

# Újabb lehetőségek a gastrointestinalis tumorok molekuláris diagnosztikájában

**Szentirmay Zoltán**

**Országos Onkológiai Intézet  
Sebészi és Molekuláris Tumor Patológiai Centrum**

EEA and Norwegian Financial Mechanisms in Hungary,  
Development of joint Hungarian  
and Norwegian strategy for cancer treatment by molecular  
methods. (Prevention, early diagnosis and therapy)

# Vastagbélrákok

# Betegek és módszerek

- **Összesen 634 műtéttel eltávolított vastagbélrák .**
- **Adatbázis szerkesztés.**
- **Automatikus DNS izolálás FFPE tumor szövetből MagNa Pure Compact készülék segítségével.**
- **PCR- és immunhisztokémia-alapú microsatellita instabilitás teszt (Dietmaier and Hofstadter Lab. Invest., 81:1453-1456, 2001).**
- **Sejtciklus paraméterek vizsgálata immunhisztokémiai módszerekkel.**
- **A KRAS exon 2 and BRAF exon 15 gén régiók DNS mutációinak a vizsgálata valósidejű PCR és olvadás-pont analízis, továbbá DNS szekvencia analízis segítségével.**

# Genetic classification of colorectal cancers

MMR negative phenotype

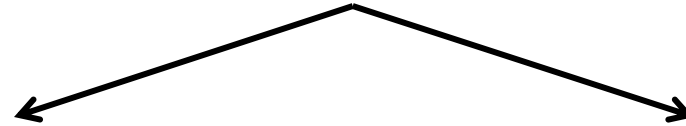


Sporadic CrC develops via „polyp-cancer” sequence  
**High metastatic potential**

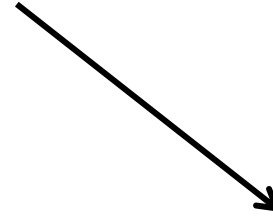


Microsatellite stability (MSS)  
Chromosomal instability

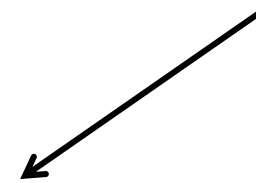
MMR positive phenotype



Hereditary non-polyposis CrC (HNPCC)  
**Very low metastatic potential**

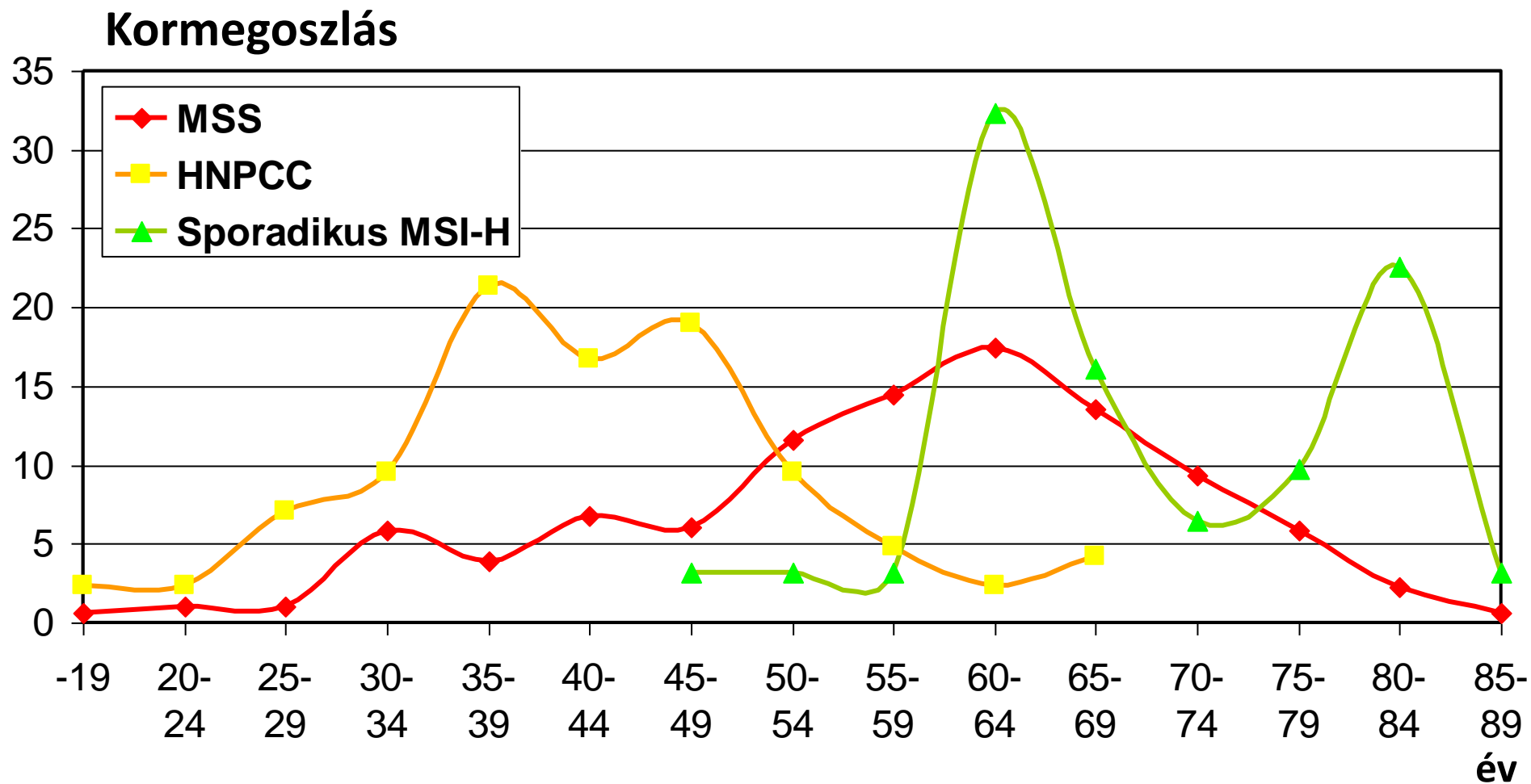


Sporadic CRC develops due to the CpG methylation of hMLH1 (CIMP+)  
**Low metastatic potential**



Microsatellite instability (MSI-H)  
Chromosomal stability

# A különböző genetikai státusú vastagbélrákok kormegoszlása (384 beteg)



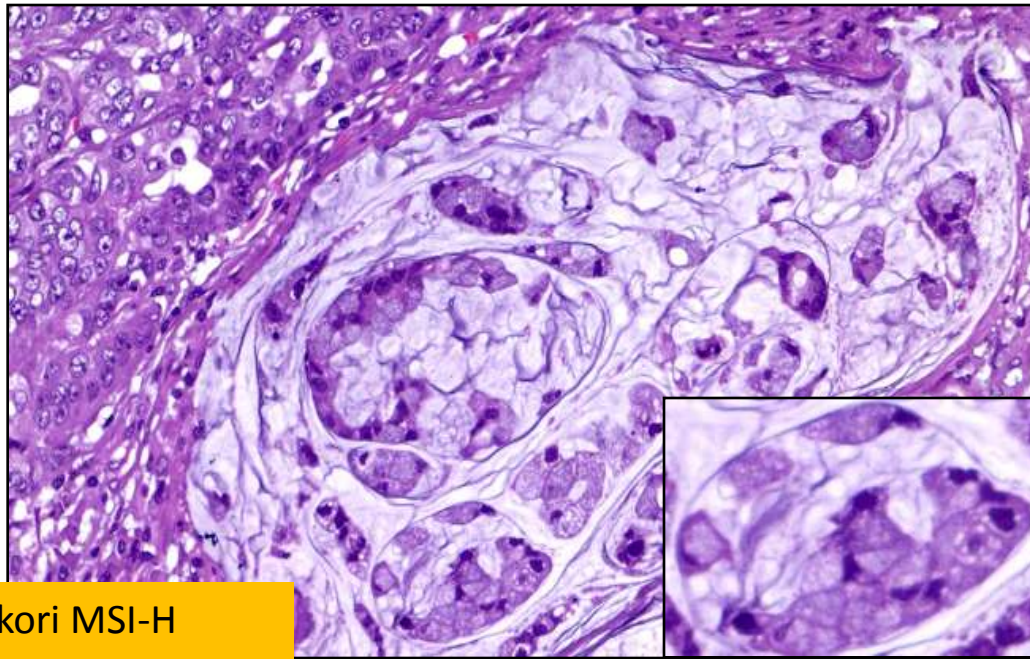
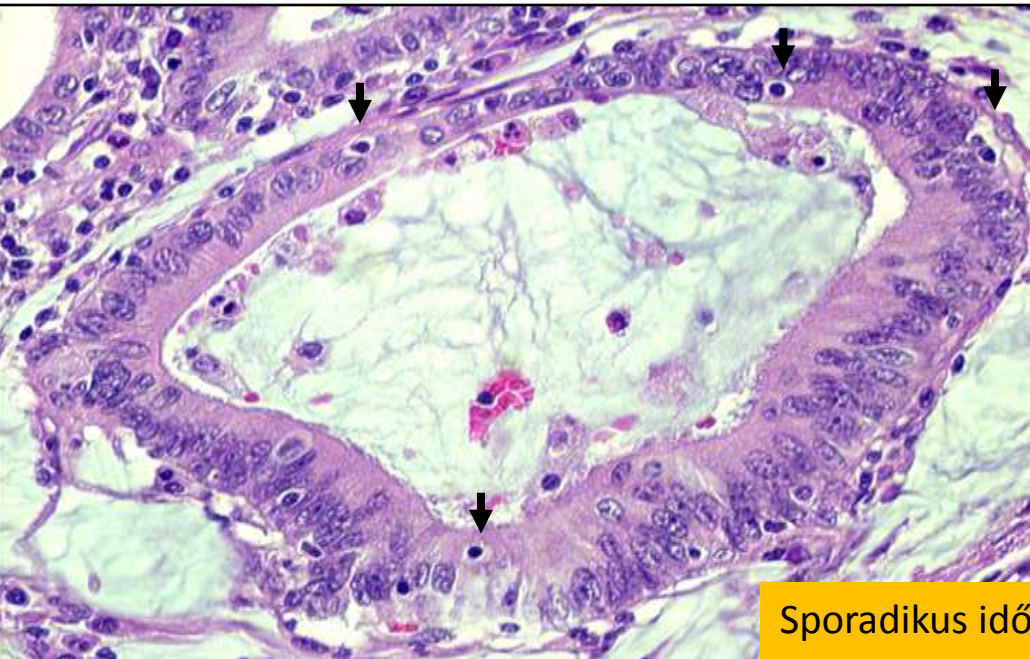
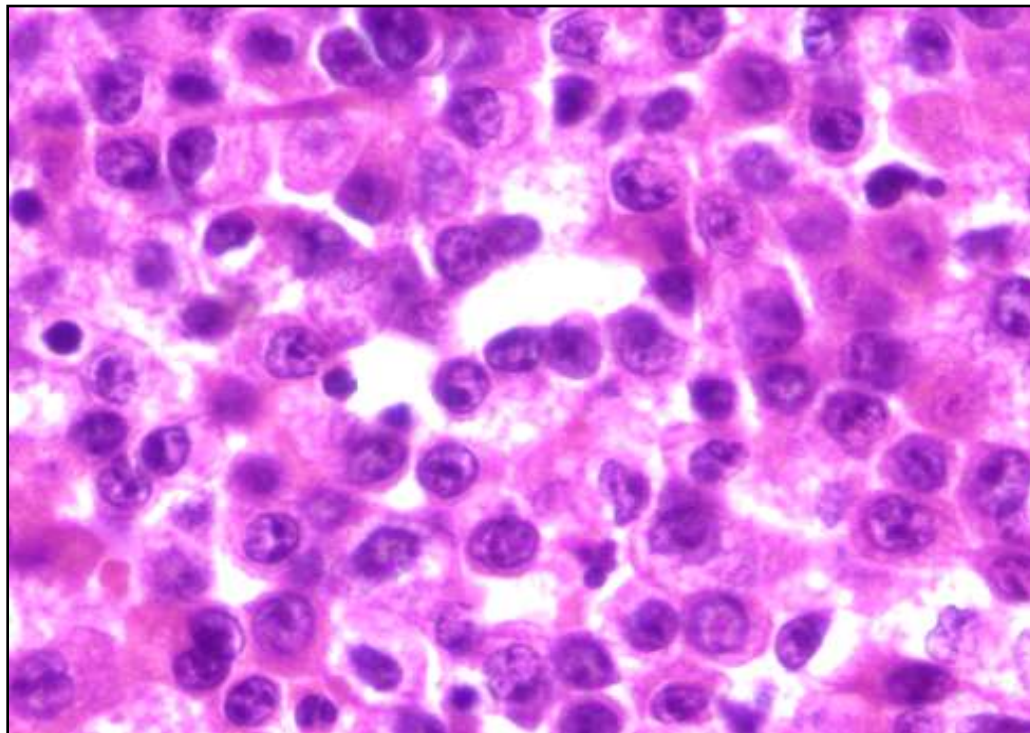
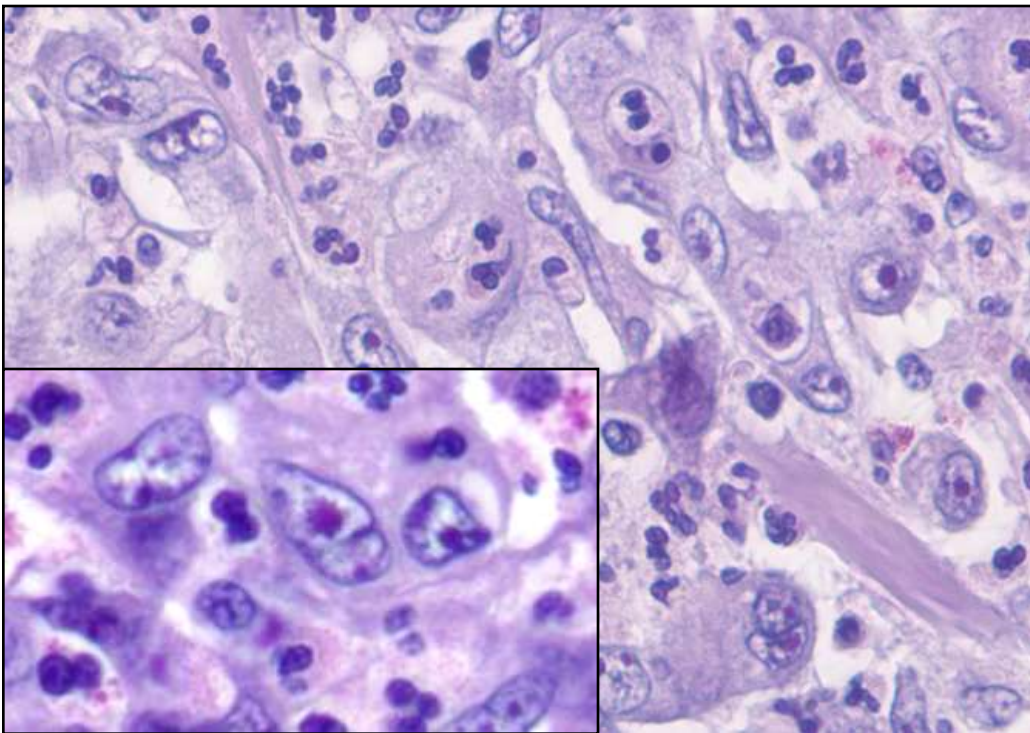
# Localization of genetically different CRCs

Colorectal cancer	Localization %		Total %
	Right half-colon	Left half-colon & rectum	
Sporadic CIMP+ MSI-H	100.0	-	100
HNPCC MSI-H	65.1	34.9	100
Sporadic MSS	21.9	78.1	100

P = 0.000

# Frequency distribution of KRAS and BRAF mutations in hereditary and sporadic CrC

CrC types	KRAS mut %	BRAF mut %
HNPCC MSI-H	39.5	-
Sporadic CIMP+, MSI-H	8.4	52.8
Sporadic MSS	45.9	4.2

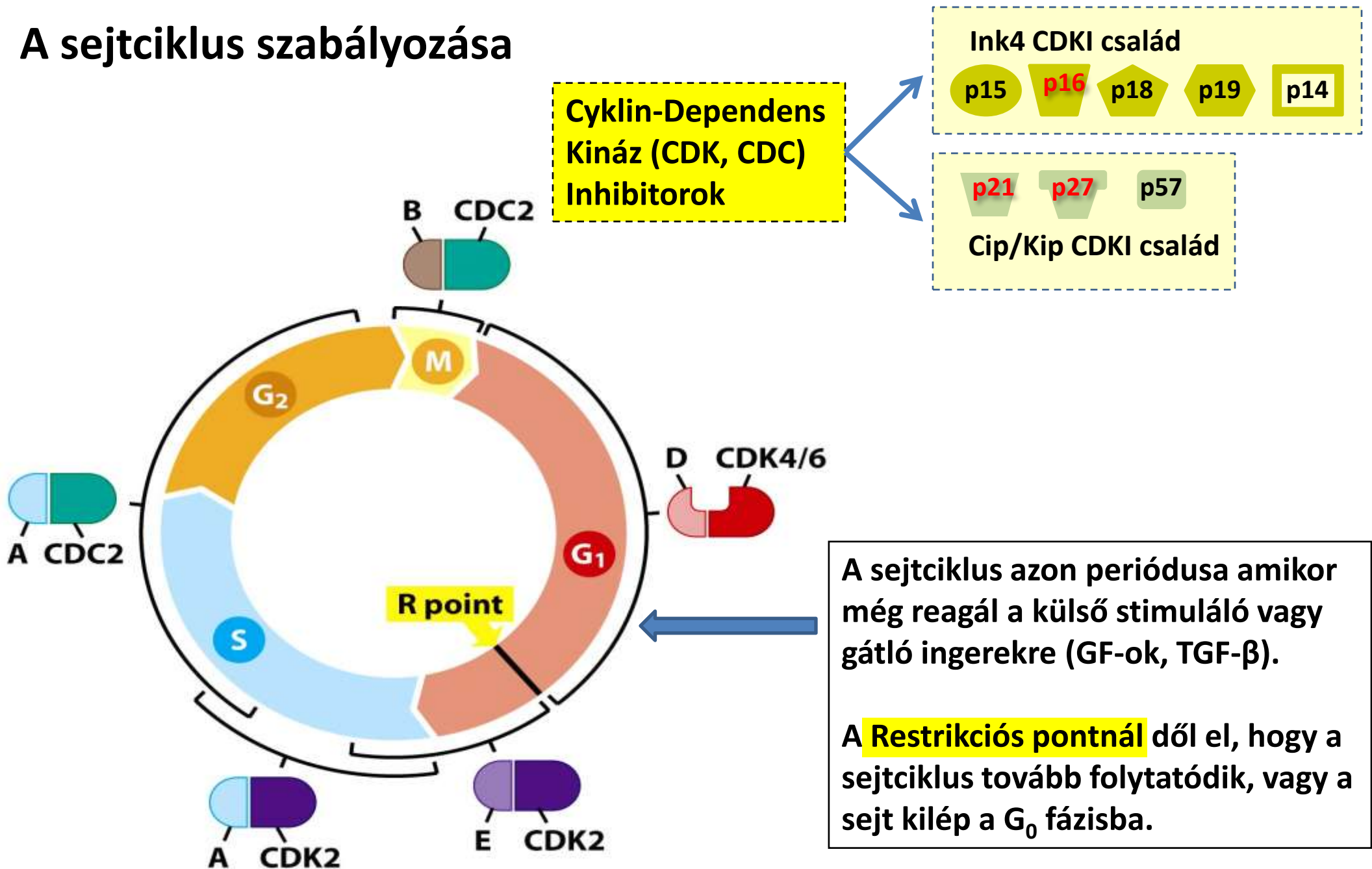


Sporadikus időskori MSI-H

# **A szignifikáns genetikai elváltozások vastagbél- rákokban befolyásolják:**

- 1. A sejtciklus szabályozást.**
- 2. A metasztázis első lépését az EMT-t.**
- 3. A daganatellenes kezelésre adott terápiás választ:**
  - 1. KRAS és BRAF mutáció gátolja az anti-EGFR antitestek terápiás hatását,**
  - 2. az 5-fluorouracil-alapú kemoterápia hatástalan microsatellita instabil (MSI-H) carcinomákban.**

# A sejtciklus szabályozása

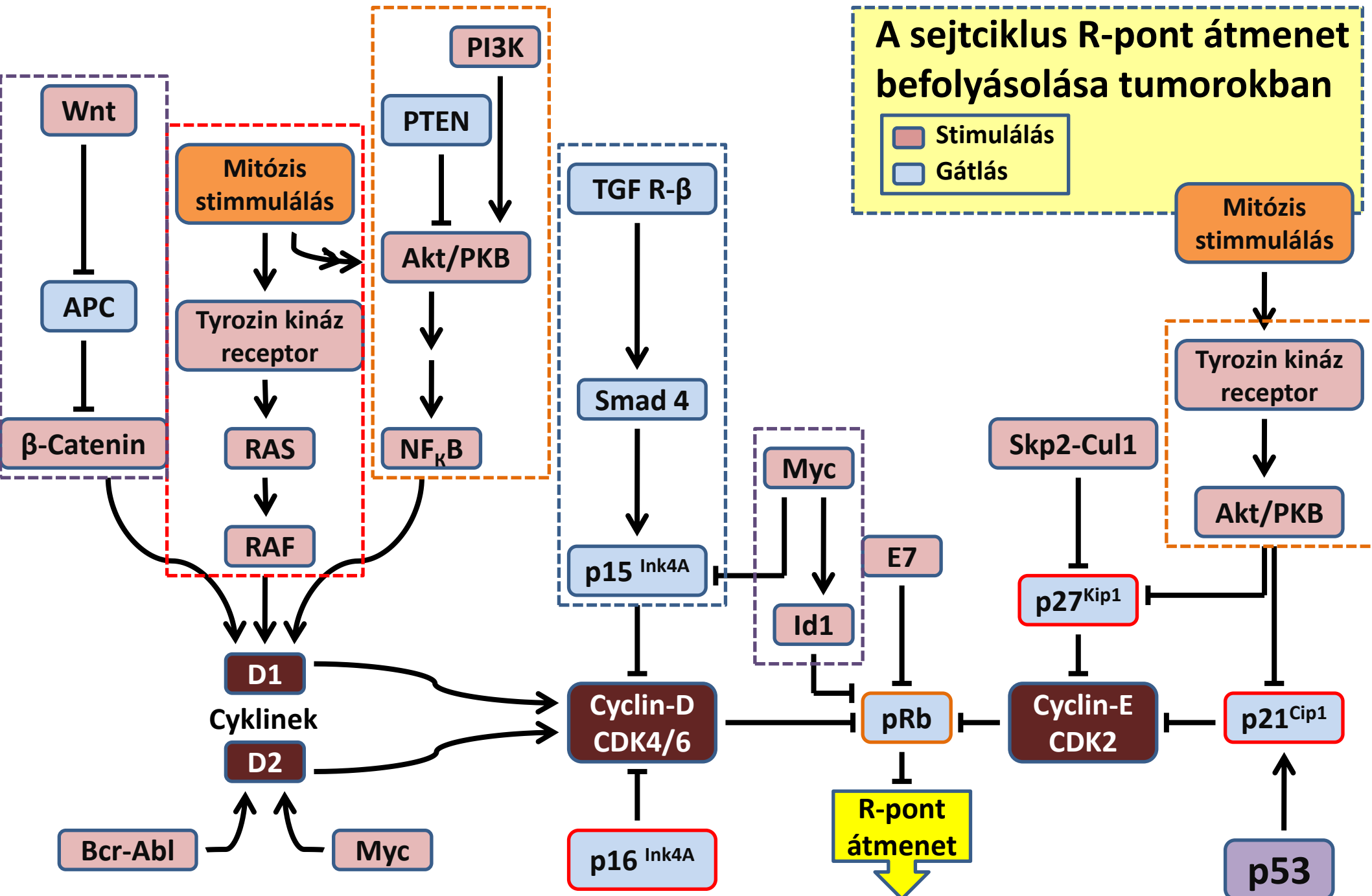


A sejtciklus azon periódusa amikor még reagál a külső stimuláló vagy gátló ingerekre (GF-ok, TGF- $\beta$ ).

A **Restriktációs pontnál** dől el, hogy a sejtciklus tovább folytatódik, vagy a sejt kilép a G<sub>0</sub> fázisba.

# A sejtciklus R-pont átmenet befolyásolása tumorokban

■ Stimulálás  
■ Gátlás



## p21<sup>cip1</sup>

- **Cyclin-dependens kináz inhibitor 1A**
- ***Stimulálja* a sejtciklust a CDK4/6 - cyclin-D komplexen keresztül**
- ***Gátolja* a CDK2 - cyclin-E/cyclin-A komplexek kialakulását és ezzel meggátolja a sejtciklus átlépését S-fázisba.**
- **A p53 mutáció meggátolja a p21 expressiot.**
- **p21 csökkent expressio fokozza a sejtosztódást a vastagbél nyálkahártyában és elősegíti a CrC kialakulását.**

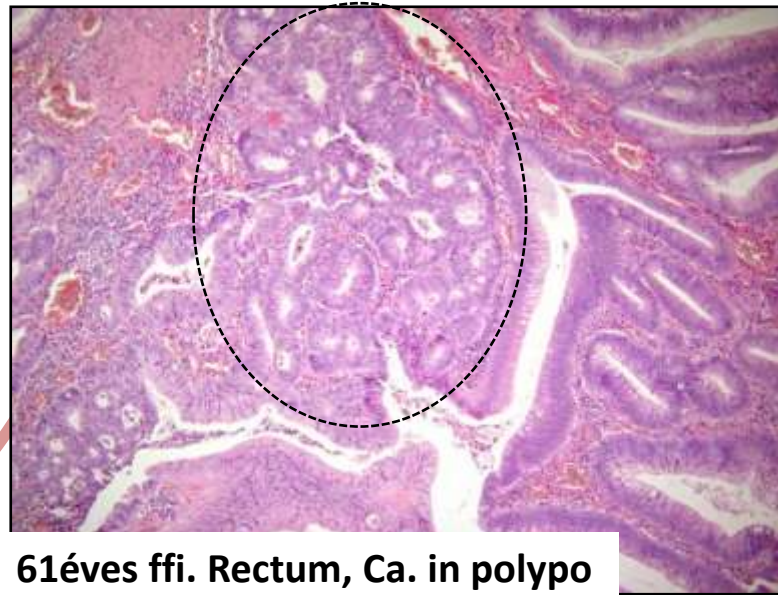
## p27<sup>kip1</sup>

- Cyclin-dependens kináz inhibitor 1B enzim (Gén: CDKN1B)
- *Stimulálja* a sejtciklust a CDK4/6-cyclin-D komplexen keresztül.
- *Gátolja* a CDK2 - cyclin-E / cyclin-A komplexek kialakulását és ezzel meggátolja a sejtciklus átlépését S-fázisba.
- MSS és MSI-H CrC-ben a p21 és p27 fehérje szintje különböző mértékben lecsökken.
- A HNPCC-ben viszonylag sok a p21+ és p27+ tumor sejt.
- A p27 expressio hiánya a II. stádiumú distalis vastagbél ca.-ban az alacsony differenciáltság és a rossz prognózis jele.

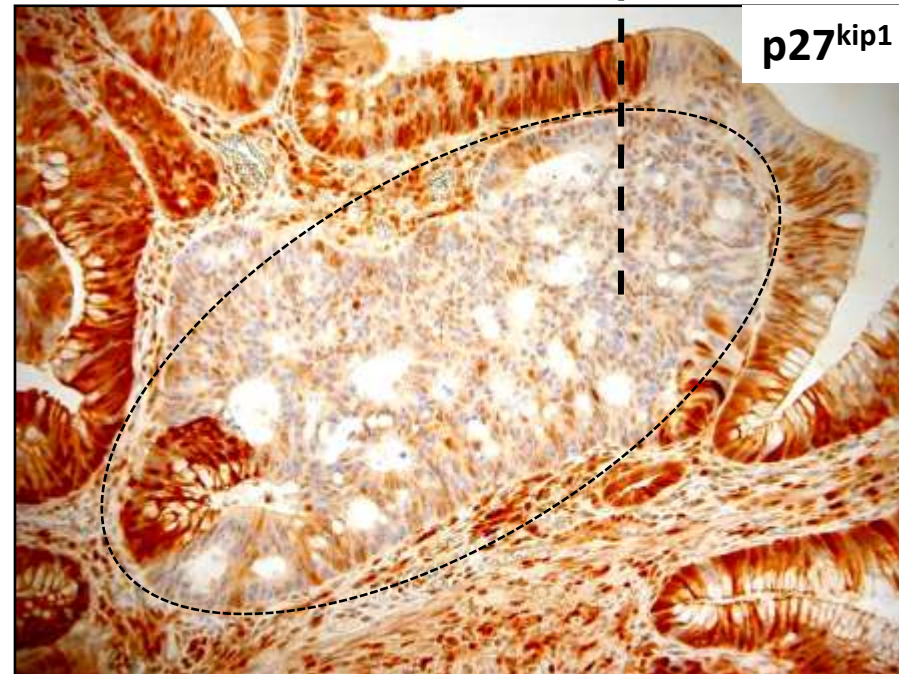
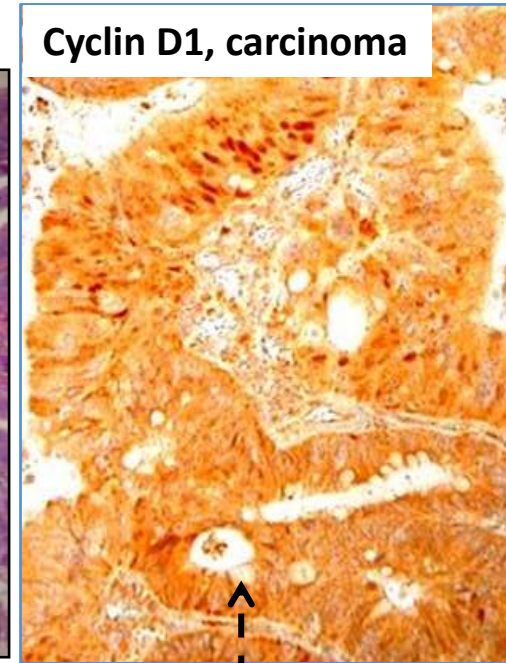
# Sejtciklus stimulálás

p21 – p27

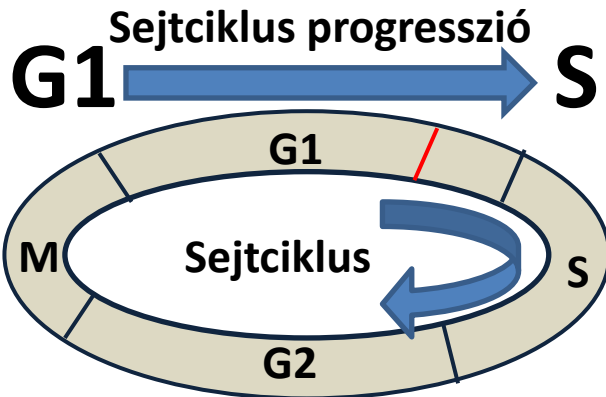
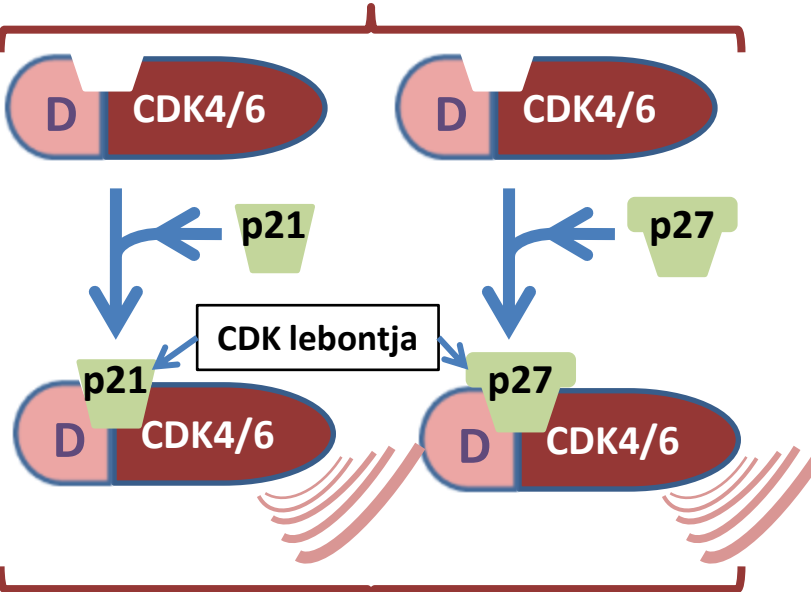
Cyclin D1, carcinoma



61 éves ffi. Rectum, Ca. in polypos



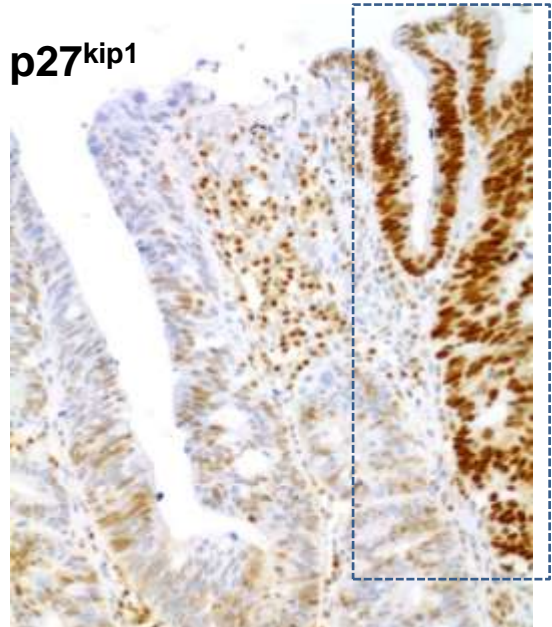
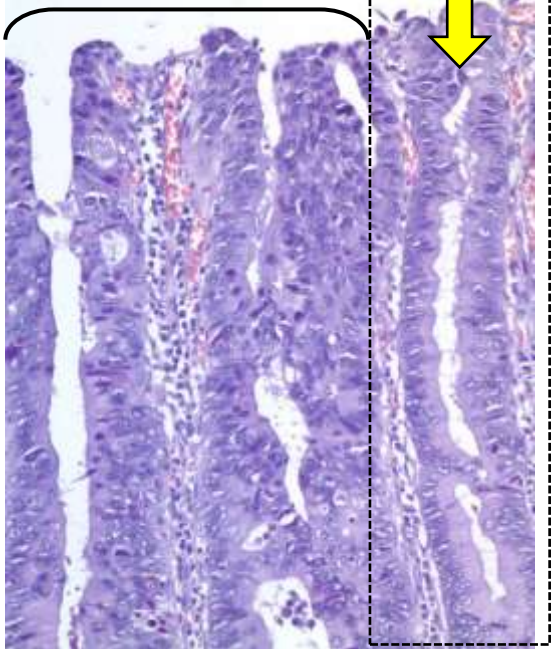
p27<sup>kip1</sup>



Mitogén stimulusra a D-CDK4/6 komplex mennyisége megnő, a p21 és p27 szintje lecsökken mert a CDK lebontja. **A sejtciklus átlép az R-ponton, a sejt osztódik.**

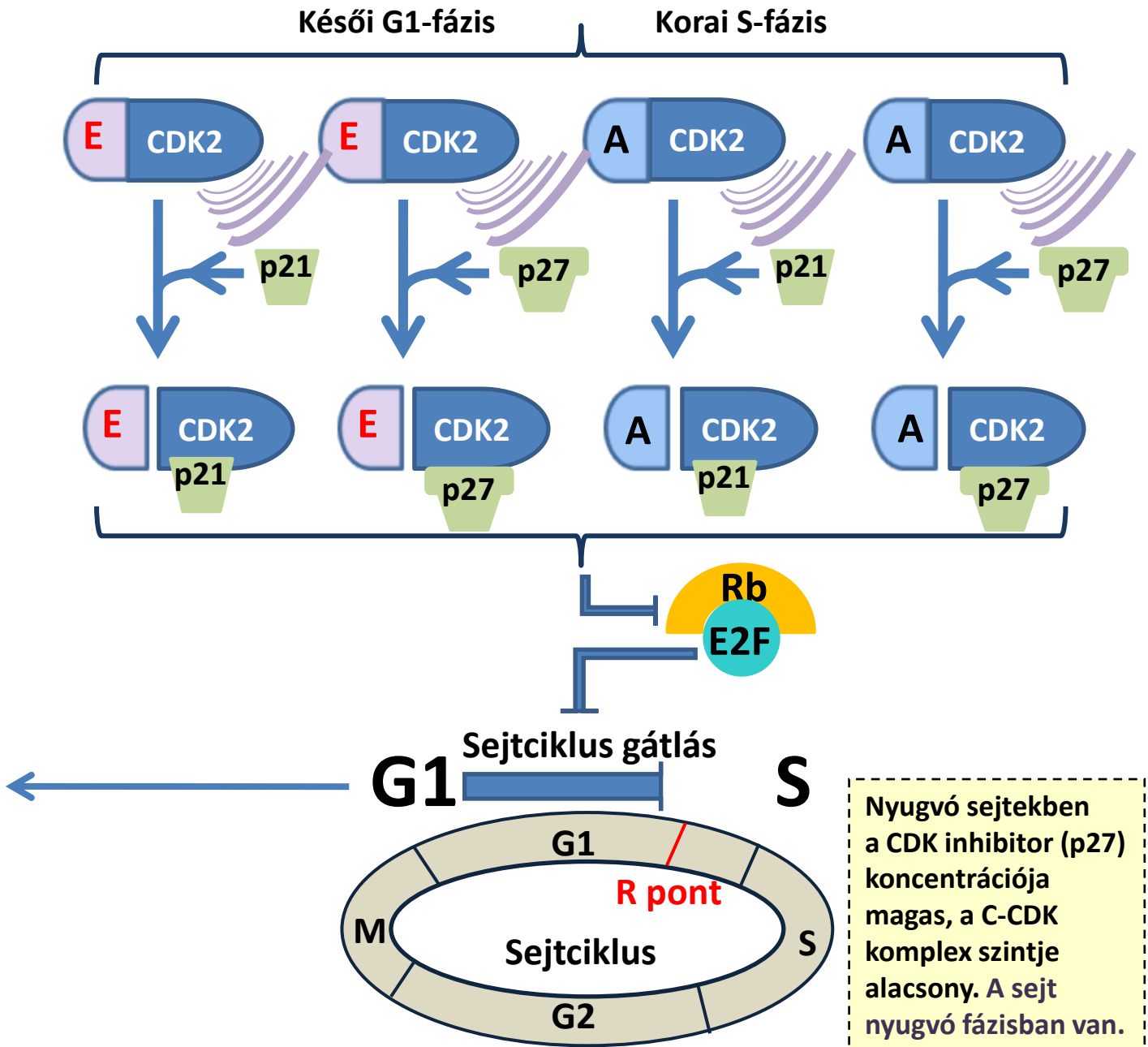
Dr. Péter Ilona szíveségéből

Adenoma dysplasiával  
súlyos enyhe

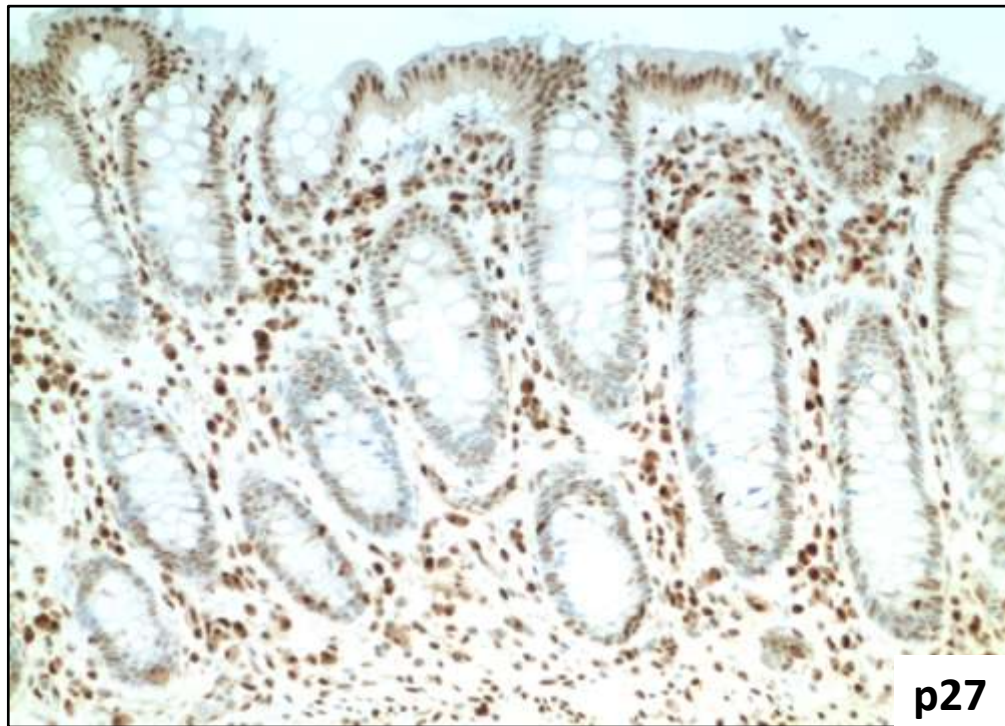


# Sejtciklus gátlás

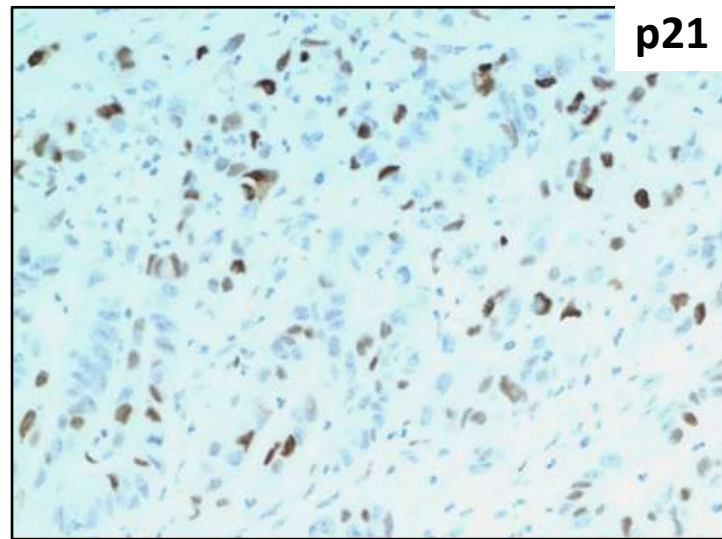
p21 – p27



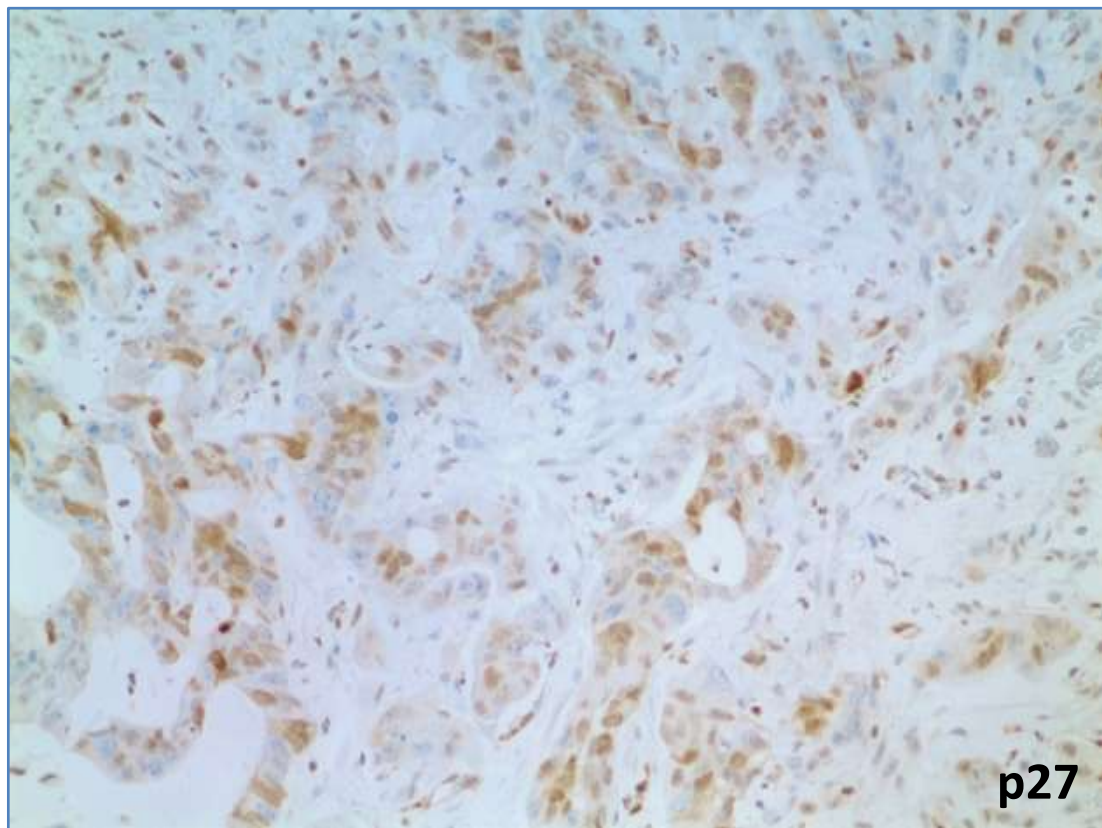
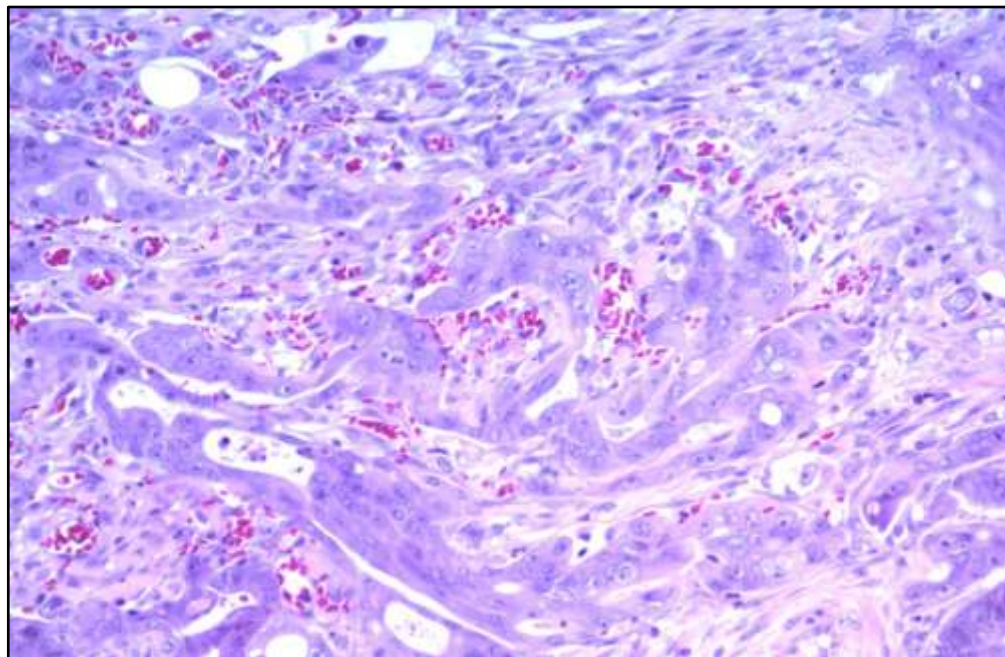
**35 éves ffi.  
HNPPC**



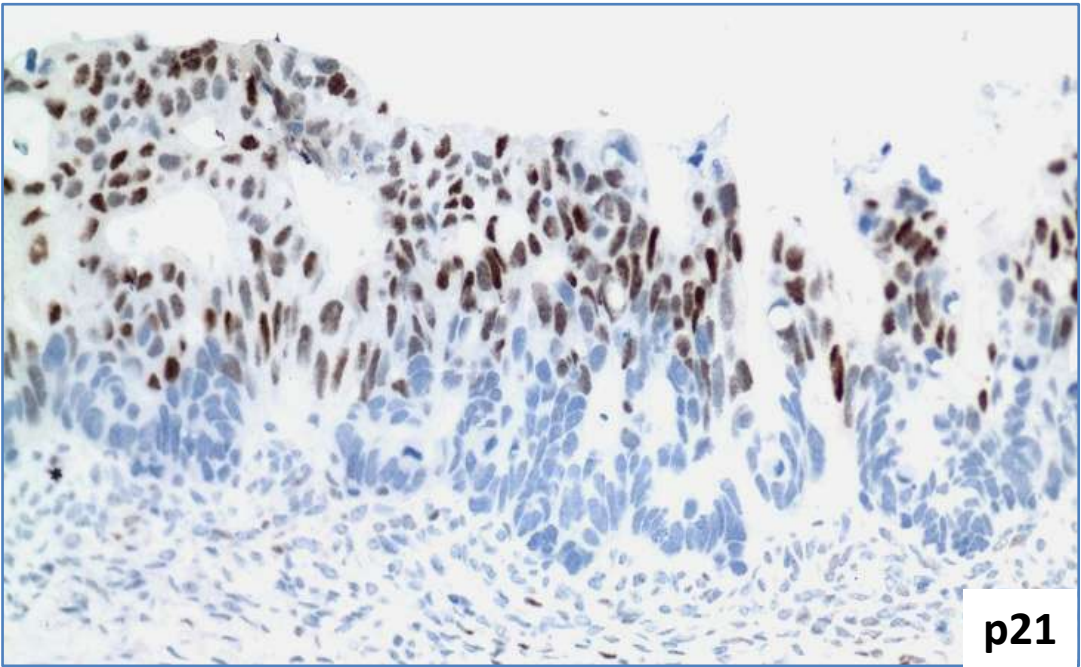
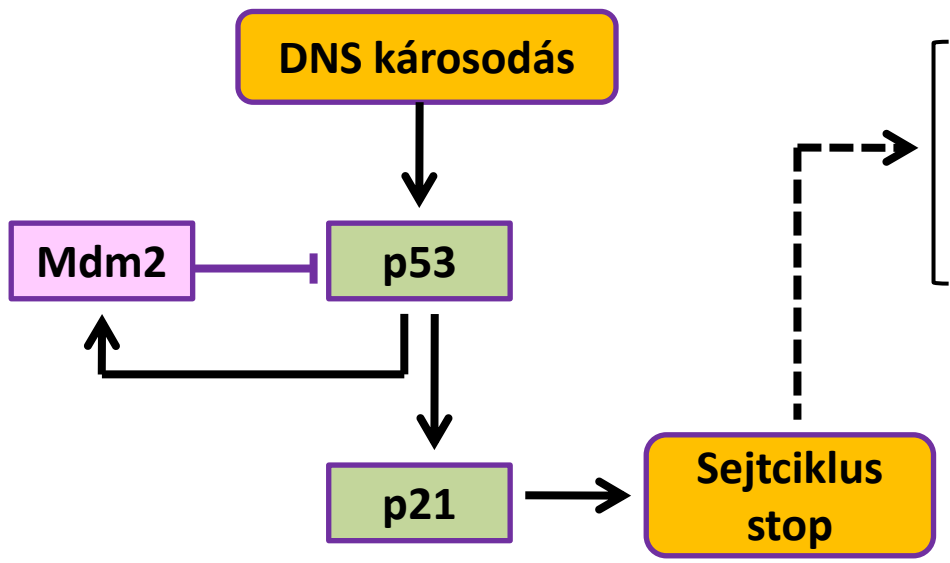
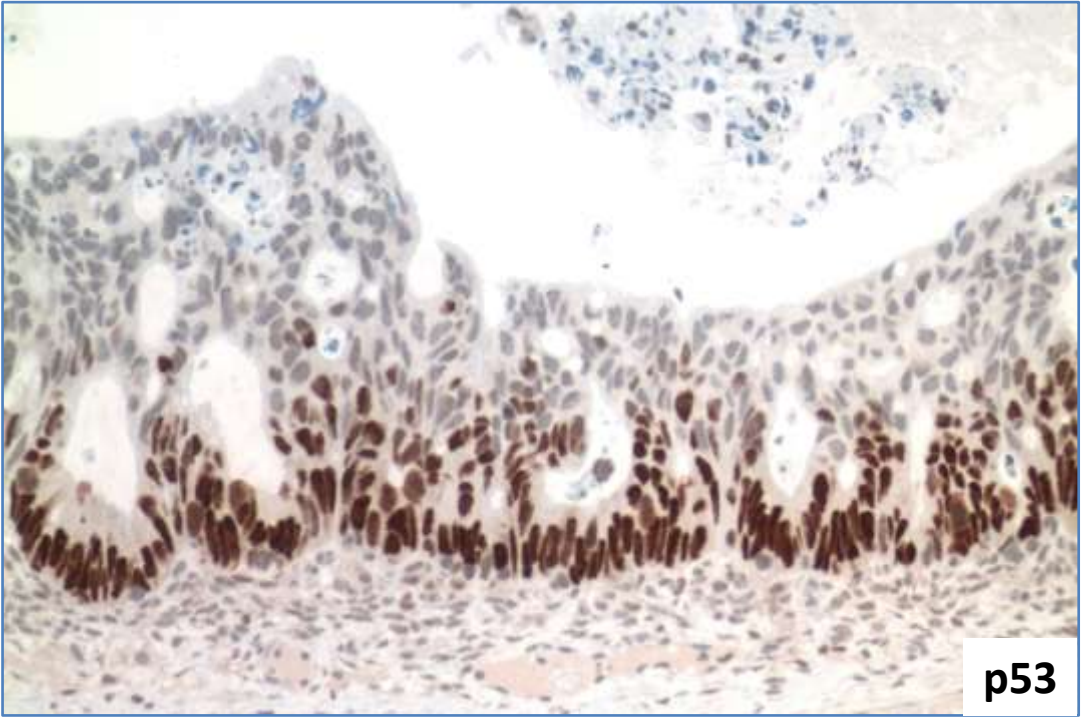
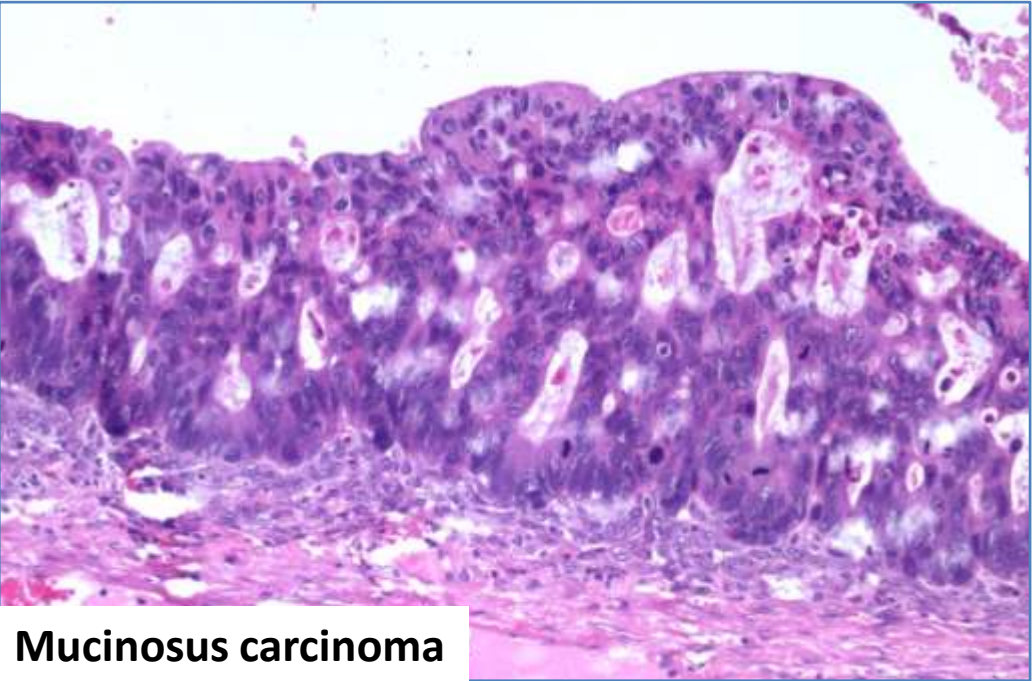
**p27**



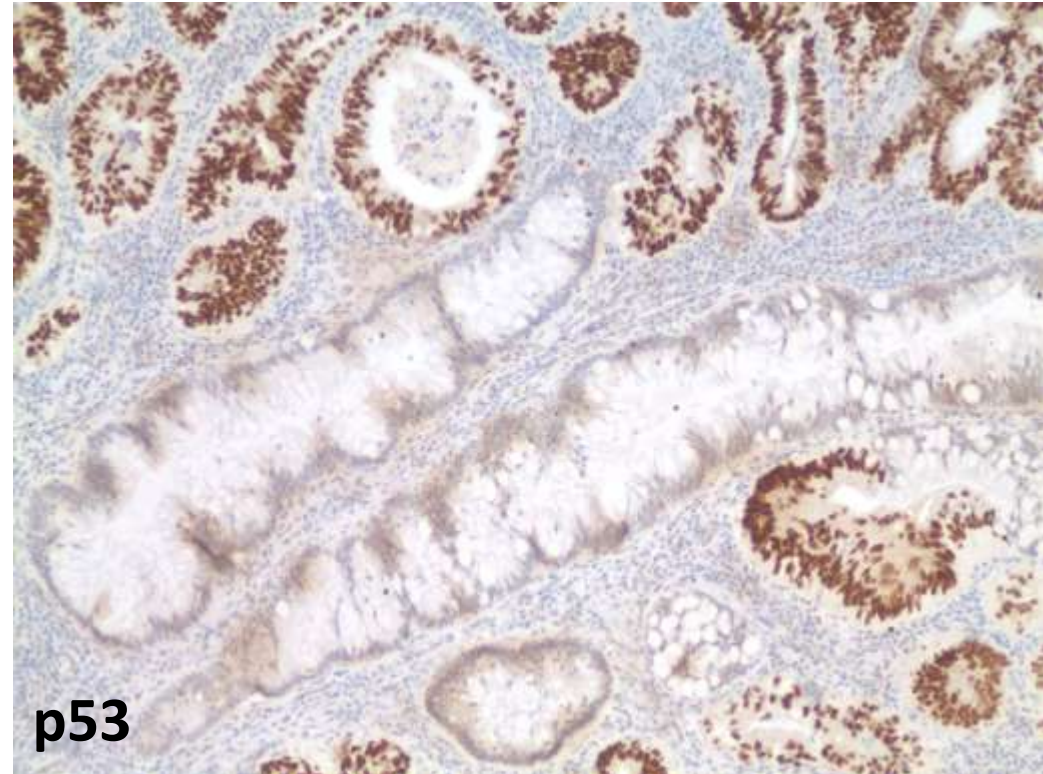
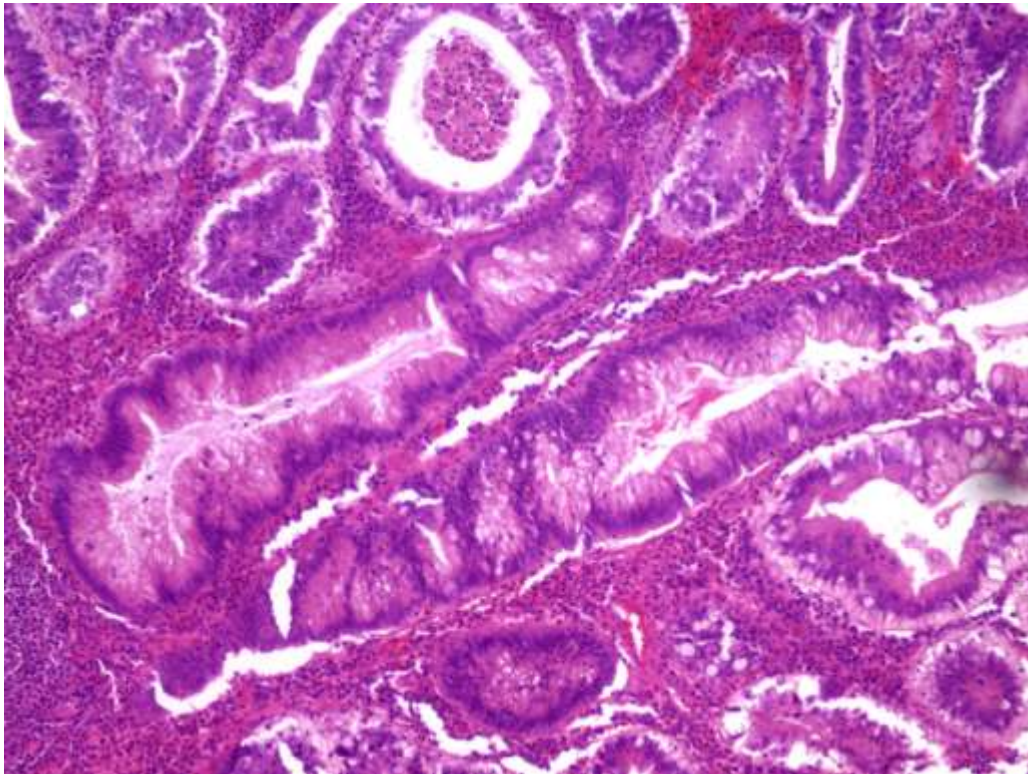
**p21**



**p27**

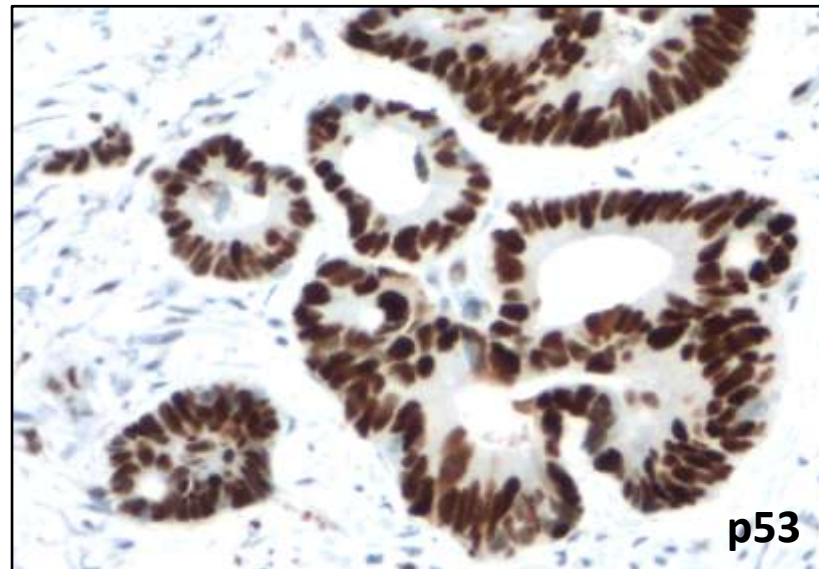
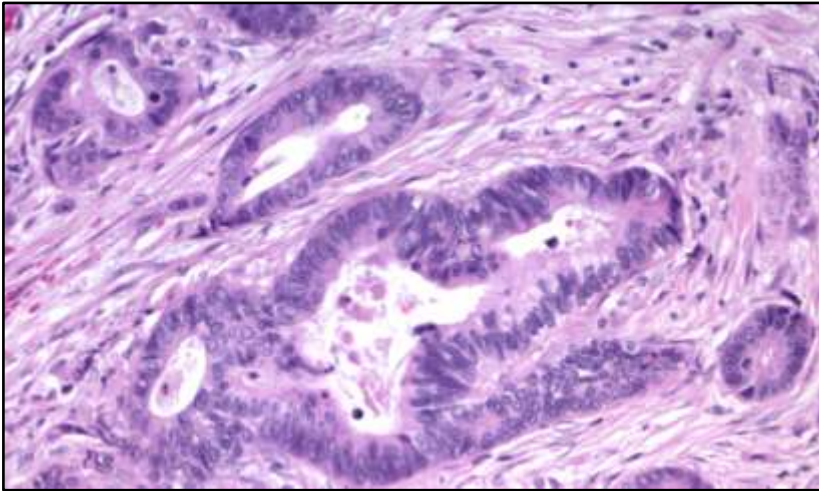


## Villosus adenoma dysplasiával

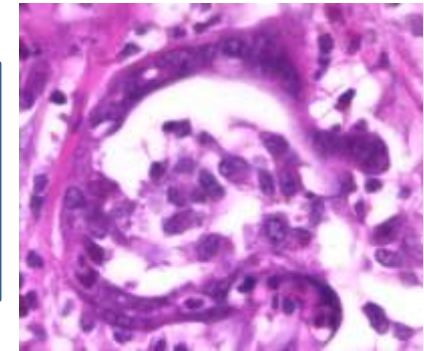


# Rectum carcinoma radio-kemoterápia után

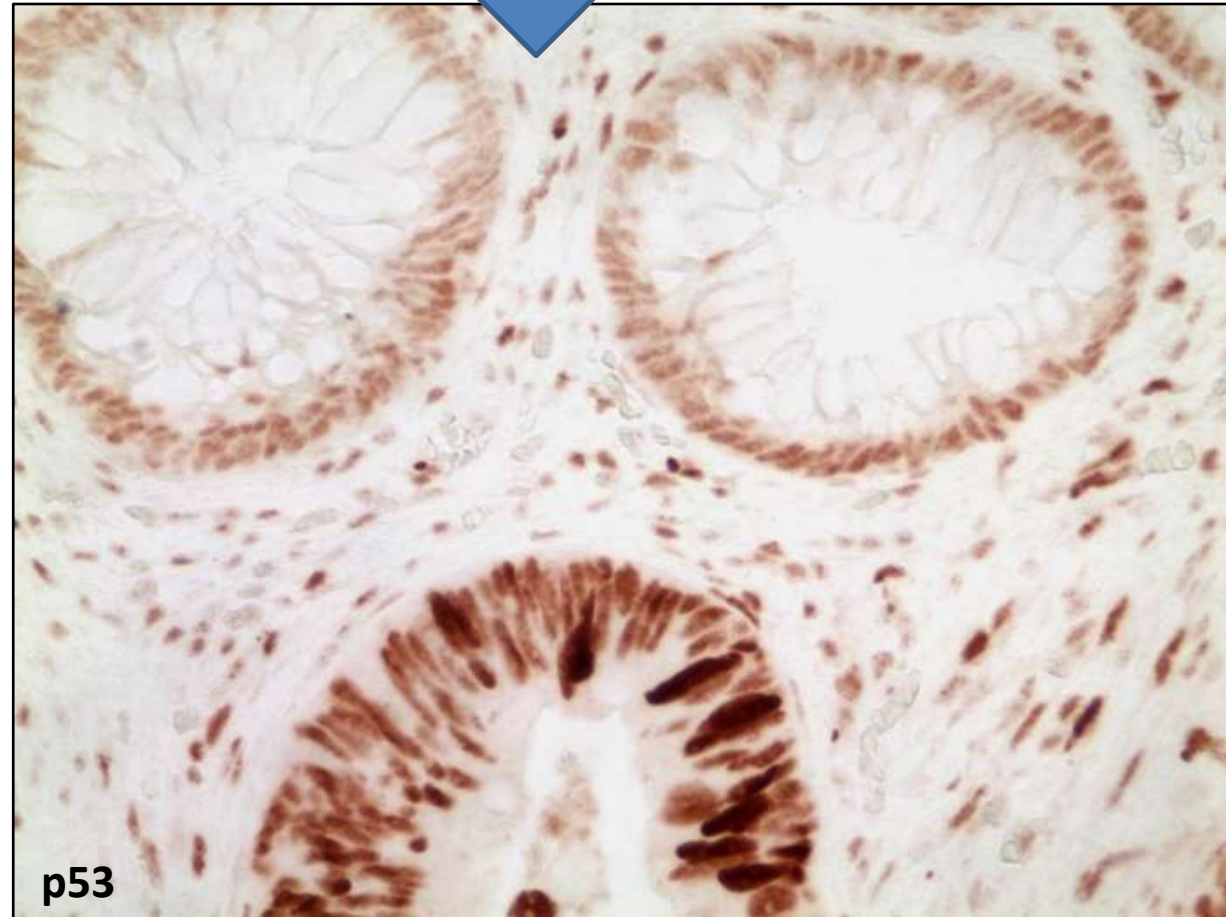
OOI 791/09



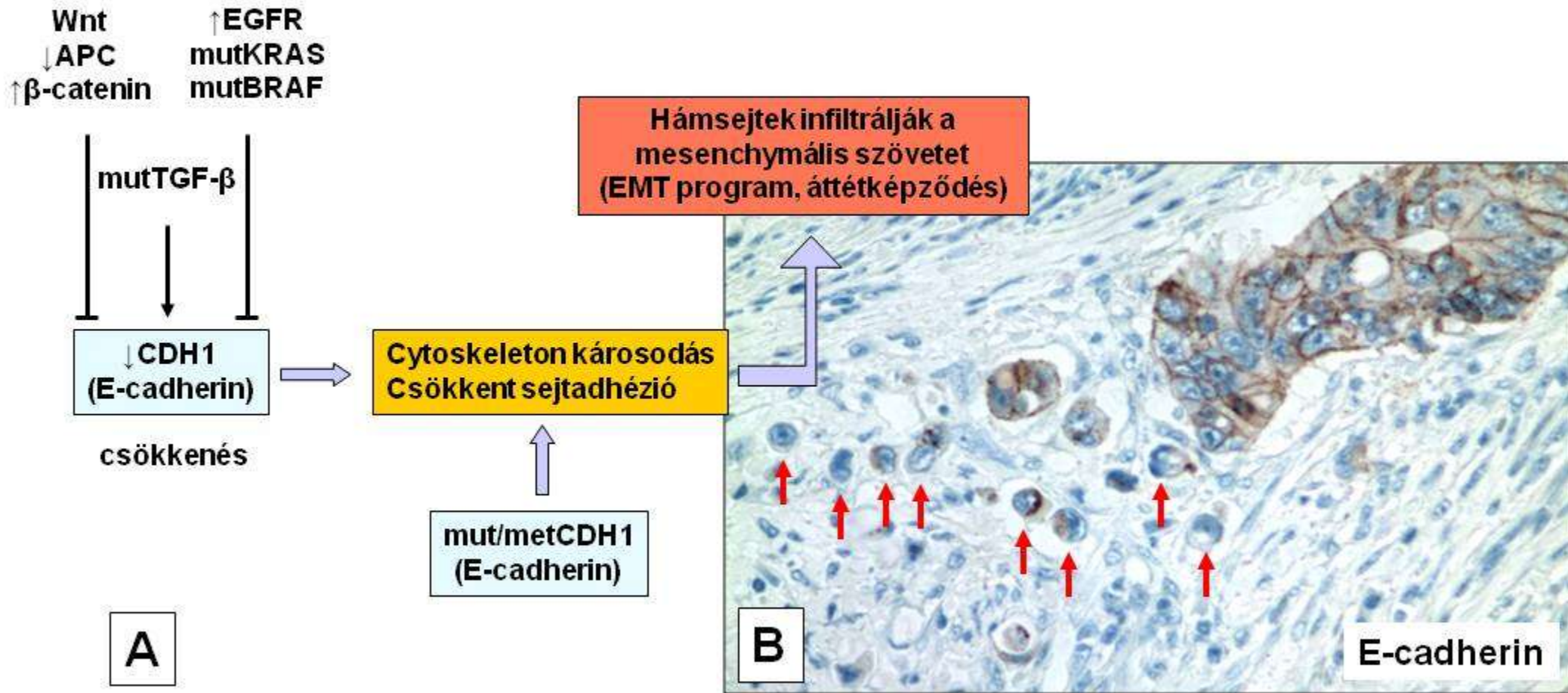
Az egyébként labilis p53  
fehérje post-translatios  
stabilizációja a nem  
daganatos sejtekben



MP 137/08



# Az „Epitelialis - Mesenchimális Trazició” (EMT) beindulását elősegítő genetikai változások vastagbél rákokban: az áttétképződés első lépése



# Reversibility of Epithelial-Mesenchymal Transition

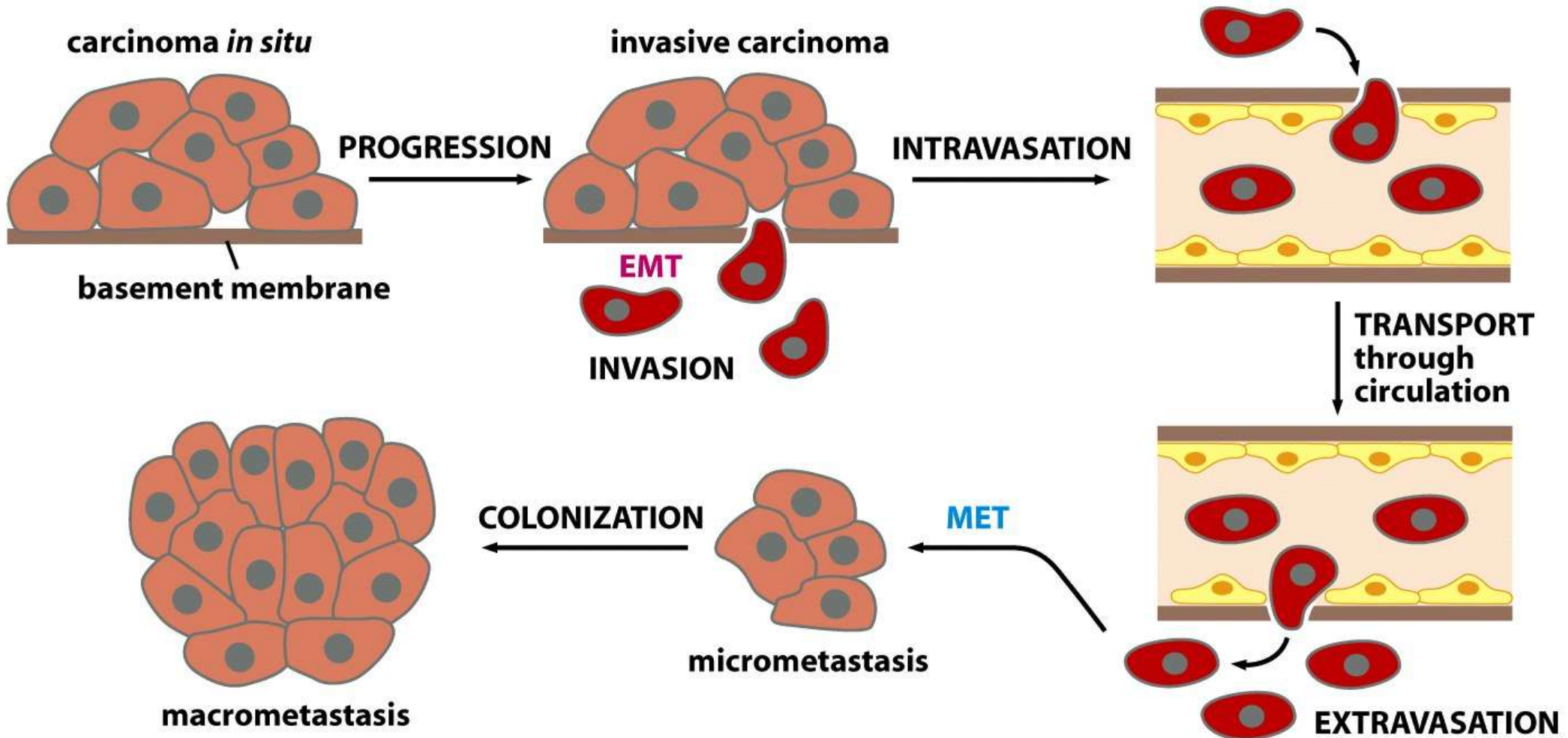
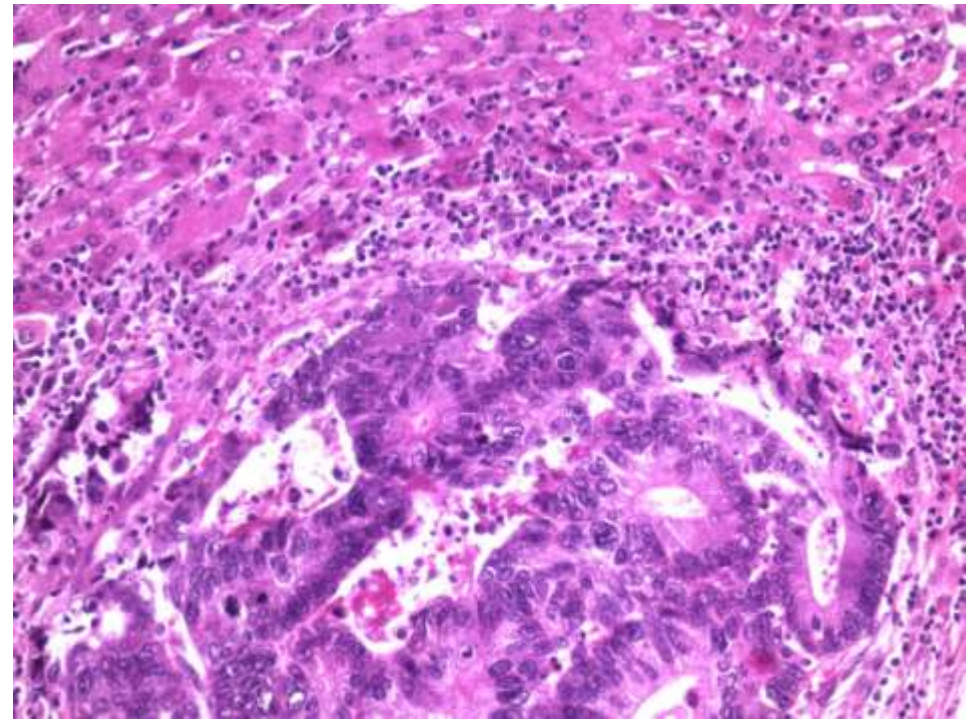
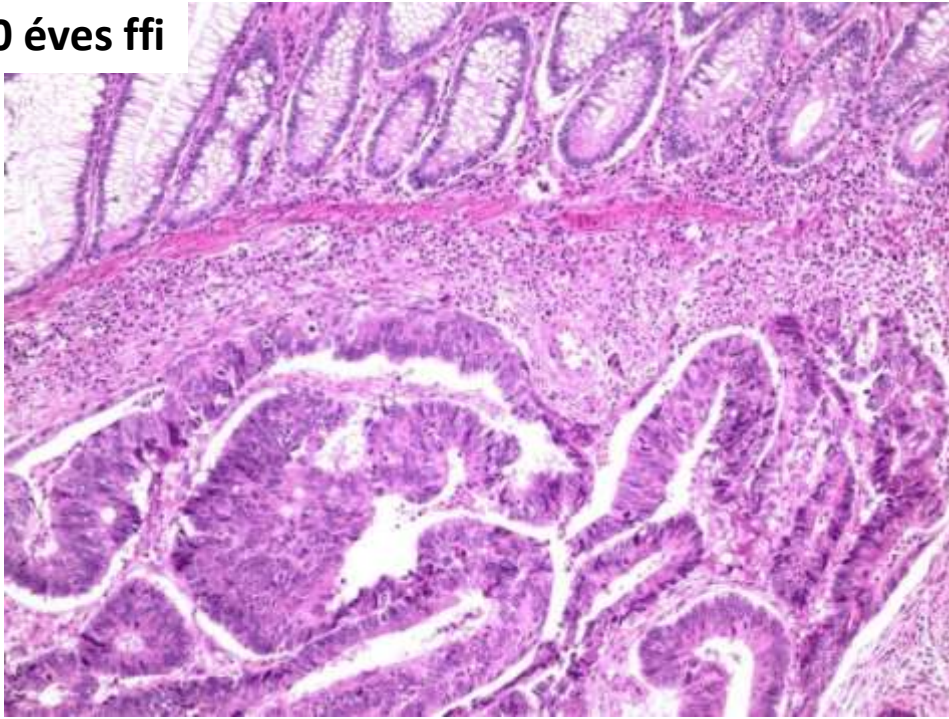


Figure 14-17b The Biology of Cancer (© Garland Science 2007)

# **A KRAS és BRAF mutáció analízis és/vagy az áttétből történjen?**

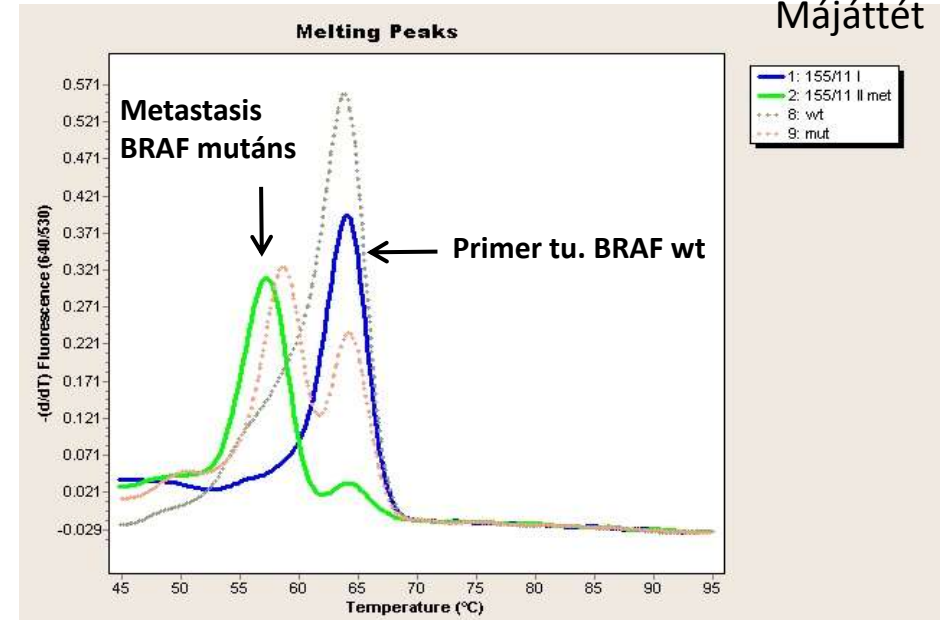
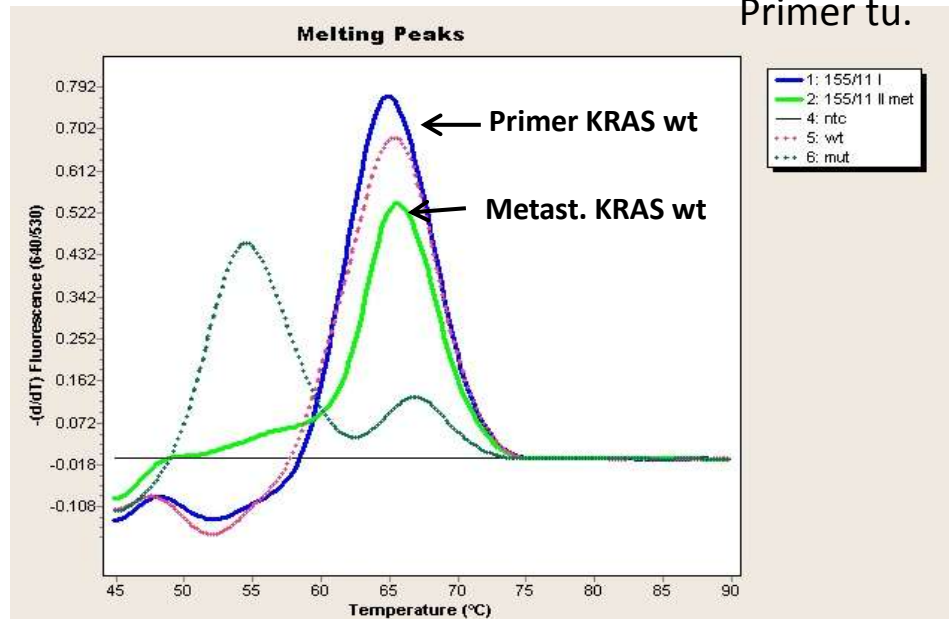
- 1. A KRAS mutáció státusa mindig ugyanaz volt a primer tumorban és az áttétben, vagyis ebben a tekintetben nem volt heterogenitás.**
- 2. A primer tumor a BRAF mutáció tekintetében heterogénnek bizonyult.**

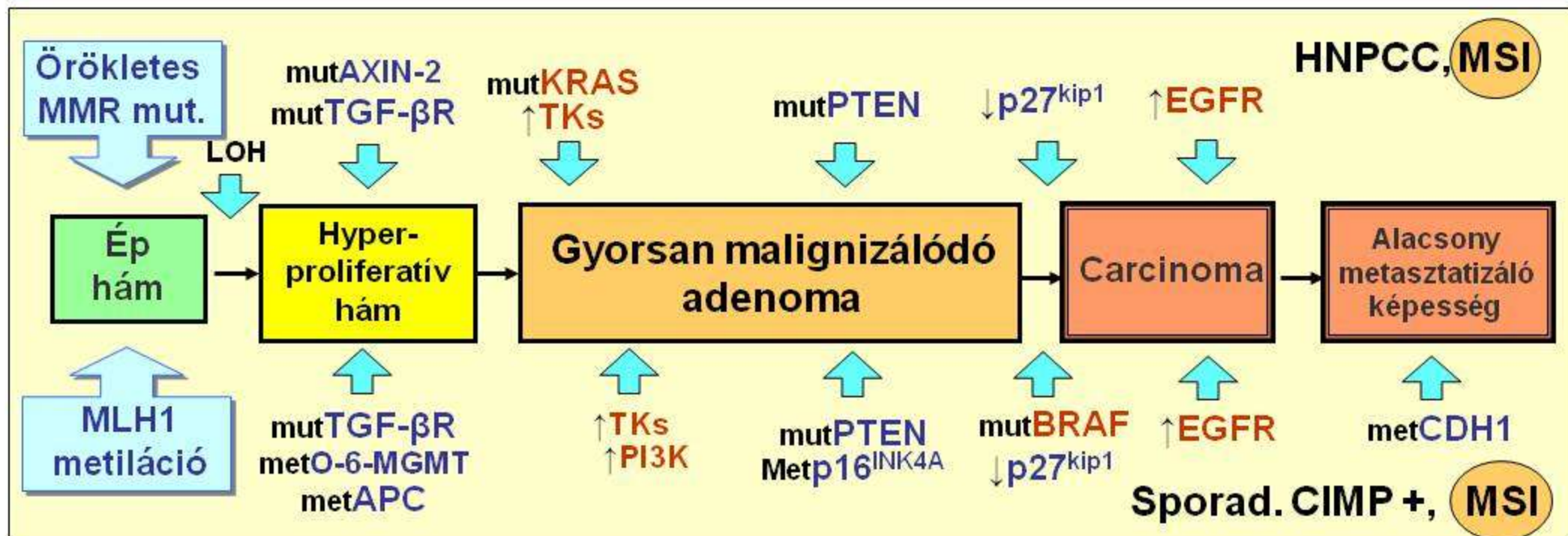
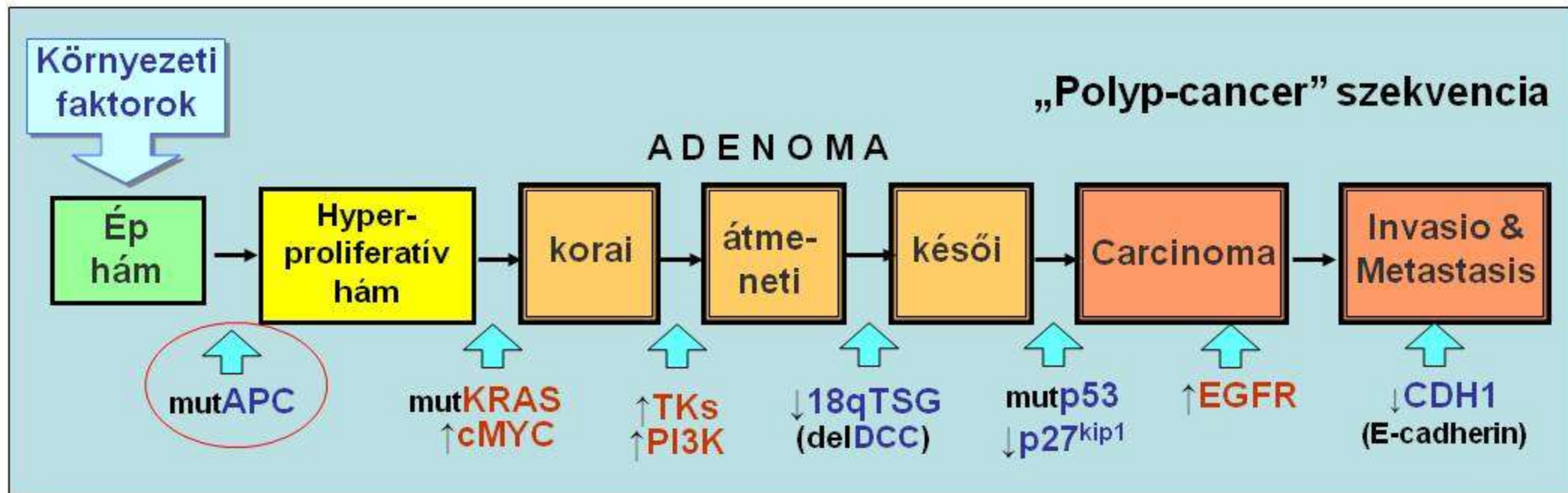
50 éves ffi



Primer tu.

Májjártét





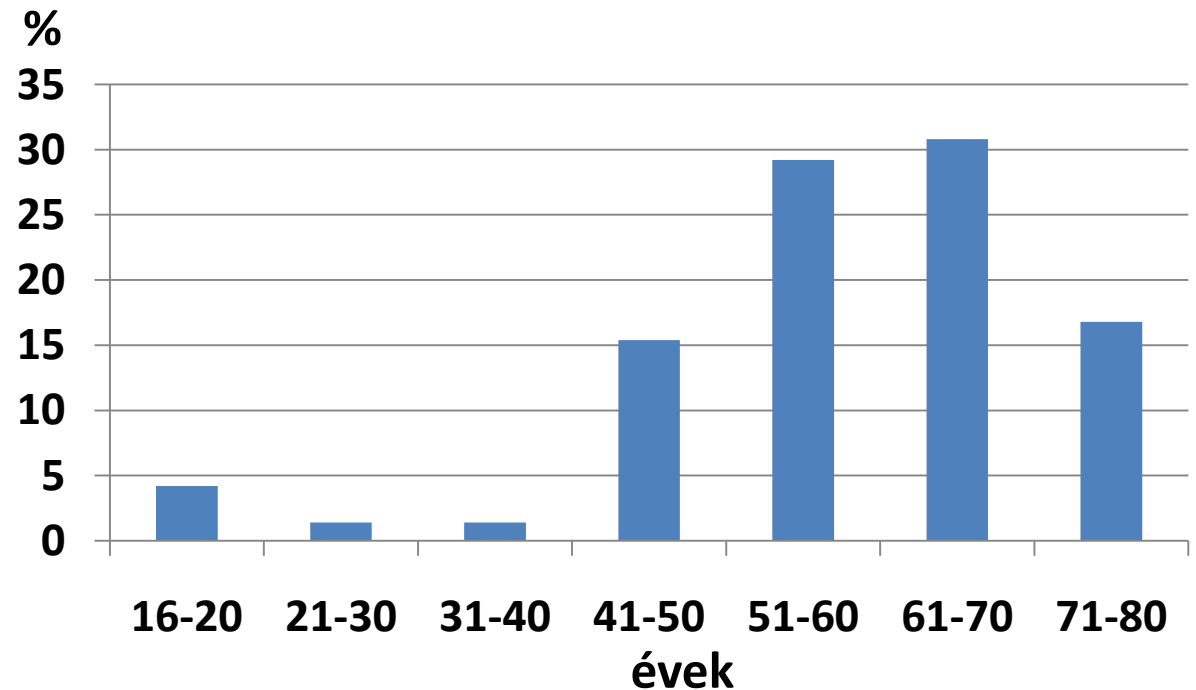
# Konklúziók

- 1. A genetikailag háromféle vastagbélrák típus kormegoszlása, lokalizációja, szövettani szerkezete, KRAS , BRAF mutáció és MSI státusa, kórlefolysa és a kemoterápiás kezelésre adott válasza egymástól jelentősen eltér.**
- 2. Az EGFR fokozott expressioja, a KRAS, BRAF és p53 mutáció és az MSI státus a p21 és p27 fehérjéken keresztül hat a a sejtciklus működésre és a metastasis képződés legkoraibb fázisára, az EMT-re.**
- 3. A sejtciklus szabályozás vizsgálata diagnosztikus és prognosztikus jelentőségű.**
- 4. A daganat genetikai heterogenitása miatt az egyénre szabott terápiához szükséges génmutációk vizsgálatát nem csak a primer tumorból, hanem az áttétből is ajánlatos elvégezni.**

# **Gastrointestinalis stromalis tumor (GIST)**

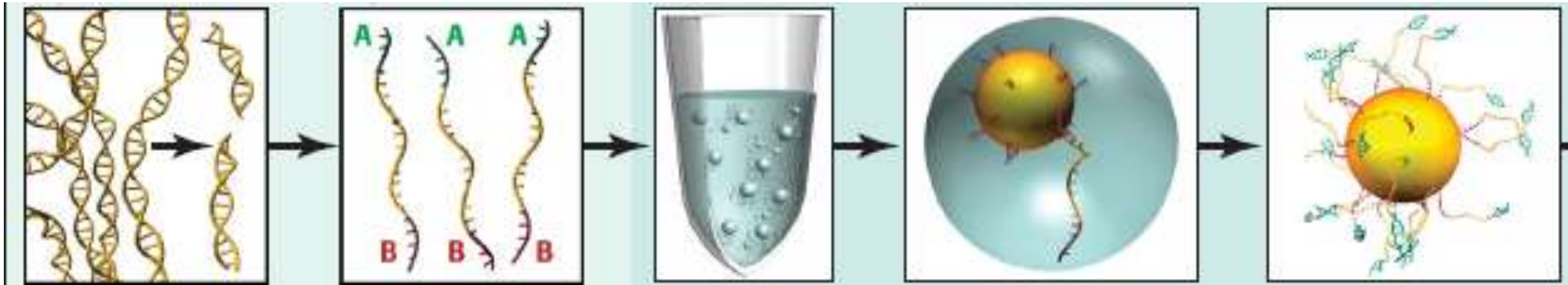
# Klinikopatológiai adatok

- A tumor minták száma: 74
- c-kit mutáns tumor 58 (78.4%), c-kit wt tumor 16 (21.6%)
- A szövettani dg. a c-kit és CD 34 immunhisztokémiára alapozott
- A betegek kormegoszlása:



# Módszerek

- Tumor minták gyűjtése az ország egész területéről és klinikopatológiai adatbázis szerkesztés.
- Diagnosztikus CD117 és CD34 immunhisztokémia és patológiai tumor prognosztikai besorolás.
- Automatikus DNS izolálás FFPE tumor szövetből MagNa Pure Compact készülék segítségével.
- A c-kit exon 9, exon 11, PDGFRA exon 12 és exon 18 gene régiók real-time PCR amplifikációja és mutáció vizsgálata:
  1. hagyományos olvadáspont analízis,
  2. Nagyfelbontású olvadáspont analízis,
  3. nagyfelbontású kapilláris gél-elektroforézis,
  4. hagyományos DNS szekvencia analízis segítségével.
- Egy c-kit wt GIST teljes genom pyroszekvenálása 454 Sequencing System (FLX Titanium) segítségével.
- Referencia szekvencia: hg19 human genom



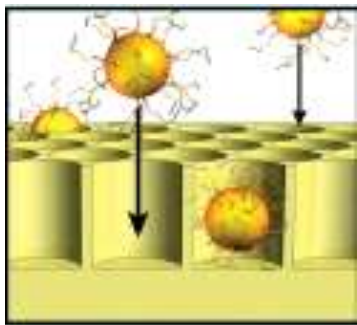
Izolált DNS fragment

Denaturált egyszálú DNS az univerzális primerekkel a végeken

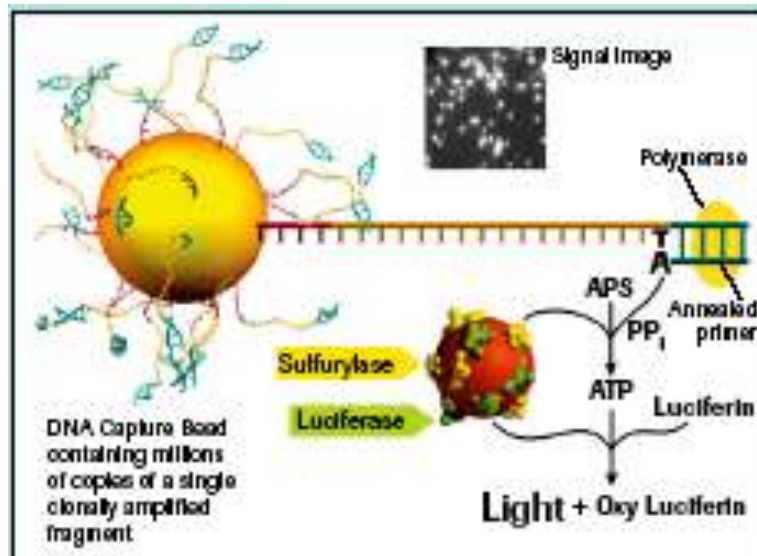
Emulzió

Szekvenáló gyöngyhöz kötött egyszálú DNS

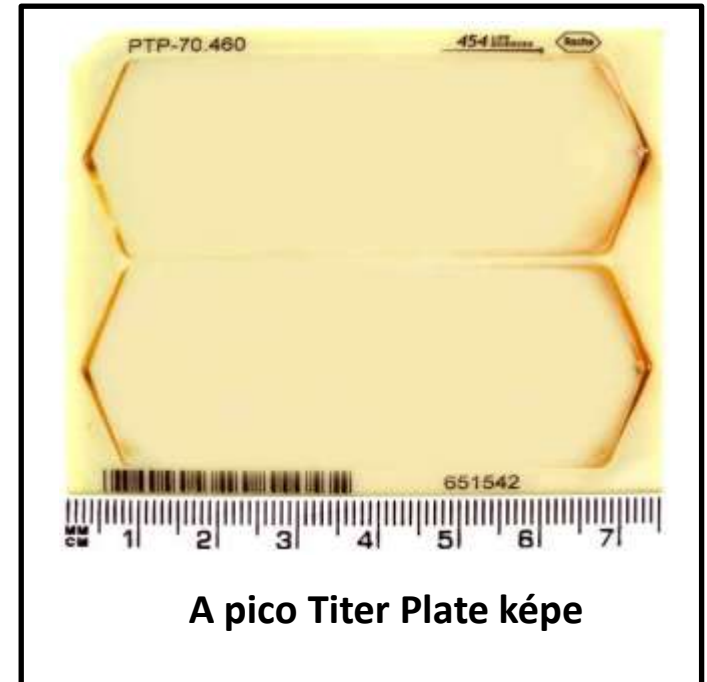
Klonális amplifikáció emPCR-rel



A Pico Titer Plate feltöltése szekvenáláshoz az előkészített gyöngyökkel



- Szekvenálás szintézissel külön-külön a gyöngyökön
- CCD kamera által rögzített fény szignál intenzitása arányos a beépült nucleotiddal.
- A szignál feldolgozásával a szekvencia megadható

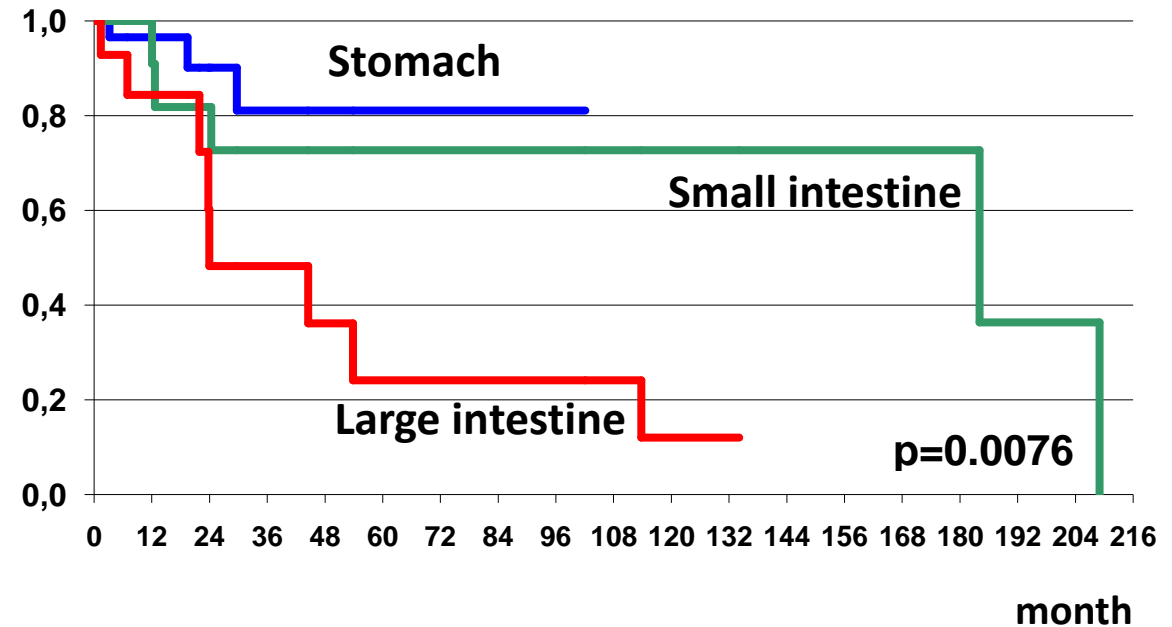


A pico Titer Plate képe

# Localization of GIST (No = 72)

Localization	Frequency (%)
Esophagus	2.8
Stomach	48.6
Small Intestine	26.4
Large Intestine	11.1
Extra-intestinal	6.9
Metastasis	4.2

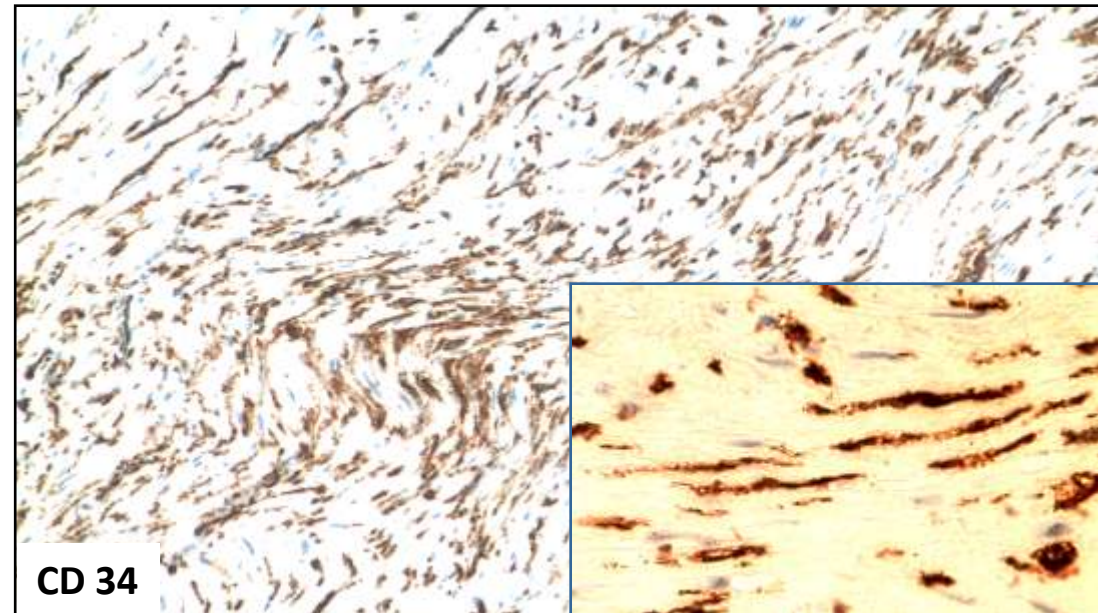
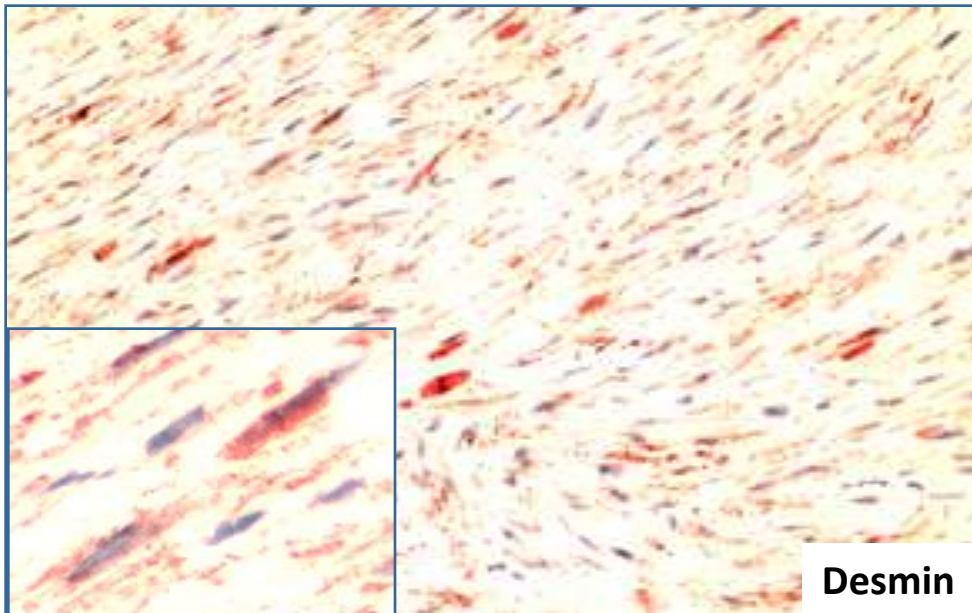
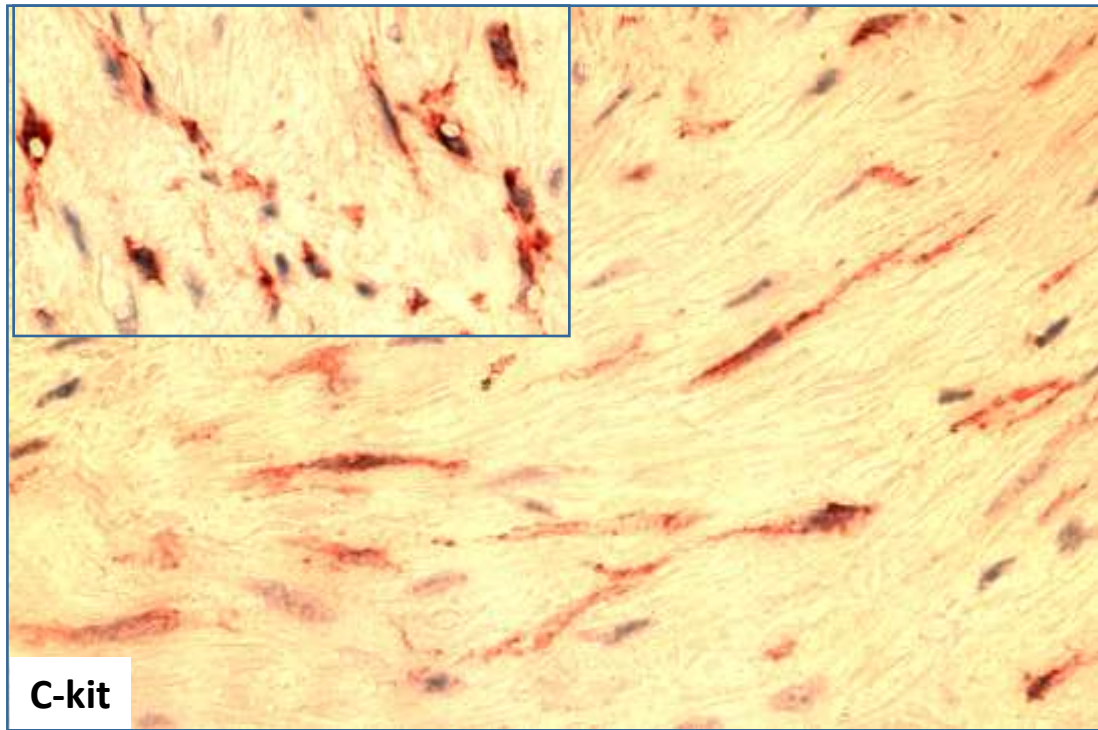
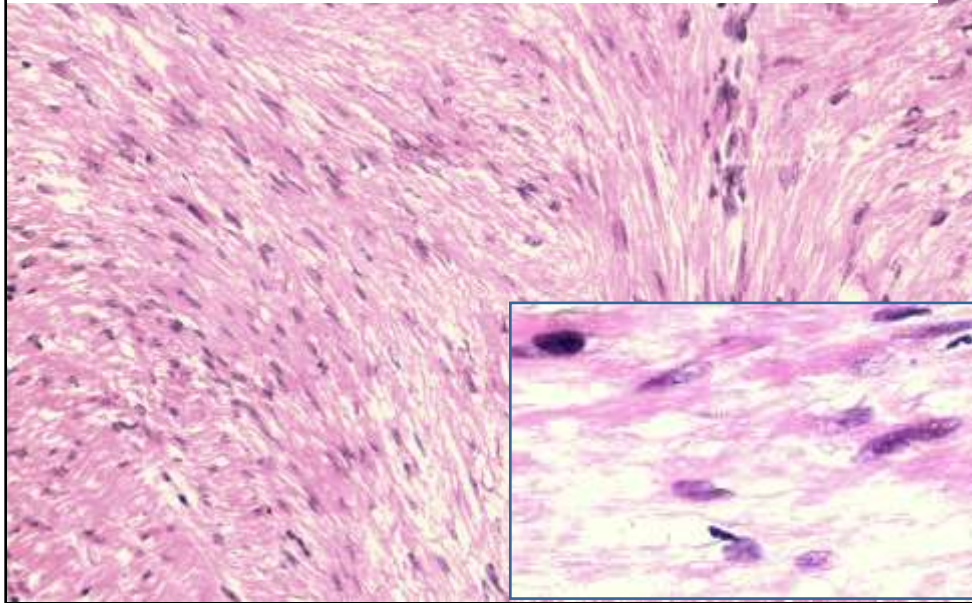
Kaplan-Meier probability survival function



# A szignifikáns mutációk megoszlása GIST-ben 74 tumor

Gleevec szenzitív mutációk, c-kit			Gleevec rezisztens mutációk, PDGFRA	c-kit és PDGFRA wt
Exon 9 pont mut & dupl	Exon 11 del	Exon 11 pont mut	Exon 18 pont mut & delins	
5 (6.8 %)	32 (43.2%)	15 (20.3 %)	8 (10.8 %)	9 (21.2 %)

65 éves nő, gyomor tumor,  
ckit mut negatív, PDGFRA 18. exon C2472C>T SNP



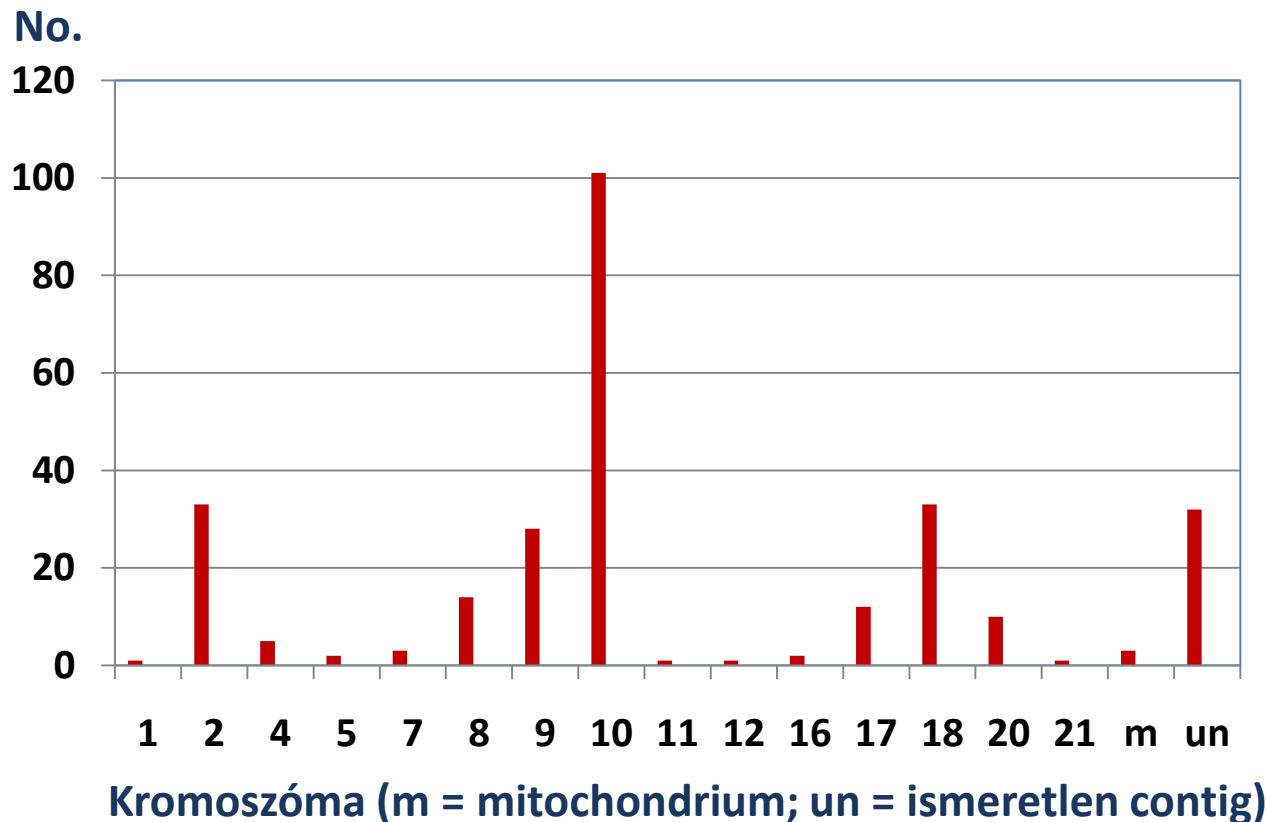
# 65 éves nő; c-kit negatív gyomor lokalizációjú GIST genetikai analízise a 454 Sequencing System segítségével -1

- **Formalin-fixált, paraffinba ágyazott tumorszövet**
- **Összes leolvasott szekvencia: 153 186**
- **Összes leolvasott bázis: 50 910 537**
- **Pontosan illeszkedő bázis: 48 609 392**
- **Illeszkedés a referencia szekvenciákhoz: 96.81 %**
- **Leolvasási hiba: 1.08 %**
- **Repetitív szekvencia: 6.99 %**
- **Chimerikus szekvencia 1.70 %**
- **Túl rövid fragment: 1.16 %**
- **Consensus pontosság: 99.8982 %**

# c-kit negatív gyomor lokalizációjú GIST genetikai analízise – 2

Ismeretlen SNP / kis genetikai eltérés: 340  
Szignifikáns előfordulás (>= 5 leolvasott szekvenciában): 279

>2 bázist érintő kis genetikai eltérés



Kromoszóma	Mutáció
8	A>GCAGAG
9	CTC>GCTT ATC>G AAGC>TAAGG
10	GAAT>AAAG
20	AAC>CAAG
mitochondrium	CCC>G

# c-kit negatív gyomor lokalizációjú GIST genetikai analízise – 3

Ismert SNP / kis genetikai eltérés: **1469**  
Coding frame: **4**

Lokalizáció	Gén szimbólum	Mutáció	Gén funkció
Chr 5	CTNND2	-/A ins	Adhesiv junctioval összefüggő fehérje, ami a hepatocytá GF hatására az E-cadherin alapú adherens junctio szét-esését okozza és ezzel elősegíti a sejtek szétszóródását. Fokozott expressióját prostata adenca.-ban mutatták ki..
Chr 5	MCC	-/GGA ins	Feltételezett colorectalis tumor supressor, a sejtciklus progressiot negatívan szabályozza
Chr 20	TSHZ2	A/T	Feltételezett transcriptios regulátor, a növekedési folyamatokban van szerepe.
Chr 18	ROCK1P1	C/T	Nem kódol RNS-t.

**CTNND2** = cadherin-associated neural plakophilin-related arm-repeat protein

**MCC** = mutated in colorectal cancers

**TSHZ2** = teashirt zinc finger homeobox 2

**ROCKK1P1** = homo sapiens Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1 pseudogene 1

# c-kit negatív gyomor lokalizációjú GIST genetikai analízise – 4

Nagyobb genetikai eltérések:	17
Chr 4:	1
Chr 8:	1
Chr 10:	7
Chr 11:	3
Chr 16:	1
Chr 18:	1

<b>chr10</b>		39094324+	TT-GTTCCAGTCCATTCCCTTTCGC-AGTCCATTCCATTTC-A-GT--CCA-TTCCATTTCGATTCCATTCCATTTCGACTCCG	
39094396				
			ins del                      del ins del ins del del ↓                                      ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓                                      ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓	
GPUG8IQ01AJAX8	(2)	295+	TT-GTTCCAGTCCATTCCCTTTCGC-GTCCATTCCATT-CCA--TTC-ACT-CCATTTCGATTCCATTTC	355
GPUG8IQ01BRJNR		276+	TTC-TTCCAGTCCATTCCCTTTCGC-GTCCATTCCATT-CCA--TTC-ACT-CCATTTCGATTCCATTCCA	338
GPUG8IQ01EZ4XZ		387+	TT-GTTCCAGTCCATTCCCTTTCGC-GTCCATTCCATT-CCA--TTC-ACT-CCATTTCGATTCCATTCCA	449
GPUG8IQ01BJP2O		270-	TT-GTTCCAGTCCATTCCCTTTCGC-GTCCATTCCATT-CCA--TTC-ACT-CCATTTCGATTCCATTCCA	208
GPUG8IQ01BPW2T		413+	TT-GTTCCAGTCCATTCCCTTTCGC-GTCCATTCCATT-CCA--TTC-ACT-CCATTTCGATTCCATTCCA	475
GPUG8IQ01C9AZH		378+	TT-GTTCCAGTCCATTTC-TTTCGC-GTCCATTCCATT-CCAC-TT-C-ACT-CCATTTCGATTCCATTCCA	439

# Konklúziók

1. Széles-skálájú szekvenálás lehetséges FFPE szövetmintából
2. Sokszor nehéz a carcinogenesis szempontjából jelentős és jelentéktelen (driver or passenger) mutációt megkülönböztetni, ezért egyszerre több hasonló daganatot szükséges vizsgálni.
3. Be kívánjuk vezetni a genom szekvenálást megelőző Sequence Capture Array eljárást, amelynek a segítségével a daganatos betegségben fontos gének kiválaszthatók. Jelenleg a 19 fontos génből nyolcnak a genetikai vizsgálatát végezzük.
4. **A most bemutatott tumorral kapcsolatos probléma:**
  - Patológiai diagnózis szerint GIST
  - Genetikai diagnózis: nem világos, hogy megfelel GIST-nek.
  - Mi legyen az esetleges kezelés legjobb módja?