

# Genomikai vizsgálatok jelentősége a daganatterápiában

Csuka Orsolya

Országos Onkológiai Intézet

Pathogenetikai Osztály

Budapest 2011. április

norwegian financial mechanism

norway  
grants 

# Integrált kliniko-genomikai modell kialakítása a daganatos betegek személyre szabott orvoslására

## 1. Molekuláris staging

Daganat progresszió

## 2. Primér tumorok genomikai mintázata

Mutáció és génexpresszió

Prognózis, új terápiás targetek

## 3. A daganat farmako-genomikai jellemzése

Individualizált terápiás protokoll

# Mikrometasztázisok kimutatásának stratégiája



mRNS

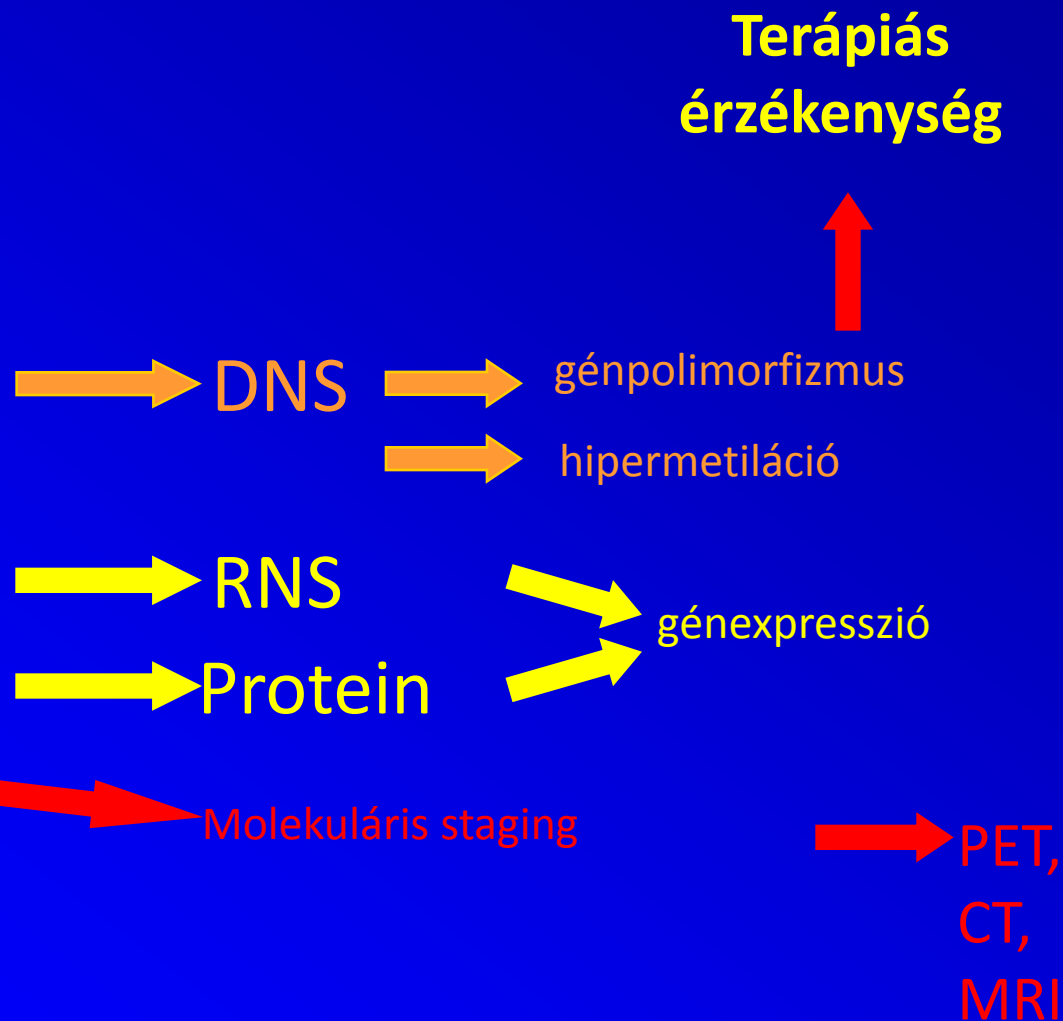
- Epithel eredet  
citokeratin RT-PCR
- Tumorspecifikus  
markerek RT-PCR  
CEA



DNS  
károsodások

1. Primer tumorok  
genetikai  
károsodásának  
jelemzése  
p53, K-ras, APC
2. Mikrometasztázisok  
azonosítása DNS  
károsodás alapján

# Keringő daganatsejtek izolálása

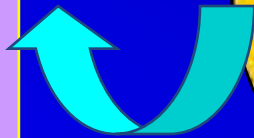


**Keringő  
daganat  
sejtek**

**Hiper-  
metiláció  
vizsgálata**

**Szérum  
DNS**

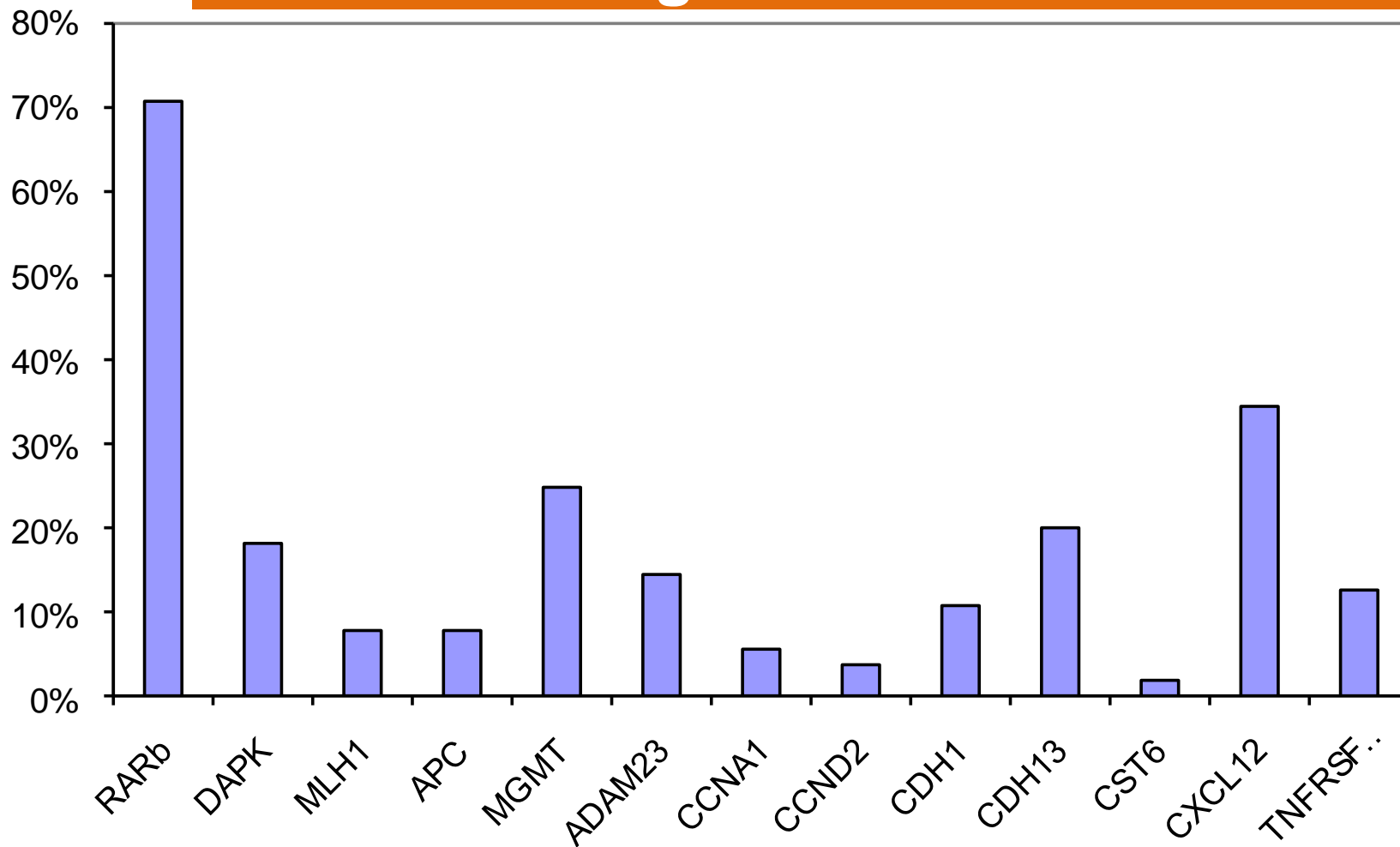
**Primer  
tumor**



# Hipermetilált gének fej-nyak daganatokban

	Funkció
ADAM23	Sejt adhézió, migráció
APC	Sejt adhézió
CCNA1	Sejt ciklus
CCND2	Sejt ciklus
CDH1	Sejt adhézió, invázió
CDH13	Sejt adhézió, invázió
CST6	Proteáz inhibitor, invázió
CXCL12	Limfocita aktiválás
DAPK	Apoptózis
MGMT	DNS-repair
RAR $\beta$ 2	Transzkripció szabályozás, növekedés, differenciálódás
TNFRSF10D	Apoptózis

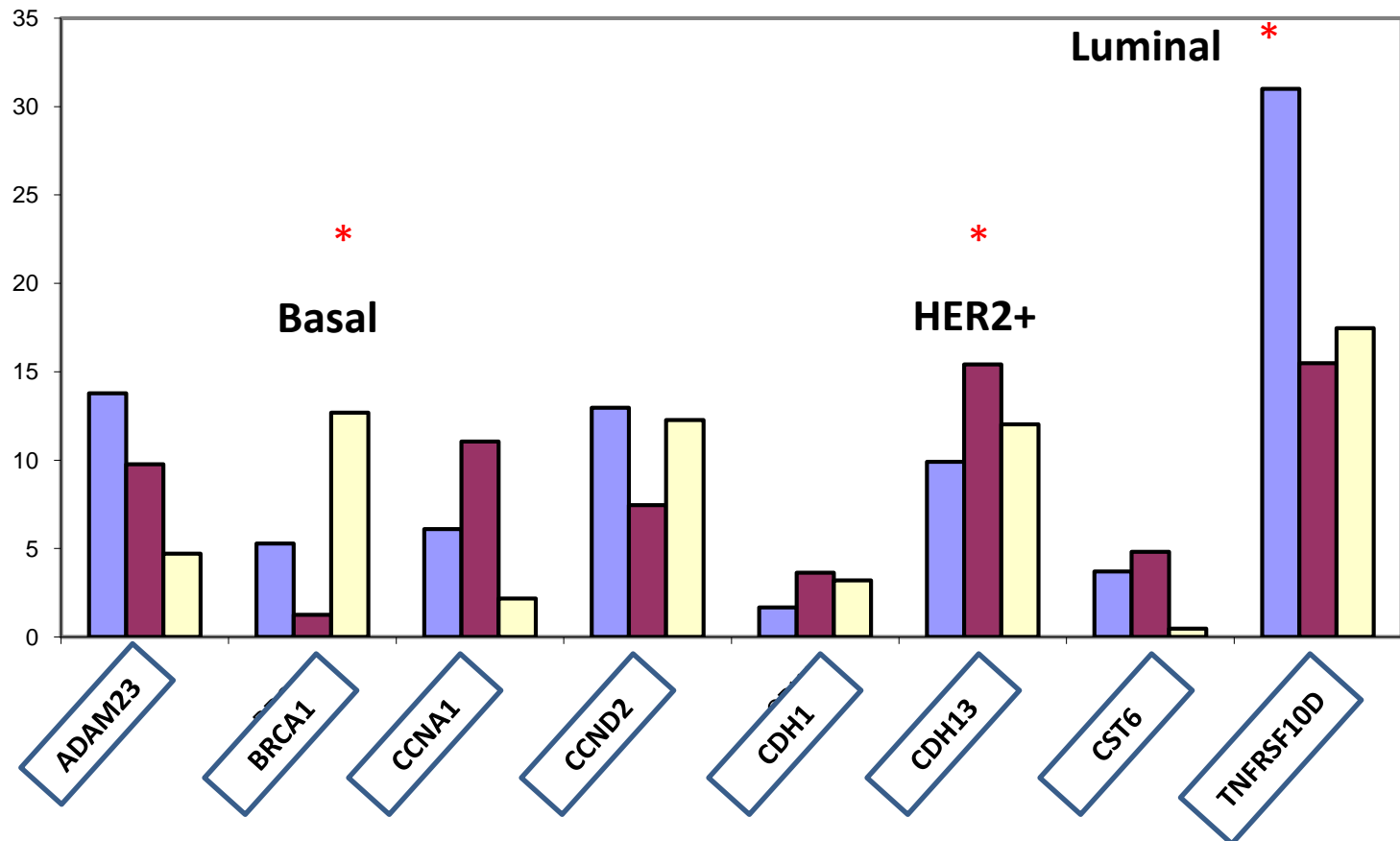
# Hipermetilált gének fej-nyak daganatokban



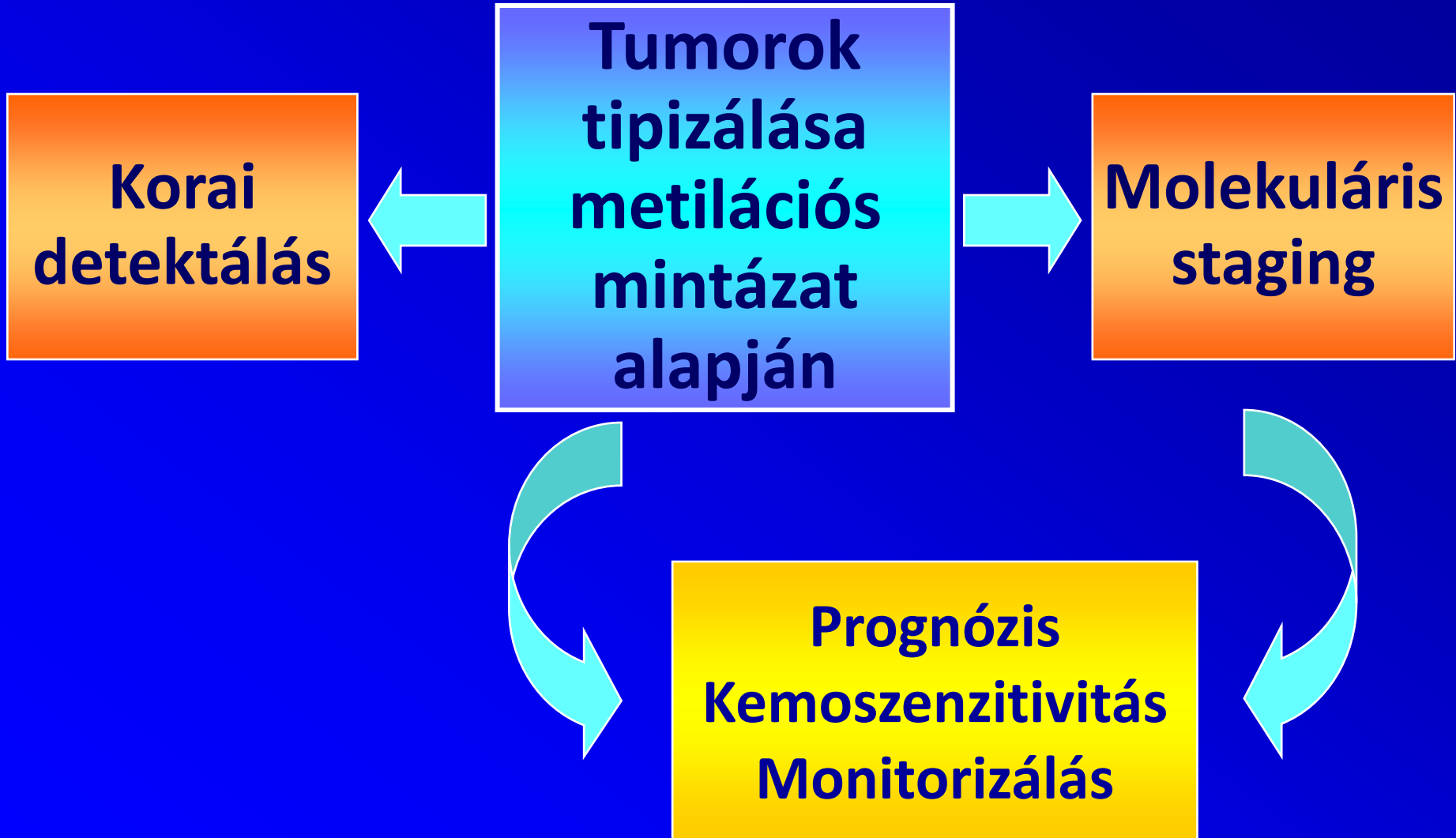
# Hipermetilált gének az emlő daganatok molekuláris altípusaiban

Emlő cc altípusok	Funkció
<b>Luminális A</b>	
ADAM23	Sejt adhézió, migráció
CCND2	Sejt ciklus
TNFRSF10D	Apoptózis
<b>HER2+</b>	
CCNA1	Sejt ciklus
CDH1	Sejt adhézió, invázió
CDH13	Sejt adhézió, invázió
CST6	Proteáz gátló, invázió
<b>Bazális</b>	
BRCA1	Sejt ciklus, DNS repair, Apoptózis
CCND2	Sejt ciklus

# Emlő daganatok metilációs vizsgálata



# Epigenetikus marker vizsgálatok jelentősége





**Molekuláris módszerek  
alkalmazása a  
daganatterápiában**

**Rezisztencia  
faktorok  
vizsgálata**

**Molekuláris  
staging**

**Gén  
polimorfizmusok  
vizsgálata**

**Terápiás  
target  
azonosítása**

# Terápiás érzékenység predikciója fej-nyak daganatokban

Daganat-  
ellenes szer

Polimorfizmus

5 FU

- Timidilát szintáz
- MTHR
- Dihidropirimidin dehidrognáz (DPD)

Taxán

- MDR1 polimorfizmus
- EGFR, HER2 státusz

Platinum  
származékok

- DNS repair gének (XPD, XRCC1)

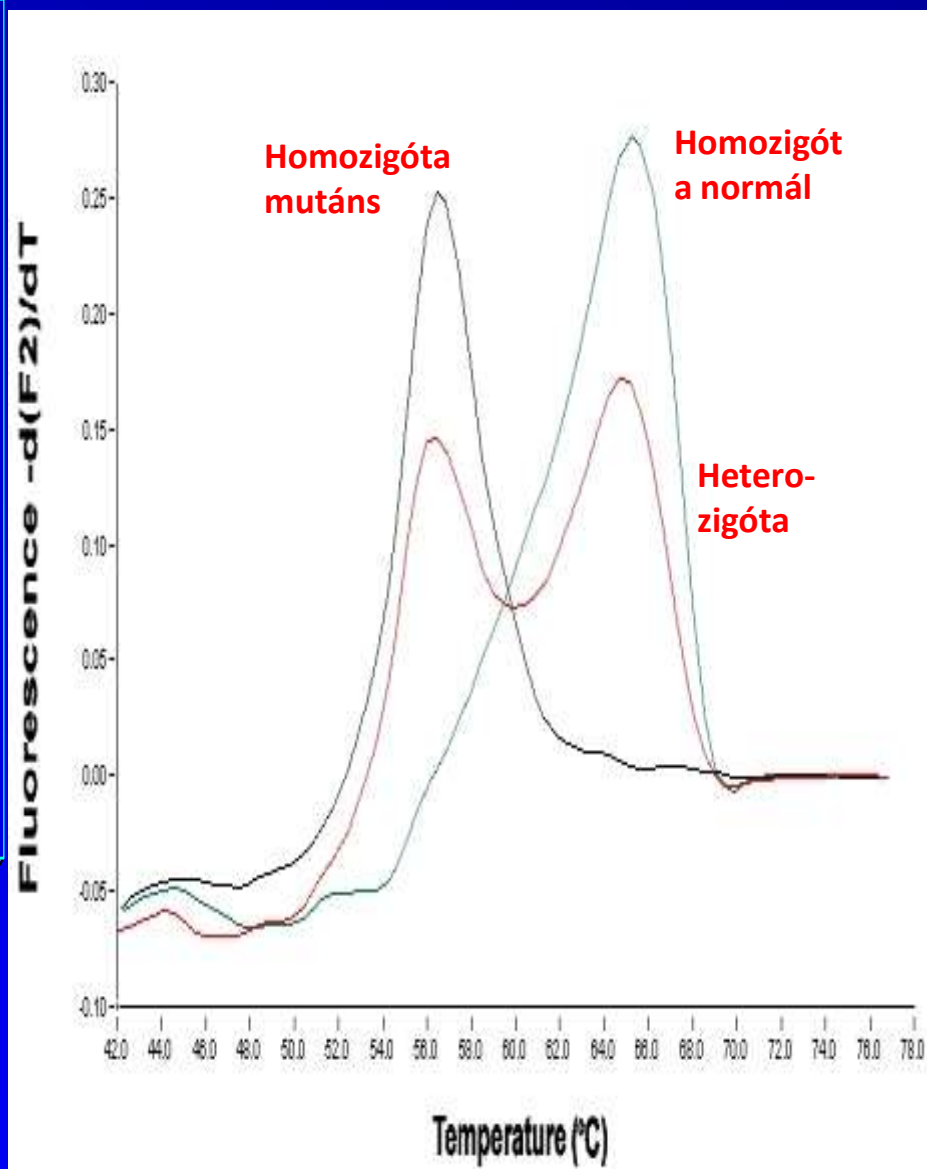
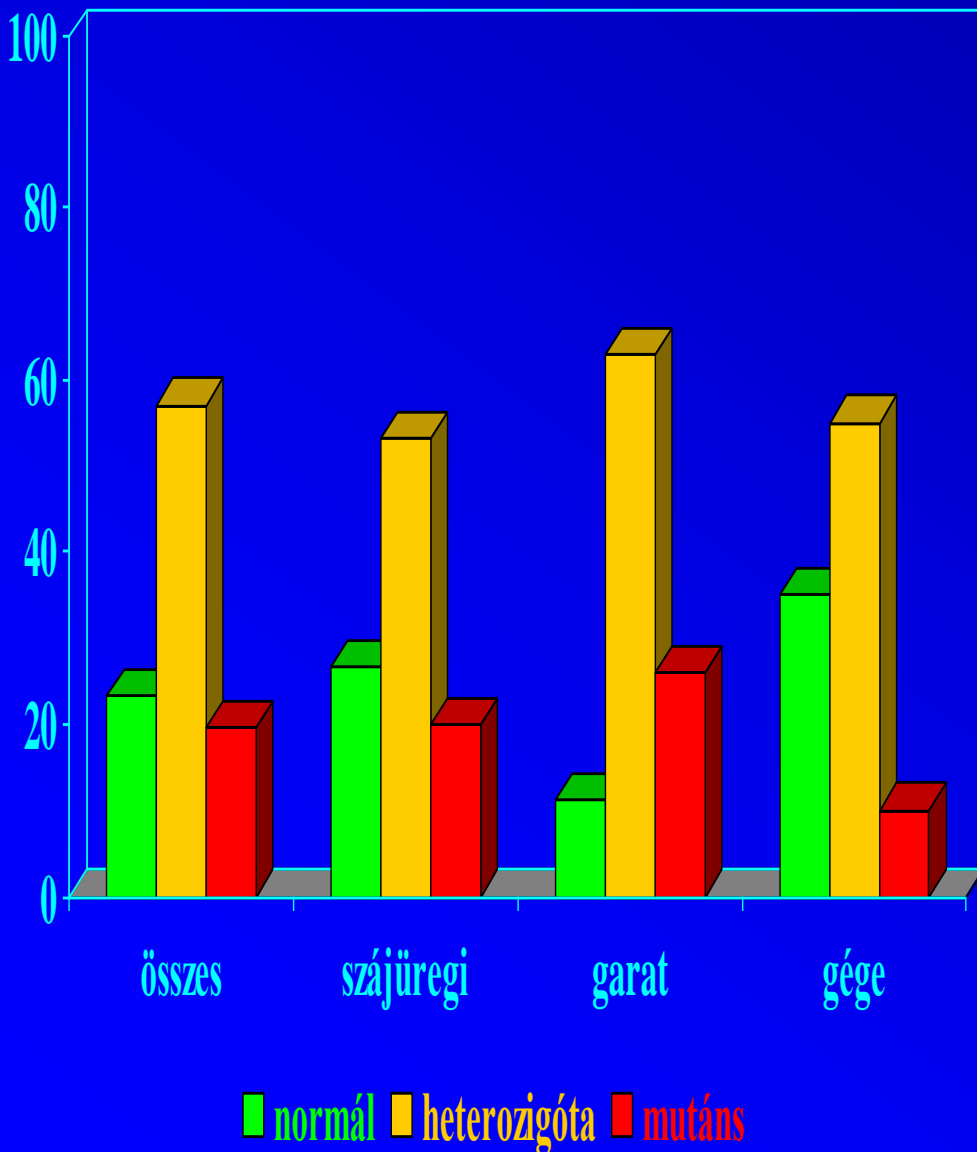
EGFR inhibitorok  
Cetuximab

- EGFR (intron 1) polimorfizmus
- EGFR (intron 1CA repeat)

# Fej-nyak daganatok farmakogenomikai vizsgálata

- 1. DNA repair enzim polimorfizmus vizsgálata**  
XPD cd 312, XRCC1 cd 399  
n = 152
- 2. Taxan érzékenység vizsgálata**  
MDR1 polimorfizmus  
n = 90
- 3. Célzott terápia tirozin kináz gátlók vizsgálata:**  
DNS chip, EGFR polimorfizmus vizsgálata  
n = 90

# XPD cd312 polimorfizmus genotípus megoszlása lokalizációnként

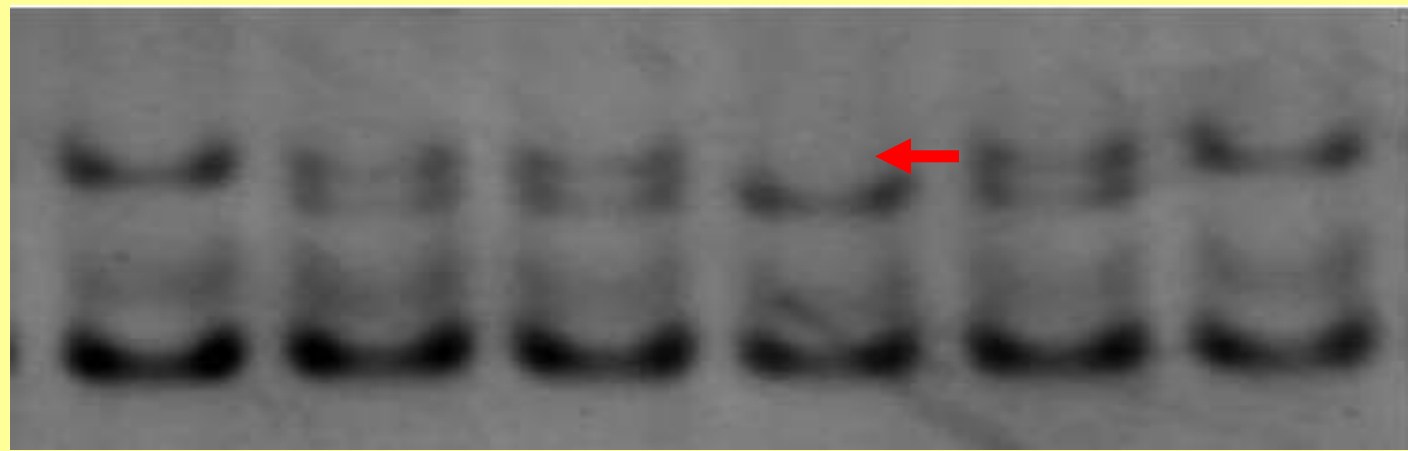


# Taxán rezisztencia markerek vizsgálata fej-nyak daganatokban

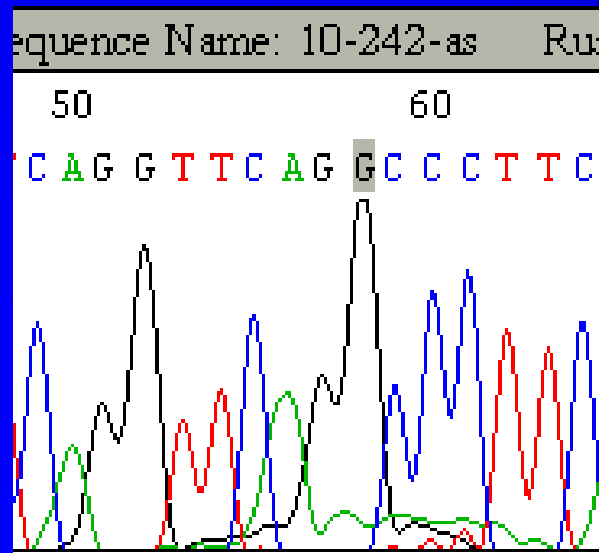
1. MDR 1 polimorfizmus (27%)
2. MRP1, MRP2 O.E. (35%)
3. HER2 O.E. (32%)
4. HER2, EGFR O.E. (28%)

# ABCB1/MDR1 exon12 C1236T polimorfizmus SSCP analízise

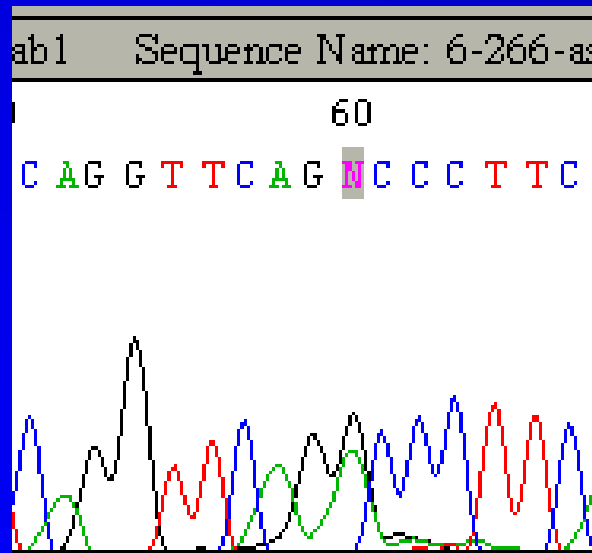
**N**      **H**      **H**      **M**      **H**      **N**



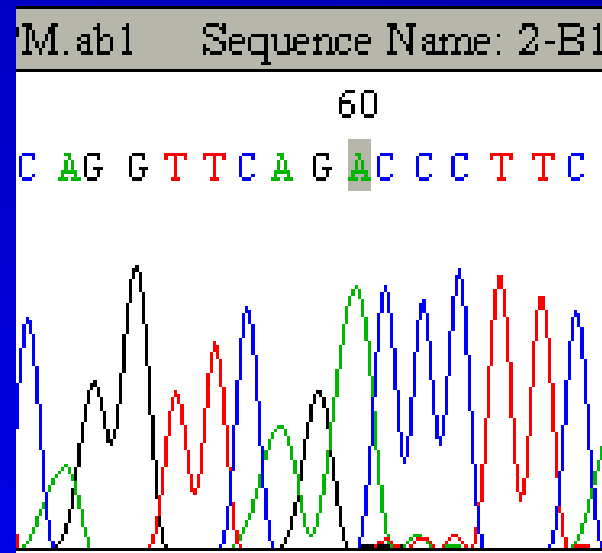
**N:** normál  
homozigóta  
**H:** heterozigóta  
**M:** mutáns  
homozigóta



**normál homozigóta**



**heterozigóta**



**mutáns homozigóta**

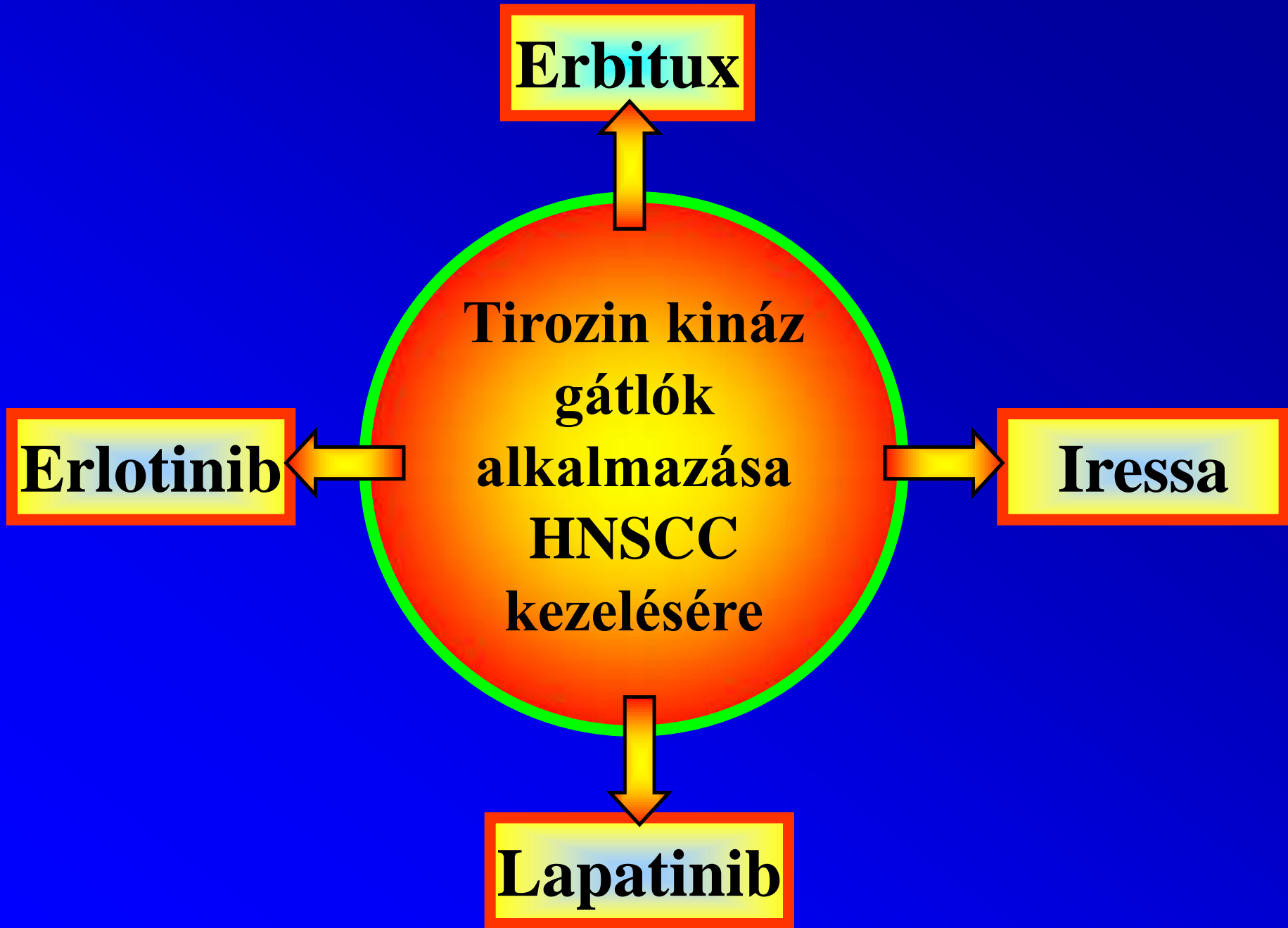
**Erbitux**

**Tirozin kináz  
gátlók  
alkalmazása  
HNSCC  
kezelésére**

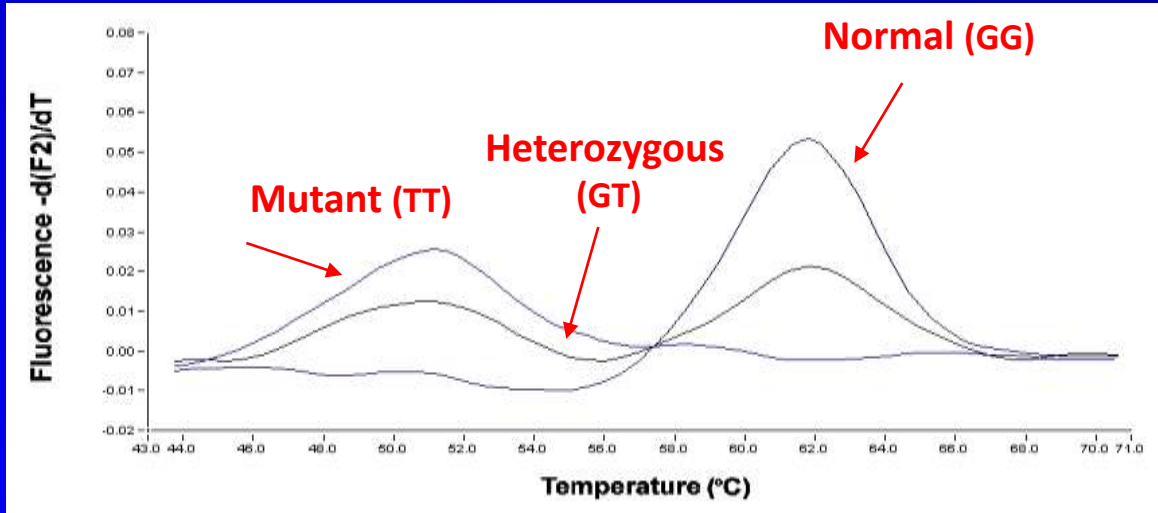
**Erlotinib**

**Iressa**

**Lapatinib**



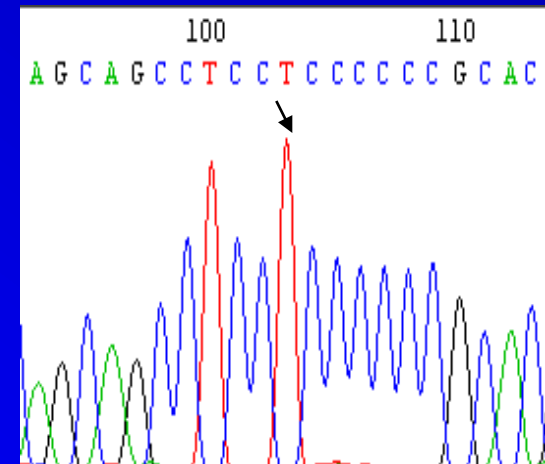
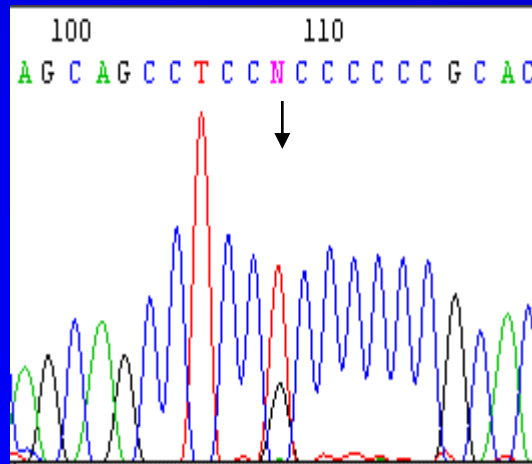
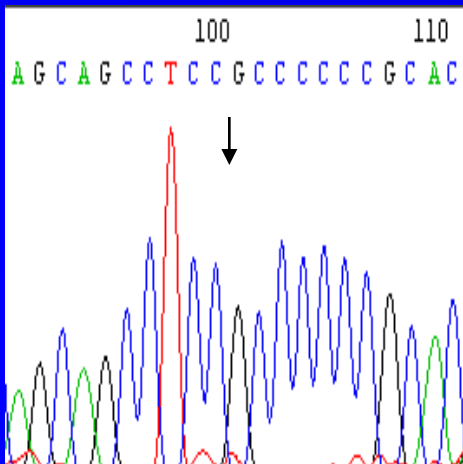
# EGFR G-216T polymorphism



N

H

M

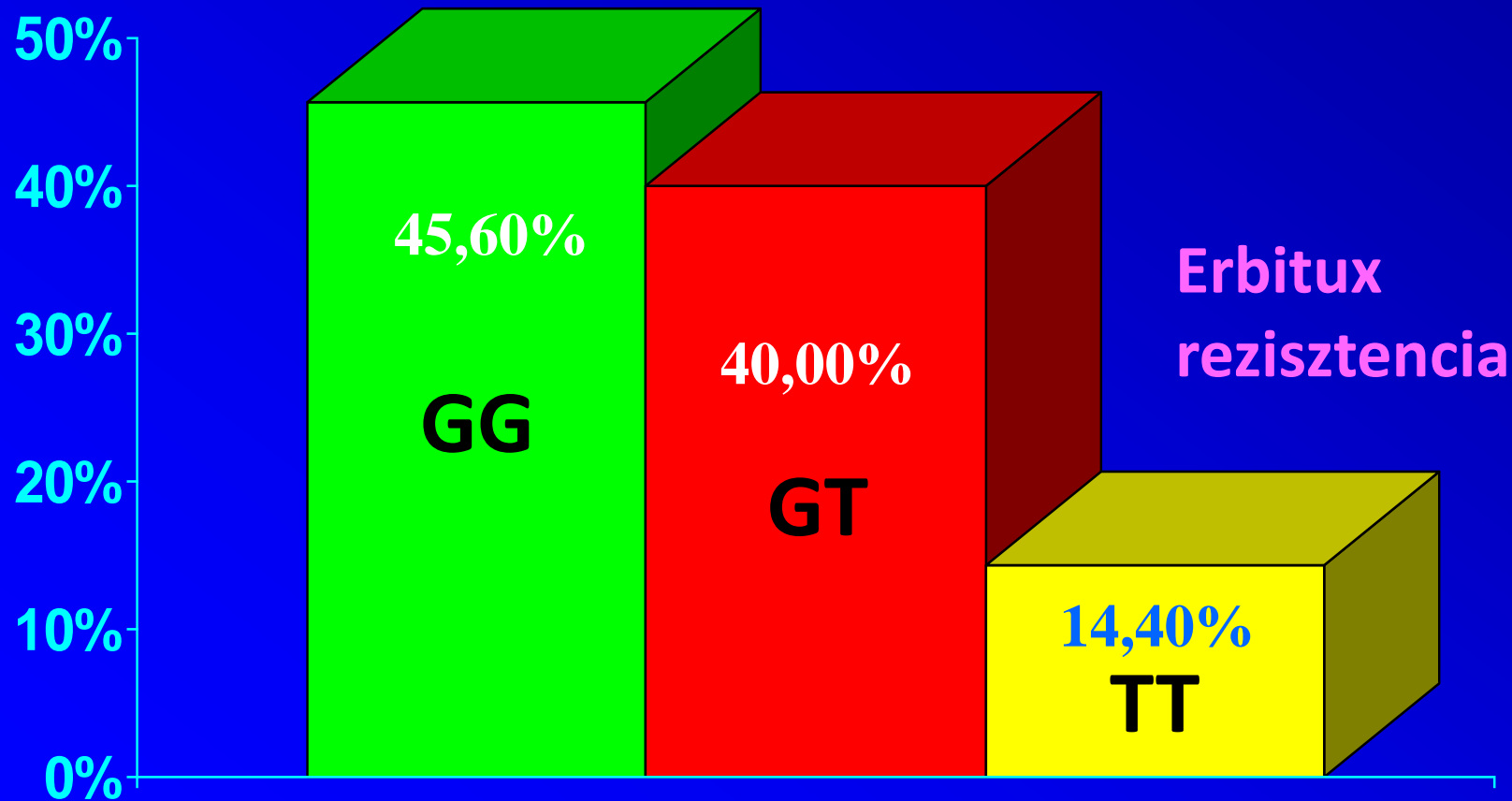


# EGFR G-216T génpolimorfizmus fej-nyak daganatokban

Normal

Heterozigóta

Mutáns

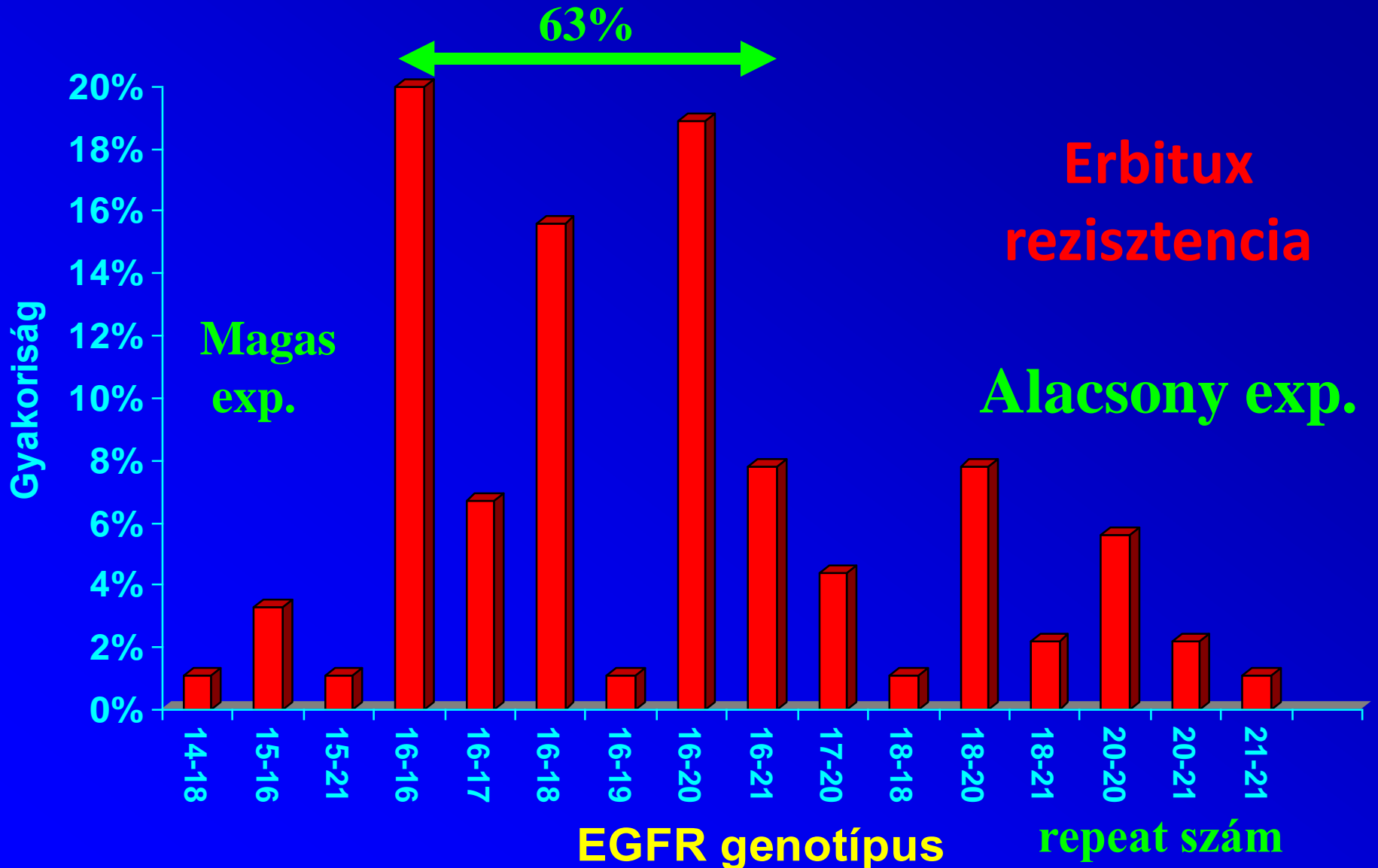


Erbix  
rezisztencia

EGFR genotípus

n=152

# EGFR intron 1 (CA repeat) genotípus fej-nyak daganatokban



# Gén polimorfizmusok vizsgálata fej-nyak daganatokban

- 1. Terápiás érzékenységet jelző  
génpolimorfizmusok (XRCC1, XRCC3, XPD)  
gyakorisága eltérő a daganat lokalizációja  
szerint. Eltérő CisPt érzékenység?**
- 2. EGFR intron 1 alacsony  
CA repeat száma magas expresszióval társul  
(terápiásérzékenység predikciója)**
- 3. Taxán rezisztencia predikciója MDR1 polimorfizmus  
alapján**

# Molekuláris vizsgálatok jelentősége terápiás terv kialakításában

**1. Molekuláris staging**

**2. Primer tumorok molekuláris tipizálása**

**3. Rizikócsoportok kialakítása**

**4. Rezisztencia faktorok felderítése**

**5. Terápiás target jellemzése**

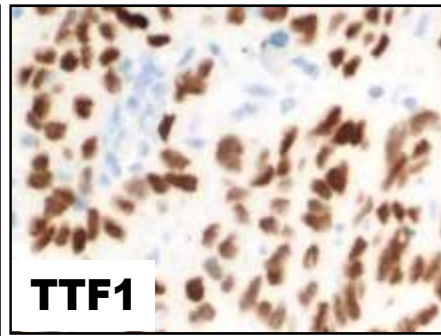
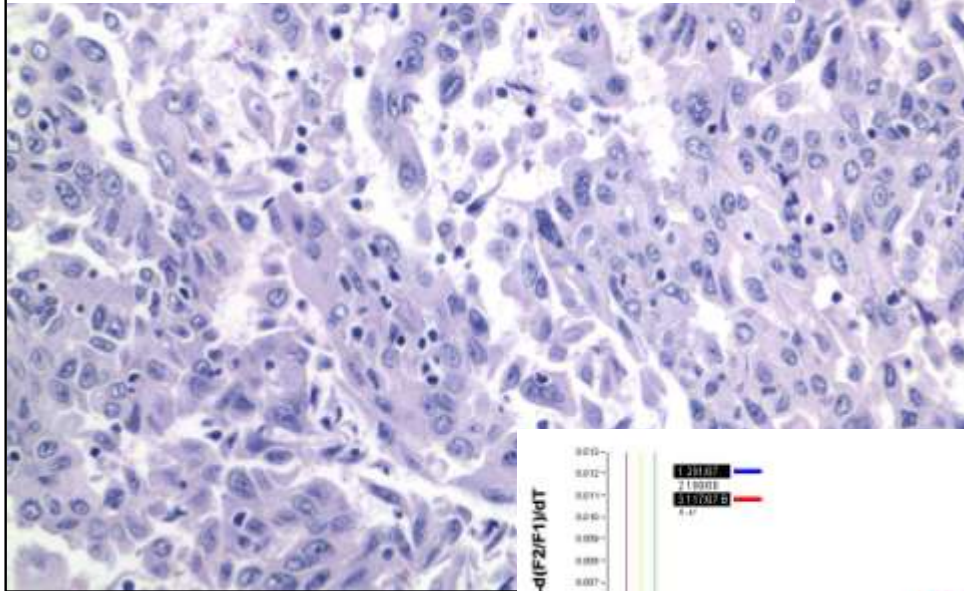
# Terápiás target jellemzése

**1. Mutációs spektrum meghatározás**

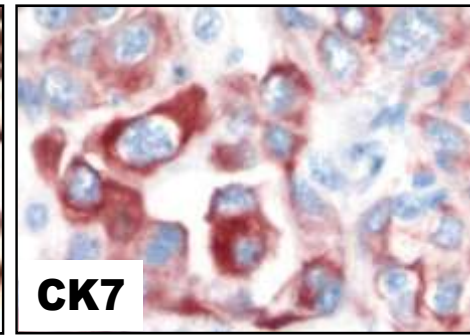
**2. Allél vesztés (LOH) vizsgálata**

**3. Epigenetikus inaktiválás, metilációs mintázat**

# Tüdő cc. EGFR és K-ras mutáció



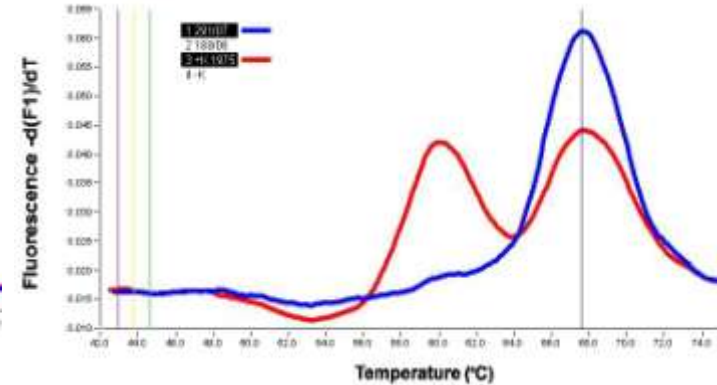
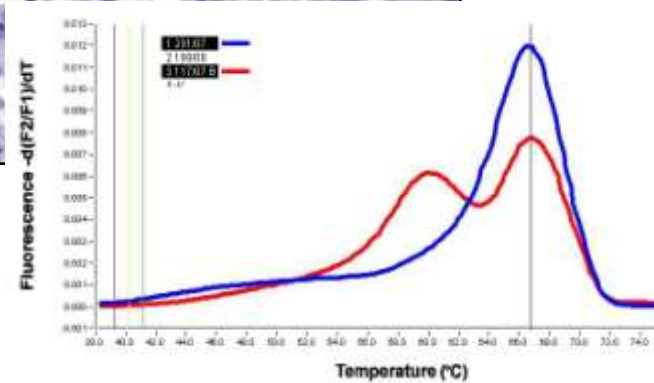
**TTF1**



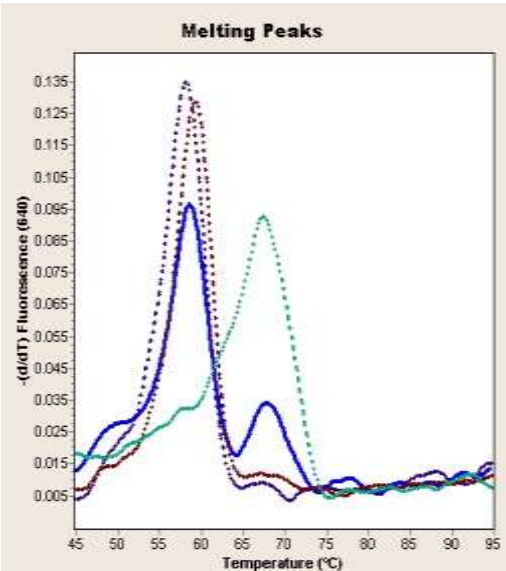
**CK7**

**EGFR e19 wt**

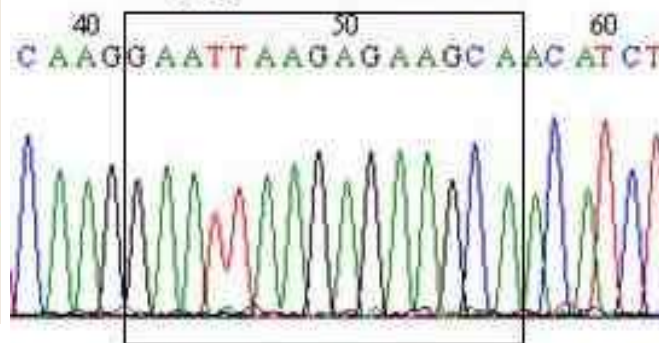
**EGFR e21 wt**



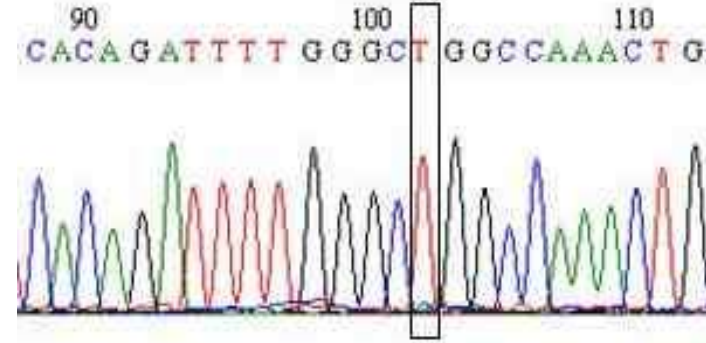
## KRAS e2 mut



46. - 50. codon  
Leggyakoribb deletio



L858R  
G



# Tüdő adenocarcinoma

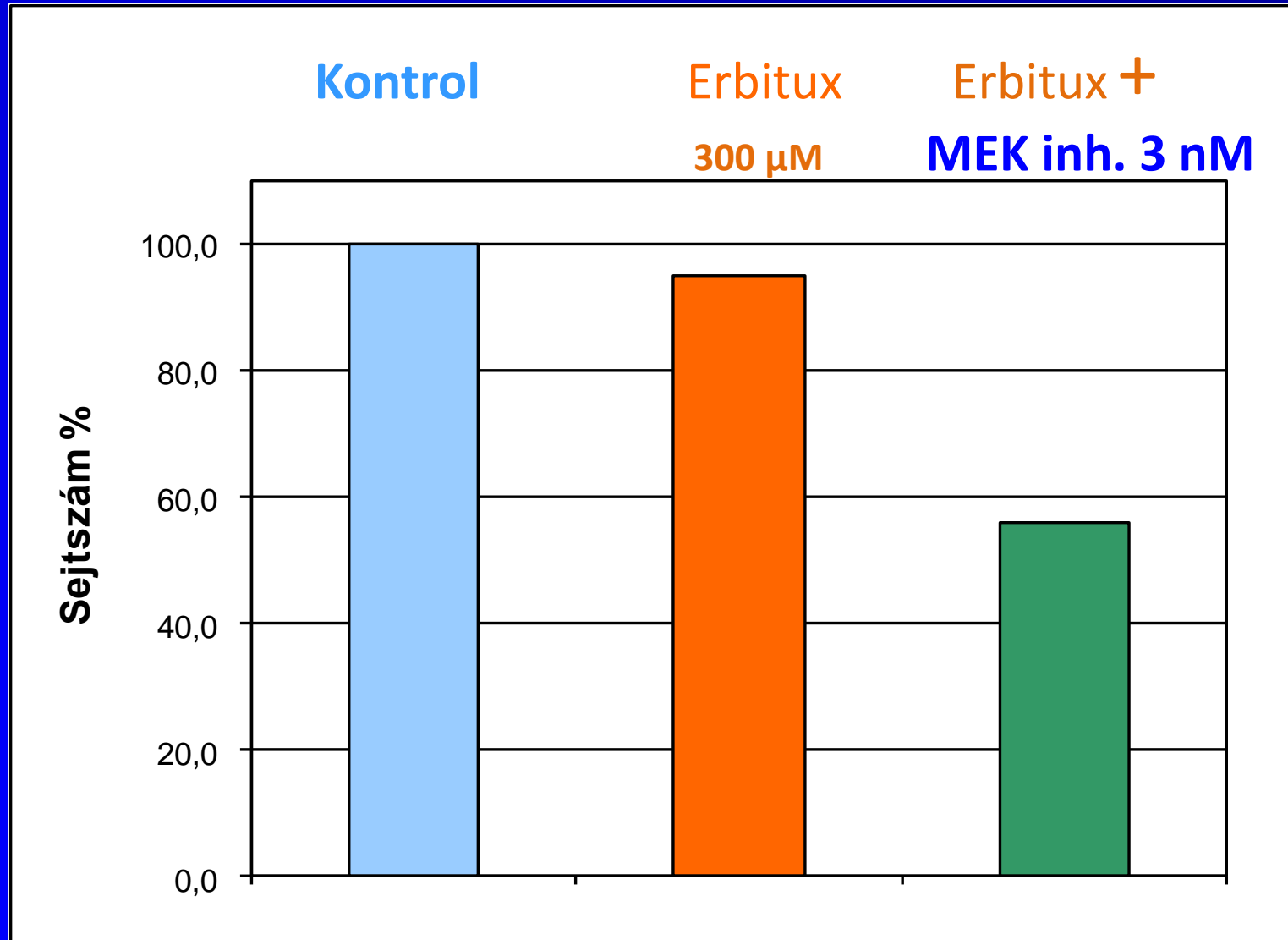
## K-ras és EGFR mutáció vizsgálata

Mutáció	Gyakoriság
EGFR e19 del	12/92 (13%)
EGFR e21 L858R	4/64 (6.3%)
KRAS e2 mut. Tarceva resist.	22/77 (28.6%)
KRAS e2 + EGFR e19 mut	0/77 (0%)
KRAS e2 + EGFR e21 mut	2/55 (3.6%)

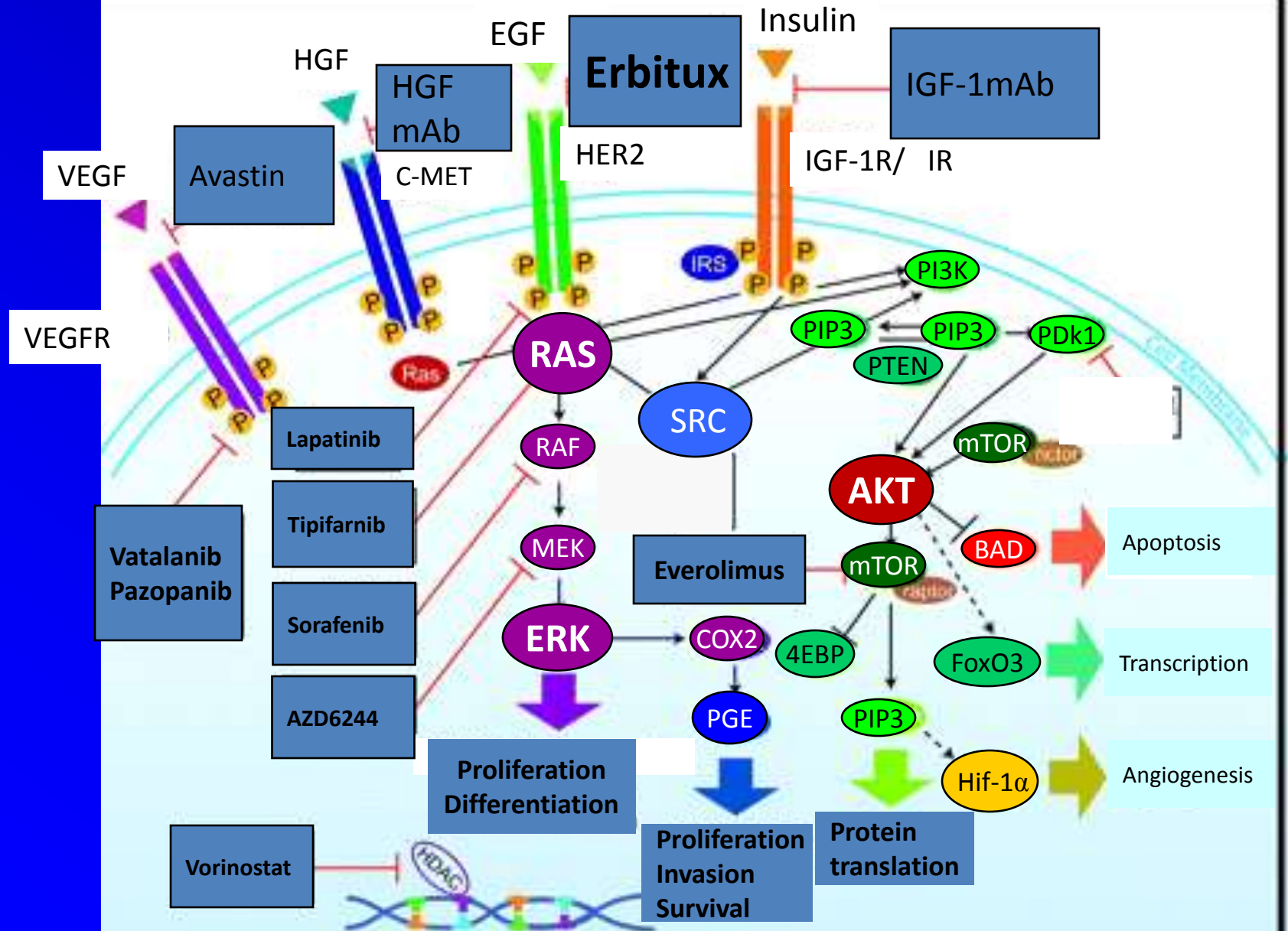
N=250



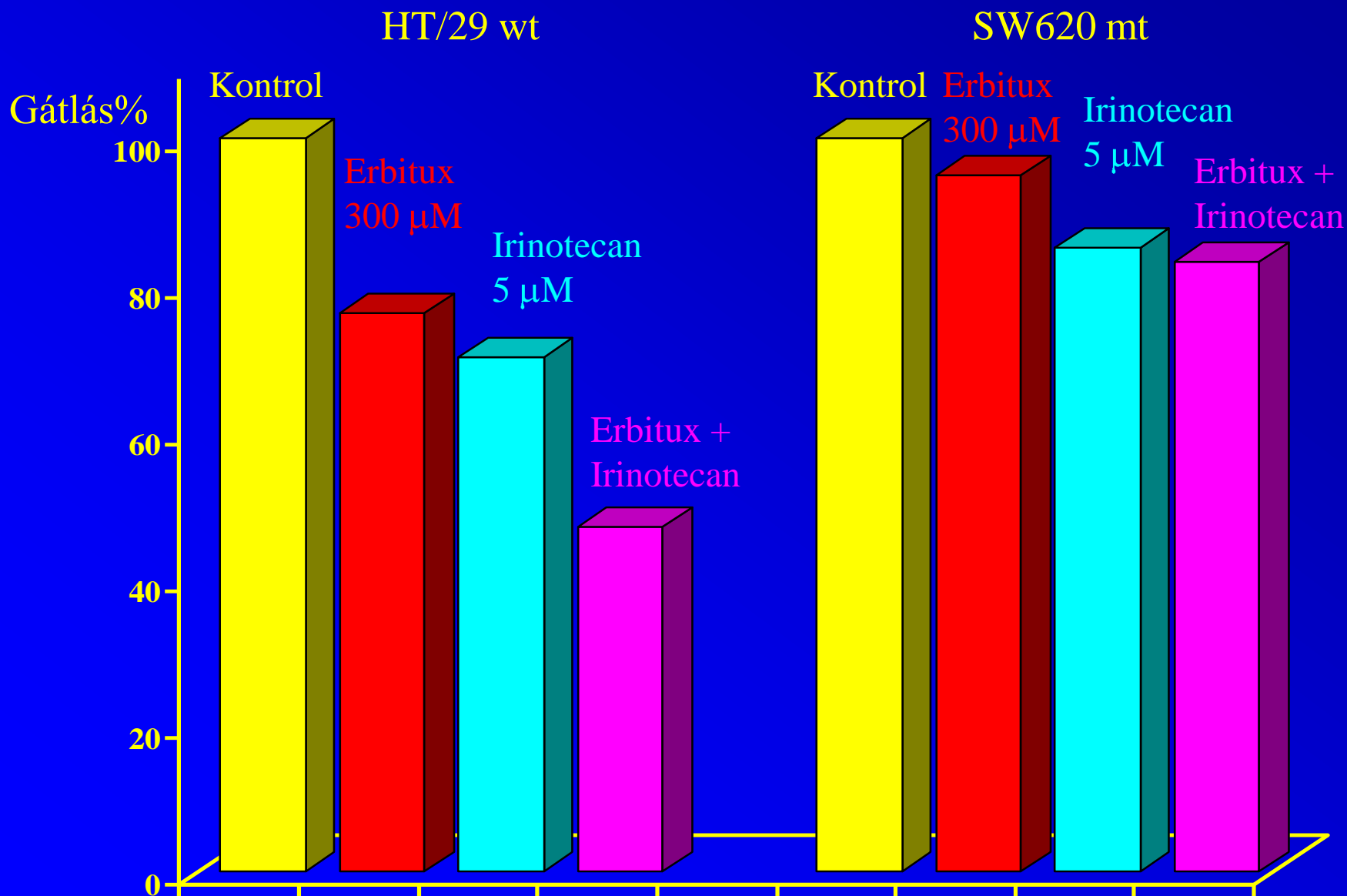
# A549 (mut K-ras) kezelése MEK ½ inhibitorral (Calbiochem)



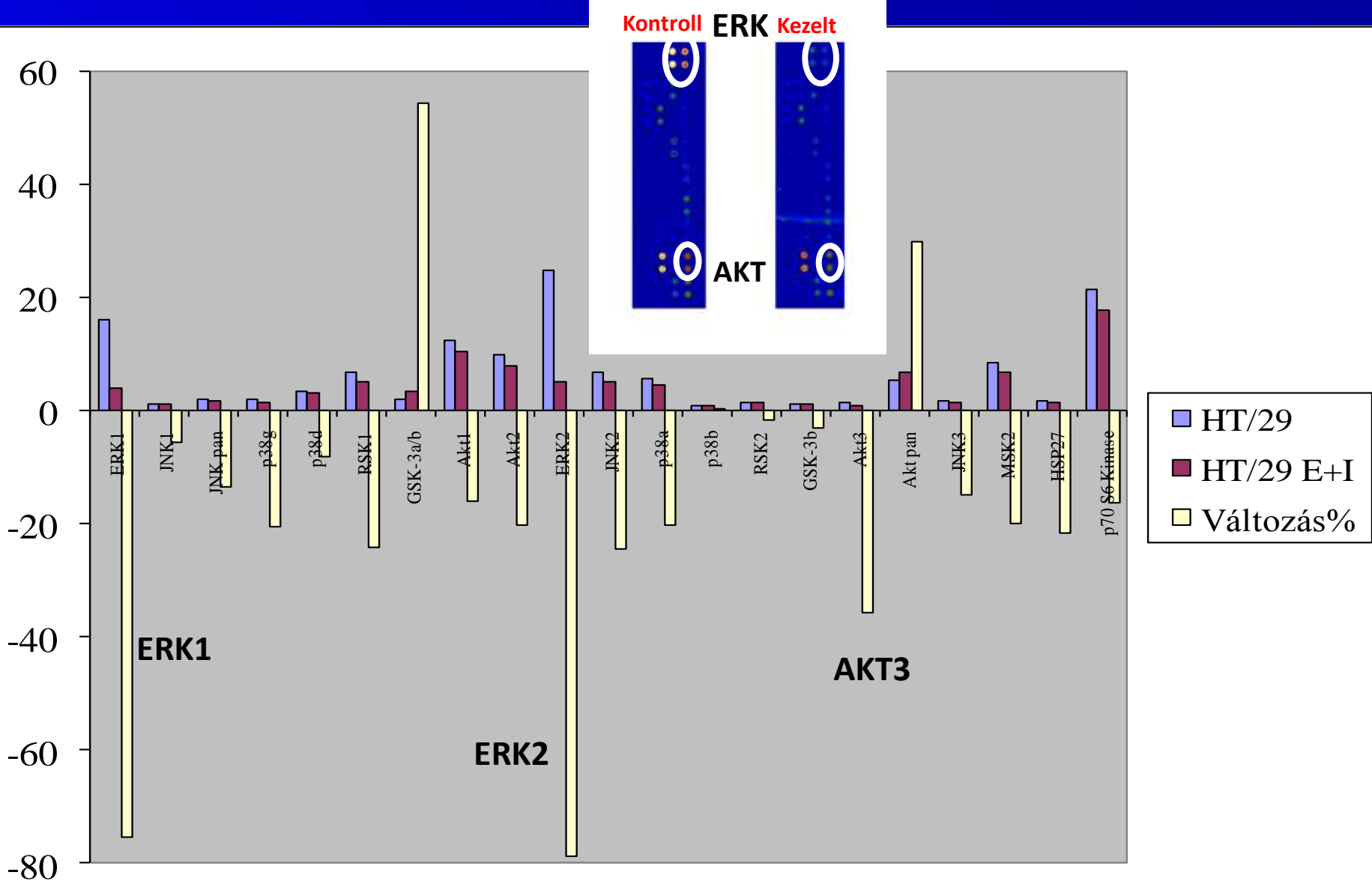
# Vastagbél daganatok szignálátvitel útjai



# Erbitux és Irinotecan kezelés hatása K-ras wt és mt vastagbél sejtvonalakra



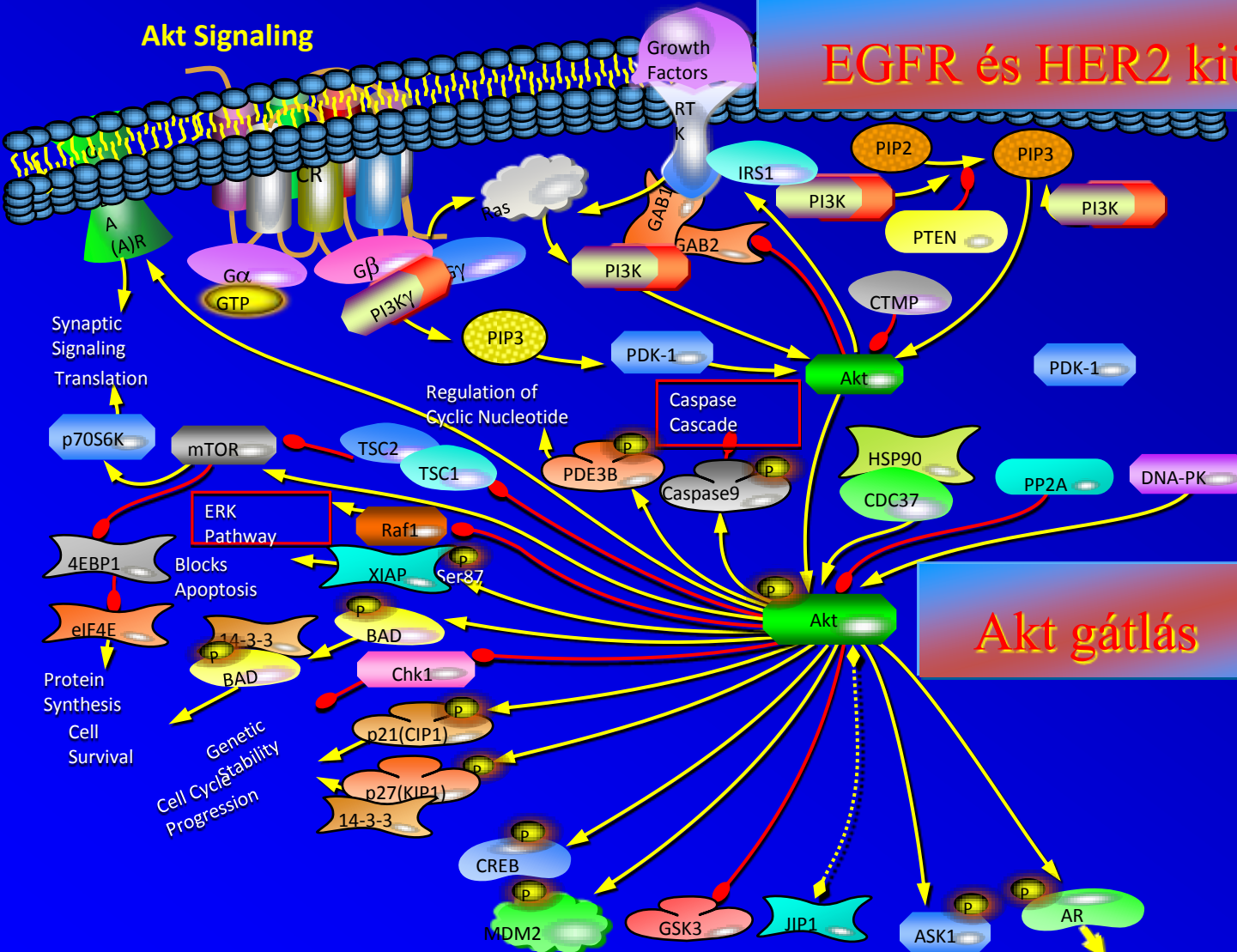
# HT/29 sejtvonal foszforilációs szintjeinek változása erbitux és irinotecan kezelés hatására



**EGFR és HER2, MEK, BRCA1 knock out  
variánsok kialakítása sRNAi technikával;  
gén expressziós mintázat  
meghatározása oligo DNS chip-el**

# Akt Signaling

## EGFR és HER2 kiütés



## Akt gátlás

## Sejt proliferáció

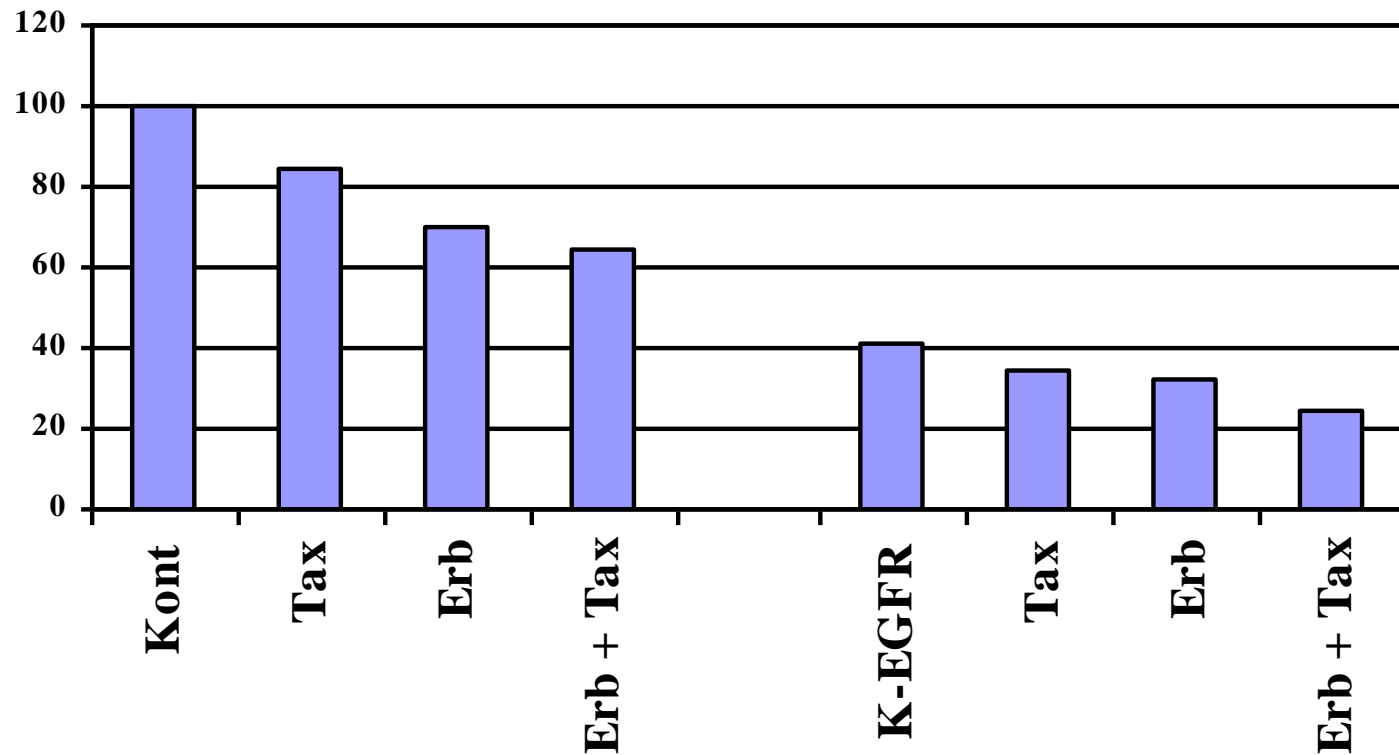
# Akt expresszió EGFR knock out fej-nyak daganat xenograftban

**GAPDH**

**%**

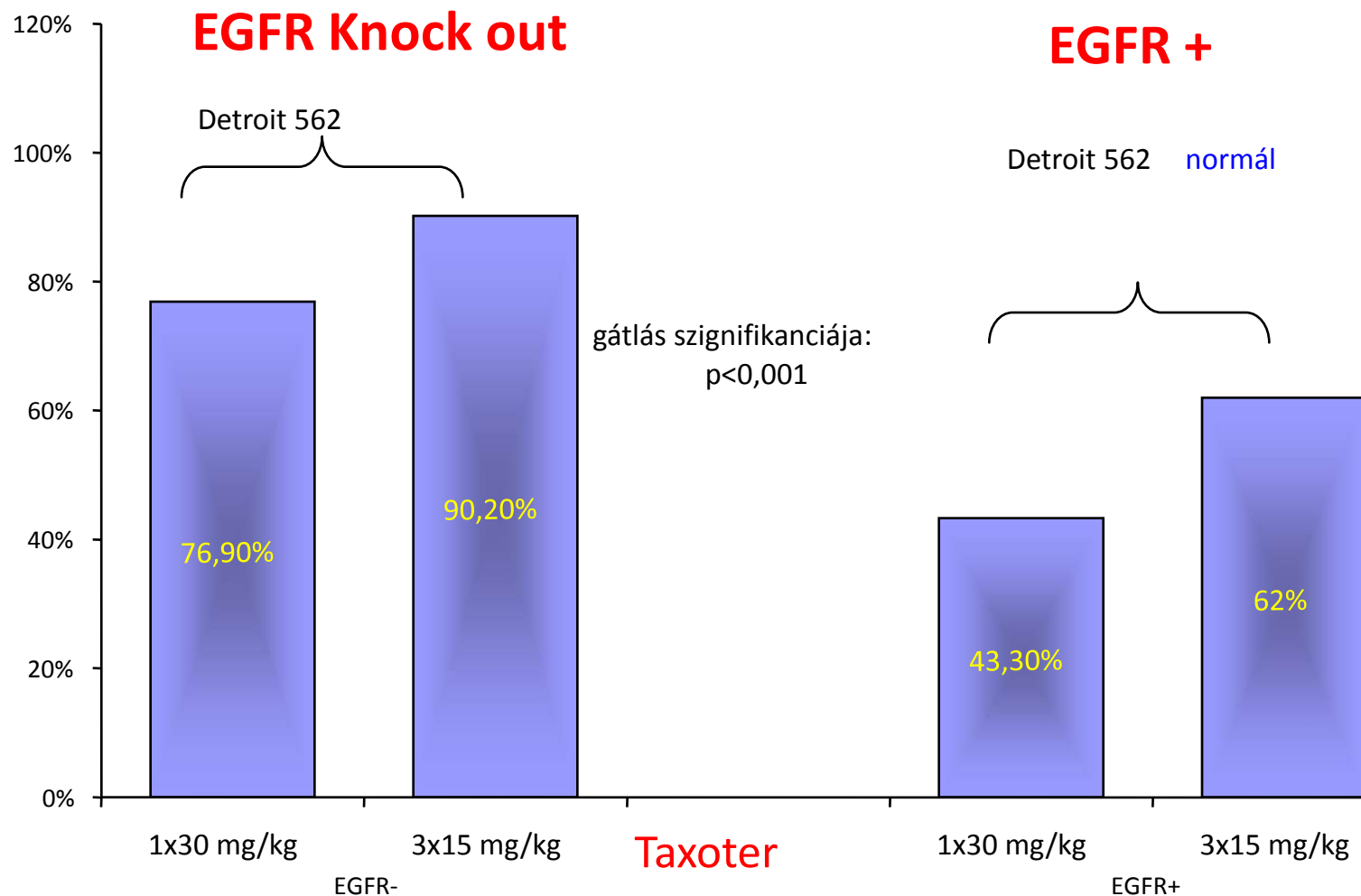
**FaDu EGFR+**

**FaDu EGFR Knock Out**



# EGFR knock out fej-nyak daganat xenograft terápiai érzékenysége

Tumor gátlás a kontroll %-ában 51 napos tumor esetén



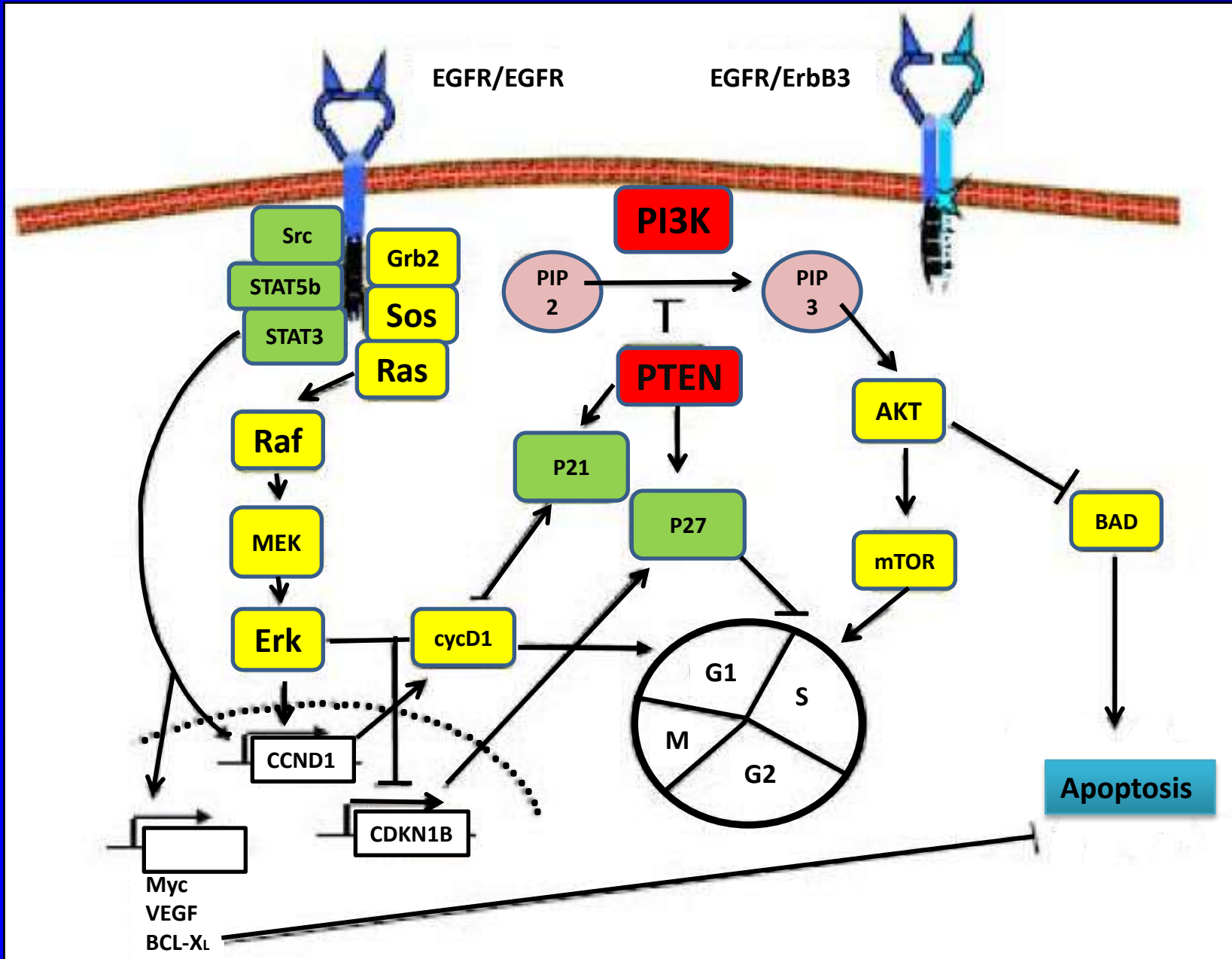
# EGFR, HER2 knock out daganattenyésztetek alkalmazása

- Új gyógyszerek screenelése
- Szignál-átviteli utak felderítése
- Gyógyszerkombinációk preklinikai vizsgálata (tirozin kináz gátlók, aromataz gátlók, antiestrogének, sugárterápia, CisPt. etc.)

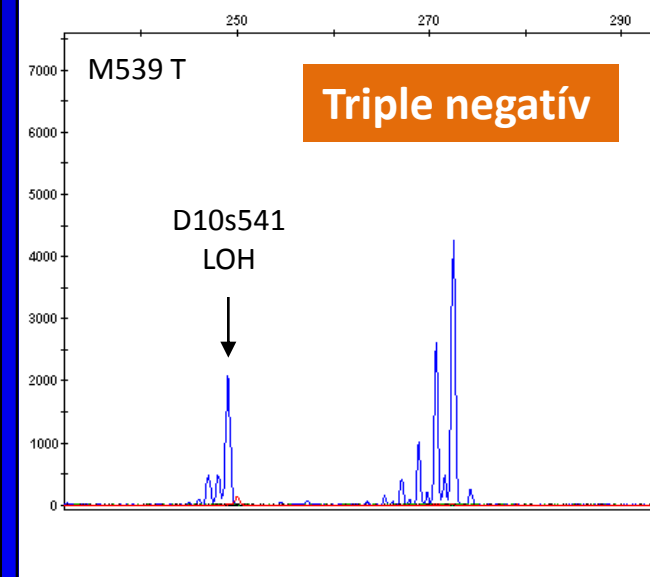
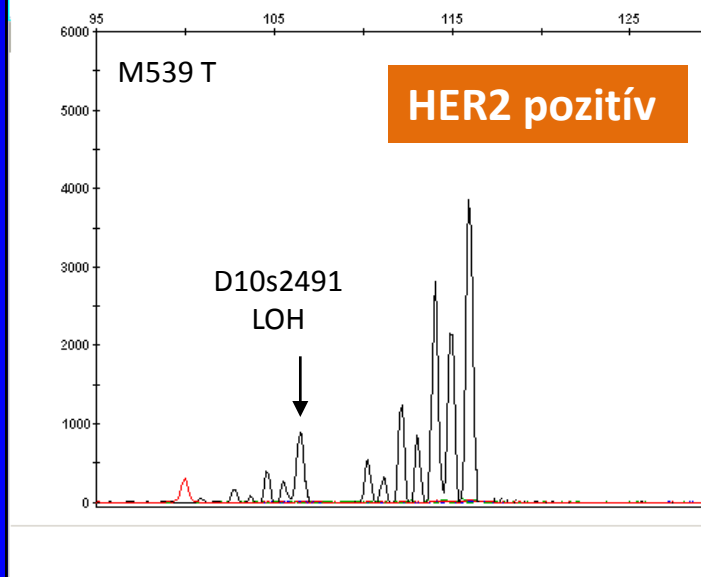
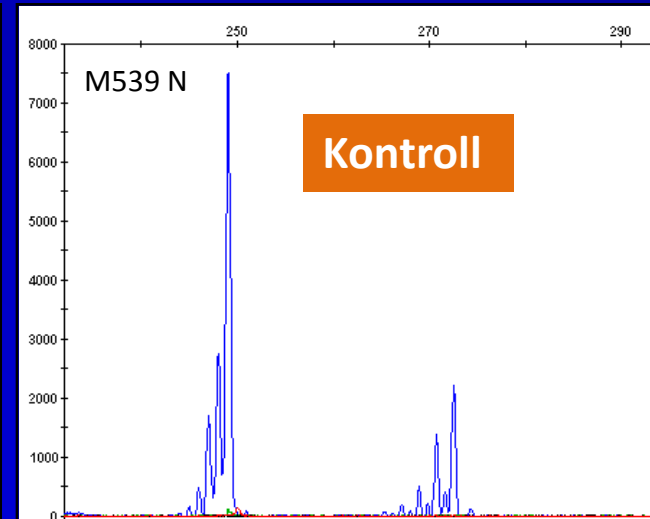
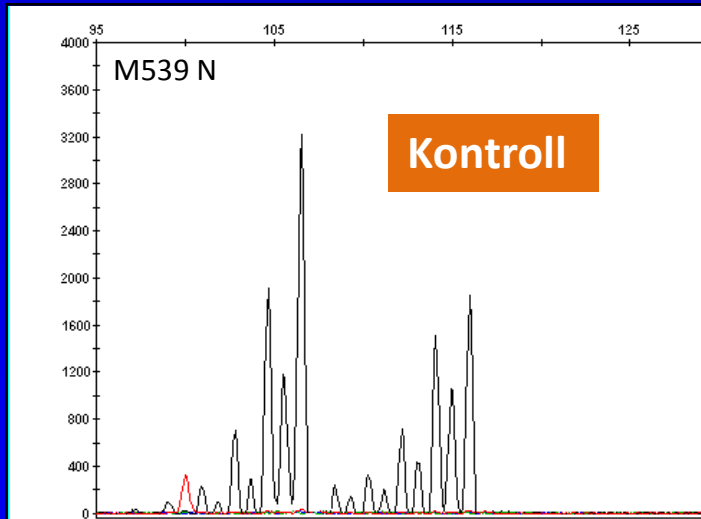
# Célzott terápia rezisztencia faktorai

- 1** Alternatív növekedési szignál átviteli utak aktiválása
- 2** Mutációk kialakulása szignál átvitelben részt vevő génekben (K-ras, **PI3K** mutációk)
- 3** Sejtproliferációt gátló gének inaktiválása (**PTEN** LOH, Herceptin rezisztencia)

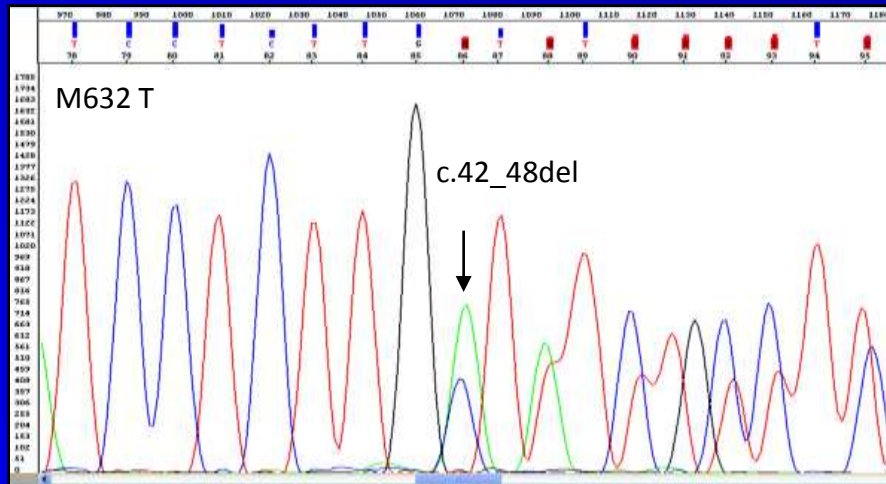
# Resistance mechanisms originating from EGFR downstream effectors



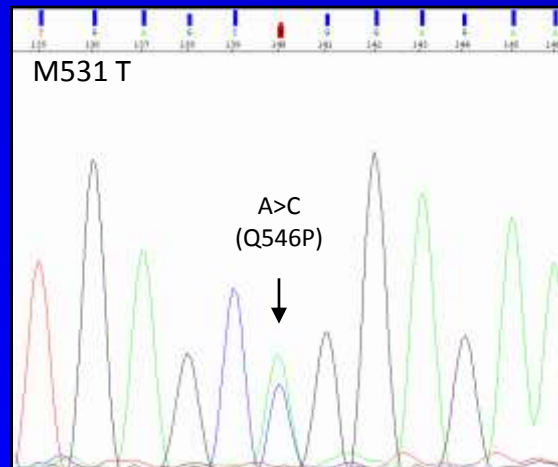
# PTEN allélvesztés emlő daganatokban



# P3 kináz és PTEN mutáció emlő daganatokban

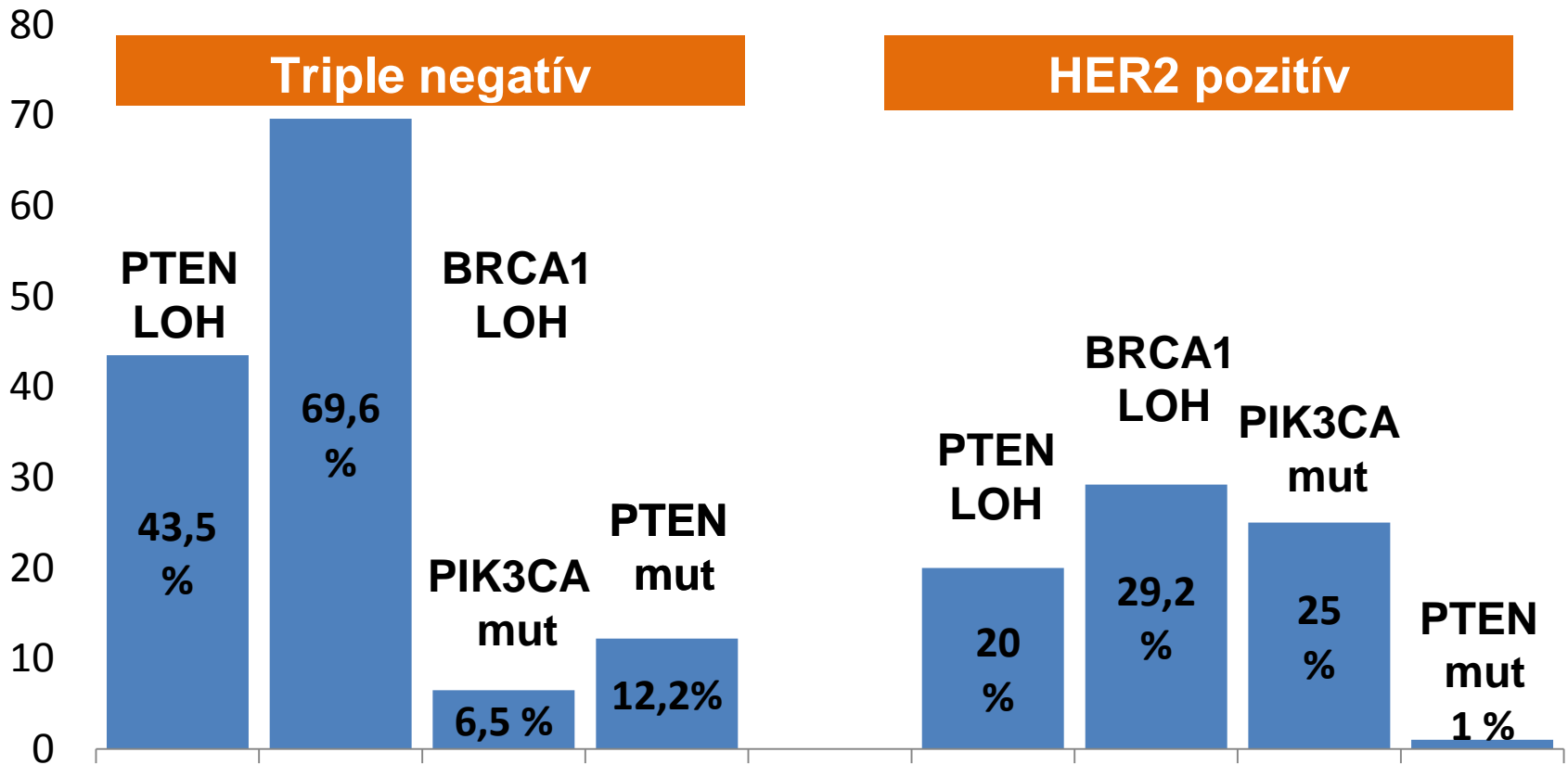


Deléción a PTEN 1. exonban



Pontmutáció a PIK3CA 9. exonban

# Szerérzékenységet meghatározó genomikai változások emlő daganatokban



# Célzott terápiával szembeni rezisztencia megszüntetése

1.

## **Target molekula mutációja**

Új TK inhibitor alkalmazása Pl.: Imatinib helyett Nilotinib, Sorafenib alkalmazása

2.

## **Alternatív szignál átviteli út aktiválása**

Multikináz inhibitorok alkalmazása

3.

## **Alacsony klinikai válasz célzott terápiára**

Kombinációs terápia alkalmazása

# Genomikai vizsgálatok jelentősége a daganatterápiában

1. Genomikai markerek alkalmazása molekuláris stagingre
2. Terápiás target azonosítása mutációinak azonosítása
3. Rezisztencia faktorok vizsgálata
4. A daganat farmako-kinetikai jellemzése génpolimorfizmusokkal
5. Daganattípusra jellemző szignálutak felderítése
6. Individualizált terápiás protokollok kialakítása