

## PILOTNÍ STUDIE IDENTIFIKACE PROGNOSTICKÝCH MARKERŮ U PACIENTŮ S KOLOREKTÁLNÍM KARCINOMEM ANALÝZOU PROFILŮ GENOVÉ EXPRESE

### IDENTIFICATION OF COLORECTAL CANCER PROGNOSTIC MARKERS BY GENE EXPRESSION PROFILES ANALYSIS: PILOT STUDY

SLABÝ O.<sup>1</sup>, GARAJOVÁ I.<sup>2</sup>, SVOBODA M.<sup>2</sup>, FABIAN P.<sup>1</sup>, SVOBODA M.<sup>1</sup>, SROVNAL J.<sup>3</sup>, ŠMERDOVÁ T.<sup>1</sup>, KOČÁKOVÁ I.<sup>2</sup>, ŠEFR R.<sup>2</sup>, JECH Z.<sup>4</sup>, HOCH J.<sup>4</sup>, a VYZULA R.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, ODDĚLENÍ KLINICKÉ A EXPERIMENTÁLNÍ PATOLOGIE, BRNO

<sup>2</sup> MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, KLINIKA KOMPLEXNÍ ONKOLOGICKÉ PÉČE LF MU, BRNO

<sup>3</sup> FAKULTNÍ NEMOCNICE OLOMOUC, DĚTSKÁ KLINIKA, LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ MEDICÍNY, OLOMOUC

<sup>4</sup> FAKULTNÍ NEMOCNICE V MOTOLE, CHIRURGICKÁ KLINIKA 2. LÉKAŘSKÉ FAKULTY UK, PRAHA

#### Souhrn

Kolorektální karcinom je jedním z nejčastěji se vyskytujících nádorových onemocnění. Bohužel, významná část pacientů v klinických stádiích II a III umírá do pěti let po radikálním chirurgickém zákroku následkem progresu onemocnění. Racionální přístup k indikaci adjuvantní léčby pro tyto pacienty nabízí molekulární charakterizace jejich rizika napříč oběma klinickými stádii pomocí technologie DNA čipů. Do studie byly zařazeny biptické vzorky dvanácti pacientů s histologicky potvrzeným kolorektálním karcinodem (K RK) v klinickém stádiu II a III tvořené minimálně ze 70% maligními buňkami. Šest pacientů mělo dobrou prognózu s délkou bezpříznakového přežití (DFS) delší než 36 měsíců, šest mělo špatnou prognózu s DFS kratším než 36 měsíců. Pomocí nízkohustotních oligonukleotidových makročipů společnosti SuperArray určených k relativní kvantifikaci exprese 128 genů potenciálně zapojených do procesu metastazování, byly identifikovány profily genové exprese primárních K RK všech 12 pacientů. Analýzou expresních profilů pomocí t-testu ( $\alpha = 0,01$ ) a metody SAM jsme identifikovali 10 genů rozdílně exprimovaných (9 up-regulovaných, 1 down-regulovaný) v primárních nádorech pacientů se špatnou prognózou. Naše výsledky nasvědčují, že technologie nízkohustotních oligonukleotidových makročipů je užitečnou pomůckou pro lepší pochopení molekulární podstaty progresu nádorového onemocnění a zlepšení predikce metastatického potenciálu primárních nádorů u pacientů s lokoregionálně pokročilým kolorektálním karcinodem.

**Klíčová slova:** kolorektální karcinom, DNA čipová technologie, profily genové exprese, prognóza

#### Summary

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common malignancies. Unfortunately, a significant proportion of surgically cured patients in the early stage of the disease develop progression and die from the disease. Twelve patients who had histologically confirmed left-sided colon adenocarcinoma with a volume fraction showing at least 70% of malignant tumor cells were included. Only stage II-III patients according to IUCG with no prior chemotherapy or radiotherapy were eligible for the study. Six patients were poor prognosis cases with disease free survival (DFS) lower than 36 month and six were good prognosis cases with DFS > 36 month. Relative gene expression levels of 128 genes potentially involved in cancer progression and dissemination were obtained by low-density oligonucleotide microarrays (SuperArray Bioscience Corp., Bethesda, MD) from 12 primary colon cancer samples. Gene expression data analysis based on the SAM and t-test ( $\alpha = 0,01$ ) methods identified 10 genes with significantly different expression in primary tumors of patients with poor prognosis. Our preliminary data suggest that oligonucleotide microarray technology should contribute to a better understanding of the progression of colorectal cancer, and facilitate prediction of their metastatic potential.

**Key words:** colorectal cancer, DNA microarray technology, gene expression profiles, pathogenesis, prognosis

## Úvod

Kolorektální karcinomy (KRK) patří v České republice k nejčastějším nádorovým onemocněním. Poslední publikovaná data udávají jejich roční incidenci 78 případů a mortalitu 41 případů na 100.000 obyvatel. To naši zemi řadí na první místo v Evropě a jedno z předních míst ve světě. V léčbě tohoto onemocnění i přes vzrůstající náklady není dosahováno uspokojivých výsledků. Jedním z důvodů je skutečnost, že pacienty v klinickém stádiu II (pT3-pT4, pN0) a III (pT2-pT4, pN+) po radikálním chirurgickém zákroku není možné s dostatečnou senzitivitou rozdělit na skupinu s vysokým a nízkým rizikem relapsu onemocnění a následně pro ně vytvořit individuální léčebný plán. Přibližně 20-30% pacientů v klinickém stádiu II umírá do pěti let na progresi onemocnění, protože nebyli na základě současně používaných diagnostických kritérií (histologická klasifikace, grade, klinický rozsah, ojedinělé molekulární markery) vyhodnoceni jako riziková z hlediska progresu onemocnění a nedostali potřebnou adjuvantní chemoterapii. U pacientů v klinickém stádiu III (k progresi dochází přibližně u 50%) je situace opačná. Naprostá většina pacientů po chirurgickém zákroku absoluuje adjuvantní chemoterapii, přestože celkové přežití významně zlepšuje pouze u 10-20% těchto pacientů a ostatní prochází zatěžující chemoterapeutickou léčbou bez zřetelného benefitu. Tyto skutečnosti mají samozřejmě význam také z hlediska farmakoekonomiky. Je tedy zřejmé, že současná kritéria pro stanovení prognózy u pacientů v klinickém stádiu II a III nemají z hlediska predikce relapsu a celkového přežití dostatečnou informativní hodnotu. Racionální přístup k indikaci adjuvantní léčby nabízí molekulární charakterizace vysoce rizikové podskupiny napříč pacienty v obou klinických stádiích pomocí technologie DNA čipů [1].

Nadějně výsledky přinesla studie zaměřená na hledání nových prognostických markerů relapsu onemocnění s využitím oligonukleotidových mikročipů Affymetrix U133a. Na souboru 74 pacientů ve stádiu Dukes B (stádium II) byla identifikována sada 23 genů, která na nezávislém validačním souboru 36 pacientů predikovala relaps s přesností 78% ( $p = 0,0001$ ) [2]. DNA mikročipy byly použity také k vytvoření molekulárního stagingu kolorektálních karcinomů. Pro 78 vzorků kolorektálních karcinomů byly získány expresní profily pomocí 32,000 cDNA mikročipů (TIGR), z nichž se pomocí klastrové analýzy podařilo identifikovat sadu 43 genů, která umožňovala nezávisle na klinické klasifikaci rozdělit pacienty na dvě prognostické skupiny ve vztahu k celkovému přežití. Při cross-validaci byla tato sada genů, obsahující mimo jiné také geny pro osteopontin a neuregulin, schopná předpovědět 36 měsíční přežití s přesností 90% ( $p < 0,001$ ) [3]. Retrospektivní studii zaměřenou na predikci relapsu onemocnění provedl na souboru 25 pacientů klinického stádia Dukes C (stádium III), u kterých byl jedinou léčebnou modalitou radikální chirurgický zákrok Arango a kol. (2005). Získaný klasifikátor tvořený 17 geny byl schopný při cross-validaci správně zařadit 88% pacientů a rozdělit je z hlediska dlouhodobého DFS na hladinu pravděpodobnosti ( $p < 0,0001$ ) [4].

Studie založené na technologii vysokohustotních oligonukleotidových nebo DNA mikročipů prokázaly velice dobré analytické vlastnosti, bohužel s minimálním průnikem mezi nalezenými genovými sadami. Srovnatelnost a reprodukovatelnost těchto studií je naneštěstí významně ovlivněna jejich technologickou rozmanitostí a výsledky, kterých bylo pomocí nich dosaženo nelze považovat za konkluzivní [5]. Předpokládáme, že pro naše účely bude vhodnější zaměřit se na sledování konkrétních biologických procesů spojených s invazivitou a diseminací charakterizovaných pomocí sady genů již dříve popsanych u jiných typů nádorů. Na stejném předpokladu je založena například práce Nosha a kol. (2005) zaměřená na porovnání expresních profilů kolorektálních adenomů

a časných stádií karcinomů pomocí nízkohustotního cDNA makročipu [6]. Pro naši studii jsme se proto rozhodli použít nízkohustotní oligonukleotidové makročipy společnosti SuperArray určené k relativní kvantifikaci exprese 128 genů potenciálně zapojených do procesu metastazování.

Cílem studie je získání expresních profilů prognosticky odlišných skupin pacientů s kolorektálním karcinomem v klinickém stádiu II a III pomocí oligonukleotidových makročipů, jejich porovnání a identifikace genů se signifikantně rozdílnou expresí mezi skupinami pacientů s různou prognózou. Tento přístup je založen na předpokladu, že pozdější vysoce invazivní a metastatický fenotyp kolorektálních karcinomů je detekovatelný již v primárních karcinomech pacientů s lokoregionálním postižením tj. v klinickém stádiu II a III [7]. Detekce tohoto specifického molekulárního profilu by v budoucnu mohla sloužit k individualizaci terapie u pacientů s kolorektálním karcinomem [8].

## Materiál a metody

### *Soubor pacientů*

Do studie bylo zařazeno 12 pacientů ve věku 52-76 let v době diagnózy s histologicky potvrzeným sporadickým kolorektálním adenokarcinomem v klinickém stádiu II a III dle IUCC (pT3-pT4, pN0 nebo pT2-pT4, pN+), kteří podstoupili chirurgický zákrok v Masarykově onkologickém ústavu v letech 2001 až 2005 (viz. tabulka č. 1). Pacienti byli rozděleni do dvou skupin z hlediska prognózy na základě parametru disease free survival (DFS). Šest pacientů mělo dobrou prognózu (DFS > 36 měsíců, medián 43), šest pacientů špatnou prognózu (DFS < 36 měsíců, medián 13).

### *Izolace a kontrola kvality RNA*

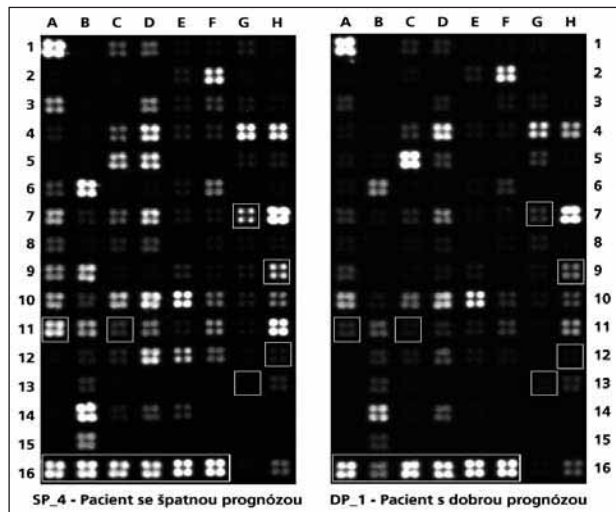
Bioptický materiál byl ihned po chirurgickém vyjmutí zamrazen a uskladněn při -80°C do dalšího zpracování. Celková RNA byla izolována pomocí TriReagentu (MRC, Research, USA) dle doporučení výrobce, v některých případech přečištěna na kolonkách užitím kitu ArrayGrade<sup>a</sup> (SuperArray Bioscience Corp.). Čistota byla ověřena spektrofotometricky a nekontaminovaná RNA ( $A_{260}/A_{280} > 2$ ;  $A_{260}/A_{230} > 1,7$ ) byla dále zpracována. Intergrita RNA byla kontrolována metodou kapilární gelové elektroforézy přístrojem Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Pouze nefragmentovaná RNA charakterizovaná hodnotou RIN (RNA Integrity Number) vyšší než 7 byla použita pro další analýzy [9].

### *Zpracování oligonukleotidových makročipů (Oligo GEArrays)*

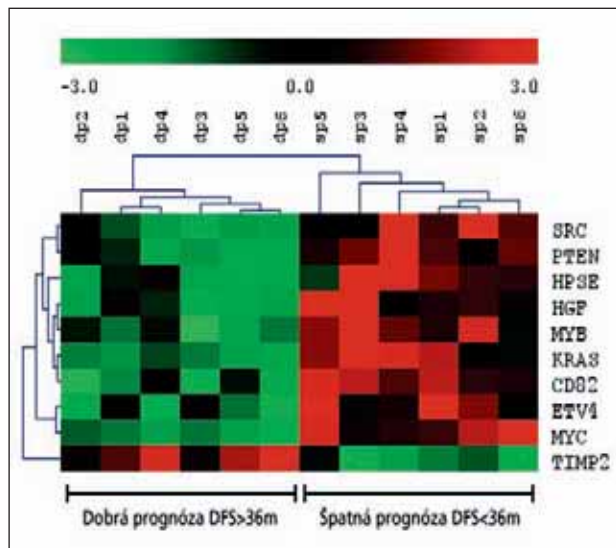
K získání expresních profilů jsme použili nízkohustotní oligonukleotidové makročipy společnosti SuperArray Tumor Metastasis Oligo GEArray (OHS-028) určené k relativní kvantifikaci exprese celkem 128 genů potenciálně zapojených do procesu nádorové invazivity a metastazování (geny související s buněčnou adhezí, extracelulární matrix, angiogenezi, regulací buněčného cyklu, apoptózou). K lineární amplifikaci ~3 µg intaktní RNA každého vzorku a jejímu značení biotinem-16-UTP (Enzo Life Sciences) jsme použili kit TrueLabeling-AMP<sup>TM</sup> 2.0 (SuperArray Bioscience Corp.). Získaná cRNA byla přečištěna pomocí kolonkového kitu ArrayGrade<sup>TM</sup> cRNA Cleanup Kit (SuperArray Bioscience Corp.). cRNA sondy byly následně denaturovány a hybridizovány 20 hodin na nylonovou membránu makročipu nesoucího oligonukleotidové sondy specifické pro jednotlivé geny. Hybridizovaná cRNA byla detekována po vazbě biotinu na avidin-fosfatázový konjugát chemiluminiscenční reakcí s činidlem CDPstar (Tropix, Inc., Bedford, MA). Všechny postupy byly provedeny dle doporučení výrobce. Chemiluminiscenční obraz byl snímán 12bitovou chlazenou CCD kamerou (Synoptics Ltd.) po dobu 17 minut.

## Analýza obrazu a zpracování dat

Analýza obrazu, odečtení pozadí (spot s nejnižší intenzitou) a normalizace dat byla provedena pomocí webové aplikace GEArray Expression Analysis Suite (SuperArray Bioscience Corp.). Intenzita signálu jednotlivých spotů byla normalizována pomocí sady housekeepingových genů GAPDH, ACTB, HSPCB a B2M (viz obr. 1 - A16- F16). Statistická analýza a vizualizace normalizovaných dat byly provedeny pomocí softwaru TIGR MultiExperiment Viewer version 3.1 (The Institute for Genomic Research, 2003, ) [10]. K identifikaci genů rozdílně exprimovaných mezi dvěma skupinami pacientů jsme použili dvouvýběrový t-test ( $\alpha = 0,01$ ) a metodu SAM (Significance Analysis of Microarrays) [11], podmínkou byl minimálně dvojnásobný rozdíl v expresi nalezených genů mezi skupinami. Metoda SAM byla použita pro studii typu „two class unpaired data“ s počtem permutací 1000, pro minimální hodnotu odhadu FDR (false discovery rate) byla stanovena hranice  $\Delta = 1,5$ . Nejvýznamnější geny získané pomocí obou metod byly použity pro shlukování pacientů s dobrou prognózou a pacientů se špatnou prognózou pomocí metody hierarchické shlukování (HCL) (viz obr. 2). Analogicky byly analyzovány rovněž expresní profily kolorektálních karcinomů dle anatomické lokalizace.



**Obrázek 1:** Ukázka nízkohustotních oligonukleotidových makročipů dvou analyzovaných vzorků



**Obrázek 2:** Ukázka klastrogramu vytvořeného na základě 10 genů se signifikantně rozdílnou expresí mezi skupinami pacientů s rozdílnou prognózou

## Výsledky

### Unifikace zkoumaného souboru, eliminace faktorů ovlivňujících čípkové analýzy

Vzhledem k popsaným výrazným rozdílům v expresních profilech nádorů vykazujících mikrosatelitní nestabilitu byla provedena imunohistochemická analýza reparačních proteinů MSH2, MLH1 a PMS2 [12] a do studie byly zařazeny pouze nádory s nepravděpodobnou mikrosatelitní nestabilitou. Za účelem eliminace vlivu anatomické lokalizace na rozdíly v expresních profilech různých prognostických skupin byly nádory rozděleny také z hlediska jejich lokalizace vzhledem ke splenické flexuře (proximálně a distálně, 5 vs. 7) a analyzovány samostatně. K vyloučení významné kontaminace jinými buněčnými populacemi (lymfocyty, fibroblasty) byly všechny vzorky ověřeny patologem z hlediska zastoupení nádorových buněk. Vzorky tvořeny z více než 70% nádorovými buňkami byly dále zpracovány [13]. Pouze nekontaminovaná a nefragmentovaná RNA (RIN > 7) byla použita k čípkovým analýzám [9]. Výše uvedená kritéria splňovalo 12 (z testovaných 20) vzorků následně použitých ve studii. Vyhodnoceno bylo rovněž rutinně prováděné stanovení hladin nádorového markeru CEA (karcinoembryonální antigen) v krevním séru. Podle očekávání byla skupina pacientů se špatnou prognózou spojena s vyšší pooperační sérovou hladinou CEA než skupina s dobrou prognózou (medián 7,1 vs. 1,9 µg/l).

### Analýza expresních profilů prognosticky rozdílných pacientů

Pro monitorování relativní exprese 128 genů potenciálně zapojených do progresu a diseminace nádorového onemocnění bylo použito nízkohustotních oligonukleotidových makročipů společnosti SuperArray (OHS-028). Panel relativní exprese těchto genů byl získán pro 12 biotických vzorků primárních kolorektálních karcinomů nepředléčených pacientů, klinicky charakterizovaných v tabulce 1. Příklady dvou nízkohustotních oligonukleotidových makročipů jsou ukázány na obrázku 1. Geny s expresí nižší než 5% mediánu byly považovány za neexprimované. Ve všech 12 případech byla pozorována detekovatelná genová exprese u více než 40% (rozsa 41- 75%) spotů přítomných na makročipu. Pomocí t-testu ( $\alpha = 0,01$ ) a metody SAM bylo identifikováno 10 genů (9 up-regulovaných, 1 down-regulovaný) se signifikantním více než dvojnásobným rozdílem v expresi mezi dvěma prognostickými skupinami pacientů (viz tabulka 2). Tato sada genů následně umožnila v klastrové analýze rozdělit pacienty do skupin dle prognózy (viz obr. 2). Z hlediska biologické funkce jsou mezi up-regulovanými geny zastoupeny především onkogeny (MYC, MYB, KRAS, SRC) dále hepatální růstový faktor HGF, transkripční faktor ETV4, regulátor buněčného cyklu PTEN a molekuly extracelulární matrix a buněčné adheze (CD82, HPSE). Sníženou expresi vykazoval ve skupině pacientů se špatnou prognózou pouze antiangiogenní inhibitor metaloproteinázy 2 (TIMP2).

### Profily genové exprese proximálně a distálně lokalizovaných kolorektálních karcinomů

Rozdíly v profilech genové exprese mezi levostrannými (ležící distálně od splenické flexury) a pravostrannými (ležící proximálně od splenické flexury) kolorektálními karcinomy byly opakovaně popsány [14]. Abychom vyloučili potenciální interferenci rozdílů v profilech genové exprese souvisejících s prognózou onemocnění a anatomickou lokalizací, rozdělili jsme zkoumaný soubor z hlediska anatomické lokalizace (pravostranné vs. levostranné, 5 vs. 7) a provedli analýzu expresních profilů analogickým postupem jako v případě prognózy. Pomocí t-testu ( $\alpha = 0,01$ ) a metody SAM ( $\Delta = 0,5$ ) byly identifikovány 4 geny se signifikantním více než dvojnásobnou expresí v proximálně ležících kolorektálních karcinomech. Tato malá skupina genů je tvořena dvěma transkripčními faktory (ETV6, EWSR1), regulátorem buněčného cyklu NF2 a adhezivní molekulou FAT (viz. tabulka č. 3).

Tabulka č. 1.: Charakteristika zkoumaného souboru pacientů

| Pacient | Věk | Pohlaví | Klinické stádium | Lokalizace | pTNM    | Grade | CEA [µg/l] | Stav při kontrole | DFS |
|---------|-----|---------|------------------|------------|---------|-------|------------|-------------------|-----|
| dp1     | 73  | žena    | III.B            | C184 (P)   | pT3N1M0 | G2    | 3,4        | remise            | 58  |
| dp2     | 73  | muž     | II.A             | C185 (D)   | pT3N0M0 | G2    | 2,1        | remise            | 54  |
| dp3     | 61  | žena    | II.A             | C182 (P)   | pT3N0M0 | G1    | 1,9        | remise            | 41  |
| dp4     | 56  | žena    | II.A             | C187 (D)   | pT3N0M0 | G2    | 0,5        | remise            | 44  |
| dp5     | 62  | žena    | III.A            | C190 (D)   | pT2N1M0 | G2    | 0,7        | remise            | 36  |
| dp6     | 61  | muž     | III.B            | C186 (D)   | pT3N1M0 | G2    | 1,9        | remise            | 36  |
| sp1     | 52  | muž     | II.A             | C190 (D)   | pT3N0M0 | G2    | 9,4        | met. v mezenteriu | 20  |
| sp2     | 72  | muž     | II.A             | C183 (P)   | pT3N0M0 | G2    | 4,8        | jaterní metastázy | 6   |
| sp3     | 60  | žena    | III.C            | C180 (P)   | pT4N2M0 | G3    | 1,4        | jaterní metastázy | 13  |
| sp4     | 73  | muž     | II.A             | C182 (P)   | pT3N0M0 | G1    | 1,7        | kostní metastázy  | 7   |
| sp5     | 52  | muž     | II.A             | C190 (D)   | pT3N0M0 | G1    | 41         | lokální recidiva  | 18  |
| sp6     | 76  | muž     | III.B            | C190 (D)   | pT3N1M0 | G1    | 22,6       | lokální recidiva  | 12  |

(P) – proximálně lokalizované nádory, (D) – distálně lokalizované nádory, DFS – disease free survival, CEA –karcinoembryonální antigen (referenční mez CEA < 4,6 µg/l)

Tabulka č. 2.: Skupina genů s více než dvojnásobně rozdílnou expresí u pacientů s nepříznivou prognózou (p<0,01)

| GeneBank  | Symbol       | Název                                                    | Δ | Pozice | p-value |
|-----------|--------------|----------------------------------------------------------|---|--------|---------|
| NM_005417 | <b>SRC</b>   | V-src sarcoma viral oncogene homolog                     | + | H12    | 0,004   |
| NM_000314 | <b>PTEN</b>  | Phosphatase and tensin homolog                           | + | C11    | 0,001   |
| NM_006665 | <b>HPSE</b>  | Heparanase                                               | + | D6     | 0,004   |
| NM_000601 | <b>HGF</b>   | Hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor) | + | E6     | 0,003   |
| NM_005375 | <b>MYB</b>   | V-myb myeloblastosis viral oncogene homolog              | + | H9     | 0,001   |
| NM_004985 | <b>KRAS</b>  | V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog     | + | G7     | 0,002   |
| NM_002231 | <b>CD82</b>  | CD82 antigen (KAI1)                                      | + | E7     | <0,001  |
| NM_001986 | <b>ETV4</b>  | Ets variant gene 4 (E1A enhancer binding protein, E1AF)  | + | E4     | 0,002   |
| NM_002467 | <b>MYC</b>   | V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog            | + | A11    | <0,001  |
| NM_003255 | <b>TIMP2</b> | TIMP metalloproteinase inhibitor 2                       | - | G13    | <0,001  |

Tabulka č. 3.: Skupina genů s více než dvojnásobnou expresí v proximálně ležících kolorektálních karcinomech (p<0,01)

| GeneBank  | Symbol       | Název                                        | Δ | Pozice | p-value |
|-----------|--------------|----------------------------------------------|---|--------|---------|
| NM_001987 | <b>ETV6</b>  | Ets variant gene 6 (TEL oncogene)            | + | F4     | 0,001   |
| NM_005243 | <b>EWSR1</b> | Ewing sarcoma breakpoint region 1            | + | G4     | <0,001  |
| NM_006665 | <b>FAT</b>   | FAT tumor suppressor homolog 1 (Drosophila)  | + | H4     | 0,004   |
| NM_000268 | <b>NF2</b>   | Neurofibromin 2 (bilateral acoustic neuroma) | + | C10    | 0,003   |

Diskuze

Cílem této studie bylo ověřit, zda vysoce invazivní a metastatický fenotyp kolorektálních karcinomů (KRK) je detekovatelný již v primárních karcinomech pacientů s lokoregionálním postižením a zda by tento specifický molekulární profil mohl sloužit ke stanovení jejich prognózy. Zkoumaný soubor byl proto rozdělen do dvou prognostických skupin na základě délky bezpříznakové přežití (DFS). Abychom zjistili změny v expresi genů spojených s invazivitou a diseminací nádorového postižení analyzovali jsme profily genové exprese primárních kolorektálních karcinomů těchto dvou skupin pacientů. Analýzou exprese 128 genů získaných pomocí oligonukleotidového makročipu se nám t-testem a metodou SAM podařilo identifikovat 10 genů (9 up-regulovaných, 1 down-regulovaný) s minimálně dvojnásobným rozdílem v expresi u skupiny pacientů s nepříznivou prognózou. Některé z těchto genů byly v souvislosti s invazivitou a metastazováním kolorektálních karcinomů již popsány. Onkogen MYC má zásadní význam v regulaci buněčné proliferace a diferenciaci. Je jedním z cílových genů regulovaných β-kateninovým komplexem, jehož inhibice produktem APC genu je u KRK znemožněna jeho častými mutacemi [15, 16]. Zvýšená hladina mRNA onkogenu MYC byla u kolorektálních karcinomů asociována rovněž s vyšší frekvencí relapsů onemocnění a nižším celkovým přežitím [17]. Up-regulace onkogenu MYC společně s onkogenem MYB byla inverzně korelována s mírou apoptózy v nádorové tkáni [18]. Pro tuto asociaci svědčí také popsána ko-exprese onkogenu MYB s anti-

apoptotickým genem Bcl-X na proteinové úrovni. Exprese obou genů byla na souboru 91 KRK asociována se zvýšeným rizikem progresu nádorového onemocnění a nižším celkovým přežitím [19]. Námí pozorována up-regulace onkogenů MYB a MYC je v souladu se současnými poznatky o jejich úloze v kolorektální kancerogenezi. Mutace onkogenu KRAS se vyskytují přibližně v 50% kolorektálních karcinomů a adenomů větších než 1 cm. K mutacím onkogenu KRAS (především v kodonech 12 a 13) dochází nejčastěji při přechodu ze stádia časného adenomu k pokročilému adenomu. Tyto mutace byly opakovaně asociovány s nepříznivou prognózou [20]. Rovněž zvýšené hladiny proteinu RAS byly spojeny s horším celkovým přežitím nezávisle na stádiu onemocnění [21, 22]. Onkogen SRC patří do rodiny genů kódujících tyrozin kinázy se zásadní rolí v transdukcí rozličných buněčných signálů zodpovědných za regulaci procesů jako je buněčné dělení, motilita, buněčná adheze, angiogeneze a buněčné přežívání. Jeho o zvýšené hladiny jsou časté ve většině epitelálních nádorů (včetně kolorektálního) a jsou spojeny s vyšší nádorovou invazivitou a metastatickým potenciálem [16, 23, 24]. PTEN je negativní regulátor Akt-kinázové signální dráhy, která má zásadní úlohou v přežívání buněk, a je proto považován za nádorový supresor. Mutace PTENU byly pozorovány v přibližně 19% sporadických kolorektálních karcinomů [25], nicméně jeho snížené hladiny na úrovni RNA a proteinu nebyly pozorovány a přesný mechanismus jeho zapojení do kolorektální kancerogeneze není znám [26]. Hepatální růstový faktor HGF je známým pro-angiogenním faktorem zvyšujícím expresi receptoru pro urokinázový aktivátor plazminogenu (uPAR)

přes Erk signální dráhu. Jeho zvýšené hladiny jsou spojeny se zvýšenou mírou angiogeneze a tedy i nádorovou invazivitou [24]. Jeho up-regulace byla pozorována u kolorektálních karcinomů nevykazujících mikrosatelitní nestabilitu [27]. ETV4 (E1AF) je členem rodiny transkripčních faktorů ets a významným induktorem matrix metaloproteináz (především matrilysin MMP7) a podílí se tak na nádorové invazivitě a diseminaci [28]. Jeho zvýšená exprese byla identifikována v časných stádiích KRK rovněž ve studii založené na nízkohustotních DNA makročipech [6]. Enzym heparanáza (HPSE) narušuje ochrannou vrstvu proteoglykanů (zejména heparan sulfátu) na cévním povrchu a přímo se tak může podílet na hematogenním metastazování. U kolorektálních karcinomů byla její up-regulace asociována se signifikantně nižším pětiletým přežitím [29]. Inhibitor metaloproteinázy 2 (gelatinázy) TIMP2 je anti-angiogenním faktorem a ztráta jeho exprese je spojena se zvýšenou aktivitou galatináz a tedy i zvýšenou nádorovou invazivitou. Námí pozorována snížená exprese TIMP2 byla již dříve pozitivně korelována s nižším celkovým přežitím u pacientů s kolorektálními karcinomy [30].

Žádný z genů nalezených v souvislosti s rozdílnou prognózou není rozdílně exprimován mezi skupinami nádorů různé anatomické lokalizace. Malé rozdíly v expresních profilech levostranných a pravostranných KRK (4 geny) pozorované v naší studii jsou pravděpodobně způsobeny vyloučením nádorů s mikrosatelitní nestabilitou (MSI+) z analýz. Dříve identifi-

kované rozdíly mezi různě lokalizovanými KRK byly způsobeny především významným zastoupením MSI+ nádorů v proximální oblasti tlustého střeva [14].

**Závěrem** lze říci, že pomocí analýzy profilů genové exprese se nám podařilo identifikovat 10 genů, jejichž rozdílná exprese umožnila rozdělit sledované pacienty do dvou skupin z hlediska prognózy. Většina z těchto genů byla již dříve v souvislosti s prognózou kolorektálního karcinomu studována. Naše výsledky potvrzují předchozí pozorování a jsou v souladu biologickou podstatou nádorové invazivity a metastazování. Alterace v expresi genů pro hepatální růstový faktor HGF a transkripční faktor ETV4 byly u kolorektálního karcinomu s nepříznivou prognózou identifikovány poprvé. Po rozšíření zkoumaného souboru pacientů a ověření výsledků metodou qRT-PCR nebo imunohistochemicky na proteinové úrovni by nalezená sada genů mohla být jedním z kroků vedoucích směrem k individualizaci terapie pacientů s lokoregionálně pokročilým kolorektálním karcinomem.

## Poděkování

Autoři děkují MUDr. Michalu Jurajdovi, PhD z Patofyziologického ústavu Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně za technickou asistenci při snímání GEArrays CCD kamerou.

**Práce byla podpořena granty IGA MZ ČR NR/9076 - 4 a MSM 6198959216.**

## Literatura

- Churchill GA: Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays. *Nat Genet* 32 Suppl:490-5, 2002
- Wang Y, Jatko T, Zhang Y, et al: Gene expression profiles and molecular markers to predict recurrence of Dukes' B colon cancer. *J Clin Oncol* 22:1564-71, 2004
- Eschrich S, Yang I, Bloom G, et al: Molecular staging for survival prediction of colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 23:3526-35, 2005
- Arango D, Laiho P, Kokko A, et al: Gene-expression profiling predicts recurrence in Dukes' C colorectal cancer. *Gastroenterology* 129:874-84, 2005
- Draghici S, Khatri P, Eklund AC, et al: Reliability and reproducibility issues in DNA microarray measurements. *Trends Genet* 22:101-9, 2006
- Nosho K, Yamamoto H, Adachi Y, et al: Gene expression profiling of colorectal adenomas and early invasive carcinomas by cDNA array analysis. *Br J Cancer* 92:1193-200, 2005
- Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, et al: A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet* 33:49-54, 2003
- Liefers GJ, Tollenaar RA: Cancer genetics and their application to individualised medicine. *Eur J Cancer* 38:872-9, 2002
- Schroeder A, Mueller O, Stocker S, et al: The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* 7:3, 2006
- Dudoit S, Gentleman RC, Quackenbush J: Open source software for the analysis of microarray data. *Biotechniques Suppl*:45-51, 2003
- Kooperberg C, Sipione S, LeBlanc M, et al: Evaluating test statistics to select interesting genes in microarray experiments. *Hum Mol Genet* 11:2223-32, 2002
- Plevova P, Krepelova A, Papezova M, et al: Immunohistochemical detection of the hMLH1 and hMSH2 proteins in hereditary non-polyposis colon cancer and sporadic colon cancer. *Neoplasma* 51:275-84, 2004
- de Ridder D, van der Linden CE, Schonewille T, et al: Purity for clarity: the need for purification of tumor cells in DNA microarray studies. *Leukemia* 19:618-27, 2005
- Birkenkamp-Demtroder K, Olesen SH, Sorensen FB, et al: Differential gene expression in colon cancer of the caecum versus the sigmoid and rectosigmoid. *Gut* 54:374-84, 2005
- Watson AJ: An overview of apoptosis and the prevention of colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 57:107-21, 2006

- Bird NC, Mangnall D, Majeed AW: Biology of colorectal liver metastases: A review. *J Surg Oncol* 94:68-80, 2006
- Kakisako K, Miyahara M, Uchino S, et al: Prognostic significance of c-myc mRNA expression assessed by semi-quantitative RT-PCR in patients with colorectal cancer. *Oncol Rep* 5:441-5, 1998
- Greco C, Alvino S, Buglioni S, et al: Activation of c-MYC and c-MYB proto-oncogenes is associated with decreased apoptosis in tumor colon progression. *Anticancer Res* 21:3185-92, 2001
- Biroccio A, Benassi B, D'Agnano I, et al: c-Myb and Bcl-x overexpression predicts poor prognosis in colorectal cancer: clinical and experimental findings. *Am J Pathol* 158:1289-99, 2001
- Anwar S, Frayling IM, Scott NA, et al: Systematic review of genetic influences on the prognosis of colorectal cancer. *Br J Surg* 91:1275-91, 2004
- Sun XF, Ekberg H, Zhang H, et al: Overexpression of ras is an independent prognostic factor in colorectal adenocarcinoma. *Apmis* 106:657-64, 1998
- Petrowsky H, Sturm I, Graubitz O, et al: Relevance of Ki-67 antigen expression and K-ras mutation in colorectal liver metastases. *Eur J Surg Oncol* 27:80-7, 2001
- Summy JM, Gallick GE: Src family kinases in tumor progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 22:337-58, 2003
- Rudmik LR, Magliocco AM: Molecular mechanisms of hepatic metastasis in colorectal cancer. *J Surg Oncol* 92:347-59, 2005
- Nassif NT, Lobo GP, Wu X, et al: PTEN mutations are common in sporadic microsatellite stable colorectal cancer. *Oncogene* 23:617-28, 2004
- Taniyama K, Goodison S, Ito R, et al: PTEN expression is maintained in sporadic colorectal tumours. *J Pathol* 194:341-8, 2001
- Inoue Y, Miki C, Watanabe H, et al: Genomic instability and tissue expression of angiogenic growth factors in sporadic colorectal cancer. *Surgery* 139:305-11, 2006
- Horiuchi S, Yamamoto H, Min Y, et al: Association of ets-related transcriptional factor E1AF expression with tumour progression and overexpression of MMP-1 and matrilysin in human colorectal cancer. *J Pathol* 200:568-76, 2003
- Sato T, Yamaguchi A, Goi T, et al: Heparanase expression in human colorectal cancer and its relationship to tumor angiogenesis, hematogenous metastasis, and prognosis. *J Surg Oncol* 87:174-81, 2004
- Curran S, Dundas SR, Buxton J, et al: Matrix metalloproteinase/tissue inhibitors of matrix metalloproteinase phenotype identifies poor prognosis colorectal cancers. *Clin Cancer Res* 10:8229-34, 2004