

1/48/2001

3. Részjelentés: 2003. November 30.-2004. december 31.

**RP4. Az emlőrákok molekuláris biológiai sajátosságai
és felhasználásuk a diagnosztikában és terápiában**

Dr. Csuka Orsolya
Országos Onkológiai Intézet

RP4. Az emlőrákok molekuláris biológiai sajátosságai és felhasználásuk a diagnosztikában és terápiában

Témavezető: dr. csuka Orsolya, Országos Onkológiai Intézet

1. Sporadikus emlődaganatok kialakulásának mechanizmusa

1.3. Epigenetikus gén-inaktiválás szerepe az emlő daganatok kialakulásában

2. Hatékony biomarker készlet kialakítása az emlő tumorok prognózisára, terápiás érzékenységük predikciójára, az emlő tumorok chemopreveniója

2.3. Emlődaganatok terápiás érzékenységének predikciója (Aventis Kft., AstraZeneca, BMS)

A carcinogenezis folyamatát a tumor szuppresszor gének inaktiválása kíséri. A gén inaktiválás epigenetikus úton is kialakulhat a gén-promoter régió hypermetilációjával. Ismerté vált, hogy a DNS mismatch repair gének (MMR) gének) és p16 gén hypermetilációja a vastagbél daganatok kialakulásának oki tényezője lehet. A vizsgálatsorozat célkitűzése az, hogy felderítsük az emlőtumorokra jellemző gén-hypermetilációs mintázatot. Az emlőtumorok kialakulásában az estrogen receptoroknak (ER) kitüntetett szerepe van. Bebizonyosodott az is, hogy az emlődaganatok kialakulása során az ER β mennyisége nő az ER α szint egyidejűleg csökken. Feltételezhető, hogy az ER α szint csökkenés a gén hypermetilációjával függ össze. A szöveti homeostasis szabályozásában, az invazív növekedés megakadályozásában az APC – Cadherin E – Catenin β rendszernek kitüntetett szerepe van. Ezen gének mutációja emlőtumorokban ritkán fordul elő, de epigenetikus inaktiválások hypermetilációval plauzibilisnek tűnik. Vizsgálataink egyik lényeges célkitűzése az emlődaganatok tumorsuppresszor géneinek metiláció inaktiválásának (BRCA1, APC) vizsgálata, valamint a szerreisztenenciában szerepet játszó MGMT és hMLH1 epigenetikus inaktivációjának meghatározása.

Anyag és módszer

Vizsgálati minták: 260 primér emlődaganatban, 450 keringő daganatsejtől izolált DNS-ből és 125 szérumból izolált DNS minta biszulfitos módosítása után analizáltuk a p16, E-cadherin, APC, DAPK, MGMT, BRCA1, ER α , hMLH1 gének metilációs mintázatát. A metilált gének azonosítására metiláció specifikus PCR (MS) és “Methyl Light” fluorescens real-time PCR módszereket alkalmaztunk. A módosított DNS-re tervezett TaqMan próbok és primer szekvenciákat az **1. sz. táblázatban** tüntettük fel.

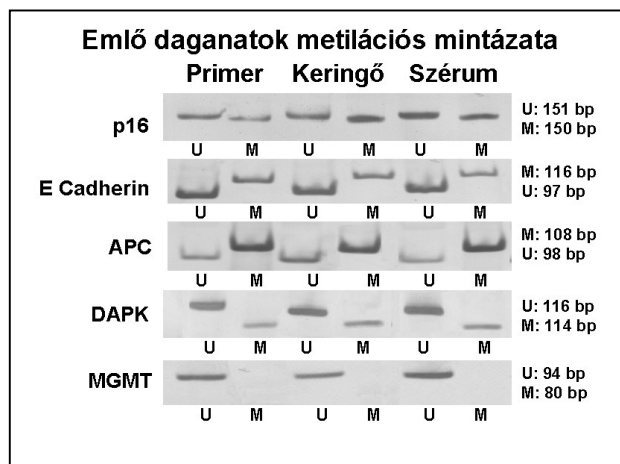
	Forward primer	TaqMan próba	Reverse primer
APC	GAACCAAAACGCTCCCCAT	6FAM-CCCCTCGAAAACCCGCCGATTA-TAMRA	TTATATGTCGGTTACGTGCGTTTATA T
BRCA1	GAGAGGTGTGTTAGCGGTAGTT	6FAM-TTTCGTGGTAACGAAAAGCGCGG-TAMRA	CGCGCAATCGCAATTTTAAT
CDH1	AATTTTAGGTTAGAGGGTTATCGCG T	6FAM-CGCCACCCGACCTCGCAT-TAMRA	TCCCCAAAACGAAACTAACGAC
ESR-1	GGCGTTCGTTTTGGGATTG	6FAM-CGATAAAACCGAACGACCCGACGA-TAMRA	GCCGACACGCGAACTCTAA
ESR-2	TTTGAAATTTGTAGGGCGAAGAGTA G	6FAM-CCGACCCAACGCTCGCCG-TAMRA	ACCCGTCGCAACTCGAATAA
MLH1	CGTTATATATCGTTCGTAGTATTCG TGTTT	6FAM-CGCGACGTCAAACGCCACTACG-TAMRA	CTATCGCCGCTCATCGT
ACTB	TGGTGATGGAGGAGGTTAGTAAGT	6FAM-ACCACCACCAACACACAATAACAAACAC A-TAMRA	AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTA A

Eredmények és megbeszélés

A vizsgálat sorozat további célkitűzése annak eldöntése, hogy a metilációs markerek keringő daganatsejtek, illetve szérumban megjelenő tumor DNS kimutatására is alkalmasak-e.

A metilált gének MSP analízisét ennek értelmében a primer emlő daganatokban, keringő daganatsejtekben és szérumban DNS mintákon is elvégeztük.

Eredményeinket az **1. ábra** szemlélteti.

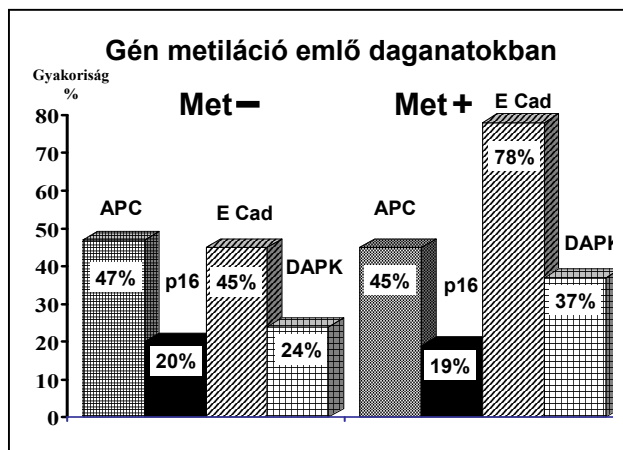


1. ábra

Megfigyelhető, hogy a metilált génszakaszra jellemző PCR termékek a primer tumorokban, keringő daganatsejtekben és szérumban DNS mintákban egyaránt kimutathatók.

Vizsgálatainkban arra is választ kívántunk kapni, hogy a daganatok gén metilációs mintázata a daganat progresszió során változik-e.

Megállapítottuk, hogy az APC, p16 gének metilációs gyakorisága közel azonos a metasztázist adó, illetve in situ emlő daganatokban. Ezzel szemben a sejt adhéziót biztosító E-Cadherin gének metilációs gyakorisága a metasztázist adó emlő daganatokban megnövekszik (**2. ábra**).



2. ábra

60 további emlő tumoros mintán vizsgáltunk az APC, BRCA1, E-cadherin, ESR-1, ESR-2, hMLH1 gének promotor hipermetilációját. A méréseket MethyLight assay-vel végeztük, ABI-7900 Sequence Detection System készüléken.

Pozitív kontrollként SssI metiláz enzimmel (New England Biolabs) mesterségesen metilált limfocita DNS-t, negatív kontrollként humán sperma DNS-t használtunk.

Az összes emlő mintában a következő arányban voltak hipermetiláltak a vizsgált markerek: APC 51,66%, BRCA1 6,78%, CDH1 3,33%, hMLH1 5%, ESR-1 18,33%, ESR-2 3,33%

Az emlő tumorok több mint felére APC hipermetiláció jellemző.

A BRCA 1 hipermetilációt mutató tumorok mindegyike ER-negatív statusú volt.

1. Ductalis és lobularis emlőtumorok promoter metiláltsága

	APC	BRCA1	CDH1	hMLH1	ESR-1	ESR-2
ductalis (46)	52,17	4,44	4,35	4,35	4,35	19,57
Lobularis (14)	50,00	14,29	0	0	7,14	14,29

Az E-cadherin és a hMLH1 gének promoter hipermetilációja csak a ductalis emlőtumorokban fordult elő. BRCA-1 hipermetilációt a lobularis mintákban találtunk magasabb arányban (**3. ábra**).

2. Grading

A ductalis, grade I tumorok promoter hipermetilációja minden markerre alacsonyabb, az APC hipermetiláció aránya mindössze 28,6%.

Legjelentősebb különbség a grade II és grade III tumorok között az ESR-2 hipermetilációban adódott. A grade II tumoroknak a 12,9%-a, a grade III tumoroknak a 30%-a hipermetilált erre a markerre.

3. Metastasis és promoter hipermetiláció

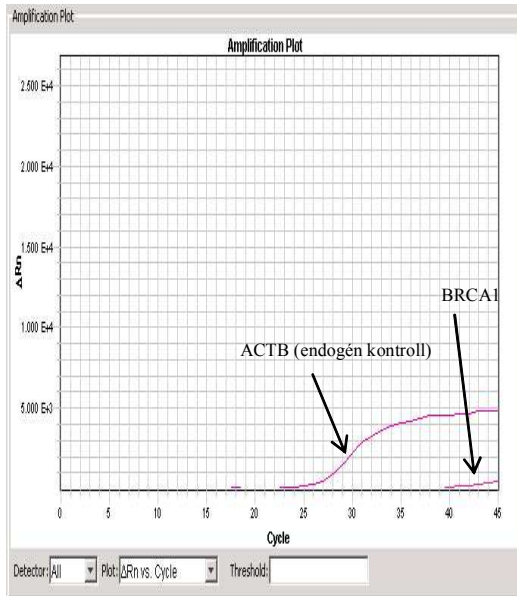
A metasztatizált és nem metasztatizált tumorok között a legjelentősebb eltérés az ESR-1 és ESR-2 hipermetilációjában adódott.

	ESR-1	ESR-2
Metastasis -	2,8%	13,9
Metastasis +	8,0%	24%

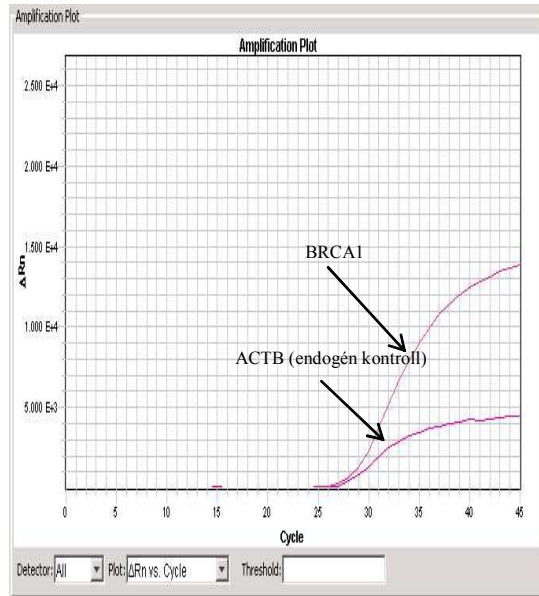
A ductalis metasztatizált tumoroknak a 40%-a hipermetilált az ESR-1 vagy az ESR-2 promoterek valamelyikére, a két gén együttes hipermetilációja a mintáink között nem fordult elő.

Az emlő daganatok epigenetikus vizsgálata alapján bebizonyosodott, hogy a daganat sejtek metilációs mintázatának meghatározása elősegítheti a daganat progresszió nyomonkövetését, a terápia monitorizálását, a daganatok molekuláris stagingjét. A promoter region hipermetilációja 100%-os biztonsággal kimutatható, eloszlása nem random, költség hatékony és gyors eljárás, ezért a hipermetilált DNS ideális tumor markernek tekinthető.

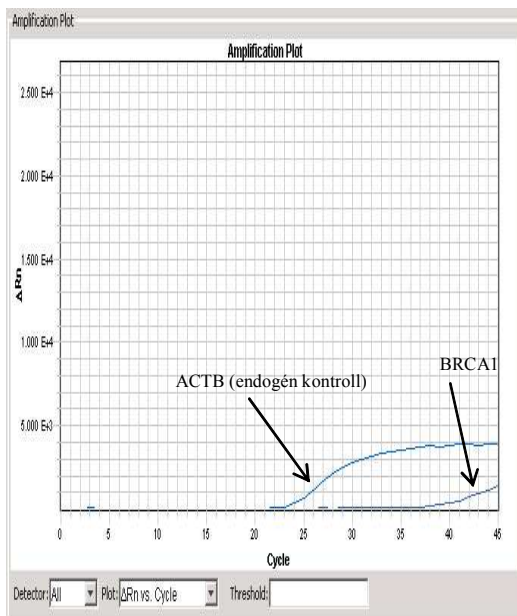
Hipermetiláció kimutatása MethyLight módszerrel



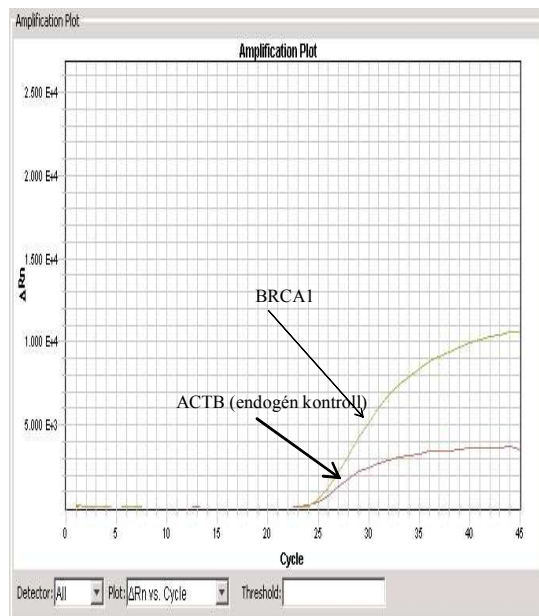
1. Negatív kontroll (humán sperma DNS) ACTB és BRCA1 real-time görbái



2. Pozitív kontroll (SssI metilált DNS) ACTB és BRCA1 real-time görbái



3. BRCA1 nem hipermetilált emlő minta real-time görbái



4. BRCA1 hipermetilált emlő minta real-time görbái

3. ábra

2. DNS chip alkalmazása az emlő tumorok prognózisára és terápiás érzékenységének predikciójára

Bevezetés, célkitűzés

Az alprogram célja, hogy az emlő daganatok kialakulását és progresszióját kísérő genetikai utakat DNS chip technológiával feltérképezzük és ezáltal elősegítsük a daganatok molekuláris diagnózisát, prognózisát és az individuális terápiás terv kialakítását. A vizsgálatsorozat lehetővé teszi, hogy a daganatokat a genetikai lenyomat alapján alcsoportokba soroljuk és új terápiás célpontokat azonosítsunk.

Vizsgálatainkban célul tűztük ki, hogy a daganatok terápiás érzékenységét meghatározó gén expresszió mintázatát (DNS repair, apoptózis, rezisztencia gének) együttesen határozzuk meg. Ezen túlmenően a metasztázis és neovascularizációt kísérő gén expressziós mintázatot is meghatározzuk DNS chip technikával. A vizsgált DNS chip(ek) 100-200 gén kimutatását célozták meg, amely könnyű kiértékelhetősége miatt rutin diagnosztikai eljárássá fejleszhető.

Az emlő daganatos minták génexpressziós mintázatának meghatározása DNS chip technikával az alábbi géneket foglalta magába:

Growth Factor Gene Array:

Epidermal Growth Factor (EGF) Family:

AREG (Amphiregulin), DTR (HB-EGF), EGF, LOC145957 (Neuregulin 4), NRG1, NRG2, NRG3.

Fibroblast Growth Factor (FGF) Family:

FGF1, FGF2, FGF3, FGF4, FGF5, FGF6, FGF7, FGF8, FGF9, FGF10, FGF11, FGF12, FGF13, FGF14, FGF16, FGF17, FGF18, FGF19, FGF20, FGF21, FGF23.

Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) Family:

FIGF (VEGFD), PDGFA, PDGFB, PDGFC, SCDGF-B (PDGFD), VEGF, VEGFB, VEGFC.

Tumor Growth Factor (TGF) Family:

TGFA, TGFB1, TGFB2, TGFB3.

Neuronal Growth Factors:

BDGF, CNTF, GDNF, KLK2 (NGFA), MDK (Midkine), NGFB, NRP1 (Neuropilin 1), NRP2, NT6G, NTF3, NTF5.

Cytokines:

CSF1 (M-CSF), CSF2 (GM-CSF), CSF3 (G-CSF), EPO, IL1A, IL1B, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11, IL12A, IL12B, IL13, IL14, IL15, IL16, IL17, IL17B, IL17C, IL17E, IL17F, IL18, IL19, IL20, IL22, KITLG (SCF), LTA (TNF beta), TNF.

Other Related Growth Factor Genes:

CTGF, CXCL1 (MGSA), ECGF1 (PD-ECGF), GH1, GH2, HGF, IGF1, IGF2, INS, PGF (PLGF), PTN.

Tumor Metastasis Gene Array:

Growth Factors and Receptors: CSF1 (csf-1), CSF1R (c-fms/MC-SF-R), FGF1 (a-FGF), FGF2 (b-FGF2), HGF (Scatter factor), IGF2, NGFB, PDGFA, TGFA (TGF-a), TGFB1 (TGF-b 1), VEGF, VEGFC

Cell-Cell and Cell-Matrix Interaction Molecules: CAV1 (caveolin-1), CDH1 (cadherin-1/E-cadherin), COL4A2 (collagen α_2 (IV)), ICAM5 (telencephalin), ITGA2, ITGA3, ITGA5, ITGA6, ITGB1, ITGB3, LAMB1 (laminin b1), LAMC1 (laminin b 2), MICA (MUC-18), MUC1, NCAM1, PECAM1, VTN (vitronectin)

Metastasis-Associated Proteases:

Matrix Metalloproteinases: MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP8, MMP9, MMP10, MMP11, MMP13, MMP14, MMP15, MMP16

Others: CASP8, CASP9, CST3 (cystatin C), CTSB (cathepsin B), CTSD (cathepsin D), CTSL (cathepsin L), ELA2 (elastase), HPSE (heparanase), MGEA5 (meningioma hyaluronidase 5), PLA1 (uPA), TMPRSS4

Protease Inhibitors: SERPINB2 (PAI-2), SERPINB5 (maspin), SERPINE1 (PAI-1), THBS1, THBS2, TIMP1, TIMP2, TIMP3

Signal Transduction Molecules: LIMK1 (LIM kinase), PLAUR (uPAR), PIK3C2B, RAC1

Oncogenes: ERBB2 (c-erb-2/neu), ETS1 (c-ets-1), ETS2 (c-ets-2), ETV4 (PEA3), FES, FOS (c-fos), HRAS (c-hRas), MDM2, MYC (c-myc), RAF1, SRC (c-src)

Metastasis Suppressors: BRMS1 (BrMS1), CD44, DCC, KAI1, KISS1 (KiSS-1), MAP2K4 (mkk4 (JNKK1)), MTA1, NM23A (NM23), NME4, PTEN

Other Related Genes: API5 (apoptosis inhibitor 5), ARHC (Rho C), EHM2, ENPP2 (autotaxin/ ATX), MGAT3 (acetylglucosaminyltransferase III), MGAT5 (acetylglucosaminyltransferase V), ODC1, PTGS2 (cox-2), S100A4 (mts-1), SNCG (BCSG1), SPP1 (osteopontin)

Angiogenesis Gene Array:

Specific Promoters and Inhibitors: AMOT (KIAA1071/angiomin), ANG (angiogenin), ANGPT1 (angiopoietin-1), ANGPT2 (angiopoietin-2), CHGA (vasostatin)

Growth Factors and Receptors:

Ephrin Family Members: EFNA2 (Ephrin A2), EFNA5 (Ephrin A5), EFNB2 (Ephrin B2), EPHB4 (Ephrin B4)

Fibroblast Growth Factors & Receptors: FGF1 (aFGF), FGF2 (bFGF), FGF4, FGF6, FGF7, FGFR1, FGFR2 (KGFR), FGFR3, FGFR4

Platelet-derived Growth Factors & Receptors: PDGFA, PDGFB, PDGFRA, PDGFRB, PF4 (Platelet factor 4)

Transforming Growth Factors & Receptors: TGFA, TGFB1, TGFB2, TGFB3, TGFBR1, TGFBR2, TGFBR3

Vascular Endothelial Growth Factors & Receptors: FIGF (VEGFD), FLK1 (KDR), FLT1 (VEGFR2), PGF, VEGF, VEGFB, VEGFC

Others: CD36, EDG1, EGF, EGFR, GRO1, HGF (Scatter factor), IGF1, TEK (Tie-2), TIE

Cytokines and Chemokines: CSF3, IFNA1, IFNB1, IFNG, IL10, IL12A, IL8, MDK, NRP1 (neuropilin-1), PRL (prolactin), PTN (pleiotrophin), SCYA2, SPARC, TNFA, TNFSF15 (VEG1)

Adhesion Molecules: CDH5 (VE-Cadherin), ITGA5 (integrin α_5), ITGAV (integrin α_V), ITGAV (integrin α_V), ITGB3, PECAM1

Matrix Proteins, Proteases and Inhibitors:ADAMTS1 (METH1), ADAMTS8 (METH2), COL18A1 (LOC51695 /endostatin), FN1 (fibronectin), HPSE (heparanase), MMP2, MMP9, MSR1, PLAU (uPA), SERPINB5 (maspin), SERPINF1 (PEDF), THBS1, THBS2, THBS3, THBS4, TIMP1, TIMP2

Transcription Factors:ERBB2, ETS1, HIF1A, ID1, ID3, MADH1 (SMAD1)

Other Related Genes:ENG (endoglin), F2 (thrombin), NOS3, PTGS1 (cox-1), PTGS2 (cox-2), RSN (restin), SPP1 (osteopontin)

Cancer Drug REsistance & Metabolism Gene Array:

Drug Resistance: ABCB1 (PGY1, MDR1), ABCC1 (MRP1), ABCC2 (cMOAT, MRP2), ABCC3 (MOAT-D, MRP3), ABCC5 (MRP5), ABCC6 (MRP6, CFTR), ABCG2 (BCRP), BAX, BCL2, BCL2L1 (bcl-x), MVP (LRP), RB1, TOP1, TOP2A, TOP2B, TP53 (p53).

Drug Metabolism: ARNT, BLMH, COMT, CRABP1, CRR9 (DKFZP761M2324), CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E, CYP3A4, CYP3A5, DHFR, EPHX1, EPHX2, GSK3A, GSTM1, GSTP1, MRP1-ESTs, NAT2, NQO1 (DIA4), SOD1, STE, TPMT, TYMS (TS), UGCG.

DNA Repair: APC, ATM, BRCA1, BRCA2, ERCC3, MGMT, MLH1, MSH2, XPA, XPC.

Cell Cycle: CCND1 (cyclin D1), CCNE1 (cyclin E1), CDK2, CDK4, CDKN1A (p21Waf1, p21Cip1), CDKN1B (p27Kip1), CDKN2A (p16Ink4), CDKN2D (p19Ink4d).

Growth Factor Receptors: EGFR (ERBB1), ERBB2 (Her-2), ERBB3, ERBB4, FGF2, IGF1R, IGF2R, MET.

Hormone Receptors: AR, ESR1 (ER-alpha), ESR2 (ER-beta-cx), PPARA, PPARD, PPARG, PPARGC1, RARA, RARB, RARG, RXRA, RXRB, RXRG, SRD5A2.

Transcription Factors: AHR, AP1S1, ELK1, FOS (c-fos), HIF1A, MAFB, MYC (c-myc), NFKB1, NFKB2, NFKBIB (TRIP9), NFKBIE, RELB (l-rel), TNFRSF11A (Rank).

DNA Damage Signaling Pathways Gene Array:

ATR/ATM signaling network:

53BP1, ATM, ATR, CDS1, CHEK1, CHEK2 (Rad53), FOXO3A, HUS1, MRE11A, NBS1 (nibrin), RAD1, RAD9, RAD17, RAD50, TREX1 (ATRIP)

DNA damage response pathways:

Cell cycle arrest pathway: CDC20 (p55cdc), CDC25A, CDC25B, CDC25C, CDK4, CDKN1A (p21), CENPE, DDIT3 (GADD153), E2-EPF, EXT1, GADD45A, GADD45B, GADD45G, GTSE1 (B99), KNSL5 (MKLP-1), KNSL6 (MCAK), MDM2, PIN1, PPM1D (Wip1), PTPRCAP (LPAP), REPRIMO, SFN (14-3-3 sigma), TP53, WEE1

Apoptosis pathway: APAF1, BAK1, BAX, BBC3 (PUMA), BCL6, BIRC2 (MIHB), BIRC3 (MIHC), BNIP3 (NIP3), LGMN (Legumain), LRDD (PIDD), P53AIP1, TNF (TNF-a), TNFRSF4 (OX40), TNFRSF6 (Fas), TNFRSF10 (DR5)

Genome stability/repair pathway: APEX (REF-1), ATRX (RAD54), BRCA1, BRCA2, BTG2, CKN1 (CSA), DDB1, DDB2, ERCC1, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, ERCC6, FEN1, GADD45A, GADD45B, GADD45G, H2AFL, MLH1, MPG, MSH2, MSH3, MSH6, PA26, PCNA, PMS1, PMS2, PRKDC (DNA-PK), PURA, RAD23A, RAD23B, RAD50, RAD51, RAD52, RPA3, RRM2B (p53R2), UNG, UNG2, XPA, XPC, XRCC1, XRCC2, XRCC3, XRCC4, XRCC5 (Ku-80).

A vizsgálat sorozat alapvető célkitűzése olyan biomarkerek keresése, amelyek alkalmasak az emlő daganatok legjelentősebb biológiai sajátosságainak: a metasztázis képzés és a terápiás érzékenység jellemzésére.

Anyag és módszer

1. cDNS előállítása genomikai mintabankhoz

1.1. Klinikai minta gyűjtése

A vizsgálati periódusban 250 emlő tumor szövet mintát és 100 vastagbél szövet mintát archiváltunk -70°C , -180°C fokon.

Az **emlő tumor** minták szövettani típus, illetve klinikai stádium szerinti megoszlása a következő:

- Ductális emlő carcinoma: 230 eset, amelyből 142 metasztatizáló ductális invazív carcinomának bizonyult.
- Lobuláris emlő carcinoma: 20 eset, 15 eset metasztatizáló invazív lobuláris emlő carcinoma.

1.2. RNS izolálás: MagNa Pure LC RNA Isolation Kit III (Tissue) – Roche

1. A Lizis/Kötő Puffer sejtlyízist, az RNázok denaturációját és inaktiválódását eredményezi.
2. Az RNS a mágneses gyöngyök felszínéhez kötődik (magas sókoncentráció, izopropanol, Lizis/Kötő Puffer ionerőssége)
3. Inkubálás DNázssal, DNS szennyeződés nélküli RNS-t kapunk
4. Izopropanol hatására az RNS visszakötődik a mágneses részecskékhez, és a mágnes elkülöníti a sejtlyízátumtól.
5. A részecskékhez kötött RNS mosási fázisokon megy át, hogy a nem kötött sejtalkotóktól (pl fehérje), PCR inhibitoroktól (hemoglobin, heparin) teljes mértékben megszabaduljon és a sókoncentráció is csökkenjen.
6. A mágneses gyöngyökhöz kötött RNS mágneses úton távolítódik el a sejtörmelék tartalmazó mosó pufferekből.
7. A tiszta RNS 70°C -on eluálódik a gyöngyök felszínéről.

1.3. Tisztasági fok ellenőrzése

Az izolálással előállított DNS és RNS oldatok tisztaságát Pharmacia GeneQuant spektrofotométeren 260/280 nm-en történő méréssel ellenőrizzük.

1.4. cDNS előállítás: SIGMA Enhanced Avian RT-PCR kit

Az izolált RNS oldatot oligo-d15T primerek hozzáadásával denaturáljuk 90°C -on 2 percen keresztül, majd 0°C -ra hűtjük és hozzáadunk AMW reverse tranzkriptáz enzimet, dNTP-t és reakció puffert. A reakció elegyet inkubáljuk 1 órán keresztül 42°C -on. Az így előállított cDNS könyvtárat -20°C -on tároljuk.

1.5. Funkcionális analízis: Light Cycler realtime PCR

A DNS minták felhasználhatóságát SNP analízissel LC NAT2 Mutation detection kit segítségével real time PCR-ban végezzük.

A cDNS minták validálását Gapdh belső standard valamint HER-2 és Cyclin D1 gének expressziójának RT-PCR mérésével végezzük. A méréshez LC FastStart DNA master SYBR Green I kisset alkalmazunk.

Primerek:	Gapdh:	CCAAATTCGTTGTCATACCAGG AAGGCTGGGGCTCATTTCAG
	HER2:	AGCCGCGAGCACCCAAGT TTGGTGGGCAGGTAGGTGAGTT
	Cyclin D1:	AGCCATGGAACACCAGCTC GCACCTCCAGCATCCAGGT

Az általunk izolált RNS funkcionális aktivitásának tesztelését real-time PCR-al, house keeping gén (GAPDH), illetve növekedési faktor receptor HER2 gén expresszió alapján ellenőrizzük.

2. Biotin-16-dUTP-vel jelölt cDNS probe szintézis

Az anellálási mixhez 1,0-5,0 µg totál RNS-t és 3 µl Puffer-A-t mérünk össze, majd RNáz mentes vízzel 10 µl-re egészítjük ki. A mixet 70°C-on tartjuk 3 percig, majd 2 percre 42°C-ra hűtjük.

Az RT mixet (összetétele: 4 µl BN Puffer, 2 µl Biotin-16-dUTP, 2 µl RNáz mentes víz és 1 µl Rnáz inhibitor) 1 percig 42°C-on tartjuk.

Az RT reakcióhoz 10 µl előmelegített RT mixet mérünk a 10 µl anellálási mixhez, majd 90 percig 42°C-on inkubáljuk. Az RT reakciót 2 µl C puffer hozzáadásával állítjuk le.

2.1. Probe denaturálása

A cDNS probe-ot 94 °C-on 5 percig denaturáljuk, majd jégen lehűtjük.

2.2. Probe hibridizációja az array-re

Prehibridizáció: Az array membránt 5 ml d. vízzel benedvesítjük. A GEAhb hibridizációs oldatot 60°C-ra melegítjük. A lazac sperma DNS-t 100°C-on tartjuk 5 percig, majd jégen lehűtjük. A DNS-t hozzáadjuk a hibridizációs oldathoz (koncentráció: 100µg/ml) és felhasználásig 68°C-on tartjuk.

A GEAPrehyb oldatból 2 ml-t adunk minden arrayhez, majd a hibridizációs kamrában 60°C-on, 1-2 óráig 5-10 rpm-en folyamatos agitáció mellett hibridizáltatjuk.

Hibridizáció: A denaturált cDNS probe-ot 0.75 ml előmelegített GEAPrehyb oldathoz mérjük, és 60°C-on tartjuk.

A GEAPrehyb oldatot eltávolítjuk a hibridizációs csőből, és belemérjük a probe-ot tartalmazó oldatot. Egy éjszakán át 60°C-on, 5-10 rpm-en hibridizáltatjuk.

Mosás:

1. oldat: 2xSSC, 1% SDS
2. oldat: 0,1xSSC, 0,5% SDS

A membránt kétszer átmoszuk először 5 ml 1. oldattal, 60°C-on 20-30 rpm-en 15 percig, majd megismételjük a 2. oldattal is.

2.3. Kemilumineszcens detektálás CCD kamerával

Az array blokkolása 2 ml GEAblocking Q oldattal, 40 percig 20-30 rpm-en.

Az alkalikus foszfatáz-konjugált streptavidin kötése: a GEAblocking oldat eltávolítása után 2 ml kötőpufferrel 10 percig inkubáljuk a membránt.

Mosás 4 ml 1x F pufferrel, 3-szor ismétljük.

A detektáláshoz a membránt műanyaglapra helyezjük és 1 ml CDP-Star oldatot csepegtetünk rá.

2.4. Az image analízis

AlphaInnotech géldokumentációs rendszerrel történt

(<http://www.microarrays.org/software.html>).

2.5. Kiértékelés

A gén expresszió mértékét a house keeping GAPDH százalékában adjuk meg. Az adatok értékeléséhez a SuperArray GEArray Analyzer szoftvert használtuk.

(<http://www.superarray.com>)

Eredmények és megbeszélés

2.1. DNS chip alkalmazása metasztatizáló emlő daganatok jellemzésére

A vizsgálat sorozat alapvető célkitűzése a metasztatizáló és in situ emlő daganatok genetikai lenyomatának meghatározása azzal a céllal, hogy új terápiás targeteket azonosítsunk. A vizsgálatainkhoz használt "metasztázis" cDNS array 96 membránhoz kötött cDNS-t tartalmazott. A 65 in situ és 97 metasztatizáló ductális emlő carcinomákból előállított cDNS minták analízisét chemiluminescens módszerrel végeztük el.

15-15 azonos szövettani típusú azonos klinikai stádiumú poolozott mintát használtunk fel vizsgálatainkhoz.

A metasztázis array az alábbi géneket tartalmazta:

-Növekedési faktor receptorokat:

CSF1 (csf-1), CSF1R (c-fms/MC-SF-R), FGF1 (a-FGF), FGF2 (b-FGF2), HGF (Scatter factor), IGF2, NGFB, PDGFA, TGFA (TGF-a), TGFB1 (TGF-b 1), VEGF, VEGFC

-Sejtmatrix fehérjéket:

CAV1 (caveolin-1), CDH1 (cadherin-1/ E-cadherin), COL4A2 (collagen α_2 (IV)), ICAM5 (telencephalin), ITGA2, ITGA3, ITGA5, ITGA6, ITGB1, ITGB3, LAMB1 (laminin b1), LAMC1 (laminin b 2), MICA (MUC-18), MUC1, NCAM1, PECAM1, VTN (vitronectin)

-Metasztázishoz kapcsolódó proteázokat:

Matrix Metalloproteinases: MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP8, MMP9, MMP10, MMP11, MMP13, MMP14, MMP15, MMP16

Others: CASP8, CASP9, CST3 (cystatin C), CTSB (cathepsin B), CTSD (cathepsin D), CTSL (cathepsin L), ELA2 (elastase), HPSE (heparanase), MGEA5 (meningioma hyaluronidase 5), PLAU (uPA), TMPRSS4

-Proteáz inhibitorokat:

SERPINB2 (PAI-2), SERPINB5 (maspin), SERPINE1 (PAI-1), THBS1, THBS2, TIMP1, TIMP2, TIMP3

Signal Transduction Molecules: LIMK1 (LIM kinase), PLAUR (uPAR), PIK3C2B, RAC1

- Onkogéneket:

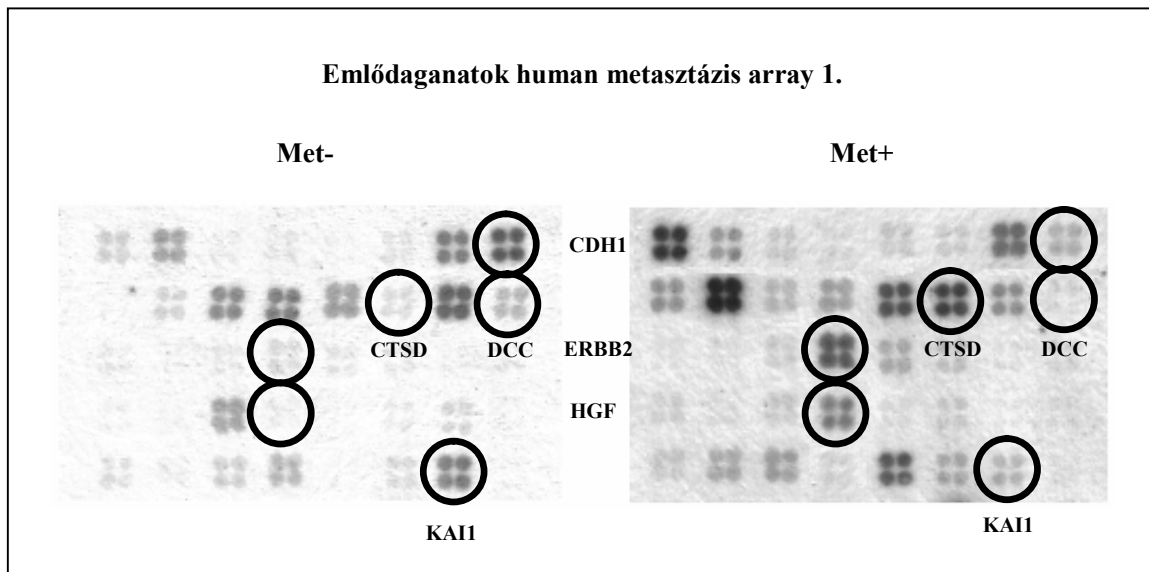
ERBB2 (c-erb-2/neu), ETS1 (c-ets-1), ETS2 (c-ets-2), ETV4 (PEA3), FES, FOS (c-fos), HRAS (c-hRas), MDM2, MYC (c-myc), RAF1, SRC (c-src)

-Metasztázis szuppresszor géneket:

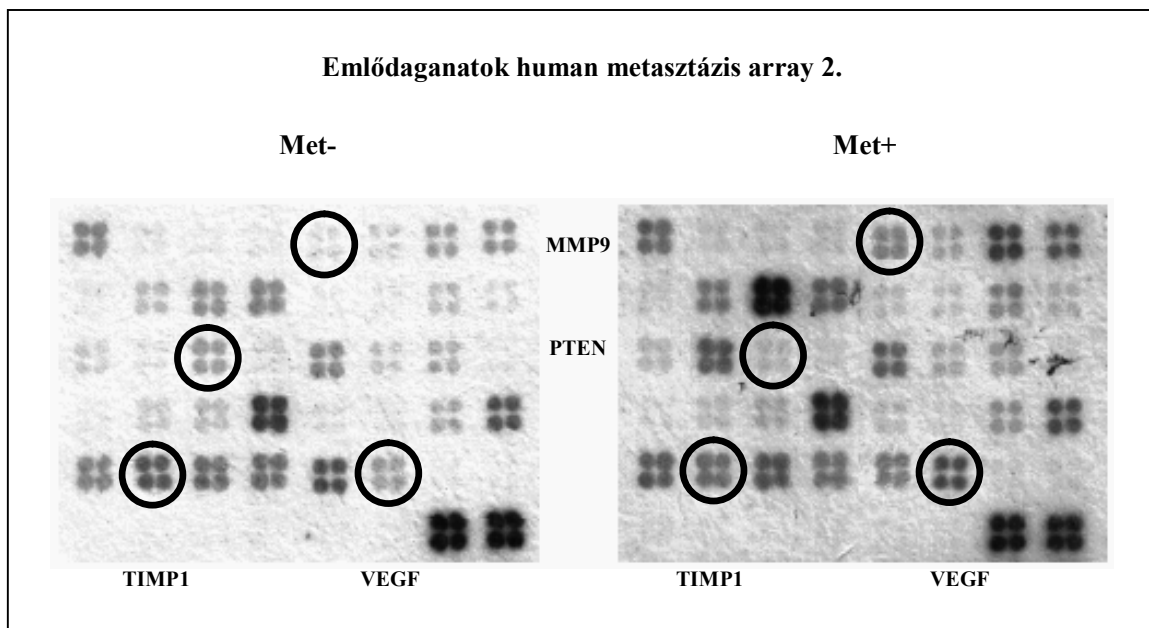
BRMS1 (BrMS1), CD44, DCC, KAI1, KISS1 (KiSS-1), MAP2K4 (mkk4 (JNKK1), MTA1, NM23A (NM23), NME4, PTEN

tartalmazott.

Az általunk vizsgált emlő daganatok egyik reprezentatív „metasztázis cDNS array”-t az **4., 5. ábra** szemlélteti.

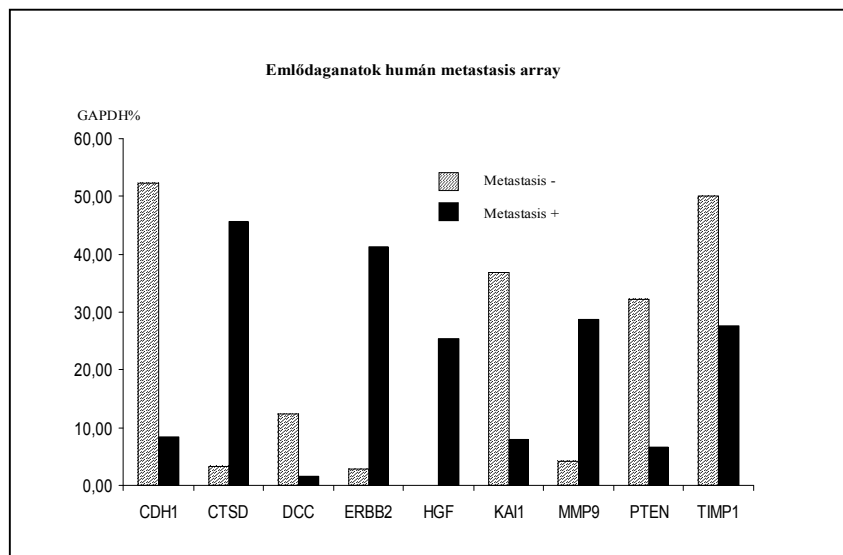


4. ábra



5. ábra

A metasztázist adó daganatokban a sejtheadhéziót biztosító Cadherin E (CDH1) szint alacsony. A metasztázist gátló tumor szuppresszor gének DCC és KAI1 PET expressziója szintén alacsony az áttétet adó daganatokban. Ezzel szemben az MMP9 proteáz a Cathepsin D hidroláz szint magasabb az áttétet adó daganatokban (4., 5., 6. ábra).



6. ábra

Figyelemre méltó, hogy a metasztatizáló daganatokban az Erbβ2 szint magasabb, mint az in situ emlőrákokban, amely magas VEGF szinttel társul. Az általunk alkalmazott cDNS chip vizsgálatok alkalmasak a daganatok HER2 statusának és az ehhez társuló metasztázis kaszkád enzimek analizisére is. A vizsgálatok elősegíthetik új kombinációs terápiás eljárások kifejlesztését (kináz gátlók, antiangiogenetikus terápia).

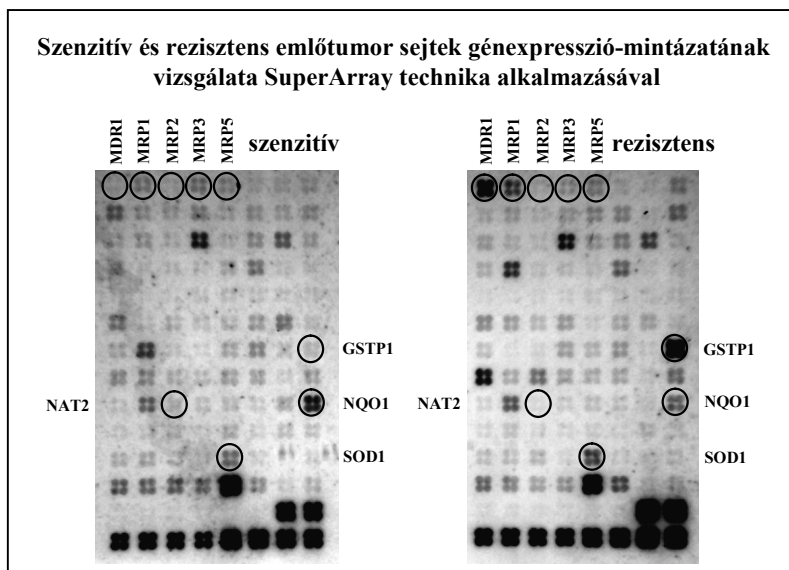
2.2. DNS chip alkalmazása az emlődaganatok terápiás érzékenységének vizsgálatára

Az emlő daganatok terápiás kezelésében a Taxán származékok alkalmazása nagy jelentőséggel bír. A Taxán kezeléssel szemben azonban az emlő daganatok rezisztenssé válhatnak. Vizsgálataink arra irányultak, hogy a Taxoter kezeléssel szemben kialakuló rezisztencia mechanizmusát felderítsük. A retrospektív vizsgálataink során nyert eredmények a későbbiekben az emlő daganatok Taxán kezeléssel szembeni rezisztencia predikciójára is felhasználhatók lesznek.

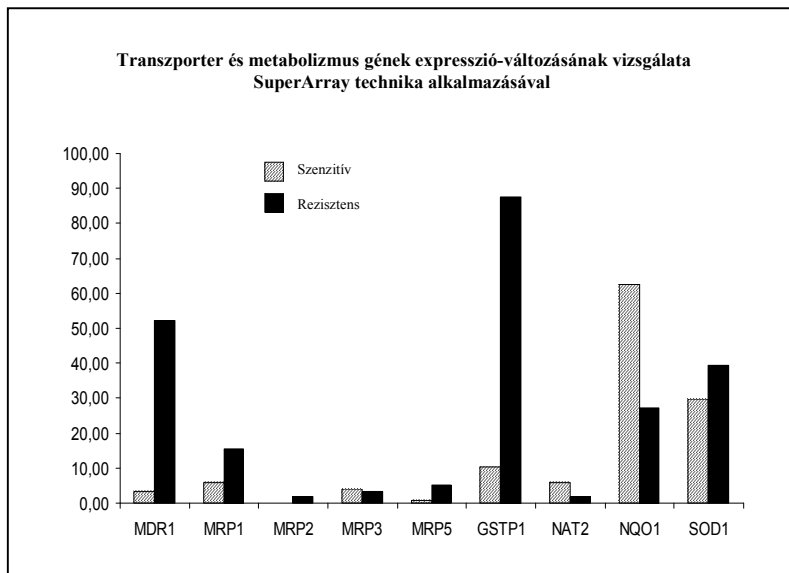
Vizsgálatainkban 65 Taxán rezisztens és 165 szenzitív emlő daganatos mintából RNS-t, DNS-t izoláltunk. A Taxoter transzportban szerepet játszó MDR1 gén polimorfizmust (Exon 12 C1236T) SSCR és DNS szekvencia analízissel vizsgáltuk.

Az MRP1-MRP5, valamint HER2 és EGFR expresszió mértékét cDNS chip segítségével határoztuk meg.

Megállapítottuk, hogy a Taxoter rezisztens daganatokban az MDR1 és MRP1 szint magasabb, mint a Taxoter szenzitív daganatokban. A gyógyszermetabolizáló enzimek közül a GSTP1 génextpresszió mértéke szintén a rezisztens daganatokban magasabb (7., 8. ábra).



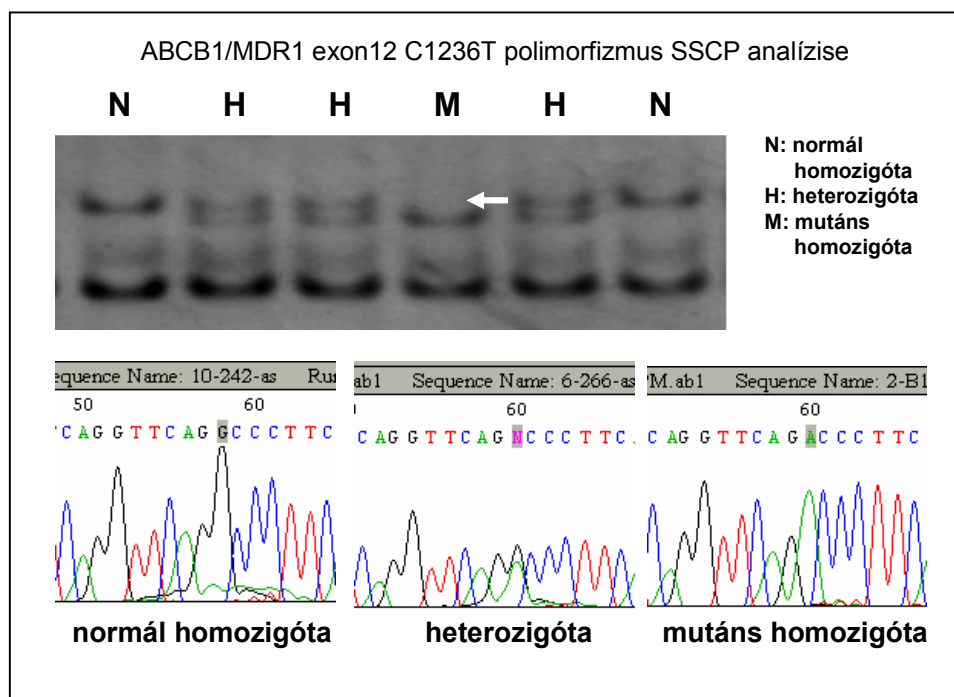
7. ábra



8. ábra

Az EGFR és HER2 expresszió mértéke szintén magasabb a Taxoter rezisztens daganatokban. Figyelemre méltó, hogy az EGFR és HER2 overexpresszió együttesen fordul elő, amely arra hívja fel a figyelmet, hogy a tirozin kináz gátlók és Herceptin kezelés együttes alkalmazása mellett a gyógyulás esélye megnövekedhet.

Az MDR1 gén polimorfizmus kimutatásának SSCP és DNS szekvenálós analízisét a **9. ábra** szemlélteti. Vizsgálatainkban a Taxán rezisztens minták mutáns allél frekvenciája 57%.



9. ábra

Vizsgálataink szerint a Taxoter rezisztencia kialakulásához a transzport fehérjék polimorfizmusához (MDR1) transzport gének közül az MDR1, MRP1 emelkedett expressziója, valamint az EGFR, HER2 gének overexpressziója járul hozzá.

Az általunk végzett génpolimorfizmus és cDNS chip vizsgálatok elősegítik a Taxán rezisztencia mechanizmus megismerését és a hatékonyabb kombinációs terápiás eljárások kifejlesztését.

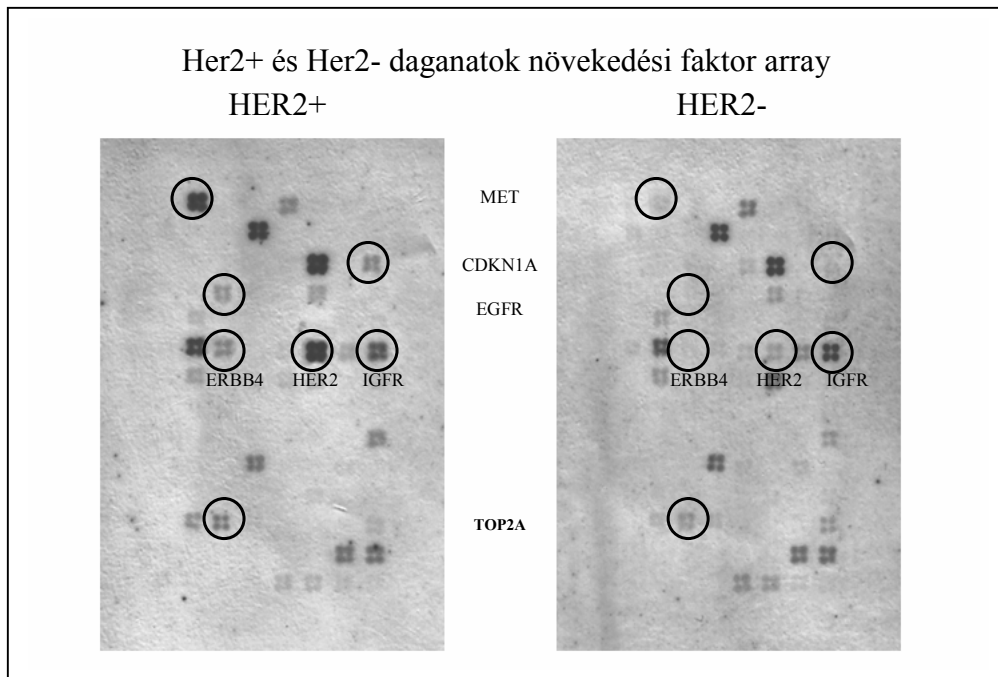
2.3. HER2 pozitív, HER2 negatív emlő daganatok „genetikai lenyomatának” meghatározása DNS chip módszerrel.

Bebizonyosodott, hogy az emlő daganatok 25-30%-ában a HER2 gén amplifikálódik. A HER2 overexpressziót mutató daganatok sugár- és kemoterápiás kezeléssel szemben általában rezisztensek, prognózisuk kedvezőtlen. Ennek alapján feltételezhető, hogy a HER2 pozitív és HER2 negatív emlő daganatok tumor biológiai sajátosságai: áttétképződés, angiogenezis, proliferációs képességük egymástól jelentős mértékben eltérnek.

Vizsgálatainkban ennek megfelelően HER2 pozitív és HER2 negatív emlő daganatok jellemzésére cDNS array alkalmazásával a következő géncsoportok expressziós szintjét határoztuk meg: 1., növekedési faktor receptorok (Erbβ-1-4, met, IGF1R) expressziós mértékét, 2. metasztázishoz kapcsolódó proteázok, 3. sejtproliferációt szabályozó gének, 4. rezisztencia gének.

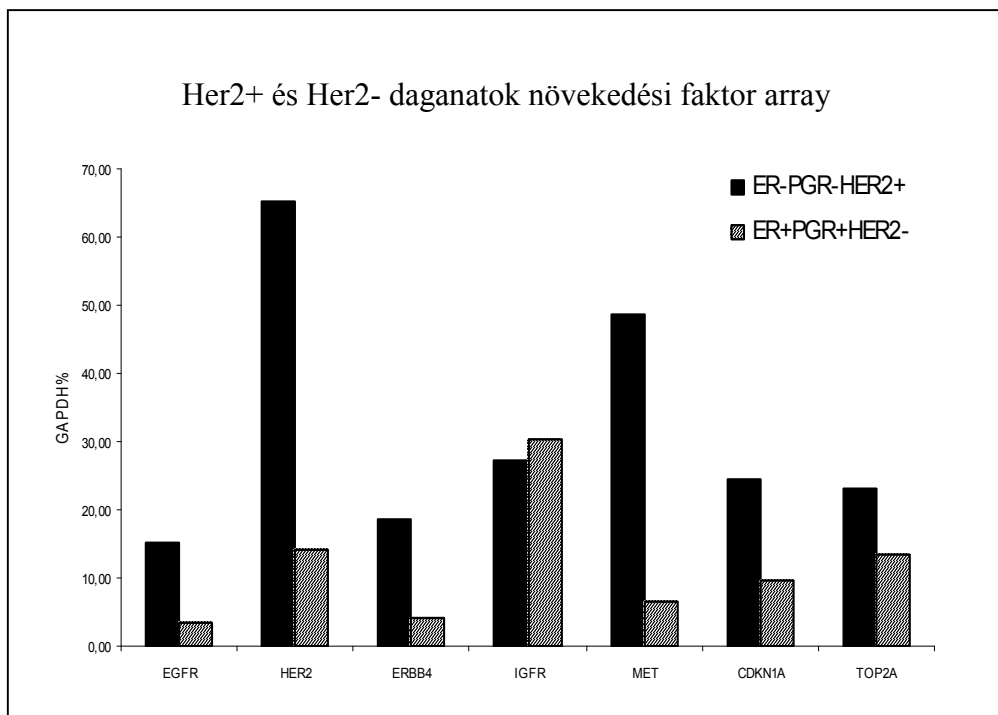
A HER2 pozitív és HER2 negatív daganatokból 15-15 daganatból pooloztunk és az így nyert cDNS mintákat analizáltuk 4 különböző típusú cDNS chip felhasználásával. A teljes mintaszámú HER2 negatív daganatok esetében 75, HER2 pozitív daganatok száma 60 volt.

A HER2 pozitív és HER2 negatív daganatok vizsgálatára alkalmas növekedési faktor cDNS chipet a **10. ábrán** mutatjuk be.



10. ábra

A housekeeping GAPDH%-ban kifejezett növekedési faktor receptor gének expresszió szintjét a **11. ábrán** foglaltuk össze.

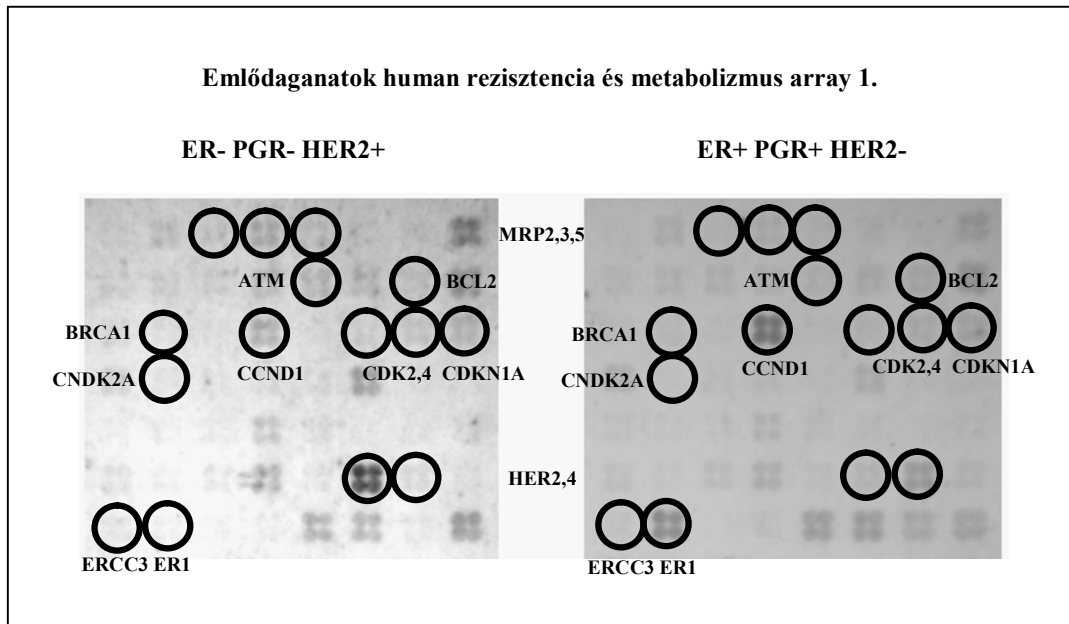


11. ábra

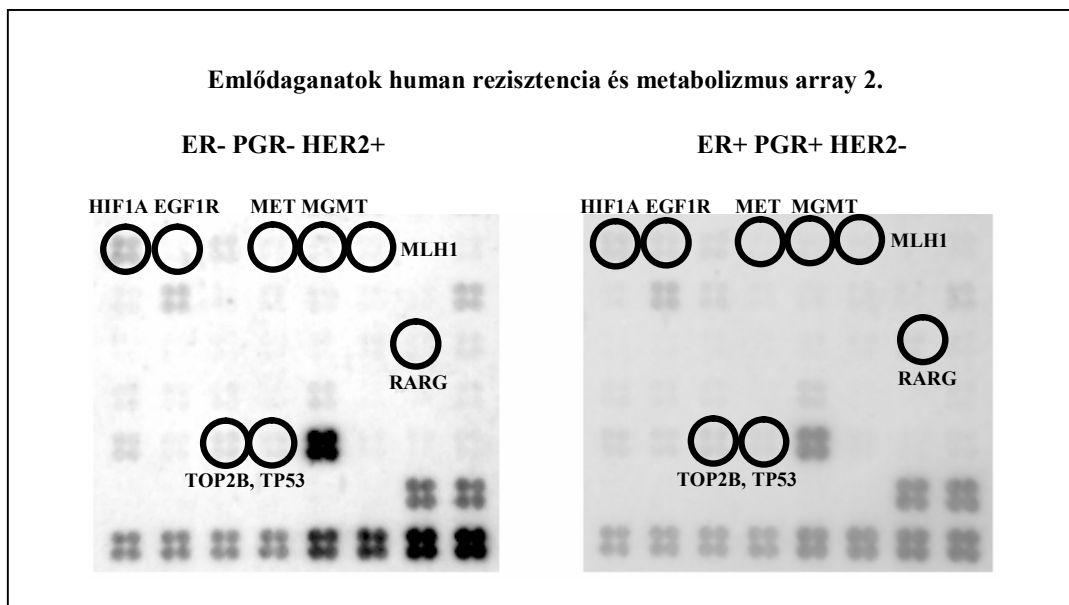
Eredményeink szerint a HER2 pozitív daganatokban az Erbβ1 és Erbβ2 szint magasabb, mint a HER2 negatív daganatokban. Az Erbβ4, az IGFR1 szint viszont a HER2 negatív daganatokban megemelkedik.

Bebizonyosodott, hogy egyedül a HER2 status meghatározása nem alkalmas az emlődaganatok kemoszenzitivitásának jellemzésére. Az ErbB családba tartozó receptorok (ERbβ1-4) egymással heterodimereket képezve alternatív növekedési szignálokat közvetítenek. Ennek alapján az Erbβ receptorok gátlására alapozó terápiás stratégia akkor megfelelő, ha mind az Erbβ1, mind az Erbβ2 receptorokat kombináció terápia alkalmazásával gátoljuk (pl. Herceptin + tirozin kináz gátlók).

A HER2 pozitív daganatok fokozott metasztatizáló képességének egyik oka, hogy ezen daganatokban a matrix metalloproteázok (MMP2, MMP9, MMP14), valamint az urokináz típusú plazminogén aktivátor szint (Plau) magasabb, mint a HER2 negatív daganatokban (12., 13. ábra).

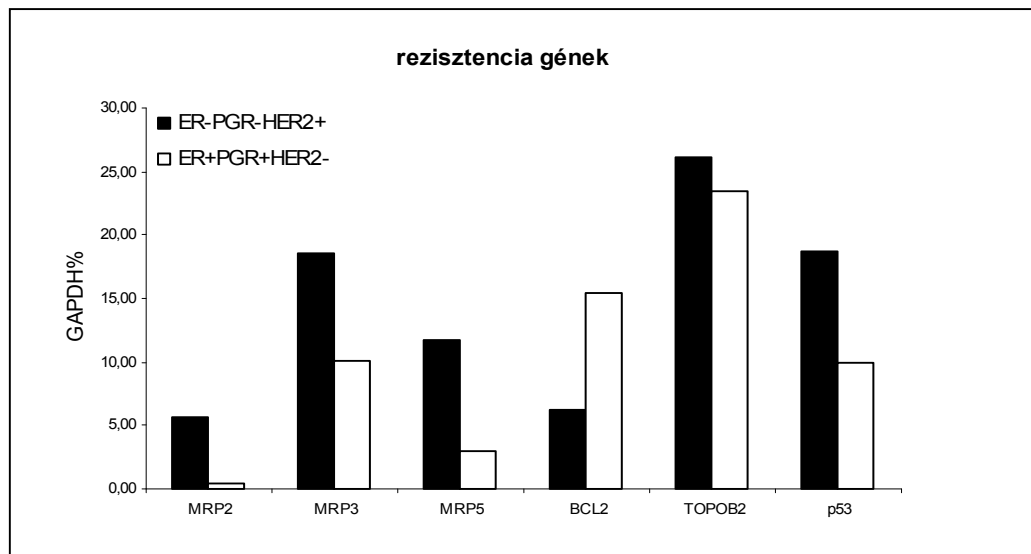


12. ábra

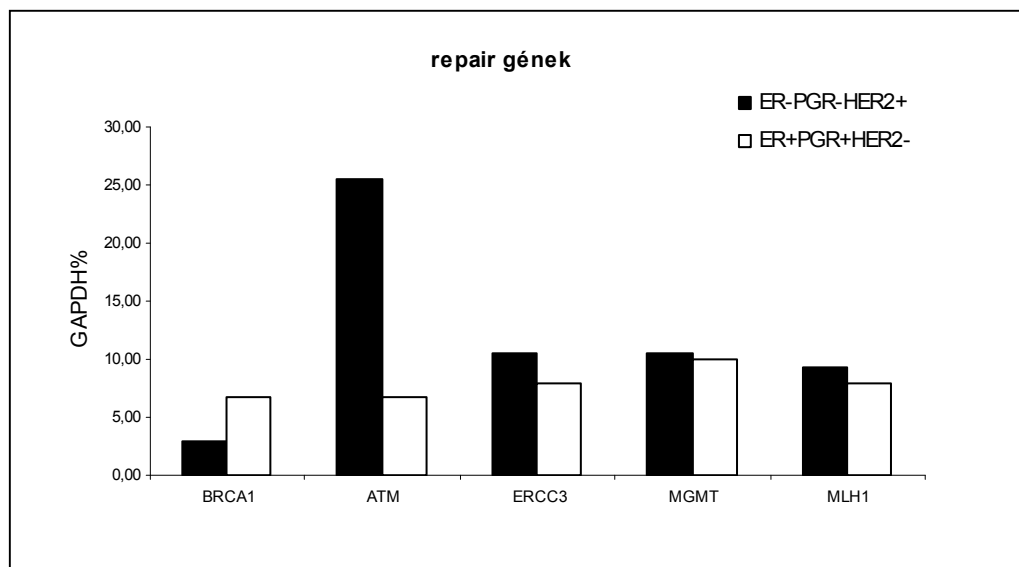


13. ábra

A rezisztencia faktorokat vizsgálva megállapítható, hogy a transzport fehérjék közül az MRP2, MRP3 és MRP5 szint a HER2 pozitív tumorokban magasabb, mint a HER2 negatív daganatokban (14., 15. ábra).



14. ábra



15. ábra

Vizsgálataink szerint a HER2 pozitív és HER2 negatív emlő daganatok genetikai lenyomata jelentős mértékben különbözik egymástól, amely főleg a metasztázist elősegítő proteázok emelkedett szintjében a transzport fehérjék fokozott expressziójában nyilvánul meg. Adataink alátámasztják és magyarázatul szolgálnak a HER2 pozitív és HER2 negatív emlő daganatok eltérő tumor biológiai sajátosságára és elősegíthetik az optimális terápia terv kialakítását.