



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —



Γ' ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΙ ΟΜΩΝΥΜΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ
ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΚΠΑ, ΓΝΑ «Η ΣΩΤΗΡΙΑ»
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Κ.Ν. ΣΥΡΙΓΟΣ, MD., PhD, FCCP



Κατ'επιλογήν Υποχρεωτικό Μάθημα «Ογκολογία»

Μοριακή Ταυτοποίηση του Καρκίνου

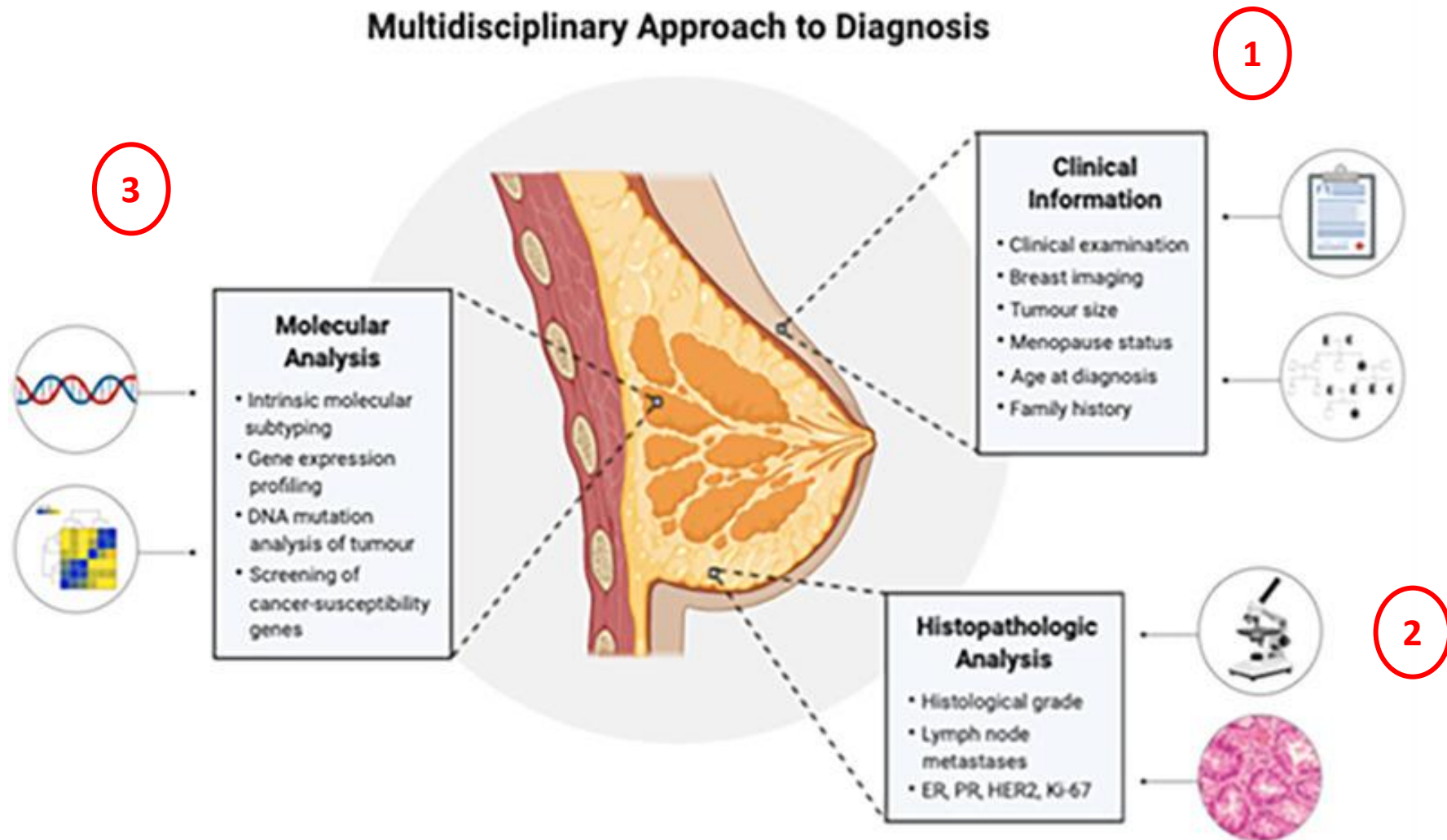
Γεωργία Γομάτου, MD, MSc, PhD

Ειδικευόμενη Ιατρός Παθολογικής Ογκολογίας

ΓΝΑ «Η ΣΩΤΗΡΙΑ»

Μοριακή Ταυτοποίηση του Καρκίνου

Multidisciplinary Approach to Diagnosis



Εφαρμογή μοριακών τεχνικών σε ιστολογικά υλικά

- **Real-time Polymerase Chain Reaction (real time-PCR)**
- **Fluorescent in situ hybridization (FISH) - Chromogen in situ hybridization (CISH)**
- **Next generation sequencing (NGS)**

Real time-PCR

- Δυνατότητα πολλαπλασιασμού μιας αλυσίδας νουκλεϊκών οξέων
- Θέρμανση – αποδιάταξη ελίκων – πτώση θερμοκρασίας – σύνδεση primers με DNA-στοχο – θέρμανση στο σημείο που η DNA pol να εμφανίζει βέλτιστη ενζυμική δραστηριότητα – σύνθεση νουκλεϊκών αλυσίδων

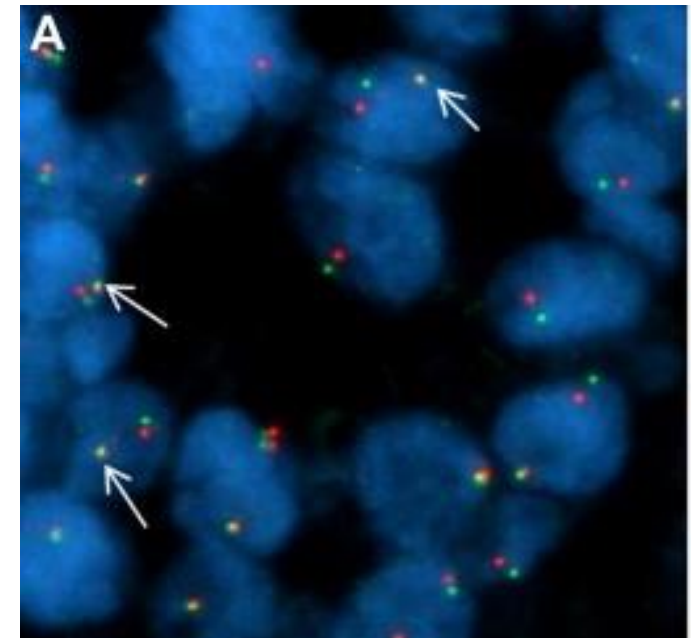
- **Pros:** απλή, γρήγορη, σχετικά χαμηλού κόστους διαδικασία, ειδική, εύκολη ανίχνευση γονιδιακών προϊόντων
- **Cons:** ενίσχυση μίας συγκεκριμένης γενετικής θέσης, προϋποθέτει γονίδια-στόχους με γνωστή αλλά μη αλλοιωμένη δομή

- ✓ Έτοιμοι εκκινητές ολιγονουκλεοτιδικών αλληλουχιών (**primers**)
- ✓ Ένα μίγμα τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (**dATP, dCTP, dGTP, dTTP**)
- ✓ Μια θερμοανθεκτική **DNA** πολυμεράση

Real-Time (ή quantitative) : ταυτόχρονη (real time) μέτρηση της συγκέντρωσης του παραγόμενου DNA, παρέχοντας έτσι πληροφορίες σχετικά με την αρχική ποσότητα του μελετώμενου γονιδιακού τμήματος

Fluorescent in situ hybridization (FISH)

- Σύνδεση (υβριδισμός) σημασμένων (fluorescently labeled) ανιχνευτών με συγκεκριμένες DNA περιοχές ενδιαφέροντος
- Μεγάλο μέγεθος των χρησιμοποιούμενων ανιχνευτών (της τάξης των 100-200 kb)
- Ύπαρξη δομικών ή αριθμητικών χρωσωμικών ανωμαλιών
- Δεν είναι ευαίσθητη για την ανίχνευση μοριακών διαταραχών της τάξης μεγέθους κάτω των 20 kb (πχ. τροποποιήσεις μεμονωμένων νουκλεοτιδίων)
- Εφαρμόζεται σε συμβατικό παθολογικό ιστό – προβληματική εφαρμογή σε οστίτη ιστό

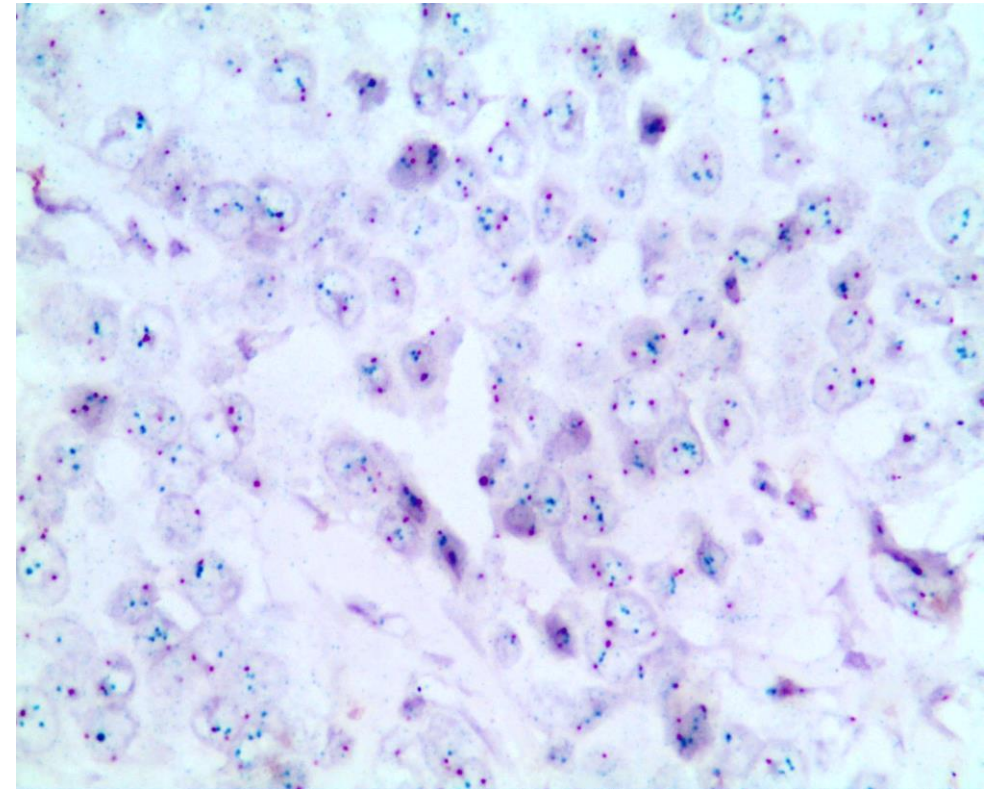


Παραδείγματα εφαρμογής FISH στην ογκολογική ιστοπαθολογία

Τύπος μοριακής διαταραχής	Τύπος νεοπλασματος	Μοριακή διαταραχή
Διαγραφές γονιδίων	ολιγοδενδρογλοίωμα	1p-, 19q-
	ουροθηλιακό καρκίνωμα	+3, 7, 17; 9p-
	καρκίνος πνεύμονα	+7p, 8q, 5p, 6
	προστατικό αδenoκαρκίνωμα	8p-, 8q+
	μηνιγγίωμα	NF2 (22q-)
Ενίσχυση γονιδίων	αδenoκαρκίνωμα μαστού	HER2/neu
	νευροβλάστωμα	N-myc
	μυελοβλάστωμα	MYCN, c-myc
	αδenoκαρκίνωμα στομάχου	HER2/neu
Διαμετάθεση	σάρκωμα Ewing/PNET	EWS/FLI1, EWS-BA
	συνοβιακό σάρκωμα	SYT-SSX, SYT-BA
	λεμφοζιδιακό λέμφωμα	IGH/BCL2
	λέμφωμα Burkitt	Myc-IGH, MYC-BA
	λέμφωμα μανδύα	IGH-CCND1
	χρόνια μυελογενής λευχαιμία	BCR-ABL
	κυψελιδικό ραβδομυοσάρκωμα	PAX3-FKHR, FKHR-BA
	λιποσάρκωμα	MDM2, CDK4

Χρωμογόνος *in situ* υβριδισμός (CISH)

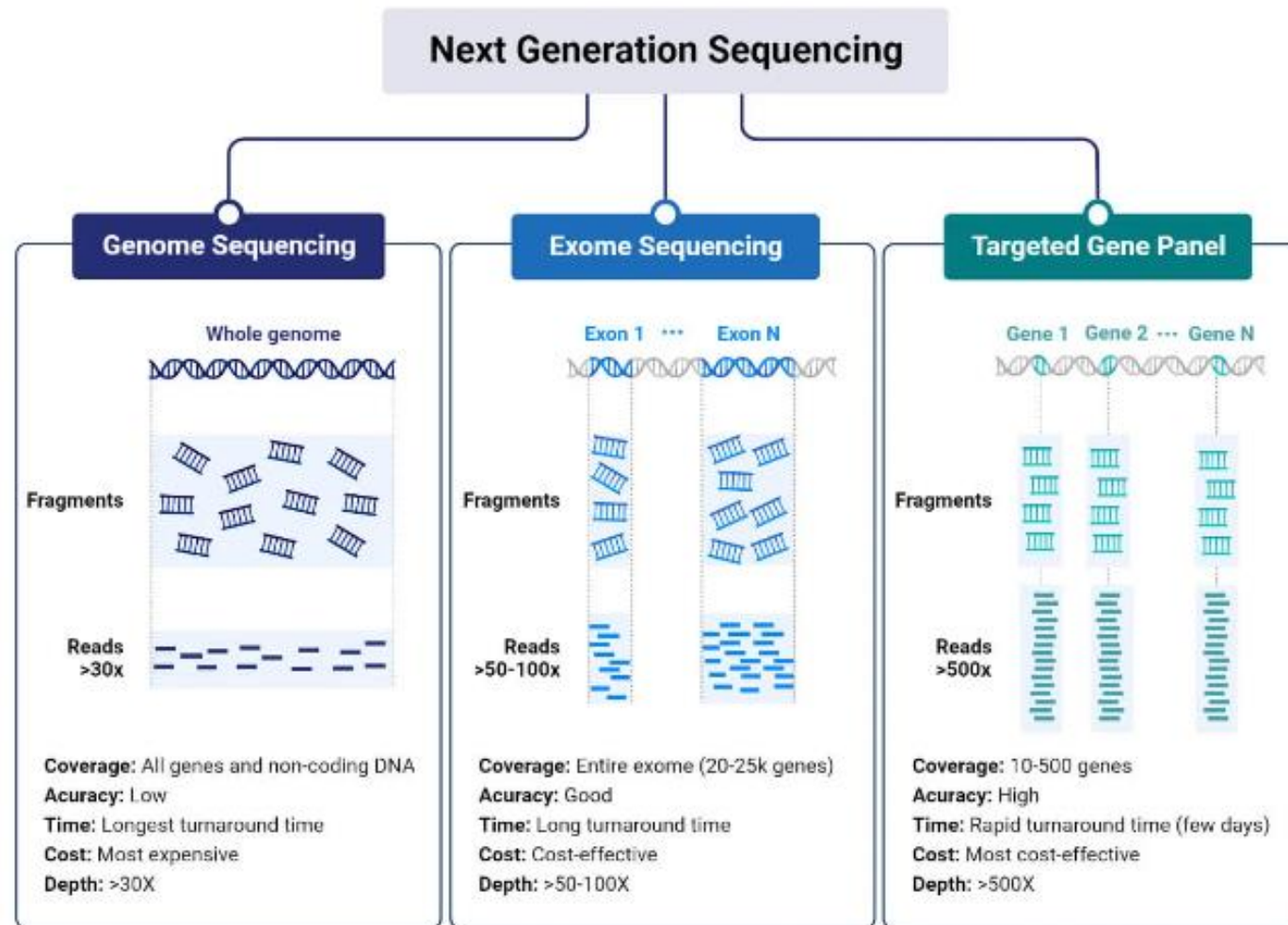
- Η διαφορά από την μέθοδο FISH είναι ότι η CISH ακολουθεί τη μεθοδολογία της ανοσοϊστοχημείας για την ανίχνευση του προϊόντος της αντίδρασης υβριδισμού, δηλαδή την μελέτη χρωμογόνου σήματος σε επίπεδο φωτονικού μικροσκοπίου.
- Χρωματική σήμανση με διγοξιγενίνη, βιοτίνη-στρεπταβιδίνη ή διαμινοβενζιδίνη, διαδικασία παρόμοια με αυτή που ακολουθείται στην ανοσοϊστοχημεία.



Μελέτη της ενίσχυσης του γονιδίου HER2 σε κύτταρα αδenoκαρκινώματος του μαστού (με πράσινο χρώμα οι αθροίσεις της ογκοπρωτεΐνης HER2 και με κόκκινο χρώμα το χρωμόσωμα 17)

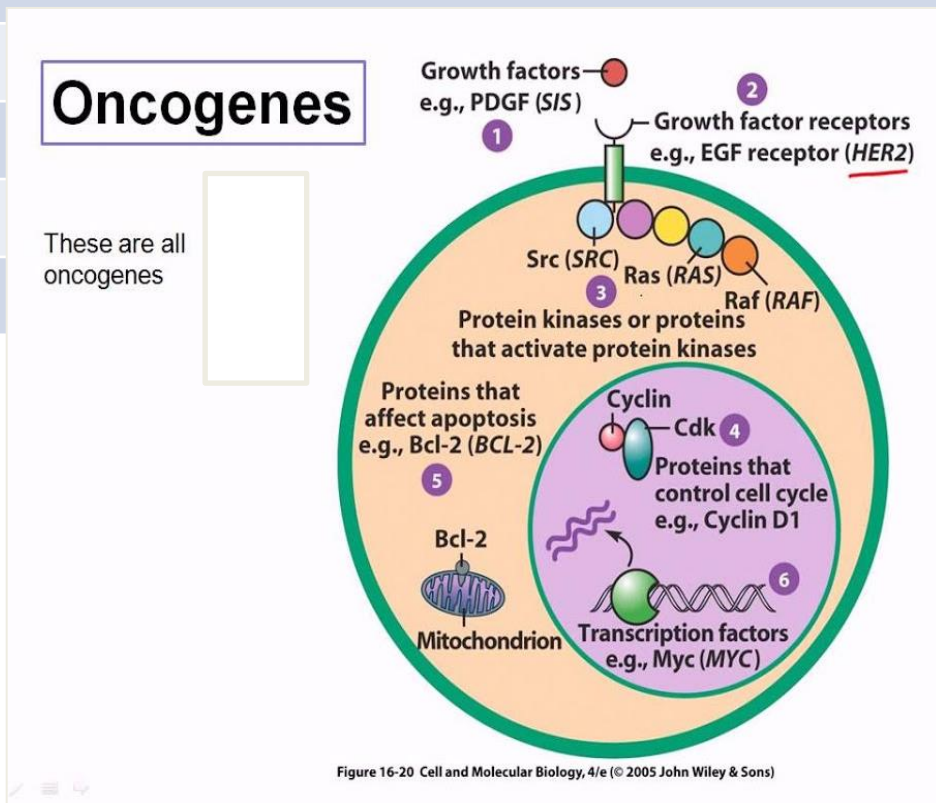
Next-generation sequencing (NGS)

- Η ταυτόχρονη και ευρεία αλληλούχιση πολλαπλών γονιδιακών στόχων με υψηλή ακρίβεια



Παραδείγματα ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων

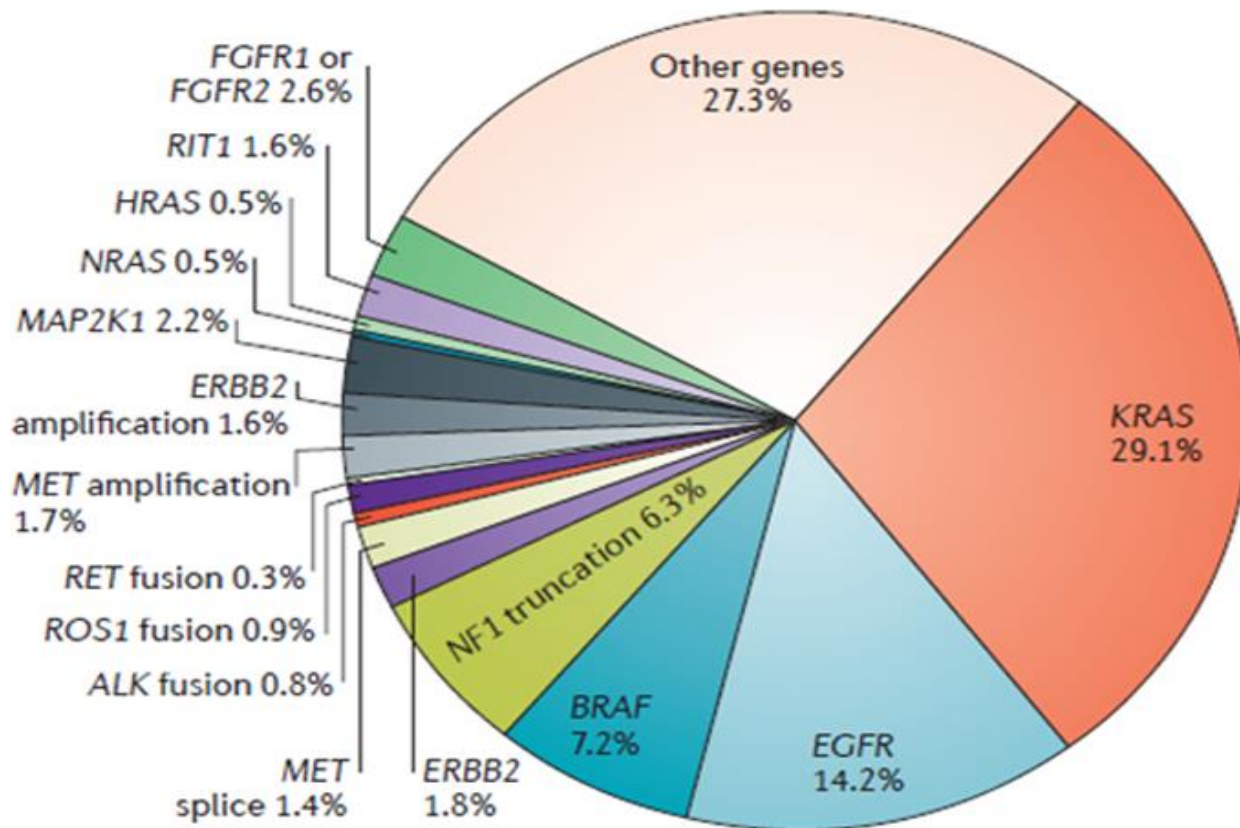
Ογκογονίδια	Ογκοκατασταλτικά γονίδια
HER/neu	BRCA1, BRCA1
KRAS	p53
NRAS	pRb
BRAF	PTEN
MET	PARP
AKT1	APC
CTNNB1	INK4



**Παραδείγματα
εφαρμογών μοριακών τεχνικών
στην κλινική πράξη της ογκολογίας**

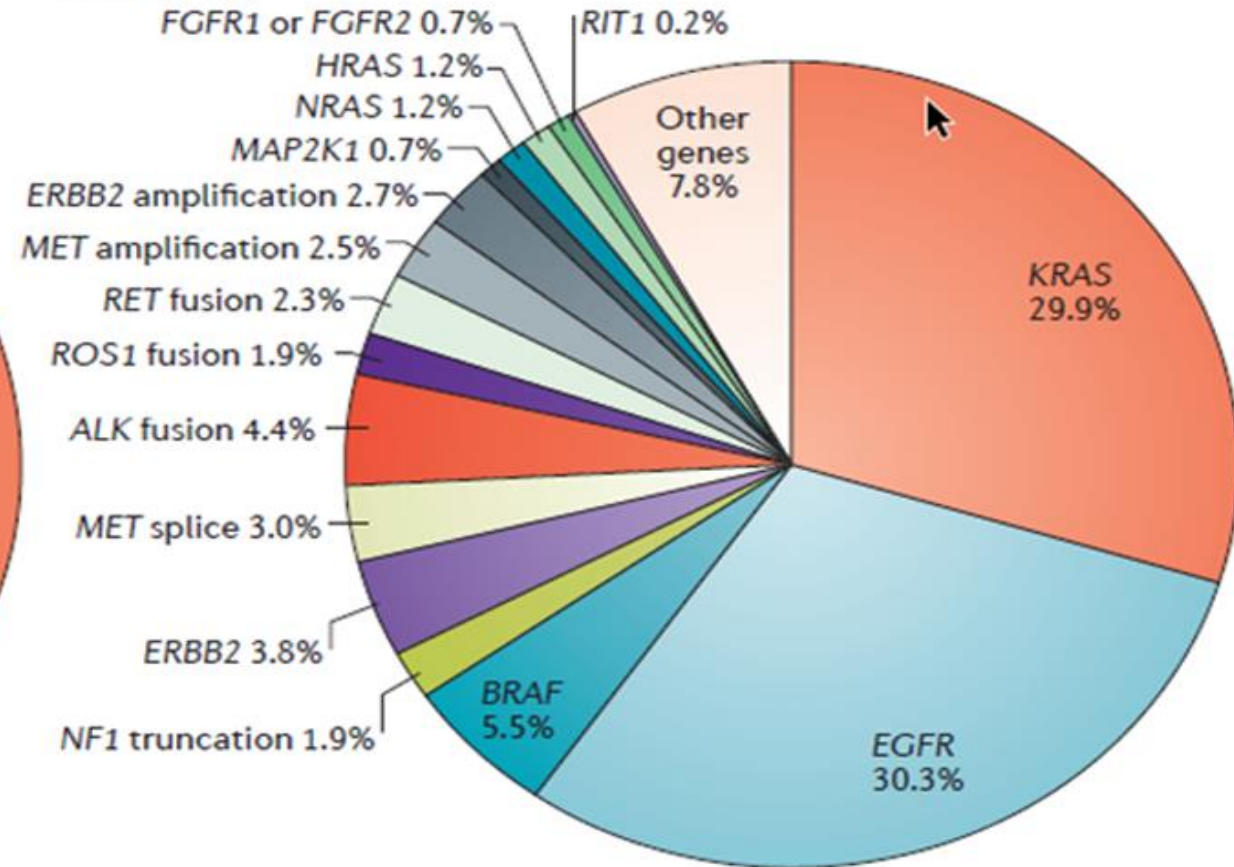
Καρκίνος Πνεύμονα

a Early stage



Data from TCGA (Sanchez-Vega et al.¹⁷⁸, Ellrott et al.¹⁷⁹ and Hoadley et al.¹⁰⁰), Imielinski et al.⁶² and Kadara et al.¹³³ (n = 741)

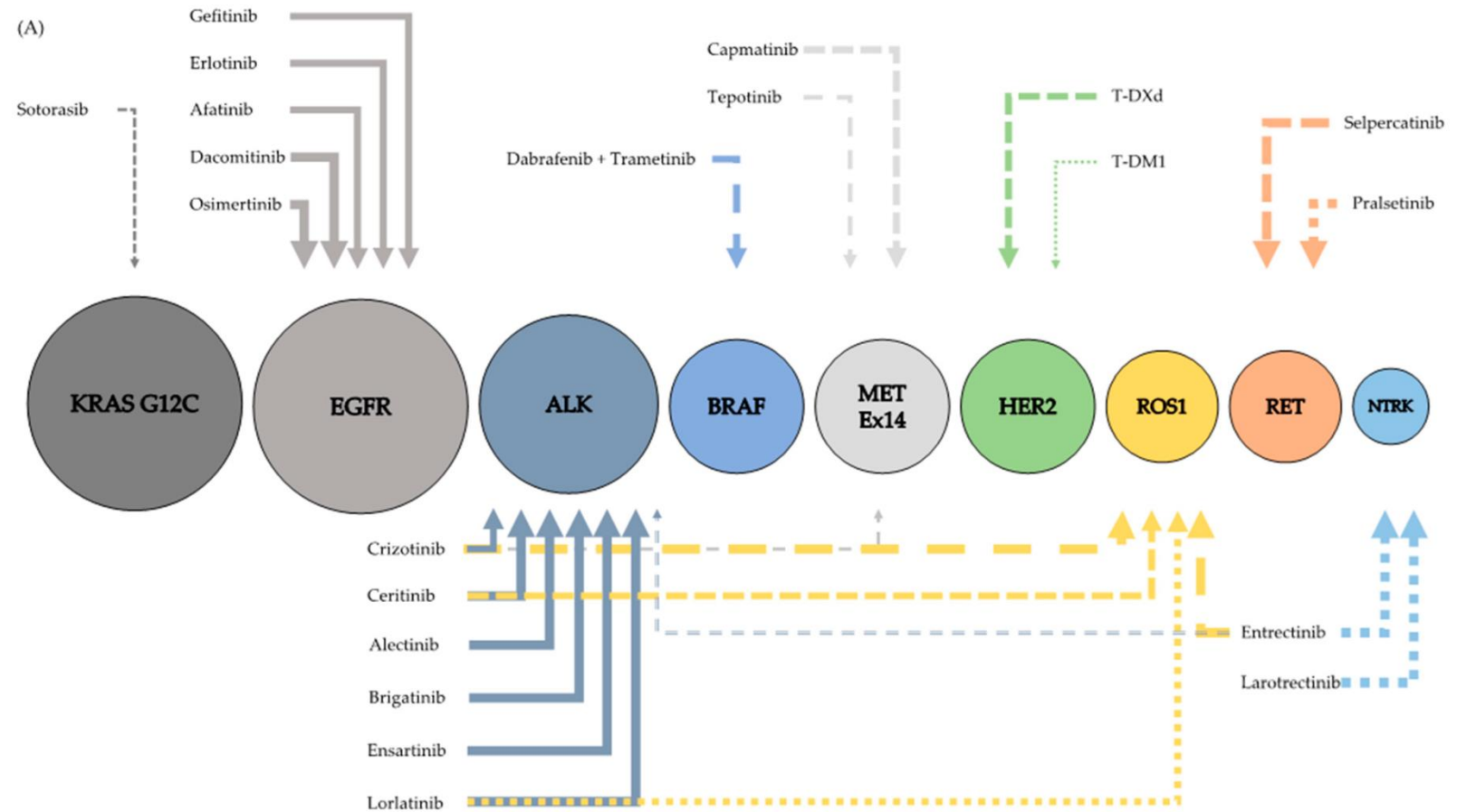
b Metastatic



Data from MSK-IMPACT (Jordan et al.⁵⁹) and FoundationOne (Frampton et al.¹⁵) panels (n = 5262)

Καρκίνος Πνεύμονα

Γιατί αναζητούμε τις συγκεκριμένες γενετικές αλλαγές στον καρκίνο του πνεύμονα;



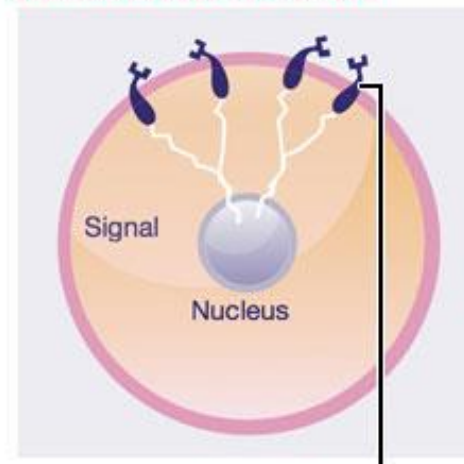
Θεραπευτικές επιλογές
στοχεύουσας θεραπείας!



Καρκίνος Μαστού

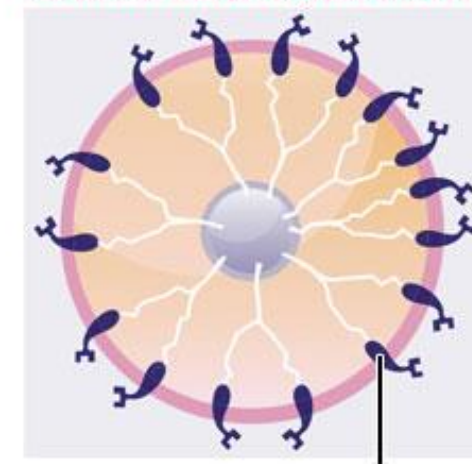
Αναζήτηση υπερέκφρασης υποδοχέα **HER2**
Ανοσοϊστοχημεία και επί ενδείξεων FISH/CISH

Normal breast cancer cell



Normal amount of HER2 receptors send signals telling cells to grow and divide.¹

Abnormal HER2+ breast cancer cell



Too many HER2 receptors send more signals, causing cells to grow too quickly.¹

Αναζήτηση μεταλλάξεων αντίστασης στον ορμονοθεραπεία (ESR1, PIK3CA)

Επί ενδείξεων γονιδιακός έλεγχος για κληρονομικό καρκίνο μαστού

Καρκίνος Μάστου – Γονιδιακές υπογραφές

NGS tests με panel γονιδίων που γίνονται στο ιστολογικό υλικό του όγκου και έχουν προγνωστική και προβλεπτική αξία για τη χορήγηση adjuvant χημειοθεραπείας

EARLY HR+/HER2- BC PATIENTS

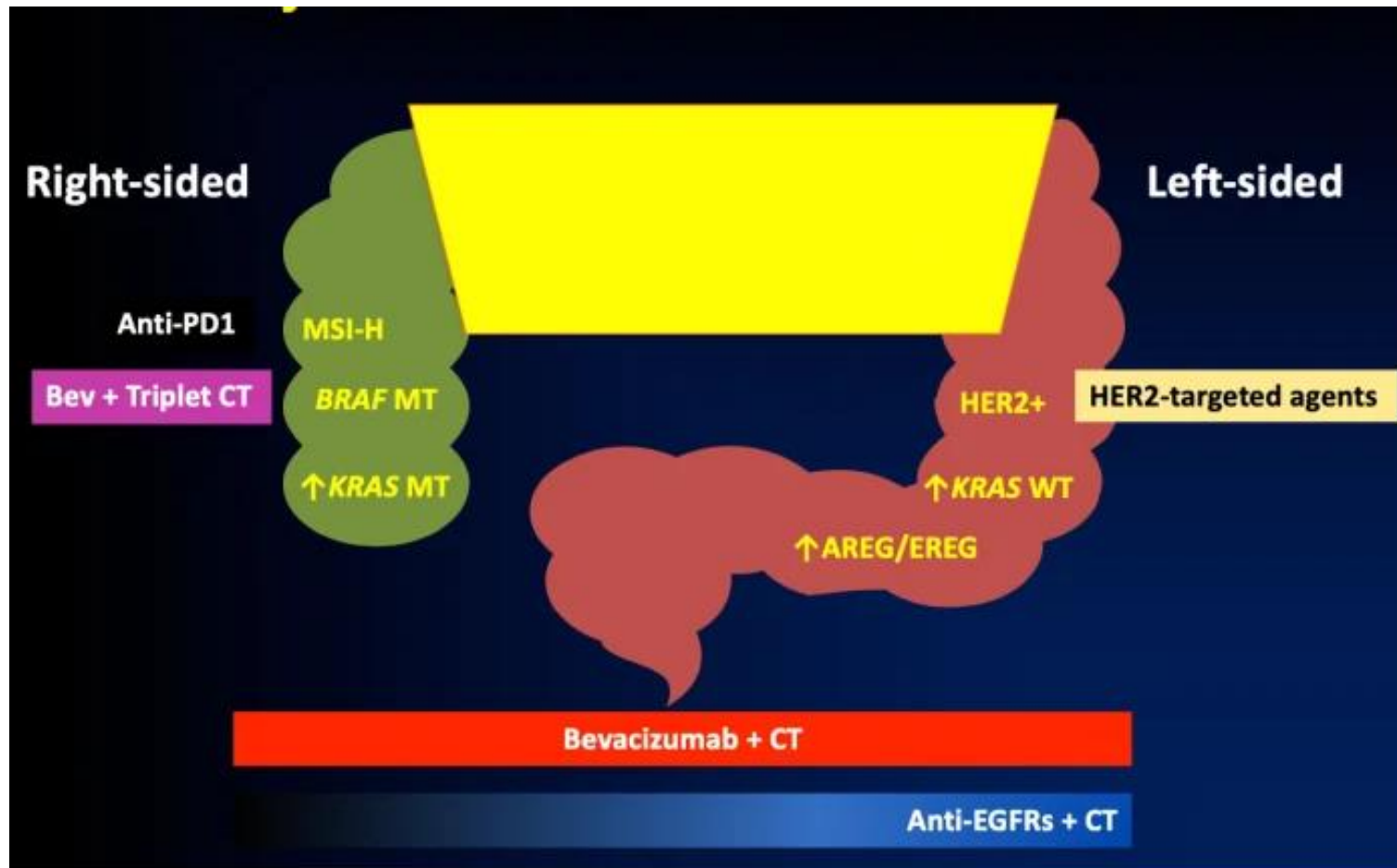


100 BC pts
20% HER2+ BC
15% TN BC

65 HR+/HER2- BC pts candidate to HT
5% ≥ 4 node positive
2-3% too frail for CT

50 HR+/HER2- BC patients
potentially candidate CT + HT
(5 years or more)

Καρκίνος Παχέος εντέρου

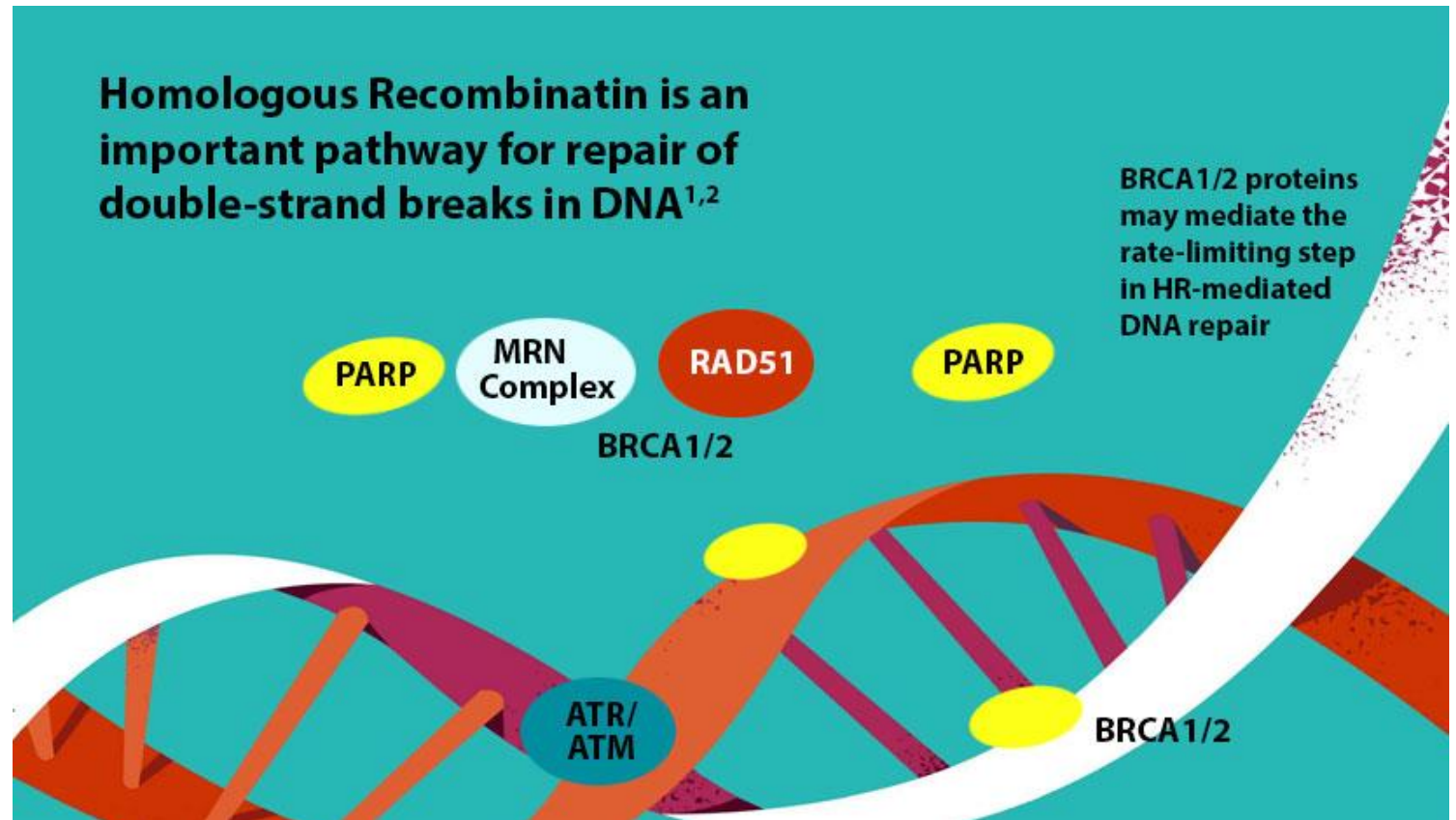


Καρκίνος ωοθηκών

Ενδείκνυται ο έλεγχος για
Homologous Recombination
Deficiency (HRD) με NGS panel

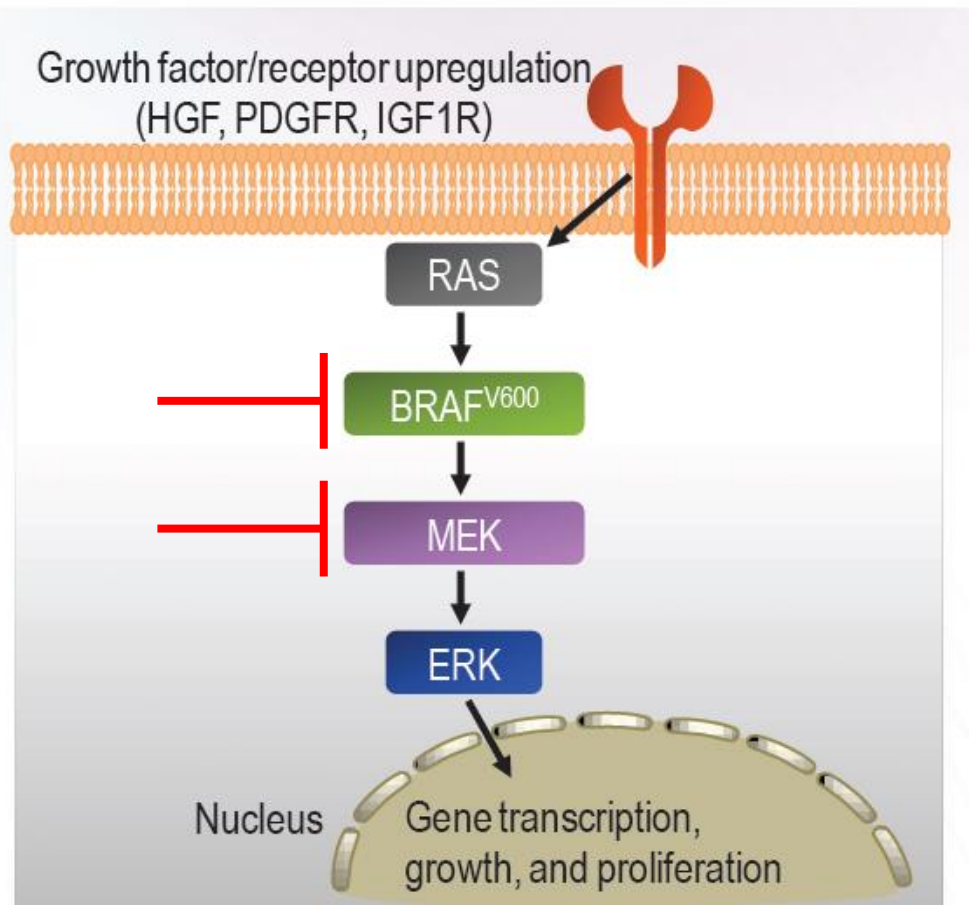
- 48% - 50% HRD+ (περίπου το 50%
εξ'αυτών είναι BRCA (+))
- 50-52% HRD (-)

Σε αυτές τις περιπτώσεις
ενδείκνυται η χορήγηση
PARP inhibitor



Μελάνωμα

Figure 1 MAPK Signaling Is Constitutively Activated, with Nearly Half of All Melanomas Harboring V600 Mutations in *BRAF*

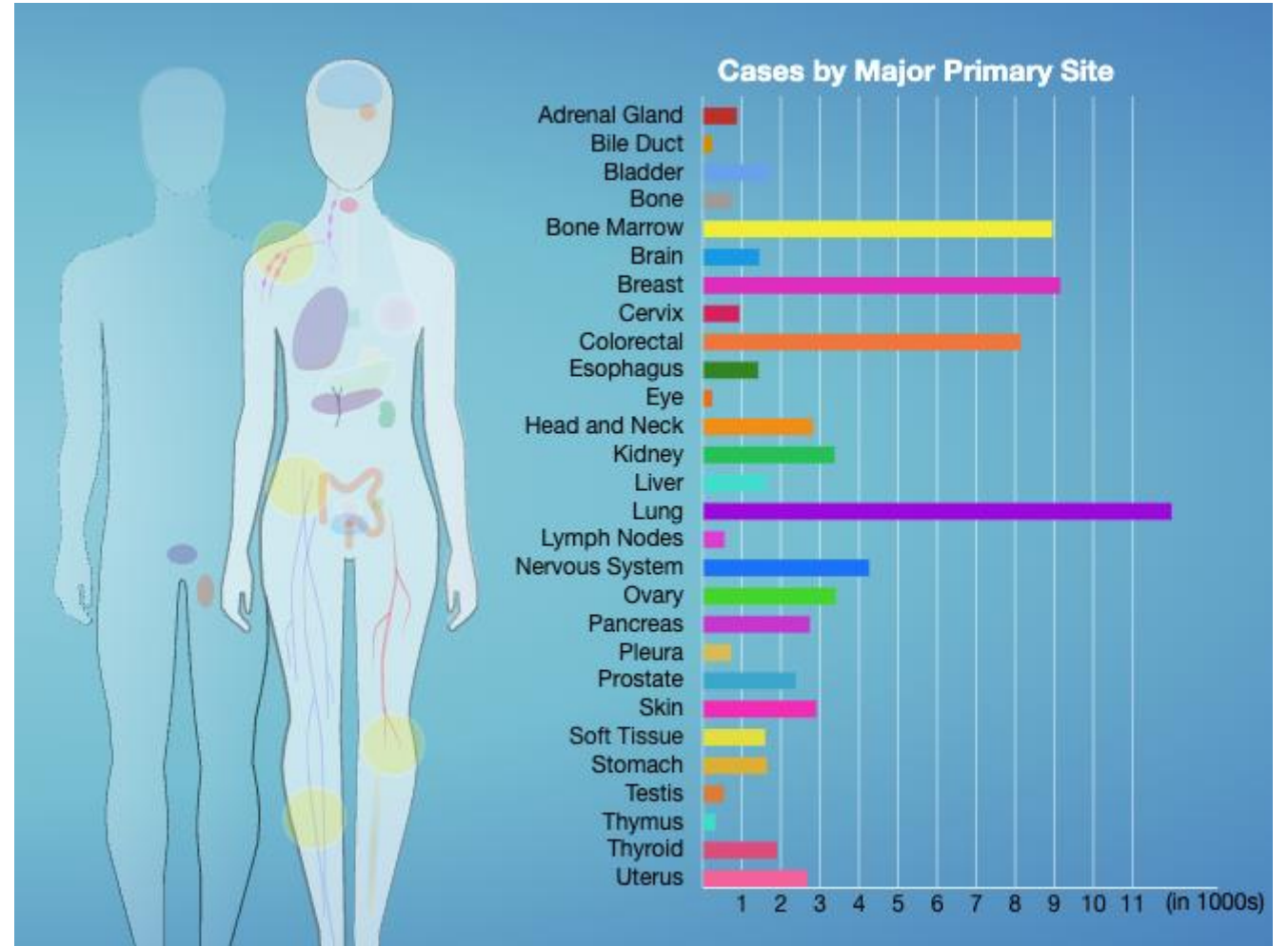


BRAF/MEK combinations

- Dabrafenib/Trametinib
- Vemurafenib/Cobimetinib
- Encorafenib/Binimetinib

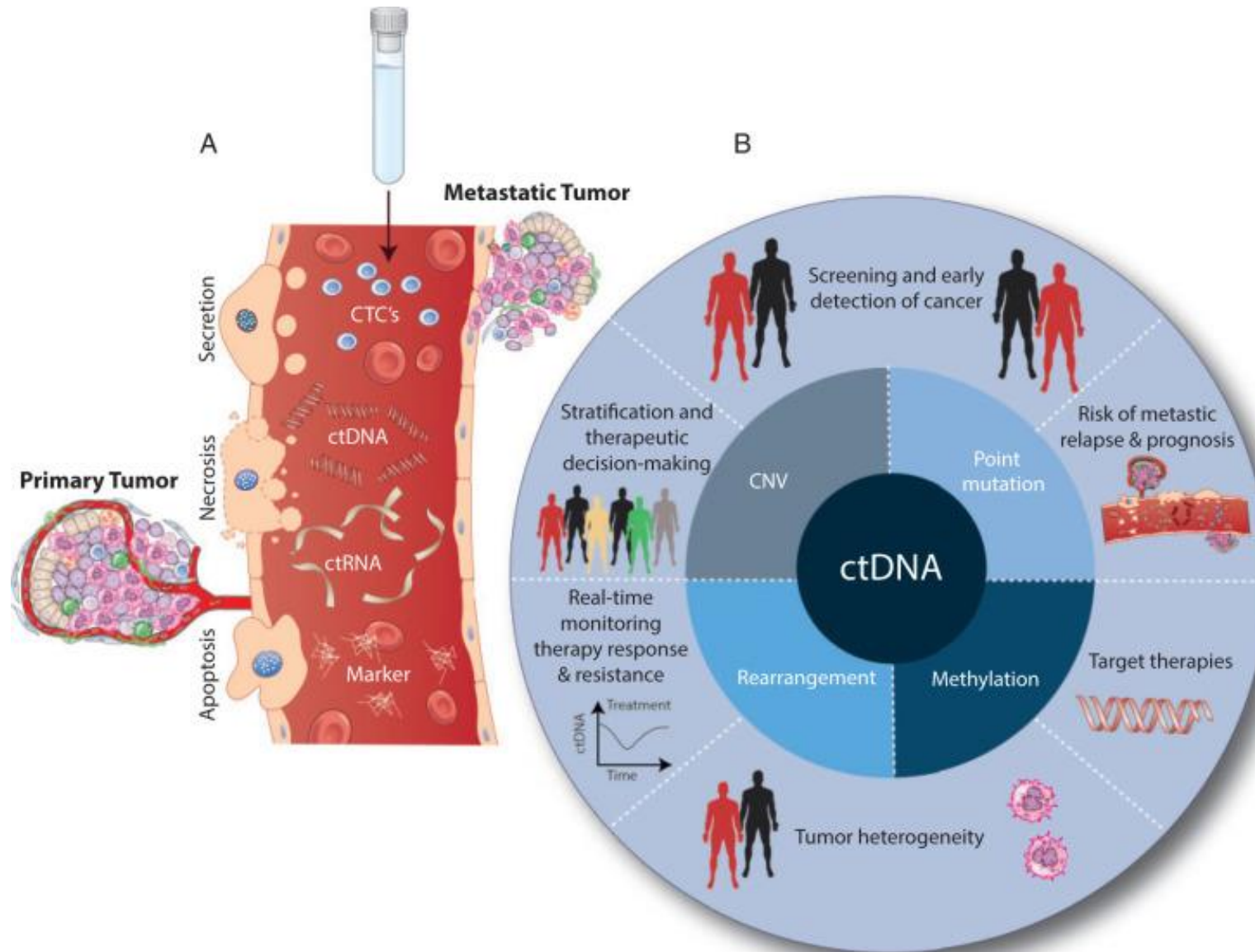
Μοριακή Ταυτοποίηση – Genomic Studies

- The Cancer Genome Atlas (TCGA)
- The International Cancer Genome Consortium (ICGC)



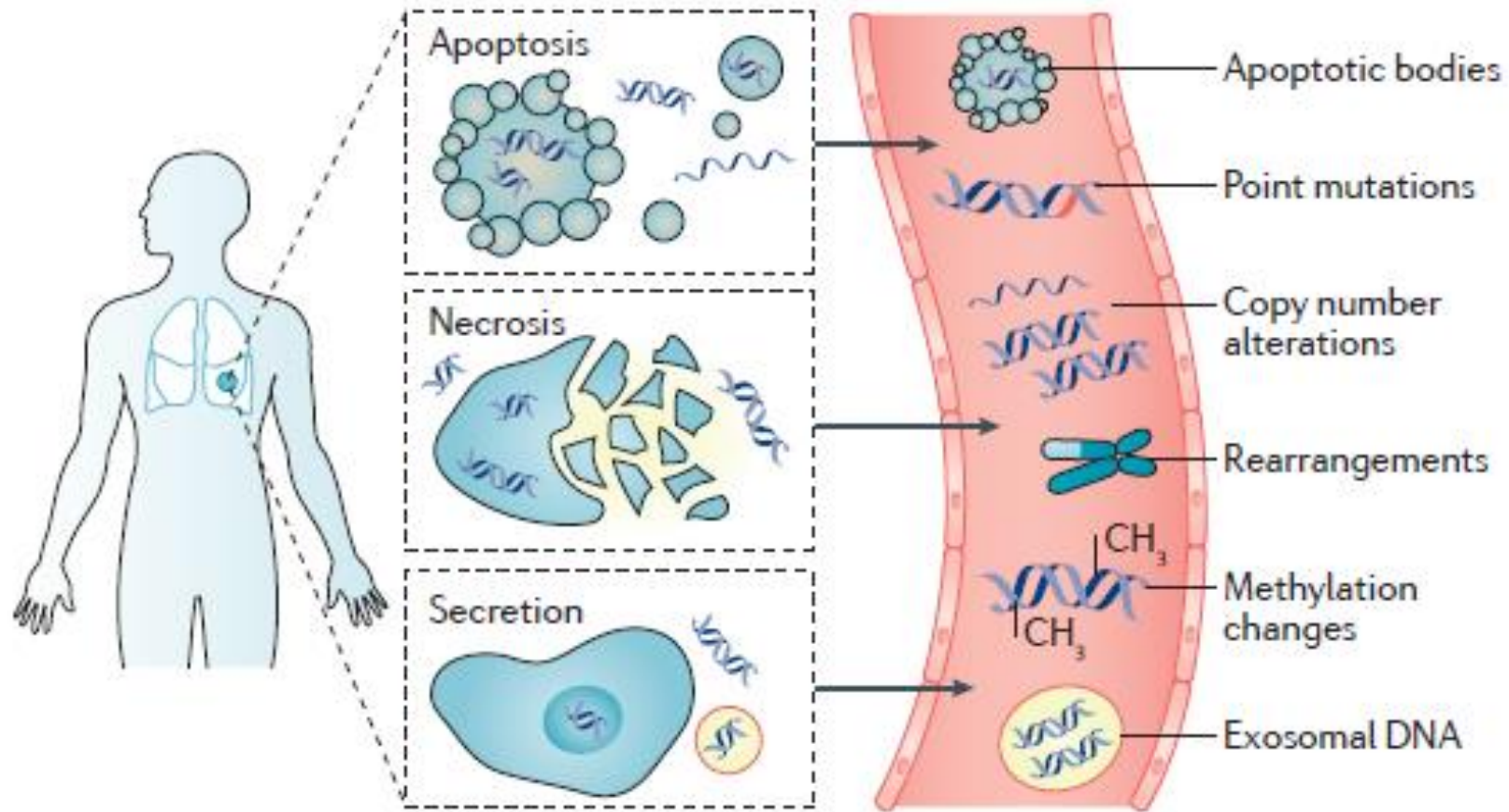
Υγρή βιοψία

Υγρή βιοψία

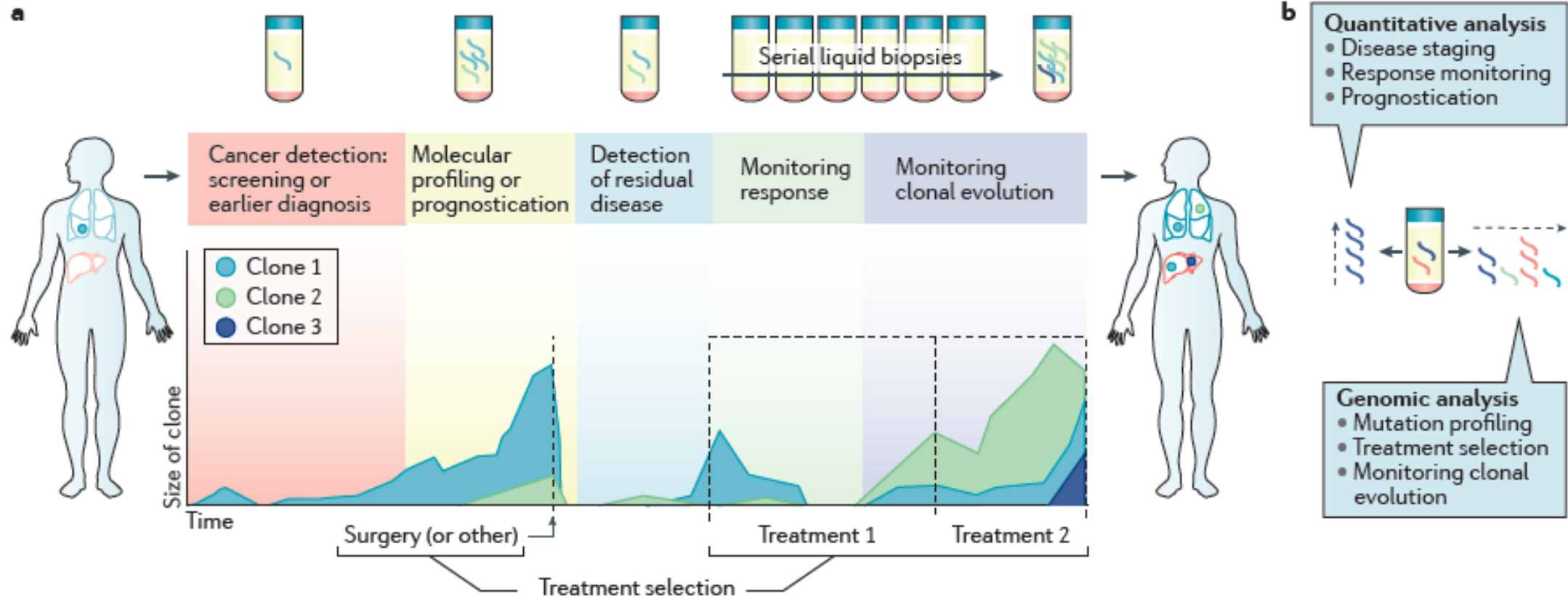


- **Circulating Tumor Cells (CTCs)**
- **cell-free DNA (cfDNA) - circulating tumor DNA (ctDNA)**
- **cell-free RNA (mRNA and microRNAs)**
- **Extracellular vesicles (exosomes)**

Υγρή βιοψία – μοριακή ταυτοποίηση

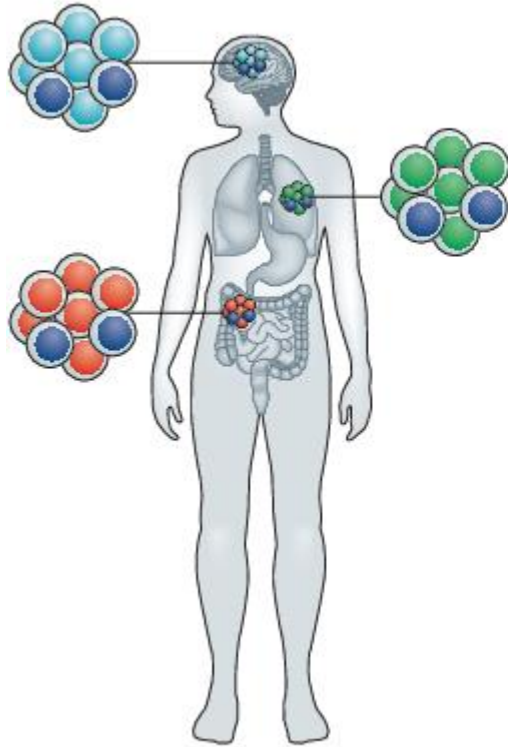


Υγρή βιοψία

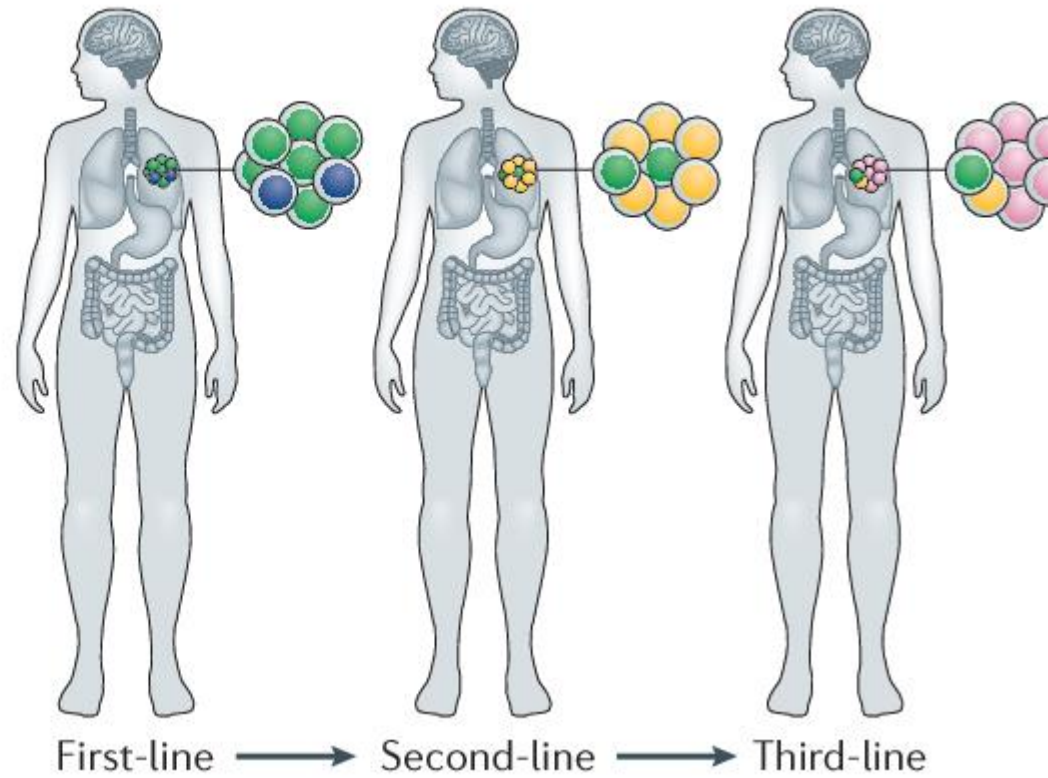


Ετερογένεια του καρκίνου

a Spatial heterogeneity



b Temporal heterogeneity



Συμπεράσματα

- Η μοριακή ταυτοποίηση των νεοπλασμάτων είναι αναπόσπαστο τμήμα της σύγχρονης ογκολογίας
- Παρέχει διαγνωστικές, προγνωστικές, προβλεπτικές πληροφορίες
- Απαραίτητη η γνώση των μοριακών τεχνικών
- Αναγκαιότητα η συνεχής ενημέρωση σε ένα διαρκώς εξελισσόμενο πεδίο



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —



Γ' ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΙ ΟΜΩΝΥΜΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ
ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΚΠΑ, ΓΝΑ «Η ΣΩΤΗΡΙΑ»
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Κ.Ν. ΣΥΡΙΓΟΣ, MD., PhD, FCCP



**Ευχαριστώ πολύ για
την προσοχή σας!**



**KEEP
CALM
AND
LOVE
ONCOLOGY**