

VYDÁVÁ
ČESKÁ LÉKAŘSKÁ
SPOLEČNOST J. E. PURKYNĚ
IČO 444359

V NAKLADATELSTVÍ
ApS BRNO, spol. s r. o.
IČO 543535

REDAKCE:
Masarykův onkologický ústav Brno
Žlutý kopec č. 7
656 53 Brno

Sekretář redakce:
ing. Zdeněk Bouša
tel., fax: 543 134 226
Přijetí příspěvků:
e-mail: vukfait@centrum.cz
e-mail: bousa@mou.cz

Tiskne Moravská typografie, a. s.
Brno, Moravské náměstí 13
IČO 15549763

Vychází 6krát ročně
Roční předplatné 180 Kč
pro studenty LF 90 Kč

Expedici na základě roční objednávky
vyřizuje redakce

Ministerstvo kultury ČR
MK ČR 5158
ISSN 0862-495 X

INTERNET – vstupní adresa:
<http://www.linkos.cz>

INDEXED IN EXCERPTA MEDICA

**ČASOPIS ČESKÉ ONKOLOGICKÉ SPOLEČNOSTI
A SLOVENSKEJ ONKOLOGICKEJ SPOLOČNOSTI**

**THE JOURNAL OF THE CZECH AND SLOVAK
ONCOLOGICAL SOCIETIES**

VEDOUcí REDAKTOR: REJTHAR ALEŠ

**ZÁSTUPCE VEDOUcíHO
REDAKTORA:**

KOZA IVAN

VÝKONNÝ REDAKTOR:

FAIT VUK

REDAKTOŘI:

ČOUPEK PETR
HÁJEK ROMAN
KOCÁK IVO

VALÍK DALIBOR
VORLÍČEK JIŘÍ
ŽALOUĐÍK JAN

REDAKČNÍ RADA:

ADAM ZDENĚK, Brno
BABUŠÍKOVÁ OLGA, Bratislava
BEDNAŘÍK OTAKAR, Brno
BILDER JOSEF, Brno
ČOUPEK PETR, Brno
DRBAL JOSEF, Brno
ECKHARDT SANDOR, Budapešť
FAIT VUK, Brno
HÁJEK ROMAN, Brno
JURGA LUDOVIT, Trnava
KALLAY JOZEF, Bratislava
KAUŠITZ JURAJ, Bratislava
KLAŠTERSKÝ JAN, Brusel
KLENER PAVEL, Praha
KOCÁK IVO, Brno
KOUTECKÝ JOSEF, Praha

KOVAŘÍK JAN, Brno
KOZA IVAN, Bratislava
MAYER JIŘÍ, Brno
MECHL ZDENĚK, Brno
NĚMEC JAROSLAV, Brno
ONDRUŠ DALIBOR, Bratislava
PAČOVSKÝ ZDENĚK, Brno
PLEŠKO IVAN, Bratislava
PETRUŽELKA LUBOŠ, Praha
REJTHAR ALEŠ, Brno
SPURNÝ VLADIMÍR, Brno
UJHÁZY VILIAM, Bratislava
VORLÍČEK JIŘÍ, Brno
VYZULA ROSTISLAV, Brno
WAGNEROVÁ MÁRIA, Košice
ŽALOUĐÍK JAN, Brno

ČIPOVÉ TECHNOLOGIE V ONKOLOGICKÉM VÝZKUMU A PRAXI

OBSAH

2006

Úvodní slovo	330
--------------------	-----

Všeobecný přehled

1. Brdička R., Bruchová H. Vznik a rozmach čipových technologií	331
2. Merkerová M., Kráčmarová A., Bruchová H., Brdička R. Využití biočipových technologií v onkologii	333
3. Koutná I., Krontorád P., Svoboda Z., Kozubek M. Vybrané aplikace technologie cDNA microarrays v onkologickém výzkumu	338
4. Jarošová M., Pospíšilová H., Plachý R., Papajík T., Koptíková J., Indrák K. Určování nebalancovaných genových změn metodou array komparativní genomové hybridizace (array CGH) u nádorů	342
5. Malčíková J., Tichý B., Kotašková J., Mayer J., Pospíšilová Š. Od genomu k proteomu - využití proteinových čipů v onkologii	346
6. Tichý B., Svoboda M., Mayer J. a Pospíšilová Š. Odběr a zpracování vzorků pro expresní DNA čipy	350
7. Dziechciarková M., Berkovcová J., Trojanec R., Srovnal P., Bouchalová K., Hajdúch M. Využití laserové mikrodisekce pro přípravu komplexních vzorků z nádorové tkáně pro účely mikrogenomických analýz	355
8. Bouchal J., Turashvili G., Kolář Z. Mikročipová analýza genové exprese v mikrodisekovaných vzorcích	360
9. Pavlík T., Jarkovský J. Statistické metody v analýze dat z DNA mikročipů	365
10. Budinská E., Jarkovský J. Metody detekce alterovaných oblastí DNA z dat CGH arrays	368

Klinický přehled

11. Svoboda M., Grell P., Fabián P., Palácová M., Petráková K., Nenutil R., Hajdúch M., Vyzula R. Molekulární taxonomie a prediktivní systémy karcinomu prsu definované na základě profilů genové exprese	373
12. Slabý O., Garajová I., Svoboda M., Kocáková I., Vyzula R. Studium patogeneze kolorektálních karcinomů pomocí profilů genové exprese a možnosti jejich využití v diagnostické a prediktivní onkologii	382
13. Svoboda M., Vášová I., Kotašková J., Malčíková J., Fabián P., Tichý B., Berkovcová J., Klabusay M., Rejthar A. Aplikace DNA čipů u lymfoidních malignit	389
14. Dudová S., Bártová E., Pour L., Krejčí J., Hájek R. Profilování genové exprese u mnohočetného myelomu	397

Původní práce

15. Slabý O., Garajová I., Svoboda M., Fabián P., Svoboda M., Srovnal J., Šmerdová T., Kocáková I., Šefr R., Jech Z., Hoch J., Vyzula R. Pilotní studie identifikace prognostických markerů pacientů s kolorektálním karcinomem analýzou profilů genové exprese	402
16. Michalová E., Hrstka R., Štěrba J., Mendelová D., Valík D., Babčanová S., Křivánková K., Vojtěšek B. Studium vlivu methotrexátu na expresi genů p53-signální dráhy v leukemických buňkách pomocí cDNA array	407
17. Pospíšilová H., Morzuch L., Jarošová M., Vandenberghe P., Wlodarska I. Array comparative genomic hybridisation as a tool for a rapid mapping of breakpoints in unbalanced translocations in leukemia	411
18. Bruchová H., Kráčmarová A., Klamová H., Brdička R. Detekce expresních profilů u pacientů s CML pomocí Atlas Plastic 8K Microarrays	415
19. Obrazová část	419

CONTENTS

Introduction	330
General reviews	
1. Brdička R., Bruchová H. The rise and expansion of biochip technologies	331
2. Merkerová M., Kráčmarová A., Bruchová H., Brdička R. Microarray technology application in oncology	333
3. Koutná I., Krontorád P., Svoboda Z., Kozubek M. Selected applications of cDNA microarrays technology in oncological research	338
4. Jarošová M., Pospíšilová H., Plachý R., Papajík T., Koptíková J., Indrák K. Determination of genomic imbalances using array comparative genomic hybridization (array CGH) in cancer genom	342
5. Malčíková J., Tichý B., Kotašková J., Mayer J., Pospíšilová Š. From genome to proteome - using of protein microarrays in oncology	346
6. Tichý B., Svoboda M., Mayer J. a Pospíšilová Š. Sample taking and processing for expression DNA microarrays	350
7. Dziechciarková M., Berkovcová J., Trojanec R., Srovnal P., Bouchalová K. Hajdúch M. The utilization of laser capture microdissection for construction of specific samples from cancer tissue in order to microgenomic analyses	355
8. Bouchal J., Turashvili G., Kolář Z. Microarray analysis of gene expression in microdissected samples	360
9. Pavlík T., Jarkovský J. Statistical methods for analysing gene expression microarray data	365
10. Budinská E., Jarkovský J. Statistical approaches for identification of areas of DNA alteration analyzed by CGH arrays	368
Clinical review	
11. Svoboda M., Grell P., Fabián P., Palácová M., Petráková K., Nenutil R., Hajdúch M., Vyzula R. Breast cancer molecular taxonomy and predictive systems based on gene expression profiling	373
12. Slabý O., Garajová I., Svoboda M., Kocáková I., Vyzula R. Studies on colorectal cancer pathogenesis by gene expression profiles and possibilities of their application to diagnostic and predictive oncology	382
13. Svoboda M., Vášová I., Kotašková J., Malčíková J., Fabián P., Tichý B., Berkovcová J., Klabusay M., Rejthar A. DNA microarrays in lymphoid malignancies	389
14. Dudová S., Bártová E., Pour L., Krejčí J., Hájek R. Gene expression profiling in multiple myeloma	397
Original publications	
15. Slabý O., Garajová I., Svoboda M., Fabián P., Svoboda M., Srovnal J., Šmerdová T., Kocáková I., Šefr R., Jech Z., Hoch J., Vyzula R. Identification of colorectal cancer prognostic markers by gene expression profiles analysis: pilot study	402
16. Michalová E., Hrstka R., Štěrba J., Mendelová D., Valík D., Babčanová S., Křivánková K., Vojtěšek B. cDNA array analysis of p53-signalling pathway genes in leukemic cells treated with methotrexate	407
17. Pospíšilová H., Morzuch L., Jarošová M., Vandenberghe P., Włodarska I. Array comparative genomic hybridisation as a tool for a rapid mapping of breakpoints in unbalanced translocations in leukaemia	411
18. Bruchová H., Kráčmarová A., Klamová H., Brdička R. Gene expression profiling in CML patients using Atlas Plastic 8K Microarrays	415
19. Supplementary pictures	419

ÚVODNÍ SLOVO

Klinická onkologie a onkohematologie čelí v posledních několika letech stoupajícímu počtu výsledků plynoucích z molekulárního výzkumu patogeneze maligních onemocnění. Tyto informace jsou implementovány jak v oblasti diagnostické, tak terapeutické. Objevují se nová protinádorová léčiva principiálně odlišného charakteru než klasická cytostatika. Jejich mechanismus účinku je přísně specifický pro určité typy nádorů. Paralelně se zaváděním nových léčiv na trh se do popředí zájmu dostávají biomarkery účinnosti definující s přijatelnou pravděpodobností skupinu pacientů, kteří budou z této specifické léčby profitovat, dochází k individualizaci terapie. Tato individualizace se nevztahuje jenom na daného pacienta, ale může být specifická pro daný nádor v daném čase a postihuje tak biologickou podstatu zhoubného bujení, která je zejména u solidních nádorů založena na mimořádné heterogenitě, přizpůsobivosti a genetické nestabilitě nádorových populací.

Individualizovaná cílená terapie, založená na komplexním poznání biologických charakteristik nádoru i jeho nositele, představuje nový přístup, který byl umožněn rozvojem moderních vyšetřovacích metod, zvláště cytogenetických a molekulárně - biologických. Na principu cílené léčby se rozvíjí prediktivní onkologie, která se zabývá hledáním prediktivních znaků, předpovídajících účinnost určitého léčebného postupu (chemoterapie, imunoterapie, radioterapie).

Komplexní změny v nádorovém genomu je možné jen s obtížemi studovat s použitím tradičních metod, které jsou vhodné k analýze jednoho nebo několika málo genů. Velké naděje se právě proto vkládají do DNA čipů a dosavadní publikované práce dokazují, že molekulární taxonomie a prediktivní systémy založené na profilech genové exprese představují správnou cestu k přesnějšímu poznání biologických vlastností nádoru v daném čase a k dosažení lepších léčebných výsledků.

Toto zvláštní číslo *Klinické onkologie* si klade za cíl podat přehled o pracovištích zabývajících se touto problematikou v České republice a seznámit čtenáře s nejvýznamnějšími poznatky, kterých bylo ve studiu biologických vlastností nádorů dosaženo pomocí technologie DNA čipů. Při skládání obsahu jsme se snažili pokrýt celou oblast této nové technologie počínaje od přípravy vzorků, technického provedení, datové analýzy a zejména poukázat na výsledky o kterých jsme přesvědčení, že mají nebo v dohledné době budou mít zásadní dopad pro klinickou praxi. Je na Vás, čtenářích, abyste posoudili do jaké míry se nám to podařilo.

Na závěr nezbyvá, než poděkovat všem participujícím autorům.

18. října 2006
Brno/Olomouc

MUDr. Marián Hajdúch, PhD.
MUDr. Marek Svoboda

VZNIK A ROZMACH ČIPOVÝCH TECHNOLOGIÍ

THE RISE AND EXPANSION OF BIOCHIP TECHNOLOGIES

BRDIČKA R., BRUCHOVÁ H.:

ÚSTAV HEMATOLOGIE A KREVŇÍ TRANSFUZE, PRAHA

Souhrn

Biočipové technologie se začaly rozvíjet zhruba před 10 lety a jejich použití stále vzrůstá a rozšiřuje se množství jejich aplikací. Od základní aplikace na problematiku molekulárně genetickou, kdy analyzovanou substancí byly nukleové kyseliny, se postupně jejich používání rozšířilo i na bílkoviny, cukry a alespoň co se týká používaného označení i na buňky a tkáně. Vývoj se ubíral v zásadě dvěma směry, směrem k neustálému zvětšování počtu současně prováděných detekcí a směrem k čipům specializovaným na řešení určitých specifických otázek.

Klíčová slova: Nové technologie v molekulární diagnostice, aktivní a pasivní DNA čipy, mikroarraye a makroarraye, genomové nanoprocesory.

Abstract

Biochip technologies have arisen and expanded during the last decade and the scope of them is now very broad. At the very beginning the analyzed substance was nucleic acid, but also proteins and carbohydrates (sugars) became the targets and the same term covers also cells and tissues now. The technology evolved by increasing the number of detections made simultaneously on one chip and reached the possibility to test all human genes at once, the other way led to specific sets with limited number of probes e.g. all known mutations of one gene, or genes participating in one pathway or function.

Keywords: New technologies in molecular diagnostics, active and passive DNA chips, microarrays and macroarrays, genomic nanoprocesors.

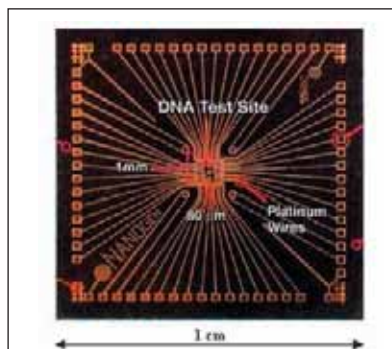
Od původních začátků konstrukce biočipů, kterým dominovaly otázky technické, které byly a jsou neustále řešeny především díky různým patentovým ochranám (<http://www.biochipnet.com/patents>), nabyly na důležitosti otázky vyhodnocení a interpretace.

Budeme-li se pokládat za pozorovatele a do jisté míry i za účastníky rozvoje této technologické revoluce od samého jejího začátku, přisvojíme si i právo kritického pohledu a odhadu jejího dalšího směřování. Prehistorické začátky jsou kladeny do různě vzdálené minulosti a záleží na tom, zda budeme brát v úvahu spíše stránku technickou – pak patrně se zmíníme o reversním dot blotingu používaném např. firmou Innolipa k původně velice skromnému určování alel systému HLA. Nebo k mnohočetné imunologické reakci, která mohla znamenat jakousi ideologickou přípravu (1). Spokojíme-li se však se vzpomínkou na skutečné „prototypy“ dnešních „biočipů“, nebudeme se muset vracet do příliš vzdálené minulosti a budeme nám na to stačit prakticky jen jedno desetiletí. Během tohoto návratu zjistíme, že některé realizační přístupy jsou používány stále.

Není bez zajímavosti, že některé principy se ukázaly jako dlouhodobě nosné a jsou používány dodnes. Na prvním místě je třeba jmenovat firmu Affymetrix a její technologii výroby mikročipů pomocí fotolitografické metody, při níž jsou reagující oligonukleotidy syntetizovány přímo na místě (in situ). Její přístup charakterizuje tzv. pasivní čipy tj. takové, kde pracovní podmínky pro všechny „sensory“ – pracovní plošky čipu jsou stej-

né. Druhou firmou, která se úspěšně uplatňuje na trhu je firma Nanogen. Její čip je typickým zástupcem tzv. aktivních čipů, u nichž je možné ovlivňovat pracovní podmínky každého senzoru individuálně. Rozdíl obou technických řešení je mnohostranný, zatímco pasivní čipy, k nimž můžeme přiřadit i membránové šíky (arraye), nebo arraye mikroteček (mikrospotů) nanášených na mikroskopická podložní sklička, jsou schopny rozšířit počet senzorů jednoho čipu do deseti- až statisíců, aktivní čipy od svých počátků obsahovaly jen desítky senzorů a dnes se propracovaly ke stovkám. Původní prototyp komerčně vyráběný firmou Nanogen, jehož obrázek by byl jistě vhodný jako vzor na dámské šaty (obr. 1) obsahoval jen 25 pracovních plošek, které byly vodivě spojeny s periferií čipu tak, aby na nich mohlo být upravováno napětí a polarita. Vedle těchto vlajkonošů obou směrů existuje celá řada dalších firem a výrobců a stále vznikají nové a nové. Některé firmy přinášejí i nová technická řešení. Na jejich přehled jen odkážeme - (<http://www.biochipnet.com/companies>), protože se jejich počet, z původních cca 10 v polovině minulého desetiletí, několikanásobně rozrostl. Geograficky je vznik a rozmach biočipových technologií spojen s Kalifornií. Z původních cca 10 firem prakticky všechny vznikly právě tam. Dnes jsou sice roztroušeny po celém světě – dokonce i u nás vzniklo na akademické půdě pracoviště vyrábějící skličkové arraye (www.geneage-tech.com) a lze očekávat, že do prostoru výrobců se všemi důsledky vstoupí i Čína. Dlouho se nedařilo ukojit zvědavou touhu najít nějaké vysvětlení existence kalifornského inkubátoru biočipových firem, až jeden americký kolega nabídl celkem plausi-

bilní vysvětlení. Ponecháme stranou fakt, že v Kalifornii je příjemné podnebí, mnoho přírodních krás a snad i vhodné ekonomické prostředí. Podle jeho vysvětlení došlo ke koincidenci několika příznivých faktorů. Jednak v době vzniku společností zabývajících se vývojem a výrobou biočipů došlo k uvolnění mnoha vysoce kvalifikovaných pracovníků řady výzkumných vojenských zařízení, v Kalifornii byl v té době již také k dispozici značný potenciál specialistů z oblasti výroby počítačů a dostatek odborníků pracujících na universitách v oblasti molekulární genetiky. Co jiného je nezbytnou podmínkou pro rozvinutí takové výroby než vysoce kvalifikovaný personál disponující potřebnými znalostmi. Nesmíme také zapomenout na skutečnost, že v USA je, na rozdíl od nás, zcela běžné propojení universitního výzkumu s výrobou.



Obrázek 1: Původní typ aktivního čipu vyráběného firmou Nanogen s 25 senzory

Co je principem „nástroje“, který biočipová technika nabízí – někdy se také mluví o laboratorii na dlani. Především je to možnost provádět mnoho analýz jednoho vzorku současně – současné čipy firmy Affymetrix mají na ploše zhruba 1.25 x 1.25 cm cca 500 000 senzorů a jsou tedy schopny bez problémů obsáhnout všechny geny, kterými lidský genom disponuje. Tomu se blíží i sklíčkové nebo membránové arraye s dnes běžnými 10 000 - 30 000 teček. Z hlediska použití se nejvíce hodí pro situaci, kdy nevíme co hledáme. Vedle těchto všeobsahujících „universálních“ čipů pak existují čipy s omezenou, ale specializovanou výbavou sond.

Jsou používány pro řešení již konkrétnějších otázek a pokrývají např. alely (mutace) určitého genu např. P53, CYP450, geny související s nějakou funkcí – apoptóza, nebo onemocněním. Změny probíhající v somatických buňkách např. během onkogenézy jsou jedním z nejčastěji zkoumaných otázek (2,3). Kromě změn, které odlišují nádorovou tkáň od zdravé, ale i změny v tkáních, v nichž neprobíhá nádorové bujení jsou předmětem mnoha výzkumných prací.

Používají se tedy k identifikaci určitých struktur a to včetně určování sekvence. Jsou také velice užitečné i při sledování aktivity genů jak za fyziologických podmínek, tak při nemoci, nebo pod vlivem léčby (4). Vsuneme-li na toto místo vlastní zkušenosti, pak použití biočipů ukázalo, že inter-individuální variabilita genové aktivity je značná a to jak ve zdraví tak v nemoci (5). Existují značné ontogenetické rozdíly – a zdá se, že existují rozdíly nejen mezi tkáněmi, což nepřekvapuje, ale patrně i mezi buňkami. K analýze genové aktivity na jednobuněčné úrovni zatím naše možnosti biočipových technik nestačí, ale i tímto směrem se nové technologie rozvíjejí.

Nálezky získané biočipovými technikami bývají podrobovány kritice z hlediska jejich věrohodnosti a často je vyžadováno jejich ověření jinou metodou. U kvantifikace genové aktivity pak především RT-PCR a ukazuje se, že někdy dávají oba postupy výsledky shodné, jindy protichůdné či spíše nesouhlasné. Je nepochybné, že citlivost RT-PCR je mnohem větší, nicméně každá z metod zkoumá genovou aktivitu trochu jiným způsobem a za jiných podmínek.

Dnes je valná většina čipů vyráběna komerčně a ani by to jinak nebylo ekonomické, s předem daným souborem sond, ale existují i tzv. zákaznické čipy, kdy si zákazník může vybrat jakými sondami má být čip osazen. Dokonce existují firmy, které čipové analýzy provádějí jako službu s tím, že zákazník pouze dodá vzorek a je mu předán výsledek na úrovni datového zpracování a statistického vyhodnocení. Kupodivu je cena takové služby jen asi dvojnásobná ve srovnání s cenou čipu.

Jestliže obecně vzrůstá množství informací exponenciálně a v podstatě překračuje naši kapacitu je zpracovávat, natož využít, platí to v ještě větší míře o rozvoji technologií v našem případě „biočipových“. Jako vždy produkce informací je nejdříve představována abstrakty přednášek (jejich sborníky) pak časopiseckými články a teprve později monografiemi. I těch je však dnes již poměrně bohatá nabídka, a proto se omezíme na úzký výběr těch, které známe (6,7,8,9,10).

Za použití grantových prostředků VZ 0002373601 a IGA MZ ČR NR /7989-3

Zájemce o podrobnější informace odkazujeme na text, který provádí kurz J.Jonáka pro postgraduální studenty: Bruchová H, Brdička R: Čipové technologie v molekulární biologii. V „Molekulární biologie a genetiky XI: sborník přednášek“ Praha : ÚMG AV ČR, 2004 s. 7-20 případně na absolvování týdenního praktického semináře: http://www.uhkt.cz/vyuka_seminare/seminare/kurz_dnadiag

Literatura

1. Ekins RP, Chu FW: Multianalyte microspot immunoassay—microanalytical „compact disk“ of the future. Clin Chem. 1991 37(11), s.1955-1967
2. Golub TR, et al.: Molecular classification of cancer: Class discovery and class prediction by gene expression monitoring. Science 1999, s.527-531
3. Minn AJ et al.: Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. Nature 2005, 436, s.518-524
4. Bruchová H, Borovanova T, Klamova H, Brdička R: Gene expression profiling in chronic myeloid leukemia patients treated with hydroxyurea. Leukemia and Lymphoma 2002, 43: s.1289-1295

5. Bruchová H, Brdička R: Inter-individuální variabilita geneové exprese sledovaná pomocí biočipů. Čas.lék.čes., 2004 142(12) :s.847-849
6. Knudsen S: A Biologist's Guide to Analysis of DNA Microarray Data. J.Wiley&Sons, New York 2002
7. Baxevanis AD, Ouellette BFF: Bioinformatics. A practical guide to the analysis of genes and proteins. J.Wiley&Sons, New York 1998
8. Schena M: DNA microarrays. A practical Approach. Oxford Univ.Press 1999
9. Schena M: Microarray Biochip Technology. Eaton Publ. Natick 2000
10. Warrington JA, Todd R, Wong D :Microarrays and cancer research. Eaton Publ. Westborough 2002 (Chen j, Kricka LJ. Biochip technology. Taylor and Francis, New York 2003)

VYUŽITÍ BIOČIPOVÝCH TECHNOLOGIÍ V ONKOLOGII

MICROARRAY TECHNOLOGY APPLICATION IN ONCOLOGY

MERKEROVÁ M., KRÁČMAROVÁ A., BRUCHOVÁ H., BRDIČKA R.

ODDĚLENÍ MOLEKULÁRNÍ GENETIKY, ÚSTAV HEMATOLOGIE A KREVNÍ TRANSFUZE, PRAHA

Souhrn

Prudký rozvoj čipových technologií v posledních letech umožnil sériové analýzy exprese několika tisíc genů zároveň v jediném experimentu a tím urychlil naše porozumění komplexnosti buněčných procesů. Pomocí mikročipového výzkumu lidského transkriptomu byly odhaleny nové, dříve nerozeznatelné subtypy tumorů, nové diagnostické a prognostické markery nebo potenciální cílové molekuly pro terapii. Aplikace „high-throughput“ technologií v klinické onkologii slibuje do budoucna posun ke každodenním rutinním čipovým analýzám nádorů a na jejich základě individualizaci léčebného programu. Před zavedením mikročipů do klinické praxe je však ještě potřeba vyřešit několik sporných otázek týkajících se analýzy dat, reprodukovatelnosti a validace výsledků, mezilaboratorního srovnávání a v neposlední řadě také problém stále poměrně vysokých pořizovacích i provozních nákladů.

Klíčová slova: mikročipy, expresní analýzy, cDNA, molekulární diagnostika

Summary

During recent few years, rapid progress in microarray technology has facilitated gene expression analyses of thousands of genes performed simultaneously in one experiment. It has revolutionized our understanding of the cellular processes complexity. Previously subtypes of tumors, new diagnostic and prognostic markers, or potential targets for therapy has been identified by microarray-based research of human transcriptome. In clinical oncology, high-throughput technologies implementation promises their routine application in tumor analyses and individualization of treatment. However, several issues relating to data analysis, reproducibility, cross-comparability, validation, and high purchase and operating costs need to be resolved before the technology can be adopted broadly in the clinical practices.

Key words: microarray, gene expression analysis, cDNA, molecular diagnostic

Onkologická onemocnění vznikají v důsledku akumulace genetických, ale také řady epigenetických změn. Druhou velmi podstatnou roli v progresi rakoviny hraje interakce nádorových buněk s okolními stromálními, imunitními a zánětlivými buňkami. Právě tato komplexnost vzniku nádoru, genetická heterogenita maligních buněk, ale také variabilita mezi pacienty vedou k identifikaci mnoha nádorových subtypů (dosud bylo rozlišeno více jak 200 různých typů nádorů) (1). Diagnostické a prognostické klasifikace nádorových onemocnění se v současné době opírají zejména o klinické a histopatologické nálezy, celou šíři klinické heterogenity neodrážejí však zcela dostatečně. Nedávné pokroky ve výzkumu lidského genomu (2,3) a tzv. „high-throughput“ technologie již umožňují prostudovat molekulární komplexnost maligních tumorů a díky tomu zvolit co nejvhodnější léčebnou strategii pro každého pacienta. Pro ucelenou charakterizaci nádorů na molekulární úrovni se otevírají možnosti v podobě analýz nukleových kyselin (RNA, DNA), proteinů a metabolitů. Velmi cenná data jsou získávána díky čipovým technologiím, mezi kterými získaly ústřední postavení expresní mikročipy. Ty dovolují současně monitorovat aktivitu několika tisíc genů v dané tkáni/buněčném typu (tzv. gene expression profiling, např. firmy Agilent, Affymetrix). Biočipové technologie jsou v současné době v onkologii nejvíce využívány pro tyto účely:

1. nalezení molekulární podstaty onemocnění
2. identifikace nových diagnostických markerů nádorového procesu
3. klasifikace/definice jednotlivých nových subtypů daného onemocnění na molekulární úrovni, tzv. molekulární diagnostika
4. identifikace odpovědi pacienta na terapii
5. zlepšení terapeutických postupů, zavedení léčby zacílené na příčinu onemocnění

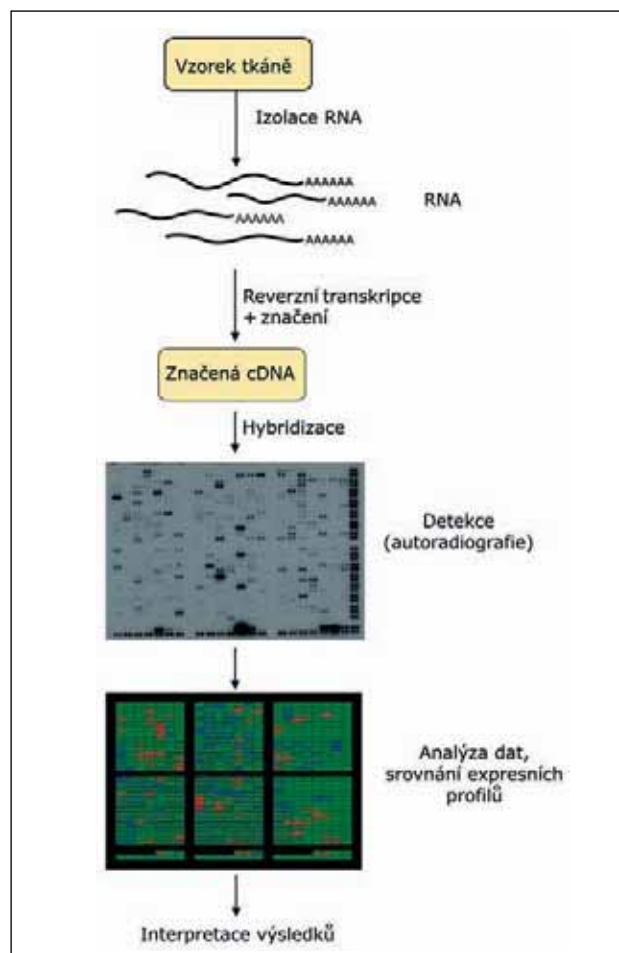
Princip čipové technologie

DNA čipové technologie jsou založeny na hybridizaci nukleových kyselin, tj. interakci mezi DNA sondami imobilizovanými na pevný povrch čipu, které reprezentují zkoumaný gen, a mezi značenými, volnými molekulami nukleových kyselin odvozenými z analyzovaného vzorku (Obr. 1). Pro expresní mikročipy jsou výchozím materiálem molekuly RNA (celkové či mRNA) izolované ze vzorku, které jsou přepsány na cDNA pomocí reverzní transkriptase a zároveň fluorescenčně či radioaktivně značeny. Takto připravená cDNA je hybridizována na komplementární sondy imobilizované na povrchu čipu. Signál generovaný na každé sondě pak odráží hladinu exprese mRNA daného genu v analyzovaném vzorku. Po detekci, kvantifikaci a normalizaci intenzit signálů pomocí specializovaného softwaru je vytvořen tzv. „gene expression profile“ analyzovaného vzorku, který pak lze srovnávat s expresními profily dalších vzorků. Existuje několik verzí uspořádání, v závislosti na typu povrchu čipu (nylonové membrány, plastické, nebo skleněné čipy) nebo na typu značení vzorku (radioaktivně, chemiluminiscenčně, fluorescenčně). Oblíbeným přístupem je semikvantitativní analýza genové exprese pomocí tzv. duálního značení, při kterém jsou na jeden čip hybridizovány dva odlišné značené vzorky, například vzorek z nádorové tkáně a vzorek z kontrolní, zdravé tkáně. Fluorescenčně značené cDNA (nejčastěji se využívá Cy3 a Cy5 či Alexa barev) obou srovnávaných vzorků jsou ve stejné koncentraci smíchány a hybridizovány na jeden mikročip. Barva spotu vzniklá interferencí signálů obou značek potom vypovídá o kvantitativním rozdílu v expresi daného genu mezi oběma vzorky.

Technologie výroby mikročipů

Pro výrobu čipů jsou nejčastěji používány nylonové membrány, plastické nebo skleněné materiály. Plastické a nylonové

vé čipy představují tzv. makročipy, neboť mají větší rozměry a menší hustotu nanesených spotů (například nylonový čip Atlas Human cDNA Expression Array od firmy Clontech sleduje expresi 588 genů na membráně o rozměru 8 x 12 cm). Nejběžnějším povrchem je pravděpodobně mikroskopické sklíčko o velikosti 7,5 x 2,5 cm s povrchem upraveným pomocí hydrofobních polymerů (poly-L-lysin, modifikovaný silan - aminosilan, epoxysilan apod.) poskytujících reakční skupiny jako jsou -NH₂, -OH, =O pro navázání oligonukleotidů. Nanášení sond na povrch čipu lze provádět několika způsoby. První možností je mechanické spotování již presyntetizovaných sond a to buď cDNA klonů či jejich PCR produktů, anebo chemicky připravených oligonukleotidů - výhody a nevýhody obou typů sond jsou shrnuty v Tabulce 1. Jednotlivé sondy jsou nanášeny na čip tenkými ostrými jehlami (ink-jet printing) v objemu cca 1nl a natištěné spoty pak mají 100-150μm v průměru. Další možností výroby mikročipů je syntéza sondy ve formě oligonukleotidů *in situ* na povrchu čipu (fotolitografie).



Obrázek 1: Princip technologie expresních mikročipů. Na obrázku je čip Atlas Human cDNA Expression Array od firmy Clontech s celkovou RNA z linie K562, z experimentů prováděných v naší laboratoři.

Metodou fotolitografie, kterou vyvinula firma Affymetrix, jsou oligonukleotidové sondy syntetizovány přímo na povrchu skleněného čipu. Fotolitografická maska řídí spolu se světelným paprskem syntézu tak, že vazebná místa oligonukleotidů jsou světlem aktivována a reagují s novým nukleotidem. Opakováním cyklů spolu se střídáním masek dochází k prodlužování řetězců sond vždy o jeden nukleotid až do celkové uniformní délky 25 nukleotidů. Tento způsob konstrukce zvyšuje využitelnost plochy čipu o 1-2 řády. Každý gen na čipu od firmy Affymetrix je reprezentován jedenácti 25-mernými sondami z různých

oblastí téhož genu, čímž je zajištěno několikanásobné měření exprese daného genu v rámci jednoho mikročipu během jedné analýzy. Každá z jedenácti sond je navíc doplněna o sondu s jednou chybně párující bází umístěnou uprostřed sondy (tzv. mismatch), což umožňuje uživatelům ověřit specifčnost hybridizace. Ploška mikročipu (1,25 cm) je rozdělena do čtverců o velikosti 11 x 11 μm, z nichž na každém jsou vázány kopie pouze pro jediný typ sondy. Nejnovější mikročip firmy Affymetrix, který umožňuje detekovat hladiny až 47 000 různých RNA, nese těchto jedinečných čtverců celkem 1,3 milionů (4).

Příprava vzorku pro expresní analýzy

Solidní nádory představují z histologického hlediska heterogenní směs různých buněčných typů: maligní buňky v různém stupni diferenciace, krevní buňky, buňky zánětlivé odpovědi atd. Díky variabilitě v buněčném složení nádorové tkáně je nutné věnovat zvláštní pozornost výběru vzorku. Obvykle je maximální snaha soustředěna na získání pouze maligních buněk. K tomuto účelu jsou používány různé mikrodisekční techniky (např. Laser Capture Microdissection - LCM). Ačkoli je dnes možné získat expresní profil pouze pro maligní složku nádorové tkáně, nelze opomenout vliv dalších buněčných komponent nádoru (endoteliální, buňky imunitního systému) na jeho progresi.

Výchozím materiálem pro analýzu expresních profilů je obvykle vysoce kvalitní celková RNA, v množství 10-40μg, což přibližně odpovídá 100mm³ tkáně (5). Další možnost pak představuje přímá izolace mRNA. Pokud není vzorek nádorové tkáně ihned zpracován a ošetřen inhibitory RNáz, je nutné tkáň bezprostředně po resekci (maximálně do 30 minut) zamrazit v tekutém dusíku a skladovat alespoň při -80°C, čímž je zamezeno degradaci RNA. Důraz je dále kladen zejména na čistotu RNA (tj. RNA bez příměsí DNA) a její integritu, kterou je možné jednoduše ověřit pomocí elektroforézy v agarózovém gelu.

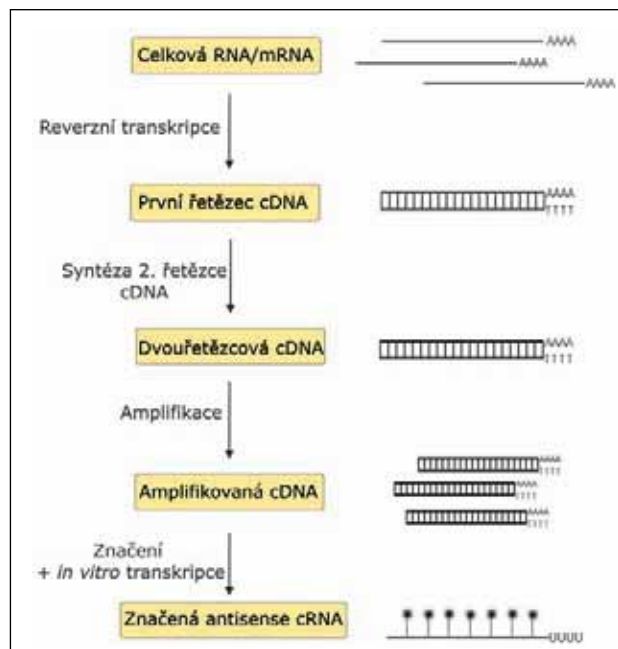
Na rozdíl od čerstvých či zamražených tkáňových vzorků, které je nutné co nejdříve zpracovat, mohou být parafinové tkáňové bločky fixované pomocí formaldehydu (tzv. FFPE vzorky) dlouhodobě skladovány. Výhodou takto uchovávaných preparátů je jejich dobrá klinická dokumentace: průběh onemocnění, odpověď pacienta na léčbu a její výsledek. Nicméně z FFPE vzorků bylo ještě nedávno velmi problematické získat dostatečné množství kvalitní, nedegradované RNA. Nyní jsou však na trhu k dispozici speciálně připravené kity pro izolaci RNA z těchto tkáňových preparátů (Arcturus, kit Paradi-se Reagent System; QIAGEN, Launches RNasy FFPE kit) a také speciálně upravené mikročipy se sondami, které jsou odvozené od 3'konců mRNA (Affymetrix, mikročip GeneChip Human X3P Array).

Pokud jsou výchozím materiálem málobuněčné vzorky (například po separaci buněk na jednotlivé subtypy, po tkáňové biopsii či LCM), je možné získanou mRNA amplifikovat. Dostupné amplifikační kity jsou zpravidla limitovány 10ng množstvím celkové RNA, nicméně i 1ng výchozího materiálu může být postačující (např. NuGEN Technologies, Ribo-SPIA technology). Základní schéma amplifikace mRNA má 3 kroky: podle mRNA je nejprve syntetizován pomocí reverzní transkriptázy komplementární řetězec cDNA, následně je vlákno mRNA odbouráno a nahrazeno 2. řetězcem cDNA, čímž vzniká dvouřetězcová cDNA, která je amplifikována. Poslední fází je příprava značeného řetězce antisense cRNA, který je syntetizován podle kódujícího (+) cDNA a má tudíž sekvenci komplementární k původní buněčné mRNA (Obr. 2).

Variabilita a její zdroje

Při porovnávání výsledků experimentů vycházejících z biočipových analýz je nutno mít na vědomí nejen přirozenou variabilitu, která vychází z charakteru buněčného materiálu nebo odlišného buněčného složení nádorové tkáně, ale také variabilitu technologického procesu. Zdroje této procesní variability mají původ například v povaze a zpracování biologického materiálu (způsob přípravy vzorku, extrakce RNA).

Pokud je po izolaci RNA kvůli malému množství výchozího materiálu zařazen navíc amplifikační krok, může představovat další příčinu nárůstu variability v důsledku různé senzitivity a aktivity enzymů používaných v amplifikačních kitech nebo rozdílné efektivity značení. Dále může variabilita získaných dat vycházet z nespecifické cross-hybridizace či z odlišností mezi jednotlivými biočipy (hybridizace, způsob značení testovaného vzorku, výběr a délka sond pro konkrétní gen při konstrukci biočipu).



Obrázek 2: Obecný princip dvoustupňové amplifikace mRNA

Deregulované geny, identifikované pomocí čipových technologií, které by mohly být využity jako diagnostické či prognostické markery a nebo jako potenciální cíle pro další výzkum, musí být nezávisle validovány jinou standardní metodou jako je např. kvantitativní RT-PCR či northern blot.

Analýza dat

Hledání odlišně exprimovaných genů mezi testovanými soubory vzorků bývá jedním z hlavních cílů biočipových analýz. Pokud chceme porovnávat intenzity signálů mezi dvěma analyzovanými vzorky, je nutno zahrnout do analýzy normalizaci dat, protože jednotlivé vzorky se mohou navzájem lišit např. v koncentraci mRNA, relativní vazebné afinitě či koncentraci vázané značky. Mezi nejčastěji používané přístupy patří celková normalizace intenzit, lineární regrese nebo log centering, přičemž normalizace může být použita globálně, tedy na celkový soubor získaných dat, anebo lokálně, čili na vybranou sadu dat (6). Zpravidla vycházíme z nulové hypotézy, která říká, že pro sledovaný gen je mezi porovnávanými vzorky pozorována shodná expresní hladina. Alternativní hypotéza naopak tvrdí, že testované vzorky nemají v příslušném genu stejnou úroveň exprese. Pro stanovení pravděpodobnosti obou hypotéz je potřeba použít např. parametrický t-test, nebo neparametrický Mann-Whitney test (6).

Protože DNA čipy poskytují až několik tisíc výsledných hodnot z jediného experimentu, jsou analýza, interpretace a uložení takto velkého množství dat náročným problémem. Přestože můžeme pomocí mikročipů nalézt geny, které vykazují výrazný rozdíl v expresi a které lze dále využít pro následné specifické analýzy, spočívá největší význam biočipových „high-throughput“ analýz v odhalování komplexnosti genetických změn. Tato komplexnost je určována pomocí matematických soustav podobně exprimovaných genů v celém množství dat. Existují dva

základní přístupy k analýze mikročipových dat. Prvním je takzvaná „unsupervised analysis“ využívající informace poskytované všemi geny, které jsou v dané tkáni exprimované. Do společné kategorie tak lze seskupovat například vzorky, které vykazují výraznou podobnost ve svých expresních profilech, nebo je možné vyhledávat geny ve vzorku, které se vyznačují shodnou expresní hladinou (zvýšenou/sníženou transkripční aktivitou v porovnání se zdravou kontrolou). Druhý přístup zvaný „supervised learning“ sleduje pouze předem vybranou skupinu genů - charakteristické markery definované pro jednotlivé diagnózy, a tím zařazuje neznámý vzorek do dříve definované podskupiny onemocnění (7). Obě tyto metody mohou být aplikovány na stejný soubor dat za různým účelem. První typ je méně ovlivnitelný a je vhodnější pro odhalování dosud neznámých, morfologicky podobných subtypů tumorů pouze na základě podobností v expresních profilech. „Supervised“ metoda je naopak vhodnější k diagnostice tumorů, které patří do již definovaných klinicky významných podskupin. Existuje několik matematických nástrojů pro testování a znázorňování vztahů mezi expresními profily, mimo jiné tzv. klastrování a „multidimensional scaling“. Klastrovací metoda poskytuje dendrogramy podobné evolučním stromům, ve kterých koncové větve zobrazují podobné vzorky/geny. Výsledkem druhé z metod jsou třidimensionální tzv. „scatter plots“, ve kterých se podobné vzorky (znázorněné body) seskupují v prostoru. Jedním z nejpoužívanějších klastrovacích nástrojů je „hierarchical clustering“ (8), jiné metody využívají „K-means clustering“ a „self-organizing maps“.

Aplikace expresních čipů v klinické onkologii

Nabídka specificky zaměřených expresních mikročipů je v současné době velmi pestrá. Vedle celogenomových mikročipů (Affymetrix, Agilent) jsou k dispozici biočipy, které umožňují detekovat expresní hladiny pouze vybraných skupin genů, jejichž proteinové produkty vykazují jistou podobnost z hlediska funkce, buněčné lokalizace, interakcí, apod. Například firmy Clontech či SupperArray nabízí biočipy se sondami pro sledování aktivity genů, u nichž se předpokládá, že participují na maligní transformaci buňky. Hlavními funkčními kategoriemi (klastry) jsou geny účastníci se regulace buněčného cyklu, apoptózy, diferenciace, buněčné signalizaci dále pak geny, jejichž produkty se uplatňují jako transkripční faktory, adhezivní molekuly či povrchové receptory. V souvislosti s hledáním molekulární podstaty vzniku a rozvoje nádorových onemocnění se nabízí možnost konstruovat mikročipy, které by dovolily monitorovat expresi genů zapojených do konkrétní signální dráhy.

Expresní biočipy jsou v klinické onkologii využívány pro diagnostiku, zjištění rizika progresu onemocnění nebo pro stanovení předpokládané odpovědi na léčbu.

Diagnostika

Zájem o využití expresních biočipů k onkologické diagnostice byl vyvolán prací kolektivu Khan et al. (9), podle které expresní profily rakovinných buněčných linií odpovídaly jejich orgánu původu. Mezi prvními klinickými studiemi využívajícími mikročipy k diagnostice byly práce zabývající se akutními leukemiemi, u nichž je přístup k čisté populaci nádorových buněk relativně jednoduchý. Golub et al. (10) se zabýval otázkou, zda je možné využít expresní čipy pro diagnostické rozlišení akutní myeloidní leukemie (AML) od akutní lymfoidní leukemie (ALL). Pomocí „unsupervised learning“, pouze na základě genové exprese, dokázal správně zařadit 36 z 38 vzorků kostní dřeně pacientů s AML nebo ALL, přičemž pouze 2 zůstaly nejasné. Tím dokázal, že akutní leukemie lze klasifikovat pomocí microarrays bez jakýchkoliv předchozích klinických znalostí. Dále zaznamenal rozdílnost expresních profilů T-ALL a B-ALL, na základě které je možné tyto dva subtypy akutní lymfatické leukemie odlišit. S využitím genových expresních profilů byly identifikovány a charakterizovány nové subtypy tumorů. Alizadeh et al. (11) identifikoval dva typy difuzního velkobuněčného B lymfomu odvozené z různých stádií zrání B-lymfocytů. Armstrong et al. (12) potvrdil, že ALL s chromozomální translokací

t(4;11)(q21;q23), jejíž součástí je gen *MLL* (mixed-lineage leukemia), mají charakteristický expresní profil odlišný od ALL i AML, který odpovídá raným hematopoetickým progenitorovým buňkám. Klastrovací algoritmy tak mohou odlišit ALL s *MLL* translokací od běžné akutní leukemie, což naznačuje, že *MLL* představuje odlišné onemocnění. Z Armstrongovy čipové analýzy vyplynulo, že nejvíce odlišná je exprese genu *FLT3* a na jejím základě lze oddělit *MLL* od ostatních typů leukemií. Aberace *FLT3* byla zaznamenána již dříve v některých případech AML a mohla by být leukemogenní (13,14,15). *FLT3*, tyrosin kinázový receptor, by tedy mohl představovat atraktivní cílovou molekulu pro vývoj nových specifických léčiv. Dalším příkladem je publikace Sorlie et al. (16), která definuje na podkladě mikročipových expresních analýz 5 podtříd karcinomu prsu, včetně nového myeloepiteliálního a dále lumenálního epitheliálního typu. Bittner et al. (17) identifikoval dvě podtřídy kožního maligního melanomu vykazující odlišnou agresivitu.

Prognostické studie

Mikročipy byly využity mimo jiné pro predikci průběhu rakoviny prsu (18,19), lymfomů (11,20), rakoviny plic (21) nebo adenokarcinomu ledvin (22,23). V případě predikce přežití u pacientek s rakovinou prsu se ukázalo, že využití mikročipové technologie předčí stávající metody založené na klinických a histologických kritériích (19).

U renálního karcinomu byl pomocí expresních čipů a validace jejich výsledků kvantitativním RT-PCR identifikován set biomarkerů pro predikci jeho agresivity. Na základě 34 genů, které nejvýrazněji vykazovaly rozdíly v expresi, bylo pomocí hierarchického klastrování správně zařazeno 88% (23 z 26) vzorků do skupiny agresivních a metastazujících karcinomů, 100% do skupiny neagresivních nádorů a 100% do skupiny non-neoplastických vzorků. Autoři navíc poukázali na fakt, že na základě exprese jednoho z kandidátních markerů (survivinu) lze predikovat přežití pacientů s renálním karcinomem (23).

Expresní čipy mohou být také využity pro diagnostikování metastáz a identifikaci tkáně, ze které původně pocházejí. I když jsou tumory často histologicky identické, určení jejich povahy a původu je důležité pro správnou volbu léčebného postupu. Potřeba nalezení lepších molekulárních markerů, které by odhalily primární zdroj metastázy, vedla k využití mikročipů při klasifikaci nádorů podle jejich původu (24-27). Například Su et al. (26) použil „supervised learning“ metodu k identifikování skupin genů, jejíž hladina exprese je charakteristická pro různé druhy nádorů. Tyto soubory zahrnovaly geny, jejichž exprese je typická pro danou zdravou tkáň, stejně jako ty, jejichž hladina je zvýšena v důsledku onemocnění. Pomocí vytvořeného klasifikačního schématu pak správně určily 90% míst původu nádorů, včetně 9 z 12 metastáz. Bhattacharjee et al. (27) dokázal, že expresní mikročipy jsou schopné rozlišit primární plicní adenokarcinom od metastáz extra-pulmonálního původu. Tyto studie prokázaly, že metastázy si obecně zachovávají expresní profil tkáně, ze které pocházejí, čímž naznačily potenciál čipové technologie pro identifikaci tkáňového původu u karcinomů vzniklých z neznámého zdroje.

Předpověď odpovědi na léčbu

Jedním z prvních úspěchů využití mikročipů pro odhad reakce pacienta na léčebný program byla identifikace 95 genů, jejichž expresní profil u pacientů s ALL podává informaci o citlivosti buněk k STI571 (glivec, imatinib) (28). Pro leukemické buňky rezistentní vůči působení STI571 bylo charakteristické zvýšení exprese v genech pro Bruton's tyrosin kinázu a dvou ATP syntetáz (*ATP5A1* a *ATP5C1*). Na druhou stranu vykazovaly signifikantní pokles v aktivitě proapoptotického genu *BAK1* a genu kontrolujícího průběh buněčného cyklu *p15INK4b*.

Obdobně byly prokázány odlišné expresní profily u skupin pacientek s rakovinou prsu pozitivně, respektive negativně reagujících na předoperační podávání docetaxelu (29). Celkem bylo definováno 92 genů, které vykazují odlišnou aktivitu u chemosenzitivních/rezistentních pacientek. Z toho 14 genů vykazovalo zvýšenou expresi u pacientek rezistentních na léč-

bu docetaxelem, přičemž tyto geny, pokud je již známa jejich funkce, se účastní převážně procesů řízení buněčného cyklu, RNA transkripce a translace. U pacientek, které odpovídaly na léčbu docetaxelem, bylo identifikováno 78 genů se zvýšenou expresí. Z nich nejvíce náleželo do kategorií genů účastnících se apoptózy, stresových reakcí, adheze, transportu proteinů, signální transdukce nebo sestřihu a transportu RNA.

cDNA mikročipy	oligonukleotidové mikročipy
Výhody	
- není nutná promární znalost cDNA sekvence - možnost vlastního nanášení spotů v laboratoři - nárůst intenzity signálu pozitivně koreluje délkou sondy - delší sonda (=stabilnější hybridní molekula) umožňuje nastavit více stringentní podmínky, tím se sníží signál pozadí - cenově výhodnější	- uniformní délka (do 80 b) - automatizace, kontrola kvality během syntézy - vyšší specifita, nižší pravděpodobnost cross-hybridizace
Nevýhody	
- možnost cross-hybridizace - možnost kontaminace cDNA klonů/PCR produktů	

Tabulka 1: Srovnání typů sond - klony cDNA/PCR produkty *versus* oligonukleotidy

Přísliby do budoucna

Potenciál expresních mikročipů pro zlepšování diagnostického a prognostického testování nejen v onkologii je stále více zřejmý. Z dat poskytovaných čipovými technologiemi lze vybrat malé množství markerů, jejichž genovou expresi je možné dále sledovat konvenčními, široce rozšířenými technikami jako jsou imunohistochemie, *in situ* hybridizace či PCR. Kvůli genetické komplexnosti onkologických onemocnění by ale měla být daleko přesnější kombinace molekulárních markerů získaná obsáhlou analýzou než použití jediného markeru. Z toho vyplývá další využití čipových technologií: komplexní testování exprese v nádorové tkáni (pomocí mikročipu vyrobeného přímo na míru danému onemocnění) a využití expresních profilů jako klinických testů.

Je zde však stále ještě několik nevyřešených otázek, na které bude třeba nalézt odpověď před zavedením mikročipů do každodenní klinické praxe. Některé se týkají samotné technologie, jiné klinické využitelnosti čipů. Důležitým problémem je standardizace metodiky. V současné době existuje velké množství různých čipových platform, které využívají rozdílné sady genů, hybridizační podmínky či detekční metody. Na některých mikročipech jsou spotovány cDNA sondy rozličných délek, na jiných jsou syntetické délkově uniformní oligonukleotidy; sonda pro tentýž gen může být reprezentována na různých čipech různými sekvencemi. Bylo pozorováno, že délka sondy, stejně jako její poloha v rámci hybridizujícího transkriptu hraje roli v intenzitě detekovaného signálu. Sondy kratší než 400 nukleotidů poskytují až o polovinu nižší intenzity signálů než sondy o délce 600 - 2000 nukleotidů. Obdobně sondy odvozené od 3'-konce mRNA se jeví z hlediska signálu jako výhodnější (6). Každá laboratoř také může mít jiný přístup k získávání vzorků z nádorové tkáně, používat jiné kontrolní vzorky, či sady používaných markerů - to vše může vést k rozdílu v intenzitě signálů. Rutinnímu využití této technologie brání v neposlední řadě i fakt, že komerčně dostupné mikročipy a přístrojové stanice jsou stále příliš drahé.

Technologická revoluce v posledních letech způsobená prudkým rozvojem „high-throughput“ technologií skýtá nové možnosti pro výzkum na poli molekulární medicíny a otevírá prostor pro celistvější pochopení světa biomolekul. Z onkologického hlediska DNA čipy umožňují zcela nový pohled do komplexity nádorů a představují do budoucna veliký potenciál pro zlepšení lékařské péče o pacienta.

Literatura

- Wadlow R, Ramaswamy S. DNA Microarrays in clinical cancer research. *Current Molecular Medicine* 2005, 5:111-120.
- Lander ES, Linton LM, Birren B et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001, 409(6822):860-921.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001, 291(5507):1304-51.
- www.affymetrix.com
- Ramaswamy S, Golub TR. DNA microarrays in clinical oncology. *J Clin Oncol* 2002, 20(7):1932-41.
- Brentani RR, Carraro DM, Verjovski-Almeida S et al. Gene expression arrays in cancer research: methods and applications. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2005, 54(2):95-105.
- Raychaudhuri S, Sutphin PD, Chang JT, Altman RB. Basic microarray analysis: grouping and feature reduction. *Trends Biotechnol* 2001, 19(5):189-93.
- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95(25):14863-8.
- Khan J, Simon R, Bittner M et al. Gene expression profiling of alveolar rhabdomyosarcoma with cDNA microarrays. *Cancer Res* 1998, 58(22):5009-13.
- Golub TR, Slonim DK, Tamayo P et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999, 286(5439):531-7.
- Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000, 403(6769):503-11.
- Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB et al. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet* 2002, 30(1):41-7.
- Nakao M, Yokota S, Iwai T et al. Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1996, 10(12):1911-8.
- Tse KF, Mukherjee G, Small D. Constitutive activation of FLT3 stimulates multiple intracellular signal transducers and results in transformation. *Leukemia* 2000, 14(10):1766-76.
- Zhao M, Kiyoi H, Yamamoto Y et al. In vivo treatment of mutant FLT3-transformed murine leukemia with a tyrosine kinase inhibitor. *Leukemia* 2000, 14(3):374-8.
- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001, 98(19):10869-74.
- Bittner M, Meltzer P, Chen Y et al. Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature*. 2000, 406(6795):536-40.
- van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002, 415(6871):530-6.
- van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 2002, 347(25):1999-2009.
- Rosenwald A, Wright G, Chan WC et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002, 346(25):1937-47.
- Beer DG, Kardia SL, Huang CC et al. Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. *Nat Med* 2002, 8(8):816-24.
- Takahashi M, Rhodes DR, Furge KA et al. Gene expression profiling of clear cell renal cell carcinoma: gene identification and prognostic classification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98(17):9754-9.
- Kosari F, Parker AS, Kube DM et al. Clear cell renal cell carcinoma: gene expression analyses identify a potential signature for tumor aggressiveness. *Clin Cancer Res* 2005, 11(14):5128-39.
- Giordano TJ, Shedden KA, Schwartz DR et al. Organ-specific molecular classification of primary lung, colon, and ovarian adenocarcinomas using gene expression profiles. *Am J Pathol* 2001, 159(4):1231-8.
- Ramaswamy S, Tamayo P, Rifkin R et al. Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98(26):15149-54.
- Su AI, Welsh JB, Sapinosa LM et al. Molecular classification of human carcinomas by use of gene expression signatures. *Cancer Res* 2001, 61(20):7388-93.
- Bhattacharjee A, Richards WG, Staunton J et al. Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98(24):13790-5.
- Hofmann WK, de Vos S, Elashoff D et al. Relation between resistance of Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia to the tyrosine kinase inhibitor STI571 and gene-expression profiles: a gene-expression study. *Lancet* 2002, 359(9305):481-6.
- Chang JC, Wooten EC, Tsimelzon A et al. Patterns of resistance and incomplete response to docetaxel by gene expression profiling in breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2005, 23(6):1169-77.

VYBRANÉ APLIKACE TECHNOLOGIE cDNA MICROARRAYS V ONKOLOGICKÉM VÝZKUMU

SELECTED APPLICATIONS OF cDNA MICROARRAYS TECHNOLOGY IN ONCOLOGICAL RESEARCH

KOUTNÁ I., KRONTORÁD P., SVOBODA Z., KOZUBEK M.

CENTRUM ANALÝZY BIOMEDICÍNSKÉHO OBRAZU, FAKULTA INFORMATIKY MU, BRNO

Souhrn

V této publikaci přinášíme přehled vědeckých prací, ve kterých nám technologie cDNA microarrays umožnila nové náhledy do procesů maligní transformace. Díky této technologii dnes můžeme sledovat v jeden okamžik expresní aktivitu tisíců genů. S pomocí vhodných nástrojů můžeme naměřené hodnoty dávat do souvislostí, které byly ještě nedávno prakticky nemyslitelné. V naší laboratoři jsme vyvinuli nové nástroje a postupy pro analýzu microarrays a pro zpracování výsledků do podoby použitelné v onkologickém výzkumu. Pro sledování některých charakteristik je nutné použít vizualizační nástroje. Například pro sledování aktivity určitých oblastí chromosomů jsou velmi vhodné transkripční mapy (dále TM). Implementovali jsme vlastní software pro generování TM a díky kombinaci jeho výstupů s dosavadními znalostmi jsme formulovali závěry našich experimentů. Intuitivním rozšířením TM jsme dosáhli mnoha dalších vizualizací např. hustoty aktivních genů, kumulativní exprese oblastí atp. Tyto nástroje by měly v budoucnosti pomáhat klinikům při diagnostice zhoubných malignit a určování následné léčby.

Klíčová slova: microarrays, leukémie, karcinom tlustého střeva, ex vivo diferenciace

Summary

In this paper we bring a scientific review of studies in which cDNA microarrays technology allowed us to create new insights into malignant transformation processes. We can monitor parallel expression activity of thousands of genes using this technology. Using appropriate tools we can evaluate biological correlations that were practically impossible few years ago. We have developed new tools and techniques transforming the data into form suitable for oncological research. Special visualizations are necessary for some types of studies. E.g. transcription maps (TMs) are a proper tool for studying activity of chromosomal regions. We have implemented our own software for generating TMs. On the basis of combination of its outputs and knowledge gained so far we have formulated our conclusions. Using intuitive TM extensions we have obtained many useful visualizations, e.g. density of active genes, cumulative expression etc. These tools are supposed to help clinicians while forming diagnoses of malignant diseases and while treatment planning.

Keywords: microarrays, leukemia, colorectal carcinoma, ex vivo differentiation

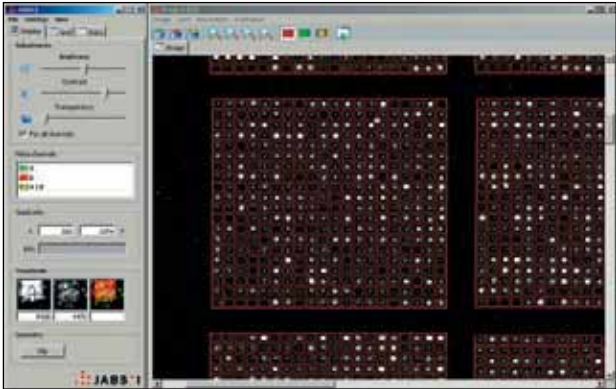
Materiál a metody

Na základě zkušeností s různými druhy microarrays jsme se pro naše experimenty rozhodli používat skla SS-H19K (Clinical Genomic Centre GCC, Toronto, Ontario, Canada). Tato skla nesou celkem 19008 EST. Takto vysoký počet EST nám umožňuje sledovat aktivitu téměř celého genomu v širokém spektru typů vzorků: vzorky odebrané z leukemických pacientů, nádory tlustého střeva atp. Náš výzkum se primárně orientuje na sledování změn genové exprese během maligních transformací a diferenciací [1 – 4]. Pracujeme s různými druhy stabilizovaných buněčných linií a se vzorky odebranými z pacientů. Odebíráme např. nádorovou tkáň tlustého střeva, kostní dřeň a krev leukemických pacientů. Experimenty využívající cDNA microarrays sestávají z následujících kroků:

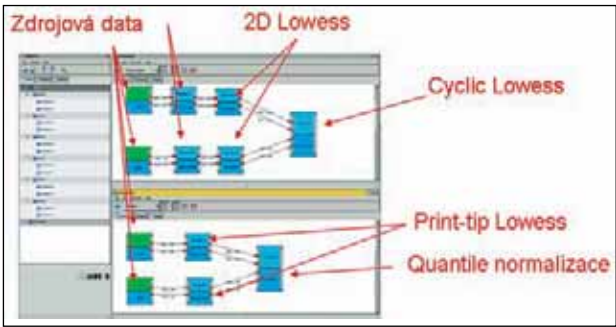
- izolace a purifikace RNA, amplifikace
- reverzní transkripce
- hybridizace
- skenování
- obrazová analýza, normalizace a statistické vyhodnocení.

Obraz pořízený skenováním sklíček analyzujeme pomocí vlastního software, který jsme v rámci výzkumu orientovaném na analýzu obrazu vyvinuli tak, aby co nejlépe vyhovoval našim potřebám. Mřížku nastavujeme poloautomaticky a provádíme velmi pečlivou kontrolu adresace (obr. 1). Další kroky jsou již plně automatické, volíme pouze použité metody. Náš software obsahuje velmi moderní segmentační a QC algoritmy kopírující vývoj v této oblasti [5]. Na výstup pro každý spot zapisujeme průměrnou intenzitu popředí, odhad intenzity lokálního pozadí a měření kvality obrazového vzorku. Numerické hodnoty získané pomocí našeho software dále normalizujeme opět ve vlastním programu. Implementovali jsme množství moderních normalizačních algoritmů a přehledné nástroje vizualizace tak, abychom mohli s ohledem na design experimentu co nejlépe transformovat vstupní data. Náš software obsahuje within-slide i between-slide normalizační metody (obr. 2) a umožňuje celý normalizační proces zapouzdřit do velmi přehledného a kompaktního prostředí. Pokud porovnáme hodnoty pouze jednotlivých skel, používáme nejčastěji LOWESS [6] within-slide normalizaci mezi jednotlivými

subgridy, která velmi kvalitně vyrovnává rozdíly v intenzitách způsobené především různým zabudováváním používaných fluorescenčních barviv. Některé experimenty vyžadují porovnávání hodnot z několika skel mezi sebou. V těchto případech volíme nejčastěji dvofázovou normalizaci. Nejprve jednotlivá skla normalizujeme pomocí vhodné within-slide normalizace a poté aplikujeme between-slide normalizaci, nejčastěji metodu Quantile [7]. Normalizované hodnoty dále podrobujeme statistické analýze pro odhalení význačných genů nebo oblastí. Pro specifické aplikace dále implementujeme vizualizační nástroje, které nám přehledně zobrazují pozorované charakteristiky.



Obrázek 1.: Ukázka našeho software pro analýzu obrazu JABS.I. Na obrázku je vidět prostředí s definovanou mřížkou. Pro další informace o tomto software nás můžete kontaktovat.



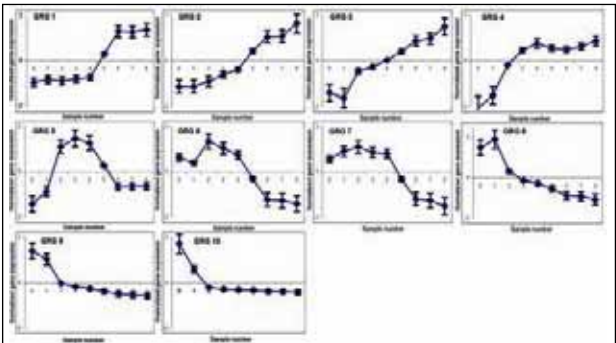
Obrázek 2.: Příklad definice normalizačního výpočtu v našem software JABS.N. Uživatel definuje výpočet graficky, pomocí schématu. Výpočet je tak velmi přehledně znázorněn.

Výzkum v oblasti leukemických onemocnění

Rádi bychom demonstrovali vhodnost použití technologie cDNA microarrays pro sledování časově závislých procesů, transkripční aktivity, diferenciálních a jiných transformací. Za tímto účelem popíšeme naše experimenty spojené s analýzou diferenciálních procesů. Studujeme kinetiku a rozdíly mezi vybranými diferenciacemi. V oblasti stabilizovaných buněčných linií provádíme intenzivní výzkum diferenciálních procesů u HL-60 a K562 buněk a také na buňkách CD34+ [8, 9].

Kinetické studie

Pro hledání rozdílů v časovém průběhu exprese jednotlivých genů používáme výše zmíněná vysokohustotní microarrays skla. Pro sledování změn genové exprese nám sloužily 3 modelové diferenciace: monocytární a granulocytární diferenciace HL-60 a megakaryocytární diferenciace buněk K562 [10 – 13]. Na základě získaných microarrays dat jsme rozdělili geny do 10 skupin (GRG) pro každý druh diferenciace. Kriteřiem byla časová kinetika změn genové exprese. Tyto skupiny jsme seřadili od 1 do 10 podle charakteristického průběhu podle následujícího klíče (obr. 3)



Obrázek 3.: Charakteristické časové průběhy genové exprese nalezené shlukovou analýzou naměřených hodnot pro všechny 3 typy diferenciace.

- rychlá up-regulace
- pomalá up-regulace
- up-regulace následovaná down-regulací
- pomalá down-regulace
- rychlá down-regulace

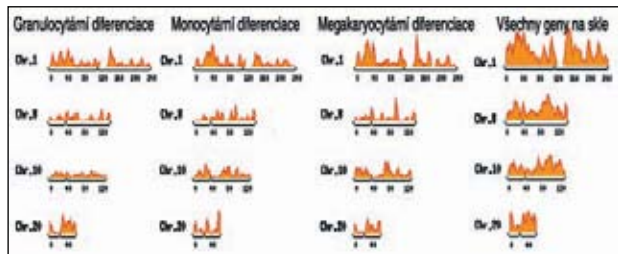
Počty genů v GRG se pohybovaly okolo 100. Za účelem porovnání těchto skupin mezi různými druhy diferenciace jsme vypočítali jejich průniky a zanesli je do tabulek. V nich můžeme pozorovat jistý řád poukazující na nenáhodné rozložení genů ve skupinách. Pro větší přehlednost jsme každé políčko obarvili tím červeněji čím více genů patří do příslušného průniku. Všimneme si červených „ostrůvků“ znamenajících velký průnik vzhledem k podobnému časovému průběhu. Diagonální políčka nám potvrzují existenci oblastí aktivních během všech druhů diferenciace (tab.1).

Megakaryocytární diferenciace										
Shluky	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	29	5	13	19	32	3	33	13	17	4
2	18	51	23	46	47	1	5	46	24	1
3	10	35	27	4	76	20	4	9	61	2
4	19	3	1	55	11	1	48	19	1	3
5	26	73	43		137	11	33	71	48	11
6	0	1	10	0	3	29	1	2	3	0
7	47	2	13	22	58	1	47	2	16	5
8	32	20	7	56	21	1	47	41	9	13
9	22	69	73	26	110	10	10		115	6
10	4	3	2	3	5	0	4	5	13	7

Tabulka 1.: Tabulka průniků jednotlivých shluků (1-10 GRG) pro megakaryocytární a monocytární diferenciace. Takovéto tabulky byly vygenerovány pro všechny kombinace diferenciálních studií. Intenzita červené barvy napomáhá k lepší přehlednosti tabulky.

Na druhou stranu červené ostrůvky ležící mimo diagonálu jsou dokladem existence oblastí, které jsou sice aktivní během různých diferenciací ale jejich aktivita se v čase pro různé diferenciace liší. Implementovali jsme vizualizační nástroj, který zobrazuje výpočet relativní hustoty exprese (weighted area regulation, WAR) vzhledem k pozici na chromosomu (obr. 4) a nástroj barevně odlišující geny jednotlivých deseti skupin. Díky němu jsme měli možnost sledovat shlukování regulovaných genů uvnitř RIDGE (regions of increased gene expression) oblastí a periodické změny kinetiky genové regulace. Získali jsme tak zcela nový pohled na dynamiku genové regulace a změnu struktury chromatinu. Pokud se zaměříme na oblasti hustě obsazené regulovanými geny, můžeme pozorovat častý jev periodického opakování genů z oblastí 1-10 na chromosomech (postupný nástup). Detailní zpracování hodnot a grafů WAR potvrdilo, že regulované geny se na chromosomech nevyskytují náhodně. Například shluky genů regulovaných v granulocytech a monocytů nacházíme na prvních 10Mbp chromosomu 7. Oproti tomu v této oblasti není žádný shluk u megakaryocytů. V oblasti okolo 90Mbp můžeme na chromosomu 8 vidět 35% genů regulovaných v megakaryocytech oproti 10% v granulocytech. Hus-

tota výskytu regulovaných genů obecně nekoreluje s hustotou genů danou obsazením sklíčka. Například pouze 5 genů ze 60 je regulovaných u monocytů v oblasti okolo 30Mbp chromosomu 20. Výskyt regulovaných genů v různých RIDGE [14, 15] oblastech není rovnoměrný a jednotlivé diferenciální procesy mají své individuální aktivní podoblasti uvnitř RIDGE.



Obrázek 4.: Hustota rozložení regulovaných genů pro různé druhy diferenciace. Díky této vizualizaci můžeme sledovat oblasti relativně (vzhledem k celkovému počtu genů v oblasti) bohaté na regulované geny a současně i s vysokým počtem (absolutně) genů. V prvním až třetím sloupci jsou data spojená s diferenciálními procesy, čtvrtý sloupec vyjadřuje hodnoty pro celé sklíčko (počty zkoumaných genů v daných oblastech).

Naše výsledky potvrdily [16], že nejsou pouze oblasti se striktně zvýšenou nebo sníženou hladinou exprese, ale že na některých polohách chromosomů existují oblasti specifické pro určité buněčné procesy. Výsledky poukazující na poziční shlukování genů během různých druhů diferenciálního procesu představují velký potenciál pro budoucí techniky diagnostického onkologického onemocnění.

Hledání reziduálních rozdílů v buněčných populacích

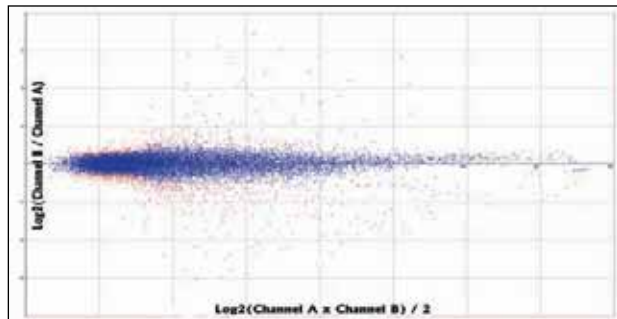
Velmi zajímavé z hlediska uplatnění microarrays v klinické diagnostice se také jeví studie hledající minimální resp. maximální shody dvou zkoumaných vzorků. V práci věnované tomuto problému [9] jsme porovnávali expresní profily CD34+ pozitivních buněk, selektovaných z periferní krve stimulovaných pacientů s non-Hodgkinovým lymfomem, dvěma způsoby selekce (CD34+ a Lin-). Buňky jsme porovnávali během ex vivo [17] diferenciace do granulocytů. Naším cílem bylo nalezení stupně shody dvou odlišně získaných vzorků. Prokázali jsme, že obě dvě selekční metody poskytují srovnatelné buněčné populace, které nemění svůj expresní status ani během dvoutýdenní ex vivo diferenciace do granulocytů.

Pro tuto studii jsme vyvinuli vlastní microarrays metodiku porovnávání vzorků. Jednoduché porovnávání hodnot je příliš zatížené systematickou chybou, především v oblasti nižších intenzit (variance se více projeví). Metoda využívající z-score [18, 19] je navržena tak, aby výsledek nebyl tímto faktem příliš ovlivněn. Námi navržená metodika se sestává nejprve z within-slide normalizace na každém sklíčku. Hodnoty ze vzájemně porovnávaných sklíčků dále normalizujeme between-slide normalizací. Poté je možné jejich hodnoty porovnávat. Z-score metodou nalezneme rozdílné hodnoty a na výstup vracíme procento zastoupení rozdílných hodnot, který reprezentuje rozdílnost (resp. shodu) vzorků aplikovaných na porovnávaných sklech (obr. 5).

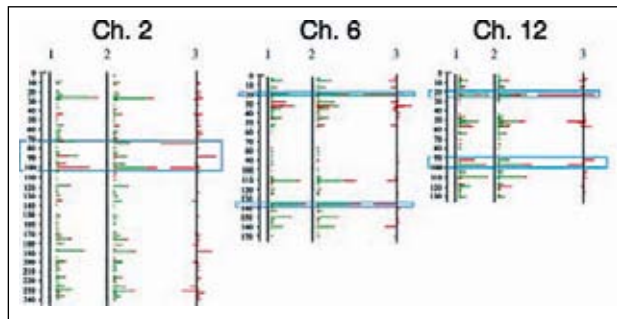
Výzkum v oblasti nádoru tlustého střeva

Experimenty zabývající se nádory tlustého střeva vedeme pomocí porovnávání zdravé a nádorové tkáně [20]. Detekujeme geny s významným rozdílem v expresi během různých stádií onemocnění. Naše cíle jsou jak v identifikaci důležitých genů, tak ve vyvíjení moderního diagnostického přístupu využívajícího srovnávací TM. Identifikovali jsme 195 důležitých genů s významným rozdílem (164 down a 31 up-regulovaných) v expresi mezi zdravou a nádorovou tkání. Pacienty jsme na základě našich studií rozdělili do dvou skupin podle výskytu metastáz v regionálních uzlinách. Provedli jsme funkční analýzu [21] identifikovaných genů. Ta rozdělila geny do kategorií dle jejich funkce a významu. Srovnávací TM nám ukázaly některé společné regiony u různých pacientů a také

regiony, které se mezi pacienty lišily [22]. Tento přístup umožňuje relativně detailní analýzu tkáně nádoru tlustého střeva. Na jejím základě je možné od sebe odlišovat pacienty s různými stádii Duke podle společných a individuálních regionů ve srovnávacích mapách. Výsledky microarrays analýz přenesené do podoby TM jsme studovali s cílem vyjasnit poziční vztahy mezi regulovanými geny. Tyto vztahy mohou objasnit vliv remodelace chromatinu na genovou expresi. Uvedené výsledky mohou doplňovat současnou diagnostiku a pomoci při plánování léčby [23] (obr. 6).



Obrázek 5.: Ukázka MA grafu pro porovnávání dvou buněčných populací (v tomto případě populace buněk získaných pomocí CD34+ a Lin-selekce na začátku ex vivo diferenciace). Modré tečky reprezentují geny s velmi malým rozdílem v expresi, červené tečky naopak geny s významnou odchylkou. Shoda pro tento graf činí 98,3%.



Obrázek 6.: Transkripční mapy jako diagnostický nástroj aplikovaný na data pacientů. V prvním sloupci je naměřená genová exprese pacientů bez metastáz, ve druhém sloupci jsou data pacientů s metastázami. Třetí sloupec reprezentuje rozdíl mezi prvním a druhým sloupcem.

Závěr

Technologie cDNA microarrays se nám osvědčila jako velmi silný nástroj při výzkumu v oblasti onkologických onemocnění a to především na hledání nových vztahů ve změně vyjádření genů, či rodin genů v průběhu maligní transformace. Díky velkému počtu současně zkoumaných genů jsou studie prováděné za pomoci této technologie velmi robustní a málo zatížené výběrovou chybou. Za pomoci stejných druhů sklů je možné sledovat široké spektrum jevů. V této publikaci jsme např. zmínili studie zabývající se leukemickými buňkami a buňkami tkáně tlustého střeva. Díky interdisciplinární povaze naší skupiny jsme vyvinuli nástroje, které nám transformovaly data do přehledné formy. Příkladem jsou transkripční mapy, které dávají do souvislosti genovou expresi s pozicí genu na chromosomu. Také nástroje funkční analýzy microarrays dat poskytují čím dál sofistikovanější výsledky umožňující propojit změny v expresním statusu s jednotlivými metabolickými dráhami [24]. Podobné nástroje je možné vytvářet i pro další studie a tím ještě více rozšířit užitečnost cDNA microarrays.

Poděkování

Tato práce byla podpořena grantem Grantové agentury České Republiky GAČR (301/04/P136) a grantem interní grantové agentury ministerstva zdravotnictví IGA MZ (1A/8241-3).

Literatura

1. Cremer, T., Cremer, C. 2001. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet.* 2: 292-301.
2. Kozubek, S., Lukášová, E., Jirsová, P., Koutná, I., Kozubek, M., Ganová, A., Bártová, E., Falk, M., Paseková, R. 2002. 3D Structure of the human genome: order in randomness *Chromosoma*. Volume 111, Issue 5, Dec 2002:321 – 331.
3. Lukášová, E., Kozubek, S., Kozubek, M., Falk, M., Amrichova, J. 2002. The 3D structure of human chromosomes in cell nuclei. *Chromosome Res.* 10(7):535-48.
4. E. Bártová, P. Jirsová, M. Fojtová, K. Souček, S. Kozubek. 2003. Chromosomal territory segmentation in apoptotic cells. *Cellular and Molecular Life Science*. Volume 60, Number 5, pages: 979 – 990.
5. MacAulay, C., Palcic, B. 1988. A comparison of some quick and simple threshold selection methods for stained cells. *Analyt. Quant. Cytol. Histol.* 10:134-138.
6. Yang, Y.H. and Thorne, N. 2003. Normalization for Two-color cDNA Microarray Data. *Science and Statistics. A Festschrift for Terry Speed, D. Goldstein (eds.)*, IMS Lecture Notes, Monograph Series, Vol 40, pp. 403-418.
7. Bolstad, B.M., Irizarry, R.A., strand, M. and Speed, T.P. 2003. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*. Jan 22;19(2):185-93.
8. Van Epps DE, Bender J, Lee W, et al. Harvesting, Characterization, and Culture of CD34+ Cells from Human Bone Marrow, Peripheral Blood, and Cord Blood. *Blood Cells* 1994;20: 411- 423.
9. Koutná I. and Klabusay M., Kohutova V., Krontorád P., Svoboda Z., Kozubek M., Mayer J. Evaluation of CD34+ and Lin- selected cells from peripheral blood stem cell grafts of patients with lymphoma during differentiation in culture ex vivo using a DNA microarray technique. *Experimental Hematology*. 2006 Jul;34(7):832-40.
10. Lee, K.H., Chang, M.Y., Ahn, J.I., Yu, D.H., Jung, S.S., Choi, J.H., Noh, Y.H., Lee, Y.S., Ahn, M.J. 2002. Differential gene expression in retinoic acid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells, NB4 and HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. Sep; 296(5):1125-33.
11. Bartova E, Kozubek S, Jirsova P, Kozubek M, Gajova H, Lukasova E, Skalníková M, Ganova A, Koutna I, Hausmann M (2002) Nuclear topography and gene activity in human differentiated cells. *J Struct Biol* 139:76–89.
12. Depaetere, S., Joniau, M. 1994. Polar agents with differentiation-inducing capacity prime myelomonocytic cell lines to lipopolysaccharide-induced cytotoxicity: the role of endogenous tumor necrosis factor. *Leukemia*. Nov;8(11):1951-9.
13. Depaetere, S., Vanhaesebroeck, B., Fiers, W., Willems, J., Joniau, M. 1995. Polar agents with differentiation inducing capacity potentiate tumor necrosis factor-mediated cytotoxicity in human myeloid cell lines. *J Leukoc Biol.* Jan;57(1):141-51.
14. Caron, H., Schaik, van B., Mee, van der M., Baas, F., Riggins, G., Sluis, van P., Hermus, M.C., Asperen, van R., Boon, K., Voute, P.A., Heisterkamp, S., Kampen, van A., Versteeg, R. 2001. The human transcriptome map: clustering of highly expressed genes in chromosomal domains. *Science*. 291:1289-1292.
15. Versteeg, R., Schik, B.D.C., Batenburg, M.F., Roos, M., Monajemi, R., Caron, H., Bussemaker, H.J., Kampen, A.H.C. van (2003) The human transcriptome map reveals extremes in gene density, intron length, GC content, and repeat pattern for domains of highly and weakly expressed genes. *Genome Res* 13: 1998-2004 .
16. Koutná, I. , Krontorád, P., Svoboda, Z., Bartová E., Kozubek, M., Kozubek, S. 2006. New insights into gene positional clustering and its properties supported by large-scale analysis of various differentiation pathways. *Genomics* (2006), doi:10.1016/j.ygeno.2006.07.013.
17. Sato N, Sawada K, Koizumi K, et al. In Vitro Expansion of Human Peripheral Blood CD34+ Cells. *Blood* 1993;82(12): 3600-3609.
18. Quackenbush J. Microarray data normalization and transformation. *Nat. Genet. Suppl.* 2002;32: 496-501.
19. Cheadle C, Vawter MP, Freed WJ, Becker KG. Analysis of microarray data using Z score transformation. *J. Mol. Diagn.* 2003;5(2): 73-81.
20. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins Pathologic Basis of Disease. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1999.
21. Abiko Y, Hiratsuka K, Kiyama-Kishikawa M, Tsushima K, Ohta M, Sashihara H. Profiling of differentially expressed genes in human gingival epithelial cells and fibroblasts by DNA microarray. *J Oral Sci*, 2004; 46: 19–24.
22. E Jansová, I Koutná, P Krontorád, Z Svoboda, S Křivánková, J Žaloudík, M Kozubek and S Kozubek. Comparative transcriptome maps: a new approach to the diagnosis of colorectal carcinoma patients using cDNA microarrays. *Clinical Genetics*, 2006, Volume 69, page 218 – 227.
23. Liefers GJ, Tollenaar RAEM. Cancer genetics and their application to individual medicine. *Eur J Cancer*, 2002; 38:872–879.
24. Mlecnik B, Scheideler M, Hackl, Hartler J, Sanchez-Cabo F , Trajanoski Z. PathwayExplorer: web service for visualizing high-throughput expression data on biological pathways. *Nucleic Acids Res.* 2005, 33: W633-W637.

URČOVÁNÍ NEBALANCOVANÝCH GENOVÝCH ZMĚN METODOU ARRAY KOMPARATIVNÍ GENOMOVÉ HYBRIDIZACE (ARRAY CGH) U NÁDORŮ.

DETERMINATION OF GENOMIC IMBALANCES USING ARRAY COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION (ARRAY CGH) IN CANCER GENOM.

JAROŠOVÁ M¹., POSPÍŠILOVÁ H¹., PLACHÝ R.¹, PAPAŽÍK T.¹, KOPTÍKOVÁ J²., INDRÁK K.²

¹HEMATO-ONKOLOGICKÁ KLINIKA LF A FN OLOMOUC

²CENTRUM BIOSTATISTIKY A ANALÝZ, PŘF A LF MU BRNO

Souhrn

Nádory jsou onemocněním charakterizovaným genomovou instabilitou. Změny v počtu kopií DNA jsou jednou z mnoha abnormit, kterými může být ovlivněna exprese a funkce genů. Proto určení nebalancovaných změn, které představují především amplifikace a delece chromosomových oblastí a genů v nich lokalizovaných, dovozuje určit kritické geny a signální dráhy zahrnuté do vzniku a vývoje onemocnění. Určení takových nebalancovaných změn dovozuje molekulárně cytogenetická metoda komparativní genomové hybridizace (CGH). CGH se stala základem nedávno vyvinuté technologie, metody array komparativní genomové hybridizace (array CGH), která dovozuje detailní analýzu chromosomových oblastí, ve kterých došlo ke změně počtu kopií sekvencí DNA. V současnosti můžeme využít řady array CGH technologií, které významným způsobem zvyšují rozlišovací schopnost metody CGH a umožňují definovat v genomu oblasti, které mají vztah ke vzniku nádoru a dovozuje rychle odhalit geny ležící v těchto oblastech.

Tato práce informuje o principu, významu a využití metody array CGH při určování nebalancovaných změn v nádorovém genomu.

Klíčová slova: CGH, DNA čip, array CGH, nádorový genom, onkogen, tumor supresorový gen

Summary

Cancer is a disease characterized by genomic instability. One of the mechanisms that changes gene expression and gene function is DNA copy number changes. These changes mostly include gains and losses of chromosomal regions, which can be detected by molecular cytogenetic method: comparative genomic hybridization (CGH). On the basis of CGH a new method has been recently developed called array comparative genomic hybridization (array CGH). Array CGH improves the resolution of CGH and enables detailed analysis of chromosomal regions, detecting DNA sequence copy number changes. Modern array CGH technologies possess increased sensitivity and are able to define genomic regions related to cancer, and to identify genes lying within these regions. Such genes may be involved in critical signaling pathways and may play role in cancer development and progression. This work informs about the principle, significance and usage of array CGH method in detection of imbalanced aberrations of cancer genome.

Key words: CGH, DNA chip, array CGH, tumor genom, oncogene, tumor suppressor gene

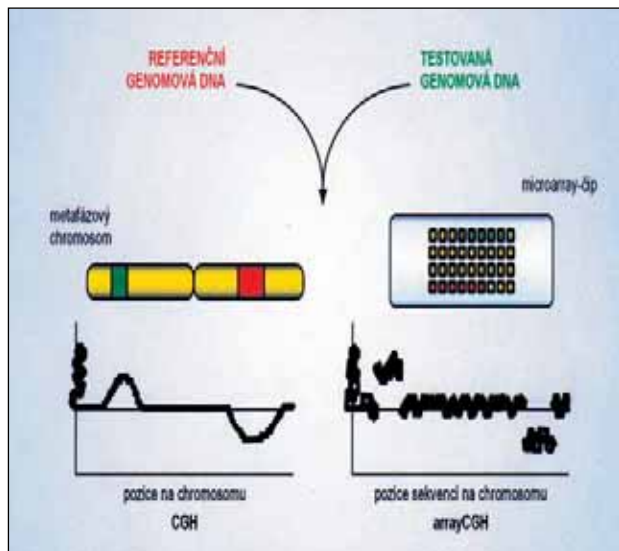
Úvod

Molekulárně cytogenetické metody představují revoluční a dnes již potvrzený způsob určování chromosomových změn. Jednou z takových technologií, která byla vyvinuta především pro vyšetřování nádorových buněk, je metoda komparativní genomové hybridizace (CGH). CGH (obr. č. 1) byla vyvinuta pro měření změn počtu kopií sekvencí DNA v celém genomu v jednom vyšetření (1, 2). Principem metody je komparativní neboli poměrná hybridizace dvou odlišně značených genomových DNA s normálními metafázovými chromosomy. Genomové DNA jsou izolovány ze dvou buněčných populací, normální a nádorové, a jsou značeny rozdílnými fluorochromy, obvykle červeným a zeleným. Po skončení hybridizace jsou měřeny intenzity obou fluorescencí podél každého chromosomu a poměr intenzit červené a zelené fluorescence pak určuje relativní poměr počtu kopií ve vyšetřovaném genomu. Jedna z genomových DNA je vždy normální, označená

jako referenční, takže poměr přímo mapuje změny počtu kopií v testovaném genomu. Je důležité si uvědomit, že CGH samotná určuje pouze změny počtu kopií, ale ne absolutní počet kopií. Přesně tetraploidní buněčná populace bude tedy dávat konstantní poměr v genomu a bude nerozlišitelná od výsledku získaného z diploidní testované populace.

Metoda CGH má své omezené rozlišovací schopnosti a dovozuje určit nebalancované změny na chromosomech, které se pohybují od 3 megabází (Mb) pro ztráty genetického materiálu a 7–10 Mb pro určení přítomnosti nadbytečného genetického materiálu (3). Zvýšit citlivost metody, která v jediné hybridizační reakci dovozuje analyzovat celý nádorový genom, se podařilo zavedením metody array komparativní genomové hybridizace (array CGH). Cíl hybridizace, metafázové chromosomy metody CGH, byly nahrazeny fragmenty klonované DNA různých genů. Tyto fragmenty byly speciální technikou umístěny – tištěny na povrch skla, kde k nim referenční

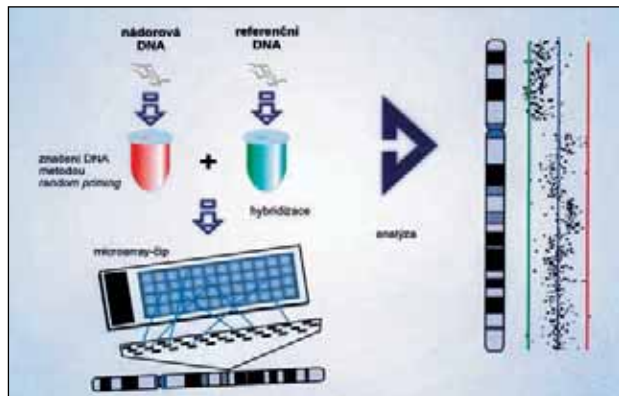
a zkoumaná DNA hybridizují. Každý fragment klonované genomové DNA zaujímá své přesně určené místo na povrchu skla. Takto připravené speciální sklo bylo označeno microarray neboli čip (obr. 1).



Obrázek č. 1: A. Komparativní genomová hybridizace (CGH). Princip metody CGH je založen na hybridizaci dvou rozdílně značených genomových DNA, které hybridizují s normálními chromosomy. Poměr fluorescenčních intenzit určuje oblasti na chromosomu, ve kterých došlo ke ztrátám nebo zmožnění genetického materiálu. B. Stejná hybridizace dvou rozdílně značených genomových DNA s DNA čipem. Počty kopií klonů na čipu jsou určeny poměrem naměřených intenzit fluorescence a jejich určení závisí také na velikosti klonů a jejich lokalizaci na chromosomu.

Princip metody array CGH

Technologie array CGH, také označována jako matrix CGH, byla zpočátku použita pro určení segmentálních změn – tj. změn, které se týkaly chromosomových oblastí o velikosti několika megabází, (Mb), a které byly lokalizované ve specifických chromosomových oblastech spojených s určitým onemocněním. Salinos-Toldo a spolupracovníci (4) použili microarray technologii k určení nebalancovaných chromosomových změn. V metodě CGH nahradili cíl hybridizace, metafázové chromosomy, microarray neboli čipem, který obsahoval klony s velkými inzerty (large insert clones – LIC) pokrývajícími chromosom 13q14 a další oblasti. Analýza řady buněčných linií a nádorového genomu v práci těchto autorů ukázala, že tento přístup dovoluje zvýšit citlivost metody CGH z 10 megabází (Mb) na 75–130 kilobází (kb).



Obrázek č. 2: Schematické znázornění principu array komparativní genomové hybridizace (detailní popis v textu).

Základním principem metody array CGH je hybridizace (Obr. č. 2). Vzorky normální a nádorové genomové DNA jsou pomocí molekulárně genetické metody random priming PCR ozna-

čeny rozdílnými fluorochromy a takto rozdílně značené DNA hybridizují s čipem obsahujícím fragmenty genomové DNA vybraných genů. Výsledek hybridizace je hodnocen pomocí speciálního přístroje, umožňující měření intenzity fluorescence hybridizované normální a nádorové DNA. Rozdíl v poměru intenzity červené a zelené fluorescence určuje nebalancované změny v nádorovém genomu. Pro vyhodnocení výsledků hybridizace se používají speciální programy zabudované přímo v čtecím zařízení a statistické vyhodnocení je prováděno pomocí dalších samostatných softwarových nástrojů.

Array CGH slouží ke zvýšení přesnosti, rozlišení a rozsahu změn ve srovnání s klasickou metodou CGH a měření může být porovnáno přímo k pozici na genomové sekvenci (5).

Čip pro array CGH je připraven z mapovaných BAC (Bacterial Artificial Chromosomes) a dalších genomových klonů nebo jsou na hybridizačním skle umístěny fragmenty komplementární DNA genů (cDNA) a nebo oligonukleotidy. V případě použití BAC array, vyžaduje hybridizační reakce několik stovek nanogramů genomové DNA, ale více jak jeden mikrogram DNA je potřebný pro cDNA array a některé specifické BAC čipy (6, 7). Jednotlivé typy čipů mají své přednosti, ale i svá omezení. Například, vyšší rozlišení je dosaženo použitím oligonukleotidových čipů, které jsou připraveny technikou spotování na sklo (8) nebo přímou syntézou na sklo nebo silikonové substráty (9), které obsahují více jak 500 000 elementů. Čipy pro určení nukleotidového polymorfismu (Single nucleotide polymorphism array-SNP) jsou vysoce citlivé čipy dovolující určit i ztrátu heterozygotizace jednotlivých nukleotidů i změny počtu kopií (10). SNP čipové sondy jsou sestavené z 25-merových oligonukleotidů a každý SNP má jak sense tak antisense řetězec. Intenzita sondy tak odpovídá dvěma alelám a umožňuje tak určit celkem tři genotypy – AA, BB nebo AB. Na rozdíl od BAC čipu hybridizuje k SNP čipu pouze jedna genomová DNA a změny počtu kopií jsou určeny na základě srovnání s nezávislou předchozí kontrolní hybridizací. Pomocí tohoto přístupu například Raghavan a spol. (10) určili velkou oblast vykazující uniparentální disomii u nemocných s leukémií, kteří měli normální karyotyp. Tento náález měl velký vliv na pochopení genových změn u leukémií a ukázal, že SNP čipy budou mít významné místo také při určování změn v nádorovém genomu.

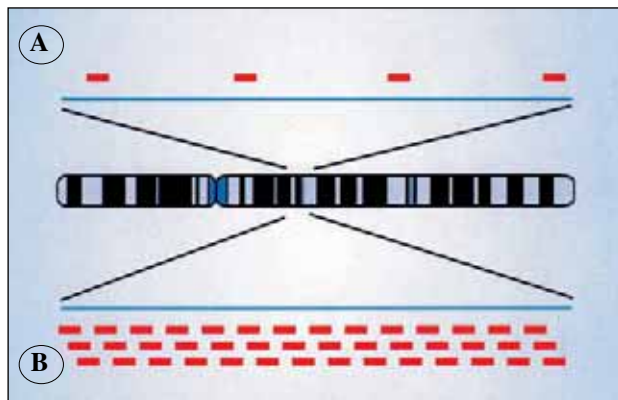
Další možností je použití tzv. long oligonucleotide array. Metoda, která je označena jako ROMA – representational oligonucleotide microarray analysis, představuje přístup, ve kterém je genomová DNA rozštěpena pomocí restričního enzymu, nejčastěji BglII, který je následován linker-mediated polymerázovou řetězovou reakcí, a výsledkem jsou fragmenty o délce menší jak 1,2 kilobáze (kb). Tento přístup dovoluje určení změn, které jsou menší jak jedna megabáze (8).

Tiling array

Přesto, že je možné konstruovat čipy s různým počtem klonovaných DNA v jednotlivých chromosomových oblastech, je výběr četnosti klonů velmi individuální. Může totiž vést k tomu, že některé oblasti zůstanou nepokryté. Pro úplné porozumění významu nebalancovaných změn v nádorovém genomu potřebujeme takové čipy, které skutečně pokrývají celý genom.

Ishkanian a spol. (11) dosud jako jediní, sestavili čip pro array CGH pokrývající skutečně celý genom (Obr. 3). Toto tzv. submegabázové rozlišení, sestavené ze sady překrývajících se klonů, bylo označeno „SMRT“ (Submegabase resolution tiling set). Tento čip je tvořen celkem 32 433 překrývajícími se BAC klony, které jsou naspotovány v triplicátech na celkem dvě hybridizační skla. Významem těchto citlivých konstrukcí tkví v tom, že takovým čipem mohou být detekovány mikrozmeny, které při použití jiných čipů zůstanou neodhalené. Avšak takové vysoké rozlišení má svá úskalí. Tento čip, na rozdíl od jiných s menším rozlišením, obsahuje i klony, které hybridizují

zují s vysoce homologními sekvencemi v genomu, a proto je vyhodnocení takových čipů velmi náročné a vyžaduje značné znalosti a zkušenosti.



Obrázek č. 3: Znárodnění možností volby klonů pro konstrukci čipu. A – Rozlišení čipu je dáno počtem a vzdáleností jednotlivých vybraných klonů v daných oblastech. B – Příklad volby klonů pro konstrukci tzv. tiling array, ve kterém se jednotlivé klony vzájemně překrývají.

Požadavky na kvalitu a kvantitu DNA

Pro získání kvalitních a validních výsledků je při použití metody array CGH zapotřebí dodržet dnes již přesně stanovené podmínky každé hybridizace. Významným faktorem, ovlivňujícím již na počátku výsledek hybridizace, je kvalita a kvantita vyšetřované DNA. Problémy se získáním potřebného množství DNA se mohou objevit především u materiálu získaného z malých biopsií, zatímco problém s kvalitou se může objevit u formalinem fixovaných tkání nebo u parafinových řezů. Dnes již víme, že tzv. „large insert“, klony s velikostí kolem 150 kb, jsou poměrně citlivé a hybridizace je úspěšná i při použití méně kvalitní DNA. To však neplatí pro oligonukleotidové čipy a čipy tvořené malými PCR fragmenty. Většina BAC čipů vyžaduje pro hybridizaci 200–400 ng DNA, zatímco oligonukleotidové a cDNA čipy vyžadují až 1 mikrogram vysoce kvalitní DNA.

Další limitací pro array CGH je heterogenita tkáně (12). Nádorové buňky v nádorovém vzorku vedou k posunu v poměru signálů spojených s genetickými změnami v nádorových buňkách. Garnis a spol. (13) napodobili tento fenomén experimentálně a potvrdili, stejně jako Davies a spol. (14), že pravděpodobnost určení změn určité velikosti není závislá jen na počtu klonů přítomných na čipu, ale také na jejich velikosti. Větší klony jsou identifikovány s větší pravděpodobností než klony malé.

Důležitý je také vhodný výběr referenční DNA. Používá se DNA jak od jedince opačného pohlaví, tak stejného pohlaví. Referenční DNA je směsí DNA různých jedinců nebo jde o DNA pouze jednoho jedince. Výběr závisí také na zkušenosti laboratoře.

Analýzy dat získaných metodou array CGH

Rychlý rozvoj metody array CGH vedl k vyvinutí řady softwarových systémů pro statistické hodnocení a vizualizaci dat. Prvním krokem vizualizace je konverze obrazových dat získaných z příslušného čtecího zařízení do číselného vyjádření lokus-specifického poměru počtu kopií. Program, který to umožňuje, je součástí softwarového vybavení řady skenerů. Druhým krokem je přiřazení elementů naspotovaných na čipu k jejich pozici v genomu. Speciální program dokáže na základě informace o sekvenci jednotlivých BAC klonů určit jejich vztah k lidskému genomu. Každý klon zastoupený na čipu je pak přesně graficky lokalizován na své genomové místo (obr. 2).

Určení nebalancovaných změn vyžaduje statistické vyhodnocení získaných dat. Programy vhodné k tomuto účelu jsou jak volně dostupné, tak je možné je zakoupit od specializovaných softwarových firem. Avšak použití softwarových programů

vyžaduje v praxi velmi dobrou znalost jejich principu. Neznalost by mohla vést k nesprávnému použití a interpretaci výsledků. Příkladem volně dostupných programů, které jsou schopné hodnotit jednotlivé experimenty, jsou např. ArrayCyCHt (genomics.catholic.ac.kr/arrayCGH), Caryoscope (caryoscope.stanford.edu/ a nebo SeeGH (www.ArrayCGH.ca) (15). Sofistikovanější programy, které dovolují vyhodnotit více experimentů, jsou např. CGHPro (http://www.molgen.mpg.de/~abtop/molecular cytogenetics/ArrayCGH/CGHPRO) nebo CGHAnalyzer (http://guanine.genomics.upenn.edu/people/faculty/weberb/douwnloads.htm cgh/html/).

Pro vlastní vyhodnocení výsledku hybridizace je nutné znát také aktuální informace o polymorfismech v lidském genomu a tyto informace využít při hodnocení výsledků (15).

Určování změn v nádorovém genomu metodou array CGH

V posledních 5 letech byla publikována řada studií využívajících metody array CGH pro určování změn počtu kopií zaměřených na specifické oblasti, o kterých bylo známo, že jsou často zahrnuté do nebalancovaných aberací. Například byl zkonstruován čip pro chromosom 3p tvořený 535 BAC klony a byl použit pro definování často deletovaných a amplifikovaných oblastí u nádorů dutiny ústní (16) a nádorů plic (17) nebo 5p čip s 491 BAC klony pokrývajících 50 Mb na chromosomu 5p (18) a čip pro chromosom 1p s celkem 642 BAC klony pokrývajících 120 Mb, zase pomohl při objevu genů podílejících se na tumorigenězi plic (19).

Význam použití čipů s vysokým rozlišením byl potvrzen na studiích provedených u lymfomu pláštěvé zóny (MCL), který je charakterizován translokací t(11;14)(q13;q32). Tato změna je příčinou zvýšené exprese cyklinu D1. Pro maligní transformaci jsou nutné přidatné genetické změny. Tyto změny a jejich frekvence byly studovány metodou array CGH s různými typy čipů. Kohlhammer a spol. (20) použili čip s rozlišením 15 Mb a detekovali průměrně 6,7 změn na jeden vyšetřený případ MCL. Určili tak o 50 % více změn, než bylo určeno klasickou metodou CGH. V této práci bylo určeno celkem 6 oblastí s kandidátními geny, které jsou cílem dalších výzkumů. Ve studii Schraderse a spol. (21) byl u MCL použit čip s rozlišením 800 kb a bylo určeno 15,4 změn na jeden případ a celkem 15 oblastí s kandidátními geny. Další významná data byla získána ze studie de Leeuw a spol. (22). Analýza buněčné linie MCL s použitím SMRT čipu dovolila určit v průměru 35 změn v genomu se stejným množstvím jak ztrát genetického materiálu, tak zmnožení, a potvrdila opakující se změny menší jak 130 kb (22). Ačkoliv byla tato studie provedena na buněčné linii, kde některé změny mohou souviset s kulturačními artefakty, detekci celkem 35 změn je možné považovat za velmi významnou. Navíc byly některé změny submegabázové velikosti a zahrnovaly pouze 1–2 kandidátní geny. Použitím tohoto velmi citlivého čipu se ukázalo, že delece na chromosomu 8p21, u které určili Kohlhammer a spol. (20) velikost 2,4 Mb, je ve skutečnosti delece o velikosti 730 kb a zahrnuje tři kandidátní tumor supresorové geny, jako např. TNFRSF10B – gen tumor necrosis factor.

Použití metody array CGH s čipy s vysokým rozlišením přináší významné informace o kandidátních genech, které jsou zahrnuty do patogenese onemocnění. Právě použití citlivých čipů dává možnost odhalit a následně analyzovat malé oblasti v genomu. Příkladem je trisomie chromosomu 12 u MCL. Ve studii de Leeuw a spol. (22) se ukázalo, že nejde o kompletní trisomii chromosomu 12, ale bylo objeveno 6 oblastí na chromosomu 12, které byly duplikované na krátkém i dlouhém rameni chromosomu 12, přičemž jedna duplikace z nich byla menší jak 370 kb a obsahovala pouze 2 geny. To je důkaz, že se vzrůstající rozlišovací schopností array CGH technologií vzrůstá také pravděpodobnost snadnějšího odhalení dosud neznámých nádorových genů.

Genetické změny spojené s progresí nádorů

Použití array CGH technologií přispělo také k porozumění některým změnám, které pozorujeme v době progresu onemocnění. Martinez-Climent a spol. (23) použili čip s 2400 klonů s rozlišením 1,4 Mb pro studium změn buněčné linie folikulárního lymfomu (FL) a několika pacientů s transformací FL do velkobuněčného B lymfomu (DLBCL). Genomový profil byl porovnán s jejich expresním profilem a bylo potvrzeno, že transformace je provázána vznikem dalších genomových změn a změna exprese řady genů odpovídala jejich genomovým změnám.

Jiná studie byla zaměřena na určení genetických změn v souvislosti s progresí premaligního stádia nádoru do plně maligní formy. Weiss a spol. (24) studovali metodou array CGH hyperplastické polypy žaludku a žaludeční adenomy a výsledkem srovnání bylo zjištění, že existují pravděpodobně dvě rozdílné patogenetické cesty vzniku nádorů žaludku.

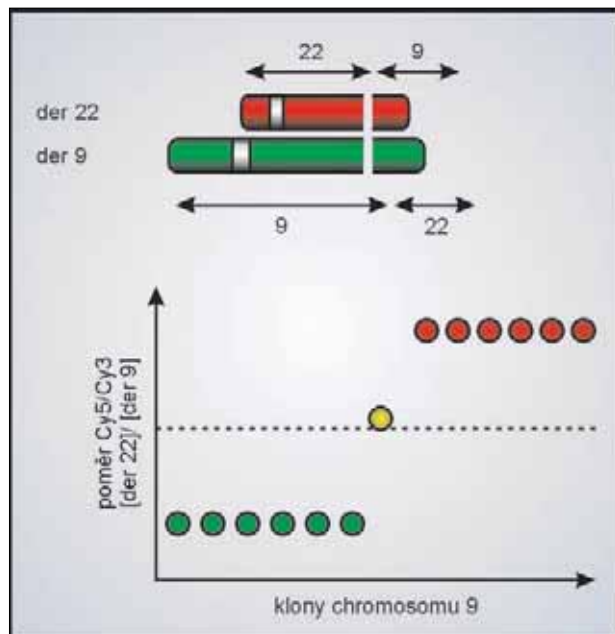
Výsledky práce Nyante a spol. (25) u nádorů prsu ukázaly, že na základě nebalancovaných změn můžeme odlišit podtypy nádorů prsních s odlišným klinickým průběhem.

Všechny tyto studie ukázaly, že pozdější nádorová stádia jsou charakterizována vyšším výskytem změn ve srovnání s jejich předchozími stádii. Předpokládá se, že právě tyto přídavné změny jsou odpovědné za progresi onemocnění. Tyto nálezy mohou také přinést důležité prognostické informace o budoucím klinickém chování onemocnění. Například, korelace array CGH výsledků s klinickým průběhem onemocnění u lymfomu plášťové zóny (MCL) ukázala, že delece na chromosomech 8p a 13q14 je vždy spojena se špatnou prognózou onemocnění (20).

Čipová technologie pro určení translokací

Metoda array CGH dovoluje určit změny počtu kopií sekvenčí DNA. Nedovoluje určit chromosomové změny typu inverze a balancované translokace, ve kterých nedochází ke změně počtu kopií. Pro určení balancovaných změn byla vyvinuta modifikace metody array CGH a byla označena array painting (26). Array painting využívá průtokové cytometrie k sortování a separaci abnormálních chromosomů, které jsou výsledkem translokace nebo inverze, pomocí změny velikosti a poměru párů bází. Následuje izolace DNA z těchto abnormálních chromosomů. DNA obou aberantních chromosomů jsou označeny rozdílnými fluorochromy a hybridizují s čipem. V případě balancované translokace rozdílně značené DNA dvou derivovaných chromosomů ukazují sekvence, které jsou pro-

ximálně vzhledem ke zlomu značené jednou barvou, zatímco sekvence, které jsou distálně ke zlomu, jsou značeny jinou barvou (Obr. 4). Kombinací metod array CGH a array painting je možné stanovit jak změny počtu kopií DNA, tak balancované translokace.



Obrázek č. 4.: Schematické znázornění principu metody paintig array (detailní popis v textu).

Závěr

V této práci jsme se zaměřili na molekulární cytogenetickou metodu array CGH dovolující určení změn počtu kopií sekvenčí DNA, na její princip a význam u nádorů. Změny počtu kopií DNA jsou jedním z mnoha mechanismů, které se mohou podílet na změně exprese genů, která vede ke vzniku nádoru. Využití této technologie pro studium změn nádorového genomu je příslibem významného pokroku v určení nádorových genů. Jejich následné analýza přinese nové informace o jejich roli a podílu na vzniku a vývoji nádorů a jejich možné cílené léčbě.

Práce je podporována grantem MŠM 6198959205.

Literatura:

1. Kallioniemi A., Kallioniemi OP., Sidar D. et al.: Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258, 1992, 818-821.
2. Du Manoir S., Speicher MR., Joos S. et al.: Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic hybridization. *Human Genet* 90, 1993, 590-610.
3. Lichter P., Joos S., Bentz M. et al.: Comparative genomic hybridization: uses and limitations. *Semin Hematol* 37, 2000, 348-357.
4. Solinas-Toldo S., Lampel S., Stilgenbauer S. et al.: Matrix-based comparative genomic hybridization biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 20, 1997, 399-407.
5. Pinkel D., Segreaves R., Sudar D. et al.: High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 20, 1998, 207-211.
6. Pollack JR., Perou CM., Elizadeh AA. et al.: Genome-wide analysis of DNA copy number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet* 23, 1999, 41-46.
7. Carvalho B., Ouwerkerk E., Meijer GA., Ylstra B.: High resolution microarray comparative genomic hybridization analysis using spotted oligonucleotides. *J Clin Pathol* 57, 2004, 644-646.
8. Lucito R., Healy J., Alexander J. et al.: Representational oligonucleotide microarray analysis: a high-resolution method to detect genome copy number variation. *Genome Res* 13, 2003, 2291-2305.
9. Zhou X., Cheng Li J., Paez G., et al.: An integrated view of copy number and allelic alterations in the cancer genome using single nucleotide polymorphism array. *Cancer Res* 64, 2004, 3060-3071.
10. Raghavan M., Lillington DM., Skoulakis S. et al.: Genome-wide single nucleotide polymorphism analysis reveals frequent partial uniparental disomy due to somatic recombination in acute myeloid leukemias. *Cancer Res* 65, 2005, 375-378.
11. Ishkaniana S., Malloff CA., Watson SK. et al.: A tiling resolution DNA microarray with complete coverage of human genome. *Nat Genet* 36, 2004, 299-303.
12. Pettus JA., Cowley BC., Maxwell T. et al.: Multiple abnormalities detected by dye reversal genomic microarrays in prostate cancer: a much greater sensitivity than conventional cytogenetics. *Cancer Genet Cytogenet* 154, 2004, 110-118.
13. Garnis C., Rosin MP., Zhang L., Lam WL.: Comparing canonical non-small cell lung squamous and adenocarcinoma model genomes. *Int J Cancer* 116(5), 2005, 813-819.
14. Davies JJ., Wilson IM., Lam WL.: Array CGH technologies and their applications to cancer genom. *Chromosome Research*, 13, 2005, 237-248.
15. Lockwood WW., Chari R., Chi B., Lam WL.: Recent advances in array comparative genomic hybridization technologies and their applications in human genetics. *E J Human Genetics*, 14, 2005, 139-148.
16. Garnis C., Baldwin C., Zhang L. et al.: Use of complete coverage array

- comparative genomic hybridization to define copy number alteration on chromosome 3p in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Res*, 63, 2003, 8582-8585.
17. Garnis C., Campbell J., Davies JJ. et al.: Involvement of multiple developmental genes on chromosome 1p in lung tumourigenesis. *Hum Mol Genet*, 14, 2005, 475-482.
18. Coe BP., Henderson LJ., Garnis C. et al.: High-resolution chromosome arm 5p array CGH analysis of small cell lung carcinoma cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* 42, 2005, 308-313.
19. Henderson LJ, Coe BP., Lee EH. et al.: Genomic and gene expression profiling of minute alteration of chromosome arm 1p in small cell lung carcinoma cell. *Br J Cancer* 92, 2005, 1553-1560.
20. Kohlhammer H., Schaenen C., Wessendorf S. et al.: Genomic DNA-chip hybridization in t(11;14)-positive mantle cell lymphomas shows a high frequency of aberrations and allows a refined characterization of consensus regions. *Blood*, 104, 2004, 795-801.
21. Schraders M., Pfund R., Straatman HM. et al.: Novel chromosomal imbalances in mantle cell lymphoma detected by genome-wide array-based comparative genomic hybridization. *Blood*, 105, 2004, 686-1693.
22. de Leeuw RJ., Davies JJ., Rosenwald A. et al.: Comprehensive whole genome array CGH profiling of mantle cell lymphoma model genomes. *Hum Mol Genet* 13, 2004, 1827-1837.
23. Martinez-Climent JA., Alizadeh AA., Segraves R. et al.: Transformation of follicular lymphoma to diffuse large cell lymphoma is associated with a heterogeneous set of DNA copy number and gene expression alterations. *Blood* 101, 2003, 3109-3117.
24. Weiss MM., Kuipers EJ., Postma C. et al.: Genome wide comparative genomic hybridization analysis of premalignant lesions of the stomach. *Mol Pathol* 56, 2003, 293-298.
25. Nyante SJ., Devries S., Chen YY. et al.: Array-based comparative genomic hybridization of ductal carcinoma *in situ* and synchronous invasive lobular cancer. *Hum Pathol*. 35, 2004, 759-763.
26. Fiegler H., Gribble SM., Burford DC. et al.: Array painting: a method for a rapid analysis of aberrant chromosomes using DNA microarrays. *J Med Genet* 40, 2003, 664-670.

OD GENOMU K PROTEOMU – VYUŽITÍ PROTEINOVÝCH ČIPŮ V ONKOLOGII

FROM GENOME TO PROTEOME – USING OF PROTEIN MICROARRAYS IN ONCOLOGY

MALČIKOVÁ J., TICHÝ B., KOTAŠKOVÁ J., MAYER J., POSPÍŠILOVÁ Š.

CENTRUM MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE A GENOVÉ TERAPIE, INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO

Souhrn

Rychlý rozvoj genomických technologií v posledních letech napomohl k lepšímu pochopení změn, které probíhají v rakovině buňce na úrovni genomu. Skutečnými vykonavateli buněčných funkcí jsou však proteiny kódované genomem. Přímá analýza souboru proteinů buňky - proteomu - má proto velký význam pro pochopení procesu karcinogeneze a také v diagnostice. Celkový buněčný proteom v klinických vzorcích studuje klinická proteomika, jejímž cílem je identifikovat a charakterizovat proteiny zapojené do vzniku a vývoje onemocnění. V onkologii se tato nová disciplína zaměřuje na identifikaci proteinů, které by mohly sloužit jako biomarkery onemocnění pro včasnou diagnosu, a také na studium vlivu terapeutik a nalezení nových terapeutických cílů. Rakovina je značně heterogenní a proměnlivé onemocnění a pro její výzkum i diagnostiku je zapotřebí zavedení vysokokapacitních proteomických přístupů. Proteinové čipy tyto požadavky splňují, neboť umožňují paralelní stanovení mnoha parametrů v minimálním množství vzorku v rámci jediného experimentu. Tato technologie je využitelná nejen pro identifikaci a kvantifikaci proteinů, ale i pro jejich funkční analýzu.

Klíčová slova: proteinové čipy, proteomika, biomarkery, rakovina

Summary

Rapid development of genomic technologies allowed better understanding of changes in cancer cell genome. However, proteins coded by genes execute biological functions predominantly. Hence, direct analysis of collections of proteins i.e. proteome, is of great importance to understanding of carcinogenesis and also for diagnostics. The entire proteome in biological samples is analysed by clinical proteomics that aims to identify and characterise the disease related proteins. The purpose of this novel discipline in oncology is to identify new molecular biomarkers useful in early diagnosis and drug discovery. As cancer being a heterogeneous and dynamic disease, new high-throughput and large-scale technologies are required. Therefore protein microarrays represent a powerful tool in cancer research and diagnosis allowing simultaneous determination of a large number of parameters from a minute amount of sample within a single experiment. Assay systems based on this technology are used for identification and quantification of proteins as well as for the study of protein functions.

Keywords: protein microarrays, proteomics, biomarkers, cancer

Úvod

Primární příčinou vzniku nádorů jsou ve většině případů změny v genomu – genové mutace a chromozómové a genomové aberace. Genom, jakožto soubor všech genů buňky, je však pouze maticí, podle níž se syntetizují proteiny. Soubor všech proteinů v daném biologickém systému v konkrétním okamžiku se nazývá proteom. Právě proteiny realizují většinu buněčných funkcí. Modifikace v proteomu pozměňují signální dráhy a mohou vést k narušení klíčových buněčných procesů jako jsou proliferace, diferenciace, přežívání, apoptóza, metabolické a imunitní procesy (1). V případě, že změny v signálních drahách poskytují buňce selektivní růstovou výhodu, jsou pak vlastní příčinou nádorového bujení (2). Proto identifikace genetických událostí vedoucích k onemocnění vyžaduje také následné pochopení změn v proteomu. Navíc v proteinovém složení se dynamicky odráží momentální změny stavu buněk, proto monitorování proteomu v čase umožňuje určit průběh onemocnění a také reakci na léčbu.

Moderní genomické přístupy v čele s DNA čipy umožňují v jediném experimentu analyzovat celý transkriptom, tj. genovou expresi na úrovni mRNA. Mohou tak určit vztah mezi aktivitou genu a maligním onemocněním. Je však známo, že korelace mezi mRNA expresí a hladinou odpovídajícího proteinu není absolutní (3, 4), a to z důvodu rozdílné kontroly rychlosti syntézy proteinů a také odlišné rychlosti degradace jak mRNA, tak proteinů. Genomické techniky také neumožňují monitorovat, zda je exprimovaný protein funkční. Funkci proteinů ovlivňují interakce s jinými proteiny, či dalšími molekulami a také řada posttranslačních modifikací: například proces přenosu signálu v buňce je přednostně řízen fosforylací proteinů. Proto v současnosti vzniká potřeba zavádění nových přístupů zaměřených přímo na detekci patologických změn v proteinovém spektru.

Studium buněčného proteomu je komplikováno právě jeho značnou komplexitou. Pokud uvažujeme, že naše genetická informace obsahuje 40 000 genů, pak díky posttranskripčním a posttranslačním modifikacím může buňka obsahovat až milion i více proteinů a mnoho z nich může hrát roli ve vývoji onemocnění. Pro analýzu celkových změn v proteinové expresi je tedy třeba zavedení moderních vysokokapacitních metod. Řešení mohou poskytnout proteinové čipy (protein arrays), které umožňují paralelní sledování širokého spektra proteinů současně. V současné době jsou již využívány nejen pro identifikaci a kvantifikaci proteinů v minimálním množství vzorku, ale také pro studium funkčnosti proteinů na základě jejich interakcí s partnerskými molekulami (5).

Princip technologie

Zjednodušeně řečeno jsou proteinové čipy stovky až tisíce proteinů imobilizovaných ve formě mikrospotů na pevném povrchu. Povrchem mohou být membrány (polystyrenové, PVDF - polyvinyliden fluorid, nitrocelulosové), ovšem v současné době se stále více využívá standardních mikroskopických sklíček – skleněných s chemicky modifikovaným povrchem (poly-lysin, aldehydické skupiny) nebo potažených membránou. Nejčastější detekční metodou je fluorescence, ale může být využito i chemiluminiscence nebo radioaktivity (6). Alternativou k těmto planárním čipům jsou systémy založené na mikrosférách pro měření menšího množství analytů. Mikrosféry jsou kulovité částice přibližně o velikosti lymfocytu (průměr ~ 10 µm) vyrobené např. z polystyrenu nebo latexu. Tyto částice jsou „kódovány“ rozdílnými barvami nebo velikostmi a na nich jsou navázány sondy specifické pro stanovené proteiny. S použitím např. flow cytometrie jsou rozdílně kódované mikrosféry rozpoznávány a proteiny ve vzorku jsou takto identifikovány a kvantifikovány. Množství stanovených proteinů je ovšem limitováno počtem druhů mikrosfér (7).

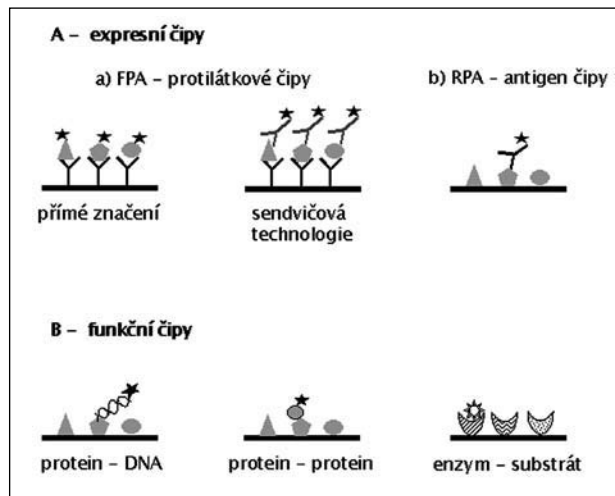
Základy pro vývoj proteinových čipů položil Roger Ekins na

konci 80. let (8). Prokázal, že analýza na principu vazby protilátka-antigen, miniaturizovaná ve formě mikrospotů protilátek na pevném povrchu, může dosáhnout vysoké citlivosti. Systém, který využívá malého množství vázané protilátky a malého objemu vzorku je citlivější než systém se stonásobně větším objemem materiálu, neboť přesto, že množství navázané molekuly je velmi nízké, v rámci mikrospotu lze dosáhnout vysoké hustoty. Při stanovení analytů jako například thyroideální stimulující hormon (TSH) nebo HBsAg dosáhl Ekins se svými spolupracovníky citlivosti řádově ve femtomolech (odpovídá 106 molekulám na ml). Zároveň je možné stanovení množství analytu ve vzorku, neboť množství vázaného analytu přímo odráží jeho koncentraci.

Typy proteinových čipů

Z hlediska použití lze proteinové čipy rozdělit na expresní (analytické) a funkční. Expresní čipy jsou používány pro stanovení přítomnosti a koncentrace proteinů v komplexních vzorcích a mají velký potenciál pro tzv. proteinové profilování, tj. monitorování proteinové exprese ve velkém měřítku (large-scale přístup). Pomocí funkčních proteinových čipů detekujeme interakce proteinů s jinými proteiny, peptidy, nízkomolekulárními látkami, oligosacharidy či DNA.

V případě expresních proteinových čipů existují dva základní formáty, které se liší způsobem aplikace vzorku: přímý (FPA – forward phase arrays) – na povrchu čipu jsou imobilizovány sondy, každý spot obsahuje jeden typ sondy. Čip je inkubován se vzorkem a proteiny jsou ze vzorku sondami vyvazovány. U zpětného formátu (RPA – reverse phase arrays) jsou stovky různých vzorků imobilizovány na povrchu čipu ve formě spotů. Čip je potom inkubován se značenými sondami (6). Nejčastějším typem sond jsou protilátky, pokud jsou imobilizovány na čipu, hovoříme o protilátkových čípech. V případě zpětného formátu, kdy jsou imobilizovány vzorky obsahující proteinové antigeny, jedná se o antigen čipy. (Obr. 1)



Obrázek 1.: Typy proteinových čipů A – expresní čipy. a – FPA (Forward Phase Arrays) u protilátkových čipů jsou na pevný povrch vázány protilátky a ty jsou inkubovány se vzorkem. Proteiny mohou být značeny přímo, nebo se provádí detekce pomocí sekundární značené protilátky – sendvičová technologie. b – RPA (Reverse Phase Arrays) analyzované proteiny jsou naspotovány na čip a jsou detekovány pomocí značených protilátek. B – funkční čipy – na čipu jsou vázány proteiny ve funkční konformaci a je tak umožněno studium jejich interakcí s DNA, jinými proteiny či dalšími molekulami a také studium enzymové aktivity.

Expresní čipy

Protilátkové čipy (FPA)

Nejběžnějším typem přímých analytických čipů jsou protilátkové čipy, kdy je na pevném povrchu vázáno velké množství protilátek a tyto jsou potom inkubovány se vzorkem. Proteiny ve vzorku mohou být značeny přímo nebo se pro detekci pou-

žívá tzv. sendvičová metoda – detekce pomocí značené sekundární protilátky. Použití sekundární protilátky značně zvyšuje citlivost a specifitu analýzy, ovšem vyžaduje dvě specifické protilátky pro daný protein.

Přímé značení proteinů ve vzorku sice umožňuje nižší citlivost detekce – řádově ng/ml, ale jeho výhodou je možnost dvoubarevného značení (9). Podobně jako u DNA čipů porovnáváme expresi mRNA ve dvou vzorcích, můžeme pomocí protilátkových čipů srovnávat hladiny proteinů v různých tkáních (např. zdravá vs. nádorová tkáň). Proteiny ze dvou různých zdrojů jsou barveny dvěma různými fluorescenčními barvami, smíchány ve stejném poměru a inkubovány na čipu. Čip je poté skenován fluorescenčním readem na dvou různých kanálech se specifickou vlnovou délkou pro daný fluorofor. Poměr fluorescence dvou fluoroforů potom odpovídá relativní koncentraci proteinu ve srovnávaných vzorcích (Obr. 2). Poprvé s touto technikou vystoupil Haab se svými spolupracovníky v roce 2001 (9). Spotovali 115 komerčně dostupných protilátek a testovali jejich reaktivitu s příslušnými značenými antigeny připravenými v různých poměrech koncentrací. Při interpretaci výsledků je však třeba brát v úvahu, že silný signál může vzniknout nejen v důsledku vysoké koncentrace stanoveného proteinu ve vzorku, ale také může být důsledkem vazby multiproteinového komplexu, který vzniká pouze v jednom z porovnávaných vzorků. Získané výsledky by proto měly být ověřeny nezávislou metodou. Přesto do dneška již mnoho výzkumných skupin prokázalo obecnou využitelnost tohoto přístupu a proteinové čipy byly použity i v mnoha pracích zaměřených na onkologický výzkum. Sreekumar se svými spolupracovníky (10) použili čipy se 146 různými protilátkami ke sledování změn proteinových hladin u buněk karcinomu tlustého střeva po léčbě ionizujícím zářením a potvrdili radiací indukované zvýšení exprese u několika regulátorů apoptózy. Pro srovnání exprese proteinů u maligní a sousedící normální tkáně u pacientek s primárním nádorem prsu bylo použito protilátkového čipu s 378 protilátkami a bylo nalezeno několik proteinů, jejichž změněná exprese obě tkáně odlišovala (11). Podobně byly studovány sérové proteiny u pacientů s nádory močového měchýře a zdravých kontrol (12). Protilátkové čipy byly také využity pro analýzu exprese CD antigenů u různých leukemických buněk. Čip s naspotovanými anti-CD protilátkami byl inkubován přímo s buněčnou suspenzí a byly takto odlišeny normální leukocyty periferní krve a buňky různých leukémií: chronická lymfatická leukémie, vlasatobuněčná leukémie, akutní myeloidní leukémie, T-buněčná akutní lymfoblastická leukémie a lymfom buněk plášťové zóny. Výhodou tohoto přístupu je, že nevyžaduje barvení, navázané buňky jsou detekovány mikroskopicky a navíc mohou být dále charakterizovány různými fluorescenčně značenými protilátkami (13,14,15). Tento typ čipů, kdy se používají přímo živé buňky se někdy označuje také jako buněčné čipy (viz níže). Pro zvýšení citlivosti detekce se používá sendvičové technologie. Tento přístup byl například využit pro kvantifikaci 150 různých cytokinů a ostatních složek séra a u více než poloviny takto analyzovaných proteinů se podařilo dosáhnout citlivosti řádově v pg/ml (16). Huang a spolupracovníci zase detekovali změny v expresi cytokinů v lidských glioblastomových buňkách po léčbě tumor nekrotickým faktorem alfa (TNF α) (17). K detekci menšího počtu komponent, např. v séru pacientů, je vhodné využít sendvičové technologie v kombinaci s mikrosférami. Byly již využity pro detekci cytokinů, protilátek, metabolických markerů, kináz, ale i širokého spektra patogenů včetně virů, toxinů a bakteriálních spor (7, 18, 19, 20). V současné době jsou již komerčně dostupné sady až sta rozdílně barevně značených mikrosfér a při jejich použití se dosahuje podobné spolehlivosti, citlivosti a přesnosti jako při využití standardní ELISA techniky.

Antigen čipy (RPA)

Jiným typem proteinových čipů jsou tzv. reverse-phase arrays (RPA), čili antigen čipy, kdy jsou na čip imobilizovány přímo

studované vzorky (buněčné nebo tkáňové lyzáty). Přítomnost jednotlivých proteinů (antigenů) je stanovována pomocí specifických značených protilátek. Takto byly například srovnávány hladiny proteinů u 60 lidských nádorových linií. Lyzáty z buněčných linií byly spotovány vždy 10krát v různých ředěních a proteiny byly detekovány pomocí 52 myších monoklonálních protilátek. Byly takto nalezeny dva potenciální markery odlišující nádory tlustého střeva od nádorů vaječníku, které jsou v některých případech histologicky špatně rozlišitelné (21). Tato skupina také srovnávala výsledky z proteinového profilování s výsledky DNA čipů a prokázala poměrně vysokou korelaci mezi hladinou mRNA a buněčnými strukturními proteiny, ovšem v případě nestrukturních proteinů žádná korelace prokázána nebyla (22). Pro studium karcinogeneze je velmi vhodná kombinace RPA s laserovou mikrodisekcí (LCM – laser capture microdissection), protože umožňuje sledovat proměnlivý stav buněčného proteomu ve vybraných buněčných subpopulacích v mikroprostředí nádoru a vysledovat takto změny v signálních drahách vedoucí ke vzniku a progresi nádoru. Tuto technologii použil Grubb se svými spolupracovníky (23) pro studium změn při progresi karcinomu prostaty. Srovnávali fosforylační status klíčových regulátorů buněčné signalizace v raných epiteliálních lézích, prostatickém stromatu a extracelulární matrix. Popsali změny v aktivaci drah při progresi normálního epitelu do invazivního karcinomu a také rozdíl mezi pacienty.

Nevýhodou RPA přístupu je poměrně nízká koncentrace studovaných proteinů (např. kináz nebo jiných signálních molekul) v mikrospotu. Řešením pro zvýšení citlivosti detekce je pre-fractionace. Toho bylo využito při studiu autoreaktivity protilátek v séru pacientů proti nádorovým proteinům. Lyzáty buněčných linií adenokarcinomu tlustého střeva byly rozděleny pomocí dvourozměrné kapalinové chromatografie a teprve jednotlivé frakce byly spotovány. Čipy byly inkubovány se sérem nově diagnostikovaných pacientů s karcinomem tlustého střeva, plic a zdravých kontrol. Mezi těmito skupinami byly prokázány rozdíly v autoreaktivitě (24). Výhodou této metodiky je možnost další analýzy a případné identifikace reaktivních autoantigenů s využitím hmotnostní spektrometrie.

Další formáty expresních proteinových čipů

SELDI

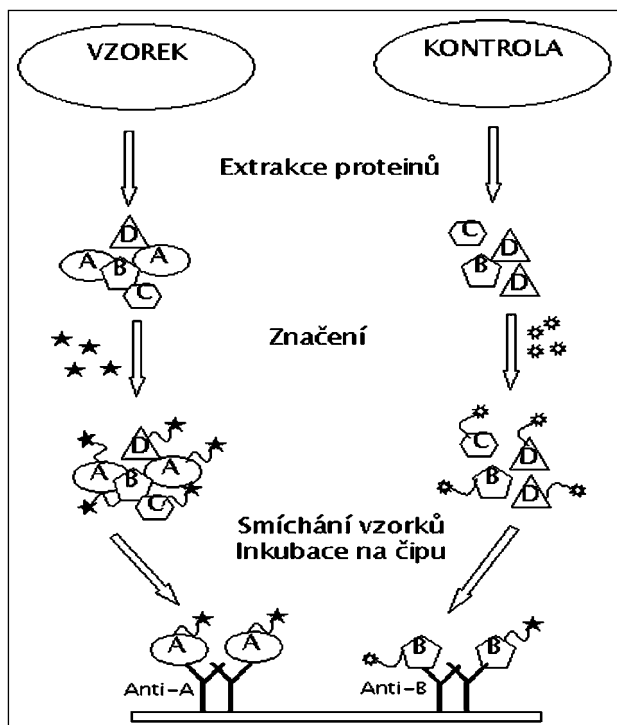
Alternativním přístupem založeným na nespecifických interakcích je technologie SELDI (surface enhanced laser desorption and ionisation). Spočívá v inkubaci buněčných extraktů na makrospacech adsorpčního povrchu s různou povrchovou úpravou (hydrofobní, hydrofilní, kation/anion výměnné a další). Nespecificky navázané proteiny jsou potom analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie (25). Tato metodika má sice nižší citlivost, ale je velmi vhodná pro rychlé vyhledávání neznámých proteinových biomarkerů.

Buněčné čipy

V současné době byly čipové technologie rozšířeny i na celé buňky. Buněčné čipy mohou být také ve formátu přímém nebo zpětném. Příkladem přímého přístupu je např. čip pro detekci CD antigenů na živých buňkách - viz výše (13, 14, 15). Při zpětném přístupu se např. využívá růstu buněk přímo na povrchu čipu s naspotovanými různými cDNA, buňky jsou schopny během růstu přijmout tuto DNA a dostaneme potom čip se spoty buněk exprimujících různé cizorodé proteiny, jejichž vlastnosti mohou být studovány přímo v buněčném kontextu (26).

Tkáňové čipy

Na čipu mohou být také imobilizovány přímo vzorky tkání, např. bioptických. Výhodou je možnost paralelního screeningu velkého množství tkáňových vzorků standardními analytickými metodami jako imunohistochemie nebo fluorescenční in situ hybridizace současně (27).



Obr. 2 Expresní protilátkové čipy - princip dvoubarevného značení proteinů - Ze studovaného vzorku a příslušné kontroly jsou vyzolovány proteiny, ty jsou nabarveny dvěma rozdílnými barvičkami (flouorofory), smíchány ve stejném poměru a inkubovány na jednom čipu. Pomocí dvoubarevné detekce jsou identifikovány přímo rozdíly v proteinové expresi mezi vzorkem a kontrolou.

Čipy pro funkční studie

Proteinové čipy jsou v poslední době využívány také pro studium funkce proteinů, a to prostřednictvím jejich interakce s jinými molekulami. Funkční čipy již byly použity pro studium interakcí s jinými proteiny, DNA, RNA, oligosacharidy, nízkomolekulárními látkami včetně terapeutik a také ke studiu enzymatické aktivity. Pro tyto aplikace je nezbytné uchovat proteiny ve funkčním stavu, čili ve správné konformaci. V současné době jsou již dostupné technologie pro imobilizaci funkčních proteinů. Jedna z prvních čipových funkčních analýz byla navržena pro studium kvasinkových proteinů, a to pro určení substrátové specifity kvasinkových kináz (28). Stejná výzkumná skupina také vytvořila funkční čip, obsahující téměř celý proteom kvasinky (5800 proteinů) a testovala na něm interakce s kalmodulinem a také s fosfolipidy (29). Funkční čipy byly také již využity při studiu řady lidských proteinů. Boutell a spolupracovníci představili čip s naspotovanými 50 variantami nádorového supre-

soru p53. Protein p53 je mutován asi u poloviny maligních onemocnění a různé mutace mohou mít na nádorové buňky různý vliv. Jelikož je p53 transkripční faktor, je tento čip vhodný zejména pro studium vlivu mutací na vazbu k DNA, ale také k jiným proteinům, které ovlivňují jeho aktivitu (30). K pochopení protein-proteinových interakcí v signalizačních procesech přispívají data získaná pomocí doménových čipů s naspotovanými různými proteinovými doménami (31, 32). Pomocí čipů lze také stanovovat enzymatickou aktivitu proteinů. Klíčovými molekulami v buněčných procesech jsou kinázy, které fosforylují proteiny signálních drah a ovlivňují tak jejich funkci. Změny v jejich aktivitě jsou tedy často příčinou nádorového bujení. Pro určení fosforylační aktivity různých kináz a také stanovení vlivu jejich inhibitorů bylo využito peptidových čipů (33). Čipy s naspotovanými malými molekulami byly navrženy pro identifikaci inhibitorů kaspáz, které hrají zásadní úlohu v procesech spouštění apoptózy (34, 35). Takovéto čipy s malými organickými molekulami („chemické knihovny“) jsou vhodné pro sledování interakcí ligand-receptor, což má přínos pro vyhledávání vhodných léků interagujících se specifickými proteiny. V současnosti je terapie většinou zaměřena na jednotlivé molekuly, ovšem vysokokapacitní proteomické techniky umožňují nalezení nových terapeutických cílů. A tak v budoucnu bude možné zaměřit terapii proti více cílům narušené signální dráhy současně. Pomocí takového kombinované terapie lze potenciálně dosáhnout vyšší účinnosti za současného snížení toxicity léčby (36).

Závěry a budoucnost proteinových čipů

Hlavní výhody proteinových čipů spočívají v možnosti testování tisíců proteinů současně a také v nenáročnosti na množství materiálu, což má význam zejména tam, kde je k dispozici jen malý objem vzorku, např. při vyhledávání více nádorových markerů v minimálním množství bioptického materiálu. Navíc kromě identifikace a kvantifikace studovaných proteinů umožňuje i jejich funkční analýzu. Proto tato technologie najde v budoucnosti využití nejen v základním výzkumu, ale i v klinické proteomice. Nové proteomické přístupy se uplatní v individuální péči o pacienta na několika úrovních: včasná detekce choroby pomocí expresních proteinových profilů, diagnóza s využitím proteinových markerů jako doplňku ke standardním vyšetřovacím metodám, individualizovaný výběr léčby na míru jednotlivým pacientům, sledování účinnosti a toxicity léčby v čase a eventuální změny v léčbě na základě detekovaných změn v proteinovém profilu konkrétního pacienta. V neposlední řadě informace o proteinech zapojených do patogeneze nemoci poskytnou potenciál k nalezení nových terapeutických cílů.

Poděkování: Tato práce je podporována granty IGA MZČR 8448-3/2005, MŠMT 1K04017, NF Elpida Nukleus

Literatura

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan;100(1):57-70.
2. Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature*. 2001 May 17;411(6835):375-9.
3. Anderson L, Seilhamer J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis*. 1997 Mar-Apr;18(3-4):533-7.
4. Le Naour F, Hohenkirk L, Grolleau A, et al. 2001. Profiling changes in gene expression during differentiation and maturation of monocyte-derived dendritic cells using both oligonucleotide microarrays and proteomics. *J. Biol. Chem.* 276:17920-17931.
5. Zhu H, Snyder M. Protein chip technology. *Curr Opin Chem Biol*. 2003 Feb;7(1):55-63.

6. Poetz O, Schwenk JM, Kramer S, et al. Protein microarrays: catching the proteome. *Mech Ageing Dev*. 2005 Jan;126(1):161-70.
7. Bellisario R, Colinas RJ, Pass KA. Simultaneous measurement of antibodies to three HIV-1 antigens in newborn dried blood-spot specimens using a multiplexed microsphere-based immunoassay. *Early Hum Dev*. 2001 Aug;64(1):21-5.
8. Ekins RP. Multi-analyte immunoassay. *J Pharm Biomed Anal*. 1989;7(2):155-68.
9. Haab BB, Dunham MJ, Brown PO. Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions. *Genome Biol*. 2001;2(2):RESEARCH0004.
10. Sreekumar A, Nyati MK, Varambally S, et al. Profiling of cancer cells using protein microarrays: discovery of novel radiation-regulated proteins. *Cancer Res*. 2001 Oct 15;61(20):7585-93.

11. Hudelist G, Pacher-Zavisin M, Singer CF, et al. Use of high-throughput protein array for profiling of differentially expressed proteins in normal and malignant breast tissue. *Breast Cancer Res Treat.* 2004 Aug;86(3):281-91.
12. Sanchez-Carbayo M, Socci ND, Lozano JJ, Haab BB, Cordon-Cardo C. Profiling bladder cancer using targeted antibody arrays. *Am J Pathol.* 2006 Jan;168(1):93-103.
13. Belov L, de la Vega O, dos Remedios CG, et al. Immunophenotyping of leukemias using a cluster of differentiation antibody microarray. *Cancer Res.* 2001 Jun 1;61(11):4483-9.
14. Belov L, Huang P, Barber N, et al. Identification of repertoires of surface antigens on leukemias using an antibody microarray. *Proteomics.* 2003 Nov;3(11):2147-54.
15. Belov L, Huang P, Chrisp JS, et al. Screening microarrays of novel monoclonal antibodies for binding to T-, B- and myeloid leukaemia cells. *J Immunol Methods.* 2005 Oct 20;305(1):10-9.
16. Shao W, Zhou Z, Laroche I, et al. Optimization of Rolling-Circle Amplified Protein Microarrays for Multiplexed Protein Profiling. *J Biomed Biotechnol.* 2003 (5):299-307.
17. Huang RP, Huang R, Fan Y, Lin Y. Simultaneous detection of multiple cytokines from conditioned media and patient's sera by an antibody-based protein array system. *Anal Biochem.* 2001 Jul 1;294(1):55-62.
18. Chen R, Lowe L, Wilson JD, et al. Simultaneous Quantification of Six Human Cytokines in a Single Sample Using Microparticle-based Flow Cytometric Technology. *Clin Chem.* 1999 Sep;45(9):1693-1694.
19. McBride MT, Gammon S, Pitesky M, et al. Multiplexed liquid arrays for simultaneous detection of simulants of biological warfare agents. *Anal Chem.* 2003 Apr 15;75(8):1924-30.
20. McBride MT, Masquelier D, Hindson BJ, et al., Autonomous detection of aerosolized *Bacillus anthracis* and *Yersinia pestis*. *Anal Chem.* 2003 Oct 15;75(20):5293-9.
21. Nishizuka S, Chen ST, Gwadry FG, et al. Diagnostic markers that distinguish colon and ovarian adenocarcinomas: identification by genomic, proteomic, and tissue array profiling. *Cancer Res.* 2003 Sep 1;63(17):5243-50.
22. Nishizuka S, Charboneau L, Young L, et al. Proteomic profiling of the NCI-60 cancer cell lines using new high-density reverse-phase lysate microarrays. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003 Nov 25;100(24):14229-34.
23. Grubb RL, Calvert VS, Wulkuhle JD, et al. Signal pathway profiling of prostate cancer using reverse phase protein arrays. *Proteomics.* 2003 Nov;3(11):2142-6.
24. Nam MJ, Madoz-Gurpide J, Wang H, et al. Molecular profiling of the immune response in colon cancer using protein microarrays: occurrence of auto-antibodies to ubiquitin C-terminal hydrolase L3. *Proteomics.* 2003 Nov;3(11):2108-15.
25. Davies H, Lomas L, Austen B. Profiling of amyloid beta peptide variants using SELDI Protein Chip arrays. *Biotechniques.* 1999 Dec;27(6):1258-61.
26. Ziauddin J, Sabatini DM. Microarrays of cells expressing defined cDNAs. *Nature.* 2001 May 3;411(6833):107-10.
27. Kallioniemi OP, Wagner U, Kononen J, Sauter G. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Hum Mol Genet.* 2001 Apr;10(7):657-62.
28. Zhu H, Klemic JF, Chang S, et al. Analysis of yeast protein kinases using protein chips. *Nat Genet.* 2000 Nov;26(3):283-9.
29. Zhu H, Bilgin M, Bangham R, et al. Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science* 2001 293(5537):2101-5
30. Boutell JM, Hart DJ, Godber BL, et al. Functional protein microarrays for parallel characterisation of p53 mutants. *Proteomics.* 2004 4(7):1950-8.
31. Liu MY, Cai S, Espejo A, et al. 14-3-3 interacts with the tumor suppressor tuberlin at Akt phosphorylation site(s). *Cancer Res.* 2002 Nov 15;62(22):6475-80.
32. Newman JR, Keating AE. Comprehensive identification of human bZIP interactions with coiled-coil arrays. *Science.* 2003 Jun 27;300(5628):2097-101.
33. Houseman BT, Huh JH, Kron SJ, Mrksich M. Peptide chips for the quantitative evaluation of protein kinase activity. *Nat Biotechnol.* 2002 20(3):270-4.
34. Gosalia DN, Diamond SL. Printing chemical libraries on microarrays for fluid phase nanoliter reactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jul 22;100(15):8721-6.
35. Winssinger N, Ficarro S, Schultz PG, Harris JL. Profiling protein function with small molecule microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Aug 20;99(17):11139-44.
36. Normanno N, Campiglio M, De LA, et al. Cooperative inhibitory effect of ZD1839 (Iressa) in combination with trastuzumab (Herceptin) on human breast cancer cell growth. *Ann Oncol.* 2002 Jan;13(1):65-72.

ODBĚR A ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ PRO EXPRESNÍ DNA ČIPY

SAMPLE TAKING AND PROCESSING FOR EXPRESSION DNA MICROARRAYS

TICHÝ B.¹, SVOBODA M.², MAYER J.¹ A POSPÍŠILOVÁ Š.¹

¹ CENTRUM MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE A GENOVÉ TERAPIE, INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

² LABORATOŘ PREDIKTIVNÍ ONKOLOGIE, ODD. KLINICKÉ A EXPERIMENTÁLNÍ PATOLOGIE, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV V BRNĚ

Souhrn

Moderní metodiky studia genové exprese na úrovni RNA využívající DNA čipy (DNA microarrays) představují účinný nástroj nejen pro výzkum onkologických onemocnění, ale mají i velký potenciál stát se základem nových diagnostických postupů. Jejich úspěšná aplikace však vyžaduje zvládnutí problematických postupů jako jsou odběr vzorku, izolace RNA nebo značení nukleových kyselin. S ohledem na množství různých DNA čipových platforem, neexistuje jeden univerzální návod, který by mohl být použit ve všech laboratořích. Protokoly zpracování DNA čipů se proto, někdy velmi výrazně liší, což má negativní dopad i na možnost jejich diagnostického využití.

Klíčová slova: RNA, DNA čip, biopsie, genová exprese

Summary

Gene expression profiling using DNA microarrays represents not only a powerful tool for oncological research but have also a big potential to become a standard diagnostic technique. However, successful microarray application needs to overcome some pitfalls such as sample collection, RNA isolation or nucleic acid labeling. Due to the number of microarray platforms there is no universal guide that can be used by all laboratories. The number of sometimes very different protocols for DNA microarray processing has a negative impact on their diagnostic utilization.

Keywords: RNA, microarray, biopsy, gene expression

Úvod

Rychlý rozvoj molekulárně-biologických technik v posledních letech s sebou přináší zcela nové požadavky i na klinické lékaře, chirurgy a patology. Odebíraný biologický materiál by měl být použitelný i pro ta nejnáročnější vyšetření, mezi něž patří i sledování genové exprese pomocí DNA čipů. Pro tyto analýzy je nutné získat co největší množství velmi kvalitní RNA, tzn. co největší, ale zároveň reprezentativní vzorek nádorové tkáně, krve nebo kostní dřeně. Asi největšími problémy, na kterých může celý čipový experiment ztroskotat, jsou nutnost rychlého odběru a „kontaminace“ vzorku „normálními“ buňkami. Ani úspěšné zvládnutí procesu odběru vzorku a izolace RNA nevede automaticky ke zdaru celého experimentu. Vzorek RNA ještě před hybridizací prochází sérií úprav, při kterých je naznačen (např. fluorescenční barvou) případně i amplifikován. Tyto kroky stejně jako hybridizace většinou vyžadují časově i finančně náročnou optimalizaci protokolů a jakákoli, byť na první pohled nepatrná změna postupu, může významně ovlivnit jejich výsledek.

Odběr vzorků

Jde o jedno z kritických míst, které většinou vyžaduje těsnou spolupráci několika pracovišť (laboratoř, chirurgie, ambulance, patologie ad.). Technická náročnost je závislá na druhu odebíraného vzorku.

a) Odběry krve a kostní dřeně.

Pro účely sledování profilů genové exprese stačí obvykle 2–10 ml nesrážlivé citrátové nebo K3EDTA krve nebo 1–5 ml obdobně ošetřené kostní dřeně. V nemocnicích jsou běžně dostupné odběrové nádoby původně určené pro stanovení krevního obrazu. Nesmějí se však použít zkumavky s heparinem, který interferuje s PCR. Buňky si zachovávají životnost dlouhou dobu po odběru a k zaznamenané degradaci nedochází ani několik hodin po aspiraci při ponechání vzorků při pokojové teplotě. Otázkou je změna exprese genů v buňkách ponechaných delší dobu mimo organismus. Výhodou krve jako zdrojového materiálu je i celkem snadná separace hlavních typů jaderných buněk – granulocytů a mononukleárů na denzitních gradientech. Takto oddělené buněčné populace mohou být použity jako výchozí materiál pro získání raritních subpopulací jako jsou např. leukemické (v průběhu léčby) nebo hematopoetické prekursorové buňky pomocí fluorescence activated (FACS) nebo magnetic cell sortingu (MACS). Mimo to jsou komerčně dostupné sady pro odběr krve na izolaci RNA používající princip chemické stabilizace. Jejich zásadní nevýhodou je nemožnost následné separace krevních buněk a samozřejmě vyšší cena.

b) Odběry bronchoalveolární laváže (BAL).

BAL se vyznačují poměrně malým výtěžkem RNA (cca do 1 µg) vzhledem k omezenému počtu buněk. Navíc první 2 frakce obsahují vedle buněk leukocytární řady poměrně hodně epitelových buněk (až desítky procent). Buňky leukocytární řady jsou však zajímavé z hlediska exprese NOS a markerů spojených s alergickými reakcemi. Pro tyto účely se proto odebírá až třetí frakce, která obsahuje převážně leukocytární řadu.

c) Odběry biopsií solidních nádorů.

Existuje několik běžných typů biopsií:

1. Jehlové biopsie. Jejich výhodou je malá zátěž pacienta. K tomuto účelu se používají speciální tzv. tru-cut jehly, které z cílové tkáně vyříznou váleček tloušťky do 1 mm a délky cca do 10 – 15 mm. Používají se např. při vyšetřování metastáz nádorů v játrech. Toto množství nemusí někdy stačit pro přípravu dostatečného množství celkové RNA a je pak nutno používat amplifikaci RNA.
2. Malé excize pomocí speciálních biopsických kleští a fibroskopů. Lze jimi odebrat až několik mm cílové tkáně. Pou-

žívají se např. při vyšetřování rektálních nádorů. Uvedené množství tkáně většinou umožní přípravu 5 – 50 µg celkové RNA, což je dostatečné pro aplikace DNA čipů.

3. Operační excize. Lze jimi odebrat většinou dostatečné množství nádorové tkáně pro DNA čipy.
4. Tenkojehelné aspirační biopsie. Ty představují nejmenší zátěž pro pacienta, množství takto získané tkáně a tedy i RNA je ale velmi malé, zároveň může být negativně ovlivněna reprezentativnost vzorku.

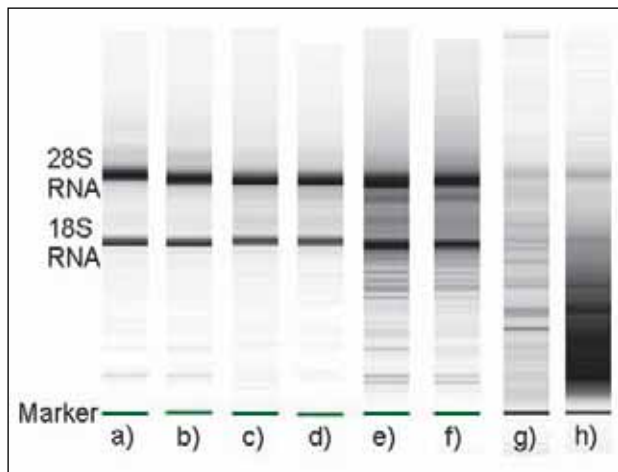
Ve všech případech probíhají odběry za informovaného souhlasu pacienta a jsou indikovány ošetřujícími onkology až po konkrétní domluvě s patologem, tak aby odběrem nebyla dotčena možnost patologického zhodnocení nádoru. Někdy není možné z důvodů priority patologického vyšetření provést nativní biopsii pro experimentální účely. V takovém případě je možné použít patologem již zhodnocené parafinové řezy tkání. To ovšem znamená nejenom malý výtěžek RNA a obvyklou nutnost amplifikace RNA, ale i rozpad RNA na menší fragmenty a nutnost použít speciální metody jak při izolaci RNA, tak při následném zpracování materiálu. Protože tkáň je v parafinových řezech obvykle fixována formaldehydem, který metyluje DNA, nejsou rutinní parafinové řezy vhodné ke sledování metylačního statusu DNA. Existují však i speciální histologická fixativa, která nemetylují DNA. S těmito fixativy lze parafinové řezy použít i pro sledování metylačních profilů DNA.

Stabilita RNA

Odběr materiálu pro izolaci RNA je vzhledem k degradabilitě RNA poměrně náročný. Samotná RNA je stabilní, ale je velmi rychle degradována všudypřítomnými enzymy ribonukleázami (RNAsami). Ty pocházejí jak z buněk, ze kterých je RNA izolována, tak i z prostředí tj. z kontaminujících mikroorganismů - bakterií. Promíneme – li bakteriální kontaminaci, vedle RNA je fyziologickou součástí buňky celá řada různých ribonukleáz, které RNA degradují. Tyto ribonukleázy jsou součástí složitých buněčných regulačních mechanismů. Naneštěstí jsou jednotlivé RNA degradovány nesterpělivě rychle díky přítomnosti AU- sekvencí v některých genech [1]. Je známo, že RNA pro některé geny (cykliny) mají poločas rozpadu v rozmezí minut, zatímco některé housekeepingové geny mají poločas několik hodin. Po vyjmutí buněk z těla se rovnovážné hladiny jednotlivých RNA poruší a „rovnovážný expresní profil“ dané tkáně se začíná měnit v jakýsi arteficiální produkt, který se tím více liší od původního stavu, čím déle trvá, než se degradace RNA zastaví. Vliv na genovou expresi mají i další faktory, např. hypoxie zapříčiněná podvázáním cév zásobujících resekováný tumor, která může vést ke změně exprese celé řady genů [2]. Protože v klinické praxi je téměř nemožné zajistit uplynutí stejné doby od okamžiku odběru vzorku po jeho zpracování, promítají se rozdílné doby odběru do expresních profilů DNA čipů a jsou zřejmě jednou z příčin známé variability experimentálních výsledků DNA čipů pocházejících od různých výzkumných skupin [3].

Předpokladem úspěšného odběru je tedy kromě sterility i co nejrychlejší stabilizace vzorku - inhibice ribonukleáz. Jednou z možností je použití chladu, kdy je vzorek tkáně velmi rychle zmrazen - vhodným způsobem je ponoření do tekutého dusíku. Druhou možností je chemická inaktivace RNAs [4]. Pro tento účel jsou určeny speciální stabilizační roztoky (např. RNAlater®). Ty přinášejí nesporné výhody zjednodušení manipulace s materiálem, kdy způsob odběru se příliš neliší od odběru např. pro histologické vyšetření, jsou však podstatně finálně nákladnější a pro správný průběh fixace je nutné použít vzorek takové velikosti, aby mohl být roztokem dostatečně rychle prosycen. Obě metody tedy vyžadují co nejrychlejší zpracování tkáně po vyjmutí z organismu, nejlépe přímo

v odběrové místnosti nebo na operačním sále. Za přijatelnou dobu mezi odběrem vzorku a jeho stabilizací se považuje max. 15 minut, většina studií používá 10 min. interval [5]. Nutnost rychlé stabilizace komplikuje kontrolu vhodnosti vzorku, protože vyžaduje přítomnost kvalifikované osoby (patologa) pro iniciační makroskopické posouzení biopsiátu a jeho rozdělení na velikostně vhodné části. Na našem pracovišti (Centrum molekulární biologie a genové terapie, Interní hemato-onkologická klinika, FN Brno – CMBGT) se osvědčil způsob odběru, při kterém je vzorek ihned po resekci zchlazen a transportován na ledu k patologovi, který jej rozdělí na části pro histologické a molekulárně-biologické vyšetření. Potom je zmrazen v tekutém dusíku a dále skladován při -80°C . Takto uskladněný vzorek je použit až po histologickém vyšetření části oddělené patologem, pokud vyhoví požadovaným kritériím zastopování patologických buněk. Při tomto způsobu nedochází k výraznější degradaci RNA (posuzováno na přístroji BioAnalyzer 2100, obr. 1) a odpadá manipulace s tekutým dusíkem na operačním sále. Je tak možno odebírat i větší vzorky tkáně, které nemohou být vzhledem k jejich velikosti stabilizovány chemicky.



Obrázek 1: Porovnání vlivu odběru na stabilitu RNA. a) RNA izolovaná z buněčné linie (1,8/10,0); b) RNA izolovaná z buněčné linie (1,8/9,9); c) RNA izolovaná ze solidní tkáně uložené po odběru 10min na ledu (2,1/9,9); d) RNA izolovaná ze solidní tkáně uložené po odběru 20min na ledu (2,2/9,7); e) RNA izolovaná ze solidní tkáně uložené po odběru 10min při pokojové teplotě (1,3/7,2); f) RNA izolovaná ze solidní tkáně uložené po odběru 20min při pokojové teplotě (1,0/6,9); g) Degradovaná RNA (-2,6); h) Degradovaná RNA (-2,4); v závorce: 28S:18S rRNA/RIN („RNA integrity number“) Gel-like výstup přístroje BioAnalyzer 2100

Izolace RNA

V praxi je používáno několik rozdílných technologií pro izolaci RNA. Nejrychlejší je izolace na kolonkách (pevné fázi), kdy po uvolnění z buněk je RNA navázána na povrch filtru, nežádoucí komponenty jsou vymyty a čistá RNA je následně z filtru eluována. Tato metoda dosahuje velmi dobrých parametrů čistoty a oproti následující vyniká jednoduchostí a rychlostí. Další často používanou metodou je izolace založená na použití směsi fenolu a chaotropních solí [6]. Vzorek je nejprve lyzován ve směsi guanidinium thiokyanátu a fenolu (Trizol® ad.), po přidání chloroformu nebo bromchloropropanolu a centrifugaci dochází k rozdělení do několika fází. V horní vodné fázi je zachycena RNA, v mezivrstvě DNA a v dolní organické fázi proteiny. Celková (totální) RNA je z vodné fáze precipitována isopropanolem. Postup je technicky i časově podstatně náročnější, není příliš vhodný pro izolaci z velmi malých vzorků. Velkou výhodou je možnost současné izolace RNA, DNA i proteinů a zachycení kratších fragmentů RNA (menších než 200 bazí). Obě metody by měly být schopny odstranit genomovou DNA, přesto je vhodné RNA ošetřit enzymem DNAsou. Námí používaná metoda závisí na druhu biologického materiálu, ze kterého má být RNA izolována. V případě leukocytů a tkáňo-

vých linií je to kolonková metoda, při izolaci z pevných tkání dosahujeme v našich podmínkách lepších výsledků kombinací obou výše popsaných metod - po úvodní lýze vzorku v Trizolu® a separaci fází pokračujeme kolonkovou metodou, která zahrnuje i ošetření vzorku DNAsou.

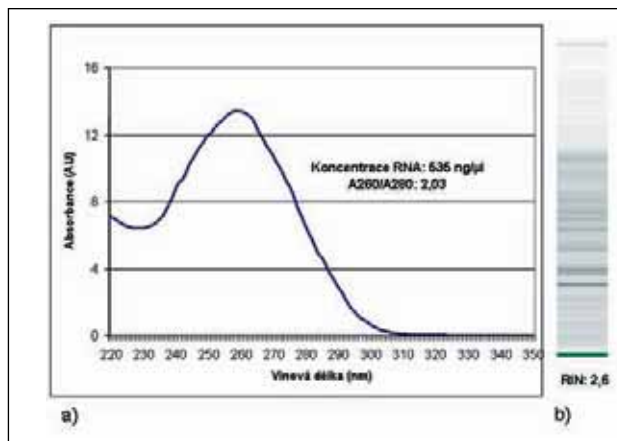
Při izolaci z pevných tkání je nutné použít mechanickou homogenizaci tkáně. Jednou z možných metod je rozdrncení hluboce zmrazené tkáně v tekutém dusíku a následná lýza. V laboratoři CMBGT dáváme přednost rotor-stator homogenizátoru, kdy je tkáň současně homogenizována i lyzována v Trizolu. Tyto homogenizační techniky s sebou nesou riziko křížové kontaminace vzorků, je tedy nutné důkladně očistit všechny opakovaně používané nástroje.

Výše uvedené metody představují ty nejčastěji používané, je dostupná řada dalších jak pro izolaci totální, tak i mediátorové RNA ve variantách pro manuální i plně automatizované zpracování. Stále větší rozšíření získávají metody magnetické separace, kdy je RNA navázána na povrch magnetických částic, které jsou při promývání ve zkumavce fixovány magnetem. Samozřejmě je použití „RNAse Free“ jednorázového plastiku a dekontaminace pracovního prostoru při veškeré práci s RNA.

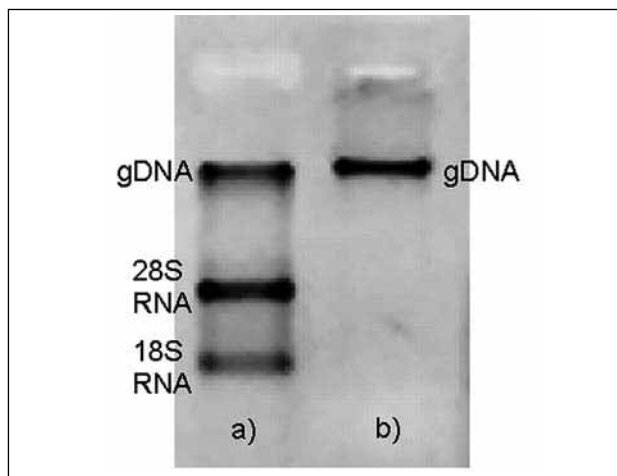
Kontrola kvality RNA

Základní podmínkou úspěšného čipového experimentu je, kromě vhodného designu, kvalita vstupního materiálu. Vzhledem k tomu, že většina technik pracuje s reverzní transkripcí iniciovanou z polyA(3') konce mRNA je nutné zachovat co největší procento transkriptů v jejich plné délce. Existují a dále jsou intenzivně rozvíjeny metody, které používají k iniciaci transkripce náhodné krátké nukleotidy (hexamery, oktamery). Ty nacházejí své uplatnění především v aplikacích využívajících degradovanou RNA získanou např. izolací z paraformových bločků (FFPE - Formalin Fixed Paraffin Embedded). Problém stability RNA si dobře uvědomují i výrobci oligonukleotidových DNA čipů, kteří se snaží snížit ovlivnění výsledků DNA čipů přizpůsobením algoritmů pro návrh sond tak, že jsou preferovány sondy ležící v sekvenci mRNA blízko k polyA(3') konci - obvykle do vzdálenosti 1000 bazí. Přes toto ulehčení je však kvalita vstupní RNA jedním z nejkritičtějších bodů celého procesu přípravy DNA čipů. Kontrola kvality RNA by tedy měla být nepostradatelnou součástí všech protokolů. Posouzení kvality RNA však není jednoduché a neexistuje pro něj spolehlivá metoda. Nejzákladnější a nejméně informativní je spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty. Základními hodnotami jsou v tomto případě absorbance vzorku při 260 nm a při 280 nm. Vlnové délce 260 nm odpovídá absorbanční maximum nukleových kyselin, poměr absorbancí při 260 a 280 nm vypovídá o kontaminaci RNA, především proteiny. Obecně doporučovaným rozmezím A260/A280 je 1,9 – 2,1. Spektrofotometrické měření ale není schopno vypovědět nic o integritě vzorku, i naprosto degradovaná RNA může mít vysokou koncentraci a poměr A260/A280 vyšší než 2 (obr. 2). Integrita je nejčastěji posuzována pomocí vzájemného poměru proužků 28S rRNA a 18S rRNA získaných při denaturující gelové elektroforéze. 28S a 18S rRNA jsou zvláštními typy RNA, které nekódují informaci o primární struktuře proteinů, ale jsou stavební součástí ribosomů. Při běžné izolaci RNA představují tyto dvě frakce většinu získané celkové RNA (asi 85 %), kdežto mRNA kódující proteiny, v závislosti na typu buněk, 2-10 %. Tyto dva druhy RNA jsou stejně citlivé k degradaci jako mRNA, čehož se využívá pro odhad její integrity. V případě intaktní RNA bývá podíl 28S rRNA : 18S rRNA větší než 2 a postupující degradací se snižuje. Tuto metodu lze použít i pro rychlé posouzení kvality vizuálním odhadem síly proužků, přesnější je samozřejmě využití specializovaného software určeného pro analýzu gelů, který je schopen vyhodnotit poměry obou proužků objektivněji. Gelová elektroforéza dovoluje i posouzení kontaminace genomovou DNA, která se v nedenaturujícím agarosovém gelu objeví jako velmi pomalu migrující proužek (obr. 3). Kontaminace DNA nejen zkresluje spektrofotometrické stanovení koncentrace RNA, ale může vést i k zavádějícím výsledkům čipové ana-

lýzy, pokud dojde k přepisu a obarvení genomové DNA. Alternativou gelové elektroforézy je použití přístroje BioAnalyzer, který kromě poměru 28S a 18S rRNA používá pro hodnocení integrity i další regiony gelu. Výsledkem analýzy je tak kromě poměru 28S/18S i tzv. RIN (RNA Integrity Number), dávající přesnější odhad intaktnosti vzorku. Posouzení kontaminace genomovou DNA je však na tomto přístroji obtížné, vzhledem k velmi krátkému času, po který jsou jednotlivé vzorky analyzovány. Další možností je zkušební PCR amplifikace vzorku. Používá se metodika RT-PCR (reverzní transkripce a následná PCR) s použitím oligo-dT primeru pro reverzní transkripci. Pomocí PCR jsou současně amplifikovány dva úseky genu, jeden v blízkosti 3' (polyA) konce, druhý v 5' oblasti. Poměr těchto dvou amplikonů je u intaktní RNA blízký 1, s postupující degradací klesá zastoupení fragmentu z 5' konce genu. Některé oligonukleotidové čipy mohou obsahovat podobnou kontrolu, kdy jsou na nich sondy navrženy pro oba konce transkriptu a z poměru jejich intenzit lze zpětně odhadnout míru degradace vstupní RNA.



Obrázek 2.: Spektrofotometrická křivka a elektroforéza degradované RNA. Přestože má vzorek velmi dobré parametry při spektrofotometrickém měření, může být integrity RNA nízká. a) Graf závislost absorpce vzorku RNA na vlnové délce, data získána přístrojem Nanodrop ND-1000; b) Stejný vzorek RNA, gel-like výstup přístroje BioAnalyzer 2100



Obrázek 3.: Kontaminace RNA genomovou DNA (gDNA). a) Kontaminovaná RNA; b) Genomová DNA – pozitivní kontrola; 1% nedenaturující TBE/agarosový gel, barvení ethidiumbromidem;

„Čistota“ vzorku

Především v onkologii je nutno brát v potaz i „čistotu“ vzorku, tj. míru zastoupení nežádoucích populací buněk. Většina experimentů je zaměřena na sledování genové exprese v nádorových buňkách. Klinické vzorky však nikdy nemůžou dosáhnout stoprocentního zastoupení nádorové subpopulace, přitom i relativně malá příměs „kontaminujících“ buněk může výrazně ovlivnit zjištěnou míru exprese genů

[7]. Proto se nyní věnuje velká pozornost vývoji metodik, které umožňují ze získaného biologického materiálu separovat žádanou populaci buněk. Minimem by měla být histologická/cytologická/flow-cytometrická kontrola vstupního vzorku. Pokud zastoupení cílové subpopulace dosahuje určité mez, je možno postupovat dále bez použití dalších purifikačních technik. Není-li tato podmínka splněna, měl by být celý experiment přizpůsoben a do jeho protokolu zahrnuta purifikace vzorku. V případě vzorku krve/kostní dřeně se dá s úspěchem použít technik MACS nebo FACS, případně jejich kombinace. Nevýhodou je samozřejmě prodloužená doba zpracování, vyšší finanční náročnost a ztráta, někdy velmi podstatné části vzorku. Pro pevné tkáně je možné využít FACS/MACS metody po předchozím rozvolnění buněk (např. trypsinací nebo mechanickou homogenizací tkáně) nebo mikrodisekční metody. Perspektivní je využití LCM (Laser Capture Microdissection) v kombinaci s metodami pro zpracování FFPE vzorků. To umožňuje nejen histologické posouzení odebíraného vzorku a výběr cílové subpopulace, ale zároveň představuje metodický postup použitelný pro analýzu vzorků uložených v patologických archívech.

Využití separovaných raritních populací buněk nebo LCM vyžaduje následné použití amplifikačních technik, protože získané množství RNA je velmi malé a pro DNA čipy nedostatečné. Typické požadované množství v případě standardních metodik používajících pro hybridizaci značenou cDNA je 10 a více mikrogramů celkové RNA. Tato množství jsou při izolaci z malého počtu buněk např. po LCM naprosto nereálná, úspěchem je získání stovek nanogramů. Amplifikačních technik bylo a je vyvíjeno značné množství [8-12], nejpoužívanější se stala „Eberwinova“ [8] a její variace. Metoda spočívá v reverzní transkripci s inkorporací promotoru pro RNA polymerázu, syntéze druhého řetězce cDNA a in vitro transkripci dvouřetězcové DNA do komplementární RNA. Mimo technik amplifikujících vzorek jsou dostupné metody pro amplifikaci signálu, např. 3DNA systém [13], kdy je cDNA označena speciální sekvencí, na kterou se poté váží speciální fluorescenčně značená struktura (dendrimery). Protože dendrimery mohou nést až několik stovek molekul fluorescenčních barev, je možné dosáhnout dostatečné intenzity signálu i při použití méně než 1 mikrogramu totální RNA. Jinou možností je chemiluminiscenční systém detekce, který je několikanásobně citlivější než fluorescenční. Existují již komerční vysokohustotní DNA čipy s chemiluminiscenční detekcí. Ve spojení s komerčně dostupným kitem na preamplifikaci RNA lze použít jen 50ng výchozí RNA. V extrémních případech lze získat expresní profily z jedné jediné buňky. Tyto profily jsou však poznamenány velkou variabilitou výsledků.

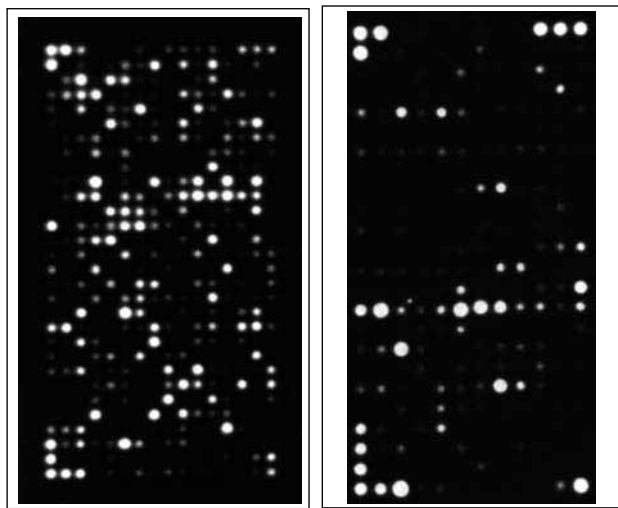
Značení a hybridizace

Zatímco základní postupy, jako je izolace RNA, jsou víceméně univerzální, metodiky značení a hybridizace vzorků se velmi liší. Každá laboratoř si vytváří vlastní protokoly, které nejlépe vyhovují jejich požadavkům a zohledňují typ a velikost vzorků i druh použitých čipů.

V laboratoři CMBGT používáme lineární amplifikaci RNA s nepřímým značením fluorescenčními barvami. Při tomto postupu je RNA nejdříve enzymaticky přepsána do dvouvláknové DNA, během této reakce je zainkorporován promotor pro enzym T7 polymerázu. V dalším kroku je dvouvláknová DNA transkribována T7 polymerázou (RNA polymeráza) do komplementární amplifikované RNA (cRNA). V tomto kroku je do cRNA zabudován aminoallyl-UTP. Na závěr je cRNA přečištěna a zakoncentrována. cRNA je poté fluorescenčně naznačena barvami, které jsou reakcí s amino skupinou aminoallyl-UTP kovalentně navázány na řetězec RNA. Po odstranění nenavázaných barev je vzorek připraven k hybridizaci.

Čipy mají formát mikroskopického sklíčka, na kterém jsou

imobilizovány oligonukleotidové sondy délky 40-70 bazí. Používáme dvoubarevnou metodiku DNA čipů, tj. na čip jsou současně hybridizovány dva vzorky (např. referenční a vyšetřovaný) značené různými fluorescenčními barvami. Při hybridizaci jsou dvě různě značené cRNA smíchány s hybridizačním pufrům a naneseny na čip, kde jsou ponechány při optimální teplotě 16-17 hodin. Nakonec je nena- vázaná cRNA odmyta a čip je možno naskenovat fluores- cenčním skenerem.



Obrázek 4a): Příklad středněhus-
totního membránového DNA čipu,
chemiluminiscenční detekce

Obrázek 4b): Příklad nízkohus-
totního membránového DNA čipu,
chemiluminiscenční detekce

V Laboratoři prediktivní onkologie a v Laboratoři experimen-
tální buněčné biologie Masarykova onkologického ústavu
(MOU) z finančních důvodů používáme tzv. nízkohustotní
DNA čipy (desítky až stovky sond na jednom čipu). Kvůli vyš-
ší citlivosti a z důvodů úspory biologického materiálu a kvůli
nenáročnosti na technické vybavení používáme membránové
čipy s chemiluminiscenční detekcí. Tyto DNA čipy obsahují
buď cDNA sondy jako klasické cDNA čipy nebo oligonukleo-
tidové sondy. cDNA nebo RNA značíme biotinyln-16-dUTP

nebo biotynyl-16-UTP. Značení je spřaženo s amplifikací cDNA
nebo lineární amplifikací cRNA. Po hybridizaci sond se zna-
čenou cDNA nebo cRNA a po vymytí přebytné cDNA nebo
cRNA je třeba membrány inkubovat s konjugátem streptavi-
din-alkalická fosfatáza. Konjugát se naváže na biotinové zbytky
značené cDNA nebo RNA na membráně. Obráz je nutno
„vyvolávat“ inkubací s chemiluminiscenčním substrátem (např.
CDPStar), který alkalická fosfatáza přeměňuje za vzniku výraz-
né chemiluminiscence. Díky tomu je dosaženo 5x až 10x vyš-
ší citlivosti metody oproti fluorescenčním metodám. Lze proto
použít pro vyšetření méně výchozí RNA (standardně 500 ng
až 6 µg). Na obr. 4a) je vidět chemiluminiscenční obraz střed-
něhustotního DNA čipu (512 bodů) pro detekci exprese onko-
genů a tumorových supresorů u nádoru rekta (klešťová biopsie,
zpracováno cca 3x3x3mm tkáně). Intenzita signálu každého
bodu představuje „intenzitu“ exprese jednoho genu nebo „inten-
zitu“ exprese kontrolních markerů. V současné době používá-
me v MOU DNA čipy při výzkumu prediktivních faktorů rezis-
tence na cytostatika (viz obr. 4b, 288 bodů) a při výzkumu
nádorových prognostických faktorů.

Závěr

Zajištění technické stránky odběru biologického materiálu pro
DNA čipové experimenty vyžaduje těsnou a bezchybně fungu-
jící kooperaci klinických a laboratorních pracovišť. Při plánová-
ní takového projektu je nutné promyslet všechny možné kom-
plikace a řešit je ještě před jeho zahájením, změna parametrů
v průběhu experimentu může zcela znehodnotit získaná data. Pře-
devším je zapotřebí se seznámit se všemi technikami, které budou
použity a zhodnotit nutnost další purifikace materiálu a jejího
možného vlivu na výběr vhodných metodik (izolace RNA, ampli-
fikace RNA). Nutností je vypracování systému kontroly kvality
od fáze odběru vzorku až po značení a hybridizaci RNA.

DNA čipy jsou stále poměrně novou metodou, ale jejich širší
rozšíření jako diagnostický nástroj v onkologii je pravděpo-
dobné v nejbližších letech. Klinická i laboratorní pracoviště
by proto měla být připravena na uplatnění této technologie.

Poděkování:

Práce byla podporována grantem IGA MZ ČR NR8448-
3/2005, a NR 9076-4.

Literatura:

1. Barreau C, Paillard L, Osborne HB. AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Res.* 2006 Jan 3;33(22):7138-50.
2. Atkin G, Daley FM, Bourne S et al. The effect of surgically induced ischaemia on gene expression in a colorectal cancer xenograft model. *Br J Cancer.* 2006 Jan 16;94(1):121-7.
3. Sotiriou C, Khanna C, Jazaeri AA, Petersen D, Liu ET. Core biopsies can be used to distinguish differences in expression profiling by cDNA microarrays. *J Mol Diagn.* 2002 Feb;4(1):30-6.
4. Grotzer MA, Patti R, Georger B et al. Biological stability of RNA isolated from RNA later-treated brain tumor and neuroblastoma xenografts. *Med Pediatr Oncol.* 2000 Jun;34(6):438-42.
5. Chu TY, Hwang KS, Yu MH, Lee HS, Lai HC, Liu JY. A research-based tumor tissue bank of gynecologic oncology: characteristics of nucleic acids extracted from normal and tumor tissues from different sites. *Int J Gynecol Cancer.* 2002 Mar-Apr;12(2):171-6.
6. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987 Apr;162(1):156-9.

7. 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.* 2005 Apr;19(4):618-27.
8. Van Gelder RN, von Zastrow ME, Yool A et al. Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Mar;87(5):1663-7.
9. Shearstone JR, Allaire NE, Campos-Rivera J et al. Accurate and precise transcriptional profiles from 50 pg of total RNA or 100 flow-sorted primary lymphocytes. *Genomics.* 2006 Apr 17.
10. Kurn N, Chen P, Heath JD et al. Novel isothermal, linear nucleic acid amplification systems for highly multiplexed applications. *Clin Chem.* 2005 Oct;51(10):1973-81.
11. Ohtsuka S, Iwase K, Kato M et al. An mRNA amplification procedure with directional cDNA cloning and strand-specific cRNA synthesis for comprehensive gene expression analysis. *Genomics.* 2004 Oct;84(4):715-29.
12. Marko NF, Frank B, Quackenbush J, Lee NH. A robust method for the amplification of RNA in the sense orientation. *BMC Genomics.* 2005 Mar 1;6(1):27.
13. Stears RL, Getts RC, Gullans SR. A novel, sensitive detection system for high-density microarrays using dendrimer technology. *Physiol Genomics.* 2000 Aug 9;3(2):93-9.

VYUŽITÍ LASEROVÉ MIKRODISEKCE PRO PŘÍPRAVU KOMPLEXNÍCH VZORKŮ Z NÁDOROVÉ TKÁNĚ PRO ÚČELY MIKROGENOMICKÝCH ANALÝZ

THE UTILIZATION OF LASER CAPTURE MICRODISSECTION FOR CONSTRUCTION OF SPECIFIC SAMPLES FROM CANCER TISSUE, IN ORDER TO MICROGENOMIC ANALYSES

DZIECHCIARKOVÁ M.¹, BERKOVCOVÁ J.¹, TROJANEC R.¹, SROVNAL P.¹, BOUCHALOVÁ K.¹, HAJDÚCH M.^{1,2}

¹ LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ MEDICÍNY PŘI DĚTSKÉ KLINICE LÉKAŘSKÉ FAKULTY UNIVERZITY PALACKÉHO A FAKULTNÍ NEMOCNICE V OLOMOUCI

² ONKOLOGICKÁ KLINIKA LÉKAŘSKÉ FAKULTY UNIVERZITY PALACKÉHO A FAKULTNÍ NEMOCNICE V OLOMOUCI

Souhrn

Laserová záchytná mikrodisekce (Laser capture microdissection, LCM) je rychlá a spolehlivá metoda, která umožňuje izolaci cílových buněk ze specifického komplexu tkáně pro jejich následnou molekulární nebo proteinovou analýzu. Základem LCM je inverzní mikroskop se zabudovaným nízkovýkonnostním infračerveným laserem. Nařezané tkáně jsou upevněny na standardní podložní sklo a termoplastická membrána (TM) je umístěna nad dehydratovaný preparát. V ohnisku laserového mikroskopu je umístěna TM, kterou laser roztaví v požadovaném místě a naváže tak cílovou buňku či strukturu k membráně. V současné době máme k dispozici několik laserových mikrodisekčních systémů, které se liší způsobem zachycení disekovaných buněk, v konfiguraci systému i v jednotlivých aplikacích. Laserovou mikrodisekcí lze použít pro izolaci buněk u řady typů buněčných i tkáňových preparátů, včetně zamražených vzorků, formalínem fixovaných parafinizovaných tkání či cytologických preparátů. V závislosti na použitém materiálu je možno z mikrodisekovaných buněk extrahovat DNA, RNA či proteiny v dobré kvalitě. Kombinací s dalšími technikami, jako je například cDNA microarray, LCM pomáhá identifikovat nové diagnostické a prognostické znaky vedoucí ke zlepšení diagnosticko-terapeutických metod v léčbě onkologických onemocnění. Na našem pracovišti jsme laserovou mikrodisekcí izolovali buňky z cytologických preparátů adenokarcinomu plic získaných punkční cytologií zmražených či parafinizovaných nádorů a také buněčné linie, např. myeloidní leukemii K562. V této práci popisujeme naše zkušenosti se zavedením LCM s následnou mikroizolací DNA/RNA a lineární amplifikací DNA/RNA pro účely dalších genetických analýz jako je např. komparativní genomická hybridizace, expresní studie, či přímé sekvenování vyšetřovaných genů z biologického materiálu s minimálním obsahem nádorových buněk, či pro studium nádorové heterogenity na jednobuněčné úrovni.

Klíčová slova: EGFR1, komparativní genomická hybridizace, laserová mikrodisekce, lineární amplifikace DNA/RNA, izolace DNA/RNA, K-ras

Summary

Laser capture microdissection (LCM) is a rapid, reliable method to obtain pure populations of targeted cells from specific microscopic regions of tissue sections for subsequent analysis. LCM is based on the adherence of visually selected cells to a thermoplastic membrane, which overlies the dehydrated tissue section and is focally melted by triggering of a low energy infrared laser pulse. Tissue sections are mounted on standard glass slides, and transparent thermoplastic membrane is then placed over the dry section. The laser provides enough energy to transiently melt this thermoplastic film in to the target cells. Several systems are available for LCM, and vary in cell-capture method, system configuration and applications. LCM was applied to a wide range of cell and tissue preparations including frozen samples, formalin-fixed paraffin-embedded tissues or cytology smears. Depending on the starting material, DNA, good quality mRNA, and proteins can be extracted successfully from captured tissue fragments, down to the single cell level. In combination with another techniques like expression library construction and cDNA array hybridisation, LCM will allow the establishment of new diagnostic and prognostic markers, in order to indicate therapy individually tailored to the molecular profile of a given tumour.

In this paper we refer our experiences with the LCM isolation of single cells from cytology smears of lung carcinomas, frozen and paraffin embedded tumour tissues as well as cell line cytospin preparation. Our ultimate goal was to introduce LCM technology in combination with DNA/RNA isolation and linear amplification for subsequent genomic analyses such as comparative genomic hybridisation, RNA expression studies and specific amplifications of investigated genes from tissue specimens with minority of tumour cells and/or for tumour heterogeneity studies based on one the single cell level.

Key words: EGFR1, comparative genomic hybridization, laser capture microdissection, linear amplification of DNA/RNA, RNA/DNA isolation, K-ras

Úvod:

V současné době molekulárně biologické vyšetření buněk a tkání na úrovni DNA, RNA a proteinů představuje revoluční obrat v diagnostice a charakterizaci biologických vlastností nádorových onemocnění. Nicméně, problém proteomických a genomických studií v případě analýzy komplexních nádorových vzorků spočívá v přípravě homogenní buněčné populace. Průtoková cytometrie byla dlouhou dobu používána jako výhradní technologie k získání jednotlivých buněčných typů do suspenze, avšak možnost získání čistých buněk ze vzorků solidní tkáně, jako je biopsie, je časově zdouhavá. Další nevýhodou průtokové cytometrie je, že vyžaduje specifický selekční marker (1). Pro zlepšení metody izolace jednotlivých buněk nebo samostatných buněčných populací byla proto vyvinuta technika laserové mikrodisekce (LCM) (2, 3, 4). Laserová mikrodisekce byla použita pro izolaci buněk u řady typů buněčných i tkáňových preparátů, včetně zamražených vzorků, formalínem fixovaných a parafrinovaných tkání či cytologických preparátů. V závislosti na použitém materiálu je možno z mikrodisekovaných buněk extrahovat DNA, RNA či proteiny v dobré kvalitě. Kombinací s dalšími technikami, jako například cDNA microarrays, pak LCM pomáhá identifikovat nové diagnostické, prediktivní a prognostické markery, vedoucí ke zlepšení diagnosticko-terapeutických metod v léčbě onkologických onemocnění.

Princip a vývoj laserové mikrodisekce

Laserová mikrodisekce je rychlá a spolehlivá metoda, která umožňuje izolaci cílových buněk ze specifického komplexu tkáně pro jejich následnou molekulární nebo proteinovou analýzu (5).

Počátek laserové mikrodisekce se datuje do roku 1970, kdy byl poprvé použit laser pro zachycení a manipulaci s buněčnými populacemi. V polovině 90. let minulého století byl vyvinut první prototyp laserového mikrodisekčního systému ve spolupráci několika ústavů z National Institutes of Health (NIH). Později ze spolupráce NIH a firmy Arcturus (www.arctur.com) vznikl první komerční mikrodisekční systém (6). Tento systém vyřezává buňky pomocí laserových pulsů cílených na okrsky tkáně, které jsou překryty speciální membránou, tzv. fúzováním tkáně a membrány. Po disekci příslušných buněk je termoplastická fólie s adharovanými buňkami odstraněna a zbytek tkáně, která nebyla vybrána k disekci, zůstává na podložním sklíčku. Buňky na membráně pak mohou být podrobeny příslušným extrakčním podmínkám pro jejich následnou mikrogenomickou analýzu.

Rozdílné LCM technologie

LCM umožňuje disekci nejen jednotlivých buněk či buněčných kolonií z komplexu tkáně uchycené na podložním sklíčku, ale také vyřezání jednotlivých chromozómů a v některých případech i disekci živých buněk přímo z kultivační misky. V současné době máme k dispozici několik mikrodisekčních systémů, které se liší v metodě odchyťování buněk, v konfiguraci systému i v aplikacích (tab.1) (7). Některé systémy umožňují bezdotykové katapultování označených buněk přímo do sběrných zkumavek, nebo vyzvednutí vyřezaných buněk přímo víčkem mikrocetrifugační zkumavky. LCM systémy mohou mít zabudovaný infračervený, nízko výkonostní infračervený, ultrafialový laser, nebo i jejich kombinace. Všechny mikrodisekční systémy mají laser zabudovaný do standardního mikroskopu.

Technologie zachytávání buněk:

Membránové (fúzní) technologie

Jedna z možností, jak zachytávat vyřezané buňky, je tzv. fúzní technologie. Fúzní technologie zachytávání buněk je založena na selektivní přilnavosti cílových buněk a fragmentů tkáně k termoplastické membráně, která je upevněna na průsvitné víčko mikrozukavky (CapSure™) (viz. www.arctur.com). Termoplastická membrána je aktivována nízkovýkonostním infračerveným laserovým pulsem. Nařezané tkáně jsou upevněny na standardní podložní sklíčko a termoplastická membrána je umístěna nad dehydratovaný preparát. V ohnisku laserového mikroskopu se aktivuje termoplastická membrána, která je navázána k identifikované cílové buňce v mikroskopované části preparátu. Laser roztaví termoplastickou fólii v místě vybrané cílové buňky (1,5,8). Protože termoplastická fólie absorbuje většinu tepelné energie a laserový puls trvá jen zlomek sekundy, poškození biologických makromolekul je minimální nebo nedetekovatelné. Po disekci příslušných buněk, je termoplastická fólie s adharovanými buňkami odstraněna a zbytek nepoužité tkáně zůstává na podložním sklíčku. Tuto technologii využívá PixCell II laserový mikrosektor firmy Arcturus. Novější verze laserového mikrodisektoru (Veritas) této společnosti má zabudovaný jak nízkovýkonostní infračervený laser, tak UV laser. Pro disekci pomocí UV laseru jsou tkáňové preparáty upevněny na tenkou polyetylenovou fólii. Polyetylenová fólie s dehydratovaným preparátem je přerostvena víčkem s termoplastickou membránou (CapSure™). Cílové buňky jsou mikrodisekovány prostřednictvím ultrafialového laseru, který přesně obkrouží feznou dráhu podél obvodu disekovaných buněk. Mikrodisekované části tkáně tak zůstávají přichyceny na spodní části víčka.

VÝROBCE	LCM SYSTÉM	VLASTNOSTI					APLIKACE
		Technologie zachytávání buněk	Technologie sběru buněk	Kompatibilní mikroskop	Typ laseru	Fluorescence	
ARCTURUS	PixCell II VERITAS	Termoplastická membrána uchycena na sběrná víčka. Laser roztaví termoplastickou fólii v daném místě kde jsou navázány cílové buňky.	Odstraněním víčka z preparátu. Cílové buňky zůstávají uchyceny na membráně víčka.	Invertovaný Olympus IX 50	IF laser IF a UV laser	ano	Zamražené tkáně Parafrinované tkáně Cytologické preparáty Živé buňky Jedna buňka
CELL ROBOTICS	Cell Robotics	Tkáňové preparáty jsou uchyceny na skla pokrytá polyetylenovou fólií, buňky jsou laserem obkrouženy.	Vyřezání kousků fólie s buňkami je vtlačeno do víčka mikrozukavky elektrostatickou silou.	Invertovaný Leica, Nikon, Olympus a Zeiss	UV laser	ano	Zamražené tkáně Parafrinované tkáně Cytologické preparáty Živé buňky Jedna buňka
MMI Molecular Machines	mmi CellCut mmi SmartCut	Tkáňové preparáty jsou uchyceny na skla pokrytá polyetylenovou fólií, buňky jsou laserem obkrouženy.	Vyřezané okrasky tkáně jsou zachyceny víčky která jsou pokryta adhezivní vrstvou.	Invertovaný Nikon, Olympus	UV laser	nevíme	Zamražené tkáně Parafrinované tkáně Cytologické preparáty Živé buňky Jedna buňka Mikromanipulace

Tabulka 1.: Srovnání různých komerčně dostupných mikrodisekčních systémů.

Cell Robotics (www.cellrobotics.com) využívá tzv. techniku „Pick-Up Sticks“, která umožňuje zachycení disekovaných buněk. Tento mikrodisekční systém je založen na UV laseru. Mikroskalpel produkuje fototermální reakci v ohniskovém bodu čočky mikroskopu, kde laserový paprsek protíná cílový vzorek. Tkáňové preparáty jsou uchyceny na skla pokrytá tenkou polyetylenovou fólií, vyřezávané buňky či okrsky tkáně jsou laserem obkrouženy. Fototermální reakce v ohniskovém bodu laseru vypaří nebo odstraní velmi malou část cílových buněk či tkáně. Disekované okrsky tkáně jsou směřovány elektrostatickou silou směrem k filmu a film s buňkami je pak vložen do mikrocentrifugační zkumavky a zpracován.

Podobný systém vyřezávání buněk má i mikrodisektor mmi-CellCut firmy MMI Molecular Machines & Industries AG (www.molecular-machines.com), tento systém se však liší od Cell Robotics ve způsobu zachytávání buněk po disekci. Buňky jsou vyřezávány automaticky pomocí velmi přesného UV laseru. Vzorky jsou uchyceny na speciální membrány upevněné v rámečku. Takto připravené vzorky jsou překryty skleněným podložním sklíčkem. Toto přikrytí efektivně ochrání vzorek před nečistotami z okolí a je rozhodující pro všechny aplikace, u kterých je klíčové zabránit zevní kontaminaci. Vyřezané okrsky tkáně jsou zachyceny víčky, která jsou pokryta adhesivní vrstvou.

Systém Bio-Rad Colonis (viz. www.microscopy.bio-rad.com) používá rovněž film pro zachycení buněk, ale jinou cestou. Tento systém umožňuje i aplikace s živými buňkami. Film je umístěn do kultivační misky a živé buňky jsou na něm přímo kultivovány. Po vypěstování kolonií je možno řezat buňky přímo v kultuře. Vyřezaný film je z kultury odloupen a požadované buňky zůstanou na něm uchyceny. Je také možno provést ablaci nežádoucích kolonií buněk. Ty jsou následně odmyty a zbylé buňky mohou být dále kultivovány (7).

Paprskové technologie

Zachytávání buněk pomocí speciálního filmu není jedinou cestou jak izolovat disekovaný materiál (7). PALM MicroBeam's (www.palm-microlaser.com) využívá tzv. technologii laserové tlakové katapultování (Laser Pressure Catapulting, LPC). Pulzní UV-A laser je zabudovaný do standardního mikroskopu. Laser je zaostřen přes objektiv čočky do bodu o velikosti 1 µm. Uvnitř úzkého bodu laserového ohniska je vytvořená síla pro ablaci materiálu, zatímco okolní tkáň zůstává zcela neporušena. Použitím tohoto laserového systému mohou být separované buňky nebo vybrané oblasti tkáně vyzvednuty a zachyceny do sběrného zařízení. Toto je zcela bezkontaktní proces zachytávání buněk, kdy pro transport selektovaných oblastí do sběrných systémů je použito jenom zaostřené světlo. Vzorek je přemístěn několik milimetrů proti gravitaci. Stejný systém je také aplikován pro získávání živých buněk z buněčných kolonií (9, 10, 11). Katapultovaný materiál může být dále centrifugován a použit pro následnou molekulární analýzu, nebo další experimenty jako je rekultivace selektovaných vitálních buněk.

Další široce používanou technikou je laserový mikropaprskový mikrodisekční systém (12) (viz. www.leica-microsystems.com). Tento systém používá pulzní ultrafialový laser s malým paprskem pro vyřezávání cílových buněk prostřednictvím fotoablace sousední tkáně. Tkáňové preparáty jsou uchyceny na tenkou polyetylenovou fólii. Cílové buňky jsou mikrodisekovány prostřednictvím UV laseru, který přesně obkrouží řezanou dráhu podél obvodu disekovaných selektovaných buněk. Touto „studenou“ ablací není materiál vystaven přímému laserovému záření. Mikrodisekované části tkáně jsou sbírány do víčka nanozkumavky bezkontaktně, tzn. buňky padají do víčka zkumavky na základě gravitace, a mohou být následně použity pro molekulární analýzu.

Mechanické technologie

Další možností zachytávání buněk nabízí např. společnost Eppendorf (www.eppendorf.com) prostřednictvím tzv. „Piezo power for microdissection“ (PPMD) technologie. Tento

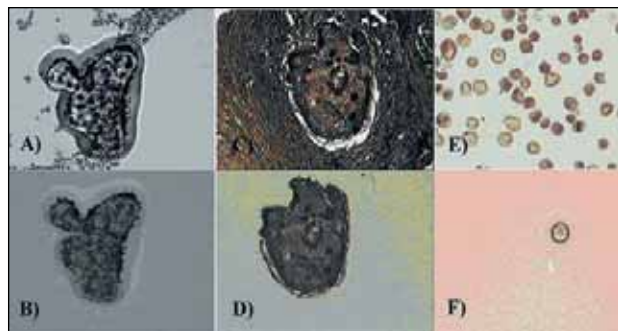
systém zahrnuje ultrazvukový piezo-mikroskalpel s velmi tenkou kovovou špičkou, který je napojen na standardní mikroskop propojený s počítačem. Disekce je prováděna v kapce vody, xyleny či jiného média a to tak, že na preparát je nanesena kapka daného média, a mikroskalpel kmitavými pohyby seškrabává potřebný úsek tkáně do této kapky. Kapka s izolovanými buňkami či okrsky tkáně je aspirována speciální pipetou a vnesena do sběrné mikrozukavky.

Aplikace LCM v diagnostice a prognózování nádorových onemocnění

Na našem pracovišti používáme laserový mikrodisektor Veritas (Arcturus) (obr.1). Vypracovali jsme rutinní postupy pro laserovou mikrodisekci z cytologických preparátů karcinomů plic získaných punkční cytologií barvených metodou Giemsa-Romanovski, zamražených či parafinizovaných nádorových tkání (barveno hematoxylinem) a také cytospinových preparátů z nejrůznějších buněčných linií (barveno neutrální červení) (obr.2). Metodickým cílem bylo zavést kombinaci LCM s lineární amplifikací DNA i RNA pro účely dalších mikrogenomických analýz z biologického materiálu s minimálním obsahem nádorových buněk, či pro studium nádorové heterogenity na jednobuněčné úrovni. V další části tohoto sdělení referujeme naše odzkoušené metodické postupy, které snad usnadní práci dalším zájemcům o přípravu genetického materiálu technikou LCM spojenou s amplifikací DNA či RNA a následnými genetickými analýzami.



Obr. 1: Laserový mikrodisektor Veritas firmy Arcturus.

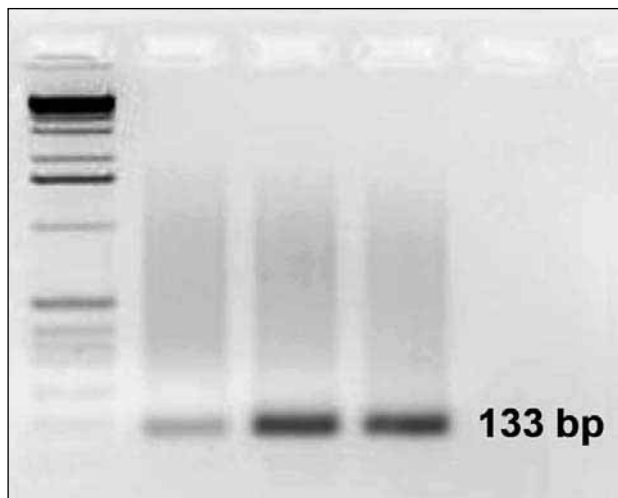


Obrázek 2.: Laserová záchytná mikrodisekce nádorových buněk z cytologického preparátu karcinomu plic získaného punkční cytologií (barveno metodou Giemsa-Romanowski), zamražených či parafinizovaných nádorových tkání (barveno hematoxylinem) a stabilní buněčné linie K562 (barveno neutrální červení): Na obrázku jsou **A)** označeny nádorové buňky cytologického preparátu karcinomu plic; **B)** disekované buňky karcinomu plic; **C)** označené nádorové buňky z řezu formalinem fixované a parafinizované nádorové tkáně; **D)** vyřezané buňky z tohoto tkáňového řezu; **E)** cytospin buněčné nádorové linie K562; **F)** disekovaná buňka nádorové buněčné linie K562.

Izolace a lineární amplifikace DNA

Technika lineární amplifikace DNA byla modifikovaná podle dříve publikovaných prací (13-16). Buňky získané pomocí LCM (1-1000 buněk) byly v mikropodmínkách lyzovány pro-

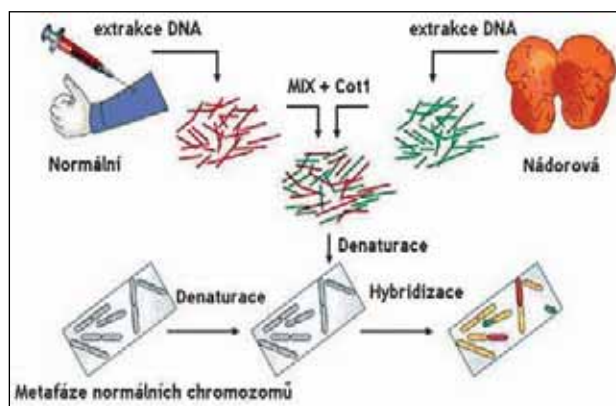
teinázou K. K mikrodisekovaným buňkám bylo přidáno 5 μ l PK pufru [50mM Tris-HCl (Sigma, USA) pH=8.1, 1 mg/ml proteinázy K (New England Biolabs, USA), 1 mM EDTA (Serva, Německo)] a 5 μ l minerálního oleje (Sigma, USA). Vše bylo inkubováno přes noc při 40°C. Druhý den byly zkumavky s natrávenými buňkami krátce centrifugovány a inkubovány 10 min. při teplotě 95°C. Při této teplotě dochází k inaktivaci proteinázy K. Poté byla dvoušroubovice DNA rozštěpena restričním enzymem *MseI* (New England Biolabs, USA). K 5 μ l lyzátu bylo přidáno 0,2 μ l One-Phor-All-Buffer-Plus (Amersham Biosciences, USA), 1 μ l *MseI* (10 jednotek) a 0,8 μ l H₂O. Směs byla inkubována 3 hodiny při 37°C. Po restrikci byly na rozštěpené konce navázány adaptéry se specifickými amplifikačními sekvencemi. Pro annealing primerů byly použity primery *MseLig* – 21 merový (5'-AGT GGG ATT CCG CAT GCT AGT-3) a *MseLig* -12 merový (5'-TAA CTA GCA TGC-3 μ) (Generi Bitech, Česká republika), 0,5 μ l One-Phor-All-Buffer-Plus a 1,5 μ l H₂O. Annealing byl zahájen inaktivací restričních enzymů při 65°C, pak se teplota snižovala po 1°C/min až na 15°C. Při 15°C bylo k reakční směsi přidáno 1 μ l T4 DNA ligázy a 1 μ l T4 DNA ligázového pufru (New England Biolabs, USA), obsahujícího 10mM ATP. Ligace probíhala přes noc při 15°C. Pomocí výše zmiňovaných sekvencí primerů byla DNA následně amplifikována v PCR reakci. Pro primární amplifikaci bylo k 12 μ l ligovaného produktu přidáno 40 μ l primární PCR směsi, která obsahovala 3 μ l Expand Long Template, buffer 1 (Expand Long Template PCR Systém, Roche, Švýcarsko), 2 μ l dNTPs (10mM deoxynukleotidy, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Sigma, USA), 35 μ l H₂O. Primární amplifikace byla započata 4 min. denaturací při 68°C. V tomto kroku jsou odstraněny přebytečné oligonukleotidy z vazby na DNA řetězec. Po denaturaci bylo do reakční směsi přidáno 0,7 μ l (3,5 jednotek) DNA polymerázové směsi Taq a Pwo polymerázy (Expand Long Template PCR Systém, Roche, Švýcarsko). V termocykléru byly nastaveny tyto amplifikační podmínky: 14 cyklů – 94°C (40s), 57°C (30s), 68°C (1min. 15s); 34 cyklů – 94°C (40s), 57°C (30s), 68°C (1min. 45s) a 1 cyklus – 94°C (40s), 57°C, 68°C (5min.). Pro kontrolu kvality a senzitivity DNA amplifikace byla použita specifická PCR amplifikace exonu 2 genu pro lidský mamaglobin B1 (Obr. 3). Naše výsledky ukazují, že lineární amplifikací lze reprodukovatelně namnožit DNA z jediné disekované buňky do množství postačujícího pro běžné genetické analýzy založené na PCR.



Obr. 3: Výsledek genově specifické PCR amplifikace exonu 2 genu pro lidský mamaglobin B1 z mikrodisekovaných buněk, jejichž DNA byla lineárně amplifikována. Produkt selektivní amplifikace exonu 2 genu pro lidský mamaglobin B1 se nacházel v oblasti 133bp. Zleva: 1) DNA ladder, 2) templat připravený lineární amplifikací DNA z 1 buňky, 3) templat připravený lineární amplifikací DNA z 10 buněk, 4) templatem byla kontrolní DNA.

Komparativní genomická hybridizace (CGH) jako jedna z možností použití lineárně amplifikované DNA získané z buněk izolovaných LCM.

Principem komparativní genomické hybridizace (CGH; obr.4) je porovnání referenční a vyšetřované DNA. Každá z obou DNA je označena jinou fluorescenční barvou. Na našem pracovišti konsenzuálně značíme referenční DNA červeně a vyšetřovanou DNA zeleně. Obě DNA jsou smíchány v poměru 1:1 a hybridizovány na normální lidské metafázni chromozómy. Interpretace výsledků je založena na změně poměru intenzity zelené a červené fluorescence u chromozómů, na nichž obě DNA byly hybridizovány (17,18,19). Delece (loss) ve vyšetřované DNA způsobí barevný posun směrem do červená, amplifikace (gain) posun do zelena. Nevýhodou CGH je fakt, že dokáže zachytit pouze nebalancované cytogenetické změny, které jsou přítomny alespoň u 50% jader, z nichž byla izolována DNA. V případě nádorových preparátů je vzorek více či méně „kontaminován“ i nenádorovými populacemi buněk, které mohou výsledky CGH ovlivnit naředěním cytogenetických alterací pod detekční limit CGH. Laserová mikrodisekce proto umožňuje citlivější zachycení cytogenetických změn, výběrem požadovaných nádorových populací či pouze jediné (ne)nádorové buňky.



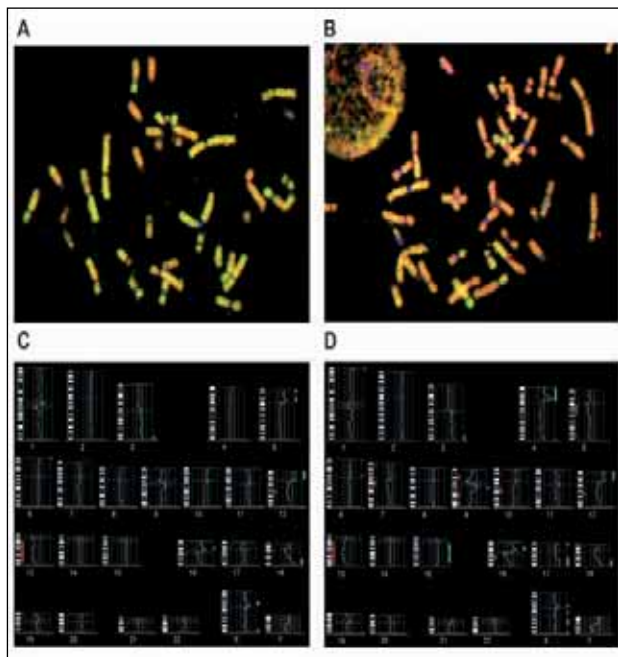
Obrázek 4.: Schématický princip komparativní genomické hybridizace (CGH)

Příkladem tohoto tvrzení je jeden z našich experimentů, ve kterém jsme technikou u laserové mikrodisekce izolovali jednotlivé buňky z linie myeloidní leukémie K562. Technikou lineární amplifikace byla DNA namnožena a produkt primární amplifikace byl použit pro CGH. Pomocí CGH jsme porovnávali DNA získanou izolací klasickým způsobem ze směsné kultury buněk a DNA po LCM jediné buňky s následnou lineární amplifikací. Na obrázku 5 jsou zobrazeny výsledky této CGH studie, včetně idiogramů po LCM a lineární amplifikaci DNA z jediné buňky v porovnání se směsným vzorkem myeloidní leukemické linie K562. Z výsledných idiogramů je patrné, že se nálezy částečně liší díky nádorové heterogenitě buněk v tkáňové kultuře. U myeloblastu podrobeného LCM je např. patrná nová amplifikace v oblasti chromozómu 15. Z analýzy také vyplývá, že při vyšetření DNA získané ze směsné populace bylo detekováno menší množství cytogenetických změn, než v případě DNA izolované z jedné buňky. U směsného vzorku tedy nebyly zachyceny aberace méně frekventní, nedosahující zastoupení alespoň u 50% buněk v celkové populaci.

Specifická amplifikace vyšetřovaných genů pro účely mutačních studií

V současné době používáme techniku laserové mikrodisekce zejména při analýze mutací genů *EGFR1* a *k-ras* u pacientů s nemalobuněčným plicním karcinomem (20). Oddělením nádorové populace od nenádorových buněk si totiž významně zvyšujeme senzitivitu DNA sekvenace. DNA získaná z 300-500 mikrodisekovaných buněk je amplifikována ve dvouko-

lové nested PCR. Dvoukolová nested PCR je založena na 30 cyklech amplifikace s externím párem genově specifických primerů. Vzniklý PCR produkt je využit jako šablona pro druhé kolo amplifikace ve 30 cyklech s interním párem primerů. Výsledný amplikon je pak podroben klasické sekvenční analýze.



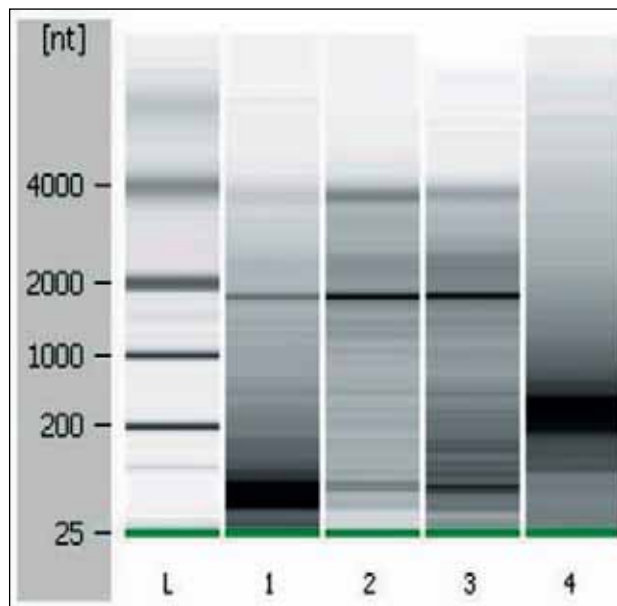
Obrázek 5.: Výsledek komparativní genomické hybridizace: **A)** Výsledný preparát (mitóza) při vyšetření cytogenetických změn DNA získané ze směsného vzorku kultury myeloidní leukemické linie K562. **B)** Výsledný preparát (mitóza) při vyšetření DNA po LCM a lineární amplifikaci získané z jedné buňky myeloidní leukemické linie K562. **C)** Idiogram získaný stanovením cytogenetických změn u DNA získané ze směsného vzorku kultury myeloidní leukemické linie K562. Cytogenetický nálezn: REV ISH ENH (3q29qter; 5p12-13.3; 5p15.2pter; 6p25.1pter; 12p11.1pter; 16p11.2-12; 18q21.3qter) REV ISH DIM (9q34.1qter; 12q21.1-21.3; 13q11.1qter; 16q12.1-13; 17p11.1-11.2; 18q11.2-12.1; 19p13.3pter). **D)** Idiogram cytogenetických změn DNA po LCM a lineární amplifikaci získané z jedné buňky myeloidní leukemické linie K562. Cytogenetický nálezn: REV ISH ENH (1p36.2pter; 3q26.3qter; 4p11.1pter; 4q35qter; 6p11.1-12.1; 9q13-21; 12p11pter; 15q11.2-24.1; 16p11.2-12; 17p12.1pter; 17q22qter; 18q22qter) REV ISH DIM (5q11.2-15; 5q34.0-35.1; 7q11.2-21.1; 9p12-21; 9q21.3qter; 10q22.1-22.3; 10q26.1qter; 12q21.1-21.3; 13q11.1qter; 16q12.1-22; 19p13.3pter)

Izolace, lineární amplifikace a hodnocení kvality mikroizolované RNA po LCM s použitím IR nebo UV laseru

Laserovou mikrodisekcí byly izolovány buňky kryoprezervované nádorové tkáně karcinomu rekta. Pro srovnání byly buňky disekovány IR laserem nebo UV laserem a to jednak jako 1) rozsáhlejší úseky tkáně čítající >1000 buněk a také jako 2) jednotlivé shluky 1-3 nádorových buněk. RNA byla izolována pomocí PicoPure™ RNA Isolation kitu (Arcturus, USA), který umožňuje purifikaci přes centrifugační kolonky. Kontrola degradace získané RNA byla provedena pomocí RNA 6000 Pico Kitu na bioanalyzáru Agilent 2100. Na obrázku 6 je znázorněn výsledek získané RNA po mikrodisekcii IR versus UV laserem. Vidíme, že při disekci malých okrsků tkáně (např. jednotlivé infiltruující či metastatické buňky) je vhodnější použít IR laser, protože během disekce malých úseků tkáně pomocí UV laseru dochází ke značné tepelné degradaci RNA.

RiboAmp RNA amplifikační kit (Arcturus, USA) byl použit pro amplifikaci vyzolované RNA. Tento kit umožňuje amplifikaci již nanogramového množství celkové RNA na mikrogramové. Lineární amplifikace RNA byla započata přepisem jednovláknové molekuly RNA na cDNA reverzní transkriptázou se současnou inkorporací T7 promotoru. Druhé vlákno cDNA bylo dosyntetizováno pomocí exogenních primerů

s následným přečištěním dvoušroubovice cDNA. *In vitro* transkripce cDNA na antisense RNA byla provedena pomocí T7 RNA polymerázy. Amplifikace RNA byla ukončena izolací a přečištěním získané antisense RNA. Takto připravenou RNA lze použít pro účely většiny expresních analýz.



Obr. 6: Analýza kvality RNA získané z nádorové tkáně karcinomu rekta po mikrodisekcii IR nebo UV laserem na bioanalyzáru Agilent 2100 kitem RNA 6000 Pico: **1)** RNA získaná po disekci celé tkáně pomocí IR laseru. **2)** RNA získaná po disekci izolovaných nádorových buněk pomocí IR laseru. **3)** RNA získaná po disekci celé tkáně pomocí UV laseru. **4)** Degradovaná RNA získaná po disekci izolovaných nádorových buněk pomocí UV laseru. **L)** Specifický selekční marker kontroly kvality a reprodukovatelnosti elektroforetické separace.

Závěr:

V současnosti existuje celá řada mikrodisekčních systémů, které se liší nejen metodou zachytávání buněk, (tzv. membránové nebo-li fúzní technologie, paprskové technologie či mechanické technologie), ale také konfigurací systému a v následných aplikacích. Pomocí všech těchto systémů lze vyšetřovanou tkáň prohlédnout pod mikroskopem před a po mikrodisekcii. Tím je zkontrolována homogenita studovaného materiálu a zachování morfologie disekované části tkáně na víčku. Tyto systémy také umožňují obrazovou dokumentaci po každé disekci, což poskytuje příležitost ke korelaci histopatologických nálezů s výsledky molekulární analýzy.

Na našem pracovišti je k dispozici laserový mikrodisekční systém Veritas firmy Arcturus, který má zabudovaný jak IR tak UV laser, což nám umožnilo provedení různých aplikací. Laserovou mikrodisekcí byly izolovány buňky z cytologických preparátů karcinomu plic, zamražených či parafrinizovaných nádorových tkání, i ze stabilních buněčných linií. Za účelem získání dostatečného množství DNA/RNA jsme zavedli techniku lineární amplifikace DNA/RNA. V současné době používáme techniku laserové mikrodisekce zejména při analýze mutací genu *EGFR* a *k-ras*, pro techniku komparativní genomické hybridizace (CGH) a pro izolaci RNA za účelem dalších expresních analýz. Z našich zkušeností jednoznačně vyplývá nutnost použití LCM pro přesnou diagnostiku, predikci terapeutické odpovědi a prognózování solidních nádorů vyznačujících se vysokou tkáňovou i buněčnou heterogenitou.

Poděkování:

Práce na tomto projektu byla podpořena výzkumným záměrem MŠM 6198959216, granty Interní Grantové Agentury Ministerstva zdravotnictví ČR NR/9076 a Ministerstvem průmyslu a obchodu ČR 1H-PK/45.

Literatura:

1. Curran S., McKeay J.A., McLeod H.L., Murray G.I.: Laser capture microscopy. *J Clin Pathol*, 2000; 53:64-68.
2. Simone N.L., Bonner R.F., Gillespie J.W. et al.: Laser-capture microdissection: opening the microscopic frontier to molecular analysis. *Trends Genet.*, 1998; 14(7):272-276.
3. Banks R.E., Dunn M.J., Forbes M.A. et al.: The potential use of laser capture microdissection to selectively obtain distinct populations of cells for proteomic analysis—preliminary findings. *Electrophoresis*, 1999; 20(4-5):689-700.
4. Emmert-Buck M.R., Bonner R.F., Chuaiqui R.F. et al.: Laser capture microdissection. *Science*, 1996;274(5289):998-1001.
5. Bonner R.F., Emmert-Buck M., Cole K., Pohida T. et al.: Laser capture microdissection: Molecular analysis of tissue. *Science*, 1997; 278: 1481-1483.
6. Brignole E.: Laser-capture microdissection. *Modern Drug Discovery*, 2000; 3:69-70, 73.
7. Willingham E.: Laser Microdissection Systems. *The Scientist*, 2002; 16(10): 42.
8. Fend F., Raffeld M.: Laser capture microdissection in pathology. *J Clin Pathol*, 2000; 53: 666-672.
9. Burgemeister R., Stich M.: Laser mediated live cell handling: Detection and collection of single live cells by laser microdissection and pressure catapulting (LMPC). *Zellbiologie*, 2004; 23-24.
10. Gjerdrum L.M., Lielpetere I., Rasmussen L.M. et al.: Laser-assisted microdissection of membráně-mounted paraffin section. *J Mol Diagn*, 2001; 3:105-110.
11. Zhang L., Yang N., Conejo-Garcia J.R. et al.: Expression of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor in ovaria carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2003; 9:264-272.
12. Chimenti C., Pieroni M., Russo A., Sale P. et al.: Laser microdissection in clinical cardiovascular research. *American College of Chest Physicians*, 2005; 128: 2876-2881.
13. Klein Ch.A., Schmidt-Kittler O., Schardt J.A. et al.: Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. *Proc Natl Acad Sci*, 1999; 96: 4494-4499.
14. Stoecklein N.H., Erbersdobler A., Schmidt-Kittler O. et al.: SCOMP is superior to degenerated oligonucleotide primed-polymerase Chin reaction for global amplification of minute amounts of DNA from microdissected archival tissue samples. *American Journal of Pathology*, 2002; 161: 43-51.
15. Serth J., Kuczyk M.A., Paeslack U. et al.: Quantitation of DNA extracted after micropreparation of cells from frozen and formalin-fixed tissue sections. *Am J Pathol*, 2000; 156:1189-1196.
16. Kuukasjarvi T., Tanner M., Pennanen S. et al.: Optimizing DOP-PCR for universal amplification of small DNA samples in comparative genomic hybridization. *Genes Chromosom Cancer*, 1997; 18:94-101.
17. Kallioniemi A., Kallioniemi O.P., Sudar D. et al.: Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*, 1992; 258(5083):818-21.
18. Kallioniemi O.P., Kallioniemi A., Piper J. et al.: Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer*, 1994 10(4): 231-43.
19. Špeicher M.R., du Manoir S., Schrock E. et al.: Molecular cytogenetic analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded solid tumors by comparative genomic hybridization after universal DANN-amplification. *Hum Mol Genet*, 1993; 2:1907-1014.
20. Berkovcová J., Hajdúch M., Dziechciarková M., Trojanec R., Janošťáková A., Wiecek S., Grygarková I., Kolek V., Vorlíček J.: Predikce účinnosti tyrozinkinázových inhibitorů Egfr1 v léčbě nemalobuněčných plicních karcinomů. *Klin Onkol*, 2006 (v tisku).

MIKROČIPOVÁ ANALÝZA GENOVÉ EXPRESE V MIKRODISEKOVANÝCH VZORCÍCH

MICROARRAY ANALYSIS OF GENE EXPRESSION IN MICRODISSECTED SAMPLES

BOUCHAL J., TURASHVILI G., KOLÁŘ Z.

LABORATOŘ MOLEKULÁRNÍ PATOLOGIE, LF UP, OLOMOUČ

Souhrn

V poslední době se v experimentální praxi stále ve větší míře uplatňují metody využívající mikročipové expresní analýzy. Většina expresních analýz v medicínském výzkumu vychází z biotických vzorků, které obsahují řadu různých typů buněk. Majoritní populace buněk je určující pro celkovou informaci o genové expresi a znemožňuje tak rozlišení specifické genové exprese jednotlivých typů buněk. Mezi metody, které umožňují selekci přesně definovaných populací buněk patří laserová a mechanická mikrodisekce. Současné čipy vyžadují mikrogramová množství značené nukleové kyseliny, přičemž vstupní množství RNA ze selektovaných buněk se může pohybovat pouze v nanogramovém až pikogramovém řádu. Tento problém je možno řešit různými způsoby amplifikace RNA, mezi které patří dvojí lineární amplifikace RNA nebo metody využívající kombinovanou PCR s lineární amplifikací. V tomto krátkém přehledu poskytujeme jednak informace, se kterými jsme se setkali jednak během naší současné analýzy genové exprese v mikrodisekovaných buňkách mléčné žlázy, a také náš optimalizovaný postup. Celý projekt sestával z časově náročného sběru čerstvě zmražené tkáně, optimalizace přípravy kryožezů pro mikrodisekci, izolace a amplifikace RNA, hybridizace na mikročipy, analýzy dat a konečně verifikace vybraných výsledků pomocí imunohistochemie. V současné době je vlastní práce v opo-
nentním řízení v zahraničním časopise, a nemůžeme proto poskytnout detailnější informace o získaných výsledcích.

Klíčová slova: fixace, mikrodisekce, RNA, amplifikace, mikročipy

Abstract: The DNA microarray is a powerful, high throughput technique for assessing gene expression on a system-wide genomic scale. Most expression profiling studies of solid tumors have used biopsy samples containing large numbers of contaminating stromal and other cell types, thereby complicating any precise delineation of gene expression in nontumor versus tumor cell types. Combining microdissection, RNA amplification protocols, microarray technologies and our knowledge of the human genome sequence, it is possible to isolate pure populations of cells or even a single cell and interrogate the expression of thousands of sequences for the purpose of more precisely defining the biology of the tumor cell. In this short overview, we provide informations on selected problems which we had to solve during our microarray analysis of microdissected normal and tumour cells of mammary gland. We provide our optimized procedure as well. The whole project consisted of the long-term collection of snap-frozen tissues, optimization of staining of cryosections for laser capture microdissection, isolation and amplification of RNA, hybridization onto chips, data analysis and finally verification of the results by immunohistochemistry. Our work is currently reviewed by an international journal and we can't provide detailed information on particular achievements yet.

Keywords: fixation, microdissection, RNA, amplification, microarray

V literatuře existuje velké množství informací týkající se mikročipové analýzy, mikrodisekce i amplifikace RNA. V tomto krátkém přehledu poskytujeme informace, se kterými jsme se setkali jednak během naší současné analýzy genové exprese v mikrodisekovaných buňkách mléčné žlázy, a také v již ukončeném experimentu s nádorovými liniemi odvozenými od karcinomu prostaty (1). Většina expresních analýz v medicínském výzkumu vychází z biopických vzorků, které obsahují řadu různých typů buněk. Majoritní populace buněk je přitom určující pro celkovou informaci o genové expresi a znemožňuje tak rozlišení specifické genové exprese jednotlivých typů buněk (2). Mezi metody, které umožňují selekci přesně definovaných populací buněk patří laserová a mechanická mikrodisekce. V naší práci jsme testovali obě metody, ale mechanická mikrodisekce pomocí systému Eppendorf se ukázala být vhodná spíše pro izolaci větších tkáňových okrsků. Vzhledem k požadavku izolace nejen nádorové tkáně, ale i normálních duktálních a lobulárních luminálních buněk mléčné žlázy, jsme použili systém laserové mikrodisekce od firmy Arcturus. Celý projekt sestával z časově náročného sběru čerstvě zmražené tkáně, optimalizace přípravy kryožezů pro mikrodisekci, izolace a amplifikace RNA, hybridizace na mikročipy, analýzy dat a konečně verifikace vybraných výsledků pomocí imunohistochemie. Zkrácený optimalizovaný postup poskytujeme níže. V současné době je naše práce v oponentním řízení v zahraničním časopise, a nemůžeme proto poskytnout detailnější informace o získaných výsledcích.

Vliv fixace a barvení na mikrodisekci a kvalitu nukleových kyselin

Optimální fixace tkání musí poskytovat přijatelnou morfologii, umožnit samotnou mikrodisekci a stabilizovat mRNA. Goldsworthy a spolupracovníci testovali účinky cross-linkujících i precipitujících fixativů na zmraženou i do parafinu zalitou tkáň (3). Precipitující fixativa jako ethanol a aceton zajišťovaly více RT-PCR produktů než formalin. Autoři také pozorovali větší výtěžnost RT-PCR z kryožezů než z řezů parafinových. Kim a spolupracovníci označují jako optimální fixativum pro stabilizaci RNA v tkáních zalitých do parafinu methacarn (kombinaci methanolu, chloroformu a kyseliny octové) (4). Takto fixované tkáně úspěšně používali pro mikrodisekci a následně RNA pro analýzu genové exprese taktéž pomocí RT-PCR. Další práce srovnávala ethanolovou fixaci a čerstvě mraženou tkáň pomocí Affymetrix mikročipů, avšak bez mikrodisekování jednotlivých buněk (5). Autoři detegovali 26% prób (přesnější probe sets, viz níže) u mražených tkání, oproti pouhým 4,5% z tkání fixovaných ethanolem a zalitých do parafinu. Přes výrazný pokles počtu detegovaných transkriptů tato data ukazují, že pokud není k dispozici čerstvě zmražená tkáň, lze získat omezenou informaci o genové expresi i z tkání zalitých do parafinu. Taktéž další autoři zjistili, že fixace tkání 70% etanolem zvyšuje výtěžnost RNA, DNA i proteinů oproti formalinové fixaci a poskytuje srovnatelnou histologickou kvalitu řezů (6-8). Přesto existuje poptávka po analýze genové exprese z tkání fixovaných formalinem a zalitých do parafinu. Firma Arcturus a Affymetrix proto vyvinuly speciální čipy (GeneChip® X3P Arrays), které obsahují hybridizační próby pouze v blízkosti 3' konce a jsou tak schopné detegovat více fragmentovaných transkriptů (vysvětlení viz níže). Laserová mikrodisekce a izolace RNA pro analýzu genové exprese je možná i z imunohistochemicky barvených parafinových řezů (9). Autoři používali kvalitně imunobarvené řezy z tkání fixovaných v acetonu, methanolu nebo ve směsi ethanolu a acetonu. Specifická i rychlost mikrodisekce byla výrazně zvýšena právě díky snazší identifikaci žádaných, popřípadě nechtěných buněčných populací. Přitom samotné barvení preparátů trvalo pouze 12-25 minut. Naproti tomu méně uspo-

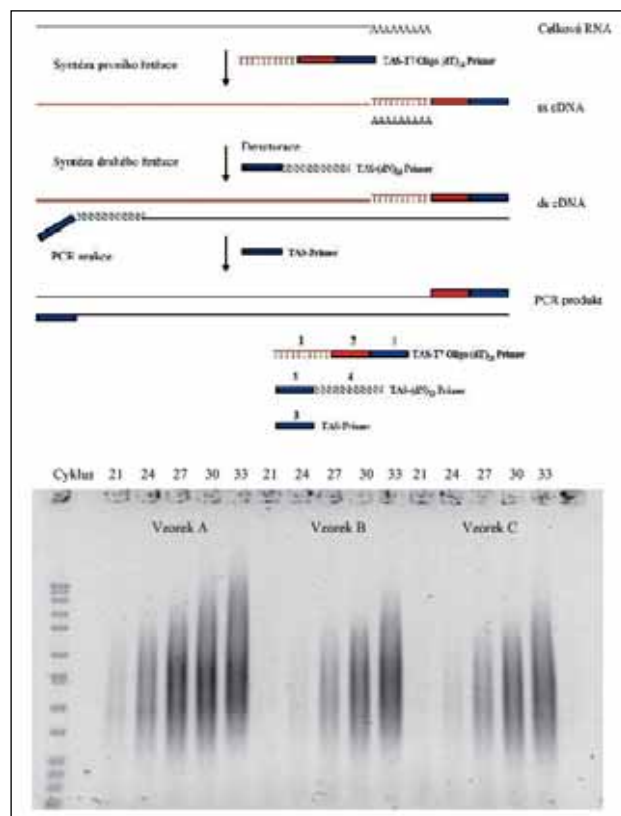
kojivé výsledky po mikrodisekci imunobarvených řezů získali Uneyama a spolupracovníci (10). Tito autoři doporučují spíše barvení cresylovou violetí, případně hematoxylin-eosinem. Použití hematoxylinu-eosinu pro laserovou mikrodisekci a mikročipovou analýzu doporučují také Michel a spolupracovníci. (11). Ginsberg a Che testovali mikrodisekci a mikročipovou analýzu při použití nejen hematoxylinu-eosinu a cresylové violeti, ale také po barvení thioninem, akridinovou oranží a stříbrem (12). Někteří autoři s úspěchem použili pro stabilizaci RNA v analyzovaných vzorcích RNAlater (13). Chaotropní soli RNAlateru však interferují s mikrodisekcí, a tak museli autoři snížit jejich koncentraci promytím v 70% ethanolu a následnou dehydratací a vysušením pomocí absolutního ethanolu a xylenu. V naší práci se vyskytl také problém související s vysokým obsahem tuků v prsní tkáni, které znesnadňují přípravu kryožezů. Po přidavku RNAlateru nebylo již možné připravit kvalitní kryožezy ani při vychlazení tkání při -80°C, a proto jsme byli nuceni používat pouze klasické kryožezy.

Obdobně jako u dostatečně koncentrovaných vzorků je optimální kontrolou kvality RNA sledování poměru 28S/18S rRNA. Vzhledem celkovému objemu vzorků v řádu mikrolitrů je tato kontrola umocněna v podstatě pouze pomocí kapilární elektroforézy s laserem indukovanou fluorescencí (14). Standardem se v této oblasti stal přístroj Agilent 2100 Bioanalyzer, který umožňuje na speciálních čípech analýzu jednoho mikrolitru celkové RNA a poskytuje nejen informaci o kvalitě RNA, ale zároveň i o koncentraci. Pokud není uvedená technologie k dispozici, je nutné barvení řezů, mikrodisekci buněk i izolaci RNA ověřit alespoň na testovacích vzorcích a celý výtěžek obětovat pro kontrolu pomocí klasických metod jako je agarozová elektroforéza a RT-PCR. Po optimalizaci celé procedury je následně nutné striktně dodržovat celý postup u analyzovaných vzorků. Průměrný výtěžek z 1000 mikrodisekovaných buněk je asi 50 ng celkové RNA, přičemž v našich laboratořích jsme pozorovali pro agarozovou elektroforézu a barvení Sybr-Gold detekční limit 10 ng při vizualizaci pomocí chlazené CCD kamery (Diana II, Raytest, Německo). Pro ověření kvality pomocí RT-PCR jsme testovali primery pro beta-actin (15), které poskytují jednak relativně dlouhý amplikon 626 bp a kontaminace genomickou DNA se projeví odlišným fragmentem o velikosti 1966 bp. Při použití Titan One Tube RT-PCR kitu (Roche) jsme však nedocílili snížení detekčního limitu a vzhledem k finanční náročnosti jsme od RT-PCR testování upustili. V době řešení našeho projektu nebyl k dispozici zmiňovaný systém 2100 Bioanalyzer a pro kvantifikaci RNA jsme používali spektrofotometr Nanodrop, který umožňuje analýzu taktéž jediného mikrolitru vzorku. Po optimalizaci postupu byl připraven nejprve jeden vzorek pouze pro testovací čip Test3 Array (viz níže) a následně byla provedena kompletní analýza všech tří buněčných populací od jedné pacientky. Po získání kvalitních výsledků jsme přistoupili k dokončení analýzy všech třiceti vzorků. Celý proces amplifikace a značení (viz níže) byl navíc monitorován pomocí GeneChip® Eukaryotic Poly-A RNA Control Kit (Affymetrix), jehož definované ředěné kontroly byly přidány do všech vzorků před syntézou cDNA a finálně byly detegovány na cílových čípech Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays (Affymetrix).

Možnosti amplifikace mRNA pro mikročipovou analýzu
Eberwine a spolupracovníci vyvinuli dnes již klasickou, tzv. lineární amplifikaci RNA (16). Jedná se o přepis mRNA do cDNA pomocí oligo-dT-T7 primeru, přičemž inkorporovaný T7-promotor umožňuje následnou amplifikaci in vitro transkripční pomocí T7- polymerázy. K dosažení mikrogramových množství RNA pro samotnou mikročipovou analýzu je někdy

tento postup třeba zopakovat. Jenson a spolupracovníci pozorovali pouze malé změny v expresním profilu vzorků amplifikovaných dvojitou lineární amplifikací oproti neřaděné RNA (17). Nejlepší výsledky byly získány při amplifikaci 500 a více nanogramů celkové RNA, přičemž jako kritické faktory se ukázaly kvalita vstupní RNA a koncentrace oligo-dT-T7 primeru. Pro zmiňovanou dvojitou lineární amplifikaci je dostupná celá řada komerčních kitů (Ambion, Arcturus, Epicentre a další). Detailní informace o problémech syntézy cDNA a in vitro transkripce poskytuje práce Baugh a spolupracovníků (18). Z jejich zkušeností vychází i další kit od firmy Artus-biotech, jehož hlavní odlišností je využití speciálních trinukleotidových primerů (sekvence neuvedena) pro syntézu druhého řetězce cDNA.

Jak již bylo zmíněno výše jedním ze základních předpokladů úspěšné mikročipové analýzy je kvalita RNA. Existují však přístupy, které umožňují získat informaci také z degradované RNA. Většina přístupů pro amplifikaci RNA používá oligo-dT-T7 primer, který umožňuje jednak přepis do cDNA (oligo-dT primer) a také in vitro transkripci pomocí T7-polymerázy (T7-promotor). Přepis do cDNA je tedy možný pouze pro fragmenty RNA obsahující poly-A signál. Xiang a spolupracovníci vyvinuli modifikovanou lineární amplifikaci při použití alternativního oligo-N9-T3 primeru (19). Náhodný devíti-mer (N9) umožňuje přepis jakéhokoli fragmentu RNA do cDNA a k in vitro transkripci slouží promotor pro T3-polymerázu. Tento postup vykazoval v degradovaných vzorcích asi o třetinu lepší zachyt rozdílně exprimovaných genů než klasická oligo-dT-T7 amplifikace.



Obrázek 1.: Amplifikace RNA pomocí PCR. Detailní vysvětlení této metody je k dispozici v textu. Z výsledku agarozové elektroforézy vyplývají optimální počty cyklů pro druhou PCR (24 cyklů pro vzorek A a 27 cyklů pro další dva vzorky). Výsledné produkty jsou použity pro in vitro transkripci, která je umožněna inkorporací T7-promotoru.

In vitro transkripci je možné kombinovat také s PCR amplifikací (20-22). Oligo-dT-T7 promotor je navíc spojen s PCR primerem, který je inkorporován i při syntéze druhého řetězce cDNA (Obr. 1). Nevýhodou tohoto postupu je nutnost defino-

vání počtu PCR cyklů pro každou cDNA tak, aby amplifikace byla ukončena v exponenciální fázi PCR. V systému firmy Roche, který jsme použili i v naší práci, se PCR amplifikace provádí dvakrát, přičemž během první reakce se odeberají alikvoty z cyklů 21, 24, 27, 30 a 33 (Obr. 1). Ty jsou poté analyzovány agarozovou elektroforézou a podle intenzity amplifikovaných produktů je vybrán počet cyklů pro druhou PCR. Získané PCR produkty jsou použity pro in vitro transkripci, během které dochází k další amplifikaci a také ke značení pro detekci na mikročipech.

Limitace mikročipových analýz

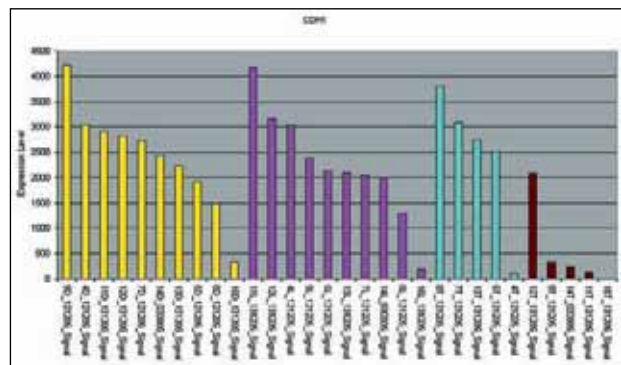
Po naskenování čipů následuje obtížná fáze analýzy dat. V naší práci jsme využili zkušeností pracoviště v anglickém Birminghamu a kromě postupu uvedeného níže zde zmíníme pouze několik detailů týkajících se Affymetrix čipů. Izzary a spolupracovníci modifikovali způsob hodnocení fluorescenčních signálů jednotlivých průb na Affymetrix čipech a srovnali jejich postup s algoritmy programů dChip (www.biostat.harvard.edu/complab/dchip) a komerčního programu Affymetrix (23). Čipy Affymetrix jsou tvořeny oligonukleotidy o délce 25nt, které jsou organizovány do tzv. probe sets pro jednotlivé geny (pro většinu genů je dostupný větší počet probe sets). Tyto probe sets sestávají z 11 až 20 párů tzv. perfect match (PM) a mismatch (MM) oligonukleotidů, přičemž uprostřed MM průby (v pozici 13) je inkorporován chybný nukleotid. Cílem tohoto přístupu je možnost lepší kontroly nespecifické hybridizace a hybridizační signály z těchto průb jsou při klasické analýze obvykle zohledňovány. Izzary a spolupracovníci však ukazují, že matematická korekce probe sets pomocí těchto MM průb pravděpodobně neodpovídá jejímu zamýšlenému biologickému významu a v jejich algoritmu hodnoty MM průb ignorují. Vedle konzistentnějších hodnot tzv. fold change, jejich použití RMA (Robust Multiarray Analysis) vykazovalo oproti Affymetrix i dChip algoritmem více než pěti-násobné snížení variance mezi replikáty. Tento aspekt je důležitý pro plánování experimentů a vzhledem k nižšímu požadavku na počet replikátů má významný ekonomický dopad.

V naší předchozí práci jsme analyzovali telomerázovou aktivitu v prostatických buněčných liniích po působení antiandrogenu bicalutamidu (1). Přes vysokou telomerázovou aktivitou v buňkách LNCaP i DU145 nebyl transkript pro TERT (proteinová podjednotka telomeazý) pomocí mikročipů detegován. Transkripty TERT pravděpodobně podléhají postranskripční úpravě, při které dochází ke ztrátě poly-A konce, který je nutný pro reverzní transkripci. Expresi TERT v obou liniích jsme následně potvrdili pomocí kvantitativní PCR v reálném čase, která pro reverzní transkripci využívá specifické primery. Stabilita mRNA i jejího poly-A konce má při mikročipové analýze zásadní význam a mechanismy její regulace jsou v literatuře diskutovány (24). Z našeho současného projektu upozorňujeme na význam ověření mRNA signálů na jednotlivých mikročipech (Obr. 2). V rámci genů, hodnocených jako statisticky signifikantně rozdílně exprimované, mohou být zahrnuty také geny s velmi heterogenní nebo nízkou expresí a jejich použití pro interpretaci studovaného problému může být zavádějící.

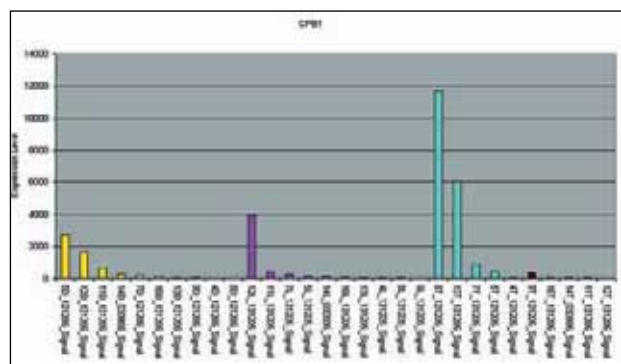
Na zásadní problém analýzy dat upozorňují Michiels a spolupracovníci, kteří znovu analyzovali mikročipová data ze sedmi velkých studií, které sestávaly alespoň ze 60 pacientů a poukázaly na význam analýzy genové exprese pro prognózu nádorového onemocnění (25). Vzhledem k neadekvátní validaci výsledků se publikované závěry ukázaly jako příliš optimistické, kdy pět ze sedmi studií neklasifikovalo pacienty lépe než náhoda. Problém mikročipových analýz představuje také použití rozdílných platform. Van't Veer a spolupracovníci definovali 70 genů, jejichž exprese by mohla diferencovat pacientky s dobrou a špatnou prognózou karcinomu prsu (26). Obdobný profil 76 genů definovali Wang a spolupracovníci (27). Pouze tři geny jsou však oběma profilům společné, což se vysvětluje

použitím odlišných mikročipů a matematických algoritmů pro analýzu dat (28). V této souvislosti Rogojina a spolupracovníci analyzovali stejné vzorky pomocí dvou rozdílných mikročipových platform, Clontech a Affymetrix, a jako nezávislé ověření použili q-RT-PCR a částečně i western blot analýzu (29). Pokud byly vzorky hodnoceny opakovaně pomocí stejných čipů, obě platformy vykazovaly vysokou míru konzistence. Avšak pokud byly výsledky získané pomocí čipů Clontech Atlas Glass 3.8 a Affymetrix U95A/U133A srovnány mezi sebou, ukázala se velmi malá shoda. Výsledky q-RT-PCR lépe korelovaly s Affymetrix (85%) než s Clontech (33%) a také western blot analýza se shodovala spíše s Affymetrix platformou.

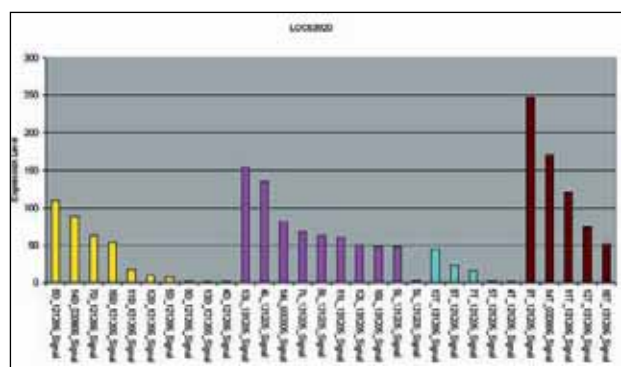
2a) Gen CDH1 vykazuje vysoké a homogenní hodnoty.



2b) Statistické hodnocení diferenciální exprese genu CPB1 je ovlivněno jeho velmi vysokou expresí ve vzorcích 8T a 13T.



2c) Expresí transkriptu LOC63920 je relativně homogenní, ale celkově nízká exprese nadhodnocuje význam tzv. násobné změny.



Obrázek 2.: Význam kontroly dat z jednotlivých čipů pro geny hodnocené jako rozdílně exprimované. Barevně jsou odlišeny čtyři buněčné populace, přičemž jsou komentovány tři geny, které byly statisticky hodnoceny jako rozdílně exprimované mezi dvěma populacemi vpravo.

Použití mikročipů umožňuje analyzovat genovou expresi celého genomu, ale potýká se přitom nejen s již uvedenými problémy. Především poskytuje informaci na úrovni mRNA, která nemusí odpovídat expresi proteinů, které jsou zodpovědné za samotnou biologickou funkci. Nemůže také poskytnout infor-

maci o postranlačních úpravách proteinů, které do značné míry rozhodují o jejich biologické aktivitě. Dalším problémem interpretace výsledků je doposud omezená nebo zcela chybějící informace o biologické funkci řady genů. Přes tyto obtíže je mikročipová analýza ve spojení s dalšími metodami, které verifikují její výsledky, velmi výkonným a nadále slibným přístupem pro studium nejen humánních chorob, ale biologie jako celku.

Metodika optimalizovaná v našich a spolupracujících laboratořích

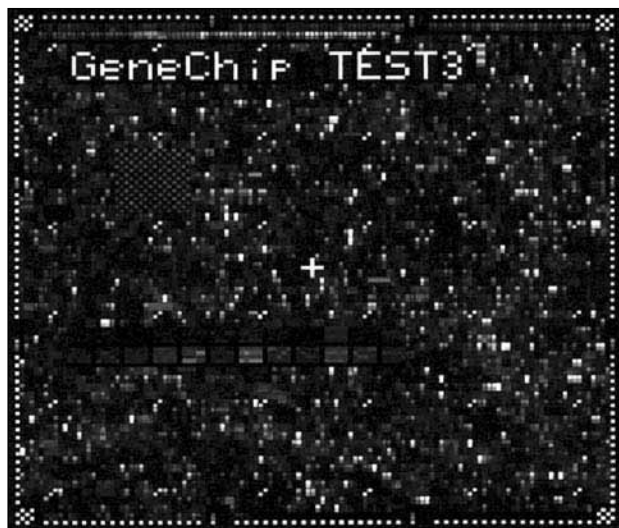
Příprava kryožejů, laserová mikrodisekce a izolace RNA.

Nádorová i normální tkáň byly zhodnoceny erudovaným patologem ihned po operaci, zmrazeny v kapalném dusíku a skladovány při -80°C . Kryožejy 7–8 μm byly připraveny v kryostat (Leica CM1850), jehož pracovní plochy byly očištěny pomocí RNaseZap (Sigma, USA). Řezy byly ihned fixovány v acetonu, obarveny hematoxylinem a dehydratovány v alkoholu a xylenu. Před samotnou mikrodisekcí byly nabarvené řezy krátkodobě skladovány v uzavřených zkumavkách se silicagelem (Sigma). Během celého postupu byly používány nástroje zbavené RNáz a všechny roztoky byly připraveny v DEPC-vodě. Přibližně 1500 buněk studovaných buněčných populací bylo mikrodisekováno pomocí VeritasTM Laser Capture Microdissection System (Arcturus Bioscience, USA; Laboratoř Experimentální Medicíny, Olomouc) podle standardního protokolu. Mikrodisekované buňky na speciálních discích byly ihned lyzovány v pufru RNesy Micro kitu (Qiagen, Německo). Úplná lyze buněk byla provedena inkubací při 42°C po dobu 30 minut a následovala izolace RNA pomocí zmíněného kitu nebo skladování při -80°C . Pro kvantifikaci RNA byl použit spektrofotometr Nanodrop (Nanodrop Technologies, USA; Biofyzikální Ústav AV ČR, Brno).

Amplifikace RNA, značení a hybridizace.

Padesát nanogramů celkové RNA bylo převedeno do cDNA a následně amplifikováno pomocí Microarray Target Amplification Kit (Roche Diagnostics, Svycarsko). Přesněji, pro přepis do cDNA byl použit modifikovaný oligo-dT primer (TAS-T7 Oligo (dT)₂₄). Speciální sekvence TAS (Target Amplification Sequence), která nevykazuje homologii k žádným známým sekvencím a umožňuje následnou amplifikaci pomocí PCR, je inkorporována i při syntéze druhého řetězce cDNA pomocí TAS-(dN)₁₀ primeru (Obr. 1). Po purifikaci cDNA pomocí Microarray Target Purification Kit (Roche) byla provedena PCR s TAS primery opět pomocí Microarray Target Amplification Kit. Aby nedošlo ke zkreslení informace o genové expresi během pozdních fází PCR, byl optimální počet cyklů určen v předběžné PCR a kontrolou produktů z cyklů 21, 24, 27, 30 a 33 pomocí agarozové elektroforézy. PCR produkty z druhé, optimalizované PCR byly přečištěny pomocí Microarray Target Purification Kit a použity pro in vitro transkripci. Pomocí Microarray RNA Target Synthesis Kit T7 (Roche) byly do finální cRNA inkorporovány biotin-14-CTP (Invitrogen, USA) a biotin-16-UTP (Roche). Značená cRNA byla purifikována pomocí Microarray Target Purification Kit, spektrofotometricky kvantifikována a zkontrolována pomocí agarozové elektroforézy. Monitorování celého procesu amplifikace a značení umožnil GeneChip[®] Eukaryotic Poly-A RNA Control Kit (Affymetrix, USA). Jeho definované ředěné exogenní pozitivní kontroly byly přidány do všech vzorků před syntézou cDNA a byly detegovány na cílových čípech Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays (Affymetrix). Před samotnou hybridizací bylo vždy 25 μg biotinylované cRNA fragmentováno a použito pro přípravu hybridizační směsi. Proces fragmentace, který umožňuje efektivní hybridizaci k oligonukleotidovým probám, byl zkontrolován pomocí agarozové elektroforézy. Hybridizační směs standardně obsahuje biotinylované hybridizační kontroly z GeneChipTM Eukaryotic Hybridization Control Kit (Affymetrix). Syntetický oligonukleotid B2 hybridizuje ke specifickým místům na čipu a umožňuje program GCOS (Gene Chip Operating Software, Affymetrix) správně umístit mřížku oddělující jednotlivé signály po naskenování celého čipu (Obr.

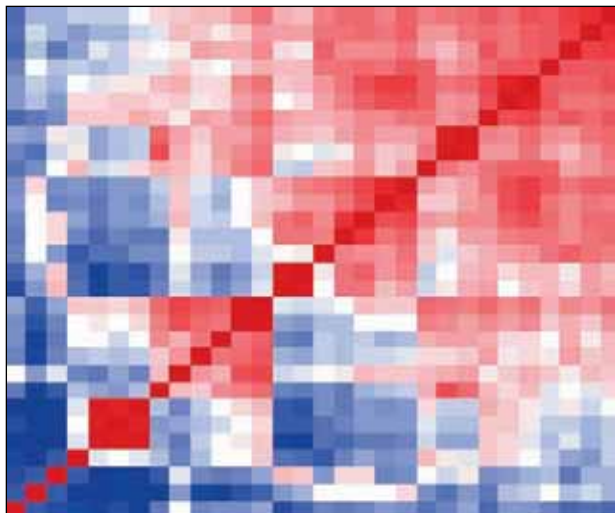
3). Další neeukaryotické hybridizační kontroly (geny syntetické dráhy E. coli pro biotin a gen pro rekombinázu bakteriofága P1) umožňují kontrolu hybridizačního kroku i kvality vlastního čipu. Vzhledem k vysoké ceně čipů Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays byla provedena nejdříve hybridizace, barvení i skenování na čipech Test3 Array za účelem ověření kvality celého procesu přípravy značené cRNA. Hybridizační směs byla přitom připravena již pro oba čipy najednou. Hybridizace probíhala 16 hodin při 45°C a 60 rpm v hybridizační peci. Promývání, barvení streptavidin-phycoerythrinem i skenování byly řízeny programem GCOS v promývacím automatu a skeneru.



Obr. 3. Affymetrix Test3 Array. Hybridizační kontroly vytváří rám a definované rohy čipu a umožňují tak správné počítačové přiložení mřížky, která odděluje signály pro jednotlivé próby.

Analýza dat. Naskenované čipy byly analyzovány pomocí GCOS se základním nastavením, s výjimkou cílového signálu definovaného na hodnotu 100. Relativní expresní hladiny mRNA byly definovány normalizovanými hodnotami signálu. Vzájemná podobnost kompletních expresních profilů všech vzorků byla hodnocena pomocí Pearsonových korelačních koeficientů. Jejich korelační matrix byla graficky zobrazena jako tzv. Heatmap (Obr. 4) pomocí příslušné funkce v programovacím prostředí R (<http://www.r-project.org/>). Podobnost kompletních expresních profilů byla hodnocena také metodou PCA (Principal components analysis) pomocí PLS_Toolbox (Version 3.5, Eigenvector Research, USA) v programu Matlab (Version 7.1, The MathWorks, USA). Rozdílně exprimované geny mezi jednotlivými buněčnými typy byly identifikovány jednak pomocí analyzačního algoritmu v GCOS a také pomocí tzv. Rank Products a RMA (Robust Multiarray analysis) (23, 30). V rámci GCOS analýzy bylo provedeno nejprve srovnání buněčných populací v rámci jednotlivých pacientek a následně byly filtrovány geny s nejvyšším počtem změn v rámci všech

deseti pacientek pomocí programů Microsoft Excel a Access. Rank Products analýza byla provedena pomocí modulu RankProd v programu Bioconductor (<http://www.bioconductor.org/>), přičemž mezní procento falešných pozitivit bylo stanoveno na 10%. Diferenciálně exprimované geny mezi jednotlivými buněčnými populacemi byly dále analyzovány pomocí online databáze DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>). Vzhledem ke komplikovanému systému Gene Ontology, který je stratifikován do tří skupin (biologický proces, molekulární funkce a buněčná lokalizace) a pěti úrovní, jsme profunkční anotaci genů použili tzv. Functional Categories (SP_PIR_Keywords), které umožnily snazší orientaci v získaných výsledcích. Detailnější informace o jednotlivých genech byly získány z dalších volně dostupných databází, především z Gene Cards (www.genecards.org) a NETAFFX Analysis Center (www.affymetrix.com/analysis).



Obrázek 4.: Analýza podobnosti genových profilů. Vzájemná podobnost kompletních expresních profilů třiceti vzorků byla hodnocena pomocí Pearsonových korelačních koeficientů a zobrazena jako tzv. sample correlation heatmap. Na ose x i y jsou jednotlivé vzorky (jejich číslování neuvádíme) a jednotlivé barevné body odpovídají korelačním koeficientům pro srovnání každého vzorku s každým. Čím vyšší korelace, tím je barva více červená a naopak nižší korelace odpovídá odstínům modré barvy. Uhlopříčka reprezentuje absolutní korelaci stejných vzorků.

Poděkování

Srdečně děkujeme všem svým spolupracovníkům za spolupráci při laserové mikrodisekci (Marta Dziechciaruková, Marian Hajdúch), při zpracování mikročipů a analýze dat (Karl Baumforth, Wenbin Wei) a za veškerou další technickou pomoc a odborné diskuze (Jiřina Zatloukalová, Jana Běláková, Irena Koutná, Kateřina Bouchalová, David Friedecký, Jiří Drábek, Jiří Klein). Tato práce byla podpořena granty NR 7844-3 a MSM 6198959216.

Literatura

1. Bouchal J, Baumforth KR, Svachova M, et al. Microarray analysis of bicalutamide action on telomerase activity, p53 pathway and viability of prostate carcinoma cell lines. *J Pharm Pharmacol* 2005;57:83-92.
2. Taylor TB, Nambiar PR, Raja R, et al. Microgenomics: Identification of new expression profiles via small and single-cell sample analyses. *Cytometry A* 2004;59:254-61.
3. Goldsworthy SM, Stockton PS, Trempus CS, et al. Effects of fixation on RNA extraction and amplification from laser capture microdissected tissue. *Mol Carcinog* 1999;25:86-91.
4. Kim JO, Kim HN, Hwang MH, et al. Differential gene expression analysis using paraffin-embedded tissues after laser microdissection. *J Cell Biochem* 2003;90:998-1006.
5. Perlmutter MA, Best CJ, Gillespie JW, et al. Comparison of snap freezing versus ethanol fixation for gene expression profiling of tissue specimens. *J Mol Diagn* 2004;6:371-7.
6. Gillespie JW, Gannot G, Tangrea MA, et al. Molecular profiling of cancer. *Toxicol Pathol* 2004;32 Suppl 1:67-71.
7. Kabbarah O, Pinto K, Mutch DG, Goodfellow PJ. Expression profiling of mouse endometrial cancers microdissected from ethanol-fixed, paraffin-embedded tissues. *Am J Pathol* 2003;162:755-62.
8. Qin Y, Heine VM, Karst H, et al. Gene expression patterns in rat dentate granule cells: comparison between fresh and fixed tissue. *J Neurosci Methods* 2003;131:205-11.
9. Fend F, Emmert-Buck MR, Chuaqui R, et al. Immuno-LCM: laser capture microdissection of immunostained frozen sections for mRNA analysis. *Am J Pathol* 1999;154:61-6.

10. Uneyama C, Shibutani M, Masutomi N, et al. Methacarn fixation for genomic DNA analysis in microdissected, paraffin-embedded tissue specimens. *J Histochem Cytochem* 2002;50:1237-45.
11. Michel C, Desdouets C, Sacre-Salem B, et al. Liver gene expression profiles of rats treated with clofibrate acid: comparison of whole liver and laser capture microdissected liver. *Am J Pathol* 2003;163:2191-9.
12. Ginsberg SD, Che S. Combined histochemical staining, RNA amplification, regional, and single cell cDNA analysis within the hippocampus. *Lab Invest* 2004;84:952-62.
13. Thelen P, Burfeind P, Grzmil M, et al. cDNA microarray analysis with amplified RNA after isolation of intact cellular RNA from neoplastic and non-neoplastic prostate tissue separated by laser microdissections. *Int J Oncol* 2004;24:1085-92.
14. Zabzdyr JL, Lillard SJ. UV- and visible-excited fluorescence of nucleic acids separated by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* 2001;911:269-76.
15. Raff T, van der Giet M, Endemann D, et al. Design and testing of beta-actin primers for RT-PCR that do not co-amplify processed pseudogenes. *Bio-techniques* 1997;23:456-60.
16. Eberwine J, Yeh H, Miyashiro K, et al. Analysis of gene expression in single live neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:3010-4.
17. Jenson SD, Robetorye RS, Bohling SD, et al. Validation of cDNA microarray gene expression data obtained from linearly amplified RNA. *Mol Pathol* 2003;56:307-12.
18. Baugh LR, Hill AA, Brown EL, Hunter CP. Quantitative analysis of mRNA amplification by in vitro transcription. *Nucleic Acids Res* 2001;29:E29.
19. Xiang CC, Chen M, Ma L, et al. A new strategy to amplify degraded RNA from small tissue samples for microarray studies. *Nucleic Acids Res* 2003;31:e53.
20. Aoyagi K, Tatsuta T, Nishigaki M, et al. A faithful method for PCR-mediated global mRNA amplification and its integration into microarray analysis on laser-captured cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;300:915-20.
21. Klur S, Toy K, Williams MP, Certa U. Evaluation of procedures for amplification of small-size samples for hybridization on microarrays. *Genomics* 2004;83:508-17.
22. Ji W, Zhou W, Gregg K, et al. A method for gene expression analysis by oligonucleotide arrays from minute biological materials. *Anal Biochem* 2004;331:329-39.
23. Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, et al. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res* 2003;31:e15.
24. Ross J. mRNA stability in mammalian cells. *Microbiol Rev* 1995;59:425-50.
25. Michiels S, Koscielny S, Hill C. Prediction of cancer outcome with microarrays: a multiple random validation strategy. *Lancet* 2005; 365: 488-92.
26. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002;415:530-6.
27. Wang Y, Klijn JG, Zhang Y, et al. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet* 2005;365:671-9.
28. Weigelt B, Peterse JL, van 't Veer LJ. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer* 2005;5:591-602.
29. Rogojina AT, Orr WE, Song BK, Geisert EE Jr. Comparing the use of Affymetrix to spotted oligonucleotide microarrays using two retinal pigment epithelium cell lines. *Mol Vis* 2003;9:482-96.
30. Breitling R, Armengaud P, Amtmann A, Herzyk P. Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments. *FEBS Lett* 2004; 573: 83-92.

STATISTICKÉ METODY V ANALÝZE DAT Z DNA MIKROČIPŮ

STATISTICAL METHODS FOR ANALYSING GENE EXPRESSION MICROARRAY DATA

PAVLÍK T.^{1,2,*}, JARKOVSKÝ J.¹

¹ INSTITUT BIOSTATISTIKY A ANALÝZ, PŘÍRODOVĚDECKÁ A LÉKAŘSKÁ FAKULTA MASARYKOVY UNIVERZITY BRNO

² KATEDRA APLIKOVANÉ MATEMATIKY, PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA MASARYKOVY UNIVERZITY, BRNO

Souhrn

Mohutný rozvoj molekulárně biologických metod v posledních deseti letech je charakterizován produkcí velkého množství dat. Nejinak je tomu i v případě technologie DNA mikročipů, která umožňuje v jednom experimentu sledovat expresi desítek tisíc genů najednou. Kvantum získaných experimentálních dat je však pro relevantní medicínské závěry nutné vhodně analyzovat a interpretovat.

Tento článek je věnován statistickým metodám, které lze pro hodnocení dat získaných z DNA mikročipů použít. Tyto metody lze rozdělit do tří velkých skupin: shlukovací metody, metody pro identifikaci rozdílně exprimovaných genů a klasifikační metody. Shlukovací metody slouží k nalezení homogenních skupin pacientů s podobným expresním profilem nebo skupin genů s podobným chováním, metody pro identifikaci rozdílně exprimovaných genů hledají geny specifické svojí aktivitou pro určitou biologickou tkáň, zatímco klasifikační metody slouží k nalezení diskriminačního pravidla pro přesnou diagnostiku nových pacientů do jedné z definovaných skupin.

Klíčová slova: DNA mikročipy, statistická analýza, shlukování, testování rozdílné exprese, klasifikační metody

Summary

Last decade led to massive progress in the molecular biology methods which was accompanied by the production of large amount of data. This is also the case of the gene expression microarray technology that makes it feasible to study thousands of genes simultaneously. However, for relevant medical inference there is the need for appropriate evaluation and interpretation of this large quantity of experimental data.

This paper is dedicated to statistical methods that can be used for the evaluation of gene expression data. These methods can be split into three main categories: clustering methods, methods for identification of differentially expressed genes and classification techniques. Clustering methods can be used for finding of homogenous groups of patients or genes with similar expression profile, methods for identification of differentially expressed genes find genes specific for activity of certain biological tissue while classification techniques are used for setting up a discrimination rule for precise diagnostics of newly diagnosed patients to one of the previously defined classes.

Keywords: DNA microarrays, statistical analysis, clustering, testing for differential expression, classification techniques

Úvod

Mohutný rozvoj molekulárně biologických metod v posledních deseti letech je charakterizován produkcí velkého množství dat. Nejinak je tomu i v případě technologie DNA mikročipů [1], která umožňuje v jednom experimentu sledovat expresi desítek tisíc genů najednou, což ji řadí mezi nejpoužívanější biologické metody dneška. Kvantum získaných experimentálních dat je však pro relevantní medicínské závěry nutně vhodně analyzovat a interpretovat [2]. K tomu slouží biostatistické metody a postupy, mnohdy neobvyklé a zcela přizpůsobené charakteru dat z DNA mikročipů. Pomocí těchto metod lze dosáhnout takových cílů jako je například identifikace genů specifických svojí aktivitou pro určitou biologickou tkáň nebo genů s rozdílnou expresí mezi dvěma skupinami biologických vzorků, nalezení homogenních skupin pacientů s podobným expresním profilem nebo skupin genů s podobným chováním či nalezení diskriminačního pravidla pro přesnou diagnostiku nových pacientů do jedné z definovaných skupin. Schematické znázornění základních cílů experimentů s použitím DNA mikročipů a statistické metody k jejich dosažení jsou uvedeny na obrázku 1.

Statistická analýza navazuje na fáze analýzy obrazu a normalizace dat a je tak poslední částí microarray experimentu, její výsledky jsou však na těchto i předchozích biologických fázích experimentu zcela závislé ve smyslu jejich kvalitního provedení a tudíž kvalitních vstupních dat. Proto se statistické principy promítají nejen do fáze analýzy obrazu a normalizace dat, ale i do samotné přípravy experimentu ve formě experimentálního designu.

Problémy

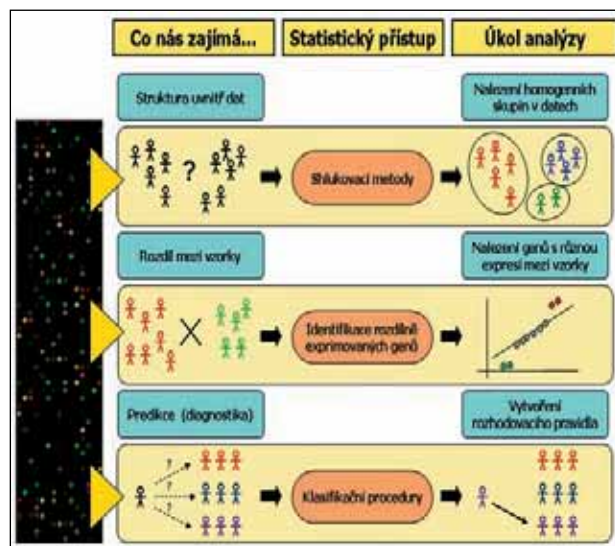
Kvůli podstatě DNA mikročipů se statistická analýza tohoto typu dat potýká s nejrůznějšími obtížemi, které někdy nelze pomocí stávajících metod uspokojivě vyřešit, což následně vede k vývoji nových biostatistických postupů specializovaných pro analýzu expresních dat. Zásadní problémy jsou tyto:

- 1. Velký počet sledovaných proměnných - genů.** Největší výhodou microarray experimentu je zároveň i jeho největší slabina, neboť velmi málo statistických metod se umí vypořádat s desítkami tisíc proměnných najednou.
- 2. Malá velikost experimentálního vzorku – pacientů.** Studie jsou limitovány jak finanční náročností DNA čipů tak omezeným počtem dostupných pacientů. Většina publikovaných prací je postavena pouze na vzorku v řádu desítek pacientů.
- 3. Chybějící hodnoty.** Chybějící hodnoty vznikají na místech podezřelých spotů, které jsou buď manuálně nebo automaticky vyloučeny z další analýzy. Spoty mohou být vyloučeny z více důvodů, např. kvůli prachu a škrábancům na mikročipu, deformovanému obrazu nebo špatnému natřetí. Nejjednodušší doplnění chybějících hodnot je metodou řádkového průměru, kdy je chybějící hodnota nahrazena průměrem ostatních expresních hodnot daného genu. Troyanskaya a kol. [3] navrhuji použít pro dopočetání chybějících hodnot metodu k nejbližším sousedům, kdy je chybějící hodnota daného genu určena jako průměr odpovídajících hodnot u k nejpodobnějších genů. Tento přístup je vhodnější, neboť bere v úvahu funkční vztahy mezi jednotlivými geny.

Statistické metody

Metody používané pro statistickou analýzu dat získaných z DNA mikročipů se dají 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 expe-

rimentu podobné chování, nebo skupin pacientů s podobným expresním profilem. Ke shlukování se používají jak klasické metody (metoda k-průměrů [2], hierarchické metody [4]), tak metody používané zejména v informačních technologiích (self-organizing maps [5]). Do druhé skupiny patří metody, jejichž úkolem je vytvářet podezřelé geny mezi všemi zkoumanými, tedy geny, které by mohly být zodpovědné za různé vlastnosti biologických vzorků. Jedná se zejména o metody násobného testování hypotéz založené na t-statistice a jejich modifikacích. Úkolem klasifikačních metod je na základě výsledku experimentu, tedy získaných intenzit genové exprese, zařadit zkoumaný vzorek do některé z definovaných tříd. Metod používaných k hodnocení dat z DNA mikročipů je velmi mnoho a jsou neustále vylepšovány, ale stejně jako v jiných oblastech matematiky nelze říci, že by nějaká z těchto metod byla nejlepší a její výsledky ty nejsprávnější.



Obrázek 1.: Základní cíle v analýze DNA mikročipů a statistické metody k jejich dosažení.

Shlukovací metody

Shluková analýza je jednou z nejpoužívanějších vícerozměrných statistických metod, a to jak obecně, tak i v případě expresních dat. Jedná se o explorativní techniku, která se používá zejména v případech, kdy nemáme žádné *a priori* znalosti o struktuře uvnitř dat. Úkolem shlukovacích metod je tedy najít v datech skupiny prvků (shluky) tak, že prvky jednotlivých skupin budou v jistém smyslu více podobné než prvky z různých skupin, tzn. nalezené skupiny prvků budou co nejvíce homogenní. V případě DNA mikročipů jsou shlukovány zejména geny a experimentální vzorky (pacienti). Jednoduše řečeno, snažíme se nalézt mezi zkoumanými geny (resp. biologickými vzorky) skupinky genů (resp. biologických vzorků), které vykazují v průběhu experimentu, tedy za působení specifických podmínek, podobné chování.

Mírou podobnosti dvou prvků (ať již genů nebo pacientů) je v tomto případě matematická metrika neboli vzdálenost, k nejhodnějšímu patří euklidovská vzdálenost, která odpovídá námi vnímané vzdálenosti ve trojrozměrném prostoru, a korelační vzdálenost, která odráží závislost expresních hodnot dvou prvků. Volba použité vzdálenosti vždy závisí na okolnostech daného experimentu. Při použití shlukovacích metod je však nutné mít na paměti, že tyto metody jsou určeny k hledání a nalezení shluků v datech, a to i v případě, že se v datech žádná vnitřní struktura nenachází. Z toho plyne, že výsledky shlukovací analýzy nelze brát jako dogma a je nutné je vždy konzultovat s expertem.

Některé metody (např. níže zmíněná metoda *k*-průměrů) považují jako vstupní informaci počet shluků, které má daná procedura vytvořit, proto je nutné počet skupin v datech nějakým způsobem předem odhadnout. Tento odhad můžeme buď získat od klinického experta nebo použitím matematických algoritmů, jako např. procedury *silhouette width* [6].

Příkladem shlukovacích metod vhodných pro expresní data jsou následující procedury:

- **Metoda *k*-průměrů.** Podstatou této jednoduché, a proto oblíbené, procedury je rozdělení prvků do skupin tak, aby byla minimalizována vnitroshluková variabilita a zároveň maximalizována mezishluková variabilita.
- **Hierarchické metody.** Principem hierarchických metod je postupná tvorba shluků, kdy v každém kroku jsou spojeny dva nejpodobnější geny nebo skupiny genů. Tento heuristický přístup zajišťuje minimální vnitroshlukovou variabilitu.
- **Self-organizing maps.** Jedná se o jeden z mnoha algoritmů ze skupiny neuronových sítí. Shluky jsou reprezentovány jako uzly dvourozměrné mřížky, které se iterativně adaptují na data v prostoru. Výhodou tohoto algoritmu je, že sousední uzly v mřížce odpovídají podobným shlukům, výsledné uspořádání tudíž odráží nejen podobnost prvků ve shlucích, ale i podobnost mezi shluky.
- **Metody založené na matematickém modelu.** Tyto metody [7] předpokládají, že expresní hodnoty prvků každého shluku lze popsat matematickou funkcí, která se mezi shluky liší pouze v několika parametrech. Cílem je tedy odhad těchto parametrů pro jednotlivé shluky a následné přiřazení genu ke shluku, do něž patří s největší pravděpodobností.

Metody pro identifikaci rozdílně exprimovaných genů

Častým a velmi důležitým cílem microarray experimentů je identifikace rozdílně exprimovaných genů, tedy genů, jejichž hladina exprese se liší mezi dvěma (nebo více) biologickými vzorky. Můžeme například zkoumat geny odpovědné za funkci různých druhů tkání, geny odpovědné za přeměnu zdravé tkáně v nádorovou nebo geny jednoznačně determinující jednotlivé nádorové tkáně. Znalost rozdílně exprimovaných genů je zajímavá nejen z hlediska přímé interpretace, ale také z hlediska použití této znalosti ke zpřesnění klasifikačních metod. Vzhledem k tomu, že při hodnocení genové exprese pracujeme někdy i s desítkami tisíc genů zároveň, setkáváme se zde s tzv. *problémem násobného testování hypotéz* [8]. Ten spočívá v tom, že s narůstajícím počtem hodnocených genů nám enormně roste také pravděpodobnost toho, že se při našem testování genů zmýlíme a označíme jako významný gen, který ve skutečnosti žádnou informaci o zkoumaných vzorcích neobsahuje. Každá metoda se s tímto problémem vypořádává po svém, ale v žádném případě nelze říci, že by tento problém byl uspokojivě vyřešen. Zde jsou některé příklady metod pro identifikaci významných genů:

- ***T*-test a jeho modifikace.** Principem této skupiny metod [9] je výpočet číselného skóre pro každý gen, které odráží rozdíl v genové expresi mezi sledovanými podmínkami, a následné určení prahové hodnoty, nad níž lze skóre považovat za statisticky významné. Jako skóre se většinou používá klasická *t*-statistika, někteří autoři však odvodili svá vlastní skóre, přičemž ve většině případů se jedná o modifikace *t*-statistiky.
- **Significance Analysis of Microarrays (SAM).** Tato procedura [10] je také založena na skóre odvozeném od *t*-statistiky, ale vzhledem k její popularitě je vhodné ji uvést zvlášť. Její výhodou je, že pro určení prahové hodnoty oddělující významné a nevýznamné geny používá SAM permutace, které umožňují vyhnout se některým předpokladům méně propracovaných metod.
- **Optimal Discovery Procedure.** Storey a kol. [11] odvodili proceduru, která při hodnocení exprese jednotlivých genů bere do úvahy také hodnoty exprese ostatních genů, což zlepšuje její srovnávací schopnost v rámci celé skupiny zkoumaných genů.

- **Analýza rozptylu.** Někteří autoři považují normalizaci expresních hodnot, která předchází statistické analýze, za zbytečnou a používají pro identifikaci významných genů analýzu rozptylu [12], v níž pomocí parametrů modelují vliv různých složek experimentu na expresní hodnoty.

Klasifikační metody

Principem klasifikačních metod v analýze dat z DNA mikročipů je vytvoření rozhodovacího pravidla, které by na základě naměřených hodnot genové exprese umožňovalo přiřazení pacienta do jedné z předem definovaných tříd (například zdravý, nemocný). Z toho je zřejmé, že by se „dobré“ rozhodovací pravidlo založené na expresních datech mohlo zařadit po bok stávajících diagnostických metod a výrazně tak přispět ke zpřesnění diagnostiky závažných onemocnění.

Klasifikační pravidlo je vytvořeno v tzv. trénovací fázi, kdy daná metoda studuje dostupná data (tzv. trénovací data) a učí se přiřazovat pacienty do jednotlivých tříd dle jejich expresního profilu. Trénovací data musí být samozřejmě předem validovaná v tom smyslu, že u každého pacienta musí být jednoznačně určeno, do které třídy patří. Měřítkem kvality klasifikačních metod je tzv. *pravděpodobnost misklasifikace*, což je pravděpodobnost přiřazení pacienta do nesprávné kategorie, kterou lze získat použitím klasifikačního pravidla na tzv. validační data.

Pro klasifikaci se většinou používá pouze část z proměnných (genů) tvořících expresní profil pacienta. Je to dáno tím, že mnoho genů nemá vzhledem ke sledovaným třídám dostatečnou diskriminační schopnost, buď proto, že jsou neaktivní, nebo proto, že se u obou skupin pacientů chovají stejně. Vlastnímu použití klasifikační procedury by tedy měl předcházet výběr k tomuto účelu vhodných genů pomocí metod pro identifikaci rozdílně exprimovaných genů.

Z klasifikačních metod používaných pro hodnocení expresních dat lze vybrat následující příklady:

- **Lineární diskriminační analýza a její modifikace.** Diskriminační metody [13] předpokládají, že data v jednotlivých třídách jsou normálně rozdělená. Úkolem těchto metod je pak odhadnout z trénovacích dat parametry pro sledované skupiny, což následně umožňuje zařadit nového pacienta do třídy dle maximální pravděpodobnosti.
- **Metoda *k* nejbližších sousedů (*k*-NN).** Princip této jednoduché metody je takový, že z trénovacích dat vybereme *k* pacientů, kteří jsou svými expresními profily nejbližší (ve smyslu matematické vzdálenosti) expresnímu profilu nového pacienta, a následně ho přiřadíme do té skupiny, která má mezi těmito *k* pacienty nejpočetnější zastoupení [14].
- **Support Vector Machines (SVM).** Tato poměrně nová klasifikační metoda se snaží najít mezi uvažovanými třídami rovinu, která by je co nejlépe vzájemně oddělovala. SVM [15] jsou proto zejména vhodné pro klasifikaci, kdy uvažujeme pouze dvě rozdílné třídy.
- **Klasifikační stromy.** Jsou založeny na postupném štěpení datového souboru dle jednotlivých proměnných (genů) [16]. Proměnné, podle nichž se soubor štěpí, jsou vybrány tak, aby měly co nejlepší schopnost oddělit uvažované třídy.

Závěr

V tomto článku jsme se zaměřili na statistické metody a postupy použitelné pro hodnocení výsledků DNA microarray experimentů. Je patrné, že spektrum metod vhodných k dosažení odpovědi na otázky v oblasti výzkumu genové exprese je velmi široké. Otázky, a tedy i statistické metody, lze rozdělit do tří hlavních kategorií. Na první skupinu nejzákladnějších otázek týkajících se vnitřní struktury dat nám dávají odpověď shlukovací procedury, jejichž úkolem je nalezení co nejpodobnějších skupin prvků, ať už genů nebo pacientů. Druhou sadu otázek zabývajících se rozdílnou aktivitou genů ve sledovaných biologických vzorcích nám mohou pomoci rozluštit metody pro identifikaci rozdílně exprimovaných genů založe-

né na statistickém testování hypotéz, kdy pro každý gen testujeme rozdíl mezi dvěma (či více) skupinami naměřených expresních hodnot. Třetí skupina statistických procedur, klasifikační metody, řeší problém predikce spjatý s diagnostikou nových pacientů na základě jejich profilu genové exprese. I když se na vývoji statistických metod pro analýzu dat z DNA mikročipů pracuje již přibližně 7 let, v žádném případě nelze říci, že by šlo o ukončený proces. Zejména obrovský počet zkoumaných genů a vůči němu poměrně malý počet dostupných pacientů či biologických vzorků předsta-

vují největší překážky pro biostatistiky na celém světě. Nicméně, DNA mikročipy jsou natolik perspektivní technologií, že se vložené úsilí nepochybně v budoucnu odrazí jak ve vývoji kvalitních matematických metod analýzy, tak následně v prohloubení znalostí o fungování buněčných pochodů i ve zlepšení diagnostiky a léčby těch nejzávažnějších onemocnění.

Poděkování:

Tato práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR NR/9076 - 4.

Literatura

1. Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W. and Brown, P.O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with complementary DNA microarray. *Science*, Vol. 270: 467-470.
2. Speed, T. (2003). Statistical analysis of gene expression microarray data. Chapman & Hall/CRC.
3. Troyanskaya, O., Cantor, M., Sherlock, G. et al. (2001). Missing value estimation methods for DNA microarrays. *Bioinformatics* Vol. 17 No. 6 pp. 520-525.
4. Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O. and Botstein, D. (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 95: 14863-14868.
5. Tamayo, P., Slonim, D., Mesirov, J. et al. (1999). Interpreting patterns of gene expression with self-organizing maps: Methods and application to hematopoietic differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 96: 2907-2912.
6. Fridlyand, Y.M. (2001). Resampling methods for variable selection and classification: applications to genomics. PhD thesis, University of California at Berkeley, Department of Statistics.
7. De Smet, F., Mathys, J., Marchal, K. et al. (2002). Adaptive quality-based clustering of gene expression profiles. *Bioinformatics* Vol.18 No. 5 pp.735-746.
8. Ge, Y., Dudoit, S. and Speed, T.P. (2003). Resampling-based multiple testing for microarray data analysis. Technical report, University of California at Berkeley, Department of Statistics.

9. Reiner, A., Yekutieli, D. and Benjamini, Y. (2003). Identifying differentially expressed genes using false discovery rate controlling procedures. *Bioinformatics* Vol. 19 No. 3: 368-375.
10. Tusher, V.G., Tibshirani, R. and Chu, G. (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 98: 5116-5121.
11. Storey, J.D., Dai, J.Y. and Leek, J.T. (2005). The Optimal Discovery Procedure for large-scale significance testing, with applications to comparative microarray experiments. UW Biostatistics Working Paper Series, University of Washington.
12. Kerr, M.K. and Churchill, G.A. (2000). Statistical design and the analysis of gene expression microarray data. Technical report, The Jackson Laboratory.
13. Dudoit, S., Fridlyand, J. and Speed, T.P. (2002). Comparison of discrimination methods for the classification of tumors using gene expression data. *Journal of the American Statistical Association* Vol.97 No 457: 77-87.
14. Wit, E. and McClure, J. (2004). *Statistics for microarrays*. Wiley, Chichester, GB.
15. Vapnik, V. (1998). *Statistical Learning Theory*. Wiley, Chichester, GB.
16. Lee, J.W., Lee, J.B., Park, M. and Song, S.H. (2005). An extensive comparison of recent classification tools applied to microarray data. *Computational Statistics & Data Analysis*, 48: 869 - 885.

METODY DETEKCE ALTEROVANÝCH OBLASTÍ DNA Z DAT CGH ARRAYS STATISTICAL APPROACHES FOR IDENTIFICATION OF AREAS OF DNA ALTERATION ANALYZED BY CGH ARRAYS

BUDINSKÁ E., JARKOVSKÝ J.

INSTITUT BIOSTATISTIKY A ANALÝZ, PŘF A LF, MU BRNO.

Souhrn

CGH arrays se v dnešní době staly významnou technikou v analýze genomu. Využívají se pro detekci změn v počtu kopií genů nebo chromozomů, popřípadě jiných chromosomových přestaveb. Základní metodou je porovnávání DNA vzorku a zdravé kontroly pomocí komparativní genomové hybridizace (CGH). Analýza genetické nestability u nádoru a s ní spojené hledání nádorových markerů se dá využít jak v diagnostice nádorů (klasifikace nádorů do již existujících skupin, hledání nových podskupin), tak i v predikci jejich odpovědi na léčbu. Výhodou technologie CGH arrays je možnost analýzy celého genomu v jediném experimentu. To ovšem znamená, že metoda produkuje velké množství dat, které musí být správně matematicky vyhodnoceny a základním cílem článku je tak představení těchto matematických metod a jejich softwarové implementace.

Klíčová slova: CGH arrays, statistická analýza, body zlomu, analýza segmentů

Summary

Nowadays, array CGH experiments became a powerful technique for analysing changes in DNA by comparing control DNA and DNA of interest. This is widely used for example in genome cancer studies. Analysis of the tumour genome instabilities and the search for tumour markers can be used for the tumour diagnostics (tumour classification, detection of the new clinical groups of tumours) or for the prediction of the response to therapy. The method produce huge amount of data and special statistic techniques for detecting of genomic changes are necessary. The purpose of this paper is to provide brief summary of existing statistical methods used in CGH array analysis and their software implementation.

Keywords: array CGH, statistical analysis, breakpoints, segment analysis

I. Úvod

Analýza microarrays je relativně nová a v dnešní době populární technologie analýzy genomu a jeho exprese. Jde o metodu schopnou analyzovat tisíce genů v jediném experimentu s širokým uplatněním v onkologii. Využívá se jí pro porovnání genomu nádorových buněk s genomem buněk zdravých téhož typu tkáně, což umožňuje vyhledávat nádorové markery a ty dále využít například pro klasifikaci nádorů do již existujících skupin, identifikovat nové podskupiny, určit odpověď nemocného na terapii [1], nebo rozlišit primární nádory od metastáz [2]. Microarray technologie může být využita ve všech třech typech analýzy genomu. Tzv. **CGH arrays** se využívají pro detekci alterovaných úseků v DNA, **expresní microarrays** se zabývají analýzou míry vyjádření (exprese) genu (ta je ekvivalentní množství RNA), a nakonec **proteinové microarrays** studují strukturu již vytvořených proteinů. CGH arrays jsou metoda, kterou lze detekovat alterované úseky v DNA, tedy delece nebo amplifikace. Protože některé CGH čipy pokrývají celý genom, jsou tyto microarrays schopny podat relativně detailní obraz o změnách podél všech chromozomů.

Základním principem CGH microarray technologie je hybridizace nukleových kyselin se sondami umístěnými na podložním skle (tzv. spoty). Zjednodušeně se na každém spotu nachází jeden klon. Zdrojem informace je DNA z jedné nebo dvou tkání (případně buněčných linií). Hybridizované DNA jsou přitom obarveny různými fluorescenčními barvami (nejčastěji červená – tkáň, kterou zkoumáme, zelená – kontrola), po jejichž excitaci laserem o příslušné vlnové délce je získána intenzita světla. Tato intenzita je úměrná množství DNA přichycené k sondě a tedy přenesené i počtu kopií genu ve zdrojové tkáni. Takto získaný obraz čipu je dále analyzován pomocí programů pro analýzu obrazu a jednotlivé intenzity fluorescence (ekvivalentní množství DNA přichycené na odpovídajících sondách) jsou převedeny do číselné podoby, která podstupuje další matematické a statistické zpracování vedoucí k závěrům a interpretacím.

Podobně jako u expresních microarrays se i u CGH arrays využívá nejčastěji takzvaný „referenční“ design, který je založen na porovnávání fluorescenčních intenzit testované (nádorové) DNA a referenční (kontrolní, zdravé) DNA. Jedná se vlastně o komparativní geonomovou hybridizaci (CGH) na microarrays čipech.

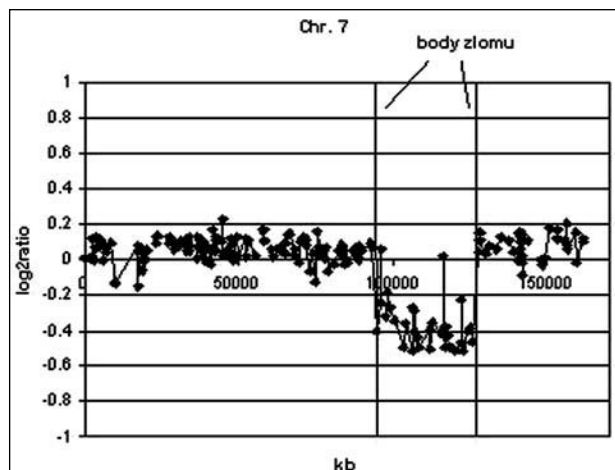
Pro následnou statistickou analýzu jsou v případě tohoto designu zajímavé poměry fluorescenční intenzity nádorové a referenční DNA pro každý klon na microarray sklíčku. Tyto poměry se nazývají „CGH ratio“, a obvykle se logaritmuji logaritmem o bázi dva ($\log_2$ ratio):

$$CGH\ ratio = \log_2 \frac{\text{intenzita nádorové DNA}}{\text{intenzita kontrolní DNA}}$$

Takhle upravený podíl se spíše řídí přibližně normálním rozložením (vzhledem k schopnosti logaritmické transformace měnit asymetrické rozložení na více či méně symetrické) [3], což je výhodné pro řadu statistických technik. Tyto podíly jsou obvykle vyjadřovány až po úpravě dat (která zahrnuje například odstranění nežádoucích spotů z analýzy) nebo případně normalizaci (pomáhá odstraňovat případné systematické i náhodné chyby), což je fáze společná jak pro analýzu expresních tak pro analýzu CGH arrays. Následujícím krokem v analýze dat CGH arrays je potom průměrování hodnot CGH ratios všech klonů oproti jejich pozici na genomu (Obr. 1). Těmhle krok poskytuje prvotní informaci o potenciálních změnách a uplatňuje se zde další výhoda logaritmování podílů. Jestliže uvažujeme ve zdravé buňce dvě kopie každého genu

(od otce a od matky), potom v případě že v nádorové buňce nedošlo u daného genu k žádné změně, dostáváme poměr 2/2, což znamená že CGH ratio se rovná nule ($\log_2 2/2 = 0$). CGH ratio menší než -1 indikuje deleci nejméně jedné kopie genu ($\log_2 1/2 = -1$) a větší než 0.58 ($\log_2 3/2 = 0.58$) naopak amplifikaci klonu v testovacím vzorku. Zjednodušeně řečeno, všechny záporné hodnoty znamenají potenciální delece a všechny kladné hodnoty potenciální amplifikace.

Na základě výše uvedených hodnot by bylo možno stanovit dvě dělicí hranice a ty využít pro detekci změn; co se týče delece, označili by jsme tak všechny klony s CGH ratio menší než -1 a za amplifikace by jsme pak považovali všechny klony s CGH ratio větší než 0.58. Z praktického hlediska bohužel není možné tento způsob analýzy použít a to z důvodu existence technické i biologické variability. Vzorek nádoru použitý pro analýzu obvykle nikdy neobsahuje sto procent nádorových buněk a nacházejí se v něm i buňky zdravé, čímž se jednotlivé hodnoty CGH ratio pro delece i amplifikace posouvají směrem k nule. Často je těžké pouhým okem rozlišit tento „šum“, který představuje falešnou odchylku od skutečných změn. Pro řešení tohoto problému byly vyvinuty speciální statistické metody, které jsou schopny s jistotou pravděpodobností tyto dva stavy odlišit. Zdrojem „šumu“ (což je směs náhodných vlivů, které ovlivňují skutečné hodnoty zkoumané proměnné a nelze je od ní uspokojivě oddělit) se kromě přítomnosti zdravých buněk ve vyšetřovaném vzorku mohou potenciálně stát také všechny části zpracovávání microarray sklíčka. Naměřené hodnoty tak můžou být ovlivněny například různými inkorporačními a excitačními vlastnostmi jednotlivých fluorescenčních barviv nebo přirozená fluorescence pozadí apod.



Obrázek 1: Graf reprezentující CGH ratio klonů proti jejich pozici na genomu v kb. Vertikální přímky označují body zlomu ohraničující detekovaný region lidského chromozomu 7.

Je známo, že u nádorů jsou obvykle změnami zasaženy větší regiony DNA [4.], tedy lze očekávat, že tyto změny jsou na grafu pozorovatelné v podobě segmentů amplifikací/delece. Oblasti, které tyto segmenty oddělují se nazývají „body zlomu“, protože se v nich graf „láme“ buď do záporných nebo do kladných hodnot (Obr. 1). Většina statistických metod používaných pro analýzu CGH arrays se snaží detekovat tyto body zlomu a vymezit tím zmíněné úseky co nejpřesněji. Při hledání segmentů se vychází z předpokladu, že geny jsou na genomu uspořádány v určitém pevném pořadí a v případě, že jsou deletovány například geny s pořadím 1, 2 a 4, je s největší pravděpodobností deletován i gen mezi nimi s pořadovým číslem 3. Tyto předpoklady pomáhají redukovat šum a zvýšit statistickou průkaznost detekovaných změn. Statistické metody

pro hledání alterovaných úseků DNA u CGH arrays se liší od metod pro hledání odlišně exprimovaných genů u expresních microarrays právě těmito předpoklady.

Hledání alterovaných větších úseků je pouze jedním z úkolů analýzy CGH arrays. Dalšími je například detekce bodových mutací, změn o velikosti jednoho nebo několika málo genů a určení počtu amplifikovaných nebo deletovaných kopií genů, neboli míry změny.

II. Metody pro statistickou analýzu CGH arrays

II.1. Metodika

V současnosti existuje řada statistických metod vyvinutých za účelem hledání alterovaných úseků DNA. Jak již bylo zmíněno, většina z nich využívá informaci o pořadí genů na genomu a faktu, že sousední geny mají většinou obdobné CGH ratio (tedy patří do stejné alterované nebo nezměněné oblasti).

Kromě nich ovšem existují i metody, které tyto předpoklady nevyužívají, jako jsou například metody používající dvě pevné dělicí hranice, jednu pro deletované a druhou pro amplifikované regiony, lišící se ve způsobu stanovení těchto hranic. Z nich lze zmínit metodu [5], která navrhuje stanovení hranic na základě rozložení CGH ratio z CGH array experimentů kontrola vůči kontrole, nebo metodu [6] využívající regresní analýzu pořadí CGH ratios. Tyto metody mají obecně nevýhodu, že neberou do úvahy výše uvedené předpoklady a jsou tak mnohem náchylnější k falešně pozitivním nebo falešně negativním výsledkům. Může se například stát, že gen s pořadím číslo 3 se nachází ve velkém alterovaném regionu DNA (dejme tomu o 20 genech), ale díky šumu jeho CGH ratio nemá dostatečně vysokou hodnotu pro přesáhnutí dělicí hranice a je tak označen jako nealterovaný, i když ve skutečnosti alterovaný je. Kromě toho použití kontrolních CGH arrays experimentů pro stanovení dělicí hranice může být zavádějící, protože takovéto hranice neberou do úvahy případné odchylky u reálných experimentů a výsledky tak nemusí úplně odpovídat realitě.

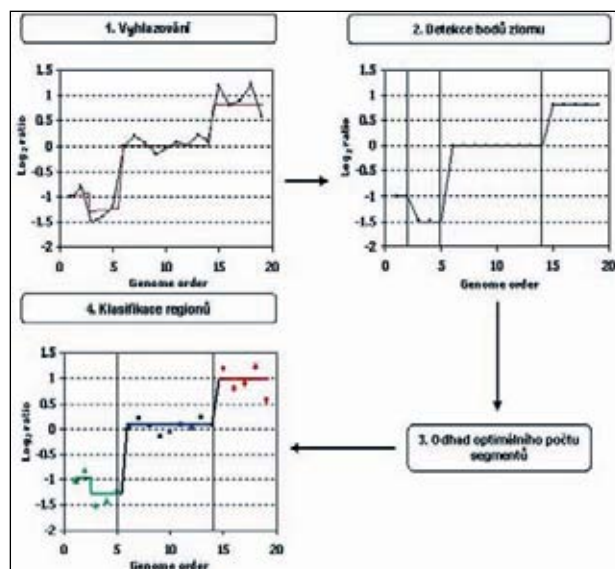
Ostatní metody se snaží CGH data matematicky modelovat a na základě optimalizace různých kritérií pomocí nejrozličnějších algoritmů najít nejlepší rozdělení dat do segmentů. Obvykle využívají jeden nebo více z následujících kroků (Obr. 2):

1. vyhlazení dat (používáno pro odstranění šumu)
 2. detekce bodů zlomu (detekce změněných úseků)
 3. odhad optimálního počtu změněných úseků
 4. klasifikace regionů (zařazení detekovaných regionů do tří skupin – deletované, nezměněné, amplifikované)
- a liší se pouze statistickými metodami, které pro tyto kroky používají.

První krok, takzvané **vyhlazování dat**, má za účel redukovat v datech šum způsobený technickou nebo nežádoucí biologickou variabilitou (Obr. 2. - 2). Pro vyhlazování se používají různé metody založené nejčastěji na virtuálním pohyblivém okně o určité velikosti, které se posouvá po hodnotách zleva doprava. V tomto okně, například o velikosti 5 genů, se spočítá jeho statistická sumarizace, například medián (mediánové vyhlazování), kterou se pak nahradí například prostřední hodnota v okně. Jednotlivé metody se liší velikostí okna, hodnotou, která je nahrazována a druhem počítané statistické sumarizace.

Ne všechny vyhlazovací metody jsou založeny na pohyblivém okně. Za všechny zmíníme metodu tzv. „kvantilové regrese“ [7], která byla speciálně navržena pro analýzu CGH arrays. Její výhodou je, že na rozdíl od ostatních technik netvoří při vyhlazování dat obloukovité a málo výrazné přechody mezi odlišnými segmenty. Problémem vyhlazování je, že kromě odstranění šumu dochází někdy i ke ztrátě skutečné informace. V případě dat z CGH arrays tak můžeme „vyhladit“ například bodové změny, nebo změny o několika málo genech a proto ne všechny metody tento krok využívají.

Dalším krokem analýzy je **detekce bodů zlomu**, která je vlastně ekvivalentní úloze najít změněné úseky (segmenty), proto se tato část analýzy nazývá také segmentací. Pro řešení úlohy je využívána řada odlišných metod. Jednu podskupinu tvoří segmentační metody, které předpokládají, že data pocházejí z rozložení, jež je směsí tří normálních rozložení (pro delece, pro geny beze změny, pro amplifikace), které se liší pouze střední hodnotou (např. -1, 0, 0.58).



Obrázek 2.: Schéma metodiky vyhledávání alterovaných segmentů.

Tyto metody se pak snaží správně odhadnout právě parametry tohoto rozložení (průměr, směrodatná odchylka) a tím určit správnou segmentaci. Metody se liší v optimalizačním kritériu (míra kontroly správnosti modelu) a algoritmem, kterým tuto optimalizaci provádějí. Z optimalizačních kritérií zmíníme věrohodnostní (likelihood) kritérium [8, 9, 10, 16], kritérium nejmenších čtverců [11], parciální sumy [12], edge detection filter [13]. Jako optimalizační algoritmy používají genetické algoritmy [8], dynamické programování [10, 11], cirkulární binární segmentaci [12], adaptive weights smoothing [9] nebo EM algoritmus [13, 16]. Další metody využívají skryté Markovovy řetězce [14] nebo modifikovanou metodu hierarchického shlukování - CLAC [15].

Kroky tři a čtyři, odhad optimálního počtu segmentů a klasifikace regionů, představují nezbytné zakončení analýzy, protože v kroku druhém nacházíme pouze nejlepší rozdělení dat do určitého počtu segmentů. V těchto segmentech však mohou být buď některé zbytečně navíc (falešně pozitivní), a je třeba je sjednotit, nebo, jako v případě metody CLAC, musíme zpětně určit počet segmentů, které jsou ze všech možností vybrány (pokud to není již součástí kroku 2). Pro nalezení optimálního počtu segmentů je používáno shlukování, jako například metoda k průměrů [11], nebo nejčastěji různá penalizační kritéria [10, 13, 15]. Je třeba zdůraznit, že některé metody tyto kroky nepotřebují, a kroky 2-4 se tak mohou prolínat.

Vysvětlování principu jednotlivých metod by přesáhlo rozsah tohoto článku, proto zájemce o podrobnější informace odkazujeme na literaturu.

II.2. Existující software pro analýzu dat CGH arrays

Softwarové implementace metod pro analýzu dat CGH arrays jsou obvykle dobře dostupné a volně stažitelné, pro některé metody existuje i více implementací. Kromě samostatných programů nebo webových aplikací se metody ve většině případů vyskytují v podobě funkcí známých matematických programů, jako jsou R [16] nebo Matlab [17] a pro analýzu je tak nut-

ná znalost práce v těchto programech. Níže jsou shrnuty příklady implementací:

- **R - balíky:**
 - GLAD [9]
 - cgh_smooth_nakao [7]
 - CLAC [14]
 - snapCGH [23]
- **Matlab:**
 - GLAD [9]
 - M-CGH [18]
 - CGH plotter [11]
 - CGH_segmentation [10]
 - ChARM [13]
- **Excel:**
 - CGH miner for Excel [14]
- **Samostatné programy nebo webové aplikace**
 - ArrayCyGht – webová aplikace pro analýzu a vizualizaci dat CGH arrays [19]
 - CGH Explorer – komplexní java nástroj [20]
 - VAMP – komplexní webová aplikace zahrnující vizualizaci, analýzu i porovnávání a analýzu profilů více pacientů najednou [21]
 - aCGHSmooth [22]

II. 3. Výhody a nevýhody jednotlivých metod

Každá z výše uvedených metod má v porovnání s ostatními své výhody a nevýhody. Pro některé je nezbytné znát a mít k dispozici speciální matematický software (R, Matlab), některé implementace zase vyžadují specifický typ formátu dat. To může být problémem, pokud máme data z jiných zdrojů a nejsme schopni je do daného programu načíst (např. M-CGH vyžaduje Gene-pix nebo Quant array formát). Některé z metod nejsou „komplexní“, a to ve smyslu chybějící analýzy segmentů (po vyhlazování využívají pouze dělicí hranici, kterou určuje sám uživatel – např. [7]). Na druhé straně, komplexní metody mohou vyžadovat nastavení množství parametrů, což vyžaduje dobrou znalost problematiky a metody samotné (např. GLAD, MCGH). Metoda CLAC je komplexní metoda, která se relativně jednoduše používá, avšak vyžaduje několik normal-normal arrays, což u některých experimentů nemusí být z finančních důvodů možné. Některé implementace poskytují předzpracování dat zahrnující kontrolu kvality a normalizaci, spolu s grafickými vizualizacemi a případnými dalšími analýzami. V současnosti je z tohoto pohledu nejkompaktnějším webovým nástrojem nástroj VAMP [21], využívající metodu GLAD, který poskytuje kromě komplexní metody analýzy změněných regionů i všechny ostatní stupně analýzy dat, včetně normalizace a následné analýzy dat více pacientů. Snad zatím jediným nástrojem, který spojuje více různých metod pro analýzu a umožňuje srovnání jejich výsledků je balík snapCGH [23], implementovaný v programu R. Tabulka č. 1 sumarizuje výhody a nevýhody vybraných metod a jejich implementací tak jak je vidí autoři. Matematické porovnání většiny metod najdeme také v referenci č. 24.

III. Závěr

CGH arrays se v dnešní době staly významnou technikou pro analýzu genomu a v jednom experimentu umožňují analýzu tisíců genů. Protože poruchy na úrovni genomu obvykle zasahují širší chromozomální regiony (což je informace kterou u expresních microarrays tolik nevyužijeme), je užitečné při jejich hledání tuto informaci použít a význam-

ně tak redukovat šum v datech. V článku jsou představeny pouze některé, z našeho pohledu nejlepší dostupné metody analýzy CGH arrays, a to prostřednictvím svých základních principů.

Tabulka 1: Porovnání implementací vybraných metod pro analýzu dat CGH arrays. „Komplexnost algoritmu“ znamená, že v programu je použita matematická metoda pro vyhledávání změněných segmentů (tedy ne pouze stanovení dělicí hranice).

Program	Implementace	Předzpracování dat	Grafy	Je algoritmus komplexní	Hlavní nevýhody	Hlavní výhody
MCGH	Matlab	ANO	ANO	ANO	Speciální vstupní formát dat (GenePix and QuantArray)	Komplexnost
CGH plotter	Matlab	NE	ANO	ANO	-	Lze použít i pro expresní microarrays
arrayCyGht	web	ANO	ANO	NE	Nekomplexní	Jednoduchý, propojení s databázemi
GLAD	R, Matlab	NE	ANO	ANO	Není „user friendly“	Komplexnost
VAMP	web	ANO	ANO	ANO	-	Komplexní zpracování CGH arrays dat, analýza více pacientů
cgh_smooth_nakao	R	NE	ANO	NE	nekomplexní, není „user friendly“	-
CGH-miner	R, Excel	NE	ANO	ANO	Vyžaduje normal – normal arrays	Implementace v Excelu

Tyto metody, na rozdíl od metod pro expresní arrays, nejsou doposud natolik unifikovány. Každá z nich má své výhody i nevýhody, mnohdy se musí uživatel rozhodovat mezi kvalitou výsledku a jednoduchostí používání. Metody se obvykle volí podle preferencí uživatele, v praxi se však doporučuje zanalyzovat data vždy více způsoby a výsledky pak porovnat. V každém případě je nutná alespoň základní znalost matematického pozadí metody využitě pro analýzu. Vzhledem k faktu, že mnohé metody pro analýzu používají pouze informaci o pořadí jednotlivých klonů na genomu a ne jejich skutečnou polohu, je důležité nalezené regiony podrobit následné kontrolní analýze uživatelem s ohledem na skutečnou pozici. Zjištěné aberace je dále vhodné ověřit pomocí jiných přesnějších molekulárně biologických technik (např. PCR). Jako zatím nejkompaktnější nástroj pro analýzu CGH arrays se jeví být webová aplikace VAMP, která ale bohužel implementuje pouze jednu z metod a neumožňuje tak porovnání. Z tohoto hlediska jsme zatím zjistili pouze jedinou aplikaci, která poskytuje porovnání tří metod najednou a to balík snapCGH, implementovaný v programu R. V této oblasti doposud chybí nástroj, který by propojoval metody všech částí analýzy CGH arrays a poskytoval širší porovnání výsledků. Z tohoto důvodu zůstáváme při jejich používání doposud odkázáni na znalost práce s různými software a detailní znalost matematického pozadí využívaných metod. Zároveň jde o oblast s dosud neukončeným matematickým vývojem, kde je možno očekávat rozvoj jak dosavadních, tak vývoj zcela nových metod analýzy dat.

Poděkování

Tato práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR NR/9076 – 4.

Literatura:

- Natrajan R, Williams RD, Hing SN et al. (2006). Array CGH profiling of favourable histology Wilms tumours reveals novel gains and losses associated with relapse. *J Pathol*, DOI: 10.1002/path.2021.
- Wa CV, DeVries S, Chen YY et al. (2005). Clinical application of array-based comparative genomic hybridization to define the relationship between multiple synchronous tumors. *Modern Pathology* 18:591-597.
- Zar H. Jerrold (1999). *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, Upper Saddle River NJ, USA, 4. ed.: 275.
- Loeb LA, Christians FC (1996). Multiple mutations in human cancers. *Mutat Res*;350:279-86.
- Pollack, J., Sorlie, T., Perou, C. et al. (2002). Microarray analysis reveals a major direct role of DNA copy number alteration in the transcriptional program of human breast tumours. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 99, 12963–12968.
- Cheng, C., Kimmel, R., Neiman, P. and Zhao, L. P. (2003). Array rank order detection of gene copy-number changes in human cancer. *Genomics* 82, 122–129.
- Eilers, P. H. C. and de Menezes, R. X. (2005): Quantile smoothing of array CGH data. *Bioinformatics*, 21: 1146–1153.
- Jong, K., Marchiori, E., van der Vaart, A., Ylstra, B., Meijer, G. And Weiss, M. (2003) Chromosomal breakpoint detection in human cancer. In *LNCS*, vol. 2611, Springer.
- Hupé, P., Stransky, N., Thierry, J.-P. et al. (2004). Analysis of array CGH data: from signal ratio to gain and loss of DNA regions. *Bioinformatics* 20, 3413–3422.
- Picard, F., Robin, S., Lavielle, M. et al. (2005). A statistical approach for CGH microarray data analysis. *BMC Bioinformatics*; 6:27.
- Autio, R., Hautaniemi, S., Kauraniemi, P. et al. (2003). Cgh-plotter, Matlab toolbox for CGH data analysis. *Bioinformatics* 19, 1714–1715.
- Olshen, A. B., Venkatraman, E. S., Lucito, R. and Wigler, M. (2004) Circular binary segmentation for the analysis of array-based DNA copy number data. *Biostatistics*, 5, 557–572.
- Myers, C.L., Dunham, M.J., Kung, S.Y., Troyanskaya, O.G. (2004) Accurate detection of aneuploidies in array CGH and gene expression microarray data. *Bioinformatics* 20(18):3533-3543.
- Fridlyand, J., Snijders, A.M., Pinkel, D., Albertson et al. (2004). Hidden Markov models approach to the analysis of array CGH data. *J. Multivariate Anal.* 90, 132–153.
- Wang P, Kim Y, Pollack J et al. (2005). A method for calling gains and losses in array CGH data. *Biostatistics* 6(1):45-58.
- R Development Core Team (2006). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Mathworks (2006). *MATLAB: The Language of Technical Computing*, Massachusetts: The MathWorks, Inc.
- Wang, J., Meza-Zepeda, L.A., Kresse, S.H., Myklebost, O. (2004). MCGH: analysing microarray based CGH experiments. *BMC Bioinformatics* 5, 74.
- Kim, S.Y., Nam, S.W., Lee, S.H. et al. (2005). ArrayCyGHt: a web application for analysis and visualization of array-CGH data. *Bioinformatics* 21(10): 2554-5.
- Lingjarde, O.Ch., Baumbusch, L.O., Liestol, K. et al. (2005). CGH-Explorer: a program for analysis of array-CGH data. *Bioinformatics* 21(6):821-822.
- La Rosa P, Viara E, Hupe P, Pierron G (2006). VAMP: visualization and analysis of array-CGH, transcriptome and other molecular profiles. *Bioinformatics*. July 4.
- Jong, K., Marchiori, E., Meijer, G. et al. (2004). Breakpoint identification and smoothing of array comparative genomic hybridization data. *Bioinformatics* 1, 1–2.
- Smith, ML. (2006). Sample of aCGH analysis. www.bioconductor.org/packages/1.8/bioc/vignettes/snapCGH/inst/doc/snapCGHguide.pdf.
- W.R. Lai, M.D. Johnson, R. Kucheralapati, and Peter J. Park (2005). Comparative analysis of algorithms for identifying amplifications and deletions in array CGH data, *Bioinformatics* 21(19):3763-3770.

MOLEKULÁRNÍ TAXONOMIE A PREDIKTIVNÍ SYSTÉMY KARCINOMU PRSU DEFINOVANÉ NA ZÁKLADĚ PROFILŮ GENOVÉ EXPRESE

BREAST CANCER MOLECULAR TAXONOMY AND PREDICTIVE SYSTEMS BASED ON GENE EXPRESSION PROFILING

SVOBODA M.^{1,2}, GRELL P.^{1,2}, FABIÁN P.¹, PALÁCOVÁ M.¹, PETRÁKOVÁ, K.¹, NENUTIL R.¹,
HAJDÚCH M.³, VYZULA R.^{1,2}

¹ MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV BRNO

² LÉKAŘSKÁ FAKULTA MASARYKOVY UNIVERZITY BRNO

³ LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ MEDICÍNY PŘI DĚTSKÉ KLINICE LF UP A FN OLOMOUC

Souhrn

Karcinomy prsu jsou nejčastějším maligním onemocněním u žen. Jejich vysoká incidence a mortalita způsobují, že se jedná nejenom o medicínský, ale i o závažný společenský problém. I přes značný pokrok, který za posledních 25 let nastal v diagnostice a v léčbě karcinomu prsu, dochází pouze k pozvolnému poklesu mortality. Pacientky sdílející stejná diagnostická a prognostická kritéria stále vykazují značné rozdíly ve vývoji onemocnění, a to i přes jednotnou protinádorovou léčbu. Příčina těchto diskrepancí může být ve stávající histopatologické klasifikaci a v prognostických systémech používaných v klinické praxi. V obou případech jsou do stejných skupin zařazovány karcinomy s odlišným molekulárním profilem a biologickým chováním, neboť histopatologická taxonomie je založena výhradně na morfologických parametrech a prognostické systémy zohledňují pouze velmi limitovaný počet molekulárních prediktivních markerů. Platí-li základní dogma biologických systémů, potom lze diverzitu fenotypu nádorových buněk sledovat na úrovni jejich genomu. Komplexnost těchto změn však předpokládá analýzu stovek až tisíců genů. Velké naděje byly proto vloženy do DNA čipů a dosavadní publikované práce a existence první klinické studie využívající DNA čipy u karcinomu prsu dokazují, že molekulární taxonomie a prediktivní systémy založené na profilech genové exprese představují správnou cestu k dosažení lepších léčebných výsledků tohoto onemocnění.

Klíčová slova: karcinom prsu, DNA čipy, taxonomie, predikce a prognóza, cílená léčba

Summary

Breast cancer is the most common malignant disease in women. Because of its high incidence and mortality, breast cancer is also important community problem. Despite the biologic and clinical advances that have been made in breast cancer diagnostic and treatment during the last 25 years, there is no corresponding reduction of mortality. Breast cancer patients with the same stage of disease can have markedly different treatment responses and overall outcome. It is believed that these discrepancies in clinical behavior are due to molecular differences between histologically similar tumors. DNA microarray technology is capable to reveal such molecular differences. Looking back to DNA microarray studies, that results have been published until now, we can state that all our expectations put in this technology, were filled up. Mainly, the breast cancer molecular taxonomy and predictive systems based on gene expression profiling are the most promising results with the direct impact on the clinical practice.

Key words: breast cancer, microarrays, taxonomy, prediction and prognosis, target therapy

1. Úvod

Vysoká incidence a mortalita karcinomů prsu představuje závažný medicínský a společenský problém (1). Uplynulých 25 let přineslo značný pokrok ve výzkumu karcinomu prsu, jehož výsledky se promítly na všech stupních diagnostického i léčebného procesu tohoto onemocnění. Pro ženy existuje efektivní program preventivních prohlídek. V diagnostice lze využít digitální mammografie, sonografických přístrojů nových generací a magnetické rezonance. Chirurgové jsou schopni provádět záchovné operace prsu a peroperačně detekovat sentinelovou uzlinu. Patologové mají běžně k dispozici imunohistochemické a FISH metody k vyšetřování molekulárních markerů. Kliničtí onkologové mohou použít moderních cytostatik a cílenou léčbu na bázi hormonoterapie, imunoterapie a nízkomole-

kulárních inhibitorů receptorů růstových faktorů. O to víc je však patrná klinická heterogenita průběhu onemocnění, kdy pacientky sdílející stejná diagnostická a prognostická kritéria a/nebo jednotnou léčbu, vykazují značné rozdíly v léčebných výsledcích. Příčina těchto diskrepancí může být ve stávající histopatologické klasifikaci a v prognostických systémech používaných v klinické praxi. V obou případech jsou do stejných skupin zařazovány karcinomy s odlišným molekulárním profilem a biologickým chováním, neboť histopatologická taxonomie je stále založena výhradně na morfologických parametrech a prognostické systémy zohledňují pouze velmi limitovaný počet molekulárních markerů. V důsledku toho dochází pouze k pomalému poklesu mortality, a naopak je patrné, že řada pacientek diagnostikovaných v časných klinických stádiích v rám-

ci screeningu je zbytečně poškozována adjuvantní chemoterapií. Klinická heterogenita karcinomů prsu se odvíjí od genomu nádorových buněk a patologické exprese jeho genů. Jedná se o komplexní změny, které je možné jen s obtížemi studovat s použitím tradičních metod, vhodných spíše k analýze jednoho nebo několika málo genů. Velké naděje byly proto vloženy do DNA čipů. Dosavadní publikované práce a vznik první klinické studie využívající DNA čipy u karcinomu prsu dokazují, že molekulární taxonomie a prediktivní systémy založené na profilech genové exprese představují správnou cestu k dosažení lepších léčebných výsledků tohoto onemocnění. Náš přehledový článek si klade za cíl seznámit svého čtenáře s nejvýznamnějšími poznatky, kterých bylo při studiu biologických vlastností karcinomů prsu dosaženo pomocí technologie DNA čipů a o kterých jsme přesvědčení, že mají zásadní dopad pro klinickou praxi.

2. Molekulární taxonomie karcinomů prsu založená na profilu genové exprese

Therese Sørlie, Charles Perou a kolektiv jejich spolupracovníků (dále jen stanfordská skupina) v roce 2000 analyzovali pomocí DNA čipů vlastní produkce expresi 8102 genů u 65 vzorků karcinomů prsu získaných od 42 pacientek. Společně s těmito primárními tumory zkoumali i tkáň ze zdravé prsní žlázy a nádorové buněčné linie, jenž byly ustaveny z odlišných buněčných komponent tumoru (z buněk bazálního a luminalního epitelu, z mezenchymu a endotelu). V první fázi zpracování výsledků autoři vybrali 496 genů, jejichž exprese se významně lišila minimálně u tří z analyzovaných vzorků. V dalším kroku provedli shlukovou analýzu, která na základě podobnosti exprese těchto genů rozdělila karcinomy do čtyř skupin. První skupina byla charakteristická přítomností exprese estrogenového receptoru- α (ER+) a cytotokeratinů buněk luminalního epitelu (cytokeratin 8 a 18), a proto byla pojmenována „luminal-like“. Druhá skupina byla pro vysokou expresi genu receptoru Her-2/neu (cErbB2) (dále jen Her-2) označena „Her-2+“. Třetí skupina vykazovala negativní expresi jak estrogenového receptoru- α (ER-), tak i progesteronového a Her-2 receptoru, naopak měla zvýšenou hladinu cytotokeratinů a receptorů adheze typických pro buňky bazálního epitelu (cytokeratin 5, 6 a 17, integrin $\alpha 4$). Tato skupina byla označena „basal-like“. Čtvrtá a poslední skupina mamárních karcinomů byla označena „normal breast-like“, neboť sdílela podobný profil genové exprese jako vzorky z normální prsní žlázy, v nichž převládaly adipocyty (2). O rok později, v roce 2001, publikovala stanfordská skupina další práci, ve které autoři potvrdili své předchozí výsledky na dvojnásobném souboru primárních tumorů. Zřejmě vyšší počet analyzovaných vzorků umožnil shlukové analýze „rozeznat“ ve skupině karcinomů „luminal-like“ tři podskupiny, které autoři označili jako „luminal-like A“, „luminal-like B“ a „luminal-like C“. Podskupina „luminal-like A“ představovala 67% všech tumorů klasifikovaných do skupiny „luminal-like“ a vyznačovala se nejvyšší koncentrací ER v nádorové tkáni (v průměru 111 fmol/mg) a expresí genů souvisejících s jeho signální dráhou. Na rozdíl od podskupiny „luminal-like A“, průměrná koncentrace ER byla v podskupinách „luminal-like B“ a „luminal-like C“ menší (60 fmol/mg). Karcinomy podskupiny „luminal-like C“ byly velmi heterogenní, exprimovaly ER i některé geny charakteristické pro „basal-like“ a „Her-2+“ karcinomy (obrázek 1/I). Ve své druhé práci autoři pokročili mnohem dále. Na základě korelace s údaji o celkovém přežití (OS) a času do relapsu choroby (RFS) prokázali významnou klinickou odlišnost u pěti z šesti molekulárně definovaných skupin karcinomů ($p < 0,01$). Rozdíl nebyl nalezen pouze mezi karcinomy „luminal-like B“ a „luminal-like C“, a proto byly sloučeny do jedné skupiny „luminal B+C“ (3). Podrobněji budeme o prognostickém významu molekulární taxonomie psát v další kapitole. Finální podobu molekulární taxonomie karcinomů prsu publikovala stanfordská skupina v roce 2003, kdy na souboru již 115 primárních

tumorů zreprodukovala dosavadní výsledky a zavedla definitivní označení skupin: „luminal-like A“, „luminal-like B“ (původní „luminal-like B+C“), „basal-like“, „Her-2+“ a poslední skupina „normal breast-like“. Profil genové exprese na jehož základě bylo uvedené členění dosaženo sestával z 534 genů (4).

Ačkoliv finální podoba molekulární taxonomie karcinomů prsu vzešla z analýz poměrně rozsáhlého souboru 115 primárních tumorů, jednalo se vždy o práci jednoho autorského týmu, který používal DNA čipy vlastní produkce. Tohoto „hendikeypu“ si byli autoři vědomi, a proto se rozhodli validovat vlastní výsledky na nezávislém souboru, kterým se stala práce skupiny nizozemských autorů pod vedením Laury van't Veer. Nizozemská skupina analyzovala profil genové exprese u 117 karcinomů prsu pomocí oligonukleotidových DNA čipů produkovaných společností Agilent (5). Stanfordská skupina autorů se rozhodla využít těchto veřejně dostupných dat a vyzkoušet, zda na základě exprese 534 genů jejich klasifikačního profilu dosáhnou stejných výsledků i na nezávislém souboru pacientů, jejichž karcinomy byly navíc analyzovány odlišnou platformou DNA čipů. I přesto, že hodnotitelných bylo 461 z původních 534 genů, rozdělení nizozemského souboru bylo stejné, opět do pěti skupin: „luminal-like A“, „luminal-like B“, „basal-like“, „Her-2+“ a skupina „normal breast-like“. Při popísané analýze vyšla najevo zajímavá skutečnost. Všechny 18 karcinomů nesoucích mutaci BRCA1 genu bylo na základě profilu genové exprese zařazeno do skupiny „basal-like“ karcinomů, a to i přesto, že dva z nich exprimovaly estrogenové receptory. Karcinomy, u kterých byla detekována mutace BRCA2 genu (2 případy) byly obsaženy ve skupině „luminal-like A“. V tabulce uvádíme distribuci karcinomů do jednotlivých molekulárně definovaných skupin ve stanfordském a nizozemském souboru (tabulka číslo 1).

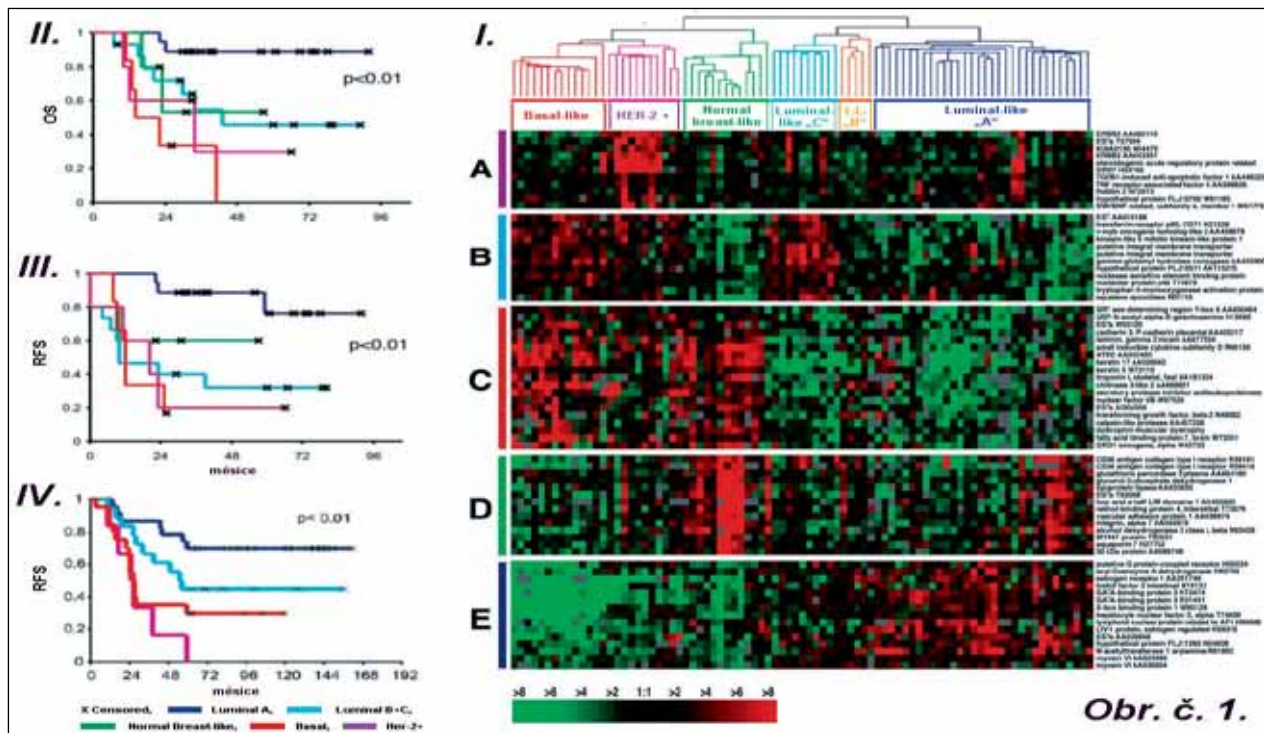
Karcinom	Basal-like	Her-2+	Luminal-like A	Luminal-like B	Normal-breast	Neurčeno
Studie						
Stanford ^a	17%	10%	24%	10%	3%	36%
van't Veer et al. ^b	21%	6%	25%	18%	5%	25%
West et al. ^c	37%	4%	39%	14%	0%	6%
Carey et al. ^d	20%	7%	51%	18%	N	N

Poznámky: N – nebylo stanoveno; ^aVytvořeno zejména z údajů uvedených v přednášce L.A. Carey, ASCO 2006.

2.1. „Basal-like“ karcinomy prsu

Otázkou zůstává, proč mají mezi nově definovanými skupinami „basal-like“ karcinomy nejhorší prognózu? Jsou příčinou této skutečnosti agresivní vlohly „basal-like“ karcinomů nebo svůj podíl nese i dosavadní léčebný přístup, který nezohledňuje jejich existenci?

Biologické vlastnosti „basal-like“ karcinomů dávají skutečně předpoklad k jejich agresivnímu chování. Jak již bylo uvedeno, na úrovni profilu genové exprese sdílí významnou podobnost s karcinomy nesoucími mutaci supresorového BRCA1 genu. Nejedná se však pouze o mutaci, která ve svém důsledku znamená nedostatek funkčního BRCA1 proteinu. Jak dokazuje řada prací, ke stejnému stavu dochází i v případě hypermetylace promotoru nemutovaného BRCA1 genu (35). Alterace na úrovni BRCA1 genu nebo proteinu však nejsou jediné mechanismy vedoucí k možnému agresivnímu chování. Za podrobnější zmínku stojí vyšší výskyt mutací v genu pro protein p53, které byly u „basal-like“ karcinomů zjištěny ve 45-82% případů, ve srovnání se 43-71% u „Her-2+“ a s 13-15% u „luminal-like A“ karcinomů (3). Řada studií přitom jednoznačně prokázala, že přítomnost mutace genu pro p53 je negativním prognostickým faktorem a je asociovaná s horší odpovědí na systémovou léčbu (6,7). Podobně



Obrázek č. 1.: (I.) Dendrogram shlukové analýzy, na kterém je patrné rozdělení 85 karcinomů prsu (sloupce) do pěti skupin definovaných na základě podobnosti exprese vybraných genů (řádky): „basal-like“, „HER-2+“, „normal breast-like“, „luminal-like C“, „luminal-like B“ (L.L. „B“). Rovněž geny jsou uskupeny do pěti funkčních skupin, „A“ až „E“. Obrázek je pouze ilustrativní a nezobrazuje všech 476 genů původního genomového profilu. Exprese genů je v dendrogramu kódována barvou. Zelená barva značí nízkou, červená barva vysokou a černá barva průměrnou expresi daného genu v daném karcinomu. Šedá barva označuje gen, jehož exprese nebyla vyhodnocena. V levé části obrázku se nachází grafy prezentující Kaplan-Meierovy křivky pravděpodobnosti celkového přežití - OS (II.) nebo času do vzdálenostního relapsu choroby - RFS (III., IV.) pro výše uvedené skupiny karcinomů prsu. Dendrogram a grafy II. a III. byly převzaty a upraveny z reference č. 3., graf IV. zobrazuje výsledky ze studie van't Veer L, a kol. (ref. č. 5), a byl převzat a upraven z reference č. 4.

výsledky publikoval i Korsching a kol., který navíc zjistil, že kromě mutovaného proteinu p53 mají „basal-like“ karcinomy i vyšší expresi Her-1 receptoru (EGFR) a proliferačního markeru Ki-67 (8).

Skupina „basal-like“ karcinomů představuje přibližně 6-20% všech karcinomů prsu. V jeho incidenci jsou však patrné rasové rozdíly, kdy zejména v populaci amerických černochů přesahuje výskyt 20% (2,3,9). Z pohledu klinického onkologa jsou „basal-like“ karcinomy součástí skupiny karcinomů prsu, pro kterou je charakteristická negativní exprese jak estrogenového, tak i progesteronového a Her-2 receptoru, tzv. „triple-negative“ (trojitě negativní) fenotyp, (3, 9). Stratifikace pacientů na základě běžně používaných prognostických indexů (St. Gallen, National Cancer Institute, Nottingham) vůbec nezohledňuje výše uvedený fenotyp. Navíc může být negativní exprese Her-2 receptoru vnímána i jako prognosticky příznivý nále. Při uplatnění uvedených prognostických indexů je zřejmé, že, za určitých okolností pacientky s „basal-like“ karcinomem nemusí být vůbec indikovány k adjuvantní chemoterapii, což může negativně ovlivnit výsledky parametrů přežití (OS, RFS).

Po přečtení výše uvedeného textu si můžeme souhrnně odpovědět na otázku v úvodu této kapitoly. Na nepříznivě prognóze „basal-like“ karcinomů prsu se podílí nejenom jejich agresivní vloh, ale rovněž i dosavadní léčebný přístup, který nezohledňuje existenci ani nenabízí cílenou léčbu těchto karcinomů. Proto je reálný předpoklad, že v případě uplatnění individuálního postupu, může nastat zlepšení léčebných výsledků „basal-like“ karcinomů. Již v současnosti je možné vůči pacientkám s triple-negativním fenotypem uplatňovat předpoklad agresivního chování choroby a indikovat adjuvantní léčbu chemoterapií i v případě I. klinického stádia. U pacientek ve věku, který sám o sobě není indikací k vyšetření klinickým genetikem, je vhodné tuto možnost nabídnout a testování na přítomnost mutace BRCA1 genu provést. Vez-

me-li v úvahu molekulární alterace zastoupené u „basal-like“ karcinomů (nadměrná exprese Her-1 receptoru, snížená exprese nebo nefunkční mutace BRCA1 proteinu) je vysoce pravděpodobné, že brzy dojde k využití terapie interferující s těmito změnami. V současné době probíhá klinická studie II. fáze, ve které jsou pacienti s „triple-negative“ fenotypem léčené neoadjuvantní chemoterapií s cisplatinou. Studie vychází z poznatku o vysoké účinnosti interkalačních cytostatik na bázi platinových derivátů u karcinomů s BRCA1 mutací (10,31,32). Kromě těchto přístupů se nabízí i léčba cíleně zaměřená na signální dráhu Her-1 receptoru, kterou představuje aplikace monoklonálních protilátek (např. cetuximab) nebo nízkomolekulárních inhibitorů kinázové aktivity Her-1 receptoru (např. erlotinib a gefitinib). Poslední skupina léčiv by mohla být za účelem stabilizace onemocnění podávána i dlouhodobě, podobně jako je tomu s tamoxifen u ER+ karcinomu prsu. Základním předpokladem pro uplatnění individuálního přístupu k „basal-like“ karcinomům v běžné klinické praxi je stanovení panelů monoklonálních protilátek, které by je dokázaly s dostatečnou specificitou a senzitivitou identifikovat. Několik prací na toto téma již bylo publikováno, přičemž nejčastěji je určen „basal-like“ karcinom založený na výsledku detekce cytokeratinu 5, 6, 17, 19, moesinu, fascinu a c-Kit., Her-1, Her-2, ER, PR a p53 (4,9,33,34).

3. Prediktivní a prognostické profily genové exprese u karcinomů prsu

Indikace adjuvantní léčby u časných stádií karcinomu prsu se v praxi klinického onkologa opírá zejména o existenci několika prognostických systémů. Mezi nejrozšířenější bezesporu patří prognostické skórovací systémy vzešlé z kritérií doporučených skupinou expertů NIH (11) a ze závěrů konference v St. Gallen (12). V podobě internetové aplikace je dostupný systém „Adjuvant on-line“ (13). Uvedené systémy jsou pra-

videlně evaluovány, a proto v současnosti zahrnují nejenom klinické ukazatele (např. věk pacientky, velikost primárního tumoru), ale i histopatologické charakteristiky nádoru (grading, exprese estrogenových a progesteronových receptorů), na základě kterých rozdělují pacientky do dvou hlavních prognostických skupin ve vztahu k riziku časného relapsu choroby. Na straně druhé tyto systémy často selhávají a pro predikci léčebné odpovědi jsou nepoužitelné. Na jejich základě je však indikována adjuvantní chemoterapie u 80% pacientek, i když víme, že pouze polovina z nich bude postižena relapsem choroby a následně podlehe metastatickému onemocnění (14). Nejistý efekt chemoterapie a riziko akutních i dlouhodobých nežádoucích účinků této léčby, představují stálý a intenzivní stimul ke hledání prediktivní a prognostických faktorů.

3.1. Prognostický význam molekulární taxonomie

Stanfordský tým prokázal, že mezi jednotlivými skupinami karcinomů prsu definovanými na podkladě příslušnosti k určitému profilu genové exprese, existují statisticky významné rozdíly v parametrech RFS a OS. Tyto rozdíly byly reprodukovatelné i na nezávislém souboru pacientek nizozemských autorů. Nejhorší prognózu vykazovala skupina „basal-like“ karcinomů, následovaná „Her-2+“ karcinomy. V obou případech více než 60% pacientek nedosáhlo RFS 48 měsíců. Naopak nejlepších výsledků vykazovala skupina karcinomů „luminal-like A“, kde osmiletého OS a RFS dosáhlo přibližně 90% a 70% pacientek. Pacientky s karcinomy „luminal-like B“, nebo „normal breast-like“ dosahovaly těchto parametrů mezi 40 - 60 % (3,4,5), (obrázek č. 1/II-1/IV.).

Rouzier a kol. si položili otázku: Souvisí odlišná prognóza jednotlivých molekulárních variant karcinomu prsu více s jejich chemosenzitivitou, nebo se jedná spíše o odraz jejich metastatického potenciálu? Autoři vybrali 82 pacientek s karcinomem prsu I. až III. klinického stádia, kterým byla podávána neoadjuvantní chemoterapie založená na sekvenčním režimu Paklitaxel+FAC. Před zahájením léčby byla pacientkám provedena tenkojehlová aspirace nádorových buněk z tumoru pro účel mikročipové analýzy, na jejímž základě byl soubor rozdělen na jednotlivé molekulárně definované taxonomické jednotky. Karcinomy typu „luminal-like“ byly zastoupeny v 37%, „normal breast-like“ ve 12%, „basal-like“ ve 27% a „Her-2+“ ve 24%. Patologická kompletní remise tumoru (pCR) nastala nejčastěji ve skupině „basal-like“ a „Her-2+“. V obou případech dosáhlo pCR 45% pacientek. Naopak v případě „luminal-like“ karcinomů byla pCR detekována pouze v 6% případů a u „normal breast-like“ karcinomů nebyla zjištěna vůbec. Autoři následně identifikovali profil genové exprese, který predikoval pCR v souvislosti s danou léčbou. Multivariabilní analýza však neprokázala jeho nezávislost, neboť stejného rozdělení bylo dosaženo i při kombinovaném použití klinicko-patologických parametrů: věku a exprese estrogenového receptoru. Tento výsledek byl bezesporu ovlivněn netypickým zastoupením jednotlivých skupin karcinomů v poměrně malém souboru, kdy karcinomy typu „basal-like“ a „Her-2+“ tvořily více než jeho polovinu. Pouze pro skupinu „basal-like“ karcinomů bylo možné identifikovat specifický profil genové exprese, který byl nezávislým prediktorem pCR (15).

3.2. Prognostické profily nezávislé na molekulární taxonomii

V úvodu k dalším kapitolám musíme poznamenat, že jsme měli snahu zachovat pro termíny „predikce“ a „prognóza“ vymezení ve smyslu predikce odpovědi na léčbu a prognóza pro přežití nebo událost spojenou s relapsem/progresí choroby. Řada publikací, ze kterých jsme čerpali, však takového vymezení neměla, a proto jsou i v našem textu oba pojmy často zastupitelné.

3.2.1. Indikace adjuvantní chemoterapie

I přesto, že na molekulární úrovni definovaná klasifikace karcinomů prsu obsahuje i prognostické informace, řada výzkumných týmů se snažila identifikovat prognostické profily genové exprese nezávisle na taxonomických jednotkách. Z dosud provedených analýz vyplývá, že v případě karcinomu prsu je možné prognózu vývoje onemocnění stanovit z profilu genové exprese primárního tumoru již v době diagnózy choroby (5).

Laura van't Veer, Marc J. van de Vijver a Yixin Wang publikovali velmi nadějně studie, jejichž výsledkem byly profily genové exprese, které dokázaly stratifikovat pacientky s karcinomem prsu lokalizovaným pouze na oblast mammy, bez prokázaného postižení regionálních lymfatických uzlin a vzdálených metastáz (dále jen $pT \leq pN0M0$), do skupiny s nízkým, nebo s vysokým rizikem vzdáleného relapsu (M1) choroby v průběhu pěti let od zahájení léčby (dále jen „časný relaps“). Nizozemská skupina autorů, pod vedením Laury van't Veer, provedla v roce 2001 DNA čipovou analýzu 117 karcinomů prsu, ve které identifikovala profil genové exprese mající silný vztah k predikci časného relapsu choroby. Aby bylo možné validovat výsledky při omezeném počtu karcinomů, rozdělili autoři soubor na cvičnou (training-set) a kontrolní (test-set) skupinu. Pomocí specifických biostatistických analýz identifikovali ve cvičném souboru profil 70 genů, jejichž hodnoty exprese se lišily mezi karcinomy pocházejícími od pacientek s časným nebo pozdním relapsem choroby ($p=0,0018$). Tento profil následně testovali na kontrolní skupině karcinomů. Senzitivita a specifita profilu pro rozdělení pacientek do výše uvedených rizikových skupin dosáhla 91% a 73% a vícerozměrné analýzy prokázaly jeho nezávislost na dosud používaných klinicko-patologických parametrech (velikost tumoru, postižení lymfatických uzlin, stav hormonálních receptorů, angioinvasze, grading) ($p<0,001$). Identifikace skupiny genů, jejichž profil exprese je zřetelně asociován s časným relapsem choroby dokazuje, že tyto karcinomy měly již od počátku svého vzniku metastatický fenotyp a samotný rozsev maligních buněk nemusí probíhat pouze lymfatickou cestou (5).

O dva roky později publikoval nizozemský tým další práci, ve které autoři testovali „svůj“ 70-genový prognostický profil na rozsáhlém souboru 295 pacientek, jehož charakteristika je podrobně rozvedena v tabulce č. 2 (Vijver a kol.). Souhrně můžeme říci, že se opět jednalo o pacientky s karcinomem prsu lokalizovaným na oblast mammy, v tomto případě však zcela záměrně přibližně polovina měla prokázané postižení regionálních lymfatických uzlin ($pN1$). Více než dvě třetiny karcinomů exprimovalo estrogenový receptor. Pacientky byly léčeny chirurgicky, a pokud byla indikována, následovala zajišťovací radioterapie. Adjuvantní chemoterapii obdrželo 37% pacientek. V retrospektivní analýze dokázal 70-genový profil spolehlivě určit riziko relapsu pacientek, a to nezávisle na stavu postižení lymfatických uzlin a řady dalších klinických parametrů ($p<0,001$, obrázek č. 2A-2D). Ve skupině 151 pacientek s karcinomem lokalizovaným pouze na oblast prsu ($pT \leq pN0M0$) provedli autoři velmi zajímavé srovnání mezi údaji o prognóze pacientek dosaženými na základě profilu genové exprese, nebo kritérií doporučených skupinou expertů NIH, či ze závěrů konference v St. Gallen. Výsledky tohoto srovnání jsou shrnuty v tabulce č. 3 a 4. Mezitím co oba klinicko-patologické prognostické systémy identifikovaly v dané skupině pouze 7-15% pacientek s nízkým rizikem relapsu, na podkladě profilu genové exprese tvořila tato skupina 39%. O prognostické síle genového profilu vypovídá nejlépe skutečnost, že pouze 13,2% pacientek s predikovaným nízkým rizikem během 10 let zrelabovalo (16). Tyto výsledky podnítily nizozemské autory k realizaci první klinické studie, která do jednotlivých ramen „randomizuje“ pacientky na základě výše uvedeného profilu genové exprese. Jedná se o prospektivní multicentrickou studii třetí fáze organizovanou pod záštitou

EORTC (protokol 10041-BIG-3-04), která byla zahájena v roce 2006 a počítá s nábořem 6000 pacientek s časným karcinomem prsu, omezeným pouze na oblast mammy (pT≤3pN0M0). Jak název klinické studie „Microarray In Node negative Disease may Avoid ChemoTherapy“ (zkratka „MINDACT“) napovídá, jejím primárním cílem je srovnat, zda je ve výběru pacientek pro adjuvantní chemoterapii efektivnější 70-genový prognostický profil, nebo stávající klinicko-patologická kritéria. Schéma studie představuje obrázek č. 3. Na začátku studie je u každé pacientky stanoveno riziko časného relapsu nemoci na základě 70-genového profilu exprese a klinicko-patologických kritérií (Adjuvant on-line). Pakliže oba prognostické systémy zařadí pacientku do skupiny s nízkým rizikem časného relapsu, není indikována adjuvantní chemoterapie. V opačné situaci ano. Předpokládá se, že ve většině případů dojde k neshodě výsledků obou prognostických systémů, kdy jeden nebo druhý zařadí pacientku do nízkého nebo vysokého rizika časného relapsu. Za těchto okolností budou pacientky randomizovány do dvou skupin. V první bude o indikaci chemoterapii rozhodnuto na základě výsledku klinicko-patologického prognostického systému, ve druhé na základě výsledku 70-genového prognostického systému. U pacientek, které budou indikovány k aplikaci adjuvantní chemoterapie dojde k další randomizaci, která je rozdělí do ramene s chemoterapií založenou na antracyklinu, nebo na kapecitabinu a docetaxelu. Pacientky s tumorem exprimujícím estrogenové receptory budou dále randomizovány do ramene s dvouletým podáváním tamoxifenu následovaným pětiletou léčbou letrozolem, nebo do ramene se samotným letrozolem aplikovaným po dobu sedmi let. Poslední dvě randomizace vycházejí z druhotných cílů studie, ve které chtějí pořadatelé srovnat efektivitu a bezpečnost obou ramen s chemoterapií a hormonoterapií.

Na nezávislém souboru čítajícím 286 pacientek a za použití jiné mikročipové technologie publikovali o několik let později podobnou práci i Wang a kol. Podrobnou charakteristiku jejich souboru udává tabulka č. 2. Stručně lze říci, že se jednalo výhradně o pacientky s karcinomem prsu lokalizovaným na oblast mammy (pT≤4M0), bez prokázaného postižení regionálních lymfatických uzlin (pN0) a více než dvě třetiny karcinomů exprimovalo estrogenový receptor. Tumory o velikosti pT3 a pT4 tvořily pouze 3% celého souboru.

Charakteristika	Studie	Vijver a kol. NEJM 2002 ¹¹	Wang a kol. Lancet 2005 ¹²
Čipová platforma		Affilent	Affymetrix
Počet detekovatelných genů		25 000	22 000
Biologický materiál		zmrazená tkáň	zmrazená tkáň
Zastoupení nádoru v analyzovaném vzorku		> 50%	> 70%
Počet pacientů (primárních tumorů)		295	286
Charakteristika TNM stadiu		T1-2N0-1M0	T1-4N0M0
Věk: < 40 let / > 55 let		21% / 0%	13% / 42%
ER +		77%	73%
PR+		neurčeno	58%
Her-2+		neurčeno	neurčeno
G1/G2/G3		25%/35%/40%	2%/15%/52%
pT1/T2/T3a/T4		53%/47%/0%	51%/46%/3%
pN0		51%	100%
Radikální mastektomie		45%	23%
Adjuvantní chemoterapie		37%	0%
Adjuvantní radioterapie		neurčeno	87%
Adjuvantní hormonoterapie		14%	neurčeno
Relaps do 5 let		26%	33%
Počet primárních tumorů ve cvičném souboru		(78:T1-2N0M0)*	115
Počet primárních tumorů v kontrolním souboru		295	171
Počet genů v prognostickém profilu		70	76
Počet genů zastoupených v obou profilech		3	
Zastoupení tumorů s prog. příznivým profilem		39% / (52%)*	35%
Senzitivita profilu		92% / (91%)*	93%
Specifita profilu		50% / (73%)*	48%

Pacientky byly léčené chirurgicky, a pokud byla indikována, následovala zajišťovací radioterapie. Adjuvantní chemoterapie nebyla podávána. Pacientky byly rozděleny na dvě části. První část, označená jako „cvičný soubor“ („training set“),

zahrnovala 115 pacientek a sloužila k identifikaci prognostického profilu genové exprese. Druhá část, kontrolní soubor („test set“), sloužila k nezávislému ověření výsledků získaných z analýzy cvičného souboru. Oba soubory obsahovaly ve stejném poměru pacientky s pozitivní a s negativní expresí estrogenového receptoru. Mikročipová analýza cvičného souboru identifikovala u ER+ pacientek 60 genů a u ER- pacientek 16 genů, které dohromady vytvořily profil genové exprese schopný rozdělit pacientky do skupiny s nízkým, nebo s vysokým rizikem časného vzdálenostního relapsu (obrázek č. 2E a 2F). Stejně jako v předchozí práci, i zde autoři provedli srovnání s klinicko-patologickými prognostickými systémy a dospěli k podobným výsledkům, které jsou shrnuty v tabulce č. 3 a 4 (10).

Tabulka č. 3. Vývoj karcinomu prsu u pacientek stratifikovaných do rizikových skupin na základě profilu genové exprese					
	Zastoupení pacientů	Přežití bez vzniku vzdálenostních metastáz		Celkové přežití	
		5 let	10 let	5 let	10 let
Studie van de Vijver a kol., NEJM 2002¹¹					
Pacienti s příznivým prognostickým profilem (115 pacientů)	39%	94,7%	85,2%	87,4%	84,6%
z toho pacienti „pT1-2pN0“	37%	93,4%	86,8%	86,7%	86,7%
Pacienti s nepříznivým prognostickým profilem (189 pacientů)	61%	60,5%	50,6%	74,1%	54,6%
z toho pacienti „pT1-2pN0“	63%	56,2%	44,7%	71,6%	49,6%
Studie Wang a kol., Lancet 2005¹²					
Pacienti s příznivým prognostickým profilem (59 pacientů)	36%	93%	N	87%	N
Pacienti s nepříznivým prognostickým profilem (112 pacientů)	66%	53%	N	70%	N
Poznámky: ¹¹ Studie zahrnovala pacientky pT1-2pN0-1M0. ¹² Studie zahrnovala pouze pacientky pT1-2pN0M0 a z celkového počtu 298 pacientek byly parametry přežití hodnoceny pouze v kontrolním souboru čítající 171 pacientek, N = neurologického dožívání.					

	Studie van de Vijver a kol., NEJM 2002 (hodnoceny pouze pT1-2pN0 pacientky)				Studie Wang a kol., Lancet 2005			
	Nízké riziko		Vysoké riziko		Nízké riziko		Vysoké riziko	
	% pacientů	MP5 10 let ^a	% pacientů	MP5 10 let ^a	% pacientů	MP5 5 let	% pacientů	MP5 5 let
NOH kritéria ¹³	7%	82%	93%	58%	9%	91%	89%	
St. Gallen kritéria ¹⁴	15%	77%	85%	57%	8%	92%	90%	
Profil genové exprese ^b	39%	86,8%	61%	44,1%	35%	65%	52%	

Z obou prací vyplývá, že na základě profilu genové exprese primárního tumoru lze predikovat vývoj nádorového onemocnění mnohem přesněji, než pomocí dosavadních klinicko-patologických prognostických systémů. Vezmeme-li v úvahu, že u pacientek s negativním postižením regionálních lymfatických uzlin, které nejsou zajištěny adjuvantní chemoterapií nastává relaps přibližně v 30-40% případů (10), tak distribuce pacientů do skupiny s nízkým rizikem je v případě klinicko-patologických prognostických systémů jednoznačně poddimenzována (7-15%). Stanovení rizika relapsu na základě profilu genové exprese přináší rozdělení blízké se více přirozenému průběhu choroby. Tomu odpovídá jak rozdělení pacientů do obou prognostických skupin (nízké riziko stanoveno v 35-39%), tak i počty pacientů dosahujících pěti a desetiletého přežití bez vzniku vzdálených metastáz (viz. tabulky č. 3 a 4). I přesto, že věrohodnost dosažených výsledků mikročipových analýz je podložena klinickým vývojem onemocnění u relativně vysokého počtu pacientek (s ohledem na finanční náklady spojené s použitím DNA čipové technologie), je nutné zmínit i několik nejasností, které nám utkvěly v paměti při pročítání uvedených prací. Překvapující je, že ani jeden z profilů neobsahuje geny, jejichž prognostický význam byl u karcinomu prsu již popsán. Jedná se například o Her-2/neu, cyklin D1, ER-alfa, p53, UPA, PAI-1, c-myc a další. Vysvětlení se nabízí několik. Vyzvednout chceme skutečnost, že výše uvedené prediktory jsou studovány především na úrovni proteinů, jejichž regulace je ovlivňována posttranslačními a posttranskripčními mechanismy. Profily přitom mohou obsahovat geny hrající důležitou roli právě v těchto mechanismech, přičemž tato jejich funkce nemusela být dosud odhalena.

Dalším překvapením je, že oba prognostické profily jsou až na tři výjimky tvořeny úplně jinými geny, a to i přesto, že původně vznikly analýzou karcinomů s velmi podobnou histopatologickou charakteristikou. Rovněž klinické parametry souborů jsou si velmi podobné. Výraznější odlišnosti jsme našli pouze ve věkovém rozložení pacientek a v zastoupení jednotlivých stupňů gradingu, kdy ve Wangově práci je větší zastoupení pacientek starších 55 let a menší zastoupení dobře diferencovaných karcinomů „G1“ (31% karcinomů ve Wangově souboru ale nemá stanoven grading). Přitom stupeň gradingu je v řadě klinických studií nezávislým prognostickým faktorem, a tedy odráží biologické vlastnosti tumoru mající základ v genomovém profilu. Pomineme-li tyto skutečnosti, odpovědnost za tak zásadní odlišnost obou prognostických genomových profilů je možné „svést“ rovněž na rozdílné mikročipové technologie použité v obou studiích. Na tento argument se přitom odvolává autorský tým Wangovy práce. Mikročipové platformy Affymetrix a Agilent sice detekují genomovou expresi více než dvou desítek tisíc genů, mezi nimi však existuje variabilita hybridizačních sekvencí a datové analýzy (37).

Tabulka č. 5. Stanovení rizika relapsu na základě profilu genomové exprese u pacientek s karcinomem prsu adjuvantně léčených tamoxifenem^{a,b}

Prognostická skupina	RS skóre ^c	NSABP B-14		NSABP B-20	
		% pacientů	Tamoxifen DRF 10 let ^d	% pacientů	Tamoxifen + chemoterapie DRF 10 let ^d
		100%	85%	100%	87,8%
Nízké riziko	< 18	91%	93,2%	94%	96,8%
Střední riziko	18 - 30	22%	86,7%	21%	90,9%
Vysoké riziko	> 31	27%	69,5%	25%	60,5%

^a Poznámky: ^a RS-skóre se pohybuje v intervalu 0-100 a je stanoveno na základě hodnoty exprese 21 genů. ^b Pacientky s karcinomem prsu (pT1-4pN0M0) exprimujícím estrogenové receptory. ^c Procento pacientek, které dosáhly desetileté přežití bez vzniku vzdálenostních metastáz.

Zajímavý komentář ke studiím Wang a van't Veerové se objevil v časopisu Lancet. Z pohledu biologických vlastností karcinomů prsu zde byla učiněna zásadní námitka, která upozornila na rozdíl v metodikách práce obou autorských týmů. Mezitím co Y. Wang vyhodnocoval výsledky mikročipových analýz odděleně u karcinomů s pozitivní a s negativní expresí estrogenových receptorů, přičemž dva takto detekované prognostické profily ve finále sloučil dohromady, L. van't Veerová analyzovala karcinomy neseřazovaně. Signální dráha estrogenového receptoru je pro nádorovou buňku mimořádně významná a přímo i nepřímo ovlivňuje expresi mnoha dalších genů. Identifikace prognostického profilu je záležitost biostatistického zpracování hodnot genomové exprese ve vztahu k vývoji choroby. Vzhledem k matematickým algoritmům, které tento vztah definují, výběr prvních několika „nejsignifikantnější asociovaných“ genů může mít významný vliv na selekci těch zbývajících, pakliže jsou v silné funkční biologické vazbě (18). Lze tedy předpokládat, že geny mající vztah k signální dráze estrogenového receptoru mohly získat významnější zastoupení v profilu L. van't Veerové. Dokázat takovou hypotézu, jak jsme již uvedli, je však obtížné, neboť u řady z nich nemusí být tento vztah dosud objeven.

Obecným problémem většiny mikročipových studií je malý počet pacientů ve cvičných souborech, na kterých jsou prognostické profily generovány. Limity počtu pacientů vycházejí z finanční náročnosti DNA čipových analýz. I při relativně vysokém počtu pacientek ve cvičných souborech obou analýz (78 a 115), je při detekci více než 20 000 genů v každém karcinomu vysoce pravděpodobné, že i na vysoké hladině statistické významnosti (např. $p < 0,001$) bude vybrána desítky genů se silnou, nicméně falešně pozitivní prediktivní hodnotou (18).

3.2.2. Predikce léčebné odpovědi na tamoxifen

Tamoxifen je nejčastěji používán antiestrogen k léčbě karcinomů prsu exprimujících estrogenové receptory. V adjuvantní terapii časných stádií představuje podávání tamoxifenu vysoce účinnou léčbu, která snižuje kumulativní riziko relapsu choroby o 40 až 50% pro každý rok jejího podávání. Při-

bližně u 40% pacientek však tato léčba na podkladě primární nebo sekundární rezistence selhává a dochází k relapsu choroby. Hormonální léčba se uplatňuje rovněž v terapii metastatického karcinomu prsu. I v těchto případech dříve či později dochází k jejímu selhání.

Již jsme uvedli, že molekulární taxonomie rozlišuje ER+ karcinomy prsu na dvě skupiny „luminal-like A“ a „luminal-like B“, které mají i přes jednotnou léčbu výrazně odlišnou prognózu (4). V případě nalezení vhodných imunohistochemicky vyšetřitelných markerů, jenž by obě skupiny spolehlivě odlišily, bylo by možné zahájit klinické studie vedoucí k optimalizaci léčby rizikových „luminal-like B“ karcinomů. Rovněž podrobnější studium jejich molekulární podstaty může přinést vysvětlení příčin selhání antiestrogenové léčby a případně odhalit nové terapeutické cíle.

Identifikaci profilu genomové exprese, na jehož podkladě by bylo možné spolehlivě určit pacientky, které budou mít největší benefit z adjuvantní léčby tamoxifenem, nebo naopak budou ohroženy jejím selháním, si vzala za cíl skupina autorů z University of Pittsburgh. V roce 2004 v NEJM publikovali práci, ve které představili profil složený z 21 genů, jenž rozdělil pacientky do tří skupin podle rizika relapsu choroby. Tyto geny byly původně vybrány ze skupiny 250 kandidátních genů, o nichž existovaly informace, včetně výsledků DNA čipových studií, dokladující jejich prediktivní význam u karcinomu prsu. Analyzovaný soubor tvořilo 668 pacientek s ER+ karcinomem prsu omezeným pouze na oblast mammy (pT≤4pN0M0). Všechny uvedené pacientky byly v rámci protokolu klinické studie NSABP B-14 adjuvantně léčené tamoxifenem po dobu pěti let a medián jejich sledování přesáhl 14 let. K analýze byla použita RNA izolovaná z karcinomů fixovaných formalinem a archivovaných v parafinových bločcích a pomocí multiplexové kvantitativní Real-Time PCR reakce byla stanovena hodnota exprese 21 vybraných genů, které se staly základem pro výpočet indexu rizika relapsu „RS-skóre“ (recurrence score). Na základě RS-skóre byly pacientky rozděleny do tří skupin: 1. s nízkým (<10%), 2. se středním (10-30%) a 3. s vysokým (>30%) rizikem vzdáleného relapsu choroby do 10 let od zahájení adjuvantní léčby tamoxifenem. Mezitím co v celém souboru dosáhlo uvedených 10 let 85% pacientek, ve skupině s nízkým, středním a vysokým rizikem tomu bylo u 93%, 85% a 31% pacientek ($p < 0,001$). Podrobně viz. tabulka č. 5. I přestože pacientky mladší 50 let (v době zahájení léčby) vykazovaly častější výskyt relapsů, v multivariabilní analýze při použití RS-skóre nebyl věk signifikantním prognostickým faktorem. Z ostatních testovaných parametrů (velikost tumoru, Her-2 amplifikace, hladina estrogenového receptoru v cytozolu buněk, grading tumoru) nabyly prognostického významu pouze údaje o gradingu. Bohužel, i přes zavedení jednotných hodnotících kritérií, stanovení gradingu tumoru vykazuje do značné míry variabilitu závislou na subjektivním úsudku patologa. Autoři proto nechali grading vyhodnotit nezávisle třemi patology, přičemž pouze u špatně diferencovaných tumorů bylo dosaženo interpersonální shody. Překvapivým nálezem bylo, že více než třetina pacientů s primárním tumorem nepřesahujícím 1cm byla ve středním nebo vysokém riziku s 15-20% výskytem relapsu ve sledovaném období (23).

Autoři si položili otázku, zda prognostický význam jejich 21-genového profilu bude zachován i v případech, kdy adjuvantní hormonoterapii předchází aplikace chemoterapie. Předmětem jejich zájmu se proto staly pacientky zařazené do klinické studie NSABP B-20. Jednalo se o soubor 651 pacientek s časným stádiem ER+ karcinomu prsu (pT≤4pN0M0), které byly léčené adjuvantní hormonoterapií tamoxifenem po dobu pěti let (227 pacientek), a nebo adjuvantní chemoterapií založenou na režimu MF a CMF s následující hormonoterapií tamoxifenem po dobu 5 let (424 pacientek). Medián jejich sledování přesáhl 10 let. Obdobně i zde byly pacient-

ky rozděleny na základě RS-skóre do 3 prognostických skupin (nízké, střední a vysoké riziko relapsu). Pacientky s nízkým RS-skóre dosahovaly nejlepších léčebných výsledků v průběhu desetiletého sledování. Potvrdil se tak prognostický význam RS-skóre, a to nezávisle na skutečnosti, zda pacientky absolvují adjuvantní chemoterapii. Podrobnější údaje viz. tabulka č.5 (24). Použitá metoda byla následně patentovaná společností Oncotype (25).

3.2.3. Predikce patologické kompletní remise po neoadjuvantní chemoterapii

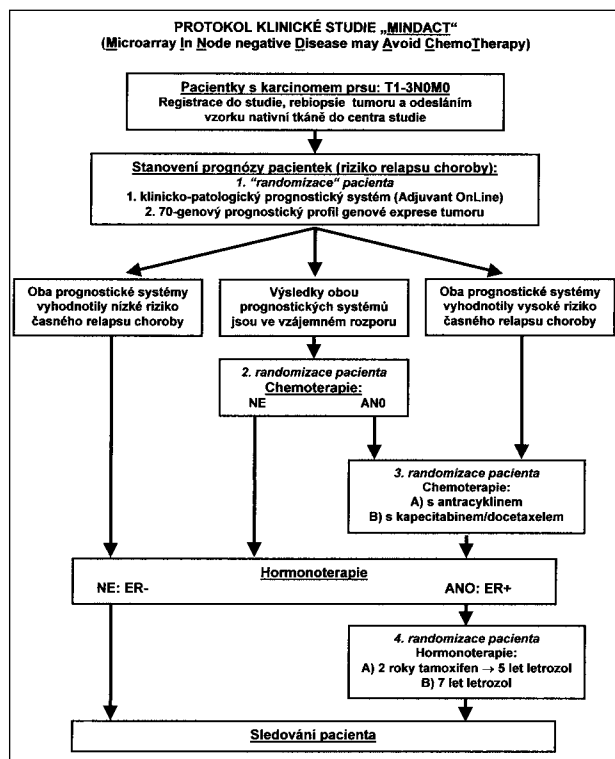
Profil genové exprese byl rovněž použit k predikci patologické kompletní remise (pCR) u pacientek s karcinomem prsu léčeným neoadjuvantní chemoterapií. Retrospektivní analýzy řady klinických studií prokázaly, že dosažení pCR po neoadjuvantní léčbě je spojeno s delším bezpříznakovým a celkovým přežitím pacientek (26,27). Pravděpodobnost dosažení pCR je při aplikaci současných chemoterapeutických režimů přibližně 25-30% (24,28). Pokud by byl objeven prediktivní test, který by dosáhl minimálně 60% pozitivní prediktivní hodnoty, takto vybrané pacientky by měly dvojnásobně vyšší pravděpodobnost dosažení pCR. Ayers a kol. publikovali práci, ve které podrobili mikročipové analýze 42 primárních karcinomů prsu od pacientek, jež podstoupily neoadjuvantní chemoterapii režimem s paklitaxelem, fluorouracilem, doxorubicinem a cyklofosfamidem (T-FAC). Třináct pacientek (31%) dosáhlo pCR. Autoři z 19813 zkoumaných genů identifikovali 74 genů, které byly signifikantně spojeny s výskytem pCR. I přestože v kontrolním souboru dosáhl tento 74 genový profil 100% specifity, jeho senzitivita byla nízká - 43% (28). Podobnou Rouzierovu práci jsme představili v kapitole 2.1. (15).

Mohlo by se zdát, že k hledání prediktivních markerů je model neoadjuvantních chemoterapií více než ideální, neboť léčebnou odpověď lze stanovit v relativně krátké době a účinek chemoterapie není ovlivněn sekundární rezistencí vzniklou na podkladě předchozí aplikace cytostatik. K překvapivému závěru proto dospěla skupina Hannemannové a kol., která nedokázala identifikovat žádný genový profil, který by předpověděl pCR u pacientek léčených neoadjuvantní chemoterapií založenou na režimu AC (doxorubicin, cyklofosfamid) a AD (doxorubicin, docetaxel) (29). Jen těžko věříme vysvětlení autorů, že v daném případě zřejmě neexistuje skupina genů, která by dokázala vytvořit silný prediktivní profil ve vztahu k pCR u uvedených chemoterapeutických režimů. Negativní stanovisko musíme zaujmout k práci Changa a kol. publikované v Journal of Clinical Oncology v roce 2005, která prezentovala profil genové exprese predikující rezistenci nebo minimální odpověď pro karcinomy prsu neoadjuvantně léčené docetaxelem. Poněkud zvláštní se jeví mezní rozdělení pacientek na docetaxel senzitivní a rezistentní kritériem dosažení 75% procentní redukce nádorové masy, pakliže 96% pacientek mělo primární tumor klasifikovaný jako T3 a u 39% z těchto tumorů přesáhl jeden z rozměrů 10 cm. Samotný profil genové exprese byl stanoven pouze na vzorku čítajícím 7 „senzitivních“ a 6 „rezistentních“ tumorů (30).

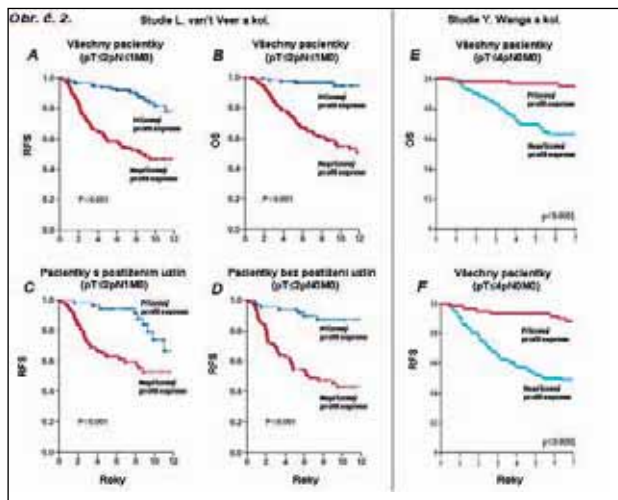
4. Příspěvek DNA čipů k vývoji nového modelu metastazování karcinomu prsu

Metastazování je považováno za poslední a fatální stupeň v relativně zdoluhavém procesu kancerogeneze solidních tumorů. Metastatický potenciál obnáší schopnost nádorové buňky migrovat extracelulární složkou tumoru, intravazovat do lymfatického a krevního oběhu, přežít v tomto nepříznivém prostředí, přestoupit z něj do jiného orgánu a zde realizovat svůj maligní potenciál. Přitom pouze méně než 0,1% nádorových buněk, které se dostanou do cirkulace, je schopno založit životaschopné metastázy (19). Dosavadní znalosti o procesu metastazování sloužily k podložení několika

hypotéz, které lze z nadhledu na jejich základní podstatu rozdělit do dvou směrů. První tvrdí, že nabytí metastatického potenciálu vyžaduje řadu postupných specifických genetických změn, které pod vysokým selekčním tlakem mohou vzniknout pouze v určité subpopulaci buněk primárního tumoru. Druhý směr tvrdí, že získání genové výbavy zodpovědné za metastazování je stochastický jev, který může postihnout kteroukoliv buňku primárního tumoru na samotném počátku jejího vzniku. Jednotlivé hypotézy pak již více nebo méně připouští, že metastatický proces může být ovlivňován buněčnou i extracelulární složkou mikroprostředí, ve kterém se nádorová buňka nachází (14,20,21).



Výsledky DNA čipových analýz jednoznačně dokazují, že genovou výbavu realizující metastatický potenciál mohou mít nádorové buňky aktivovanou již od počátku svého vzniku. Svědčí o tom dvě skutečnosti. Ta první spočívá ve zjištění, že již v časných karcinomech prsu ($pT \leq pN0M0$) lze v době stanovení diagnózy identifikovat profil genové exprese spjatý s časným vzdálenostním relapsem choroby (5,16,17). Druhá skutečnost potvrzuje předchozí. Práce publikované kolektivy autorek Laury van't Veer a Britty Weigeltové dokazují, že genová exprese primárního tumoru a jeho metastázy je sobě vzájemně podobná mnohem více, než genová exprese mezi jednotlivými primárními tumory nebo mezi metastatickými ložisky. Dosud necitovaná práce B. Weigeltové analyzovala expresi 18336 genů u osmi párových vzorků primárních tumorů a jejich vzdálených metastáz, které vznikly v intervalu 2 až 15 let od diagnózy primárního tumoru. Stejnou expresi v primárním tumoru a v jeho metastáze vykazovalo 17748 až 18271 genů (96,7-99,6%), což potvrdilo domněnku, že za metastatický potenciál je zodpovědná početně malá skupina genů (5,20). Karcinom prsu má svá predilekční místa metastatického rozsevu. Další otázku zůstává, zda stejné geny, které předurčují metastatický potenciál zodpovídají i za orgánový tropismus, nebo se v tomto případě jedná o selekční tlak na genovou výbavu tumoru vycházející z mikroprostředí, ve kterém se nádorové buňky vyskytují (složení extracelulární matrice, makrofágy, dendritické buňky, endotelie, přítomnost tumor infiltrujících lymfocytů)?



Obrázek č. 2.: Šest dílčích grafů zobrazuje Kaplan-Meierovy křivky pravděpodobnosti celkového přežití (OS), nebo pravděpodobnosti přežití bez výskytu vzdáleného relapsu choroby (RFS) v příslušné skupině pacientek s nízkým (příznivý profil exprese), nebo s vysokým (nepříznivý profil exprese) rizikem časného vzdáleného relapsu choroby. Riziko bylo určeno na základě profilu genové exprese. Grafy „A“ až „D“ byly převzaty a upraveny z reference č. 16 a grafy „E“ a „F“ z reference č. 17. V obou studiích (ref. č. 16 a č. 17) byl použitý nezávislý prognostický profil genové exprese. Pozor: barevné značení křivek není v obou studiích totožné.

Z tohoto pohledu přináší zajímavé výsledky práce publikovaná Minne a kol. v *Nature* v roce 2005. Autoři použili buněčnou linii karcinomu prsu, která byla původně izolována z pleurálního výpotku pacientky v odstupu řady let od operace primárního tumoru. Tyto buňky označili za mateřské a pomocí níže popsané metodiky mezi mateřskými buňkami identifikovali ty, jenž preferenčně metastazovaly do plic. Buňky mateřské linie vstříkli do ocasní žíly myši. Po průkazu plicních metastáz myši usmrtili a z plicních ložisek vyizolovali jednotlivé nádorové buňky, které po pomnožení opět vstříkli do ocasní žíly dalších myší. Tento proces dvakrát zopakovali a v jeho závěru získaly populaci nádorových buněk, která velmi agresivně zakládala pouze plicní metastázy. Mikročipovou analýzou následně detekovali profil složený z 54 genů, jejichž exprese odlišovala nádorové buňky metastazující do plic od buněk původní mateřské linie. S ohledem na proces metastazování obsahoval profil dvě skupiny genů. První skupinu tvořily geny, jejichž biologická funkce je obecně spjatá s agresivitou a metastazováním nádorů. Druhou skupinu představovaly geny, jejichž exprese je v primárním tumoru nízká, ale významně se zvýší v okamžiku, kdy se nádorová buňka ocitne v místě vhodném pro založení metastázy. Ze druhé skupiny uvedeme několik příkladů: epiregulin (ligand receptorů ErbB rodiny), CXCL1 (chemokin), IL13RA2 (receptor pro interleukin 13), ID1 (inhibitor transkripce), MMP1 a 2 (matrixmetaloproteinázy), SPARC (adhezní molekula), COX2 a VCAM1 (receptor adheze). Dokonalost jejich práce tkvěla především ve validaci získaných výsledků. Autoři prokázali nejenom, že změny exprese uvedených devíti genů se odrážejí i na proteinové úrovni, ale především jednoznačnou souvislost těchto genů se vznikem plicních metastáz. Pokud v mateřských buňkách docílili zvýšení jejich exprese, tyto buňky zakládaly signifikantně větší množství plicních metastáz. Na-

pak snížení exprese uvedených genů v buňkách, které původně metastazovaly pouze do plic, způsobilo až desetinásobné snížení počtu plicních metastáz.

Objevený genový profil predikující metastatické postižení plic autoři následně ověřovali na souboru primárních karcinomů prsu získaných od 82 pacientek. Na jeho základě rozdělili pacientky na skupinu s nízkým a s vysokým rizikem vzniku metastatického postižení plic. Desetiletého období bez vzniku plicních metastáz dosáhlo ve skupině s nízkým rizikem 89% pacientek, mezitím co ve skupině s vysokým rizikem pouze 56% ($p<0,0018$). Autoři vyslovili hypotézu, že primární tumory, které mají metastatický potenciál, obsahují subpopulace buněk s orgánově specifickým genovým profilem předurčujícím místo jejich metastatického rozsevu (22).

Na základě nejnovějších poznatků, které zahrnují výsledky mikročipových analýz a objev nádorových kmenových buněk, vznikl nový model metastazování karcinomu prsu. Na jeho počátku stojí fyziologická kmenová buňka mléčné žlázy, která po dobu své existence akumuluje genové mutace do chvíle, kdy nabydou transformujícího potenciálu. V tomto okamžiku vzniká nádorová kmenová buňka, která je při neomezeném množství buněčného dělení schopna sebeobnovy a diferenciaci do stádií jednotlivých maligních progenitorů. Mezitím co z progenitorů vzniká majoritní buněčná populace primárního nádoru, která však nemá potenciál k založení vzdálených metastáz, samotná kmenová buňka migruje do krevního oběhu a následně do jednotlivých orgánů, kde může i po letech strávených ve stádiu dormance úspěšně založit metastatická ložiska. Genový program pro specifický orgánový tropismus získává kmenová buňka interakcí se svým mikroprostředím. Tak mohou vzniknout kmenové buňky schopné založit metastázy například pouze v plicích nebo ve skeletu (14).

5. Závěr

Technologie DNA čipů se stala základním nástrojem výzkumu biologické podstaty a chování karcinomů prsu a její výsledky mění náš pohled na toto onemocnění. Vznikla molekulární taxonomie, která definuje pět skupin karcinomů prsu: „luminal-like A“, „luminal-like B“, „basal-like“, „Her-2+“ a skupinu „normal breast-like“, které se výrazně liší svým klinickým průběhem. V případě „luminal-like B“ a „basal-like“ karcinomů existuje navíc předpoklad, že individualizace terapeutického přístupu může vést ke zlepšení jejich léčebných výsledků. Nové poznatky přinesly DNA čipové analýzy rovněž do procesu metastazování, kde dokazují, že genovou výbavu realizující metastatický potenciál mohou mít nádorové buňky aktivovanou již od počátku svého vzniku. To může vysvětlovat skutečnost, proč stávající klinicko-patologické prognostické systémy, na jejichž podkladě je v současnosti indikována adjuvantní chemoterapie, tak často selhávají. Z tohoto důvodu byly další DNA čipové analýzy zaměřeny na identifikaci prediktivních a prognostických profilů genové exprese, které by daleko přesněji stanovovaly riziko časného relapsu choroby, nebo odpověď na podanou léčbu. Výsledkem jsou první klinické studie, které za tímto účelem DNA čipy používají.

Poděkování:

Práce byla podpořena grantovými projekty: IGA MZČR NR/8335-3, IGA MZČR NR/8270-3, MŠMT 6198959216 a MPO 1H-PK45.

LITERATURA:

- Novotvary 2003 ČR, ÚZIS ČR Praha, 2006, str. 31-69.
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;406(6797):747-52.
- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci* 2001;98(19):10869-74.
- Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100(14):8418-23.
- van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002;415(6871):530-6.
- Aas T, Borresen AL, Geisler S, et al. Specific P53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients. *Nat Med* 1996;2(7):811-4.
- Bergh J, Norberg T, Sjogren S, et al. Complete sequencing of the p53 gene provides prognostic information in breast cancer patients, particularly in relation to adjuvant systemic therapy and radiotherapy. *Nat Med* 1995;1(10):1029-34.
- Korsching E, Packeisen J, Agelopoulos K, et al. Cytogenetic alterations and cytokeratin expression patterns in breast cancer: integrating a new model of breast differentiation into cytogenetic pathways of breast carcinogenesis. *Lab Invest* 2002;82(11):1525-33.
- Nielsen T, Hsu F, Jensen K, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;10(16):5367-74.
- Majdack EJ, Debnjak J, Milczek T, et al. Prognostic impact of BRCA1 pathogenic and BRCA1/BRCA2 unclassified variant mutations in patients with ovarian carcinoma. *Cancer* 2005;104(5):1004-12.
- Eifel P, Axelsson JA, Costa J, et al. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: adjuvant therapy for breast cancer, November 1-3, 2000. *J Natl Cancer Inst* 2001;93: 979-89.
- Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, et al. International Consensus Panel on the Treatment of Primary Breast Cancer: Seventh International Conference on Adjuvant Therapy of Primary Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2001;19:3817-27.
- www.adjuvantonline.org, Adjuvant Inc., USA.
- Weigelt B, Peterse J, van't Veer L, et al. Breast Cancer Metastasis: Markers and Models. *Nature Rev Cancer* 2005;5:591-602.
- Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, et al. Breast Cancer Molecular Subtypes Respond Differently to Preoperative Chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2005;11(16):5678-5685.
- van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 2002;347(25):1999-2009.
- Wang Y, Klijn JGM, Zhang Y, et al. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet* 2005;365:671-679.
- Jenssen TK, Hoving E. Gene-expression profiling in breast cancer. *Lancet* 2005;365:634-635.
- Fidler IJ. Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumour emboli labeled with 125-I-5-iodo-2-deoxyuridine. *J Natl Cancer Inst* 1970;45:773-782.
- Weigelt B, Glas AM, Wessels LF, et al. Gene expression profiles of primary breast tumors maintained in distant metastases. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100(14):15901-15905.
- Fidler IJ, Kripke ML. Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science* 1977;197(4306):893-5.
- Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, et al. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* 2005;436(7050):518-524.
- Paik S, Shak S, Tang G, et al. A multigene assay to predict recurrence of Tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004;351(27):2817-26.
- Paik S, Tang G, Shak S, et al. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor positive breast cancer. *J Clin Oncol* 2006;24:3726-3734.
- www.oncotypedx.com
- Fisher B, Bryant J, Wolmark N, et al. Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer. *J Clin Oncol* 1998;16:2672-2685.
- Kuerer HM, Newman LA, Smith TL, et al. Clinical course of breast cancer patients with complete pathologic primary tumor and axillary lymph node response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 1999;17:460-469.
- Ayers M, Symmans WF, Stec J, et al. Gene expression profiles predict complete pathologic response to neoadjuvant paclitaxel and fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:2284-2293.
- Hannemann J, Oosterkamp HM, Bosch CA, et al. Changes in gene expression associated with response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:3331-3341.
- Chang JC, Wooten EC, Tsimelzon A, et al. Patterns of resistance and incomplete response to docetaxel by gene expression profiling in breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2005;23:1169-1177.
- Foulkes WD. BRCA1 and BRCA2: Chemosensitivity, Treatment Outcomes and Prognosis. *Fam Cancer* 2006;5(2):135-42.
- Dana-Farber Clinical Trial No.: DFCI 04-183. Preoperative Cisplatin in Early Stage Breast Cancer, II Phase Study. www.dfci.harvard.edu
- Rodriguez-Pinilla SM, Sarrio D, Honrado E, et al. Prognostic significance of basal-like phenotype and fascin expression in node-negative invasive breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12(5):1533-1539.
- Charafe-Jauffret EA, Monville F, Finetti P, et al. Definition of basal-like breast tumors: Validation of new protein markers. *Proc Amer Assoc Cancer Res* 2006;47:3602.
- Matros E, Wang ZC, Lodeiro G, et al. BRCA1 promoter methylation in sporadic breast tumors: relationship to gene expression profiles. *Breast Cancer Treatment* 2005;91:179-186.
- West M, Blanchette C, Dressman H, et al. Predicting the clinical status of human breast cancer by using gene expression profiles. *Proc Natl Acad Sci* 2001;98(20):11462-7.
- Cheadle C, Becker KG, Cho-Chung YS, et al. A rapid method for microarray cross platform comparisons using gene expression signatures. *Mol Cell Probes* 2006. In press.

STUDIUM PATOGENEZE KOLOREKTÁLNÍCH KARCINOMŮ POMOCÍ PROFILŮ GENOVÉ EXPRESE A MOŽNOSTI JEJICH VYUŽITÍ V DIAGNOSTICKÉ A PREDIKTIVNÍ ONKOLOGII

STUDIES ON COLORECTAL CANCER PATHOGENESIS BY GENE EXPRESSION PROFILES AND POSSIBILITIES OF THEIR APPLICATION TO DIAGNOSTIC AND PREDICTIVE ONCOLOGY

SLABÝ O.¹, GARAJOVÁ I.², SVOBODA M.², KOCÁKOVÁ I.², VYZULA R.²

¹MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, ODDĚLENÍ KLINICKÉ A EXPERIMENTÁLNÍ PATOLOGIE, BRNO

²MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, KLINIKA KOMPLEXNÍ ONKOLOGICKÉ PÉČE, BRNO

Souhrn

Technologie DNA čipů je v současné době nejúčinnější a nejrozšířenější metodou studia genové exprese. Počet prací využívajících tuto technologii v posledních letech exponenciálně narůstá a možnosti jejího využití se výrazně posunuly z oblasti experimentální do oblasti klinické. Ve výzkumu kolořektálních karcinomů bylo za posledních pět let využito DNA čipů ve více než šedesáti studiích. Tyto práce popisovaly schopnost čipů odlišit nádorovou tkáň od zdravé střevní sliznice, rozdělit nádory podle histopatologického stádia, anatomické lokalizace, mikrosatelitní nestability, determinovat znaky regionálních a vzdálených metastáz v primárních nádorech, predikovat léčebnou odpověď a identifikovat prognostické skupiny pacientů. Srovnatelnost a reprodukovatelnost výsledků DNA čipových studií bohužel výrazně ovlivňuje jejich technologická rozmanitost. Přesto jsme našli několik desítek genů, potenciálních markerů kolořektální karcinogeneze, jejichž pozměněná exprese v nádorové tkáni byla pozorována ve dvou a více nezávislých studiích. Slibné výsledky přinesly práce zaměřené na využití profilů genové exprese ke stanovení prognózy. Průměrná senzitivita predikce relapsu nádorového onemocnění, vzdálenostní progresu a délky celkového přežití pomocí profilů genové exprese byla pro všechny tři parametry přibližně 80%. Dobré analytické vlastnosti prokázaly DNA čipy také v predikci léčebné odpovědi. Klinické využití profilů genové exprese bude znamenat zásadní krok vedoucí směrem k individualizaci léčby a dispenzarizace pacientů s kolořektálními karcinomy.

Klíčová slova: kolořektální karcinom, DNA čipová technologie, genová exprese, patogeneze, prognóza, predikce léčebné odpovědi

Summary

DNA microarray technology is currently the most effective and widespread technique used for gene expression studies. Over the last years the number of reports related to this technology exponentially increases and possibilities of DNA microarrays usage markedly drifted from basic to clinical research. DNA microarrays were used in more than sixty studies focused on colorectal cancer during last five years. This reports show efficiency of this technology to distinguish tumor from normal colonic tissue and classify tumors in order to their pathological grade, anatomic localization and microsatellite status. Subsequent papers demonstrate abilities of gene expression profiles to determine molecular signature of metastatic disease in primary tumors and predict therapy response and disease prognosis. However, comparability and reproducibility of studies based on DNA microarrays are notably affected by their technological diversity. Anyway, we found several genes (potential markers of colorectal carcinogenesis) with altered expression in tumors identified by two or more independent studies. Promising results were reached by gene expression profiles in prediction of colorectal cancer prognosis. DNA microarrays showed good analytical ability also in therapy response prediction. Clinical application of gene expression profiles will be the important advance leading to individualized therapy and dispensarization of patients with colorectal cancer.

Key words: colorectal cancer, DNA microarray technology, gene expression, pathogenesis, prognosis, prediction of therapy response

1. Úvod

Kolořektální karcinomy (KRK) patří v České republice k nejčtenějším 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. Prognóza pacientů závisí nejen na použitých léčebných modalitách, ale i na stavu pokročilosti

onemocnění při zahájení léčby. Klinický výzkum se proto v současné době zaměřuje na prevenci, včasnou detekci, optimální selekci pacientů pro adjuvantní chemoterapii a individuální chemoterapeutický plán založený na biologických vlastnostech konkrétního nádoru.

Technologie DNA čipů umožňuje ve velmi krátkém čase paralelně monitorovat expresi tisíců genů, případně celý lidský genom na úrovni RNA (tedy transkriptom) [1,2]. Díky výrazným alteracím v expresních profilech „zblázněné“ nádorové

buňky je ideální aplikací pro tuto technologii právě onkologický výzkum [3]. Posun z oblasti základního výzkumu ke klinickému využití DNA čipů znamenala práce T. R. Goluba a kol. (1999) publikována v Science. Pomocí profilů genové exprese dokázal odlišit pacienty s akutní myeloidní a akutní T- a B-lymfoblastickou leukémií [4]. Klíčovou práci z hlediska onkologické prognostiky provedla van't Veerová a kol. (2002), která analyzovala profily genové exprese primárních nádorů pacientek s karcinomem prsu a pomocí 70 genů byla schopná predikovat metastazování nových pacientek s 89% přesností [5]. Tato sada genů je v současnosti ověřována multicentrickou klinickou studií a čeká na svoje uplatnění v rutinní klinické praxi.

Technologie DNA čipů byla během poledních sedmi let opakovaně využívána rovněž ve výzkumu kolorektálních karcinomů. Cílem tohoto přehledu je shrnout nejen nové poznatky o karcinogenním procesu, kterých bylo pomocí DNA čipové technologie dosaženo, ale také výsledky klinických studií zaměřených na prognózu a predikci léčebné odpovědi KRK a zhodnotit možnosti využití profilů genové exprese k individualizaci léčby a dispenzarizace pacientů s kolorektálními karcinomy [6].

2. Srovnání expresních profilů nádorové tkáně a normální střevní sliznice

Doposud největší množství DNA čipových studií bylo zaměřeno na srovnávání expresních profilů nádorové tkáně a k ní přiléhající normální střevní sliznice [7-23, 35]. Výstupem z těchto studií byla vždy sada genů s pozměněnou expresí, na základě které bylo možné s určitou citlivostí rozlišit nádorovou tkáň od normálního střevního epitelu. Byly takto identifikovány stovky nových genů, potenciálních markerů nádorové transformace, ale bohužel při minimálním průniku nalezených genových sad mezi jednotlivými studiemi.

Když opomeneme základní parametry ovlivňující váhu studie jako je například počet zkoumaných vzorků [24], podílí se na

variabilitě výsledků další faktory jako nehomogenní soubory pacientů, rozdílná kritéria pro kvalitu vstupního materiálu, validace výsledků alternativní metodikou, variabilita statistických metod, různá kritéria statistické významnosti nebo tzv. ischemické zdržení (čas od podvázání cév do zamražení vzorku) [25-27]. Díky výše uvedeným faktorům můžeme z velkého množství doposud identifikovaných genů pouze malé množství považovat za kandidátní geny nádorové transformace.

Vybrané studie srovnávající profily genové exprese u nádorové tkáně a normálního střevního epitelu jsou shrnuty a charakterizovány v tabulce č.1. I přes rozmanitost čipových platforem a nekonzistentnost metodických postupů se nám podařilo nalézt několik desítek genů s pozměněnou expresí identifikovanou ve dvou a více nezávislých studiích [28]. Tyto geny jsou shrnuty s konkrétními citacemi a rozčleněny podle biologické funkce v tabulce č. 2. U většiny z nalezených genů byla již dříve pozorována pozměněná exprese buď přímo u KRK nebo u jiných typů nádorových onemocnění.

Velkou skupinu z těchto genů tvoří regulátory buněčného cyklu a apoptózy, onkogeny a nádorové supresory. Typickým regulátorem buněčného cyklu je CDC25B, člen CDC25 fosfatázové rodiny, který aktivuje cyklin-dependentní kinázu CDC2 a je proto klíčový pro indukci M-fáze buněčného cyklu, s čímž souvisí jeho onkogenní vlastnosti. Zvýšené hladiny chemokinu a růstového onkogenu GRO-1 strukturně podobného interleukinu 8, byly již asociovány se ztrátou kontroly buněčného cyklu a angiogenezí u melanomu [29] a karcinomu prostaty [30]. Zvýšená exprese onkogenu MYC, který má klíčovou úlohou v kontrole buněčné proliferace a diferenciace, byla pozorována ve více než 70% KRK [31]. Nárůst hladin onkogenu MYC byl opakovaně potvrzen pomocí DNA čipů. Onkogen MYC je jedním z cílových genů regulovaných β-kateninovým komplexem. β-katenin je ve zdravé tkáni inhibován produktem APC (adenomatous polyposis coli) genu, jehož alterace se vyskytuje u většiny KRK. Mutované formy APC genu ztrácí schopnost vázat se na β-katenin, který může

Tabulka č. 1: Vybrané čipové studie zaměřené na molekulární charakterizaci kolorektálních karcinomů

Reference	Rok	Čipová platforma	N sond	N genů +/-	Počet vzorků	Validace
Srovnání nádorové tkáně a normální střevní sliznice						
Notterman a kol. (10) *	2001	Affymetrix GeneChip	6600	19/47	22 NSE, 4 AD, 18 KRK	RT-PCR
Takemasa a kol. (13)	2001	cDNA microarray	4608	23/36	16 NSE, 16 KRK	
Agrawal a kol. (35)	2002	Affymetrix GeneChip	12000	339	10 NSE, 60 KRK	NB, TMA
Birkenkamp-Demtroder a kol. (15)	2002	Affymetrix GeneChip	6800	88/70	6 NSE 21 LKRK	RT-PCR
Lin a kol. (16) *	2002	cDNA microarray (LCM)	23040	50	20 NSE, 11 KRK, 9 AD	
Williams a kol. (19)	2003	cDNA microarray	9592	574/2058	20 NSE, 20 KRK	RT-PCR
Bertucci a kol. (20)	2004	cDNA microarray	8074	130/115	23 NSE, 22 KRK	TMA
Birkenkamp-Demtroder a kol. (22)	2005	Affymetrix GeneChip	7129	80	20 NSE, 25 KRK	RT-PCR
Croner a kol. (7)	2005	Affymetrix GeneChip	22284	168/283	10 NSE, 10 KRK	
Jansová a kol. (8)	2006	cDNA microarray	19008	31/164	18 NSE, 18 KRK	RT-PCR
Kolorektální karcinomy různé anatomické lokalizace						
Bertucci a kol. (20)	2004	cDNA microarray	8074	46	10 LKRK, 9 PKRK	TMA
Birkenkamp-Demtroder a kol. (22)	2005	Affymetrix GeneChip	7129	30	15 LKRK, 10 PKRK	RT-PCR
Srovnání kolorektálních karcinomů vzhledem k mikrosatelitní nestabilitě						
Mori a kol. (38)	2003	cDNA microarray	8064	20	12 MSIK, 29 MSSK	RT-PCR
Banerjea a kol. (39)	2004	Affymetrix GeneChip	22284	542	29 MSIK, 104 MSSK	RT-PCR
Primární nádory ve vztahu k rozvoji regionální a vzdálenostní progresi						
Yanagawa a kol. (42)	2001	cDNA microarray (LCM)	9121	40/7	10 KRK, 10 HMKRK	RT-PCR
Bertucci a kol. (22)	2004	cDNA microarray	8074	46	6 KRKNO, 13KRKNX	TMA
Croner a kol. (40)	2005	Affymetrix GeneChip	22284	neuvedeno	41 KRKNO, 25KRKNX	
* bylo provedeno také srovnání expresních profilů adenomu a adenokarcinomu						
N sond - odpovídá počtu genů detekovatelných daným čipem; N genů +/- - počet nalezených up/down regulovaných genů; LCM - laserová mikrodisekce; NB - Northern Blot; TMA - tkáňové microarrays; RT-PCR - reverzní transkriptázová PCR; IHC - imunohistochemické metody; NSE - normální střevní epitel; KRK - kolorektální karcinom; AD - adenom; LKRK - levostranný KRK; PKRK - pravostranný KRK; MSIK - KRK s mikrosatelitní nestabilitou; MSSK - KRK bez mikrosatelitní nestability; HMKRK - jaterní metastáze KRK; KRKNX - primární KRK metastazující do jater; KRKNX - primární KRK metastazující do uzlin; KRKNO - primární KRK bez postižení uzlin						

Tabulka č. 2: Geny s rozdílnou expresí v nádorové tkáni identifikované minimálně dvěmi nezávislými čipovými studiemi

GeneBank	Symbol	Gene Name	□ Reference
Buněčný cyklus, onkogeny, nádorové supresory, apoptóza			
S78187	CDC25B	cell division cycle 25B	+ 7, 9, 10, 15, 19
X54489	CXCL1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (MGSA, GRO-1)	+ 7, 9, 10, 18, 19, 23
K02276	MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	+ 7, 10, 19, 23, 35
H74208	BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2 (Bcl-2)	+ 19, 20
AI800528	BIRC5	baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	+ 7, 19
U33286	CSE1L	CSE1 chromosome segregation 1-like (yeast) (CAS)	+ 10, 15
U37518	TNFSF10	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10 (TRAIL)	- 9, 19
U60519	CASP10	caspase 10, apoptosis-related cysteine peptidase	- 9, 12
Transkripční faktory			
U14134	GTF3A	general transcription factor IIIA	+ 10, 15
Růstové faktory, cytokiny			
M38449	TGFB1	transforming growth factor, beta 1 (Camurati-Engelmann disease)	+ 7, 9, 15, 22
M77349	TGFB1	transforming growth factor, beta-induced, 68kDa (BIGH3)	+ 9, 10, 14, 15, 35
U88323	GDF15	growth differentiation factor 15 (PLAB, PDF, PTGFB)	+ 18, 19
Buněčná signalizace			
AF487339	NME1	non-metastatic cells 1, protein (nm23A)	+ 10, 11, 20, 23
M97496	GUCA2A	guanylate cyclase activator 2A (guanylin)	- 10, 15, 17
Z70295	GUCA2B	guanylate cyclase activator 2B (uroguanylin)	- 15, 35
Metabolické enzymy a transportní proteiny			
M61832	AHCY	S-adenosylhomocysteine hydrolase	+ 7, 10, 15
Z26491	COMT	catechol-O-methyltransferase	- 10, 15, 17
M10050	FABP1	fatty acid binding protein 1, liver	- 7, 13, 15
M33987	CA1	carbonic anhydrase I	- 7, 19, 22
J03037	CA2	carbonic anhydrase II	- 7, 8, 9, 13, 19, 35
M83670	CA4	carbonic anhydrase IV	- 7, 10, 15, 20, 22, 35
X04350	ADH1C	alcohol dehydrogenase 1C (class I), gamma polypeptide (ADH3)	- 7, 9, 10, 35
K01383	MT1A	metallothionein 1A (functional)	- 7, 11, 15, 19, 21, 35
U29091	SELENBP1	selenium binding protein 1	- 7, 13, 15
U14528	SLC26A2	solute carrier family 26, member 2	- 13, 35
L02785	SLC26A3	solute carrier family 26, member 3; colon mucosa-associated (DRA)	- 10, 15, 35
Proteiny extracelulární matrix, adhezivní molekuly, angiogeneze			
BC054498	COL1A2	collagen, type I, alpha 2	+ 7, 8, 13, 17, 20, 35
J03040	SPARC	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	+ 7, 10, 19, 20, 35
J04765	SPP1	secreted phosphoprotein 1 (osteopontin)	+ 10, 22, 35
M32977	VEGF	vascular endothelial growth factor	+ 13, 13, 40
AJ002550	MMP1	matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	+ 7, 14, 20, 22
AL542407	MMP2	matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase)	+ 20, 22
AI628953	MMP3	matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)	+ 7, 20, 22
BC003635	MMP7	matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine)	+ 7, 20, 22, 40
AK075448	MMP11	matrix metalloproteinase 11 (stromelysin 3)	+ 7, 20
AA411757	CEACAM1	carcinoembryonic antigen-related molecule 1 (biliary glycoprotein)	- 10, 15, 19
□ - <i>exprese genu (+ up-regulovaný, - down-regulovaný) v nádorové tkáni ve srovnání s normálním střevním epitelem</i>			

tvorit komplexy s jinými proteiny, například TCF (T-cell factor). TCF/ β -kateninový komplex je spojen s trvalou aktivací Wnt signální dráhy a následně zvýšenou expresí onkogenu MYC [31]. Dalším z genů aktivovaných signální drahou TCF/ β -katenin je regulátor apoptózy a buněčné proliferace BIRC5 (survivin). Survivin je členem rodiny IAP (inhibitor of apoptosis protein) a jeho antiapoptotický účinek je spojen především s vazbou na různé druhy kaspáz a jejich inhibicí [31]. Zvýšená hladina antiapoptotického proteinu Bcl-2 zvyšuje u nádorových buněk schopnost přežívání a jejich rezistenci vůči proapoptickým stimulům, jako je odstranění růstových faktorů a glukózy, hypoxie, antionkogen p53 a chemoterapeutická léčba (je jedním z MDR „multi drug resistance“ proteinů) [31]. Snížená exprese byla pozorována u genů proapoptotických faktorů jako je TNFSF10 (TRAIL) a kaspáza 10 (CASP10). TRAIL funguje jako induktor apoptózy specificky v nádorových buňkách agonizací receptorů TRAIL-R1 a TRAIL-R2. Jeho snížená exprese v nádorové tkáni je spojena s nižší apoptotickou aktivitou. U kolorektálních karcinomů byla zvýšená exprese receptoru TRAIL-R1 pozitivně asociována s lepším disease free survival (DFS) a sníženým rizi-

kem relapsu onemocnění [32]. Na skupině genů spojených s buněčným cyklem a apoptózou byl pozorován nárůst exprese především u genů s antiapoptickým účinkem, naproti tomu sníženou expresí vykazovaly geny proapoptotické.

Všechny tři nalezené geny související s růstovými faktory (TGFB1, TGFB1, GDF15) patří do proteinové rodiny TGF- β . Alterace v TGF- β signální dráze byly u KRK dříve pozorovány především na úrovni TGF- β receptorů. Mutace v genu pro TGF- β receptor II se nacházejí u většiny KRK s mikrosatelitní nestabilitou a asi v polovině všech ostatních. Navíc zvýšená hladina proteinu SMAD4, který je jedním z intracelulárních transduktorů signálu TGF- β receptorů, byla asociována se signifikantně lepší prognózou KRK, a jeho deficience s neschopností TGF- β signální dráhy inhibovat proliferaci v G1-fázi buněčného cyklu, již dříve popsanou u transformovaných buněk [31].

Gen pro NME1 (nm23), kódující nukleotid difosfát kinázu, svůj název získal díky snížené expresi ve vysoce metastatických nádorových liniích. Tato inverzní asociace byla potvrzena také v klinické studii s KRK nemetastazujícími a metastazujícími do jater [32].

Tabulka č. 3: Čípkové studie zaměřené na stanovení prognózy a predikci léčebné odpovědi kolorektálních karcinomů

Reference	Rok	Čípková platforma	N sond	N genů +/-	Počet vzorků	Validace
Využití mikročipů ke stanovení prognózy						
Wang a kol. (45)	2004	Affymetrix GeneChip	22284	23	31 KRKDP, 43 KRKSP	GeneChip
Eschrich a kol. (46)	2005	cDNA microarray	31872	43	30 KRKDP, 45 KRKSP	
Barrier a kol. (43)	2005	Affymetrix GeneChip	22284	30	9 KRKDP, 9 KRKSP	
Arango a kol. (47)	2005	Affymetrix GeneChip	22284	218	15 KRKDP, 10 KRKSP	RT-PCR
Využití mikročipů k predikci léčebné odpovědi a její charakterizaci na molekulární úrovni						
Mariadason a kol. (48)	2003	cDNA microarray	9216	50	30 KRK buněčných linií	RT-PCR
Inoue a kol. (44)	2004	Affymetrix GeneChip	12000	neuvezeno	12 KRK	RT-PCR
Arango a kol. (49)	2004	cDNA microarray	9216	neuvezeno	30 KRK buněčných linií	
Ghadimi a kol. (51)	2005	cDNA microarray	9984	54	30 KRK	
Souza a kol. (50)	2005	Affymetrix GeneChip	22284	152/40	buněčná linie SW-620	RT-PCR
<i>N sond - odpovídá počtu genů detekovatelných daným čipem; N genů +/- - počet nalezených up/down regulovaných genů; RT-PCR - reverzní transkriptázová PCR; KRKDP - kolorektální karcinomy s dobrou prognózou; KRKSP - kolorektální karcinomy se špatnou prognózou</i>						

Další velkou skupinu tvoří geny pro metabolické enzymy a transportní proteiny. Změny v metabolických drahách mastných kyselin a jejich význam v karcinogenezi KRK byly vícekrát popsány [30,33]. U nalezeneho genu pro FABP1 byla snížená exprese již pozorována a předpokládá se, že bude mít funkci v diferenciaci enterocytů [13]. Ve většině DNA čípkových studií byla pozorována snížená exprese alespoň jednoho metalothioneinu, nejčastěji MT1A. Metalothioneiny (MT) jsou ubikvitární nízkomolekulární proteiny s vysokou afinitou k dvouvalentním kovům. Imunohistochemické studie na KRK prokázaly v souladu s výsledky čípkových analýz signifikantně sníženou expresi MT, negativně korelující s klinickým stádiem onemocnění a postižením lymfatických uzlin [21]. Často diskutovanými markery kolorektální karcinogeneze jsou karbonát anhydrázy CA2 a CA4. Karbonát anhydrázy reverzibilně hydratují CO₂ a jejich snížené hladiny v primární nádorové tkáni souvisí s mírou angiogeneze, invazivitou KRK (i jiných typů nádorových onemocnění) a rozvojem vzdálených metastáz [34]. Patogeneze nádorové růstu je spojena s přestavbou extracelulární matrix (ECM), redistribucí adhezivních molekul a aktivací angiogeneze. Pomocí DNA čípkové technologie byly nalezeny případně potvrzeny geny, které s těmito procesy souvisí. Agrawal a kol. (2002) identifikoval na souboru pacientů, kteří byli rozděleni do skupin podle jednotlivých klinických stádií onemocnění jako hlavní marker progresu kolorektálních karcinomů SSP1 (osteopontin). Osteopontin je glykoprotein vázající integriny, indukující antiapoptotické signální dráhy. Poměr hladin osteopontinu v normálním střevním epitelu (NSE) a KRK je 1:15, mezi NSE a jaterními metastázami KRK je 1:30 [35]. K nárůstu hladin osteopontinu pravděpodobně dochází stimulací Wnt signální dráhy jako u invazivních mamárních karcinomů, ovšem u KRK způsobené zvýšenou hladinou TCF/β-kateninu následkem mutací v APC genu [32]. Mezi nejčastěji prokázané stimulatory nádorové angiogeneze patří VEGF, což potvrzují i výsledky některých DNA čípkových studií. Jeho zvýšené hladiny v primárním nádoru a v krevním séru byly opakovaně pozitivně korelovány s horší prognózou nádorových onemocnění včetně KRK. VEGF hraje důležitou roli při tvorbě jaterních metastáz, ve kterých už ovšem k jeho zvýšené expresi nedochází. Vysvětluje se to hypoxickou indukci exprese VEGF v rostoucím primárním nádoru, která v dostatečně prokveném jaterním parenchymu není přítomna [32]. Matrix metaloproteinázy (MMP-1,-2,-3,-7,-11) mají komplexní úlohu v procesu nádorového růstu a metastazování, jejich zvýšené hladiny byly častokrát nalezeny v souvislosti s invazivitou a metastatickým potenciálem různých typů nádorů včetně KRK. Degradací bazálních membrán kompartmentových systémů ovlivňují nejen invazi nádoru do bezprostředního okolí nebo intra- a extravazaci nádorových buněk, ale také migraci buněk v místě tvorby vzdálených metastáz. Hrají významnou úlohu v procesu angiogeneze, a to vytvářením prostoru pro nově vznikající cévy, podporou mobility endotelií a invazí buněk nádorů do cév. Zvýšené hladiny matrix metaloproteináz u KRK jsou

v souladu s jejich biologickou funkcí [32]. Častokrát popisovaný nárůst v expresi kolagenu typu I. (COL1A2), jehož exprese je omezena pouze na fibroblasty, potvrzuje předchozí pozorování epitel-mezenchymálních interakcí u karcinomů prostaty, kde měly zásadní vliv na chování nádorových buněk, především jejich vlastnosti spojené s progresí a invazivitou [36]. DNA čípkové studie prokázaly schopnost odlišit nádorovou tkáň od normálního střevního epitelu na základě rozdílných profilů genové exprese. Výsledky těchto studií korelují se současnými znalostmi molekulárně biologické podstaty kolorektálních karcinomů a obohacují je o nové poznatky.

3. Kolorektální karcinomy různé anatomické lokalizace

Mnoho epidemiologických, morfologických a molekulárně biologických pozorování svědčí pro odlišnosti v karcinogenezi sporadických KRK v závislosti na jejich anatomické lokalizaci. Karcinomy levého a pravého colon mohou tvořit rozdílné skupiny nádorů díky svému rozlišnému embryonálnímu původu a díky tomu, že jsou vystaveny různému střevnímu obsahu. Pravostranné kolorektální karcinomy (PKRK) se častěji vyskytují u žen, zatímco levostranné (LKRK) jsou běžnější u mužů. PKRK a LKRK se také rozdílně klinicky manifestují a mají rozdílnou prognózu [37]. Přestože mají PKRK větší průměr a jsou hůře diferencované, vyznačují se příznivější prognózou a jsou spojeny se signifikantně lepší léčebnou odpovědí na 5-fluorouracil [15].

Studii zaměřenou pouze na porovnání LKRK a PKRK včetně přilehlého střevního epitelu (NSE) provedla Birkenkamp-Demtroderová a kol. (2005). Alterace v genové expresi našla u 186 genů v levostranných a 118 genů v pravostranných KRK. Levostranné KRK vykazovaly vůči pravostranným signifikantně nižší expresi cytokateratinů 8, 19 a 20, vyšší exprese byla pozorována u cyklooxygenázy 2 (COX2), caldesmonu 1 a transgelinu 11 [22].

Je zřejmé, že rozdíly v genové expresi mezi levostrannými a pravostrannými KRK existují, a pravděpodobně budou mít souvislost s jejich rozdílným vývojem a prognózou onemocnění. Nalézt mechanismus odpovědný za lepší léčebnou odpověď PKRK na 5-fluorouracil a přesněji charakterizovat LKRK a PKRK a jejich rozdíly na molekulární úrovni současný stav znalostí bohužel neumožňuje. Lokalizace KRK by se v budoucnosti mohla stát důležitým prognostickým a prediktivním faktorem při navrhování individuálního terapeutického plánu.

4. Srovnání kolorektálních karcinomů vzhledem k mikrosatelitní nestabilitě

Přibližně 90% hereditárních nepolypózních kolorektálních karcinomů (HNPCC) a 20% sporadických KRK vykazuje tzv. mikrosatelitní nestabilitu (MSI). Četné alterace mikrosatelitů krátkých repetitivních sekvencí DNA v průběhu celého genomu jsou způsobeny replikačními chybami DNA polymerázy, které vznikají během vývoje tumoru a nebyly adekvátním způsobem opraveny. Nádory vykazující mikrosatelitní nestabili-

tu většinou nejsou spojeny s mutacemi onkogenu RAS a nádorového supresoru p53, mají lepší prognózu a léčebnou odpověď a jejich expresní profily jsou odlišné od nádorů MSI-. Mori a kol. (2003) zjišťoval vliv mikrosatelitní nestability na profily genové exprese a srovnával jeho významnost s jinými molekulárními (status p53, mutace k-RAS, MLH1, MSH2) a klinickými charakteristikami (lokalizace, grade, věk, pohlaví, klinické stádium) pomocí vícerozměrné statistické analýzy PCA (analýza hlavních komponent). Z nalezených komponent korelujících s molekulárními a klinickými vlastnostmi měla největší vliv na variabilitu expresních profilů komponenta schopná signifikantně odlišit fenotyp MSI+ od MSI- ($p < 0,0001$). Pomocí této komponenty bylo možné statisticky významně rozlišit také anatomickou lokalizaci nádoru a histopatologický grade, které byly již dříve se stavem MSI asociovány. Nádory s fenotypem MSI+ byly méně diferencované a byly lokalizovány napravo. Několik genů tvořících tuto komponentu bylo již dříve v souvislosti s MSI zkoumáno nebo potvrzeno. Například snížená exprese genu MLH1, který je součástí systému zodpovědného za opravy chybného párování bází, proapoptotického genu BAX nebo zvýšená exprese genů pro glykoproteiny mucin 1 a mucin 5 [38]. Další specifickou vlastností MSI+ nádorů je častá infiltrace lymfocyty. Lymfocyty infiltrující nádorový epitel (IELs) jsou převážně cytotoxické, aktivované a uvolňují mediátory buněčné smrti. Fenotyp apoptotických MSI+ je spojen se zvýšenou apoptickou aktivitou, ale souvislost mezi IELs a apoptózou zatím nebyla prokázána. Někteří se domnívají, že IELs je pouze sekundární jev bez jakékoliv biologické relevance. DNA čipová studie provedená Banerjeem a kol. (2004) spíše potvrzuje imunogenní vlastnosti KRK s mikrosatelitní nestabilitou. Zvýšená exprese velkého množství genů prozánětlivých faktorů (interleukin 8 a 18, granulysin, HSP70, HSP110) a apoptotických genů (TNF induced protein, TRAIL), svědčí pro spojení IELs s aktivní imunitní odpovědí [39]. Follow-up analýzy potvrdily lepší celkové přežití u pacientů s tímto typem nádoru. Další možné vysvětlení lepší prognózy pacientů s KRK fenotypu MSI+ a jejich zvýšené apoptotické aktivity vychází z koncepce tzv. „oslabené malignity“, která je založena na předpokladu, že akumulace chyb způsobených špatným párováním bází může překonat svůj karcinogenní potenciál a v důsledku oslabit životaschopnost nádorových buněk [39]. Zvýšená apoptotická aktivita nádorů s MSI+ fenotypem bude ovšem ovlivněna spíše oběma výše uvedenými mechanismy než výhradně jedním z nich.

5. Primární nádory ve vztahu k rozvoji regionální a vzdálenostní progresse

V současné době se předpokládá, že schopnost metastázování získává pouze malá subpopulace buněk primárního nádoru somatickými mutacemi během nádorového růstu, odhadem méně než jedna na 10 miliónů nádorových buněk. Tuto představu o ojedinělých metastatických buňkách v mase primárního nádoru zpochybnila zásadní práce Ramaswamy a kol. (2002). Identifikovala skupinu 128 genů asociovaných s metastatickou tkání, které ji odlišovaly od tkáně primárního nádoru. Tento metastatický genový profil byl ovšem přítomen také v některých testovacích primárních nádorech, které byly chybně identifikovány jako metastatické ložisko. Na dalších 279 primárních adenokarcinomech různého původu byl metastatický genový profil signifikantně asociován s nádory, u kterých došlo k rozvoji metastáz a měly horší prognózu. Ramaswamy formulovala hypotézu, že program genové exprese metastatického onemocnění může být přítomen již v molekulární výbavě primárního nádoru, a proto identifikovatelný v době diagnózy [36]. Postižení regionálních lymfatických uzlin je jedním z nejdůležitějších prognostických faktorů KRK a klíčovým kritériem klinických klasifikačních systémů. Jejich předoperační diagnostika má význam pro indikaci neoadjuvantní chemoradiotherapie u rektálních karcinomů a radikalitu chirurgického zákro-

ku. Bohužel citlivost standardních zobrazovacích metod (CT, PET) se pohybuje pouze mezi 50 a 60%. Bertucci a kol. (2004) identifikoval sadu 46 genů se statisticky významně rozdílnou expresí v primárních nádorech spojených s metastatickým postižením regionálních uzlin. Tato sada genů souvisela také s relapsem nádorového onemocnění [20]. Na klinické využití čipové technologie v diagnostice postižení regionálních uzlin se zaměřil Croner a kol. (2005). Srovnával schopnost předoperační predikce regionálních metastáz pomocí expresních profilů a konvenčních zobrazovacích metod. Po doplnění výsledků čipové studie ke standardním diagnostickým algoritmům se jejich senzitivita zvýšila přibližně o 12% [40]. Přítomnost molekulárního profilu spojeného s rozvojem jaterních metastáz v primárních KRK ověřoval Li a kol. (2004). Identifikoval soubor 429 genů se signifikantně rozdílnou expresí mezi nádory nemetastazujícími a metastazujícími do jater [41].

U studií s pokročilými kolorektálními karcinomy bohužel není možné rozlišit jestli k alteracím v jejich expresních profilech došlo v časných nebo pozdních stádiích karcinogeneze. Proto jejich klinické využití pro prognózu a predikci diseminace je diskutabilní. K relevantním výsledkům by bylo možné dospět pouze pomocí velkého souboru prospektivně sledovaných pacientů.

6. Využití mikročipů ke stanovení prognózy

Prognosticky odlišné skupiny pacientů s kolorektálními karcinomy se v současnosti vymezují na základě histologické klasifikace, gradingu, klinického rozsahu a ojedinělých molekulárních markerů. Tyto faktory jsou pro chirurgicky vyléčené pacienty rozhodující z hlediska indikace adjuvantní chemoterapie. Jejich prediktivní síla ovšem není dostatečná a 25-30% pacientů v klinickém stádiu (dále jen stádium) Dukes B umírá do pěti let na relaps nádorového onemocnění. Racionální přístup k indikaci adjuvantní léčby nabízí molekulární charakterizace této vysoce rizikové podskupiny pomocí technologie DNA čipů.

Nadějné výsledky přinesla studie zaměřená na hledání nových prognostických markerů relapsu onemocnění využitím oligonukleotidových mikročipů Affymetrix U133a. Na souboru 74 pacientů ve stádiu Dukes B byla identifikována sada 23 genů, která na nezávislém validačním souboru 36 pacientů predikovala relaps s přesností 78% [45].

DNA mikročipy byly použity k vytvoření molekulárního stagingu KRK, který měl výrazně vyšší prognostický potenciál než standardní Dukesova klasifikace [46]. Pro 78 vzorků kolorektálních karcinomů byly získány expresní profily, 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% ($p < 0,001$). Na základě molekulární klasifikace byla navíc ze skupiny pacientů ve stádiu Dukes B vyčleněna podskupina, která měla horší prognózu než část pacientů ve stádiu Dukes C. Prognostická síla této skupiny genů byla validována na nezávislé skupině 95 pacientů z jiné než testovací populace s využitím rozdílné čipové platformy. Konverze mezi jednotlivými technologiemi znamenala redukci genové sady z 43 na 26 genů a její schopnost predikce 36 měsíčního přežití byla 78% [46]. Pro dobrou reprodukovatelnost a vysoký prognostický potenciál tohoto souboru genů svědčí nejen zachování vysoké predikční síly při validaci na velkém souboru jiné populace při použití jiné čipové technologie, ale také výskyt genů již dříve asociovaných s progresí onemocnění v tomto souboru.

Retrospektivní studii zaměřenou na predikci relapsu onemocnění provedl na souboru 25 pacientů klinického stádia Dukes C, u kterých byl jedinou léčebnou modalitou radikální chirurgický zákrok Arango a kol. (2005). Je to jediná práce, ve které byla vstupním materiálem RNA izolovaná z tkání fixovaných ve formalinu a uložených v parafinových bločcích

(FFPE). Podmínkou studií založených na FFPE je důkladná kontrola kvality vstupního materiálu (u této studie znamenala redukci z 91 na 25 vzorků). Získaný klasifikátor tvořený 17 geny byl schopný při cross-validaci správně zařadit 88% pacientů a rozdělit je z hlediska dlouhodobého DFS na hladině pravděpodobnosti ($p < 0,0001$) [47]. Tato práce dokazuje, že je možné provádět retrospektivní čipové studie založené na formalinem fixovaných tkáních, ale musí být dodržena přísná kritéria pro kontrolu kvality vstupního materiálu.

7. Využití mikročipů k predikci léčebné odpovědi a její molekulární charakterizaci

Současná klinická onkologie staví na výsledcích randomizovaných klinických studií a za léčebný standard je přijímán statisticky nejlepší léčebný postup. Přitom se nebere ohled na skutečnost, že i chemoterapie dosahující statisticky horšího výsledku může být individuálně účinnější. Současné možnosti prediktivní onkologie bohužel nenabízejí dostatečně senzitivní testy schopné predikovat léčebnou odpověď v rutinní klinické praxi. Doposud prováděné testování ojedinelých např. metabolických markerů cytostatik jako je tymidylát syntáza (TS), tymidin fosforyláza (TP) a dihydropyrimidin dehydrogenáza (DPD), se ukázalo jako nedostatečně účinné. Hned první DNA čipové studie na buněčných liniích kolorektálních karcinomů potvrdily, že mechanismus nádorové rezistence je značně komplexnější problém, když různá cytostatika indukovala expresi řádově až stovek genů [48, 49]. Nejčastěji zkoumaným cytostatikem je 5-fluorouracil (5-FU), který přestože je společně s leukovorinem léčbou první volby při adjuvantní chemoterapii kolorektálních karcinomů, má léčebný efekt pouze u přibližně 20% pacientů. Mariadason a kol. (2003) identifikoval 50 genů korelujících s apoptózou indukovanou účinkem 5-FU na 30 buněčných liniích KRK. Tento soubor genů byl schopný předikovat léčebnou odpověď signifikantně účinněji než používané prediktory jako jsou TS, TP, DPD, status p53 nebo mikrosatelitní nestabilita [48].

Inhibitor topoizomerázy I, irinotekan se indikuje samostatně u 5-FU rezistentních pacientů nebo v kombinaci s 5-FU a leukovorinem (režim FOLFIRI) při léčbě pokročilého KRK. Nové mechanismy účinku irinotekanu (jeho aktivního derivátu SN-38) byly studovány na buněčné lince SW-620. Indukce více než dvojnásobné změny exprese byla pozorována u 192 genů [50].

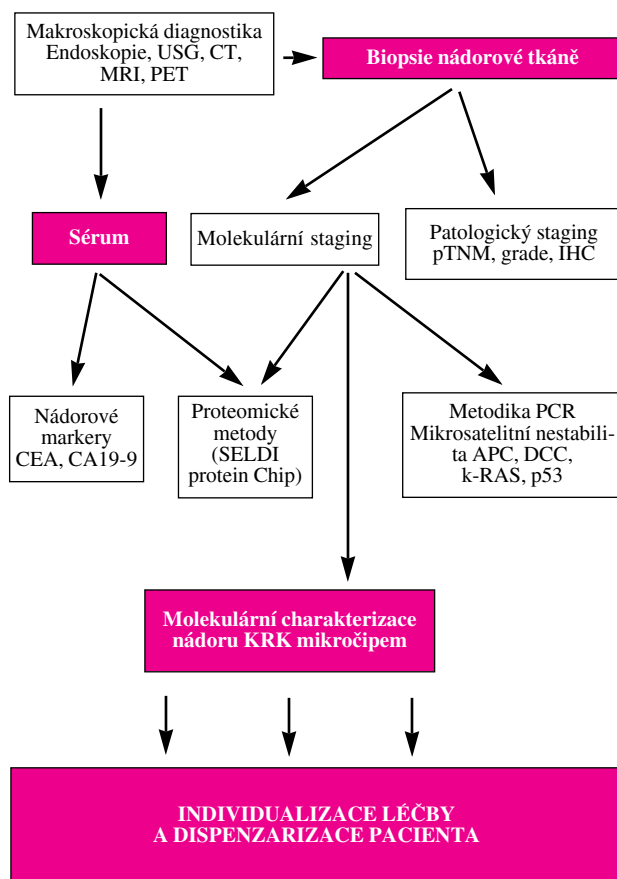
Dalším lékem používaným v kombinaci s 5-FU a leukovorinem je oxaliplatin (režim FOLFOX). Vystavení nádorových buněk účinku oxaliplatinu vede k zablokování G2/M přechodu buněčného cyklu a indukci apoptózy. Na 30 KRK buněčných liniích našel Arango a kol. (2004) soubor genů, mj. obsahujících geny zapojené do apoptózy a oprav DNA, schopný predikovat léčebnou odpověď na oxaliplatinu s vyšší senzitivitou než mutační status p53. Schopnost predikce při cross-validaci byla statisticky významná na hladině pravděpodobnosti $p=0,002$ [49].

8. Souhrn - klinické využití mikročipové technologie u pacientů s kolorektálními karcinomy

DNA čipové studie prokázaly schopnost odlišit nádorovou tkáň od normálního střevního epitelu na základě rozdílných profilů genové exprese, a výsledky těchto studií korelují se současnými znalostmi molekulárně biologické podstaty KRK a obohacují je o nové poznatky. Profily genové exprese podpořily hypotézu o rozdílném mechanismu karcinogeneze v levé

a pravé části tlustého střeva a význam anatomické lokalizace nádoru pro prognózu onemocnění a predikci léčebné odpovědi. KRK byly molekulárně charakterizovány z hlediska mikrosatelitní nestability. V karcinogenním procesu nádorů MSI- a MSI+ byly identifikovány rozdíly, které korelují s anatomickou lokalizací nádoru. Nádory MSI+ jsou převážně pravostranné a mají lepší prognózu. V primárních nádorech se podařilo identifikovat znaky regionálních a vzdálených metastáz. Průměrná senzitivita predikce relapsu nádorového onemocnění a délky celkového přežití byla u obou parametrů přibližně 80%. Výzkum predikce léčebné odpovědi byl doposud prováděn především na buněčných liniích a DNA čipy zde prokázaly velice dobré analytické vlastnosti.

Obrázek 1: Návrh doplněného diagnostického schématu pacientů s kolorektálním karcinomem



Výsledky DNA čipových studií společně se současnými poznatky o molekulární biologii nádorů by v budoucnu mohly sloužit k navržení specifického KRK nízkohustotního DNA čipu, schopného molekulárně charakterizovat daný nádor a to především z hlediska jeho invazivních vlastností, metastatického potenciálu a rezistence na běžně používaná cytostatika. Získaný expresní profil by zapojením do standardního diagnostického schématu (viz obr. č. 1) umožňoval společně s proteomickými metodami a ostatními používanými diagnostickými kritérii přesnější staging více korelující s klinickým stavem pacienta a biologii nádoru, odhad pravděpodobnosti relapsu onemocnění a parametru celkového přežití a citlivosti nádorových buněk k různým chemoterapeutickým režimům. Klinické využití profilů genové exprese bude znamenat zásadní krok vedoucí směrem k individualizaci léčby a dispenzarizace pacientů s kolorektálními karcinomy.

Poděkování

Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR NR/9076 - 4.

Literatura

1. Svoboda M, Michálek J: Úvod do technologie DNA čipů. *Lék. a Techn.* 35:67-75, 2004
2. Pospíšilová, Mayer J: DNA čipy - moderní metodika analýzy diferenciální genové exprese a její význam pro diagnostiku a léčbu nádorových onemocnění. *Cas Lek ces* 144:11-17, 2005
3. Gabriele L, Moretti F, Pierotti MA, et al: The use of microarray technologies in clinical oncology. *J Transl Med* 4:8, 2006
4. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, et al: Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 286:531-7, 1999
5. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al: Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415:530-6, 2002
6. Liefers GJ, Tollenaar RA: Cancer genetics and their application to individualised medicine. *Eur J Cancer* 38:872-9, 2002
7. Croner RS, Foertsch T, Brueckl WM, et al: Common denominator genes that distinguish colorectal carcinoma from normal mucosa. *Int J Colorectal Dis* 20:353-62, 2005
8. Jansová E, Koutná I, Krontorad P, et al: Comparative transcriptome maps: a new approach to the diagnosis of colorectal carcinoma patients using cDNA microarrays. *Clin Genet* 69:218-27, 2006
9. Kitahara O, Furukawa Y, Tanaka T, et al: Alterations of gene expression during colorectal carcinogenesis revealed by cDNA microarrays after laser-capture microdissection of tumor tissues and normal epithelia. *Cancer Res* 61:3544-9, 2001
10. Notterman DA, Alon U, Sierk AJ, et al: Transcriptional gene expression profiles of colorectal adenoma, adenocarcinoma, and normal tissue examined by oligonucleotide arrays. *Cancer Res* 61:3124-30, 2001
11. Okuno K, Yasutomi M, Nishimura N, et al: Gene expression analysis in colorectal cancer using practical DNA array filter. *Dis Colon Rectum* 44:295-9, 2001
12. Pinheiro NA, Caballero OL, Soares F, et al: Significant overexpression of oligophrenin-1 in colorectal tumors detected by cDNA microarray analysis. *Cancer Lett* 172:67-73, 2001
13. Takemasa I, Higuchi H, Yamamoto H, et al: Construction of preferential cDNA microarray specialized for human colorectal carcinoma: molecular sketch of colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 285:1244-9, 2001
14. Tsunoda T, Nakamura T, Ishimoto K, et al: Upregulated expression of angiogenesis genes and down regulation of cell cycle genes in human colorectal cancer tissue determined by cDNA macroarray. *Anticancer Res* 21:137-43, 2001
15. Birkenkamp-Demtroder K, Christensen LL, Olesen SH, et al: Gene expression in colorectal cancer. *Cancer Res* 62:4352-63, 2002
16. Lin YM, Furukawa Y, Tsunoda T, et al: Molecular diagnosis of colorectal tumors by expression profiles of 50 genes expressed differentially in adenomas and carcinomas. *Oncogene* 21:4120-8, 2002
17. Saito A, Fujii G, Sato Y, et al: Detection of genes expressed in primary colon cancers by in situ hybridisation: overexpression of RACK 1. *Mol Pathol* 55:34-9, 2002
18. Zou TT, Selaru FM, Xu Y, et al: Application of cDNA microarrays to generate a molecular taxonomy capable of distinguishing between colon cancer and normal colon. *Oncogene* 21:4855-62, 2002
19. Williams NS, Gaynor RB, Scoggin S, et al: Identification and validation of genes involved in the pathogenesis of colorectal cancer using cDNA microarrays and RNA interference. *Clin Cancer Res* 9:931-46, 2003
20. Bertucci F, Salas S, Eysteries S, et al: Gene expression profiling of colon cancer by DNA microarrays and correlation with histoclinical parameters. *Oncogene* 23:1377-91, 2004
21. Jansová E, Krontorad P, Svoboda Z, et al: Nové možnosti v diagnostice kolorektálního karcinomu s využitím technologie DNA mikročipů. *Klinická onkologie* 17:203-207, 2004
22. 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
23. Chiu ST, Hsieh FJ, Chen SW, et al: Clinicopathologic correlation of up-regulated genes identified using cDNA microarray and real-time reverse transcription-PCR in human colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:437-43, 2005
24. Tibshirani R: A simple method for assessing sample sizes in microarray experiments. *BMC Bioinformatics* 7:106, 2006
25. Shih W, Chetty R, Tsao MS: Expression profiling by microarrays in colorectal cancer (Review). *Oncol Rep* 13:517-24, 2005
26. Kim BS, Kim I, Lee S, et al: Statistical methods of translating microarray data into clinically relevant diagnostic information in colorectal cancer. *Bioinformatics* 21:517-28, 2005
27. Draghici S, Khatri P, Eklund AC, et al: Reliability and reproducibility issues in DNA microarray measurements. *Trends Genet* 22:101-9, 2006
28. Moreau Y, Aerts S, De Moor B, et al: Comparison and meta-analysis of microarray data: from the bench to the computer desk. *Trends Genet* 19:570-7, 2003
29. Wang D, Yang W, Du J, et al: MGSA/GRO-mediated melanocyte transformation involves induction of Ras expression. *Oncogene* 19:4647-59, 2000
30. Galamb O, Sipos F, Fischer K, et al: The results of the expression array studies correlate and enhance the known genetic basis of gastric and colorectal cancer. *Cytometry B Clin Cytom* 68:1-17, 2005
31. Watson AJ: An overview of apoptosis and the prevention of colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 57:107-21, 2006
32. Bird NC, Mangnall D, Majeed AW: Biology of colorectal liver metastases: A review. *J Surg Oncol* 94:68-80, 2006
33. Yeh CS, Wang JY, Cheng TL, et al: Fatty acid metabolism pathway play an important role in carcinogenesis of human colorectal cancers by Microarray-Bioinformatics analysis. *Cancer Lett*, 2005
34. Bekku S, Mochizuki H, Yamamoto T, et al: Expression of carbonic anhydrase I or II and correlation to clinical aspects of colorectal cancer. *Hepato-gastroenterology* 47:998-1001, 2000
35. Agrawal D, Chen T, Irby R, et al: Osteopontin identified as lead marker of colon cancer progression, using pooled sample expression profiling. *J Natl Cancer Inst* 94:513-21, 2002
36. Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, et al: A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet* 33:49-54, 2003
37. Iacopetta B: Are there two sides to colorectal cancer? *Int J Cancer* 101:403-8, 2002
38. Mori Y, Selaru FM, Sato F, et al: The impact of microsatellite instability on the molecular phenotype of colorectal tumors. *Cancer Res* 63:4577-82, 2003
39. Banerjee A, Ahmed S, Hands RE, et al: Colorectal cancers with microsatellite instability display mRNA expression signatures characteristic of increased immunogenicity. *Mol Cancer* 3:21, 2004
40. Croner RS, Peters A, Brueckl WM, et al: Microarray versus conventional prediction of lymph node metastasis in colorectal carcinoma. *Cancer* 104:395-404, 2005
41. Li M, Lin YM, Hasegawa S, et al: Genes associated with liver metastasis of colon cancer, identified by genome-wide cDNA microarray. *Int J Oncol* 24:305-12, 2004
42. Yanagawa R, Furukawa Y, Tsunoda T, et al: Genome-wide screening of genes showing altered expression in liver metastases of human colorectal cancers by cDNA microarray. *Neoplasia* 3:395-401, 2001
43. Barrier A, Lemoine A, Boelle PY, et al: Colon cancer prognosis prediction by gene expression profiling. *Oncogene* 24:6155-64, 2005
44. Inoue Y, Shirane M, Miki C, et al: Gene expression profiles of colorectal carcinoma in response to neo-adjuvant chemotherapy. *Int J Oncol* 25:1641-9, 2004
45. Wang Y, Jatke 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
46. Eschrich S, Yang I, Bloom G, et al: Molecular staging for survival prediction of colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 23:3526-35, 2005
47. Arango D, Laiho P, Kokko A, et al: Gene-expression profiling predicts recurrence in Dukes' C colorectal cancer. *Gastroenterology* 129:874-84, 2005
48. Mariadason JM, Arango D, Shi Q, et al: Gene expression profiling-based prediction of response of colon carcinoma cells to 5-fluorouracil and camptothecin. *Cancer Res* 63:8791-812, 2003
49. Arango D, Wilson AJ, Shi Q, et al: Molecular mechanisms of action and prediction of response to oxaliplatin in colorectal cancer cells. *Br J Cancer* 91:1931-46, 2004
50. Souza V, Dong YB, Zhou HS, et al: SW-620 cells treated with topoisomerase I inhibitor SN-38: gene expression profiling. *J Transl Med* 3:44, 2005
51. Ghadimi BM, Grade M, Difilippantonio MJ, et al: Effectiveness of gene expression profiling for response prediction of rectal adenocarcinomas to preoperative chemoradiotherapy. *J Clin Oncol* 23:1826-38, 2005

APLIKACE DNA ČIPŮ U LYMFOIDNÍCH MALIGNIT

DNA MICROARRAYS IN LYMPHOID MALIGNANCIES

SVOBODA M.^{1,2}, VÁŠOVÁ I.^{2,3}, KOTAŠKOVÁ J.¹, MALČÍKOVÁ J.³, FABIÁN P.¹, TICHÝ B.³, BERKOVCOVÁ J.⁴, KLABUSAY M.^{2,3}, REJTHAR A.⁵

¹ MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV BRNO

² LÉKAŘSKÁ FAKULTA MASARYKOVY UNIVERZITY BRNO

³ INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

⁴ LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ MEDICÍNY PŘI DĚTSKÉ KLINICE LF UP A FN OLOMOUC

⁵ PATOLOGICKO ANATOMICKÝ ÚSTAV, FN U SV. ANNY, BRNO

Souhrn

Diagnostika hematologických malignit je v současnosti založena na morfologických kritériích, doplněných o analýzy několika molekulárních markerů. Uvnitř řady takto definovaných jednotek však pacienti vykazují heterogenní odpověď na aplikovanou léčbu a odlišný klinický vývoj onemocnění. Vystává tedy otázka, co je příčinou tohoto stavu? Selhávají stávající diagnostické metody nebo klasifikační systémy hematologických malignit? Zhoubné novotvary obecně představují chorobu genomu. Z tohoto důvodu je naděje vkládána do DNA čipů (DNA microarrays), neboť se jedná o zařízení schopné ve velmi krátkém čase paralelně detekovat a kvantifikovat expresi až desítky tisíc genů. DNA čipové analýzy nám umožňují globální pohled na genovou expresi nádoru a identifikaci molekulárních markerů důležitých pro diagnostiku, klasifikaci a predikci nádorového onemocnění, zejména se zřetelem na vývoj a efektivní použití cílené terapie. V případě lymfoidních malignit DNA čipy již přinesly několik významných objevů s jednoznačným klinickým dopadem. Jejich souhrn přinášíme v našem přehledovém článku.

Klíčová slova: lymfom, leukémie, DNA čipy, predikce a prognóza, cílená léčba.

Summary

The diagnosis of hematologic malignancies is currently based on morphology and analysis of a few of molecular markers of cancer cells. Responses to treatment and clinical outcomes of patients within these diagnostic categories are heterogenous. What is the reason of this situation? The inadequacy of existing diagnostic methods or diagnostic categories? Cancer is, in essence, a genetic disease. DNA microarrays represents a tool capable of both detecting and quantifying expression of tens of thousands genes (expression profiling) in a very short period of time. On this account DNA microarrays are used to identify new molecular markers important for diagnostic and classification of cancer and prediction of treatment outcome. The aim of this review article is to introduce to some fundamental discoveries provided by microarray technology in lymphoid malignancies.

Key words: lymphoma, leukemia, microarrays, prediction and prognosis, target therapy.

Diagnostika hematologických malignit je v současnosti založena na morfologických kritériích, doplněných o analýzy několika molekulárních markerů. Uvnitř řady takto definovaných jednotek pacienti vykazují heterogenní odpověď na aplikovanou léčbu a odlišný klinický vývoj onemocnění. Vystává tedy otázka, co je příčinou tohoto stavu? Selhávají stávající diagnostické metody nebo klasifikační systémy hematologických malignit? Obecně lze konstatovat, že zhoubné novotvary představují chorobu genomu, jehož patologické alterace (chromozomální aberace nebo genové mutace) vedou k maligní transformaci buňky a kumulace těchto změn ovlivňuje vývoj nádorového onemocnění. Relativně vysoký počet genů s primárně (onkogeny a supresorové geny), ale zejména se sekundárně pozměněnou expresí je možnou příčinou stavu, kdy na základě analýzy jednoho nebo několika z nich nelze vždy dosáhnout optimální diagnostické diskriminanty nebo prediktivního faktoru daného onemocnění. Z tohoto důvodu je naděje vkládána do DNA čipů (DNA microarrays), které představují zařízení schopné ve velmi krátkém čase paralelně detekovat a kvantifikovat expresi až desítky tisíc genů (stanovit profil genové exprese) a nebo

identifikovat variabilitu genetického kódu. DNA čipové analýzy nám umožňují globální pohled na genovou expresi nádoru a identifikaci molekulárních markerů důležitých pro diagnostiku, klasifikaci a predikci nádorového onemocnění, zejména se zřetelem na vývoj a efektivní použití cílené terapie (1). V případě lymfoidních malignit DNA čipy již přinesly řadu významných objevů s jednoznačným klinickým dopadem. Jejich souhrn přinášíme v našem přehledovém článku.

1. DIFÚZNÍ VELKOBUNĚČNÝ LYMFOM Z B-LYMFOCYTŮ (DLBCL)

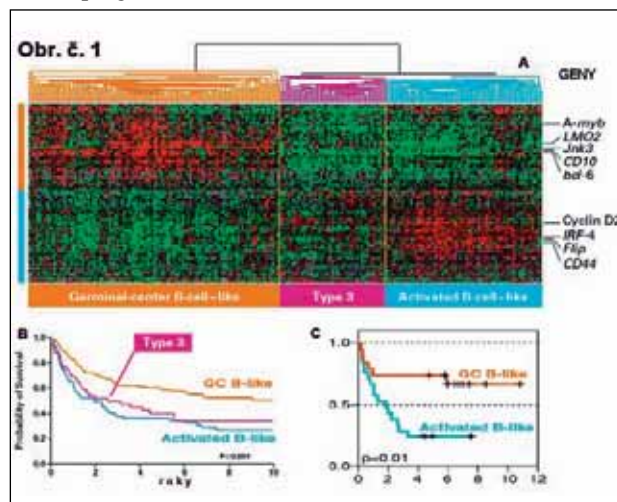
DLBCL má nejvyšší incidenci z celé skupiny ne Hodgkinských lymfomů (NHL). Jedná se o agresivní onemocnění, jehož potenciální kurabilita souvisí zejména se zavedením kombinované chemoterapie založené na antracyclinech, která vede k vyléčení přibližně 40% pacientů. Modifikace režimů chemoterapie, ať už v podobě intenzifikace nebo počtu cytostatik, nepřinesly přesvědčivé změny v léčebných výsledcích. Určitá naděje spočívá v biologické terapii monoklonálními protilátkami (2). Klinická heterogenita onemocnění proto vede ke snaze o identifikaci prognostických markerů. Jak se ukázalo

na začátku osmdesátých let, morfologická kritéria (definující např. imunoblastickou, centroblastickou, anaplastickou variantu DLBCL) nedosahovala přesvědčivého prognostického významu (3). S postupným rozvojem imunohistochemických a později zejména molekulárně genetických metod, bylo možné studovat expresi jednotlivých markerů na proteinové nebo genové úrovni. Ani s touto pomocí však nedošlo k nalezení silných prediktorů, neboť u řady z nich existovaly rozporuplné výsledky (např. CD10, CD44, BCL-6) (4,5,6). Tyto rozpaky se staly mnohem znatelnějšími ve světle pozitivních výsledků mezinárodního projektu „International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project“, založeného však na analýze běžně dostupných klinických parametrů a laboratorních vyšetření. Jeho závěry byly publikovány v roce 1993, a to v podobě prognostického indexu „IPI“ (International Prognostic Index) (7). Index IPI dosahoval mnohem vyšší prognostické síly než tradičně používaná klinická stádia, na druhou stranu nebylo možné přehlédnout, že mezi pacienty uvnitř jednotlivých prognostických skupin stále existovaly významné rozdíly ve vývoji choroby. S ohledem na podstatu nádorového onemocnění jsou v současnosti naděje vkládány zejména do komplexních analýz genové exprese pomocí technologie DNA čipů (1).

1.1. Molekulární taxonomie DLBCL

Jak již bylo uvedeno, subklasifikace DLBCL na základě morfologických kritérií neměla v klinickém vývoji onemocnění odpovídající korelát. Až použití DNA čipů vedlo k odhalení nových variant DLBCL, které se výrazně liší svým biologickým chováním. První práci na toto téma publikoval A. Alizadeh s kolektivem svých stanfordských spolupracovníků. Autoři pro tento účel použili DNA čipy vlastní produkce, tzv. lymfočipy, nesoucí na svém povrchu sondy pro více než 17 000 genů exprimovaných zejména v lymfocytech a v lymfatické tkáni. Získané hodnoty genové exprese byly podrobeny shlukové analýze, která na základě jejich podobnosti identifikovala dvě dosud nerozpoznané varianty DLBCL, označené jako: „Germinal Center B-cell like DLBCL“ (GCBC-like DLBCL; B-lymfocytům zárodečného centra podobný DLBCL) a „Activated B-cell like DLBCL“ (ABC-like DLBCL; aktivovaným B-lymfocytům podobný DLBCL). Názyvy byly odvozeny z podobnosti profilů genové exprese obou variant s profily B-lymfocytů vycházejících buď ze zárodečného centra (GC-germinal center) lymfatického folikulu, nebo z antigenem aktivovaných a mitoticky aktivních B-lymfocytů periferní krve. Zajímavé zjištění nastalo po korelaci uvedené molekulární klasifikace DLBCL s klinickými údaji. Pacienti s GCBC-like DLBCL (21 případů) měli signifikantně lepší výsledky 5ti-letého přežití, než pacienti s ABC-like DLBCL (22 případů) (76% vs 16% pacientů, $p < 0,01$; obrázek č. 1C). Multivariabilní analýza potvrdila, že tato klasifikace je nezávislým prognostickým faktorem, schopným stratifikovat i pacienty se stejnou hodnotou indexu IPI (8). Stanfordská skupina ve svém výzkumu pokračovala a o dva roky později publikovala práci, která obsahovala výsledky analýzy souboru 240 pacientů s DLBCL. Zřejmě vyšší počet lymfomů způsobil, že mezi původně dvěma zřetelně odlišnými variantami byla nalezena varianta třetí, označená jednoduše „Type-3 DLBCL“ (třetí typ DLBCL). Všechny tři varianty DLBCL se lišily profilem genové exprese (obrázek č. 1A), i když v parametrech přežití přetrvávaly jednoznačné rozdíly jen mezi ABC-like a GCBC-like DLBCL (5-leté přežití ve skupině GCBC-like DLBCL 60% pacientů, ABC-like DLBCL 35%, Type-3 DLBCL 39%, obrázek č. 1B) (9). Uvedená molekulární klasifikace byla později transformována na proteinovou úroveň, kde je založena na imunohistochemické detekci (IHC) několika antigenů. GCBC-like DLBCL jsou od ABC-like DLBCL odlišeny nejčastěji na základě pozitivní exprese povrchového antigenu CD10 a/nebo proteinu BCL-6 a negativní exprese proteinu

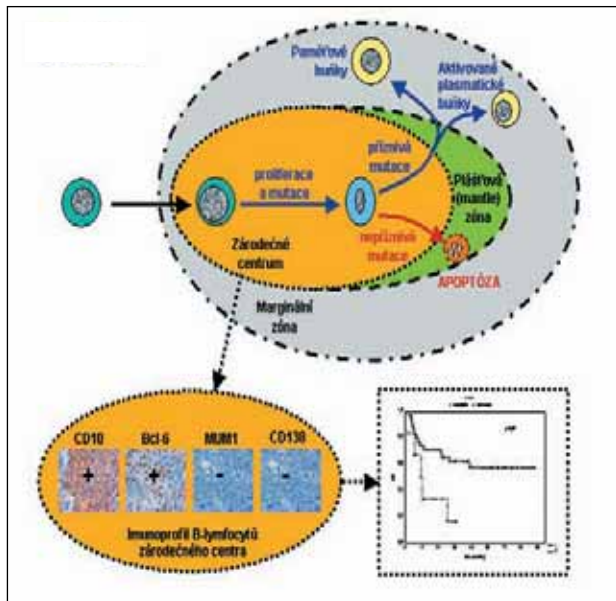
MUM1/IRF4 (multiple myeloma-1/interferon regulatory factor-4) a povrchového antigenu CD138 (10). I naše vlastní, dosud nepublikované, výsledky získané z hodnocení souboru 48 pacientů s DLBCL ukazují, že obě výše uvedené varianty DLBCL jsou identifikovatelné pomocí IHC a mají rozdílnou prognózu (obrázek č.2).



Obrázek č. 1: (A) Dendrogram shlukové analýzy, na kterém je patrné rozdělení DLBCL (sloupce) do tří skupin definovaných na základě podobnosti exprese vybrané skupiny genů (řádky): 1. Germinal Center B-cell like DLBCL; 2. Type-3 DLBCL; 3. Activated B-cell like DLBCL. Expresí genů je v dendrogramu kódována barevně. Zelená barva značí nízkou, červená barva vysokou a černá barva průměrnou expresi daného genu v daném DLBCL. Šedá barva označuje gen, jehož exprese nebyla vyhodnocena. Na pravé straně dendrogramu jsou uvedeny geny s nejvyšší diskriminační hodnotou. Převzato a upraveno z ref. č. 9, podrobně viz. text. (B a C) Kaplan-Meierovy křivky pravděpodobnosti celkového přežití u pacientů s jednotlivými variantami DLBCL, kteří byli léčení kombinovanou chemoterapií založenou na antracyclinech. Hodnoty na ose „x“ jsou uvedeny v letech. (B) převzato a upraveno z reference č. 9, podrobně viz. text. (C) převzato a upraveno z reference č. 8, podrobně viz. text. Jak ukazují křivky Type-3 DLBCL a Activated B-cell like DLBCL mají horší prognózu, než Germinal Center B-cell like DLBCL. Rovněž profil genové exprese vykazuje větší podobnost mezi Type-3 DLBCL a Activated B-cell like DLBCL.

DNA čipové analýzy přispěly rovněž k molekulární charakteristice dalších varianty DLBCL, a to primárně mediastinálního B-lymfocytárního lymfomu (mediastinal large B-cell lymphoma, MLBCL). MLBCL není histopatologickými metodami jednoznačně odlišitelný (11) a jeho diagnostika se proto opírá o korelaci klinických údajů s diagnózou DLBCL. Incidence MLBCL převažuje u mladších pacientů, častěji jsou to ženy (1,8:1), medián věku se nachází v rozmezí 30-35 let. Onemocnění typicky postihuje zejména mediastinum, ale může i „metastazovat“, nejčastěji do ledvin, CNS a jater (11,12). MLBCL je agresivní onemocnění, na druhou stranu relativně dobře odpovídá na primární léčbu. Některé studie prokázaly dosažení lepších léčebných výsledků než u klasického DLBCL, pakliže byla chemoterapie kombinována s radioterapií (3-leté přežití v 82% případů) (13). Jak jsme již uvedli, z morfologického pohledu není MLBCL od DLBCL jednoznačně odlišitelný. Obě varianty vykazují difúzní proliferaci velkých B-lymfocytů s bledou cytoplasmou a ani na úrovni jednotlivých molekulárních znaků není patrná výrazná diference. Jejich imunofenotyp sdílí přítomnost povrchových antigenů typických pro B-lymfocytární linii (CD19, CD20, CD22 a CD79a), ale na rozdíl od DLBCL, MLBCL postrádají imunoglobulinovou komponentu BCR receptoru a pouze vyjimečně nesou translokaci BCL-2 nebo BCL-6 genu. Naopak nadměrnou sklerotizaci potvrzuje zvýšená exprese genů extracelulární matrice ve vzorcích MLBCL, zejména fibronectinu a kolagenu typ III a IV (11,12). O buněčném původu MLBCL nebyl dosud učiněn definitivní závěr. Výsledky CGH (comparative genomic hybridization) a DNA

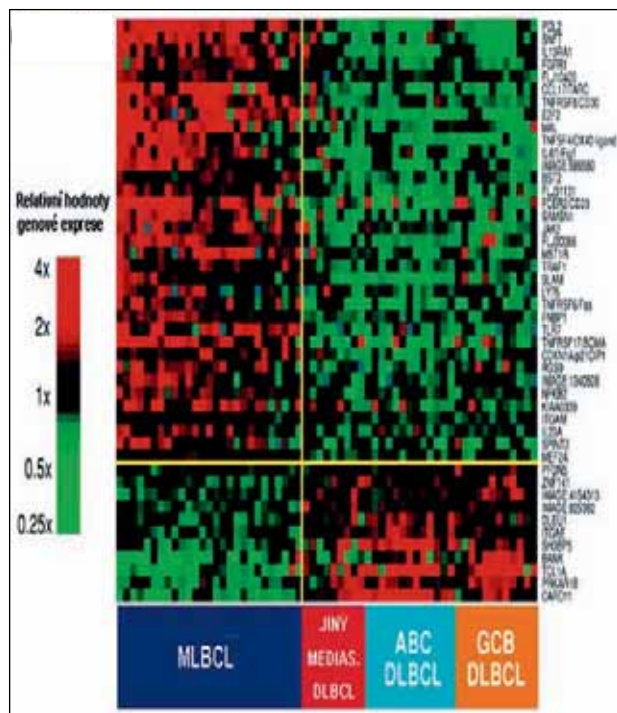
čipových analýz odhalily na úrovni genomu podobnost mezi MLBCL a klasickým Hodgkinovým lymfomem typu nodulární sklerózy (HL-NS). MLBCL a HL-NS sdílejí některé chromosomální a genové abnormality, například amplifikaci krátkého raménka chromosomu 9 (75% MLBCL) a 2 (20% MLBCL), které způsobují zvýšenou expresi genů JAK2, PDL2, PDL1 (9p24) a REL (2p16). Tyto změny jsou u DLBCL detekovány jen velmi zřídka, stejně jako zvýšená exprese proteinů CD30, MAL, STAT1, TRAF1, IL-13R α , CD58 a TARC. (11,12). Podobnost na molekulární úrovni zčásti potvrzují i kazuistiky z klinické praxe popisující pacienty s HL-NS, u kterých dochází do jednoho roku od ukončení léčby k relapsu choroby, která nese jednoznačné histopatologické charakteristiky DLBCL (14). Byly ale zaznamenány i opačné případy (12). Zajímavou práci na toto téma publikoval A. Rosenwald, který se svými spolupracovníky z NCI (National Cancer Institute, USA) analyzoval rozsáhlou skupinu 274 pacientů s DLBCL. Autoři identifikovali 46 genů, jejichž exprese byla statisticky signifikantně odlišná ($p < 0.001$) mezi MLBCL (46 pacientů) a DLBCL (obrázek č. 3). Iniciálně byla diagnóza MLBCL stanovena na základě klinických charakteristik, přičemž 76% těchto lymfomů mělo profil genové exprese charakterizující MLBCL (35 pacientů), 15% (7 pacientů) vykazovalo profil odpovídající GCBC-like DLBCL a 9% (4 pacienti) profil ABC-like DLBCL. Pacienti v poslední skupině měli značně nepříznivý vývoj choroby, zemřeli do 2 let od stanovení diagnózy. Pokud byli hodnoceni pouze pacienti s MLBCL definovaným na základě profilu genové exprese, pětiletého přežití dosáhlo 64% pacientů, ve srovnání se 46% DLBCL (11). Z klinického hlediska má dosud největší význam aberace chromosomu 2 vedoucí ke zvýšené expresi genu c-REL a k následné aktivaci signální dráhy NF- κ B, která je v případě MLBCL vhodným terčem k vývoji cílené terapie (15). V předcházející části textu jsme čerpali rovněž z výsledků práce Savage K. a kol. kteří studovali profil genové exprese na souboru 176 pacientů s DLBCL a 34 pacientů s MLBCL (12).



Obrázek č. 2.: Na podkladě profilu genové exprese je možné DLBCL rozdělit na dvě základní varianty: Germinal Center B-cell like DLBCL (GCBC-like DLBCL; B-lymfocytům zárodečného centra podobný DLBCL) a „Activated B-cell like DLBCL“ (ABC-like DLBCL; aktivovaným B-lymfocytům podobný DLBCL). Pro obě varianty DLBCL byl definován charakteristický fenotyp, který je identifikovatelný pomocí imunohistochemického vyšetření. Pro lymfocyty zárodečného centra je charakteristická pozitivní exprese CD10 a/nebo Bcl-6, a naopak negativní exprese MUM1 a CD138, jenž je typická pro antigenem stimulované mitoticky aktivní plasmatické lymfocyty. Jak ukazuje Kaplan-Meierova křivka GCBC-like DLBCL má příznivější prognózu. Podrobně viz. text.

1.2. Prognostické profily genové exprese DLBCL

Vedle vzniku molekulární taxonomie DLBCL, paralelně probíhá i snaha o identifikaci profilů genové exprese, které by sloužily pouze k prognostickým nebo k prediktivním účelům. V roce 2002 publikovala M. Shipp s kolektivem bostonských spolupracovníků práci, ve které analyzovali genovou expresi 58 DLBCL, pocházejících od pacientů léčených chemoterapií na bázi CHOP režimu. V tomto souboru dosáhlo kompletní remise a minimálně pětiletého přežití bez relapsu onemocnění (RFS) 32 pacientů. Zbývajících 23 pacientů zemřelo v důsledku progresu choroby a 3 pacienti měli opakovaný relaps onemocnění, i když zůstávali na živu. Autoři identifikovali profil složený ze 13 genů, jejichž expresi se lišily lymfomy vyléčených pacientů („cured“) od pacientů, kteří neúspěšně bojovali s chorobou („fatal/refractory“). V prvním případě dosáhlo pětiletého přežití 72% pacientů, ve druhém případě 12% ($p < 0.0001$) (16). K sedmi genům spjatých se špatnou prognózou patřily geny kódující PKC β II a PDE4B, jejichž negativní prognostický význam byl později ověřen i na proteinové úrovni (17,18).



Obrázek č. 3.: DNA čipové analýzy přispěly rovněž k molekulární charakteristice primárně mediastinálního B-lymfocytárního lymfomu (mediastinal large B-cell lymphoma, MLBCL). Diagnostický profil MLBCL tvoří 46 genů, jejichž exprese je v dendrogramu kódována barevně. Zeleň barva značí nízkou, červená barva vysokou a černá barva průměrnou expresi daného genu v daném DLBCL. Šedá barva označuje gen, jehož exprese nebyla vyhodnocena. Na základě podobnosti genové exprese uvedených 46 genů (řádky) je tedy možné odlišit MLBCL od jiných variant DLBCL (sloupce). Převzato a upraveno z reference č. 11. Podrobně viz. text.

Ve stejném roce publikoval A. Rosenwald 17ti-genový prognostický profil, který vznikl z analýzy DLBCL 240 pacientů léčených kombinovanou chemoterapií založenou na aplikaci antracyklinů (nejčastěji režim CHOP). Uvedených 17 genů bylo s ohledem na svou biologickou funkci rozděleno do 5 kategorií. Zvýšená exprese genů v prvních třech kategoriích byla spjata s dobrou prognózou onemocnění, naopak zvýšená exprese genů čtvrté a páté kategorie s prognózou nepříznivou. První kategorii tvořily geny charakteristické pro B-lymfocyty zárodečného centra (např. BCL-6), druhou kategorii geny mající vztah k MHC komplexu II. třídy (např. HLA-DP α), třetí kategorii geny kódující proteiny extracelulární matrice (např.

kolagen a fibronectin) nebo spjaté s jejich syntézou (např. CTGF). Čtvrtou kategorií představovaly geny regulující buněčnou proliferaci (např. c-myc). Do žádné z uvedených funkčních kategorií nebyl zařaditelný gen kódující BMP6 protein, který jako jediný vytvořil pátku kategorií (9). Pro jednotlivé případy DLBCL bylo na základě údajů o expresi uvedených 17 genů vypočteno skóre, které stratifikovalo pacienty do čtyř prognostických skupin. Mezitím co v první a ve druhé skupině dosahovalo 5ti-letého přežití 73% a 71% pacientů, ve zbývajících dvou skupinách 34% a 15% pacientů ($p < 0,001$). Další prognostický genový profil, tentokrát složený ze 6 genů, byl publikován I. Lossossem v roce 2004. Opět se jednalo o stanfordský tým autorů, kteří nikoliv DNA čipy, ale tentokrát pomocí multiplexové kvantitativní Real-Time PCR reakce validovali expresi 36 genů, jenž byly součástí již dříve publikovaných prognostických profilů nebo se z hlediska prognózy a predikce zkoumaly samostatně (8,9,16). Na základě korelace údajů o genové expresi a parametrů přežití bylo uvedených 36 genů seřazeno podle jejich prediktivní síly a ze získaného pořadí byly vybrány tři geny s nejvyšší dosaženou kladnou (LMO2, BCL-6, fibronectin) a zápornou hodnotou (cyklin D2, SCYA3, BCL-2). Vznikla sestava šesti genů, která se stala základem pro výpočet MP-skóre (mortality-predictor score), jehož hodnota rozdělila pacienty s DLBCL do tří prognostických skupin. Pacienti ve skupině s nízkým rizikem (20 pacientů) dosáhli pětiletého přežití v 65% případů, ve skupině se střední mírou rizika (18 pacientů) ve 49% a v poslední, vysoce rizikové skupině (20 pacientů), pouze v 15% případů ($p < 0,004$). V multivariabilní analýze prokázali autoři nezávislost MP-skóre na ostatních běžně užívaných klinicko-patologických parametrech, včetně indexu IPI (19). Svůj prognostický model navíc úspěšně verifikovali na dvou nezávislých souborech DLBCL, a to na souboru 58 lymfomů M. Shipp a 240 lymfomů A. Rosenwalda. Obě práce již byly popsány výše (9,16).

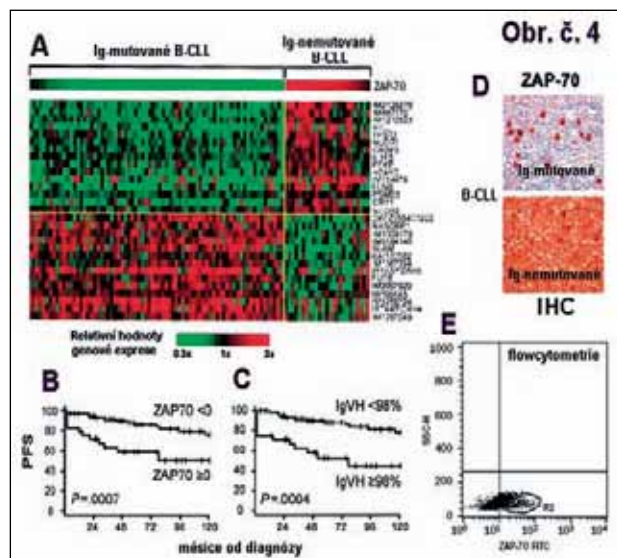
2. FOLIKULÁRNÍ LYMFOM (FL)

Folikulární lymfom se v incidenci NHL řadí na druhé místo. I přestože je obecně považován za indolentní onemocnění, klinický průběh jednotlivých případů je variabilní a může docházet k transformacím do agresivních lymfomů (2).

Velmi zajímavou preklinickou práci zabývající se výhradně folikulárním lymfomem publikoval Hervé Hussen. Pomocí DNA čipů analyzoval a následně porovnal profil genové exprese fyziologických B-lymfocytů vycházejících ze zárodečného centra a lymfocytů folikulárního lymfomu. Výsledkem analýzy byla identifikace 28 genů s nízkou a 37 genů s vysokou expresí v lymfocytech FL ve srovnání s fyziologickým protějškem. Nezávislá metoda (kvantitativní Real-Time PCR) potvrdila výsledek DNA čipů ve 32 případech z výše uvedeného počtu genů. Mezi 24 geny s vysokou expresí byly i dva geny, jejichž proteiny patří k významným negativním regulátorům buněčného cyklu: p21^{CIP1} a p16^{INK4a}. Tento náález koresponduje s přirozeným, indolentním, vývojem onemocnění. K nadměrně exprimovaným genům patřily ty, jejichž proteiny se účastní procesů mezibuněčných interakcí (TNF, IL2RG a IL4RA) nebo slouží jako transkripční faktory (PAX5 a ID-2). Naopak nízkou expresi u FL vykazovaly geny MRP8 a MRP14. Jejich proteiny hrají významnou roli v buněčné adhezi (20).

Prognostický profil genové exprese publikovalo několik autorů. Glass AM a kol. analyzovali párové vzorky FL získané v průběhu indolentní a agresivní fáze onemocnění u jednotlivých pacientů. Pomocí DNA čipů identifikovali profil genové exprese složený z 81 genů, který v kontrolním souboru s 94% přesností odlišil vzorky pocházející z indolentní, nebo z agresivní fáze choroby. Geny tohoto profilu bylo možné rozdělit do několika funkčních kategorií: a) regulátory buněčného cyklu (CCNE2, CCNA2, CDK2, CHEK1); b) regulátory DNA syntézy (TOP2A, PLOD3A, POLE2); c)

regulátory metabolismu (FRSB, RARS, LDHA); d) zástupci dalších signálních cest (PIK4CA a MAPK1) a e) geny jednoznačně související s tumor infiltrujícími T-lymfocyty a makrofágy (CD3D, CXCL12 a TM4SFA2). Kromě poslední kategorie, byly ostatní geny zvýšeně exprimovány v agresivní fázi FL (21).



Obrázek č. 4: (A) Dendrogram shlukové analýzy přehledně znázorňuje rozdíl v genové expresi dvou základních skupin B-CLL, které se liší mutačním stavem IgVH. Nejvyšší diskriminační hodnotu dosáhl gen pro protein ZAP-70 (1. řádek). Expresí genů (řádky) je v dendrogramu kódována barevně. Zelená barva značí nízkou, červená barva vysokou a černá barva průměrnou expresi daného genu v dané B-CLL (sloupce). Kaplan-Meierovy křivky znázorňují čas do progresu choroby (PFS) u pacientů s B-CLL v závislosti na přítomnosti: (B) exprese genu ZAP-70 (počet molekul mRNA), nebo (C) mutace IgVH (gen pro IgVH byl v daném případě považován za mutovaný tehdy, sdílel-li se zárodečnou buněčnou linií v nukleotidové sekvenci méně než 98% homologii). (D) Imunohistochemický průkaz proteinu ZAP-70 ve skupině B-CLL s mutovaným, nebo nemutovaným IgVH. (A-D) převzato a upraveno z reference č. 42. (E) průkaz pozitivní exprese proteinu ZAP-70 pomocí flowcytometrické analýzy s fluorescenčně značenou monoklonální protilátkou u pacienta s B-CLL s nemutovaným IgVH. Převzato a upraveno z reference č. 44.

Vliv mikroprostředí na biologické chování nádoru studovali Dave S. a kol. na souboru 191 pacientů s FL. Výsledkem byly dva genové profily („Profil imunitní odpovědi 1“ a „Profil imunitní odpovědi 2“) záměrně složené z genů exprimovaných pouze v tumor infiltrujících buňkách (T-lymfocyty, makrofágy a dendritické buňky). „Profil imunitní odpovědi 1“ byl asociovaný s dobrou prognózou a obsahoval zejména geny charakteristické pro T-lymfocyty (CD7, CD8B1, ITK, LEF1) a makrofágy (ACTN1 a TNFSF13B), naopak „profil imunitní odpovědi 2“ obsahoval převážně geny zvýšeně exprimované v dendritických buňkách a/nebo v makrofázích (TLR5, FCGR1A, SEPT10, LGMN a C3AR1) a korespondoval se špatnou prognózou vývoje FL (22). O prognostickém významu tumor infiltrujících makrofágů (TIM) u pacientů s FL hovoří i Farinhova práce, ve které byly TIM detekovány imunohistochemicky na základě přítomnosti CD68 antigenu. Pacienti s vysokým počtem TIM dosahovali delšího celkového přežití než v opačném případě (< 15 TIM/high-power zorné pole). Multivariabilní analýza prokázala nezávislost tohoto parametru na indexu IPI (23). Z obecného pohledu není prognostický význam TIM jednoznačný. V případě solidních tumorů existují práce, které naopak potvrzují negativní prognostický význam TIM. Z tohoto rozporu je evidentní, že izolovaná detekce TIM nemusí mít jasnou výpovědní hodnotu. Není totiž vyloučeno, že existují jednotlivé subpopulace makrofágů, které se liší svou biologickou funkcí (podobně jako v případě T-lymfocytů). Na druhé straně může být biologická diverzita TIM indukovaná sekundárně, například T-lymfocyty nebo samot-

nými nádorovými buňkami, tzv. „parakrinní smyčka“ (24). Za zmínku stojí i práce, která se zabývala profilem genové exprese pacientů s FL s rozdílnou odpovědí na terapii monoklonální protilátkou proti CD20 receptoru (rituximab). Dosud bez podrobnější interpretace stojí zjištění autorů, že FL s nedostatečnou léčebnou odpovědí na rituximab měly profil genové exprese podobný více buňkám pocházejícím z fyziologické lymfatické tkáně krčních uzlin a sleziny, než skupině FL, která velmi dobře reagovala na cílenou imunoterapii (25).

3. LYMFOM PLÁŠTOVÉ ZÓNY / MANTLE CELL LYMPHOMA (MCL)

I v případě MCL je možné sledovat klinickou heterogenitu onemocnění. Ačkoliv medián celkového přežití dosahuje 3 až 4 let, existují mezi jednotlivými pacienty výrazné rozdíly. Na straně jedné stojí ti, kteří podlehnou progresi MCL do jednoho roku od stanovení diagnózy, na druhé straně jsou pacienti přežívající více než 10 let. Pro MCL je obecně charakteristická chromozomální aberace t(11;14)(q13;q32), jenž vede k nadměrné expresi cyklinu D1. Rozdíly v jeho kvantitě však nevysvětlují odlišnosti v klinickém průběhu jednotlivých případů MCL, i když existují ojedinělé práce, které prokazují negativní prognostický význam vysoké hladiny cyklinu D1 (26). Analýzou genové exprese MCL pomocí DNA čipů se mezi prvními zabývala Rosenwaldova práce. Soubor obsahoval 92 pacientů s MCL, jehož diagnóza byla stanovena na základě morfologických kritérií a přítomnosti vysoké hladiny cyklinu D1 (CCND1+). V úvodní fázi analýzy bylo identifikováno více než 1000 genů, jejichž exprese se MCL lišily od ostatních NHL. Diagnostický profil MCL nakonec utvořilo 42 genů, přičemž gen pro CCND1 byl záměrně vyřazen. Autoři testovali uvedený profil na kontrolním souboru NHL, kde dosáhl správné identifikace MCL v 98% případů (27).

Zajímavým zjištěním bylo, že sedm případů NHL s negativní expresí cyklinu D1 (CCND1-) bylo na podkladě uvedeného profilu klasifikováno jako CCND1+ MCL. U těchto lymfomů byla následně nalezena nadměrná exprese cyklinu D2 nebo D3 (27). Existenci CCND1- MCL s prokázanou expresí cyklinu D2 nebo D3 potvrdily i další práce, což naznačuje určitou „funkční zastupitelnost“ jednotlivých cyklinů D v případě patogeneze MCL (28). Rosenwaldova práce vedla rovněž k identifikaci prognostického genového profilu MCL, který obsahoval 48 genů ve významné vazbě k době celkového přežití ($p < 0,001$) (27).

Studiem prognosticky nepříznivé blastoidní varianty MCL (BV-BCL) se zabývala publikace de Vose a kol. Autoři identifikovali 118 genů, jejichž exprese se MCL a BV-MCL vzájemně odlišovaly. Ke skupině genů s vyšší expresí u BV-MCL patřily například: cyklin-dependentní kináza 4 (CDK4); onkogeny: c-myc, c-pim1 a c-pim2; inhibitory apoptózy: DAD1 a RSK1; a transkripční faktory: YY1 a CDC25B. V případě CDK4 a CDC25B přitom existuje přímá spojitost s CCND1. Vazba CDK4 a CDC25B na CCND1 umožňuje iniciaci přechodu přes kontrolní body buněčného cyklu G1/S a G2/M. Oba posledně jmenované geny byly autory označeny za potenciální kandidáty k cílené terapii, která by u BV-MCL mohla dosáhnout lepšího terapeutického úspěchu, než stávající cytostatická léčba (27,29).

4. CHRONICKÁ LYMFATICKÁ LEUKÉMIE Z B-LYMFOCYTŮ (B-CLL)

Další hematologickou malignitou, při jejímž studiu jsou s úspěchem využívány DNA čipy, je B-CLL. Onemocnění postihuje zejména jedince nad 50 let věku a s incidencí 3:100 000 patří k nejrozšířenějším typu leukémie (pozn. WHO klasifikace řadí B-CLL k hematologickým malignitám vycházejícím ze zralých forem B-lymfocytů, tedy do stejné skupiny, jako NHL) (30,31). V histopatologickém obraze je pro B-CLL charakteristická akumulace zralých monomorfních monoklonálních B-lymfocytů s typickým imunofenotypem

(32). Klinicky je B-CLL charakterizována jako lymfoproliferativní onemocnění relativně nízké malignity, nicméně s velmi variabilním průběhem. Mezitím co u větší části pacientů se jedná o indolentní onemocnění, se kterým se mohou potýkat i po desetiletí, ve druhé skupině dochází k rychlé progresi choroby, které mohou podlehnout během několika měsíců. Klinické klasifikace B-CLL navržené Raiem nebo Binetem mají jen omezený prognostický význam, a to zejména u časných stádií nemoci (Binet A, Rai 1 a 2), ve kterých je však diagnostikována většina pacientů (34,35). Proto nastala potřeba identifikace molekulárních prognostických markerů. Zpočátku byl výzkum zaměřen především na hledání chromosomálních aberací. Bohužel, konvenční cytogenetické techniky u pomalu progresujících buněčných populací selhávaly, v důsledku čehož byly chromosomální aberace detekovány pouze u 40-50% případů B-CLL. Výrazný posun přineslo až zavedení metody FISH, která prokázala nejenom vyšší frekvenci (až 85% případů), ale i větší spektrum chromosomálních změn u B-CLL. K prognosticky významným patří delece 17p13 a 11q22-q23, které jsou spjaty se špatnou prognózou (medián přežití 32 a 79 měsíců) a s vyšší pokročilostí choroby v době diagnózy, naopak trisomie 12q, normální karyotyp a delece 13q14 byly častěji detekovány u pacientů s delším přežitím (medián 114, 111 a 133 měsíců) (35). Autoři Haslinger a kol. porovnávali expresní profily B-lymfocytů 11 zdravých dárců a 100 B-CLL pacientů nesoucích některou z těchto aberací. Lokalizace rozdílně exprimovaných genů u jednotlivých skupin poměrně dobře korelovala s lokalizací relevantních aberací, je tedy pravděpodobné, že chromosomální aberace hrají roli v patogenezi B-CLL a jsou jednou z příčin klinické heterogenity onemocnění B-CLL (36).

Další studie prokázaly, že rovněž výskyt somatických mutací v genech kódujících variabilní části těžkého (V_H) řetězce imunoglobulinů (Ig) má vztah k predikci klinického vývoje onemocnění (obrázek č. 4C). Na základě výskytu nebo absence těchto mutací je možné B-CLL členit do dvou skupin. B-CLL vycházející z „paměťových“ B-lymfocytů, které již prošly zárodečným centrem a jsou nositeli IgV_H mutací (M-B-CLL, mutated B-CLL), a B-CLL z „naivních“ B-lymfocytů (pre-GC B-lymfocyty), které do zárodečného centra dosud nevstoupily, nebo se v něm nesetkaly s antigenem, a proto nenesou žádnou somatickou mutaci genů IgV_H (UM-B-CLL, unmutated B-CLL) (37,38). Medián celkového přežití (OS) pacientů ve skupině UM-B-CLL se pohybuje v rozmezí 79-119 měsíců, zatímco ve skupině M-B-CLL je několikanásobně delší a u řady těchto pacientů onemocnění vůbec nevyžaduje léčbu. Mutační status IgV_H je nezávislým prognostickým faktorem, který pacienty stratifikuje bez ohledu na klinické stádium B-CLL. Tak například u pacientů klinického stádia „Binet A“ byl ve skupině UM-B-CLL medián OS 95 měsíců a ve skupině MB-CLL 293 měsíců ($P = 0.0008$) (37-39).

Vzhledem k tomu, že přítomnost nebo absence somatické mutace genů pro IgV_H je vázána na odlišné maturační stádium B-lymfocytů, bylo překvapením, že první mikročipové analýzy genové exprese B-CLL nevedly při použití nezávislých (unsupervised) shlukových analýz k identifikaci profilu genové exprese, který by obě skupiny B-CLL odlišil. Tato skutečnost naopak podporuje hypotézu, že B-CLL sdílí společný buněčný původ, ve kterém procházejí stejným mechanismem maligní transformace (40). Problematikou interpretaci vyvolávají výsledky další studie, ve které autoři na souboru 100 pacientů vyselektovali genový profil, na jehož základě bylo možné odlišit M-B-CLL od UM-B-CLL. Kuriózní však bylo, že pouze u mužů. Autoři přitom analyzovali zpočátku celý soubor, následně zvlášť mužskou a ženskou populaci. Jak u mužů (62 pacientů), tak i u žen (38 pacientek) představovala skupina M-CLL přibližně 55% případů (36). Je snad příslušnost k pohlaví determinantou genové exprese leukemických buněk? Myšlenka to není tak úplně zavržení hodná, uvědomíme-li si, že incidence B-CLL je u mužů přibližně 2x vyšší než u žen,

a že v několika studiích byla prokázána jednoznačná souvislost mezi výskytem UM-B-CLL a mužským pohlavím. Například v Damleově práci byl poměr mužů a žen ve skupině UM-B-CLL 11:1 a 1,1:1 ve skupině M-B-CLL ($p<0,003$), v Oscierově souboru 2,4:1 u UM-B-CLL a 1:1,1 u M-B-CLL ($p=0,003$) a v Hamblinově souboru 2:1 u UM-B-CLL a 1,1:1 u M-B-CLL ($p>0,05$) (37-39). Oscier navíc prokázal příslušnost k mužskému pohlaví jako negativní prognostický faktor, neboť po 10 letech v jeho souboru přeživalo 64% mužů a 87% žen ($p=0,01$) (39). Vzhledem k tomu, že incidence hematologických malignit je obecně vyšší u mužů než u žen, přičemž v ojedinělých případech se může jednat o výrazné rozdíly (např. HCL 5:1, Burkittův lymfom sporadická forma 2-3:1, endemická forma 2:1, MCL 2:1), stojí souvislost pohlaví a hematologických malignit za bližší prozkoumání (30,31). Po „selhání“ nezávislých shlukových analýz byl k identifikaci genových profilů specifických pro M-B-CLL a UM-B-CLL použit jiný biostatistický přístup, pracující již od počátku s informací, který ze vzorků je, a nebo není nositelem mutace IgV_H. Tímto způsobem byl na pilotním souboru 28 pacientů identifikován první genový profil čítající 175 genů, jejichž exprese se mezi vzorky UM-B-CLL a M-B-CLL výrazně lišila. Ke třem genům s nejvyšší diskriminační hodnotou patřil i ZAP-70, kódující stejnojmennou proteinkinázu. Gen ZAP-70 byl exprimován ve všech případech UM-B-CLL, a naopak v žádném vzorku M-B-CLL (41). O dva roky později publikovali stejní autoři práci, ve které podrobili DNA čipové analýze celkem 107 pacientů s B-CLL, přičemž v 74% se jednalo o M-B-CLL (obrázek č. 4A). I v tomto případě byla exprese ZAP-70 výrazně vyšší u UM-B-CLL než u M-B-CLL ($p<0,001$) a ze všech 240 genů v profilu ZAP-70 dosahoval nejvyššího diskriminačního potenciálu k odlišení obou skupin B-CLL (správně klasifikoval 93% vzorků, $p<0,001$) (42). Podobné výsledky přinesla i další práce (43).

Objevení ZAP-70 patří dosud k nejvýznamnějším příspěvkům DNA čipů do klinické praxe v oblasti prediktivní diagnostiky lymfoidních malignit. Jeho exprese je silným a nezávislým molekulárním prediktorem nepříznivé prognózy (obrázek č. 4B) (42,44). Jako názorný příklad uvádíme výsledky práce Orchardové a kol., jenž studovali expresi ZAP-70 v souboru 167 pacientů s B-CLL. Jednoznačná mutace IgV_H byla detekována u 65% pacientů. Medián celkového přežití ve skupině s negativní expresí ZAP-70 přesahoval 24 let, zatímco ve skupině s pozitivní expresí byl 9,3 roku ($p<0,0001$) (44). Pro klinickou praxi je zásadní i skutečnost, že genová exprese ZAP-70 odpovídá výskyt proteinu, který lze velmi jednoduše stanovit pomocí flowcytometrie (obrázek č. 4E) nebo imunohistochemie (obrázek č. 4D), přičemž senzitivita a specifita těchto metod se pohybuje nad 95%. Z hlediska technické variability, ale rovněž s ohledem na korelaci s proteinovou expresí ZAP-70 a s údaji o klinickém průběhu choroby, je gen pro IgV_H považován za mutovaný tehdy, sdílí-li se zárodečnou buněčnou linií v nukleotidové sekvenci méně než 97% homologií (40,44).

Jako poslední příklad využití DNA čipů u B-CLL uvedeme identifikaci profilu genové exprese predikujícího odpověď na fludarabin. Rosenwald a kol. tak učinili na souboru 7 pacientů. Většina genů z tohoto profilu měla funkční vztah k signální dráze proteinu p53, což odpovídá situaci v in-vitro systémech, kde kultivace maligních lymfocytů s fludarabinem vyvolává odpověď závislou na stavu signální dráhy p53 a vede k pozitivní selekci buněk s mutovaným proteinem. Tímto mechanismem dochází k indukci sekundární rezistence a k selhání protinádorové léčby (45).

5. AKUTNÍ LYMFOLASTICKÁ LEUKÉMIE (ALL)

ALL je jedním z nejčastějších nádorových onemocnění v dětském věku. I přestože v posledních desetiletích bylo dosaženo vynikajících léčebných výsledků, stále existuje skupina pacientů, která tomuto onemocnění podlehne. Rizikové paci-

enty spolehlivě neodhalí ani použití stávajících klinických, cytogenetických a molekulárních markerů (46). DNA čipy se proto nabízí jako vhodná metoda ke hledání nových prediktivních a prognostických ukazatelů. Jedny z prvních mikročipových analýz, které byly na souborech primárních lidských tumorů vůbec provedeny, se týkaly právě pacientů s akutními leukémiemi. V roce 1999 publikovala skupina T. Goluba v časopisu Science práci, ve které autoři na základě profilu genové exprese dokázali odlišit obě hlavní skupiny akutních leukémií (ALL a AML) (47). Optimismus autorů tehdy spočíval zejména v budoucnosti DNA čipů, které považovali za hlavní nástroj rozvíjející se prediktivní diagnostiky. Představovali si, že pro každou skupinu nádorových onemocnění budou existovat specifické DNA čipy, nesoucí na svém povrchu sondy pouze pro omezený počet relevantních genů, a jejich pomocí bude možné stanovit přesnou diagnózu choroby, určit nejvhodnější možnou léčbu a předpovědět prognózu pacienta. Je příjemné sledovat, jak se jejich vize postupně naplňují. O tři roky později publikovali Armstrong a kol. práci, ve které identifikovali profil genové exprese specifický pro skupinu leukémií s chromosomální abercací postihující mixed-lineage leukemia (MLL) gen. Tato skupina ALL má z hlediska svého biologického chování nepříznivou prognózu a právě odlišný klinický průběh a přítomnost patologické chromosomální aberace vedly k jejímu vyčlenění a označení MLL (mixed-lineage leukemia; nebo Re-MLL-ALL, Rearrangements-MLL-ALL). Armstrogova práce byla realizována na souboru 37 pacientů a profil genové exprese dokázal jednoznačně od sebe odlišit ALL, MLL a AML. Při podrobnější analýze autoři zjistili, že profil MLL se nápadně podobá profilu genové exprese hematopoetických progenitorů stojících ve vývojové řadě na rozcestí myeloidních a lymfoidních linií. Tím potvrdili výsledky jiných prací, které poukazovaly na rozporuplný fenotyp těchto nádorových buněk (exprese lymfoidních znaků CD79B, CD44 a CD19, naopak ztráta exprese lymfocytárního antigenu CD10, nebo koexprese myeloidních antigenů CD15 a CD65). Z mikročipové analýzy dále vyplynulo, že MLL, ve srovnání s ALL a AML, ve zvýšené míře exprimují geny HOXA9, HOXA5 a HOXA4, které se podílejí na regulaci diferenciace pluripotentní hematopoetické buňky a jejich progenitorů, a dále FLT3 gen, kódující stejnojmenný receptor růstového faktoru, jenž se vyskytuje výhradně u hematopoietických kmenových buněk (CD34+). Přítomnost interní tandemové mutace FLT3 genu je detekována přibližně u 20-30% procent případů AML a je jednoznačným nepříznivým prediktivním a prognostickým faktorem (48). Podrobnějším studiem expresního profilu MLL se zabýval i Tsutsumi a kol. (49). Proteiny výše popisovaných genů mohou být vhodnými kandidáty pro cílenou léčbu. Z tohoto pohledu si nelze přát nic jiného, než aby i v případě MLL byl objeven další „Gleevec“, jako v případě CML s fúzním BCR/ABL genem. V této souvislosti se v současnosti vkládají nemalé naděje do inhibitorů tyrozin-kinázové aktivity FLT3 receptoru (50).

Další rozsáhlá práce byla provedena na souboru 360 vzorků ALL pocházejících od dětských pacientů. Autoři na základě profilu genové exprese složeného z 271 genů rozdělili ALL do sedmi skupin: 1. BCR-ABL, 2. E2A-PBX1, 3. TEL-AML1, 4. MLL, 5. hyperploidní karyotyp, 6. T-ALL a sedmá skupina s dosud nejasným významem. Profil genové exprese klasifikoval všechny analyzované vzorky ALL s mnohem větší přesností, než by se stalo pouze s ohledem na výskyt specifických genových alterací. Tak například čtyři případy ALL byly zařazené do skupiny TEL-AML1 i přesto, že u nich nebyla RT-PCR reakcí nalezena žádná známá chimerická přestavba. Sekvenční analýza TEL však prokázala jeho mutaci (51). O rok později publikoval stejný autorský tým práci potvrzující existenci uvedených 7 molekulárně definovaných skupin ALL, přičemž tentokrát s použitím jiné DNA čipové platformy (52). Zajímavé práce byly publikovány se specifickým zaměřením na akutní lymfatické leukémie vycházející z T-lymfocytární

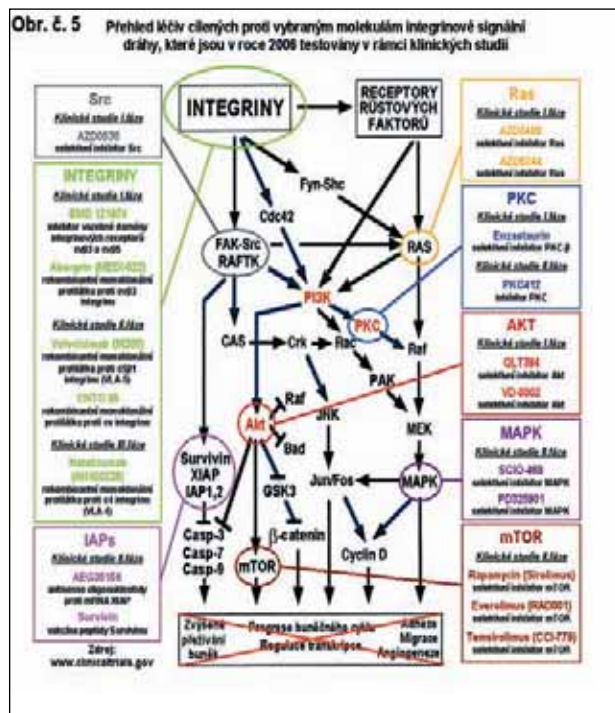
řady (T-ALL). Z jejich výsledků vyplývá, že na základě profilu genové exprese je možné T-ALL rozdělit do tří skupin, pro které je charakteristická nadměrná exprese jednoho ze tří transkripčních faktorů: LYL1, HOX11, nebo TAL1. Genový profil T-ALL s nadměrnou expresí LYL1 a genů podléhajících jeho regulaci byl podobný profilu genové exprese pro-T-lymfocytů, a podobně v případě T-ALL s nadměrnou expresí HOX11, nebo TAL1, byla pozorována shoda s profilem časných, nebo pozdních kortikálních T-lymfocytů. Na rozdíl od molekulární klasifikace DLBCL, rozdělení T-ALL na základě podobnosti k jednotlivým vývojovým stádiím T-lymfocytů jenom potvrdilo stávající imunologické dělení T-ALL (53,54).

Mechanismy chemorezistence a predikce vnímavosti na vybraná cytostatika a kortikoidy se staly předmětem několika prací. Holeman a kol. sledovali změny genové exprese v lymfoblastech pacientů s ALL, které byly v in-vitro podmínkách kultivovány s prednisolonom, vinkristinem, cytosinarabinsidem a daunorubicinem. Pomocí DNA čipů autoři identifikovali genové profily predikující chemosenzitivitu k aplikovaným látkám a potvrdili známou skutečnost, že in-vitro detekovaná chemorezistence jednoznačně koreluje s vysokým rizikem relapsu choroby (55). Použití DNA čipů vedlo rovněž k určení genů, jejichž exprese se významně lišila mezi ALL s nízkou, nebo s vysokou kumulací metotrexát-polyglutamatů - metabolitů metotrexátu. Toto zjištění by mohlo v budoucnosti vést k individualizaci terapeutických protokolů pacientů s ALL ve smyslu intenzity dávky metotrexátu nebo jeho úplné záměny za jiné cytostatikum (56). Cytoprotektivní účinek mikroprostředí, ve kterém se lymfoblasty nacházejí, může být další příčinou relapsů leukémií po indukční terapii. Za normálních okolností jsou hematopoietické buňky v mikroprostředí kostní dřeně v kontaktu se stromálními buňkami a s okolními složkami extracelulární matrice (ECM). Kromě řady esenciálních růstových faktorů, které produkují stromální buňky, je pro přežívání hematopoietických buněk důležitý již prostý kontakt s těmito buňkami a s vláknitými složkami ECM (např. fibronectin, vimentin, laminin, kolagen) zprostředkovaný pomocí receptorů adheze (např. integrinové receptory, VCAM-1). A právě stimulace receptorů adheze mimo jiné spouští signální dráhy vedoucí k inhibici apoptózy. Uvedený cytoprotektivní účinek se stává významným zejména za nepříznivých podmínek, například v přítomnosti cytostatika. Astier a Svoboda jako první publikovali profil genové exprese B-lymfoblastů, které po stimulaci integrinových receptorů přežily i ve stresových podmínkách (bez přítomnosti růsto-

vých faktorů nebo při kultivaci s doxorubicinem). Výsledkem jejich práce byla identifikace několika signálních drah realizujících antiapoptotický účinek integrinových receptorů (např. signální dráha PI3K-Akt a XIAP/Survivin-Caspasa-3/7) (57,58). O významu receptorů adheze svědčí existence řady klinických studií s monoklonálními protilátkami proti integrinovým receptorům nebo s inhibitory jednotlivých kináz integrinových signálních drah (obrázek č. 5).

Závěr:

Komplexní analýzy genové exprese pomocí DNA čipů umožňují realizovat nový pohled na genom nádorových buněk. V případě lymfoidních malignit uvedené analýzy již přinesly první výsledky použitelné v klinické praxi pro diagnostiku, klasifikaci a predikci vývoje nádorového onemocnění.



Poděkování:

Práce byla podpořena grantem MZ ČR: NR 8231/3

Literatura:

- Svoboda M, Michálek J. Úvod do technologie DNA čipů. *Lékař a technika* 2004;35:67-75.
- Freedman AS, Nadler LM. Non-Hodgkin's lymphoma. In: Holland, Frei et al. *Cancer medicine*, 5th ed., B.C. Decker Inc. 2000; pp. 2 034-2059.
- Nathawani B, Dixon D, Jones S, et al. The clinical significance of the morphological subdivision of diffuse "histiocytic" lymphoma: A study of 162 patients treated by the Southwest Oncology Group. *Blood* 1982;60:1068.
- Colomo L, Lopez-Guillermo A, Peralas M, et al. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2003;101(1):78-84.
- Jalkanen S, Joensuu H, Soderstrom KO, et al. Lymphocyte homing and clinical behavior of non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Invest* 1991;87:1835-1841.
- Muris JJ, Meijer CJ, Vos W, et al. Immunohistochemical profiling based on Bcl-2, CD10 and MUM1 expression improves risk stratification in patients with primary nodal diffuse large B cell lymphoma. *J Pathol* 2006;208(5):714-23.
- A predictive model for aggressive Non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1993; 329(14):987-94.
- Alizadeh A.A., Eisen M.B., Davis R.E., et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000;403:503-11.
- Rosenwald A., Wright G., Chan W.C., et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002;346(25):1937-47.
- Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004;103(1): 275-82.
- Rosenwald A., Wright G., Leroy K., et al. Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *J Exp Med* 2003;198(6):851-62.
- Savage K.J., Monti S., Kutok J.L., et al. The molecular signature of mediastinal large B-cell lymphoma differs from that of other diffuse large B-cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2003;102(12):3871-9.
- Zinzani PL, Martelli M, Magagnoli E, et al. Treatment and clinical management of primary mediastinal large B-cell lymphoma with sclerosis: MACOP-B regimen and mediastinal radiotherapy monitored by (67)Gallium scan in 50 patients. *Blood* 1999;94:3289-3293.
- Zarate-Orsola A, Medeiros LJ, Longo DL, et al. Non-hodgkin's lymphomas arising in patients successfully treated for Hodgkin's disease. A clinical, histologic, and immunophenotypic study of 14 cases. *Am J Surg Pathol* 1992;16:885-895.
- Staudt LM, Dave S. The biology of human lymphoid malignancies revealed by gene expression profiling. *Adv Immunol* 2005;87:163-208.
- Shipp MA, Ross KN, Tamayo P, et al. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction on by gene-expression profiling and supervised machine learning. *2002;8(1):68-74.*
- Hans C.P., Weisenburger D.D., Greiner T.C., et al. Expression of PKC-beta or cyclin D2 predicts for inferior survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Mod Pathol* 2005;18(10):1377-84.
- Espinosa I., Briones J., Bordes R., et al. Membrane PKC-beta 2 protein expres-

- sion predicts for poor response to chemotherapy and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Ann Hematol* 2006;85(9):597-603.
19. Lossos I.S., Czerwinski D.K., Alizadeh A.A., et al. Prediction of survival in diffuse large-B-cell lymphoma based on the expression of six genes. *N Engl J Med* 2004;350(18):1828-37.
 20. Hussen H, Carideo EG, Neuberg D, et al. Gene expression profiling in follicular lymphoma and normal germinal center B cells using cDNA arrays. *Blood* 2002;99:282-289.
 21. Glass AM, Kersten J, Delahaye LJM, et al. Gene expression profiling in follicular lymphoma to assess clinical aggressiveness and to guide the choice of treatment. *Blood* 2005;105:301-307.
 22. Dave SS, Wright G, Tan B, et al. Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N Engl J Med* 2004;351:2159-2169.
 23. Farinha P, Masoudi H, Skinnider BF, et al. Analysis of multiple biomarkers shows that lymphoma-associated macrophage (LAM) content is an independent predictor of survival in follicular lymphoma. *Blood* 2005; 106: 2169-2174.
 24. Wyckoff J, Wang W, Lin EY, et al. A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer Res* 2004;64(19):7022-9.
 25. Bohan SP, Troyanskaya OG, Alter O, et al. Variation in gene expression patterns in follicular lymphoma and the response to rituximab. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100:1926-1930.
 26. Meusers P, Hense J, Brittinger G. Mantle cell lymphoma: diagnostic criteria, clinical aspects and therapeutic problems. *Leukemia* 1997;Suppl 2: S60-4.
 27. Rosenwald A, Wright G, Wiestner A, et al. The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. *Cancer Cell* 2003;3:185-197.
 28. Chuang SS, Huang WT, Hsieh PP, et al. Mantle cell lymphoma in Taiwan: clinicopathological and molecular study of 21 cases including one cyclin D1-negative tumor expressing cyclin D2. *Pathol Int* 2006;56(8):440-8.
 29. De Vos S, Krug U, Hofmann WK, et al. Cell cycle alterations in the blastoid variant of mantle cell lymphoma (BV-MCL) as detected by gene expression profiling of mantle cell lymphoma (MCL) and BV-MCL. *Diagn Mol Pathol* 2003;12:35-43.
 30. Novotny 2003 CR, ÚZIS ČR Praha, 2006, str. 31-69.
 31. National Cancer Institute, SEER Incidence and US Death Rates 1975-2003, Bethesda, USA, www.nci.gov; www.cancer.gov.
 32. Garand R and Robillard N. Immunophenotypic characterization of acute leukemias and chronic lymphoproliferative disorders: practical recommendations and classifications. *Hematol. Cell Ther* 1996; 38: 471 - 486.
 33. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, et al. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975;46:219-234.
 34. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981;48:198-206.
 35. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *New Engl J Med* 2000; 343:1910-1916.
 36. Haslinger C, Schweifer N, Stilgenbauer S, et al. Microarray gene expression profile of B-cell chronic lymphocytic leukemia subgroups defined by genomic aberrations and VH mutation status. *J Clin Oncol* 2004; 22(19): 3937 - 3949.
 37. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, et al. Unmutated IgVH genes are associated with more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94: 1848 - 1854.
 38. Damle RN, Wasil T, Fais F, et al. IgV gene mutation status and CD38 expression as a novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2000; 95: 2455 - 2457.
 39. Oscier D.G., Gardiner A.C., Mould S.J., et al. Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood* 2002;100(4):1177-84.
 40. Weistner A, Staudt LM. Towards molecular diagnosis and targeted therapy of lymphoid malignancies. *Semin Hematol* 2003;40:296-307.
 41. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2001; 194: 1639 - 1647.
 42. Wiestner A., Rosenwald A., Barry T.S., et al. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood* 2003;101(12):4944-51.
 43. Ferrer A, Ollila J, Tobin G, et al. Different gene expression in immunoglobulin-mutated and immunoglobulin-unmutated forms of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genetic and Cytogenetic* 2004; 153: 69 - 72.
 44. Orchard J.A., Ibbotson R.E., Davis Z., et al. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 2004;363 (9403):105-11.
 45. Rosenwald A, Chuang EY, Davis RE, et al. Fludarabine treatment of patients with chronic lymphocytic leukaemia induces a p53-dependent gene expression response. *Blood* 2004;104:1428-1434.
 46. Einsiedel HG, von Stackelberg A, Hartmann R et al. Long-term outcome in children with relapsed ALL by risk-stratified salvage therapy: results of trial acute lymphoblastic leukemia-relapse study of the Berlin-Frankfurt-Munster Group 87. *J Clin Oncol* 2005;23(31):7942-50.
 47. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999;286(5439):531-7.
 48. Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB, et al. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. 2002; 30(1) :41-7.
 49. Tsutsumi S, Taketani T, Nishimura K et al. Two distinct gene expression signatures in pediatric acute lymphoblastic leukemia with MLL rearrangements. *Cancer Res* 2003 ;63(16):4882-7.
 50. Brown P, Lewis M, McIntyre E, et al. Combinations of the FLT3 inhibitor CEP-701 and chemotherapy synergistically kill infant and childhood MLL-rearranged ALL cells in a sequence-dependent manner. *Leukemia* 2006;20(8):1368-1376.
 51. Yeoh EJ, Ross ME, Shurtleff SA et al. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell* 2002;1(2) :133-43.
 52. Ross ME, Zhou X, Song G et al. 1-40 Classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Blood* 2003;102(8): 2951-9.
 53. Ferrando AA, Look AT. Gene expression profiling in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol* 2003;40:274-280.
 54. Ferrando AA, Neuberg DS, Dodge RK, et al. Prognostic importance of TLX1 (HOX11) oncogene expression in adults with T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Lancet* 2004;363:535-6.
 55. Holleman A, Cheok MH, den Boer M et al. Gene-expression patterns in drug-resistant acute lymphoblastic leukemia cells and response to treatment. *N Engl J Med* 2004 ;351(6):533-42.
 56. Kager L, Cheok M, Yang W et al. Folate pathway gene expression differs in subtypes of acute lymphoblastic leukemia and influences methotrexate pharmacodynamics. *J Clin Invest* 2005; 115(1):110-7.
 57. Astier AL, Ronghui X, Svoboda M, et al. Temporal gene expression profile of human precursor B leukemia cells induced by adhesion receptor: identification of pathways regulating B-cell survival. *Blood* 2003;101(3):1118-1127.
 58. Astier AL, Svoboda M, Hinds E, et al. Integrins regulate survival of pre-B-ALL cells through differential IAP and caspase-7 ubiquitination and degradation. *Leukemia* 2004;18:873-875.

PROFILOVÁNÍ GENOVÉ EXPRESU U MNOHOČETNÉHO MYELOMU.

GENE EXPRESSION PROFILING IN MULTIPLE MYELOMA.

DUDOVÁ S.^{1,2}, BARTOVÁ E.³, POUR L.^{1,2,4}, KREJČÍ J.², HÁJEK R.^{1,2,4}

¹ LEHABI (LABORATORY OF EXPERIMENTAL HEMATOLOGY AND IMMUNOTHERAPY)
ODDĚLENÍ KLINICKÉ HEMATOLOGIE FN BRNO

² LÉKAŘSKÁ FAKULTA MU BRNO

³ BIOFYZIKÁLNÍ ÚSTAV AKADEMIE VĚD ČESKÉ REPUBLIKY

⁴ INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA FN BRNO

Souhrn

V našem sdělení chceme informovat o použití dvou metodik ke studiu molekulárně genetické problematiky mnohočetného myelomu (MM). Prvně zmíníme využití DNA čipů (microarrays) a ve druhé části se zaměříme na chromatinovou imunoprecipitaci v analýzách epigenetických změn genů. Obě metodiky náš výzkumný tým používá, a proto představíme i první výstupy. Využití obou metodik je u MM stejné jako u všech ostatních nádorů. Představují možnost studia patogeneze maligních onemocnění na molekulární úrovni, klasifikaci jinak neodlišitelných prognostických skupin choroby, predikci léčebné odpovědi na daný terapeutický zásah a identifikaci možných molekulárních cílů protinádorové terapie.

Klíčová slova: DNA čipy, profil genové exprese, chromatinové imunoprecipitace, mnohočetný myelom.

Summary

This review informs about utilization of two methods used in molecular examination in multiple myeloma on genomic level: DNA microarrays and chromatin immunoprecipitation. The profit of both methods is very similar in myeloma as well as in other cancers. They allow to study disease pathogenesis, generate new disease classification, and try to predict effect of therapy. Also, they are used to find the new potential target of therapy in multiple myeloma.

Key words: DNA microarray, gene expression profile, chromatin immunoprecipitation, multiple myeloma.

DNA čipy u mnohočetného myelomu.

Profilování genové exprese fyziologické a maligní plasmatické buňky.

Genová exprese je určována nejenom faktory prostředí, ale rovněž genetickým pozadím. Proto byla metoda DNA čipů použita při srovnání profilů genové exprese (PGE) CD138+ buněk získaných z kostní dřeně pacienta s MM a CD138+ plasmatických buněk geneticky identického dvojčete. V CD138+ buňkách MM byla zjištěna zvýšená exprese u 296 genů, naopak snížená hladina transkriptů byla detekována u 103 genů, ve srovnání s fyziologickými plasmatickými buňkami (FPB) dvojčete (1).

Davies a kolektiv využili DNA čipovou analýzu k identifikaci procesů účastnících se při transformaci FPB na buňky monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS) a mnohočetnému myelomu. Sledováním genů, které vykazovaly velkou variabilitu mezi vzorky byly definovány dvě skupiny pacientů: kontrolní a MGUS/MM. Analýza prokázala 263 genů odlišně exprimovaných mezi buňkami MGUS a FPB, a 380 genů s odlišnou expresí mezi buňkami MM a FPB, ze kterých bylo 197 genů společných s první skupinou. Pouze u 74 genů byla zjištěna odlišná míra transkripce mezi buňkami MGUS a MM. Tato zjištění naznačují, že mezi MGUS a MM jsou menší rozdíly než mezi fyziologickým protějškem a MM nebo MGUS. Mezi geny s rozdílnou expresí převládaly: onkogeny, tumor supresorové geny, geny podílející se na signální transdukci, geny kódující vazebné proteiny a transkripční faktory DNA a geny podílející se na diferenciaci buňky (2). Profilování genové exprese tak nám pomáhá odhalovat genetické

změny probíhající v průběhu transformace FPB na buňku MGUS a MM (2-5). Sekvenování variabilní oblasti genů pro imunoglobuliny prokázalo, že plasmatické buňky od jednotlivých pacientů s MGUS vykazují intraklonální variabilitu, která ovšem není pozorována u myelomových buněk (6). Tato data jsou v souladu se zjištěním, že plasmatické buňky MGUS kontinuálně podléhají somatickým hypermutacím, zatímco u MM je jeden klon plasmatických buněk dominantní a expanduje v kostní dřeni.

Další studie prokázala celkem 156 genů se zvýšenou expresí v souvislosti s výskytem translokací t(4;14)(p16;q32), nebo t(11;14)(q13;q32). Získaná data umožňují rozdělit MM do čtyř odlišných podskupin: MM1, MM2, MM3 a MM4. Skupina MM4 má molekulární znaky jako buňky rychle proliferujících buněčných linií MM. Skupina MM1 nese znaky MGUS. Nejvýznamnější rozdíly v expresi mezi MM1 a MM4 byly nalezeny u genů, jejichž produkty se podílí na buněčném cyklu a metabolismu DNA. Jejich vysoká exprese byla detekována právě ve skupině MM4, u které je častěji detekován abnormální karyotyp a zvýšená hladina sérového κ -2-microglobulinu. Tyto parametry jsou v klinické praxi spojovány se špatnou prognózou (7).

Molekulární klasifikace MM na základě profilování genové exprese.

Plasmatické buňky byly dříve považovány za homogenní populaci terminálních stadií B-lymfocytů. Někteří autoři soudí, že MM buňky představují terminálně diferenciované potomstvo transformovaného B-lymfocyty. Poslední fenoty-

pové analýzy a profily genové exprese prokázaly, že plazmatické buňky izolované z určitých orgánů mohou patřit k odlišným stádiím svého vývoje (8,9). Mnohočetný myelom by tak představoval spektrum onemocnění s molekulárními otisky, které ukazují na jejich původ v odlišných stádiích vývoje pozdního B-lymfocyty. Alizadeh a kolektiv prokázali podobnou situaci u difuzního velkobuněčného B-lymfocytárního lymfomu (DLBCL), který v histopatologickém obraze představuje jednu diagnostickou jednotku, přičemž na molekulární úrovni může být rozdělen na dva základní podtypy: DLBCL vycházející z B-lymfocytů zárodečného centra (Germinal-centre B-cell like DLBCL) a z antigenem aktivovaných mitoticky aktivních B-lymfocytů

Activated B-cell like DLBCL) (10). Profilování genové exprese bylo použito rovněž pro odlišení pozdních stádií diferenciace B-lymfocytů, kdy byly identifikovány geny regulující časnou fázi buněčné diferenciace (*early-stage differentiation genes*, EDG), kdy dochází k přechodu nezralých B-lymfocytů do tzv. „tonsillar B-cells“, a geny pozdní fáze diferenciace (*late-stage differentiation genes*, LDG), které charakterizují přeměně „tonsillar B-cells“ na plazmatické buňky kostní dřeně (11, 12). Buňky MM vykazovaly variabilní expresi řady EDG a LDG genů. Na základě variability exprese EDG a LDG genů bylo stanoveno, že již dříve definované podtypy MM1 až MM4 mohou být přiřazeny k některé z „vývojových“ řad plazmatické buňky. Podtyp MM4 je z buněk podobných „tonsillar B-cells“. Podtyp MM3 je rovněž spojen s „tonsillar B-cells“, ale naopak MM2 sdílí podobnost s plazmatickými buňkami kostní dřeně. Tato data potvrzují hypotézu, že MM může být odvozen z buněk maligně transformovaných v různých stádiích vývoje. Funkční spektrum genů ze skupiny EDG bylo širší, než v případě LDG, a zahrnovalo geny, jejichž proteiny se účastní v procesech adheze, transkripce, vnitrobuněčné signální transdukce a metabolismu. Pouze několik málo genů bylo spojeno s buněčnou proliferací.

Vliv chromosomálních aberací na genovou expresi

V souvislosti s tzv. „genomovým chaosem“ myelomové buňky Shaughnessy a kolektiv sledovali ploiditu u MM buněk s abnormálními karyotypy (11). U 10% pacientů byla nalezena trizomie chromosomů 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 a 21, zatímco monozomie a delecce převážně q raménka postihovaly přednostně chromosom 6 (6%), 13 (13%), 16 (10%) a 22 (6%). Aby autoři určili, zda existuje souvislost mezi profilem genové exprese a chromosomálními aberacemi, pomocí DNA čipů srovnávali profily genové exprese plazmatických buněk získaných od pacientů s MM a od zdravých dárců. Pro analyzované geny byla stanovena chromozomální pozice a dále počty abnormálně exprimovaných genů na jednotlivých chromosomech. Autoři zjistili pozitivní korelaci mezi chromosomálními aberacemi a genovou expresí. Většina genů ležících na chromosomech 3, 5, 7, 9, 15 a 19 měla zvýšenou expresi, zatímco geny na chromosomech 10, 13, 14, 16 a 22 měly sníženou expresi, přičemž nejmarkantnější rozdíl byl u chromosomu 13. Počet kopií chromosomů se tak promítá do úrovně transkripce.

Podobně jako další nádory z B-lymfocytů, i MM vykazuje přítomnost alterací v oblasti 14q32, kde se nachází geny těžkého řetězce imunoglobulinu (*IGH*). DNA čipy byly proto použity ke sledování expresních hladin postižených genů, s cílem stanovení možných translokačních partnerů. Autoři se zaměřili na geny, které nejsou exprimovány normálními plazmatickými buňkami, ale ve vyšších hladinách jsou detekovány u pacientů s MM. Zvýšená exprese receptoru-3 fibroblastového růstového faktoru (*FGFR3*), cyklinu D1 a D3 (*CCND1*, *CCND3*) byla ve shodě s přítomností t(4;14)(p16;q32), t(11;14)(q13;q32) nebo t(6;14)(p21;q32) (7, 13-16). Při analýze nově diagnostikovaných případů MM byla zjištěna přítomnost *CCND1* a *FGFR3* exprese u 13%, homolog musculoaponeurotického fibrosarkomového onkogenu (*c-MAF*) u 7,5% a *CCND3* u 4,1%. U 34% myelomů byla nalezena zvý-

šená exprese jednoho ze čtyř partnerů *IGH* translokace. Tato procenta však naznačují, že musí existovat i jiné vysvětlení pro sledované jevy, například přítomnost bílelické 14q32 translokace uvnitř jedné buňky, či biklonální nádor, nebo možnost, že změna hladiny zmíněných genů vznikla mechanismem nesouvisejícím s translokací. Mnohočetný myelom podtypu MM3 úplně postrádá translokace zahrnující výše uvedené geny. Autoři rovněž zmiňují paralelní expresi *FGFR3* a *MMSET* u podtypů MM1 a MM2. *MMSET* exprese bez přítomnosti *FGFR3* byla zjištěna pouze u podtypu MM4. Ve více než 90% případů klonotypických plazmatických buněk došlo ke ztrátě *FGFR3*, což naznačuje, že tak muselo dojít v časně fázi vývoje onemocnění. Aktivace *MMSET* může být rozhodující událostí při vzniku t(4;14)(p16;q32). Její přítomnost vede k charakteristické expresi 21 genů včetně 4 známých translokačních partnerů, z nichž některé mohou představovat možné partnery u 14q32 translokace (17).

Monosomie chromosomu 13 je detekována u 50-60% pacientů s MM s delečním místem v oblasti 13q14. Pro stanovení, jestli změny v genové expresi genů lokalizovaných v dané oblasti chromosomu predikují jeho delecí, byla použita fluorescenční hybridizace (FISH) a profilování genové exprese (18, 19). Ze souboru vzorků s prokázanou delecí chromosomu 13 (FISH13-) a vzorků bez delecce (FISH13+) bylo identifikováno 36 kandidátních genů. Pětatřicet genů, z nichž 32 leželo na chromosomu 13, včetně genů v oblasti 13q14 (*GTF2F2*, *TSC22* a *RBI*), mělo sníženou hladinu exprese. Pouze 1 gen, *IGF1R* (receptor pro inzulinu podobný růstový faktor 1) vykazoval vyšší hladinu transkripce. Deset genů, včetně genu retinoblastomu 1 (*RBI*), bylo použito s 85% úspěšností ke stanovení delecce u pacientů s MM bez známého stavu genu určeného pomocí metody FISH. Data z této studie naznačují, že možný důsledek delecce chromosomu 13 je vznik haploinsuficience tumor supresorového genu *RBI*, a právě snížení hladiny jeho transkriptů se může podílet na vzniku nádoru. Normální plazmatické buňky kostní dřeně i myelomové buňky exprimují *IGF1*, zatímco u ostatních typů vyžralých B-lymfocytů nebyla jeho exprese nalezena (8). Autoři naznačují, že aktivace *IGF1R* u pacientů s delecí chromosomu 13 může vytvářet autokrinní růstový signál, což potvrzují studie, ve kterých jsou hladiny sérového *IGF1R* spojeny s přežíváním pacientů s MM (20).

Statistickou analýzou profilů genové exprese ze vzorků MM bez přítomnosti delecce chromosomu 13 a bez dalších karyotypových abnormalit (CA) a vzorků s delecí chromosomu 13 a s přítomností CA, bylo nalezeno 157 genů se změněnou expresí RNA. Většina genů (91%) měla vyšší expresi ve skupině s chromosomálními aberacemi, pouze 14 genů (8 z nich na chromosomu 13) mělo v dané skupině expresi menší. Nejvíce genů kódovalo proteiny, které se podílí na proliferaci, regulaci přechodu mezi G1/S fází buněčného cyklu, segregaci chromosomů a na replikaci DNA (18, 21).

Další otázka byla, zda hladiny exprese sledovaných genů mohou rozdělit MM na čtyři cytogenetické skupiny (FISH13+/CA-, FISH13+/CA+, FISH13-/CA-, a FISH13-/CA+). Za tímto účelem bylo sledováno třicet genů: dvacet rozdílně exprimovaných mezi FISH13-/CA+ a FISH13+/CA- a deset genů odlišujících FISH13- od FISH13+ (22). Autoři analyzovali 45 pacientů s MM FISH13-/CA-, u kterých zjistili nízkou expresi genů regulujících buněčný cyklus a genů na chromosomu 13. Naopak 30 pacientů ve skupině FISH13+/CA+ mělo relativně zvýšenou expresi těchto genů. Třetí skupina, 37 pacientů FISH13+/CA-, exprimovala geny na chromosomu 13 současně se sníženou expresí genů regulujících buněčný cyklus. U 34 pacientů s MM FISH13-/CA+ byly geny buněčného cyklu byly vysoce exprimované (více než u MM FISH13+/CA+), naopak geny lokalizované na chromosomu 13 měly nízkou expresi (méně než u skupiny FISH13-/CA-). Stanovením ploidie na základě profilu genové exprese hypodiploidních a hyperdiploidních vzorků, Shaughnessy a kolektiv identifikovali 14 genů, jejichž odlišná exprese může pre-

dikovat ploidii s více než 95% přesností u vzorků se známým karyotypem a s více než 83% přesností u neinformativních případů (18, 22).

Prediktivní a prognostické profily genové exprese u mnohočetného myelomu

V případě MM již byly identifikovány profily genové exprese charakterizující klinický průběh onemocnění, s rozdíly v přežití od 2 po více než 80 měsíců od stanovení diagnózy. Podobně byly stanoveny i prediktivní profily genové exprese, a to v souvislosti s účinností léčby založené na thalidomidu a vysokodávkované chemoterapii. Rovněž byly objeveny profily predikující odpověď na kombinovanou protinádorovou léčbu režimem VAD (vinkristin, adriamycin, dexamethazon), kde byli pacienti rozděleni na dvě skupiny podle hladiny exprese 11 genů regulujících buněčný cyklus. Sedmdesát procent pacientů s vyšší expresí minimálně 8 z 11 genů, dospělo po aplikaci výše uvedené chemoterapie do částečné, nebo kompletní remise. Naopak, pouze u 30% pacientů s expresí menší než medián u 8 z 11 těchto genů, byla zjištěna odpověď na léčbu. Podobně, i v případě inhibitoru proteazomu PS-341 bylo nalezeno 44 genů, jejichž exprese predikovala odpověď na uvedenou látku. Tyto studie naznačují možnosti využití profilování genové exprese k identifikaci rizikových pacientů a k predikci odpovědi na cílenou léčbu (23,25,26).

Současné chemoterapeutické postupy využívají kombinace několika léčiv, které interferují s vícero molekulárními mechanismy nezbytnými pro životaschopnost nádorové buňky. Pomocí DNA čipů lze identifikovat geny, jejichž exprese je cíleně regulována nádorovou buňkou právě po specifickém terapeutickém zásahu. Například po ošetření buněk MM dexamethazonem vykazoval gen pro adhezní molekulu destiček/endotheliálních buněk (*PECAM1*) sníženou expresi u 20 z 20 sledovaných případů a představoval největší odchylku v genové expresi vůbec. Téměř u všech pacientů léčených dexamethazonem byla zjištěna snížená exprese proangiogenního genu vaskulárního endoteliálního faktoru (*VEGF*) a sekvence 1 genu leukémie myeloidních buněk (*MCL1*), který má antiapoptotickou funkci.

PS-341 (bortezomib) vyvolával změny v expresi pouze 9 genů (2 se zvýšenou a 7 se sníženou expresí). Snížená exprese genu Cockaynova syndromu 1 (*CKN1*) představovala největší změnu. *CKN1* kóduje protein, který reaguje mimo jiné s podjednotkou transkripčního faktoru IIH RNA polymerázy II a jeho mutace jsou spojeny s defektní opravou transkripčně aktivních genů (24). Snížená transkripce *CKN1* účinkem PS-341 může mít negativní vliv na transkripci RNA polymerázou II a vysvětluje nízký počet genů se změněnou expresí v porovnání s účinky dexamethazonu, thalidomidu a IMiD. IMiD a CC-5013 thalidomidový analog vyvolávaly změny v expresi u 98 genů (41 genů se zvýšenou a 57 genů se sníženou hladinou), zatímco thalidomid způsobil změny u 57 genů (29 zvýšená a 28 snížená hladina). Šest genů bylo ovlivněno současně IMiD i thalidomidem (25).

Metodu DNA čipů lze využít rovněž pro identifikaci nových terapeutických cílů již existujících léčiv a rozšířit tak spektrum jejich indikace. Po aplikaci léčiv můžeme identifikovat přítomnost specifických transkriptů a zjistit společné rysy profilů genové exprese u nádorových buněk v souvislosti s odlišnou odpovědí na podání určité látky. Například v maligních plazmatických buňkách byla zjištěna vysoká transkripce farnesyltransferázy (*FNTA*) a onkogenu krysího sarkomu (*RAS*) (7). *FNTA* posttranskripčně modifikuje *RAS* tak, aby se *RAS* protein mohl vázat na plazmatickou membránu, kde je schopen vykonávat svou funkci. Proto mohou mít inhibitory *FNTA* velký význam u pacientů s MM s vysokou expresí *RAS* a/nebo *FNT* (26).

Profily genové exprese charakteristické pro mikroprostředí u MGUS a MM

Růst MM a stejně tak i jiných nádorových buněk je částečně závislý na svém mikroprostředí, a to zejména na stromálních buňkách v okolí, které produkují růstové faktory a různé sig-

nální molekuly. Mimo jiné tím poskytují cytoprotektivní účinek nádorovým buňkám, včetně ochrany před účinky chemoterapie (35). Změny v expresních profilech stromálních složek mikroprostředí kostní dřeně mohou být i v případě MM spojeny s predikcí progresse onemocnění. Jedna ze studií genové exprese z biopsií kostní dřeně pacientů s MGUS, MM a zdravých dárců odhalila 146 genů se sníženou a 86 genů se zvýšenou expresí u MM. Srovnání profilů genové exprese mezi vzorky z biopsií MM a purifikovanými plazmatickými buňkami téhož pacienta prokázalo 75 genů s rozdílnou expresí. Tyto geny byly funkčně spjaty s mikroprostředím MM (microenvironment-associated genes, MAG). Celkem 54 MAG mělo sníženou a 21 MAG zvýšenou expresi, přičemž dva z pěti genů s nejvyšší odchylkou exprese, *UMAG1* a *UMAG2*, kódují adhezni proteiny, které se podílejí na vzájemných interakcích myelomových a stromálních buněk. Oba geny byly exprimovány více než desetinásobně u MM biopsií s vysokým procentem plazmatických buněk (80%) v porovnání se vzorky s nízkým procentem (20%), nebo biopsiemi od zdravých dárců. Jejich exprese přitom nebyla zvýšena ani ve vzorcích MGUS (11). U obou genů byla prokázána významná role v nádorovém růst a rezistenci na léky (27, 28). Další MAG, *UMAG3*, je člen rodiny matrixových metalloproteináz (*MMP*). Vzorky MGUS biopsií vykazovaly variabilní expresi tohoto genu, v purifikovaných plazmatických buňkách nebyl detekovatelný. Zvýšená exprese *UMAG3* naznačuje působení *MMP* v odlišných oblastech patologie MM včetně angiogeneze nebo resorpce kostí (29, 30).

Využití chromatinové imunoprecipitace při studiu epigenetických změn genů významných pro diagnostiku mnohočetného myelomu

Chromatinová imunoprecipitace, kombinovaná s polymerázovou řetězovou reakcí (ChIP-PCR), představuje významnou molekulárně-biologickou metodu, která slouží ke studiu epigenetických modifikací chromatinu. Touto metodou je možné velice detailně analyzovat vazbu transkripčních faktorů na vybrané úseky DNA a nebo studovat změny v acetylacích, methylacích, fosforylacích a ubikvitinacích histonů. Histony H2A, H2B, H3 a H4, představující hlavní složku chromatinu, jsou součástí takzvaných nukleosomů, které tvoří dva základní typy chromatinu, tj. euchromatin (transkripčně aktivní DNA) a heterochromatin (kondenzované, transkripčně neaktivní chromosomální oblasti). Ty se od sebe odlišují nejenom množstvím GC párů bazí, mírou kondenzace, ale právě i specifickými modifikacemi histonů. Typickým markerem heterochromatinu je například deacetylase a nebo methylace histonu H3 v pozici lysinu 9, která je u lidských buněk zprostředkována enzymem zvaným histon methyl transferáza Suv39H1 (31). Na druhou stranu, pro euchromatin je velmi typická acetylase a také methylace histonu H3 v pozici lysinu 4. Za všechny tyto modifikace N-terminálních konců histonů jsou opět zodpovědné příslušné enzymy jako jsou například histon acetylázy a deacetylázy (HATs, HDACs) a nově objevený demethylující enzym LSD1 (32).

Epigenetický stav příslušné kódující oblasti a hlavně promotoru, jako místa iniciace transkripce, je zásadní právě pro regulaci transkripční aktivity genů. To vše, společně s transkripčními faktory, rozhoduje o optimální expresi genů. Je obecně známo, že nádorové buňky jsou charakteristické mnoha genetickými abnormalitami, včetně genových amplifikací, delecí nebo translokací chromosomů. Tyto genetické přestavby vedou k nekontrolované expresi některých genů a tudíž jsou doprovázeny rozsáhlými změnami v epigenetických profilech chromatinu (33, 34). Z tohoto důvodu se studium epigenetické regulace exprese genů zdá být velmi zásadní z hlediska pochopení maligní transformace buněk. Chromatinová imunoprecipitace, kombinovaná s PCR metodologií, představuje slibný krok v těchto studiích. S využitím ChIP-PCR metody je možné přesně stanovit míru methylace a acetylase promotoru nebo kódující sekvence prognosticky významných genů.

ChIP-PCR metodologie zahrnuje několik kroků vedoucích k optimálnímu stanovení epigenetických změn ve vybraných lokusech. Prvním krokem je vytvoření vazby mezi DNA a histony, takzvaný „cross link“, pomocí fixace buněk ve formaldehydu. Po lyzaci buněk je třeba DNA vázanou na histony fragmentovat na menších úseky, zhruba o velikosti do 200-1000 párů bazí. K tomuto účelu se používá přístroj zvaný sonikátor. Jako další krok následuje imunoprecipitace DNA-proteinového komplexu s příslušnou protilátkou, která má schopnost rozpoznat studovanou modifikaci histonů. Po odmytí přebytečné protilátky je při teplotě 65oC přerušena vazba mezi DNA a histony a pomocí DNA izolačních a purifikačních technik je získáno optimální množství DNA. Ta je dále použita v klasické PCR reakci navržené k detekci vybraných genových lokusů, které jsou zásadní v maligní transformaci studovaných nádorových buněk. Velmi slibnou metodou se v současné době jeví i kombinace ChIP metody s DNA mikročipy, tak zvaná „ChIP-on-chip“ technologie, která slouží ke stanovení epigenetických změn například v promotorových oblastech několika stovek genů (GeneChips, Affymetrix). V tomto případě metoda přináší velké množství dat o změnách v epigenetických profilech nádorových buněk. To vše poskytuje cenné informace o celkových rozdílech mezi normální a maligně transformovanou buňkou.

V naší laboratoři jsme se zaměřili na studium změn v methylacích a acetylaci histonu H3 v pozici lysinu 9 u genů c-myc a CCND1, které hrají důležitou úlohu v patogenezi mnohočetného myelomu. V současné době se zaměřujeme na optimální

zaci metody pro vzorky získané po magnetické separaci CD138- a CD138+ buněk mnohočetného myelomu. Provedli jsme již několik pilotních studií, které budou dále rozpracovány. Rovněž se zaměřujeme na studium změn v epigenetických stavech myelomových buněčných linií ovlivněných látkami, jako je například dexamethason, melfalan nebo Velcade, které mají nezastupitelný význam při léčbě mnohočetného myelomu.

Závěr:

I přes pokroky v léčbě mnohočetného myelomu, včetně vysokodávkované chemoterapie, autologní transplantace a zavedením nových léků do léčby relapsu onemocnění, toto onemocnění zůstává stále nevyléčitelné. Výše uvedené metody umožňují sledovat změny v celkové expresi genů i změny v epigenetickém uspořádání chromatinu s cílem identifikovat molekulární profily spojené se vznikem a vývojem maligního onemocnění. Uplatnění přístupu analýzy víceetapové patogeneze myelomu umožní lépe pochopit jak se mění exprese genů a epigenetické uspořádání chromatinu během různých stadií onemocnění a popsat terapeutické cíle na molekulární úrovni u jednotlivých pacientů. Charakterizace genetických jevů a jejich důsledků důležitých v růstu a přežití myelomových buněk spolu s porozuměním mechanismu citlivosti a rezistence na aplikovanou léčbu, může pomoci odhalit pacienty, kteří budou odpovídat na danou léčbu a stanovit další cíle nových terapeutických postupů.

Poděkování:

Práce byla podpořena : VC MŠMT ČR LC06027

Literatura

- Munshi N. C., Hideshima T., Carrasco D., Shamas M., Auclair D., Davies F., Mitsiades N., Mitsiades C., Kim R. S., Li C., Rajkumar S. V., Fonseca R., Bergsagel L., Chauhan D., Anderson K. C. Identification of genes modulated in multiple myeloma using genetically identical twin samples. *Blood*. 2004;103(5):1799-806
- Davies F. E., Dring A. M., Li C., Rawstron A. C., Shamas M. A., O'Connor S. M., Fenton J. A., Hideshima T., Chauhan D., Tai I. T., Robinson E., Auclair D., Rees K., Gonzalez D., Ashcroft A. J., Dasgupta R., Mitsiades C., Mitsiades N., Chen L. B., Wong W. H., Munshi N. C., Morgan G. J., Anderson K. C. Insights into the multistep transformation of MGUS to myeloma using microarray expression analysis. *Blood*. 2003;102(13):4504-11
- Hardin J., Waddell M., Page C. D., Zhan F., Barlogie B., Shaughnessy J., Crowley J. J. Evaluation of multiple models to distinguish closely related forms of disease using DNA microarray data: an application to multiple myeloma. *Stat Appl Genet Mol Biol*. 2004;3(1):Article10
- Claudio J. O., Masih-Khan E., Tang H., Goncalves J., Voralia M., Li Z. H., Nadeem V., Cukerman E., Francisco-Pabalan O., Liew C. C., Woodgett J. R., Stewart A. K. A molecular compendium of genes expressed in multiple myeloma. *Blood*. 2002;100(6):2175-86
- Shaughnessy J. D. Jr. Global gene expression profiling in the study of multiple myeloma. *Int J Hematol*. 2003;77(3):213-25a
- Stevenson F. K., Sahota S. S. B cell maturation in relation to multiple myeloma. *Pathol Biol*. 1999;47: 89-97
- Zhan F., Hardin J., Kordsmeier B., Bumm K., Zheng M., Tian E., Sander R., Yang Y., Wilson C., Zangari M., Anaissie E., Morris C., Muwalla F., van Rhee F., Fassas A., Crowley J., Tricot G., Barlogie B., Shaughnessy J. Jr. Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bone marrow plasma cells. *Blood*. 2002;99(5):1745-57
- Zhan F., Tian E., Bum K., Smith R., Barlogie B., Shaughnessy J. Jr. Gene expression profiling of human plasma cell differentiation and classification of multiple myeloma based on similarities to distinct stages of late-stage B-cell development. *Blood*. 2003;101:1128-1140
- Medina F., Segundo C., Campos-Caro A., Gonzales-Garcia I., Brieve J. The heterogeneity shown by human plasma cells from tonsil, blood, and bone marrow reveals graded stages of increasing maturity, but local profiles of adhesion molecule expression. *Blood*. 2002;99:2154-2161
- Alizadeh A. A., Eisen M. B., Davis R. E., Ma C., Lossos I. S., Rosenwald A., Boldrick J. C., Sabet H., Tran T., Yu X., Powell J. I., Yang L., Marti G. E., Moore T., Hudson J. Jr., Lu L., Lewis D. B., Tibshirani R., Sherlock G., Chan W. C., Greiner T. C., Weisenburger D. D., Armitage J. O., Warnke R., Levy R., Wilson W., Grever M. R., Byrd J. C., Botstein D., Brown P. O., Staudt L. M. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403(6769):503-11
- Anderson KC, Shaughnessy JD Jr, Barlogie B, Harousseau JL, Roodman GD. Multiple myeloma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2002;1:214-40
- Tarte K., Zhan F., De Vos J., Klein B., Shaughnessy J. Jr. Gene expression profiling of plasma cells and plasmablasts: toward a better understanding of the late stages of B-cell differentiation. *Blood*. 2003 Jul 15;102(2):592-600
- Shaughnessy J., Gabrea A., Ying Q., Brents L., Zhan F., Tian E., Sawyer J., Barlogie B., Bergsagel P. L., Kuehl M. Cyclin D3 at 6p21 is dysregulated by recurrent Ig translocations in multiple myeloma. *Blood*. 2001;98(1):217-223
- Largo C., Alvarez S., Saez B., Blesa D., Martin-Subero J. I., Gonzalez-Garcia I., Brieve J. A., Dopazo J., Siebert R., Calasanz M. J., Cigudosa J. C. Identification of overexpressed genes in frequently gained/amplified chromosome regions in multiple myeloma. *Haematologica*. 2006;91(2):184-91
- Stewart J. P., Thompson A., Santra M., Barlogie B., Lippin T. R., Shaughnessy J. Jr. Correlation of TACC3, FGFR3, MMSET and p21 expression with the t(4;14)(p16.3;q32) in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2004 Jul;126(1):72-6
- Shaughnessy J., Tian E., Sawyer J., McCoy J., Tricot G., Jacobson J., Anaissie E., Badros A., Zangari A., Fassas A., Morris C., Muwalla F., Barlogie B. Prognostic Impact Of Cytogenetic And Interphase FISH Defined Chromosome 13 Deletion In Multiple Myeloma: Early Results Of Total Therapy II. *Br J Haematol*. 2003;120:44-52b
- Santra M., Zhan F., Tian E., Barlogie B., Shaughnessy J. Jr. A subset of multiple myeloma harboring the t(4;14)(p16;q32) translocation lacks FGFR3 expression but maintains an IGH/MMSET fusion transcript. *Blood*. 2003;101:2374-2376
- Shaughnessy J., Jacobson J., Sawyer J., McCoy J., Fassas A., Zhan F., Bumm K., Epstein J., Anaissie E., Jagannath S., Vesole D., Siegel D., Desikan R., Munshi N., Badros A., Tian E., Zangari M., Tricot G., Crowley J., Barlogie B. Continuous absence of metaphase-defined cytogenetic abnormalities, especially of chromosome 13 and hypodiploidy, ensures long-term survival in multiple myeloma treated with Total Therapy I: interpretation in the context of global gene expression. *Blood*. 2003;101(10):3849-56c
- Shaughnessy J., Tian E., Sawyer J., Bumm K., Landes R., Badros A., Morris C., Tricot G., Epstein J., Barlogie B. High Incidence of Chromosome 13 Deletion In Multiple Myeloma Detected by Multi-Probe Interphase FISH. *Blood*. 2000;96:1505-1511
- Standal T., Borset M., Lenhoff S., Wisloff F., Stordal B., Sundan A., Waage A., Seidel C. Serum insulinlike growth factor is not elevated in patients with multiple myeloma but is still a prognostic factor. *Blood*. 2002;100(12):3925-9
- Barlogie B. Jr., Shaughnessy J. D. Early results of total therapy II in mul-

- tiple myeloma: implications of cytogenetics and FISH. *Int J Hematol*. 2002;76 Suppl 1:337-9a
22. Shaughnessy J. Jr. Primer on medical genomics. Part IX: scientific and clinical applications of DNA microarrays-multiple myeloma as a disease model. *Mayo Clin Proc*. 2003;78(9):1098-109d
 23. Barlogie B., Shaughnessy J., Zangari M., Tricot G. High-dose therapy and immunomodulatory drugs in multiple myeloma. *Semin Oncol*. 2002;29(6 Suppl 17):26-33b
 24. Henning K. A., Li L., Iyer N., McDaniel L. D., Reagan M. S., Legerski R., Schultz R. A., Stefanini M., Lehmann A. R., Mayne L. V., Friedberg E. C. The Cockayne syndrome group A gene encodes a WD repeat protein that interacts with CSB protein and a subunit of RNA polymerase II TFIIH. *Cell*. 1995;82(4):555-64
 25. Shaughnessy J. Jr., Zhan F., Barlogie B., Stewart A. K. Gene expression profiling and multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2005;18(4):537-52
 26. Barlogie B, Shaughnessy J, Zangari M, Tricot G. High-dose therapy and immunomodulatory drugs in multiple myeloma. *Semin Oncol*. 2002 Dec;29(6 Suppl 17):26-33
 27. Damiano J. S., Cress A. E., Hazlehurst L. A., Shil A. A., Dalton W. S. Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. *Blood*. 1999;93:1658-1667
 28. Shain K. H., Landowski T. H., Dalton W. S. The tumor microenvironment as a determinant of cancer cell survival: a possible mechanism for de novo drug resistance. *Curr Opin Oncol*. 2000;12:557-563
 29. Vacca A., Ribatti D., Presta M., Minischetti M., Iurlaro M., Ria R., Albini A., Bussolino F., Dammacco F. Bone marrow neovascularization, plasma cell angiogenic potential, and matrix metalloproteinase-2 secretion parallel progression of human multiple myeloma. *Blood*. 1999;93(9):3064-73
 30. Wahlgren J., Maisi P., Sorsa T., Sutinen M., Tervahartiala T., Pirila E., Teronen O., Hietanen J., Tjaderhane L., Salo T. Expression and induction of collagenases (MMP-8 and -13) in plasma cells associated with bone-destructive lesions. *J Pathol*. 2001;194(2):217-24
 31. Rice J. C., Allis C. D. Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Curr. Opin. Cell Biol*. 2001;(3):263-273
 32. Shi Y., Lan F., Matson C., Mulligan P., Whetstone J. R., Cole P. A., Caseiro R. A., Shi Y. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 2004;119(7):941-953
 33. Nguyen C. T., Gonzales F. A., Jones P. A. Altered chromatin structure associated with methylation-induced gene silencing in cancer cells: correlation of accessibility, methylation, MeCP2 binding and acetylation. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(22):4598-4606
 34. Bártová E., Harničarová A., Pacherník J., Kozubek S. Nuclear topography and expression of the BCR/ABL fusion gene and its protein level influenced by cell differentiation and RNA interference. *Leuk. Res*. 2005;8:901-913

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

¹ MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, ODDĚLENÍ KLINICKÉ A EXPERIMENTÁLNÍ PATOLOGIE, BRNO

² MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, KLINIKA KOMPLEXNÍ ONKOLOGICKÉ PÉČE LF MU, BRNO

³ FAKULTNÍ NEMOCNICE OLOMOUC, DĚTSKÁ KLINIKA, LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ MEDICÍNY, OLOMOUC

⁴ 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 absolvuje 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

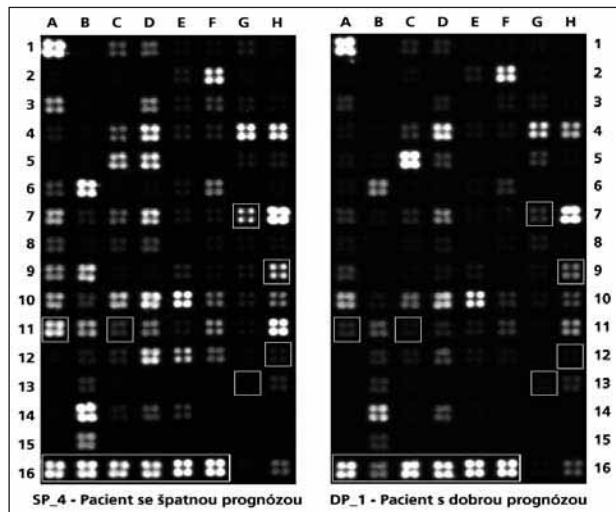
Bioptický materiál byl ihned po chirurgickém vyjmutí zamrazen a uskladněn při -80°C do dalšího zpracování. Celková RNA byla izolována pomocí TriReagentu (MRC, Research, USA) dle doporučení výrobce, v některých případech přečištěna na kolonkách užitím kitu ArrayGradea (SuperArray Bioscience Corp.). Čistota 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)

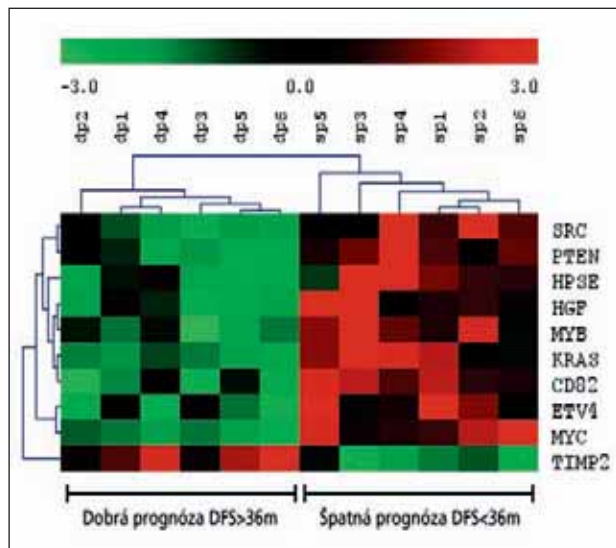
K získání expresních profilů jsme použili nízkohustotní oligonukleotidové makročipy společnosti SuperArray Tumor Metastasis Oligo GEArray (OHS-028) určené k relativní kvantifikaci exprese celkem 128 genů potenciálně zapojených do procesu nádorové invazivity a metastazování (geny související s buněčnou 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™ 2.0 (SuperArray Bioscience Corp.). Získaná cRNA byla přečištěna pomocí kolonkového kitu ArrayGrade™ 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 čipové analýzy

Vzhledem k popsáným 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 čipovým 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	SRC	V-src sarcoma viral oncogene homolog	+	H12	0,004
NM_000314	PTEN	Phosphatase and tensin homolog	+	C11	0,001
NM_006665	HPSE	Heparanase	+	D6	0,004
NM_000601	HGF	Hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)	+	E6	0,003
NM_005375	MYB	V-myb myeloblastosis viral oncogene homolog	+	H9	0,001
NM_004985	KRAS	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	+	G7	0,002
NM_002231	CD82	CD82 antigen (KAI1)	+	E7	<0,001
NM_001986	ETV4	Ets variant gene 4 (E1A enhancer binding protein, E1AF)	+	E4	0,002
NM_002467	MYC	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog	+	A11	<0,001
NM_003255	TIMP2	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	ETV6	Ets variant gene 6 (TEL oncogene)	+	F4	0,001
NM_005243	EWSR1	Ewing sarcoma breakpoint region 1	+	G4	<0,001
NM_006665	FAT	FAT tumor suppressor homolog 1 (Drosophila)	+	H4	0,004
NM_000268	NF2	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 matrilysinu 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. Námi 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

STUDIUM VLIVU METHOTREXÁTU NA EXPRESI GENŮ P53-SIGNÁLNÍ DRÁHY V LEUKEMICKÝCH BUŇKÁCH POMOCÍ cDNA ARRAY.

cDNA ARRAY ANALYSIS OF P53-SIGNALLING PATHWAY GENES IN LEUKEMIC CELLS TREATED WITH METHOTREXATE.

MICHALOVÁ E.¹, HRSTKA R.¹, ŠTĚRBA J.^{1,3}, MENDELOVÁ D.³, VALÍK D.², BABČANOVÁ S.¹, KRIVÁNKOVÁ K.¹, VOJTĚŠEK B.¹

¹ MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, ODDĚLENÍ PATOLOGIE, ŽLUTÝ KOPEC 7, BRNO

² MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, ODDĚLENÍ LABORATORNÍ MEDICÍNY, ŽLUTÝ KOPEC 7, BRNO

³ FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO, KLINIKA DĚTSKÉ ONKOLOGIE, ČERNOPOLNÍ 9, BRNO

Souhrn

Východiska: Akutní lymfoblastická leukémie je nejčastěji diagnostikovanou malignitou dětských pacientů v České republice. V posledních desetiletích byl učiněn nebývalý pokrok v její léčbě, k němuž bezesporu napomohla i řada poznatků týkající se molekulárních charakteristik onemocnění. Analýza expresních profilů pomocí „Arrays“ (čipů) se stala jednou z významných metod při identifikaci potenciálních markerů onemocnění, které by umožnily bližší charakterizaci nádorových buněk a přispěly k porozumění procesu vzniku leukémie i stratifikace léčby.

Metody a výsledky: V rámci studie byl sledován vliv methotrexátu na expresi genů p53-signální dráhy u maligních blastů izolovaných z kostní dřene dětských pacientů s akutní leukémií. Změny exprese genů byly detekovány pomocí „GEArray Q series Human p53 Signalling Pathway Gene Array“. Porovnáním získaných expresních profilů jednotlivých pacientů byly pozorovány odlišné hladiny exprese sledovaných genů u kontrolních buněk, taktéž změny transkripční aktivity vlivem methotrexátu byly různorodé. Kromě jiných došlo vlivem methotrexátu k výrazným změnám transkripce genů uplatňující se při apoptóze či regulaci buněčného cyklu. Změny exprese některých genů byly nalezeny u více pacientů, řada ostatních se však projevila individuálně, nezávisle na typu onemocnění.

Závěry: Byly detekovány změny v expresi řady genů p53-signální dráhy u maligních blastů kultivovaných *ex vivo* s methotrexátem. Odlišné hladiny exprese genů potvrzují značnou heterogenitu dětských leukémií, projevující se v našem souboru v expresních profilech a ve způsobu buněčné odpovědi na přítomnost methotrexátu, jejichž důsledkem může být různá míra citlivosti k aplikované látce a také různá odpověď pacienta na terapii.

Klíčová slova: cDNA array, leukémie, p53, methotrexát

Summary

Backgrounds: Acute lymphoblastic leukemia is the most frequent malignancy diagnosed in children in the Czech Republic. During last few decades, considerable progress in the treatment had been made and it was similarly contributed by many findings on the molecular basis of the disease. Expression profiling analysis using Macro or Micro Arrays has become an important technique to identify potential markers of the disorder, which might characterise malignant cells and help in the understanding of development of leukaemia and treatment stratification.

Methods and Results: In the present study, the effect of methotrexate on the expression of p53-signalling pathway genes was investigated in malignant blasts isolated from the bone marrow of patients with acute leukemia. Expression variations were detected using „GEArray Q series Human p53 Signalling Pathway Gene Array“. Having drawn a comparison between expression profiles, variable gene expression levels in the control cells; likewise various transcription activity alterations were observed. Significant changes in the transcription were found among genes involved in the of apoptosis or cell cycle regulation. Regarding some genes, changes in expression were observed in more than one patient. However, the expression levels of most other genes varied individually, independently on the subtype of the disease. **Conclusions:** Changes in the expression of p53-signalling pathway genes were detected in the malignant blasts cultivated *ex vivo* with methotrexate. Different levels of the transcription in our series confirm heterogeneity of childhood leukemias, where patients with the same diagnosis do not need to share identical gene expression profiles even the manner of cellular response on the presence of methotrexate, resulting in the various level of perceptiveness to the medication and in the final response to the therapy.

Keywords: cDNAarray, leukemia, p53, methotrexate

Úvod

Leukémie je nejčastějším nádorovým onemocněním dětí v České republice a tvoří asi 30-35 % všech zhoubných nádorů. Leukémií v naší republice onemocní každý rok asi 80 - 90 dětí, přičemž u převážné části z nich je diagnostikována akut-

ní lymfoblastická leukémie (ALL) (1). Jedná se o nádorové onemocnění krvetvorné tkáně, které vzniká maligní transformací kmenové buňky lymfatické řady. Vedle kostní dřene a krve však mohou leukemické buňky pronikat do dalších tkání a orgánů jako jsou mízní uzliny, slezina, játra, ledviny, CNS.

Podle fenotypu je ALL rozlišována na leukémii z B-prekursorů, která tvoří asi 85 % všech případů a leukémii z T-prekursorů (15 % případů) (2).

Stejně jako u solidních nádorů je i pro vznik leukémie nezbytný větší počet genetických změn, které jako důsledek nestability genomu buňce propůjčují odlišné „výjimečné“ nežádoucí vlastnosti, vymykající se běžnému životu buňky. Zde je možno jmenovat aberantní exprese protoonkogenů, chromozomální translokace dávající vznik fúzním genům, hyperploidie. Jejich důsledkem jsou posměněné vlastnosti kmenových buněk vedoucí k jejich abnormální proliferaci, blokování diferenciace a necitlivost k proapoptickým signálům (3). V léčbě akutní lymfoblastické leukémie byl za posledních několik desetiletí učiněn nebyvalý pokrok a ve vyspělých centrech dětské onkologie je dnes dosahováno dlouhodobých remisí u více než 80 % dětí s ALL (4, 5). K pokroku v léčbě nepochybně přispělo také intenzivní studium molekulárních charakteristik leukemických buněk prohlubující celkové znalosti o daném onemocnění.

Biologické chování buňky je do jisté míry dáno profilem exprimovaných genů. Studium buňky na úrovni RNA umožňuje sledovat její aktuální stav, který je výrazem nesčetných buněčných signálů vedoucích právě k expresi vybraných genů. Technologie založené na principu čipů umožňují analýzu exprese a transkripční aktivity stovek (makročipy) až několika tisíců (mikročipy) genů najednou (6, 7). S jejich pomocí lze sledovat transkripční aktivitu skupiny genů v nejrůznějších biologických systémech a za různě definovaných podmínek. Čipové technologie jsou využívány i při studiu maligních transformací a řešení problematiky nádorových onemocnění, leukémie nevyjímaje. Analýza transkripční aktivity širokého spektra genů a srovnávání expresních profilů je výchozí při odhalování jednotlivých genů a jimi kódovaných proteinů jako potenciálních markerů diagnózy či následné prognózy onemocnění (8, 9). Expresní analýza umožňuje odlišit akutní myeloblastickou leukémii od akutní lymfoblastické leukémie (10) či blíže klasifikovat akutní lymfoblastickou leukémii u dětí (11). Odlišné genetické abnormality maligních buněk v kombinaci s typem leukémie a řadou dalších sledovaných znaků mohou být spojeny s různou mírou citlivosti buněk k aplikované léčbě (12). Na základě identifikace klíčových genů je možno dále sledovat vývoj onemocnění (13), studovat příslušné signální dráhy vybraných genů, a to vše s cílem přispět k porozumění procesu vzniku leukémie, k vývoji nových preparátů a tím k efektivnější léčbě onemocnění.

V rámci studie byl pomocí cDNA GEArray sledován vliv methotrexátu na transkripční aktivitu genů p53-signální dráhy u maligních blastů dětských pacientů trpících akutní leukémií. Methotrexát je již po několik desetiletí nejčastěji používaným antifolátem při léčbě pacientů trpících akutní leukémií (14, 15). Působí jako silný inhibitor enzymu dihydrofolátreduktázy a narušuje tak buněčný metabolismus folátů, metabolity methotrexátu pak přímo blokuje aktivitu dalších enzymů podílejících se na syntéze purinů a pyrimidinů (16). Konečným důsledkem je celkový útlum syntézy DNA v buňce (17). Při léčbě akutní lymfoblastické leukémie je methotrexát aplikován v dávkách 12 až 36000 mg/m², přesné množství a interval dávkování jak methotrexátu, tak leukovorinu je definováno specifickými léčebnými protokoly jednotlivých kooperativních skupin (18). Chemoterapie zahrnující methotrexát vykazuje vyšší efektivitu především u pacientů trpících akutní lymfoblastickou leukémií typu B (19). Buňky B- ALL prokazují vyšší citlivost k methotrexátu než T-ALL buňky (20, 21). Rozdíly mezi nimi byly nalezeny v intenzitě transportu methotrexátu do buněk, v aktivitě metabolizujících enzymů či v afinitě metabolitů methotrexátu k cílovým molekulám (21). Mechanismus odpovědi leukemických buněk na terapii methotrexátem není doposud zcela objasněn, přispívá k tomu i množství a variabilita genetických změn podílejících se na vzniku leukémie.

Materiál a metody

Od pacientů léčených na Klinice dětské onkologie FN Brno s diagnózou akutní lymfoblastické leukémie (ALL) a akutní myeloidní leukémie (AML) byly získány vzorky kostní dřeně, ze kterých byly izolovány maligní blasty pomocí systému Lymphoprep (Axis-Shield). Blasty byly převedeny do RPMI média (Sigma) s obsahem 5- methyltetrahydrofolátu o výsledné koncentraci 25 nM a následně kultivovány se 40 μM methotrexátem či s DMSO jako kontrola po dobu 24 hod. Buňky byly sklizeny a pelety uchovány při -80 °C. Z blastů byla izolována celková RNA pomocí RNeasy Mini Kit (Qiagen) nebo TriReagent (MRC).

Expresce p53-signálních genů byla sledována pomocí GEArray Q series Human p53 Signalling Pathway Gene Array (SuperArray Bioscience Corporation). Produkt je navržen pro studium panelu 96 genů spojených se signální dráhou proteinu p53, podle vztahu k p53 jsou geny rozděleny do několika funkčních skupin (**Tabulka 1**). Izolovaná celková RNA byla naznačena biotinem v procesu reverzní transkripce pomocí MMLV-reverzní transkriptázy (Promega) a získaná cDNA následně použita jako hybridizační sonda. Při hybridizaci se sonda specificky váže na komplementární sekvence jednotlivých genů, ukotvené v přesně definovaných pozicích na komerčně dodávané membráně. Pozitivní signály na membráně jsou detekovány na principu chemiluminiscence. Míra exprese jednotlivých genů byla hodnocena jako intenzita signálů pomocí programu TotalLab 2003 (Nonlinear USA Inc) a normalizována vzhledem k expresi genu GAPDH kódujícího glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázu. Princip metody znázorňuje **Obrázek 1**. Získaná data byla statisticky analyzována v programu Statistica Cz7 (StatSoft) za použití Wilcoxonova testu s hladinou významnosti $p < 0,05$.

Celkově byla exprese p53-signálních genů byla hodnocena u 12 pacientů trpících ALL, z toho u 10 případů ALL B-řady (B1 až 10) a 2 případů T-ALL (T1, 2), a u 2 pacientů trpících AML (AML1, 2).

Tabulka 1.: Geny analyzované z hlediska jejich exprese pomocí GEArray Q series Human p53 Signalling Pathway Gene Array

p53 rodina: TP53, TP63, TP73

Geny ovlivňující p53:

Expresce a stabilita p53: BZRP (pBR), CREBBP (CBP), D5S346 (DP1), E2F1 (E2F), EP300 (p300), MDM2, MTBP, NFKB1, NUMB

Modifikace p53: ATM, ATR, CCNH (cyclin H), CDK7 (CAK), CHEK1 (Chk1), CHEK2 (Chk2), CREBBP (CBP), CSNK1A1 (CK1), CSNK2A1, CSNK2A2, CSNK2B, EP300 (p300), HIPK2, KIP2, KIP3, MAP2K4, MAP2K7, MAPK8IP2, PCAF, PML, PRKCA, PRKCB1, PRKCG, PRKCQ, PRKDC (DNA-PK), SIRT1

Interakce s p53: APEX (Ref-1), BAP1, BRAP, BRCA1, CDKN2A (p14ARF), E1B-AP5 (E1B55K), E2F1, MDM2, MYC, RASA1 (Ras), RB1 (pRB), TEAD1 (SV40), WRN, WT1

Geny ovlivněné p53:

Buněčný cyklus: ABCB1 (MDR1), ACTA1 (actin), AD022, APR-3, CDC2, CDKN1A (P21Waf1), DAXX, ESR1, FADD, FAF1, GADD45A, GTS1 (B99), HIF1A, HSPA4 (Hsp70), LRDD, MAP4, NDRG (RTP), PIG8 (E124), PMP22, RELA, REPRIMO, SFN (14-3-3), SP1, STAT5A, TBP, THRA, TNFAIP1, TNFSF6, TP53TGI, TRAF1, TRAF4, TRAF5, WIG1

Apoptóza: APAF1, BAX, BBC3 (PUMA), BCL2, CASP9 (Caspase-9), CTSD (Cathepsin D), LRDD (PIDD), P53AIP1, PMAIP1 (NOXA), PMP22 (GAS-3), TNF, TNFRSF10B (Killer5/DR5), TNFSF6 (Fas), TP53BP2 (ASPP2)

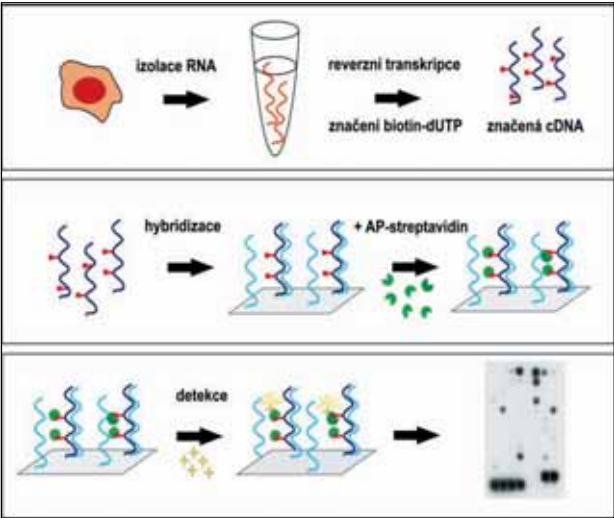
Reparace DNA: GADD45A, RRM2B (p53R2)

Angiogeneze a tvorba metastáz: BAI1, SERPINB5 (Maspin), THBS1 (TSP1)

Tabulka 2.: Expres vybraných genů p53-signální dráhy u jednotlivých pacientů vyjádřená procentuálně vzhledem k expresi genu GAPDH. K: kontrolní blasty kultivované bez methotrexátu, ME: blasty kultivované s methotrexátem.

Gen	B1		B2		B3		B4		B5		B6		B7		B8		B9		B10		T1		T2		AML1		AML2		
	K	ME	K	ME	K	ME	K	ME	K	ME	K	ME	K	ME	K	ME	K	ME	K	ME	K	ME	K	ME	K	ME	K	ME	
BAX	166	358	6	12	8	18	0	13	0	19	15	23	15	6	21	23	8	0	10	5	27	3	11	17	0	0	0	0	
BBC3	181	416	55	99	118	170	523	100	516	213	303	444	72	178	336	274	380	270	123	124	149	147	124	121	125	211	54	44	
BCL2	0	0	11	14	0	0	14	14	0	10	27	38	13	17	52	44	47	41	7	1	31	25	0	0	30	7	14	11	
ASPP2	138	177	16	15	90	127	0	0	0	6	33	45	10	14	18	36	33	28	22	12	41	24	93	100	17	0	0	8	
FAF1	181	263	4	9	118	120	0	4	33	10	8	16	9	16	4	26	27	10	10	5	23	11	114	115	3	0	0	0	
HIF1A	7	25	47	70	86	187	101	59	0	34	123	219	28	10	62	78	109	121	100	90	58	46	140	45	37	30	14	9	
MDM2	2	9	64	117	82	72	0	41	60	34	89	144	12	16	134	124	107	111	89	81	80	62	3	3	43	32	16	26	
MTBP	22	141	3	6	6	6	0	0	13	24	22	27	8	2	6	20	25	20	3	11	9	5	3	6	13	32	7	0	
p14/CDKN2A	169	230	44	68	54	122	378	100	183	170	287	419	87	197	280	235	306	213	113	114	155	167	33	46	153	177	11	21	
p21/CDKN1A	41	97	18	33	3	14	105	47	127	13	31	72	18	26	35	51	22	16	9	20	0	45	0	0	24	28	11	7	
SP1	112	164	23	34	25	29	486	46	315	64	46	81	26	50	38	42	52	13	35	23	45	0	20	14	6	46	10	1	
EP300	15	78	17	47	3	5	0	24	137	49	70	107	44	61	78	79	84	58	61	51	100	99	2	4	45	59	23	25	
CSNK1A1	33	176	38	46	58	40	0	21	243	90	62	118	26	41	89	104	141	95	56	30	150	122	34	16	77	78	41	29	
JNKK2	230	259	38	83	79	99	370	85	640	154	287	427	91	218	339	279	342	257	103	138	128	115	48	59	197	302	82	115	
SIRT1	28	103	15	36	114	139	0	10	226	44	42	118	28	25	102	99	148	85	30	28	64	72	80	10	77	96	39	47	
HIPK2	280	475	18	53	85	123	113	49	304	138	184	321	39	58	100	138	240	187	94	107	86	47	60	83	67	112	21	9	
TP53	0	4	9	12	0	0	0	12	0	12	25	34	9	17	8	19	21	17	9	2	15	13	0	0	5	6	1	9	
GAPDH	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Obrázek 1.: Princip metody cDNA GEArray.



Výsledky a diskuse

Při porovnání expresních profilů byly zjištěny rozdílné hladiny exprese jednotlivých genů v kontrolních buňkách, taktéž míra odpovědi buněk na působení methotrexátu se mezi pacienty lišila. U všech pacientů bylo možné sledovat změny v expresi genů uplatňujících se v procesu apoptózy. Pacienti B1, B2, B6, B8 a AML1 se vyznačovali statisticky významným nárůstem exprese proapoptických genů. Opačný účinek methotrexátu u dané skupiny genů byl zjištěn u pacientů B5 a B9. Silná transkripční aktivita v kontrole i po podání methotrexátu byla zaznamenána u genu BBC3, kódující protein PUMA, který vazbou na BCL2 indukuje uvolnění cytochromu c z mitochondrií a následně apoptózu (22). Výrazný nárůst exprese BCL2 vazebného proteinu BAX byl pozorován u pacienta B1, u ostatních se hladina exprese po methotrexátu zvýšila jen mírně a zůstávala celkově nízká. Hladina exprese BCL2,

působícího jako inhibitor apoptózy (23), byla taktéž nízká, případně poklesla vlivem methotrexátu. Dále byly zaznamenány individuální změny v expresi proapoptických genů PIDD, NOXA, APAF- 1, ASPP2 a genů FADD, FAF1 a HIF1A uplatňujících se kromě apoptózy i při regulaci buněčného cyklu. Byla pozorována pouze bazální transkripční aktivita TP53 a vlivem methotrexátu se výrazně neměnila. U některých pacientů však došlo ke změnám exprese v genu kódujícího protein MDM2, který je negativním regulátorem endogenní hladiny proteinu p53 (24). Methotrexát taktéž ovlivnil transkripční aktivitu genů, jejichž produkty se uplatňují při regulaci buněčného cyklu. U blastů kultivovaných s methotrexátem rostla u některých pacientů exprese p21^{Waf1/Cip1}, kódujícího inhibitor cyklin-dependentních kináz (25, 26) a ARF (p14), jehož produkt se váže na MDM2 a podporuje jeho degradaci (27). U pacienta B1 byl zaznamenán výrazný vzestup exprese MTBP, jehož produkt může navodit zástavu buněčného cyklu v G1 fázi nezávisle na p53 (28). Celkové zvýšení exprese skupiny genů přispívající k zástavě buněčného cyklu bylo pozorováno u pacientů B1, B2, B6, B7 a AML1, útlum exprese naopak u pacientů B4, B5, a B9. Vysoké hladiny exprese a individuální změny byly prokázány u genů kódujících produkty spojené s modifikací p53: JNKK2, CSNK1A1, SIRT1 nebo HIPK2, kódující kinázu, která stabilizací p53 či negativní regulací MDM2 přispívá k indukci apoptózy či zástavě buněčného cyklu (29). Individuální změny exprese po vystavení buněk methotrexátu byly detekovány i u řady transkripčních faktorů či vazebných proteinů (SP1, EP300). Výsledky expresní analýzy vybraných p53-signálních genů u jednotlivých pacientů uvádí **Tabulka 2.** V rámci vyšetřovaném souboru byly nalezeni pacienti (B1, B2, B6), u nichž methotrexát navodil zvýšenou expresi genů indukujících apoptózu a zástavu buněčného cyklu. Naopak u pacientů B5 a B9 byl zaznamenán opačný efekt vedoucí k celkovému poklesu transkripční aktivity sledovaných genů. Klinické údaje týkající se průběhu léčby v současnosti nebyly dostupné u všech sledovaných pacientů a celkové hodnocení získaných výsledků v souvislosti s úspěšností léčby bude vyžadovat delší časový odstup.

Cílem studie bylo zjistit, zda methotrexát navozuje změny exprese signálních genů p53 a popřípadě vytipovat geny, které by přispěly k charakterizaci onemocnění či sledování jeho průběhu a odpovědi pacienta na léčbu. Na základě analýzy vzorků 15 pacientů však nebyl nalezen gen, jehož transkripční aktivita by byla obdobná u všech pacientů. Řada genů byla exprimována s vysokou intenzitou, taktéž změny exprese vlivem methotrexátu byly v některých případech velmi výrazné. Jednotliví pacienti se však mezi sebou lišili jak ve spektru silně exprimovaných genů, tak i ve spektru změn exprese a jejich intenzitě. Tato variabilita je potenciálním důsledkem odlišného genetického pozadí každého pacienta, které ovlivňuje i buněčnou odpověď na přítomnost cytostatika.

Technologie cDNA Array použitá v rámci studie je varianta expresní analýzy finančně méně náročná, která taktéž nevyžaduje speciální a nákladné přístrojové vybavení. Je koncipována pro studium užší skupiny genů (96 genů), přesněji genů vybrané signální dráhy a výběr produktu je možno jednodušeji orientovat v závislosti na sledovaném problému či studovaném systému. Stěžejním krokem je izolace celkové RNA jako výchozího materiálu pro syntézu značené cDNA sondy. Úspěšnost izolace v tomto případě závisela především na objemu sedimentu kultivovaných blastů, jejich množství izolovaná ze vzorku kostní dřeně však nebyla vždy dostačující, což bylo jedním z faktorů limitující počet doposud vyšetřených pacientů. S koncem roku 2005 firma SuperArray Bioscience Corporation ukončila výrobu doposud používaného produktu „GEArray Q series Human p53 Signalling Pathway Gene Array“ a nahradila jej distribucí produktu „Oligo GEArray Human p53 Signalling Pathway Microarray“. Počet analyzovaných vzorků, rozšiřující stávající výsledky (30), byl omezen počtem dostupných membrán původního produktu. Expre-

si genů p53-signální dráhy bude dále možno studovat pomocí OligoGEArray, založeného na obdobném principu.

Závěr

Z výsledků studie vyplývá, že u maligních blastů kultivovaných s methotrexátem skutečně dochází ke změnám exprese některých genů p53-signální dráhy. Heterogenní expresní profily kontrolních buněk a buněk kultivovaných *ex vivo* s methotrexátem odrážejí odlišná genetická pozadí každého pacienta a odlišný způsob odpovědi jednotlivců na přítomnost antifolátu. Tato skutečnost je plně v souladu se současným trendem biomedicínského výzkumu, který směřuje k vytvoření personalizované medicíny, kde medikamentózní léčba bude cílena na fyziologické a genetické pozadí pacienta.

Byla pozorována indukce exprese genů, jejichž produkty se účastní regulace apoptózy a buněčného cyklu a které by tak mohly hrát významnou roli při eliminaci maligní buněčné populace. Pro zhodnocení vztahu vytipovaných genů k methotrexátu by však bylo potřeba ještě více rozšířit soubor analyzovaných vzorků a studovat tyto geny také z hlediska jimi kódovaných proteinů a jejich interakcí. Poznatky o působení methotrexátu by dále mohly být rozšířeny o analýzu změn exprese genů jiných signálních drah, pro které výrobce dodává taktéž komerčně připravené membrány typu „GEArray Q series Array“ nebo „Oligo GEArray Microarray“. Budoucí výsledky získané expresní analýzou dalších pacientů by tak mohly přispět k hodnocení citlivosti a individuální míry odpovědi pacientů na terapii methotrexátem.

Poděkování

Práce byla podpořena z finančních zdrojů IGA MZ ČR No. NR8338- 3/2005 a MZO 000209805.

Literatura

- Mališ J, Klenner P. Nádorová onemocnění dětského věku. In: Klenner P, ed. Klinická onkologie. Galén, 2002:607-630.
- Starý J. Moderní léčba dětské leukémie je především ambulantní. Vox Pediatrica 2003; 3:16-20.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell 2000; 100:57-70.
- Pui CH, Relling MV, Campana D, Švand WE. Childhood acute lymphoblastic leukemia. Rev Clin Hematol 2002; 6:161-180.
- Starý J. Historie a současnost léčby akutní lymfoblastické leukémie u dětí. Trans Hematol 2005; 11:170-175.
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with complementary DNA microarray. Science 1995; 270:467-470.
- Diehn M, Alizadeh AA, Brown PO. Examining the living genome in health and disease with DNA microarrays. JAMA 2000; 283:2298-2299.
- Nasedkina TV, Zharinov VS, Isaeva EA et al. Clinical screening of gene rearrangements in childhood leukemia by using a multiplex polymerase chain reaction-microarray approach. Clin Cancer Res 2003; 9:5620-5629.
- Bruchova H, Kalinova M, Brdicka R. Array-based analysis of gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. Leuk Res 2004; 28:1-7.
- Golub TR, Slonim DK, Tamayo P et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. Science 1999; 286:531-537.
- Yeoh EJ, Ross ME, Shurtleff SA et al. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. Cancer Cell 2002; 1:133-143.
- Belkov VM, Krynetski EY, Schuetz JD et al. Reduced folate carrier expression in acute lymphoblastic leukemia: a mechanism for ploidy but not lineage differences in methotrexate accumulation. Blood 1999; 93:1643-1650.
- Chen JS, Coustan-Smith E, Suzuki T et al. Identification of novel markers for monitoring minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. Blood 2001; 97:2115-2120.
- Farber S, Diamond LK, Mercer RD et al. Temporary remission on acute leukemia in children produced by folic acid antagonists, 54-aminopteroylglutamic acid (aminopterin). N Engl J Med 1948; 238:778-793.
- Bertino JR. Karnofsky memorial lecture. Ode to methotrexate. J Clin Oncol 1993; 11:5-14.
- Miller GP, Benkovic SJ. Stretching exercises—flexibility in dihydrofolate reductase catalysis. Chem Biol 1998; 5: R105-R113.
- Olsen EA. The pharmacology of methotrexate. J Am Acad Dermatol 1991; 25:306-318.
- Minnaur NJ, Kounali D, Vedi S et al. Methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. II. In vivo effects on bone mineral density. Rheumatology 2002; 41:741-749.
- Evans WE, Relling MV, Rodman JH et al. Conventional compared with individualized chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med 1998; 8:499-505.
- Galpin AJ, Schuetz JD, Masson E et al. Differences in folylpolyglutamate synthetase and dihydrofolate reductase expression in human B-lineage versus T-lineage leucemic lymphoblasts: mechanism for lineage differences in methotrexate polyglutamylation and cytotoxicity. Mol Pharmacol 1997; 52:155-163.
- Rots MG, Pieters R, Peters GJ et al. Role of folylpolyglutamate synthetase and folylpolyglutamate hydrolase in methotrexate accumulation and polyglutamylation in childhood leukemia. Blood 1999; 93:1677-1683.
- Yu J, Zhang L, Hwang PM et al. PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. Molec Cell 2001; 7:673-682.
- Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. Cell 1993; 74:609-619.
- Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH. Regulation of p53 stability by Mdm2. Nature 1997; 387:299-303.
- el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. Cell 1993; 75:817-825.
- Harper JW, Adami GR, Wei N et al. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. Cell 1993; 75:805-816.
- Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. Cell 1998; 92:725-734.
- Boyd MT, Vlatkovic N, Haines DS. A novel cellular protein (MTBP) binds to MDM2 and induces a G1 arrest that is suppressed by MDM2. J Biol Chem 2000; 275:31883-31890.
- Di Stefano V, Mattiussi M, Sacchi A, D'Orazi G. HIPK2 inhibits both MDM2 gene and protein by, respectively, p53-dependent and independent regulations. FEBS Lett 2005; 579:5473-80.
- Hrstka R, Muller P, Vojtěšek B et al. Analýza změn exprese p53-signálních genů v buňkách akutní lymfoblastické leukémie v závislosti na působení methotrexátu. Klinická onkologie 2005; 18:64-68.

ARRAY COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDISATION AS A TOOL FOR A RAPID MAPPING OF BREAKPOINTS IN UNBALANCED TRANSLOCATIONS IN LEUKEMIA

ARRAY KOMPARATIVNÍ GENOMICKÁ HYBRIDIZACE JAKO NÁSTROJ PRO RYCHLÉ MAPOVÁNÍ ZLOMOVÝCH MÍST NEBALANCOVANÝCH TRANSLOKACÍ U LEUKÉMIÍ

POSPÍŠILOVÁ H.^{1,2}, MORZUCH L.¹, JAROŠOVÁ M.², VANDENBERGE P.¹, WLODARSKA I.¹

¹DEPARTMENT OF HUMAN GENETICS, CATHOLIC UNIVERSITY OF LEUVEN, LEUVEN, BELGIUM

²DEPARTMENT OF HEMATO-ONCOLOGY, PALACKÝ UNIVERSITY, OLMOUC, CZECH REPUBLIC

Summary

Background: Chromosomal translocations involving immunoglobulin loci (14q32/*IGH*, 2p11/*IGK* and 22q11/*IGL*) play an important role in pathogenesis of B cell leukemia and lymphoma. These aberrations lead to deregulated transcription of targeted oncogenes by their juxtaposition with the *IGH* transcriptional enhancer(s). Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) showed to be a potential tool for identification of cancer-related genes located in breakpoint regions of chromosomal translocations. However, the commonly used „probe-mapping“ FISH strategy requires numerous experiments with consecutively selected probes from the narrowed down region and uses a significant amount of cytogenetic material. One of the alternative approaches, array comparative genomic hybridisation (aCGH), is a rapid technique that operates on DNA level and uses only a small amount of tumor material. In contrast to FISH, however, it analyzes only unbalanced aberrations. The aim of this study was to evaluate array comparative genomic hybridisation (aCGH) as a potential tool for a rapid mapping of breakpoint of non- reciprocal *IGH*-associated translocation in B cell leukemia and lymphoma. **Material and methods.** For this study, we selected one case of B cell chronic lymphocytic leukemia (CLL) with a complex karyotype including unbalanced der(14)t(1;14)(q25;q32) involving *IGH*. Genomic profiling of this case was performed using 1 megabase (Mb) aCGH. Validation of aCGH results was done by metaphase FISH with Bacterial Artificial Chromosome (BAC) clones and chromosome painting probes.

Results and conclusions. In one single aCGH experiment eight regions of genomic imbalances (4 gains and 4 losses) were identified. As expected, these imbalances included also duplication of 1q due to the der(14)t(1;14). Two consecutive BAC clones flanking the proximal breakpoint at 1q21.3 have been identified. These clones were further applied for metaphase FISH analysis that confirmed aCGH findings. Despite of 1 Mb resolution of the applied platform, these particular clones are separated by approximately 3 Mb. Given that this region is gene-rich, further BAC-mapping is required to identify the candidate gene located in the breakpoint region. Moreover, aCGH data helped us to correct original cytogenetic findings and precisely define karyotypic changes in this case. Our data provide additional evidence that aCGH is a powerful technique for molecular karyotyping of tumors and allows a rapid mapping of genomic imbalances, including breakpoints of non-reciprocal translocations. As shown in this study, the latter can be detected with high accuracy and sensitivity during a single experiment.

Keywords: array comparative genomic hybridisation, aCGH, unbalanced translocation, oncogene, *IGH*, chronic lymphocytic leukemia

Souhrn

Východiska: Chromosomální translokace zahrnující imunoglobulinové lokusy (14q32/*IGH*, 2p11/*IGK* a 22q11/*IGL*) hrají důležitou roli v patogenezi B-buněčných leukémií a lymfomů. Jejich výsledkem je deregulace transkripce onkogenů zahrnutých do těchto translokací, která je způsobená jejich juxtapozicí s *IGH* transkripčními enhancery. Pro identifikaci nádorových genů lokalizovaných v blízkosti zlomových míst chromosomových translokací lze použít fluorescenční *in situ* hybridizaci (FISH). Nicméně běžně užívaná mapovací strategie metodou FISH vyžaduje velký počet experimentů se sondami vybranými ze zkoumané oblasti a spotřebuje značné množství cytogeneticky zpracovaného nádorového materiálu. Jedním z alternativních přístupů je array komparativní genomická hybridizace (aCGH), rychlá technika na úrovni DNA, která používá jen malé množství nádorového materiálu. Narozdíl od metody FISH však dovoluje určit pouze nebalancované změny. Cílem této práce bylo ukázat, že aCGH je efektivní nástroj k rychlému mapování zlomových míst nerekipročných *IGH* translokací u B-buněčných leukémií a lymfomů.

Materiál a metody. Pro tuto studii jsme vybrali jednoho pacienta s B-buněčnou chronickou lymfocytární leukémií (CLL) s komplexním karyotypem a nebalancovanou translokací der(14)t(1;14)(q25;q32) zahrnující *IGH*. Ke genomickému profilování tohoto případu jsme použili metodu aCGH s rozlišením 1 megabáze (Mb). Validace výsledků aCGH byla provedena pomocí metafázové FISH s BAC klony a celochromosomovými malovacími sondami. **Výsledky a závěry.** Během jednoho aCGH experimentu bylo identifikováno osm aberrantních oblastí (4 zmnnožení a 4 ztráty genetického materiálu). Podle našeho očekávání tyto abnormality

zahrnovaly také duplikaci 1q zahrnuté do tranlokace der(14)t(1;14). Byly identifikovány dva po sobě následující BAC klony ohraničující zlomové místo v oblasti 1q21.3. Tyto klony byly posléze použity pro meta-fázovou FISH, která potvrdila aCGH nález. Navzdory 1 Mb rozlišení použitého chipu, byly od sebe tyto dva konkrétní klony odděleny oblastí přibližně 3 Mb velkou. Vzhledem k tomu, že v této oblasti se vyskytuje velké množství genů, je k identifikaci kandidátního genu ležícího v oblasti zlomu nezbytné další mapování za pomoci BAC klonů. aCGH výsledky nám navíc pomohly opravit původní cytogenetický nález a přesně určit změny karyotypu u tohoto pacienta. Naše data poskytují další důkaz toho, že aCGH je efektivní technika pro molekulární karyotypování nádorů a umožňuje rychlé mapování genomických změn, včetně zlomových míst nerekipročných translokací. Ty mohou být detekovány s vysokou přesností a citlivostí během jediného experimentu, jak ukazuje naše práce.

Klíčová slova: array komparativní genomická hybridizace, aCGH, nebalancované translokace, onkogen, *IGH*, chronická lymfocytární leukémie

INTRODUCTION

Molecular cytogenetic techniques including FISH and aCGH are potential tools used to unravel tumor-associated chromosomal aberrations. They offer precise molecular karyotyping with a much higher resolution than conventional banding analysis. Among others, FISH has been successfully applied for mapping of translocation breakpoints and identification of targeted genes. This strategy, however, requires selection of numerous DNA probes from the presumably involved region and several rounds of experiments before the breakpoint region will be narrowed down to <1 Mb. Usually this procedure is labourious and time- and material-consuming. Array comparative genomic hybridisation (aCGH) enables rapid and efficient mapping of genomic imbalances (including unbalanced translocations) in one reaction at a resolution given only by the size and density of clones on the array (1). By principle, this technique does not operate in cases with balanced rearrangements.

The aim of this study was to evaluate aCGH as a tool to identify putative oncogenes located in the breakpoint regions of non-reciprocal *IGH*/14q32-associated translocations in B cell leukemia and lymphoma. It is well known that these, usually reciprocal, translocations result in deregulated transcription of affected oncogenes by bringing them in the vicinity of regulatory sequences of *IGH*. Thus, hypothetically, each gene affected by 14q32/*IGH* translocation can be considered as a putative oncogene.

To evaluate potential of aCGH in a rapid mapping of breakpoints of *IGH*-associated translocations, we selected one case of B cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) with unbalanced der(14)t(1;14)(q25;q32) and other complex chromosomal changes. Results of our studies are shown and discussed below.

MATERIAL AND METHODS

Patient

Patient, 66-year-old male with clinically and immunophenotypically unambiguous B-CLL, was recently diagnosed in our center. Peripheral blood was taken at the time of diagnosis after informed consent.

Cytogenetic analysis

Peripheral blood cells were cultured 72 hours in presence of tetradecanoyl phorbol acetate (TPA). Chromosome preparations, R-banding and karyotyping were performed using conventional methods. Chromosomal aberrations were described according to ISCN (2005)(2).

Array CGH

Arrays were constructed using a 1 Mb Clone Set (Wellcome Trust Sanger Institute, UK) containing a total of 3527 BAC/PAC clones (3), in MicroArray Facility (Flanders

Interuniversity Institute for Biotechnology, VIB, Leuven, Belgium). Genomic DNA was extracted according to standard procedures. Test and reference gDNA were labeled by a random prime labeling system (BioPrimeR Array CGH Genomic Labeling Module, Invitrogen, Carlsbad, CA) with Cy3-/Cy5-labeled dCTPs (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Probe preparation, preblocking of the slide, hybridization and posthybridisation washes were performed with small modifications as described previously (3, 4). Slides were scanned using GenePix 4000B scanner (Axon Instruments, Foster City, CA), image and data analysis was done using GenePix Pro 6.0 (Axon Instruments) and Excel (Microsoft Inc., Diegem, Belgium). Data were normalized by dividing the fluorescent intensity ratio of each spot by the mean of the ratios of the autosomes. The normalized ratio values of the duplicates were averaged and a log₂ value was calculated. For detection of copy number alterations we determined our thresholds as 0.3 for gains and -0.3 for losses.

Interphase/metaphase FISH

BAC/PAC clones, RP4-790G17 (148,42-148,56 Mb) and RP11-216N14 (151,95-152,11 Mb), were labeled in Spectrum Green and Spectrum Orange, respectively and used for FISH. We selected them from the 1 Mb Clone Set (Wellcome Trust Sanger Institute, UK) used for arrays. Other applied probes included LSI *IGH*, WCP 2 (Vysis Inc, IL, USA), WCP7 and WCP 8 (Cambio Ltd, Cambridge, UK) and break-apart *IG* kappa assay (5). BAC DNA was labeled by a random prime reaction (RadPrime DNA labeling system, Invitrogen) with Spectrum Orange/Green d-UTPs (Vysis Inc.) according to manufacturers protocols.

FISH experiments were evaluated using the Axioplan 2 fluorescence microscope equipped with the charge-coupled device Axiophot 2 camera (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany) and the MetaSystems Isis imaging system (MetaSystems, Altlussheim, Germany). Three to six abnormal metaphases were evaluated in each FISH experiment.

RESULTS AND DISCUSSION

Cytogenetic analysis of peripheral blood cells from the reported patient revealed presence of two related abnormal clones presented in Table 1. The second subclone showed structural aberrations of both 14q32 described as der(14)t(1;14)(q25;q32) and add(14)(q32).

The applied aCGH analysis identified 8 regions of genomic imbalances. These imbalances include loss of 10q26.3qter, 11q22.3q23.2, 13q14.2q14.3 and 14q32.33qter and duplication of 1q21.3qter, 2p14pter, 7q11.2qter and 8q21.3qter (Fig. 1A). The size of unbalanced regions varied from 2 to 97 Mb. The identified duplicated 1q region covered 94 Mb; RP4-790G17 mapped at 148,42-148,56 Mb is the first proximal

Table 1.: Summary of cytogenetic and aCGH/FISH results
*aCGH results described according to ISCN (2005)

Karyotype	aCGH results*	Karyotype corrected after aCGH and FISH
1. 46,XY,add(5)(q35),add(10)(q26),del(11)(q21q23),del(13)(q13q21) [3]/	arr cgh 1q21.3qter(RP4790G17→CTB-160H23)x3, 2p14pter(GS1-68F18→RP11-568N6)x3, 7q11.2qter(RP5-905H7→RP4-764O12)x3, 8q21.3qter(RP11-3J21→CTC-489D14)x3, 10q26.3qter(RP11-168C9→CTB-137E24)x1, 11q22.3q23.2(RP11-563P16→RP11-212D19)x1, 13q14.2q14.3(RP11-305D15→RP11-431O22)x1, 14q32.33qter(RP11-417P24→CTC-820M16)x1	1. 46,XY,add(5)(q35), der(10)t(8;10)(q21.3;q26.3), del(11)(q22.3q23.2),del(13)(q14.2q14.3) [3]/
2. 46,XY,del(2)(p12),t(3;13)(q27;q31),add(7)(q35),add(8)(p12),add(10)(q26),del(11)(q21q23),del(13)(q13q21),der(14)t(1;14)(q25;q32),add(14)(q32),add(15)(q26) [5]		2. 46,XY,t(2;14)(p12;q32),t(3;13)(q27;q31),dup(7)(q11.21qter), der(10)t(8;10)(q21.3;q26.3), del(11)(q22.3q23.2),del(13)(q14.2;q14.3),der(14)t(1;14)(q21.3;q32.33),der(15)t(2;15)(p14;q26.3) [5]

BAC clone found to be duplicated and CTB-160H23 at 247,03-247,17 Mb is the most terminal duplicated clone. These results indicated gain of the 1q21.3qter region (B). According to cytogenetics, this region was translocated to the der(14). To validate this aCGH finding, we performed metaphase FISH analysis with SpectrumGreen-labeled RP4-790G17 (148,42-148,56 Mb) and SpectrumOrange-labeled RP11-216N14 (151,95-152,11 Mb); the latter clone represents the adjacent proximal region flanking the 1q21.3 breakpoint. Indeed, the der(14)t(1;14) was marked by a single green signal while both normal chromosomes 1 carried co-localized green/red signals (Figure 2.A). The aberrant 2FIR signal pattern was found in 36 % of interphase cells. Further FISH with LSI IGH applied on the previously analyzed metaphases showed two red signals (3' end of IGH) on der(14) and add(14) and one green signal (IGHV) on chromosome resembled del(2)(p12) (Fig. 2.B). Loss of the second green IGH signal was in line with the 14q32.33-qter loss found by aCGH illustrating the non-reciprocal t(1;14). The postulated reciprocal t(2;14)(p14;q32.33) was demonstrated by chromosome painting with WCP2 that hybridized to the add(14)(q32), del(2)(p12), normal chromosome 2 and unexpectedly, to add(15)(q26). The 2p12 breakpoint of t(2;14) was further mapped distally to *IGK* that retained on the der(2).

The remaining 7q11.2qter and 8q21.3qter gains were also validated by metaphase FISH using respective chromosome paintings. WCP7 hybridized with a normal chromosome 7 and add(7)(q35) indicating dup(7)(q11qter). WCP8 marked two normal chromosomes 8 and add(10)(q26) that showed to be der(10)t(8;10)(q21.3;q26.3). The latter non-reciprocal translocation was confirmed by loss the 10q26.3-qterm region found by aCGH. Losses of 11q22.3-q23.2 and 13q14.2-q14.3 remained in line with the respective del(11q) and del(13q) observed by cytogenetics. Results of cytogenetic, aCGH and FISH analysis are summarized in Table 1.

Altogether, aCGH complemented by FISH studies allowed us to correct karyotype of the reported case as follows: 46,XY,t(2;14)(p12;q32),t(3;13)(q27;q31),dup(7)(q11qter),der(10)t(8;10)(q21.3;q26.3),del(11)(q22.3q23.2),del(13)(q14.2q14.3),der(14)t(1;14)(q21.3;q32.33),der(15)t(2;15)(p14;q26.3)

Particularly important, we were able to rapidly map the breakpoint of non-reciprocal IGH-mediated t(1;14)(q21;q32) expecting to affect gene involved in pathogenesis of CLL. The breakpoint was narrowed down to the 1q21.3 region flanked by two consecutive BAC clones spaced by approximately 3 Mb. Unfortunately, this chromosome region is not covered with a resolution of 1 Mb, as could be expected. We searched for potential candidate genes with the Ensembl Cytoview genome browser (www.ensembl.com). This region, however, contains dozens of genes, mostly with unknown functions. It is

worth to note that none of the 4 previously described genes associated with lymphomas: *BCL9* (6), *FCGR2B* (7), *MUC1* (8) and *IRTA2* (9), is located in the breakpoint region. This suggests that t(1;14)(q21.3;q32.33) involves a new oncogene that warrants identification and characterization. Further FISH studies with BAC and fosmid clones selected from the narrowed down 3 Mb breakpoint region will follow.

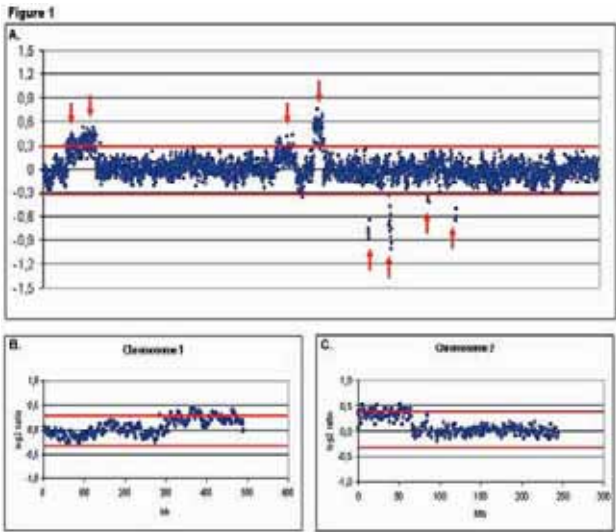


Figure 1.:
A. aCGH genomic profile The x-axis represents the clones ordered from the chromosome 1 to 22, X and Y. The Y-axis shows the log2 ratios of Cy5/Cy3 fluorescent intensity. The bold line indicates the thresholds for gains (0.3) and losses (-0.3). Arrows mark duplications of 1q21.3qter, 2p14pter, 7q11.2qter, 8q21.3qter and losses of 10q26.3qter, 11q22.3q23.2, 13q14.2q14.3 and 14q32.33qter, from the left side to the right.
B. Partial genomic profile of chromosome 1 showing the 1q21.3qter duplication The x-axis represents the clones ordered from 1p telomere to the 1q telomere. The Y-axis shows the log2 ratios of Cy5/Cy3 fluorescent intensity. The bold line indicates the thresholds for gains (0.3) and losses (-0.3). Lower log2 ratios of duplicated region reflect subclonal appearance of this aberration found by interphase FISH.
C. Partial genomic profile of chromosome 2 showing the 2p14pter duplication. The x-axis represents the clones ordered from 1p telomere to the 1q telomere. The Y-axis shows the log2 ratios of Cy5/Cy3 fluorescent intensity. The bold line indicates the thresholds for gains (0.3) and losses (-0.3).

In addition to der(14)t(1;14), we were able to map breakpoints of two other non-reciprocal translocations, t(2;15) and t(8;10) and to determine duplicated region of 7q. Deletions of 11q and 13q were mapped with a resolution of approximately 1 Mb. As expected, the 11q and 13q lost regions harbor respectively, *ATM* and *miR15/miR16*, the candidate tumor suppressor genes involved in pathogenesis of CLL (10, 11). Finally, using FISH, we identified t(2;14)(p12;q32), the second

IGH-associated translocation present in this case of CLL. Given that this translocation is reciprocal, the 2p12 breakpoint could not be rapidly mapped by aCGH; FISH identification of the involved partner gene requires more labourious BAC-mapping strategy. The known 2p genes involved in *IGH*-associated translocations in B-NHL include *REL* (2p16) and *BCL11A* (2p16) (12).

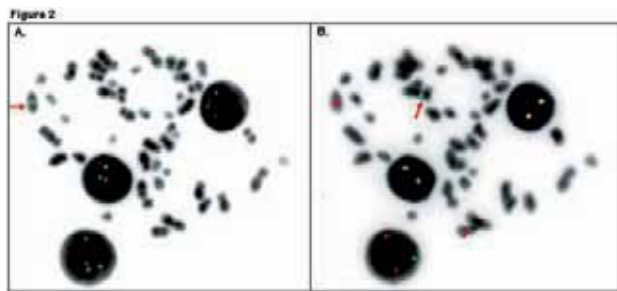


Figure 2.

A. FISH with RP4-790G17 (SpectrumGreen) (148,42-148,56 Mb) and RP11-216N14 (SpectrumOrange) (151,95-152,11 Mb) confirming the aCGH results. The arrow shows the der(14)t(1;14)(q21.3;q32.33) with the only RP4-790G17 signal. Other two red/green signals are localized on both chromosomes 1.

B. FISH with LSI IGH (Vysis Inc.) probe on the same rehybridized metaphase. The red signals confirm the presence of 3' end of *IGH* on der(14) and add(14). The arrow is showing one green signal (*IGHV*) localized at der(2)t(2;14)(p12;q32.33). Loss of second green signal remains in line with the 14q32.33qter loss found by aCGH. Note the aberrant signal pattern also in interphase nuclei.

B-CLL is one of the most common leukemias in the Western world showing variable clinical course. The most frequent genomic aberrations identified in CLL include del(13q), del(11q), trisomy 12, del(17p) and del(6q) found in up to 80 % of cases analyzed by FISH. Importantly, del(11)(q22q23) and del(17)(p) likely targeting the *ATM* and *p53* genes, res-

pectively, hallmark rapid disease progression and poor survival, while del(13)(q14.3) as a single aberration is associated with a good prognosis (13, 14). Chromosomal translocations involving 14q32/*IGH* are relatively rare in CLL; they occur in about 4 % of cases studied by FISH and usually affect the *BCL2*/18q21 and *BCL3*/19q13 genes (13, 14, 15). Particularly interesting is finding of two 14q32/*IGH* translocations in the present case. Given that der(14)t(1;14) and t(2;14) were found in a subclone with a more complex karyotype, we believe that both these translocations represent secondary chromosomal aberrations acquired during evolution of the del(11q)/del(13q)-positive karyotype.

In conclusion, using isolated CLL case, we demonstrated potential of aCGH as a tool for a rapid molecular mapping of non-reciprocal translocation. Resolution of this analysis reflects resolution of the applied aCGH platform. In the present case, the 1q21 breakpoint possibly harboring a novel CLL-associated oncogene, was narrowed down to the approximately 3 Mb region during one aCGH experiment. This approach is significantly less time- and material-consuming when compare to a standard probe-walking strategy. In most cases, the definitive mapping of breakpoint may require complementary FISH analysis. Although application of aCGH is limited to unbalanced translocations, it can be successfully used in rare non-reciprocal translocations involving *IGH*/14q32 likely targeting lymphoma-associated oncogenes.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by KULeuven Research Foundation (BIL05/59). We would like to thank the Wellcome Trust Sanger Institute for clone supply, Paul Van Hummelen (MicroArray Facility, Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology, VIB, Leuven, Belgium) for generating aCGH slides and Joris R. Vermeesch (Center for Human Genetics, University Hospital Gasthuisberg, Leuven, Belgium) for important technical guidance.

REFERENCES

1. Fiegler H., Gribble SM., Burford DC. et al.: Array painting: a method for the rapid analysis of aberrant chromosomes using DNA microarrays. *J Med Genet* 40, 2003, 664-670.
2. ISCN (2005): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, Shaffer LG., Tommerup N. (eds); Karger S., Basel 2005
3. Fiegler H., Carr P., Douglas EJ. et al.: DNA microarrays for comparative genomic hybridization based on DOP-PCR amplification of BAC and PAC clones. *Genes Chromosomes Cancer* 36, 2003, 361-374.
4. Vermeesch JR., Melotte C., Froyen G. et al.: Molecular Karyotyping: Array CGH Quality Criteria for Constitutional Genetic Diagnosis. *J Histochem Cytochem* 53(3), 2005, 413-422.
5. Martin-Subero JL., Harder L., Gesk S. et al.: Interphase FISH assays for the detection of translocations with breakpoints in immunoglobulin light chain loci. *Int J Cancer* 98(3), 2002, 470-474.
6. Willis TG., Zalcberg IR., Coignet LJ. et al.: Molecular cloning of translocation t(1;14)(q21;q32) defines a novel gene (*BCL9*) at chromosome 1q21. *Blood* 91(6), 1998, 1873-81.
7. Callanan MB., Le Baccon P., Mossuz P. et al.: The IgG Fc receptor, FcRIIB, is a target for deregulation by chromosomal translocation in malignant lymphoma. *PNAS* 97(1), 2000, 309-314.
8. Teruya-Feldstein J., Donnelly GB., Goy A. et al.: MUC-1 Mucin Protein Expression in B-cell Lymphomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 11(1), 2003, 28-32.
9. Ise T., Maeda H., Santora K. et al.: Immunoglobulin superfamily receptor translocation associated 2 protein on lymphoma cell lines and hairy cell leukemia cells detected by novel monoclonal, 3413-20.
10. Schaffner C., Stilgenbauer S., Rappold GA. et al.: Somatic ATM mutations indicate a pathogenic role of ATM in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94(2), 1999, 748-53.
11. Calin GA., Dumitru CD., Shimizu M. et al.: Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukaemia. *PNAS* 99(24), 2002, 15524-15529.
12. Satterwhite E., Sonoki T., Willis TG. et al.: The *BCL11* gene family: involvement of *BCL11A* in lymphoid malignancies. *Blood* 98(12), 2001, 20018.
13. Mossafa H., Huret JL.: Chronic lymphocytic leukaemia (CLL). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.*, August 1997.
14. Reddy KS.: Chronic lymphocytic leukaemia (CLL). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.*, May 2005.
15. Dyer MJ.: The pathogenetic role of oncogenes deregulated by chromosomal translocation in B-cell malignancies. *Int J Hematol* 77(4), 2003, 315-20.

DETEKCE EXPRESNÍCH PROFILŮ U PACIENTŮ S CML POMOCÍ ATLAS PLASTIC 8K MICROARRAYS

GENE EXPRESSION PROFILING IN CML PATIENTS USING ATLAS PLASTIC 8K MICROARRAYS

BRUCHOVÁ H., KRÁČMAROVÁ A., KLAMOVÁ H., BRDIČKA R.

ODDĚLENÍ MOLEKULÁRNÍ GENETIKY, ÚSTAV HEMATOLOGIE A KREVŇÍ TRANSFUZE, PRAHA

Souhrn

Východisko: Expresní microarrays představují vhodnou technologii i pro studium patologických procesů na genomické úrovni. Pro identifikace odlišně exprimovaných genů u pacientů s CML jsme použili plastické microarrays, které kombinují hlavní přednosti nylonových membrán a skleněných microarrays.

Pacienti a Metody. Leukocyty byly izolovány z periferní krve 6 pacientů s chronickou myeloidní leukémií v době stanovení diagnózy. U všech pacientů byl detekován BCR/ABL fúzní gen. Pro detekci expresních profilů byly použity Atlas Human Plastic 8K Microarrays (Clontech) s 8 327 genovými sondami. mRNA byla izolována z 45 µg celkové RNA pomocí magnetických částic.

Výsledky. Většina genů u pacientů vykazovala stejnou expresi jako kontrolní vzorek. U některých genů bylo možné detekovat podobné změny v expresi u všech (či většiny) pacientů např. zvýšená exprese: lactotransferrin, proteoglycan 2, elastase 2, MMP 9, defensin alpha 1,3,4, peptidoglycan recognition protein, cathepsin G, myeloperoxidase, proteinase 3; snížená exprese: CD68 antigen, cathepsin B, H factor, integrin-alpha X, interleukin 8, preB cell colony enhancing factor. **Závěr.** Naše studie odhalila variabilitu v expresi mnoha genů, ale i přesto jsme identifikovali skupinu genů s podobnými změnami v aktivitě. Tyto geny by mohly být asociovány s rozvojem onemocnění a budou podrobněji studovány.

Klíčová slova: genová exprese, CML, plastické microarrays

Summary

Background: Expression microarrays provide a powerful technology for studying disease processes on a genomic scale. We used plastic microarrays for identification of differentially expressed genes in chronic myeloid leukemia patients. Plastic arrays combine the best properties of glass and nylon arrays. **Patients and Methods:** Leukocytes were isolated from peripheral blood of 6 CML patients at diagnosis. All patients were BCR/ABL fusion gene positive. For gene expression profiling we used Atlas Human Plastic 8K Microarrays (Clontech) with 8 327 gene probes. mRNA was isolated from 45 µg of total RNA using magnetic bead method. **Results:** Majority of the patient genes showed the same transcription activity as in the control sample. In a few genes it was possible to observe similar significant changes of gene expression in all (most) patients e.g. up-regulation: lactotransferrin, proteoglycan 2, elastase 2, MMP9, defensin alpha 1,3,4, peptidoglycan recognition protein, cathepsin G, myeloperoxidase, proteinase 3; down-regulation: CD68 antigen, cathepsin B, H factor, integrin-alpha X, interleukin 8, preB cell colony enhancing factor. **Conclusions:** Although the study revealed variability of gene expression in many genes, we identified a number of genes with the similar expression regulation. The genes may be associated with the disease process and will be analysed in detail.

Key words: gene expression, CML, plastic microarrays

Úvod

Čipové technologie představují velmi přínosnou metodiku pro studium komplexního pozadí různých onemocnění. Právě sledování transkripční aktivity genů v době rozvoje onemocnění či v průběhu léčby pomocí těchto metod může vést k odhalení kandidátních genů, které se podílejí na vzniku onemocnění a zároveň mohou představovat další potenciální diagnostické či terapeutické cíle. U leukemií byly cDNA microarrays již využity pro charakterizaci jejich molekulárního (genetického) pozadí (1,2), jejich klasifikaci (3,4,5,6,7,8), identifikaci molekulárních změn při progresi onemocnění (9) či pro studium působení léků používaných pro chemoterapii (10,11).

Také cílem této studie byla charakterizace expresních profilů u pacientů s chronickou myeloidní leukémií (CML) v době stanovení diagnózy pomocí microarrays a identifikace genů s odlišnou expresí. Doposud jsme pro expresní analýzy v naší laboratoři využívali nylonové membrány, které však umožňují

detekovat relativně malý počet genů (600 až 1200), ale nevyžadují speciální vybavení laboratoře. Pro sledování exprese většího počtu genů jsme začali používat plastické microarrays. Firma Clontech vyvinula plastickou microarray Atlas Plastic 8K Microarray s 8327 sondami, u které se pokusila zkombinovat hlavní přednosti nylonových membrán a skleněných microarrays (12). Tyto plastické microarrays lze stejně jako nylonové membrány opakovaně použít minimálně 3krát (dle našich praktických zkušeností to je i maximální počet recyklací), což je činí finančně dostupné. Zároveň použitý materiál má přednosti „sklíček“ tzn. uniformní neporézní povrch, který umožňuje efektivní nanášení sond po stránce kvantitativní i kvalitativní. Neporézní povrch samozřejmě minimalizuje pozadí a zjednodušuje metodiku z hlediska prehybridizace a odmývání. Navíc pevné materiály jsou pohodlné na manipulaci a je zde i možnost automatizace.

Materiál a metody

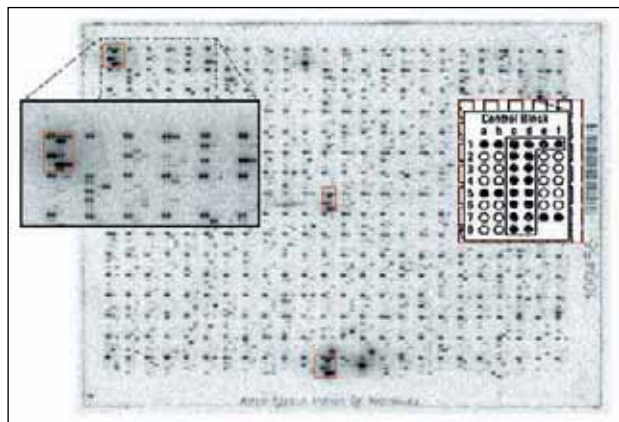
V rámci studie bylo vyšetřeno 6 pacientů s CML ve věku od 39 do 76 let (medián 49) (Tab. 1). Diagnóza byla stanovena podle standardních kritérií. Vzorky periferní krve byly odebrány v době stanovení diagnózy s informovaným souhlasem pacientů na základě schválení etickou komisí. Do souboru byli zařazeni pacienti v chronické fázi s relativně vysokým počtem leukocytů, přičemž u pacientů č. 3, 4 onemocnění již přešlo v akcelerovanou fázi. U všech pacientů byl detekován BCR/ABL fúzní gen.

Tabulka 1: Charakteristika testovaných pacientů

pacient č.	pohlaví	věk	diagnóza	BCR/ABL	leukocyty (109/l)
1	Ž	49	CML	b3 a2	350,7
2	Ž	49	CML	b3 a2	236,5
3	Ž	60	CML (akce. fáze)	b3 a2	189,0
4	Ž	76	CML (akce. fáze)	b3 a2	380,0
5	M	39	CML	b2 a2	590,0
6	Ž	49	CML	b2 a2	354,6

Celková RNA z leukocytů periferní krve byla izolována pomocí kyselého guanidinium thiokyanat/fenol:chloroformové metody (13) a následně byla inkubována s DNase I (0.2U/μg, Sigma) 30min při 37°C. Ze 45mg total-RNA byla izolována mRNA kitem Atlas Pure Total RNA Labeling System (Clontech), který je založený na magnetické separaci (12). Pro detekci expresních profilů byly využity Atlas Plastic Human 8K Microarrays (Clontech) s 8 327 genovými sondami o délce 80b (Obr. 1).

Obrázek 1.: Atlas Plastic Human 8K Microarray (Clontech) s 8 327 genovými sondami, které jsou v duplikátech uspořádány do 384 bloků. cDNA fragmenty o délce 80b jsou na plastickém nosiči imobilizovány UV zářením. Červeně jsou ohraničeny kontrolní bloky obsahující pozitivní a negativní kontroly (12). Na obrázku je expresní profil pacienta č. 1.



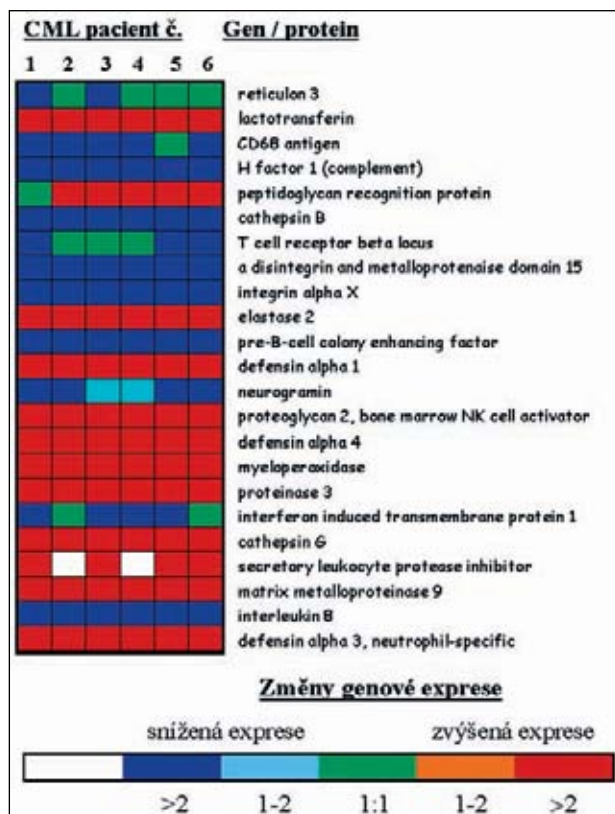
Pro přepis mRNA na cDNA neboli reverzní transkripci (RT) byl použit Atlas cDNA Expression Arrays kit (Clontech) dle instrukcí v manuálu (12), přičemž reakční směs obsahovala jako primery náhodné hexanukleotidy, MMLV reverzní transkriptasu a pro radioaktivní značení cDNA bylo použito $\alpha^{33}\text{P}$ [dATP] (50mCi/vzorek, Amersham Pharmacia Biotech). RT probíhala 30min při 42°C. Pro oddělení označené cDNA od neinkorporovaných nukleotidů byla použita silikagelová kolonová chromatografie (Atlas NucleoSpin Extraction Kit, Clontech). Vzorky byly hybridizovány přes noc při 60°C za stálého míchání (6 ot/min). Při posthybridizačním odmytí byly microarrays 2-krát opláchnuty (20s) roztokem 0.1x SSC, 0.1% SDS pokojové teploty a následně inkubovány v 50ml stejného roztoku 10min při 60°C. Po ukončení inkubace byly microarrays opláchnuty destilovanou vodou a důkladně usušeny. Radioaktivita byla detekována pomocí přístroje Phosphorimager FLA-2000 (Fuji) (doba expozice-24hod). Komparativní analýzy expresních profilů byly provedeny pomocí programu AtlasImage 2.7 (Clontech). Expresní profily u CML pacientů byly porovnány se standardním profilem

(profil směsného vzorku zdravých osob). Do výsledkové tabulky byly zahrnuty geny (na základě standardně nastavených podmínek v softwaru), jejichž exprese se lišila nejméně dvojnásobně a rozdíl v intenzitách představoval nejméně dvojnásobek průměrné hodnoty pozadí. Názvy genů/proteinů v tabulkách a v textu byly zachovány dle Clontech databáze.

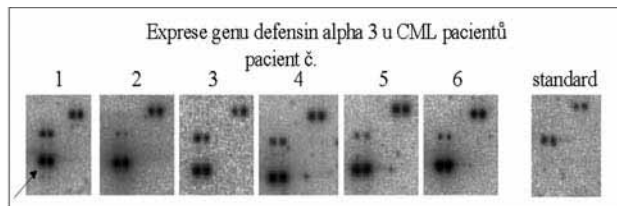
Změny genové exprese vykazující dvojnásobné Výsledky a diskuse

Na Atlas Plastic Human 8K Microarray je naneseno 8 327 genových sond, přičemž pozitivní signál (nad úroveň pozadí) byl detekován průměrně u 16% genů. Podíl genů vykazujících signifikantní změny exprese při srovnání s kontrolním vzorkem se pohyboval v rozmezí 10-20% (z exprimovaných genů) v závislosti na jednotlivých pacientech. Zbývající geny pacientů se v expresi nelišily od kontrolního vzorku. U některých genů bylo možné detekovat podobné změny v expresi u všech pacientů např. zvýšená exprese - *lactotransferrin* (LTF), *proteoglycan 2* (PRG2), *elastase 2* (ELA2), *metalloproteinase 9* (MMP9), *defensin alpha 1/3/4* (DEFA1, DEFA3, DEFA4), *peptidoglycan recognition protein* (PGLYRP), *cathepsin G* (CTSG), *myeloperoxidase* (MPO), *proteinase 3* (PRTN3), *secretory leukocyte protease inhibitor* (SLPI); snížená exprese - *CD68 antigen* (CD68), *cathepsin B* (CTSB), *H factor* (CFH), *integrin-alpha X* (ITGAX), *interferon induced transmembrane protein* (IFITM), *interleukin 8* (IL8), *preB cell colony enhancing factor* (IL6), *neurogranin* (NRGN) (Obr. 2). Řada genů dále vykazovala signifikantní změny exprese pouze u některých pacientů jako např. *reticulon 3* (RTN3), *T cell receptor beta locus* (TCRB), *hemoglobin alpha 1* (HBA1), *hemoglobin alpha 2* (HBA2), *arrestin* (SAG), *polymerase RNA II polypeptide E* (POLR2E), *small inducible cytokine A5* (CCL5), *tumor protein* (HLA-A) atd.

Obrázek 2.: Signifikantní změny genové exprese (normalizovaná data) detekované u většiny CML pacientů v době diagnózy pomocí Atlas Plastic Human 8K Microarrays (Clontech). Změny exprese jsou vyjádřeny barevnou škálou, kdy červené barvy představují zvýšení a modré barvy snížení genové exprese u pacienta. Zelená barva vyjadřuje stejnou expresi genu jako u standardu (bílá barva – nedetekovatelná exprese/pod úroveň pozadí).



Obrázek 3.: Expresí genu defensin alpha 3 detekovaná plastikovými mikročipy u CML pacientů a standardu.



Výrazně silnou expresi u všech pacientů vykazovaly geny *defensin alpha 1,3 a 4* (DEFA1, DEFA3, DEFA4) (Obr.3). Defensiny kódují skupinu peptidů s protibakteriálními a cytotoxickými účinky, které zajišťují obranyschopnost hostitele a jsou produkovány především neutrofily. Vysoká expresí defensinů u myeloidních leukemických buněk byla již prokázána v několika studiích (14,15) a stejně jako *myeloperoxidase* (MPO) mohou defensiny sloužit jako marker myeloidní diferenciace (16). Právě také gen MPO byl u všech pacientů exprimován na zvýšené hladině. Protein MPO je syntetizován během diferenciace myeloidních buněk, a je proto využíván pro určování subtypů AML (17). V jádře se MPO může vázat na DNA a chránit ji před poškozením kyslíkovými radikály, které vznikají při maturaci myeloidních buněk. MPO byla nalezena v jádře a cytoplasmě normálních i myeloidních leukemických buněk (18). Další gen se zvýšenou transkripční aktivitou u všech pacientů byl *secretory leukocyte proteinase inhibitor* (*antileukoproteinase*, SLPI), jehož produkt chrání epitelové tkáně před proteasami jako je *cathepsin G* a *neutrophil elastase*. Geny kódující obě zmíněné proteasy vykazovaly u testovaných pacientů zvýšenou expresi. *Elastase 2* (ELA2) je proteasa produkovaná krevními neutrofily a podílí se na štěpení proteinů v pojivových tkáních (19). *Cathepsin G* (CTSG) je proteasa produkovaná také neutrofily, která se uplatňuje v imunitních procesech (20). Vyšší expresí námi detekovaných genů MPO, DEFA1, DEFA3, DEFA4 a CTSG byla zjištěna i u pacientů s akutní promyelocytární leukémií (15). Zvýšená expresní aktivita genů kódujících proteasy v neutrofilech u pacientů s CML poukazuje zřejmě na vyšší aktivitu těchto myeloidních buněk či na jejich zvýšené početní zastoupení. Právě expanze terminálně diferenciovaných neutrofilů je charakteristická pro chronickou fázi CML (21). Dále u testovaných pacientů byl silněji exprimován gen *lactotransferrin* (LFT), jehož produkt zajišťuje transport železa v extracelulárních tekutinách a uplatňuje se i v imunitní obraně. U několika genů byla sledována snížená či žádná (resp. nedetekovatelná) expresí při porovnání se standardním profilem. Mezi takovéto geny s nízkou expresí u všech pacientů patřil gen *CD68 antigen* (CD68). CD68 je transmembránový glykoprotein neznámé funkce, který je vysoce exprimován v lidských monocitech a tkáňových makrofágách (22). Signi-

fikantní pokles expresí byl dále detekován u genu *H factor* (CFH), což je pozitivní regulační kofaktor komplementové kaskády (23). Nízkou transkripční aktivitu vykazovaly také geny kódující proteasy *cathepsin B* (CTSB) a *ADAM*. CTSB je lysosomální cystein-protease účastnící se maturace amyloidních prekurzorů (24). Protein *a disintegrin and metalloprotease domain 15* (ADAM) je členem ADAM proteasové rodiny podílející se na regulaci buňka-buňka a buňka-matrix interakcí. ADAM proteiny jsou také schopny interakce s integriny či *Scr* kinasami (25). Ačkoliv integriny u CML pacientů vykazovaly většinou vyšší expresi, v případě *integrin alpha X* (ITGAX) tomu tak nebylo. Gen *ITGAX* je součástí *integrin alpha*, což je adhezivní receptor na povrchu krevních buněk, který zprostředkovává adhezi k vaskulárnímu endotelu, migraci, chemotaxi atd. (26).

PreB-cell colony-enhancing factor (IL6) je cytokin zvyšující aktivitu MGF (stem cell factor) a interleukinu 7 (27). Expresí tohoto genu byla pod hranici detekovatelnosti. Dalším cytokinovým genem s velmi nízkou expresní aktivitou byl *interleukin 8* (IL8). IL8 je cytokin hrající důležitou roli především v chemotaxi a aktivaci neutrofilů (28).

Výrazné expresní změny byly pozorovány především u genů podílejících se na regulaci imunitních procesů, což naznačuje, že u pacientů byly zřejmě aktivovány obranné mechanismy.

Závěr

Leukemie se vyznačuje velkou variabilitou jak na klinické, tak i na molekulární úrovni. Proto variabilita v genové expresi u pacientů s CML zjištěná v této studii není nijak překvapující. Příčinou této variability mohou být inter-individuální rozdíly mezi pacienty ve věku, pohlaví, stádiu choroby atd. Ale i přes tuto variabilitu bylo možné vysledovat stejné změny expresí některých genů u všech či většiny pacientů v souboru, které mohou být asociované s rozvojem onemocnění či „udržováním“ maligního klonu. Kromě genů, jejichž účast u leukemii je z hlediska funkce jasná, odhalilo naše testování i změny expresí genů, o jejichž významu u CML není zatím nic známo, a které tak představují cíle dalšího výzkumu. Atlas Plastic Microarrays představují novou zajímavou platformu pro testování genové expresí, neboť co do objemu získaných výsledků jsou srovnatelné s dalšími typy microarrays, ale po finanční stránce představují mnohem levnější alternativu díky možnosti opakovaného použití. Microarray technologie díky své výkonnosti zcela jistě najdou své uplatnění v našich laboratořích nejen při řešení výzkumných projektů, ale i v rutinní diagnostice.

Poděkování

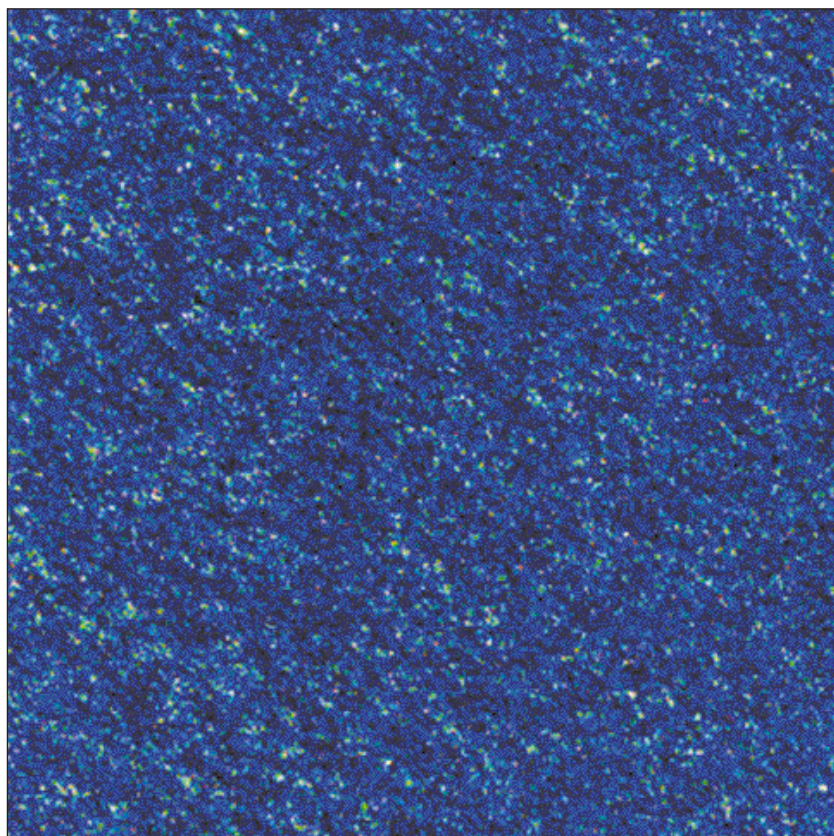
Autoři děkují Mgr. J. Polákovi (Oddělení molekulární genetiky, ÚHKT) za poskytnutí molekulárních dat týkajících se BCR/ABL fúzního genu. Studie byla podpořena VZ 000237601 MZ ČR.

Literatura a odkazy

1. Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB, et al. MLL translocation specifies a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet* 2002;30:41-7
2. Niini T, Vetteranta K, Hollmen J, et al. Expression of myeloid-specific genes in childhood acute lymphoblastic leukemia - a cDNA array study. *Leukemia* 2002, 16(11):2213-21
3. Cohen N, Rozenfeld-Granot G, Hardan I, et al. Subgroup of patients with Philadelphia-positive chronic myelogenous leukemia characterized by a deletion of 9q proximal to ABL gene: expression profiling, resistance to interferon therapy, and poor prognosis. *Cancer Genet Cytogenet* 2001;128:114-9
4. Moos PJ, Raetz EA, Carlson MA, et al. Identification of gene expression profiles that segregate patients with childhood leukemia. *Clin Cancer Res* 2002;8(10):3118-30

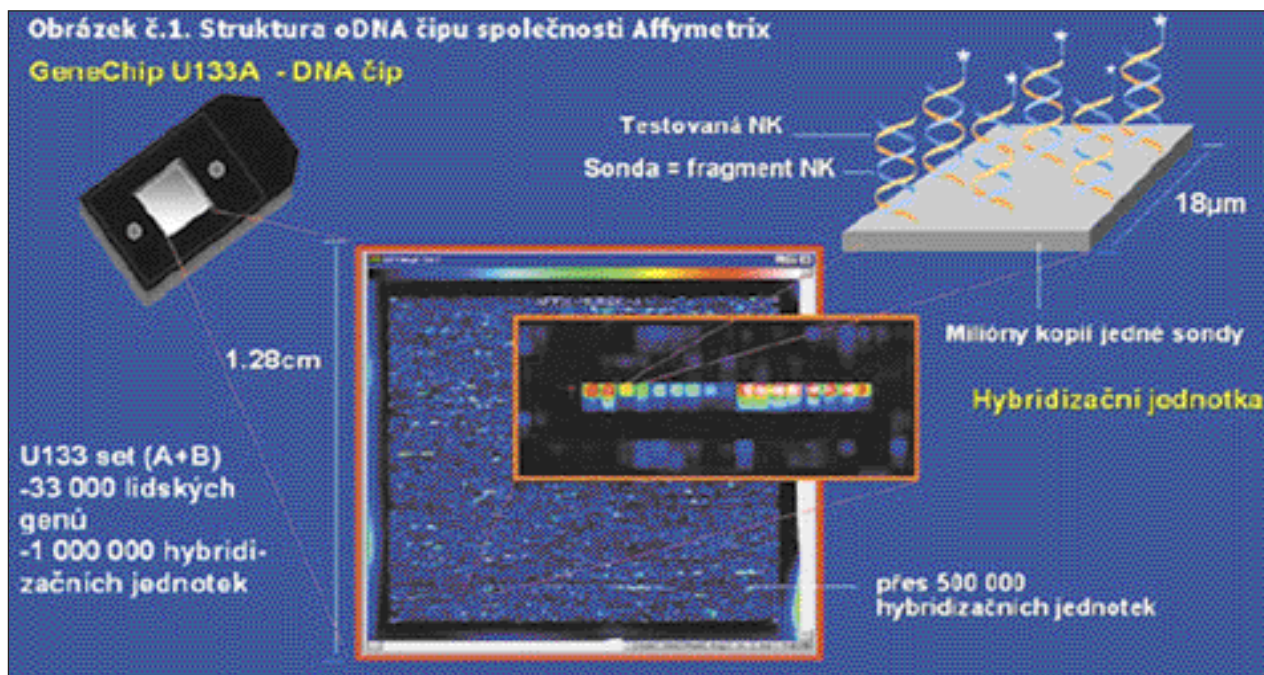
5. Cho JH, Lee D, Park JH, et al. Optimal approach for classification of acute leukemia subtypes based on gene expression data. *Biotechnol Prog* 2002, 18(4):847-54
6. Yeoh EJ, Ross ME, Shurtleff SA, et al. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell* 2002, 1(2):133-43
7. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999;286:531-7
8. Schoch C, Kohlmann A, Schnittger S, et al. Acute myeloid leukemias with reciprocal rearrangements can be distinguished by specific gene expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99(15):10008-13
9. Ohmine K, Ota J, Ueda M, et al. Characterization of stage progression on chronic myeloid leukemia by DNA microarrays with purified hematopoietic stem cells. *Oncogene* 2001;20:8249-57

10. Hofmann WK, de Vos S, Elashoff D, et al. Relation between resistance of Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia to the tyrosine kinase inhibitor STI571 and gene-expression profiles: a gene-expression study. *Lancet* 2002, 359 (9305):481-6
11. Bruchova H, Borovanova T, Klamova H, Brdicka R. Gene expression profiling in chronic myeloid leukemia patients treated with hydroxyurea. *Leukemia and Lymphoma* 2002, 43(6):1289-1295
12. www.clontech.com
13. Chomczynsky P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium-isothiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987, 162:156-159
14. Valore EV, Ganz T. Posttranslational processing of defensins in immature human myeloid cells. *Blood* 1992, 79(6):1538-44
15. Hirata RK, Chen ST, Weil SC. Expression of granule protein mRNAs in acute promyelocytic leukemia. *Hematol Pathol* 1993, 7(4):225-38
16. Tsuruta T, Tani K, Shimane M, et al. Effects of myeloid cell growth factors on alkaline phosphatase, myeloperoxidase, defensin and granulocyte colony-stimulating factor receptor mRNA expression in haemopoietic cells of normal individuals and myeloid disorders. *Br J Haematol* 1996, 92(1):9-22
17. Adam Z, Vorlíček J a kol. *Hematologie II: Přehled maligních hematologických nemocí*. Grada Publishing 2001, Praha
18. Murao S, Stevens FJ, Ito A, Huberman E. Myeloperoxidase: a myeloid cell nuclear antigen with DNA-binding properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988, 85(4):1232-6
19. Takahashi H, Nukiwa T, Yoshimura K et al. Structure of the human neutrophil elastase gene. *J Biol Chem* 1988, 263(29):14 739-47
20. Hohn PA, Popescu NC, Hanson RD, et al. Genomic organization and chromosomal localization of the human cathepsin G gene. *J Biol Chem* 1989, 264(23):13412-9
21. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 2001, 293(5531):876-880
22. Holness CL, Simmons DL. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood* 1993, 81(6):1607-13
23. Perkins SJ, Goodship TH. Molecular modelling of the C-terminal domains of factor H of human complement: a correlation between haemolytic uraemic syndrome and a predicted heparin binding site. *J Mol Biol* 2002, 316(2):217-24
24. Chan SJ, San Segundo B, McCormick MB, Steiner DF. Nucleotide and predicted amino acid sequences of cloned human and mouse preprocathepsin B cDNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986, 83 (20):7721-5
25. Poghosyan Z, Robbins SM, Houslay MD, Webster A, Murphy G, Edwards DR. Phosphorylation-dependent interactions between ADAM15 cytoplasmic domain and Src family protein-tyrosine kinases. *J Biol Chem* 2002, 277(7):4999-5007
26. Shelley CS, Teodoridis JM, Park H, et al. During differentiation of the monocytic cell line U937, Pur alpha mediates induction of the CD11c beta 2 integrin gene promoter. *J Immunol* 2002, 168(8):3887-93
27. Samal B, Sun Y, Stearns G, et al. Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Mol Cell Biol* 1994, 14(2):1431-7
28. Holmes WE, Lee J, Kuang WJ, et al. Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science* 1991, 253(5025):1278-80

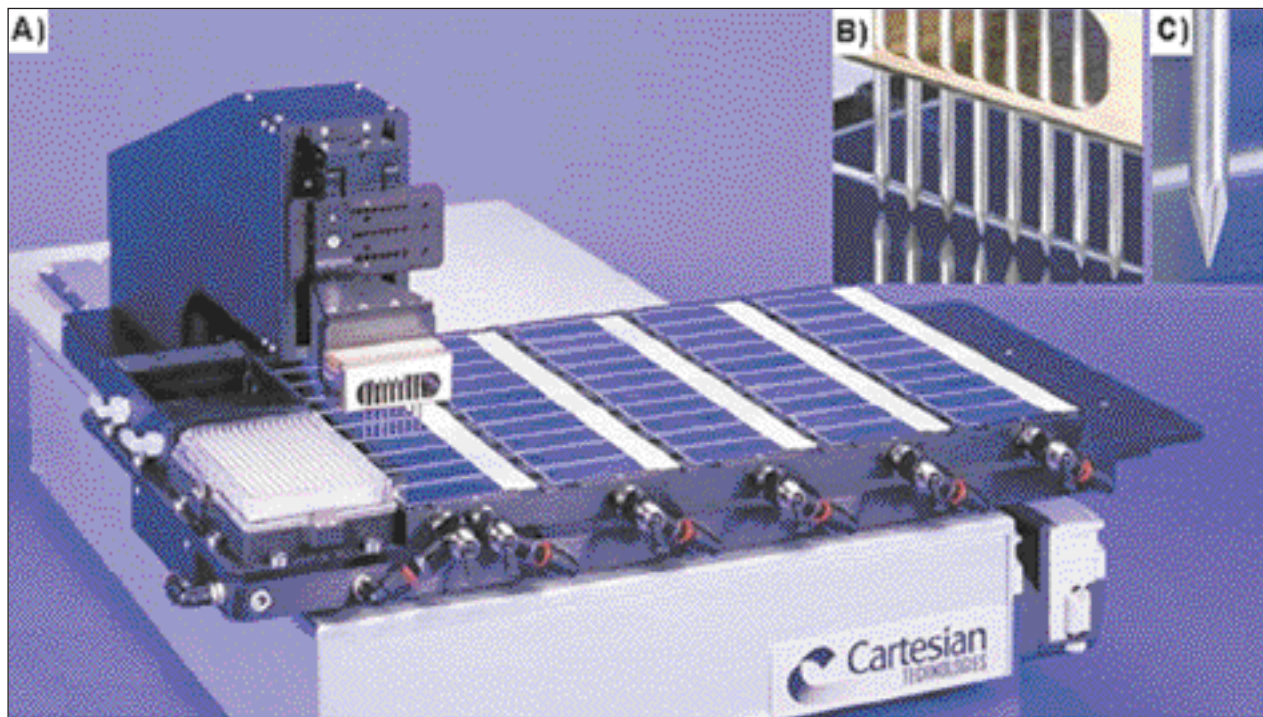


„Hvězdná obloha“
Marek Švoboda a GeneChip®
17. června 2002

Obrázek představuje plochu DNA čipu GeneChip®U95Av2, která byla skenována po ukončení hybridizace. Na ploše čipu se nachází více než 400 000 hybridizačních jednotek (viditelné jako svítící body). Každá hybridizační jednotka nese více než 1 000 000 kopií oligonukleotidových průb pro detekci 12 600 lidských genů.

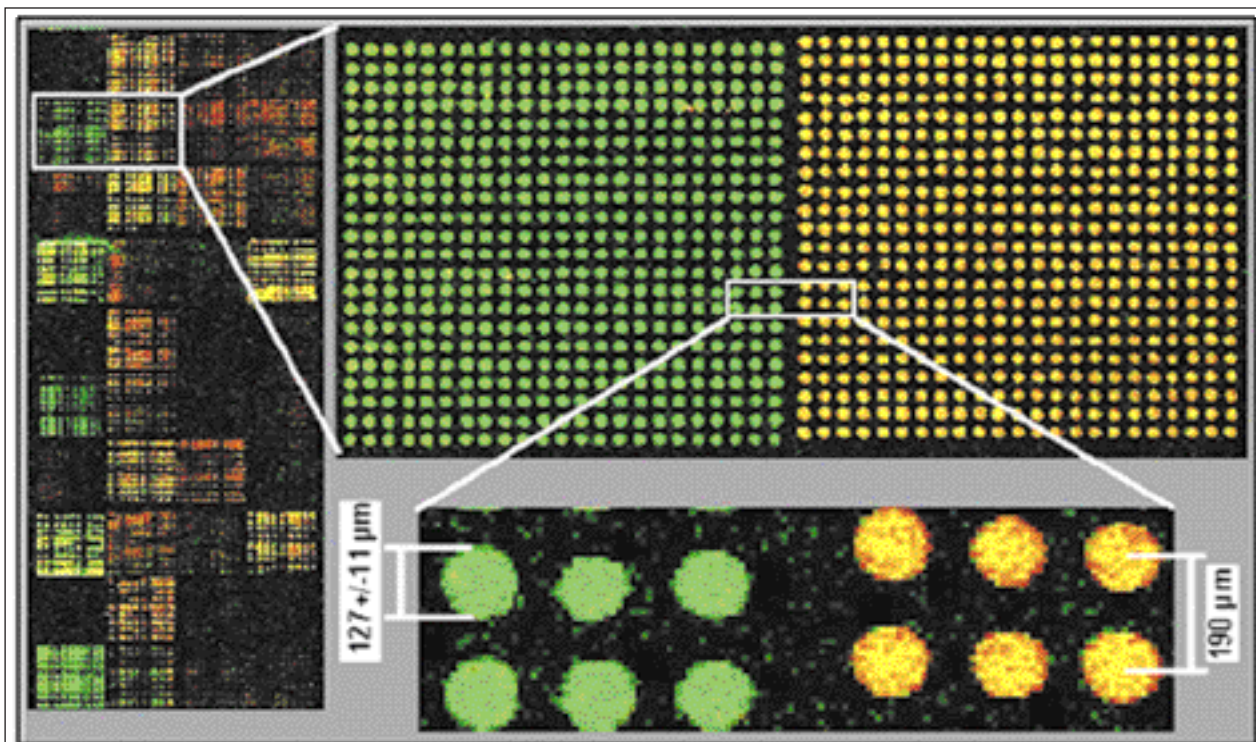


Obrázek č. 1.: Obrázek vysvětluje strukturu DNA čipu GeneChip®U133A. Samotný čip o velikosti plochy 1,28cm x 1,28cm je pro snadnější manipulaci zabudován do plastové kazety (vlevo). Na ploše čipu (uprostřed) se nachází více než 500 000 hybridizačních jednotek (viditelné jako svítící body). Každá hybridizační jednotka (vpravo) nese více než 1 000 000 kopií oligonukleotidových průb pro detekci cca 17 000 lidských genů. Společnost Affymetrix® vyrábí i čip GeneChip®U133B. U133A a U133B jsou schopny dohromady detekovat cca 33 000 lidských genů. DNA čipy GeneChip® jsou vyráběny pomocí litografické technologie. Podrobně viz.: Švoboda M, Michálek J. Úvod do technologie DNA čipů. Lékař a technika 2004;35:67-75.



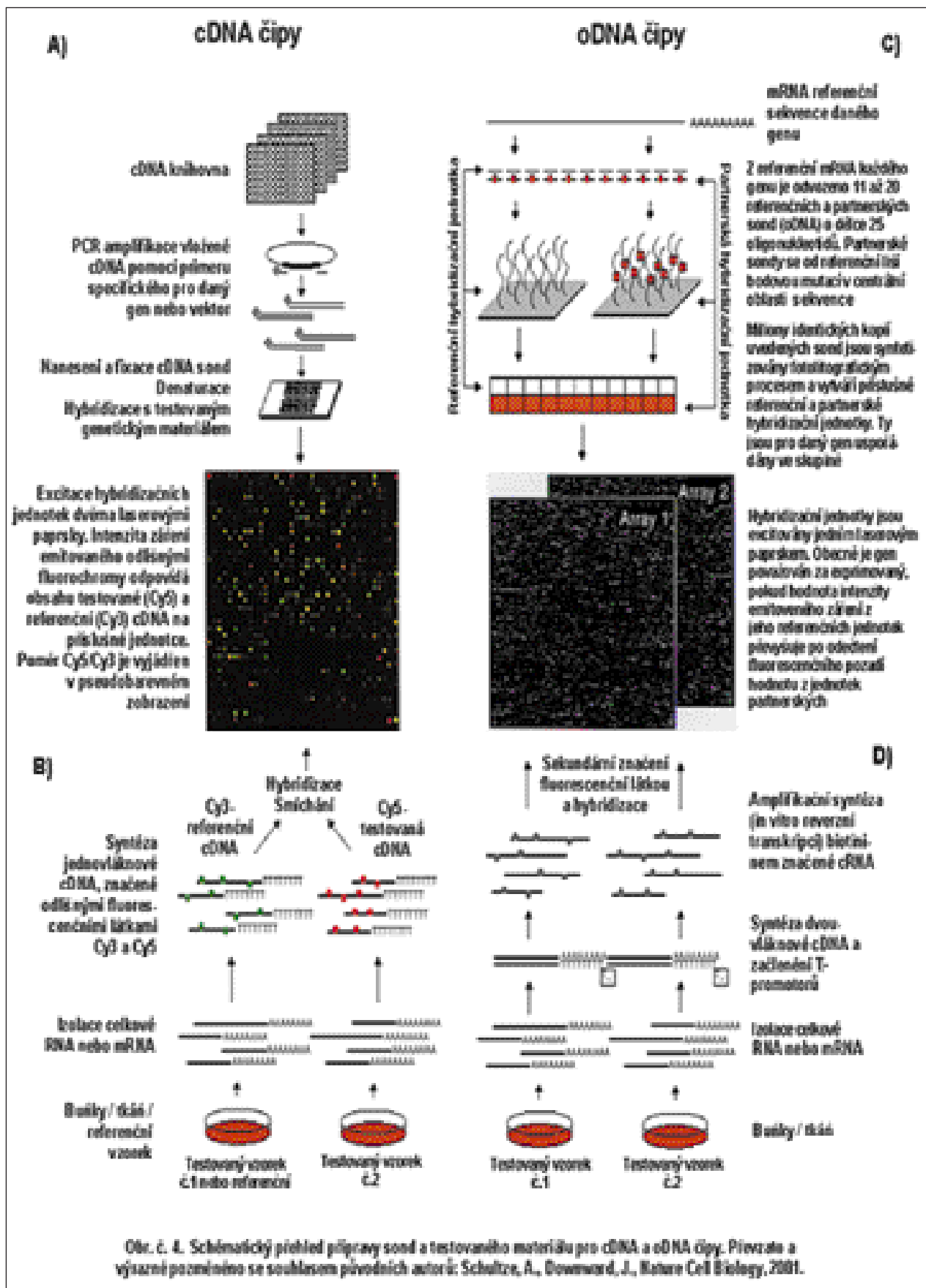
Obr. č. 2. A) Pohled na výkonnou část čipovacího přístroje společnosti Cartesian Technologies. Detailní snímek na: B) pracovní hlavu osazenou nanášecími tělesy (NT) a C) kontaktní NT – štěrbínovitý hrot.

Obrázek č. 2.: Výroba DNA čipu pomocí čipovacího (spotovacího) stroje. Kontaktní nanášecí tělesa stroje přenášejí připravený genetický materiál (oligonukleotidy nebo cDNA) ze zásobníku na přesně určená místa skleněné podkladové desky čipu. Podrobně viz.: Svoboda M, Michálek J. Úvod do technologie DNA čipů. Lékař a technika 2004;35:67-75.



Obr. č. 3. cDNA čip obsahující přes 25.000 hybridizačních jednotek (HJ), k jehož výrobě byl použit přístroj MicroSpot 2500 společnosti BioRobotics. Průměr HJ přibližně 127 μm. Vzdálenost mezi centry dvou HJ 190 μm. Převzato a upraveno od BioRobotics.

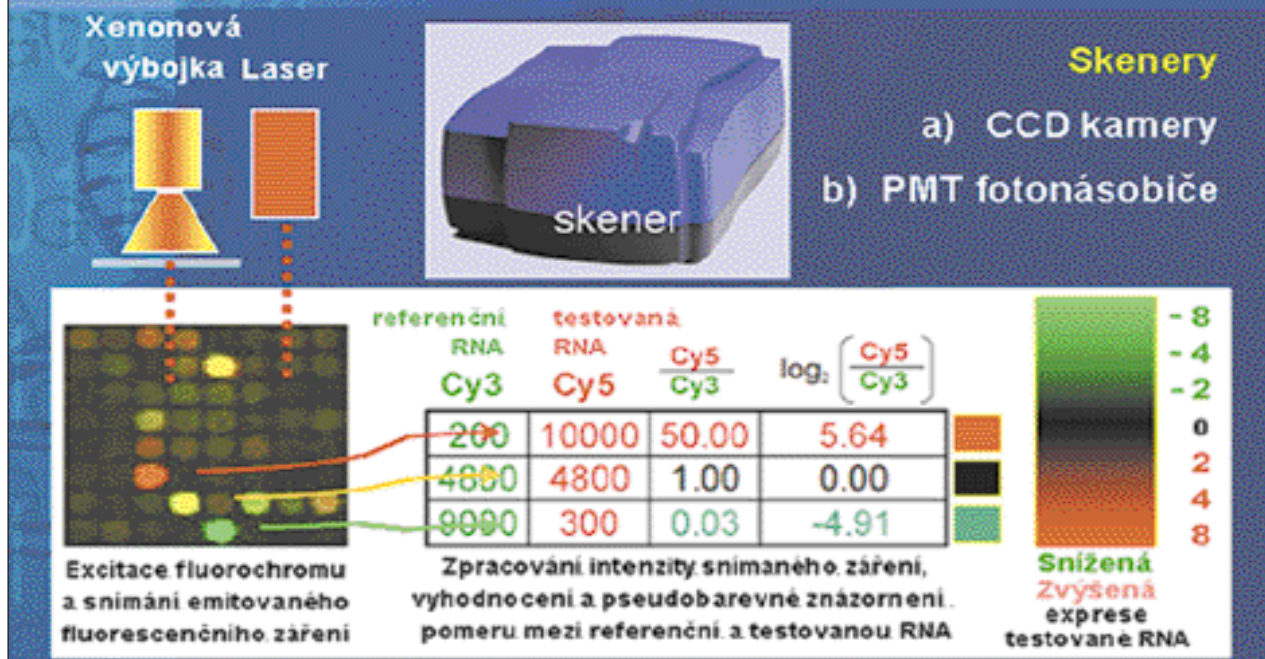
Obrázek č. 3.: Struktura DNA čipu vyrobeného pomocí čipovacího stroje. Podrobně viz.: Svoboda M, Michálek J. Úvod do technologie DNA čipů. Lékař a technika 2004;35:67-75.



Obrázek č. 4: Příprava sond (A,C) a testovaného genetického materiálu (B,D) pro DNA čipy. Postup je odlišný u DNA čipů nesoucích na svém povrchu sondy v podobě cDNA (tzv. cDNA čipy), nebo oligonukleotidů (tzv. oDNA čipy). Podrobně viz.: Svoboda M, Michálek J. Úvod do technologie DNA čipů. Lékař a technika 2004;35:67-75.

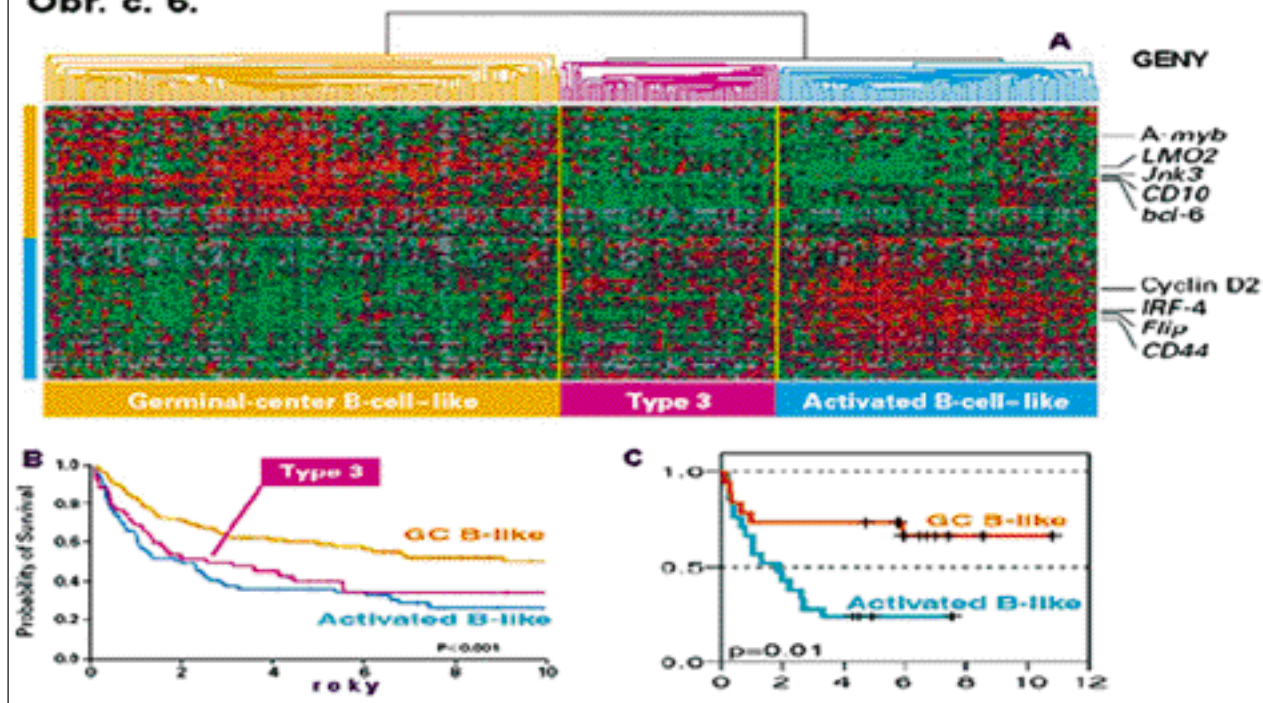
DNA ČIPY – OBRAZOVÁ ANALÝZA

čtení (skenování) čipu



Obrázek č. 5.: Po ukončení hybridizace následuje další fáze zpracování DNA čipu, tzv. „obrazová analýza“. Plocha DNA čipu nesoucí fluorochrome-moznačené molekuly testované DNA je excitována laserem, nebo filtrovaným světlem xenonové výbojky. Intenzita světla emitovaného fluorochromy je snímána „skenována“ skenery, jenž pracují na principu CCD kamery, nebo využívají PMT fotonásobičů. Intenzita detekovaného záření je vyhodnocena a následně pseudobarevně znázorněna. Podrobně viz.: Svoboda M, Michálek J. Úvod do technologie DNA čipů. Lékař a technika 2004;35:67-75.

Obr. č. 6.



Obrázek. č. 6.: (A) Dendrogram shlukové analýzy, na kterém je patrné rozdělení DLBCL (sloupce) do tří skupin definovaných na základě podobnosti exprese vybrané skupiny genů (řádky): 1. Germinal Center B-cell like DLBCL; 2. Type-3 DLBCL; 3. Activated B-cell like DLBCL. Expresi genů je v dendrogramu kódována barevně. Zelená barva značí nízkou, červená barva vysokou a černá barva průměrnou expresi daného genu v daném DLBCL. Šedá barva označuje gen, jehož exprese nebyla vyhodnocena. Na pravé straně dendrogramu jsou uvedeny geny s nejvyšší diskrimační hodnotou. (B a C) Kaplan-Meierovy křivky pravděpodobnosti celkového přežití u pacientů s jednotlivými variantami DLBCL. Podrobný popis obrázku a odkazy na literaturu naleznete v článku: Svoboda M., a kol. Aplikace DNA čipů u lymfoidních malignit.