

# 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 nejhodnější 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

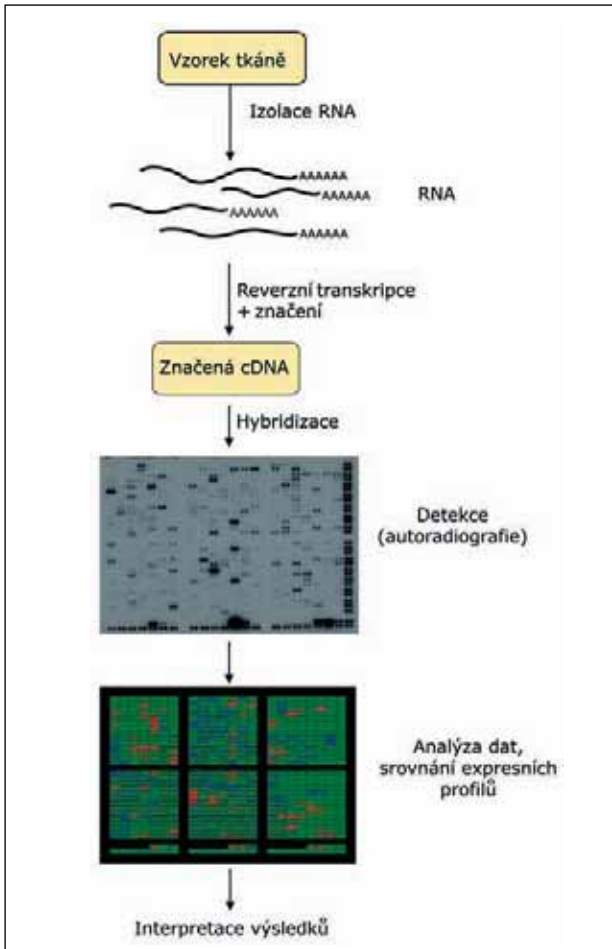
### Princip čipové technologie

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 odlišně 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 nanášených spotů (například nylonový čip Atlas Human cDNA Expression Array of 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 -NH<sub>2</sub>, -OH, =O pro navázání oligonukleotidů. Nanášení sond na povrch čipu se 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 uživateli 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 miliony (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 100mm<sup>3</sup> tkáně (5). Další možností 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.

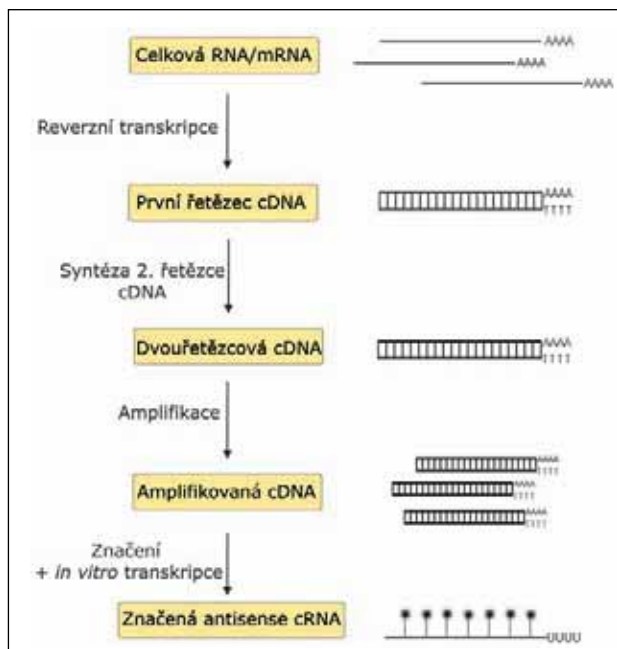
Na rozdíl od čerstvých či zamražených tkáňových vzorků, které je nutné co nejdříve zpracovat, mohou být parafinové tkáňové bločky fixované pomocí formaldehydu (tzv. FFPE vzorky) dlouhodobě skladovány. Výhodou takto uchovávaných preparátů je jejich dobrá klinická dokumentace: průběh onemocnění, odpověď 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 podobnosti 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 třídimensionální 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 rakovinu 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, jejichž 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 proapoptického 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 reakcích, adheze, transportu proteinů, signální transdukce nebo sestřihu a transportu RNA.

cDNA mikročipy	oligonukleotidové mikročipy
<b>Výhody</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>● není nutná promární znalost cDNA sekvence</li> <li>● možnost vlastního nanášení spotů v laboratoři</li> <li>● nárůst intenzity signálu pozitivně koreluje délkou sondy</li> <li>● delší sonda (=stabilnější hybridní molekula) umožňuje nastavit více stringentní podmínky, tím se sníží signál pozadí</li> <li>● cenově výhodnější</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● uniformní délka (do 80 b)</li> <li>● automatizace, kontrola kvality během syntézy</li> <li>● vyšší specifita, nižší pravděpodobnost cross-hybridizace</li> </ul>
<b>Nevýhody</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>● možnost cross-hybridizace</li> <li>● možnost kontaminace cDNA klonů/PCR produktů</li> </ul>	

**Tabulka 1:** Srovnání typů sond - klonů 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 obsahlou 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

1. Wadlow R, Ramaswamy S. DNA Microarrays in clinical cancer research. *Current Molecular Medicine* 2005, 5:111-120.
2. Lander ES, Linton LM, Birren B et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001, 409(6822):860-921.
3. Venter JC, Adams MD, Myers EW et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001, 291(5507):1304-51.
4. www.affymetrix.com
5. Ramaswamy S, Golub TR. DNA microarrays in clinical oncology. *J Clin Oncol* 2002, 20(7):1932-41.
6. 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.
7. Raychaudhuri S, Suthphin PD, Chang JT, Altman RB. Basic microarray analysis: grouping and feature reduction. *Trends Biotechnol* 2001, 19(5):189-93.
8. 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.
9. Khan J, Simon R, Bittner M et al. Gene expression profiling of alveolar rhabdomyosarcoma with cDNA microarrays. *Cancer Res* 1998, 58(22):5009-13.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. Bittner M, Meltzer P, Chen Y et al. Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature*. 2000, 406(6795):536-40.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. Su AI, Welsh JB, Sapinoso LM et al. Molecular classification of human carcinomas by use of gene expression signatures. *Cancer Res* 2001, 61(20):7388-93.
27. 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.
28. Hofmann WK, de Vos S, Elashoff D et al. Relation between resistance of Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia to the tyrosine kinase inhibitor ST1571 and gene-expression profiles: a gene-expression study. *Lancet* 2002, 359(9305):481-6.
29. 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.