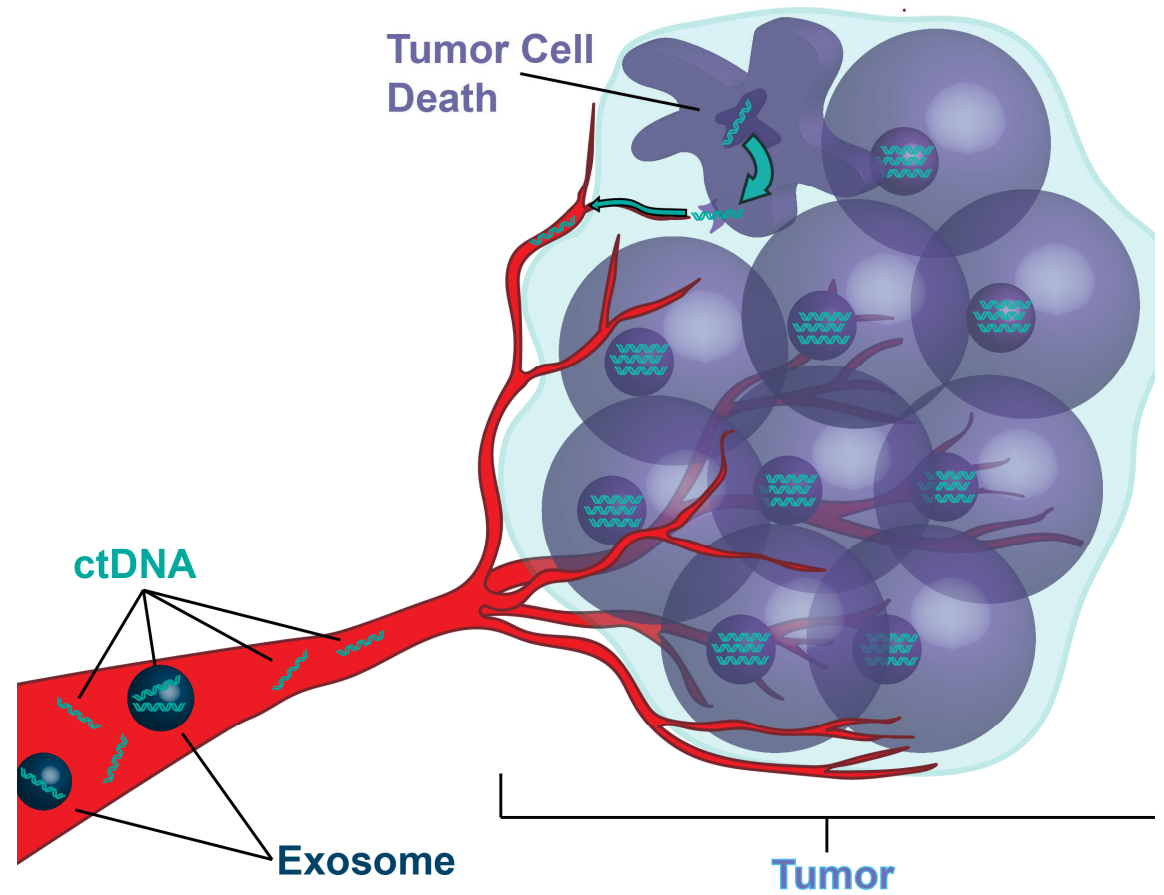


CIRCULERENDE KERNZUREN: GEVOELIGHEID EN SPECIFICITEIT

Prof. S. Van Laere, MSc, PhD

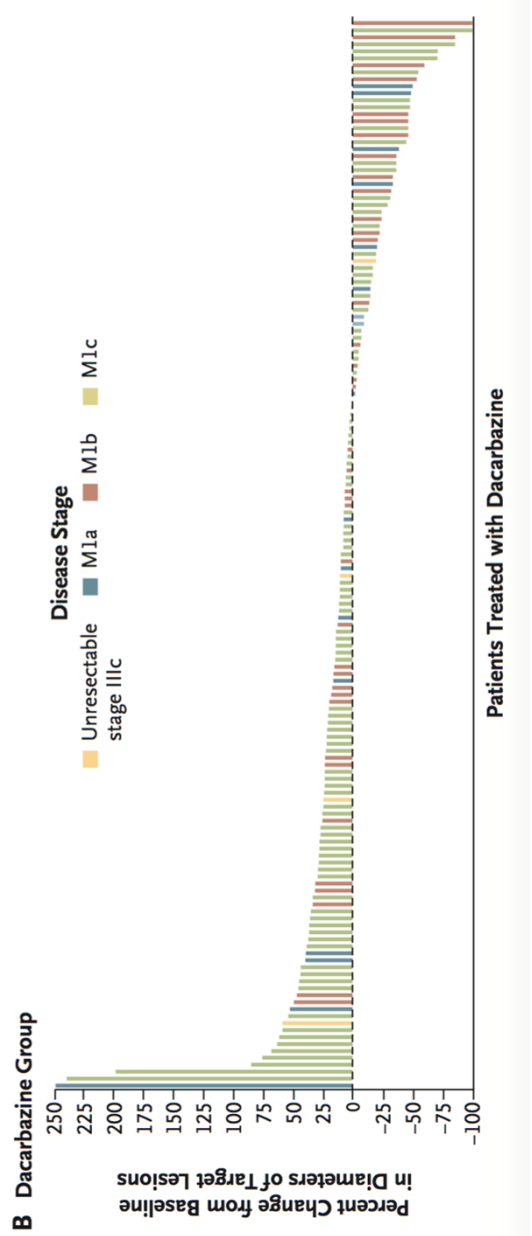
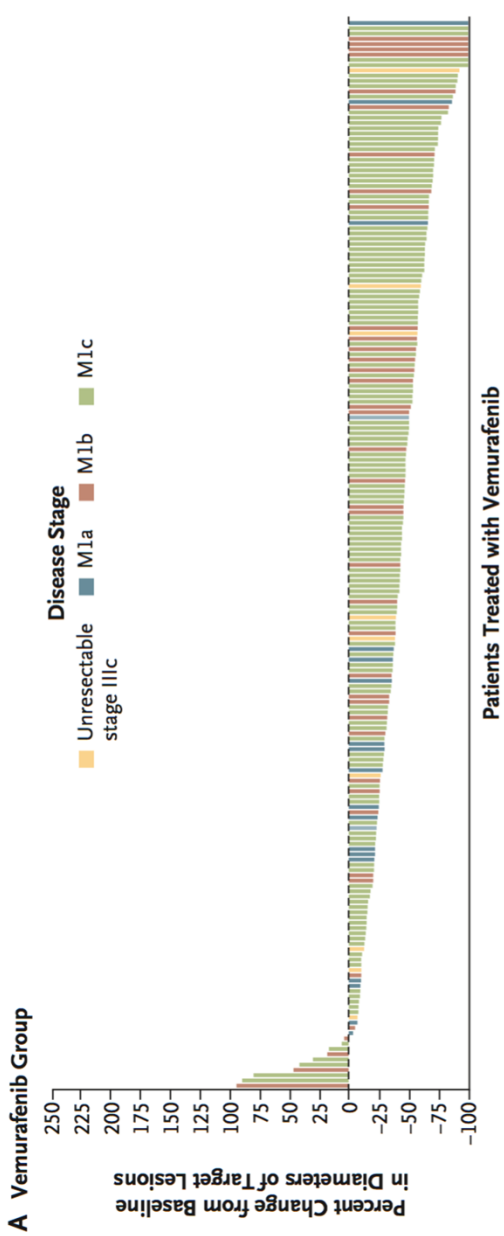
Scientific Officer

*Translational Cancer Research Unit GZA - Core UA
Vakgroep oncologie - UA*



Het menselijk genoom en kanker

- Elke humane cel bevat 2 kopijen van het menselijke genoom
 - Genoom is een aaneenschakeling of sequentie van verschillende letters (i.e. A, C, G, en T)
 - De volgorde van deze letters bepaald de correcte vorming van eiwitten die belangrijk zijn voor het juist functioneren van een cel
- Veranderingen in het genoom liggen aan de basis van de ontwikkeling van kanker
 - Vier soorten veranderingen of mutaties: puntmutaties, kleine inserties/deleties, kopijnummerveranderingen, herschikkingen
 - Verstoren de correcte vorming van eiwitten waardoor functies verloren of gewonnen worden
- Gepersonaliseerde kankergeneeskunde
 - Toedienen van doelgerichte medicijnen gericht tegen specifieke gemuteerde eiwitten om hun werking te blokkeren

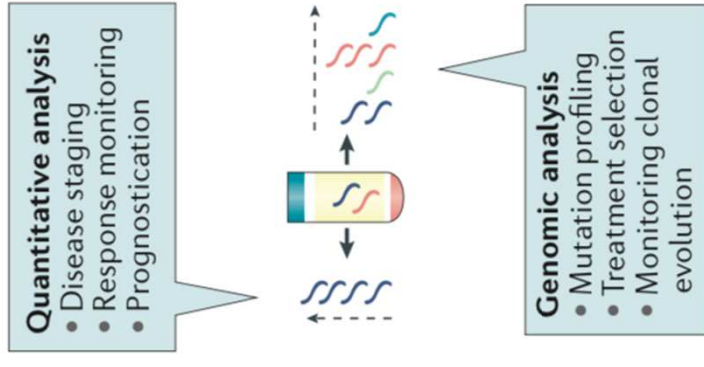


Moleculaire diagnosetechnieken

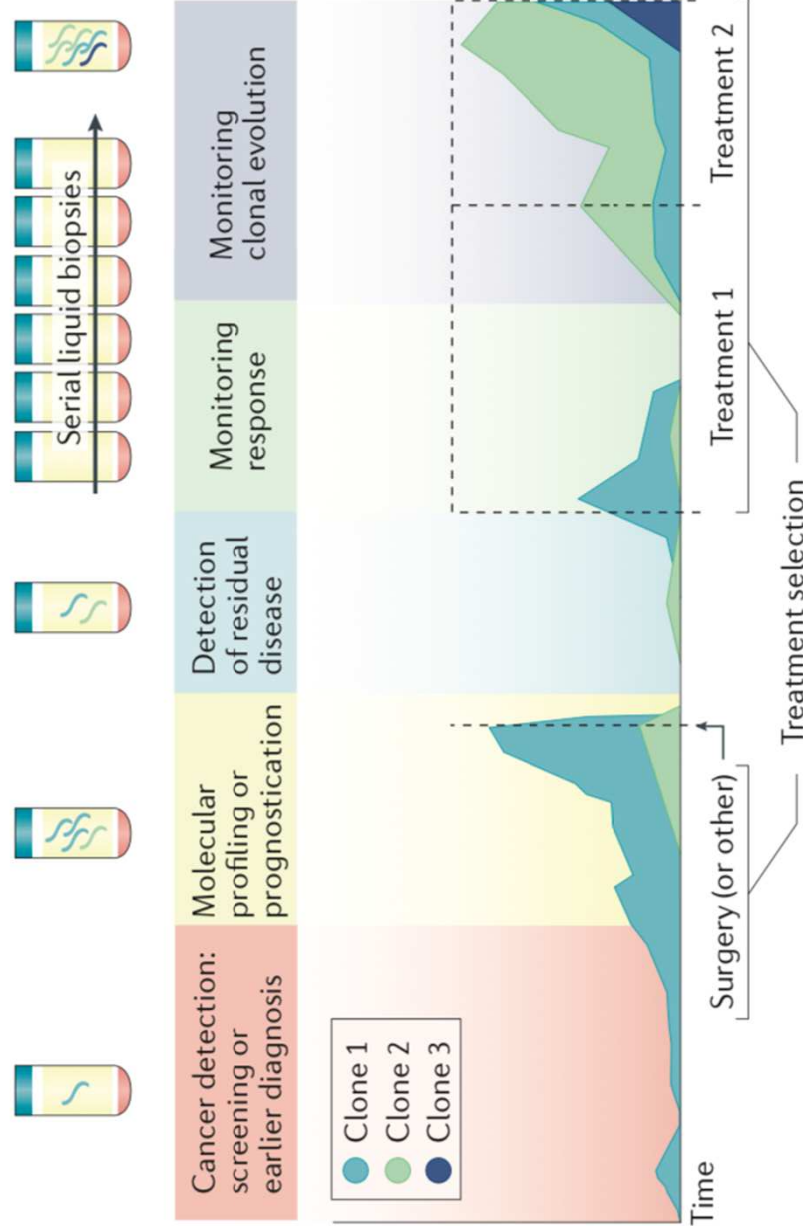
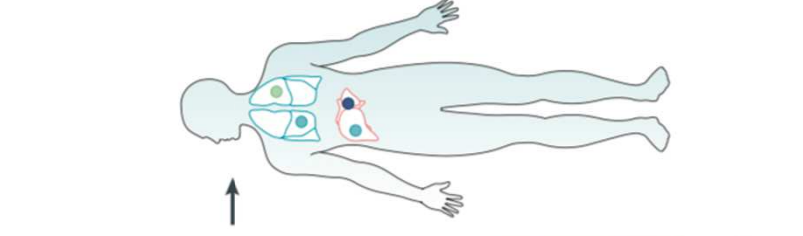
- Methoden waarmee de aan- of afwezigheid van nucleïnezuren kan worden bepaald, alsmede de aan- of afwezigheid van mutaties in deze moleculen
- Vloeibare biopsie
 - Oogsten van (fragmenten van) tumorcellen uit lichaamsvochten, voornamelijk bloed
 - Alternatief voor weefselbiopsie: makkelijker, sneller, representatiever, minder invasief, pijnlijk en risicovol
- Twee matrices
 - Circulerende tumorcellen
 - Circulerend DNA

Circulerend DNA

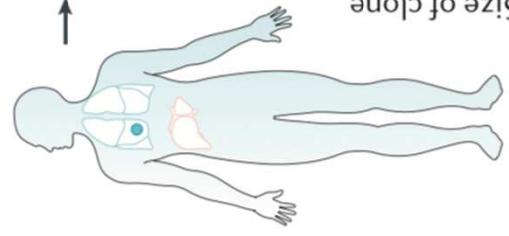
- Cel-vrij DNA (cfDNA)
 - DNA dat in de bloedstroom circuleert en dat wordt vrijgesteld door cellen oiv apoptose, necrose of actieve secretie
 - Concentratie: 1ng-10ng per mL plasma
 - Veranderingen in concentratie oiv fysieke inspanning, inflammatie, trauma, etc.
 - Korte halfwaardetijd: ~15min – 120min (i.e. real-time monitoring)
 - Ook aanwezig in andere lichaamsvochten (i.e. urine, speeksel, cerebrospinaal- en pleuravocht)
- Circulerend tumor DNA (ctDNA)
 - Cel-vrij DNA specifiek afkomstig van tumorcellen
 - Korte DNA fragmenten in vergelijking met cfDNA van niet-maligne cellen (~144bp vs. 166bp)
 - **Fractie ctDNA in cfDNA is variabel maar klein: gemiddeld <1%**

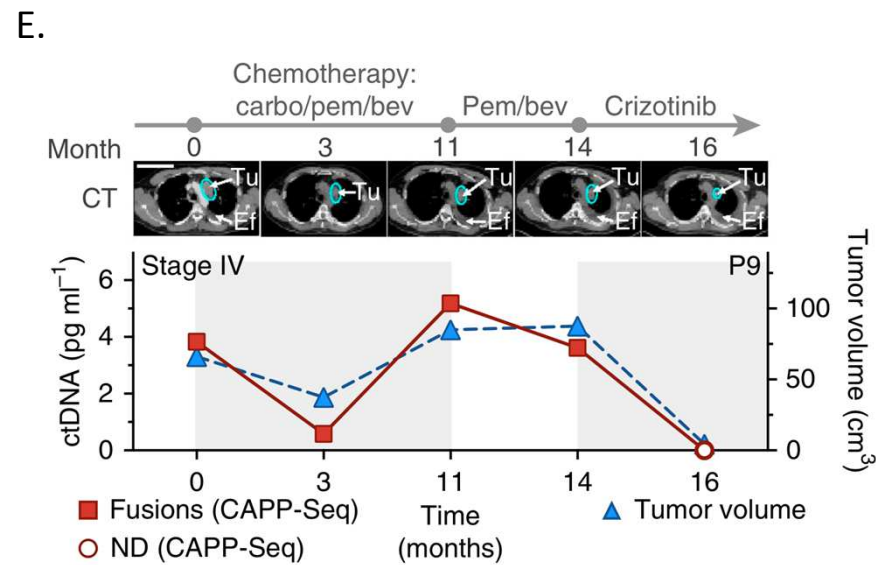
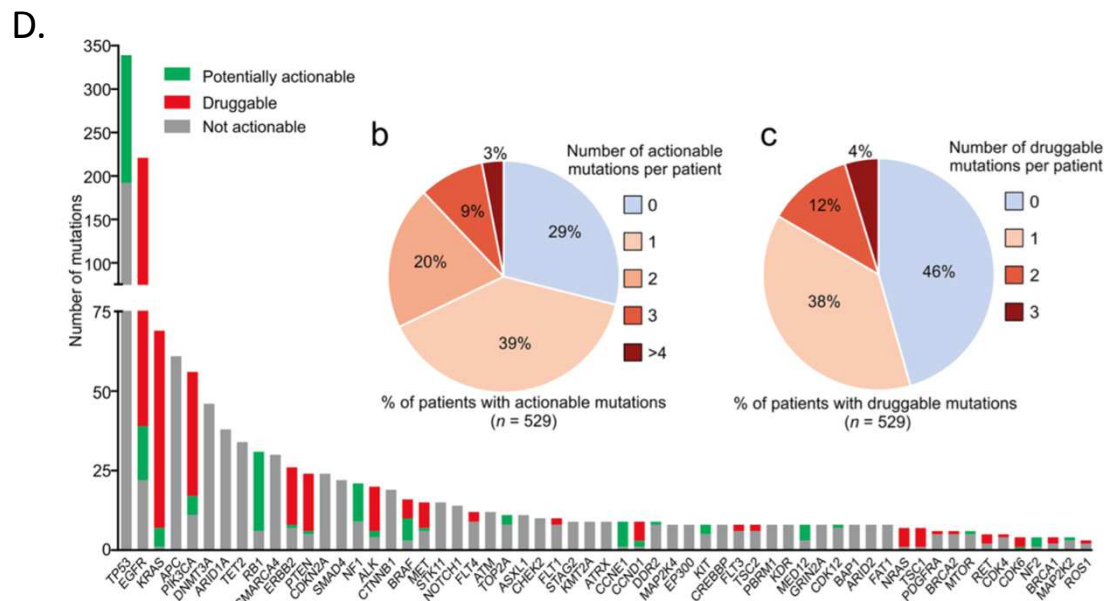
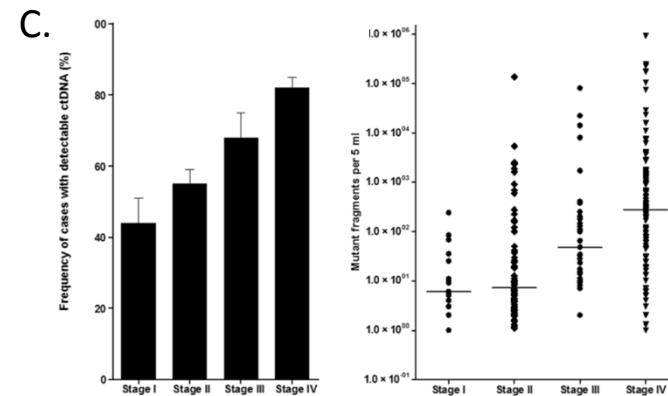
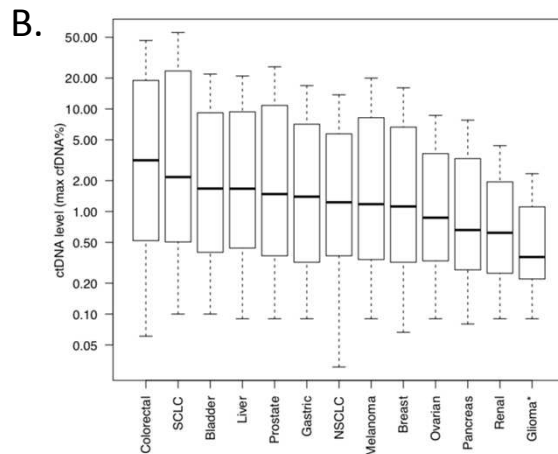
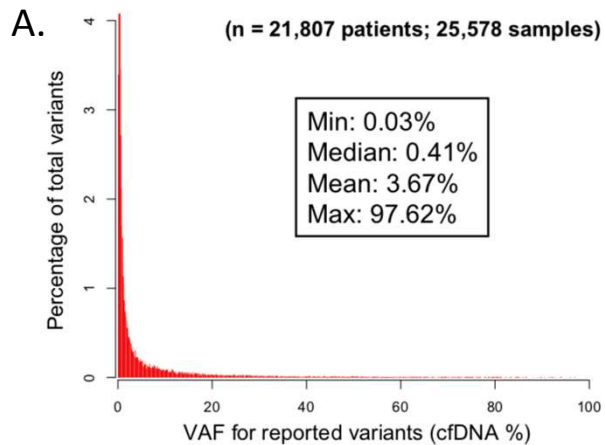


b



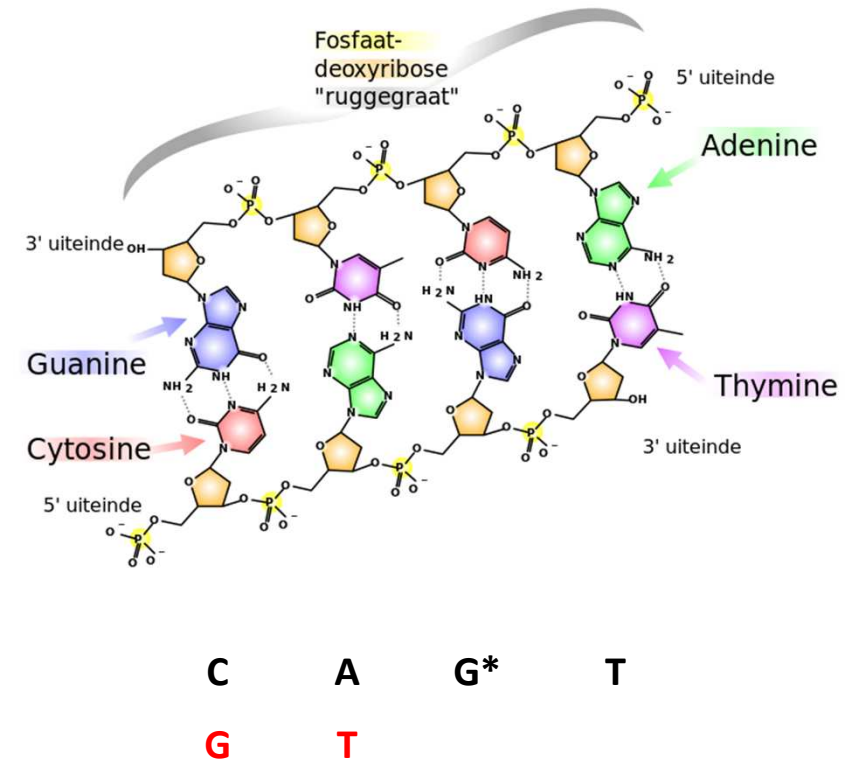
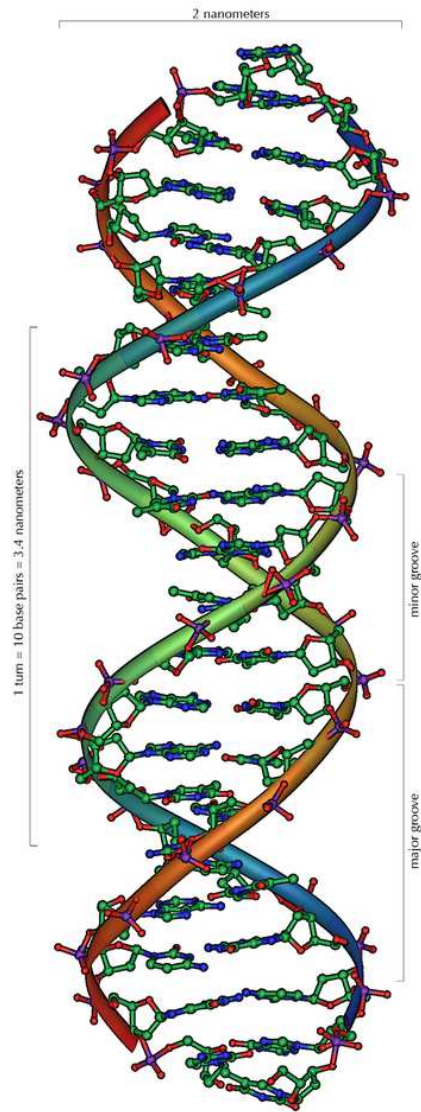
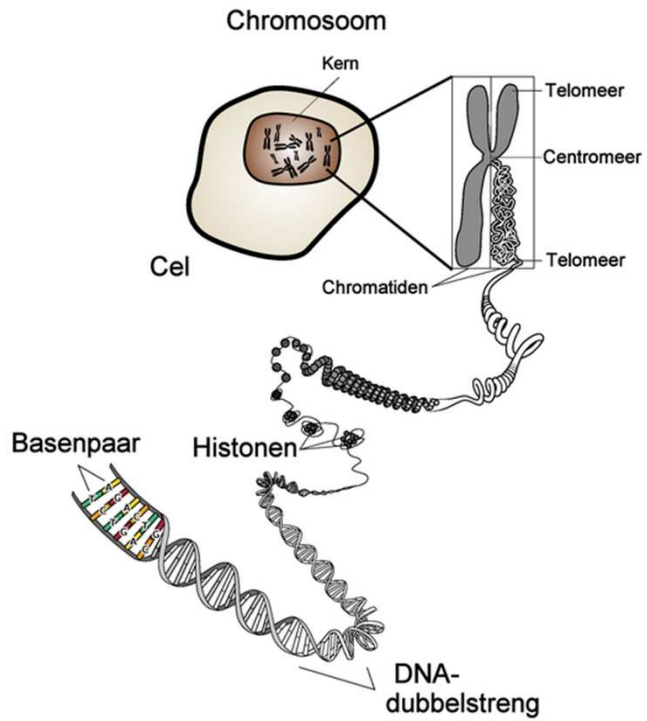
a

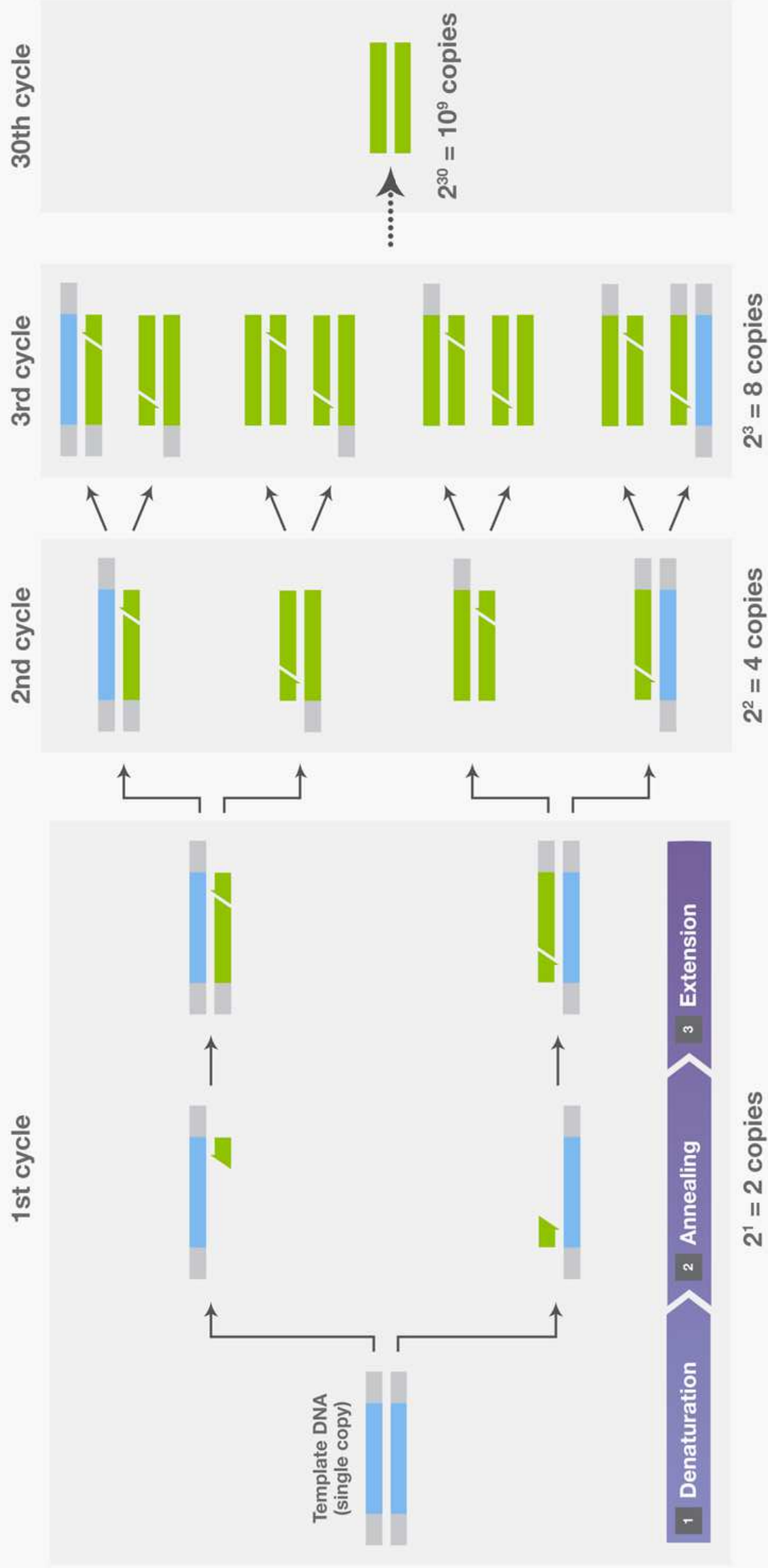




Detectiemethoden voor circulerend (tumor) DNA

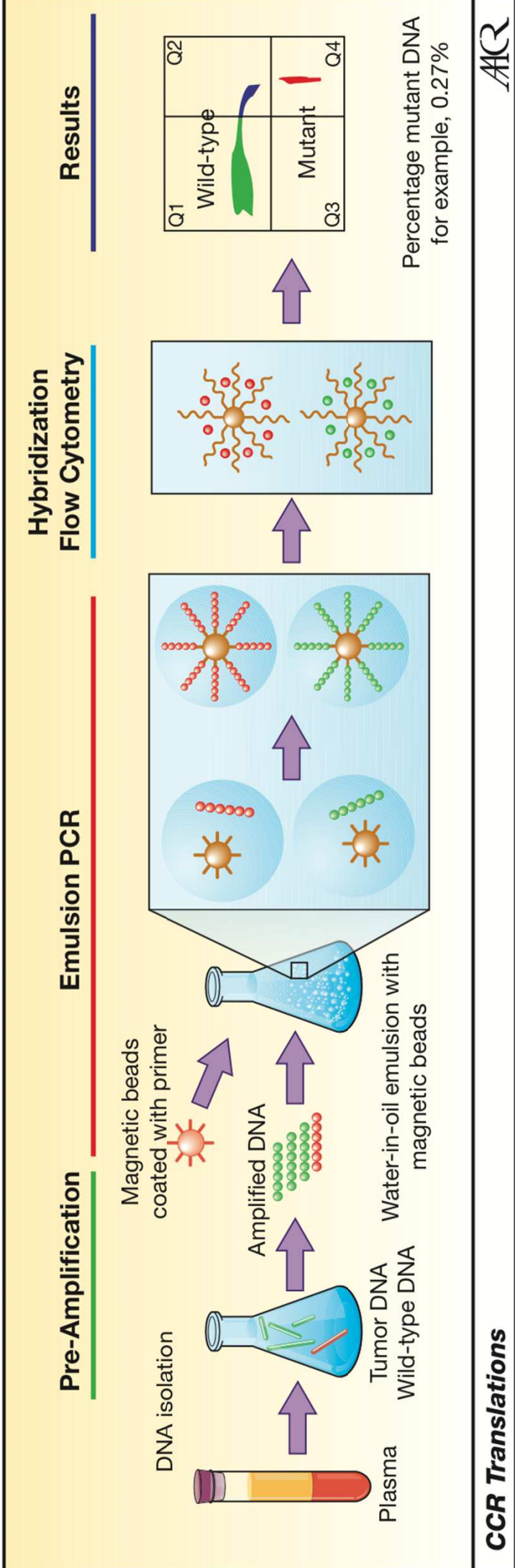
- Belangrijkste voorwaarde: hoge gevoeligheid bij een lage detectielimiet
 - Detectie van kleine fractie ctDNA (i.e. gemiddeld 0.5%) in een achtergrond van niet-tumoraal cfDNA
- Polymerase kettingreactie of “Polymerase Chain Reaction” (PCR)
 - Geïntroduceerd in 1983
 - Techniek die toelaat dat specifieke DNA-fragmenten exponentieel worden vermenigvuldigd
 - Benodigdheden: voorbeeld-DNA (i.e. ctDNA), enzyme dat DNA aanmaakt (i.e. polymerase), een startpunt (i.e. primer), en een gevoelige detectiemethode (i.e. fluorescent signaal)
 - Primer is een kort DNA fragment dat zodanig gekozen wordt dat het in de buurt van een mutatie van interesse ligt (e.g. BRAF c.1799T>A mutatie bij melanoom)
 - Keuze juiste primer is ook belangrijk om de kans op vals positieve bevindingen te minimaliseren





Detectiemethoden voor circulerend DNA

- Detectielimiet van klassieke PCR (+/- 1% mutante kopijen) is te beperkt voor ontwikkeling gevoelige test
 - 1. Beperkte efficiëntie van PCR om lage hoeveelheden specifieke DNA moleculen op te sporen in een wild-type achtergrond
 - 2. Ongevoelige detectiemethoden (e.g. Sanger sequencing, MALDI-TOF)
 - Beperkte verbetering door gebruik van aanrijkmethode of mutatie-specifieke PCR
- Nieuwe biotechnologie: digitale detectiemethoden en "next-gen sequencing"
 - PCR-gebaseerde amplificatie
 - Analyse van fysiek gescheiden individuele DNA-kopijen (e.g. via emulsie of ruimtelijke begrenzing)
 - Gevoelige optica (e.g. flow-cytometer)



Andere limiterende factoren

- Pre-analytische factoren
- Variatie door bemonstering (i.e. “sampling error”)
- Fouten tijdens de analyse (i.e. PCR- en sequenceringsartefacten)
- Biologische en genomische variatie geassocieerd met tumortype (e.g. hersentumoren)
- Biologische en genomische variatie in de populatie
- Mutatietype dat gedetecteerd moet worden

