

# GÉNEXPRESSZIÓ MÉRÉSÉN ALAPULÓ MULTIGÉNES PROGNOSZTIKAI ÉS PREDIKTÍV ELŐREJELZÉS EMLŐTUMOROKBAN

Pénzváltó Zsófia, Mihály Zsuzsanna, Győrffy Balázs

Magyar Tudományos Akadémia és Semmelweis Egyetem Gyermekgyógyászati és Nefrológiai Kutatócsoportja, Semmelweis Egyetem, I. Gyermekklinika, Budapest

*Az egyénre szabott terápia az emlőtumorok közeljövőbeli klinikai szisztémás kezelésének alapja lesz. Ehhez a tumorok hatékonyabb jellemzése, pontosabb prediktív és prognosztikus információk nyerése szükséges, amelyet monogénes (ER, PR, HER-2, stb.), vagy multigénes tesztek alkalmazása tesz lehetővé. Multigénes tesztek segítségével különböző klinikai problémákra tudunk egyidejűleg választ kapni, amely az összköltséget és az időigényt csökkenti. Az általunk ismertetett tesztek a MammaPrint, Oncotype DX, BLN Assay, Theros Breast Cancer Index SM, MapQuant DX, ARUP Breast Bioclassifier, Celera Metastatic Score, eXagen BCtm, Invasive Gene Signature, Wound Response Indicator, Mammostrat, amelyek microarray vagy RT-PCR módszert alkalmaznak a génexpresszió mérésére. Ezek közül kettő (Oncotype DX és MammaPrint) már most az ajánlott diagnosztikus protokollok része. Ma még sok probléma jelentkezik a kereskedelmi forgalomban is kapható tesztekkel kapcsolatban: jellemző a gyenge validáltság, az azonos célra tervezett chippek teljesen eltérő génlistái, az eljárás költségessége és a kiértékeléshez szükséges bioinformatikai módszerek bonyolultsága. Magyar Onkológia 53: 351–359, 2009*

**Kulcsszavak:** microarray, emlőtumor, prognózis, predikció, multigénes tesztek

*Patient tailored therapy will serve the fundamentals of future cancer treatment. For this it will be imperative to characterize the tumor and to acquire precise predictive and prognostic information. We can achieve this by using not only monogenic (like ER, PR, HER-2, Ki-67) but also multigene assays, which can provide answers to several diagnostic questions simultaneously. We present a summary of currently available RT-PCR and microarray based multigene tests including MammaPrint, Oncotype DX, BLN Assay, Theros Breast Cancer Index SM, MapQuant DX, ARUP Breast Bioclassifier, Celera Metastatic Score, eXagen BCtm, Invasive Gene Signature, Wound Response Indicator and Mammostrat. Two of these (Oncotype DX and MammaPrint) are already incorporated in several diagnostic protocols. However, multiple unsolved issues deteriorate the value of these tests: generally the validation is poor, the gene sets do not confirm each other, the associated costs are high and the necessary bioinformatics is highly complex. Pénzváltó Z, Mihály Z, Győrffy B. Gene expression based multigene prognostic and predictive tests in breast cancer. Hungarian Oncology 53: 351–359, 2009*

**Keywords:** microarray, breast cancer, prognosis, prediction, multigene assay

Közlésre érkezett:  
2009. augusztus 31.

Elfogadva:  
2009. október 20.

Levelezési cím:  
Pénzváltó Zsófia  
Semmelweis Egyetem  
I. sz. Gyermekklinika  
1083 Budapest  
Bókay u. 53/54.  
Telefon:  
(06-1) 266-0926/52772  
E-mail:  
penzvaltozsofi@gmail.com

## BEVEZETŐ

Az emlőtumorok genetikai és biológiai felépítéséből adódóan a szisztémás kezelések széles választéka alkalmazható adjuváns vagy neoadjuváns kezelésként: hormonterápia (tamoxifen, anastrozole, stb.), kemoterápia (antraciklinek, taxoidok, stb.) és célzott terápia (trastuzumab, lapatinib, bevacizumab, stb.), illetve ezek kombinációi. A betegek beosztása az egyes kezelésekre hagyományosan patológiai tényezők alapján történik: a tumor receptorstátusza, grade, stádium, nyirokcsomó-érintettség segítenek a terápiás döntések

meghozatalában. Ezek felmérése azonban, bármennyire is standardizált eljárásokkal történik, nagyban függ a patológus rutinjától, szubjektív megítélésétől. Egy korábbi vizsgálatban azt találták, hogy három különböző patológus által adott tumorgrade-meghatározás mindössze 50%-os egyezést mutatott (56). A génexpresszió mérésén vagy szekvenáláson alapuló objektívebb diagnosztikus eszközök megbízhatóbb előrejelzést adhatnak. Összefoglaló referátumunkban a génexpresszió mérésén alapuló monogénes és (a részben jelenleg még fejlesztés alatt álló) multigénes tesztek hasonlítottuk össze.

## MONOGÉNES TESZTEK

A patológiai gyakorlatban rutinszerűen vizsgált faktorok az ösztrogén-, progeszteronreceptor és a HER-2.

Az ösztrogénreceptor és a progeszteronreceptor a hormonterápiára adott válasz előrejelzésében játszanak szerepet. Klasszikusan paraffinba ágyazott szövetszövetmintán immunhisztokémiai eljárással detektálják az ösztrogénreceptor-státuszt. Az ösztrogénreceptor (ER)-pozitív betegek 60%-a egyben progeszteronreceptor (PR)-pozitív is, és a kétszeresen pozitív (ER+/PR+) betegek 75%-a reagál tamoxifenre és az aromatázinhibitorokra (67), valójában tehát az ER és PR kombinált előfordulása esetén megbízhatóbb az előrejelzés. ER-/PR- betegek egyáltalán nem reagálnak, az ER+/PR- és ER-/PR+ betegek válasza változó a hormonterápiára (4). Az Allred score két tényező vizsgálatával 8 fokú skálán osztályozza az ER-státuszt, a két elem egyrészt a pozitívan festődő tumorsejtek hányada, másrészt a festődés átlagos intenzitása a pozitív sejteken (34). Az immunhisztokémiai eljárás azonban laboronként eltérhet, és a reakció értékelése is lehet szubjektív. Az immunhisztokémiai reakció és a minta értelmezésének megbízhatatlanságát szemlélteti az a vizsgálat, melyben 26 ország 200 klinikai laboratóriuma végezte el alacsony, közepes és magas ösztrogénreceptor-státuszú mintákon az immunhisztokémiai vizsgálatot. Az eredmények elemzése után kiderült, hogy a vizsgálatok 30–60%-a adott hibás negatív eredményt (63). Ezen túlmenően igazolt, hogy az ER+ tumorok mintegy 10%-ában nincs aktív downstream jelátvitel, azaz az ösztrogénreceptor nem funkcionális (6). Az ER-státusz nem csak prediktív, de prognosztikus információt is hordoz (ER-pozitivitás a relapszusmentes túlélés idejét jelzi előre adjuváns tamoxifen monoterápiával kezelt betegekben) (78), valamint az ER+ státusz a kemoterápiára adott gyengébb válasszal is összefügg (6). ER-státusz meghatározására microarray-alapú eljárások is alkalmasak: Gong és mtsai bemutatták, hogy emlőtumorok microarrayvel mért ERBB2 (HER-2) és ER-státusza a hagyományos módszerekkel összevethető eredményeket ad (29). Meg kell jegyeznünk, hogy mivel a microarray-n több próbával is lehet egy gént mérni, ezért az egyes próbákat a hatékonyság alapján sorba lehet rendezni. Gong és mtsai munkájukban egy próbát azonosítottak (a 205225\_at az Affymetrix HGU133A chipen), amely kimagasló korrelációt mutatott a független módszerrel mért receptorstátusszal. Ennek a próbának a jelintenzitása (és ezáltal a mért dinamikus tartomány) az ötszöröse a többi, jóval alacsonyabb összefüggést mutató próba átlagos jelintenzitásának.

A human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2) a trastuzumab (Herceptin) monoklonális antitest-terápia (12) prediktív markere, az antitest a HER-2 extracelluláris doménjéhez köt. A HER-2 gén amplifikációja illetve felülexpressziója a betegek mintegy 25%-ánál fordul elő. Bár a pozitív HER-2-státusz az antitest-terápia sikerességét előre jelzi, ugyanakkor ha-

gyományosan rosszabb prognózissal társul. Egy, a korai emlőrák adjuváns kemoterápiás kombinációit összehasonlító vizsgálatban a HER-2-státusz és antraciklin-ill. nem-antraciklin alapú terápia hatékonyságának összefüggéseit vizsgálták. HER-2+ betegekben (n=1536) az antraciklinek fölényes sikert értek el a betegségmentes túlélés, illetve teljes túlélés terén is (adjuváns fázisban), míg HER-2- betegekben (n=3818) az antraciklinek nem voltak hatásosak (24). A nem kissejtes tüdőrákokban viszont a HER-2 felülexpressziójának kedvezőtlen prediktív szerepe van, azaz kemorezisztenciával társul (80). A HER-2-státuszt szintén immunhisztokémiával, paraffinos mintán detektálják. Az általánosan használt diagnosztikus algoritmus szerint a score 2+ esetekben in situ hibridizációs vizsgálat (leggyakrabban fluoreszcens ISH, FISH) szükséges a HER-2 gén amplifikációjának kimutatására. Microarray-alapú vizsgálatok a HER-2-státusz meghatározására is alkalmasak, a legjobb korrelációt Affymetrix HGU133A chipen a 216836\_s\_at próbával mérték (29).

A Ki-67 egy proliferációs marker, mely korrelációt mutat a hisztológiai grade-del (88). Jelen van a sejtciklus minden aktív fázisában (G1, S, G2, M), ugyanakkor nem detektálható G0 fázisban, így a proliferáló sejtek tökéletes markere (25). A Ki-67-expresszió prognosztikus értékét számos vizsgálat bizonyította, a betegség kimenetelére, távoli metasztatizárismentességre egyaránt (10, 18, 83). Ugyanakkor a legújabb vizsgálatok már megkérdőjelezzik a Ki-67-expresszió jelentőségét és más proliferációs markereket helyeznek előtérbe (50).

További monogénes markerek az urokináz típusú plazminogénaktivátor/plazminogénaktivátor-inhibitor 1 (uPA/PAI-1) (33, 38, 44, 51), a ciklin D1 (75) és a c-myc (8). Ezek expressziójának mértéke prognosztikai előrejelzésre lehet alkalmas. A metalloproteinázok prognosztikus és prediktív szerepe is felemerült (17, 19, 20). Az ER-státusztól függetlenül az emelkedett metalotionein-szint kedvezőtlen jelnek bizonyul a tamoxifen-terápiára nézve (77). Újabban kerülnek klinikai kipróbálásra egyéb markerek, bár ezekkel kapcsolatban még nem tisztázott, hogy prediktív, vagy inkább prognosztikus, esetleg kombinált markereknek tekinthetjük őket. Az antraciklin-terápia hatását a TOP2A gén overexpressziója előrejelezheti, bár az irodalomban a különböző kutatások és vizsgálatok szignifikáns prediktív erőt nem mutattak ki (33, 48, 51, 62, 79). Valamint lehetséges, hogy a Tau gén a neoadjuváns paclitaxellel szembeni rezisztencia előrejelzésében alkalmazható biomarkerként (2, 7, 68). Az itt felsorolt gének expressziójának rutin klinikai vizsgálata nem jellemző.

## MULTIGÉNES TESZTEK

A tumoros megbetegedések mutációk halmozásával alakulnak ki, feltételezzük, hogy a tumor kialakulása, az esetleges terápiarezisztenciák hátterében multigénes folyamatok állhatnak, így az előbbieken felsorolt egy

tényezőt vizsgáló tesztek információtartalma korlátozott. A géneexpressziós mintázatok információtartalma ezzel szemben nagyobb és közelebb áll az *in vivo* folyamatok hátteréhez. Valamennyi jelenleg fejlesztett teszt az mRNS cDNS-sé való átírásán alapszik. Az eljárás teljes mértékben standardizált, három alapvető technológiát használhat, ezek a FISH, az RT-PCR és a DNS-microarray.

A DNS-microarray-k a hibridizáción alapuló, egyszerre több szekvencia párhuzamos vizsgálatára alkalmas rendszerek. Alapelvük, hogy a DNS ismert szakaszának egyik szálát szilárd hordozó mátrixon rögzítik, majd ellenoldali DNS-szekvenciát kapcsolnak hozzá. A célszekvenciát vizsgálat előtt fluoreszcensen vagy enzimmel jelölik. Minél erősebb az adott szakasz expressziója, annál erősebb a jel a leolvasó rendszerben. A technika lehetővé teszi a sejtek funkcionális, genomi léptékű vizsgálatát. Expresszió alatt a DNS átíródását mRNS-re értjük, ez azonban még nem egyértelműen utal a valódi, működőképes fehérjék létrejöttére és mennyiségére, mivel különböző poszttranszkripció hatásai miatt nem feltétlenül jelenik meg egy mRNS fehérjeszinten is a sejtben. A teljes genom expressziójának mérése főlegesen és drága lenne, ezért jellemzően redukált próbaszámot tartalmazó (úgynevezett „custom”) chipeket fejlesztenek. Ma már jónéhány ilyen speciális chip kapható kereskedelmi forgalomban.

## EMLŐRÁK-ALOSZTÁLYOK AZ EXPRESSZIÓS MINTÁZATOK ALAPJÁN

Az emlőrák heterogenitása szükségessé teszi egy objektív alosztályrendszer kialakítását, melyben az eltérő expressziós jelleget mutató tumorok külön típusokba sorolhatóak, és ezek a típusok más, klinikai jelentőséggel bíró tulajdonságokkal korrelálhatóak. Az expressziós mintázatok alapján elkülönített emlőrák-alosztályok közelebb vezethetnek a pontosabb prognózishoz, a megfelelően megválasztott tényezők alapján elkülönített alosztályok prediktív erőt is hordoznak magukban, így segíthetnek a hatékonyabb személyre szabott terápia kialakításában.

Perou és munkatársai ma már klasszikus közleményükben microarray-adatok alapján különítették el altípusokat, melyeket a betegség kimenetelével is korreláltattak. Az általuk leírt hat altípus (60, 72): bazális, HER-2, normális emlő jellegű, luminális A, luminális B és luminális C, később a luminális C altípust törölték a rendszerből, így öt kategória maradt (73).

Az alapvetően vizsgált monogén faktorok alapján jellemezve a szubtypusokat a bazális típus ER-, PR-, HER-2-; a luminális A típus ER+ és/vagy PR+, HER-2-; a luminális B típus ER+ és/vagy PR+, HER-2+; a HER-2 típus pedig ER-, PR- és HER-2+ (87). A luminális típusok ösztrogénreceptor-pozitívak, legkiemelkedőbb a luminális A típus ER-expressziója. A luminális A tí-

pus esetén jelentős még a GATA1, XBP1, TFF3, HNF3 $\alpha$ , LIV-1 expressziója is. A luminális B szubtypus szintén ER-pozitív, a luminálspecifikus génekből közepes expressziót mutat. Az ER-negatív tumorok három altípusa a rendszerben a HER-2, bazális és normális emlő-szerű. A bazális típus megfeleltethető a „triple-negative” patológiai kategóriának (ER-, PR- és HER-2-), a jellemzésből azonban nem mellőzhető a bazális citokeratinok expressziója, úgymint citokeratin 5/6, citokeratin 14 vagy citokeratin 17 és/vagy HER-1 (55). Az öt tényezőt (HER-2, ER, PR, citokeratin 5/6, EGFR) figyelembe vevő alosztályba sorolás pontosabb meghatározása a bazális típusnak (15). A hormonterápiák alkalmazása eredménytelen a bazális és HER-2 tumorral rendelkező páciensek esetében.

Az alosztályok eltérő molekuláris biológiai jellegükön túl korrelálnak prognosztikus tényezőkkel is. Megbízható előrejelzői a túlélésnek, a standard klinikai tényezőktől (beteg kora, nyirokcsomó-érintettség, stb.) függetlenül. Mind a relapszusmentes, mind a teljes túlélés legmagasabb a luminális A típusban (35, 54) és a legrosszabb prognózis a HER-2, bazális típusokkal jár (55).

Az alosztályok asszociálhatóak a gyakorlatban régóta használt prognosztikus faktorokkal is, amely klinikai, patológiai tényezők hatékony előrejelzői a túlélésnek. Ilyen hagyományos tényezők segítségével nyerhetők prediktív információk az adjuváns terápiaiból származó esetleges előnyökre az Adjuvant! Online segítségével (<http://www.adjuvantonline.com/index.jsp>). A bazális, HER-2 tumorok jellemzően magas grade-et képviselnek, míg a luminális típusokra az alacsonyabb grade jellemző. Nem mutatható ki szignifikáns korreláció a nyirokcsomó-érintettség és alosztálybesorolás között, azonban a besorolás korrelál az ER-státusszal, ahogy azt már korábban tárgyaltuk (a luminális típusok ER-pozitívak, a bazális, HER-2, normális emlő-szerű típusok jellemzően ER-negatívak) és a tumor méretével is, ez utóbbi azonban nem túl erős kapcsolat (87).

Az alosztályok jelentős eltérése egymástól géneexpressziós szinten arra utal, hogy itt különböző eredetű, egymástól teljesen eltérő tumorokkal állunk szemben (41). Azonban ennek ellenére a molekuláris klasszifikációk hozzáadott klinikai értéke erősen limitált azáltal, hogy az alosztályok a receptorstátusszal szorosan összefüggenek.

## PROGNÓZIS ÉS PREDIKCIÓ

Az utóbbi néhány évben egyre több, és egyre erősebb prediktív erővel bíró géneexpresszió alapuló teszt jelent meg. Az assay-k célja a klinikai döntéshozatal megkönnyítése az egyes pácienseknél, így növelve a terápia hatékonyságát, a várható túlélés időtartamát, ugyanakkor csökkentve a költségeket és a mellékhatásokat, mivel a betegek csak a leghatásosabb szereket kapják meg. A tesztek alkalmazhatóságának indikációi az 1. táblázatban, a termékek összehasonlítása pedig a 2. táblázatban látható.

1. táblázat. Multigén teszt indikációja a hormonreceptor-státusz és a nyirokcsomó-érintettség függvényében

	ER pozitív	ER nem releváns
Nyirokcsomó negatív	Oncotype DX Theros Breast Cancer Index MapQuant DX Breast Bioclassifier Celera Metastatic Score Mammostrat	MammaPrint Breast Lymph Node (BLN) Assay eXagen
Nyirokcsomó nem releváns	Nouvera Biosciences	Invasive Gene Signature Wound Response Indicator

2. táblázat. Emlőtumorok diagnosztikájára kifejlesztett tesztek

Név	Cég	Elérhető	Gének száma	Assay		Cél
				Szövet	Technika	
MammaPrint	Agendia	EU, USA	70	F/F	Microarray	Prognózis 61 éven felül
Oncotype DX	Genomic Health	EU, USA	21	Ffp	Q-RT-PCR	Prognózis, tamoxifen-kezelést követő kiújulás predikciója
Theros Breast Cancer Index	Biotheranostics	USA	2(5)	Ffp	Q-RT-PCR	PM prognózis, endokrin terápiát követő kiújulás predikciója
MapQuant DX	Ipsoggen	EU	97	F/F	Microarray	Prognózis
Breast Bioclassifier	ARUP	USA	55	Ffp	RT-PCR	Prognózis
Celera Metastatic Score	Applera	–	14	Ffp	RT-PCR	Prognózis, tamoxifen-kezelést követő kiújulás predikciója
Breast Lymph Node (BLN) Assay	GeneSearch Veridex	UK	76	F/F	Microarray	Intraoperatív metasztáziskimutatás
Invasive Gene Signature	–	–	186	F/F	Microarray	Prognózis
Wound Response Indicator	–	–	512	F/F	Microarray	Prognózis
Nouvera Biosciences	Veridex	–	30	–	–	Prognózis, tamoxifen- és taxán kezelést követő kiújulás predikciója
eXagen	eXagen Diagnostics	–	3	Ffp	FISH	Prognózis
Mammostrat	Genomics	USA	5		IHC	PM prognózis

F/F: friss vagy fagyasztott minta, Ffp: formalinfixált paraffinos metszet, IHC: immunhisztokémia, FISH: fluoreszcens in situ hibridizáció, PM: menopauza után

A MammaPrint és a BNL assay elfogadottak az US Food and Drug Administration (FDA) által. A BNL tesztje olyan intraoperatív assay, amelynek segítségével a 0,2 mm-nél nagyobb metasztázis kimutatható az őrszemnyirokcsomóban a citokeratin 19 és a mammaglobin mRNS-ek expressziójának mértéke alapján (9, 49). A MammaPrint 70 gén expresszióját mérő DNS-microarray, jó és rossz prognózisú csoportba sorolja az I–IV-es stádiumú, nyirokcsomó-negatív betegeket (11, 26, 53, 76, 84–86). A cég külön RNS-tartósító folyadékot hozott forgalomba, melynek segítségével ígéretük szerint tesztjük egyszerűbb, mint a formalinfixált és paraffinos módszerek.

Annak ellenére, hogy az FDA még nem fogadta el az Oncotype DX tesztjét, az NCCN és ASCO protokoll is hivatkozik rá 2008 óta. A teszt elérhető nemcsak a tengerentúli, hanem az európai betegek számára is. A teszt ER-pozitív, nyirokcsomó-negatív, invazív emlőrá-

kos páciensek esetében előrejelzi a terápia várható hatékonyságát és a kiújulás esélyét. A 21 gént mérő assay esetében a 16 tumorasszociált gén expressziós szintjéből a „Recurrence Score” egy egyszerű matematikai algoritmus segítségével számítható, mely korrelációt mutat a tumor 10 éven belüli kiújulásával, a kemoterápiára való érzékenységgel, valamint a mortalitással. A módszert több korábbi nagy tanulmányban, illetve jelenleg is futó klinikai vizsgálat során validálják (National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project NSABP, Trial Assigning Individualized Options for Treatment TAILORx) (5, 32, 56, 57). Azonban meg kell jegyeznünk, hogy a 16 prediktor gén (a teszt 5 referenciagén expresszióját is méri) közül a már jól ismert és rutinszerűen vizsgált ER, PR, HER-2 és Ki-67 gének azok, amelyek a rekurrenca score számolásánál igen nagy súllyal esnek latba, a többi gén hozzáadott értéke csak azokban az esetekben számít, ha a kulcsgének segítségével a

diagnózis nem lehetséges. Az Oncotype DX a legsikeresebb teszt, az USA-ban 2008-ban már 50 ezer tesztet végeztek ([www.genomichealth.com](http://www.genomichealth.com)).

Ugyancsak megrendelhető a Theros Breast Cancer Index SM teszt, amely a THEROS H/I és a THEROS MGI tesztek kombinációja. A THEROS H/I a HOXB13 és IL17BR gének expressziójának arányát vizsgálja, melyek ER+ és nyirokcsomó-érintettséggel nem rendelkező páciensekben független prediktorai a kiújulásnak. Magas H/I ráta magasabb relapszusaránytal és emelkedett mortalitással párosul. A predikció alacsony és magas rizikót különböztet meg, valamint jó és rossz válasz-készséget az endokrin terápiára. A THEROS MGI teszt 5 gén expressziója alapján adja meg a genomikai grade-beosztást. Prediktív értékét egymástól független klinikai vizsgálatokban validálták (27, 28, 39, 40, 45–47). Szintén kereskedelmi forgalomban kapható a DNS-microarray-alapú, MapQuant DX assay, amely 97 gén expressziója alapján invazív, primer, ER+, nyirokcsomó-negatív, grade II tumorokat osztályoz alacsony vagy magas rizikójú csoportba (43, 74). 2009 végére ígérik, hogy az ARUP Breast Bioclassifier assay elérhető lesz. A teszt hormon- és nyirokcsomóstatusztól függetlenül az I–IV stádiumú emlőtumorokat prognosztikus és prediktív értékű szubtypusokba sorolja a génextpressziós mintázatuk szerint, folyamatos rizikópontszám-skálát alkalmazva (56, 58, 85). A Celera Metastatic Score tesztje szintén nincs még forgalomban, a cég eddig még nem nyilatkozott a forgalomba kerülés várható idejéről. Tesztjük 14 gén expressziója alapján a tamoxifen-kezelésben részesülő nyirokcsomó-negatív, ER+ betegeknél folyamatos skálán jelzi előre a kiújulás esélyét (36, 81, 82). Az irodalomban olvashatunk még az Invasive Gene Signature tesztről, amelyben CD44+/CD24- sejtek expressziós aránya alapján adják meg az IGS-t, ami rövidebb metasztatizánsmentes túlélési időszakkal függ össze. Kombinálva az NIH prognosztikus kritériumaival a korai emlőrákban előrejelzi a nagy rizikójú áttétet vagy halált (1, 42, 61, 70). A Wound Response Indicator tesztről egyelőre szintén még csak az irodalomban olvashatunk: Dvorak és mtsai 512 génből álló WRI indexe szérummal aktivált fibroblasztokultúrában megváltozott expressziójú génekből áll és korai stádiumú emlőrákokban rövidebb túlélést és távoli metasztatizánsmentes időszakot jelez előre (13, 14, 21, 37).

5 antitest (p53, HTF9C, CEACAM5, NDRG1, SLC7A5) immunhisztokémiai mérésén alapul a Mammostrat tesztje, amely nyirokcsomó-negatív, ER+, posztmenopauzás betegek kiújulási esélyét jelzi előre. Az USA-ban már elérhető, az FDA általi elismerés azonban még folyamatban van (64, 65). Bár egyelőre még nem kapható, de létezik egy FISH-alapú, három gén alapján, korai invazív emlőrákban távoli kiújulást előrejelző assay ER/PR+ betegek számára, az eXagenBC™. Az ER/PR- páciensek számára is létezik a cégnek tesztje (16). 2009 áprilisában a Nouvera Biosciences és Veridex bejelentette, hogy forgalomba hozza a Nouvera által

kifejlesztett 30 génen alapuló farmakogenomikai előrejelzést adó tesztet, amely a tamoxifen endokrin terápia, valamint a taxánalapú kemoterápia várható hatását jelzi előre. A tamoxifenre adott válasz előrejelzését az ER-rel koexpresszáldó génekből fejlesztették a relapszusmentes túlélés időtartamának megbecslésére az adjuvánsan tamoxifennel kezelt betegek esetében. A taxánalapú kemoterápia esetében az előrejelzés a prospektív neoadjuváns trial-eken alapul.

Érdeemes az assay-k alkalmazása előtt azt is mérlegelni, hogy az alkalmazott technikáknak a gyakorlatban milyen anyagi és labortechnikai igényei vannak. Az IHC és FISH technika előzetes mikrodisszekciót nem igényel, alkalmazása során formalinban fixált minta a kiindulási anyag, amely egyszerű módszer és a költségei viszonylag alacsonyak. Hátránya, hogy szemikvantitatív és kevésbé standardizálható, automatizálhatósága közepes. A segítségével vizsgálható gének száma kicsi, így nem alkalmas összetett rendszerek egyidejű vizsgálatára. Ezzel szemben az RT-PCR és a microarray esetében a vizsgálható gének száma nagy és kvantitatív eredményt adnak, valamint a módszerek könnyen automatizálhatóak. Hátrányuk azonban, hogy bonyolult statisztikai algoritmusokat igényelnek, valamint kiértékelésük és költségük nagyságrendekkel nagyobb, mint a FISH-é vagy az IHC-é. A QRT-PCR esetében formalinfixált paraffinos mintával is lehet dolgozni, ami a rutin patológiai feldolgozás része, itt nem szükséges fagyasztott minta. A microarray-vizsgálathoz azonban friss vagy fagyasztott minta szükséges, ami egyrészt emeli a költségeket, másrészt plusz feladatot ró a patológusra (66).

Az ígéretes eredmények ellenére kifejezetten a terápiás válasz előrejelzésére alkalmas chipok kereskedelmi forgalomban még nem kaphatóak (30). A témában íródott vizsgálatok zöme neoadjuváns kemoterápiás kezelésekre koncentrálnak és az annak hatására esetlegesen kialakuló patológiai komplett remisszió (pCR) előrejelzését célozza meg (3). A neoadjuváns kezelésre adott pCR szignifikánsan javítja a túlélést. A fent említett vizsgálatban 78%-os prediktív pontossággal jelezték előre a neoadjuváns paclitaxel, fluorouracil, doxorubicin és cyclophosphamid hatására kialakuló patológiai komplett remissziót. Az eddig elmondottak alapján várható, hogy önálló markert nem sikerült találni a predikcióra, helyette egy 74 génes multigén tesztet azonosítottak a szerzők. Egy másik vizsgálatban egy 30 génes predikciós tesztet állítottak össze, neoadjuváns T/FAC-kezelés után a pCR illetve a reziduális betegség mértékének előrejelzésére (59).

A prognózis és predikció (előrejelzés) közötti különbséget legkönnyebben a „Seattle projekt” példáján keresztül lehet bemutatni (71). Ennek során a DNS-repair rendszer illetve a sejtciklus géneiben specifikus mutációkat hordozó élesztő sejtvonalakat kezeltek jóváhagyott kemoterápiás szerekekkel. Meglepő módon a legtöbb gyógyszer – különösen az emlőrák kezelésében alkalmazott szerekek, mint az 5-fluorouracil vagy

a doxorubicin – nem mutatott a célfehérjére vonatkozó szelektivitást. Pontosán emiatt a predikció nagyon nehéz, illetve a magas proliferációs rátával rendelkező tumorok lesznek a legérzékenyebbek a kemoterápiával szemben. Ez azt is megmagyarázza, hogy miért rendelkezik a legtöbb prognosztikus marker jelentős prediktív értékkel is.

## A MULTIGÉNES TESZTEK HÁTRÁNYAI

A microarray-alapú analitikai vizsgálatok mindössze tizenöt éves múltat tekintenek vissza (23), és az eljárás klinikumba lépése még folyamatban van, így érthető és több ponton indokolt a velük szembeni szkepticizmus. Alapvető technikai tényező, hogy a microarray mRNS-szinteket mér a sejtekben, ami nem szükségszerűen egyezik a kódolt fehérje valódi megjelenésének mértékével. Az egyidejűleg sok fehérje szintjének gyors mérésére alkalmas proteinarray technológia még nem kiforrott, kidolgozása a proteomika közeljövőbeni feladatai közé tartozik.

A legfontosabb kérdés a microarray-vizsgálatok reprodukálhatósága. Az FDA vizsgálatot indított a microarray-elemzések reprodukálhatóságának felmérésére, melynek során négy RNS-mintát, ötszörös ismétléssel, hét különböző array platformon, három különböző laborban vizsgáltak összesen majdnem ezer microarray felhasználásával, illetve a mintákat RT-PCR-rel is újramérték. Magas egyezést találtak a microarray- és a PCR-eredmények között, és a microarray-eredmények is jól reprodukálhatónak bizonyultak (69).

A kiértékelés eredményeként felmerülő probléma a génlisták kérdése: azonos célra, problémára létrehozott chipek gyakran teljesen különböző génlistákat tartalmaznak. A génlisták eltérésének több oka is lehet: a felhasznált biológiai anyag különbözhet (sejtvonalak, klinikai minták, stb.), a bevont minták száma alacsony egyes vizsgálatokban (kevés minta esetén valódi összefüggés helyett a heterogenitásból adódó genetikai diverzitást mérhetjük), az egyes microarray-k különböző technológiát használnak (ami szükségszerűen máshova kötődő próbákat jelent), illetve az egyes vizsgálatokban eltérő bioinformatikai módszereket alkalmaztak. Kérdéses tehát, hogy valójában sikerült-e megtalálni ez esetekben az oki géneket, vagy csupán egyes útvonalak downstream génjeit emeli ki a teszt? Természetesen lehetséges, hogy a nem átfedő génlisták esetében egy adott kérdés több lehetséges jó megoldásáról van szó. Erre utal Fan és mtsai vizsgálata, melyben 5 különböző multigénes prediktor tesztet próbáltak ki 295 mintán, és az öt tesztből négy szignifikáns egyezést mutatott a predikcióban, annak ellenére, hogy különböző gének expresszióját vizsgálták (22).

Egyes esetekben átgondolandó, hogy valóban multigénes-e a microarray chip. Némely teszteknel (pl. Oncotype DX) megfigyelhető, hogy a régóta ismert és

rutinszerűen vizsgált gének mellett ugyan feltűnnek újabb elemek, alaposabban megvizsgálva a teszt felépítését azonban kiderül, hogy a végső prognosztikus/predikciós score kialakításához az egyes génekhez egy-egy szorzót rendelnek, így kiemelve, hangsúlyt adva a régóta ismert prognosztikus erejű géneknek, míg az újdonságként bevezetett gének valójában érdemben nem is vesznek részt a score kialakításában.

További, és talán legjelentősebb kétséget a forgalomban lévő multigénes tesztek sokszor megkérdőjelezhető validáltsága jelenti, ugyanis csak ritkán találni valóban független validációt (gyakrabban ez szintén a fejlesztők nevéhez köthető). A ClinicalTrials.gov (<http://www.clinicaltrials.gov/>) az US National Institute of Health által működtetett adatbázis, ahol a jelenleg futó, és a már lezárt klinikai vizsgálatok követhetők nyomon. Adatbázisa alapján az emlőrákkal kapcsolatos génextpresszió alapuló klinikai vizsgálatok között jelenleg 48 study fut. A Nouvera Bioscience a III. fázisban lévő prospektív vizsgálat, GeneSearch Breast Lymph Node (BLN) Assay esetében gyűjt bizonyítékot arra, hogy az assay klinikai körülmények között is igen hasznos eszköze az orvosi döntéshozatalnak. A III. fázisban lévő lezárt vizsgálatok közül egyben az előrejelzés pontosságát értékelik génextpressziós profil alapján preoperatív taxán- és antraciklin kemoterápiára kiválasztott I–III. stádiumú emlőrákos betegeknél. Elsősorban a preoperatív kemoterápiás szerrel kezelt I–III. stádiumú betegeknél igyekeznek előrejelezni a pCR-t genetikai profilon alapuló tesztel, valamint hogy a teszt paclitaxel/FAC-specifikus vagy csupán FAC-terápiában növekszik a szenzitivitása. Összesen négy III. fázisú vizsgálat fut jelenleg. A még jelenleg is futó MINDACT (Microarray In Node-negative Disease May Avoid Chemotherapy) egy prospektív, random összehasonlító elemzés, amely 70 gén alapján közös klinikopatológiai kritériumok szerint adjuváns kemoterápiára kiválasztott nyirokcsomó-negatív páciensekkel dolgozik. A kezelés eredményeit összevették a 70 gén alapján adott prognózzal. Ez valójában a MammaPrint validációja (52). Öt klinikai vizsgálat foglalkozik az emlőrák prognosztikus tesztjeivel. Az NSABP (National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project) keretén belül a B40, B41, és B42 jelenleg is futó III. fázisú vizsgálatok a különböző terápiás kombinációkat hasonlítják össze HER-2-pozitív (B41), posztmenopauzális, hormonreceptor-pozitív (B42) páciensek esetében. Ezen NSABP-s vizsgálatokban validálták az Oncotype DX tesztjét.

Nagyban korlátozza továbbá a microarray mint technika felhasználhatóságát az elemzéshez szükséges bioinformatikai eszközök éretlensége. A legtöbb vizsgálat során az R statisztikai környezetben [[www.r-project.org](http://www.r-project.org)] futó bioconductor [[www.bioconductor.org](http://www.bioconductor.org)] könyvtárakat használnak, ez azonban egy parancssoros munkafelületet jelent, amelyet csak jelentős informatikai háttérrel lehet kezelni. Az adatok elemzése során sok olyan részlepcs kapcsolódik, amelyekre külön-külön is több lehetséges algoritmus érhető el. Több

próbálkozás történt egyszerű felhasználóbarát programok kifejlesztésére (pl. dChip, Genespring), ezek a programok azonban rendkívül egysíkú statisztikai algoritmus-készletet tudnak felmutatni, így a felhasználó végül mégis az R használatára kényszerül. Végezetül a sok párhuzamos mérés miatt a multiple testing problémája kiemelten jelentkezik, amelyet korábbi összefoglaló referátumunkban mutattunk be (31, 52).

Utolsó, de az elterjedés gátjai közül az első hátránnyként kell megemlítenünk, hogy a microarray chipek költsége jóval meghaladja némely hagyományos módszerekét, mérésenként 3500 USD-t megközelítő átlagos árral.

## ÖSSZEFOGLALÁS

A génexpressziós microarray-eket eredetileg az egyes gének expressziómérésének a sokszorozásaként fogtuk fel, mintha több RT-PCR-t vagy Northern blot-ot futtatnánk le párhuzamosan. Mára azonban világossá vált, hogy ezen egydimenziós megközelítés helyett a teljes genomikus jel integrációjából létrehozott genomikus mintázat a kulcs, amelynek a felhasználásával (és részben redukálásával) diagnosztikus eszközöket lehet fejleszteni. A multigénes tesztek fejlesztése és klinikai tesztelése ma a kutatások forrópontját képezi, várható a gyors fejlődés a tesztek minden vonatkozásában, illetve a már meglévő tesztek tökéletesedése, a kereskedelmi forgalomba kerülő tesztek körének gyarapodása. A közeljövőben a pontos klinikai környezetbe ágyazott, prospektív vizsgálatokkal alátámasztott multigénes tesztek széleskörű elterjedése várható.

## IRODALOM

- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:3983–3988, 2003
- Andre F, Hatzis C, Anderson K, et al. Microtubule-associated protein-tau is a bifunctional predictor of endocrine sensitivity and chemotherapy resistance in estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 13:2061–2067, 2007
- 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* 22:2284–2293, 2004
- Bardou VJ, Arpino G, Elledge RM et al. Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *J Clin Oncol* 21:1973–1979, 2003
- Bast RC Jr, Hortobagyi GN. Individualized care for patients with cancer – a work in progress. *N Engl J Med* 351:2865–2867, 2004
- Berry DA, Cirincione C, Henderson IC, et al. Estrogen-receptor status and outcomes of modern chemotherapy for patients with node-positive breast cancer. *JAMA* 295:1658–1667, 2006
- Bhat KM, Setaluri V. Microtubule-associated proteins as targets in cancer chemotherapy. *Clin Cancer Res* 13:2849–2854, 2007
- Bieche I, Lidereau R. Genetic alterations in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 14:227–251, 1995
- Blumencranz P, Whitworth PW, Deck K, et al. Scientific Impact Recognition Award. Sentinel node staging for breast cancer: intraoperative molecular pathology overcomes conventional histologic sampling errors. *Am J Surg* 194:426–432, 2007
- Broyde A, Boycov O, Strenov Y et al. Role and prognostic significance of the Ki-67 index in non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Hematol* 84:338–343, 2009
- Bueno-de-Mesquita JM, Linn SC, Keijzer R, et al. Validation of 70-gene prognosis signature in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 117:483–495, 2009
- Carter P, Presta L, Gorman CM et al. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:4285–4289, 1992
- Chang HY, Nuyten DS, Sneddon JB, et al. Robustness, scalability, and integration of a wound-response gene expression signature in predicting breast cancer survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:3738–3743, 2005
- Chang HY, Sneddon JB, Alizadeh AA, et al. Gene expression signature of fibroblast serum response predicts human cancer progression: similarities between tumors and wounds. *PLoS Biol* 2:E7, 2004
- Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res* 14:1368–1376, 2008
- Davis LM, Harris C, Tang L, et al. Amplification patterns of three genomic regions predict distant recurrence in breast carcinoma. *J Mol Diagn* 9:327–336, 2007
- Debatin KM, Krammer PH. Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene* 23:2950–2966, 2004
- Drach J, Gattlinger C, Glassl H, et al. The biological and clinical significance of the Ki-67 growth fraction in multiple myeloma. *Hematol Oncol* 10:125–134, 1992
- Duffy MJ. Predictive markers in breast and other cancers: a review. *Clin Chem* 51:494–503, 2005
- Duffy MJ, McCarthy K. Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and targets for therapy (review). *Int J Oncol* 12:1343–1348, 1998
- Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 315:1650–1659, 1986
- Fan C, Oh DS, Wessels L, et al. Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *N Engl J Med* 355:560–569, 2006
- Fodor SP, Rava RP, Huang XC, et al. Multiplexed biochemical assays with biological chips. *Nature* 364:555–556, 1993
- Gennari A, Sormani MP, Pronzato P et al. HER2 status and efficacy of adjuvant anthracyclines in early breast cancer: a pooled analysis of randomized trials. *J Natl Cancer Inst* 100:14–20, 2008
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, et al. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 31:13–20, 1983
- Glas AM, Floore A, Delahaye LJ, et al. Converting a breast cancer microarray signature into a high-throughput diagnostic test. *BMC Genomics* 7:278, 2006
- Goetz MP, Suman VJ, Ingle JN, et al. A two-gene expression ratio of homeobox 13 and interleukin-17B receptor for prediction of recurrence and survival in women receiving adjuvant tamoxifen. *Clin Cancer Res* 12:2080–2087, 2006
- Goldhirsch A, Coates AS, Gelber RD, et al. First--select the target: better choice of adjuvant treatments for breast cancer patients. *Ann Oncol* 17:1772–1776, 2006
- Gong Y, Yan K, Lin F, et al. Determination of oestrogen-receptor status and ERBB2 status of breast carcinoma: a gene-expression profiling study. *Lancet Oncol* 8:203–211, 2007
- Gralow JR, Burstein HJ, Wood W, et al. Preoperative therapy in invasive breast cancer: pathologic assessment and systemic therapy issues in operable disease. *J Clin Oncol* 26:814–819, 2008
- Gyorffy B, Gyorffy A, Tulassay Z. A "multiple testing" problémája és a genomialis kísérletekre alkalmazott megoldások. *Orvosi Hetilap* 146:559–563, 2005
- Habel LA, Shak S, Jacobs MK, et al. A population-based study of tumor gene expression and risk of breast cancer death among lymph node-negative patients. *Breast Cancer Res* 8:R25, 2006

33. Harris L, Fritsche H, Mennel R, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol* 25:5287–5312, 2007
34. Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, et al. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 17:1474–1481, 1999
35. Hu Z, Fan C, Oh DS, et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics* 7:96, 2006
36. Iverson AA, Gillett C, Cane P, et al. A single-tube quantitative assay for mRNA levels of hormonal and growth factor receptors in breast cancer specimens. *J Mol Diagn* 11:117–130, 2009
37. Iyer VR, Eisen MB, Ross DT, et al. The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science* 283:83–87, 1999
38. Janicke F, Prechtel A, Thomssen C, et al. Randomized adjuvant chemotherapy trial in high-risk, lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1. *J Natl Cancer Inst* 93:913–920, 2001
39. Jansen MP, Sieuwerts AM, Look MP, et al. HOXB13-to-IL17BR expression ratio is related with tumor aggressiveness and response to tamoxifen of recurrent breast cancer: a retrospective study. *J Clin Oncol* 25:662–668, 2007
40. Jerevall PL, Brommesson S, Strand C, et al. Exploring the two-gene ratio in breast cancer--independent roles for HOXB13 and IL17BR in prediction of clinical outcome. *Breast Cancer Res Treat* 107:225–234, 2008
41. Kakarala M, Wicha MS. Implications of the cancer stem-cell hypothesis for breast cancer prevention and therapy. *J Clin Oncol* 26:2813–2820, 2008
42. Liu R, Wang X, Chen GY, et al. The prognostic role of a gene signature from tumorigenic breast-cancer cells. *N Engl J Med* 356:217–226, 2007
43. Loi S, Haibe-Kains B, Desmedt C, et al. Definition of clinically distinct molecular subtypes in estrogen receptor-positive breast carcinomas through genomic grade. *J Clin Oncol* 25:1239–1246, 2007
44. Look MP, van Putten WL, Duffy MJ, et al. Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 94:116–128, 2002
45. Ma XJ, Hilsenbeck SG, Wang W, et al. The HOXB13:IL17BR expression index is a prognostic factor in early-stage breast cancer. *J Clin Oncol* 24:4611–4619, 2006
46. Ma XJ, Salunga R, Dahiya S, et al. A five-gene molecular grade index and HOXB13:IL17BR are complementary prognostic factors in early stage breast cancer. *Clin Cancer Res* 14:2601–2608, 2008
47. Ma XJ, Wang Z, Ryan PD, et al. A two-gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Cancer Cell* 5:607–616, 2004
48. Mano MS, Rosa DD, De AE, et al. The 17q12-q21 amplicon: Her2 and topoisomerase-IIalpha and their importance to the biology of solid tumours. *Cancer Treat Rev* 33:64–77, 2007
49. Mansel RE, Goyal A, Douglas-Jones A, et al. Detection of breast cancer metastasis in sentinel lymph nodes using intra-operative real time GeneSearch BLN Assay in the operating room: results of the Cardiff study. *Breast Cancer Res Treat* 115:595–600, 2009
50. Miyabe S, Okabe M, Nagatsuka H, et al. Prognostic significance of p27Kip1, Ki-67, and CRTCl-MAML2 fusion transcript in mucocutaneous carcinoma: a molecular and clinicopathologic study of 101 cases. *J Oral Maxillofac Surg* 67:1432–1441, 2009
51. Molina R, Barak V, van Dalen A, et al. Tumor markers in breast cancer – European Group on Tumor Markers recommendations. *Tumour Biol* 26:281–293, 2005
52. Mook S, Bonnefoi H, Pruneri G, et al. Daily clinical practice of fresh tumour tissue freezing and gene expression profiling; logistics pilot study preceding the MINDACT trial. *Eur J Cancer* 45:1201–1208, 2009
53. Mook S, Schmidt MK, Viale G, et al. The 70-gene prognosis-signature predicts disease outcome in breast cancer patients with 1–3 positive lymph nodes in an independent validation study. *Breast Cancer Res Treat* 116:295–302, 2009
54. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 10:5367–5374, 2004
55. Onitilo AA, Engel JM, Greenlee RT, et al. Breast cancer subtypes based on ER/PR and Her2 expression: comparison of clinicopathologic features and survival. *Clin Med Res* 7:4–13, 2009
56. 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* 351:2817–2826, 2004
57. 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* 24:3726–3734, 2006
58. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol* 27:1160–1167, 2009
59. Peintinger F, Anderson K, Mazouni C, et al. Thirty-gene pharmacogenomic test correlates with residual cancer burden after preoperative chemotherapy for breast cancer. *Clin Cancer Res* 13:4078–4082, 2007
60. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406:747–752, 2000
61. Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, et al. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res* 65:5506–5511, 2005
62. Pritchard KI. Are HER2 and TOP2A useful as prognostic or predictive biomarkers for anthracycline-based adjuvant chemotherapy for breast cancer? *J Clin Oncol* 27:3875–3876, 2009
63. Rhodes A, Jasani B, Barnes DM, et al. Reliability of immunohistochemical demonstration of oestrogen receptors in routine practice: interlaboratory variance in the sensitivity of detection and evaluation of scoring systems. *J Clin Pathol* 53:125–130, 2000
64. Ring BZ, Seitz RS, Beck R, et al. Novel prognostic immunohistochemical biomarker panel for estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 24:3039–3047, 2006
65. Ross DT, Kim CY, Tang G, et al. Chemosensitivity and stratification by a five monoclonal antibody immunohistochemistry test in the NSABP B14 and B20 trials. *Clin Cancer Res* 14:6602–6609, 2008
66. Ross JS, Hatzis C, Symmans WF, et al. Commercialized multi-gene predictors of clinical outcome for breast cancer. *Oncologist* 13:477–493, 2008
67. Ross JS, Symmans WF, Pusztai L, et al. Standardizing slide-based assays in breast cancer: hormone receptors, HER2, and sentinel lymph nodes. *Clin Cancer Res* 13:2831–2835, 2007
68. Rouzier R, Rajan R, Wagner P, et al. Microtubule-associated protein tau: a marker of paclitaxel sensitivity in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:8315–8320, 2005
69. Shi L, Reid LH, Jones WD, et al. The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. *Nat Biotechnol* 24:1151–1161, 2006
70. Shipitsin M, Campbell LL, Argani P, et al. Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell* 11:259–273, 2007
71. Simon JA, Szankasi P, Nguyen DK, et al. Differential toxicities of anticancer agents among DNA repair and checkpoint mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cancer Res* 60:328–333, 2000
72. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10869–10874, 2001
73. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:10393–10398, 2003
74. Sotiriou C, Wirapati P, Loi S, et al. Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *J Natl Cancer Inst* 98:262–272, 2006
75. Steeg PS, Zhou Q. Cyclins and breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 52:17–28, 1998
76. Straver ME, Glas AM, Hannemann J, et al. The 70-gene signature as a response predictor for neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2009



77. Surowiak P, Matkowski R, Materna V, et al. Elevated methionine (MT) expression in invasive ductal breast cancers predicts tamoxifen resistance. *Histol Histopathol* 20:1037–1044, 2005
78. Symmans WF, Peintinger F, Hatzis C, et al. Measurement of residual breast cancer burden to predict survival after neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 25:4414–4422, 2007
79. Tanner M, Isola J, Wiklund T, et al. Topoisomerase II $\alpha$  gene amplification predicts favorable treatment response to tailored and dose-escalated anthracycline-based adjuvant chemotherapy in HER-2/neu-amplified breast cancer: Scandinavian Breast Group Trial 9401. *J Clin Oncol* 24:2428–2436, 2006
80. Tsai CM, Chang KT, Wu LH, et al. Correlations between intrinsic chemoresistance and HER-2/neu gene expression, p53 gene mutations, and cell proliferation characteristics in non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Res* 56:206–209, 1996
81. Tutt A, Ashworth A. Can genetic testing guide treatment in breast cancer? *Eur J Cancer* 44:2774–2780, 2008
82. Tutt A, Wang A, Rowland C, et al. Risk estimation of distant metastasis in node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer patients using an RT-PCR based prognostic expression signature. *BMC Cancer* 8:339, 2008
83. Ueda T, Aozasa K, Tsujimoto M, et al. Prognostic significance of Ki-67 reactivity in soft tissue sarcomas. *Cancer* 63:1607–1611, 1989
84. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Expression profiling predicts outcome in breast cancer. *Breast Cancer Res* 5:57–58, 2003
85. van de Vijver M, He YD, van 't Veer LJ, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 347:1999–2009, 2002
86. Weigelt B, Hu Z, He X, et al. Molecular portraits and 70-gene prognosis signature are preserved throughout the metastatic process of breast cancer. *Cancer Res* 65:9155–9158, 2005
87. Wiechmann L, Sampson M, Stempel M, et al. Presenting features of breast cancer differ by molecular subtype. *Ann Surg Oncol* 16:2705–2710, 2009
88. Wiesner FG, Magener A, Fasching PA, et al. Ki-67 as a prognostic molecular marker in routine clinical use in breast cancer patients. *Breast* 18:135–141, 2009