



Mutace s dobrou prognózou, mutace se špatnou prognózou – omezené možnosti biologické léčby pro onkologické pacienty

J.Berkovcová, M.Dziechciarková, M.Staňková,
A.Janošťáková, D.Dvořáková, M.Hajdúch

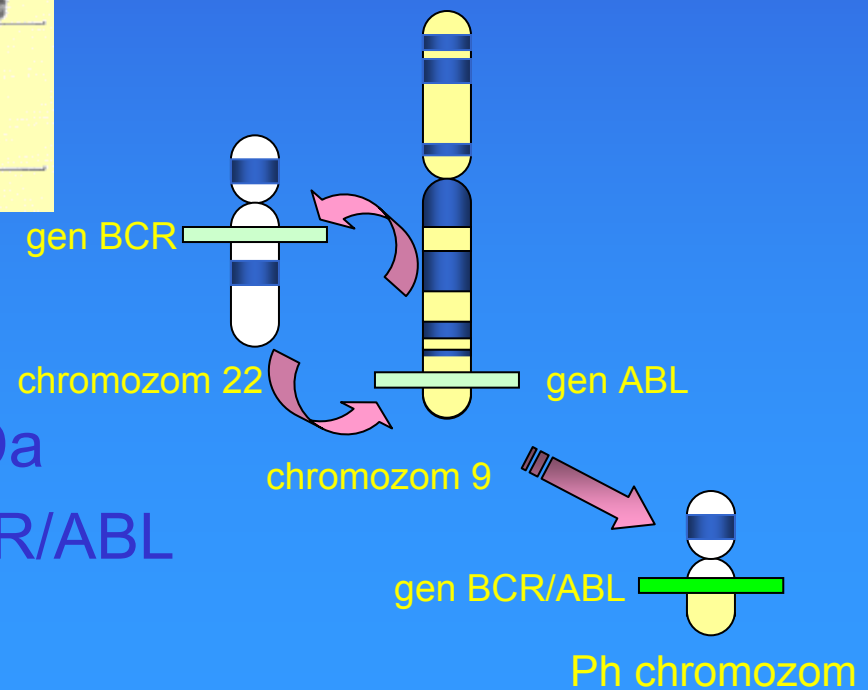
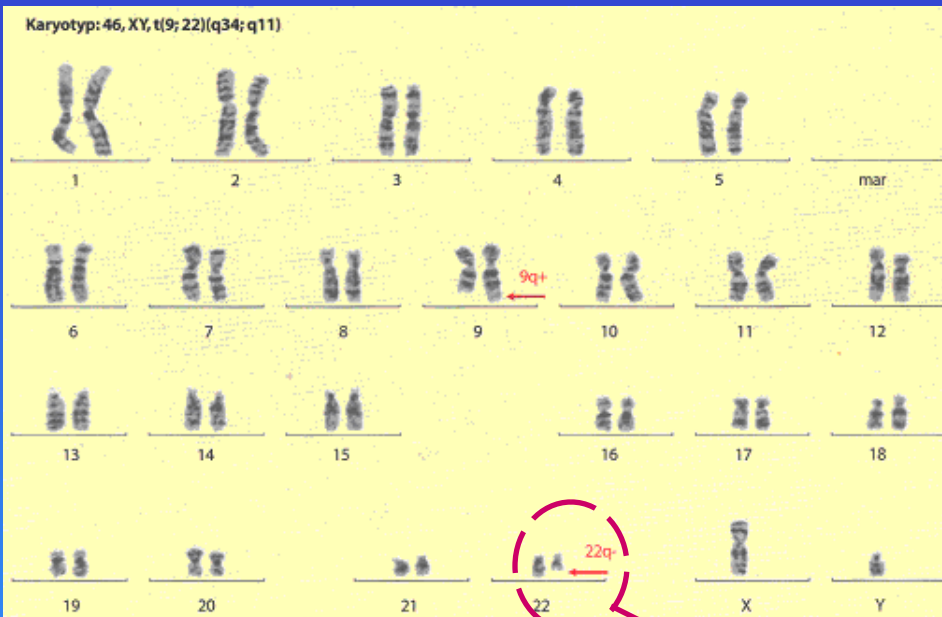
Laboratoř experimentální medicíny

www.lem-olomouc.cz

Biologická léčba

- Cílené působení na určitý protein
- monoklonální protilátky
- konjugáty ligand + toxin
- nízkomolekulární látky inhibující fosforylaci intracelulární části receptoru
 - ⇒ zastavení patologické signální dráhy
- Minimální toxicita proti standardní chemo a radioterapii
- Nová léčba = nové problémy

Chronická myeloidní leukémie



- ✓ 1986 ... objev proteinu 210kDa
produkt fúzního genu BCR/ABL
(Ben Neriah Y. *et al.*)

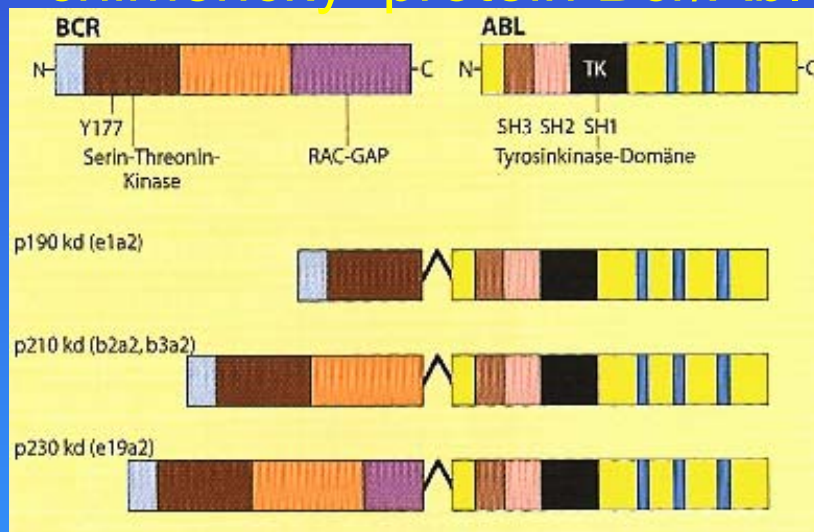


Imatinib mesylát – STI 571

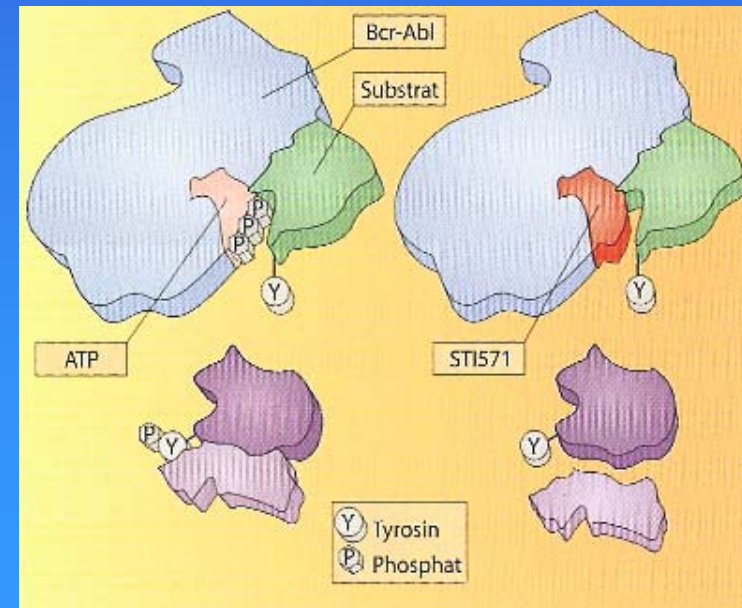
➤ reaguje na patologickou funkci nádorové buňky

➤ přináší nové problémy ...
REZISTENCE

chimerický protein Bcr/Abl



- ✓ tyrozinkinázová aktivita
- ✓ nekontrolovaná a konstitutivní fosforylace
- ✓ aktivuje řadu přenašečů různých signálních drah



inhibice tyrozinkinázy Bcr/Abl

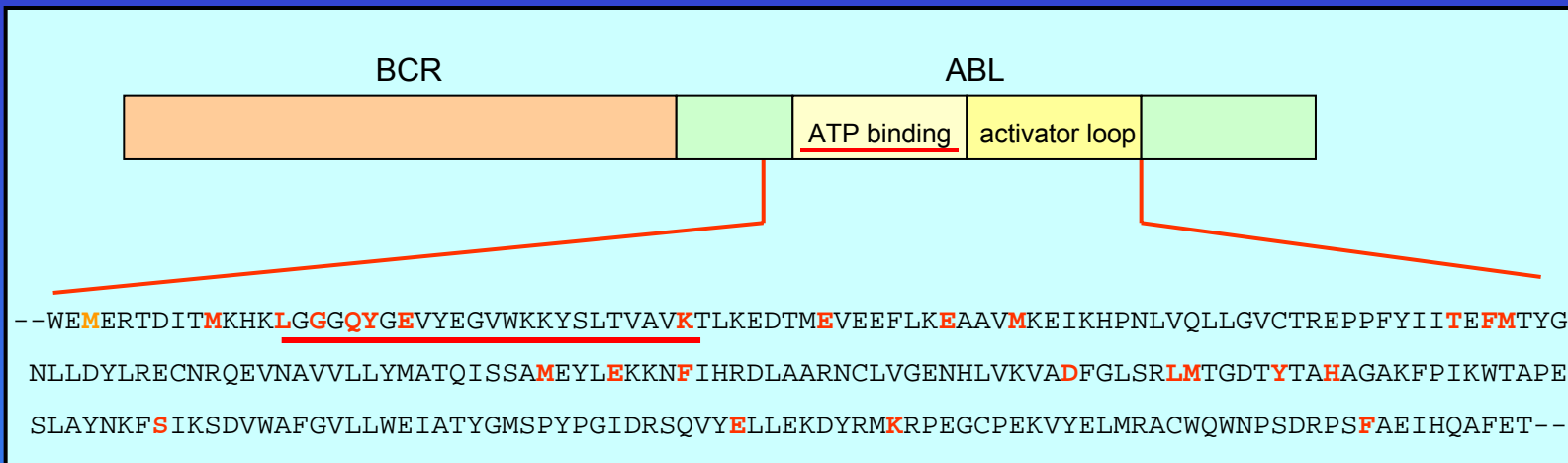
Mechanismus rezistence na imatinib

- 1) amplifikace BCR/ABL genu – zmnožení Ph chr.,
tandemové duplikace
overexprese BCR/ABL genu
- 2) bodové mutace ATP vazebné domény BCR/ABL genu
- 3) zamezení vstupu imatinibu do buňky:
 - ⇒ overexprese P-glykoproteinů
 - ⇒ overexprese Bcl-X_L
 - ⇒ overexprese α -1 acid glykoproteinů

Progrese CML po terapii imatinibem

- ⇒ imatinibu zamezena vazba ke katalytické Abl doméně proteinu Bcr/Abl
- ⇒ leukémie na Bcr/Abl kináze nezávislá

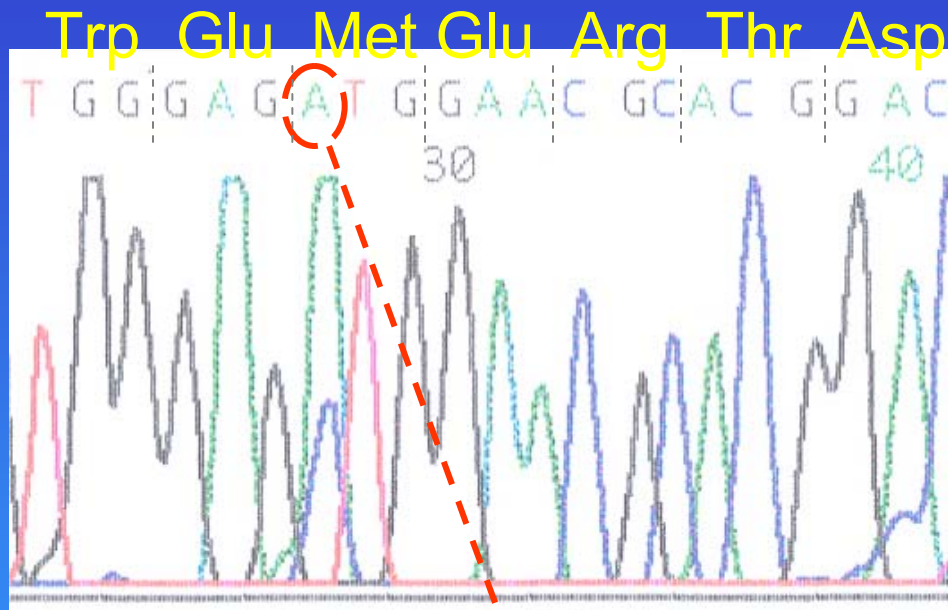
Bodové mutace v katalytické doméně Bcr/Abl



1. bodové mutace v oblastech interakce k imatinibu
⇒ přímé znemožnění vazby
2. bodové mutace v přilehlých oblastech
⇒ změna konformace proteinu



Detekce mutace M244L



gen. kód ATG => Met ...

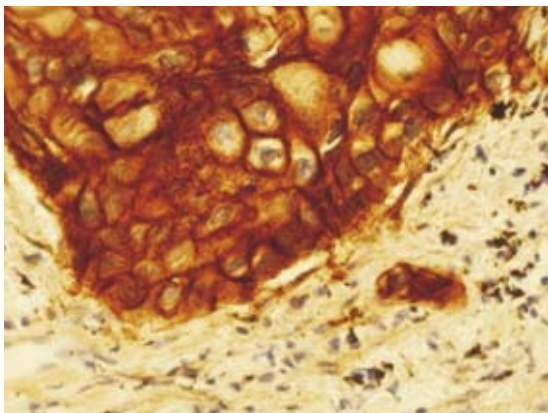
polární aminokyselina

gen. kód CTG => Leu ...

neutrální aminokyselina

=> změna struktury kinázové
domény ABL

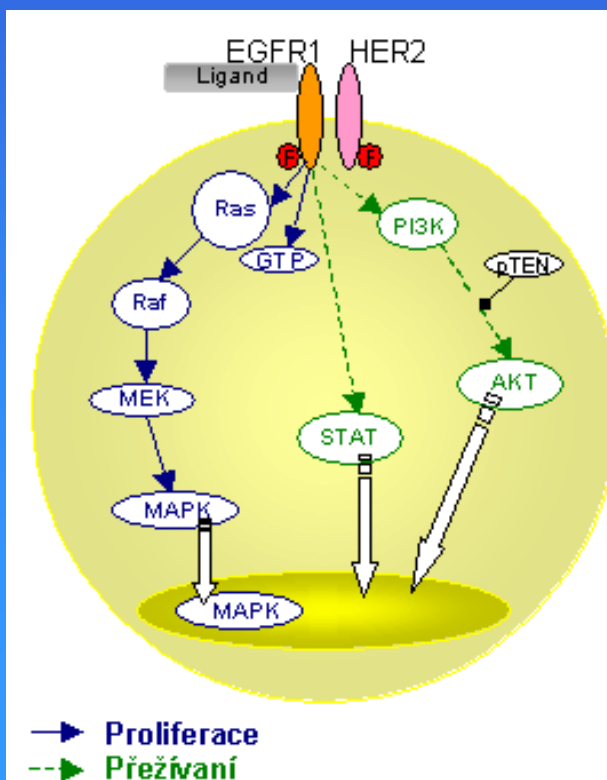
Relaps onemocnění → další inhibitory???



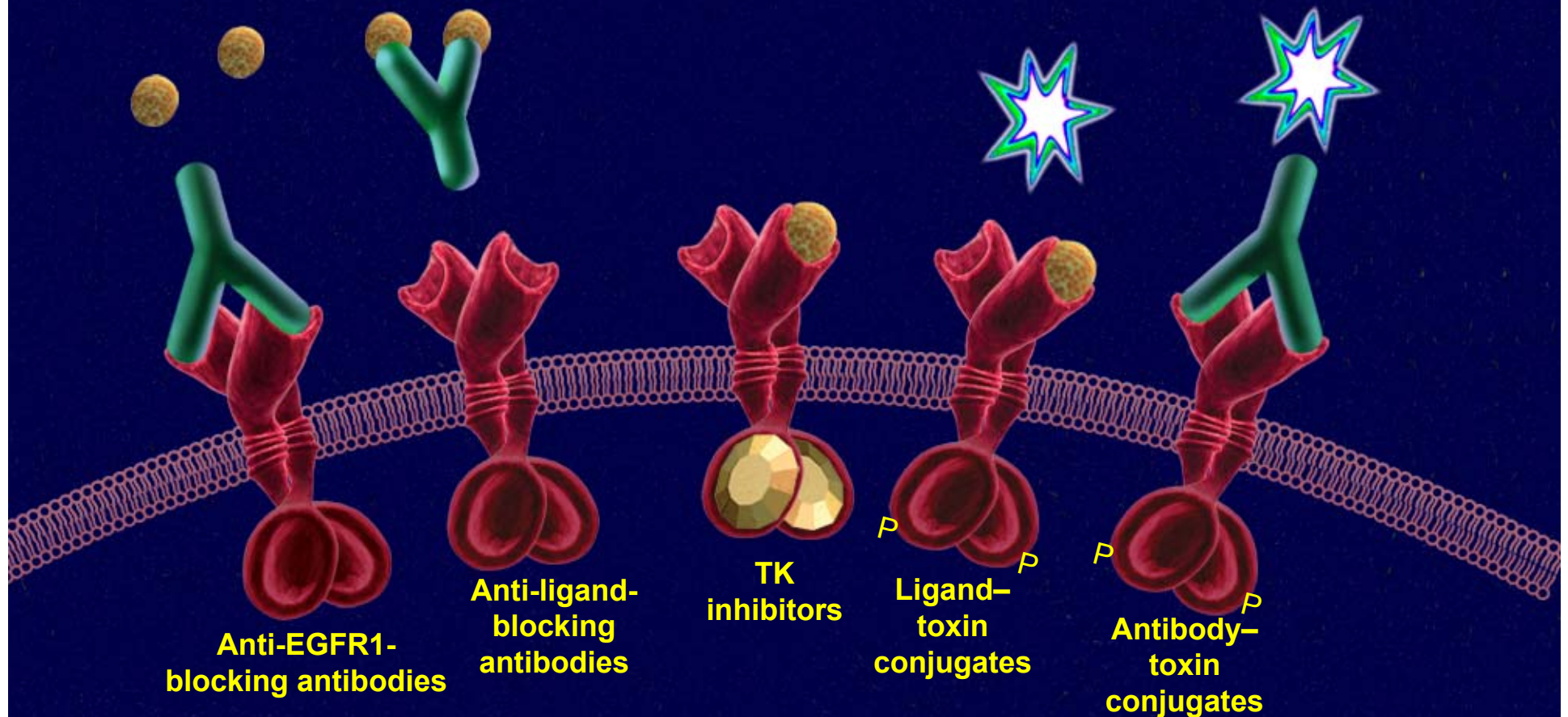
Overexprese Egfr1 u nádorů epiteliálního původu

Head & neck	80-100%
Renal cell	50-90%
NSCLC	40-80%
Glioma	40-50%
Ovarian	35-70%
Pancreatic	30-50%
Colorectal	25-77%
Breast	14-91%
Gastric	40%

- Signální dráha AKT a STAT
 - přežívání buněk
- Signální dráha MAPK
 - proliferace buněk



Cílené působení na Egfr1



Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. *N Engl J Med.* 2001;344:783-792; Mendelsohn J, Baselga J. *Oncogene.* 2000;19:6550-6565; Noonberg SB, Benz CC. *Drugs.* 2000;59:753-767; Raymond E, Faivre S, Armann JP. *Drugs.* 2000;60(Suppl 1):15-23; Arteaga C. *J Clin Oncol.* 2001;19:32s-40s; Pedersen MW, Meltom M, Damstrup L, et al. *Ann Oncol.* 2001;12:745-760.

Patologická aktivace Egfr1

- Amplifikace genu *egfr1*
- Overexprese genu *egfr1*
- Aktivující mutace tyrozinkinázové domény

Používané preparáty

TK inhibitory:

Iressa (gefitinib, ZD1839) ... NSCLC

Tarceva (erlotinib, OSI774) ... NSCLC

Humanizované protilátky:

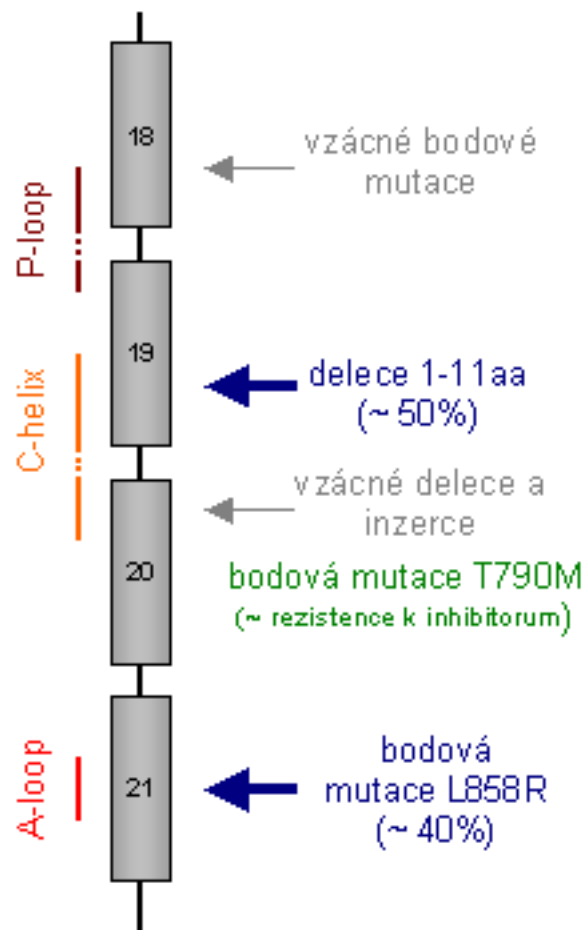
Erbitux (cetuximab) ... metastazující kolorektální ca

Vectibix (panitumumab) ... metastazující kolorektální ca

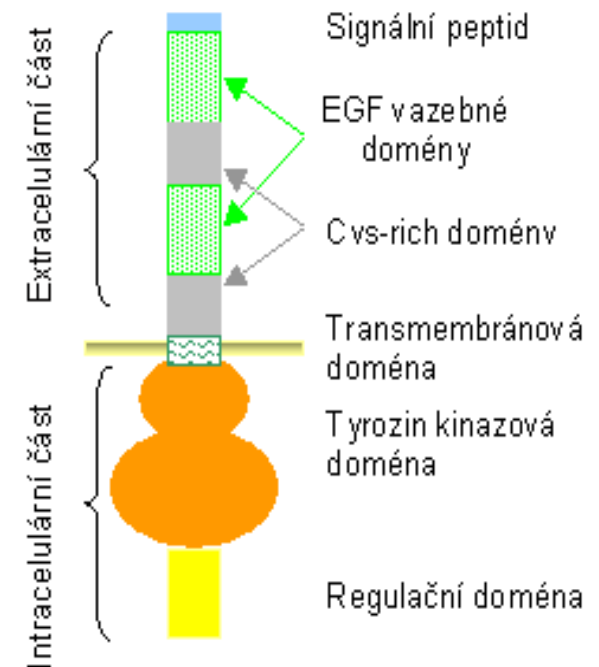
Nízkomolekulární inhibitory tyrozinkináz

Inhibitor	Cílová tyrozinkináza	IC ₅₀ (nM) k inhibici kinázové aktivity	Typ nádorového onemocnění	Klinické postavení
Imatinib mesylát (STI 571, Glivec)	Bcr/Abl C-kit Pdgfr	100 100 100	CML GIST	schváleno
Gefitinib (ZD1 839, Iressa)	Egfr1	33	NSCLC	schváleno
Erlotinib (OSI 774, Tarceva)	Egfr1	2	NSCLC	schváleno
Lapatinib (GW 572016)	Egfr1 Her2	10 98	nádory prsu další solidní nádory	Fáze II
Canertinib (CI-1033)	Egfr (ne selektivní)	17 (EGFR1) 9 (HER2)	nádory prsu	Fáze III
Semaxinib (SU 5416)	Vegfr2 C-kit Ft3	1040 - -	AML	Fáze III
Vatalanib (PTK787/ZK222584)	Vegfr1 Vegfr2	77 37	kolorektální karcinomy nádory prostaty a ledvin	Fáze III
Sutent (SU 11248)	Vegfr Pdgfr Kit Ft3	10 10 - -	GIST nádory ledvin	Fáze III
Sorafenib (BAY 43-9006)	B-raf Vegfr2	38 90	nádory ledvin maligní melanomy	Fáze II/III
Leflunomide (SU 101)	Pdgfr	65	nádory prostaty	Fáze II/III

Aktivující mutace Egfr1



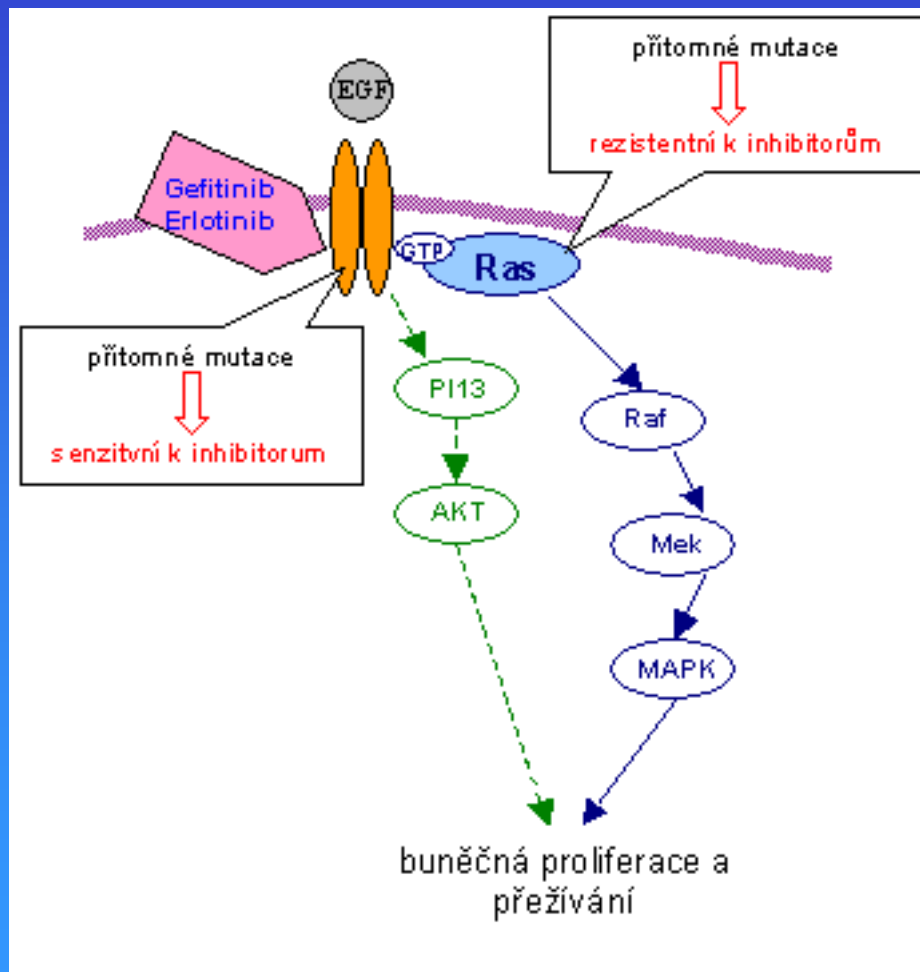
Struktura tyrozinkinázové domény genu *egfr1* a znázornění popsaných aberací



- Přítomné v tyrozinkinázové části receptoru
- Bodové mutace
→ záměna aminokyselin
- Delece (spojené s inzercí) bez posunutí čtecího rámce

Rezistence k inhibitorům

- odpověď na léčbu u < 10% pacientů s NSCLC



Jeden z důvodů

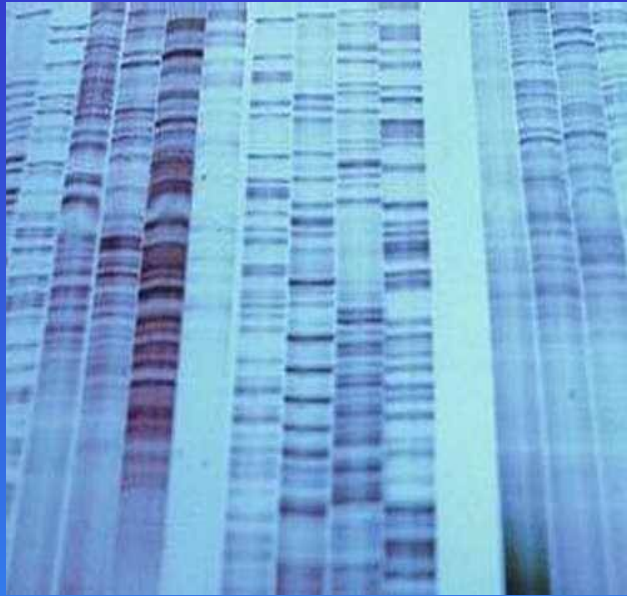
- mutace v genu *k-ras*
(v dalších členech signální dráhy?)
- Velikost 21 kDa
- GTP-vázající protein
- Tvorba různých isoform v tkáních
- Součást transdukční kaskády
- Účastní se přenosu signálu

Mutace ve 12 a 13 kodonu

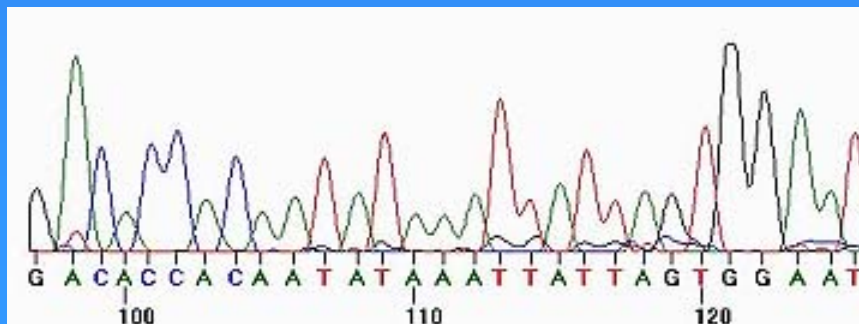
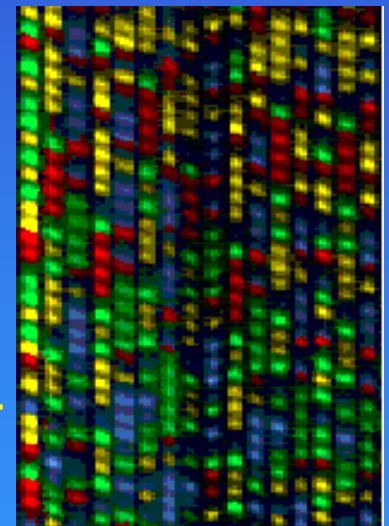
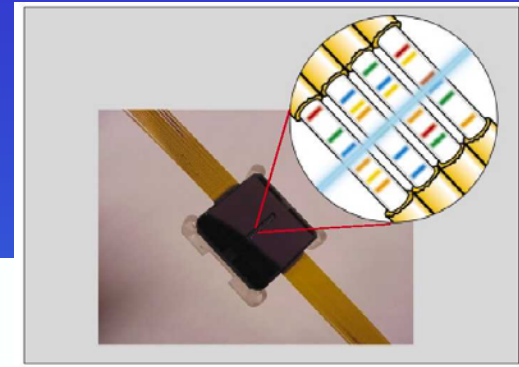
	Val	Gly	Ala	kodon		Val	Gly
				12	13		
	Val	Gly	Ala	Gly	Gly	Val	Gly
	GTT	GGA	GCT	GGT	GGC	GTA	GGC
K. asparagová	GTT	GGA	GCT	GAT	GGC	GTA	GGC
Valin	GTT	GGA	GCT	GTT	GGC	GTA	GGC
Serin	GTT	GGA	GCT	AGT	GGC	GTA	GGC
Cystein	GTT	GGA	GCT	TGT	GGC	GTA	GGC
Arginin	GTT	GGA	GCT	CGT	GGC	GTA	GGC
Alanin	GTT	GGA	GCT	GCT	GGC	GTA	GGC
K. asparagová	GTT	GGA	GCT	GGT	GAC	GTA	GGC

- celkově špatná prognóza
- rezistence na konvenční chemoterapii

Automatizace čtení



značení radioaktivně →
„ruční“ čtení

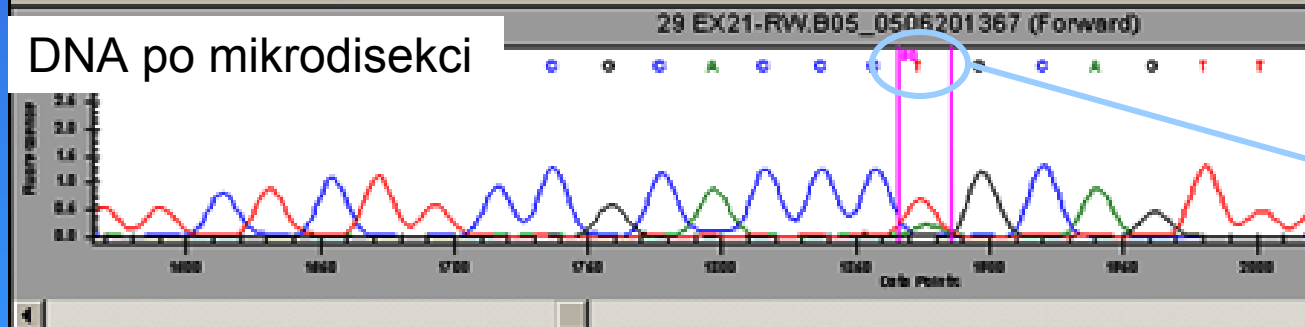


fluorescenční značení →
automatické čtení

Úskali sekvenace

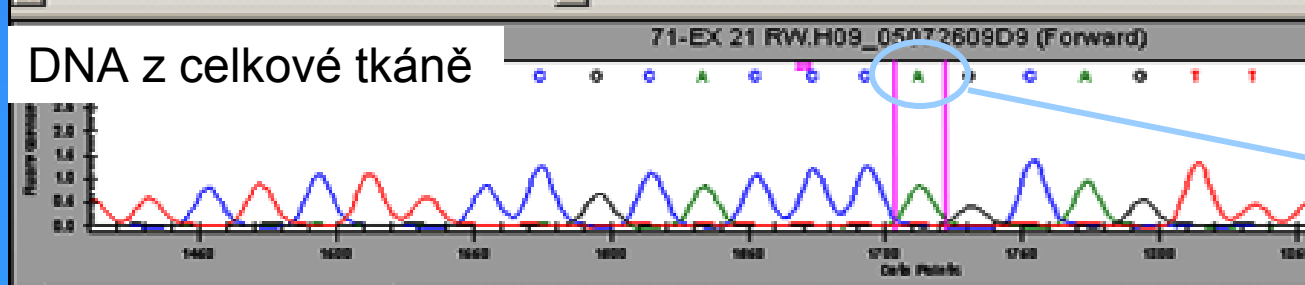
Codon Number	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
Reference AA Tr	F	F	L	F	R	T	Q	Q	F	G	Q	
EGFR exon 21 RW	A	TTC	TTT	CTC	TTC	CGC	ACC	CAG	CAG	TTT	GGC	CAG
29 EX21-RW.B05	A	TTC	TTT	CTC	TTC	CGC	ACC	CTG	CAG	TTT	GGC	CAG
71-EX 21 RW.H09	A	TTC	TTT	CTC	TTC	CGC	ACC	CAG	CAG	TTT	GGC	CAG
Differences							!					
Consensus	A	TTC	TTT	CTC	TTC	CGC	ACC	CAG	CAG	TTT	GGC	CAG
Consensus AA Tr	F	F	L	F	R	T	LQ	Q	F	G	Q	

DNA po mikrodisekci



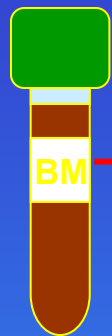
aberrantní nukleotid (T)

DNA z celkové tkáně



wt nukleotid (A)

Metoda detekce bodových mutací



izolace RNA

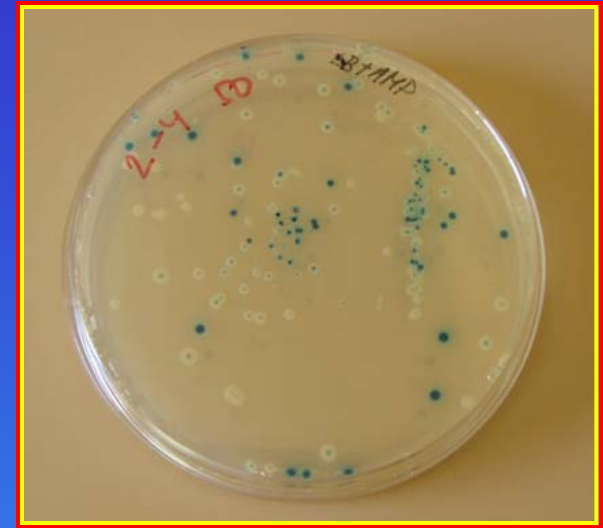
reverzní transkripce

PCR

sekvenace PCR produktu

ligace plazmidu,
transformace bakterií

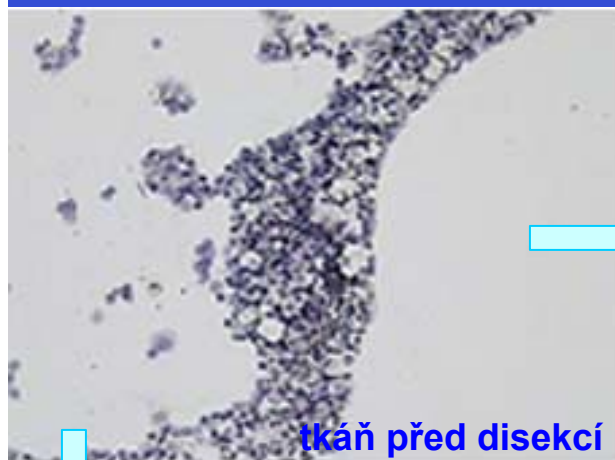
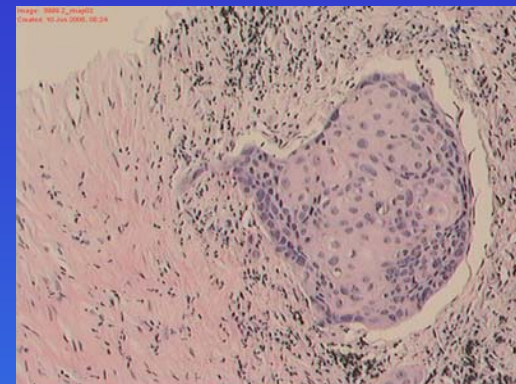
sekvenace pozitivních kolonií





Zpracování materiálu

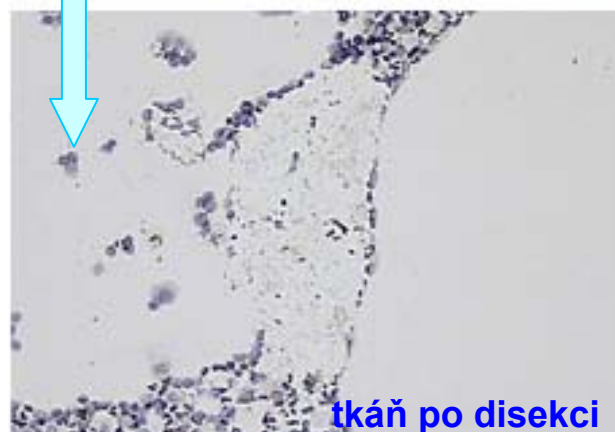
- zamražená nádorová tkáň
- parafinové bločky
- cytologické preparáty



tkáň před disekcí



selekce buněk k disekci

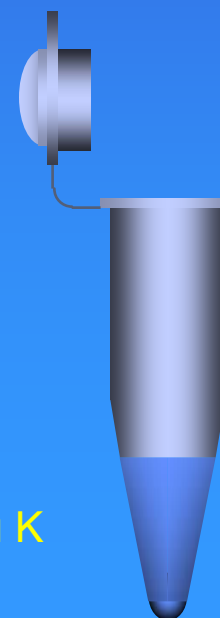


tkáň po disekci



uchycení buněk na víčku

natrávení buněk proteinázou K
uvolnění DNA do roztoku



Autorský kolektiv: Podporováno:

Jitka Berkovcová
Marta Dziechciarková
Marcela Staňková
Anna Janošťáková
Dana Dvořáková
Marián Hajdúch

firmou Astra-Zeneca
granty: MSM6198959216
IGA MZCR NC7506-3
NC7495

Děkuji za pozornost

