

3 Hierarchické shlukování proteomických profilů u karcinomu prsu.

Nenutil R.¹, Brožková K.¹, Budínská E.², Bouchal P.^{1,3}, Knoflíčková D.¹, Valík D.¹, Vojtěšek B.¹

1) *Masarykův onkologický ústav v Brně*

2) *Institut Biostatistiky a analýz Masarykovy university v Brně*

3) *Ústav Biochemie Masarykovy university v Brně*

Úvod

Mapování genové exprese v nádorech pomocí DNA mikročipů přineslo významný přelom v našich znalostech o molekulární biologii a taxonomii karcinomu mléčné žlázy. Byly identifikovány genové expresní profily spojené s přítomností hormonálních receptorů, uzlinových metastáz a vysokým rizikem diseminace onemocnění. Existuje snaha využít DNA mikročipy rovněž k predikci odpovědi onemocnění na specifickou hormonoterapii a chemoterapii. Expresní profily cDNA však neposkytují informaci o posttranslačních změnách na úrovni bílkovin a nemohou zachytit celou biologickou složitost procesů, ke kterým v nádorech dochází. Metodickým přístupem, který může rozšířit naše možnosti v tomto směru, je vysokokapacitní proteomické profilování. Dosud nejrozvinutější takovou metodou je paralelní imunohistochemická analýza mnoha markerů na složených tkáňových blocích („tissue microarrays“). Její výsledky potvrdily informace získané shlukováním profilů cDNA exprese, tj. zejména klasifikaci mamárního karcinomu do několika subtypů (luminální A+B, bazální, Her-2). Hierarchické shlukování takto získaných proteinových profilů může mít rovněž prognostický význam. Neodstranitelnou nevýhodou imunohistologického přístupu je však omezení detekce jen na známé proteiny, proti kterým jsou k dispozici protilátky. Pokud chceme zachytit také bílkoviny, o kterých se dosud v této souvislosti neuvažuje, musíme zvolit jinou metodu. Tou může být například SELDI-TOF MS (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionisation Time of Flight Mass Spectrometry). Tato technologie je založena na hmotnostní spektrometrii proteinů navázaných na selektivní povrchy chromatografických čipů a umožňuje simultánní pořízení hmotnostních profilů desítek až stovek vzorků. Profily pak mohou být dale analyzovány bioinformatickými metodami. V naší práci jsme se pokusili o takové zpracování tkáňových vzorků karcinomu prsu.

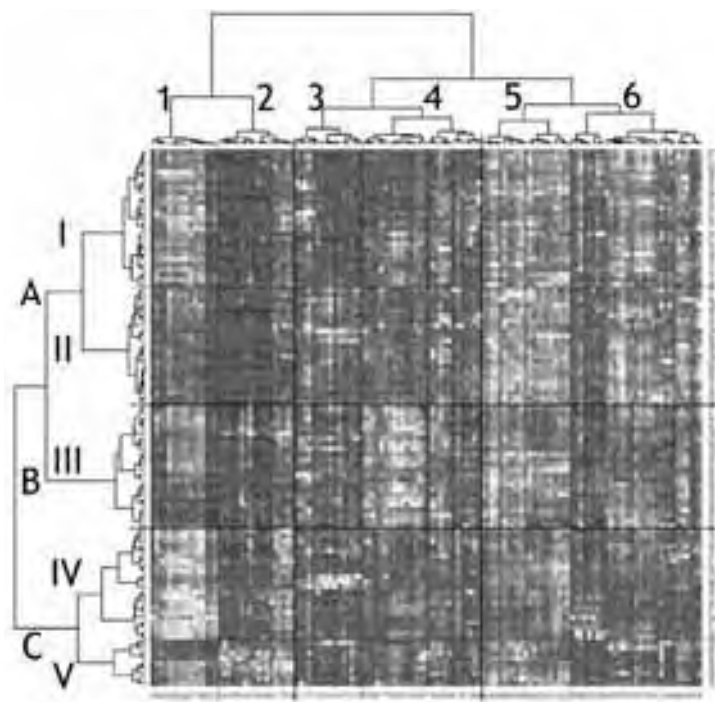
Materiál a metody

Lyzáty ze 105 případů mamárního karcinomu (byly použity nativní tkáň uchovávané hlubokým zmrazením) byly analyzovány SELDI-TOF na čipech IMAC 30 (BioRad) pomocí přístroje ProteinChip Reader Model PBS IIc (Bio-Rad) a software Ciphergen ProteinChip. Z paralelních formolek fixovaných parafinových bloků byly zpracovány složené bloky (TMA), na kterých byla provedena imunohistologická a hybridizační stanovení. Základní klinicko-patologické parametry byly získány ze zdravotnické dokumentace. Proteinová spektra byla zpracována neřízeným hierarchickým shlukováním Wardovou metodou se vzdálenostmi odvozenými ze Spearmannových korelačních koeficientů.

Výsledky

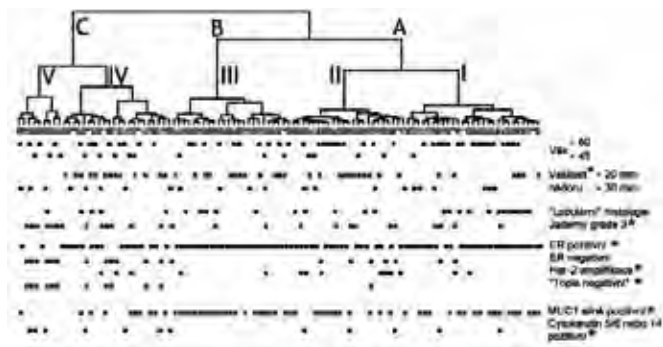
Výstupem neřízeného hierarchického shlukování 130 peaků detekovaných v proteinových spektrech bylo 6 shluků peaků a 3-5 shluků pacientek (Obr. 1).

EXPERIMENTÁLNÍ ONKOLOGIE

**Obr. 1.**

Výsledek hierarchického shlukování. Řádky představují jednotlivé případy, sloupce pak 130 peaků použitých pro analýzu. Intenzita šedé odráží hodnotu peaku. Případy se sdružují do 3 (A, B., C), případně pěti (značeno I až V) skupin.

Klinicko-patologické parametry jsou ve shlucích pacientek nerovnoměrně rozloženy (Obr.2). Nádory starších pacientek s pozitivním estrogenovým receptorem, expresí MUC1 a nízkým jaderným gradem se koncentrují ve shlucích I až III. Ve shluku I přitom převažují lobulární karcinomy. Shluk II obsahuje nádory s vyšší jadernou polymorfií a koncentrují se v něm případy s Her-2 amplifikací. Nádory mladších pacientek s vysokým gradem, případně „triple negativní“ a/nebo s expresí bazálních cytokeratinů jsou častěji ve shlucích IV a zejména V. Pokud bychom toto rozložení srovnávali s výsledky studií klasifikujících cDNA expresní profily, pak by I a III by mohly odpovídat lumenálním karcinomům typu A, skupina II lumenálním karcinomům B, skupina IV pak subtypu Her-2 a skupina V karcinomům bazálního typu.

**Obr. 2.**

Rozložení vybraných klinicko-patologických parametrů proti shlukování pacientek.

Čtverečky znamenají jednotlivé případy. * $p < 0.01$

Závěr

Náš přístup klasifikoval karcinom prsu obdobným způsobem jako shlukování expresních profilů cDNA. Tento fakt svědčí pro to, že proteomický přístup pomocí SELDI-TOF je v principu pro obdobné účely použitelný, může rozšířit naše znalosti o karcinomu prsu a případně vyhledat nové biomarkery.