i wsp 2014 unpublished

Wynik diagnostyczny BADANIA MOLEKULARNEGO

1. Rozpoznanie patomorfologiczne
2. Metoda diagnostyczna
3. Wynik badania molekularnego
4. Komentarz
5. Informacja o certyfikacji laboratorium (EMQN)

Results of the First Italian External Quality Assurance Scheme for Somatic *EGFR* Mutation Testing in Non–Small-Cell Lung Cancer

Nicola Normanno, MD,† Carmine Pinto, MD,‡ GianLuigi Taddei, MD,§ Marcello Gambacorta, MD,‖ Francesca Castiglione, MD,§ Massimo Barberis, MD,¶ Claudio Clemente, MD,# and Antonio Marchetti, MD***



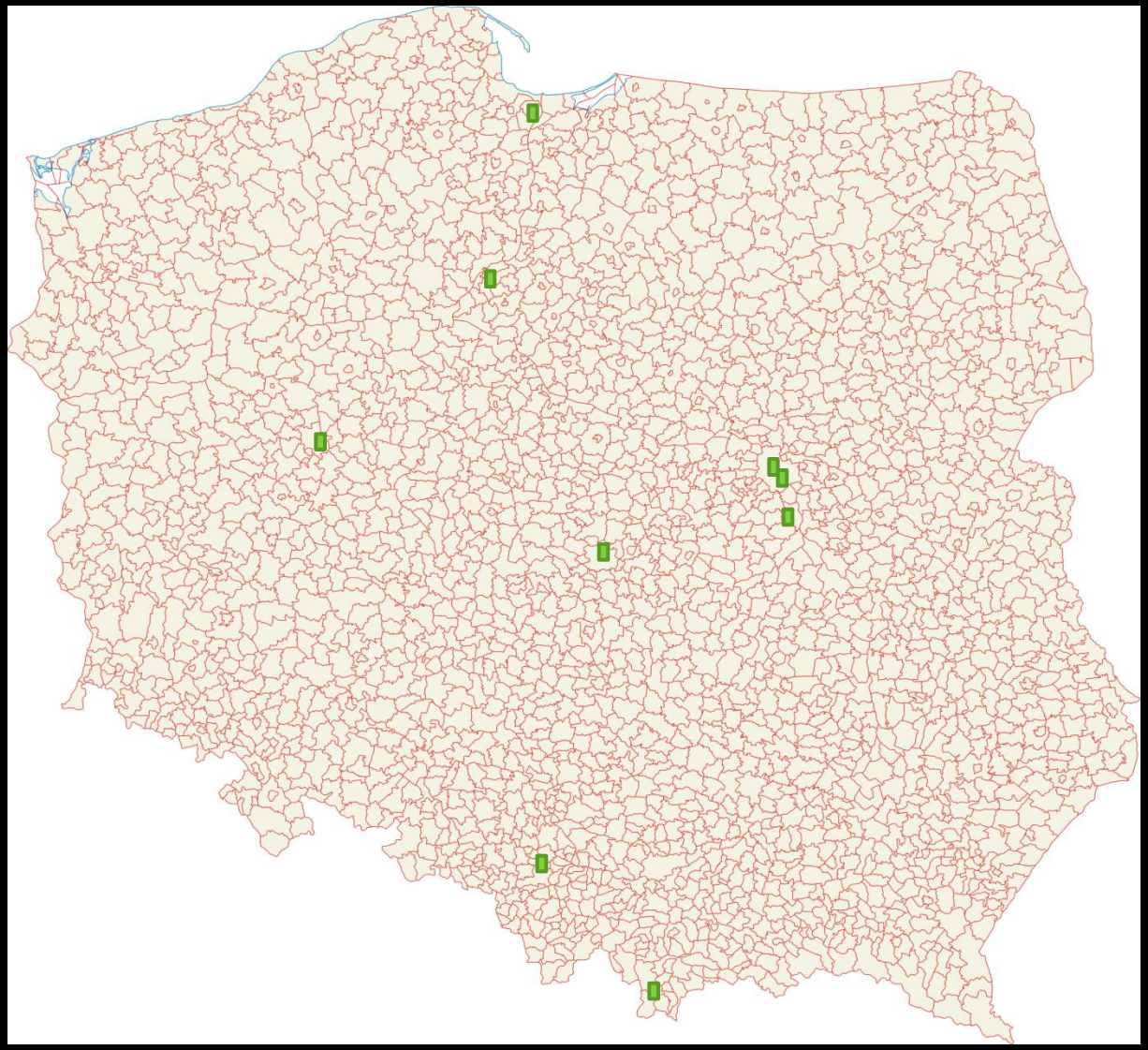
(*J Thorac Oncol.* 2013;8: 773-778)

Andrzej Tysarowski[1], Dariusz Kowalski[2], Oksana Kowalczuk[3], Lech Chyczewski[3], Ewelina Antoszewska[4], Janusz Limon[4], Artur Kowalik[5], Stanisław Góźdź[6], Paweł Krawczyk[7], Łukasz Łaczmański[8], Anna Szumera-Ciećkiewicz[9], Włodzimierz P. Olszewski[9], Maciej Krzakowski[2], Janusz A. Siedlecki[1]

[1]Zakład Biologii Molekularnej, Centrum Onkologii — Instytut w Warszawie
[2]Klinika Nowotworów Płuca i Klatki Piersiowej, Centrum Onkologii — Instytut w Warszawie
[3]Zakład Klinicznej Biologii Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku
[4]Katedra i Zakład Biologii i Genetyki Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku
[5]Pracownia Diagnostyki Molekularnej Świętokrzyskiego Centrum Onkologii w Kielcach
[6]Dział Chemioterapii i Onkologii Klinicznej Świętokrzyskiego Centrum Onkologii w Kielcach
[7]Pracownia Immunologii i Genetyki Katedry i Kliniki Pneumonologii, Onkologii i Alergologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
[8]NZOZ GeneSys we Wrocławiu
[9]Zakład Patologii, Centrum Onkologii — Instytut w Warszawie

Walidacja wybranych ośrodków zaangażowanych w diagnostykę molekularną chorób nowotworowych w zakresie oznaczania mutacji w genie *EGFR1*

Onkologia w Praktyce Klinicznej
2011, tom 7, nr 3, 138–145



Krawczyk P. i wsp 2014 submitted

4 laboratoria diagnostyczne:

- Lublin
- Warszawa
- Gdańsk
- Bydgoszcz

Wykonano 2450 oznaczeń

Obecność mutacji genu EGFR – 9% materiałów

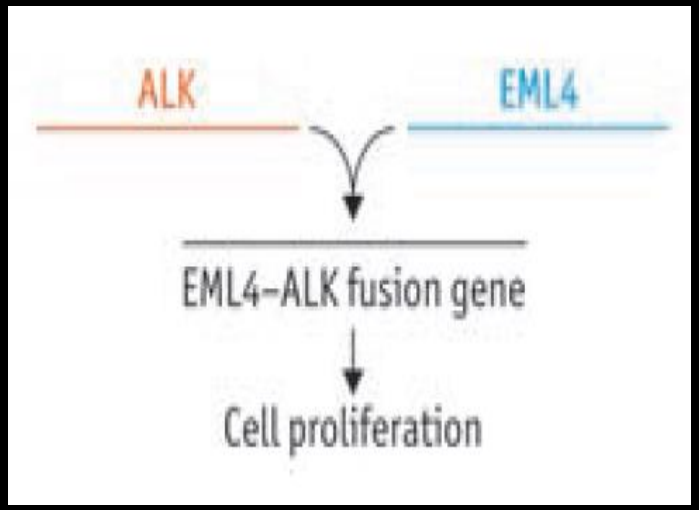
W tym częściej:

- kobiety (13,9%)
- rak gruczołowy płuca (10%)

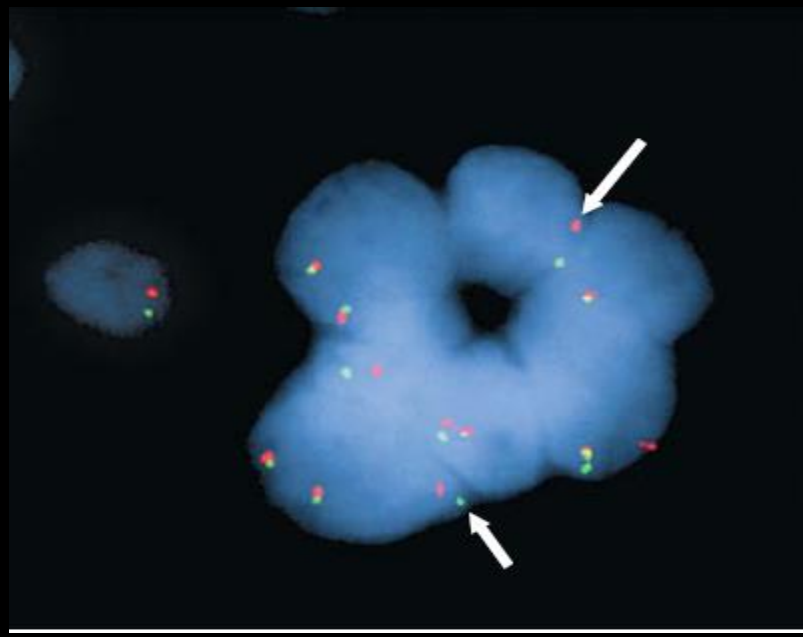
Krawczyk P. i wsp 2014 submitted

REARANŻACJE GENU ALK

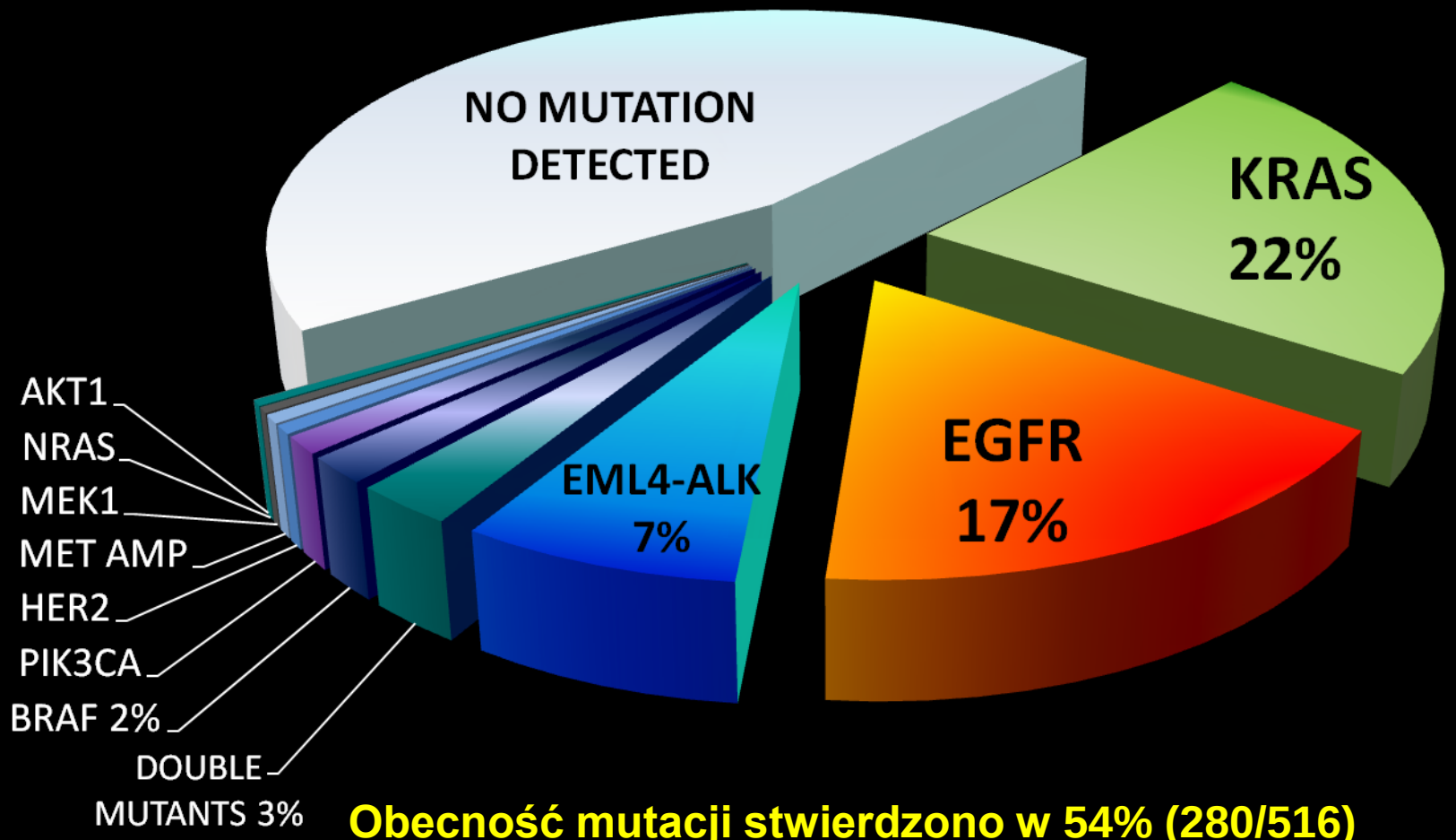
- Rak gruczołowy płuca (1,6-13%),
- zwykle 3-7%
- Osoby bez wywiadu palenia
- Częściej rak gruczołowy płuca o typie zrazikowym lub z komórek sygnetowatych
- rearanżacja wykluczająca z mutacjami aktywującymi genu EGFR



<u>Metoda diagnostyczna:</u>
FISH – fluorescencyjna hybrydyzacja in situ

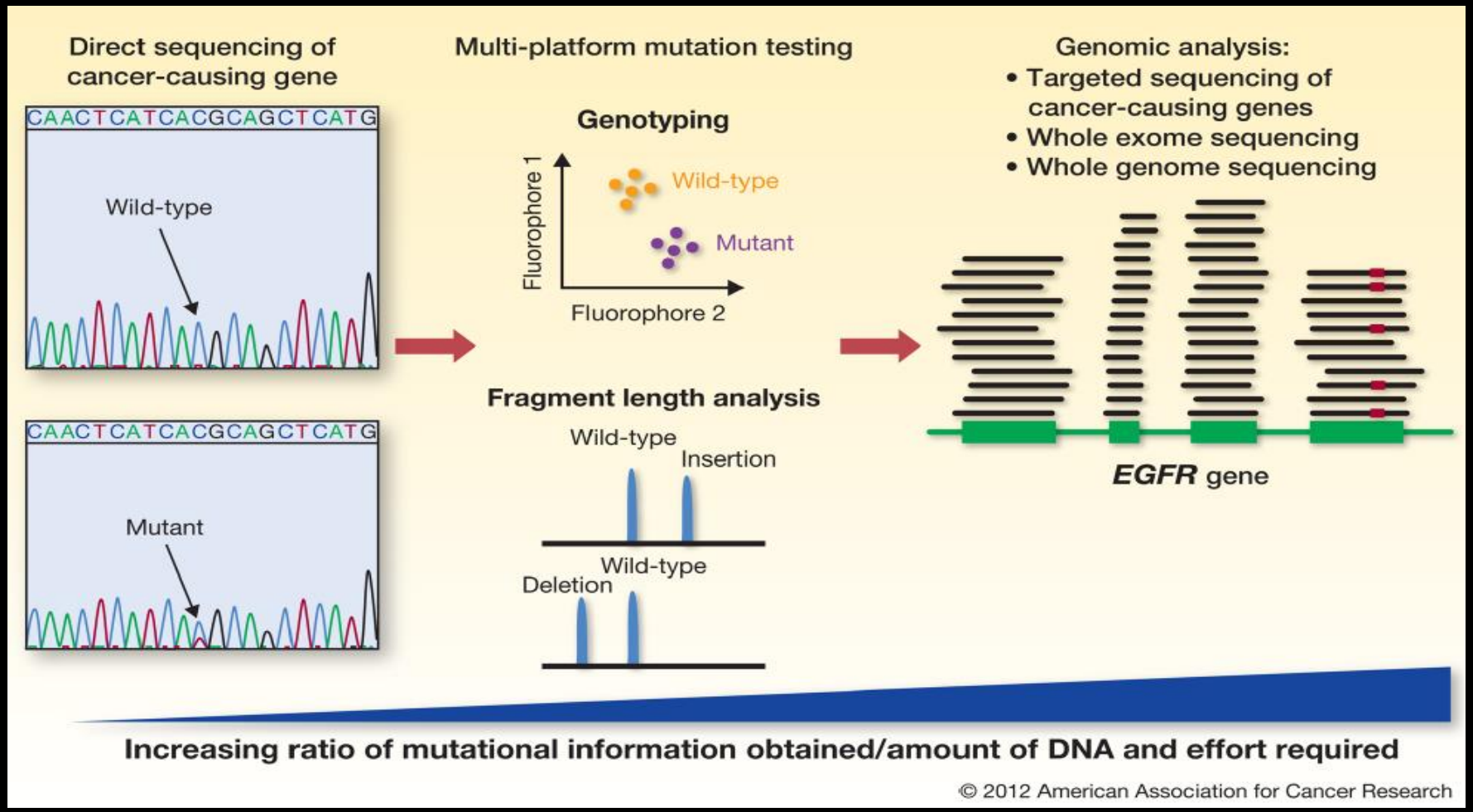


Lung Cancer Mutation Consortium



Obecność mutacji stwierdzono w 54% (280/516) badanych materiałów (CI 50-59%)

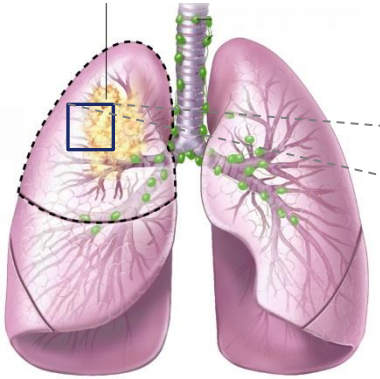
Kris M. ASCO 2011

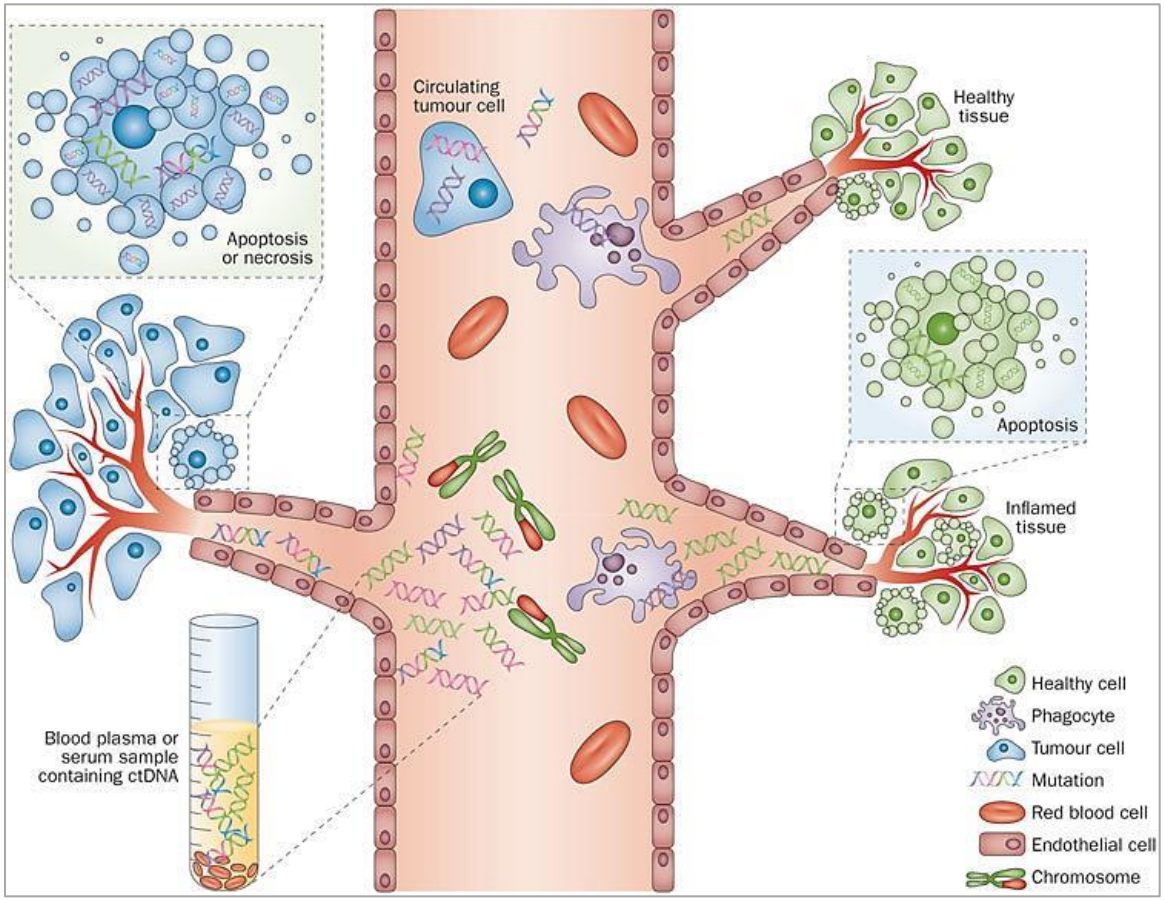


© 2012 American Association for Cancer Research

„Płynna Biopsja” *(liquid biopsy)*

Genetyczne i epigenetyczne markery raka płuca są obecne we krwi obwodowej





1. Wczesne diagnozowanie
   - Metylacja DNA
   - Niestabilność mikrosatelitarna
   - Integralność
   - MikroRNA
2. Markery predykcyjne
   - Mutacje *EGFR*
   - Metylacja DNA
3. Prognozowanie
   - Mutacje *KRAS*
   - mikroRNA
4. Monitorowanie sktuczeności leczenia
   - Mutacje oporności na TKI (T790M)
   - Metylacja DNA

Nature Reviews Clinical Oncology 2013