

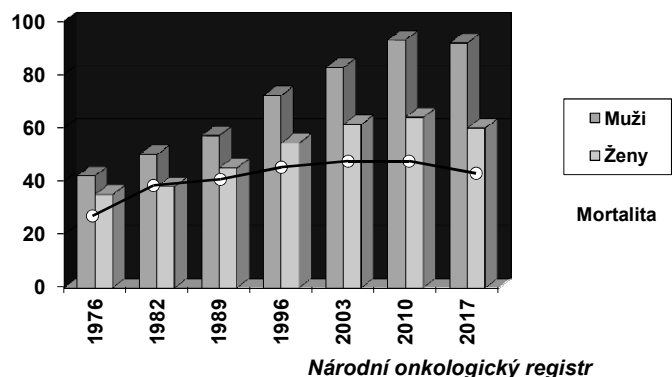
# Tumorové markery

Martin Beránek

## Onkohematologie a solidní tumory

- Znamé místo primární léze (dřeň, uzlina, krev)
- Nativní aspiráty, krev, uzliny
- Relaps vyšetřován v témže typu materiálu
- Šíření klonů krevními buňkami nebo se nevyplavují
- Lze separovat vyšetřovanou buněčnou linii (centrifugace, CD...)
- Cytogenetika rutinně
- Průtoková cytometrie rutinně
- Primární tumor někdy nelze s určitostí prokázat (až 6 %)
- Fixovaná nebo nativní tkáň, biopsie, plasma, (uzliny)
- Relaps v sekundárních orgánech a metastázách
- Šíření do svaloviny, místních či vzdálených uzlin, krevní cestou se vyplavují dle pokročilosti tumoru
- Heterogenita odebraných vzorků (citlivost metod !!!)
- Cytogenetika vzácně
- Histopatologické vyšetření rutinně
- Zobrazovací technika rutinně

## Incidence a mortalita C18-C20 v ČR (na 100 000 obyvatel)



## Klinická a patologická klasifikace nádorových onemocnění v humánní a veterinární medicíně

- **Typing** je stanovení histologického typu nádoru
- **Grading** je stanovení stupně ztráty podobnosti nádoru s původní tkání (stupeň dediferenciace a buněčné anaplasie, změna objemu organel, aj.); míra agresivity
- **Staging** je stanovení klinické pokročilosti onemocnění
- Klasifikace nádorů ICD-O – jde o mezinárodní klasifikaci podle typingu a gradingu nádoru.

## Karcinogeneze

mnohostupňový proces ovlivněný mnoha faktory

### Genetické faktory

*familiární predispozice  
nebo somatické mutace:*

- protoonkogenů
- tumor suppressor genů
- repairových genů
- modifikujících genů
- numerické a strukturní změny chromosomů

### Epigenetické faktory

Metylace bází v regulačních částech genů ovlivňující genovou expresi

Acetylace histonů rozvolňující interakce DNA-histony a zvyšující expresi genů

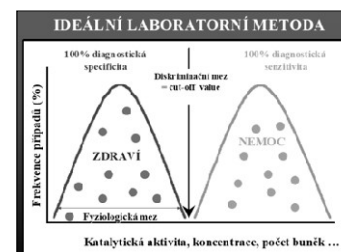
### Environmentální faktory

*Induktory mutací:*  
radiace, kouření, toxické l., chronický zánět  
volné O radikály  
viry, abnormální buněný růst a dělení  
výživa, bakteriální produkty

vede k nekontrolovanému buněčnému dělení, změnám v diferenciaci, přežití, angiogenezi a metastázování

## Ideální nádorový marker

- Specifický pro malignity daného typu a orgán
- Citlivý pro záchyt již v časných stádiích růstu (vysoké koncentrace k krvi)
- Koreluje svými hodnotami s rozsahem (velikostí) nádoru
- Je korelace mezi hodnotami markeru a prognózou onemocnění a účinnou terapií



## Klasické nádorové markery

- Klasické nádorové markery představují látky, které jsou produkovány nádorovými buňkami nebo hostitelem jako odpověď na nádor.
- Látky přecházejí do tělesných tekutin (krevní sérum, moč), kde je lze prokázat (detekce je založena na přítomnosti nádorových antigenů, hormonů, enzymů, aj. – tkáňové markery uvnitř nebo na povrchu nádorových buněk)
- Klasické nádorové markery lze málo použít v diagnostice (CA 19-9 a CA 125 i u pleurálních či břišních výpotků zvýšené !!!)
- Větší význam mají při sledování vývoje recidivy.
- Někdy ovšem mohou nádorové buňky začít vytvářet populaci dediferenciovaných buněk bez markerů.
- **Nádorově specifické markery:** PSA nebo tyreoglobulin
- Prognosticky cenné markery: AFP a hCG (germinativní nádory), CEA (kolorektální ca), beta2 mikroglobulin (myelomy)

## Klasické nádorové markery

- Onkofetální antigeny (AFP, CA125, CA15-3, CA19-9, CA72-4, CEA, hCG)
- Cytokeratiny (CYFRA 21.1, TPA, TPS)
- Enzymy (thymidinkináza, NSE, PSA, freePSA)
- Hormony (ACTH, ADH, kalcitonin, parathormon, prolaktin, STH, TG)
- Další nespecifikované látky (ferritin, b2-mikroglobulin, Ig)
- Markery související s rozvojem nádoru (HER-2/neu, EGF, osteopontin)
- Tkáňové markery histologické (ER, PR, HER-2/neu, EGFR, p53)

*Diagnóza malignity? NE*

*Screening malignity v populaci? NE (výjimka okultní krvácení)*

*Rodinný výskyt nádoru? NE (mol biol BRCA1/2 u ca prsu)*

*Prekancerózy? Výjimečně*

*Potvrzení diagnózy? Výjimečně*

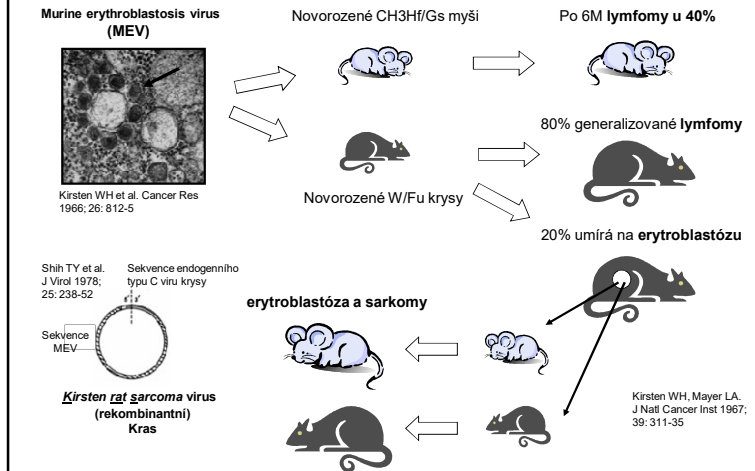
*Agresivita tumoru? Výjimečně*

*Pooperační kontrola? Relaps? Typ biologické léčby? ANO*

## Molekulárně biologická diagnostika solidních tumorů

- Vyšetření mutací v onkogenech (*KRAS*) a tumor supresorových genech v DNA z nativních anebo fixovaných tkání
- Vyšetření vrozených predispozic k rakovině (*BRCA1a2*)
- Metylační změny DNA v tumor supresorových genech v tkáni, v krvi, atd.
- Odhad rychlých a pomalých metabolizátorů léků
- Tumorové buňky v cirkulaci
- Volná nádorová DNA v plazmě nebo v séru
- Profil miRNA transkriptů ve tkáni nebo tělesných tek.
- Molekulárně cytogenetické vyšetření maligně transformovaných buněk (translokace, aneuploidie)

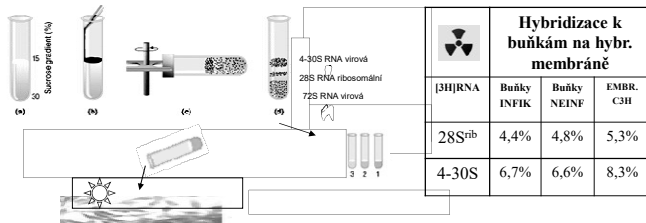
## Buněčná biologie v 60. letech vytvořila řadu leukemických linií buněk díky „leukemogenním“ virům



## Cellular Origin of a Mouse Leukemia Viral Ribonucleic Acid

R. L. WOLLMANN<sup>1</sup> AND W. H. KIRSTEN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departments of Pathology and Pediatrics, The University of Chicago, Chicago, Illinois 60637



Pozdější výzkum ukázal, že některé retroviry obsahují ve své RNA struktuře onkogenní struktury, v řadě případů zčásti nahrazující původní genetickou výbavu viru



## v-ras<sup>K</sup> Δ = 6 AK C-ras<sup>K</sup>

## Proposal for Naming Host Cell-Derived Inserts in Retrovirus Genomes†

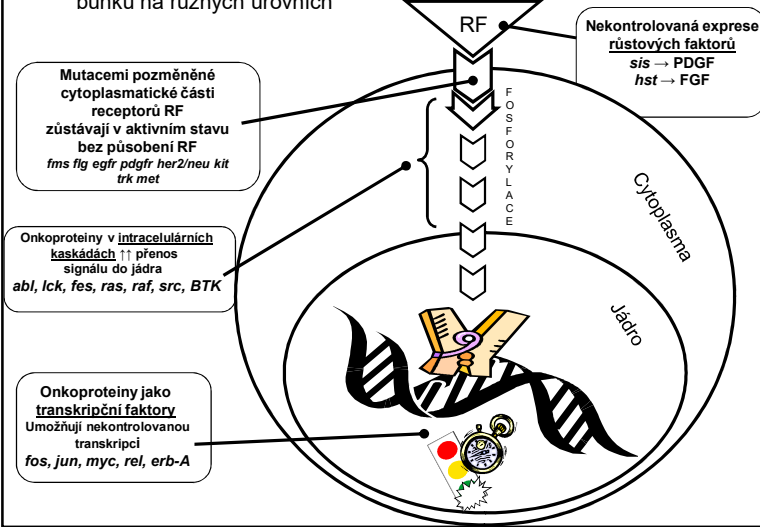
JOHN M. COFFIN, HAROLD E. VARMUS, J. MICHAEL BISHOP, MYRON ESSEX, WILLIAM D. HARELY, JR., C. STEVEN MARTIN, NAOMI E. ROSENBERG, EDWARD M. SCOLNICK, ROBERT A. WEINBERG, AND PETER K. VOCT†

Received 22 June 1981/Accepted 17 July 1981

We propose a system for naming inserted sequences in transforming retroviruses (i.e., onc genes), based on using trivial names derived from a prototype strain of virus.

<i>erb-A</i>	AEV- <i>erb-A</i>	Avian erythroblastosis virus	Chicken	P75 <sup>erb-A</sup>
<i>erb-B</i>	AEV- <i>erb-B</i>	Avian erythroblastosis virus	Chicken	p45 <sup>erb-B</sup>
<i>fps</i> <sup>a</sup>	FSV- <i>fps</i> PRCII- <i>fps</i> PRCIV- <i>fps</i>	Fujinami sarcoma virus PRCII sarcoma virus PRCIV sarcoma virus	Chicken Chicken Chicken	P140 <sup>fps</sup> P105 <sup>fps</sup> P170 <sup>fps</sup>
<i>yes</i>	Y73- <i>yes</i> ESV- <i>yes</i>	Y73 avian sarcoma virus Esh sarcoma virus	Chicken Chicken	P60 <sup>yes</sup> P60 <sup>yes</sup>
<i>ros</i>	UR2- <i>ros</i>	UR2 avian sarcoma virus	Chicken	P68 <sup>ros</sup>
<i>mos</i> <sup>b</sup>	Moloney- <i>mos</i> Gazdar- <i>mos</i>	Moloney murine sarcoma virus Gazdar murine sarcoma virus	Mouse Mouse	
<i>ras</i>	Kirsten- <i>ras</i> Harvey- <i>ras</i> Rasheed- <i>ras</i>	Kirsten murine sarcoma virus Harvey murine sarcoma virus Rasheed rat sarcoma virus	Rat Rat Rat	p21 <sup>ras</sup> p21 <sup>ras</sup> p29 <sup>ras</sup>
<i>abl</i> <sup>c</sup>	<i>abl</i>	Abelson murine leukemia virus	Mouse	P120 <sup>abl</sup>

Produkty onkogenů (onkoproteiny) ovlivňují buňku na různých úrovních

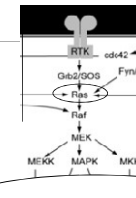


### Comparative Biochemical Properties of p21 *ras* Molecules Coded for by Viral and Cellular *ras* Genes

ALEX PAPAGEORGE,<sup>1</sup> DOUGLAS LOWY,<sup>2</sup> AND EDWARD M. SCOLNICK<sup>1,4\*</sup>  
 Laboratory of Tumor Virus Genetics<sup>1</sup> and Dermatology Branch,<sup>2</sup> National Cancer Institute, Bethesda, Maryland 20205

Received 7 June 1982/Accepted 30 July 1982

The p21 proteins coded for by *v-ras<sup>H</sup>* and *c-ras<sup>H</sup>-1* shared certain properties: each protein was synthesized as a precursor protein which subsequently became bound to the inner surface of the plasma membrane; each protein was associated with guanine nucleotide-binding activity.



### protoonkogen vs onkogen

**Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the *ras* genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses**

(human tumors/transfection/retroviruses)

CHANNING J. DER, THEODORE G. KRONTRIS, AND GEOFFREY M. COOPER

Lokalizace	ras gen	% vyskyt
Pankreas	K	85
Tlusté střevo	K	45
Plíce	K	44
Žlučník	H	37
Tenké střevo	H	31
Štítná žláza	HKN	30
Varičata	KN	28
Děloha	K	25
Ledviny	K	25
Vaječníky	K	24
Kůže	HKN	23
Leukémie	NK	23
Žaludek	H	21
Děložní šípek	K	20
Játra	KN	19
Hlava a krk	HK	15
Prostata	HK	13
Mozek	NK	7
Prsa	K	6

Kiaris H et al.  
 Int J Oncol 1995;  
 7: 413-21

### Human Colon Carcinoma *Ki-ras2* Oncogene and Its Corresponding Proto-Oncogene

MELISSA S. MCCOY, CORNELIA I. BARGMANN, AND ROBERT A. WEINBERG\*

Department of Biology and Center for Cancer Research, Massachusetts Institute of Technology, and Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, Massachusetts 02139

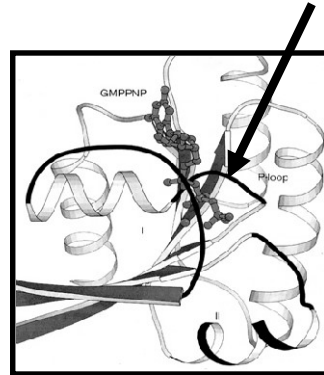
We isolated cDNA clones corresponding to the normal human *Ki-ras2* gene and to the transforming allele of the *Ki-ras2* gene present in the human colon carcinoma cell line SW480. These two cDNAs encode p21 proteins which differ only at the amino acid at position 12. The normal cDNA encodes (glycine) at this position, and the transforming allele encodes a valine.

DNA z buněk nádorové tkáně a nádorových linií transformují buňky nenádorové (NIH 3T3)

Normální sekvence KRAS2	I	ATC	ACT	GAA	TAT	AAA	CTT	GTC	GTA	GTT	GGA
Normální sekvence KRAS2	II	GCT	GCT	GCC	CTA	GCC	AAC	ACT	GCC	TTC	ACC
Sekvence KRAS2 u linie SW480											

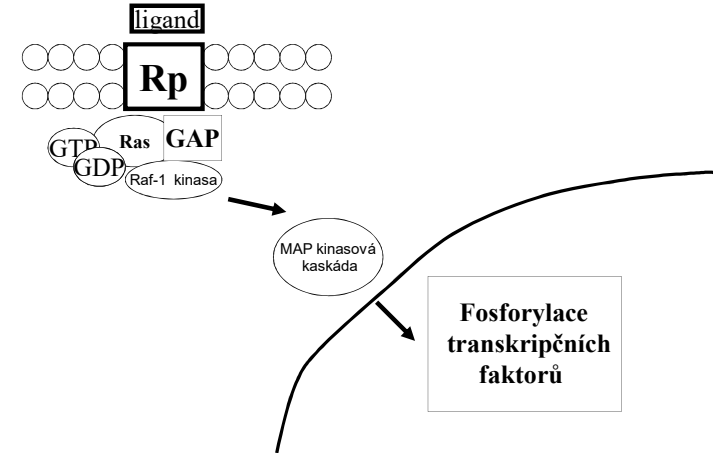
## Aminokyselinová sekvence konzervativní P-smyčky p21<sup>ras</sup>

kodon	AK	DNA
10	Gly	GGA
11	Ala	GCT
12	Gly	GGT
13	Gly	GGC
14	Val	GTA
15	Gly	GGC

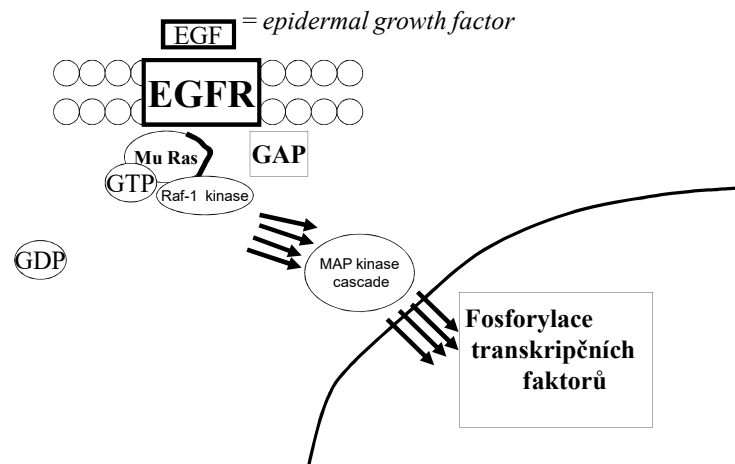


Gamblin SJ et al. Current Opinion in Structural Biology, 8, 1998, 195-201.

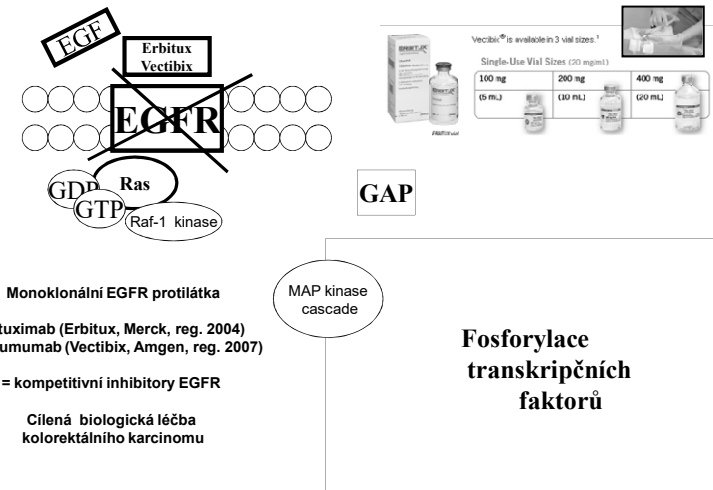
## p21<sup>ras</sup> protein v buněčné proliferaci



## Somaticky mutovaný p21<sup>ras</sup> protein v buněčné proliferaci



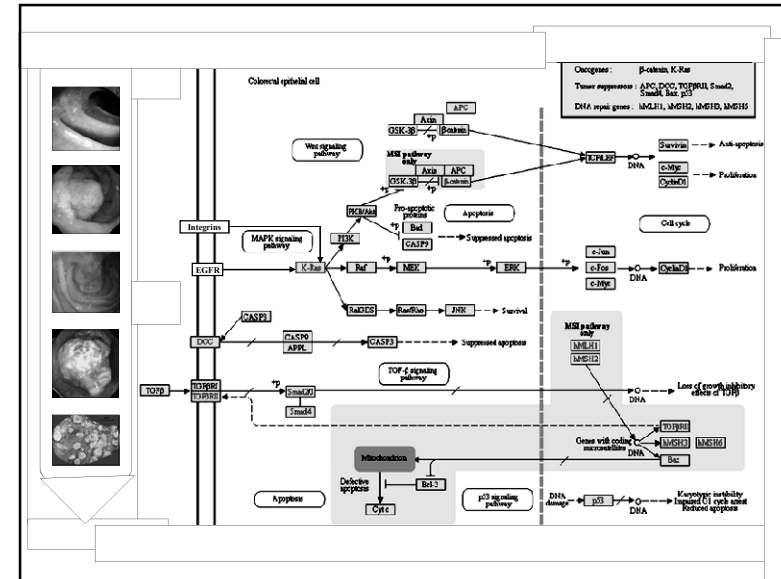
## Jak zablokovat p21<sup>ras</sup> signální kaskádu



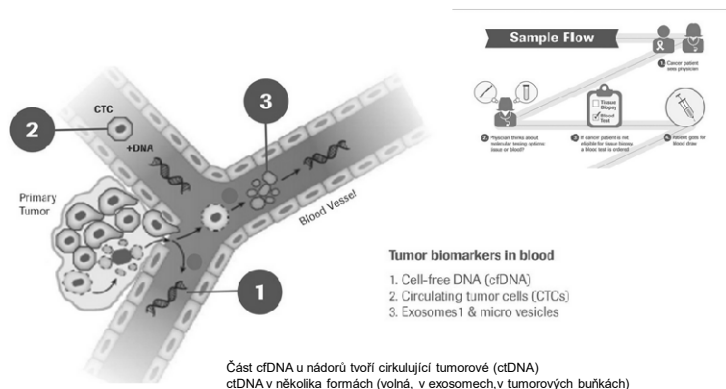
## Cílená biologická léčba

- Látky zasahují cíleně do biologických dějů, zejména imunitních a zánětlivých na **molekulární úrovni**
- Tyto látky jsou přesně definovány z hlediska **biologické povahy**
- Výroba biotechnologicky** - podoba endogenním látkám produkovaným v lidském organismu
- Monoklonální protilátky, rekombinantní peptidy, syntetické oligos, genová terapie**
- Nákladná výroba, cílená distribuce, ambulantní léčba, méně NÚ a předávkování
- MoAb podle homologie: Humánní **struktura** (-mumab), humanizovaná (>90%, -zumab), chimerická (<90%, -ximab), čistě myší (-momab); **inhibitory tyrosinkináz** (-inib)
- Kombinace s klasickými léčivými

-momab = mouse monoclonal antibodies

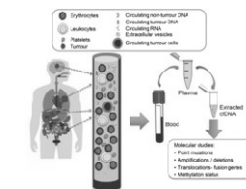


## DNA a buňky tumoru v plazmě/séru

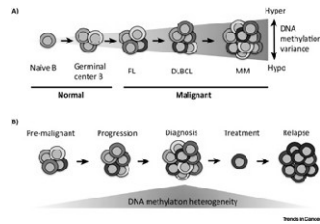


## cfDNA pro klinickou onkologii?

- Vyšší koncentrací volné cirkulující v plasmě nebo séru
- Fyziologicky 10-100 ng/ml; patologicky až 1000 ng/ml
- Vyšší úmrtí buněk nebo nedostatečné odstranění činností jater
- cfDNA se zvyšuje mj. také při procesu krevního srážení !!!
- Dlouhé cfDNA molekuly u nádorových procesů, krátké cfDNA 180 bp prokázány u apoptózy (záněty, trauma, infarkt, imunodeficiency...)
- Funkce cfDNA: stimulace imunitního systému jako Ag
- ctDNA nese charakter DNA tumoru: somatické mutace, metylace...
- V praxi se ctDNA šíří klinicky zatím nevyšetřuje

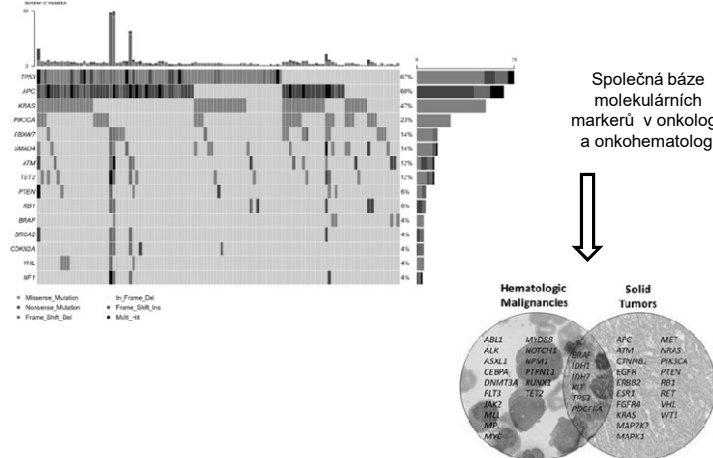


## Metylace DNA v současné onkologii



- Klinické využití metylace cytosinu v mnoha genech (*TWIST1*, *OTX1*, *FGFR3*, *TERT*, *SOX1*, *IRAK3*, *PITX2*, *ASTN1*, *DLX1*, *SEPT9*, *MGMT*, aj.)
- Nabídka hotových souprav na analýzu metylace zejména u tumor supresorových genů
- Nádory močového měchýře, prsu, tlustého střeva, plic, děložního čípku, glioblastomu
- Moč, bločky, krev, cervikální stěry, stolice, plasma, biopsie

Oncoplot of the top 15 most frequently mutated genes in 115 cases. This shows the list of top 15 genes arranged based on the total number of variants in each gene



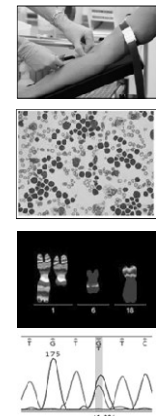
## Onkohematologická onemocnění

- Hematologické malignity postihují myeloidní a lymfoidní tkáň
- Malignity klonálního původu zahrnují genetické abnormality
- Molekulární genetika je součástí postupů:
  - diagnostických [O jakou jde nemoc?]
  - klasifikačních [Jakého je typu?]
  - prognostických [Jak je závažná?]
  - monitorovacích [Jak odpovídá na léčbu?]
- Diagnostika a léčba zpravidla ve specializovaném centru



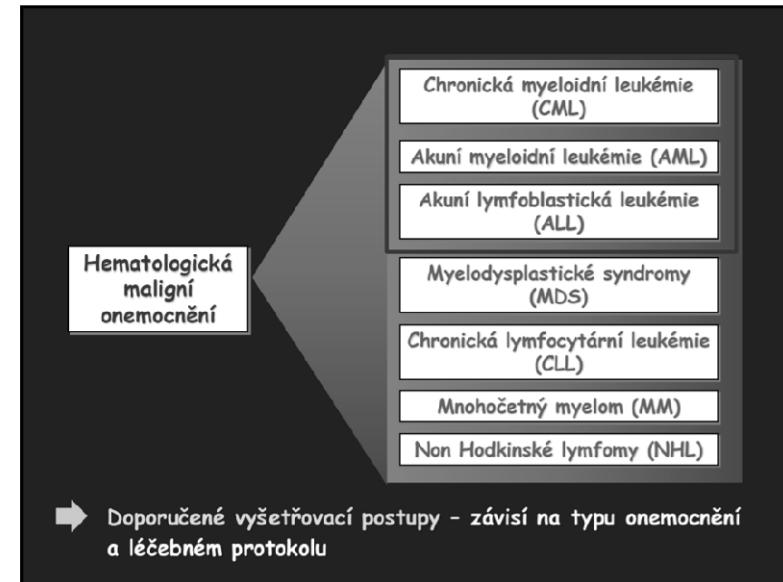
## Molekulární diagnostika v onkohematologii

- Hodnocení krevního obrazu
- Hodnocení nátěru z kostní dřeně
- Klasická cytogenetika
- FISH techniky
- Mikroarray
- Screening (somatických) mutací
- MPS pro hodnocení počtu kopií v genomu



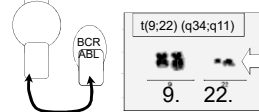
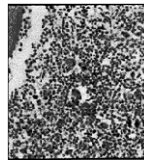
## Obecné podmínky molekulárního vyšetření

- Odběry biologických vzorků ve fázi diagnózy, při kontrole během léčby a při relapsu choroby
- **Kostní dřev** při myeloidní neoplazii, akutní leukemii a myelomu
- **Krev** u CLL a CML
- **Lymfatická uzlina nebo biopsie** u lymfomů
- Pro založení buněčné kultury krev heparinizovaná
- Pro DNA analýzu krev s EDTA
- U MM se DNA izoluje z buněčné frakce CD138+
- Minimální reziduální choroby se často monitorují pomocí **kvantitativní PCR** (a multiparametrické průtokové cytometrie)
- **Molekulární diagnostika a FISH** preferovány u vzorků potransplantačních

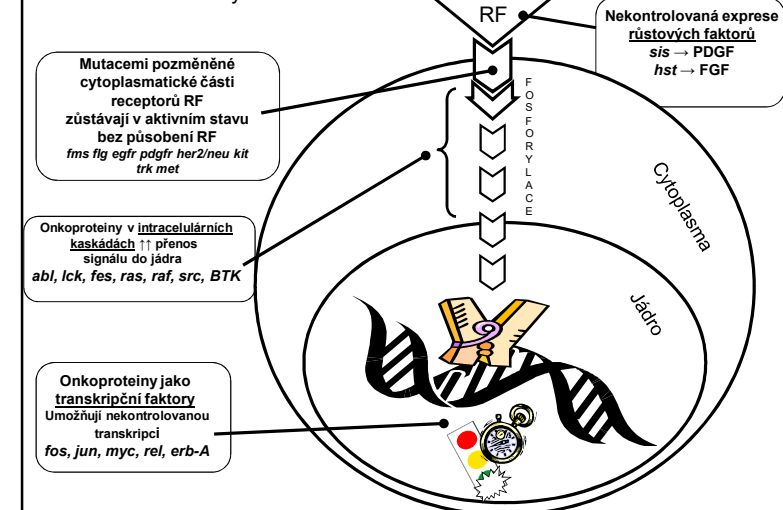


## Chronická myeloidní leukemie

- Velké množství bílých krvinek, které se vymkly kontrole
- Klonální myeloproliferace – masivní nárůst blastů ve dřev
- t(9;22)(q34;q11) v důsledku existence Filadelfského chromosomu (der(22)t(9;22)(q34;q11))
- Translokace u 90–95% případů
- Odlišná stavba *ABL* dána spojením chromosomů 9 a 22, konkrétně v genech *BCR* a *ABL*
- 5–10% s variantou t(9;22) zahrnující další chromosomy nebo s kryptickou (=submikroskopickou) přestavbou chromosomů
- Prognostický význam dalších prokázaných abnormalit Ph+ buňkách - druhý Ph chromosom, trisomie 8, isochromosom 17q a trisomie 19
- *BCR-ABL1* analýza pomocí FISH nebo RT-PCR
- Ph- CML s dále testuje jako myeloproliferace

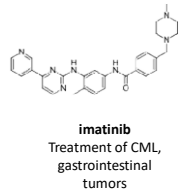
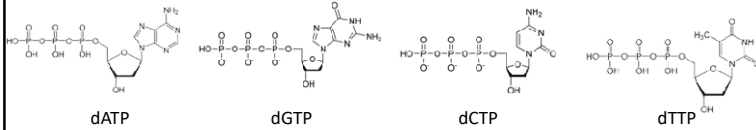


## Produkty onkogenů (onkoproteiny) ovlivňují buňku na různých úrovních

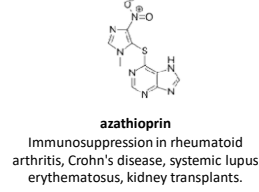




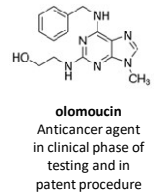
## Modifikované nukleosidy a nukleotidy v klinické medicíně



**Mechanism of treatment:**  
competition with ATP in active centre of ABL kinase



**Mechanism of treatment:**  
terminate replication in proliferative states



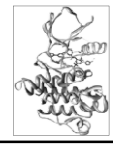
**Mechanism of treatment:**  
inhibits cyclin-dependent kinases and induces G arrest

## (BCR)-ABL kináza a CML léčba

ABL inaktivní konformace      ABL aktivní konformace

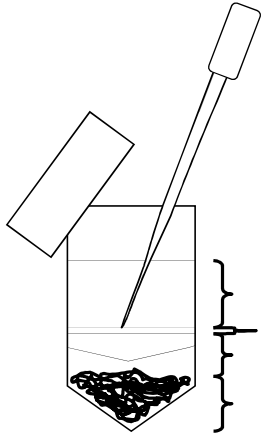


Úspěšná léčba CML  
=> leu jdou do apoptosy



## Pracovní postup při sledování fúze BCR-ABL

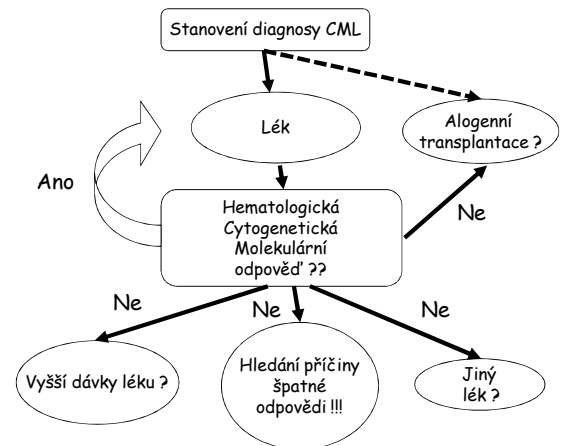
- Odběr krve / kostní dřeně
- ↓
- Čištění bílých krvinek**
- ↓
- Izolace nukleových kyselin (RNA)
- ↓
- Množení nukleové kyseliny
- ↓
- Hodnocení výsledků BCR-ABL (laboratoř)
- ↓
- Hodnocení klinických a laboratorních dat (lékař)



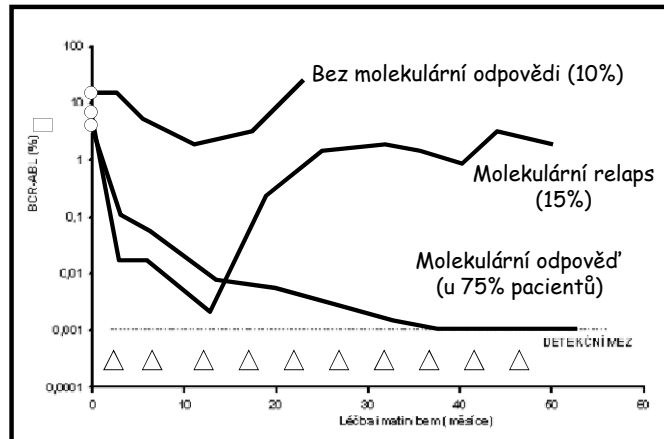
krvní plasma  
bílé krvinky  
separační médium  
červené krvinky

## Algoritmus diagnostiky a léčby CML

- Odběr krve / kostní dřeně
- ↓
- Čištění bílých krvinek
- ↓
- Izolace nukleových kyselin (RNA)
- ↓
- Množení nukleové kyseliny
- ↓
- Hodnocení výsledků BCR-ABL (laboratoř)
- ↓
- Hodnocení klinických a laboratorních dat (lékař)**



## Odpověď na pravidelnou léčbu CML imatinibem (Glivecem 400 mg/d)



## Další léčba rezistentních osob

- Zvýšit dávku imatinibu (600-800 mg/d)
- Alogenní transplantace progenitorových buněk
- Aplikace nových léků: dasatinib (Sprycel, Bristol), nilotinib (Tasigna, Novartis), bosutinib (Bosulif, Pfizer), ponatinib (Iclusig, Ariad)

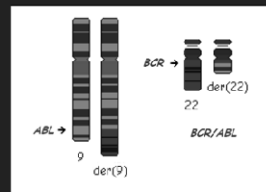


V klinickém výzkumu:  
LBH589, LAQ824, MK-0457, DCC-2036, bafenitib (NS-187), ...

## Chromosomové aberace u CML

- ✓ Kromě t(9;22)(q34;q11) mohou být detekovány i další aberace:
- ✓ Delece 9q34 (delece oblasti vedle ABL) - může být provázena horší prognózou; vzniká současně s iniciální translokací t(9;22)(q34;q11)
- ✓ Trisomie 8 (+8) - 34%
- ✓ Další nadpočetný Ph chromosom (+Ph) - 30%
- ✓ Isochromosom 17q - i(17)(q10) - 20%
- ✓ Trisomie 19 (+19) - 13%
- ✓ Ztráta Y (-Y) - 8% mužů

atd.



## Myeloproliferace a myelodysplastický syndrom

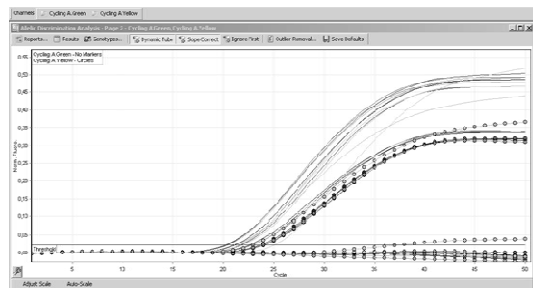
- **Myeloproliferativní neoplasie (MPN)**
- Analýza *JAK2*, *CALR* a *MPL* v diagnostice
- **Myeloidní/lymfoidní neoplasie s eosinofilií a abnormalitami *PDGFRA*, *PDGFRB* a *FGFR1* nebo s přestavbou *PCM1-JAK2***
- Analýza *FIP1L1-PDGFRB*, *PCM1-JAK2* fúze, *PDGFRB* a *FGFR1* a *PCM1-JAK2* (FISH, PCR)
- **Myelodysplastické syndromy (MDS)**
- Bodové mutace se špatnou prognózou: *ASXL1*, *EZH2*, *TP53* a *RUNX1* pomocí MPS
- monosomie 5/delece 5q a monosomie 7/delece 7q, trisomie 8, delece *TP53* a 20q delece; *MECOM* genová přestavba
- **Myelodysplastické/myeloproliferativní neoplasie**
- Některá onemocnění obsahují mutace *SF3B1*
- **Myeloidní neoplasie s predispozicí v zárodečné linii**
- familiární mutace v zárodečné linii – geny *DDX41*, *CEBPA*, *GATA2*, *TP53*
- Trisomie 21 Downův sy, řídké robertsonské translokace rob(15;21)(q10;q10)

## Ph negativní myeloproliferace

### ○ JAK2 V617F- 1849G>T v exonu 14

- Janusova tyrozinkináza (patří mezi protoonkogeny)
- záměna původního valinu za fenylalanin
- ztráta autinhibiční aktivity enzymu vede k nekontrolované proliferaci

Výsledek: M/wt  
M/M  
wt/wt



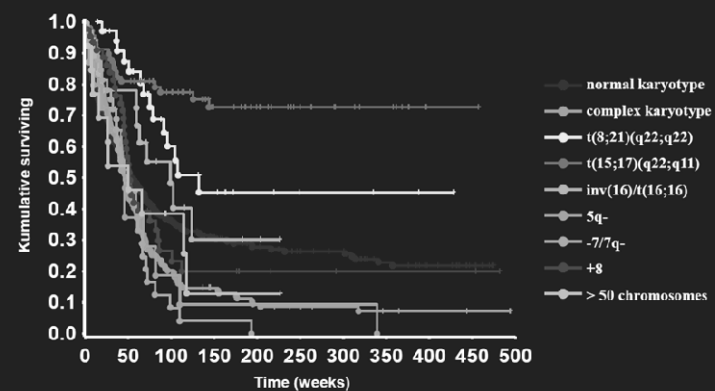
## Akutní myeloidní leukémie (AML)

- ✓ Heterogenní skupina maligních onemocnění krvetvorby
- ✓ Akumulace nezralých myeloidních buněk (myeloblastů) v kostní dřeni
- ✓ Diagnostikovaná ve všech věkových skupinách
- ✓ Nejčastěji postihuje lidi starší než 60 let (medián věku 64–68 let)
- ✓ Sekundární AML, „therapy-related“ AML
- ✓ Agresivní onemocnění - medián OS 2–3 měsíce
- ✓ Specifické chromosomové aberace s jasným prognostickým významem → stratifikace léčby podle cytogenetických nálezů

## Cytogenetické nálezy u AML

Chromosomová aberace	geny	prognóza
t(8;21)(q22;q22)	<i>RUNX1-RUNX1T1</i>	dobrá
inv(16)(p13.1;q22) nebo t(16;16)(p13.1;q22)	<i>CBFB-MYH11</i>	dobrá
t(15;17)(q22;q12)	<i>PML-RARA</i>	dobrá
t(9;11)(p22;q23)	<i>MLL3-MLL</i>	střední
t(6;9)(p23;q34)	<i>DEK-NUP214</i>	špatná
inv(3)(q21;q26.2) nebo t(3;3)(q21;q26.2)	<i>RPN1-EVI1</i>	velmi špatná
t(1;22)(p13;q13)	<i>RBM15-MKL1</i>	dobrá
přestavby <i>MLL</i> genu	<i>MLL</i>	špatná
monosomie 7 nebo delecce 7q31		špatná
delecce 5q31	?	špatná
komplexní chromosomové přestavby	?	velmi špatná

## Prognostický význam chromosomových aberací u AML



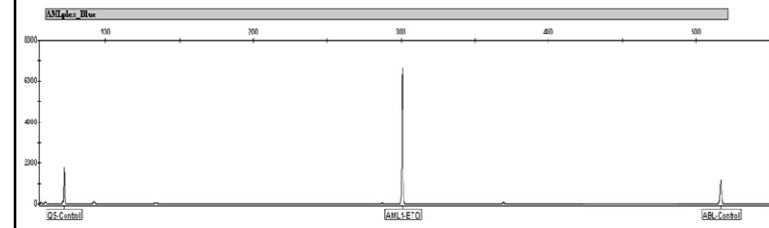
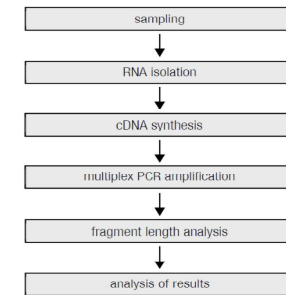
Alert

## Akutní leukemie

- **AML**
- Mutace v genech *NPM1*, *FLT3*, *CEPBA*, *RUNX1*, *ASXL1*, *DNMT3A* a *TP53*
- FISH analysis zaměřená na přestavby genů *KMT2A* a *MECOM*
- Další analýza: *PML-RARA*, *CBFB-MYH11* nebo *RUNX1-RUNX1T1* přestavby
- Monosomie 5/del(5)(q31.2) a monosomie 7/del(7)(q31.2), inv(16) s trisomií 22, t(5;11)(q35.2;p15.4); *NUP98-NSD1* u dětí
- t(7;12)(q36;p13); *MNXX1-ETV6* u dětí, delece 7q, trisomie 19, inv(16)(p13.3q24.3); *CBFA2T3-GLI2*
- **Akutní lymfoblastická leukemie/lymfom**
- **B-ALL:**
- t(9;22)(q34;q11.2); *BCR-ABL1*; t(v11q23); *KMT2A (MLL)* přestavby; t(12;21)(p13;q22); *ETV6-RUNX1*; t(1;19)(q23;p13.3); *TCF3-PBX1*; *iAMP21* a t(17;19)(q22;p13.3); *TCF3-HLF*
- *TP53* mutace
- Podtřída *ABL* fúzí zahrnuje *ABL1*, *ABL2*, *CSF1R* a *PDGFRB* léčba inhibitory *ABL1* tyrosinkinázy
- Podtřída změn *BCR-ABL1* a *CRLF2*, *JAK2* a *EPOR* aktivující *JAK/STAT* signální kaskádu léčba *JAK* inhibitory
- **T-ALL:**
- 50–70% změna karyotypu, tetraploidie v 5%, 35% přestavby TCR loci v 7q34 (TRB) nebo 14q11.2 (TRA/TRD)
- *TLX3* a *TLX1* abnormality u 25% a 5% u dětských T-ALL
- Fúzní *NUP214-ABL1* u 6%
- Přestavby *TLX3*, *TLX1*, *KMT2A*, *TAL1*, *LMO2* a *ABL1*

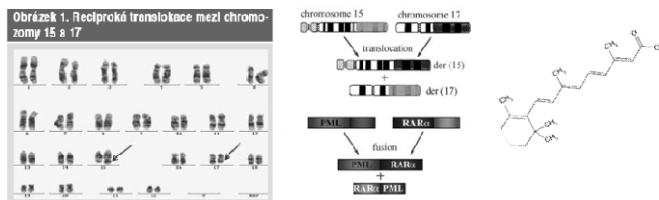
## AML-průkaz I

- AML Plex = komerční systém zachytí multiplexně 11 různých fúzních transkriptů na základě fragmentační analýzy
- *NPM1* mutace = komerční real-time PCR
- *FLT3*



## AMLplex a vyšetření PML-RARa

- t(15;17) = Akutní promyelocytární leukémie tvoří 5% AML
- Klinický obraz: promyelocyt s Aureovýmí tyčemi, leukopenie, těžká koagulopatie
- Fúzní transkript PML-RARa- blokuje diferenciaci buněk
- Cílená léčba – jedna z nejlépe léčitelných leukémií (ATRA+idarubicin, při relapsu oxid arsenitý)



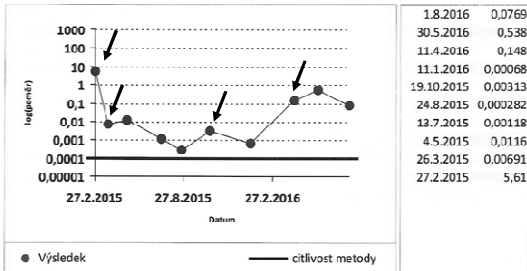
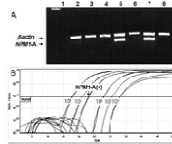
## AML-průkaz II

- *NPM1* = Nukleofosmin 1
- *NPM1* typizace (DNA)- typ A,B,D
- Nejčastější mutace u AML, hlavně u AML s normálním karyotypem
- Relativně dobrá prognóza
- Vhodný marker pro sledování MRN (qPCR)- stabilní, citlivý a specifický při vyšetření v průběhu onemocnění

Type of mutation	Sequence	Predicted protein	number
WTB type	GATCCTCG...GCAGTGGAGGAGCTCTTTAAGAAATAG	DLWGRKSL	173
Mutation A	GATCCTCGCTGGCAGTGGAGGAGCTCTTTAAGAAATAG	DLCLAYEYSLRE	49
Mutation B	GATCCTCGCTGGCAGTGGAGGAGCTCTTTAAGAAATAG	DLCLAYEYSLRE	7
Mutation D	GATCCTCGCTGGCAGTGGAGGAGCTCTTTAAGAAATAG	DLCLAYEYSLRE	4
Mutation G	GATCCTCGTGGCAGTGGAGGAGCTCTTTAAGAAATAG	DLCLAYEYSLRE	1
Mutation H	GATCCTCGTGGCAGTGGAGGAGCTCTTTAAGAAATAG	DLCLAYEYSLRE	1
Mutation I	GATCCTCGTGGCAGTGGAGGAGCTCTTTAAGAAATAG	DLCLAYEYSLRE	1
Mutation J	GATCCTCGTGGCAGTGGAGGAGCTCTTTAAGAAATAG	DLCLAYEYSLRE	1

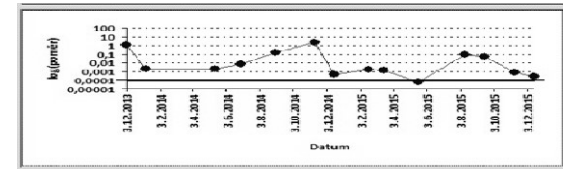
## Relativní kvantifikace genu NPM1- typ A

- Skupina 1b: Záchyt
- Skupina 2b: Monitorování léčby
- Skupina 3b: Monitorování léčby
- Skupina 4b: Monitorování léčby: Relaps



## Porovnání výsledků získaných metodou qPCR a průtokovou cytometrií

Průběh exprese genu MLL-PTD e9e3 během léčby

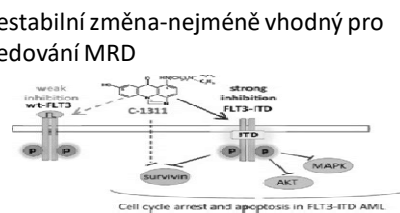
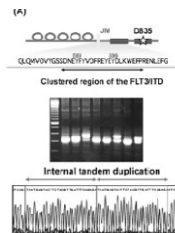


Porovnání s výsledky imunofenotypizace

datum	3.12.2013	6.1.2014	12.5.2014	30.6.2014	1.9.2014	10.11.2014	15.12.2014
qPCR/exprese	pozitivní záchyt	negativní	negativní	Nárůst o 0,5 řádu nástup relapsu	Nárůst o 2 řády relaps	Nárůst o 1 řád relaps	negativní
Průtok. cytometrie	pozitivní	negativní	negativní	negativní	negativní	relaps	negativní

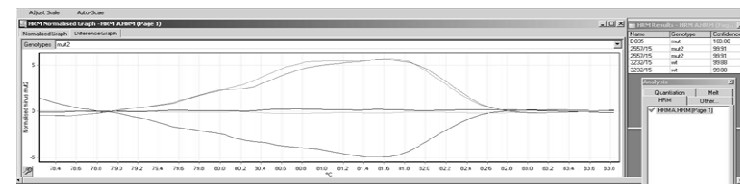
## AML-průkaz III

- FLT3* ITD (vyšetřuje se DNA)
- FMS-like tyrosinkináza 3 = *FLT3*
- ITD = internal tandem dupl.
- nepříznivý prognostický faktor
  - Vyšší riziko relapsu
  - Kratší přežití
  - Nestabilní změna-nejméně vhodný pro sledování MRD



## AML-průkaz IV

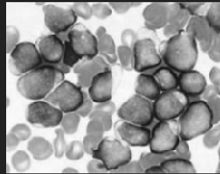
- V případě negativity AML-Plex, *NPM1*, *FLT3* ITD, po domluvě s lékařem prováděna další vyšetření (cena x profit pro pacienta)
  - Expresse WT1
  - Mutace v genech: *CEBPA*, *FLT3* D835, *c-kit*, *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*



## Akutní lymfoblastická leukémie (ALL)

✓ heterogenní skupina onemocnění

20% leukémií u dospělých  
80% všech dětských leukémií  
(1/3 všech pediatrických nádorů)



✓ Nejčastěji postihuje děti ve věku 2-5 let (3-5% kojenci <1 rok věku)

✓ U dospělých incidence mírně stoupá po 50. roku věku.

✓ Nejčastěji leukémie z nezralých prekurzorů B-lymfocytů (BCP ALL)

✓ Méně častá leukémie z prekurzorů nebo zralých T-lymfocytů (T-ALL)

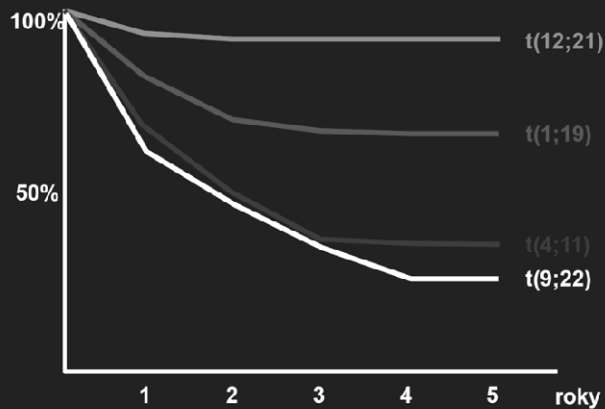
✓ Vzácně leukémie z velmi nezralých prekurzorů krvetvorby před vývojem do lymfatické řady (hybridní leukémie).

## Cytogenetika ALL

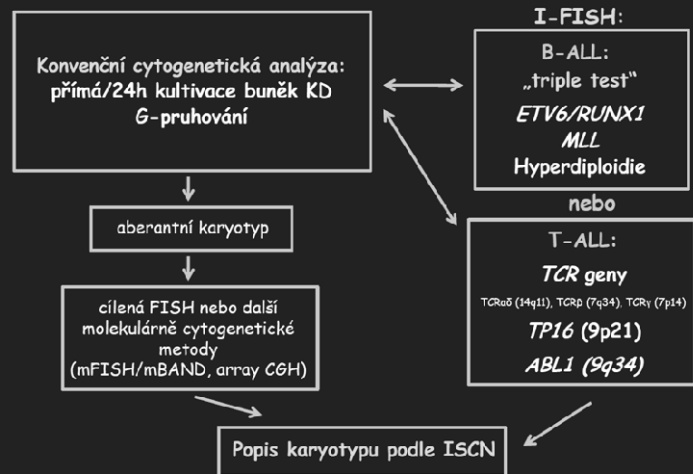
Riziková skupina	Cytogenetický nález
Nízké riziko	vysoká hyperdiploidie (51-55 chromosomů)
	<i>ETV6-RUNX1</i>
Střední riziko	<i>t(1;19)(q23;p13)</i>
	<i>IGH-CESP</i>
	<i>IGH-ID4</i>
	<i>del(6)(q)</i>
	aberrace 9p
	aberrace 11q
	<i>dup(1q)</i>
	-7
	<i>dic(9;20)(p13;q11)</i>
	<i>dic(9;12)(p11-21;p11-13)</i>
jakýkoliv jiná změna	
normální karyotyp	
Vysoké riziko	<i>t(9;22)(q34;q11)</i>
	<i>AMP21</i>
	<i>MLL</i> translokace
	„near“ haploidie (-30 chromosomů)
	nízká hypodiploidie (30-39 chromosomů)
	<i>t(7;19)(q23;p13)</i>
aberrace 17p	
ztráta 13q	

Moorman et al., Lancet Oncol 2010

## Prognostický význam chromosomových aberací u dětských ALL

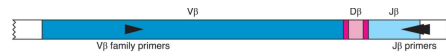
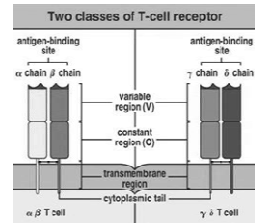


## Akutní lymfoblastická leukémie (ALL)

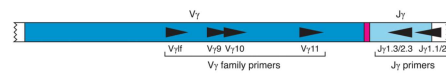
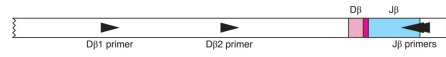


## TCR přestavby

- T- buněčné  
lymfoproliferace



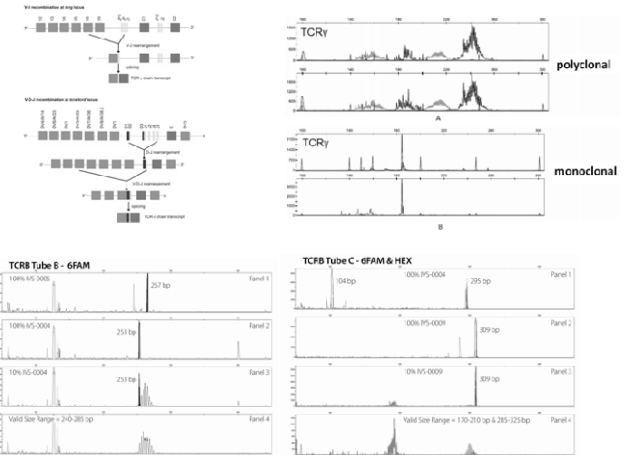
TCRB Tube A: 23 Vβ primers + 6 Jβ1 primers and 3 Jβ2 primers  
TCRB Tube B: 23 Vβ primers + 4 Jβ2 primers  
TCRB Tube C: 2 Dβ primers + 13 Jβ primers



TCRG tube A: Vγ1f and Vγ10 primers + Jγ1.1/2.1 and Jγ1.3/2.3  
TCRG tube B: Vγ9 and Vγ11 primers + Jγ1.1/2.1 and Jγ1.3/2.3

- PCR amplifikace hypervariabilní části genu pro receptory T-lymfocyty
- Multiplex PCR následovaná fragmentační analýzou (FA)

## TCR pomocí fragmentační analýzy

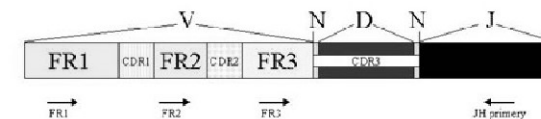


## CLL a myeloma multiplex

- **Chronická lymfocytická leukemie**
- Delece 11q, 13q, 17p a trisomie 12
- TP53 delece nebo mutace před léčbou
- Určení IGHV mutačního stavu
- **Myeloma multiplex**
- TP53 delece a t(4;14)(p16;q32); FGFR3/MMSET-IGH přestavby
- t(14;16)(q32;q23); MAF-IGH přestavby
- Monosomie 14, delece 14q32
- 1p/1q analýza, t(11;14)(q13;q32); CCND1-IGH, t(14;20)(q32;q12); MAFB-IGH, MYC translokace

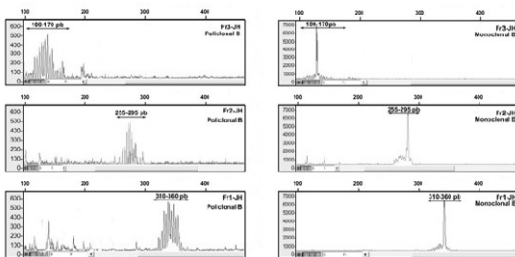
## IGHV přestavby u CLL

- B- chronické lymfocytární leukémie (lymfomy)
- Lehké (IgL) a těžké řetězce (IgH)
- IgH- V (variable), D (diversity), J (joining) + C (konstantní část)
- CDR oblasti- **hypervariabilní úseky** určující komplementaritu, vazebná místa Ag
- **FR1, FR2, FR3** – stálá místa bez mutací => nasednutí primerů PCR



## IgH přestavby

- FA, Sangerovo sekvenování
- NGS
- IMGT



- Klony:
  - polyklon x monoklon
  - mutované x nemutované
  - produktivní x neproduktivní

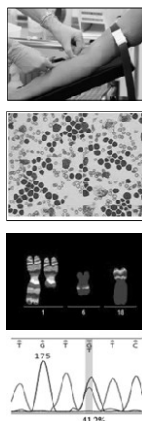
- Monitorování MRD

## Široká paleta vyšetření u B-buněčných lymfomů

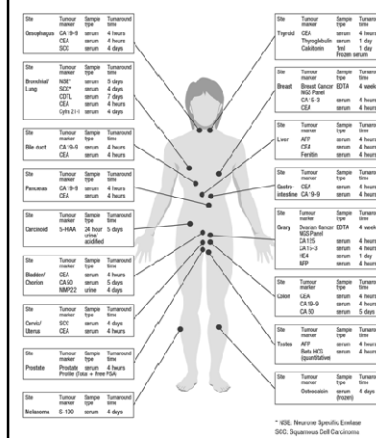
- **B-cell lymfomy**
- Mantle cell lymfom: t(11;14); *CCND1*-*IGH* a *IGK/IGL* a *CCND2&3* varianty.
- Folikulární lymfom: t(14;18); *BCL2*-*IGH* a *IGK/IGL* varianty, *BCL6* přestavby
- Difuzní velkobuněčný B-cell lymfom: *IGH*, *BCL6*, *BCL2* a *MYC* přestavby
- ALK-positivní DLBCL: t(2;17)(p23;q23); *CLTC-ALK*
- Burkittův lymfom: t(8;14); *MYC*-*IGH* a *IGK/IGL* varianty
- T-cell polymocytární leukemie: 14q11 (TRA/D) přestavba
- Anaplastický velkobuněčný lymfom: *ALK* přestavby, hlavně t(2;5)(p23;q35); *ALK-NPM1*,
- *DUSP22-IRF4* přestavby hlavně t(6;7)(p25.3;q32.3) či *TP63* přestavby
- Prognosticky *MYC* přestavby, *BCL2* nebo *BCL6* translokace

## Závěry

- Cytogenetická a molekulárně biologická analýza se stala standardem při vyšetření onkohematologických chorob
- Význam při určení diagnózy, bližšího určení diagnózy a prognózy choroby
- Kombinace různých vyšetřovacích metod umožňuje pochopit komplexnost onkohematologických onemocnění a nevhodnější terapeutický postup
- Umožňují monitorování léčebné odpovědi a reziduální zbytkové choroby
- Cytogenetické metody (modifikace FISH) umožňují určit **komplexní karyotyp** v dané fázi rozvoje/léčby choroby
- Citlivost molekulárně biologických metod (PCR, mikroarray, Sanger, MPS) předurčuje jejich využití pro **záchyt relapsu onemocnění** na molekulární úrovni



## Budoucnost personalizovaných nádorových markerů



- Markery s populačně nízkou senzitivitou (5-30 %), ale s vysokou specifičností (>95 %) se definují individuálně
- Záměr vytvořit unikátní veřejnou databázi zahrnující tisíce tumorových markerů
- Vyšetření na bázi proteomiky, genomiky z krevního biologického vzorku (plasma sérum)
- Volba vhodného markeru (3-5 markerů) podle dynamiky jejich změn po první fázi léčby
- Centralizované laboratoře pro desítky milionů pacientů