

Génexpressziós profil a szolid tumorok diagnosztikájában és prognosztikájában

Kopper László, Tímár József

Semmelweis Egyetem, I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Budapest
és Országos Onkológiai Intézet, Tumor Progressziós Osztály, Budapest

A DNS-chipek több ezer gén expressziójának kimutatására alkalmasak. A génexpressziós profil meghatározása a várakozások szerint segít a daganatok pontosabb jellemzésében; ez pedig hozzájárulhat a különböző klinikai lefolyást mutató, de jelenlegi ismereteink szerint azonos csoportba tartozó daganatok jobb osztályozásához, a terápiás érzékenység, ezen keresztül a prognózis jobb megítéléséhez. A daganattípusra jellemző génexpressziós profil segíthet új terápiás célpontok kiválasztásában, a daganatkeletkezés iránti érzékenység esélyének becslésében. A DNS-chipek alkalmazásával a molekuláris onkológia új dimenziói nyíltak meg. *Magyar Onkológia* 46:3-9, 2002

DNA-microarray technology can be used to assess the expression of several thousands of genes at the same time. The identification of the gene expression profiles may help to better characterize human cancer. These studies may reveal subclasses of tumor types with similar histopathologic profile but different clinical courses. Furthermore, such studies could help to define therapeutic sensitivity and to estimate prognosis of various cancers. Identification of gene expression profiles of cancer can identify new therapeutic targets or cancer susceptibility genes. The DNA-microarray technology may write a new chapter in molecular oncology. *Kopper L, Tímár J. Gene expression profiles in the diagnosis and prognosis of cancer. Hungarian Oncology* 46:3-9, 2002



A *Journal of Molecular Diagnostics* tavalyi augusztusi számában jelent meg Ladanyi és mtsai cikke a következő címmel: „Expression profiling of human tumors: the end of surgical pathology?” (8). A provokatív kérdésre – amely egyre többször fel fog merülni a közeljövőben – a válaszuk: szerintünk a vég még nem következett el, de a molekuláris patológia vagy molekuláris onkológia ideje igen. Az elmúlt évek módszertani fejlődése – elsősorban molekuláris szinten – tette lehetővé, hogy ma a daganatokat genetikai megbetegedéseknek tartjuk, hiszen létrejöttükért elsősorban a sejtprolifrációt és sejthalált szabályozó gének hibái, ezek felhalmozódása tehető felelőssé. Ismerjük már a különböző kémiai anyagok (akár karcinogének, akár citosztatikumok) metabolizmusában részt ve-

vő gének polimorfizmusát, és az ezzel járó egyéni különbségeket, a génhiba kijavításáért felelős rendszer ugyancsak genetikai zavarait, és – ha csak elszórt adatok formájában is – kezdjük megismerni a daganatsejtek és környezetük (a környező normális sejtek és az extracelluláris matrix) kapcsolatát befolyásoló genetikai és epigenetikai tényezőket. Utóbbiak feltehetően alapvető szerepet játszanak a daganatok terjedésében, azaz a daganatos beteg életkilátásaiban. Mindezek indokolják az olyan géntechnológiai eljárások iránt megnyilvánuló érdeklődést, amelyek nagyságrendekkel gyorsabban adnak felvilágosítást a daganatokban található genetikai hibákról. A nagyságrendet pedig a DNS-chip vagy -microarray technika biztosítja, amelyről e lap hasábjain nemrég kitűnő összefoglalót olvashattunk (14). A DNS-chip alkalmazásával arra kaphatunk választ, hogy adott sejten, szövetben milyen gének fejeződnek ki (expresszálnak). (Az expresszió alatt mindvégig az mRNS DNS-ről történő átíródását értjük. Az expressziós profil pedig az aktuálisan kifejeződő gének összességét jelenti.) És ami a módszer „erejét” jelenti: elvileg a humán genom összes génjére felvilágosí-

Közlésre érkezett: 2002. február 8.
Elfogadva: 2002. március 14.

Levelezési cím: dr. Kopper László,
Semmelweis Egyetem, I. sz. Patológiai és Kísérleti
Rákkutató Intézet,
1085 Budapest, Üllői út 26. Tel/fax: 317-0891,
E-mail: kopper@korb1.sote.hu

tást kaphatunk. A következőkben két területet érintünk röviden: egyrészt a chip-technikának feltehető kérdéseket és a várható válaszokat, másrészt ehhez csatlakozóan néhány – nem hematólogiai – daganat ilyen irányú vizsgálataiból mutatunk be példákat.

Mire alkalmas a génexpressziós profil?

A chip-technikának feltett kérdés egyértelmű: mely gének expresszálódnak az adott daganatban, összehasonlítva a megfelelő normális szövetekkel és a hasonló daganatokkal. A választ az expressziós profil adja, amely a jelenlegi szinten vagy azt jelenti, hogy véletlenszerűen összeválogatott több ezer vagy tízezer génből választja ki az aktívakat, vagy néhány százból, de ekkor már rendszerint adott daganattípusra tervezett chipről van szó. Majdnem biztos, hogy az előzőből nyert információk vezetnek, vagy fognak vezetni utóbiak kialakításához. Nem foglalkozva a szenzitivitás, a specificitás és a költséghatékonyság problémáival, azt kérdezhetjük, hogy milyen felvilágosítást nyújthat az expressziós profil ismerete.

Mint látni fogjuk, nincs új a nap alatt ami a kérdések jellegét illeti, az igazi különbség – reményeink szerint – a válasz információtartalmában rejlik (1, 2). A génexpressziós profil a) diagnosztikai értékű lehet – ha adott tumortípus jellemző profilját sikerül azonosítani; b) prognosztikai értékű lehet – ha a profil és a klinikai lefolyás közötti összefüggést sikerül bizonyítani; c) alkalmas lehet a daganatkialakulás esélyét (rizikóját) hordozók felismerésére; és nem utolsósorban d) alkalmas lehet a terápia tervezésére és a terápia várható hatékonyságának megítélésére. Ez persze a jövő, miután az OEP még nem finanszírozza az ilyen típusú diagnosztikus vizsgálatokat.

A tumorok diagnosztikájához és prognosztikájához, azaz a tumorok patológiai viselkedésének megítéléséhez használt eddigi módszerek az esetek egy részében – különösen a diagnosztika terén – jó szolgálatot tesznek és tettek. Legtöbbször pillanatkepillanatképp alapján történik a döntés, amelynek alapját a múltban – a vizsgáló vagy elődei által – látott morfológiai képek jelentik. A tumor morfológiai azonosítása, a „malignitás” meghatározása általában nem nehéz (bár sok a kivétel), de annak megítélése, hogy a látott kép „mennyire” malignus adott betegben, beleértve a kor színvonalán alkalmazott terápiás eljárásokra adott választ is, azaz milyen a prognózis, már sokkal nehezebb. Tudjuk, hogy ugyanaz a morfológiai kép mennyire eltérő prognózissal társulhat. Természetesen számos olyan paramétert, módszert (főleg immunhisztokémiai és molekuláris genetikait) ismerünk, amelyekkel a tumorok természete és a várható klinikai lefolyás is jobban becsülhető. Mivel valószínű, hogy a daganat viselkedését és a daganatos beteg reakcióit jelentős részben rosszul működő gének határozzák meg (rossz időben, rossz helyen, rossz mennyiségben és/vagy minőségben termelődött fehérjékkel), jogos a feltetelezés, hogy a normálistól eltérő génaktivitási mintázat a jelenlegi paramétereknél jobban mu-

tathatja a daganat valódi mivoltát. Mielőtt örömmel ünnepet ülünk, vagy pálcát törünk a génexpressziós profil meghatározását lehetővé tevő chip-technológia felett, lássunk néhány példát.

Módszertani kérdések (11)

A sebészeti biopsziás mintákból kiindulva gyakorlatilag három lehetőség áll a molekuláris patológus előtt, hogy a vizsgálandó mintából nukleinsavat állítson elő. Az egyik lehetőség (és a legbonyolultabb), hogy először a daganatsejtek primer tenyésztését hozzák létre, majd ezekből izolálják a DNS-t, illetve RNS-t. A módszer legnagyobb hátránya, hogy tenyésztési lehetőségeket igényel, és még ha sikerül is a primer tenyésztet kialakítása, azokban az eredeti tumorpopuláció természetes heterogenitásának reprezentációja esetleges. A második lehetőség, hogy a kivett tumorszövet egy részéből azonnal izoláljuk a nukleinsavat. Ennek hátránya az, hogy az izolálásra bármikor (pontosabban a műtét idején) rendelkezésre kell állni. A korszerű alternatíva az, ha a molekuláris vizsgálatokra szánt mintát megfelelő speciális izoláló/tartósító oldatba helyezik, ami lehetővé teszi a minta tetszőleges időpontban történő feldolgozását. Problémát jelenthet, hogy az eltávolított minta a tumorsejtek mellett a stromában levő normális sejteket is tartalmazza, következésképpen a kapott expressziós információban a tumoros és a normális sejtekre vonatkozó keverednek. Ennek kiküszöbölésére alkalmas a mikrodisszekciós módszer, amikor a patológiai vizsgálatra készített paraffinos vagy fagyasztott metszetből a tumorsejteket tartalmazó területet távolítjuk csak el és ebből történik a DNS illetve RNS izolálása. Ez a legbonyolultabb, ugyanakkor a leginkább munkai igényes módszer, emiatt jelenleg nem is lehet rutinszerűen alkalmazni.

Génexpressziós profilok humán szolid tumorokban

Emlőrák

Emlőrák – mesenchymalis és hemopoetikus sejtvonalak és emlőrákszövet – génexpressziós profilját összehasonlítva el lehetett különíteni a daganatsejtekre, a tumort infiltráló lymphocytákra és a stromára jellemző profilt (10). (Mondhatnánk, hogy ez igazán nem nagy eredmény, de a molekuláris patológus még az alapok lerakásánál tart.) Invazív ductalis emlőrák, jóindulatú emlődaganat, illetve normális emlőszövet DNS-chipvizsgálata alapján a tumorokat 4 típusra osztották: a) normális emlőre emlékeztető (magasan differenciált), b) luminalis és c) basalis ductalis epithelszerű, illetve d) ERBB2-amplifikációt mutatók. A luminalis csoporton belül további 3 altípust különítettek el (A, B és C). Az egyes csoportok jelentősen eltértek p53-expresszió szempontjából is. A luminalis A és a normális emlő fenotípusát mutató csoportban alacsony volt a mutációk aránya (15–30%), míg a luminalis C, a basalis és az ERBB2 csoportban gyakori (70–80%). Prog-

nosztikailag: az 5 éves túlélés a luminalis A csoportban bizonyult a legkedvezőbbnek, míg a balsalis- és az ERBB2 csoportban a legkedvezőtlenebbeknek. Ez a vizsgálat támogatta azt a feltevést, hogy adott szövettani típusú szolid daganatok a molekuláris génextpressziós profiljuk alapján olyan alcsoportokra bonthatók, amelyek biológiai sajátosságai eltérnek (13).

Tüdőrák

67 tüdőrák több mint 17000 génre vonatkozó chipvizsgálata igazolta, hogy a szövettanilag eltérő tumork génexpressziós profilja is eltérő (6). A nagysejtes tüdőrák genetikailag azt bizonyította, hogy erre a tumortípusra az epithelialis → mesenchymalis átmenet irányába történő dedifferenciálódás a jellemző, melyet a PAX-8 transzkripció faktor expressziójának elvesztése és a DICKKOPF-1 fokozott expressziója irányíthat. Következmenyeként a hámsejtekre jellemző gének expressziója jelentősen csökken (1. táblázat).

A kissejtes tüdőrák ettől eltérően és a vártak megfelelően neurogén génextpressziós profillal rendelkezik. Ez megnyilvánult az N-CAM (CD56), az inzulin-asszociált-1 gén, több neuroszekréciós granulum komponens, ill. egy agyi fehérje génjének expressziójában. Érdekes, hogy ezek közül több expresszáldott az adenocarcinomák egyik csoportjában (1. táblázat).

A laphámrákok differenciáltságuknak megfelelően többféle citokeratint (10, 14) expresszáltak, feltehetően a háttérben a p63 elszarusodó laphámtranszkripció faktor aktivitása áll (1. táblázat).

Az adenocarcinomák (AC) 3 csoportra oszlottak expressziós profiljuk alapján: az első két csoportban a surfactant-A (valamint B és C és a pronapsin A proteáz) a jellegzetes genetikai marker, ami viszont hiányzik a 3. csoportból. Ehhez hasonlóan a pajzsmirigy transzkripció faktor-1 is csak az 1. és 2. csoport jellegzetessége. A 3. csoport több gén (DICKKOPF-1, uPAR, catepszin-L, VEGF-C és PPARgamma) expressziójában hasonlított a nagysejtes tüdőrákhoz. Ez a csoport a laphámrákokhoz is hasonlított számos eicosanoid-metabolizáló enzim (PGE-szintáz vagy LTB4-dehidrogenáz) expresszióját tekintve. Ugyanakkor a három csoportot az expressziós profiljuk alapján egyértelműen el lehetett különíteni egymástól (2. táblázat). A három csoport eltérő 5 éves túlélést mutatott: az AC2 volt a legjobb prognózisú, míg az AC3 a legrosszabb, aminek oka az igen korai nyirokér- és vérérszóródás kialakulása. Utóbbiban azt is ki lehetett mutatni, hogy pusztán morfológiai eszközökkel (differenciáció, illetve grading) nem lehetett különbséget tenni a három csoport között, ami arra utal, hogy legalábbis ebben a tüdőráktípusban a molekuláris jegyek valószínűleg jobban használhatók a prognózis megítélés szempontjából, mint a morfológia.

A gyomor-bél rendszer daganatai

Ezen a területen kevés vizsgálat történt. Az egyikben colorectalis carcinoma sejt vonalakat hasonlí-

tottak össze más daganatféléssel és normális szövetrel (9). Megállapították, hogy a vastagbélrák és az emlőrák sejt vonalakat hasonló expressziós profilúak; epithelialis desmosoma-, citokeratin- és bazális membrán-adhéziós molekulák génjeinek expressziójával. Igazolódott a CEA differenciáldiagnosztikus hatékonysága is. A legtöbb colorectalis carcinomában jellegzetesek a mutáns wnt/ β -catenin jelátviteli pálya cél-transzkripció faktorai (CDX1, BTEB2). Egy másik vizsgálatban (40 daganatszövet és 20 normális minta) három olyan gén expresszióját emelték ki a vizsgált 2000 közül, melyek alapján a transzformált bélnyálkahártya 98%-os biztonsággal volt elkülöníthető a normális területektől (16). A három gén eddig még nem került kapcsolatba a colorectalis karcinogenezissel: IL-8, CANX chaperon és a RAB3B Ras-családtag.

Májrák

Harminc májrák és a környező máj génextpressziós profiljának 1200 gént tartalmazó chip-pel történő vizsgálata a rákokban jellegzetes ex-

1. táblázat.

Tüdőcarcinomák génextpressziós jellegzetességei

Gén-expresszió	LCLC	SCLC	SQCLC
Fokozott	HMGI(Y) Fos-szerű antigén-1 TPA DICKKOPF-1 uPAR Katepszin-L	N-CAM L-myc Inzulin-asszociált gén-1 7B2 Glutamil-cikláz	CK5,13,17 p63 PGE-szintáz LTB4-dehidrogenáz Glutation-peroxidáz Aldo-keto-reduktáz
Csökken	Epithelialis transzkripció faktor PAX-8 E-cadherin γ -catenin CATX-8 Claudin 4-7		

LCLC= nagysejtes tüdőrák, SCLC= kissejtes tüdőrák, SQCLC= laphámrák

2. táblázat. Tüdőadenocarcinomák molekulárisan meghatározható alcsoportjai

Prognózis	AC2 (jó)	AC1	AC3 (rossz)
Közös	v-ERBB2 homológ Foszfatidilkolin-transzferáz-2 Szigetsejt autoantigen	v-ERBB2 homológ Foszfatidilkolin-transzferáz-2 Szigetsejt autoantigen	v-ERBB2 homológ Foszfatidilkolin-transzferáz-2 Szigetsejt autoantigen
	Surfactant-A(BC) Citron Pajzsmirigy transzkripció faktor-1 Epididymis-specifikus gén Hepsin	Surfactant-A(BC) Citron Pajzsmirigy transzkripció faktor-1 Epididymis-specifikus gén Hepsin p16-CDK-inhibitor	p16-CDK-inhibitor
Specifikus	Del-oral cc-1 Porc gén Na-csatorna Ea2 Ornitin-dekarboxiláz	ICAM-1 PTK7 CEA-szerű gén CD26 Kollagén IXa2	CD98 ATX-társult gén PGE-szintáz Catepszin-L LTB4-dehidrogenáz VEGF-C ERO-1-szerű gén

pressziós profilt mutatott. A HBV génjeinek kifejeződése egyértelműen csökkent a tumorok többségében. A korábbi megfigyeléseknek megfelelően a fokozott glikolízis kulcsenzime, a 6-foszfofruktokináz-1 fokozottan expresszáldott, míg a sejtlégzés, a glikogén- és aminosav-szintézis és a lipid-metabolizmus enzimeit csökkenten fejeztek ki. A jelátviteli utak elemei közül az E-cadherin csökkent expressziója mellett fokozott MAPK- és p38-kifejeződés volt megfigyelhető. A sejtciklust szabályozók közül jellegetesen több ciklin (A2, B1, E1, G1) és ciklinfüggő kináz (CDK1, -8, -9, -10) fokozottan, míg a gátlók közül a p27 és a PTEN csökkenten expresszáldók. Génexpressziós profil alapján kétféle tumort különítettek el: az egyikre az Rb, p15, c-jun, p38 és MAPK6, míg a másikkra az N-ras expressziója volt jellemző. A sokféle változásból bonyolult matematikai analízissel kimutatták, hogy a TOPO2a és a ciklin A2 fokozott és két transzkripciós faktor (a growth arrest specific 2 és myeloid leukemia rel-1) csök-

kent génexpressziója nagy valószínűséggel kapcsolatban áll a hepatokarcinogenezissel (15).

Melanoma

Több mint 60 humán melanomából indított sejtvonal 12000 gént hordozó chippel történt vizsgálata igazolta azt a tapasztalatot, hogy a melanomát azonosító 16 gén csoportjában szerepel a tirozináz, a TRP-1, a DOPA-króm-tautomeráz, az S100B és a MART-1 antigén (3. táblázat). Egy másik vizsgálatban 31 beteg tumorából (29 cutan melanoma, 2 uveális melanoma) indított sejtvonalakban 7000 gén expresszióját a tumorok klinikopatológiai és a sejtvonalak in vitro biológiai viselkedésével hasonlították össze (3. táblázat). Ennek alapján a cutan melanomák között két alcsoportot különítettek el, amelyek profilja 20 gén expressziójában mutatott eltérést, és a két csoport a belőlük izolált tumorsejtek invazív képessége alapján is elkülönült. A gének között azonban csak két melanoma-antigén (MART-1 és CD63) szerepelt az előző vizsgálat listájából. Fontos megfigyelés volt, hogy a p16, illetve β -catenin mutációja alapján (melyek melanomákban igen gyakoriak) nem lehetett összefüggést találni a génexpressziós profil és a klinikai paraméterek között.

Gyermekkori daganatok

A kis kereksejtes gyermekkori tumorok elkülönítése a patológiai differenciáldiagnosztika egyik legnehezebb területe, ahol a klasszikus morfológia még a korszerű diagnosztikus immunhisztokémiával és molekuláris technológiákkal kiegészítve is gyakran sikertelen. Ebben a tumorcsoportban igen széles spektrum jelenhet meg a B-sejtes non-Hodgkin-lymphomától (B-NHL) a Ewing-sarcomán (EWS) át a rhabdomyosarcomáig (RMS) és a neuroblastomáig (NBL). Khan és mtsai (7) 6500 gén expressziója alapján választották ki neurális network-modellt alkalmazó értékelési módszerekkel azt a 93 gént, amelynek expressziója alapján az említett 4 daganatféleséget gyakorlatilag teljes biztonsággal meg lehet határozni patológiai/morfológiai módszerek nélkül. A 93 gén közül 16 az EWS-t, 20 az RMS-t, 15 a NBL-t, míg 10 a B-NHL-t jellemezte (4. táblázat). Érdekes, hogy a 93 gén közül 32 eddig még nem azonosított fehérjét kódol, és a 61 ismert gén közül 41-et eddig még nem hoztak kapcsolatba emberi daganattal.

Az EWS-ben manapság alkalmazott CD99-ről kimutatták, hogy mind RMS-ben mind B-NHL-ben expresszáldhat, így önmagában erre alapozni a diagnosztikát nagyon veszélyes lehet. Az EWS-specifikus gének között 4 neuroektodermális gén (TUBB5, ANXA1, NOE, GSTM5) ami újabb adatot szolgáltat arra, hogy az EWS neurális eredetű. Az RMS-ben megjelenő 20 gén közül az izomspecifikus gének mellett öt gén az izomfejlődéssel kapcsolatos (FGFR4, IGF2, IGFBP5, MYL4, ITGA7). Miután normális izomban csak az ITGA7 és IGFBP5 expresszáldók, a többiek az RMS új

3. táblázat.
Melanoma-specifikus
génexpressziós profilok

Ross et al. 2000 (10)	Bittner et al. 2001 (3)
Referencia: carcinoma	Referencia: fibroblaszt
G2 protein	Wingless-típusú MMTV integrációs hely család-5
PTPRZ1 tirozin-foszfátáz- ζ	Human melanoma antigén MART-1
MBP mielin bázikus protein	Pirin
BCHE butirilkolinészteráz	Hidroxiacil-koenzim-dehidrogenáz
SCRAPIE protein 1	CD63 antigén (melanoma 1 antigén)
ART3 riboziltranszferáz	Endotelin receptor-B
SIAT6 α 2,3-szialisziferáz	Foszfoglicerol-mutáz 1
ACP5 savanyú foszfátáz-5	Tenascin C
RXRG retinoid X receptor- γ	Retinoid X receptor α
DCT dopakrómtautomeráz	Integrin β 1
TYR tirozináz	Syndecan 4
MUTYH muty-homológ gén	Tropomiozin α
S100B	AXL receptor tirozinkináz
EDNRB endotelin receptor-B	EphA2
TRP-1	Növekedési gén 43
SIAT8A α 2,8-szialisziferáz	Foszfofruktokináz (máj)
MLANA melanoma antigén	Synuclein α
GM6b	Annexin II
PDNP2 nukleotid-pirofoszfátáz-2	Hypoxia-indukálható faktor 1, α
ERDA3 CAGH3	Human Dr1-asszociált korepresszor
CPB2 plazma karboxipeptidáz B	Human scaffold protein Pbp1
LGALS3BP Galectin-6-kötő protein	RAB2
A2M α -2-makroglobulin	H. sapiens MLC kináz
AACT α -1-antikimotripszin	Malát-dehidrogenáz
LAMA4 laminin α 4	TGF- β -indukált 68kD protein
	Human glioma patogenezissel kapcsolatos protein (GliRP)

markereként jöhetnek szóba. E vizsgálat érdekes eredménye az volt, hogy az FGFR4 expressziója fehérjeszinten is (immunhisztokémiailag) alkalmas arra, hogy az RMS-t el lehessen különíteni a csoport többi tagjától.

A génextpressziós profil és a terápia

A globális (elvileg minden génre kiterjedő) génextpressziós profilvizsgálatok egyik lehetséges jövőbeni alkalmazása a terápiában használt szerrel szembeni érzékenység nagy hatékonysággal történő előrejelzése lehet. Erre vonatkozóan egyelőre csak néhány példát találunk. A chip-technológia két ponton hozhat jelentős változást: a) a xenobiotikumok metabolizációját végző számos enzim populációs szinten igen jelentős polimorfizmust mutat, aminek meghatározása az egyén szintjén nem képzelhető el másképpen, mint az erre a célra specifikusan tervezett ún. polimorfizmuschipek segítségével. A legfontosabb gének ebből a szempontból az 5. táblázatban szerepelnek (5). A terápia szempontjából legfontosabb géneket 3 csoportba lehet osztani jelenlegi ismereteink szerint: thiopurinmetabolizáló enzimek, antifolátmetabolizmusban érintett enzimek és a legnagyobb csoport, melyben minden egyéb szer metabolizálásában felmerült enzimek találhatóak.

Az igen kevés farmakogenomikai vizsgálat közül kiemelendő Scherf és mtsai (12) munkája, amelynek során az NCI 60 standard tumorsejtvonala határozták meg a 8000 génre vonatkozó expressziós profilt és ezt hasonlították össze 1400 klinikailag használt, illetve kísérleti stádiumban levő szer iránti érzékenységgel. Az első alapvető megfigyelés az volt, hogy a különböző szöveti eredetű daganatsejtvonalak génextpressziós profiljuk alapján egyértelműen elkülöníthetők egymástól, ahogy azt más vizsgálat is igazolta (10). Ugyanakkor a kemoterápiás szer iránti érzékenység szempontjából ezek a csoportok értelmüket veszítették és újak alakultak ki, amelyek alapját a gyógyszer-érzékenység képezte. Miután a vizsgált szerek közül csak mintegy 120 hatásmechanizmusa ismert pontosan, ezért a részletes analízist ezekre nézve végezték. A 120 kemoterápiás szer iránti érzékenység alapján a 60 tumorsejtvonalt 5 nagy csoportra osztották: DNS-, illetve DNS/RNS-antimetabolit-csoport, tubulin-inhibitorok, DNS-károsítók csoportja és TOPO1/2-inhibitorok csoportja. Érdekes, hogy az 5-FU-érzékeny sejtvonalak az RNS-gátlókkal egy csoportban jelentek meg, ami arra utal, hogy az 5-FU hatásában az RNS-szintézis gátlása lenne a meghatározó tényező. A legközelebb álló csoportot a tubulin-inhibitorok iránt érzékeny sejtvonalak képezték és itt is volt meglepetés: ide kerültek expressziós profiljuk és érzékenységük alapján a geldanamycin (G1 sejtciklus-blokkoló) iránt érzékeny sejtvonalak valamint a TOPO2-gátló Bisantrone, ami arra utal, hogy ezek hatásában az elsődleges tényező a mikrotubuláris rendszer károsítása. A TOPO1 iránti érzékenység expressziós sajátosságai alapján hasonló volt a DNS-szintézis-gátlókéhoz, ami arra utal, hogy a TOPO1 fő hatása a DNS-szintézis-gátlás. Ugyanakkor

kor a TOPO2-érzékeny sejtvonalak a DNS-t alkiláló szerek iránti érzékenységhez mutattak expressziós hasonlóságot, utalva arra, hogy e szerek hatásában fontos a DNS-károsítás is.

Néhány esetben gén-szer kapcsolatra is fény derült, bár ezek igazi meglepetést nem okoztak. Az 5-FU-val szembeni érzékenység a dihidropirimidin-dehidrogenáz-aktivitás szintjével függött össze, hasonlóképpen az L-aszparagináz-érzékenység az aszparagin-szintáz (ASNS) expressziójával. Kiderült, hogy bizonyos tumortípusokban igen alacsony ASNS-szint észlelhető, pl. melanómában vagy petefészekrákokban, ami felveti an-

4. táblázat.

Gyermekkori kis kereksejtes tumorok génextpressziós profiljai (7)

	Ewing sarcoma	Neuroblastoma	Rhabdomyosarcoma	B-NHL
s p e c i f i k u s	TUBB5	DPYSL4	NME2	ACTA2
	ANXA1	CDH2	AMPHL	HLA-DPB1
	DAPK1NOE1	AFIQ	HSBP2	HLA-DQA1
	SELENBP1	CRMP1	IGFBP5	HLA-DMA
	TIE2	KIF3C	COL3A1	ELF1
	DTPNI3	GAP43	COL15A1	HCLS1
	FNT1	MAP1B	COL4A2	PIM2
	TNFIP6	RCV1	ITGA7	MT1L
	CAV1	SFRP1	TNNT1,2	MME
	FCGRT	GATA2	FGFR4	PRKAR2B
	GYG2	PFN2	IGF2	
	GSTM5	FHL1	MYL4	
	IFI17		SGCA	
		GATM		
k ö z ö s	APLP1	APLP1		
	CCND1	CCND1		
	DPYSL2	DPYSL2		
			NF1B	NF1B
			CNN3	CNN3
			PIG3	PIG3
				MIC2/CD99
				HSRNASEB
				MYC
				IL4R
				IFI16
				REG1A

5. táblázat Gyógyszer-metabolizmust meghatározó genotípusok

Gyógyszertípus	Gének
Thiopurinok	TPMT MSH2/MSH6
Antifolátok	FPGS FPGH RPC MRP MTHFH
Egyéb gyógyszerek	CYP3A4 CYP2D6 MDR UGT GST

nak a lehetőségét, hogy az eddig csak leukémiákban alkalmazott szert szélesebb körben használják. A különböző daganatfélések nagyon heterogén csoportot képeztek az MDR1-expresszió szempontjából (10). Ebben az esetben a globális génexpressziós profilnak gyakorlatilag nem volt jelentősége, igazolva azt a korábban sokszor hangsúlyozott ténytet, hogy az MDR1-expresszió és -funkció minden egyéb tényezőnél erősebben befolyásolja bizonyos kemoterápiás szerek iránti érzékenységet.

A génexpressziós profil és a prognózis

A primer tumorok génexpressziós profiljának megállapítása elvileg alkalmas lehet arra, hogy meghatározzuk a progressziós készség genetikai feltételeit. Ilyen típusú génexpressziós vizsgálatok elsősorban malignus melanoma esetében történtek és magunk is hasonló vizsgálatokat folytattunk. A már korábban említett NCI tanulmányban (3) 31 beteg primer tumorának analízise során elkülönített 20 gén expressziója alapján két betegcsoportot lehetett alkotni, amelyek esetében feltűnő volt, hogy azokban az esetekben, amikor a daganatok ezeket a géneket fokozottan expresszálták, a prognózis a vizsgált periódusban rosszabb volt. E gének között találták a melanoma progressziójával már korábban kapcsolatba hozott $\beta 3$ integrint, a WNT-jelátviteli pályához tartozó WNT5A-t, a syndecan-4-et, az IL-6-ot és a TGF- β -jelátvitelhez kapcsolódó SMAD1-et.

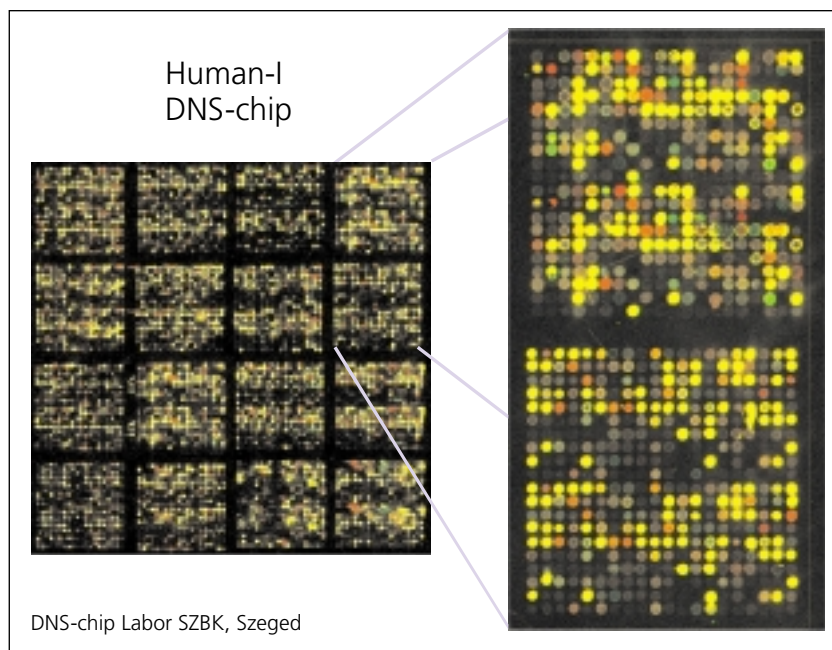
Egy másik vizsgálatban (4) eltérő áttétképző képességű melanoma sejtvonalakban 8 gént találtak, melyek expressziója összefüggött a primer és az áttétképző melanomában megnyilvánuló expressziós mintázathoz. A TGF- β , APOCII és a PACE4 fokozott expressziója, valamint az $\alpha 2$ -makroglobulin (általános proteázgátló), a CDC10 és a DYRK1A csökkent expressziója jellemezte az áttéti tumorokat. Saját, az SZBK DNS-chip laboratóriumával kollaborációban jelenleg zajló vizsgál-

ataink első eredményei szerint (dr. Puskás László) három áttétképző humán melanoma vonalban 3200 génre vonatkozó adatok alapján konzekvensen fokozódott az RXR- γ retinolsavreceptor és számos jelátvitelben szerepet játszó gén (pl. GAP-SH3-kötő fehérje és a farneziltranszferáz), valamint a metallothionein expressziója, ugyanakkor a TIMP-3 metalloproteázgátló expressziója következetesen csökkent (1. ábra). Ezek közül a retinolreceptort és a TIMP-csoportot korábban már kapcsolatba hozták a melanoma progressziójával.

Megbeszélés helyett

Mit mondhatunk a fentiek alapján? Egyrészt nyilvánvalónak látszik, hogy a génexpressziós profilok számos területen a jelenleginél pontosabb összefüggéseket tárnak fel részben a tumorok azonosítása (azaz a diagnosztika), részben viselkedésük megítélése (azaz a prognosztika) terén. Most még nem megválaszolható, hogy ezek a profilok függetleníteni tudják-e magukat a patológiai daganatdiagnosztika jelenlegi fő eszközétől, a morfológiai tapasztalattól. E sorok írói – eltekintve ismét a chip-technológia módszertani kérdéseitől – legalább két olyan területen éreznek nehézséget, amely beárnyékolhatja azokat a jóslatokat, amelyek az onkogenomika mindenhatóságát ecsetelik. Az egyik a tumorok heterogenitása, amely régi gondja a patológusnak és klinikusnak egyaránt. A mai technikák is csak korlátozott mennyiségű mintát képesek feldolgozni, és aligha hihető, hogy ezek mindenben reprezentálják a tumor tulajdonságait. A nagy kérdés persze az, hogy kell-e tudnunk „mindent”, vagy pedig információ-töredékek is elégségesek ahhoz, hogy megfelelő terápiát tervezzünk. A másik kérdés magában a módszerben rejlik: génexpresszió vizsgálat, az mRNS alapján. Tudjuk, ez még nem jelenti azt, hogy működőképes fehérje is keletkezik, különösen nem, hogy e fehérjék rendelkeznek azokkal a poszttranszlációs módosulásokkal, amelyek funkciójukat meghatározzák. (Természetesen ha a gén hiányát mutatjuk ki, akkor ez nem probléma.) Ezen a téren újabb technológiai „robbanások”, a proteomikai korszak beköszöntése várható. Feltűnő, hogy a fenti vizsgálatok egymással csak igen kicsi átfedést mutatnak, melynek egyik oka az, hogy eltérő, inkomplett humán génkészletre vonatkoztak, mivel a DNS-chipeket más-más gyártótól szereztek be és azok összetételükor nem vették figyelembe sem a korábbi irodalmi adatokat, sem az adott vizsgálat sajátosságait. Ez arra kell buzdítsa a kutatókat, hogy a DNS-chipeket célirányosan állítsák össze, ellenkező esetben csak fragmentált genomikai információk keletkeznek. Tudva azt, hogy az emberi genom mintegy 30–40 000 génből áll, két lehetőség áll előttünk: vagy ún. designer chipen dolgozni, vagy a teljes genomot lefedő ún. globális chippel. Így lehetne csak elérni, hogy a vizsgált gének körébe mindig belekerüljenek azok, amelyek az eddigi tapasztalatok szerint biztosan érintettek, és természetesen a potenciálisan újak is.

1. ábra.
Különböző áttétképző képességű humán melanoma sejtvonalak génexpressziós profiljának összehasonlító vizsgálata Humán cDNS-I. chip (dr. Puskás L., SZBK, Szeged) segítségével. (HT199 vonal = vörös folt, WM35 vonal = zöld folt).



Sorolhatnánk még az előnyös és hátrányos tulajdonságokat, de mindezek nem változtatnának azon a tényen, hogy napjainkban a génextpressziós profilok egyre szélesebb onkológiai felhasználásával fogunk találkozni, a genetikai altípusoktól kezdve a gyógyszerérzékenység előrejelzéséig, vagy éppen adott tumorra tervezett terápiáig. Fontos, hogy értsük, és szükség esetén alkalmazni is tudjuk ezeket a módszereket.

Irodalom

1. Alizadeh AA, Ross DT, Perou CM, van de Rijn M. Towards a novel classification of human malignancies based on gene expression patterns. *J Pathol* 195:41-52, 2001
2. Bertucci F, Houlgatte R, Nguyen C, et al. Gene expression profiling of cancer by use of DNA arrays: how far from the clinic? *Lancet Oncol* 2:674-682, 2001
3. Bittner M, Meltzer P, Chen Y, et al. Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature* 406:536-540, 2000
4. de Wit NJW, Buirtscher HJ, Weidle UH, et al. Differentially expressed genes identified in human melanoma cell lines with different metastatic behaviour using high density oligonucleotide arrays. *Melanoma Res* 12:57-69, 2002
5. Evans WE, Relling MV. Pharmacogenomics: Transplanting functional genomics into rational therapeutics. *Science* 286: 487-491, 1999
6. Garber ME, Troyanskaya OG, Schluens K, et al. Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung. *PNAS* 98:13784-13789, 2001
7. Khan J, Wei JS, Ringnér M, et al. Classification and diagnostic prediction of cancer using gene expression profiling and artificial neural networks. *Nature Med* 7:673-678, 2001
8. Ladanyi M, Chan WC, Triche TJ, Gerald, WL. Expression profiling of human tumors: the end of surgical pathology? *J Mol Diagnostics* 3:92-97, 2001
9. Ramaswamy S, Tamayo P, Rifkin R, et al. Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures. *PNAS* 98:15149-15154, 2001
10. Ross DT, Scherf U, Eisen MB, et al. Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nature Gen* 24:227-235, 2000
11. Schena M. (ed). *Microarray Biochip Technology*. A BioTechniques Books Publication, Eaton Publishing, Natick, USA, 2000
12. Scherf U, Ross DT, Waltham M, et al. A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nature Genetics* 24:236-244, 2000
13. Sørlie T, Perou CM, Tibshirami R, et al. Gene expression patterns of breast carcinoma distinguish tumor subclasses with clinical implications. *PNAS* 98:10869-10874, 2001
14. Uher F. DNS-chipek alkalmazása az oncohaematológiában. *Magyar Onkológia* 45:59-66, 2001
15. Xu X-R, Huang J, Xu Z-G, et al. Insight into hepatocellular carcinogenesis et transcriptome level by comparing gene expression profiles of hepatocellular carcinoma with those of corresponding noncancerous liver. *PNAS* 98:15089-15094, 2001
16. Zang H, Yu C-Y, Singer B, Xiong M. Recursive partitioning for tumor classification with gene expression microarray data. *PNAS* 98:6730-6735, 2001

A Magyar Onkológusok Társasága Dunántúli Szekciója

VII. Tudományos Vándorgyűlése

és az Onkológiai Szakdolgozók

VI. Tudományos Kongresszusa

Veszprém, Megyeház Terem
2002. május 23-25.

Programok:

Május 23. 14⁰⁰ – 18⁰⁰

Népegészségügyi Program Onkológiai alprogramja

Megyei Onkológiai Központok helyzete

Jogi témakörök: „Kórháztörvény”, „Szabad szellemi” foglalkozású orvosok jogállása

Május 24. 9⁰⁰ – 13⁰⁰

Daganatos betegek gyógyszeres kezelése

Május 24. 14⁰⁰ – 18⁰⁰

Onkológiai Szakdolgozók VI. Tudományos Kongresszusa

Május 25. 9⁰⁰ – 13⁰⁰

Daganatos betegek gyógyszeres kezelése (előző napi program folytatása)

Sugárterápiás központok helyzete

Daganatdiagnosztika

Daganatsebészet

Daganatok sugárterápiája

Daganatos betegek rehabilitációja