přehled

ANALÝZA PROFILŮ GENOVÉ EXPRESE U MNOHOČETNÉHO MYELOMU A JEJÍ VÝZNAM V KLINICKÉ ONKOLOGII

ANALYSE OF GENE EXPRESSION PROFILES OF MULTIPLE MYELOMA AND ITS SIGNIFICANCY FOR CLINICAL ONCOLOGY

ŠVÁCHOVÁ H.[1,2,] **HÁJEK R.**[1,3,4]

[1] UNIVERZITNÍ VÝZKUMNÉ CENTRUM – ČESKÁ MYELOMOVÁ SKUPINA (URC-CMG), LF MU BRNO
[2] ODDĚLENÍ GENETIKY A MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE, ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE, PŘF MU BRNO
[3] LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE (LEHABI), OKH, FN BRNO, PMDV
[4] INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO A LF MU BRNO, PMDV

Souhrn
Klinická a genetická heterogenita je charakteristickým rysem mnohočetného myelomu (MM) a navzdory intenzivnímu úsilí o porozumění patogenezi MM, zůstává řada procesů zahrnutá ve vývoji MM neobjasněna. Nové metodologické přístupy, jako je studium profilů genové exprese (GEP), jsou vhodným nástrojem spojujícím klinické výstupy (odpověď na léčbu a přežití) s molekulární a genetickou variabilitou onemocnění. Hlavním úkolem je nyní definovat diagnostický a prognostický význam GEP technologie v klinickém praxi.

Klíčová slova: mnohočetný myelom, microarrays, čipy, profilování genetické exprese (GEP), individualizovaná léčebná strategie.

Summary
Clinical and genetic heterogeneity is a characteristic feature of multiple myeloma (MM). Despite intensive efforts to clarify the pathogenesis of MM, mechanisms of MM development remain enigmatic. Novel methodological approaches, such as gene expression profiling (GEP), are valuable tools in order to link clinical endpoints, such as response to treatment and surfoval, with th molecular and genetic heterogenity of the disease. The main challenge of current studies is to define diagnostic and prognostic relevance of GEP technologies in a clinical management.

Keywords: multiple myeloma, microarrays, chips, gene expression profiling (GEP), individual therapy.

Úvod: Historie microarray profilování MM

Patofyziologie MM je ovlivněna mikroprostředím kostní dřeně a škálou molekulárních signálů, podílejících se na procesech diferenciace B-lymfocytů a plazmatických buněk. Microarray technologie spolu s analýzou profilů genetické exprese nabízí cenný nástroj pro studium těchto procesů a přináší nový pohled na základní molekulární děje postihující vývoj MM *(18)*.

První DNA čip byl vyvinut roku 1989 týmem S. P. A. Fodora spojením fotolitografické technologie, používané při výrobě polovodičů, a syntézy oligonukleotidů *in situ*. Na principu „Fodorova" čipu založila firma Affymetrix v roce 1994 výrobu komerčních čipů pod značkou „GeneChip" *(9)*.

V roce 1995 Mark Schena ze Stanford University, USA představil jiný typ čipu, tzv. komplementární DNA čip neboli zkráceně cDNA čip. V tomto případě byly fragmenty komplementární DNA na sklíčko umístěny pomocí vysokorychlostního robotického tisku *(19)*.

Pro studium MM byly čipové technologie poprvé použity vědeckým týmem De Vose *(6)*. V této práci použili lidské myelomové linie a cDNA mikročipy o nízké hustotě k identifikaci klíčových intracelulárních signálních genů exprimovaných v maligních plazmatických buňkách (PC). Claudio a kolegové (2002) použili kombinaci „high-throughput" DNA sekvenování a microarray analýzy plazmatických buněk pocházejících z různých typů leukémií. Cílem bylo vytvořit komplexní seznam genů exprimovaných u MM. Důležitým mezníkem pro studium GEP bylo zavedení automatizované imunomagnetické separace PC z plné kostní dřeně pomocí monoklonálních protilátek (BB4 – anti-syndecan-1/CD138) a objev metody pro *in vitro* diferenciaci B-lymfocytů periferní krve *(23, 21)*. Od roku 1997 začali tyto „high-throughput" technologie využívat i Shaughnessy a jeho kolegové (Myeloma Institut for Research and Therapy, Arkansas) pro studium biologie a terapie tohoto geneticky velmi komplexního onemocnění. V roce 2000 zahájili analýzu $CD138^+$ PC z kostní dřeně zdravých dárců, nově diagnostikovaných a konečných stadií MM, dále MGUS, SMM (Smoldering multiple myeloma) a pacientů s Waldenströmovou makroglobulinémií. Do dnešních dnů prostudovali více než 5000 případů *(17)*.

Princip metody

Microarray technologie vychází z předpokladu, že množství mRNA pro každý gen v dané buňce odráží, ve většině případů, množství proteinu a tím i biologickou charakteristiku genu *(5)*.

Princip microarrays spočívá v tom, že RNA extrahovaná z tkáně našeho zájmu je přepsaná pomocí reversní-transkripce do cDNA. V protokolech používaných především pro tištěné cDNA mikročipy jsou v tomto kroku do cDNA inkorporovány fluorescenčně značené oligonukleotidy; v protokolech pro oDNA mikročipy je značena cRNA, která vzniká *in vitro* transkripcí z cDNA pomocí T7 RNA polymerázy. V obou případech se značená cDNA nebo cRNA nechává hybridizovat na destičku a intenzita hybridizace k individuálním cDNA fragmentům nebo oligonukleotidům na destičce je zachycena skenerem s vysokým rozlišením. Hybridizační signál je pak použit pro stanovení hladiny exprese každého genu representovaného na destičce *(www.medscape.com)*.
Po detekci, kvantifikaci a normalizaci intenzit signálů pomocí specializovaného softwaru je vytvořen tzv. „gene expression profile" (GEP) analyzovaného vzorku, který pak lze srovnávat s expresními profily dalších vzorků *(13)*.

Typy arrays
Rozlišujeme několik typů microarrays v závislosti na technologii výroby a použitém materiálu. Obecně lze čipy rozdělit na komplementární DNA (cDNA) čipy a „high-density" oligonukleotidové arrays – oligonukleotidové čipy o vysoké hustotě (oDNA).
První typ čipů je vyráběn pomocí vysokorychlostního robotického tisku cDNA fragmentů na neporézní nosič. Každý gen je zde reprezentován dlouhou dvouřetězcovou DNA sondou nebo EST (expressed sequence tags), která je generována pomocí PCR (polymerase chain reaction) *(Schena et al., 1995)*.
cDNA čipy mají řadu výhod i nevýhod. Pozitivem je, že není nutná primární znalost cDNA sekvence, nárůst intenzity signálu pozitivně koreluje s délkou sondy, delší sonda navíc umožňuje nastavit přísnější podmínky a tím snížit intenzitu pozadí, je také cenově výhodnější.
Nevýhoda spočívá v nutnosti udržovat DNA knihovny, může docházet ke cross-hybridizacím a ke kontaminacím cDNA klonů/PCR produktů *(11, 13)*.
Kombinací fotolitografické technologie a „in situ" syntézy DNA jsou vyráběny vysokohustotní oligonukleotidové mikročipy označované jako oDNA mikročipy. Tato technologie byla vyvinuta firmou Affymetrix. Hustota nejnovějších Affymetrix mikročipů je až 1 300 000 oligonukleotidů / 1,25 cm^2 a jsou schopny detekovat expresi více než 47 000 transkriptů. Ve srovnání s cDNA čipy je zde každý gen reprezentován 25 bp oligonukleotidy, což umožňuje navrhnout oligonukleotidové sondy, které budou hybridizovat se specifickým exonem daného genu *(www.affymetrix.com)*.
Další typ čipů vyrábí firma Agilent Technologies, Santa Clara, Californie. Tyto čipy obsahují, na rozdíl od čipů Affymetrix, 60-merní sondy, což zvyšuje citlivost i pro nízká množství transkriptů. Technologie Agilent využívá mnohonásobný skenovací systém, který dále zvyšuje senzitivitu detekce *(www.agilent.com)*.
Účinné a cenově výhodné mikročipy nabízí NimbleGen Systems, Madison, Wisconsin. Jejich čipy jsou vyráběny metodou modifikované fotolitografie s využitím dynamického mikrosklíčka namísto světelné masky (Affymetrix). Nejnovější čipy NimbleGen obsahují více než dva milióny sond. Výhodou těchto čipů je, že kombinují vysokou hustotu a dlouhé 60-merní sondy *(8)*.

Analýza dat
Microarray experiment vytváří velké množství dat, která vyžadují složitou analýzu pomocí sofistikovaných biostatistických nástrojů. Tyto metody lze rozdělit do tří velkých skupin: shlukovací metody, metody pro identifikaci rozdílně exprimovaných genů a klasifikační metody. Cílem shlukovacích metod může být nalezení skupin genů, které vykazují v průběhu experimentu podobné chování, nebo skupin pacientů s podobným expresní profilem. Do druhé skupiny patří metody, jejichž úkolem je vytipovat geny zodpovědné za různé vlastnosti biologických vzorků (t-test a jeho modifikace). Úkolem klasifikačních metod je na základě intenzit genové exprese získaných z experimentu zařadit zkoumaný vzorek do některé z definovaných tříd *(16)*.

Vstupní materiál
Výchozím materiálem jsou plazmatické $CD138^+$ buňky, které jsou získávány imunomagnetickou seperací mononukleární frakce buněk z aspirátů kostní dřeně. Microarray vyžaduje 85 – 95% čistotu. Čistota se hodnotí morfologicky a flowcytometricky na základě exprese $CD38^+$ a $CD45^{/dim}$ *(24)*. Po separaci následuje extrakce RNA, která je většinou prováděna pomocí komerčně dodávaných kitů. Vstupní množství RNA se pohybuje v rozmezí 5 – 40 μg, ale vzhledem k tomu, že jde o klinický materiál, jehož množství je omezeno, je možné vycházet již z množství 1 – 15 μg celkové RNA (0,2 ug – 2 ug mRNA). Malá vstupní množství RNA vyžadují lineární amplifikaci cDNA, která nám umožní „namnožení" cDNA. Zařazením dvoukolové lineární amplifikace nám umožňuje snížit vstupním množství celkové RNA až na 10 – 100 ng [www.affymetrix.com].

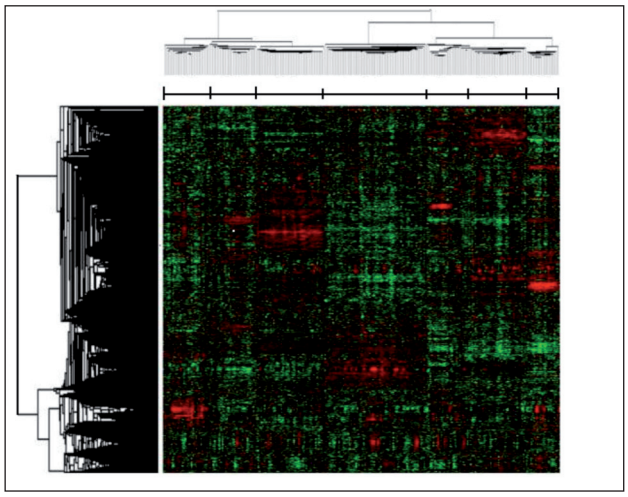
Specifická nastavení u MM
Použití čipové technologie při studiu MM nevyžaduje žádné specifické modifikace postupu, je potřeba pouze splnit již zmíněné požadavky na vstupní materiál a použít vhodné statistické metody pro analýzu dat.

Specifické problémy u MM
Přestože je zřejmé, že microarrays a GEP se stávají významným diagnostickým a prognostickým nástrojem v klinické péči krevních nádorových chorob, je nutné si uvědomit, že metoda má stále svá technologická omezení – neexistuje žádná univerzální microarray, odlišnosti vznikají již při výrobě a v laboratořích, dalším omezením je i vysoká cena.
Rizikovým místem je odběr a zpracování vzorku vyžadující separaci $CD138^+$ plazmatických buněk, kvalifikovaný personál a čas. Otázkou zůstává, do jaké míry ovlivňuje separace buněčné interakce a expresi genů a zda separace eliminuje subpopulaci CD138 negativních buněk. Variabilita může být způsobena i velkým časovým odstupem mezi odběrem a zpracováním vzorku. I po separaci však může být detekována vnitronádorová heterogenita a lze pak těžko určit, zda je daný gen aktivní ve všech buňkách nebo pouze v subpopulaci *(17)*.

Potenciálním problémem je „unsupervised“ hierarchická shlukovací metoda používaná pro statistickou analýzu GEP. Tato metoda využívá informace poskytované všemi geny, které jsou v dané tkáni exprimované. Její nevýhodou je, že vykazuje nízký, ale významný stupeň plasticity, tzn. po zařazení dalšího vzorku či genu do analýzy může dojít k přesunu vzorků z jedné definované podskupiny/klastru do jiné *(13)*.
GEP analýzy jsou limitovány velkou komplikovaností lidského genomu, kterou navíc zvyšuje alternativní sestřih a alelické variace *(17)*.

Studium genové exprese poskytuje užitečné informace pro klinický i základní výzkum, přesto však předkládá do jisté míry zkreslený pohled na genovou expresi a vyžaduje validaci pomocí standardních laboratorních technik (real-time PCR, ELISA) *(17)*.

Ukázka reprezentativního výsledku
Interpretace velkého množství dat z DNA čipů vyžaduje pokročilé statistické nástroje, které jsou schopny podchytit složitost genetických změn v dané tkáni. Jedním z přístupů je „unsupervised“ analýza, která vyhledává podobnosti v expresních profilech mezi jednotlivými vzorky. Příkladem metody, která testuje a vyhledává podobnosti mezi GEP, je „unsupervised“ shlukovací analýza, která poskytuje dendorgramy podobné evolučním stromům *(13)*. Tato metoda byla použita i pro analýzu GEP nově diagnostikovaných pacientů s MM. Výsledkem byl dendrogram se dvěmi hlavními větvemi a 7 podvětvěmi, na jehož základě bylo identifikováno 7 molekulárních podskupin MM (Obrázek č.1). Větve dendrogramu byly významně ovlivněny silně exprimovanými geny. Geny jsou reprezentovány jednotlivými tečkami, kterým jsou během skenování počítačově přiřazovány pseudobarvy. Intenzita signálu pak odpovídá velikosti exprese daného genu *(24)*.



Obrázek č. 1: Dendrogram shlukové analýzy
Exprese genů je v dendrogramu kódovaná barevně. Průměrným hodnotám genové exprese byly po normalizaci intenzit fluorescence přiřazeny pseudobarvy. Zelená barva značí nízkou, červená barva vysokou a černá barva průměrnou expresi genů v daném vzorku. Dendrogram vzorků nahoře a dendrogram genů vlevo odráží vztah mezi vzorky. Větve dendrogramu jsou ovlivněny výraznými shluky silně expriovaných genů. Dendrogram byl převzat a upraven z citace Zha*n et al.* (2006).

Význam metody u MM stávající
Čipové technologie nám nabízí nebývalou příležitost pro lepší pochopení deregulací genové exprese a molekulární podstaty vývoje MM (viz. význam GEP u MM). V současné době byly použity v těchto oblastech výzkumu *(http://myeloma.uams.edu/lambertlab/)*

- rozpoznání kritických genetických změn, které odlišují normální a myelomové buňky
- korelace genetické exprese s klinickým výstupem – definice genetických podskupin
- stanovení genetických změn v nenádorových buňkách kostní dřeně
- sledování změn v genové expresi v nádorových a nenádorových buňkách kostní dřeně v odpovědi na léčbu
- identifikace změn v genové expresi asociovaných s vývojem lékové rezistence
- nalezení genetických a biochemických drah, které mohou být cílem nových chemoterapeutik
- porozumění mechanizmu vzniku kostních lézí

Význam metody u MM očekávaný
V poslední době jsme svědky nástupu farmakogenomických metod, mezi něž patří právě microarrays, které umožňují sledovat efekt podávané látky na úrovni celého genomu, tedy transkriptomu *(20)*. S rostoucím počtem nových léků pro léčbu MM narůstá i potřeba přesně definovat jejich optimální užívání dle farmakogenomických zásad, tedy individualizovat léčbu tak, aby u pacientů s lepší prognózou byla minimalizována toxicita, u pacientů s horší prognózou to znamená včasné zahájení specifické vysokodávkové (high dose) terapie *(25)*. Současné klinické prognostické parametry však nejsou dostačující pro rozpoznání nejrizikovějších skupin pacientů. Předpokládá se, že genomika s GEP by mohla být novým prognostickým a prediktivním nástrojem pro klinickou odpověď a toxicitu asociovanou s novými léky (bortezomib, lenalidomid, melphalan, thalidomid a další imunomodulátory) *(3, 14)*. Zhan et al. (2008) vytvořili na základě GEP nový stratifikační model rozdělující pacienty v relapsu po léčbě bortezomibem nebo high dose dexametazonem do rizikových skupin. Ukázalo se, že tento model je schopný identifikovat nejrizikovější skupiny i u nově diagnostikovaných pacientů léčených následně high dose terapií a zdá se být nezávislý na různých formách léčby. Předpokládá se, že tento model je schopný identifikovat pacienty, kteří jsou obecně necitliví k současně používaným lékům nebo jejich kombinacím.
Výstupy ze současných klinických studií nám umožňují vytvořit seznamy genů, které by mohly sloužit jako potenciální prediktory rezistence a odpovědi na léčbu, a dokonce by mohly vést k vytvoření zákaznických arrays, které by sloužily jako základ pro optimální léčebnou strategii u pacientů s MM *(10)*.

Závěr
Microarray technologie jsou velmi cenným nástrojem poskytujícím důkladný pohled na mechanismy zahrnuté ve vývoji B-lymfocytů a plazmatických buněk a jejich fyziologické interakce s dalšími buněčnými populacemi,

obzvláště v mikroprostředí kostní dřeně *(7)*. Je patrné, že genomika hraje významnou roli v základním a preklinickém výzkumu a její význam roste i v klinickém výzkumu, méně jasné je, kdy a jak se čipové technologie začnou uplatňovat i v rutinní diagnostice. Vše bude záviset na ceně, uživatelské nenáročnosti technologie a také na existenci vhodných statistických nástrojů pro zpracování dat.

Poděkování
Práce byla podpořena projekty MŠMT LC06027 a MSM0021622434.

Literatura

1. http://www.affymetrix.com/index.affx (Version Date: 1-16-2006).
2. http://www.agilent.com (© Agilent 2000-2008)
3. Broyl A, Hose D, Knegt de Y et al. In Haematologica. Vyd. Vol. 92(s2). Pavia (Italy) : Ferrata-Storti foundation, 2007. ISBN 0390-6078, s. 65. 25.7.2007, Kos Island, Greece.
4. Claudio JO, Masih-Khan E, Tang H et al. A molecular kompendium of genes expressed in multiple myeloma. Blood 2002, 100:2175-2186
5. Dahlgaard JO, Dybkaer K, Johnsen HE. A novel Chemo Sensitivity Index for Melphalan Based on Gene Expression Profilig (GEP). Session Type: Publication Only. Program and abstracts of the American Society of Hematology's 49th Annual Meeting, December 8-11, 2007, Atlanta, GA.
6. De Vos J, Couderc G, Tarte K et al. Identifying intercellular signaling genes expressed in malignant plasma cells by usány complementary DNA arrays. Blood 2001;98:771-780.
7. De Vos J, Hose D, Rème T et al. Microarray-based understanding of normal and malignant plasma cells. Immunol Rev. 2006 Apr; 210:86-104.
8. Eisenstein M. Microarray quality control. Nature. London: Aug 31, 2006. Vol. 442, Iss. 7106; p. 1067
9. Fodor SP, Read JL, Pirrung MC, Stryer L et al. Light-directed,spatially addressable parallel chemical synthesis. Science 1991, 251(4995): 767-773.
10. Kumar S. Microarray analysis to predict response to Thalidomide and the IMIDs. In Haematologica. Vyd. Vol. 92(s2). Pavia (Italy) : Ferrata-Storti foundation, 2007. ISBN 0390-6078, s.9-10. 25.7.2007, Kos Island, Greece.
11. Lausted C, Dahl T, Warren C et al. POSaM: a fast, flexible, open-source, inkjet oligonucleotide synthesizer and microarrayer. 2004;5(8):R58. Epub 2004 Jul 27.
12. http://www.medscape.com/home (Medscape General Medicine 5(3), 2003.© 2003Medscape)
13. Merkerová , Kráčmarová A, Bruchová H, Brdička R.Využití biočipových technologií v onkologii. Klinická onkologie, Brno: ApS Brno, spol.s r.o., 19, 12/2006, 2006. ISBN 0862-495X, s. 333-337.
14. Mulligan G, Mitsiades C, Bryant B et al. Gene expression profilig and correlation with autcome in clinical trials of the proteasome inhibitor bortezomib.Blood.2007;109:3177-3188.
15. http://myeloma.uams.edu/lambertlab/
16. Pavlák T., Jarkovský J.: Statistické metody v analýze dat z DNA mikročipů. Klinická onkologie, Brno: ApS Brno, spol.s r.o., 19, 12/2006, 2006. ISBN 0862-495X, s. 365-368.
17. Shaughnessy JD Jr, Barlogie B. Interpreting the molecular biology and clinical behaviour of multiple myeloma in the kontext of global gene expression profilig. Immunol Rev. 2003 Aug;194:140-63.
18. Shaughnessy JD Jr. Clinical use of genomics in multiple myeloma. Clin Adv Hematol. Oncol. 2006 Jun; 4(6):419-21.
19. Shena M, Heller RA, Theriault, TP et al. Microarrays: Biotechnology's discovery platform for functional genomics. Trends in Biotechnology 1998, 16: 301-306.
20. Šeda O, Šedová L. Farmakogenomika a nutrigenomicka: Komplexní interakce genů s prostředím.Klin Farmakol Rarm.2005;19:116-120.
21. Tarte K, De Vos J, Thykjaer T et al. Generation of polyclonal plasmablasts from peripheral blood B cells: a normal counterpart of malignant plasmablasts. Blood 2002;100:1113-1122.
22. Zhan F, Hardin J, Kordsmeier B et al. Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bonemarrow plasma cells. Blood 2002;99:1745–57.
23. Zhan F, Tian E, Buml et al. Gene expression profilig of human plasma cell differentiation and classification of multiple myeloma basen on similarities to distinct stages of late stage B-cell development. Blood 2003; 101:1128-1140.
24. Zhan R, Juany Y, Colla S, Stewart JP, Hanamura I, Gusta S, Epstein J, Yaccoby S, Sawyer J, et al.The molecular classification of multiple myeloma. Blood. Sep 2006;15;108(6):2020-8.Epub 2006 May 25.
25. Zhan F, Barlogie B, Mulligan G et al. High-risk myeloma: a gene expression based risk-stratification model for newly diagnose multiple myeloma treated with high-dose tharapy is predictive of outcome in relapsed disease treated with single-agent bortezomib or high-dose dexamethasone.Blood.2008;111:968-969.