



Percentage of neoplastic cells in papillary thyroid carcinoma: implications for DNA microarray studies of gene expression profile

Ewa Chmielik¹, Michał Jarzab², Dariusz Lange¹

¹Department of Tumor Pathology, Maria Curie-Skłodowska Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, Gliwice Branch

²Department of Tumor Biology, Maria Curie-Skłodowska Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, Gliwice Branch

Abstract

Studies of gene expression profile using DNA microarray technology are usually performed using either tumor-derived sample material or isolated neoplastic cells obtained through microdissection. The scope of information about neoplastic transformation gained from studying profile of gene expression in microdissected samples would be much wider but collection of sufficient amounts of intact RNA is very difficult. A compromise could be reached by relating gene expression profile to percentage of neoplastic cells in the investigated tissue sample. The ratio of neoplastic cells in the investigated sample of papillary thyroid cancer was assessed through evaluation of approximated count of cell number in 10–18 examined image fields. This information was related to gene expression profiles obtained from DNA microarrays. The study involved 40 cases of papillary thyroid cancer; the percentage of PTC cells varied between 20 and 95% and only in half of the cases exceeded 75%. Correct differentiation of tumor and normal sample by means of gene expression profile was possible only when the percentage of tumor cells exceeded 25–30%. Seventeen genes showing the best correlation with the tumor cell numbers were selected and their classification potential was evaluated.

Strength of information derived from gene expression profile studies by DNA microarrays in papillary thyroid cancer cells is very reliable and permits distinguishing correctly between normal and neoplastic tissues even when the percentage of cancer cells does not exceed 25–50%. However, the differentiation potential of gene expression profile is not markedly improved by selection of genes showing best correlation with the number of tumor cells.

(*Pol J Endocrinol* 2006; 57 (supl. A): A32–A37)

Key words: DNA microarray, papillary thyroid carcinoma, percentage of neoplastic cells



Ewa Chmielik, M.D., Ph.D.
Department of Tumor Pathology
Maria Curie-Skłodowska Memorial Cancer Center and
Institute of Oncology
Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44–101 Gliwice
phone.: 032 278 94 20, fax: 032 278 94 15
e-mail: chmiel@mp.pl



Odsetek komórek nowotworowych w raku brodawkowatym tarczycy: implikacje dla badania profilu ekspresji genów metodą mikromacierzy DNA

Ewa Chmielik¹, Michał Jarzab², Dariusz Lange¹

¹Zakład Patologii Nowotworów, Centrum Onkologii — Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

²Zakład Biologii Molekularnej, Centrum Onkologii — Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

Streszczenie

Badanie profilu ekspresji genów techniką mikromacierzy DNA wykonywane jest albo w próbkach guza, albo w izolowanych komórkach nowotworowych uzyskanych techniką mikrodyssekcji. W tym przypadku uzyskuje się znacznie lepszą informację o ekspresji genów związanych z transformacją nowotworową, ale zebranie wystarczającej ilości nieuszkodzonego RNA jest bardzo trudne i w praktyce klinicznej niemożliwe. Wyjściem kompromisowym jest próba odniesienia profilu ekspresji genów do procentowego udziału komórek nowotworowych w utkaniu guza. Rak brodawkowaty tarczycy (PTC, *papillary thyroid carcinoma*) należy do tych guzów nowotworowych, które charakteryzują się dużym udziałem podścieliska. Udział komórek nowotworowych w utkaniu raka brodawkowego oceniano przez przybliżone badanie liczby komórek widocznych w 10–18 polach widzenia oraz badanie korelacji między tą informacją a profilem ekspresji genów, uzyskanych metodą mikromacierzy DNA. Badanie wykonano w 40 przypadkach raka brodawkowego tarczycy i stwierdzono, że odsetek komórek PTC waha się od 20–95% i tylko w około 1/4 przypadków przekracza 75%. Wykazano, że trafne rozróżnienie profilu ekspresji guza nowotworowego od prawidłowego utkania tarczycy jest możliwe, gdy odsetek komórek nowotworowych przekracza 25–30%.

Sygnal informacyjny wynikający z badania profilu ekspresji genów metodą mikromacierzy DNA jest w raku brodawkowatym tarczycy bardzo silny i pozwala na prawidłowe rozróżnienie utkania nowotworowego od utkania prawidłowego nawet w przypadkach, gdy odsetek komórek nowotworowych waha się w zakresie 25–50%. Wniosek ten zachęca do kontynuacji badań mikromacierzowych, gdyż silnie wskazuje na możliwość uzyskania sygnatury genowej przydatnej w rutynowej diagnostyce raka brodawkowego tarczycy w materiale uzyskanym z biopsji podejrzanego guza.

(*Endokrynol Pol* 2006; 57 (supl. A): A32–A37)

Słowa kluczowe: mikromacierze DNA, rak brodawkowaty tarczycy, odsetek komórek nowotworowych



Dr med. Ewa Chmielik
Zakład Patologii Nowotworów
Centrum Onkologii — Instytut, Oddział w Gliwicach
ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-101 Gliwice
tel.: 032 278 94 20, faks: 032 278 94 15
e-mail: chmiel@mp.pl

Wstęp

Zsekwencjonowanie genomu ludzkiego było punktem zwrotnym w medycynie [1]. Wiedza pozyskiwana dzięki molekularnym metodom badawczym prowadzi do bardzo szybkiego rozwoju wielu jej dziedzin, a przede wszystkim onkologii.

W odniesieniu do najczęstsze go raka tarczycy, jakim jest rak brodawkowaty (PTC, *papillary thyroid carcinoma*), badanie profilu ekspresji genów może umożliwić lepsze zrozumienie jego patogenezy i przebiegu klinicznego [2].

Rak brodawkowaty, jak większość nowotworów złośliwych, składa się z komórek nowotworowych i podścieliska. Podścielisko tworzą: tkanka łączna z reaktywnymi fibroblastami i komórkami dendrytycznymi,

naczynia krwionośne i chłonne oraz komórki nacieku zapalnego. Proporcja komórek raka do podścieliska może być różna zarówno u poszczególnych pacjentów, jak i w ramach poszczególnych guzów u tego samego pacjenta, czy też w obrębie tego samego guza [3]. Jest ona inna w każdym wariantcie PTC; najwięcej podścieliska, zgodnie z definicją, spotyka się w wariantcie stwardniającym PTC. W obrazie mikroskopowym tego wariantu raka dominuje szklawiejąca tkanka łączna z naciekiem limfocytarno-plazmatyczno-komórkowym i komórkami dendrytycznymi, a komórki raka występują w postaci małych wysp z ogniskami metaplastji płaskonabłonkowej [4, 5]. W wariantcie pęcherzykowym PTC stwierdza się zazwyczaj najmniejszy udział podścieliska w budowie guza nowotworowego [4].

Na podstawie profilu ekspresji genów badanego metodą mikromacierzy możliwe jest rozróżnienie PTC i prawidłowej tarczycy [3]. Opublikowany w tym doniesieniu klasyfikator 20-genowy, wykorzystujący technikę maszyn wektorów podpierających SVM, dobrze klasyfikował 16 PTC i 16 próbek prawidłowej tarczycy u tych samych chorych. Autorzy zastosowali wyżej wymieniony klasyfikator do analiz kolejnych próbek raka i łagodnych zmian tarczycy potwierdzonych histopatologicznie.

Celem niniejszej pracy była ocena zależności między zawartością komórek nowotworowych w pobranym fragmencie guza a uzyskanym profilem ekspresji genów.

Material i metody

Material stanowiło 49 próbek raków brodawkowatych tarczycy pobranych śródoperacyjnie od 40 kobiet (śr. wiek 38 lat; zakres wieku 6–71 lat) i 9 mężczyzn (śr. wiek 27 lat; zakres wieku 9–67 lat). Wariant klasyczny stwierdzono w 35 przypadkach, wariant pęcherzykowy — w 11, wariant stwardniający — w 2, wariant „*Warthin-like*” — w 1 przypadku.

Badaniu poddano wycinki pobrane z mrożonych próbek materialu operacyjnego guza. W celu oceny udziału komórek nowotworowych w utkaniu guza pobrane wycinki mrożono w kriostacie, krojono na skrawki o grubości 12 mikronów i barwiono hematoksyliną i eozyną. Oceny zawartości komórek nowotworowych dokonywano pod mikroskopem metodą półilościową, szacując odsetek powierzchni skrawka zajmowany przez komórki raka i przez podścielisko lub prawidłową tkankę tarczycy w małym polu widzenia (5 ×). Następnie wynik porównywano ze średnią oceny powierzchni komórek raka z 10–18 dużych pól widzenia (40 ×), w zależności od wielkości skrawka. Ze względu na małe rozmiary skrawka nie stosowano metod morfometrycznych. Uzyskane wyniki odniesiono do wyników badania profilu ekspresji genów metodą mikromacierzy DNA, przeprowadzonego na macierzach *GeneChip* HG-U 133 A. Wyniki badań opracowano metodą klasteryzacji K-średnich i rozkładu na wartości osobliwe (SVD, *singular value decomposition*).

Wyniki

Wyniki oceny mikroskopowej zestawiono w tabeli I. Jak wynika z tabeli, w 11 (23%) próbkach raka odsetek komórek nowotworowych był mniejszy niż 20%. Ponad połowa badanych próbek (26) wykazywała mniej niż 50% zawartości komórek nowotworowych w utkaniu raka, a tylko w 12 (25%) odsetek ten wynosił 80% lub więcej.

Tabela I

Odsetek komórek raka a liczba przypadków raka brodawkowatego tarczycy

Table I

Percentage of cancer cells vs. number of papillary thyroid carcinoma cases

Odsetek komórek raka	Liczba przypadków PTC
< 20%	11
20%	2
25%	2
30%	3
40%	4
50%	4
60%	5
70%	4
75%	2
80%	3
90%	3
95%	4
100%	2
Razem	49

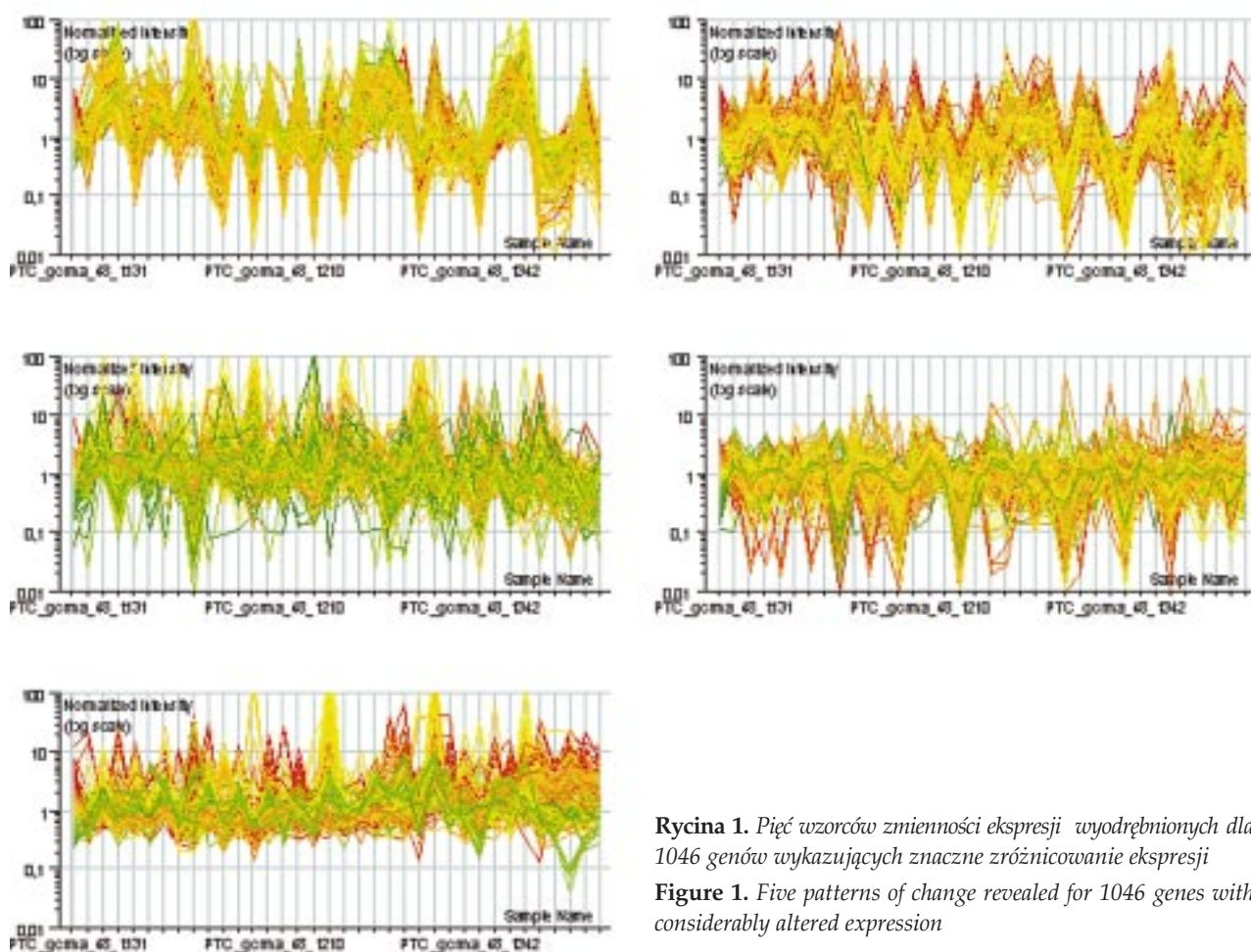
PTC (*papillary thyroid carcinoma*) — rak brodawkowaty tarczycy

Przeprowadzenie analizy profilu ekspresji genów w badanym materiale pozwoliło na wyodrębnienie 1046 genów wykazujących znaczne zróżnicowanie ekspresji.

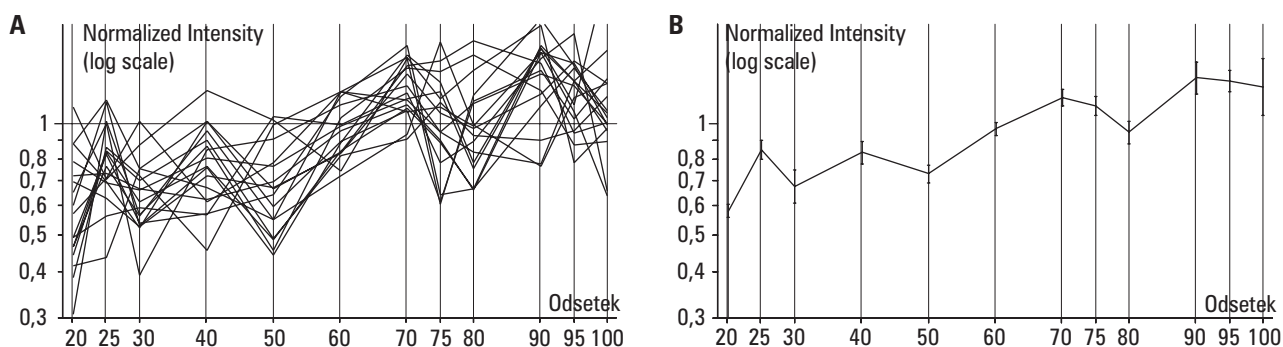
Rozkład ekspresji wyselekcjonowanych genów przyporządkowano pięciu różnym wzorcom zmienności, które przedstawiono na rycinie 1. Spośród tych genów 698 (66,7%) dobrze sprawdza się w różnicowaniu PTC od prawidłowej tarczycy. Rozkład ekspresji wyżej wymienionych genów nie jest jednakowy we wszystkich próbkach, a poziom ekspresji genów charakterystycznych dla PTC w niektórych próbkach jest bardziej zbliżony do poziomu ekspresji dla prawidłowej tarczycy niż dla raka.

Za pomocą metod statystycznych udało się wyodrębnić 17 genów, których ekspresja jest ściśle skorelowana ($r > 0,9$) z odsetkiem komórek nowotworowych w badanej próbce raka. Do genów tych należą: *TNIK*, *EPS 8* (*epidermal growth factor receptor kinase substrate*), *TGF A* (*transforming growth factor alpha*), *ETV 5*, *kładyna* (*CLDN1*), *DOCK 9*, *BID*, *TNFRSF 12A*, *GPRC 5B*, *ALS2CR3*, *NAV 2* (*neuron navigator 2*), *RHOBTB3*, *MYO6*, *PTPLA* (*protein tyrosine phosphatase-like, member a*), *S100 A14* (*S100 calcium binding protein A14*), *TPD52*, *CPD* (*carboxypeptidase D*). Rozkład ekspresji poszczególnych genów przedstawiono na rycinie 2, a rozkład uśrednionej ekspresji — na rycinie 3.

Zmienność ekspresji i współczynnika korelacji wybranych 17 genów w zależności od odsetka komórek



Rycina 1. Pięć wzorców zmienności ekspresji wyodrębnionych dla 1046 genów wykazujących znaczne zróżnicowanie ekspresji
Figure 1. Five patterns of change revealed for 1046 genes with considerably altered expression



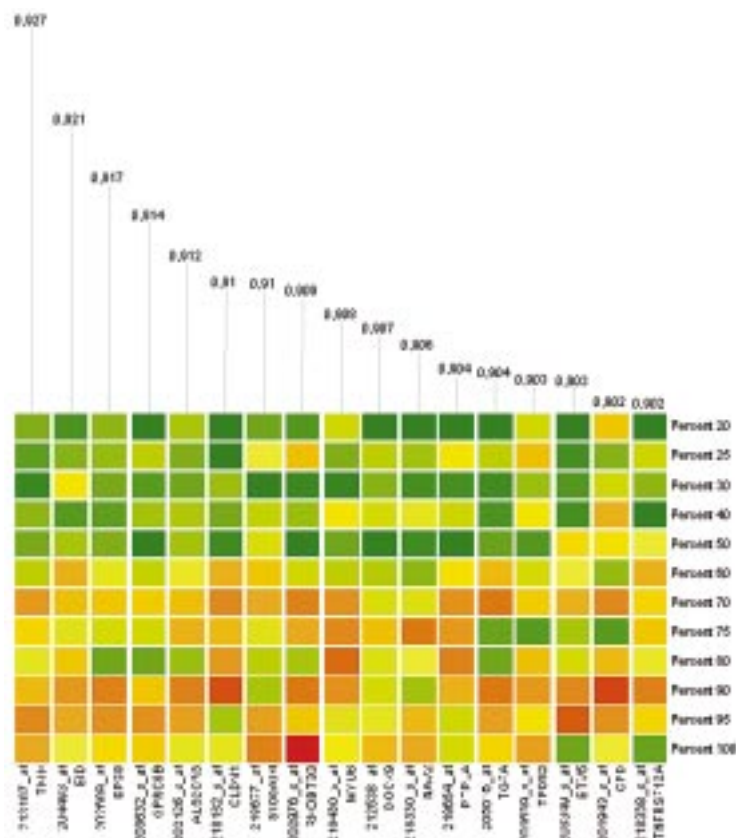
Rycina 2A. Rozkład ekspresji wybranych 17 genów, których ekspresja jest skorelowana z odsetkiem komórek nowotworowych ($r > 0,9$);
B. Rozkład uśrednionej ekspresji ($r > 0,9$) wszystkich 17 genów; normalized intensity (log scale) — wartość ekspresji genu po normalizacji, w skali logarytmicznej

Figure 2A. Expression distribution of 17 selected genes for which expression correlates with cancer cells' ratio ($r > 0.9$);
B. Distribution of averaged expression ($r > 0.9$) for 17 selected genes

nowotworowych w próbce przedstawiono na rycinie 4. Wartość ekspresji genu *TNIK* wykazuje silny związek ($r = 0,927$) z odsetkiem komórek nowotworowych w próbce. Próbkę o zawartości komórek nowotworowych wynoszącej 70% i więcej charakteryzowały się znacząco wyższą ekspresją tego genu w porównaniu z prób-

kami o zawartości 20–60%. Geny *CPD* i *TNFRSF 12A*, które wykazywały najbardziej zróżnicowaną ekspresję przy poszczególnych zawartościach procentowych komórek raka, osiągnęły współczynniki korelacji 0,902.

Gdyby przewidywanie obecności PTC w badanej próbce opierało się na 17 genach wykazujących najsil-



Rycina 3. Zmienność ekspresji i współczynnik korelacji poszczególnych 17 genów w zależności od odsetka komórek nowotworowych w próbce
Figure 3. Individual expression changes and correlation coefficients for 17 selected genes vs. proportion of cancer cells in sample

niejszy związek ekspresji z odsetkiem komórek nowotworowych, to 15 ze 135 próbek pobranych śródoperacyjnie byłoby nieprawidłowo sklasyfikowanych (11,11%).

Dyskusja

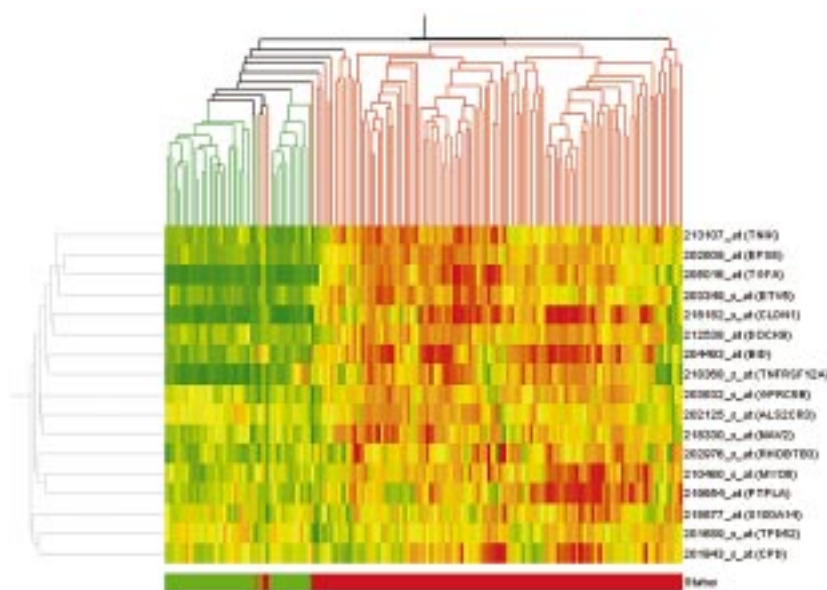
Autorzy pracy analizowali, czy budowa klasyfikatora molekularnego, opierającego się wyłącznie na genach wykazujących silną korelację z szacowanym odsetkiem komórek nowotworowych w guzie, jest lepszym rozwiązaniem niż budowa klasyfikatora opartego na bardziej skomplikowanych metodach analizy.

W rutynowo pobranych fragmentach raka tarczycy odsetek komórek nowotworowych może się wahać w przedziale 2–100%. Z kolei profil ekspresji genów wykazuje charakterystyczny wzorec, jeżeli odsetek komórek nowotworowych w badanym fragmencie przekracza 20–25% [3].

Huang i wsp. [7] w pierwszej pracy poświęconej genomowej analizie ekspresji PTC opisali bardzo wyraźną różnicę w profilu ekspresji genów pomiędzy PTC a prawidłową tarczycą. Autorzy zastosowali w swojej pracy ostre kryterium, włączając do badania tylko te guzy, w których odsetek komórek nowotworowych przekraczał 90%. Te geny, które zdaniem autorów wy-

kazywały najwyraźniejszą ekspresję w raku tarczycy, nie znalazły się w grupie 17 genów związanych z odsetkiem komórek raka. Autorzy wytypowali natomiast inne geny związane z cytoszkieletem komórki, adhezją komórek, macierzą zewnątrzkomórkową i regulatory wzrostu komórek.

Opisywane w naszej pracy geny pełnią najróżniejsze funkcje. Gen *TNFK* pełni funkcję w regulacji cytoszkieletu, *EPS 8* implikuje regulację remodelingu cytoszkieletu podczas migracji komórki, produkt genu *TGF A* uczestniczy w transdukcji sygnału, wywołując odpowiedź mitogenną, *ETV 5* reguluje transkrypcję, *CLDN 1* bierze udział w adhezji komórkowej, *DOCK 9* indukuje tworzenie filopodiów, a *BID* indukuje apoptozę. Gen *TNFRSF 12A* odgrywa rolę w interakcjach między komórką a macierzą zewnątrzkomórkową. Specyficzna funkcja białka *GPRC5B* jest nieznana, ale uważa się, że może pośredniczyć w komórkowych efektach kwasu retinowego. Inny gen, który ma związek z retinoidami, to *NAV 2* — gen ulegający ekspresji w nerwiakach zarodkowych, wzbudzany kwasem retinowym. Gen *MYO 6* uczestniczy w transporcie wewnątrzkomórkowym, *PTAPLA* reguluje różne procesy komórkowe (jego produkt jest znajdowany głównie w mięśniu sercowym, a jego niższa ekspresja jest opisywana w mięśniach



Rycina 4. Klasteryzacja hierarchiczna. Do analizy włączono 80 przypadków własnych próbek tarczycy na podstawie klasyfikatora zbudowanego z 17 genów wykazujących największy związek z liczbą komórek nowotworowych i 55 przypadków opublikowanych przez Giordano T.J. i wsp. [6]; kolorem zielonym oznaczono próbki pobrane z tarczycy niezmienionej nowotworowo, a kolorem czerwonym próbki PTC

Figure 4. Hierarchical clustering. 80 samples were selected from own database of thyroid cases using a 17-gene classifier built from genes having strongest relationship with number of cancer cells; data from these samples were analyzed along with those of 55 cases published by Giordano et al. [6]; samples from normal thyroid are denoted green, samples of PTC marked red

szkieletowych i gładkich), *S100 A14* pełni potencjalnie ważne funkcje w transformacji nowotworowej.

Gen *TPD52* (*tumor protein D52*) odgrywa rolę w procesie proliferacji komórki, zaś *CPD* jest jednym z genów proteolitycznych.

Można podsumować, że podjęta w pracy próba poszukiwania nowych markerów PTC związanych z powiązaniem ekspresji genów z oszacowaniem liczby komórek nowotworowych w guzie nie przyniosła wyraźnej poprawy dokładności zbudowanego w ten sposób klasyfikatora. Na podstawie przeprowadzonej analizy autorzy uważają, że szukanie wielogenowych klasyfikatorów molekularnych należy oprzeć na szerszych kryteriach, nie ograniczając się do badania zależności z odsetkiem komórek nowotworowych. Autorzy pracy nie sądzą też, żeby użycie dokładniejszej metody obliczania liczby komórek guza było uzasadnione. W pracy przyjęto szacowanie półilościowe, nie stosując dokładniejszych metod morfometrycznych, gdyż autorzy uważali, że istniejącą tendencję uda się wykryć już na tym poziomie dokładności.

Geny podścieliska mogą również stanowić przydatne markery złośliwości badanego guza.

Piśmiennictwo

1. Giordano TJ, Molecular profiling and personalized predictive pathology: challenge to the academic surgical pathology community. *Am J Surg Pathol* 2006; 30: 402–404.
2. Hundahl SA, Fleming ID, Fremgen AM i wsp. A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985–1995. *Cancer* 1998; 83 (12): 2638–2648.
3. Jarzab B, Wiench M, Fijarewicz K i wsp. Gene expression profile of papillary thyroid cancer: sources of variability and diagnostic implications. *Cancer Res* 2005; 65 (4): 1587–1597.
4. Chan JK. Tumors of the thyroid and parathyroid glands. W: Fletcher CDM. *Diagnostic histopathology of the tumors*. Churchill Livingstone, London 2000.
5. Chan JK, Tsui MS, Tse CH. Diffuse sclerosing variant of papillary carcinoma of the thyroid: a histological and immunohistochemical study of three cases. *Histopathology* 1987; 11 (2): 191–201.
6. Giordano TJ, Kuick R, Thomas DG i wsp. Molecular classification of papillary thyroid carcinoma: distinct BRAF, RAS, and RET/PTC mutation-specific gene expression profiles discovered by DNA microarray analysis. *Oncogene* 2005; 24 (44): 6646–6656.
7. Huang Y, Prasad M, Lemon WJ i wsp. Gene expression in papillary thyroid carcinoma reveals highly consistent profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98 (26): 15044–15049.