

**Andrzej Tysarowski¹, Dariusz Kowalski², Oksana Kowalczyk³, Lech Chyczewski³,
 Ewelina Antoszewska⁴, Janusz Limon⁴, Artur Kowalik⁵, Stanisław Gózdź⁶, Paweł Krawczyk⁷,
 Łukasz Łączmański⁸, Anna Szumera-Ciećkiewicz⁹, Włodzimierz P. Olszewski⁹,
 Maciej Krzakowski², Janusz A. Siedlecki¹**

¹Zakład Biologii Molekularnej, Centrum Onkologii — Instytut w Warszawie

²Klinika Nowotworów Płuca i Klatki Piersiowej, Centrum Onkologii — Instytut w Warszawie

³Zakład Klinicznej Biologii Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

⁴Katedra i Zakład Biologii i Genetyki Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku

⁵Pracownia Diagnostyki Molekularnej Świętokrzyskiego Centrum Onkologii w Kielcach

⁶Dział Chemioterapii i Onkologii Klinicznej Świętokrzyskiego Centrum Onkologii w Kielcach

⁷Pracownia Immunologii i Genetyki Katedry i Kliniki Pneumonologii, Onkologii i Alergologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

⁸NZOZ GeneSys we Wrocławiu

⁹Zakład Patologii, Centrum Onkologii — Instytut w Warszawie

Walidacja wybranych ośrodków zaangażowanych w diagnostykę molekularną chorób nowotworowych w zakresie oznaczania mutacji w genie *EGFR1*

Validation of selected medical centers involved in molecular diagnostics of cancer in the field of *EGFR1* mutations determination

Adres do korespondencji:

Prof. dr hab. med. Janusz A. Siedlecki

Zakład Biologii Molekularnej

Centrum Onkologii — Instytut

ul. Roentgena 5, 02-781 Warszawa

e-mail: jas@coi.waw.pl

STRESZCZENIE

Rak płuca to jeden najczęściej występujących nowotworów złośliwych w Polsce i na świecie. Według danych statystycznych rocznie jest przyczyną zgonów 1,3 miliona osób na całym świecie. W niedrobnokomórkowym raku płuc (NDRP) u niektórych chorych (10–15% Ameryka Północna i Europa Zachodnia; 30–35% Japonia i Wschodnia część Azji) występują mutacje somatyczne w genie receptora nabłonkowego czynnika wzrostu (*EGFR*) powodujące stałą aktywność tego receptora. Występowanie takich mutacji ściśle wiąże się ze skutecznością działania niektórych inhibitorów kinazy tyrozynowej (TKI). Określenie statusu genu *EGFR* jest kluczowe w doborze najbardziej odpowiedniego schematu leczenia chorych z NDRP. Celem tej pracy jest wykazanie, czy ośrodki zaangażowane w diagnostykę molekularną chorób nowotworowych posiadają odpowiedni potencjał, aby skutecznie przeprowadzić analizę statusu genu *EGFR1* w zakresie zmian w eksonach 19. i 21. Dodatkowym celem jest wypracowanie odpowiednich standardów postępowania.

Wynikiem przeprowadzonego procesu walidacji są następujące zalecenia dla laboratoriów diagnostycznych: 1. Materiał do izolacji DNA powinien zawierać nie mniej niż 50% utkania nowotworowego; 2. Ujednolicenie procedury izolacji DNA ze skrawków parafinowych wymaga stosowania gotowego zestawu do izolacji DNA; 3. W przypadku braku jednoznacznego wyniku, powinno się wykorzystać dwie metody oznaczania mutacji, zaleca się, aby jednego z wykonywanych oznaczeń dokonać przy wykorzystaniu metody sekwencjonowania bezpośredniego; 4. Zaleca się rozszerzenie panelu analizowanych eksonów do 18., 19., 20. i 21.; 5. Od momentu wypisania skierowania na badanie diagnostyczne do momentu przekazania wyniku badania nie powinno upłynąć więcej niż 10 dni roboczych.

Słowa kluczowe: rak płuca, mutacje *EGFR*, status *EGFR*, gefitinib, terapia celowana, diagnostyka molekularna

Onkologia w Praktyce Klinicznej

2011, tom 7, nr 3, 138–145

Copyright © 2011 Via Medica

ISSN 1734-3542

www.opk.viamedica.pl

ABSTRACT

Lung cancer is one of the most common cancers in Poland and abroad. According to statistics, it causes the death of 1.3 million people per year worldwide. In a nonsmall cell lung cancer (NSCLC), some patients have somatic mutations in the gene for epidermal growth factor receptor (*EGFR*), resulting in a constant activity of this receptor (10–15% patients of North American and Western European origin, and 30–35% of patients from Japan and Eastern Asia). The occurrence of such mutations is closely associated with efficacy of tyrosine kinase inhibitors (TKI). Thus, determination of *EGFR* status is crucial in selecting the most appropriate treatment of patients with NSCLC.

The aim of this paper is to show whether the laboratories involved in molecular diagnostics for cancer have the potential to effectively determinate the mutation status (in exons 19 and 21) of the *EGFR1* gene. An additional objective is to develop appropriate standards for mutation testing in non-small cell lung cancer. As the result of validation process conducted in the study, the following recommendations for diagnostic laboratories were approved: 1. At least 50% of cancer cells should be present in a tissue for DNA isolation; 2. The method of DNA isolation should be standardized, the most appropriate is usage of DNA isolation kits; 3. In case of equivocal results two independent molecular methods should be employed, one of them should be direct sequencing; 4. It is recommended to extend the panel of analyzed exons to 18, 19, 20 and 21; 5. The turnaround time (TAT) should not take more than 10 working days.

Key words: lung cancer, *EGFR* mutations, *EGFR* mutational status, targeted therapy, molecular diagnostic

Onkol. Prak. Klin. 2011; 7, 3: 138–145

Wstęp

Cechą charakterystyczną komórek nowotworowych jest zaburzenie równowagi w mechanizmach rządzących proliferacją [1]. Jest ono wynikiem akumulacji zmian w genomie komórki. W prawidłowo funkcjonującej komórce proliferacja jest pod kontrolą trzech głównych szlaków. W komórkach nabłonkowych głównym regulatorem proliferacji jest ścieżka EGFR/RAS/RAF/MAP/ERK. Jej zaburzenie prowadzi nie tylko do niekontrolowanego rozrostu, ale także do zahamowania procesu apoptozy oraz nabycia przez komórki nowotworowe zdolności do rozprzestrzeniania się po organizmie i zasiedlania nowych obszarów zajmowanych normalnie przez inne typy komórek. Jedną z obecnie stosowanych metod terapii jest wykorzystanie leków, które w swoim założeniu powinny przywracać kontrolę nad proliferacją. Do nich zalicza się inhibitory aktywności EGFR1. Białko to jest błonowym receptorem należącym do rodziny receptorów naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR, *epidermal growth factor receptor*) [2]. Rodzina ta składa się z czterech białek EGFR1, 2, 3 i 4 (inne nazwy dla tych receptorów to: HER1, 2, 3 i 4 lub ERB B1, 2, 3 i 4). Receptor, łącząc się z ligandem, ulega dimeryzacji, co z kolei powoduje zmianę konformacji receptora i wzajemną autofosforylację przekształcającą receptor w aktywną funkcjonalnie kinazę tyrozynową. W wyniku dimeryzacji mogą powstać zarówno homodimery, jak i heterodimery. Dodając do tego fakt, że receptory mogą być aktywowane przez kilka różnych ligandów: naskórkowy czynnik wzrostu (EGF, *epidermal growth factor*), transformujący czynnik wzrostu beta ($TGF\beta$, *transforming growth factor*

beta), nabłonkowy czynnik wzrostu wiążący heparany (HB-EGF, *heparin binding epithelial growth factor*) amfireguliny, hereguliny, neureguliny, betaceluliny to okazuje się, że jest to potężna sieć informacyjna napędzająca proliferację [2, 3]. Stosowane obecnie inhibitory EGFR1 można podzielić na dwie grupy. Do pierwszej zalicza się przeciwciała monoklonalne, takie jak cetuksymab czy panitumumab. Wiążą się one z zewnątrzkomórkową domeną EGFR1 w obszarze wiązania liganda, uniemożliwiając utworzenie funkcjonalnego dimeru zdolnego do przyłączenia liganda [4]. To z kolei oznacza, że zablokowana zostaje możliwość aktywacji kinazowej funkcji receptora, przez co jest on niezdolny do aktywacji (fosforylacji) białek efektorowych. W sumie oznacza to zahamowanie przekazywania sygnału. Do drugiej grupy inhibitorów zalicza się drobnocząsteczkowe związki, takie jak erlotynib czy gefitynib. Leki te, łącząc się ze znajdującą się w części cytoplazmatycznej aktywnością ATPazową receptora, konkurują z cząsteczką ATP o miejsce wiązania w centrum katalitycznej aktywności kinazy tyrozynowej EGFR1. Blokowanie dostępu dla ATP, cząsteczki uczestniczącej w procesie fosforylacji, prowadzi do utraty zdolności do fosforylacji białek efektorowych, a w konsekwencji do przerywania szlaku przekazywania sygnału. Mutacje występujące w receptorze EGFR powodują zmiany przestrzenne w obrębie centrum katalitycznego kinazy tyrozynowej, w efekcie czego preferencyjnie przyłączane są inhibitory drobnocząsteczkowe [5].

W Polsce z powodu raka płuca umiera rocznie około dwadzieścia kilka tysięcy osób, co stanowi około 24% wszystkich zgonów z powodu nowotworów. Większość pierwotnych nowotworów płuca (ponad 80%)

to niedrobnokomórkowy rak płuca (NDRP). Jedynie we wczesnych stopniach zaawansowania (co stanowi 10–15% przypadków) nowotwór ten może być skutecznie leczony chirurgicznie [6]. W późniejszych stadiach zaawansowania stosuje się głównie chemioterapię. Jednak wykorzystywane dotychczas schematy leczenia, których podstawą są związki platyny w połączeniu z innymi cytostatykami, są mało skuteczne. Odpowiedź obserwuje się maksymalnie u 50–60% chorych (25–30% odpowiedzi obiektywnych i około 30% stabilizacji choroby). Ostatnio do instrumentarium leczenia wprowadzono leki celowane hamujące aktywność przekazywania sygnału za pośrednictwem EGFR1. Z dotychczasowych doświadczeń wynika, że leki te są skuteczne jedynie wówczas, gdy podaje się je pacjentom, u których biologia nowotworu ukierunkowana jest zgodnie z mechanizmem

działania leku [7]. Oznacza to, że należy wstępnie wyselekcjonować grupę chorych, która odniesie korzyść ze stosowanej terapii. Taka selekcja jest dodatkowo konieczna ze względu na wysokie koszty tego typu terapii. Do niedawna podstawową metodą selekcji było badanie ekspresji EGFR1 metodą immunohistochemiczną [8]. Obecnie coraz częściej uznaje się, że nie jest to metoda optymalna [8]. Badania molekularne przeprowadzone w grupie pacjentów, u których uzyskano odpowiedź na leczenie antyEGFR1, wykazały obecność mutacji w eksonach 18.–24. (eksony kodujące domenę aktywności kinazy tyrozynowej receptora). Zaobserwowano, że większość mutacji następuje w eksonie 19. (45–50%) i 21. (35–45%). Niektóre z mutacji (np. T790M) w eksonie 20. mają negatywny efekt terapeutyczny (tab. 1) [9–12]. Dodatkowo w przypadkach, w których występują

Tabela 1. Mutacje w genie *EGFR* w niedrobnokomórkowym raku płuca (NDRP) [15]

Table 1. Mutations in *EGFR* gene in non-small cell lung cancer (NSCLC) [15]

<i>EGFR</i> ekson 18.	<i>EGFR</i> ekson 19.	<i>EGFR</i> ekson 20.	<i>EGFR</i> ekson 21.
Mutacje warunkujące wrażliwość na lek			
p. G719C	p. E746_A750del	p. V765A	p. L858R
p. G719S	p. E746_T751del	p. T783A	p. N826S
p. G719A	p. E746_A750delinsRP	(< 1%)	p. A839T
p. V689M	p. E746_T751delinsA/I		p. K846R
p. N700D	p. E746_T751delinsVA		p. L861Q
p. E709K/Q	p. E746_S752delinsV		p. G863D
p. S720P (5%)	p. L747_E749del (A750P)		(40–45%)
	p. L747_A750delinsP		
	p. L747_T751del		
	p. L747_T751delinsP/S		
	p. L747_S752del		
	p. L747_S752del(E746V)		
	p. L747_S752del(P753S)		
	p. L747_S752delinsQ		
	p. L747_P753del		
	p. L747_P753delinsQ		
	p. L747_P753delinsS		
	p. S752_I759del (45%)		
Mutacje warunkujące niewrażliwość na lek			
	p. D761Y (<1%)	p. T790M (50%)	
		p. D770_N771insNPG	
		p. D770_N771insSVQ	
		p. D770_N771insG, N771T	
		p. V769L	
		p. S768I (5%)	

mutacje w *EGFR1*, nie wykryto mutacji w genie *K-RAS*. Uznano więc, że są to mutacje wzajemnie wykluczające się. Ponadto do rzadkości należy amplifikacja genu *EGFR1*. Według obecnie obowiązujących zaleceń badania molekularne należy wykonać, gdy pacjenci spełniają następujące kryteria:

- pod względem histologicznym stwierdza się naciekającego *adenocarcinoma* lub raka niedrobnokomórkowego *not otherwise specified* (NOS);
- w ocenie typu histologicznego zaleca się stosowanie panelu przeciwciał (p63, CK5/6, TTF1 i CK7) w celu wyeliminowania niskodojrzałych postaci raka płaskonabłonkowego;
- nie zaleca się stosowania oceny amplifikacji genu *EGFR*.

W takich przypadkach należy wykonać analizę statusu genu *EGFR*, co najmniej w eksonach 19. i 21. Optymalne jest jednak przeprowadzenie takiej analizy w eksonach 18., 19., 20. i 21.

Celem tej pracy jest wykazanie, czy ośrodki zaangażowane w diagnostykę molekularną chorób nowotworowych posiadają odpowiedni potencjał, aby skutecznie przeprowadzić analizę statusu genu *EGFR1* w zakresie zmian w eksonach 18.–21. lub przynajmniej w eksonach 19. i 21. Dodatkowym celem jest wypracowanie odpowiednich standardów postępowania.

Materiały i metody

Ośrodki uczestniczące w procesie walidacji

W przeprowadzonym teście udział wzięły następujące ośrodki: Zakład Biologii Molekularnej (ośrodek referencyjny), Zakład Patologii i Klinika Nowotworów Płuca i Klatki Piersiowej Centrum Onkologii — Instytut; Pracownia Immunologii i Genetyki Katedry i Kliniki Pneumonologii, Onkologii i Alergologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie; Katedra i Zakład Biologii i Genetyki Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Zakład Klinicznej Biologii Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku; Pracownia Diagnostyki Molekularnej Świętokrzyskiego Centrum Onkologii w Kielcach; NZOZ GeneSys we Wrocławiu.

Izolacja DNA z bloczków parafinowych

Na potrzeby procesy walidacyjnego wytypowano 20 preparatów pochodzących od pacjentów ze zdiagnozowanym zaawansowanym, niedrobnokomórkowym rakiem płuca, leczonych lub objętych obserwacją w Centrum Onkologii — Instytucie w Warszawie. Wybrane preparaty histopatologiczne (bloki parafinowe) zostały zweryfikowane przez patologa z Zakładu Patologii Centrum Onkologii — Instytutu w Warszawie

(WPO), pod kątem zawartości utkania nowotworowego naciekającego raka płuca tak, aby zawartość komórek nowotworowych w preparacie nie była mniejsza niż 50% [13]. Następnie bloczki zasztyfowano. Z każdego z bloczków skrojono kilka skrawków o grubości 5–10 mikrometrów do izolacji DNA. Próbkom zawierającym skrojony materiał nadano numery od 1 do 20 w sposób przypadkowy.

Procedurę izolacji DNA wykonano w Zakładzie Biologii Molekularnej Centrum Onkologii — Instytucie w Warszawie. DNA wyizolowano z całości przekazanego materiału. Skrawki parafinowe poddano 3-krotnej ekstrakcji z użyciem ksylenu w celu usunięcia parafiny. Resztki ksylenu usunięto przez przepłukanie skrawków w alkoholu bezwodnym. Następnie preparat suszono w wirówce próżniowej (SpeedVac) w celu usunięcia resztek alkoholu. Odparafinowane fragmenty tkanki poddano izolacji DNA z wykorzystaniem zestawu QIA-amp® DNA Mini Kit firmy Qiagen. Preparaty DNA powtórnie zaślepiono poprzez nadanie im nowych numerów różnych od numerów skrawków, z których były izolowane.

Przed wysłaniem preparatów do analizy w Zakładzie Biologii Molekularnej wykonano dokładną analizę statusu eksonów 18.–21. genu *EGFR*. Metodyka stosowana do amplifikacji badanych eksonów genu *EGFR* była tak zoptymalizowana, aby wydajnie amplifikować materiał pochodzący z bloków parafinowych, który niejednokrotnie jest znacznie zdegradowany i zawiera inhibitory reakcji enzymatycznych. Mieszanina reakcyjna do reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR, *polymerase chain reaction*) (25 μ l) zawierała: 1 \times bufor PCR, 200 μ M każdego dNTP, 2 mM MgCl₂, 0,4 μ M każdego z pary starterów, 50–100 ng matrycowego DNA oraz 0,5 jednostki polimerazy Ampli-Taq Gold (Applied Biosystems). Reakcję przeprowadzano w termocyklerze GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems). Warunki reakcji były następujące: 95°C przez 5 min, 40 cykli (95°C przez 30 s, 57°C przez 30 s, 72°C przez 30 s), 72°C przez 7 min. Produkty reakcji PCR rozdzielano w 2-procentowym roztworze żelu agarozowego w buforze TBE przy napięciu 5 V/cm (60–80 V). Produkt PCR oczyszczano enzymatycznie, stosując odczynnik ExoSAP-it zawierający egzonukleazę i fosfatazę (Affymetrix, Santa Clara, Stany Zjednoczone). Oczyszczony produkt PCR znakowano przy użyciu zestawu BigDye® Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, Stany Zjednoczone) według zaleceń producenta. Warunki reakcji były następujące: 95°C przez 2 min, 25 cykli (96°C przez 10 s, 55°C przez 5 s, 60°C przez 4 min). Produkt reakcji sekwencjonowania oczyszczano zestawem Exterminator (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska). Sekwencjonowanie prowadzono w aparacie Abi Prism 3130xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, Stany Zjednoczone). Uzyskane fluorogramy

analizowano manualnie oraz za pomocą oprogramowania służącego do analizy mutacji. W przypadku zidentyfikowania próby z mutacją cały proces dla danej próbki ponawiano w celu weryfikacji oznaczenia.

Wszystkie zespoły uczestniczące w procesie walidacji otrzymały 0,5–1 μg każdego z 20 analizowanych preparatów DNA. Zadaniem każdego z zespołów było określenie statusu genu *EGFR* na podstawie analizy obecności mutacji w eksonach 19. i 21. tego genu.

Techniki molekularne zastosowane do oznaczenia statusu genu *EGFR*

Każde laboratorium mogło zastosować preferowaną przez siebie technikę analizy DNA do wykrywania zmian molekularnych. Laboratoria uczestniczące w walidacji zastosowały następujące techniki: sekwencjonowanie bezpośrednie (Zakład Biologii Molekularnej Centrum Onkologii, Katedra i Zakład Biologii i Genetyki Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Zakład Klinicznej Biologii Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, Pracownia Diagnostyki Molekularnej Świętokrzyskiego Centrum Onkologii w Kielcach); analizę długości fragmentów amplifikowanego DNA i allelospecyficznego PCR (Pracownia Immunologii i Genetyki Katedry i Kliniki Pneumonologii, Onkologii i Alergologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie); minisekwencjonowanie z wykorzystaniem zestawu SNaPshot firmy Life Technologies oraz analizę długości fragmentów metodą wysokorozdzielczej analizy krzywych topnienia (HRM, *high resolution melting*) (NZOZ GeneSys we Wrocławiu).

Wyniki

Analizie poddano status mutacji genu *EGFR* w 20 preparatach DNA wyizolowanych z blozków parafinowych chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca. Analizowano jedynie obecność mutacji w eksonie 19. i 21. Otrzymane preparaty cechowały się wysokim stopniem czystości. Wartość A_{260}/A_{280} we wszystkich przypadkach mieściła się w zakresie 1,8–2,0. Stężenie otrzymanych preparatów wynosiło 40–470 $\text{ng}/\mu\text{l}$. Wszystkie preparaty przed rozesłaniem do zespołów testujących poddano analizie molekularnej. We wszystkich przypadkach, stosując polimerazę DNA AmpliTaq Gold (Applied Biosystem), uzyskano produkty amplifikacji. Wszystkie 20 preparatów DNA poddano bezpośrednio sekwencjonowaniu nici sensownej i antysensownej w Zakładzie Biologii Molekularnej Centrum Onkologii — Instytucie w celu ustalenia wzorca statusu genu *EGFR*. Spośród 20 analizowanych preparatów DNA w 15 przypadkach nie wykryto mutacji. Mutacje w eksonie 19. wykryto w 4 przypadkach (próbki nr 3, 8, 11, 13). W jednym przypadku stwierdzono mutacje w eks-

onie 21. (próbka nr 19). Preparaty zawierające mutacje charakteryzowały się wysokim odsetkiem komórek nowotworowych, dzięki czemu interpretacja zmian nie pozostawiała żadnych wątpliwości.

Zespołom testującym pozostawiono swobodę w zakresie wyboru metody oznaczania statusu genu *EGFR*. Trzy zespoły posłużyły się metodą sekwencjonowania bezpośredniego. Wyniki uzyskane przez te zespoły były w 100% zgodne z wzorcem. Podobnie zgodne z wzorcem były wyniki uzyskane z wykorzystaniem alternatywnych do sekwencjonowania metod. Zestawienie uzyskanych wyników przedstawiono w tabeli 2.

Dyskusja

Chorzy na zaawansowanego niedrobnokomórkowego raka płuca przed zakwalifikowaniem do terapii celowanej z użyciem drobnocząsteczkowych inhibitorów kinazy tyrozynowej muszą zostać poddani diagnostyce molekularnej, mającej na celu określenie statusu genu *EGFR*. Tylko w przypadku stwierdzenia obecności mutacji chory może odnieść korzyść terapeutyczną po podaniu takiego leku. Odsetek pacjentów ze zmutowanym genem *EGFR* waha się na poziomie 10% w populacji europejskiej. Wszystkie istotne mutacje znajdują się w obrębie kodowania domeny kinazy tyrozynowej — eksony od 18. do 21. Ponad 90% wszystkich zmian molekularnych to aktywujące delekcje w eksonie 19. i zmiany punktowe w kodonie 858 (ekson 21.) (ryc. 1 i 2). Pozostałe 10% przypada na mutacje aktywujące w kodonie 719 eksonu 18. oraz zmiany w obrębie eksonu 20. prawdopodobnie warunkujące wrażliwość lub brak wrażliwości [mutacja p. T790M (ryc. 3), p. S768I] na leczenie inhibitorami drobnocząsteczkowymi [14, 15]. W Centrum Onkologii — Instytucie w Warszawie w ramach rutynowej diagnostyki molekularnej ocenie podlegają eksony od 18. do 21. Natomiast w wielu ośrodkach w celu zmniejszenia kosztów analizy bada się jedynie eksony 19. i 21. Dlatego w początkowej fazie walidacji zdecydowano się na ustalenie statusu jedynie w tych dwóch eksonach. Autorzy niniejszej pracy podjęli próbę sprawdzenia, czy ośrodki, w których odbywa się leczenie chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca lub płacówki wykonujące oznaczenia molekularne na potrzeby szpitali nieposiadających własnych zakładów diagnostycznych, są w stanie wykonywać rutynowe oznaczenia pozwalające na określenie statusu mutacji w tym genie dla celów diagnostycznych.

W procesie walidacji uczestniczyło 6 zespołów. W sumie do wykrywania mutacji wykorzystano 5 różnych metod pozwalających na wykrycie zmian w eksonie 19. i 21.: sekwencjonowanie bezpośrednie, analizę długości fragmentów, PCR allelospecyficzny, minisekwencjonowanie i HRM.

Tabela 2. Zestawienie wyników walidacji

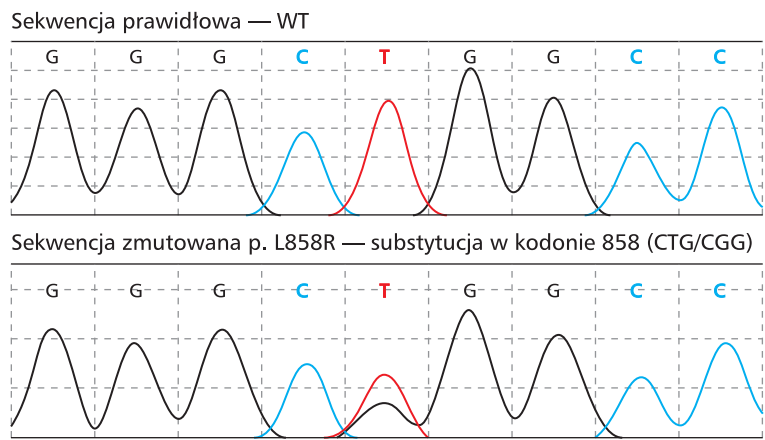
Table 2. Summary of validation results

Nr próbki	Wzorzec	Gdańsk	Lublin	Kielce	Białystok	Wrocław
1	–	–	–	–	–	–
2	–	–	–	–	–	–
3	p. E746_A750del	+	+	+	+	+
4	–	–	–	–	–	–
5	–	–	–	–	–	–
6	–	–	–	–	–	–
7	–	–	–	–	–	–
8	p. E746_A750del	+	+	+	+	+
9	–	–	–	–	–	–
10	–	–	–	–	–	–
11	p. E746_A750del	+	+	+	+	+
12	–	–	–	–	–	–
13	p. E746_A750del	+	+	+	+	+
14	–	–	–	–	–	–
15	–	–	–	–	–	–
16	–	–	–	–	–	–
17	–	–	–	–	–	–
18	–	–	–	–	–	–
19	p. L858R	+	+	+	+	+
20	–	–	–	–	–	–

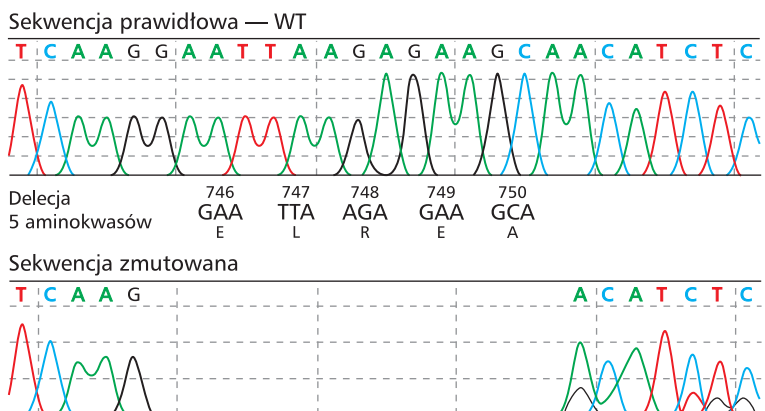
Wzorzec statusu mutacji we wszystkich 20 preparatach DNA opracowano w Zakładzie Biologii Molekularnej Centrum Onkologii — Instytucie. Do oznaczania obecności mutacji wykorzystano sekwencjonowanie bezpośrednie obu nici — metodę referencyjną wykrywania mutacji [13]. Mutacje wykryto w 5 spośród 20 analizowanych próbek (nr 3, 8, 11, 13 i 19). Wszystkim zespołom udało się zamplifikować DNA pochodzące ze skrawków parafinowych, korzystając z opracowanych przez siebie metod diagnostycznych (co w przypadku źle dobranej metodyki może przysparzać wiele trudności) i poprawnie określić status genu *EGFR*. Reakcja bezpośredniego sekwencjonowania jest techniką najlepiej obrazującą występowanie zaburzeń w DNA i umożliwiającą dokładne opisanie zmiany z uwzględnieniem nukleotydowego wariantu mutacji. Należy jednak uwzględnić fakt, że produkty uzyskane po amplifikacji materiału wyizolowanego z parafiny przeznaczone do sekwencjonowania nie powinny przekraczać 200 pz [13]. Jest to istotne, gdyż jakość preparatów parafinowych, na którą laboratorium diagnostyczne nie ma wpływu, może być bardzo różna. Nieprawidłowe utrwalenie materiału w bloku parafinowym może prowadzić do znacznej degradacji DNA, co skutkuje albo całkowitym brakiem amplifikacji, albo otrzymywaniem dodatkowych niespecyficznych produktów reakcji. To z kolei uniemożli-

wia przeanalizowanie wyniku sekwencjonowania ze względu na bardzo wysokie tło. Ponadto należy mieć również na uwadze, że klony komórek z mutacjami mogą występować w małej ilości, co uwidoczni się obecnością niewielkich pików w obrazie sekwencjonowania, słabo wyróżniających się z tła (sygnał z komórek z mutacją jest zdominowany przez sygnał z komórek nowotworowych bez mutacji lub komórek zdrowej tkanki obecnych w preparacie). Dlatego w takich przypadkach sekwencjonowanie obu nici sensownej i antysensownej wydaje się najwłaściwsze. Chociaż sekwencjonowanie bezpośrednie nie odznacza się wyjątkowo dużą czułością, jednak z powyżej opisanych względów (idealne obrazowanie molekularne) jest techniką dobrze nadającą się do oznaczania całego panelu mutacji w *EGFR*. W przeciwieństwie do testów dostępnych komercyjnie sekwencjonowanie pozwala na znalezienie wszystkich zmian. Pozostałe metody zastosowane w walidacji są ukierunkowane na detekcję najbardziej typowych zmian w receptorze naskórkowego czynnika wzrostu. Charakteryzują się one podobnym poziomem czułości, ale niższymi kosztami. Uniemożliwiają jednak detekcję mniej typowych wariantów mutacji, co jest ich istotną wadą.

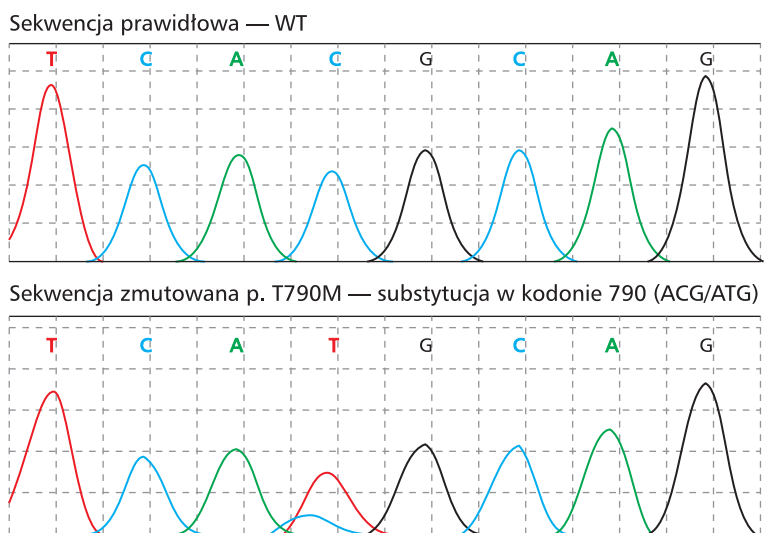
Należy jeszcze wspomnieć o teście komercyjnym firmy DxS Diagnostic, którego dystrybutorem jest firma



Rycina 1. Mutacja p. L858R w eksonie 21. genu *EGFR*, warunkująca wrażliwość na lek
 Figure 1. The p. L858R mutation in ekson 21 of the *EGFR* gene, associated with drug sensitivity



Rycina 2. Mutacja p. E746_A750del w 19. eksonie genu *EGFR*, warunkująca wrażliwość na lek
 Figure 2. The p. E746_A750del mutation in exon19 of the *EGFR* gene, associated with drug sensitivity



Rycina 3. Mutacja p. T790M w 20. eksonie genu *EGFR* związana z brakiem wrażliwości na lek
 Figure 3. The p. T790M mutation in exon19 of the *EGFR* gene, associated with drug resistance

Qiagen. Jest to jedyny test dostępny w Europie posiadający certyfikat CE-IVD. Charakteryzuje się dużą (nawet nadmierną) czułością i wysoką specyficznoscią. Ukie-runkowany jest na detekcję niektórych typowych, zmian występujących w eksonach 18., 19., 20. i 21. (3 typowe zmiany w eksonie 18. G719A/C/S, 19 delecji w eksonie 19., 3 insercje oraz zmianę T790M i S768I w eksonie 20., a także mutacje L858R i L861Q w eksonie 21.; w sumie 29 zmian). Zastosowanie tego testu nie jest jednak powszechne ze względu na jego wysokie koszty i konieczność posiadania odpowiedniego wyposażenia sprzętowego.

Podsumowanie

Wszystkie jednostki uczestniczące w procesie walidacji w końcowym efekcie w sposób prawidłowy oznaczyły status genu *EGFR* we wszystkich 20 preparatach DNA. W praktyce oznacza to, że są one odpowiednio przygotowane do tego, aby podjąć działalność diagnostyczną w zakresie oznaczania statusu genu *EGFR*. Proces walidacji ujawnił jednak potrzebę uwiarygodnienia stosowanych w diagnostyce molekularnej procedur. Okazało się, że nawet jeżeli w badaniach naukowych powszechnie wykorzystuje się metody molekularne, to stosowane procedury nie są na tyle jednolite, aby możliwe było ich proste przeniesienie do rutynowej diagnostyki klinicznej. Wynikiem przeprowadzonego procesu walidacji są następujące zalecenia dla laboratoriów diagnostycznych:

- materiał do izolacji DNA powinien zawierać nie mniej niż 50% utkania nowotworowego. W przypadku izolacji materiału z bloczków parafinowych lub rozmazów cytologicznych patolog powinien wstępnie ocenić preparat, zanim materiał zostanie przekazany do izolacji DNA. Jeżeli preparat zawiera mniej niż 50% utkania nowotworowego zaleca się mikrodysekcję lub przynajmniej makrodysekcję. Inną metodą jest wydłubywanie materiału z bloczku parafinowego. Ponieważ jest to niszczenie materiału diagnostycznego, nie może być przyjęte jako zalecana procedura; alternatywą jest wykorzystanie innego bloczka, jeżeli laboratorium takim dysponuje;
- procedura izolacji DNA ze skrawków parafinowych powinna być ujednolicona. W tym celu zaleca się korzystanie z gotowego zestawu do izolacji DNA ze skrawków parafinowych;
- w przypadku braku jednoznacznego wyniku, uwzględniając czułość i precyzję stosowanych metod, powinno się wykorzystać dwie metody oznaczania mutacji. Stosując zasady dobrej praktyki laboratoryjnej, zaleca się, aby jednego z wykonywanych

oznaczeń dokonać przy wykorzystaniu metody sekwencjonowania bezpośredniego z obu nici;

- zaleca się rozszerzenie panelu analizowanych eksonów do 18., 19., 20. i 21.;
- od momentu wypisania skierowania na badanie diagnostyczne do momentu przekazania wyniku badania nie powinno upłynąć więcej niż 10 dni roboczych.

Podziękowania

Autorzy pragną wyrazić podziękowanie firmie Astra Zeneca Sp. z o.o. za inicjatywę przeprowadzenia procesu walidacji.

Piśmiennictwo

1. Siedlecki J.A. Choroby nowotworowe. W: Bal J. (red.). Biologia molekularna w medycynie. Elementy genetyki klinicznej. Wydawnictwa naukowe PWN, Warszawa 2006: 336–397.
2. Hynes N.E., Lane H.A. ERBB receptors and cancer: Complexity of targeted inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* 2005; 5: 341–354.
3. Kumar A., Petri E.T., Halmos B. i wsp. Structure and clinical relevance of the epidermal growth factor receptor in human cancer. *J. Clin. Oncol.* 2008; 26: 1742–1751.
4. Pirker R., Filipits M. Monoclonal antibodies against EGFR in non-small cell lung cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2010. [Epub].
5. Paez J.G., Jänne P.A., Lee J.C. i wsp. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004; 304: 1497–1500.
6. Szostakiewicz B., Jassem J., Dziadziuszko R. Perspektywy zastosowania inhibitorów angiogenezy w leczeniu niedrobnokomórkowego raka płuca. *Współczesna Onkologia* 2003; 7: 668–674.
7. Gridelli C., Maione P., Ferrara M.L., Rossi A. Cetuximab and Other Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibodies in the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer. *The Oncologist* 2009; 14: 601–611.
8. Rossi A., Bria E., Maione P., Palazzolo G., Falanga M., Gridelli C. The role of cetuximab and other epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in the treatment of advanced non-small cell lung cancer. *Rev. Recent Clin. Trials.* 2008; 3: 217–227.
9. Schmid K., Oehl N., Wrba F., Pirker R., Pirker C., Filipits M. EGFR/KRAS/BRAF mutations in primary lung adenocarcinomas and corresponding locoregional lymph node metastases. *Clin. Cancer Res.* 2009; 15: 4554–4560.
10. Shigematsu H., Lin L., Takahashi T. i wsp. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* 2005; 97: 339–346.
11. Sharma S.V., Bell D.W., Settleman J., Haber D.A. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2007; 7: 169–181.
12. Lynch T.J., Bell D.W., Sordella R. i wsp. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N. Engl. J. Med.* 2004; 350: 2129–2139.
13. Tysarowski A., Siedlecki J.A., Olszewski W.P. Walidacja wybranych technik molekularnych oznaczania mutacji w kodonie 12 i 13 genu *K-RAS* przeprowadzona w pięciu ośrodkach badawczo-naukowych Polski. *Onkol. Prakt. Klin.* 2008; 4: 232–244.
14. Penzel R., Sers C., Chen Y. i wsp. EGFR mutation detection in NSCLC — assessment of diagnostic application and recommendations of the German Panel for Mutation Testing in NSCLC. *Virchows Arch.* 2011; 458: 95–98.
15. Pirker R., Herth F.J., Kerr K.M. i wsp. European EGFR Workshop Group. Consensus for EGFR mutation testing in non-small cell lung cancer: results from a European workshop. *J. Thorac. Oncol.* 2010; 5: 1706–1713.