

## NOVÉ MOŽNOSTI V DIAGNOSTICE KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU S VYUŽITÍM TECHNOLOGIE DNA MIKROČIPŮ

### NEW POSSIBILITIES IN COLORECTAL CARCINOMA DIAGNOSTICS USING DNA MICROARRAYS

JANSOVÁ E.<sup>1</sup>, KRONTORÁD P.<sup>1</sup>, SVOBODA Z.<sup>1</sup>, PAVLÍK T.<sup>2</sup>, KOUTNÁ I.<sup>1</sup>, KOZUBEK M.<sup>1</sup>, ŽALOUĐÍK J.<sup>3</sup>, KOZUBEK S.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> FAKULTA INFORMATIKY MU BRNO

<sup>2</sup> PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA MU BRNO

<sup>3</sup> LÉKAŘSKÁ FAKULTA MU BRNO

<sup>4</sup> BIOFYZIKÁLNÍ ÚSTAV AVČR BRNO

**Souhrn:** *Východiska:* Technologie DNA mikročipů patří mezi nejmodernější biotechnologie zaznamenávající v posledních letech velký rozvoj. Tato technologie umožňuje porovnání expresních profilů zkoumaných vzorků a je tak vhodná k diagnostice různých onemocnění na genové úrovni. *Typ studie a soubor:* Cílem této práce bylo porovnat genovou expresi kolorektálního karcinomu s normálním epitelem a detekovat rozdíly v expresi genů mezi pacienty s regionálními metastázemi a bez metastáz. Studie byla provedena na skupině 12 pacientů s kolorektálním karcinomem. *Metody a výsledky:* Expresní profil pacientů byl studován na 1.7K Human cDNA mikročipech obsahujících 1700 fragmentů lidské cDNA. Mezi kolorektálním karcinomem a zdravým epitelem tlustého střeva bylo nalezeno 22 genů s odlišnou expresí. Pomocí klastrové analýzy byli pacienti rozděleni na 2 skupiny podle výskytu metastáz v lymfatických uzlinách a mezi těmito dvěma skupinami pacientů bylo identifikováno celkem 6 genů se změněnou expresí. *Závěr:* cDNA microarray technologii bude možné v budoucnu použít jako diagnostický nástroj ke stanovení, včasnému a přesnému rozpoznání onemocnění na základě expresního profilu pacienta. Geny vytipované pomocí cDNA mikročipů v našich experimentech mohou být v budoucnu součástí diagnostických mikročipů pro analýzu nádorů tlustého střeva.

**Klíčová slova:** cDNA mikročipy; microarray technologie; klastrová analýza; nádor tlustého střeva; metastáze v lymfatických uzlinách

**Summary: Backgrounds:** In the last decade various new technologies in medicine and molecular biology have been developed, among others cDNA microarray technology. The cDNA microarray technology enables comparison of expression profiles of tested samples and it is convenient for diagnostics of diseases on gene level. **Design and Subject:** The aim of this study was comparison of gene expression of colorectal carcinoma and colon epithelium and detection of differences in expression profiles of patients with regional metastases and non-metastatic patients. The study was performed on a group of 12 patients with colorectal carcinoma. **Methods and Results:** 1.7K Human cDNA microarrays containing 1700 fragments of human cDNA were used for determination of expression profiles of patients. We have found 22 genes with altered expression in colorectal carcinoma as compared with normal tissue. Using hierarchical clustering, patients were divided into two groups according to occurrence of regional metastases: patients with regional metastases and non-metastatic patients. These two groups differed in expression of 6 genes. **Conclusion:** cDNA microarray technology, based on the detection of changes in the expression profiles, provides easier, quicker and more effective diagnostics of various diseases. In future, genes found by cDNA microarrays in our experiments could constitute a part of the newly developed colon cancer diagnostics chips.

**Key words:** cDNA microarray technology; cluster analysis; colorectal cancer; regional metastases

## Úvod

Nádory tlustého střeva patří mezi nejčastější onemocnění trávicího traktu. Navíc, první místo ve světových statistikách výskytu kolorektálního karcinomu zaujímá Česká republika. Riziko vzniku tohoto onemocnění roste po 45. roce života. Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) je četnost nádorů u věkové skupiny do 45 let dána poměrem 2 případy na 100 000 obyvatel, u věkové skupiny nad 75 let je to již 300 případů na 100 000 obyvatel za rok. Ročně je diagnostikováno téměř 7 500 nových případů výskytu tohoto onemocnění a více než 4 000 pacientů s tímto onemocněním každoročně umírá.

Karcinomy tlustého střeva patří do skupiny zhoubných epitelálních nádorů, které se v průběhu svého vývoje nejprve šíří ve sliznici, později prorůstají střevní stěnou, v dalším vývoji buňky pronikají do lymfatických cest a vytvářejí metastázy v lymfatických uzlinách, naposledy pronikají do krevních cév

a vytvářejí vzdálené metastázy. Převážná většina (90 %) těchto nádorů vzniká sporadicky a na jejich vznik mají vliv faktory okolního prostředí, dietetické zvyklosti a vnitřní prostředí střeva. Dědičné formy nádorů tlustého střeva (10 %) jsou často spojeny s Familiární adenomatózní polypózou (FAP) nebo Hereditární nepolypózní rakovinou tlustého střeva. Mutace zodpovědné za tyto syndromy jsou především mutace APC genu (FAP) a genů „mismatch“ reparace DNA (HNPCC) [1,2]. Průměrný věk detekce těchto onemocnění se pohybuje okolo 40 let. U pacientů s FAP je možné nalézt zvýšený výskyt polypů (stovky až tisíce), z nichž některé s velkou pravděpodobností podléhají maligní transformaci. HNPCC sice není spojen s výskytem prekurzorových adenomů, patří však k nádorům s velkou genetickou nestabilitou spojenou s rychlou progresí nádoru. Vzhledem k frekvenci výskytu onemocnění a jeho vážnosti je nutné provádět u pacientů pečlivý screening. V dnešní době s přibývajícím počtem nových zhoubných one-

mocnění roste potřeba jejich včasné diagnostiky a navržení odpovídající léčby pacienta. V této oblasti se dostává v posledním desetiletí do popředí zájmu tzv. cDNA microarray technologie umožňující monitorování exprese několika tisíc genů současně a napomáhá tak k odhalení genetické podstaty onemocnění. Tato technologie je založena na využití malých čipů nesoucích na svém povrchu fragmenty cDNA schopné specificky interagovat s cDNA získanou přepisem RNA izolovaného z pacientů. První studie využívající tuto technologii byly prováděny na akutní leukemii, lymfomech a nádorech prsu [3-8]. Řada studií byla prováděna i na nádorech tlustého střeva [9-15].

## Cíl práce

Využití cDNA microarrays technologie ke sledování rozdílů genové exprese nádoru tlustého střeva v porovnání s normální epiteliální tkání a dále rozlišení pacientů s výskytem regionálních metastáz od pacientů, u nichž žádné metastázy v lymfatických uzlinách nejsou patrné. Pomocí této technologie jsme se pokusili vytýpat potenciální možné nádorové a metastatické markery, které by bylo možné použít pro včasnou diagnostiku a klasifikaci onemocnění.

## Materiál a metody

### Vzorky tkání a microarrays

Vzorky kolorektálního karcinomu a zdravé tkáně tlustého střeva byly získány z pacientů Masarykova onkologického ústavu v Brně a Fakultní nemocnice Brno. Vzorky tkání byly okamžitě po chirurgickém vyjmutí zmrazeny a uskladněny při  $-80^{\circ}\text{C}$ . Získaná tkáň byla homogenizována (Polytron System PT 1200CL) a byla z ní izolována celková RNA pomocí TRI REAGENT (Sigma). RNA pak byla následně přečištěna s využitím RNeasy Mini Kit (Qiagen). Takto získaná RNA byla rozpuštěná v superčisté vodě bez DNáz a RNáz. Tato metoda izolace je modifikací protokolu pro izolaci super čisté RNA [16]. Pro kontrolu hybridizačního procesu byla použita *Arabidopsis* cDNA získaná z pArab plasmidu (the UHN Microarray Centre) pomocí *in vitro* transkripce (T7 Transcription kit, Fermentas; *SacI*, Fermentas; T4 DNA Polymerase, Fermentas). Jako společná reference pro srovnávání pacientů vzájemně mezi sebou byla použita Human colon total RNA (Clontech).

V této studii byly použity Human H1.7k4 mikročipy (Clinical Genomic Centre (CGC), Toronto, Ontario, Canada) obsahující 1718 fragmentů lidské cDNA, pozitivní kontroly (fragmenty genu pro *Arabidopsis* chlorophyll syntetázu). Celkový počet spotů na mikročipu byl 3840.

### Příprava sond, hybridizace a odmytí

Pro každý experiment bylo potřeba 10-20  $\mu\text{g}$  celkové RNA získané z pacienta. Tato RNA byla v průběhu RT-PCR přepsána do jednořetězové cDNA a současně naznačena pomocí fluorescenčních barev (nádorová Cy5-dCTP, zdravá Cy3-dCTP) (Amersham) pomocí Oligo(dT) primeru (Anchored) a SuperScript II reverzní transkriptázy (Invitrogen). Takto získaná cDNA pak byla hybridizována na mikročip při  $37^{\circ}\text{C}$  přes noc a odmyta (protokol the OCI Microarray Centre, 2000). Expresní obraz byl získán měřením fluorescence pomocí scanneru ScanArray Express V2.0 (PerkinElmer).

### Semikvantitativní RT-PCR

Vzorky celkové RNA byly nejdříve přepsány do jednořetězové cDNA pomocí oligo(dT) primeru (Anchored) a SuperScript II reverzní transkriptázy (Invitrogen). Získaná cDNA byla použita pro následnou PCR amplifikaci. Každá PCR reakce probíhala v objemu 50  $\mu\text{l}$  master mixu s 1mM  $\text{MgCl}_2$  a Tag DNA polymerázy 5 minut při  $94^{\circ}\text{C}$  (počáteční denaturace), následovalo 35 cyklů: 30s při  $94^{\circ}\text{C}$ , 30s při  $58^{\circ}\text{C}$ , a 1.5 min při  $72^{\circ}\text{C}$ , v PCR systému (PTC-100MJ, Research, Inc.). Sekvence primerů použitých pro RT-PCR byly: FTL forward, 5'-ATGAGCTCCCAGATTCGTCAG-3', reverse, 5'-GCTT-

GAGAGTGAGCCTTTCG-3'; NNMT forward, 5'-AGACCTGCTGATTGACATCGG-3', reverse, 5'-GTCAGTGACGACCTCCTTAA-3'; WNT2 forward, 5'-CATGGTGGTACATGAGACTAC-3', reverse, 5'-GGCAAATACACTCCAGCTGAG-3'; MT1B forward, 5'-CCTGACTCTCATATCTTGCC-3', reverse, 5'-GTGTTTTATTGTCTTTTACA-3'.

### Analýza obrazu a zpracování dat

K analýze obrazových dat jsme použili dva programové balíky. Spotfinder vyvinutý institutem TIGR ([www.tigr.org](http://www.tigr.org)), ve kterém je implementován Otsuův segmentační algoritmus (hledání prahové hodnoty) [17]. Proces segmentace se spouští na obdélníkové mřížce, kterou je nutno nastavit ručně s malou asistencí programu. Každému spotu patří jeden obdélník v mřížce. Program vyžaduje na uživateli zadat minimální a maximální počet pixelů, které mohou tvořit spot. Na výstup pak Spotfinder vrátí sumu intenzit všech pixelů tvořících daný spot, od které je odečtena aproximace intenzity pozadí (pixelů z obdélníku, které mají podprahovou intenzitu).

Druhým programem použitým pro analýzu obrazu byl Spot, vyvinutý institutem CSIRO jako skript ve statistickém jazyce R. Ve Spotu je implementován algoritmus SRG (Seeded Region Growing) [18], jež principem vychází ze známého algoritmu Watershed [19]. V důsledku to znamená, že oblast, kterou SRG přisoudí danému spotu, je vždy spojitá. I Spot aproximuje intenzitu pozadí, kterou vypočítává z malých oblastí okolo nalezeného spotu. Na výstup Spot vrací průměr a medián popředí (oblast spotu) a pozadí.

Dalším důležitým krokem při analýze je rozpoznání systematických odchylek v intenzitách fluorescence mezi vzorky na jednom sklíčku a mezi jednotlivými sklíčky navzájem a následná oprava těchto odchylek, které nejsou připisovány biologickým rozdílům mezi vzorky, ale jsou způsobeny různými vlastnostmi fluorescenčních barviček, scannerem, atd. pomocí procesu zvaného normalizace.

Při normalizaci dat jsme nejdříve použili regresní metodu LOWESS (locally weighted scatterplot smoothing) pro lokální normalizaci [20-23]. Tuto metodu jsme prováděli pro celé sklíčko a následně lokálně mezi jednotlivými subgridy. Umožnila nám vypočítat intenzitní a prostorový bias. Vyhlažovací parametr byl nastaven na 0,33.

Dále bylo nutné použít scale normalizaci, protože sklíčka měla různé stupnice a to by mohlo vést k nesprávným rolím, když jsou porovnávány. Pro scale normalizaci jsme použili metodu Standard deviation [21]. Vhodným škálovacím faktorem je rozptýl pro určité sklíčko dělené geometrickým průměrem rozptýlů všech sklíček. Nakonec jsme použili Slice analysis filtr [21], který smaže geny, jejichž z-score je mimo zajímavý rozsah. K vyhodnocení našich experimentálních dat jsme použili program MIDAS (TIGR), který má implementovány všechny výše zmíněné metody.

Po analýze obrazu a normalizaci získaných dat byla provedena statistická analýza. Geny, které se exprimovaly rozdílně mezi zdravou a nádorovou tkání, byly identifikovány pomocí t-testu a statistické metody SAM [24] (<http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM>). Vzhledem k párovému uspořádání dat byl použit jednovýběrový t-test s  $\alpha = 0,01$ , přičemž jsme testovali, jestli  $M = \text{průměrný } \log_2(R/G)$  se významně liší od nuly, s dodatečnou podmínkou, že  $|M|$  musí být větší než 0,5. V softwaru SAM (Excel verze 1.21) byla data hodnocena jako „one class data“ s počtem permutací 5000, chybějící hodnoty byly doplněny metodou 10-nejbližších sousedů. Pro data ze Spotfinderu byla stanovena hranice  $\Delta = 1,8$  a pro data ze Spotu  $\Delta = 1,9$ .

Dalším cílem našeho experimentu byla identifikace genů rozdílně exprimovaných mezi pacienty bez metastáze a s metastázou, proto byl použit SAM software a dvouvýběrový t-test ( $\alpha = 0,01$  a  $|M| > 0,5$ ). SAM software byl použit jako „two class unpaired data“ s počtem permutací 5000. Chybějící hod-

noty byly dopočítány pomocí metody řádkového průměru, naše hranice  $\Delta$  byla stanovena pro minimální hodnotu odhadu FDR jako  $\Delta = 0,45$ .

Několik nejvýznamnějších genů pak bylo použito pro shlukování pacientů bez metastázy a s metastází, přičemž byla použita shlukovací metoda k-průměru (pro  $k = 2$ ) a hierarchické shlukování.

## Výsledky

Studie expresního profilu nádoru tlustého střeva byla prováděna na skupině 12 pacientů (tab. 1), která zahrnovala 6 mužů (50%) a 6 žen (50%) u nichž byl diagnostikován kolorektální karcinom. Studovaná skupina zahrnovala 6 pacientů s výskytem regionálních metastáz (Dukes' C) a 6 pacientů, u nichž žádné metastázy detekovány nebyly (Dukes' B a A). Průměrný věk pacientů činil 67 let. Expresní profil pacientů byl monitorován pomocí cDNA mikročipů, umožňujících sledovat expresi až několika tisíc genů současně a poskytující tak komplexní pohled na vývoj a stádium onemocnění pacientů. Při monitorování rozdílů v expresi kolorektálního karcinomu a normálního epitelu byly na cDNA mikročipy nanášeny fluorescenčně označené vzorky cDNA nádorové tkáně (Cy5-dCTP) a vzorky cDNA zdravého epitelu (Cy3-dCTP) vždy ze stejného pacienta. Tím byl získán pacientův celkový expresní profil. Pro porovnání pacientů s rozdílnou diagnózou bylo nutné zařadit do experimentu společnou referenci, kterou byla cDNA získaná z epitelu tlustého střeva zdravých jedinců (Clontech). V tomto případě byly na mikročipy nanášeny společně vzorky cDNA nádorové tkáně (Cy5-dCTP) a vzorky referenční cDNA (Cy3-dCTP). Analýza cDNA mikročipů spočívala v několika po sobě následujících krocích. Nejprve byla provedena analýza obrazu pomocí dvou softwarů pro analýzu obrazu SpotFinderu a Spotu. Získaná data bylo nutné nejprve znormalizovat, aby došlo k vyrovnání systematických rozdílů v intenzitě různých barev, které nebyly způsobené biologickými rozdíly ve vzorcích a dále následovala statistická analýza pomocí t-testu, SAM metody a HCL metody.

Tabulka č. 1: Charakteristiky pacientů.

Pacient č.	Věk	Pohlaví	TNM klasifikace	Dukes diagnóza	Lokalizace
1	65	žena	T:2 N:1 M:X	Dukes C	ascending colon
2	59	muž	T:3 N:1 M:X	Dukes C	rectum
3	66	muž	T:3 N:1 M:X	Dukes C	rectum
4	61	žena	T:2 N:0 M:X	Dukes A	rectum
5	64	žena	T:3 N:1 M:X	Dukes C	rectum
6	74	žena	T:4 N:1 M:X	Dukes C	cecum
7	50	muž	T:3 N:1 M:X	Dukes C	rectum
8	74	muž	T:3 N:0 M:X	Dukes B	rectosigmoid junction
9	57	žena	T:3 N:0 M:X	Dukes B	sigmoid colon
10	80	žena	T:3 N:0 M:X	Dukes B	sigmoid colon
11	91	muž	T:3 N:0 M:X	Dukes B	cecum
12	64	muž	T:3 N:0 M:X	Dukes B	rectum

V první fázi experimentu byly sledovány změny v expresi mezi kolorektálním karcinomem a normálním epitelem. V tomto případě byly cDNA microarray data analyzovány pomocí metody SAM a t-testu, který byl kombinován s metodou HCL. Metoda HCL umožnila rozdělit pacienty na dvě skupiny podle výskytu metastáz v lymfatických uzlinách. Statistické metody t-test a SAM umožnily vytipování genů, které by mohly sloužit jako markery specifické pro kolorektální karcinom. Při monitorování rozdílů v expresi mezi normálním epitelem tlustého střeva a kolorektálním karcinomem bylo nalezeno celkem 22 genů s odlišnou expresí. 4 geny vykazovaly zvýšenou expresi v nádorové tkáni oproti zdravé a 18 genů mělo expresi v nádoru sníženou (tab. 2).

Tabulka č. 2: Seznam genů se změnou expresí v nádoru tlustého střeva oproti zdravému epitelu.

Accession number	Unigene ID	Symbol	Název genu
<b>Geny se sníženou expresí v nádoru tlustého střeva</b>			
AA046143	Hs.80776	PLCD1	phospholipase C, delta 1
AI027434	Hs.264509	LOC51326	ARF protein
AW025250	Hs.191979	KIAA1733	RPEL repeat containing 1
BF218768	Hs.184326	CDC10	CDC10 cell division cycle 10 homolog (S. cerevisiae)
BG531969	Hs.81892	KIAA0101	KIAA0101 gene product
N77287	Hs.47913	F10	coagulation factor X
N79851	Hs.46440	SLC21A3	solute carrier organic anion transporter family, member 1A2
R01959	Hs.78683	USP7	ubiquitin specific protease 7 (herpes virus-associated)
R06555	Hs.19718	PTPRU	protein tyrosine phosphatase, receptor type, U
R14146	Hs.75652	GSTM5	glutathione S-transferase M5
R20063	Hs.169750	TPR	translocated promoter region (to activated MET oncogene)
R23802	Hs.1376	HSD11B2	hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 2
R59684	Hs.75379	SLC1A3	solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 3
R81039	Hs.3745	MFGE8	milk fat globule-EGF factor 8 protein
T74000	Hs.78943	BLMH	bleomycin hydrolase
T74462	Hs.352018	TAP1	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)
W03376	Hs.364345	NNMT	nicotinamide N-methyltransferase
W25194	Hs.75372	NAGA	N-acetylgalactosaminidase
<b>Geny se zvýšenou expresí v nádoru tlustého střeva</b>			
H21130	Hs.183800	RANGAP1	RAN binding protein 1
N77157	Hs.62	PTPN12	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 12
T99684	Hs. 90073	CSE1L	CSE1 chromosome segregation 1-like (yeast)
W45012	Hs.183650	CRABP2	cellular retinoic acid binding protein 2

Tabulka č. 3: Seznam genů navržených jako potenciální markery regionálních metastáz.

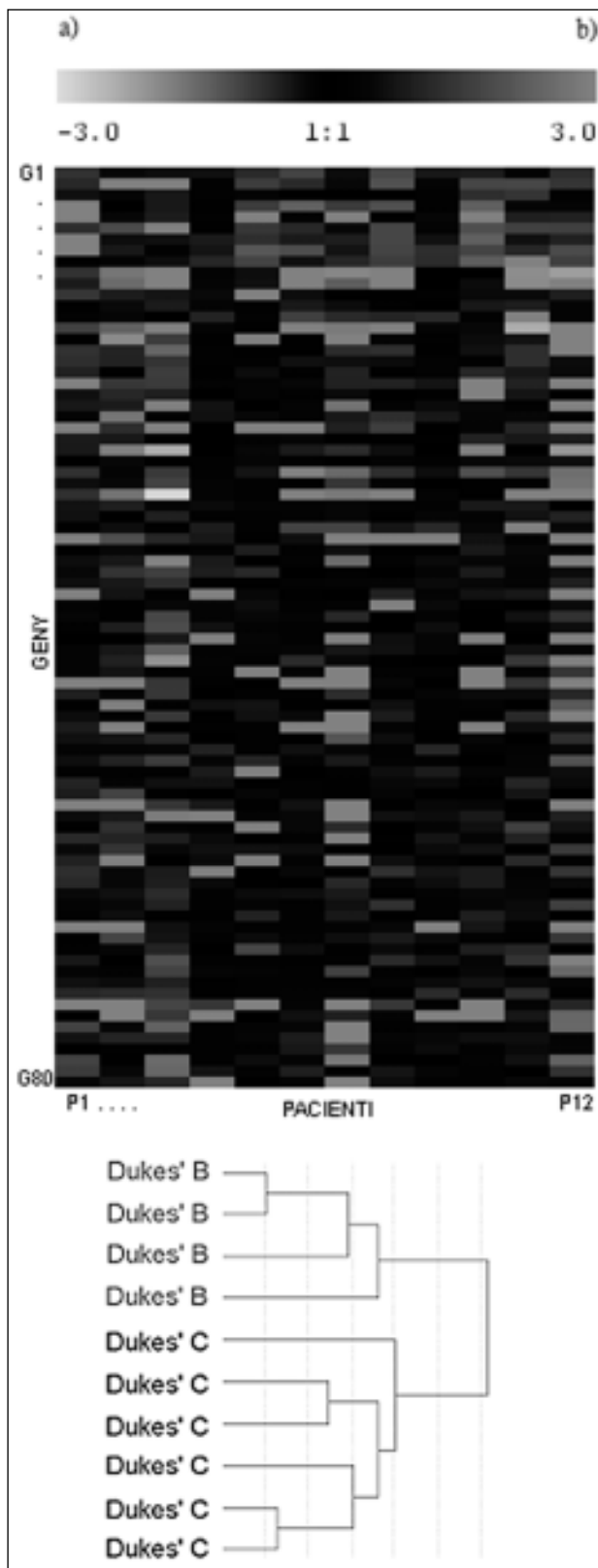
Accession number	Unigene ID	Symbol	Název genu
AA010908	Hs.348401	LCAT	lecithin-cholesterol acyltransferase
AA156696	Hs.77054	BTG1	B-cell translocation gene 1
AI889525	Hs.26670	MGC17330	HGFL gene
H82390	Hs.180911	RPS4Y	ribosomal protein S4, Y-linked
W42478	Hs.119403	HEXA	hexosaminidase A (alpha polypeptide)
W60777	Hs.181418	KIAA0152	KIAA0152 gene product

V další fázi experimentu bylo využito získané rozdělení pacientů pomocí HCL na dvě skupiny: pacienti s výskytem regionálních metastáz a pacienti bez výskytu metastáz. Tato diagnostika byla ověřena pomocí histopatologické zkoušky.

Při porovnávání expresního profilu pacientů s metastázemi a pacientů bez metastáz bylo nutné použít společnou referenci. Statistická analýza byla provedena opět pomocí metody SAM a t-testu. Podařilo se nám identifikovat 6 genů (tab. 3), které měly expresi lišící se mezi těmito dvěma skupinami pacientů.

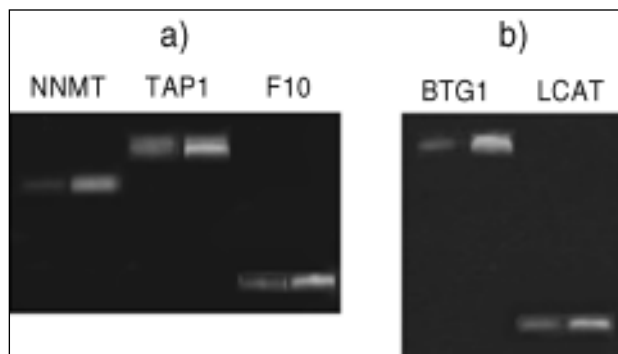
Těchto vybraných 6 genů (markerů pro regionální metastázy)

**Obr. 1.** Statistická analýza cDNA mikročipů. a) ukázka expresních profilů přibližně 80 genů u pacientů s kolorektálním karcinomem získaná pomocí softwaru MeV (TIGR); b) klastrogram vzorků kolorektálního karcinomu s regionálními metastázemi a bez metastáz získaný pomocí „two-sample“ t-testu, vytvořený na základě detekovaných potenciálních metastatických markerů.



následně sloužilo jako vstupní data pro další následnou klastrovou analýzu. Tato analýza umožnila na základě rozdílů exprese v normální a nádorové tkáni u jednotlivců rozdělit paci-

**Obr. 2.** Verifikace změny exprese u vybraných genů detekovaných cDNA mikročipy pomocí RT-PCR (2% agarózový gel). a) geny s odlišnou expresí mezi nádorovou tkání (nalevo) a normálním epitelem (napravo); b) geny se změněnou expresí u pacientů s regionálními metastázemi (napravo) a bez metastáz (nalevo).



enty na 2 skupiny: pacienti s metastázemi v lymfatických uzlinách a pacienti bez detekovatelných metastáz. (obr. 1).

Pro ověření výsledků cDNA microarray experimentů jsme použili RT-PCR, kterou jsme provedli na vzorcích 6 pacientů. Z 22 genů s rozdílnou expresí mezi nádorovou tkání a normálním epitelem jsme vybrali 3 geny (NNMT, F10, TAP1), které vykazovaly sníženou expresi v nádoru. Pomocí RT-PCR byla tato změna exprese potvrzena. Také byla provedena RT-PCR dvou genů s odlišnou expresí mezi pacienty s metastázemi v lymfatických uzlinách a bez metastáz. Jednalo se o geny BTG1 a LCAT, které vykazovaly zvýšenou expresi u pacientů s regionální metastázi. I v tomto případě byla pomocí RT-PCR potvrzena změna exprese v těchto genech (obr. 2).

#### Diskuse

V této práci jsme se pokusili o porovnání expresního profilu 12 pacientů s kolorektálním karcinomem a detekci změn v genové expresi mezi pacienty s metastázemi v lymfatických uzlinách a pacienty bez metastáz. Experimenty byly prováděny na 1,7K Human cDNA mikročipech, které obsahovaly 1700 fragmentů lidské cDNA. Cílem této práce bylo využití cDNA microarrays technologie pro diagnostiku kolorektálního karcinomu, vzhledem k jejím možnostem poskytnout komplexní pohled na expresní profil pacienta. Podařilo se nám identifikovat celkem 22 genů s odlišnou expresí mezi zdravým epitelem tlustého střeva a kolorektálním karcinomem a pomocí klastrovací analýzy rozdělit pacienty na dvě skupiny, které bylo možno identifikovat jako skupinu s regionálními metastázemi a bez nich. 18 genů vykazovalo sníženou expresi v nádoru a 4 geny zvýšenou expresi v nádoru. Skupina down-regulovaných genů zahrnovala geny, jejichž produkty jsou zapojeny v signálních drahách, regulaci buněčného cyklu a regulaci transkripce jako např. PLCD1 gen kódující fosfolipázu C, která hydrolyzuje fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát ( $PIP_2$ ) na diacylglycerol (DAG) a inositol-1,4,5-trisfosfát ( $IP_3$ ) a je tak součástí základních signálních drah. Dalším zástupcem je USP7 gen kódující ubiquitin specifickou proteázu, která hraje roli ve stabilizaci p53 a je důležitá pro tumor supresorovou funkci p53. Mezi skupinu genů se zvýšenou expresí v nádoru byly zařazeny geny kódující proteiny spojené se signálními drahami např. aktivitou RAS proteinů a aktivací MAP kinázových kaskád (RANGAP1) nebo produkty zapojené v remodelaci chromatinu jako např. CRABP2, který negativně ovlivňuje deacetylaci histonů vazbou na kyselinu retinovou.

Při porovnávání expresního profilu pacientů s detekovaným výskytem regionálních metastáz a pacientů bez metastáz, se nám podařilo identifikovat 6 genů, které mají mezi těmito dvěma skupinami pacientů odlišnou expresi. Tyto geny jsou spojeny s buněčnou proliferací, diferenciací a základním metabolismem, např. gen LCAT nacházející se na 16 chromosomu kódující lecitin-cholesterol acyltransferázu, gen kódující ribo-

somální protein S4 (RPS4Y) na chromosomu Y nebo HGFL gen na chromosomu 22 kódující hepatocytární růstový faktor. Tyto geny pak sloužily jako markery pro následnou klastrovou analýzu zaměřenou na detekci metastáz u pacientů. Sledováním změn v expresi genů u nádoru tlustého střeva pomocí cDNA mikročipů se zabývá řada známých laboratoří [9-12]. Častým problémem microarray experimentů je jejich obrazová a statistická analýza neboť různé softwary pro analýzu dat a různé statistické metody vedou k různým výsledkům. V naší práci jsme se proto pokusili o vyhodnocení cDNA mikročipů pomocí dvou softwarů pro analýzu obrazu (SpotFinder a Spot) a dvou statistických metod (t-test, SAM). Výsledky prezentované v této práci jsou průnikem všech možných kombinací analýzy obrazu a statických metod. Při porovnání námi identifikovaných genů a výsledků prezentovaných jinými autory je možné konstatovat, že spolu částečně korespondují a současně přinášejí novy způsob možnosti analýzy dat cDNA mikročipů, který umožnil identifikaci několika nových potenciálních markerů kolorektálního karcinomu a přidružených metastáz.

## Závěr

Pomocí cDNA mikročipů byly porovnány expresní profily nádoru tlustého střeva a zdravého epitelu. Podařilo se nám identifikovat 22 genů se změněnou expresí mezi nádorovou a zdravou tkání. Pomocí klastrové analýzy se nám podařilo vybrat 6 genů, které rozdělují pacienty podle výskytu regionálních metastáz a prokázat funkčnost těchto markerů. Nový přístup v diagnostice kolorektálního karcinomu spočívá ve využití cDNA microarrays k vytipování genů, které se liší svou expresí ve zkoumaných vzorcích a mohou tak být potenciálními markery onemocnění. Takto vytipované geny lze pak využít v klastrové analýze, kde na základě jejich specifické exprese, jsou pacienti rozděleni do jednotlivých skupin podle typu (stádia) onemocnění. Tuto technologii by bylo možné v budoucnu využít v klinických laboratořích pro včasnou a přesnou diagnostiku onemocnění.

*Práce vznikla za podpory grantu IGA MZ ČR NC6987-3.*

## Literatura

1. R.S. Cotran, V. Kumar, T. Collins, Robbins Pathologic Basis of Disease, six ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1999.
2. E. R.Fearon, B.Vogelstein, A genetic model for colorectal tumorigenesis, Cell 61 (1990) 759-767.
3. S. Chu, J. DeRisi, M. Eisen, J. Mulholland, D. Botstein, P.O. Brown, I. Herskowitz, The transcriptional program of sporulation in budding yeast, Science 282 (1998) 699-705.
4. P.T. Spellman, G. Sherlock, M.Q. Zhang, V.R. Iyer, K. Anders, M.B. Eisen, P.O. Brown, D. Botstein, B. Futcher, Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization, Mol. Biol. Cell 9 (1998) 3273-3297.
5. M.B. Eisen, P.O. Brown, DNA arrays for analysis of gene expression, Methods Enzymol. 303 (1999) 179-205.
6. A.A. Alizadeh, M.B. Eisen, R.E. Davis, C. Ma, I.S. Lossos, A. Rosenwald, J.C. Boldrick, H. Sabet, T. Tran, X. Yu, J.I. Powell, L. Yang, G.E. Marti, T. Moore, J. Jr. Hudson, L. Lu, D.B. Lewis, R. Tibshirani, G. Sherlock, W.C. Chan, T.C. Greiner, D.D. Weisenburger, J.O. Armitage, R. Warnke, R. Levy, W. Wilson, M.R. Grever, J.C. Byrd, D. Botstein, P.O. Brown, L.M. Staudt, Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling, Nature 403 (2000) 503-511.
7. C.M. Perou, S.S. Jeffrey, M. van de Rijn, C.A. Rees, M.B. Eisen, D.T. Ross, A. Pergamenschikov, C.F. Williams, S.X. Zhu, J.C. Lee, D. Lashkari, D. Shalon, P.O. Brown, D. Botstein, Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96 (1999) 9212-9217.
8. C.M. Perou, T. Sorlie, M.B. Eisen, M. van de Rijn, S.S. Jeffrey, C.A. Rees, J.R. Pollack, D.T. Ross, H. Johnsen, L.A. Akslen, O. Fluge, A. Pergamenschikov, C. Williams, S.X. Zhu, P.E. Lonning, A.L. Borresen-Dale, P.O. Brown, D. Botstein, Molecular portraits of human breast tumours, Nature 406 (2000) 747-752.
9. D.A. Notterman, U. Alon, A.J. Sierk, A.J. Levine, Transcriptional gene expression profiles of colorectal adenoma, adenocarcinoma, and normal tissue examined by oligonucleotide arrays, Cancer Res. 61 (2001) 3124-3130.
10. K. Birkenkamp-Demtroder, L.L. Christensen, S.H. Olesen, C.M. Frederiksen, P. Laiho, L.A. Aaltonen, S. Laurberg, F.B. Sorensen, R. Hagemann, T.F. Orntoft, Gene expression in colorectal cancer, Cancer Res. 62 (2002) 4352-4363.
11. T.T. Zou, F.M. Selaru, Y. Xu, V. Shustova, J. Yin, Y. Mori, D. Shibata, F. Sato, S. Wang, A. Olaru, E. Deacu, T.C. Liu, J.M. Abraham, S.J. Meltzer, Application of cDNA microarrays to generate a molecular taxonomy capable of distinguishing between colon cancer and normal colon, Oncogene 21 (2002) 4855-4862.
12. O. Kitahara, Y. Furukawa, T. Tanaka, C. Kihara, K. Ono, R. Yanagawa, M.E. Nita, T. Takagi, Y. Nakamura, T. Tsunoda, Alterations of gene expression during colorectal carcinogenesis revealed by cDNA microarrays after laser-capture microdissection of tumor tissues and normal epithelia, Cancer Res. 61 (2001) 3544-3549.
13. P. Platzer, M.B. Upender, K. Wilson, J. Willis, J. Lutterbaugh, A. Nosrati, J.K.V. Willson, D. Mack, T. Ried, S. Markowitz, Silence of chromosomal amplifications in colon cancer, Cancer Res. 62 (2002) 1134-1138.
14. P. Hegde, R. Qi, R. Gaspard, K. Abernathy, S. Dharap, J. Earle-Hughes, C. Gay, N.U. Nwokekeh, T. Chen, A.I. Saeed, V. Sharov, N.H. Lee, T.J. Yeatman, J. Quackenbush, Identification of tumor markers in models of human colorectal cancer using a 19,200-element complementary DNA microarray, Cancer Res. 61 (2001) 7792-7797.
15. H.M. Lee, G.H.Jr. Greeley, E.W. Englander, Age-associated changes in gene expression patterns in the duodenum and colon of rats, Mech Ageing Dev. 122 (2001) 355-371.
16. Baelde H. J.: High quality RNA isolation from tumours with low cellularity and high extracellular matrix component for cDNA microarrays: application to chondrosarcoma. Journal of Clinical Pathology 54: 778-782, 2001.
17. N. Otsu, A threshold selection method from gray-level histograms, IEEE Trans. Syst. Man, Cybern.9 (1979) 62-66.
18. R. Adams, L. Bischof, Seeded region growing, IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.16 (1994) 641-647.
19. S. Beucher, Watersheds of functions and picture segmentation, ICASSP 82, Proc. IEEE Intern. Conf. on Acoustics, Speech and Signal Processing, Paris, 3-5 May 1982.
20. J. Quackenbush, Microarray data normalization and transformation, Nat. Genet.32 (2002) 496-501.
21. W. S. Cleveland, Robust locally-weighted regression and smoothing scatterplots, J. Am. Stat.Assoc. 74 (1979) 829-836.
22. Y.H. Yang, S. Dudoit, P. Luu, D.M. Lin, V. Peng, J. Ngai, T.P. Speed, Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation, Nucleic Acids Res. 30 (2002) e15.
23. I.V. Yang, E. Chen, J.P. Haseman, W. Liang, B.C. Frank, S. Wang, V. Sharov, A.I. Saeed, J. White, J. Li, N.H. Lee, T.J. Yeatman, J. Quackenbush, Within the fold: assessing differential expression measures and reproducibility in microarray assays, Genome Biol. 3 (2002) research 0062.1-0062.12.
24. V.G. Tusher, R. Tibshirani, G. Chu, Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98 (2001) 5116-5121.