

Radziław Kordek¹, Andrzej K. Bednarek²

¹Zakład Patologii Katedry Onkologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

²Zakład Biochemii Lekarskiej Instytutu Fizjologii i Biochemii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Mikromacierze DNA w badaniach raka piersi

DNA microarray studies on breast cancer

Adres do korespondencji:

prof. dr hab. med. Radziław Kordek
Zakład Patologii Katedry Onkologii
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
ul. Paderewskiego 4, 93-509 Łódź
e-mail: rkordek@csk.am.lodz.pl
tel.: (042) 689 57 81, faks: (042) 689 54 22

STRESZCZENIE

Badania molekularne nowotworów zazwyczaj opierały się na poszukiwaniu zmian w pojedynczych genach lub ich niewielkich grupach i pozwoliły na znaczny postęp wiedzy dotyczącej biologii nowotworów. Jednak — poza nielicznymi wyjątkami — nie przyniosły przełomowych wyników, mogących stanowić istotne zastosowania rokownicze lub predykcyjne. Wynika to z faktu, że nowotwór zazwyczaj nie jest następstwem uszkodzenia funkcji pojedynczego genu, lecz ich całych zespołów, kontrolujących liczne szlaki metaboliczne i regulacyjne w komórce. Obecnie dzięki technologii mikromacierzy cDNA jest możliwe jednoczesne badanie funkcji dużej liczby genów w pojedynczych próbkach tkankowych.

Raki piersi, nawet jeśli są w tym samym stanie zaawansowania klinicznego i mają podobne utkanie histologiczne — mogą znacznie różnić się przebiegiem klinicznym. Z kolei wiadomo, że chemioterapia stosowana na podstawie klasycznych czynników rokowniczych, nie wpływa na przeżycie tylko 70–80% chorych, które ją otrzymały. Kwalifikacja jest zatem mało precyzyjna, a leczenie zbyt słabo zróżnicowane. Ostatnio wprowadzona technologia mikromacierzy cDNA pozwoliła na stworzenie molekularnych profili raka piersi, różniących się również biologicznie. Należy oczekiwać, że badania te dostarczą istotnych narzędzi przydatnych w codziennej praktyce klinicznej.

Słowa kluczowe: mikromacierze, rak piersi, rokowanie, profile molekularne

ABSTRACT

Molecular studies based on the analysis of alterations in single or in a few genes did not produce results, which may be used as an important individual prognostic factor. It shows, that as cancer is not a result of a single gene alteration, we need to study a multiple gene alterations, and not only on the structural level but also analyzing its expression. As so many genes are involved in different cellular controlling mechanisms, the only way to make tumor profiling and looking for its biological significance is concerted analysis of thousands genes simultaneously. Such a gene expression profiling on a big scale is now possible with cDNA microarray technology.

Patients with breast cancer with the same histology and the same clinical stage often present different clinical outcome. Adjuvant therapy is ordered mostly on the basis of these standard prognostic factors, but 70–80% of patient receiving this therapy, would have survived without it. The recent development of gene expression microarray provides an opportunity to prepare more detailed profiling of tumors, allowing to treat only those patients who are most likely to have a benefit from this.

Key words: microarrays, breast cancer, prognosis, molecular profiles

Wstęp

Badania molekularne nowotworów opierały się zazwyczaj na poszukiwaniu zmian w pojedynczych genach lub ich niewielkich grupach i pozwoliły na znaczny postęp w biologii nowotworów. Jednak — poza nielicznymi wyjątkami — nie przyniosły przełomowych wyników, mogących stanowić istotne zastosowania rokownicze lub predykcyjne. Wynika to z obserwacji, że nowotwór zazwyczaj nie jest następstwem uszkodzenia funkcji pojedynczego genu, lecz ich całych zespołów, kontrolujących liczne szlaki metaboliczne i regulacyjne w komórce. Jednoczesne badanie funkcji dużej liczby genów jest obecnie możliwe dzięki technologii mikromacierzy cDNA.

Technika mikromacierzy cDNA

Technika mikromacierzy cDNA (mikroprocesorów lub mikrosiatek; DNA *chips microarrays*) pozwala na jednoczesne porównanie ekspresji dziesiątków tysięcy genów w jednym nowotworze. Opiera się ona na metodzie hybrydyzacji, czyli łączenia się komplementarnych nici DNA. Na niewielkiej płytce, w specjalnym urządzeniu (*arrayer*) przytwierdza się w bardzo gęstych szeregach (*array*) znane sekwencje cDNA badanych genów — sondy. Zazwyczaj stosuje się końcowe 3' fragmenty cDNA (*complementary DNA*, komplementarny DNA) o długości 200–600 par zasad. Po tym etapie, płytka zawiera w określonych punktach sondy dla poszczególnych badanych genów. Na następnym etapie wykonuje się hybrydyzację z mieszaniną znakowanych fluorescencyjnie cDNA, zawierającą cDNA otrzymane z normalnych komórek odnośnikowych i cDNA uzyskane z puli mRNA wyizolowanych z badanego nowotworu. Do znakowania tych dwu próbek używa się odmiennych barwników, odnośnikowe cDNA jest znakowane na przykład zielonym barwnikiem fluorescencyjnym, a badane cDNA — innym, na przykład pomarańczowym. Tam gdzie podczas hybrydyzacji obydwie próbki znakowanych cDNA zwiążą się w jednakowych ilościach z sondą na mikromacierzy — punkt da żółty sygnał (będący złożeniem jednakowych ilościowo fluorescencji barwnika zielonego i pomarańczowego). Jeżeli wystąpi hybrydyzacja tylko z cDNA komórek zdrowych (znakowanych na zielono) — sygnał będzie zielony. Czyli każde przesunięcie koloru sygnału z żółtego w kierunku zielonego lub pomarańczowego oznacza inną zawartość transkryptów określonego genu w próbce badanej i referencyjnej. Zatem sygnał zielony będzie oznaczał niskie stężenie RNA dla danego genu w tkance nowotworowej (niska ekspresja), a sygnał pomarańczowy — stężenie wysokie w stosunku do próbki referencyjnej (wysoka ekspresja). Punkty na mikromacierzy DNA są mikrosko-

pijne, dlatego jest ona odczytywana przez specjalny, skomputeryzowany automat (czytnik) z potrójnym systemem światła laserowego. Uzyskane wyniki również wymagają analizy komputerowej: badanie kilkudziesięciu przypadków raka na płytkach zawierających od kilku do kilkudziesięciu tysięcy genów daje w sumie setki tysięcy poszczególnych odczytów. Profilowanie molekularne polega właśnie na tworzeniu klastrów („drzew”) wykazujących podobne zmiany ekspresji zespołów genów.

Technologie mikromacierzy zastosowano w celu poszukiwania profili molekularnych w niemal wszystkich grupach nowotworów, między innymi w rakach piersi, płuca, jelita grubego, wątroby, guzów mózgu, mięsaków i chłoniaków [1–9]. We wszystkich tych przypadkach udało się uzyskać molekularne profile, posiadające odmienne właściwości biologiczne, z wyraźnymi różnicami w przeżyciach chorych.

Dla przykładu, badania z zastosowaniem techniki mikromacierzy cDNA wykazały odmienne profile różnych typów histologicznych raka płuca: raka płaskonabłonkowego, gruczolakoraka i raka wielkokomórkowego [4]. Ponadto, w obrębie gruczolakoraka, wykazano odmienne profile dla guzów o różnym stopniu złośliwości histologicznej, co poza tym korelowało z przeżyciami chorych.

Interesujące wyniki przyniosły badania chłoniaków. W grupie chłoniaków wielkokomórkowych linii B (DLBCL, *diffuse large B-cell lymphoma*), Alizadeh i wsp. wyróżnili dwie odmienne molekularnie grupy: jeden typ z ekspresją genów typowych dla komórek grudek chłonnych, i drugi typ — z ekspresją genów, które ulegają ekspresji po aktywacji obwodowych limfocytów B [1]. Ważne jest, że typ pierwszy charakteryzował się znacznie lepszymi przeżyciami. Badania te ostatnio rozwinęli Lossos i wsp., którzy stworzyli model oparty jedynie na ekspresji sześciu genów (LMO2, BCL6, FN1, CCND2, SCYA3, BCL2), którego znaczna wartość rokownicza okazała się niezależna od Międzynarodowego Indeksu Rokowniczego (IPI, *International Prognostic Index*) [10]. Co więcej, badanie to wykonano z zastosowaniem ilościowego RT-PCR (*quantitative real-time polymerase chain reaction*), czyli bez stosowania techniki mikromacierzowej. Stanowi jednak ich owocną kontynuację, która może znaleźć zastosowanie w klinice.

Z kolei Thieblemont i wsp., badając chłoniaki o niskiej złośliwości, wydzielili zespół 44 genów, których ekspresja z 96-procentową czułością pozwala na rozróżnienie między chłoniakiem limfocytarnym, chłoniakiem z komórek płaszczka i chłoniakiem strefy brzeżnej [11]. Niedawno opublikowane wyniki badań, dokumentują istnienie zespołu genów, których ekspresja w rakach jelita grubego pozwala na wyróżnienie dwóch grup u chorych o odmiennych przeżyciach 5-letnich (100% vs. 40%) [2]. W przypadkach raka płaskonabłonkowego

głowy i szyi, przy użyciu techniki mikromacierzy wykazano odmienne profile dla czterech grup, które z kolei charakteryzowały istotne różnice w przeżyciach [12]. Poza tym, system ten wykazał 80-procentową czułość dla prognozowania obecności przerzutów w węzłach chłonnych.

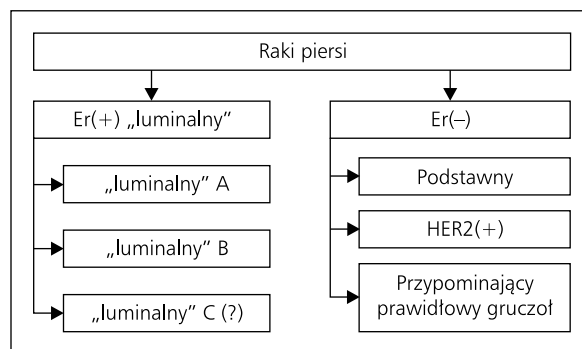
Ostatecznie, badania ekspresji genów w glejakiach astrocytarnych pozwoliły na identyfikację nowych genów uczestniczących w mechanizmie progresji glejaków o niższym stopniu złośliwości w stosunku do glejaka wielopostaciowego [7–9], a także różnice w ekspresji genów pierwotnych i wtórnych glejaków wielopostaciowych [13]. Wykazano przy tym, że dla guzów o nieklasycznym obrazie histologicznym, ocena rokowania na podstawie profilu ekspresji genów była bardziej wiarygodna od oceny opartej na samej morfologii [14].

Amatschek i wsp. badali profile ekspresji genów w rakach piersi, rakach płaskonabłonkowych i gruczolowych płuc oraz w rakach nerki [15]. W założeniach tego eksperymentu przyjęto poszukiwanie genów, które nie tylko wykazują bardzo wysoką ekspresję w komórkach nowotworowych, ale również nie ulegają ekspresji w tkankach prawidłowych lub jest ona minimalna. Stosując połączenie metody różnicującej hybrydyzacji i mikromacierzy cDNA wyeliminowali z analizy geny, których ekspresja w tkankach prawidłowych też jest wysoka oraz transkrypty pochodzące z komórek odpornościowych naciekających tkankę nowotworową. Analiza ekspresji genów wykazała odmienne profile dla wszystkich badanych rodzajów nowotworów, ale też wyodrębniła grupy genów o profilu ekspresji charakterystycznym dla komórek nowotworowych. Wśród genów o podwyższonej ekspresji w tkankach nowotworowych, a znikomej w prawidłowych znalazły się geny odpowiedzialne za procesy mineralizacji kości (OSN, OPN i OSF2) i biorące udział w kontroli homeostazy Ca^{2+} (RCN1, CALCA i S100) [15].

To tylko część z licznych publikacji, które przygotowano z zastosowaniem techniki mikromacierzy cDNA, przy czym w ostatnich miesiącach liczba takich prac istotnie wzrosła. Najwięcej z nich dotyczy raka piersi.

Profile molekularne raka piersi

Badania raków piersi z zastosowaniem techniki mikromacierzy cDNA pozwoliły na znaczny postęp w naszej wiedzy o tym nowotworze. Jedne z pierwszych prac, oparte na badaniu ekspresji 8102 genów w tkankach raka piersi pobranych od 42 kobiet, wykazały, że każdy przypadek charakteryzował się unikalnym profilem ekspresji. Porównywanie profili tych samych guzów — przed chemioterapią i po niej — jak i porównywanie guza pierwotnego z przerzutem ujawniło, że profile guzów od jednej osoby zawsze były do siebie bardziej



Rycina 1. Schemat klasyfikacji profili molekularnych raka piersi [17]

Figure 1. Classification of breast tumor gene expression profiles [17]

podobne niż do któregośkolwiek innego przypadku [6]. Spośród ponad 8000 badanych genów, istotne różnice w ekspresji stwierdzono w przypadku 1753 genów. Największy zespół tych „istotnych” genów obejmował te, które biorą udział w proliferacji, między innymi Ki67 i PCNA. Dalsze badania tej samej grupy pozwoliły na rozszerzenie tej klasyfikacji i przyporządkowanie jej cech biologicznych [16, 17]. Ogólnie, raki piersi można podzielić pod względem ekspresji genów na dwie główne grupy: z ekspresji receptora estrogenowego (ER) i bez niej (ryc. 1). Z kolei guzy bez ekspresji ER można podzielić na trzy podgrupy: typu „podstawnego” (*basal-like subtype*), guzy z ekspresją HER2+/ERBB2+ i guzy z profilem przypominającym prawidłowy gruczoł (*normal-breast like group*). Podtyp „podstawny” charakteryzuje ekspresja cytokeratyn 5 i 17, lamininy i białka wiążącego kwasy tłuszczowe typu 7. Podtyp HER2+, charakteryzowała wysoka ekspresja amplikonu 17q22.24, zawierającego *ERBB2* i *GRB7*. Guzy z profilem przypominającym prawidłowy gruczoł wykazywały wysoką ekspresję genów, które prawidłowo są aktywne w tkance tłuszczowej i innych komórkach nienabłonkowych, z towarzyszącą wysoką ekspresją genów typu podstawnego” i z niską ekspresją genów typu „luminalnego”.

Raki piersi wykazujące ekspresję ER (typ „luminalny”) również podzielono na podtypy. Guzy z wysoką ekspresją ER α i inne (m.in. *GATA binding protein 3*, *X-box binding protein 1*) nazwano podtypem „luminalnym” A. Z kolei guzy z niższą ekspresją ER α podzielono na podtypy B i C (ryc. 1). Podtyp „luminalny” C wykazywał ekspresję zespołu genów o nieznanym funkcji; ten sam zespół występował także w podtypie „podstawnym” i HER2+. Podgrupa C nie jest jednak jednorodna i w późniejszych publikacjach Sorlie i wsp. [17] nie wymienia się jej. W reanalizie wykonanej przez tych autorów, gdzie badano także przypadki z innych publikowanych wcześniej

badania profili raka piersi (tj. [18], [19] i innych nie cytowanych w pracy), zwrócono uwagę, że mikromacierze cDNA pozwalają na podzielenie wszystkich tych guzów na poszczególne podtypy z wysoką czułością, jednak nie w pełni zadowalającą [17]. Wyraźnie odmienny profil podtypu „podstawnego” jest łatwo identyfikowalny i bez wątplenia powinien on być już dzisiaj wyróżniany jako oddzielna jednostka fenotypowa i kliniczna. Dość wyraźny, choć nie w pełni powtarzalny w tych badaniach jest podział na raki „luminalne A” i „luminalne B”. Mimo niezwykle zachęcających wyników, na jednoznaczne klasyfikacje należy zatem jeszcze poczekać.

Technika mikromacierzy pozwoliła również na wykazanie odmiennych profili dla raków zrazikowych piersi i raków przewodowych [20]. Swoistość takiego profilowania oceniono aż na 93,7%. Istotne różnice w ekspresji genów stwierdzono także porównując raki wewnątrzprzewodowe z rakami naciekającymi [21], a także badając podtypy raków wewnątrzprzewodowych, gdzie najważniejszy podział rozdzielał raki z martwicą (typu *comedo*) od pozostałych [22]. Z kolei Miller i wsp. stwierdzili, że raki wewnątrzprzewodowe piersi w poszczególnych stopniach według Wskaźnika Progностycznego Nottingham (*Nottingham Prognostic Index*) również różnią się profilami ekspresji, co dowodzi ich rzeczywistej różnicy biologicznej [23].

Odmienny profil raków ER+, niespotykany u ludzi rasy białej, stwierdzono u Amerykanek pochodzenia afrykańskiego [24].

Sotiriou i wsp. przeprowadzili analizę ekspresji 7650 genów, spośród których statystycznie istotną zmianę ekspresji związaną ze statusem ER(+) vs. ER(-) wykazało 606 różnych genów. Znaczące różnice w ekspresji 137 genów zauważono, porównując nowotwory o stopniu zróżnicowania morfologicznego (*grading*) 1/2 z 3, a przy porównaniu obecności przerzutów do węzłów chłonnych wydzielono 11 genów wykazujących zróżnicowanie poziomu transkrypcji. Stwierdzono także odmienną ekspresję 3 genów w nowotworach mniejszych niż 2 cm w porównaniu z większymi oraz 13 genów, porównując nowotwory u kobiet przed menopauzą i po niej [25].

Profile molekularne, odmienne na poziomie ekspresji zespołów genów, wykazują także odmienności w strukturze genów. I tak, utrata heterozygotyczności (LOH) w rejonach 5q i 4p charakteryzowała raki typu „podstawnego”, podczas gdy LOH rejonu 1 p i 16q często obserwowano w rakach typu „luminalnego” [26].

Hefler i wsp. badali 10 SNP (*single-nucleotide polymorphism*, jednonukleotydowych polimorfizmów) w obrębie 5 różnych enzymów szlaku metabolizmu estrogenu za pomocą technologii zwanej sekwencjonowaniem na chipie i opartej na macierzach oligonukleotydowych. Łącznie przebadali ponad 2000 kobiet w tym z rakiem piersi, *fibroadenoma*, porównując z dużą grupą kontrolną. Okazało się, że polimorfizm w obrębie rodziny

genów cytochromu P-450 wiąże się ze zwiększonym lub zmniejszonym ryzykiem zachorowania. Obecność cytozyny zamiast tyminy w pozycji CYP1A1-1, mimo że nie powodowała zmiany sekwencji aminokwasów jest związana z mniejszym ryzykiem raka piersi, natomiast guanina zamiast adeniny w miejscu CYP1A1-2 powoduje polimorfizm aminokwasów (Ile462Val) i zwiększone ryzyko zachorowania. Podobnie polimorfizm CYP1A1-1 wiązał się z mniejszym ryzykiem, a CYP17 (T → C bez zmiany aminokwasu) ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia *fibroadenoma* [27].

Profile molekularne a rokowanie

Molekularna klasyfikacja raków piersi, stworzona na podstawie odmiennych ekspresji zespołów genów przyniosła istotne informacje kliniczne. W jednej z pierwszych prac na ten temat Bertucci i wsp. uzyskali interesujące wyniki po analizie ekspresji 176 genów w 34 przypadkach raka piersi [28]. Dwa główne profile molekularne, które otrzymali, cechowały przypadki o odmiennym rokowaniu. Te różnice rokownicze nie miały związku ze stopniem złośliwości histologicznej i wielkością guza, korelowały jednak z obecnością przerzutów w węzłach chłonnych i obecnością ER (z którymi z kolei korelowała ekspresja *HER2* i *GATA3*).

W kolejnej pracy ci sami autorzy analizowali profile ekspresji w guzach od 55 chorych leczonych adiuwantowo antracyklinami i badając ekspresję około 1000 genów, znaleźli zespół 23 genów, dzielący tę źle rokującą grupę nowotworów na trzy podgrupy o odmiennych przeżyciach [29]. Także w grupie nowotworów z ekspresją ER, badacze ci stwierdzili obecność dwóch odmiennych molekularnie i rokowniczo grup.

Ten sam zespół zbadał następnie 592 guzy pochodzące od 55 kobiet leczonych adiuwantowo antracyklinami, używając podobnego panelu 1045 genów [30]. Różnice w ekspresji pozwoliły na wydzielenie trzech grup prognostycznych — co dowodzi, że istnieje profil molekularny, gdzie chemioterapia okazała się nieskuteczna. Ponadto, wśród ER-pozytywnych nowotworów wydzieleno dwie grupy o całkowicie odmiennym rokowaniu.

W tej samej pracy porównywano znaczenie rokownicze ekspresji na poziomie białka z ekspresją na poziomie RNA, stwierdzając istotne różnice. Ogólnie, tylko w około 1/3 przypadków stwierdzano taką korelację. I tak na przykład niski poziom białka MUC1 wiązał się z lepszym rokowaniem, natomiast zależność nie dotyczyła mRNA dla MUC1 [30]. Co więcej, dla MUC1 ważna klinicznie jest informacja o lokalizacji odczynu w barwieniu immunohistochemicznym: apikalna lokalizacja — podobnie jak brak MUC1 — rokuje lepiej, natomiast lokalizacja cytoplazmatyczna lub błonowa — gorzej. Jednak najbardziej interesujące wyniki przyniosła ana-

Tabela 1. Analiza porównawcza określania rokowania tej samej grupy chorych przez dwa standardy kliniczne i profilowanie molekularne [18]**Table 1. Comparison analysis of prognosis in the same group of patients by using two clinical standards and gene expression profiling [18]**

| | Odsetek chorych o złym rokowaniu określonych jako źle rokujący (%) | Odsetek „złego rokowania” u chorych z rozsiewem (%) | Odsetek chorych (kwalifikacja do chemioterapii) w grupie żyjących po 5 latach (%) |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Konsensus z St. Galen | 82 | 97 | 70 |
| Konsensus WHO | 92 | 94 | 91 |
| Mikromacierze | 55 | 91 | 27 |

WHO (World Health Organization) — Światowa Organizacja Zdrowia

liza przeżyć w opisanych wcześniej typach i podtypach molekularnych [6, 16, 17]. I tak, chorzy z podtypem „podstawnym” lub podtypem HER2+ żyli krócej i mieli krótsze przeżycia bez objawów choroby [16]. Co ciekawe, podtyp „podstawnym” częściej wykazuje obecność mutacji *TP53*. Różnice w przeżyciach zaobserwowano także w obrębie podtypów typu „luminalnego”: najlepsze rokowanie towarzyszyło typowi „luminalnemu” A, natomiast podtyp B/C rokował gorzej.

W reanalizie, obejmującej także inne publikowane serie guzów uzyskano podobne wyniki: podtyp „podstawnym” i HER2+ rokowały najgorzej, „luminalny” A — najlepiej, a „luminalny” B — pośrednio [17]. Jest to tym bardziej istotna informacja, że przypadki z badań Geislera i wsp. obejmowały chorych leczonych adiuwantowo, i to zarówno chemicznie jak i hormonalnie, więc były to nowotwory bardziej zaawansowane, natomiast chore objęte badaniami van't Veer i wsp. generalnie nie miały żadnej terapii uzupełniającej.

W kilku publikacjach przypadki z mutacją *BRCA1* należały do grupy podtypu „podstawnego” i miały niekorzystny przebieg kliniczny [17]. Co ciekawe, raki z mutacjami *BRCA1* często — jak w typie „podstawnym” — wykazywały również obecność mutacji *TP53* i charakteryzowały się wysokim indeksem proliferacyjnym.

W 2001 roku West i wsp. opublikowali wyniki szerszych badań poświęconych prognostycznemu znaczeniu profilowania z zastosowaniem mikromacierzy [19]. Analizie ponad 7 tysięcy genów poddano grupy liczące po kilkanaście przypadków różniące się obecnością receptora estrogenowego i/lub obecnością przerzutów w węzłach chłonnych pachowych. Autorzy wyselekcjonowali grupę 100 genów, których ekspresja bardzo silnie korelowała z obecnością receptorów estrogenowych, stanem węzłów chłonnych pachowych oraz przeżyciami. Ubocznym, lecz istotnym wynikiem tych badań było także stwierdzenie, że wyniki immunohistochemicznego oznaczania obecności receptorów estrogenowych różnią się w około 10% przypadków od wyników uzyskanych metodą *blottingu*.

Niezwykle interesujące wyniki uzyskali van't Veer i wsp. [18]. Zbadali raki piersi pochodzące od 98 kobiet: 34 z rozsiewem w ciągu 5 lat, 44 bez cech wznowy po 5 latach, 18 od nosicieli mutacji *BRCA1* lub *BRCA2*. Były to chore w wieku do 55. roku życia i bez zajętych węzłów chłonnych pachowych. Badając ekspresję około 25 000 genów, stwierdzono, że istotne różnice ekspresji dotyczą około 5000 genów, z których wydzielono następnie zespół 231 genów, których wysoka ekspresja silnie korelowała z przeżyciami. Dalsza eliminacja doprowadziła do utworzenia zespołu 70 genów, których łączna wartość prognostyczna wynosiła 83%. Geny, których ekspresja źle rokuje, to między innymi cyklina E2 i B2, MCM6, metalloproteinazy MMP9 i MP1, VEGF receptor. Co ciekawe, w tym zespole 70 genów brakuje między innymi ER, cykliny D1, HER2 i c-myc. Poza tym, rokowanie na podstawie tego zespołu genów miało silniejszą wartość rokowniczą niż przyjęte powszechnie standardy kliniczne (Konsensus z St. Galen, Konsensus WHO) (tab. 1).

Ten sam zespół zbadal te zależności na większej grupie chorych — 295 kobiet w wieku poniżej 53 lat z I lub II stopniem zaawansowania klinicznego [31]. Zespół 70 genów opracowanych wcześniej również wykazał silne właściwości prognostyczne: średnie 10-letnie przeżycia dla chorych, których guzy wykazywały zły prognostycznie profil molekularny wynosiły 54,6% (\pm 4,4%), podczas gdy dla chorych z dobrym prognostycznie profilem — 94,6% (\pm 2,6%). Te istotne różnice były także zachowane, gdy analizowano chore zależnie od obecności przerzutów w węzłach chłonnych pachowych. Podobnie jak w poprzedniej publikacji, także i w tym badaniu wykazano, że „moc” predykcyjna profilowania molekularnego jest większa od klasycznych standardów stosowanych w klinice [18].

W dalszych badaniach, ta sama grupa 231 genów badana w innych przypadkach, wykazywała słabsze właściwości prognostyczne — ocenione na 47% [17], co dowodzi, że może on mieć przede wszystkim zastosowanie u młodych kobiet z mało zaawansowanym procesem nowotworowym.

Podobną analizę prognozy przeżycia w zależności od profili ekspresji genów wykonali Amatschek i wsp., którzy wyodrębnili grupę 42 genów ściśle związanych z rokowaniem. Co ciekawe, w tej grupie znalazły się w większości inne geny niż stosowane w rokowaniach przez van't Veer i wsp. [18]. W grupie pacjentek z przeżyciami poniżej 3 lat zaobserwowano podwyższoną ekspresję genów: TGF- β 3, VCAM-1, CD44, cyklina B1, ERG2, MTH1, NET-1 i receptora hormonów tarczycy, a wyraźnie obniżoną ekspresję (w stosunku do tkanki prawidłowej) genów: MIG-6, Eps15, APLP2. Te same geny w nowotworach pochodzących od pacjentek z przeżyciami powyżej 9 lat wykazywały całkowicie przeciwny poziom ekspresji [15].

Także Huang i wsp. wyselekcjonowali grupę genów, których ekspresja silnie korelowała z obecnością przerzutów i nawrotem choroby [32]. Czułość prognostyczną tego narzędzia ustalono na niezwykle wysokim poziomie 90%.

Kang i wsp. przeprowadzili profilowanie ekspresji genów w eksperymencie *in vitro* na subpopulacjach linii komórkowej raka piersi wykazujących różną aktywność metastatyczną do kości. Wyodrębnili oni zespół genów, których zwiększona ekspresja ściśle wiąże się ze zwiększonym ryzykiem przerzutów do kości, w tej grupie znalazły się głównie geny kodujące białka błony komórkowej i wydzielane poza komórkę [33].

Podobne wyniki, lecz na znacznie mniejszej liczbie chorych uzyskali Nagahata i wsp. [34]. Porównali oni profile ekspresji 25 344 genów w receptoro-negatywnych guzach pochodzących od chorych, które nie przeżyły 5 lat z grupą chorych żyjących, uzyskując dwa zespoły genów: 71 genów o wyższej ekspresji u chorych z gorszym rokowaniem i 15 genów z wyższą ekspresją u chorych z lepszym rokowaniem [34].

Praca Glinsky i wsp. wskazuje, że połączenie profilowania opartego na mniejszej liczbie badanych genów z oceną obecności receptora estrogenowego i stanu węzłów chłonnych niesie również bardzo istotne informacje rokownicze [35], co pozwala przypuszczać, że badania z użyciem mikromacierzy cDNA mogą doprowadzić do stworzenia prostego testu przydatnego klinicznie.

Z kolei Pittman i wsp. opracowali zestaw 29 metagenów (grup genów posiadających jednorodny obraz ekspresji genów sklasyfikowanych w funkcjonalnych podgrupach) zawierających od 10 do ponad 100 różnych genów. Określili następnie wartość rokowniczą zarówno pojedynczych mutagenów, jak i ich zespołów. Okazało się, że taka ukierunkowana klasyfikacja różnych profili ekspresji jest użyteczna nie tylko w przypadku badań populacyjnych, ale także w celu diagnostyki indywidualnej. Stosując klasterowanie metagenów Pittman i wsp. byli w stanie określić z bardzo dużym prawdopodobieństwem rokowanie dla pojedynczych pacjentów [36].

Podtyp „podstawny” raka piersi — gorsze rokowanie?

Jak już wspomniano, najgorsze rokowanie wiąże się z podtypami „podstawnym” i HER+. Te korelacje były również badane immunohistochemicznie. Rokownicze znaczenie nadekspresji HER2 było bardzo intensywnie eksplorowane — w około połowie prac, które obejmowały w sumie ponad 17 tysięcy chorych wykazano taką zależność w analizie wielowariantowej [37].

Wpływ cytokeratyn typu podstawnego na rokowanie również poddawano analizom. Uzyskiwano różny odsetek przypadków raka wykazujący ekspresję CK5/6 i/lub CK17 — od 16% do 40% [38–42]. Malzahn i wsp. znaleźli związek takiego fenotypu z rokowaniem, ale tylko u chorych bez przerzutów w węzłach chłonnych pachowych [39]. Odmienne wyniki uzyskali van de Rijn i wsp., którzy wykazali taką zależność w analizie wielowariantowej u chorych bez przerzutów, w tym niezależnie od zaawansowania guza i jego złośliwości histologicznej [41]. Podobnie Abd El-Rehim i wsp. donieśli, że w ich badaniach fenotyp „podstawny” wiązał się z gorszym rokowaniem, a te przypadki w większości nie wykazywały obecności receptorów estrogenowych [43]. Także w tej pracy ekspresja CK5/6 była niezależnym czynnikiem rokowniczym.

Korsching i wsp. również zaobserwowali biologiczną odmienność podtypu podstawnego raka piersi [44]. Badane przez nich nowotwory pozytywne dla cytokeratyn 5/6 w przeważającej większości nie wykazywały obecności receptorów estrogenu i progesteronu, miały wysoką proliferację (silne barwienie Ki67 i cykliny A) i wykazywały ekspresję białka TP53. Z kolei nowotwory z negatywną reakcją na cytokeratyny 5/6 miały zwiększoną ekspresję p21, p27, c-ERBB2 i Bcl2. Wykazywały również stosunkowo niski poziom zmian genetycznych, z najczęściej występującą utratą regionu chromosomu 16q [44]. Nie obserwowano różnic w poziomie cyklin D1 i E między nowotworami z ekspresją cytokeratyn 5/6 lub bez takiej ekspresji. Korsching i wsp. sugerują, że odmienne podgrupy raka piersi pochodzą z innych grup komórek, a zróżnicowanie poziomu ekspresji białek jest przyczyną odmiennych obrazów klinicznych.

Foulkes i wsp. uzyskali podobne wyniki: CK5/6-dodatnie guzy zazwyczaj nie wykazywały obecności ER, natomiast posiadały nadekspresję P53 i cykliny E oraz występowały u młodszych kobiet [38]. Towarzystwo zazwyczaj guzom większym i o wyższym stopniu złośliwości histologicznej. Często występowały też u nosicieli mutacji *BRCA1*. W analizie jednowariantowej guzy z ekspresją CK5/6 wiązały się z gorszymi przeżyciami, jednak w analizie wielowariantowej CK5/6 nie było obecne w modelu końcowym.

Te obserwacje potwierdzają badania Jones i wsp., którzy wykazali, że ekspresja markera komórek mioepi-

telialnych — SPARC (osteonektyny) — również wiąże się z gorszym rokowaniem u pacjentek chorych na raka piersi [45].

Podsumowanie

Raki piersi, nawet w tym samym stanie zaawansowania klinicznego i wykazujące ten sam typ histologiczny — mogą znacznie różnić się przebiegiem klinicznym. Wiadomo jednak, że chemioterapia stosowana na podstawie klasycznych czynników rokowniczych, zmienia losy tylko 20–30% chorych, które ją otrzymały. Kwalifikacja jest zatem mało precyzyjna. Ostatnie dokonania, które były możliwe dzięki technologii mikrosiatek cDNA pozwoliły na stworzenie molekularnych profili raka piersi, różniących się również biologicznie. Należy oczekiwać, że badania te dostarczą istotnych narzędzi przydatnych w codziennej praktyce klinicznej, zarówno w ocenie rokowania, w podejmowaniu decyzji o wdrożeniu i rodzaju terapii adiuwantowej, jak również w optymalizacji radykalności postępowania chirurgicznego.

Liczba prac badawczych opartych na technice mikrosiatek DNA stale rośnie, jednak z uwagi na ograniczenia technologiczne, wykonuje się je zazwyczaj na ograniczonej liczbie przypadków. Należy mieć nadzieję, że dalszy postęp w tej dziedzinie już niedługo doprowadzi do stworzenia przydatnych klinicznie testów diagnostycznych.

Piśmiennictwo

- Alizadeh A.A., Eisen M.B., Davis R.E. i wsp. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000; 403: 503–511.
- Bertucci F., Salas S., Eysteries S. i wsp. Gene expression profiling of colon cancer by DNA microarrays and correlation with histoclinical parameters. *Oncogene* 2004; 23: 1377–1391.
- Chen X., Cheung S.T., So S. i wsp. Gene expression patterns in human liver cancers. *Mol. Biol. Cell.* 2002; 13: 1929–1939.
- Garber M.E., Troyanskaya O.G., Schluens K. i wsp. Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 98: 13784–13789.
- Nielsen T.O., West R.B., Linn S.C. i wsp. Molecular characterization of soft tissue tumours: a gene expression study. *Lancet* 2002; 359: 1301–1307.
- Perou C.M., Sorlie T., Eisen M.B. i wsp. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406: 747–752.
- Rickman D.S., Bobek M.P., Misk D.E. i wsp. Distinctive molecular profiles of high-grade gliomas based on oligonucleotide microarray analysis. *Cancer Res.* 2001; 61: 6885–6891.
- Sallinen S-L., Sallinen P-K., Haapasalo H.K. i wsp. Identification of differentially expressed genes in human gliomas by DNA microarray and tissue chip techniques. *Cancer Res.* 2000; 60: 6617–6622.
- Van den Boom J., Wolter M., Kuick R. i wsp. Characterization of gene expression profiles associated with glioma progression using oligonucleotide-based microarray analysis and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Am. J. Pathol.* 2003; 163: 1033–1043.
- Lossos I.S., Czerwinski D.K., Alizadeh A.A. i wsp. Prediction of survival in diffuse large B-cell lymphoma based on the expression of six genes. *N. Engl. J. Med.* 2004; 350: 1828–1837.
- Thieblemont C., Nasser V., Felman P. i wsp. Small lymphocytic lymphoma, marginal zone B-cell lymphoma, and mantle cell lymphoma exhibit distinct gene-expression profiles allowing molecular diagnosis. *Blood* 2004; 103: 2727–2737.
- Chung C.H., Parker J.S., Karaca G., Wu J. i wsp. Molecular classification of head and neck squamous cell carcinoma using patterns of gene expression. *Cancer Cell.* 2004; 5: 489–500.
- Godard S., Getz G., Delorenzi M. i wsp. Classification of human astrocytic gliomas on the basis of gene expression: a correlated group of genes with angiogenic activity emerges as a strong predictor of subtypes. *Cancer Res.* 2003; 63: 6613–6625.
- Nutt C.L., Mani D.R., Betensky R.A. i wsp. Gene expression-based classification of malignant gliomas correlates better with survival than histologic classification. *Cancer Res.* 2003; 63: 1602–1607.
- Amatschek S., Koenig U., Auer H. i wsp. Tissue-wide expression profiling using cDNA subtraction and microarrays to identify tumor-specific genes. *Cancer Res.* 2004; 64: 844–856.
- Sorlie T., Perou C.M., Tibshirani R. i wsp. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *PNAS* 2001; 98: 10869–10874.
- Sorlie T., Tibshirani R., Parker J. i wsp. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *PNAS* 2003; 100: 8418–8423.
- van't Veer L.J., van de Vijver M.J., Dai H. i wsp. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002; 415: 530–535.
- West M., Blanchette C., Dressman H. i wsp. Predicting the clinical status of human breast cancer is associated with remarkably distinct gene expression profiles. *PNAS* 2001; 98: 11462–11467.
- Korkola J.E., DeVries S., Fridlyand J. i wsp. Differentiation of lobular versus ductal breast carcinomas by expression microarray analysis. *Cancer Res.* 2003; 63: 7167–7175.
- Seth A., Kitching R., Landberg G., Xu J., Zubovits J., Burger A.M. Gene expression profiling of ductal carcinomas in situ and invasive breast tumors. *Anticancer Res.* 2003; 23: 2043–2051.
- Adeyinka A., Emberley E., Niu Y. i wsp. Analysis of gene expression in ductal carcinoma in situ of the breast. *Clin. Cancer Res.* 2002; 8: 3788–3795.
- Miller D.V., Leontovich A.A., Lingle W.L. i wsp. Utilizing Nottingham Prognostic Index in microarray expression profiling of breast carcinomas. *Mod. Pathol.* 2004; 17: 756–764.
- Selaru F.M., Yin J., Olaru A. i wsp. An unsupervised approach to identify molecular phenotypic components influencing breast cancer features. *Cancer Res.* 2004; 64: 1584–1588.
- Sotiriou Ch., Soek-Ying N., McShane L.M. i wsp. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *PNAS* 2003; 100: 10393–10398.
- Wang Z.C., Lin M., Wei L.J. i wsp. Loss of heterozygosity and its correlation with expression profiles in subclasses of invasive breast cancers. *Cancer Res.* 2004; 64: 64–71.
- Hefler L.A., Tempfer C.B., Grimm C. i wsp. Estrogen-metabolizing gene polymorphisms in the assessment of breast carcinoma risk and fibroadenoma risk in Caucasian women. *Cancer* 2004; 101: 264–269.
- Bertucci F., Houllgatte R., Benziane A. i wsp. Gene expression profiling of primary breast carcinomas using arrays of candidate genes. *Hum. Mol. Genet.* 2000; 9: 2981–2991.
- Bertucci F., Nasser V., Granjeaud S. Gene expression profiles of poor-prognosis primary breast cancer correlate with survival. *Hum. Mol. Genet.* 2002; 11: 863–872.
- Ginestier C., Charafe-Jauffret E., Bertucci F. i wsp. Distinct and complementary information provided by use of tissue and DNA microarrays in the study of breast tumor markers. *Am. J. Pathol.* 2002; 161: 1223–1233.
- van de Vijver M.J., He Y.D., van't Veer L.J. i wsp. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 2002; 347: 1999–2009.
- Huang E., Cheng S.H., Dressman H. i wsp. Gene expression predictors of breast cancer outcomes. *Lancet* 2003; 361: 1576–1577.
- Kang Y., Siegel P.M., Shu W. i wsp. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell.* 2003; 3: 537–549.
- Nagahata T., Onda M., Emi M. i wsp. Expression profiling to predict postoperative prognosis for estrogen receptor-negative breast cancers by analysis of 25,344 genes on a cDNA microarray. *Cancer Sci.* 2004; 95: 218–225.
- Glinsky G.V., Higashiyama T., Glinsky A.B. Classification of human breast cancer using gene expression profiling as a component of the survival prediction algorithm. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10: 2272–2283.

36. Pittman J., Huang E., Dressman H. i wsp. Integrated modeling of clinical and gene expression information for personalized prediction of disease outcomes. *PNAS* 2004; 101: 8431–8436.
37. Kaptain S., Tan L.K. Her-2/neu and breast cancer. *Diag. Mol. Pathol.* 2001; 10: 139–152.
38. Foulkes W.D., Brunet J.S., Stefansson I.M. i wsp. The prognostic implication of the basal-like (cyclin E high" p27 low" p53+" glomeruloid-microvascular-proliferation+) phenotype of BRCA1- related breast cancer. *Cancer Res.* 2004; 64: 830–835.
39. Malzahn K., Mitze M., Thoenes M., Moll R. Biological and prognostic significance of stratified epithelial cytokeratins in infiltrating ductal breast carcinomas. *Virchows Arch.* 1998; 433: 119–129.
40. Signoretti S., Di Marcotullio L., Richardson A. i wsp. Oncogenic role of the ubiquitin ligase subunit Skp2 in human breast cancer. *J. Clin. Invest.* 2002; 110: 633–641.
41. van de Rijn M., Perou C.M., Tibshirani R. i wsp. Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. *Am. J. Pathol.* 2002; 161: 1991–1996.
42. Wetzels R.H., Kuijpers H.J., Lane E.B. i wsp. Basal cell-specific and hyperproliferation-related keratins in human breast cancer. *Am. J. Pathol.* 1991; 138: 751–763.
43. Abd El-Rehim D.M., Pinder S.E., Paish C.E. i wsp. Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. *J. Pathol.* 2004; 203: 661–671.
44. Korsching E., Packeisen J., Agelopoulos K. i wsp. Cytogenetic alteration and cytokeratin expression patterns in breast cancer: integrating a new model of breast differentiation into cytogenetic pathways of breast carcinogenesis. *Lab. Invest.* 2002; 82: 1525–1533.
45. Jones C., Mackay A., Grigoriadis A. i wsp. Expression profiling of purified normal human luminal and myoepithelial breast cells: identification of novel prognostic markers for breast cancer. *Cancer Res.* 2004; 64: 3037–3045.