

Metody biologii molekularnej w diagnostyce mutacji genu *EGFR* u chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca

Adam SZPECHCIŃSKI

Zakład Genetyki i Immunologii Klinicznej
Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie

Wprowadzenie

Medycyna personalizowana wymaga zintegrowanego podejścia klinicznego, łączącego precyzyjne diagnozowanie choroby na poziomie molekularnym i terapię z użyciem selektywnych leków, działających specyficznie na komórki nowotworowe obciążone konkretną zmianą genetyczną. Aktualnie najpowszechniej stosowaną formą personalizowanej terapii chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP) jest leczenie ukierunkowane molekularnie (ang. *targeted therapy* – terapia celowana) z wykorzystaniem inhibitorów kinazy tyrozynowej (IKT), które w odróżnieniu od standardowej chemioterapii wybiórczo hamują wzrost komórek nowotworu poprzez swoiste oddziaływanie na domenę wewnątrzkomórkową receptora naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *epidermal growth factor receptor*, EGFR).

Szlak sygnałowy EGFR jest istotnym elementem w procesie powstawania i progresji wielu chorób nowotworowych. Aktywacja EGFR, poprzez przyłączenie swoistego liganda lub mutację genu, promuje proliferację i migrację komórek nowotworowych, zwiększając ich inwazyjny potencjał, oraz hamuje sygnały apoptotyczne.

W leczeniu NDRP korzystna odpowiedź na IKT EGFR warunkowana jest obecnością somatycznych mutacji w genie *EGFR*. Obecność mutacji aktywujących wiąże się ze zwiększonym powinowactwem receptora do cząsteczki inhibitora i indukcją wzmocnionej apoptozy komórek guza w odpowiedzi na terapię IKT. Mutacje aktywujące występują w obrębie eksonów 18–21 genu *EGFR*, kodujących domenę kinazową receptora, który ulega w ich wyniku konstytutywnej aktywacji. Zidentyfikowano ponad 188 różnych mutacji *EGFR*, lecz u 85% chorych na NDRP,

którzy odpowiadają na leczenie IKT EGFR, wykrywa się dwa najczęstsze typy mutacji: niewielkie delecje w obrębie eksonu 19 (45–50%) oraz mutację punktową L858R w eksonie 21 (40–45%; tab. 1). Mutacje w genie *EGFR* dotyczą głównie chorych na raka gruczołowego płuca, niepalących, nieznacznie częściej kobiet i osób po 65. roku życia. Mutacje występują też znacznie częściej u chorych rasy azjatyckiej (40%) niż kaukaskiej (10%, z czego 3–25% w populacji amerykańskiej, 10–24% w populacji południowoeuropejskiej). Największym ograniczeniem stosowania IKT EGFR w terapii spersonalizowanej NDRP jest oporność na te leki, nabywana przez chorych w trakcie leczenia. Największe znaczenie kliniczne ma mechanizm nabytej oporności związany z wystąpieniem dodatkowej mutacji T790M w eksonie 20 w uprzednio zmutowanym allelu genu *EGFR*, który dotyczy ponad połowy chorych leczonych IKT EGFR I generacji (erlotynib, gefitynib).

Podstawą kwalifikacji chorych na NDRP do leczenia IKT EGFR jest wiarygodna i skuteczna diagnostyka klinicznego materiału nowotworowego na obecność mutacji w genie *EGFR*. W ostatniej dekadzie rozwinięto szereg metod molekularnych do analizy genetycznej mutacji *EGFR*, z których wiele przeszło pomyślnie proces walidacji i certyfikacji IVD (ang. *in vitro diagnostics*) i jest dostępnych komercyjnie w postaci gotowych zestawów odczynnikowych. Mimo to kluczowym etapem postępowania diagnostycznego nadal jest właściwe przygotowanie materiału biologicznego do badania molekularnego. W niniejszej pracy scharakteryzowano metody biologii molekularnej aktualnie wykorzystywane w diagnostyce mutacji *EGFR* oraz opisano podstawowe problemy związane z analizą genetyczną materiału klinicznego od chorych na NDRP.

Wskazania kliniczne do oceny mutacji w genie *EGFR*

Oznaczenie mutacji genu *EGFR* należy wykonać u chorych z rozpoznaniem NDRP o innym utkaniu niż płaskonabłonkowe lub w przypadku, gdy ustalenie typu morfologicznego

	Ekson 18	Ekson 19	Ekson 20	Ekson 21
Mutacje aktywujące	5%	45–50%	< 1%	40–45%
	G719X (3–4%) V689M N709K/Q S720P	ΔE746-A750 ΔE746-T751 ΔE746-A750 (ins RP) ΔE746-T751 (ins A/I) ΔE746-T751 (ins VA) ΔE746-S752 (ins A/V) ΔL747-E749 (A750P) ΔL747-A750 (ins P) ΔL747-T751 ΔL747-T751 (ins P/S) ΔL747-S752 ΔL747-752 (E746V) ΔL747-752 (P753S) ΔL747-P752 (ins Q) ΔL747-P753 ΔL747-P753 (ins S) ΔS747-I759	V765A T783A	L858R (40–45%) L861X (2%) N826S A839T K846R G863D
Mutacje oporności		< 1%	5%	
		D761Y	T790M (3–5%) D770_N771 (ins NPG) D770_N771 (ins SVQ) D770_N771 (ins G) N771T V769L D761Y S768I	

Tab. 1. Mutacje genu *EGFR*

Najważniejsze z klinicznego punktu widzenia mutacje genu *EGFR* zlokalizowane w eksonach 18–21. Najwyższą częstość (%) występowania wśród chorych na NDRP prezentują delecje w obrębie eksonu 19 i mutacje punktowe w eksonie 21 genu.

nego NDRP nie jest możliwe (ang. *not otherwise specified*, NOS). Nie zaleca się wykonywania badania genetycznego, jeśli w ocenie histopatologicznej wycinków guza i (lub) badaniu cytologicznym uwidoczniło się jedynie komórki raka płaskonabłonkowego, raka drobnokomórkowego płuca lub rakowiaka.

Materiał biologiczny do diagnostyki mutacji *EGFR*

Badanie tkanki nowotworowej pozostaje złotym standardem w diagnostyce molekularnej raka płuca. Do diagnostyki mutacji genu *EGFR* wykorzystywane są materiały tkankowe oraz różnego typu materiały cytologiczne pochodzące z biopsji cienko- i gruboigłowych (transbronchialne, transtorakalne), wymazy szczoteczkowe z oskrzela, osady komórek pochodzących z płynu z opłucnej, popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych czy

płynu osierdziowego. Badanie genetyczne w kierunku mutacji genu *EGFR* powinno być wykonywane jedynie na materiale zabezpieczonym odpowiednimi technikami. Materiałem preferowanym są fragmenty tkanek utrwalonych w 10-procentowej zbuforowanej formalinie o obojętnym pH i zatopionych w parafinie (ang. *formalin-fixed paraffin-embedded tissue*, FFPE), ze względu na stabilność i przydatność do badania genetycznego nawet po kilku latach od pobrania materiału. Do analizy mutacji genu *EGFR* kwalifikuje się również materiał cytologiczny, zwłaszcza utrwalony w postaci cytobloków. Rozmazy cytologiczne na szkiełkach mikroskopowych, na podstawie których ustalono rozpoznanie gruczolakoraka lub NDRP-NOS, również można wykorzystać do oceny mutacji *EGFR*. Jednak ze względu na unikatowość materiału cytologicznego należy dążyć do sporządzenia z niego cytobloku, który daje większe możliwości wykonania

dodatkowych barwień immunohistochemicznych, o ile określenie postaci morfologicznej NDRP na podstawie barwienia HE nie powiodło się. Analiza mutacji somatycznych może być także wykonywana w oparciu o świeżo pobrane lub zamrożone w ciekłym azocie fragmenty tkanek oraz tkanki utrwalone w alkoholach (etanol o stężeniu > 70% i/lub metanol > 80%). W diagnostyce molekularnej wykorzystuje się zarówno materiał tkankowy pochodzący z guza pierwotnego, jak i ten pochodzący z przerzutów NDRP, przy czym zawsze preferowany jest materiał uzyskany podczas ostatniego zabiegu. Wybór reprezentatywnego materiału do oznaczenia mutacji genu *EGFR* dokonywany jest przez patomorfologa na podstawie standardowych preparatów mikroskopowych w celu oceny obecności komórek nowotworowych oraz ich odsetka w ogólnej populacji komórek występujących w preparacie.

Czynniki kluczowymi dla skutecznej diagnostyki są: odpowiednia liczba komórek nowotworowych w materiale oraz ich odsetek w stosunku do komórek prawidłowych. Przyjmuje się, że pełną wiarygodność diagnostyczną badania molekularnego zapewnia stwierdzenie 200–400 komórek nowotworowych w materiale. W codziennej praktyce diagnostycznej kryterium to bywa trudne do spełnienia, ponieważ całkowita liczba komórek, nowotworowych i prawidłowych, uzyskiwanych za pomocą biopsji igłowych jest zwykle ograniczona do zaledwie 100–500 na jedno nakłucie. Dlatego za minimalną wartość graniczną wystarczającą do diagnostyki mutacji *EGFR* przyjmuje się liczbę 100 komórek nowotworowych.

Nie mniej istotna niż liczba komórek nowotworowych jest ich procentowa zawartość w materiale na tle pozostałych, prawidłowych komórek jądrzastych. Ten parametr ma krytyczne znaczenie dla doboru odpowiednio czułej metody diagnostycznej. W przypadku cennych materiałów skąpokomórkowych zaleca się makrodysekcję, która polega na manualnym wycięciu lub zdrapaniu z preparatu fragmentu tkanki o szczególnie wysokiej zawartości komórek nowotworowych. Inną możliwością jest laserowa mikrodysekcja, w której pozyskuje się pojedyncze komórki lub ich jednorodną populację z różnorodnych preparatów histologicznych i cytologicznych poprzez ich automatyczne laserowe wycięcie i przeniesienie do osobnej próbówki.

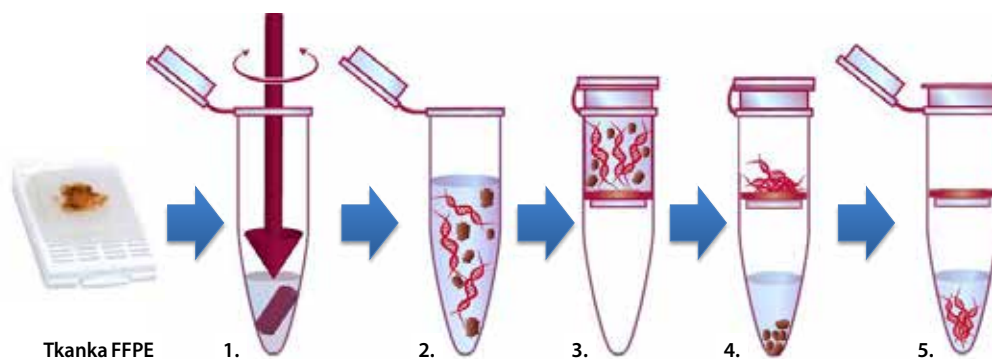
Należy pamiętać, że przygotowanie materiału tkankowego w laboratorium patomorfologicznym do dalszych analiz molekularnych wymaga zachowania szczególnych zasad ochrony próbki analitycznej przed zanieczyszczeniem z otoczenia (degradacja DNA na skutek działania nukleaz bakteryjnych, działania silnego środka odczającego itd.) oraz przed krzyżową kontaminacją próbek

ze względu na wysoką czułość testów diagnostycznych, a tym samym duże ryzyko wyniku fałszywie dodatniego.

Diagnostyka oparta na materiale tkankowym jest obciążona szeregiem ograniczeń, które w istotny sposób wpływają na skuteczność stosowanych metod molekularnych. Przede wszystkim biopsja to skomplikowany i inwazyjny zabieg pozyskania próbek tkanki, a pobrany materiał zwykle reprezentuje tylko jedno umiejscowienie nowotworu, co nie pozwala ocenić genetycznych zmian odległych przerzutów. Ponadto heterogenność komórkowa i molekularna tkanki nowotworowej znacząco obniża czułość badania molekularnego. W dobie rozwoju terapii spersonalizowanej konieczna jest nie tylko wiarygodna analiza zaburzeń genetycznych o znaczeniu predykcyjnym w pierwotnym materiale nowotworowym, uzyskanym od chorego przed wdrożeniem leczenia, ale również monitorowanie statusu szeregu zmian molekularnych warunkujących oporność na leczenie celowane. W praktyce klinicznej wykonanie powtórnej biopsji pacjentowi z progresją choroby w celu pogłębionej analizy molekularnej rzadko jest możliwe.

Krew obwodowa od chorego na zaawansowaną postać raka płuca może stanowić alternatywę dla tkanki nowotworowej w przypadkach, gdy tradycyjna biopsja nie jest możliwa lub pobrany tą drogą materiał tkankowy jest z różnych przyczyn nieodpowiedni do badania mutacji genu *EGFR*. Krew obwodowa, jako tzw. płynna biopsja (ang. *liquid biopsy*), dostarcza pozakomórkowe DNA (ang. *cell-free DNA*, cfDNA), pochodzące z różnych lokalizacji ognisk nowotworowych (z guza pierwotnego, z odległych przerzutów, z krążących we krwi mikroprezerzutów) oraz różnych klonów komórek rakowych, dzięki czemu do pewnego stopnia pomijany jest problem heterogenności tkanki nowotworowej. Należy także podkreślić, że komórki nowotworowe uwalniają cfDNA w sposób ciągły (opisano szereg mechanizmów tego zjawiska), co zapewnia dostateczną ilość materiału genetycznego do analiz molekularnych przez cały okres rozwoju choroby nowotworowej.

Krew obwodową pobiera się od chorego najczęściej z żyły w zgięciu łokciowym do próbek hematologicznych zawierających K3-EDTA jako antykoagulant i/lub inne środki stabilizujące (zapobieganie lizie komórek jądrzastych, inhibicja enzymów nukleolitycznych). Obróbka przedanalizyczna krwi powinna zapewnić przede wszystkim szybką i bezpieczną separację osocza od frakcji komórkowej, aby nie dopuścić do kontaminacji cfDNA materiałem genetycznym pochodzącym z rozpadu komórek jądrzastych, co znacząco obniżyłoby skuteczność badania molekularnego. Z tego powodu nie zaleca się wykorzystywania surowicy krwi do badania cfDNA, po-



Ryc. 1. Schemat izolacji DNA z tkanki nowotworowej metodą kolumnienkową

Preparaty FFPE należy w pierwszej kolejności poddać deparafinizacji poprzez traktowanie ksylenem i alkoholem etylowym. Poszczególne etapy procedury są podobne dla większości metod izolacji DNA:

1. Mechaniczna homogenizacja lub enzymatyczne trawienie fragmentu tkanki celem uwolnienia komórek z podścieliska.
2. Usunięcie błon lipidowych i rozpad (liza) komórek przez zastosowanie odczynników lizujących oraz usunięcie białek przez dodanie proteazy (zwykle w wysokiej temperaturze $> 50^{\circ}\text{C}$).
3. Odseparowanie DNA od pozostałych składników lizatu (w tej metodzie DNA jest selektywnie wiązane przez złożo krzemionkowe kolumnienki).
4. Oczyszczenie DNA z zanieczyszczeń (lipidów, białek, soli) i innych składników dodanych do mieszaniny w poprzednich krokach (kilkakrotne przepłukanie złoża kolumnienki odpowiednim buforem).
5. Elucja DNA (wymycie DNA ze złoża wodą lub odpowiednim buforem).

nieważ w procesie krzepnięcia krwi w próbówce komórki podlegają mechanicznemu zgnieceniu przez tworzący się skrzep.

Izolacja kwasów nukleinowych z materiału klinicznego

Wydajna izolacja DNA to drugi, po odpowiednim opracowaniu materiału klinicznego, kluczowy etap diagnostyki molekularnej NDRP. Standardowa obróbka materiału tkankowego przez utrwalanie w 10-procentowej buforowanej formalinie i zatapianie w bloczkach parafinowych (FFPE) obniża analityczną jakość kwasów nukleinowych. Czas inkubacji w formalinie ma bezpośrednie przełożenie na stopień degradacji DNA i jest proporcjonalny do wielkości materiału (formaldehid wysycający tkankę stopniowo utlenia się do kwasu mrówkowego, który hydrolizuje DNA). W związku z powszechnym wykorzystywaniem preparatów FFPE do oznaczeń molekularnych zalecana jest standaryzacja postępowania z różnymi typami materiałów, np. do 6–12 godzin inkubacji w formalinie w przypadku małych biopsji oraz 8–18 godzin przy utrwalaniu dużych fragmentów tkanki (formalina wysycająca tkankę w tempie około 1 mm/h). Niektóre procedury stosowane w przypadku zestawów odczynnikowych do izolacji DNA z preparatów FFPE obejmują etap inkubacji lizatu komórkowego w temperaturze 90°C w celu zerwania niespecyficznych wiązań pomiędzy białkami i DNA,

spowodowanych działaniem formaliny, co znacząco poprawia jakość izolowanego materiału genetycznego. Fragmentacja kwasów nukleinowych, zmniejszająca wydajność reakcji PCR i w efekcie reprezentatywność próbki materiału diagnostycznego, stwarza wymóg zastosowania szczególnie wydajnych procedur izolacji DNA, zwłaszcza dla materiałów skąpokomórkowych. Podobnie w przypadku izolacji cfDNA z osocza krwi zalecane jest stosowanie odczynników przeznaczonych dla tego rodzaju materiału biologicznego, z uwagi na jego unikalną charakterystykę biochemiczną. Obecnie dostępne są liczne zestawy komercyjne oparte na różnych systemach izolacji kwasów nukleinowych, pozwalające na wysoki stopień standaryzacji procedury dla konkretnego rodzaju materiału biologicznego. Procedury dla większości metod izolacji DNA zawierają te same etapy (ryc. 1).

Obiektywne badania porównawcze, biorące pod uwagę odzysk DNA z materiału biologicznego, jego fragmentację i stopień hamowania reakcji PCR, wskazują na relatywnie wysoką jakość DNA otrzymywanego metodą opartą na kolumnkach ze złożem krzemionkowym. W tej metodzie izolacji wykorzystuje się wiązanie DNA do złoża krzemionkowego w warunkach wysokiego stężenia soli chaotropowych. Ujemnie naładowane cząsteczki DNA łączą się wtedy z dodatnio naładowaną krzemionką, dzięki czemu możliwe jest bezpieczne odpłukanie zanieczyszczeń (przede wszystkim białek). Następnie DNA

wymywane jest ze złoża roztworem o niskim stężeniu soli (woda lub bufor o niskim stężeniu).

W innej popularnej metodzie DNA oddziela się od zanieczyszczeń przy pomocy kuleczek paramagnetycznych, opłaszczonych specjalnym ligandem (pochodzenia naturalnego lub syntetycznego), wykazującym wysokie powinowactwo do izolowanej cząsteczki kwasu nukleinowego. Po przyłożeniu magnesu do próbki z lizatem komórkowym kulki paramagnetyczne ze związanym DNA osadzają się na ścianie próbki od strony magnesu; nadsącz usuwa się za pomocą pipety, DNA przytwierdzone do kulek przemywa się kilkakrotnie, a następnie odzyskuje w postaci eluatu. Obydwie metody zautomatyzowano; dostępne są laboratoryjne urządzenia o dużej mocy przerobowej, izolujące DNA z różnego rodzaju tkanek i preparatów. Do izolacji cfDNA z osocza krwi można wykorzystywać zarówno metodę kolumnkową, jak i magnetyczną, choć nie zawsze są one równoważne pod względem ilości i czystości materiału genetycznego. Istotne jest zatem, aby stosowana metoda izolacji DNA dobrana była w sposób optymalny do danego rodzaju materiału biologicznego (np. do materiałów FFPE, do cfDNA z osocza krwi itd.).

Nieodzowny etap kończący każdą procedurę izolacji DNA stanowi ocena czystości molekularnej i ilości materia-

łu genetycznego w eluacie. Najpowszechniej stosowaną i najtańszą metodą jest spektrofotometryczny pomiar absorbancji zawiesiny DNA oraz oszacowanie stopnia czystości i stężenia z użyciem odpowiednich wzorów. Wyniki tych pomiarów umożliwiają dobór odpowiednich warunków amplifikacji materiału genetycznego i detekcji zmian genetycznych w jego sekwencji technikami opartymi na metodzie *real-time PCR*. Metody wysokoprzepustowe (NGS) oraz ultraczułe (ddPCR) wymagają bardziej precyzyjnego pomiaru stężenia – tu zaleca się stosowanie metod fluorymetrycznych. Izolowany materiał genetyczny może zostać zamrożony w temperaturze -20°C (DNA) lub -80°C (RNA) i być przechowywany przez okres co najmniej kilkunastu miesięcy bez znaczącego ubytku na ilości i jakości, o ile nie będzie poddawany wielokrotnym cyklom rozmrażania i zamrażania.

Metody wykorzystywane w diagnostyce mutacji genu *EGFR*

Diagnostyka molekularna raka płuca dysponuje szeregiem technik laboratoryjnych umożliwiających skuteczną analizę zmian genetycznych o znaczeniu klinicznym, przede wszystkim mutacji somatycznych genu *EGFR*. W ciągu ostatniej dekady metody wykorzystujące amplifikację DNA techniką PCR w czasie rzeczywistym (ang.

Technika biologii molekularnej	Czułość detekcji (% allelu zmutowanego)*	Wykrywane mutacje	Komercyjne testy IVD	Analiza cfDNA z osocza
Techniki oparte na sekwencjonowaniu DNA				
Sekwencjonowanie Sangera	~20%	Znane i nowe	X	X
Pirosekwencjonowanie	2–10%	Znane i nowe	✓	X
Sekwencjonowanie nowej generacji (NGS)	1–0,1%	Znane i nowe	✓	✓
Allelospecyficzne testy real-time PCR				
<i>Real-time PCR</i> z sondami hydrolizującymi	1–5%	Tylko znane	✓	X
Cobas EGFR Mutation Test	1–5%	Tylko znane	✓	✓
Scorpion-ARMS	1–5%	Tylko znane	✓	✓
PNA-LNA PCR clamp (+ sekwencjonowanie produktu)	1–0,1%	Znane i nowe	✓	✓
Techniki ultraczułe				
Droplet Digital PCR (ddPCR)	0,01–0,001%	Tylko znane	✓	✓ ✓
BEAMing	0,01–0,001%	Tylko znane	X	✓ ✓

* Wartości limitu czułości detekcji (ang. *limit of detection*, LOD) na podstawie danych publikowanych przez producentów zestawów odczynnikowych do diagnostyki *in vitro* (IVD) lub dostępnego piśmiennictwa naukowego. Wartości LOD różnią się dla poszczególnych mutacji.

Tab. 2. Popularne techniki biologii molekularnej wykorzystywane w diagnostyce mutacji genu *EGFR*

real-time PCR, *quantitative PCR*, *qPCR*) oraz sekwencjonowanie DNA metodą Sangera uważano za złoty standard w analizie mutacji genu *EGFR*. W tym czasie opracowano i wprowadzono na rynek komercyjny szereg testów diagnostycznych opartych na technice *real-time PCR*, jak również rozwinęto kilka nowych technik analizy genetycznej, których faktyczna przydatność diagnostyczna jest obecnie przedmiotem wielu badań walidacyjnych (tab. 2).

Metody oparte na technice *real-time PCR*

Reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*, PCR) to podstawowa technika biologii molekularnej, wykorzystywana do powielania kopii cząsteczek DNA w badanej próbce w warunkach laboratoryjnych. Obecnie w diagnostyce genetycznej najpowszechniej wykorzystywaną techniką jest *real-time PCR*, czyli modyfikacja klasycznej metody PCR, w której do środowiska reakcji wprowadzane są znakowane barwnikami fluorescencyjnymi oligonukleotydy (sondy) łączące się z DNA w stosunku stechiometrycznym, dzięki czemu można na podstawie odczytów intensywności emitowanej fluorescencji w kolejnych cyklach PCR określić ilość matrycy (badanej próbki DNA) użytej do reakcji, jak również śledzić przyrost ilości powstającego produktu (liczby kopii badanej cząsteczki DNA) w trakcie trwania reakcji (*real-time*) – stąd nazwa „ilościowy PCR”. Główną zaletą testów diagnostycznych opartych na PCR w czasie rzeczywistym jest bardzo wysoka czułość detekcji, sięgająca 1% allelu zmutowanego w mieszaninie DNA genomowego (allel-specyficzna amplifikacja PCR), przy jednocześnie bardzo wysokiej specyficzności i szerokim zakresie dynamicznym, pozwalającym analizować próbki o różnym stężeniu DNA (różnica 6–8 rzędów wielkości).

Wysoka czułość i specyficzność najpopularniejszych testów diagnostycznych (certyfikowanych IVD) wykorzystywanych w analizie mutacji genu *EGFR* wynika z zastosowania w nich jednej ze strategii allelospecyficznej amplifikacji PCR, dzięki czemu podczas reakcji selektywnie zwiększana jest liczba kopii zmutowanego allelu DNA, przez co mierzony sygnał (fluorescencyjny) nie jest maskowany przez tło (pochodzące od allelu typu natywnego – *wild type*). Cel ten może zostać osiągnięty poprzez pozytywną selekcję zmutowanej sekwencji DNA z wykorzystaniem starterów i sond specyficznych dla poszukiwanego allelu (np. sondy typu Scorpion-ARMS, *Scorpion Amplified Refractory Mutation System*) lub drogą selekcji negatywnej poprzez blokowanie amplifikacji DNA typu natywnego (np. metoda PNA-LNA PCR clamp z użyciem kwasu peptydonukleinowego, PNA). Ponadto amplifikacja krótkich fragmentów DNA, zwykle poniżej 100 par zasad, zapewnia wysoką skuteczność badania materiałów

o niskiej jakości DNA, takich jak utrwalone w bloczkach parafinowych skrawki tkanki nowotworowej lub materiał cytologiczny z biopsji cienkoigłowej (cytobloki).

Inną ważną zaletą *real-time PCR* jest możliwość multipleksowania reakcji, to jest jednoczesnej amplifikacji dwóch i więcej matryc DNA w tej samej mieszaninie reakcyjnej (próbówce), co znacząco skraca czas i zmniejsza koszt wykonania oznaczeń (zamiast kilku reakcji PCR wykonywana jest jedna), pozwala zużyć mniej matrycy DNA (szczególnie ważne, gdy dysponujemy minimalnymi ilościami unikatowego materiału genetycznego), a także daje możliwość zastosowania wewnętrznej kontroli amplifikacji w reakcjach, w których stwierdza się obecność lub brak produktu (dodatni/ujemny). Obecnie najbardziej zaawansowane multipleksy allelospecyficznego PCR w czasie rzeczywistym pozwalają na jednoczesną analizę ponad 40 różnych mutacji w 18, 19, 20 i 21 eksonie genu *EGFR* w 30 próbach DNA podczas jednego cyklu pracy aparatu.

Należy podkreślić, że pomimo szeregu zalet metody *real-time PCR* cechuje stosunkowo niska przepustowość, umożliwiającą analizę kilku do kilkudziesięciu wyłącznie znanych (zdefiniowanych przez producenta testu) zmian molekularnych w obrębie zaledwie jednego genu i w ograniczonej liczbie próbek (zwykle im większa liczba wykrywanych zmian molekularnych, tym mniejsza liczba próbek badanych w jednym cyklu pracy), co przekłada się na ogólny koszt badania.

Metody bezpośrednie oparte na sekwencjonowaniu DNA

Metody bezpośrednie to techniki molekularne umożliwiające ustalenie sekwencji wybranego fragmentu DNA bezpośrednio poprzez odczyt kolejności nukleotydów, dzięki czemu mogą być stosowane zarówno do analizy genetycznej znanych mutacji, jak i jako narzędzie odkrywania nowych zmian genetycznych. Sekwencjonowanie DNA, w ogólnym pojęciu, obejmuje zbiór technik laboratoryjnych wykorzystywanych w genetyce i biologii molekularnej do odczytywania sekwencji, czyli kolejności par nukleotydowych w cząsteczce DNA.

1. Sekwencjonowanie DNA metodą Sangera

Metoda opracowana przez zespół Fredericka Sangera w latach 70. XX wieku była przez niemal trzy dekady najpopularniejszą techniką sekwencjonowania DNA, powszechnie wykorzystywaną w badaniach naukowych i diagnostyce genetycznej. Najnowocześniejsze sekwencjatory kapilarne mogą analizować sekwencje 384 prób DNA w jednym cyklu pracy, choć najpopularniejsze są aparaty 8- i 16-kapilarne. Przybliżony czas odczytu 1000

nukleotydów w cząsteczce DNA to 125 minut. Możliwość odczytu stosunkowo długich fragmentów w pojedynczej reakcji (100–1000 par zasad) przy jednoczesnej bardzo dużej trafności i jednoznaczności uzyskiwanych wyników powoduje, że metoda Sangera jest szeroko stosowana do analizy sekwencji DNA w poszukiwaniu mutacji pojedynczych nukleotydów, a także niewielkich delecji i insercji. W diagnostyce molekularnej raka płuca ta metoda sekwencjonowania DNA jest często wykorzystywana do potwierdzania wyników analizy somatycznych mutacji genu *EGFR* z użyciem testów diagnostycznych opartych na technice *real-time PCR*. Z raportu EMQN (European Molecular Genetics Quality Network) za rok 2016 podsumowującego rezultaty zewnętrznej kontroli jakości w zakresie diagnostyki mutacji *EGFR*, w którym udział wzięło 295 laboratoriów diagnostycznych z całego świata, wynika, że sekwencjonowanie Sangera jest nadal powszechnie stosowaną metodą (zaraz po komercyjnych testach opartych na technice *real-time PCR*), najczęściej w połączeniu z innymi technikami molekularnymi.

Pomimo wysokiej specyficzności podstawowym problemem ograniczającym zastosowanie metody Sangera w diagnostyce mutacji somatycznych nowotworów jest relatywnie niska czułość. W optymalnych warunkach przy wykorzystaniu matrycy DNA o wysokiej jakości sekwencjonowanie metodą Sangera może osiągać czułość detekcji do 20–25% allelu zmutowanego na tle wariantu natywnego dla danego genu. Wiele materiałów diagnostycznych, przede wszystkim utrwalonych FFPE, charakteryzuje się jednak wysokim stopniem degradacji DNA, co ma istotnie negatywny wpływ na odczyt i interpretację analizowanej sekwencji. We wcześniej wspomnianym raporcie EMQN analiza mutacji *EGFR* metodą Sangera obarczona była dużym odsetkiem wyników fałszywie ujemnych, choć ani jednym wynikiem fałszywie dodatnim, które z kolei dotyczyły niektórych komercyjnych testów diagnostycznych. Zaleca się zatem, aby w praktyce diagnostycznej metodą sekwencjonowania kapilarnego analizować jedynie materiały zawierające przynajmniej 50% komórek nowotworowych. Z danych uzyskanych w 2015 roku od 10 wiodących laboratoriów diagnostycznych w Polsce wynika, że tak wysokie utkanie nowotworowe prezentuje aż 70% materiałów klinicznych badanych pod kątem mutacji genu *EGFR*.

2. Pirosekwencjonowanie DNA

W 2005 roku wprowadzono na rynek biotechnologiczny nową technologię zwaną pirosekwencjonowaniem DNA. Metoda ta nadal wykorzystuje sangerowskie sekwencjonowanie poprzez syntezę, lecz w reakcji wykrywany jest pirofosforan (PPI), uwalniany podczas przyłączania

nukleotydu do nowo syntetyzowanej nici DNA. Odczyt sekwencji możliwy jest dzięki zapisaniu w pamięci komputera każdego zdarzenia uwolnienia PPI i przypisaniu go w czasie dla rodzaju nukleotydu (A, G, C, T), aktualnie dodanego do mieszaniny reakcyjnej w celu syntezy DNA.

Główną zaletą analizy mutacji *EGFR* metodą pirosekwencjonowania DNA jest możliwość detekcji szerokiego spektrum zmian genetycznych, rozmieszczonych w obrębie eksonów 18–21 genu, z czułością znacznie przewyższającą parametry oferowane przez klasyczną metodę Sangera. Mimo dostępności zwalidowanych systemów diagnostycznych IVD do analizy mutacji *EGFR* pirosekwencjonowanie nie jest nawet w połowie tak popularne jak metoda Sangera lub NGS (według raportu EMQN za rok 2016). Wynika to m.in. z gorszego zaplecza komercyjnego i technicznego (dostępność odczynników i urządzeń od różnych producentów) dla tej metody, a jednocześnie długiej historii i silnej pozycji sekwencjonowania sangerowskiego na rynku laboratoryjnym.

Badania porównujące parametry analityczne trzech metod analizy mutacji genu *EGFR* w materiałach resekcyjnych utrwalonych FFPE: sekwencjonowania Sangera, allelospecyficznej amplifikacji *real-time PCR* i pirosekwencjonowania wykazały ponad 82-procentową zgodność wyników, co należy po części przypisać wysokiej jakości badanych preparatów tkankowych. Z drugiej strony czułość i specyficzność pirosekwencjonowania okazały się wystarczające do badania skąpokomórkowego materiału cytologicznego w diagnostyce mutacji *EGFR*.

3. Sekwencjonowanie nowej generacji (NGS)

Sekwencjonowanie sangerowskie oraz pirosekwencjonowanie doskonale nadają się do analizy sekwencji pojedynczych genów, są jednak zbyt kosztowne i pracochłonne, aby można je było efektywnie zastosować do badania kilkudziesięciu czy kilkuset genów w standardowych warunkach laboratoryjnych. Najnowsze techniki sekwencjonowania, zwane ogólnie sekwencjonowaniem nowej generacji (ang. *next generation sequencing*, NGS) lub równoległym sekwencjonowaniem wielu fragmentów DNA (ang. *massively parallel sequencing*, MPS), charakteryzuje o wiele wyższa przepustowość, pozwalająca sekwencjonować w tym samym czasie wiele regionów w obrębie genomu, w dużej liczbie próbek DNA (np. od różnych pacjentów) pod kątem różnych zmian genetycznych (mutacje punktowe, insercje, delecje, CNV) w ciągu jednego cyklu pracy maszyny. Ponadto techniki NGS są znacznie czulsze od sekwencjonowania sangerowskiego, wymagają próbek o wielokrotnie niższym stężeniu DNA. Czułość detekcji najpopularniejszych systemów NGS pozwala wykrywać 1–5% allelu zmutowanego w tle wa-

riantu natywnego. W dodatku NGS jest metodą zarówno jakościową (odczyt sekwencji DNA, wykrycie mutacji), jak i ilościową, gdyż zapewnia dokładny pomiar liczby kopii fragmentów DNA zawierających daną mutację. Procedury analityczne większości dostępnych systemów NGS zawierają te same etapy, z których najbardziej pracochłonne to przygotowanie tzw. bibliotek DNA (lub RNA) oraz analiza bioinformatyczna surowych danych. Na rynku dostępnych jest wiele różnych zestawów odczynnikowych dla danego systemu NGS, przeznaczonych do różnych aplikacji diagnostycznych i naukowych, w tym do analizy mutacji *EGFR* (najczęściej w panelu z innymi genami).

Liczne prace badawcze opublikowane w ostatnim 5-leciu dowodzą, że wprowadzenie metody NGS do praktyki klinicznej raka płuca może znacząco poprawić skuteczność leczenia. Dla przykładu Lim *et al.* wykazali, że 58% z badanej grupy chorych na NDRP z negatywnym wynikiem badania molekularnego na obecność zaburzeń somatycznych w genach *EGFR*, *KRAS*, *ALK*, przeprowadzonego za pomocą metod podstawowych, po powtórzeniu badania metodą NGS nadal prezentowało szereg innych zmian molekularnych, dla których obecnie rozwijane są terapie celowane (możliwość uczestniczenia w badaniu klinicznym). Z kolei Scarpa *et al.* już w 2013 roku dowiedli skuteczności badania molekularnego metodą NGS w skąpomórkowym materiale cytologicznym od chorych na NDRP typu gruczołowego, pomimo że większość zestawów odczynnikowych była wówczas optymalizowana pod kątem tkanek FFPE. Stworzyło to szansę na pogłębioną diagnostykę molekularną i analizę setek zaburzeń genetycznych w oparciu o bardzo małą ilość DNA (> 10 ng), co do tej pory nie było możliwe przy użyciu metod podstawowych. W szerszej perspektywie nawet 60% chorych na NDRP mogłoby skorzystać z diagnostyki opartej na metodzie NGS, ponieważ taki odsetek pacjentów jest diagnozowany w późnych stadiach zaawansowania choroby, kiedy możliwości uzyskania tkanki nowotworowej do badania drogą resekcji są ograniczone, a biopsja nie dostarcza materiału w odpowiedniej jakości lub ilości.

Techniki NGS już na obecnym etapie rozwoju umożliwiają skuteczną analizę pozakomórkowego DNA z krwi chorych na raka płuca pod kątem szeregu zaburzeń genetycznych o potwierdzonym bądź potencjalnym znaczeniu klinicznym. Dostępne są komercyjne zestawy odczynnikowe o podwyższonej czułości detekcji (poniżej 1% zmutowanego allelu) przeznaczone do analizy cfDNA na konkretnych platformach NGS. Przewagą metody NGS nad testami opartymi na *real-time PCR* jest możliwość identyfikowania nie tylko zdefiniowanych, lecz wszystkich zmian w obrębie genu, w tym szczególnie rzadkich mutacji *EGFR*, które nie są wykrywane techni-

kami podstawowymi (np. mutacji C797S, warunkującej oporność na leczenie ozymertynibem). Badania ostatnich lat wykazały bardzo wysoką zgodność (60–95%) profiliów zaburzeń genetycznych oznaczanych metodą NGS w preparatach tkanki nowotworowej i próbach krwi od tych samych chorych. W badaniu porównującym metodą NGS status mutacji 70 genów w cfDNA z krwi oraz materiałach tkankowych od 102 chorych na raka płuca ogólna zgodność dla mutacji *EGFR* wykrytych w tkance i krwi wyniosła 79%, co potwierdza dużą wartość diagnostyczną płynnej biopsji. Mutacje genu *EGFR* były najczęściej obserwowanymi zmianami; zidentyfikowano 50 mutacji o charakterze aktywującym i 12 mutacji warunkujących oporność. Sekwencjonowanie DNA z materiału tkankowego z różnych przyczyn technicznych i klinicznych nie powiodło się u ponad połowy chorych (51%), dla których analiza cfDNA z krwi stanowiła jedyną możliwość sprawdzenia statusu mutacji genu *EGFR* i ewentualną szansę na zakwalifikowanie do terapii celowanej.

Techniki ultraczułe

Bardzo interesującą metodą detekcji mutacji somatycznych w onkogenach jest BEAMing (ang. *beads, emulsion, amplification and magnetics*). Wykorzystuje ona wiązanie pojedynczych cząsteczek DNA do powierzchni magnetycznych kuleczek i ich klonalną amplifikację za pomocą emulsyjnego PCR oraz odczyt sygnału fluorescencyjnego z wykorzystaniem cytometru przepływowego. Niezwykle wysoka czułość detekcji prezentowana przez tę technikę pozwala na wykorzystanie w badaniu materiałów biologicznych o szczególnie niskiej zawartości nowotworowego DNA, przede wszystkim cfDNA z osocza krwi. W międzynarodowym badaniu klinicznym AURA, w którym oceniano skuteczność kliniczną inhibitora kinazy tyrozynowej *EGFR* III generacji, AZD9291, wykorzystano BEAMing jako metodę referencyjną do walidacji parametrów diagnostycznych dwóch komercyjnych testów opartych na *real-time PCR* pod kątem analizy mutacji *EGFR* w cfDNA. Niestety analiza genetyczna metodą BEAMing dostępna jest na razie jedynie w postaci komercyjnej usługi w kilku ośrodkach na świecie, co wiąże się z koniecznością transportu materiału klinicznego.

Inną nowoczesną metodą wysokoczułej detekcji mutacji występujących w niewielkiej liczbie kopii w analizowanej mieszaninie DNA jest Droplet Digital PCR (ddPCR). Technika ta opiera się na namnażaniu klonów pojedynczych cząsteczek DNA w wielokrotnych, równoległych reakcjach PCR zachodzących w mikroskopijnych kroplach roztworu reakcyjnego o objętości nanolitrow. Pozwala to nie tylko z wysoką czułością wykrywać obecność w obrębie guza nielicznych klonów komórek zawierających

mutację genu *EGFR*, lecz także może służyć do pomiaru ilościowego zawartości zmutowanego allelu oraz liczby kopii genu. Podczas gdy konwencjonalne testy diagnostyczne, oparte na *real-time PCR*, pozwalają wykryć pierwotną mutację oporności T790M w materiale tkankowym u zaledwie 3% chorych na NDRP przed leczeniem IKT *EGFR*, analiza metodą ddPCR dowiodła występowania tej mutacji aż u 83% chorych kwalifikowanych do terapii celowanej. Im wyższy był procentowy udział allelu z mutacją T790M w materiale genetycznym izolowanym z tkanki nowotworowej pozyskanej od chorego przed leczeniem IKT *EGFR*, tym częściej wykrywano tę mutację w materiale tkankowym pochodzącym z powtórnej biopsji pacjenta z progresją choroby w trakcie terapii celowanej. Wynika to z procesu powolnej selekcji rzadkich klonów komórek z mutacją T790M w masie guza nowotworowego podczas leczenia IKT *EGFR*, jako jednego z głównych mechanizmów nabywania oporności komórek NDRP na ten rodzaj terapii (dotyczy to blisko 60% chorych leczonych IKT *EGFR* I generacji). Metoda ddPCR, podobnie jak BEAMing, często wykorzystywana jest do analizy genetycznej cfDNA; aparatura i odczynniki dostępne są komercyjnie. Niestety spory odsetek wyników fałszywie dodatnich oraz konieczność rozległej optymalizacji procedur analitycznych ograniczają powszechne stosowanie technik ultraczułych w rutynowej diagnostyce mutacji *EGFR*, co czyni z tych metod narzędzia pomocnicze, stosowane przede wszystkim w celu pogłębionej analizy genetycznej materiałów wstępnie przebadanych metodami konwencjonalnymi.

Podsumowanie

Zgodnie z aktualnymi zaleceniami polskimi i międzynarodowymi wykrywanie mutacji somatycznych genu *EGFR* powinno być nieodzownym etapem rutynowej diagnostyki chorych na zaawansowaną postać gruczołowego raka płuca, u których rozważana jest terapia inhibitorami kinazy tyrozynowej. Pośród dostępnych metod molekularnych nie można jednoznacznie wskazać standardu w diagnostyce laboratoryjnej mutacji genu *EGFR*, ponieważ mimo określonych zalet każda metoda prezentuje także szereg ograniczeń, wpływających na jej ogólną przydatność diagnostyczną. Problem ten najlepiej uwidaczniają cykliczne raporty z wynikami zewnętrznej kontroli jakości w laboratoriach wykonujących diagnostykę mutacji *EGFR*, nadal prezentujące przypadki wyników fałszywie dodatnich i ujemnych. Optymalnym rozwiązaniem wydaje się korzystanie z przynajmniej dwóch różnych metod molekularnych do detekcji mutacji, uzupełniających się nawzajem w zakresie czułości i specyficzności (np. sekwencjonowanie Sangera i allelospecyficzny *real-time PCR*). Bez względu na wybór techniki biologii molekularnej

kluczowe znaczenie dla wykonywania wiarygodnych oznaczeń ma zawsze odpowiednia walidacja całego procesu diagnostycznego, włącznie z przygotowaniem materiału biologicznego, izolacją DNA oraz analizą genetyczną mutacji *EGFR*, przeprowadzona wewnątrz danego laboratorium czy ośrodka klinicznego. Zaleca się również udział laboratorium w programach zewnętrznej kontroli jakości lub międzylaboratoryjną walidację procedur. Punktem wyjścia przy wdrażaniu procedur diagnostycznych lub wyborze usługodawcy zewnętrznego powinno być przestrzeganie międzynarodowej normy ISO 15189 (dotyczącej systemu jakości i kompetencji technicznych laboratoriów medycznych), zasad dobrej praktyki laboratoryjnej (ang. *good laboratory practice*, GLP) oraz aktualnych zaleceń towarzystw naukowych i organizacji zrzeszających specjalistów w dziedzinie onkologii klinicznej, patomorfologii, diagnostyki laboratoryjnej i biologii molekularnej, opisujących ogólnie przyjęte zasady przygotowania materiału biologicznego i analizy mutacji *EGFR*.

Piśmiennictwo

1. Krawczyk P, Chorostowska-Wynimko J, Dziadziuszko R *et al.* Zalecenia metodyczne dotyczące oceny mutacji genu EGFR oraz rearanżacji genu ALK w kwalifikacji chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca do terapii ukierunkowanych molekularnie. *Nowotwory. J Oncol* 2014; 64(4): 336–342.
2. Skroński M, Szpechciński A, Chorostowska-Wynimko J. Współczesne metody wykrywania mutacji genu EGFR jako czynnika predykcyjnego dla terapii ukierunkowanej molekularnie chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca – czy istnieje „złoty standard” diagnostyczny? *Pneumonol Alergol Pol* 2014; 82(3): 311–322.
3. Szpechciński A, Florczuk M. Rola mikroRNA w mechanizmach oporności niedrobnokomórkowego raka płuca na inhibitory kinazy tyrozynowej EGFR oraz perspektywy klinicznego wykorzystania tego zjawiska. *Postępy Polskiej Medycyny i Farmacji. Zeszyty Naukowej Fundacji Polpharmy* 2017; 5(1): 47–60.
4. Szpechciński A, Chorostowska-Wynimko J, Kupis W *et al.* Quantitative analysis of free-circulating DNA in plasma of patients with resectable NSCLC. *Expert Opin Biol Ther* 2012; 12 Suppl 1: S3–9.
5. Krawczyk P, Ramlau R, Chorostowska-Wynimko J *et al.* The efficacy of EGFR gene mutation testing in various samples from non-small cell lung cancer patients: a multicenter retrospective study. *J Cancer Res Clin Oncol* 2015; 141(1): 61–68.
6. Lee HJ, Xu X, Kim H *et al.* Comparison of direct sequencing, PNA clamping-real time polymerase chain reaction, and pyrosequencing methods for the detection of EGFR mutations in non-small cell lung carcinoma and the correlation with clinical responses to EGFR tyrosine kinase inhibitor treatment. *Korean J Pathol* 2013; 47(1): 52–60.
7. European Molecular Genetics Quality Network. EMQN External Quality Assessment Scheme for Lung Cancer – Summary Scheme Report. Opublikowano 11 listopada 2016.
8. Lee SE, Lee SY, Park HK *et al.* Detection of EGFR and KRAS mutation by pyrosequencing analysis in cytologic samples of non-small cell lung cancer. *J Korean Med Sci* 2016; 31(8): 1224–1230.
9. Szpechciński A. Wykorzystanie sekwencjonowania nowej generacji (NGS) w diagnostyce molekularnej niedrobnokomórkowego raka płuca: aktualne możliwości i perspektywy na przyszłość. *Wiadomości Onkologiczne w Pigulce: Rak Płuca* 2017; 2: 13–24.
10. Lim SM, Kim EY, Kim HR *et al.* Genomic profiling of lung adenocarcinoma patients reveals therapeutic targets and confers clinical benefit when standard molecular testing is negative. *Oncotarget* 2016; 7(17): 24172–24178.
11. Scarpa A, Sikora K, Fassan M *et al.* Molecular typing of lung adenocarcinoma on cytological samples using a multigene next generation sequencing panel. *PLoS One* 2013; 8(11): e80478.
12. Thompson JC, Yee SS, Troxel AB *et al.* Detection of therapeutically targetable driver and resistance mutations in lung cancer patients by next-generation sequencing of cell-free circulating tumor DNA. *Clin Cancer Res* 2016; 22(23): 5772–5782.
13. Thress KS, Brant R, Carr TH *et al.* EGFR mutation detection in ctDNA from NSCLC patient plasma: A cross-platform comparison of leading technologies to support the clinical development of AZD9291. *Lung Cancer* 2015; 90(3): 509–515.
14. Isobe K, Hata Y, Tochigi N *et al.* Usefulness of nanofluidic digital PCR arrays to quantify T790M mutation in EGFR-mutant lung adenocarcinoma. *Cancer Genomics Proteomics* 2015; 12(1): 31–37.
15. Cree IA, Deans Z, Ligtenberg MJ *et al.* Guidance for laboratories performing molecular pathology for cancer patients. *J Clin Pathol* 2014; 67(11): 923–931.
16. Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB *et al.* Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *Arch Pathol Lab Med* 2013; 137(6): 828–860.



Adres do korespondencji

Dr n. med. Adam Szpechciński

Zakład Genetyki i Immunologii Klinicznej
Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc
ul. Płocka 26
01-138 Warszawa
tel. 22 431 21 58
a.szpehcinski@igichp.edu.pl