

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



GENOTYPIZACE GENU *EGFR* U PACIENTŮ S KARCINOMEM

Diplomová práce

Bc. Hana Nosková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2011

Vedoucí práce: doc. Mgr. Jiří Drábek, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem předkládanou diplomovou práci zpracovala samostatně za použití citované literatury a pod odborným vedením doc. Mgr. Jiřího Drábka, PhD.

V Olomouci dne 2.8. 2011

.....

(podpis)

Poděkování

V první řadě bych chtěla poděkovat svému vedoucímu práce panu **doc. Mgr. Jiřímu Drábkovi, PhD.** za odborný dohled při zpracování této práce, pomoc při plánování experimentů a jejich průběhu, a dále za trpělivost a čas, který mé práci věnoval. Dále děkuji dalším důležitým lidem z DNA laboratoře LEM, bez kterých bych si mnohdy nevěděla rady, a to paní **Miroslavě Rabčanové, Veronice Holinkové, DiS., Mgr. Janě Stránské, PhD.** a **Mgr. Silvii Jančík** a to především za praktickou pomoc – extrakci DNA a WGA, práci na genovém analyzátoru, a v neposlední řadě za vytvoření skvělé pracovní atmosféry. Za pomoc při statistickém zpracování výsledků děkuji Mgr. Lence Radové, PhD.

Zvláštní poděkování bych chtěla věnovat své rodině, a to zejména mamince Haně Noskové a babičce Jaroslavě Žárské, za umožnění studia a psychickou podporu.

Experimentální práce byly prováděny s podporou grantu OPVVI
CZ.1.05/2.1.00/01.0030 a MPO TIP FR-TI1/525.

Souhrn

EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor – také HER1 a ERBB) je transmembránový receptor s tyrozin-kinázovou aktivitou ERBB2 rodiny, jehož aktivace po vazbě příslušného ligandu vede ke spuštění dráhy intracelulární signalizační kaskády, která ovlivňuje expresi řady genů podílejících se na buněčné proliferaci. Pro některé typy nádorových onemocnění je typická zvýšená aktivita této EGFR signální dráhy, což přispívá jak k proliferaci nádorových buněk, tak k růstu nádoru, jeho invazivitě a krevnímu zásobení, tvorbě metastáz a inhibici apoptózy buněk. Mezi tato onemocnění patří také nemalobuněčný karcinom plic (NSCLC), který se vyskytuje přibližně u 80 % případů pacientů s karcinomem plic. Jedná se o agresivní nádor, který je v dnešní době nejčastější příčinou úmrtí na rakovinu. Mutace v genu *EGFR*, zejména ty, které se nacházející v jeho tyrosinkinázové doméně v exonech 18 – 21, se významně podílejí na projevu onemocnění, tzn. jeho závažnosti a zároveň určují možnosti jeho léčby.

Cílem teoretické části práce bylo seznámení se se současnou problematikou genu *EGFR* a proteinu EGFR, možnostech léčby nádorového onemocnění pomocí látek namířených proti EGFR a metodami umožňujícími detekci mutací v genu *EGFR*. Praktická část práce byla zaměřena na optimalizaci kvantitativní real-time analýzy pro jednoduchou a citlivou detekci 19 nejčastějších typů delecí v exonu 19 a bodové mutace L858R (2573T>G) v exonu 21, které společně tvoří až 90 % část všech mutací genu *EGFR* s aktivovanou tyrozin-kinázovou aktivitou a porovnat data pacientů vyšetřených na přítomnost mutace v genu *EGFR* v LEM při Dětské klinice, Lékařská fakultě Univerzity Palackého a FN v Olomouci s daty získanými celosvětovými studiemi.

Summary

EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor – also HER1 and ERBB) is a transmembrane receptor with tyrosine-kinase activity, whose activation by the ligand binding leads to starting up of the intracellular signaling cascade, which affects the expression of many genes involved in the cell proliferation. Some types of cancer are characterized by increased activity of the EGFR signaling pathway, which contributes to the proliferation of tumor cells and the tumor growth, invasiveness and its blood supply, metastasis and inhibition of apoptosis of cells. Non-small cell lung cancer (NSCLC) also belongs to these diseases occurring in about 80% of patients with lung cancer. NSCLC is an aggressive tumor that is currently the most common cause of death from cancer. *EGFR* mutations, especially those located in its tyrosine-kinase domain in exons 18 to 21, significantly contribute to the symptoms and severity of disease, and also determine options of treatment.

The theoretical part's aim of this thesis was to get familiar with current knowledge of *EGFR* gene and EGFR protein, treatment options by using EGFR antagonists and current possibilities in detection of mutations in *EGFR* gene. The practical part was focused on the optimization of quantitative real-time PCR assay for simple and sensitive detection of 19 most common types of deletions in exon 19 and single nucleotide substitution L858R (2573T > G) in exon 21, which together make up 90 % of all tyrosine-kinase activating *EGFR* mutations. This thesis also compares data of patients examined for *EGFR* mutations in Laboratory of Experimental Medicine associated with Children's Clinique, Medical Faculty of Palacky University and Faculty Hospital in Olomouc, with data gained in global studies.

Obsah

1 Úvod	10
2 Současný stav problematiky	12
2. 1 Gen <i>EGFR</i> a protein EGFR	
2. 2 Signalizace EGFR	13
2. 2. 1 Signalizace EGF – MAPK	14
2. 2. 2 Signalizace EGF – PI3K	14
2. 2. 3 Signalizace EGF – STAT	15
2. 3 Molekulární biologie mutací v genu <i>EGFR</i>	16
2. 4 Nádorová onemocnění plic	17
2. 4. 1 Molekulární mechanismy vzniku rakoviny plic	19
2. 4. 1. 1 Role genu EGFR při vzniku nádorového onemocnění	21
2. 4. 1. 1. 1 Ras – Raf – Mek	21
2. 4. 1. 1. 2 PI3K – Akt – mTOR	22
2. 4. 1. 1. 3 Angiogeneze	22
2. 5 Látky namířené proti EGFR používané v léčbě rakoviny plic	22
2. 5. 1 Vývoj látek namířených proti EGFR	23
2. 5. 2 Klinická účinnost látek namířených proti EGFR	24
2. 5. 2. 1 Inhibitory tyrozin-kinázové aktivity EGFR – TKIs	24
2. 5. 2. 1. 1 Erlotinib	24
2. 5. 2. 1. 2 Gefitinib	25
2. 5. 2. 2 Monoklonální protilátky proti EGFR	26
2. 5. 2. 2. 1 Cetuximab	26
2. 5. 2. 2. 2 Panitumumab	27
2. 6 Metody používané k detekci mutací v genu <i>EGFR</i>	27
2. 6. 1 Real-time PCR	27
2. 6. 2 Detekční systém využívající k amplifikaci alelicky specifické primery – ARMS metoda a TaqMan™ sondy	29
2. 7 Komerční soupravy pro detekci mutací v genu <i>EGFR</i>	30
2. 7. 1 TheraScreen® DxS: EGFR29 Mutation Kit (DxS Diagnostic)	30
2. 7. 1. 1 Princip detekce mutací soupravou TheraScreen® DxS	30
2. 7. 2 PNA Clamp™ EGFR Mutation Detection Kit (Panagene)	31
2. 8 Další metody používané k detekci mutací v genu <i>EGFR</i>	32
3 Cíle práce	34

4 Materiál a metodika	35
4. 1 Přístroje a pomůcky	35
4. 2 Spotřební materiál	36
4. 3 Chemikálie a reagenty	37
4. 3. 1 Chemikálie a reagenty pro real-time PCR	37
4. 3. 1. 1 Použité primery, sondy a ostatní oligonukleotidy	38
4. 3. 2 Chemikálie a reagenty pro fragmentační analýzu delecí	38
4. 3. 3 Chemikálie a reagenty pro sekvenování mutace L858R	39
4. 3. 4 Ostatní chemikálie a reagenty	39
4. 4 Software	39
4. 5 Biologický materiál	40
4. 6 Sekvence exonů 18 – 21 genu <i>EGFR</i>	40
4. 7 Návrh primerů a TaqMan™ sond pro metodu SSP-ARMS a Endpoint genotyping analýzu	42
4. 7. 1 Vnitřní kontrola pro metodu SSP-ARMS	44
4. 7. 2 Endpoint genotyping analýza	45
4. 8 Příprava primerových směsí specifických pro jednotlivé <i>EGFR</i> mutace	46
4. 9 Příprava PCR mixu, nanášení na destičku a přidavek templátové DNA	47
4. 10 Optimalizace koncentrace MgCl ₂ a dalších složek reakční směsi a optimalizace real-time PCR analýzy na LC 480	48
4. 10. 1 Pracovní protokol a PCR program na LC480 pro detekci mutace L858R Endpoint genotyping analýzou	51
4. 10. 2 Pracovní protokol a PCR program na LC480 pro detekci mutace L858R metodou PCR-SSP/ARMS s vnitřní kontrolou	52
4. 10. 3 Pracovní protokol a PCR program na LC480 pro detekci mutace L858R metodou COLD PCR	53
4. 10. 4 Pracovní protokol a PCR program na LC480 pro detekci delecí metodou PCR- SSP/ARMS s vnitřní kontrolou	53
4. 11 Určování meze detekce metody	54
4. 12 COLD PCR - COamplification at Lower Denaturation PCR	54
4. 12. 1 COLD PCR analýza mutace L858R	55
4. 12. 1. 1 Statistické srovnání COLD a „ne-COLD“ PCR	55
4. 13 Zpracování dat pacientů vyšetřených na mutace genu <i>EGFR</i> z DNA databáze LEM	56

5 Výsledky	57
5. 1 Optimalizace real-time PCR analýzy pro detekci bodové mutace L858R	57
5. 1. 1 Detekce mutace L858R Endpoint genotyping analýzou	57
5. 1. 1. 1 Analyzované vzorky a použité primery	57
5. 1. 1. 2 Výsledky Endpoint genotyping analýzy pro detekci mutace L858R	58
5. 1. 1. 3 Stanovení meze detekce metody	58
5. 1. 2 Detekce mutace L858R vylepšenou Endpoint Genotyping analýzou	59
5. 1. 2. 1 Analyzované vzorky a použité primery	59
5. 1. 2. 2 Výsledky analýzy a stanovení meze detekce metody	60
5. 1. 3 Detekce mutace L858R metodou PCR-SSP/ARMS s vnitřní kontrolou	61
5. 1. 3. 1 Analyzované vzorky a použité primery	61
5. 1. 3. 2 Výsledky analýzy a její hodnocení	62
5. 1. 4 COLD PCR analýza bodové mutace L858R	64
5. 1. 4. 1 Statistické srovnání standardní COLD PCR a „ne-COLD“ PCR	65
5. 1. 5 Další pokusy detekce mutace L858R - nested PCR na principu COLD PCR	67
5. 2 Detekce bodové mutace L858R soupravou TheraScreen® DxS	67
5. 3 Detekce delecí metodou PCR- SSP/ARMS s vnitřní kontrolou	69
5. 3. 1 Analyzované vzorky a použité primery	69
5. 3. 2 Výsledky analýzy a její hodnocení	69
5. 4 Zpracování pacientů vyšetřených na mutace genu <i>EGFR</i> z DNA databáze LEM k porovnání s daty získanými celosvětovými studiemi	71
6 Diskuze	75
7 Závěr	78
8 Použitá literatura	81
9 Seznam použitých zkratk	88
10 Přílohy	

1 Úvod

Nádorové buňky se vyznačují získanou zvýšenou autonomní a neregulovatelnou proliferací a to pomocí nekontrolovatelné produkce specifických molekul, které podporují růst buněk (růstové faktory), nebo díky abnormální, posílené expresi specifických proteinů (receptory růstových faktorů) na buněčných membránách, ke kterým se růstové faktory selektivně váží. Oba procesy spouštějí řadu intracelulárních signálů, které vedou k proliferaci nádorových buněk, indukci angiogeneze a metastázování. Většina lidských epiteliálních nádorových onemocnění se vyznačuje funkční aktivací růstových faktorů (dále EGF) a rodiny receptorů pro epidermální růstové faktory (dále EGFR) (Ciardiello, Tortora; 2008).

EGFR je transmembránový receptor patřící do rodiny čtyř příbuzných proteinů (Obr.1). Na každý receptor se může selektivně vázat 10 různých ligandů. Po navázání ligandu jedno-řetězcový EGFR receptor vytvoří dimer, který spustí přenos signálu uvnitř buňky aktivací autofosforylace receptoru díky své tyrosin-kinázové aktivitě. Mutace v tyrosin-kinázové doméně genu pro EGFR zvyšuje její aktivitu a indukuje intracelulární přenos signálu kaskádovitým mechanismem až do buněčného jádra, což může mít za následek proliferaci nádorových buněk, zablokování apoptózy, aktivaci invazivity a metastázování a stimulaci neovaskularizace indukované tumorem.

Díky tomu byl EGFR navržen jako první cíl pro léky namířené proti nádorového onemocnění plic. Čtyři antagonisté EGFR (viz dále) jsou po 20 letech vývoje léčiv k dispozici pro léčbu metastázujících epiteliálních nádorových onemocnění. Těmito onemocněními jsou: nemalobuněčný karcinom plic (Non-Small Cell Lung Carcinoma, dále NSCLC), skvamózně – buněčný karcinom hlavy a krku (Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck), kolorektální karcinom a karcinom pankreatu.

Testování EGFR spočívá v detekci mutací a chromosomálních změn v genu pro EGFR. Screening statusu *EGFR* – určení negativity/ pozitivitu a typu mutace, je u pacientů s lokálně-pokročilým nebo metastazujícím NSCLC velmi důležitý a umožňuje tak lékařům zvolit vhodnou a efektivní léčbu (Mok a kol., 2009). Pro tento účel byly vyvinuty malé molekuly namířené proti kinázové aktivitě EGFR zvané tyrosine kinase inhibitors - erlotinib a gefitinib, stejně tak jako monoklonální protilátky cetuximab a panitumumab (Cadranel a kol., 2010).

K detekci *EGFR* mutací je k dispozici celá řada metod. Pro skríníng známých mutací v *EGFR* se nejčasteji používá metody kvantitativní PCR v reálném čase, která je také důležitým

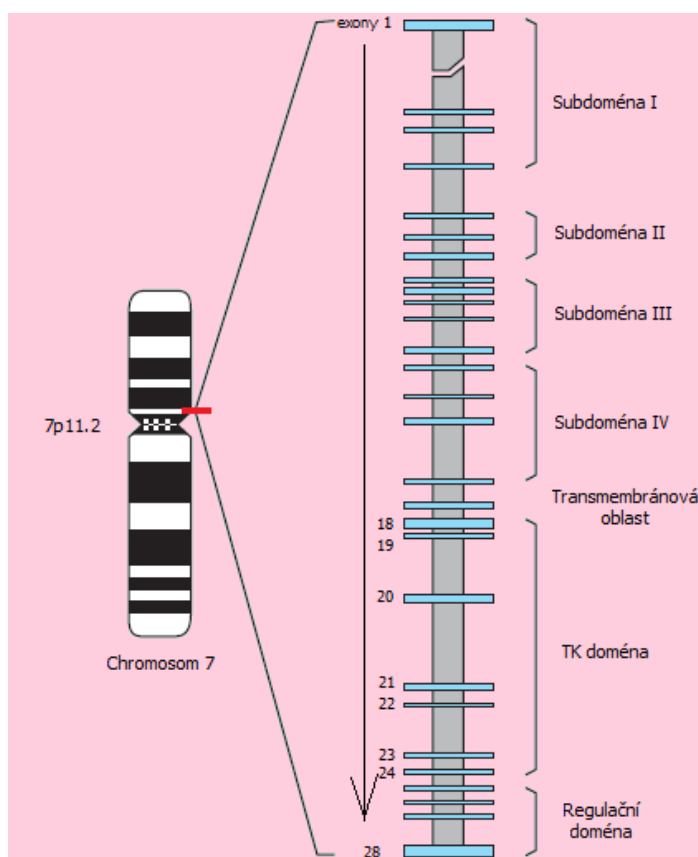
ukazatelem množství a kvality vzorku DNA. V této modifikaci PCR je detekce mutací často založena na principu tzv. Amplification Refractory Mutation System (dále ARMS) – detekčního systému využívajícího k amplifikaci alelicky specifické primery. Další metodou často používanou k detekci všech typů mutací, včetně těch nových, je sekvenování.

V současné době jsou pro analýzu mutací v *EGFR* k dispozici mnohé komerční soupravy, mezi něž patří TheraScreen EGFR29 Mutation Test kit od společnosti DxS a PNA ClampTM EGFR Mutation Detection Kit společnosti Panagene. Avšak existují i mnohé metody nezávislé na těchto soupravách, kdy daná laboratoř zpravidla používá své vlastní reagenty. PCR a sekvenování zůstávají nejpoužívanějšími metodami umožňujícími detekci mutací nejčastěji se nacházejících v exonech 18, 19, 20 a 21 genu *EGFR*. Jak již bylo uvedeno výše, sekvenování má navíc schopnost detekce nových typů mutací. Pokud je taková mutace detekována, je potřeba ověření její přítomnosti v nezávislé reakci, a určení, zda se jedná o nádorovou variantu, či o vzácný polymorfismus (AstraZeneca, 2011), jehož přítomnost se zjišťuje sekvenací z nenádorové tkáně.

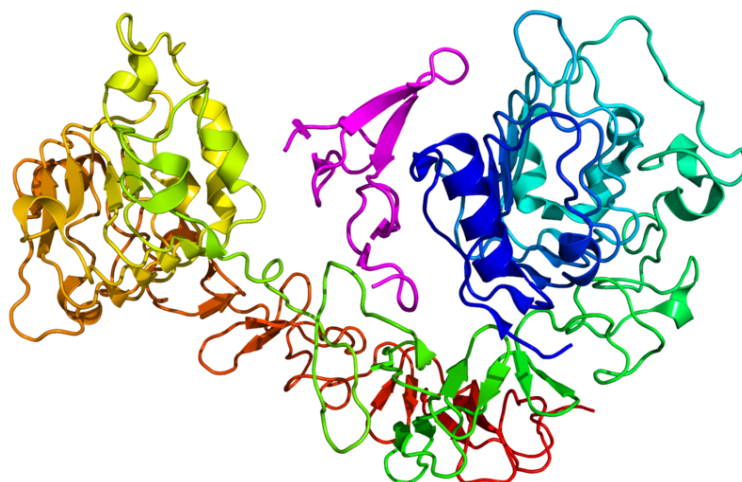
2 Současný stav problematiky

2.1 Gen *EGFR* a protein EGFR

Sekvence genu *EGFR* – homolog onkogenu avian erythroblastic leukemia (v-erb-b) viru – je vysoce mezidruhově konzervován. Lidský gen *EGFR* se nachází na chromosomu 7 v pozici 7p11.2 a zabírá přibližně 200kb genomické DNA (Reiter a kol., 2001). Gen *EGFR* se skládá z 28 exonů a kóduje glykoprotein o velikosti 170 kDa. Receptor epidermálního růstového faktoru EGFR byl objeven americkým biochemikem Stanley Cohenem, který za tento objev získal v roce 1986 Nobelovu cenu. Protein EGFR je receptor s tyrosin – kinázovou (dále TK) aktivitou patřící do rodiny ErbB. Do této rodiny patří: EGFR (ErbB1, lidský HER1), ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) a ErbB4 (HER4). EGFR je složen ze tří domén: extracelulární domény (exony 1 – 16), transmembránové domény (exon 17) a intracelulární domény (18 – 28). Extracelulární doména sestává ze čtyř poddomén (I – IV), intracelulární z C – terminální regulační domény a TK domény.



Obr. 1: Lokalizace genu *EGFR* na chromosomu 7, struktura jeho exonů a domény proteinu *EGFR* (upraveno podle: Medscape Today's News, 2006)



Obr. 2: *Struktura monomerního proteinu EGFR (modrá: N – konec, červená: C – konec) a jeho ligandu EGF (růžová) vycházející z krystalografie (en.wikipedia.org, 2008)*

2. 2 Signalizace EGFR

EGFR signalizace je započata navázáním příslušného ligandu na extracelulární doménu receptoru. Ligandy mohou být následující molekuly (Linggi, Carpenter; 2006):

- **EGF**
- TGF α
- HB – EGF
- amfiregulin
- betacellulin
- epigen
- epiregulin

Po navázání ligandu dojde k homo/ heterodimerizaci receptoru, což stimuluje jeho vlastní intracelulární proteinkinázovou aktivitu. Výsledkem je autofosforylace několika tyrosinových (Y) residuí na C – terminální doméně receptoru. Mezi tato residua patří Y992, Y1045, Y1068, Y1148 a Y1173.

Fosforylace tyrozinu EGFR vede k navázání různých signálních proteinů včetně adaptorových proteinů GRB2 a Nck, fosfolipázy PLC-Gamma, proteinu SHC, přenašeče signálu a aktivátora transkripce STAT, a několika dalších proteinů a molekul, a tím následně dochází k downstream přenosu signálu (de)fosforylací příslušných cytoplazmatických substrátů soustavou kináz a fosfatáz. Tento přenos signálu zahrnuje několik signalizačních kaskád, mezi které patří základní dráhy jako jsou proteinkinázy MAPK, Akt a JNK vedoucí k syntéze DNA a buněčné proliferaci (Oda a kol., 2005). Výsledkem signalizace EGFR je aktivace genů zodpovědných za změny v genové expresi, cytoskeletální přestavby, migraci a adhezi buněk, zabránění navození apoptózy a zvýšenou buněčnou proliferaci.

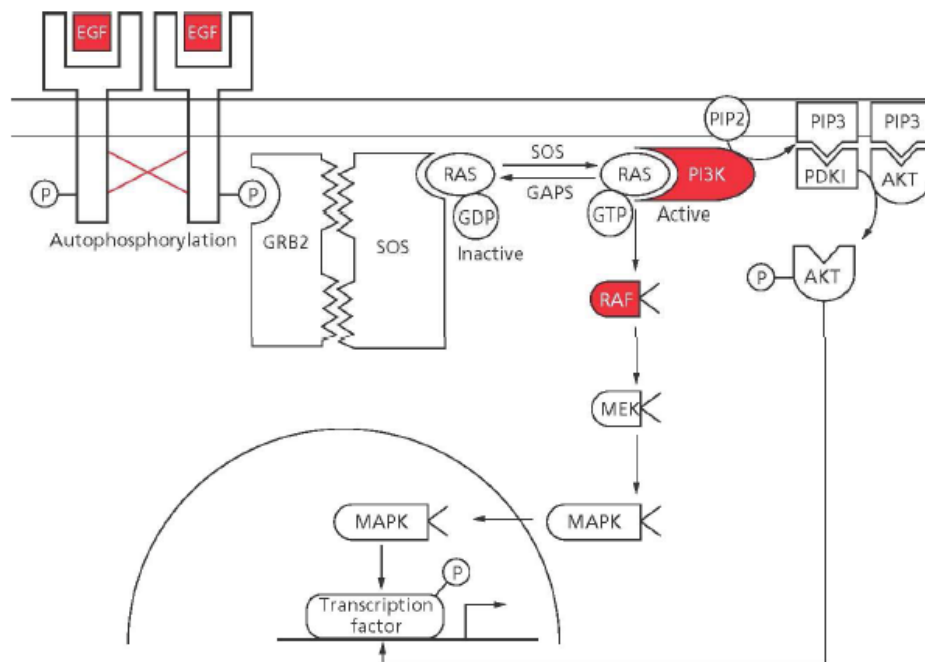
2. 2. 1 Signalizace EGF – MAPK

Adaptorový protein GRB2 je nezbytnou součástí převodu signálu z EGFR ke GTPáze Ras. SH2 doména GRB2 je schopná přímé vazby na fosforylované tyrosiny 1068 a 1086 aktivovaného EGFR nebo vazby nepřímé přes tyrosin-fosforylovaný adaptorový protein SHC. SH3 domény GRB2 jsou konstitučně spojeny s proteinem SOS, výměnným faktorem Ras GTPázy. Navázáním GRB2 a SOS komplexu na EGFR se SOS dostává do blízkosti k Ras, čímž jej aktivuje a následně tak aktivuje Ras efekторы jako jsou Raf kinázy a PI3K. Raf zahajuje kaskádu fosforylačních událostí zahrnujících fosforylaci a aktivaci MEKs (MAPK/ERK kinázy) a ERKs (kinázy regulované extracelulárním signálem). Výsledkem kaskády je aktivace transkripčních faktorů, podílejících se na expresi genů důležitých pro buněčný cyklus (Immervoll a kol., 2006; Meng a kol., 2005).

2. 2. 2 Signalizace EGF – PI3K

Kináza PI3K je aktivována přímou vazbou s GTPázou Ras. Aktivovaná kináza PI3K fosforyluje na membráně navázaný protein PIP2, který následně generuje PIP3. PIP3 hraje roli jako druhý posel lokalizovaný v membráně, který aktivuje na PIP3 – závislou kinázu 1 (PDK1) a proteinkinázu B (PKB/Akt). PDK1 fosforylací aktivuje Akt, která se uvolňuje z membrány a je translokována do jádra. Aktivovaná Akt fosforylací aktivuje transkripční faktory jako jsou AP-1, E2F a Myc a dochází k expresi genů důležitých pro přežívání buňky. Transkripční faktory rodiny AP-1 se váží na promotory různých genů a regulují proliferaci,

apoptózu nebo angiogenezi. Protein Myc z rodiny transkripčních faktorů Myc aktivuje expresi N-Ras, p53 a dalších genů (Immervoll a kol., 2006; Meng a kol., 2005).



Obr. 3: Schéma přenosu signálu přes EGFR (přednáška doc. Kryštofa – PŘF UPOL, 2010)

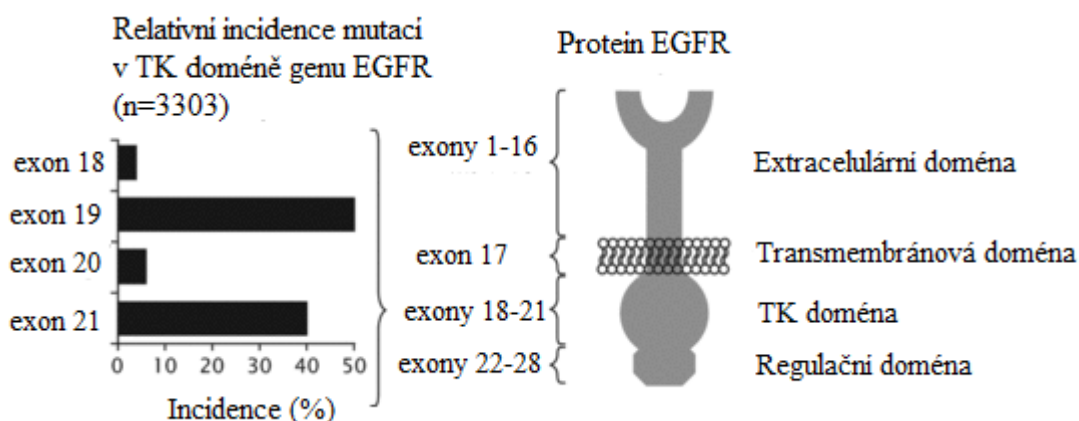
2. 2. 3 Signalizace EGF – STAT

Další z důležitých událostí zodpovědných za přenos signálu je EGF aktivace proteinů STAT. Stimulace EGFR vyvolává fosforylaci STAT1 a STAT3 a zahajuje formaci komplexu STAT1 a STAT3 s JAK1 a JAK2. JAKs jsou nepostradatelné ke zprostředkování interakce EGFR se STAT1 a STAT3. Poté jsou STATs translokovány do jádra, kde aktivují genovou expresi. EGFR také aktivuje STAT3 do jisté míry nezávisle na JAKs, ale v závislosti na aktivaci Src kináz. Aktivovaný c-Src fosforyluje tyrosin 845 na EGFR, což hraje důležitou roli ve fosforylaci a aktivaci proteinů STAT (Smith a kol., 2006; Alvarez a kol., 2006).

2. 3 Molekulární biologie mutací v genu *EGFR*

Objev somatických mutací genu *EGFR* u pacientů s NSCLC byl velice významným mezníkem v pochopení tohoto onemocnění a příspěvkem v možnostech jeho léčby. Další molekulární studie provedené několika vědeckými skupinami ukázaly, že se mutace *EGFR* objevují téměř výhradně v exonech 18–21 genu, které kódují aminokyselinovou oblast a část karboxylové oblasti receptoru (Obr. 4). Murray a kol. vytvořil rozsáhlou databázi publikované literatury, která obsahovala data více než 12 000 pacientů s 254 nezávislými somatickými mutacemi v této oblasti genu (Murray a kol., 2008). Ze získaných dat vyplynulo, že mezi nejčastější mutace genu *EGFR* patří:

- bodové mutace v exonu 18
- delece a/ nebo inzerce v exonu 19
- inzerce/ duplikace a bodové mutace v exonu 20
- bodové mutace v exonu 21



Obr. 4: Incidence mutací genu *EGFR* kódující TK doménu receptoru a znázornění jeho struktury (upraveno podle: Paz-Ares a kol., 2010)

Ze souhrnných dat mnohých rozsáhlých studií bylo zjištěno, že se mutace vyskytují nejčastěji u dlouhodobých nekuřáků (51 %), žen (38 %), pacientů s adenokarcinomem (31 %), pacientů východoasijského původu (29 %) a 10 % severních Američanů a západních Evropanů s NSCLC (Marchetti a kol., 2005). Dvě „hot spot“ mutace čítají na 90 % všech *EGFR* mutací zaznamenaných u NSCLC. Mezi ně patří krátké delece v exonu 19 zahrnující ztrátu 9, 12, 15 a 18 nukleotidů vyskytující se u 45 % případů. Druhá nejčastější mutace se nachází v exonu 21 a jedná se o bodovou mutaci L858R (2573T>G), která obsahuje místo původní aminokyseliny leucinu arginin v kodonu 858. Z výsledků studií bylo také zjištěno, že

80% nádorů, které jsou citlivé na léčbu TKIs, obsahují mutace měnící smysl kodonu nebo delece v genu, v porovnání s žádnými mutacemi nalezenými u necitlivých forem nádorů (Kris MG a kol., 2003; Fukuoka a kol., 2003; Parra a kol., 2004). Bodová mutace T790M v exonu 20 vykazuje sekundární rezistenci na TKIs namířené proti EGFR.

Mutace v oblasti genu EGFR, která kóduje TK doménu receptoru, byly poprvé u pacientů s NSCLC popsány v roce 2004 (Paez a kol., 2004). Paez a kol. amplifikoval a sekvenoval gen *EGFR* u 119 pacientů s NSCLC. Somatické delece a missense mutace byly identifikovány u 16 z nich. Sekvenací genu *EGFR* pěti pacientů odpovídajících na léčbu gefinitibem a čtyř pacientů užívajících gefinitib s progresí nemoci bylo zjištěno, že mutace byly nalezené pouze u pacientů odpovídavých a u žádného s progresí nemoci. Skupina Lynche ve stejnou dobu vydala zprávu o nálezů somatických heterozygotních mutací okolo ATP-vázací kapsy TK domény u osmi z devíti pacientů s NSCLC, kteří odpověděli na léčbu gefinitibem, zatímco žádné mutace nádorových buněk nebyly nalezeny u pacientů, kteří na stejnou léčbu neodpověděli (Lynch, 2004). *In vitro* studie dále dokázaly, že mutované receptory byly funkční, avšak více citlivé na endogenní ligandy i gefitinib než wt receptory. Mechanismus, kterým mutovaný *EGFR* indukuje onkogenní stav, nebyl doposud zcela objasněn. Mutované receptory mohou být postupně aktivovány, zatímco trvá déle jejich defosforylace následující po aktivaci ligandem, nebo může docházet k aberantní fosforylaci jiných proteinů.

2. 4 Nádorová onemocnění plic

Rakovina plic je celosvětově nejčastější příčinou úmrtí na nádorové onemocnění. Nezhoubné nádory se vyskytují mnohem méně často než nádory zhoubné. Podle Mačáka (2004) se u zhoubných nádorů jedná nejčastěji o **karcinomy** odvozené ze sliznice bronchů – tzv. bronchogenní karcinomy. Jejich vznik souvisí s kouřením a inhalací výfukových plynů (aromatických uhlovodíků, dioxinů), radiaci (vdechování radonu) a ke vdechování dalších chemických látek během jejich průmyslovém zpracování (např. azbestu, niklu, chrómu). Dlouhodobým pravidelným kouřením se riziko vzniku rakoviny plic zvyšuje 60krát. Z dosud ne zcela jasných důvodů jsou ženy na kouř a vznik rakoviny plic více citlivé.

Podle histologické struktury dělíme zhoubné nádory plic na:

Nemalobuněčné karcinomy (70 – 75 % všech nádorů, dále NSCLC)

- dlaždicobuněčné karcinomy
- adenokarcinomy a bronchioloalveolární karcinomy
- velkobuněčné karcinomy

Malobuněčné karcinomy (20 – 25 %, dále SCLC)

Smíšené nádory (5 – 10 %)

- smíšené dlaždicobuněčné karcinomy a adenokarcinomy
- smíšené dlaždicobuněčné karcinomy a malobuněčné karcinomy (Mačák, Mačáková; 2004)

Níže jsou rozepsány nejdůležitější charakteristiky podtypů NSCLC.

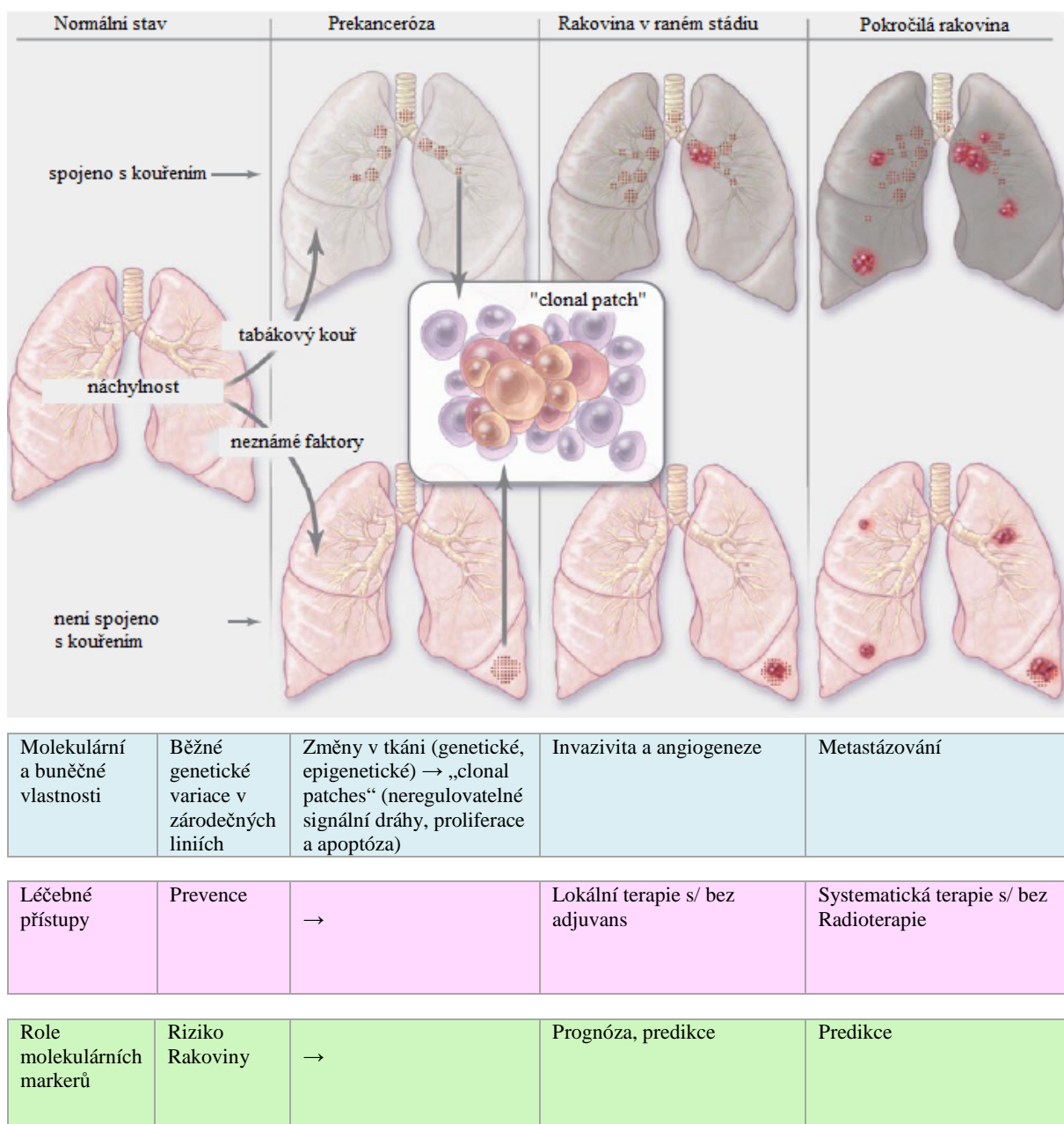
Dlaždicobuněčné karcinomy (tvoří 25 – 30 % plicních karcinomů) vznikají z dlaždicového metaplastického epitelu objevujícího se v bronších většinou po prodělaných zánětech nebo v souvislosti s kouřením a nedostatkem vitamínu A. Během několika let dochází k dysplazii a vzniku karcinomu *in situ* prokazatelným cytologickým vyšetřením sputa. Nádory mohou růst dovnitř bronchu a způsobovat tak problémy při dýchání či zánět plic, přičemž postupně dochází k proliferaci nádoru do hloubky a nabývání jeho invazivního charakteru.

Adenokarcinomy, které tvoří 30 – 35 % plicních karcinomů, rostou stejně jako dlaždicobuněčné karcinomy v plicích centrálně nebo i v periferních oblastech a v okolí žizev. Tento druh karcinomu plic se nedává do vztahu s kouřením. Nádory rostou většinou pomalu bez tvorby velké nádorové masy za poměrně časněho vzniku metastáz. Podtypem adenokarcinomu je **bronchioloalveolární karcinom**, který je považován za adenokarcinom *in situ* a na rozdíl od invazivního adenokarcinomu plicí nedestruuje a nemusí vytvářet metastázy.

Velkobuněčné karcinomy tvořící 10 – 15 % plicních karcinomů jsou charakteristické velkými nediferencovanými buňkami nejistého původu, které mohou nabývat až obrovských rozměrů s obsahem mnoha jader.

Přes pokroky včasné detekce a možnosti standardní léčby je NSCLC často diagnostikován v pokročilém stádiu a má tak špatnou prognózu. Dokonalejší pochopení molekulárního původu nemoci a její evoluce může být zásadním příspěvkem pro léčbu a prevenci rakoviny plic.

2. 4. 1 Molekulární mechanismy vzniku rakoviny plic



Obr. 5: Molekulární původ nádorového onemocnění plic (upraveno podle: Roy a kol., 2008)

Environmentální faktory, jako je tabákový kouř, genetické vloh, působení hormonů a virů (např. lidský papillomavirus) spolu interagují a ovlivňují kancerogenezi. První změny v tkáni vyvolané např. tabákovým kouřem se vyskytují ve stádiu genetických (mutace, ztráta heterozygoty) a epigenetických změn (změna metylace promotoru). Tyto změny mohou přetrvávat a popřípadě vést k aberantní aktivaci signálních drah a buněčných funkcí (neregulovatelná proliferace a apoptóza). Výsledkem jsou pak premaligní změny v podobě dysplázie a tvorba shluků nádorových buněk tzv. „clonal patches“ (shluky nádorových buněk klonálního charakteru), které mohou tvořit cévy zásobujících nádor (angiogeneze) a ovlivňovat invazivitu nádoru. Rakovina raného stádia dále přechází v pokročilou formu a vede až ke vzniku metastáz. Jednotlivé premaligní shluky nádorových buněk jsou tvořeny klony a subklony, ve kterých může docházet ke ztrátě heterozygoty, genetické nestabilitě a vzniku mutací (např. v p53 nebo EGFR). Následující tabulka uvádí známé genetické abnormality zodpovědné za vznik NSCLS:

Tab. 1: Genetické abnormality u NSCLC

Abnormalita	Nemalobuněčný karcinom plic	
	Skvamózně-buněčný karcinom	Adenokarcinom
Prekurzor		
Léze	Známa (dysplázie)	Pravděpodobná (atypická adenomatózní hyperplazie)
Genetická změna	Mutace v p53	<i>KRAS</i> mutace (atypická adenomatózní hyperplazie u kuřáků), <i>EGFR</i> mutace u nekuřáků
Nádorové onemocnění		
<i>KRAS</i> mutace	Vzácné	10 – 30 %
<i>BRAF</i> mutace	3 %	2 %
<u><i>EGFR</i></u>		
- mutace v TK doméně	Vzácné	10 – 40%
- amplifikace	30 %	15 %
- další mutace	5 %	Vzácné
<i>HER2</i>		
- mutace v TK doméně	Vzácné	4 %
- amplifikace	2 %	6 %
<i>ALK</i> fúzní gen	Vzácné	7 %
<i>MET</i>		
- mutace	12 %	14 %
- amplifikace	21 %	20 %
<i>TTF-1</i> amplifikace	15 %	15 %
<i>p53</i> mutace	60 – 70 %	50 – 70 %
<i>LKB1</i> mutace	19 %	34 %
<i>PIK3CA</i>		
- mutace	2 %	2 %
- amplifikace	33 %	6 %

(upraveno podle: Roy a kol., 2008)

Status kuřáctví nápadně odlišuje molekulární profil nádorových onemocnění plic včetně mutací v *p53*, *KRAS*, *EGFR* a *HER2*. Nádorová onemocnění plic související s kouřením (SCLC) se začínají tvořit především centrálně v dýchacích cestách, zatímco nekuřácké nádory (adenokarcinomy) se tvoří v periferiích dýchacích cest. Molekulární markery mohou předznamenat riziko onemocnění u zdravých jedinců a prognózu nezávislé na léčbě (prognostické markery) anebo poukázat na citlivost na danou léčbu (prediktivní markery). Pomocí markerů specifických pro určitá stádia nemoci je možné určit její typ nebo definovat mechanismy rezistence na terapii.

Prediktivní markery jsou faktory spojené s odpovědí nebo rezistencí na určitý typ léčby (Duffy, 2005). Pouze někteří pacienti s rakovinou dokáží reagovat na danou léčbu a u většiny z nich se často vyskytují nežádoucí vedlejší účinky. Pro optimální léčbu pacienta je proto nezbytné předem brát v úvahu s jakou pravděpodobností bude nádor na určitou léčbu reagovat. Prediktivní markery jsou často zaměňovány s markery prognostickými. Oba typy molekulárních markerů poskytují informace o pravděpodobném budoucím chování nádoru. Některé markery mohou mít dvojitý charakter. Například estrogenový receptor (ER) u rakoviny prsu pouze nepředpovídá odpověď na endokrinní terapii, ale také souvisí s dobrou prognózou (přínejmenším v krátkodobém časovém horizontu).

2. 4. 1. 1 Role genu *EGFR* při vzniku nádorového onemocnění

Podle Roye a kol. (2008), jak již bylo uvedeno výše, *EGFR* reguluje důležité procesy zodpovědné za kancerogenezi – proliferaci, apoptózu, angiogenezi a invazivitu a je během vývoje a progresu NSCLC se svými ligandy často zvýšeně exprimován. Klinická data vypovídají o tom, že mutace v *EGFR* patří mezi časné události ve vývoji NSCLC a mutace v exonech 18, 19 a 20 a L858R jsou schopny transformovat fibroblasty a epitelální buňky plic.

2. 4. 1. 1. 1 Ras – Raf – Mek

Ras – Raf – Mek dráha je zapojena do přenosu signálu downstream od *EGFR* a ostatních drah vedoucích k růstu nádorových buněk a progresi karcinomu. Aktivující *KRAS* mutace jsou limitovány na NSCLC (především adenokarcinomy) a jsou od *EGFR* a *HER2* mutací v TK doménách zcela odlišné včetně rezistence k chemoterapii a k inhibitorům namířeným proti *EGFR* (TKIs a mAbs). Mutace v genu *KRAS* jsou spojeny s kouřením a nejčastěji zahrnují G→T transverze v exonech 12 a 13 (Sun a kol., 2007; Riely a kol., 2008).

2. 4. 1. 1. 2 PI3K – Akt – mTOR

Dráha vedoucí downstream od EGFR sestávající z PI3K, Akt a mTOR je aktivovaná ve stádiu časně karcinogeneze. Akt je také zvýšeně exprimován u bronchiální dysplazie. Experimenty na zvířecích modelech ukázaly, že inhibicí dráhy vedoucí přes Akt mohou lidské pronádorové a nádorové buňky vstoupit do apoptózy a tím zabránit progresi nemoci. U myších modelů může zase inhibice mTOR zastavit maligní progresi atypické adenomatózní hyperplazie (Wislez a kol., 2005).

2. 4. 1. 1. 3 Angiogeneze

V epiteliálních buňkách bronchů v souvislosti s progresí bronchiální dysplazie stoupá hladina cévního endoteliálního růstového faktoru VEGF (Merrick a kol., 2005). Bronchiální hyperplazie, metaplazie a karcinom *in situ* jsou spojeny se zvýšenou cévní hustotou, která může mít za následek tvorbu tzv. angiogenní skvamózní dysplazie. Faktory asociované se zvýšenou nádorovou angiogenezí korelují s vývojem a prognózou rakoviny plic. Mnoho angiogenních faktorů je regulováno alespoň zčásti přes dráhy regulované hypoxií zahrnující HIF 1 α a 2 α . VEGF a ostatní angiogenní faktory jsou také regulovány EGFR přes HIF-závislé a nezávislé mechanismy a onkogeny *KRAS* a *p53*. VEGF byl v současné době validován jako terapeutický cíl a byla optimalizována léčba pokročilého NSCLC za použití monoklonální protilátky bevacizumabu v kombinaci se standardní chemoterapií. Nejslibnější výsledky v léčbě NSCLC byly získány experimentálně na základě použití kombinace léčiv bevacizumabu určeného proti VEGF a erlotinibu proti EGFR nebo kombinace chemoterapie a vandetanibu (současná inhibice VEGF a TK domény EGFR) (Heymach a kol., 2007; Heymach a kol. 2008).

2. 5 Látky namířené proti EGFR používané v léčbě rakoviny plic

Většina epiteliálních karcinomů u lidí je vyvolaná funkční aktivací růstovými faktory a jejich receptory z EGFR rodiny. Po dvaceti letech vývoje léčiv cílených na EGFR dráhu jsou v současné době pro léčbu metastazujících epiteliálních nádorových onemocnění k dispozici čtyři antagonisté EGFR. Méně informací máme o možnostech léčby raných stádií onemocnění (Ciardello, Tortora; 2008).

2. 5. 1 Vývoj látek namířených proti EGFR

První léčivo proti EGFR bylo vyvinuto v 80. letech 20. století. Experimenty s EGFR se dají rozdělit na tři období, přičemž v posledním byly úspěšně testovány dvě třídy EGFR antagonistů současně používaných v klinické praxi. Jsou jimi monoklonální protilátky a malé molekuly zvané TK inhibitory (TKIs).

Monoklonální protilátky (dále mAbs) jako je cetuximab se váží na extracelulární doménu EGFR v neaktivním stavu, soutěží tak s ligandem o vazebné místo na receptoru a tím blokuje aktivaci EGFR tyrozinkinázy ligandem. Malé molekuly TKIs, jako jsou erlotinib a gefitinib, soutěží zase s ATP o vazebné místo na intracelulární katalytické doméně EGFR tyrosinkinázy a tím inhibují autofosforylaci EGFR a downstream signalizaci. mAb proti EGFR specificky a selektivně rozpoznávají pouze tento receptor. Naproti tomu TKIs mohou blokovat různé receptory růstových faktorů včetně ostatních členů EGFR rodiny nebo receptoru pro VEGF. V současné době jsou ve fázi vývoje různé TKIs, které se váží na EGFR ireverzibilně. Funkční a farmakologické vlastnosti inhibitorů EGFR shrnuje následující tabulka:

Tab. 2: Funkční a farmakologické vlastnosti inhibitorů EGFR:

Vlastnost	Monoklonální protilátky	Inhibitory TK aktivity EGFR
Způsob podání	Intravenózně (běžně jednou týdně nebo jednou za 14 dní)	Orálně (denně)
Struktura	Rekombinantní imunoglobuliny (150 – 180 kDa)	Látky o nízké molekulové hmotnosti (400 – 600 kDa)
Cílová selektivita	Specifická pro EGFR	Relativně specifická pro EGFR (inhibice i jiných receptorů rodiny EGFR a VEGFR)
Mechanismus interference s aktivitou EGFR	Váží se na extracelulární doménu receptoru, zabraňují navázání ligandu a dimerizaci receptoru vazbou na oblast vazby ligandu	Váží se na intracelulární část receptoru v TK doméně, soutěží s ATP a inhibují autofosforylaci, vazba je většinou reverzibilní, ireverzibilně vážící se TKIs jsou ve stádiu klinického vývoje
Buněčné efekty spojené s EGFR inhibicí	Inhibují proliferaci nádorových buněk v G1 kontrolním bodu, angiogenní produkci VEGF a nádorově indukovanou angiogenezi a invazivitu nádorových buněk, umocňují protinádorovou aktivitu cytostatik a radioterapie	Inhibují proliferaci nádorových buněk (zástava v G0-G1 fázi), angiogenní produkci VEGF a nádorově indukovanou angiogenezi a invazivitu nádorových buněk, umocňují protinádorovou aktivitu cytostatik a radioterapie

Vlastnost	Monoklonální protilátky	Inhibitory TK aktivity EGFR
Indukce EGFR internalizace, deregulace a degradace	Ano	Ne (reverzibilní vazba)
Inhibice intracelulárního přenosu signálu závislého na EGFR	Ano	Ano
Působení proti mutantním EGFR proteinům	Pravděpodobně ano, platí pro mutace v TK doméně od počátku vazby mAb na extracelulární doménu receptoru, není známo pro mutace EGFR v extracelulární doméně	Ano, pro mnohé mutace v TK doméně (mutace v kodonech 746 – 750 v exonu 19 a L858R mutace v exonu 21), od počátku vazby mutantních proteinů na vysokoafinitní TKIs jako je erlotinib a gefitinib, ne u gefitinib/erlotinib rezistentní mutace T790M v exonu 20
Aktivace imunitní odpovědi pacienta	Ano, na protilátce-závislá cytotoxicita může značně přispět k protinádorové aktivitě anti-EGFR mAbs jako je cetuximab. U panitumumabu nebyla na protilátce-závislá cytotoxicita zaznamenána.	Ne

(upraveno podle: Ciardiello, Tortora; 2008)

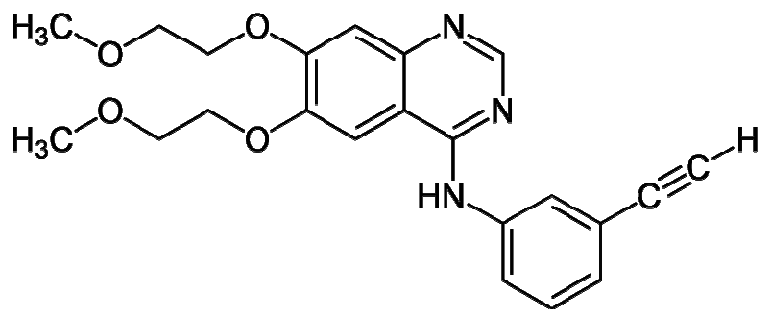
2. 5. 2 Klinická účinnost látek namířených proti EGFR

V současné době je ve fázi výzkumu více než 10 látek namířených proti EGFR pro několik druhů rakoviny u lidí (Normanno a kol., 2003; Ciardiello, Tortora, 2001; Grünwald a kol., 2003; Mendelsohn a kol., 2003). V několika zemích byly pro léčbu metastazujícího NSCLC, kolorektálního karcinomu, skvamózně-buněčného karcinomu hlavy a krku a karcinomu pankreatu schváleny dvě mAbs (cetuximab a panitumumab) a dvě TKIs (erlotinib a gefitinib).

2. 5. 2. 1 Inhibitory tyrozin-kinázové aktivity EGFR - TKIs

2. 5. 2. 1. 1 Erlotinib

Erlotinib (TarcevaTM) je reverzibilní inhibitor TK aktivity EGFR odvozený od molekuly chinazolinu. Jeho strukturu zobrazuje následující obrázek:

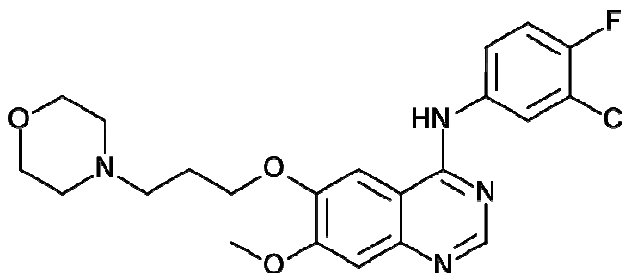


Obr. 6: Chemická struktura Erlotinibu - *N*-(3-etynylfenyl)-6,7-bis(2-metoxyetoxy) chinazolin-4-amin (*en.wikipedia.org*, 2009)

Erlotinib pro monoterapii NSCLC, který neodpovídá na léčbu chemoterapií na bázi platiny, byl schválen několika agenturami pro kontrolu léčiv po celém světě, včetně FDA a EMEA v EU. Stejně tak bylo schváleno použití Erlotinibu v kombinaci s gemcitabinem jako hlavní linie léčby pokročilého karcinomu pankreatu.

2. 5. 2. 1. 2 Gefitinib

Gefitinib (IressaTM) je reverzibilní inhibitor TK aktivity EGFR odvozený od molekuly chinazolinu. Jeho strukturu zobrazuje následující obrázek:



Obr. 7: Chemická struktura Gefitinibu - *N*-(3-chloro-4-fluoro-fenyl)-7-metoxy-6-(3-morfolin-4-ylpropoxy)chinazolin-4-amin (zdroj: *en.wikipedia.org*, 2011)

Gefitinib byl v mnoha zemích schválen jako třetí možnost léčby NSCLC necitlivého na chemoterapie na bázi platiny a docetaxelu. Gefitinib je na trhu v Japonsku, Korei, Číně a dalších severoasijských zemích. V USA a EU je používán pouze v rámci výzkumu.

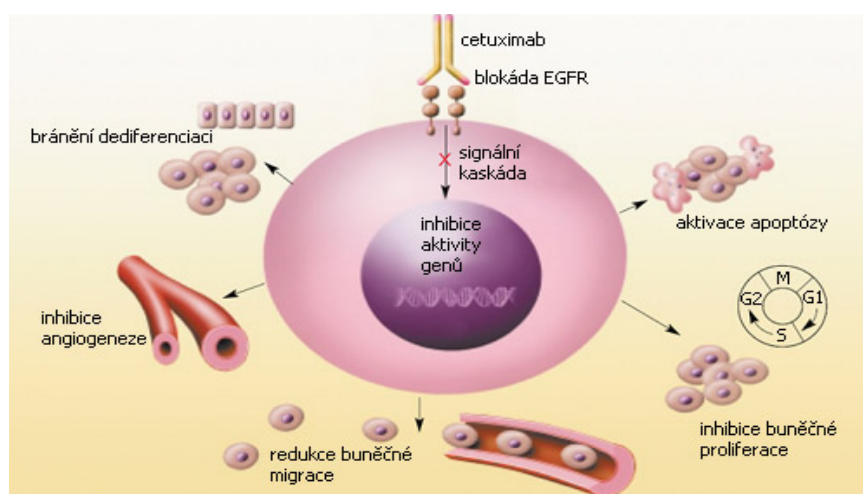
První fáze experimentů s EGFR prokázaly, že TKIs jsou klinicky velice důležitými látkami pro pacienty s metastazujícím, na chemoterapii necitlivým NSCLC. Maximální snesitelná denní dávka je pro gefitinib 750 mg a pro erlotinib 150 mg. Mezi nejčastější vedlejší účinky u pacientů užívajících TKIs patří opakující se průjemy a vyrážky podobné akné, přičemž vyrážky se vyskytují i u pacientů užívajících mAbs (Lacouture a kol., 2006).

Gefitinib byl první látkou vyvinutou proti EGFR, u které byla během dvou nezávislých studií druhé fáze experimentů prokázána klinicky důležitá protinádorová aktivita u pacientů s NSCLC necitlivým na mnohé chemoterapie včetně terapií založených na platině a docetaxelu. V roce 2003 byl gefitinib schválen FDA jako léčivo používané po selhání obou chemoterapií. Nicméně experimenty třetí fáze za použití placebo jako kontroly prokázaly selhání léčiva jako prostředku zvyšujícího přežívání pacientů – výsledky pacientů užívajících gefitinib a pacientů, kterým bylo podáváno pouze placebo, se po roce užívání výrazně nelišily. Zajímavé je, že následující studií byla zjištěna citlivost na léčbu gefinitibem u severoasijské populace, proto je tohoto léčiva využíváno pouze v těchto zemích, v USA bylo od látky upuštěno v roce 2005 a v EU nebyla nikdy schválena.

2. 5. 2. 2 Monoklonální protilátky proti EGFR

2. 5. 2. 2. 1 Cetuximab

Cetuximab (ErbixTM) je chimérická (člověk – myš) monoklonální protilátka typu IgG1 schválená několika agenturami pro kontrolu léčiv po celém světě, včetně FDA a EMEA v EU a je používána jako léčivo pokročilého kolorektálního karcinomu necitlivého k chemoterapii na bázi irinotecanu. V USA se může používat léčivo samotné, nebo v kombinaci s irinotecanem, v EU pouze v kombinaci. Cetuximab spolu s radioterapií se používá k léčbě lokálně-pokročilého skvamózně-buněčného karcinomu hlavy a krku. Následující obrázek znázorňuje mechanismus účinku cetuximabu:



Obr. 8: Mechanismus účinku cetuximabu (Merck Serono, 2011)

2. 5. 2. 2. 2 Panitumumab

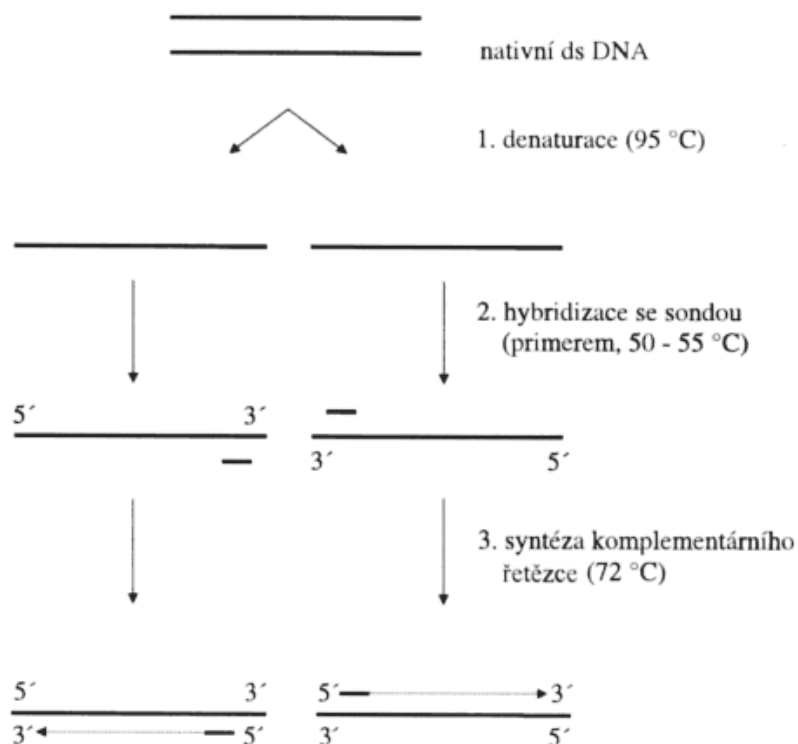
Panitumumab (Vectibix™) je plně lidská monoklonální protilátka typu IgG2 celosvětově schválená (včetně FDA) jako monoterapie kolorektálního karcinomu necitlivého na chemoterapie na bázi fluoropyrimidinů, oxaliplatinu nebo irinotecanu. V roce 2007 bylo léčivo schváleno také EMEA k léčbě pacientů s kolorektálním karcinomem nesoucích nemutovaný, standardní gen pro KRAS.

I když jsou obě zmíněné mAbs namířené proti EGFR, liší se cetuximab (IgG₁) a panitumumab (IgG₂) v mechanismu svého účinku – mAb izotopu IgG₁ je schopná aktivovat komplement a vyvolat cytotoxicitu závislou na protilátce (ADCC) (HealthValue, 2011).

2. 6 Metody používané k detekci mutací v genu *EGFR*

2. 6. 1 Real-time PCR

Real- time PCR (polymerázová řetězová reakce) je založena na klasické PCR, jejíž princip připomíná následující obrázek:



Obr. 9: Princip PCR (1.LF UK, 2011)

Rozdíl mezi klasickou a real-time PCR je v použití speciálního cykléru, který již v průběhu amplifikace umožňuje kontinuálně monitorovat přírůstky fluorescenčně značené DNA během každého cyklu. Data jsou sbírána během celého PCR testu na speciálních termocyklérech vybavených optikou umožňující excitaci substrátů a následnou detekci fluorescence v každé jamce. Kvantifikace produktu amplifikace může být buď relativní (porovnání s jinou skupinou vzorků, např. kontrolami), nebo absolutní (z kalibrační křivky rekombinantní DNA o známém množství). Real-time PCR je metoda vyznačující se vysokou citlivostí (detekce 1 nádorové buňky na 100 000 normálních) a specifitou.

Fluorescenční substráty používané při real-time PCR dělíme do dvou skupin:

- **nespecifické:** substráty, které se nespecificky váží na dvouvláknovou (ds) DNA (např. SYBR® Green)
- **specifické:** sondy, které ve své struktuře obsahují oligonukleotidový řetězec, který hybridizuje k PCR amplikonu (např. sondy TaqManTM). Specifické substráty pracují na principu přenosu energie fluorescenční resonancí – FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) mezi fluorescenčním barvivem (fluorofor - F) a zhášedčem (quencher - Q). Nárůst fluorescence je způsoben zvýšením vzdálenosti mezi molekulou fluoroforu a molekulou zhášedče po rozštípnutí navázané sondy DNA polymerázou (LF HK, 2006).

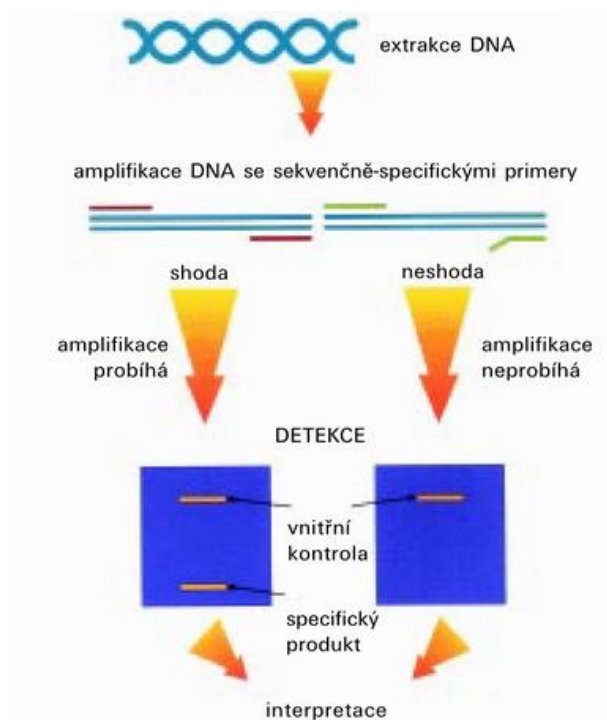
Princip real-time PCR při použití nespecifických a specifických fluorescenčních substrátů je podrobněji znázorněn v kapitole Přílohy – Obr A.

Při metodě real-time PCR jsou nejčastěji využívány dva primery a sonda se značkou, která po ozáření světlem o určité vlnové délce (zpravidla kratší) emituje záření o vlnové délce (zpravidla delší), která je specifická pro danou značku. Mezi tyto sondy patří i tzv. TaqManTM sondy, což jsou oligonukleotidy delší než primery s T_m teplotou přibližně o 10°C vyšší než je T_m primerů. Sondy jsou dvojitě značené nesoucí fluorescenční značku na 5'-konci a zhášedč na 3'-konci. Sonda se váže na vnitřní část amplifikované sekvence a pokud vytváří homoduplex, je rozložena 5' exonukleázovou aktivitou *Taq* DNA-polymerázy, čímž dojde k ukončení zhášení a emisi fluorescence (Šmarda a kol., 2005).

2. 6. 2 Detekční systém využívající k amplifikaci alelicky specifické primery – ARMS metoda a TaqManTM sondy

Mutace v genu *EGFR* je velice významným biomarkerem nádorového onemocnění, a proto je potřeba vyvíjet rychlé, účinné a citlivé metody pro jejich detekci.

ARMS je metoda detekce jakékoliv mutace v rozsahu záměny jednoho nukleotidu nebo malé delece. Jedná se o variantu alelově specifickou PCR (také AS-PCR, PCR-SSP), jejíž princip popisuje následující obrázek:



Obr. 11: Princip metody ARMS (Cukrovka očima biochemie, 2011)

ARMS je jednoduchá a spolehlivá metoda, která jasně rozliší heterozygota ve sledovaném lokusu od homozygotů pro jednu nebo druhou alelu (Ferrie et al., 1992). Systém ARMS je založen na pozorování, že DNA/DNA hybridy pospojované nedokonalým spárováním („*mismatched*“) na 3'-konci nejsou primeru nejsou vhodnými substráty pro působení *Taq* DNA polymerázy. Tento princip byl využit pro vývoj systému diferenciální amplifikace. Testování pomocí ARMS systému sestává ze dvou samostatných reakcí, z nichž jedna je specifická pro normální DNA sekvenci a druhá pro sekvenci mutantní. Do tohoto testu musí být dále zařazena vnitřní kontrola PCR pro ověření, že v dané zkumavce systém funguje. Je možná realizace tzv. multiplexového ARMS testu, kde je možné kombinovat několik ARMS reakcí. Vlastní PCR probíhá na termocykléru v běžném provedení, následovaná elektroforézou anebo na qPCR cykléru.

2. 7 Komerční soupravy pro detekci mutací v genu *EGFR*

2. 7. 1 TheraScreen® DxS: EGFR29 Mutation Kit (DxS Diagnostics)

Tato souprava umožňuje detekci 29 mutací v genu *EGFR*, které souvisí s možností léčby pomocí TKIs včetně mutace vykazující rezistenci k těmto látkám. Detekuje následující mutace na pozadí standardní DNA pomocí PCR v reálném čase:

Tab. 3: Mutace EGFR detekovatelné soupravou TheraScreen® DxS

Mutace	Exon	Změna báze/ rozsah mutace
Delece*	19	del9 – 18 nt
L858R	21	2573T>G
L861Q	21	2582T>A
T790M	20	2369C>T
S768I	20	2303G>T
Inzerce*	20	ins3 a 9 nt
G719A	18	2156G>C
G719S	18	2155G>A
G719C	18	2155G>T

* mutace jsou podrobněji rozepsány v kapitole Přílohy – Tab. A.
(TheraScreen® DxS: *EGFR Mutation – Instruction for use*, 2009)

2. 7. 1. 1 Princip detekce mutací soupravou TheraScreen® DxS

Tato souprava k detekci mutací pomocí real-time PCR kombinuje technologie ARMS a Scorpions.

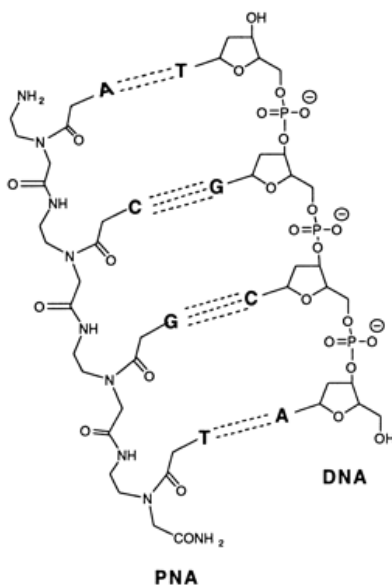
Bifunkční molekuly Scorpions jsou oligonukleotidy obsahující PCR-primer kovalentně navázaný na hybridizační sondu. Oligonukleotid obsahuje na 5' konci fluorofor, který je v interakci se zhášečem navázaným na střední části oligonukleotidu – tzv. monomolekulární škorpión, nebo na 3' konci druhého oligonukleotidu, který je k prvnímu komplementární – tzv. bimolekulární škorpión. Po dokončení cyklu PCR dojde k intramolekulárnímu přeskupení škorpiónu v důsledku hybridizace sondy k cílové sekvenci, čímž se fluorofor oddělí od zhášeče a je detekován světelný signál (Šmarda a kol., 2005). Díky spojení obou technologií je TheraScreen® DxS vysoce citlivá (detekce mutací u méně než 1 % přítomných nádorových buněk) a vysoce specifická souprava.

2. 7. 2 PNA ClampTM EGFR Mutation Detection Kit (Panagene)

PNAClampTM EGFR kit k detekci mutací je založen na technologii real-time PCR za využití blokovací sondy tvořené peptidovou nukleovou kyselinou (PNA).

PNA je syntetický analog DNA, kde je fosfodiesterový skelet nahrazen opakujícími se (2-aminoethyl)-glycinovými jednotkami. PNA je schopná silné vazby na komplementární DNA, ale ne k DNA, která by obsahovala třeba i jedinou sekvenční neshodu. Proto je tato souprava vysoce citlivá a je schopná detekovat velmi malá množství mutantní DNA oproti velkému nadbytku standardní DNA.

Podle Panagene Inc. (2011) spočívá real-time PCR zprostředkované PNA v následujících dvou jedinečných vlastnostech PNA sond. Zaprvé, PNA-DNA duplexy jsou obvykle tepelně stabilnější než odpovídající DNA-DNA duplexy. Zadruhé, oligomery PNA nejsou rozpoznávány DNA polymerázami jako substrát a mohou tedy následně sloužit jako sekvenčně-selektivní blok během PCR amplifikace. Strukturu komplexu PNA-DNA zachycuje následující obrázek:



Obr. 12: *Struktura duplexu PNA-DNA (Physics Forum, 2010)*

PNA sondy se pevně vážou k sekvencím DNA standardní formy genu pro EGFR, čímž zamezuje amplifikaci standardních DNA fragmentů, zatímco mutované DNA fragmenty, především ty obsahující single-nucleotide polymorfismy (dále SNPs), jsou úspěšně amplifikovány.

2. 8 Další metody používané k detekci mutací v genu *EGFR*

Podle AstraZeneca (2011) existuje k detekci mutací přítomných v genu *EGFR* široké spektrum metod různých vlastností, které lze rozdělit na dvě následující skupiny:

- skrínigové metody umožňující detekci všech mutací v *EGFR* (známé i nové)
- metody zaměřené pouze na vybrané mutace v *EGFR*

Tab. 4: Nejčastěji používané metody k detekci mutací v genu *EGFR*

Název metody	Skrínigové metody pro všechny mutace	Metody zaměřené pouze na známé mutace
PCR/ sekvenování	✓	
Nested PCR/ sekvenování	✓	
PCR/ HRMA/ dHPLC (analýza tání)	✓	
Pyrosekvenování	✓	
ARMS		✓
PNA/ LNA Clamp		✓
SnaPshot		✓
PCR/ fluorescenční RFLP		✓
ME PCR/ sekvenování		✓
PCR „invader“		✓

(upraveno podle: AstraZeneca, 2011)

Každý ze dvou výše uvedených přístupů má své relativní výhody a nevýhody, které jsou uvedeny níže.

a) Metody pro detekci všech mutací (např. sekvenování):

- výhody: detekce všech mutací v genu včetně nových
platforma je k dispozici u mnoha genetických laboratoří
- nevýhody: nižší citlivost než u druhého typu metod (10 – 30 % mutované DNA na pozadí standardní DNA)

b) Metody zaměřené na detekci vybraných mutací (např. ARMS)

- **výhody:** rychlá detekce vybraných mutací
vyšší citlivost oproti skrínigovým metodám (záchyt 1 % mutované DNA)
- **nevýhody:** nezachytí nové a netestované mutace
mohou být drahé reagentie

3 Cíle práce

Cílem teoretické části práce bylo shromáždit dostupné informace o genu *EGFR* a proteinu, který tento gen kóduje, a přiblížit tak souvislost mutací v genu se vznikem rakoviny plic, zejména pak s nemalobuněčným karcinomem plic. Teoretická část byla dále zaměřena na současné možnosti léčby NSCLC s mutovaným *EGFR* a na seznámení se s dosavadními metodami a komerčními soupravami pro detekci mutací v genu *EGFR*.

V experimentální části práce bylo vytyčeno několik cílů:

- shromáždit sekvence exonů 18 – 21 genu *EGFR*, sestavit standardní a mutantní sekvence pro 29 typů mutací detekovatelných komerční soupravou TheraScreen® DxS
- navrhnout na tyto uspořádané sekvence pomocí příslušného softwaru primery a TaqMan™ sondy (pro princip ARMS) pro detekci mutací metodou qPCR v reálném čase
- navrhnout a optimalizovat nejvhodnější postup pro detekci nejčastěji se vyskytujících mutací genu tvořících 90 % všech mutací *EGFR* s aktivovanou TK doménou (bodovou mutací L858R v exonu 21 a 19 typů delecí v exonu 19) a to metodami na principu ARMS, popř. metody nested/ COLD PCR.
- statisticky vyhodnotit rozdíl v citlivostech mezi metodami COLD PCR a standardní „ne-COLD“ PCR
- vyhodnotit a srovnat data pacientů vyšetřených v DNA laboratoři LEM při Dětské klinice, LF UP a FN Olomouc na přítomnost mutace v *EGFR* s daty získanými celosvětovými studiemi.

4 Materiál a metodika

4.1 Přístroje a pomůcky

Termocyklér pro real-time analýzu - LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche, Švýcarsko)

- LightCycler® 480 Real-Time PCR je systém umožňující přesnou kvalitativní a kvantitativní detekci DNA a určování genotypu na počtu 96 vzorků nanesených na destičce.



Obr. 13: LightCycler® 480 Real-Time PCR Systém propojený s PC sestavou (vlastní foto, 2011)

Genetický analyzátor pro fragmentační analýzu a sekvenování – CEQ™ 8800 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, USA)

Termocyklér MJR PTC 100 (Biotech, ČR)

Centrifugy:

- Centrifuge 5430 (Eppendorf, Německo)
- Eppendorf MiniSpin (Eppendorf)

Nanodrop:

- Spectrofotometer ND 1000 (Biotech)

Vortex (Merci, ČR)

Termostat Bio TDB – 100 (BioSan, USA)

Laminární box (BioSan)

Chladnička a mrazák (Liebherr, Německo)

Mrazící boxy:

- Mrazící box LG (Jižní Korea)
- Mrazící box C340 New Brunswick Scientific (USA)

Pipety (Eppendorf) o objemech:

- 0,1 – 2,5 μ l
- 0,5 – 10 μ l
- 2 – 20 μ l
- 10 – 100 μ l
- 20 – 200 μ l
- 100 – 1000 μ l

Stojánky:

- Stojánek PCRack s víčkem (P-LAB, ČR)
- Chladící stojánek na mikrozkušavky (Eppendorf)
- Chladící stojánek na zkumavky 1,5 ml (P-LAB)

4. 2 Spotřební materiál

Zkumavky:

- mikrozkušavky pro PCR s plochým víčkem 0,2 ml (P-LAB)
- mikrozkušavky se šroubovacím víčkem 0,5 ml (P-LAB)
- PCR zkumavky 1,5 ml (P-LAB)
- sběrací zkumavky 2 ml (P-LAB)

96ti jamkové destičky LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 clear/ white + fólie (Roche)

Špičky s dvojitým filtrem (Eppendorf) o objemech:

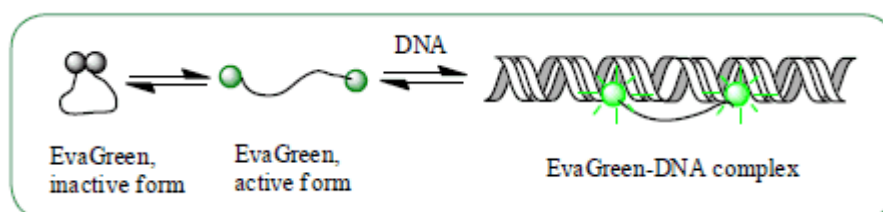
- 10, 20, 100, 200 a 1000 μ l

Ochranné rukavice Digitil N (Hartmann, ČR)

4. 3 Chemikálie a reagentie

4. 3. 1 Chemikálie a reagentie pro real-time PCR

- Voda ošetřená DEPC (Ambion, USA) – sterilně filtrovaná s přidavkem DEPC (dietyl pyrokarbonátu - DEPC modifikuje zbytky histidinu v bílkovinách na N-carbethoxy histidin, což vede k inhibici RNáz a DNáz. DEPC se při autoklávování rozkládá na CO₂ a etanol) a autoklávovaná H₂O
- 10mM TrisCl ph=8 (Trizma hydrochloride buffer solution, Sigma-Aldrich, USA)
- 10x PCR pufr (Thermo Scientific, USA)
- 25mM roztok MgCl₂ (Thermo Scientific)
- 5U/μl Thermo Start DNA polymeráza (Thermo Scientific)
- 25 mM dNTPs (2'-deoxynukleosid-5'-trifosfáty, Thermo Scientific)
- EvaGreen[®] - barvivo vážící se k DNA (Biotium, USA):



Obr. 14: *EvaGreen[®] barvivo se váže na dsDNA mechanismem "uvolnění-na-vyžádání" (release-on-demand) (Biotium, 2011)*

PCR barvivo emituje fluorescenci vytvořením komplexu barvivo-DNA. Barvivo je tvořeno dvěma monomerními DNA-vážícími barvivy interagujícími díky pružnému spojení. Při absenci DNA tvoří dimerické barvivo inaktivní konformaci se smyčkou. Za přítomnosti DNA je smyčka rozvolněna a barvivo je po navázání k DNA fluorescenčně detekováno.

4. 3. 1. 1 Použité primery, sondy a ostatní oligonukleotidy

- zásobní 100 μ M primery a sondy pro **EGFR delece**:
696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 327 (primerová směs – PM č. 409, metoda SSP-ARMS)
- zásobní 100 μ M primery a sondy pro **EGFR L858R bodovou mutaci**:
506, 507 (PM č. 299, externí primery); 642, 643, 638 (PM č. 373, metoda SSP-ARMS); 624, 625, 626, 627 (PM č. 366, endpoint genotyping analýza); 692, 693, 688, 689 (metoda nested/ COLD PCR)
- zásobní 100 μ M primery pro **vnitřní kontrolu β -globin**:
576, 577, 574 (PM č. 337)

Primery, sondy a ostatní oligonukleotidy jsou dodávány výrobcí Metabion (Německo), Generi-Biotech (ČR), Sigma-Aldrich a Exiqon (Dánsko). Sekvence všech výše uvedených primerů jsou uvedeny v kapitole Přílohy – Tab. B.

4. 3. 2 Chemikálie a reagentie pro fragmentační analýzu delecí

- souprava pro purifikaci PCR produktu QIAquick[®] PCR Purification Kit (Qiagen, Nizozemí) obsahující DNA-vázající pufr
promývací pufr s etanolem
eluční pufr
- SLS (deionizovaný formamid s nízkou konduktivitou, Beckman Coulter)
- DNA velikostní standard – DNA Size Standard Kit – 400 (Beckman Coulter)
- separační pufr – DNA CEQ Sep Buffer Kit, Beckman Coulter)
- minerální olej (Beckman Coulter)
- primery: 516, 326 (PM č. 318)

4. 3. 3 Chemikálie a reagentie pro sekvenování L858R bodové mutace

- souprava pro purifikaci PCR produktu QIAquick[®] PCR Purification Kit (Qiagen)
- univerzální master mix z kitu DTCS Quick Start Kit (Beckman Coulter)
- 10 µM primer – 519 (exon 21 interní)
- pro přečištění sekvenačního produktu je potřeba:
 - směs octanu sodného obsahující EDTA
 - GlycoBlue
- SLS (Beckman Coulter)
- Separační pufr (Beckman Coulter)
- Minerální olej (Beckman Coulter)

4. 3. 4 Ostatní chemikálie a reagentie

- Etanol – Ethyl Alcohol 99,8 % for UV spectroscopy (Lach-Ner, ČR) – ředěný na 25 % a 70 % koncentraci
- DNA-ExitusPlus[™] (AppliChem, USA)
- Souprava pro izolaci DNA:
 - Nucleospin Tissue XS Nucleic Acid and Protein Purification (Macherey-Nagel)
 - DNeasy Blood & Tissue Kit 250 (Qiagen)
 - Genome Plex Tissue Whole Genome Amplification Kit (Sigma-Aldrich)

4. 4 Software

LightCycler 480 SW 1.5 (Roche)

CEQ[™] 8800 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, 2004)

ND – 1000 v3.3.0 (Biotech)

FastPCR (primerdigital.com/fastpcr.html)

Web-based Allele Specific Primer – WASP (bioinfo.biotec.or.th/WASP, Biotec, 2006-2009)

Statistica v7.0 (StatSoft Inc.)

Microsoft Office – Word, Excel a PowerPoint (Microsoft Corporation, USA)

4. 5 Biologický materiál

Analyzovaná patientská DNA byla získávána izolací z nádorové tkáně (parafinový bloček, řez), cytologického materiálu (punktát, nátěr) a krve (plazma, leukocyty). Dále byla používána DNA izolovaná z buněčných linií.

Pro izolaci DNA z patientských vzorků byly používány výše uvedené kity a u některých vzorků byla provedena také celogenomová amplifikace (WGA).

Práce byla prováděna laborantkami DNA laboratoře z Laboratoře Experimentální Medicíny (dále LEM) při FN Olomouc.

4. 6 Sekvence exonů 18 – 21 genu *EGFR*

Pro správný návrh sekvencí primerů a dalších sond, je potřeba najít spolehlivý a důvěryhodný zdroj sekvence genu. Proto byla vybrána databáze UCSC Genome Bioinformatics Site (2010) k získání sekvencí exonů 18 – 21 genu spolu s částí intronů obklopující exon (cca 200bp). Takto získané sekvence žádaných exonů byly sestaveny pro dva typy fenotypů – standardní (wildtype) a mutantní. Sekvence byly získány pro ty exony a mutace, které jsou detekovatelné komerční soupravou TheraScreen® DxS. Pro kontrolu správnosti sestavených sekvencí byly používány ještě dva další zdroje sekvence – genomická sekvence z databáze NCBI (2010) a cDNA sekvence z oficiálních stránek genu *EGFR* (EGFR Mutation Database, 2010).

Např. pro wildtype sekvenci exonu 21, kodon 858 je zvýrazněn červeně:

```
gtcagcagcgggttacatcttctttcatgcgctttccattctttggatcagtagtcactaacgttcg
ccagccataagtcctcgcagctggagaggctcagagcctggcatgaacatgaccctgaattcggatgca
gagcttcttcccatgatgatctgtccctcacagcagggtcttctctgtttcagGGCATGAACTACTTG
GAGGACCGTCGCTTGGTGACCGCGACCTGGCAGCCAGGAACGTACTGGTGAAAACACCGCAGCATGT
CAAGATCACAGATTTTGGGCTGGCCAAACTGCTGGGTGCGGAAGAGAAAGAATACCATGCAGAAGGAG
GCAAAgtaaggaggtggctttaggtcagccagcattttcctgacaccaggaccaggctgccttccca
ctagctgtattgtttaacacatgcaggggaggatgctctccagacattctgggtgagctcgcagcagc
tgctgctggcagctgggtccagccagggtctcctggtagtgtagccagagctgctttgggaacagta
cttgctgggacagt
```


a pro mutovanou sekvenci exonu 21 obsahující bodovou mutaci L858R, kodon 858 je zvýrazněn červeně, zaměněná báze tučně:

gtcagcagcgggttacatcttctttcatgcgctttccattctttggatcagtagtcactaacgttcg
 ccagccataagtccctcgacgtggagaggctcagagcctggcatgaacatgaccctgaattcggatgca
 gagcttcttcccatgatgatctgtccctcacagcagggtcttctctgtttcagGGCATGAACTACTTG
GAGGACCGTCGCTTGGTGCACCGCGACCTGGCAGCCAGGAACGTACTGGTGAAAACACCGCAGCATGT
CAAGATCACAGATTTTGGGCGGGCCAAACTGCTGGGTGCGGAAGAGAAAGAATACCATGCAGAAGGAG
GCAAgtaaggaggtggctttaggtcagccagcattttcctgacaccagggaccagggtgccttccca
 ctagctgtattgtttaacacatgcaggggaggatgctctccagacattctgggtgagctcgcagcagc
 tgctgctggcagctgggtccagccaggggtctcctggtagtgtagccagagctgcttgggaacagta
 ctgctgggacagt

Výše uvedeným způsobem byly zaznamenány všechny sekvence wt exonů a exonů s bodovými mutacemi a insercemi.

Pro delece v exonu 19 bylo třeba rozepsat sekvence všech 19 typů těchto delecí (viz kapitola Přílohy – Tab. A) a poskládat je do následujícího tvaru kvůli návrhu primerů:

```
GGA CTC TGG ATC CCA GAA GGT GAG AAA GTT AAA ATT COC GTC GCT ATC AAG GAA TTA AGA GAA GCA ACA TCT CCG AAA GCC AAC AAG
GGA CTC TGG ATC CCA GAA GGT GAG AAA GTT AAA ATT COC GTC GCT ATC AA- --- --- --- --- --A ACA TCT CCG AAA GCC AAC AAG
GGA CTC TGG ATC CCA GAA GGT GAG AAA GTT AAA ATT COC GTC GCT ATC AAG --- --- --- --- --- --- TCT CCG AAA GCC AAC AAG
GGA CTC TGG ATC CCA GAA GGT GAG AAA GTT AAA ATT COC GTC GCT ATC AAG G-- --- --- --- --- --- -CA TCT CCG AAA GCC AAC AAG
GGA CTC TGG ATC CCA GAA GGT GAG AAA GTT AAA ATT COC GTC GCT ATC AAG G-- --- --- --- --- --- -CT CCG AAA GCC AAC AAG
GGA CTC TGG ATC CCA GAA GGT GAG AAA GTT AAA ATT COC GTC GCT ATC AAG --- --- --- --- --- --- ACA TCT CCG AAA GCC AAC AAG
GGA CTC TGG ATC CCA GAA GGT GAG AAA GTT AAA ATT COC GTC GCT ATC AAG GA- --- --- --- --- --- --- -T CCG AAA GCC AAC AAG
GGA CTC TGG ATC CCA GAA GGT GAG AAA GTT AAA ATT COC GTC GCT ATC AAG GAA --- --- --- --- --- --- GCA ACA TCT CCG AAA GCC AAC AAG
GGA CTC TGG ATC CCA GAA GGT GAG AAA GTT AAA ATT COC GTC GCT ATC AAG GAA --- --- --- --- --- --- TCT CCG AAA GCC AAC AAG
GGA CTC TGG ATC CCA GAA GGT GAG AAA GTT AAA ATT COC GTC GCT ATC AAG GAA --- --- --- --- --- --- CCG AAA GCC AAC AAG
GGA CTC TGG ATC CCA GAA GGT GAG AAA GTT AAA ATT COC GTC GCT ATC AAG GAA T-- --- --- --- --- --- -CA TCT CCG AAA GCC AAC AAG
GGA CTC TGG ATC CCA GAA GGT GAG AAA GTT AAA ATT COC GTC GCT ATC AAG GAA T-- --- --- --- --- --- -CG AAA GCC AAC AAG
GGA CTC TGG ATC CCA GAA GGT GAG AAA GTT AAA ATT COC GTC GCT ATC AAG GAA T-- --- --- --- --- --- -CT CCG AAA GCC AAC AAG
```

Obr. 15: Sekvence delecí v exonu 19 sestavených pod sebou (obsahuje delece typu 2235_2249del15, ne delece v komplexu – např. 2237_2255>T, první sekvence je wildtype)

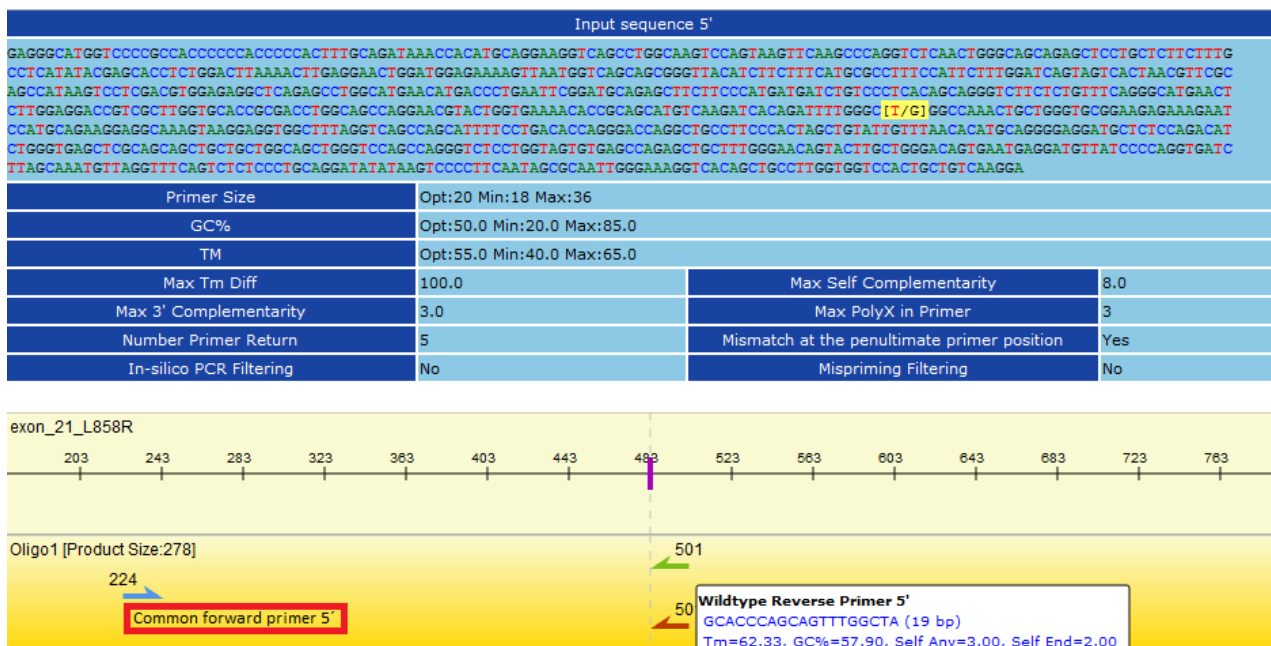
4. 7 Návrh primerů a TaqManTM sond pro metodu SSP-ARMS a Endpoint genotyping analýzu

Pro přesnou a účinnou PCR amplifikaci určitého genu, v našem případě části genomové DNA, je potřeba pečlivého návrhu obou primerů – tedy forward a reverse, při němž je potřeba přihlížet k celkové sekvenci studovaného genomu. Pro lidský genom o velikosti přibližně 3 Gbp postačí sekvence dlouhá cca 16 bp (4^{16}), která by však měla být jedinečná a nacházet se tedy v celém genomu pouze jednou, což zajistí specifickou vazbu na jediné místo.

Jak pro standardní, tak pro real-time PCR, je při designu primerů důležité dodržovat několik pravidel, mezi která patří:

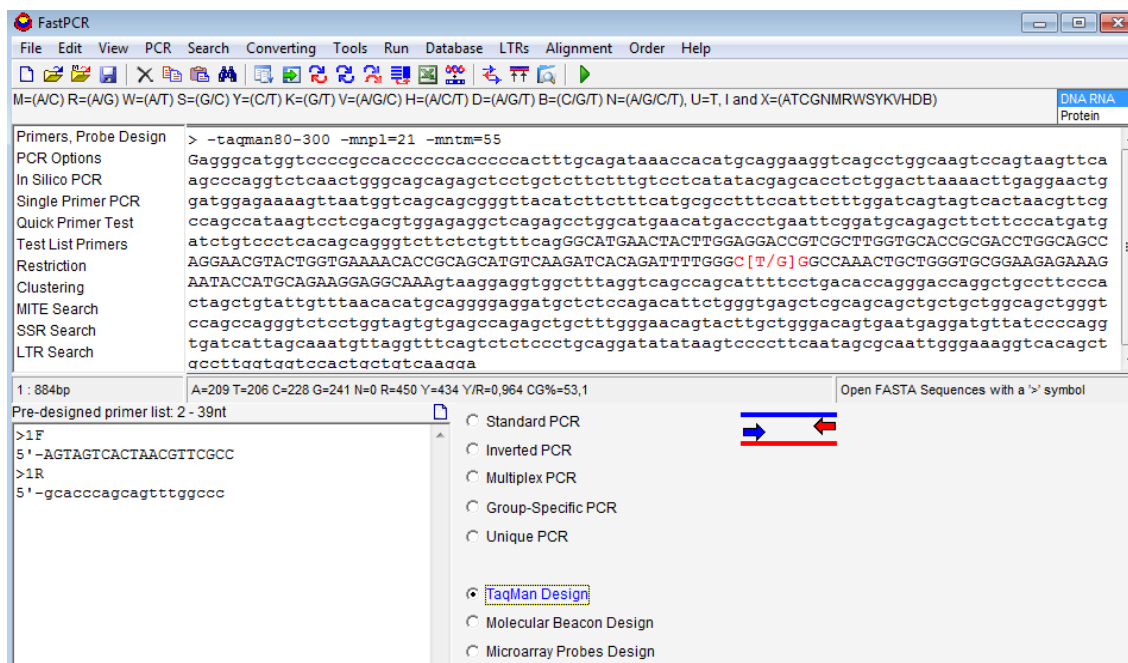
- délka zpravidla 18 – 25 nukleotidů
- obsah G+C bazí alespoň 40 % (až 60 %)
- rovnoměrná distribuce oblastí bohatých na G/C a A/T páry
- T_m (teplota tání) primeru alespoň 50°C
- přibližně stejná T_m teplota u obou primerů z páru
- na matricové DNA se nesmí nacházet nespecifická vazebná místa, aby byla zajištěna specifická vazba primerů
- absence komplementárních sekvencí v primerech, které by mohly vést k tvorbě dimerů
- absence vnitřních sekundárních struktur – vlásenek
- zařazení 1 – 2 zbytků G nebo C na 3'-konec primeru pro zajištění pevné vazby na templátovou DNA

Pro princip ARMS byly navrženy dva páry primerů – pro wildtype a mutantní fenotyp, z nichž jeden primer byl společný pro oba fenotypy a jeden se lišil pouze v koncové bázi napovídající přítomnosti bodové mutace. Pár primerů byl navržen pomocí on-line programu WASP (Web-based Allele Specific Primer) a sondy TaqManTM programem FastPCR.



Obr. 16: Příklad přípravy primerů pro L858R mutaci v programu WASP

Získané primery poté byly přeneseny do programu FastPCR, který navrhnul sondy TaqMan™:



Obr. 17 a 18: Design TaqMan™ sondy pro L858R mutaci v programu FastPCR a jeho výstup

Name	Sequence	Length	Tm	CG%	Q
> -taqman80-300 -mnp1=21 -mntm=55					
1F1_90-110	ccaggtctcaactgggcagca	21	61,6°C	61,9%	109
2F1_125-147	ctttgtcctcatatcagcacc	23	55,1°C	47,8%	89
3F1_260-281	cagccataagtcctcgactgg	22	59,5°C	59,1%	109
4F1_30-53	ccactttgcagataaaccacatgc	24	57,2°C	45,8%	114
5F1_57-77	aaggtcagcctggcaagtcca	21	60,7°C	57,1%	115
6F1_90-110	ccaggtctcaactgggcagca	21	61,6°C	61,9%	109
7F1_125-147	ctttgtcctcatatcagcacc	23	55,1°C	47,8%	89
8F1_260-281	cagccataagtcctcgactgg	22	59,5°C	59,1%	109
9F1_294-314	cctggcatgaacatgaccctg	21	58,4°C	57,1%	111
10F1_316-337	attcggatgcagagcttcttcc	22	57,0°C	50,0%	103
11F1_342-363	atgatctgtccctcacagcagg	22	58,4°C	54,5%	96
12F1_463-485	caagatcacagattttgggctgg	23	56,5°C	47,8%	79
13F1_556-579	tcagccagcattttcctgacacca	24	60,6°C	50,0%	115
14F1_636-656	tctccagacattctgggtgag	21	55,7°C	52,4%	101
15F1_752-773	atgaggatgttatccccagggtg	22	56,1°C	50,0%	75
16F1_818-838	taagtcccccttcaatagcgca	21	55,6°C	47,6%	102
1R1_259-281	ccacgtcgcaggacttatggctgg	23	61,3°C	60,9%	105
2R1_138-159	tttaagtcacagaggtgctcgta	22	54,9°C	45,5%	87

Primery i sondy byly vybrány a objednány na základě porovnání a vyhodnocení nejlepších vlastností sekvencí navržených programy s ohledem na obecně doporučovaná pravidla pro design těchto oligonukleotidů (viz. výše), dále pak možnosti použití jednoho primeru či sondy pro podobné typy mutací (např. L858R a L861Q na exonu 21), a to především z ekonomických důvodů.

Dále byly používány stávající primery z laboratoře DNA (ohraničující mutaci zleva a zprava, používané k fragmentační analýze či sekvenování, aj).

Primery pro delecce byly na základě dodaných sekvencí navrženy doc. Mgr. Drábkem, PhD.

4. 7. 1 Vnitřní kontrola pro metodu SSP-ARMS

Pro ověření správnosti amplifikační reakce založené na principu SSP-ARMS musí být zařazena vnitřní kontrola PCR, v našem případě přidáním primerů pro amplifikaci části genu pro lidský β -globin, která probíhá současně s amplifikací části sekvence genu *EGFR*. Sekvence použitých primerů pro lidský β -globin jsou následující:

Tab. 5: Primery a sonda pro lidský β -globin používané pro ověření správnosti amplifikace (PM č. 337)

Číslo primeru	Název (specifita) primeru	Směr	Sekvence	Speciální nukleotidy
576	Globin	F	CCCACCCTTAggCTgCTggT	
577	Globin	R	ggCAAAGgTgCCCTTgAggT	
574	Globin sonda		TgTCCAAGgTgAgCCAAGgCCATCACT	HEX BHQ1

Pokud nedojde k amplifikaci vnitřní kontroly v příslušném kanálu chybí signál (v našem případě kanál JOE $\lambda= 533-580$), můžeme předpokládat chybu v pipetování, chybění některé z reagensů apod. Primery pro vnitřní kontrolu byly testovány a vybírány na základě koamplifikace s částí genu *BRAF* a softwarového testu komplementarity s primery pro *EGFR*.

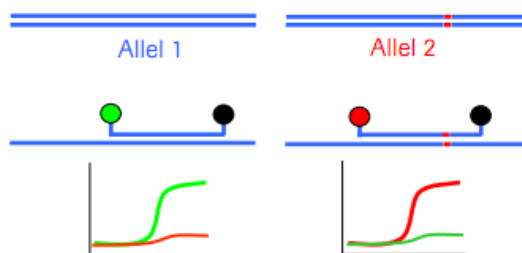
Vnitřní kontrola je také velmi důležitá pro hodnocení výsledku, obzvláště u metody SSP-ARMS, kde produkt vzniká nejen v případě přítomnosti určité alely, ale s určitým zpožděním i v případě nepřítomnosti alely a neshody specifického primeru s templátem. Konkrétně je sledován cyklus amplifikace, ve kterém došlo k překročení prahové hodnoty fluorescence (cycle treshold - C_t) a tedy k nárůstu produktů amplifikace části genu *EGFR* a produktů vnitřní kontroly. Z rozdílu mezi cykly amplifikace (ΔC_t) pro část genu *EGFR* (emise fluorescence v kanálu FAM) a vnitřní kontrolu (kanál JOE) se stanovuje výsledný status analyzovaného vzorku.

Tab. 6: Příklad hodnocení real-time PCR pro detekci mutace L858R metodou SSP-ARMS (PM 373+PM 337)

Číslo vzorku	C_t FAM ($\lambda= 465-510$)	C_t JOE ($\lambda= 533-580$)	ΔC_t	Status vzorku
2935	29,94	17,45	12,49	Negativní
4527	13,00	13,75	0,75	Pozitivní
3010	-	-	-	(nelze určit)

4. 7. 2 Endpoint genotyping analýza

Tato analýza umožněná systémem LC 480 je založena na použití dvou sekvencně-specifických sond (např. TaqMan sondy) pro wildtype a mutantní fenotyp tak, že je každá značená jinou fluorescenční barvičkou a je navržena standardním způsobem (obsahuje fluorofor a zhášeč). Software tak určí genotyp vzorku změřením finální intenzity obou použitých barviček po PCR.





Obr. 19 a 20: Princip endpoint genotyping analýzy a její výstup v podobě bodového diagramu fluorescence na LC 480 (Roche Applied Science, 2011)

V DNA laboratoři LEM se pro Endpoint genotyping analýzu na LC 480 používá dvojice fluorescenčních barviček FAM (osa x) pro wildtype fenotyp a JOE pro mutantní fenotyp (osa y).

4. 8 Příprava primerových směsí specifických pro jednotlivé EGFR mutace

Pro zjednodušení přípravy PCR mixu v kroku přidávání příslušných primerů a zároveň pro zamezení kontaminace zásobních roztoků primerů jsou pro jednotlivé EGFR mutace i pro různé principy PCR analýzy vytvářeny primerové směsi. Primerová směs obsahuje vždy forward a reverse primer (i více primerů různého směru), popřípadě fluorescenčně značenou sondu pro specifickou PCR analýzu. Např. PM č. 366 pro Endpoint genotyping analýzu mutace L858R obsahuje forward primer 624, reverse primer 625 a dvě sondy značené různými fluorescenčními barvičkami 626, 627. V primerové směsi je nutno optimalizovat koncentrace primerů a sond.

4. 9 Příprava PCR mixu, nanášení na destičku a přidavek templátové DNA

PCR mix vždy obsahuje:

- 10x PCR pufr ředěný na koncentraci 1x
- $MgCl_2$ v zásobní koncentraci 25 mM ředěného na koncentraci, kterou bylo potřeba optimalizovat podle typu analýzy (2mM; 1,5 mM nebo 1mM)
- dNTPs v zásobní koncentraci 25 mM ředěných 125x na koncentraci 0,2 mM
- primery vymezující amplifikaci žádaného úseku genu *EGFR* v zásobní koncentraci 100 μ M ředěných podle typu analýzy
- Thermo Start DNA polymeráza v zásobní koncentraci 5U/ μ l ředěná 100x na koncentraci 0,05U/ μ l
- vodu ošetřenou DEPC doplňující PCR mix do žádaného objemu (ten činí 10 μ l nebo 20 μ l)

Podle typu analýzy může PCR mix obsahovat:

- EVAGreen ředěná na koncentraci 0,5x
- PM č. 337 pro vnitřní kontrolu ve směsi o koncentraci 50 μ M ředěná 500x na výslednou koncentraci 1 μ M

Objem master mixu byl vybírán na základě toho, zda bylo potřeba vzorek ještě dál analyzovat, např. nasadit na fragmentační analýzu nebo sekvenování. Pro výsledek při kterém stačil výstup z LC 480, byl volen objem celkového množství master mixu a DNA na 10 μ l, pro potřebu další analýzy pak na 20 μ l.

Při celkovém objemu 10 μ l byla většinou DNA do master mixu o objemu 9,5 μ l naneseného v jamce 96-jamkové destičky přidávána v množství 0,5 μ l nezávisle na přesné koncentraci DNA. U aplikací, které jsou na vstupní množství DNA citlivé (PNAClamp), byla DNA ředěna na finální koncentraci 2 ng/ μ l. Pokud byla stanovována mez detekce dané analýzy (viz. kapitola 4. 13), tj. mutovaná DNA byla ředěna v různém poměru ve wildtype DNA, bylo potřeba změřit koncentraci obou DNA spektrofotometricky na Nanodropu a naředit obě DNA na stejnou koncentraci, tj. 10 ng/ μ l (koncentrace používaná pro stanovení mezu detekce již dříve). DNA pak byla přidávána do 9 μ l objemu mastermixu v množství 1 μ l.

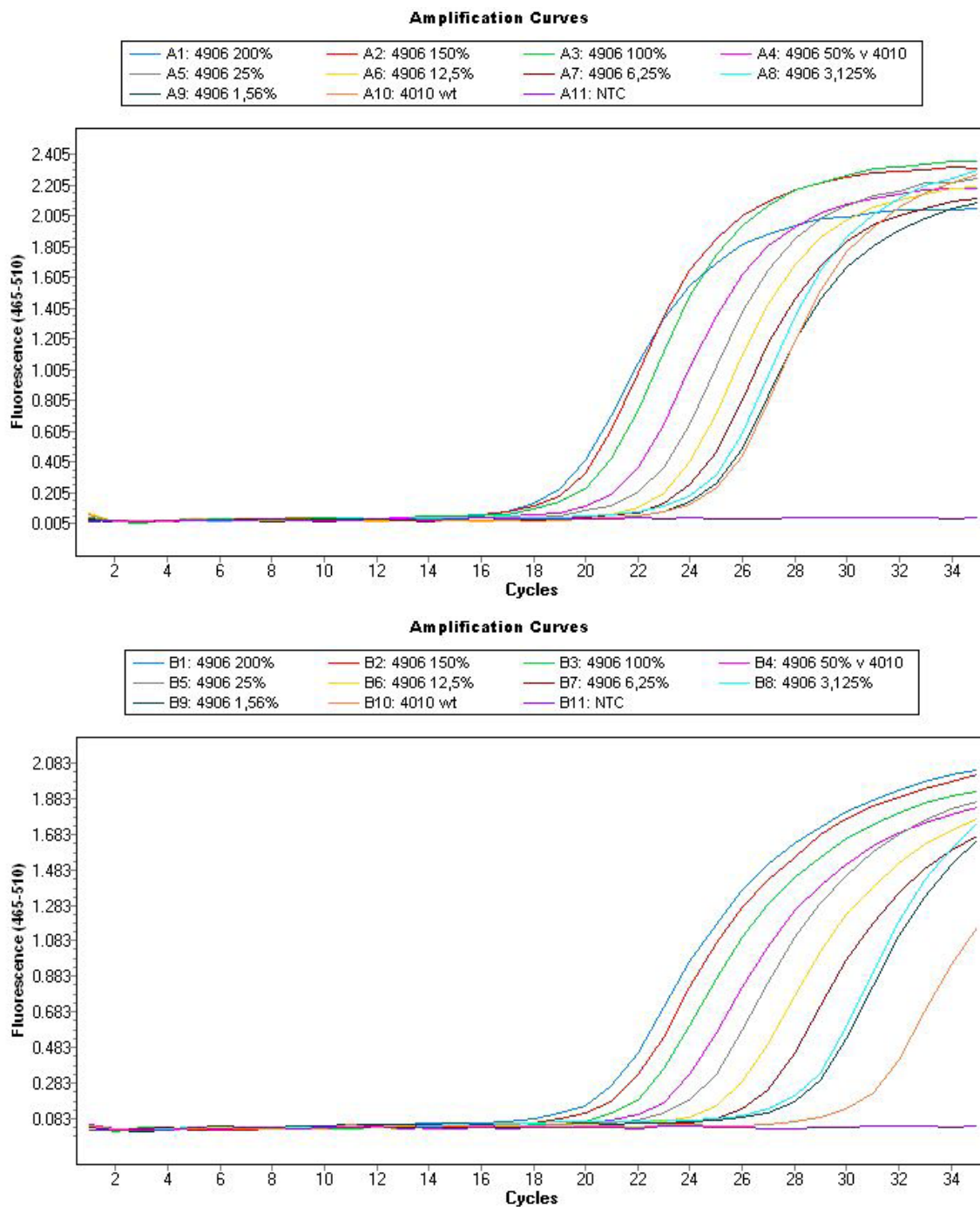
4. 10 Optimalizace koncentrace $MgCl_2$ a dalších složek reakční směsi a optimalizace real-time PCR analýzy na LC 480

Pro získání požadovaného produktu, specifčnosti a výtěžku je důležitá koncentrace jednotlivých složek PCR reakční směsi. Zároveň je třeba optimalizovat přesné hodnoty teploty a dobu trvání jednotlivých kroků real-time PCR.

$MgCl_2$ tvoří v PCR reakční směsi důležitou složku, Mg^{2+} slouží totiž jako kofaktor tvořící s dNTPs rozpustný komplex rozpoznávaný *Taq* DNA-polymerázou. Mg^{2+} reaguje nejen s dNTPs, ale i s primery, templátovou DNA, EDTA a dalšími chelatačními činidly, je proto potřeba jeho množství v reakční směsi optimalizovat. Příliš vysoká koncentrace $MgCl_2$ i některých dalších složek v reakční směsi může vést k chybám a vzniku nespecifických produktů PCR reakce. Optimální koncentrace je stanovena empiricky, zpravidla 1 – 4 mM. Příliš nízká koncentrace Mg^{2+} nemusí nastartovat PCR, či může poskytnout její malý výtěžek z důvodu poklesu aktivity *Taq*-DNA polymerázy.

Při zjišťování optimální koncentrace $MgCl_2$ v reakční směsi pro metody založené na SSP-ARMS a všechny testované mutace byly zpočátku vytvořeny master mixy lišící se koncentrací $MgCl_2$ (2mM a 1,5 mM) a jeho optimální množství stanovováno na základě výsledku real-time PCR. Do tohoto testu je pro ověření správnosti výsledku nezbytné zařazení pozitivních a negativních kontrol v podobě patientské DNA (již předtím opakovaně vyšetřené TheraScreenem DxS, či genovém analyzátoru, vždy vyhodnocené jako pozitivní/ negativní) a DNA izolované z buněčných linií (předpokládá přítomnost mutace 100 %).

Pro detekci mutace L858R metodou PCR-SSP/ARMS s vnitřní kontrolou byla stanovena optimální koncentrace $MgCl_2$ v reakční směsi na 1,5 mM, pro detekci mutace L858R Endpoint genotyping analýzou na 2mM a pro detekci delecí metodou SSP-ARMS s vnitřní kontrolou na 1mM. Rozdíl mezi 1,5 mM a 1 mM horčíkem byl znatelný při zjišťování meze detekce pro delece metodou SSP-ARMS s vnitřní kontrolou (PM č.409+PM č.337) a je znázorněn následujícími dvěma obrázky:



Obr. 21 a 22: Amplifikační křivky real-time analýzy delecí metodou SSP-ARMS s vnitřní kontrolou a 1,5 mM MgCl₂ v porovnání s 1mM MgCl₂

Vzorek pozitivní kontroly předředěný na koncentraci 10ng/μl (4906) byl ředěn diluční řadou ve wildtype DNA (4010) o stejné koncentraci v poměru 1:1, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64. Dále byl analyzován samostatně vzorek 4906 o koncentraci 20 ng/μl, 15 ng/μl a 10 ng/μl, vzorek 4010 o koncentraci 10ng/μl a DEPC-voda jako negativní kontrola.

První rozdíl mezi oběma použitými koncentracemi $MgCl_2$ je z předcházejících obrázků vidět na první pohled. Amplifikační cykly v kanálu FAM se při koncentraci 1,5mM $MgCl_2$ pro jednotlivé vzorky pohybují v rozmezí $C_t = 6,36$ (mezi 20ng/ μ l mut DNA a 10ng/ μ l wt DNA), což může v porovnání s 1mM $MgCl_2$ s rozmezím $C_t = 10,84$ působit méně přehledně a méně specificky. Tuto metodu pro detekci delecí však nebylo možné na základě předešlých pokusů zcela optimalizovat tak jako u bodové mutace L858R a nevykazovala požadovanou citlivost (viz. kapitola 5. 3).

Co se týče koncentrace primerů v PCR reakční směsi je obecně doporučováno rozmezí mezi 0,1 μ M – 1 μ M. Při použití vyšší koncentrace než doporučené mohou nastat při analýze problémy jako je tvorba dimerů mezi primery a snížení účinnosti amplifikace žádaného úseku genu, či zvýšení nespecifických vazeb primerů k DNA, což může vést ke vzniku falešných a nežádaných PCR produktů. Pro detekci mutací genu *EGFR* v této práci byla použita koncentrace primerů v rozmezí od 0,2 – 0,66 μ M koncentrace primerů.

K tvorbě optimálního programu na real-time PCR systému LC 480 pro různé metody detekce genu *EGFR* je potřeba správně nastavit:

- **teplotu annealingu:**
- volí se podle T_m teploty primerů, zpravidla je o 5°C nižší než T_m (55 – 68°C/ 30 – 60s)
- vyšší T_m → vyšší specifita primerů k matricové DNA, vyšší přesnost PCR (příliš vysoká → neproběhnutí PCR)
- nižší T_m → navázání i méně specifických primerů (vznik nespecifických produktů PCR)
- * „touchdown“ režim: teplota s rostoucím počtem cyklů klesá – v prvních cyklech vznik výhradně specifických fragmentů avšak s malým výtěžkem, v dalších cyklech se výkonost PCR zvyšuje – použita pro detekci mutace L858R metodou SSP-ARMS s vnitřní kontrolou
- **počet cyklů:**
- optimálně v rozmezí 25 – 35 cyklů, vyšší počet může vést ke vzniku nespecifických produktů PCR

Programy na LC 480 byly vytvářeny doc. Mgr. Drábkem, PhD.

4. 10. 1 Pracovní protokol a PCR program na LC480 pro detekci mutace L858R Endpoint genotyping analýzou

Po optimalizaci složek reakční směsi a PCR programu na LC 480 byly vzorky vyšetřovány podle následujících protokolů:

Tab. 7: Pracovní protokol pro detekci mutace L858R Endpoint genotyping analýzou 2

Složka reakční směsi	Původní koncentrace	Koncentrace v reakci	Množství složky na jednu reakci (celkový objem= 20 μ l)
DEPC-voda	-	-	17, 13
PCR pufr	10x	1x	2,34
MgCl ₂	25 mM	2 mM	1,872
dNTPs	25 mM	0,2 mM	0,187
Thermo Start DNA polymeráza	5 U/ μ l	0,05 5 U/ μ l	0,234
PM č. 366	100 μ M	2 μ M	0,468
templátová DNA			1 μ l

Tab. 8: Program na LC 480 pro detekci mutace L858R Endpoint genotyping analýzou 2

Název programu	Teplota (°C)	Čas (hh:mm:ss)	Počet cyklů
1. Denaturace	95	00:15:00	1
2. PCR amplifikace	95	00:00:10	40
	60	00:00:50	
	72	00:00:20	
3. Parkování	50	00:00:01	1

4. 10. 2 Pracovní protokol a PCR program na LC480 pro detekci mutace L858R metodou PCR-SSP/ARMS s vnitřní kontrolou

Po optimalizaci složek reakční směsi a PCR programu na LC 480 byly vzorky vyšetřovány podle následujících protokolů:

Tab. 9: Pracovní protokol pro pro detekci mutace L858R metodou PCR-SSP/ARMS s vnitřní kontrolou

Složka reakční směsi	Původní koncentrace	Koncentrace v reakci	Množství složky na jednu reakci (celkový objem= 20 μ l)
DEPC-voda	-	-	17,54
PCR pufr	10x	1x	2,34
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	1,41
dNTPs	25 mM	0,2 mM	0,187
Thermo Start DNA polymeráza	5 U/ μ l	0,05 5 U/ μ l	0,234
PM č. 337	100 μ M	0,2 μ M	0,047
PM č. 373	100 μ M	2 μ M	0,468
templátová DNA			1 μ l

Tab. 10: Program na LC 480 pro detekci mutace L858R metodou PCR-SSP/ARMS s vnitřní kontrolou

Název programu	Teplota (°C)	Čas (hh:mm:ss)	Druhá teplota (°C) a velikost kroku (°C)	Počet cyklů
1. Denaturace	95	00:15:00		1
2. PCR touchdown	95	00:00:15	56 a 1	10
	70	00:00:50		
3. PCR amplifikace	72	00:00:20		35
	95	00:00:15		
	60	00:00:50		
4. Parkování	72	00:00:20		
	50	00:00:01		1

4. 10. 3 Pracovní protokol a PCR program na LC480 pro detekci mutace L858R metodou COLD PCR

Vzorky pro tuto analýzu byly vyšetřovány podle pracovního protokolu pro Endpoint genotyping analýzu. Prvotní analýzou 3 vzorků DNA s PM č. 366 na gradientovém termocykléru byla vybrána optimální teplota denaturace na 85°C (viz. kapitola 4. 12. 1). Podle toho byl na LC vytvořen následující PCR program.

Tab. 11: Program pro detekci mutace L858R metodou Endpoint genotyping analýzy COLD PCR

Název programu	Teplota (°C)	Čas (hh:mm:ss)	Počet cyklů
1. Denaturace	95	00:15:00	1
2. PCR	95	00:00:10	10
	60	00:00:50	
3. PCR COLD	72	00:00:20	30
	85	00:00:10	
	60	00:00:50	
4. Parkování	72	00:00:20	1
	50	00:00:01	

4. 10. 4 Pracovní protokol a PCR program na LC480 pro detekci delecí metodou PCR-SSP/ARMS s vnitřní kontrolou

Po optimalizaci složek reakční směsi byly vzorky vyšetřovány podle následujícího protokolu:

Tab. 12: Pracovní protokol pro detekci delecí metodou PCR-SSP/ARMS s vnitřní kontrolou

Složka reakční směsi	Původní koncentrace	Koncentrace v reakci	Množství složky na jednu reakci (celkový objem= 20 µl)
DEPC-voda	-	-	16,15
PCR pufr	10x	1x	2,34
MgCl ₂	25 mM	1 mM	0,936

dNTPs	25 mM	0,2 mM	0,187
Thermo Start DNA polymeráza	5 U/ μ l	0,05 5 U/ μ l	0,234
PM č. 337	100 μ M	0,2 μ M	0,047
PM č. 409	100 μ M	10 μ M	2,34
templátová DNA			1 μ l

4. 11 Určování meze detekce metody

Pro každou testovanou metodu pro detekci mutací je nezbytné zjistit nejnižší množství mutace ve vzorku, které může být danou metodou detekováno. K tomu se využívá ředění vhodné patientské DNA, ve které byla předchozími testy (např. TheraScreen® DxS) zjištěna mutace zájmu na pozadí wildtype DNA. Namísto patientské DNA je možné použít i vybranou buněčnou linii, kde je předpokládána 100 % přítomnost mutace.

U obou testovaných DNA je nejdříve potřeba na Nanodropu změřit koncentraci a podle výsledků pak DNA naředit pomocí 10 mM Tris-Cl na stejnou koncentraci – 10ng/ μ l. Poté je mutovaná DNA diluční řadou naředěna ve wildtype DNA např. 1:1; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32 a 1:64, popř. použity i vyšší koncentrace mutované DNA (např. 20 ng/ μ l a 15 ng/ μ l). U mutované patientské DNA, u které nevíme přesné procento obsahu mutace, je lepší mluvit o dílech. DNA izolovanou z buněčné linie obsahující 100% mutaci pak ředíme ve wildtype DNA např. na 50 %; 25 %; 12,5 %; 6,25 %; 3,125 %; 1,5625 %, popř. nižší. Mez detekce lze určit u každé z testovaných metod (fragmentační analýzy a sekvenování na genovém analyzátoru, qPCR metody na cykléru).

4. 12 COLD PCR – COamplification at Lower Denaturation PCR

COLD PCR je novou modifikací PCR, která selektivně posílí amplifikaci templátové DNA, která obsahuje mutaci (Milbury a kol., 2011). Je to metoda založená na snížené teplotě tání heteroduplexů mezi mutantní a standardní DNA na rozdíl od wildtype homoduplexů (a mutantních homoduplexů v případě mutantních buněčných linií). Po denuraci jsou k hybridizaci s primery přístupné převážně jen heteroduplexy mutant-standard, z nichž se každá část teoreticky amplifikuje s 50% účinností, což může výrazně zvýšit citlivost PCR analýzy.

4. 12. 1 COLD PCR analýza mutace L858R

Pro zvolení optimální hodnoty denaturace byly nejdříve vyšetřované vzorky DNA nasazeny na gradientový termocyklér umožňující testování několika teplot denaturace v jediném běhu.

Byly analyzovány 3 vzorky DNA PM č. 366 při dvanácti teplotách:

- mutovaná patientská DNA 4527 o koncentraci 10ng/μl naředěná ve wildtype DNA 4010 o koncentraci 10ng/μl v poměru 1:16 (1); 1:32 (2), 1:64 (3).

Tab. 13: Gradient denaturačních teplot použitých pro optimalizaci COLD PCR na LC 480 pro detekci mutace L858R

č. zkumavky	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
teplota denaturace (°C)	83,5	83,6	83,8	84,1	84,5	84,8	85,2	85,5	85,9	86,2	86,4	86,5
1. mut:wt 1:16												
2. mut:wt 1:32												
3. mut: wt 1:64												

Právě tyto poměry mutované a wildtype DNA byly zvoleny, protože pokrývají oblast citlivosti, kterou je maximálně schopna dosáhnout „ne-COLD“ PCR.

Na základě tohoto pokusu bylo vybráno rozpětí 3 teplot, při kterých byla PCR nejefektivnější: 84,5 - **84,8** - 85,2°C a následovala real-time PCR na LC 480 při teplotách denaturace 85°C (COLD PCR) a 95°C („ne-COLD“ PCR).

4. 12. 1. 1 Statistické srovnání COLD a „ne-COLD“ PCR

Výsledky tohoto pokusu byly srovnány za použití standardních statistických metod:

- testování hypotéz - p-value menší než 0,05 je považována za statisticky signifikantní
- porovnání dvou metod párovým t-testem a znaménkovým testem

T-test umožňuje ověřit některou z následujících hypotéz:

- zda normální rozdělení, z něhož pochází určitý náhodný výběr, má určitou konkrétní střední hodnotu, přičemž rozptyl je neznámý
- zda dvě normální rozdělení mají stejné střední hodnoty (resp. rozdíl těchto středních hodnot je roven určitému danému číslu)

V našem případě ověřujeme druhou hypotézu, přičemž náhodný výběr je tvořen dvojicemi hodnot, u nichž zjišťujeme významnost jejich rozdílů – párový t-test. Párový t-test vychází z náhodného výběru poskytujícího dvojice hodnot $(y_1, z_1), (y_2, z_2), \dots, (y_n, z_n)$, přičemž uvnitř každé dvojice nemusí jít o nezávislé veličiny (Anděl J., 1985). V tomto testu jsme testovali hypotézu H_0 , zda rozdíl středních hodnot rozdělení pro veličiny y (COLD PCR) a z („ne-COLD PCR) je roven 0.

Znaménkový test se užívá v případě dvou opakovaných měření na týchž objektech. U tohoto testu se nejdříve pomocí znamének (+) a (-) vyjádří, zda u jednotlivých vzorků došlo ke zvýšení, či snížení hodnot. Test je založen na úvaze, že v případě, že by nebyl mezi oběma měřeními rozdíl, měla by se obě znaménka vyskytovat se stejnou pravděpodobností, tj. měl by jich být stejný počet. „Rozdíl mezi oběma opakovanými měřeními se projeví tím, že znaménka jednoho druhu začnou převažovat nad znaménky druhého druhu, a to tím více, čím tento rozdíl bude výraznější“ (Chráska, 2007). Testem byla prověřována účinnost „ne-COLD“ PCR jakožto nové metody, tzn. zda je tato metoda lepší než stará (standardní PCR).

Statistické srovnání bylo zpracováno s pomocí Mgr. Lenky Radové, Ph.D.

4. 13 Zpracování dat pacientů vyšetřených na mutace genu *EGFR* z DNA databáze LEM

Informace o pacientech byly zpracovány z období roku 2009 – 2011, ve kterém byli pacienti vyšetřeni na přítomnost mutace v genu *EGFR* komerční soupravou TheraScreen® DxS. Ve všech případech se jednalo o onkologické pacienty. Pacienti byli rozděleni podle pohlaví a poté podle rodných čísel, protože na jednoho pacienta mohlo připadat více vzorků (většinou DNA izolovaná z různých tkání – vždy nádorová tkáň v podobě parafinového bločku, popř. ještě plazma, či buněčný nátěr). Pokud byla detekována mutace, byla přítomna vždy v nádorové tkáni a nemusela být detekována v plazmě. Proto byl u takového pacienta počítán výsledek z tkáně, kde je předpokládáno vyšší procento mutace. Každý pacient byl tak nakonec započítán pouze jednou. Kromě výsledku z TheraScreenu byl dále sledován kuřácký status, či indikovaná léčba. Obě položky však často v databázi chyběly, jsou proto brány pouze jako doplňkové. Data byla procentuálně a graficky zpracována pomocí MS Excel.

5 Výsledky

5. 1 Optimalizace real-time PCR analýzy pro detekci bodové mutace L858R

5. 1. 1 Detekce mutace L858R Endpoint genotyping analýzou

5. 1. 1. 1 Analyzované vzorky a použité primery

Pro tuto analýzu bylo vyšetřeno PM č. 366 vyšetřeno 20 vzorků DNA a DEPC-voda jako negativní kontrola. PM č. 366 obsahuje následující primery a sondy:

Tab. 14: Oligonukleotidy obsažené v PM č. 366

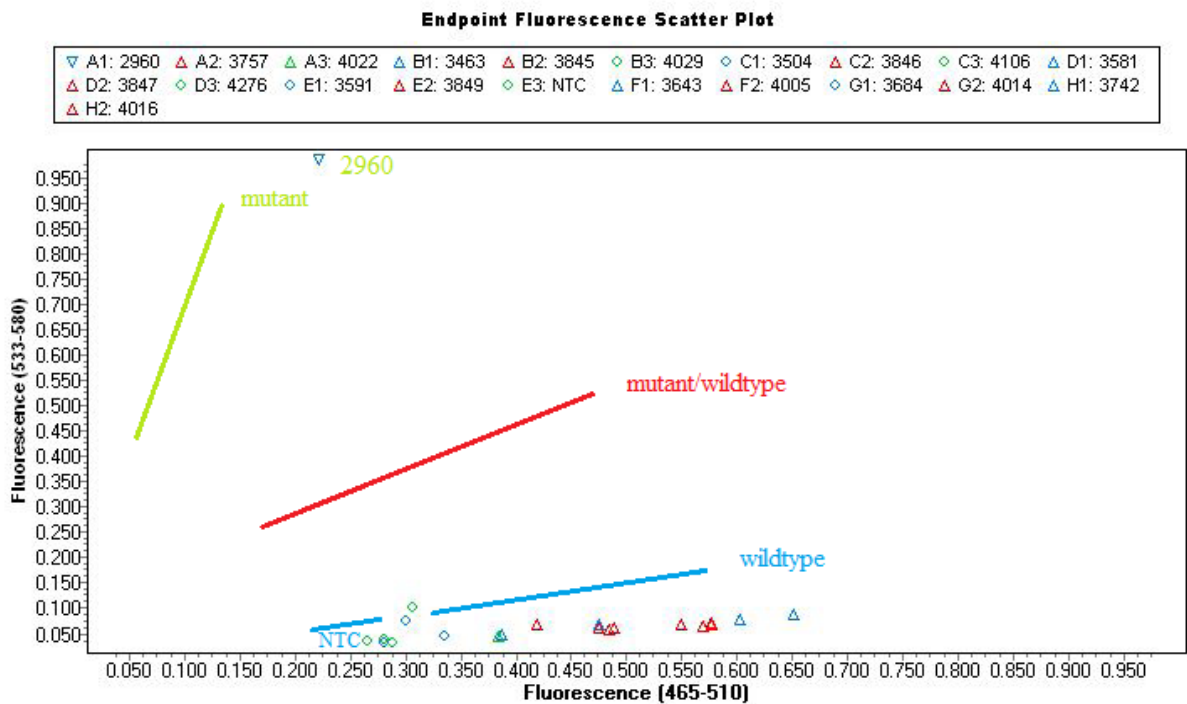
Číslo oligon.	Název (specifita) oligonukleotidu	Směr	Sekvence	Speciální nukleotidy
624	EGFR exon 21 pro L858R	F	CACCgCAgCATgTCAAgA	
625	EGFR exon 21 pro L858R	R	TgCCTCCTTCTgCATggTAT	
626	EGFR exon 21 L858R sonda standardní		CACAgATTTTgggCTgg	5'-FAM, 3'-BHQ1
627	EGFR exon 21 L858R sonda mutantní	F	ATTTTgggCgggCCA	5'-TET, 3'-BHQ1

Endpoint genotyping analýzou pro detekci mutace L858R bylo vyšetřeno 20 vzorků DNA:

- pozitivní kontrola: buněčná linie NCI-H1975 s mutací L858R pod DNA číslem 2960
- ostatní vzorky, které byly voleny náhodně, jejich status byl neznámý, či v nich soupravou TheraScreen® DxS byla detekována delece či žádná mutace: 3463, 3504, 3581, 3591, 3643, 3684, 3742, 3757, 3845, 3846, 3847, 3849, 4005, 4014, 4016, 4022, 4029, 4106, 4276,
- negativní kontrola (NTC): DEPC-voda

Vzorky nanesené na 96-jamkovou destičku byly analyzovány na LC 480 programem v touchdown režimu.

5. 1. 1. 2 Výsledky Endpoint genotyping analýzy pro detekci mutace L858R



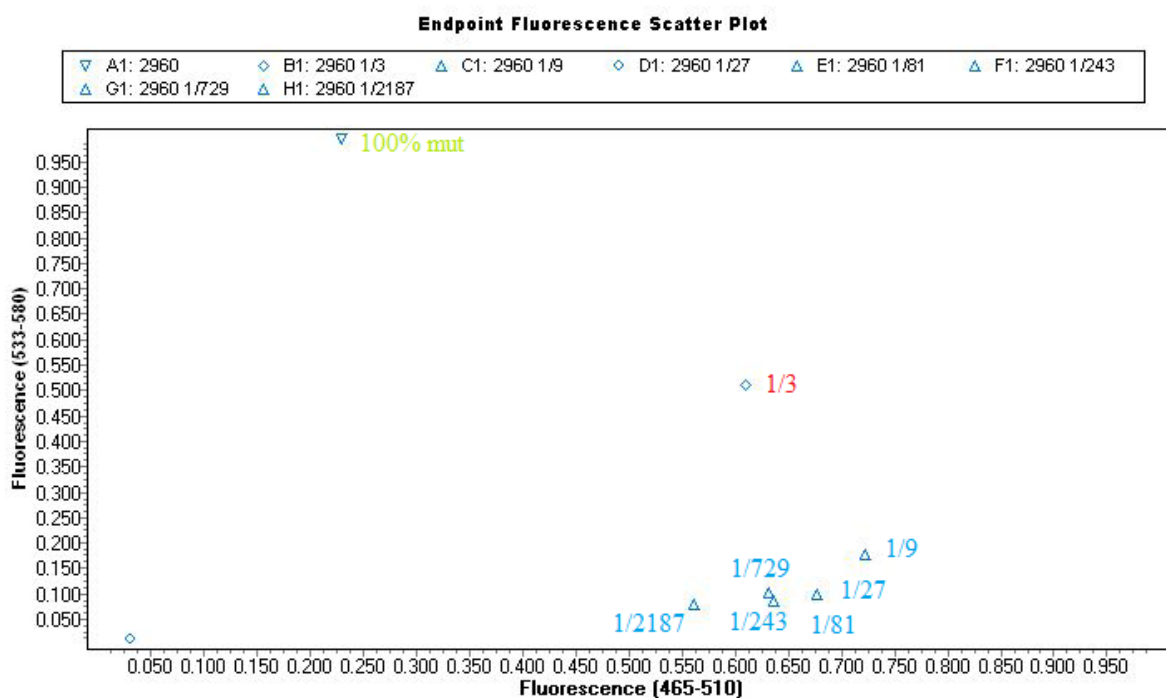
Obr. 23: Diagram fluorescence vzorků vyšetřených na L858R Endpoint genotyping analýzou – osa y signál pro JOE (mutace), osa x signál pro FAM (wildtype)

Z obrázku lze vidět, že pouze vzorek 2960, tedy mutantní buněčná linie, je v diagramu vyhodnocen jako mutantní. Tento test nevypovídá není dostatečný pro zhodnocení, jak se bude primerová směs chovat s reálnými patientskými vzorky s minoritní mutantní populací. Proto bylo dále třeba určit mez detekce této metody.

5. 1. 1. 3 Stanovení meze detekce metody

Ke stanovení meze detekce metody byla použita mutantní buněčná linie 2960 (mut) ředěná ve standardní DNA 3642 (wt) v poměrech: 100 % mut, 1/3 (mut/wt), 1/9, 1/27, 1/81, 1/243, 1/729, 1/2187. Pokus byl opakován znova za použití stejné mutantní DNA ředěné ve standardní DNA 4021 v poměrech: 100 %, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 a 1/128. Prvním pokusem bylo dokázáno, že je tato metoda schopná detekovat přibližně **33 %** mutantních buněk na 67 % buněk zdravých. Druhý pokus dokonce dokázal citlivost ještě nižší a to **50 %** mutantních buněk na 50% zdravých. Ve srovnání se soupravou TheraScreen® DxS, která je schopná zachytit méně než 1% přítomných mutantních buněk, je tato metoda s **33 %** záchytem mutantních buněk pro detekci mutace L858R nedostačující, protože se ve vzorku

často může vyskytovat jen minoritní populace mutantních buněk (1 % a nižší). Za klinicky významnou se bere hranice 1 %.



Obr. 24: Diagram fluorescence koncentrační řady mutantní DNA 2960 ve standardní DNA 3642 při stanovení meze detekce metody

5. 1. 2 Detekce mutace L858R vylepšenou Endpoint Genotyping analýzou

Po pokusu s nedostatečnou citlivostí byla vytvořena nová platforma této analýzy, a to změnou koncentrace jedné ze složek PCR mixu a tvorbou nového PCR programu (viz. kapitola 4.10.1)

5. 1. 2. 1 Analyzované vzorky a použité primery

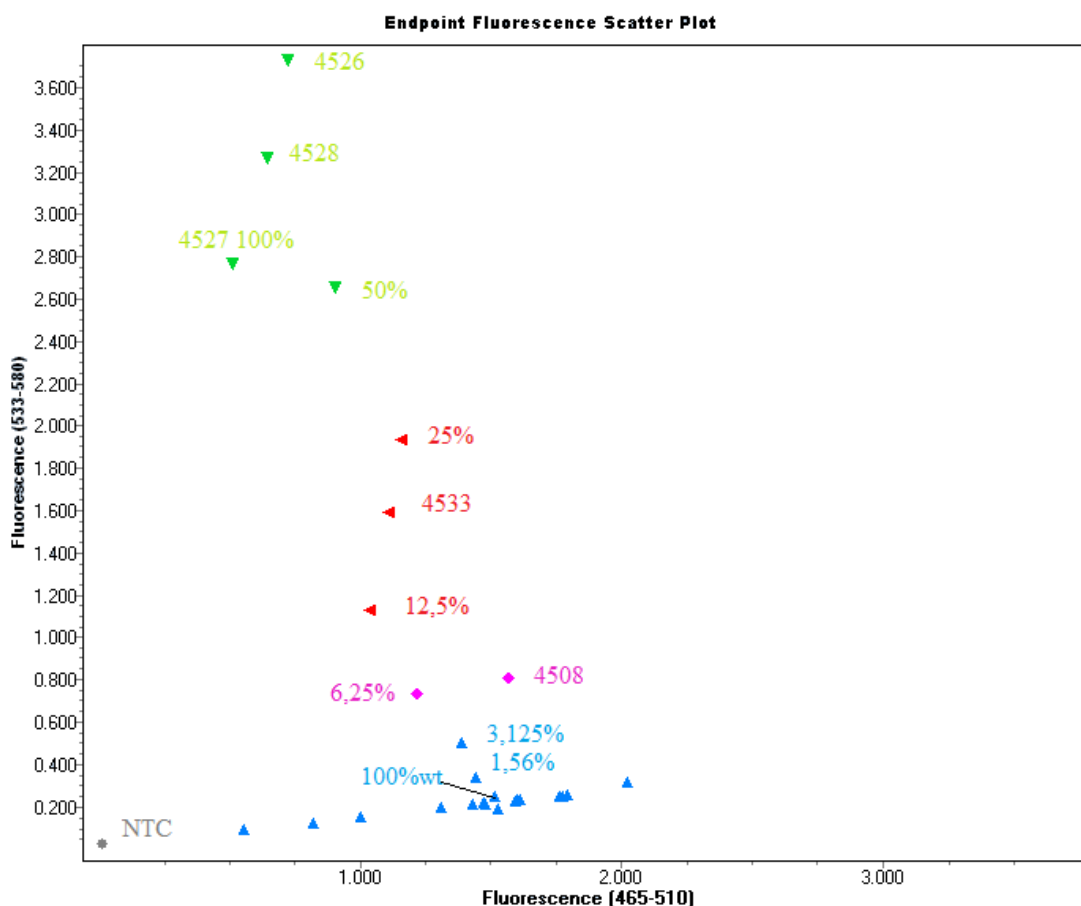
Endpoint genotyping analýzou 2 bylo pro detekci mutace L858R vyšetřeno 26 vzorků DNA:

- L858R mutantní buněčná linie NCI-H1975 pod DNA číslem 4527 ředěná ve standardní DNA 4010 na procento mutantních buněk: 50 %; 25 %; 12,5%; 6,25 %; 3,125 %; 1,56 %; 100 % mutovaná DNA 4527 a 100 % wildtype DNA 4010
- další mutantní buněčné linie: 4526, 4528, 4533, 5269
- patientské vzorky pozitivní na mutaci: 4508, 4548, 4589

- pacientské vzorky negativní na mutaci: 5474, 5475, 5479, 5480, 5481, 5486, 5499, 5502, 5512, 5517, 5542
- negativní kontrola: DEPC-voda

Primerová směs zůstala stejná (PM č. 366).

5. 1. 2. 2 Výsledky analýzy a stanovení meze detekce metody



Obr. 25: Diagram fluorescence Endpoint genotyping analýzy pro detekci mutace L858R a stanovení meze detekce metody

Testem byla prokázána schopnost vylepšené Endpoint genotyping analýzy zachytit **12,5 %** mutantních buněk na 87,5 % buněk zdravých. 6,25 % mutantní DNA na pozadí standardní DNA by už byl považován za hraniční výsledek. Z diagramu je dále možné vyčíst další informace o analyzovaných vzorcích – buněčné linie 4526 a 4528 musely obsahovat 100% mutantních buněk. Ostatní analyzované buněčné linie by tedy měly teoreticky obsahovat nižší procento mutantních buněk. Z patientských vzorků by mohl být 4508 považován za hraniční, ostatní vzorky, které byly podle TheraScreenu dříve prokázány jako pozitivní, zřejmě

nesplňovaly požadavky na procento obsahu mutantních buněk, byly tedy touto metodou určeny jako negativní.

5. 1. 3 Detekce mutace L858R metodou PCR-SSP/ARMS s vnitřní kontrolou

5. 1. 3. 1 Analyzované vzorky a použité primery

Dalším krokem bylo vytvoření L858R specifické směsi za použití protokolu PCR-SSP/ARMS ve složení primery a FAM/JOE sondy pro mutaci L858R v genu *EGFR* a primery a JOE sonda pro β -globin (dvoubarevný TaqMan princip s vnitřní intrazkumavkovou kontrolou).

Podle níže uvedeného protokolu bylo analyzováno 96 vzorků DNA (velký soubor z důvodu současného vyloučení falešně pozitivních výsledků). Mezi analyzovanými vzorky byly tyto vzorky pozitivní na L858R mutaci:

- pozitivní kontrola: buněčné linie NCI-H1975 – 4526, 4527, 4528 a 4533
- patientský vzorek: 4589
- ostatní vzorky byly různého statusu – pozitivní na mutaci, negativní či neanalyzované
- negativní kontrola DEPC-voda

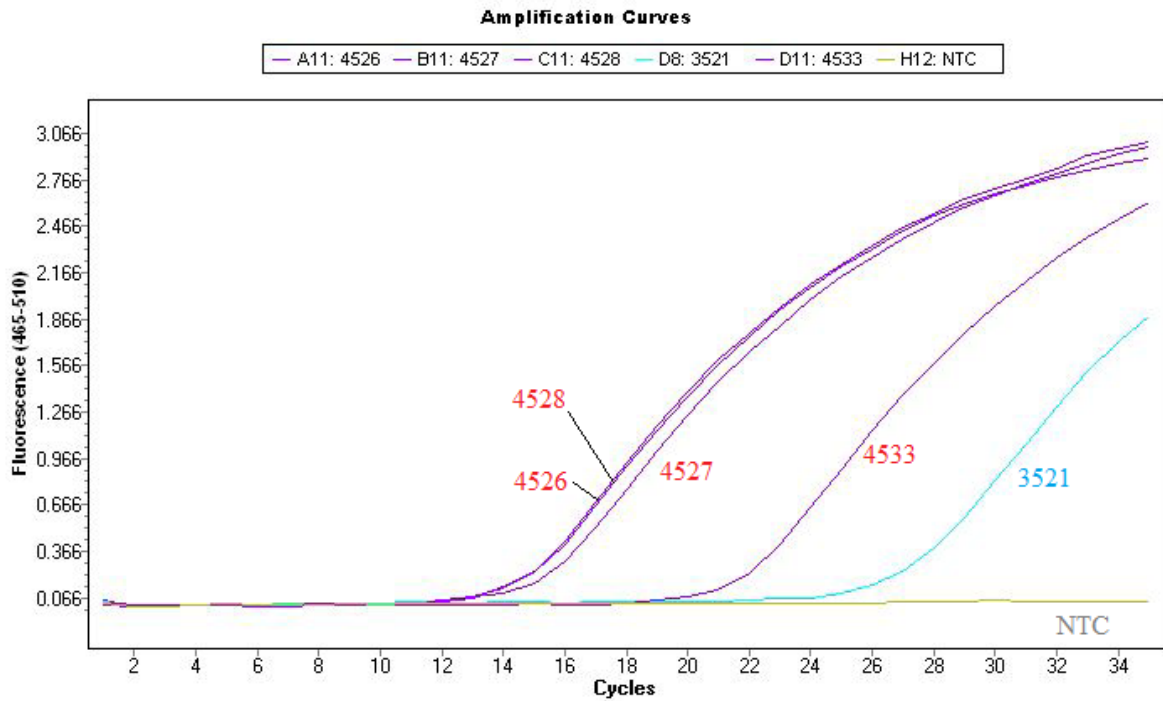
Primerová směs (PM č. 373+337) obsahuje následující primery a sondy.

Tab. 15: Oligonukleotidy obsažené v primerové směsi pro *EGFR* a globin

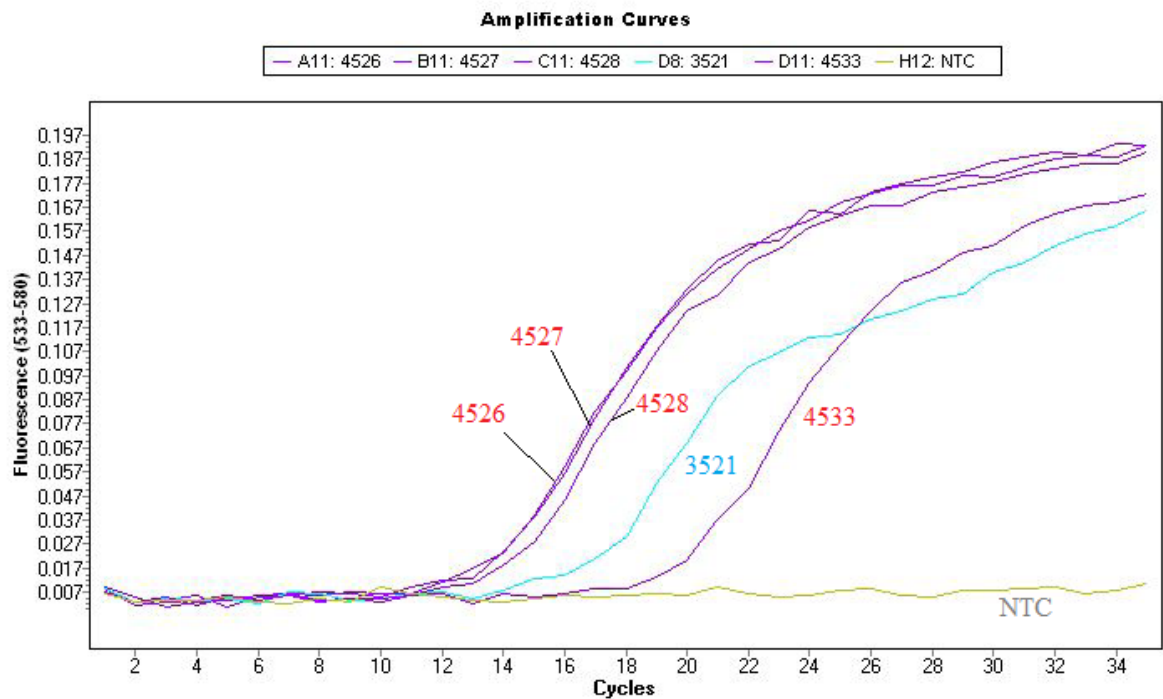
Číslo oligon.	Název (specifita) oligonukleotidu	Směr	Sekvence	Speciální nukleotidy
642	EGFR exon 21 L858R	F	gATCAgTAgTCACTAACgTTCgCC	
643	EGFR exon 21 L858R specifický	R	CACCCAgCAgTTTggCCC	
638	EGFR exon 21 L861 a L858 sonda	F	CCTggCATgAACATgACCCTg	5' FAM, 3' BHQ1
576	Globin	F	CCCACCCTTAggCTgCTggT	
577	Globin	R	ggCAAAGgTgCCCTTgAggT	
574	globin sonda		TgTCCAggTgAgCCAggCCATCACT	5' HEX, 3' BHQ1

Vzorky nanesené na celou 96-jamkovou destičku byly na LC 480 analyzovány programem v touchdown režimu (viz. kapitola 4. 10. 2).

5. 1. 3. 2 Výsledky analýzy a její hodnocení



Obr. 26: Amplifikační křivky vzorků analyzovaných na přítomnost mutace L858R metodou SSP-ARMS v kanálu FAM (mutace v EGFR)



Obr. 27: Amplifikační křivky vzorků analyzovaných na přítomnost mutace L858R metodou SSP-ARMS v kanálu JOE (β -globin)

Protože by byly křivky fluorescence všech 96 vzorků nepřehledné, byly do obrázku vybrány pouze 4 vzorky vyhodnocené jako pozitivní, jeden negativní a DEPC-voda (NTC).

Hodnocení vzorků je provedeno na základě rozdílu cyklů amplifikace jednotlivých vzorků, ve kterých došlo k překročení prahové hodnoty fluorescence (C_t), mezi signálem v kanálu FAM a signálem v JOE (ΔC_t).

Tab. 16: Hodnocení vzorků vyšetřených na mutaci L858R metodou PCR-SSP/ARMS s vnitřní kontrolou pomocí ΔC_t

Číslo vzorku	C_t FAM ($\lambda= 465-510$)	C_t JOE ($\lambda= 533-580$)	ΔC_t	Status vzorku
4526	12,63	13,65	0,96	Pozitivní
4527	13,00	13,75	0,75	Pozitivní
4528	12,73	14,36	1,63	Pozitivní
4533	19,88	19,99	0,11	Pozitivní
3521	24,34	16,86	7,48	Negativní
NTC	-	-	-	(nelze)

Na základě řady testů s touto metodou bylo stanoveno, že ΔC_t menší než 4 cykly odpovídá záchytu mutace, vzorek je tedy pozitivní. Přesná hraniční hodnota bude získána po rozšíření souboru. Pokud je ΔC_t vyšší než 4, vzorek je vyhodnocen jako negativní. O čistotě provedení testu vypovídá negativní kontrola (NTC), u které by neměl být signál v žádném kanálu, což je splněno.

Experimentem bylo zjištěno, že:

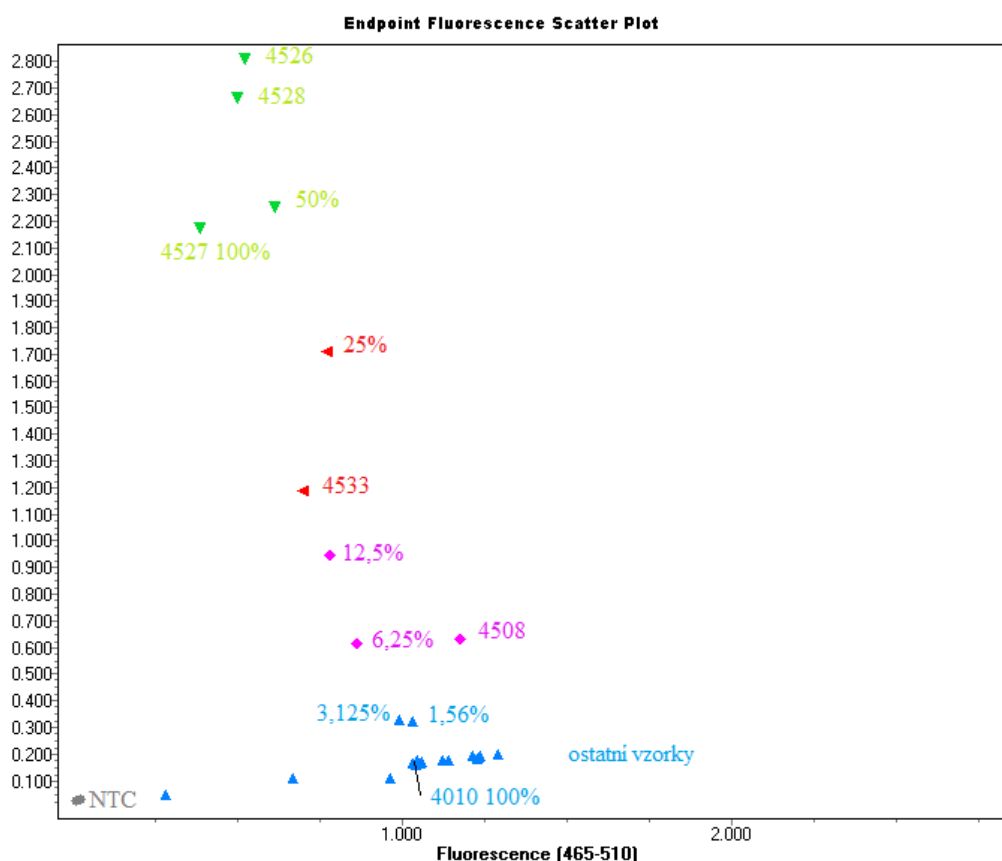
- z **pěti** vzorků TheraScreenem dříve určených jako **pozitivní** na mutaci L858R byly **správně určeny 4** z nich (vše buněčné linie)
- u **šesti** vzorků nebylo možné status odečíst (řeší se opakováním analýzy vzorků)
- **85** vzorků bylo **správně určeno jako negativní**, což vylučuje přítomnost falešně pozitivních výsledků

5. 1. 4 COLD PCR analýza bodové mutace L858R

Prvotní analýzou 3 vzorků DNA s PM č. 366 na gradientovém termocykléru byla vybrána optimální teplota denaturace na **85°C**. Podle toho byl na LC vytvořen PCR program (viz. kapitola 4. 10. 3).

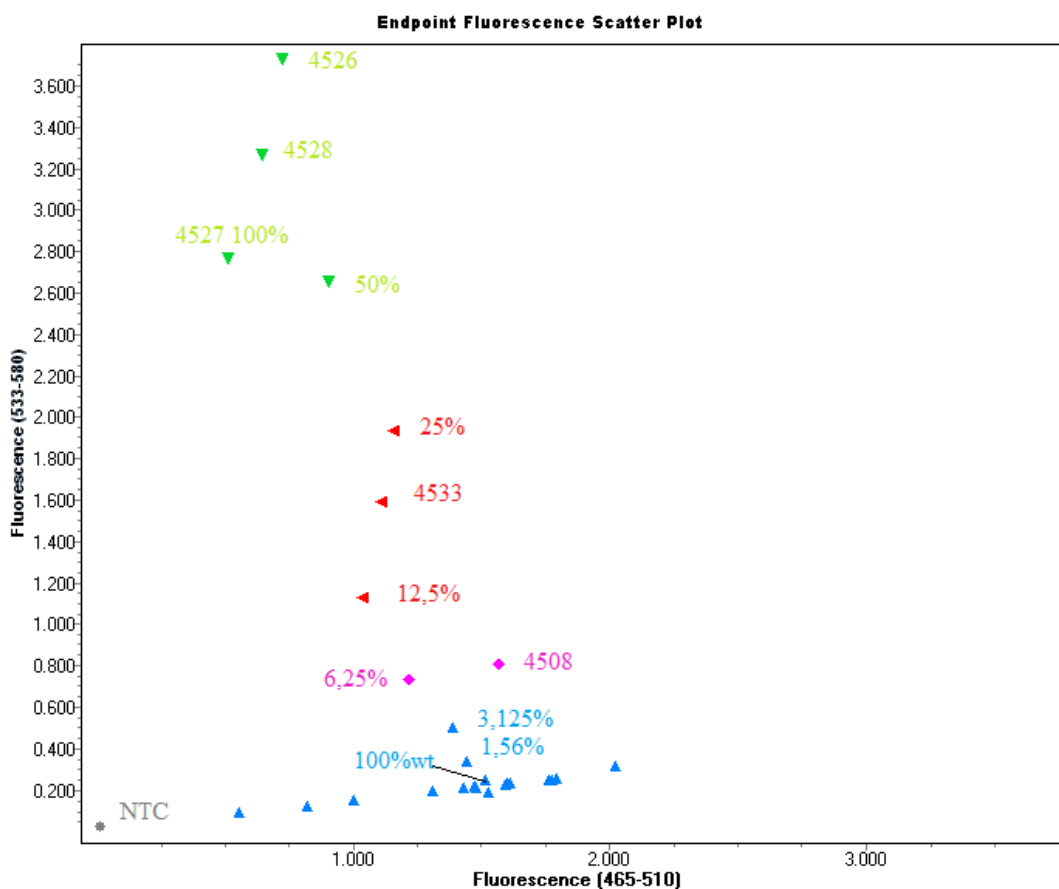
Pro metodu COLD PCR bylo vyšetřeno 26 vzorků DNA:

- buněčná linie NCI-H1975 pod DNA číslem 4527 ředěná ve wt 4010 na % mutantních buněk: 50 %, 25 %; 12,5 %; 6,25 %; 3, 125 % a 1,56 %
- 100 % 4527, 100 % 4010
- další mutantní buněčné linie: 4526, 4528, 4533, 5269
- pacientské vzorky pozitivní na mutaci: 4508, 4548, 4589
- pacientské vzorky negativní na mutaci: 5475, 5474, 5479, 5480, 5481, 5486, 5499, 5502, 5512, 5517, 5542
- negativní kontrola: DEPC-voda



Obr. 28: Diagram fluorescence Endpoint genotyping analýzy COLD PCR pro detekci mutace L858R

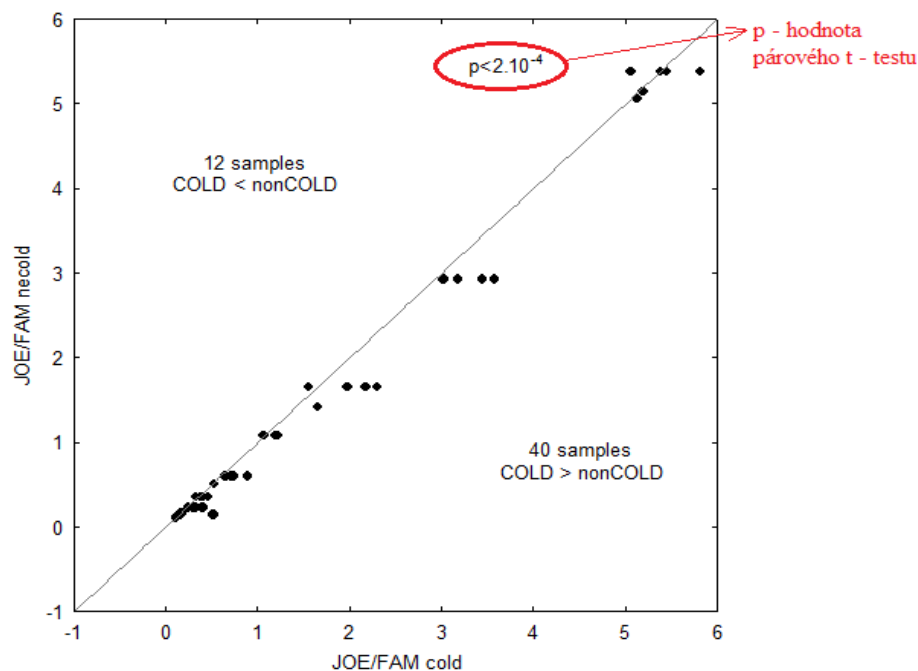
Stejný soubor vzorků byl testován stejným programem, ale teplota denaturace u kroku 3. PCR COLD byla nastavena na standardních 95°C („ne-COLD“ PCR) (shoduje se s experimentem v kapitole 5. 1. 2)



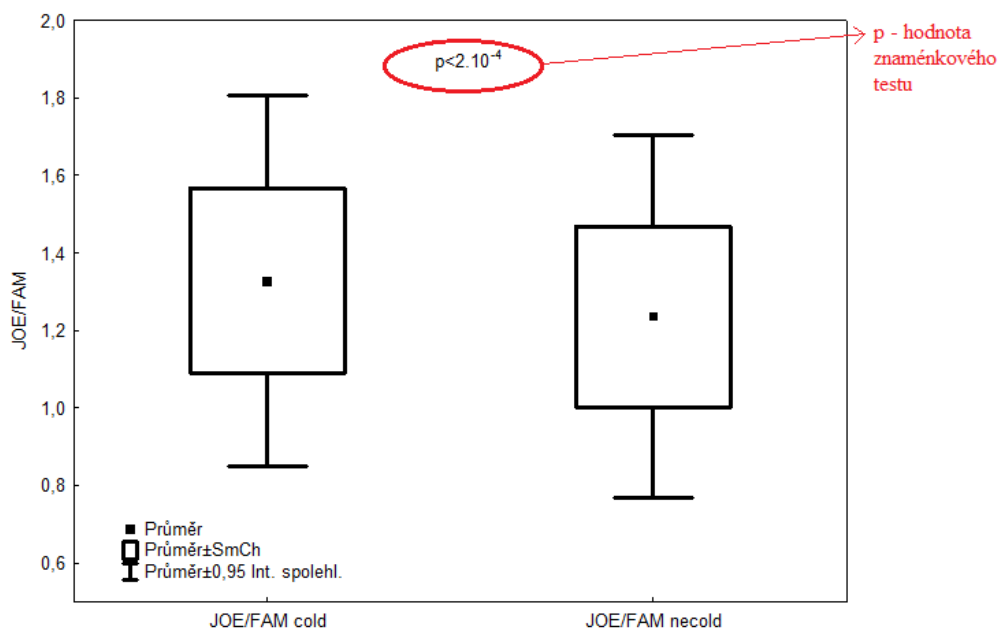
Obr. 29: Diagram fluorescence Endpoint genotyping analýzy „ne-COLD“ PCR pro detekci mutace L858R

5. 1. 4. 1 Statistické srovnání standardní COLD PCR a „ne-COLD“ PCR

Z porovnání obou výstupů Endpoint genotyping analýzy COLD a „ne-COLD“ PCR cvičeným okem bylo možné usoudit, že u COLD PCR došlo k celkovému posunutí signálu vzorků k ose y, což odpovídá navýšení signálu sondy JOE pro mutaci. Jestli je tento posun statisticky významný bylo možné zjistit pomocí statistických metod (párový t-test a znaménkový test) schopných tyto dvě metody srovnat.



Obr. 30: Statistické srovnání COLD a „ne-COLD“ PCR párovým t-testem



Obr. 31: Statistické srovnání COLD a „ne-COLD“ PCR znaménkovým testem

Oba použité testy mají stejný výsledek, což potvrzuje robustnost nálezu, který nezávisí na normalitě vstupních dat. 12 vzorků podmínku „citlivost COLD je větší než citlivost neCOLD“ nesplňuje. Mezi těmito vzorky jsou také homozygotní mutantní linie, na kterých se COLD princip nemůže uplatnit. P-hodnota obou testů je menší než $2 \cdot 10^{-4}$, z čehož vyplývá, že citlivost metody COLD PCR je statisticky významně vyšší než u standardní PCR.

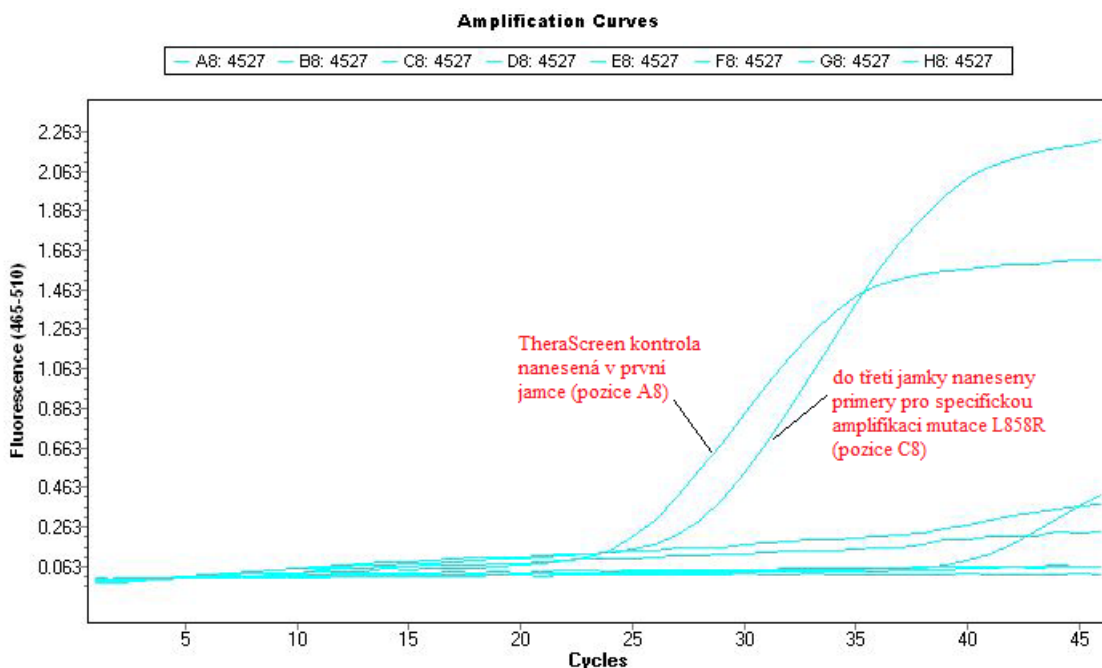
5. 1. 5 Další pokusy detekce mutace L858R - nested PCR na principu COLD PCR

Metoda SSP-ARMS s vnitřní kontrolou pro detekci mutace L858R poskytla požadovaný detekční limit 1 % mutované DNA v 99 % standardní DNA, avšak došlo ke změně situace (k externě vynucené změně preanalytické fáze): Byl odsouhlasen a publikován Interdisciplinární konsensus pro prediktivní vyšetřování aktivačních mutací v *EGFR* u NSCLC (Pirker a kol., 2010), který nastolil důležitý mezikrok před doručením vzorku do laboratoře. Zatímco doposud byla metoda optimalizována na DNA izolované z bioptické tkáně ve stabilizačním roztoku RNAlater, nyní musí být vzorek nejdříve zkontrolován patologem k určení procenta nádorových buněk. Kontrola probíhá pod mikroskopem, po převedení vzorku do FFPE (fixace ve formalinu a zalití do parafinu), řezu na mikrotomu a přenesení na sklíčko, a končí verdiktem patologa ohledně diagnózy a množství nekrotické/ neoplastické tkáně a vhodnosti pro analýzu mutací v genu *EGFR*. I když tato změna přináší větší klinickou validitu vyšetření mutačního statusu *EGFR*, zároveň snižuje využitelnost kitu naší laboratoře, protože jednokolová PCR neumožňuje analýzu řádově desítek buněk, které jsou poskytnuty k DNA extrakci z parafinového řezu na sklíčku.

Proto byly další experimenty směřovány k testování další metody, a to nested PCR v jedné zkumavce za využití principu COLD PCR. Tento přístup by mohl vyřešit dva zásadní technické problémy v souvislosti s detekcí *EGFR* statusu: malé množství DNA k analýze, jehož jen malá frakce je mutovaná, protože je schopen analyzovat potencionálně i jedinou buňku a preferenčně množí heteroduplexy mezi standardní a mutovanou DNA. Oproti plánu systém ještě nelze považovat za optimalizovaný a zralý pro validaci. Pro optimalizaci této velmi citlivé metody by bylo vhodné vyzkoušet reagentie používané světovými laboratořemi, ve kterých je COLD PCR již zavedena – např. místo naší Thermo Start DNA polymerázy (Thermo Scientific) použít přesnější Phusion high-fidelity polymerase (Finnzymes Inc., USA) (Milbury a kol., 2010).

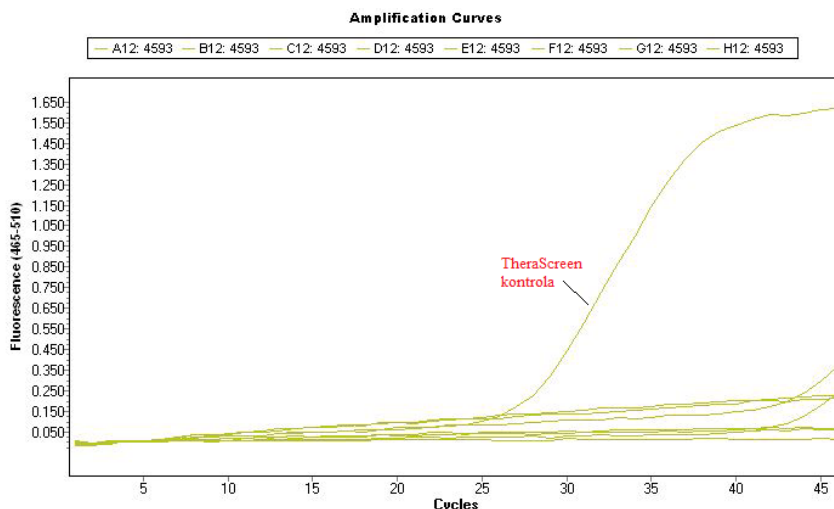
5. 2 Detekce bodové mutace L858R soupravou TheraScreen® DxS

Pro srovnání optimalizované metody SSP-ARMS s vnitřní kontrolou pro detekci mutace L858R, způsobu jejího provedení a hodnocení, byly vzorky buněčných linií touto metodou správně určených, srovnány se způsobem detekce soupravou TheraScreen® DxS.



Obr. 32: Křivky amplifikace buněčné linie 4527 vyšetřené soupravou TheraScreen® DxS

Do prvního řádku na 96-jamkové destičce (pozice A1-A12) se nanáší TheraScreen externí kontrola (směsný standard se všemi testovanými mutacemi), podle které se poté odečítá ΔC_P . Do každého následujícího řádku (pozice B1-B12; C1-C12;...; H1-H12) jsou poté naneseny reakční směsi obsahující primery pro specifickou amplifikaci určitého typu mutace. Do jednotlivých sloupců se poté nanáší vzorky DNA o množství větším než 1,5 ng na reakci (množství DNA potřebné k detekci 1 % obsahu mutace). ΔC_P mezi kontrolou a vzorkem do 12 cyklů odpovídá záchytu L858R mutace. V případě buněčné linie 4527 je ΔC_P 3,14, ve vzorku je tedy detekována mutace L858R. Pokud není ve vzorku detekována žádná mutace, tak se žádná další křivka nezvedne s odstupem do 12 cyklů od křivky kontrolní.



Obr. 33: Negativní výsledek vzorku 4527 analyzovaného soupravou TheraScreen® DxS

5. 3 Detekce delecí metodou PCR- SSP/ARMS s vnitřní kontrolou

5. 3. 1 Analyzované vzorky a použité primery

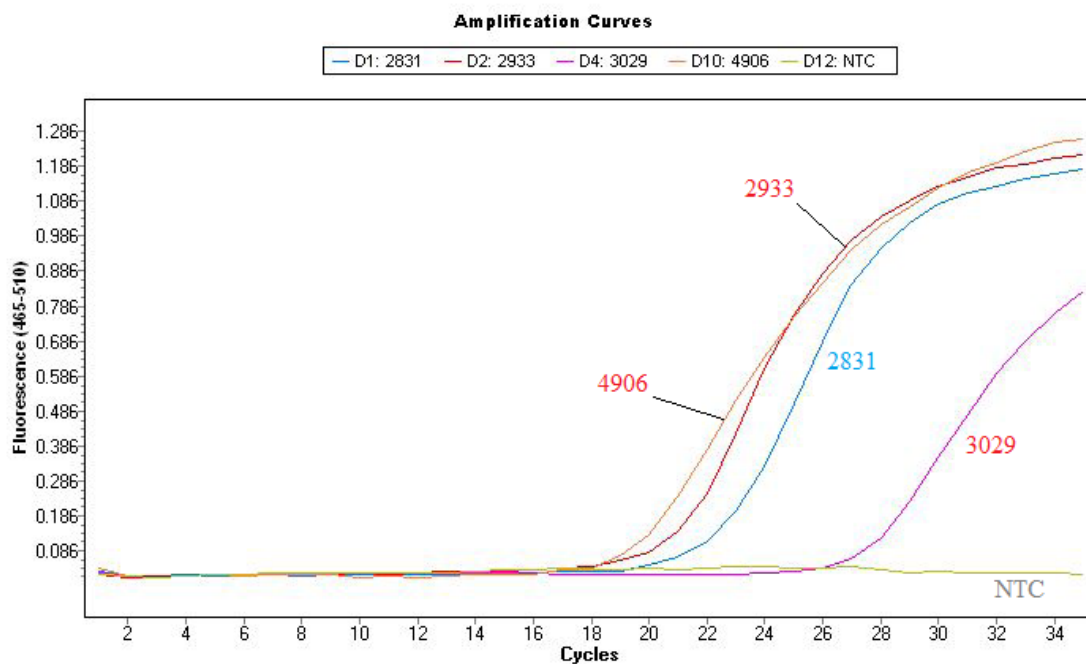
V tomto testu bylo analyzováno 10 vzorků DNA:

- pozitivní kontrola: pacientské vzorky pozitivní na delecii: 2933, 2978, 3029, 4092, 4102, 4298, 4496, 4906
- pacientské vzorky negativní na mutaci v *EGFR*: 2831, 5148
- negativní kontrola: DEPC-voda jako

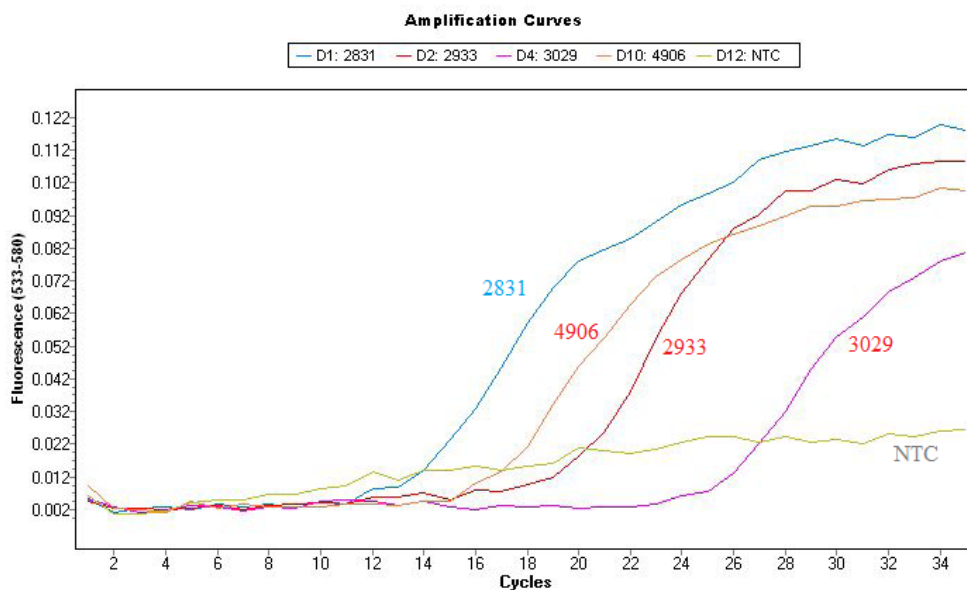
Vzorky byly analyzovány PM č. 409 programem na LC 480 shodným s detekcí mutace L858R metodou SSP-ARMS.

Primerová směs č. 409 obsahuje 10 primerů a jednu sondu. Sekvence jednotlivých primerů směsi jsou uvedeny v kapitole Přílohy – tab. B.

5. 3. 2 Výsledky analýzy a její hodnocení



Obr. 34: Amplifikační křivky vzorků analyzovaných na přítomnost delecie metodou SSP-ARMS v kanálu FAM a v kanálu JOE (Obr. 35)



Pro lepší přehlednost byly opět vybrány vzorky, které byly během analýzy správně určeny jako pozitivní a jeden vzorek ze dvou správně určených jako negativní.

Vyhodnocení vzorků je opět založeno na ΔC_t , tentokrát však ne na rozdílu signálu dvou vzorků ve FAM, ale na signálu FAM-JOE u jediného vzorku.

Tab. 17: Hodnocení vzorků vyšetřených na delece metodou PCR-SSP/ARMS s vnitřní kontrolou pomocí ΔC_t

Číslo vzorku	C_t FAM ($\lambda= 465-510$)	C_t JOE ($\lambda= 533-580$)	ΔC_t	Status vzorku
2831	20,49	13,94	6,55	Negativní
2933	18,82	19,66	0,84	Pozitivní
3029	26,75	26,12	0,63	Pozitivní
4906	18,52	17,4	1,12	Pozitivní
NTC	-	-	-	(nelze)

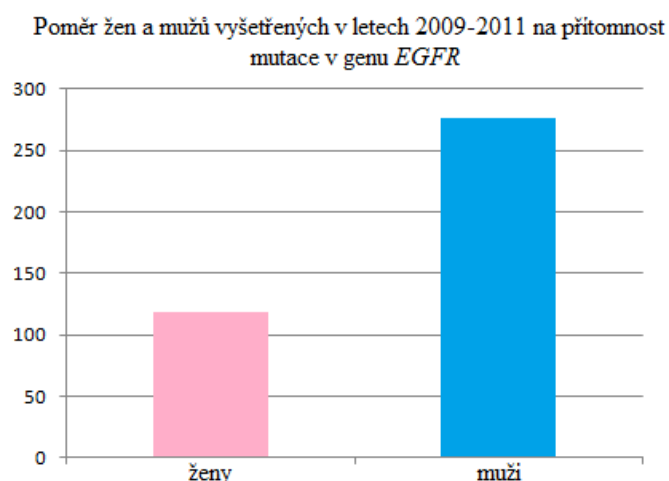
Pokud bychom vzorky hodnotili stejným způsobem jako u L858R, byl by u osmi vzorků pozitivních na deleci **3 x** status určen správně (ΔC_t do 1,12 cyklu). U dvou negativních vzorků by byl status určen správně a to s nejvyšším rozdílem ΔC_t (6,55 a 6,29). ΔC_t ostatních vzorků se pohybovalo od 2,55 do 5,33.

Otázkou je tedy prahová hodnota, tzn. od jaké hodnoty ΔC_t by byl vzorek už považován za negativní. Stanovením meze detekce metody ředěním mutantní DNA 5237 (buněčná linie PC9, Panagene) na pozadí standardní DNA 4010 v procentuálním zastoupení

mutantní DNA 100 %; 50%; 25 %; 12,5 %; 6,25 %; 3,125 %, 1,56 % a 0 % bylo zjištěno, že u prvních 7 vzorků vyšlo ΔC_t do 5,06 cyklu a u 100% wt DNA 9,91 cyklu. Pokud by se práh detekce stanovil na 5 cyklů, dalo by se říct, že je tato metoda schopná detekovat 3,125 % mutantní DNA na pozadí standardní DNA, 1,56 % mutantní DNA by pak bylo považováno za hraniční a 100% wt DNA jako negativní. U této metody jsou hodnoty ΔC_t velmi úzké a pohybují se od 0 – 10 cyklů, na rozdíl od stejné metody pro detekci mutace L858R, kde se ΔC_t pohybuje až do 30 cyklů. Řešením pro další optimalizaci metody by mohlo být zvýšení specifity reakce, tj. např. snížení koncentrace $MgCl_2$ v reakční směsi, zvýšení teploty annealingu v PCR programu, či použití blokační sonda vůči standardní DNA. Koncentrace $MgCl_2$ je ovšem už i tak celkem nízká (1mM), nižší koncentrace než 1mM $MgCl_2$ se již nedoporučuje, a to z toho důvodu, že PCR nemusí být nastartována, či reakce poskytne pouze malý výtěžek z důvodu poklesu aktivity *Taq*-DNA polymerázy (platí i pro příliš vysokou teplotu annealingu).

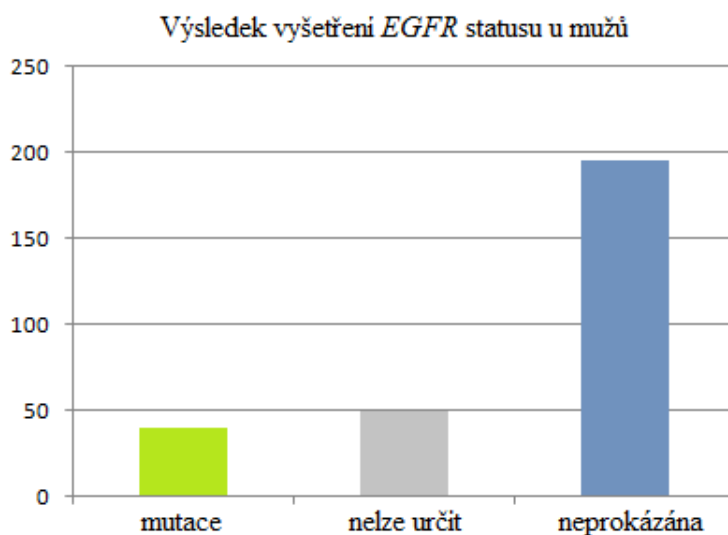
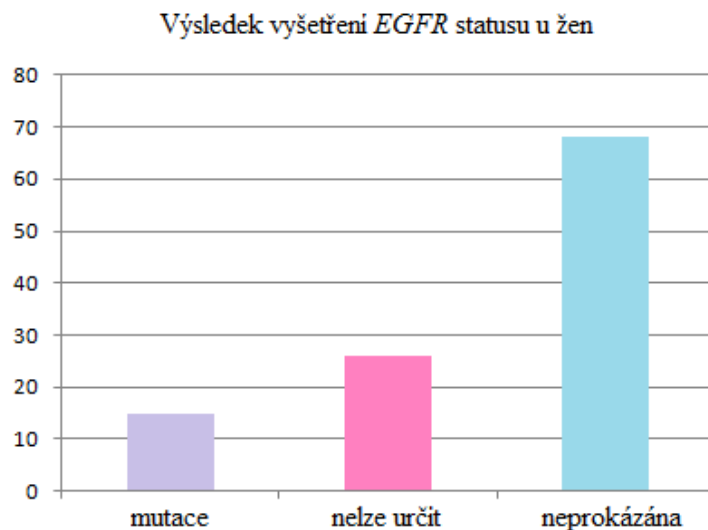
5. 4 Zpracování pacientů vyšetřených na mutace genu *EGFR* z DNA databáze LEM k porovnání s daty získanými celosvětovými studiemi

V období od 16. 6. 2009 do 10. 6. 2011 bylo na přítomnost mutace v genu *EGFR* soupravou TheraScreen® DxS vyšetřeno celkem 395 pacientů. Z toho 119 žen (ročníky 1921-1982) a 276 mužů (ročníky 1927-1979).



Obr. 36: Poměr žen a mužů vyšetřených v letech 2009-2011 na přítomnost mutace v *EGFR*

U žen byla v 15 (7,5 %) případech detekována mutace v *EGFR*, u 68 případů mutace detekována nebyla a 26 x se nepodařilo status určit. Mezi muži byla mutace přítomna u 40 (14, 5 %) z nich, ve 195 případech nebyla mutace prokázána a 50 x nebylo možné status určit.

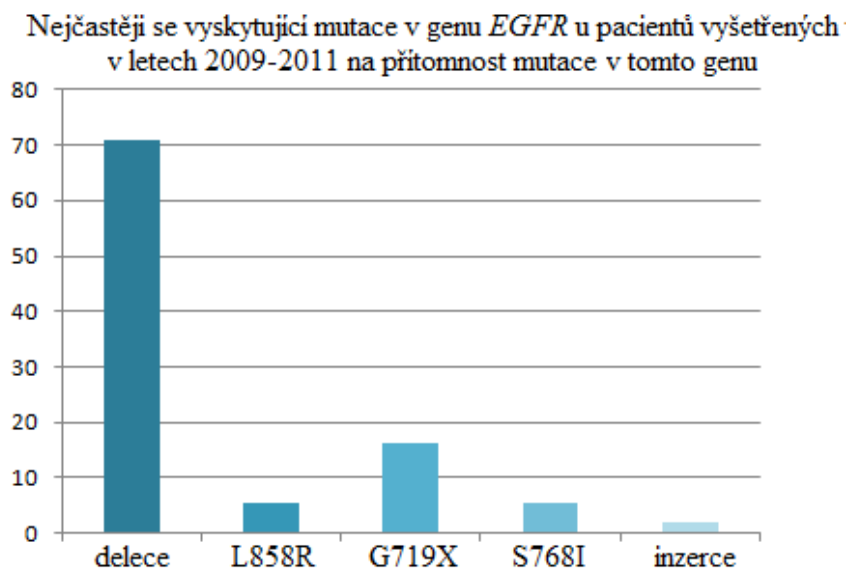


Obr. 37 a 38: Výsledek vyšetření *EGFR* statusu u žen a mužů vyšetřených na přítomnosti mutace v *EGFR*

Ze všech přítomných mutací tvořily **delece** největší část – **70,91 %**, dále se nejčastěji vyskytovaly bodové mutace: G719X (16,36 %), L858R (5,45 %) a S768I (5,45 %) a u 1,83 % se vyskytovaly inserce.

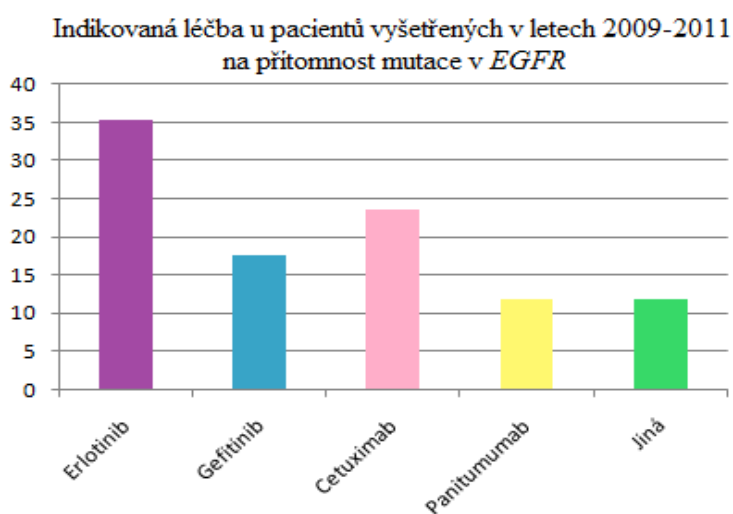
Podle celosvětových komparativních studií (např. Marchetti a kol., 2005; Paz-Ares a kol., 2009) by měly delece a bodová mutace L858R stejným podílem tvořit až **90 %** všech aktivačních mutací v genu *EGFR*. U pacientů vyšetřených v LEM v letech 2009-2011 na přítomnost mutace v *EGFR* tvořily tyto dvě mutace dohromady **76,5 %**, přičemž delece mutaci L858R jasně převyšovaly (71 %). Mutace L858R však se třemi bodovými mutacemi označovanými souhrnně jako G719X a S768I tvořily přibližně stejný podíl a za delecemi se vyskytovaly jako druhé nejčastější. Vzhledem k tomu, že na hladiny citlivosti 1 % nelze

výsledky TheraScreen potvrdit sekvenováním, je možné, že detekce mutací G719X a S768I byly falešně pozitivní, a že některé mutace L858R nebyly metodou TheraScreen zjištěny. Naše optimalizované metody s využitím COLD a PCR-SSP principu by mohly tuto diskrepanci vysvětlit, pokud se zachovalo dostatečné množství genotypizovatelného materiálu.



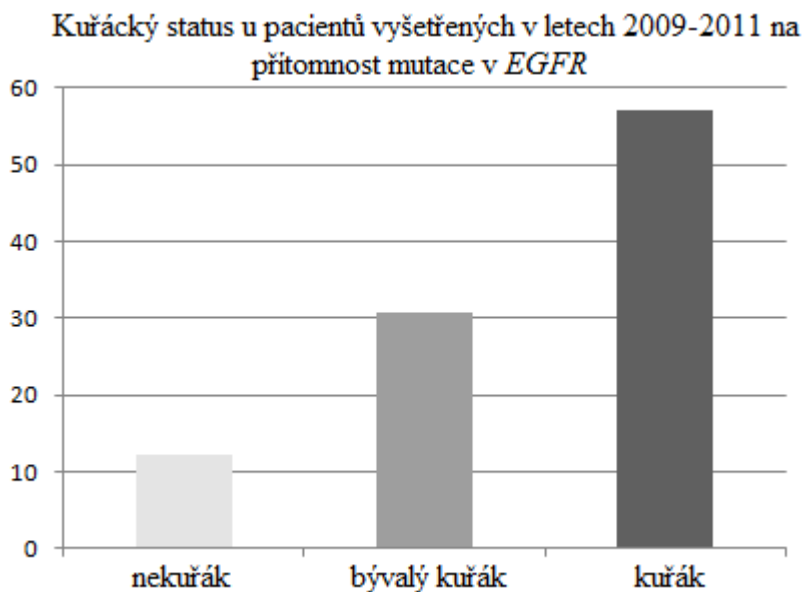
Obr. 39: Nejčastěji se vyskytující mutace v genu *EGFR* u pacientů vyšetřených v letech 2009-2011 na přítomnost mutace v tomto genu

Pokud byl u pacientů uveden způsob léčby, u **35,29 %** případů byla indikována léčba **Erlotinibem**, 23,5 % Cetuximabem, 17,65 % Gefitinibem, 11,76 % Panitumumabem a u 11,76 % jiná (nemířená proti *EGFR*).



Obr. 40: Indikovaná léčba u pacientů vyšetřených v letech 2009-2011 na přítomnost mutace v genu *EGFR*

Pokud byl u pacientů uveden kuřácký status, z **57,14 %** se jednalo o **kuřáky**, z 30,6 % se jednalo o bývalé kuřáky a 12,24 % bylo nekuřáků.



***Obr. 41:** Kuřácký status u pacientů vyšetřených v letech 2009-2011 na přítomnost mutace v genu *EGFR**

Co se týče kuřáckého statusu, byl přinejmenším potvrzen vliv kuřáctví na vznik rakoviny. NSCLC je však z velké části spojován s nekuřáctvím, ovšem tato diagnóza se v databázi pacientů vyskytovala sporadicky. Jako diagnóza byl často uveden jen karcinom plic; karcinom horního/ dolního laloku, bronchu nebo plíce; či novotvar nejistého nebo neznámého původu - průdušnice, průduška a plíce.

6 Diskuze

Somatické mutace v tyrozin-kinázové doméně EGFR, typické pro onemocnění NSCLC, jsou časté u dlouhodobých nekuřáků (**51 %** vs. 9 %), žen (**38 %** vs. 13%), adenokarcinomů (31 % vs. 2 %) a pacientů východoasijského původu (29 % a 8 %) (Marchetti a kol., 2005). Dvě „hot-spot“ mutace tvoří na **90 %** všech mutací v *EGFR* zaznamenaných u NSCLC. Mezi nejčastější mutace vyskytující se přibližně u 45 % mutací v *EGFR* patří krátké delece zahrnující ztrátu 9, 12, 15, 18 a 24 nukleotidů v exonu 19. Druhou nejčastější mutací, vyskytující se u dalších 45 % případů s mutacemi v *EGFR*, je bodová mutace L858R v exonu 21 v nukleotidu 2573 (změna CTG na CGG), která vede k substituci aminokyseliny leucinu za arginin v kodonu 858. Ostatní mutace se vyskytují s mnohem menší frekvencí a zahrnují exony 18, 20 a 21 (Pao a kol., 2005). Jedním z cílů diplomové práce bylo vytvoření malé studie z dat pacientů DNA databáze, kteří byli v letech 2009-2011 v LEM při Dětské klinice, Lékařské fakultě Univerzity Palackého a FN v Olomouci vyšetřeni soupravou TheraScreen® DxS na přítomnost mutace v genu *EGFR*. Zpracováním dat pacientů bylo zjištěno, že se mutace vyskytovaly častěji u mužů (**14,5 %** vs. 7,5 %), kuřáků (**57,1 %** vs. 12 %) a delece a bodová mutace tvořily společně téměř **77 %** všech přítomných mutací v *EGFR*. Je však nutné podotknout, že u přibližně 1/5 žen i mužů se nepodařilo mutační status určit (chybějící signál sondy FAM pro mutaci a exogenní kontrolu), což by se dalo vyřešit jedině opětovným odběrem bioptického materiálu, což někdy nemusí být proveditelné. Co se týče kuřáckého statusu, ne u všech pacientů byla tato informace uvedena, proto není tento sledovaný parametr přesný. NSCLC je z velké části spojován s nekuřáctvím, tato diagnóza se však v databázi pacientů vyskytovala jen sporadicky a nahrazovala ji obecná diagnóza karcinomu plic, průdušek aj.

Detekce mutací v genu *EGFR* je obvykle prováděna sekvenováním DNA amplifikované PCR a izolované z nádorové tkáně (Yung a kol., 2009; Sequist, 2009). Diagnostické sekvenovací techniky však zahrnují několik kroků, jsou proto pro rutinní klinickou praxi časově náročné a vykazují nízkou citlivost (detekce více než 20 % přítomných mutovaných sekvencí na pozadí standardních). Komplikací vyšetření jako je sekvenování, či fragmentační analýza, je fakt, že klinické vzorky často obsahují malou subpopulaci mutantních buněk na nadbytek normální tkáně, což může znemožnit detekci mutací těmito technikami. V DNA laboratoři LEM je pro sekvenování, či fragmentační analýzu, využíván genetický analyzátor CEQTM 8800 Genetic Analysis System (Beckman Coulter), který

poskytuje sice *high-throughput* genovou analýzu, avšak s maximální citlivostí 30 %. Naproti tomu se celosvětově pro detekci mutací v genu *EGFR* používá metod založených na PCR (PCR-RFLP, PCR-SSCP atd.), které nedosahují parametrů kitu TheraScreen a nejsou pro rutinní klinickou praxi optimální (Marchetti, 2009). Jihokorejská společnost Panagene proto vyvinula vysoce citlivou a jednoduchou metodu založenou na technologii real-time PCR za využití blokovací sondy tvořené peptidovou nukleovou kyselinou (PNA), která je schopna detekce malého množství mutantní DNA v přítomnosti nadbytku standardní DNA. Metoda byla validována a byla vytvořena komerční souprava pro detekci mutací v genu *EGFR* PNA ClampTM EGFR Mutation Detection Kit (Panagene, dostupná také pro geny *KRAS* a *BRAF*) schopná detekce 1 % mutantní DNA na pozadí standardní DNA. Přes počáteční slibné výsledky v rutinním provozu se ukázalo, že metoda ztratila citlivost a kit v současné době reklamujeme. Další, již mnohem starší a osvědčenou metodu založenou na PCR je technologie ARMS (Amplification Refractory Mutation System), která jasně rozliší heterozygota ve sledovaném lokusu od homozygotů pro jednu nebo druhou alelu (Ferrie a kol., 1992). Metoda nepotřebuje kromě realtime termocykléru žádné další speciální zařízení, jednotlivé reakční kroky jsou jednoduché, reagentie relativně levné a metodologie může být snadno prováděna v klinické laboratoři. Komerční souprava TheraScreen® DxS EGFR Mutation Kit, používaná v DNA laboratoři LEM cca 2 roky, také využívá metodiky ARMS (komplementarita 3' konce primeru s templátem rozhoduje o namnožení/ nenamnožení sekvence) a škorpiónových primerů (sonda s fluoroforem a zhasičem je připojena k primeru). Ale narozdíl od soupravy pro detekci mutací v genu *KRAS* stejné společnosti, nejsme s tímto kitem zcela spokojeni – jeho cena je 300€ bez možnosti vyšetření na TKIs rezistentní mutaci T790M, DNA z parafinového řezu nemusí být amplifikovatelná (25 %) a v neposlední řadě došlo v roce 2008 k převzetí DxS společností Qiagen, která není několik měsíců schopna dodat žádané produkty. Mimo to souprava TheraScreen® DxS špatně snáší opakované rozmrazování a interpretace výsledků vyžaduje vizuální odečet zkušeného analytika (software je jen nápomocný). Proto byla jedním z hlavních cílů této práce optimalizace vlastní skriningové metody pro detekci nejčastěji se vyskytujících mutací v genu *EGFR* založené na PCR-ARMS a použití sond TaqManTM, a to pomocí dvou přístupů – Endpoint genotyping analýzy umožněné real-time PCR systémem LC 480 (Roche) a PCR-SSP/ARMS s vnitřní intrazkumavkovou kontrolou. Nezbytným krokem před návrhem primerů a sond na studované části genu, byl získání jeho standardních a mutovaných sekvencí, v našem případě exonů 18 – 21 genu *EGFR* a cca 200 bp části intronu z levé a pravé strany exonu. Sekvence byly získány

z databáze UCSC Genome Bioinformatics Site. Dále následovalo navržení primerů a TaqManTM sond pro metodu ARMS. Během prvních pokusů byla zkoušena **detekce mutace L858R** na základě **Endpoint genotyping analýzy**, což je metoda založena na použití dvou sekvenčně-specifických sond (např. TaqManTM sondy) pro wildtype a mutantní fenotyp tak, že je každá značena jinou fluorescenční barvičkou, přičemž je navržena standardním způsobem (obsahuje fluorofor a zhášec). Metoda však nevykazovala dostatečnou citlivost – mez detekce se podařila snížit z cca **33 %** na **12 %** po optimalizaci. Přistoupili jsme tedy k vytvoření L858R specifické směsi za použití protokolu **PCR-SSP/ARMS** ve složení primery a FAM sonda pro mutaci L858R v genu *EGFR* a primery a JOE sonda pro **β -globin** (dvoubarevný TaqMan princip s vnitřní intrazkumavkovou kontrolou). Tento test je schopen detekce bodové mutace L858R v exonu 21 s citlivostí **1%** mutantní DNA na pozadí standardní DNA, kdy byly opakovaně na velkém souboru vzorků (vyločení falešně pozitivních výsledků) správně určeny čtyři pozitivní vzorky z pěti, přičemž hodnocení vzorku se provádí pomocí rozdílu amplifikačních cyklů mezi signály pro sondu FAM (mutace L858R) a sondu JOE (β -globin). Rozdíl je označován jako ΔC_t a pokud je jeho hodnota nižší než 4 cykly, je vzorek považován za pozitivní na danou mutaci. Po řadě zkoušení a optimalizací se systém PCR-SSP/ARMS s vnitřní kontrolou nepodařilo ještě zcela rozběhnout pro detekci 19 nejčastějších delecí v exonu 19. Jedním řešením pro další optimalizaci metody by mohlo být zvýšení specifity reakce, tj. např. snížení koncentrace $MgCl_2$ v reakční směsi, či zvýšení teploty annealingu v PCR programu. Příliš nízká koncentrace $MgCl_2$ / vysoká teplota annealingu se však nedoporučuje, a to z toho důvodu, že PCR nemusí být nastartována, či reakce poskytne pouze malý výtěžek z důvodu poklesu aktivity *Taq*-DNA polymerázy. Jiným řešením by mohlo být využití COLD PCR principu u metody detekci delecí, založené na značení jednoho primeru a elektroforetické separaci na kapilárním sekvencéru. Tímto přístupem již byly získány první nadějně výsledky, které se však ještě nepodařilo zpracovat do této diplomové práce.

Dalším cílem praktické části práce bylo otestování metody **COLD PCR** (COamplification at Lower Denaturation PCR), během které dochází k preferenční amplifikaci heteroduplexů mezi standardní a mutovanou DNA, což může zvýšit citlivost PCR analýzy. Zvýšená citlivost metody byla testována u detekce mutace L858R Endpoint genotyping analýzou v porovnání se standardní „ne-COLD“ PCR. Na základě pokusu na gradientovém termocykléru byla vybrána optimální teplota denaturace na **85°C** a tato teplota byla poté testována na LC 480 oproti standardní teplotě denaturace – **95°C** na stejném

souboru vzorků. Pro srovnání metod bylo použito dvou statistických testů – párového t-testu a znaménkového testu. Oba použité testy poskytly stejný výsledek, což potvrdilo robustnost nálezu, který nezávisí na normalitě vstupních dat. 40 vzorků podmínku citlivost COLD je větší než citlivost neCOLD splňovalo a 12 vzorků nesplňovalo. Mezi vzorky nesplňujícími podmínku byla 100 % mutantní a 100 % wildtype DNA, což je v pořádku, protože metodou COLD PCR jsou přednostně amplifikovány heteroduplexy mezi standardní a mutovanou DNA. Rozdíl mezi COLD PCR a standardní PCR nás zajímá především u 6,25 %; 3,125 % a 1, 56 % mutované DNA na pozadí standardní DNA, protože pokrývají oblast citlivosti, kterou je maximálně schopna dosáhnout standardní „ne-COLD“ PCR. Ostatní vzorky, které dále nesplňovaly podmínku cold>noncold, byly převážně negativní na mutaci v genu *EGFR*. P-hodnota obou testů byla menší než $2 \cdot 10^{-4}$, z čehož vyplývá, že citlivost metody COLD PCR je statisticky významně vyšší než u standardní PCR.

Z důvodu změny preanalytické fáze u vyšetřování aktivačních mutací v *EGFR* u NSCLC bylo potřeba přistoupit k testování citlivější metody, a to **nested PCR** v jedné zkumavce za využití principu **COLD PCR**. Oproti plánu však systém ještě nelze považovat za optimalizovaný a zralý pro validaci, avšak samotná metodika má vysoký potenciál být vypracována k dosažení maximální citlivosti, například v rámci případného doktorského projektu.

Závěr

Teoretická část předkládané diplomové práce má za cíl přiblížení problematiky genu *EGFR*, proteinu EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), který tento gen kóduje a hodnotí význam a funkci tohoto proteinu při vzniku nádorového onemocnění plic. Dále je zaměřená na současné možnosti detekce mutací v genu *EGFR*, a to především standardními metodami jako je PCR, či sekvenování.

Praktická část práce, která byla vykonávána v Laboratoři Experimentální Medicíny při Dětské klinice Lékařské fakulty Univerzity Palackého a Fakultní nemocnici Olomouc, měla z velké části za cíl návrh a optimalizaci metody založené na kvantitativní real-time PCR, kterou by bylo možné detekovat nejčasteji se vyskytující mutace v genu *EGFR* jako je bodová mutace L858R (2573T>G) v exonu 21 a 19 typů nejčastějších delecí v exonu 19, a to bez nutnosti post-PCR kroku, jako je sekvenování, či fragmentační analýza, čímž by se detekce mutací v *EGFR* značně zjednodušila, stala by se rychlejší, ekonomicky přijatelnější a použitelnější v rutinní klinické praxi. Pro splnění těchto požadavků je však třeba vyvinout dostatečně citlivou metodu, která by byla schopná detekovat i přítomnost 1% mutantních buněk na pozadí buněk zdravých. Této a nižší citlivosti dosahuje komerční souprava TheraScreen® společnosti DxS Diagnostics, která byla cca 2 roky rutinně využívána v DNA laboratoři LEM pro skrínig 29 nejčastějších mutací v *EGFR*. Náš real-time PCR systém využívá chemismu fluorescenčně značených TaqManTM sond a metodiku PCR-SSP/ARMS s vnitřní kontrolou pro β -globin (dvoubarevný TaqMan princip s vnitřní intrazkumavkovou kontrolou) a Endpoint genotyping analýzy umožněnou LightCycler® 480 Real-Time PCR systémem. První pokusy s Endpoint genotyping analýzou bodové mutace L858R nevykazovaly dostatečnou citlivost, proto byla vytvořena specifická L858R reční směs za použití protokolu PCR-SSP/ARMS ve složení primery a FAM sonda pro mutaci L858R v genu *EGFR* a primery a JOE sonda pro β -globin. Tento test je schopen detekce mutace L858R s citlivostí až 1 % mutantní DNA na pozadí standardní DNA a může tak být využíván jako doplňující prostředek ke komerčním soupravám, které poskytují přesnější výsledky a vykazují větší stabilitu reagentů, zejména pak k PNA ClampTM soupravě pro detekci mutací v genu *EGFR* společnosti Panagene, která v posledních měsících vystřídala soupravu TheraScreen® DxS, se kterou jsme nebyli z několika důvodů zcela spokojeni. Po řadě zkoušení a optimalizací se systém PCR-SSP/ARMS s vnitřní kontrolou nepovedl ještě zcela rozběhnout pro detekci 19 nejčastějších delecí v exonu 19, která zatím nevykazuje tak

vysokou specifitu jako u detekce mutace L858R. Řešením pro další optimalizaci metody by mohlo být zvýšení specificity reakce, nebo vytvoření zcela nové platformy testu založené na citlivějších metodách jako je nested PCR, či COLD PCR/ fragmentační analýza, na které se v současné době v DNA laboratoři LEM pracuje.

Dalším cílem praktické části práce bylo otestování metody COLD PCR u detekce mutace L858R a její statistické srovnání se standardní „ne-COLD“ PCR, a to pomocí dvou statistických testů. Oba testy poskytly stejný výsledek, což potvrdilo robustnost nálezu, který nezávisí na normalitě vstupních dat. 40 vzorků podmínku citlivost COLD je větší než citlivost neCOLD splňovalo a 12 vzorků nesplňovalo. K významnému posunu došlo především u vzorků obsahujících různé procento mutovaných buněk na pozadí buněk zdravých, protože tyto vzorky jsou COLD PCR preferenčně amplifikovány.

Nested PCR v jedné zkumavce za využití principu COLD PCR byla testována z důvodu externě vynucené změně preanalytické fáze. Oproti plánu však systém ještě nelze považovat za hotový a zralý pro validaci, tato metodika má ovšem vysoký potenciál být další optimalizací vylepšena pro dosažení maximální citlivosti, např. v rámci případného PhD. projektu.

8 Použitá literatura

Alvarez J.V.,Greulich H.,Sellers W.R.,Meyerson M.,Frank D.A. (2006): Signal transducer and activator of transcription 3 is required for the oncogenic effects of non-small-cell lung cancer-associated mutations of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res.* Mar 15;66(6): 3162-8.

Anděl J. (1985): *Matematická statistika*. Praha: SNTL/Alfa.

Cadranel J., Zalcman G., Sequist L. (2010): Genetic profiling and epidermal growth factor receptor-directed therapy in nonsmall cell lung cancer. *Eur Respir J*; 37(1):183-93.

Ciardello F., Tortora G. (2001): A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res*;7:2958-70.

Ciardello F., Tortora G. (2008): EGFR Antagonists in Cancer Treatment. *N Engl J Med*; 358: 1160-74.

Chráska M. (2007): *Metody pedagogického výzkumu. Základy kvantitativního výzkumu*. Praha : Grada. ISBN 978-80-247-1369-4.

Choi J-J., Cho M., Oh M., Kim H., Kil M-s., Park H. (2010): PNA-mediated Real-Time PCR Clamping for Detection of EGFR Mutations. *Bull. Korean Chem. Soc.* Vol. 31, No. 12 3525.

Duffy M.J. (2005): Predictive markers in breast and other cancers: a review. *Clin Chem.* Mar;51(3): 494-503.

Ferrie, R. M., Schwarz, M. J., Robertson, N. H. et al. (1992): Development, multiplexing, and application of ARMS tests for common mutations in the CFTR gene. *Am. J. Hum. Genet.*, 51, 251-262.

Fukuoka M., Yano S., Giaccone G., Tamura T., Nakagawa K., Douillard J.Y., Nishiwaki Y., Vansteenkiste J., Kudoh S., Rischin D., Eek R., Horai T., Noda K., Takata I., Smit E., Averbuch S., Macleod A., Feyereislova A., Dong R.P., Baselga J. (2003): Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial) [corrected]. *J Clin Oncol.* 2003 Jun 15;21(12):2237-46.

Grünwald V., Hidalgo M. (2003): Developing inhibitors of the epidermal growth factor receptor for cancer treatment. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:851-67.

Herbst R.S., Heymach J.V., Lippman S.M. (2008): Molecular origins of cancer – Lung Cancer. *N Engl J Med*. 359: 1367-80.

Heymach J.V., Johnson B.E., Prager D., Csada E., Roubec J., Pesek M., Spásová I., Belani C.P., Bodrogi I., Gadgeel S., Kennedy S.J., Hou J., Herbst R.S. (2007): Randomized, placebo-controlled phase II study of vandetanib plus docetaxel in previously treated non small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. Sep 20;25(27):4270-7.

Heymach J.V., Paz-Ares L., De Braud F., Sebastian M., Stewart D.J., Eberhardt W.E., Ranade A.A., Cohen G., Trigo J.M., Sandler A.B., Bonomi P.D., Herbst R.S., Krebs A.D., Vasselli J., Johnson B.E. (2008): Randomized phase II study of vandetanib alone or with paclitaxel and carboplatin as first-line treatment for advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. Nov 20;26(33):5407-15.

Immervoll H., Hoem D., Kugarajh K., Steine S.J., Molven A. (2006): Molecular analysis of the EGFR-RAS-RAF pathway in pancreatic ductal adenocarcinomas: lack of mutations in the BRAF and EGFR genes. *Virchows Arch*. Jan;448(6): 788-96.

Kris M.G., Natale R.B., Herbst R.S., Lynch T.J. Jr, Prager D., Belani C.P., Schiller J.H., Kelly K., Spiridonidis H., Sandler A., Albain K.S., Cella D., Wolf M.K., Averbuch S.D., Ochs J.J., Kay A.C. (2003): Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial. *JAMA*. Oct 22;290(16): 2149-58.

Lacouture M.E. (2006): Mechanisms of cutaneous toxicities to EGFR inhibitors. *Nat Rev Cancer*. 6:803-12.

Linggi B., Carpenter G.. (2006): ErbB-4 s80 intracellular domain abrogates ETO2-dependent transcriptional repression. *J Biol Chem*. Sep 1;281(35): 25373-80.

Lynch T.J., Bell D.W., Sordella R., Gurubhagavatula S., Okimoto R.A., Brannigan B.W., Harris P.L., Haserlat S.M., Supko J.G., Haluska F.G., Louis D.N., Christiani D.C., Settleman J., Haber D.A. (2004): Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. Mar 20;350(21): 2129-39.

Mačák J., Mačáková J. (2004): Patologie. Praha: GRADA Publishing. 192 – 194 s. ISBN 80-247-0785-3.

Marchetti A., Martella C., Felicioni L., Barassi F., Salvatore S., Chella A., Campese P.P., Iarussi T., Mucilli F., Mezzetti A., Cuccurullo F., Sacco R., Buttitta F. (2005): EGFR mutations in non-small-cell lung cancer: analysis of a large series of cases and development of a rapid and sensitive method for diagnostic screening with potential implications on pharmacologic treatment. *J Clin Oncol*. Feb 1;23(4): 857-65

Mendelsohn J., Baselga J. (2003): Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *J Clin Oncol*. 21:2787-99.

Meng S., Chen Z., Munoz-Antonia T., Wu J. (2005): Participation of both Gab1 and Gab2 in the activation of the ERK/MAPK pathway by epidermal growth factor. *Biochem J*. Oct 1;391(Pt 1): 143-51.

Merrick D.T., Haney J., Petrunich S., Sugita M., Miller Y.E., Keith R.L., Kennedy T.C., Franklin W.A. (2005): Overexpression of vascular endothelial growth factor and its receptors in bronchial dysplasia demonstrated by quantitative RT-PCR analysis. *Lung Cancer*. Apr;48(1):31-45.

Milbury C.A., Li J., Makrigiorgos G.M (2011): Ice-COLD-PCR enables rapid amplification and robust enrichment for low-abundance unknown DNA mutations. *Nucleic Acids Research*, 2011, Vol. 39, No. 1 e2.

Mok T.S., Wu Y.L., Thongprasert S., et al. (2009): Gefitinib or Carboplatin–Paclitaxel in Pulmonary Adenocarcinoma. *N Engl J Med*; 361:947-957

Murray S., Dahabreh I.J., Linardou H., Manoloukos M., Bafaloukos D., Kosmidis P. (2008): Somatic mutations of the tyrosine kinase domain of epidermal growth factor receptor and tyrosine kinase inhibitor response to TKIs in non-small cell lung cancer: an analytical database. *J Thorac Oncol*. Aug;3(8):832-9.

Normanno N., Bianco C., De Luca A., Maiello M.R., Salomon D.S. (2003): Target-based agents against ErbB receptors and their ligands: a novel approach to cancer treatment. *Endocr Relat Cancer*. 10:1-21.

Oda K., Matsuoka Y., Funahashi A., Kitano H. (2005): A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Syst Biol.* 1: 2005-0010.

Paez J.G., Jänne P.A., Lee J.C., Tracy S., Greulich H., Gabriel S., Herman P., Kaye F.J., Lindeman N., Boggon T.J., Naoki K., Sasaki H., Fujii Y., Eck M.J., Sellers W.R., Johnson B.E., Meyerson M. (2004): EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science.* Jun 4;304(5676): 1497-500.

Panagene Inc. (2011): PNAclamp™ EGFR Mutation Detection Kit – Instruction for use. Panagene Inc., Jižní Korea, dosud nezveřejněná verze

Pao W., Miller V., Zakowski M., Doherty J., Politi K., Sarkaria I., Singh B., Heelan R., Rusch V., Fulton L., Mardis E., Kupfer D., Wilson R., Kris M., Varmus H. (2004): EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from “never smokers” and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep 7; 101(36): 13306–13311.

Parra H.S., Cavina R., Latteri F., Zucali P.A., Campagnoli E., Morengi E., Grimaldi G.C., Roncalli M., Santoro A. (2004): Analysis of epidermal growth factor receptor expression as a predictive factor for response to gefitinib ('Iressa', ZD1839) in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer.* Jul 19;91(2): 208-12.

Paz-Ares L., Soulières D., Melezínek I., Moecks J., Keil L., Mok T., Rosell R., Klughammer B. (2010): Clinical outcomes in non-small-cell lung cancer patients with EGFR mutations: pooled analysis. *J Cell Mol Med.* Jan;14(1-2): 51-69.

Pirker R., Herth F.J., Kerr K.M., Filipits M., Taron M., Gandara D., Hirsch F.R., Grunenwald D., Popper H., Smit E., Dietel M., Marchetti A., Manegold C., Schirmacher P., Thomas M., Rosell R., Cappuzzo F., Stahel R; European EGFR Workshop Group (2010): Consensus for EGFR mutation testing in non-small cell lung cancer: results from a European workshop *J Thorac Oncol.* Oct;5(10):1706-13.

Přednáška doc. Kryštofa – PřF UPOL (2010): Mitogenní signály a onkogeny. Předmět Biologie Nádorových Buněk (LRR – BNB)

Reiter J.L., Threadgill D.W., Eley G.D., Strunk K.E., Danielsen A.J., Sinclair C.S., Pearsall R.S., Green P.J., Yee D., Lampland A.L., Balasubramaniam S., Crossley T.D., Magnuson T.R., James C.D., Maible N.J. (2001): Comparative genomic sequence analysis and isolation of human and mouse alternative EGFR transcripts encoding truncated receptor isoforms. *Genomics*. Jan 1;71(1): 1-20.

Riely G.J., Kris M.G., Rosenbaum D., Marks J., Li A., Chitale D.A., Nafa K., Riedel E.R., Hsu M., Pao W., Miller V.A., Ladanyi M. (2008): Frequency and Distinctive Spectrum of *KRAS* Mutations in Never Smokers with Lung Adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. Sep 15; 14(18): 5731–5734.

Sequist L.V., Bell D.W., Lynch T.J., Haber D.A. (2007): Molecular predictors of response to epidermal growth factor receptor antagonists in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. Feb 10;25(5):587-95.

Smith K.D., Wells A., Lauffenburger D.A. (2006): Multiple signaling pathways mediate compaction of collagen matrices by EGF-stimulated fibroblasts. *Exp Cell Res*. Jul 1;312(11): 1970-82.

Sun S., Schiller J.H., Gazdar A.F. (2007): Lung cancer in never smokers — a different disease. *Nat Rev Cancer*. 7:778-90.

Šmarda J., Doškař J., Pantůček R., Růžičková V., Koptíková J. (2005): *Metody molekulární biologie*. Masarykova Univerzita v Brně. 79 – 82 s. ISBN 80-210-3841-7

TheraScreen® DxS (2009): EGFR Mutation Kit – Instructions for use. DxS, Manchester UK, verze DU002g

Wislez M., Spencer M.L., Izzo J.G., Juroske D.M., Balhara K., Cody D.D., Price R.E., Hittelman W.N., Wistuba I.I., Kurie J.M. (2005): Inhibition of mammalian target of rapamycin reverses alveolar epithelial neoplasia induced by oncogenic K-ras. *Cancer Res*. Mar 15;65(8):3226-35.

Yung T.K., Chan K.C., Mok T.S., Tong J., To K.F., Lo Y.M. (2009): Single-molecule detection of epidermal growth factor receptor mutations in plasma by microfluidics digital PCR in non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res*. Mar 15;15(6):2076-84.

Online elektronické dokumenty

AstraZeneca (2011): Methodologies for EGFR Mutation Detection. [Citováno 8. 11. 2010] Dostupné na World Wide Web: http://www.egfr-mutation.com/_mshost8902790/content/documents/EGFR-Test-Guide

Biotium (2011): EvaGreen®: A PCR Dye Safe to the Environment [Citováno 24. 6. 2011] Dostupné na World Wide Web: http://www.biotium.com/product/product_info/Newproduct/EvaGreen.asp

EGFR Mutation Database (2010) [Citováno 20.6.2010] Dostupné na World Wide Web: <http://www.egfr.org/>

HealthValue (2011): IgG1 (Cetuximab, Nimotuzumab, Matuzumab, Zalutumumab, Ipilimumab, IMC A12) & IgG2 (Panitumumab, Tremelimumab, CP-751,871): Biological activities on complement and ADCC [Citováno 21. 6. 2011] Dostupné na World Wide Web: http://www.healthvalue.net/IgG1_IgG2.html.

Lékařská Fakulta Hradec Králové (2006): Real-time PCR [Citováno 21. 6. 2011]. Dostupné na World Wide Web: <http://www.lfhk.cuni.cz/farmakol/interakce/micuda/real-PCR.htm>

National Center for Biotechnology Information (2010) [Citováno 20.6.2010] Dostupné na World Wide Web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Roche Applied Biosciences (2011): Genotyping Concept for the LightCycler 480® System [Citováno 20.6.2011] Dostupné na World Wide Web: <http://www.gene-quantification.de/genotyping-concepts-hrm-ras.pdf>

UCSC Genome Bioinformatics Site (2010) [Citováno 15.6.2010] Dostupné na World Wide Web: <http://genome.ucsc.edu/>

Ostatní obrázky převzaté z online elektronických dokumentů

1. Lékařská Fakulta Univerzity Karlovy v Praze (2011): Amplifikační metody [Citováno 22. 6. 2011] Dostupné na World Wide Web: <http://www.lf2.cuni.cz/Projekty/prusa-dna/newlook/defa6.htm>

Cukrovka očima biochemie (2011): Genová analýza. [Citováno 22. 6. 2011] Dostupné na World Wide Web: <http://cukrovka-ocima-biochemie.blog.cz/1011/merime-cukrovku-xiv-genova-analyza>

Medscape Today News (2006): Epidermal Growth Factor Receptor-Targeted Agents for Lung Cancer: Epidermal Growth Factor Receptor. [Citováno dne 2. 3. 2011] Dostupné na World Wide Web: http://www.medscape.com/viewarticle/536314_2

Merck Serono (2011): CETUXIMAB (Erbix) C255 [Citováno dne 20. 6. 2011] Dostupné na World Wide Web: <http://www.erbitux.cz/nadory-oblasti-hlavy-a-krku-cetuximab-erbitux-c255.html>

Physics Forums (2010): How could you chemically detect peptide nucleic acid? [Citováno 24. 6. 2011] Dostupné na World Wide Web: <http://www.physicsforums.com/showthread.php?t=111258>

Wikipedia, The Free Encyclopedia (2007): Gefitinib. [Citováno dne 20. 6. 2011] Dostupné na World Wide Web: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Gefitinib_structure.svg

Wikipedia, The Free Encyclopedia (2008): Epidermal Growth Factor Receptor. [Citováno dne 2. 3. 2011] Dostupné na World Wide Web: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:1NQL.png>

Wikipedia, The Free Encyclopedia (2009): Erlotinib. [Citováno dne 20. 6. 2011] Dostupné na World Wide Web: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Erlotinib_Structural_Formulae.png

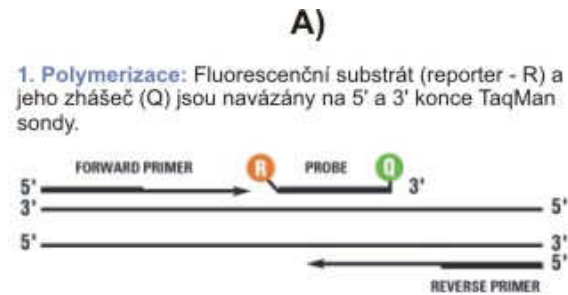
9 Seznam použitých zkratek

ADCC	buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (<i>Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity</i>)
Akt	proteinkináza B, také PKB (<i>Proteinkinase B</i>)
Alk fúzní gen	fúzní gen EML4-ALK (<i>Echinoderm Microtubule-associated protein-Like 4 - EML4 a Anaplastic Lymphoma Kinase - ALK</i>) u NSCLC
AP-1	transkripční faktor (<i>Activator Protein-1</i>)
ARMS	<i>Amplification Refractory Mutation System</i> , také AS-PCR, SSP-PCR
AS-PCR	Alelově specifická PCR (<i>Allele Specific – PCR</i>)
bp	pár bazí (<i>Base Pair</i>)
<i>BRAF</i>	gen pro Ser/Thr proteinkinázu b-Raf (<i>v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>)
C _t	amplifikační cyklus, ve kterém hodnota fluorescence překročila prahovou hodnotu (<i>Cycle Threshold</i>)
DNA	deoxyribonukleotidová kyselina (<i>DeoxyriboNucleic Acid</i>)
ds (DNA)	dvouvláknová DNA (<i>double stranded</i>)
E2F	transkripční faktory rodiny E2F
EDTA	kyselina etylendiamintetraoctová (<i>EthyleneDiamineTetraacetic Acid</i>)
EGFR	Receptor epidermálního růstového faktoru (<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>), také HER1 a ErbB1
EGF	Epidermální růstový faktor (<i>Epidermal Growth Factor</i>)
EMA	Evropská agentura léčivých přípravků (<i>European Medicines Evaluation Agency</i>)
ER	Estrogenový receptor (<i>Estrogene-Receptor</i>)
ErbB	Homolog virálního onkogenu erytroblastické leukémie (<i>Erythroblastic leukemia viral oncogene homolog</i>)
ERK	kinázy regulované extracelulárními signály (<i>Extracellular signal-regulated Kinase</i>)
F	<i>forward</i> (směr primeru)
FDA	Americká Správa potravin a léčiv (<i>U S Food and Drug Administration</i>)
FRET	rezonanční přenos fluorescenční energie (<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>)
GRB2	adaptorový protein vázící receptor růstového faktoru (<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>)
GTPáza	enzym, který váže a hydrolyzuje GTP (<i>Guanosine-triphosphate</i>)
HB – EGF	heparin – vázící růstový faktor podobný EGF (<i>Heparin-binding EGF-like growth factor</i>)

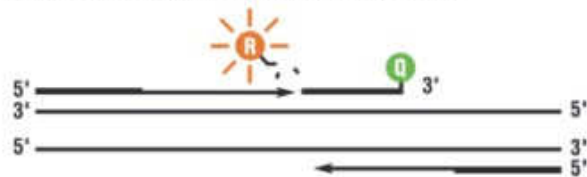
HER2	lidský epidermální růstový faktor (<i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>)
HIF 1 α /2 α	hypoxií indukovaný faktor (<i>Hypoxia-Induced Factor 1α/2α</i>)
HRMA	analýza křivek teplot tání s vysokým rozlišením (<i>High Resolution Melting Analysis</i>)
IgG	imunoglobuliny typu G
JAK1/JAK2	tyrozinová kináza asociovaná s receptorem (<i>Janus Kinase-1/2</i>)
JNK	c-Jun N-terminální kináza (<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>)
KRAS	homolog onkogenu Kirsten rat sarcoma viru (<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>)
LKB-1	gen pro Ser/Thr proteinkinázu LKB-1, tumorový supresor
LNA	nukleová kyselina s tzv. uzamčenou konformací (<i>Locked Nucleic Acid</i>)
mAbs	monoklonální protilátky (<i>monoclonal AntiBodies</i>)
MAPK	mitogeny-aktivované proteinkinázy (<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>)
ME PCR	vícevláknová elektronická PCR (<i>Multithreaded Electronic PCR</i>)
MEKs	MAPK/ERK kinázy
MET	protoonkogen kódující receptor hepatocytárního růstového faktoru (HGFR)
mTOR	cíl rapamycinu u savců (mammalian Target Of Rapamycin)
NCBI	Národní centrum pro biotechnologické informace (<i>National Center for Biotechnology Information</i>)
p53	gen pro transkripční faktor p53, tumorový supresor
PCR	polymerázová řetězová reakce (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDK1	PIP3 – dependentní kináza 1 (<i>PIP3- dependent kinase</i>)
PI3K	fosfatidylinositol 3-kináza (<i>Phosphatidylinositol-3-kinase</i>)
PIK3CA	gen pro lidský p110 α protein, katalytickou podjednotku PI3K
PIP	fosfatidylinositol-fosfát (<i>Phosphatidylinositol-phosphate</i>)
PLC-Gamma	fosfolipáza Gamma (<i>Phospholipase Gamma</i>)
PNA	peptidová nukleová kyselina (<i>Peptide Nucleic Acid</i>)
Nck	adaptorový protein nekatalytické oblasti TK domény (<i>Non-Catalytic region of tyrosine Kinase</i>)
NSCLC	nemalobuněčný karcinom plic (<i>Non-small Cell Lung Carcinoma</i>)
R	<i>reverse</i> (směr primeru)
Raf	Ser/Thr proteinkináza
RAS	skupina přenašečů signálu (N-ras, K-ras, H-ras)
RFLP	délkový polymorfismus restrikčních fragmentů (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
SCC	skvamózně-buněčný karcinom plic (<i>Squamous-Cell Carcinoma</i>)
SCLC	malobuněčný karcinom plic (<i>Small-Cell Lung Carcinoma</i>)

SH2 doména	Src-homologní 2 doména (<i>Src Homology 2</i>)
SHC	transformující protein obsahující SH2 doménu (<i>Src homology 2 domain containing</i>)
SNaPshot	analýza umožňující simultánní multigenní skrínig mutací
SNPs	existence několika přirozených variant (alel) zasahujících jediný nukleotid. Nejběžnější alela nesmí přesáhnout 95% frekvence v populaci, nejméně čtená nad 1% (<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>)
SP-PCR	PCR se sekvenčně specifickými primery (<i>Single Specific Primer – PCR</i>)
STAT	přenašeč signálu a aktivátor transkripce (<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>)
SOS	protein aktivující GTPázovou aktivitu Ras (<i>Son of Sevenless</i>)
Src	intracelulární tyrosinová protein kináza
TGF α	transformující růstový faktor α (<i>Transforming Growth Factor α</i>)
<i>TTF-1</i>	gen pro transkripční faktor (<i>thyroid transcription factor 1</i>)
TK	tyrozin-kinázová (doména, aktivita)
TKIs	inhibitory TK aktivity EGFR (<i>Thyrosine Kinase Inhibitors</i>)
T _m	teplota tání, teplota, při které dochází k denuraci 50 % amplikonů (<i>melting temperature</i>)
VEGF	cévní endoteliální růstový faktor (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)
wt (DNA)	standardní, nemutovaný typ (<i>wildtype</i>)

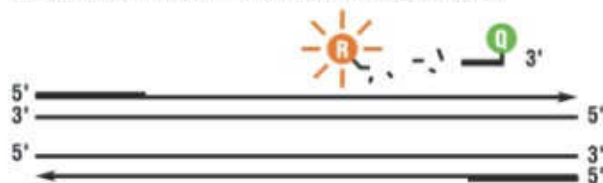
10 Přílohy



3. **Odštěpení:** když Tag polymeráza dorazí k začátku sondy, postupně ji odchlípuje až odštěpí fluorofor. Ten se tímto oddálí od zhášeče a emitované světlo přestane být pohlcováno - detekovaná fluorescence stoupá.



4. **Polymerizace ukončena:** reporterová barva oddělená od zhášeče emituje charakteristickou fluorescenci.



B)

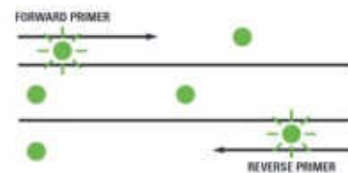
1. **Navázání:** SYBR® Green I se váže během každého cyklu na dvouvláknovou DNA.



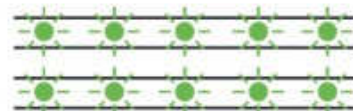
2. **Denaturace:** Ve fázi denaturace DNA je SYBR® Green I uvolněn z vazby na DNA a celková fluorescence dramaticky klesá.



3. **Polymerizace:** Během annealingu primerů a elongace řetězce se Sybr Green opět začíná navazovat na vznikající dvouvláknovou DNA - fluorescence stoupá.



4. **Ukončení polymerizace:** Emitovaná fluorescence dosahuje maxima.



Obr. A: Princip real-time PCR při použití nespecifických (A) a specifických (B) fluorescenčních substrátů (LF HK, 2006)

Tab. A: Vyšetřované mutace v genu *EGFR* soupravou TheraScreen® DxS:

Mutace	Exon	Změna báze	Cosmic ID
T790M	20	2369C>T	6240
L858R	21	2573T>G	6224
L861Q	21	2582T>A	6213
S768I	20	2303G>T	6241
G719A	18	2156G>C	6239
G719S	18	2155G>A	6252
G719C	18	2155G>T	6253
Inzerce	20	2307_2308ins9	12376
		2319_2320insCAC	12377
		2310_2311insGGT	12378
Delece	19	2235_2249del15	6223
		2235_2252>AAT (komplex)	13551
		2236_2253del18	12728
		2237_2251del15	12678
		2237_2254del18	12367
		2237_2255>T (komplex)	12384
		2236_2250del15	6225
		2238_2255del18	6220
		2238_2248>GC (komplex)	12422
		2238_2252>GCA (komplex)	12419
		2239_2247del9	6218
		2239_2253del15	6254
		2239_2256del18	6255
		2239_2248TTAAGAGAAG >C (komplex)	12382
		2239_2258>CA (komplex)	12387
		2240_2251del12	6210
		2240_2257del18	12370
2240_2254del15	12369		
2239_2251>C (komplex)	12383		

(TheraScreen® DxS: *EGFR* Mutation – Instruction for use, 2009)

Tab. B: Sekvence použitých primerů a sond

Číslo Oligon.	Název (specifita) oligonukleotidu	Směr	Sekvence
326	EGFR exon 19 externí	F	gCAATATCAgCCTTAggTgCggCTC
327	EGFR exon 19 externí	R	CATAgAAAgTgAACATTTAggATgTg
506	EGFR exon 21 externí	F	gCTgCgAgCTCACCCAgAA
507	EGFR exon 21 externí	R	CTAACgTTCgCCAgCCATA
516	EGFR exon 19 interní (značený 513)	F	CCTgAggTTCAgAgCCATggAC
519	EGFR exon 21 interní	F	TCACCCAgAATgTCTggAgAg
574	globin sonda		TgTCCAaggTgAgCCaggCCATCACT
576	globin_for		CCCACCCTTAggCTgCTggT
577	globin_rev		ggCAAaggTgCCCTTgAggT
624	EGFR exon 21 pro L858R	F	CACCgCAgCATgTCAAgA
625	EGFR exon 21 pro L858R	R	TgCCTCCTTCTgCATggTAT
626	EGFR exon 21 L858R (L-T) sonda wt	F	CACAgATTTTgggCTgg
627	EGFR exon 21 L858R (R-G) sonda mutant	F	ATTTTgggCgggCCA
638	EGFR exon 21 L861 a L858 sonda	F	CCTggCATgAACATgACCCTg
642	EGFR exon 21 L858R		gATCAgTAgTCACTAACgTTCgCC
643	EGFR exon 21 L858R specific		CACCCAgCAgTTTggCCC
688	EGFR exon 21 L858R vnitřní F	F	Cagcctggtccctggtgtcagga
689	EGFR exon 21 L858R vnitřní R	R	ActtggaggaccgtcgcttggTg
692	EGFR exon 21 L858R vnější R	R	Gcatgaactacttggaggaccgtcgcttgg
693	EGFR exon 21 L858R vnější F	F	Tccctggtgtcaggaaaatgctggctga
696	EGFR exon 19 delece 2235-2249, 2235-2252-AAT	F	AgTTAAAATTCCCgTCgCTATCAAAA
697	EGFR exon 19 delece 2236-2253	F	TCCCgTCgCTATCAAgTCTCC
698	EGFR exon 19 delece 2237-2251, 2237-2254	F	ATTCCCgTCgCTATCAAggC
699	EGFR exon 19 delece 2236-2250	F	AATTCCCgTCgCTATCAAgACA
700	EGFR exon 19 delece 2237-2255 T, 2238-2255	F	CgTCgCTATCAAggWTCCgAAAgCC
701	EGFR exon 19 delece 2238-2248 GC, 2238-2252 GCA	F	AAATTCCCgTCgCTATCAAggAg
702	EGFR exon 19 delece 2239-2247	F	CCgTCgCTATCAAggAAgC
703	EGFR exon 19 delece 2239-2253, 2239-2248 TTA AGA GAAG C, 2239-2258 CA, 2239-2251 C	F	TTCCCgTCgCTATCAAggAAC
704	EGFR exon 19 delece 2239-2253, 2240-2251, 2240-2257, 2240-2254	F	TCCCgTCgCTATCAAggAATC
705	EGFR exon 19 sonda	F	CTgCTTTgCTgTgTgggggTCCATg