

Vastagbél-daganatok ellenanyag-microarray-vel kimutatott, TMA-validált progressziós markerei

SPISÁK SÁNDOR DR.¹ ■ GALAMB BARNABÁS DR.¹

WICHMANN BARNABÁS DR.¹ ■ SIPOS FERENC DR.¹

GALAMB ORSOLYA DR.¹ ■ SOLYMOSI NORBERT DR.¹ ■ NEMES BALÁZS DR.²

TULASSAY ZSOLT DR.¹ ■ MOLNÁR BÉLA DR.¹

Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, ¹II. Belgyógyászati Klinika

²Transzplantációs és Sebészeti Klinika, Budapest

Háttér: A vastagbél-daganatok kialakulásának és progressziójának molekuláris folyamata, valamint az ennek hátterében álló fehérjeszintű változások nem ismertek. A microarray-rendszerek alkalmazása több száz vagy ezer fehérjekomponens párhuzamos vizsgálatával újabb információkat adhat ezeknek a kérdéseknek a megválaszolásához. **Célkitűzés:** A daganatkialakulás és -progresszió fehérjeszintű markereinek azonosítása ellenanyagcsípekkel, valamint validálása szöveti microarray-rendszerral. Célunk továbbá olyan fehérjeszintű markerkombinációk azonosítása, amelyek lehetővé teszik a korai és kései vastagbél-daganatok molekuláris módszerekkel történő elkülönítését és diagnosztizálását. **Anyag és módszer:** Tíz Dukes B, valamint 6 Dukes D stádiumú beteg sebészi úton eltávolított, friss fagyasztott daganatos és ép mintáit vizsgáltuk meg. A homogenizált mintákból nyert yers fehérjépreparátumokat Clontech AB500 array-re hibridizáltuk. Tizenkét kiválasztott gén validálása szöveti microarray (TMA) -technológiával történt. **Eredmények:** A makroszkóposan ép és daganatos területek között 67 szignifikáns, fehérjeszinten eltérő expressziót mutató gént azonosítottunk ($p < 0,05$), amelyek az apoptózis (5), sejtciklus-szabályozás (7), transzkripciószabályozás (4) és DNS-replikáció (6), illetve más olyan, mint transzport, sejtadhézió (45) sejtfunkcióiban vesznek részt. Immunohisztokémiai alapú TMA-val igazoltuk 12 marker: a CYCA1, HSP60, TOP1, APC, CBP, ERK, EGFR, C-myc, Cald, DARPP32, MRE11A, AR, EPS8 génekben kapott eltéréseket morfológiai szinten is. **Megbeszélés:** Eredményeink szerint a tumoros kialakulás fehérjecsíppel meghatározott, morfológiai szinten ellenőrzött markerei a sejtfunkció széles spektrumát érintik. A daganat progressziós markerei az apoptózis, sejtciklus szabályozása és a jelátviteli utak sejtfunkcióit érintik. Sikerült egy olyan 6 fehérjéből álló markerkombinációt meghatározunk, amely lehetővé teszi a korai és késői daganatok elkülönítését.

Kulcsszavak: vastagbél-daganat, proteomika, ellenanyag-microarray, szöveti microarray, diagnosztika

Tissue microarray (TMA) validated progression markers in colorectal cancer using antibody microarrays

Background: The exact molecular biological background of colorectal cancer development and progression are not hitherto known. Using microarray systems, hundreds or thousands of parameters could be examined simultaneously for answering the mentioned questions. **Aim:** To identify possible protein markers of colorectal cancer development and progression using antibody array, and the validation of these markers on tissue microarrays done with colorectal cancer samples. Furthermore, to determine colorectal cancer diagnostic marker combination in protein level. **Materials and methods:** Surgically resected samples from ten Dukes B and six Dukes D stage patients containing both diseased and un-involved parts of the colon were freshly frozen. The samples were homogenized and the extracted proteins were used for Clontech AB500 arrays. Twelve selected genes were validated on tissue microarrays. **Results:** The expression of 67 proteins was altered ($p < 0.05$) between the normal colon and cancerous samples. These genes are related to apoptosis ($n = 5$), cell cycle regulation ($n = 7$), transcription ($n = 4$), DNA replication ($n = 6$) and other cell functions, such as transport and cell adhesion ($n = 45$). Twelve potential markers were immunohistochemically validated on morphological level by using tissue microarrays (CYCA1, HSP60, TOP1, APC, CBP, ERK, EGFR, C-myc, Cald, DARPP32, MRE11A, AR, EPS8). **Conclusion:** Based on these results, validated colorectal cancer development related protein markers are involved in a wide spectrum of cell functions such as apoptosis, cell cycle regulation, and signal transduction. A set of six proteins has been determined, which helps to differentiate between normal specimen, early and late stage colorectal cancer with high sensitivity and specificity.

Keywords: colorectal cancer, proteomics, antibody microarray, tissue microarray, diagnostics

(Beérkezett: 2009. június 19.; elfogadva: 2009. június 22.)

A CRC a fejlett országok második leggyakoribb neoplasztikus halál oka [1, 2], amelynek molekuláris hátterében különböző genetikai útvonalak károsodásai mutathatók ki. Az útvonalak károsodásának különböző molekuláris okai lehetnek, mint például: egyrészt a DNS-ben bekövetkezett változások (SNP, inszerció, deletio, duplikáció, metiláció), másrészt a transzkripcionális és transzlációs szabályozásban bekövetkezett változások (splicing, miRNA, foszforiláció, glikoziláció, komplex képzés és különféle interakciók), valamint ezek kombinációja. Azonban ezeknek a fehérjeszinttel való összefüggései még nem tisztázottak. Ebben a közleményben azt vizsgáljuk, hogy a betegség kialakulása és fejlődése során hogyan változik több száz fehérje szintje, valamint ez a megváltozott fehérjeszint alkalmas-e molekuláris klasszifikációra.

A jelenlegi molekuláris patológiai csoportosítás alapja a kromoszomális vagy a mikroszatellita instabilitás, illetve a CpG-sziget metilátor fenotípus megléte vagy hiánya. A mikroszatellita instabilitás bizonyos DNS hibajavító enzimek funkciójának (mismatch repair, MMR) károsodása (mutáció vagy metiláció) következtében előforduló jelenség, amelynek során genomátrendeződés következtében gének, miRNS-ek aktiválódhatnak és inaktíválódhatnak [3, 4, 5, 6]. A mutációk számának növelésével tumorsuppresszor gének inaktívációja történhet (IGF2R, BAX) [7, 8, 9]. A megváltozott metilációs státus is fontos szerepet játszik a vastagbélrák kialakulásában és a genomiális instabilitással is összefüggésbe hozható. A daganatos sejtekben levő gének kódolórégiójának 5' promóter régióiban a hipermetiláció jellemző, ezzel előidézve bizonyos gének, esetleg tumorsuppresszorok (p16, RB1, E-kadherin) inaktívációját. Az adenoma-karcinóma szekvencia során kromoszomális instabilitás, aneuploidia kialakulása figyelhető meg. Első lépésben az APC gén mutációjának következtében a normál epitheliumból diszplasztikusan aberráns kripták, majd kezdeti adenoma alakul ki [10, 11, 12]. Ezt követi a K-Ras gén mutációja, ami átmeneti adenoma kialakulásához vezet. Az átmeneti adenomákból a DCC gén, valamint az MMR gének germline mutációjával kései adenoma alakul ki. A folyamat a p53 gén mutációjával folytatódik, és vezet a karcinóma kialakulásához [13, 14].

Az elmúlt években több száz vagy ezer sejtalkotó párhuzamos vizsgálatára alkalmas, úgynevezett array-technikák jelentek meg, először mRNS-expresszió, majd SNP- és DNS-metiláció és végül fehérjeszinten történő változások kimutatására [15, 16].

A teljes genomvizsgálati módszerek lehetőséget adtak újfajta molekuláris expressziós mintázaton alapuló vastagbélrák-csoportosítás létrehozására [17, 18, 19, 20, 21, 22]. A mintázatok diagnosztikai alkalmazása is felmerül [17, 18, 23] munkacsoportunk korábbi eredményei alapján.

Jelentős különbségeket sikerült azonosítani jobb és bal oldali daganatok között, amelyből származó mintá-

zat alapján egyértelműen elkülöníthető a két csoport. Olyan géneket sikerült így azonosítani, mint a RAD52 és UBL1, amelyek a DNS-javító mechanizmusban vesznek részt. Ez az eredmény erősíti azt a megfigyelést, hogy a jobb oldali daganatok esetében gyakoribbak az MSI-tumörök. Negyvenöt daganatos mintát megvizsgálva 58 expressziós különbséget mutató gént azonosítottak jobb és bal oldali daganatok között [24]. Azt találták, hogy a kreatin-8, -19 és -20, valamint a karbon anhidráz-II, -IV és -VI a bal oldali tumorokban alulreguláltak, míg a teratocarcinoma growth factor és a ciklooxygenáz-2 a bal oldali tumorokban felülexpresszáltak.

A daganatos progresszió, vagyis a tumor metasztatizálóképességének megítélésére huszonkét tumoros szövetet vizsgált meg *Bertucci és munkacsoportja*. A metasztatizáló és nem metasztatizáló daganatok között 224 génben találtak szignifikáns eltérést [25]. Microarray felhasználásával azt találták, hogy az oszteopontin szintje adenomákban megemelkedik, míg tumorban 15-szörös, metasztatizációban pedig 27-szeres expressziós növekedést mutat [26, 27].

A daganatkialakuláshoz vezető molekuláris elváltozások felderítésére fehérjeszinten is van lehetőség array-módszerek alkalmazására [23]. Az elmúlt években a hagyományos MS és 2-D ELFO eljárások mellett a proteinszepek (antitesteket tartalmazó array a szöveti lizátumban levő fehérjemarkerek kimutatására) is elérhetővé váltak. Ez a technológia nem csupán kvalitatív expressziós mintázatokat eredményez, hanem a konkrét fehérje mennyiségének meghatározására is alkalmas lehet. További előnye a fehérjecsipeknek, hogy a két klasszikus proteomikai technológiánál egyszerűbb mintaelőkészítést igényel.

Vizsgálataink célja a vastagbél-daganatok kialakulásának és progressziójának fehérjeszintű markereinek azonosítása volt proteinszepekkel. Eredményeinket szöveti szinten immunhisztokémiával verifikáltuk. A proteinszepek és RNS-expressziós csip eredményei közötti összefüggést ugyanabból az esetből származó ép és beteg minták fehérje- és RNS-preparátumaiból vizsgáltuk.

Anyagok, módszerek

Mintagyűjtés

A vizsgálatokat 16 CRC-s (10 Dukes B és 6 Dukes D stádiumú) (1. táblázat) beteg sebészeti úton eltávolított mintáin végeztük. A reszekció után legfeljebb 10 perccel a párhuzamosan az ép, reszekciós véghez közeli nyálkahártyából, valamint a beteg szövetből vett 1 g szövetet helyeztünk folyékony nitrogénbe. A mintákat ezt követően -80 Celsius-fokon tároltuk. Az egészséges és a beteg szövetből FFPE-minták is készültek a patológiai feldolgozás során a patológiai diagnózis, valamint a TMA-k elkészítéséhez.

1. táblázat | Szöveti és beteg adatok

Azonosító	Kor	Nem	Diagnózis	Dukes-beosztás	Szöveti	Áttét
5	80	F	Tu. recti	B	jól differenciált adenokarcinóma	–
8	58	F	Tu. sigmatis	D	mérsékelt differenciált adenokarcinóma	máj
11	66	M	Tu. sigmatis	B	mérsékelt differenciált adenokarcinóma	–
12	56	F	Tu. sigmatis	D	mérsékelt differenciált adenokarcinóma	–
13	69	M	Tu. sigmatis	D	rosszul differenciált adenokarcinóma	máj, tüdő
15	72	M	Tu. recti	D	rosszul differenciált adenokarcinóma	máj, tüdő, agy
16	82	M	Tu. recti	B	mérsékelt differenciált adenokarcinóma	máj
18	55	M	Tu. recti	B	jól differenciált adenokarcinóma	–
20	62	M	Tu. recti	B	mérsékelt differenciált adenokarcinóma	–
22	64	F	Tu. sigmatis	B	jól differenciált adenokarcinóma	–
31	52	M	Tu. recti	B	jól differenciált adenokarcinóma	–
32	59	F	Tu. recti	B	mérsékelt differenciált adenokarcinóma	–
33	70	F	Tu. recti	D	mérsékelt differenciált adenokarcinóma	máj
39	62	M	Tu. sigmatis	D	rosszul differenciált adenokarcinóma	máj
45	59	M	Tu. sigmatis	B	jól differenciált adenokarcinóma	–
46	83	M	Tu. recti	B	mérsékelt differenciált adenokarcinóma	–

Fehérjeizolálás

A fagyasztott mintákat lízispufferben homogenizáltuk, majd jégen minden gramm kiindulási szövethez egy gramm alumínát (Sigma Aldrich) adtunk. Ezt erőteljes keveréssel (vortex) homogenizáltuk, majd 10 percen keresztül 25 000 g-vel centrifugáltuk. A felülúszót, ami a nyers fehérje preparátumot (crude extract) tartalmazza, 100 µl-es adagokban –80 Celsius-fokon tároltuk a felhasználásig.

Clontech AB 500 arrayanalízis

A nyers fehérje preparátumok koncentrációját BCA-módszerrel határoztuk meg, majd 1 mg/ml koncentrációjú munkaadatokat készítettünk a tumoros és normál mintákból egyaránt. A jelöléshez monoreaktív Cy3 és Cy5 fluoreszcens festékeket (Amersham, GE Healthcare) használtunk a gyártó előírása szerint. A jelölést keresztjelölés (dye swap) módszerrel végeztük, ahol az „A” reakcióban a tumoros mintát pirossal (Cy5), a normál zölddel (Cy3) jelöltük, majd a párhuzamos minták jelölése a „B” reakcióban színcserével történt. A jelölt fehérje tisztítását és a nem kötődött festékek eltávolítását CD10-es oszlopon (Amersham, GE Healthcare) végeztük.

A jelölt és tisztított fehérjék koncentrációját ismételt meghatározást BCA-módszerrel, majd ekvivalens mennyiségben összekevertük (100–100 µg), és 30–30 µg-ot felhasználva elkészítettük a hibridizációs koktejlét. Ezt Clontech AB500 array-re (Clontech) hibridizáltuk az alkalmazott kit leírása szerint. A hibridizáció után a nem kötődött molekulákat abszolút etanollal történő mosással távolítottuk el, majd száradásig centrifugáltuk.

A száraz lemezeket a fluoreszcens leolvasásig (scan) sötét helyen tároltuk.

A lemezeket Axon 4000B típusú szkennel (Axon Instruments, Amerikai Egyesült Államok) digitalizáltuk 532 és 635 nm-en. A gyártó által javasolt 33%-os lézererő, valamint 560 és 670 PMT-erősítés, valamint 20 µm/pixel felbontás mellett és GenePix 4.1 szoftverrel értékeltük ki (Axon instruments). Az arrayháló (Lot: 5010317) illesztése után meghatároztuk a fluoreszcenciaintenzitásokat, valamint a háttérintenzitásokat mindkét csatornán. Ezt követően helyi háttérkorrekciót végeztünk. Az adatokat gpr és csv formátumban rögzítettük (exportáltuk). Az elemzést R környezetben végeztük, Bioconductor programcsomagok felhasználásával. A háttérkorrekciót elvégzése után (RMA, normexp), a csiperedmények normalizációjára quantile módszert alkalmaztunk.

Az expressziós különbséget mutató gének azonosítása a normalizált M értékek alapján történt:

$$M = \log_2(R/G),$$

vagyis M a piros (R) és a zöld (G) csatornán mért fluoreszcenciaintenzitások kettes alapú logaritmusainak különbsége.

A szignifikáns eltérést mutató határfehérje-markerek esetén $M = \pm 0,5$ értéknél van, vagyis 30%-nál nagyobb változás esetén már megbízhatónak tekinthető a változás.

Szöveti microarray-analízis

A fehérjecsip eredményeit TMA (szöveti microarray) technológiával igazoltuk további, független minták bevonásával. A validációba 15 egészséges területről szár-

mazó minta mellett 36 különböző lokalizációjú, differenciáltságú, valamint Dukes (B, D) stádiumú mintákat is bevontunk. A szöveti microarray 2 mm-es mintákat tartalmazott 24-es blokkokban. A TMA-blokkokból 5 µm-es sorozatmetszeteket készítettünk, majd a következő fehérjékre specifikus ellenanyagokkal immunhisztokémiai festéseket végeztünk el: APC, Caveolin, CBP, cyclinA, ERK, HSP60, Cox2, EGFR, C-myc, Cald, Top1, DARPP32, MRE11A, AndrogenR, EPS8. A megfestett sorozatmetszeteket Mirax Desk rendszerrel digitalizáltuk (3DHISTECH Kft., Budapest), majd TMA virtuális mikroszkóppal értékeltük ki (3DHISTECH Kft., Budapest).

Immunohisztokémia

A paraffinmentesítést követően 20 perces hőindukciós antigénfeltárást végeztünk citrátpufferben. A kötődött ellenanyagokat standard indirekt immunoperoxidáz reakcióval tettük láthatóvá, kromogénként diaminobenzidint használtunk (Dako). Az immunohisztokémiai festésekhez Abgene és Dako ellenanyagokat használtunk, a gyártó utasításai alapján.

Statisztikai kiértékelés

Az ellenanyagarray és az immunohisztokémiai alapú szöveti microarray-vizsgálatok kiértékelése R környezet-

ben Bioconductor programcsomagok felhasználásával történt.

Eredmények

Normál és tumoros csoportok (normál vs. Dukes B és Dukes D) elkülönítése

A tumoros csoportokat összevontan a normálhoz hasonlítottuk, majd meghatároztuk a különbözően expresszáló fehérjék listáját (1. ábra).

A két csoport között 67 szignifikánsan változó gént sikerült azonosítanunk fehérjeszinten. Ezeket a géneket a funkcionális csoportosítás alapján apoptózis (5), sejtciklus-szabályozás (7), transzkripciószabályozás (4), DNS-replikáció (6) és molekuláris transzport, sejtdhézió (45), sejtfunkció területére tudtuk lokalizálni. Az expressziós különbségeket mutató gének közül a 10-10 leginkább növekedést és csökkenést mutató fehérje sejtfunkció szerinti csoportosítását a 2. táblázat szemlélteti.

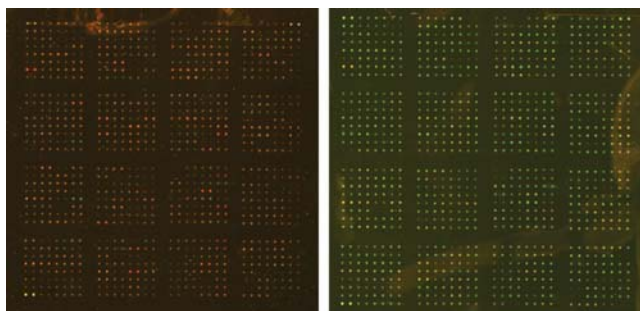
AB array eredmények verifikációja TMA-technológiával

Normál-tumor

Normál- és tumoros minták között a TOP1, CCNA1 és a HSP60 géntermékek fokozódását, míg az APC

2. táblázat | 20, szignifikáns (10 lefelé és 10 felfelé) változást mutató fehérje a daganatos és ép területek között, sejtfunkció szerint csoportosítva

Génnev	SwissProt ID	Sejtfunkció	M-érték	P-érték
Ubiquitin-conjugating enzyme E2E 1 (UBC4/5 homolog, yeast)	P51965	fehérjelebontás	-1,319	0,002
Sequestosome 1	Q13501	sejtdifferenciáció	-1,044	0,005
KH domain containing, RNA binding, signal transduction associated 1	Q07666	sejtproliferáció	-0,733	0,008
Branched chain aminotransferase 1, cytosolic	P54687	sejtproliferáció	-0,719	0,008
Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1B (dopamine and cAMP regulated phosphoprotein, DARPP-32)	Q9NNW1	jelátvitel	-0,616	0,035
Syntaxin 8	Q9UNK0	transzport	-0,541	0,029
Plectin 1, intermediate filament binding protein 500kDa	Q15149	sejtváz-kialakítás	-0,478	0,005
Nitric oxide synthase 1 (neuronal)	P29475	sejtek közötti kommunikáció	-0,408	0,025
Adenomatous polyposis coli	P25054	jelátvitel	-0,397	0,026
Caldesmon 1	Q05682	izom-összehúzódnás	-0,392	0,022
Proteasome (prosome, macropain) activator subunit 3 (PA28 gamma; Ki)	Q12920	immunválasz	0,389	0,033
Serine/threonine kinase 24 (STE20 homolog, yeast)	Q9Y6E0	jelátvitel	0,431	0,003
Topoisomerase (DNA) I	P11387	DNS-térszerkezet	0,435	0,008
Thioredoxin-like, 32kDa	O43396	apoptózis	0,474	0,001
Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1	P04901	jelátvitel	0,478	0,004
F11 receptor	Q9Y624	gyulladás	0,529	0,005
Cyclin A1	P20248	sejtciklus	0,543	0,002
Nuclear mitotic apparatus protein 1	Q14980	sejtciklus	0,571	0,004
CDC-like kinase 1	P21127	sejtproliferáció	0,578	0,003
Heat shock 60 kDa protein 1 (chaperonin)	P10809	fehérjeszerkezet	0,635	0,004



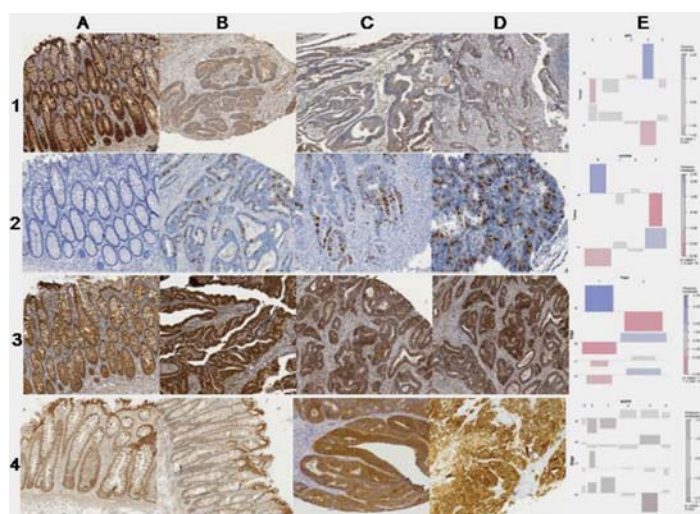
1. ábra

Az ellenanyag microarray (AB array) hibridizációs képe és a 2 fluoreszcens festéket alkalmazó keresztjelölés eredménye

fehérje csökkenését sikerült TMA-val visszaigazolnunk (2. ábra). A v-myc esetében ugyan szignifikáns ($p = 0,019$), de nagyon kismértékű csökkenést ($M = -0,16$) tapasztaltunk fehérjecsipen. Immunohisztokémiával jelentős mértékű csökkenést sikerült igazolnunk. Az AR esetében proteincsip alapján csökkenést tapasztaltunk, de az immunohisztokémia növekedést igazolt a tumoros mintákban.

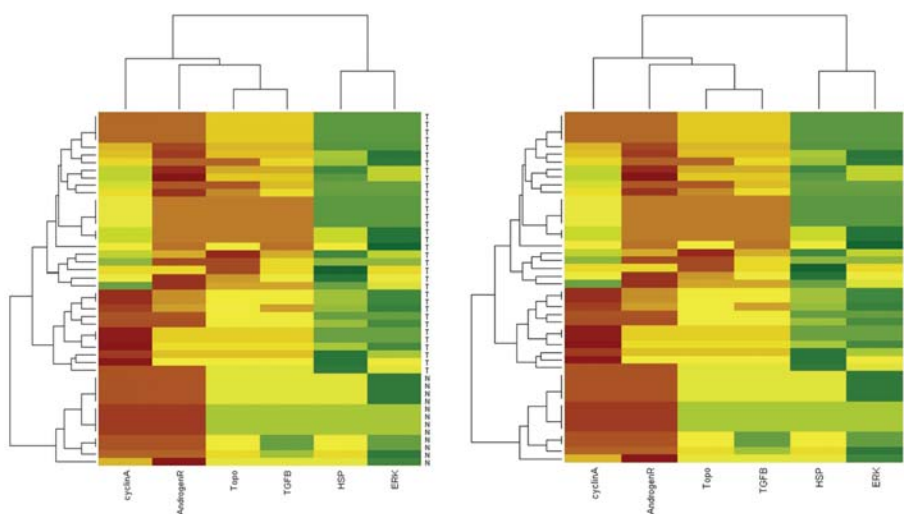
Validációs eredmények

Korábbi eredményeinkkel egybecsengenek azok az irodalmi megfigyelések, amelyek szerint egyetlen marker



2. ábra

A kiválasztott fehérjemarkerek TMA-validációja. Az adenomatosus PC, cyclin A1, topoisomerase-1 és az epidermalis növekedési faktor receptor (EGFR) fehérjék expressziója morfológiai szinten. APC immunohisztokémia egészséges nyálkahártya (1A), Dukes B (1B), Dukes B (1C) és Dukes D (1D) stádiumú vastagbél-daganat-metszeteken, valamint a festés eredményeit összegző asszociációs plot (1E), ami a festődések erősségének gyakoriságát mutatja. Cyclin A1 immunohisztokémia normális (2A), Dukes B (2B), Dukes B (2C), Dukes D (2D) stádiumú vastagbél-minták metszetein, valamint a kapcsolódó asszociációs plot (2E). Topoisomerase-1 immunohisztokémia normális (3A), Dukes B (3B), Dukes B (3C), Dukes D (3D) stádiumú vastagbél-minták metszetein, valamint a kapcsolódó asszociációs plot (3E). EGFR-immunohisztokémia ép (4A), ép (4B), Dukes B (4C), Dukes D (4D) stádiumú vastagbél-minták metszetein, valamint a kapcsolódó asszociációs plot (4E).



3. ábra

Hierarchikus clusteranalízis a TMA-vizsgálat után kiválasztott 6 expressziós különbséget mutató fehérjemarkerekkel a vastagbél-daganat-típusok elkülönítésére

nem alkalmas a CRC betegségcsoportok elkülönítésére. Ezért olyan markerszetek (kombinációk) meghatározását terveztük, amelyek alkalmasak lehetnek a probléma megoldására.

A marker szetek diszkrimináló erejének teszteléséhez független mintákat vontunk be a kísérletbe, amelyeket TMA-n végzett immunohisztokémiával festettünk meg. A score-értékek alapján végzett clusteranalízis által meghatároztunk egy hat markerből álló kombinációt (CycA, Ar, Top1, TGFB, Hsp60, ERK), amellyel egyértelműen elkülöníthetők a tumoros és normálcsoportok (3. ábra).

Megbeszélés

A proteincsipeket leginkább jelátviteli utakban szerepet játszó molekulák expressziós változásának mérésére és a fehérjék aktivációs állapotának (foszforiláció) vizsgálatára használták. A technológia fejlődésével azonban egyre inkább előtérbe kerül az expressziós profilok meghatározása is. RPA (reversephase array) segítségével lézermikrodisszekált mintákon 29, szignáltranszdukcióban részt vevő gén foszfoproteomikai profilja alapján sikerült elkülöníteni a primer tumormintákat a metasztatizálóktól [28]. Fontos megjegyezni, hogy korábbi AB array-vel végzett tanulmányok alapján szintén kevés gén mutatott kétszeresére növekedett vagy felére csökkent expressziót fehérjeszinten. Ezért az expresszió változásának mértéke helyett célszerűbb a csoporton belüli varianciát figyelembe venni, amit a p-értékkel jellemeznek az elemzések során. Más tapasztalatok is azt mutatják, hogy a 0,5–0,7-es M-értékek elfogadható fehérjeszintű változásokat jelentenek, vagyis a fehérjeexpresszió 140%-ra történő növekedése és 70%-ra történő csökkenése jelentős változásnak tekinthető [1].

A klasszifikációban szignifikánsnak talált CCNE1 és CCND1 génekről leírták, hogy vastagbél-daganatokban emelkedett expressziót mutatnak, sőt, a CCND1 emelkedett szintje a betegek plazmájából is kimutatható. Ezzel a megfigyeléssel egybecseng Ab array eredményünk, miszerint a tumorokban a CCNA1 felülexpresszál. Ezt TMA-val is sikerült igazolnunk. Az MRE11A gén egy olyan sejtmagi fehérjét kódol, amelyik a RAD50 és NBS1 fehérjékkel alkotott komplexei a homológ rekombinációban, valamint a telomer régiók fenntartásában, továbbá a dupla szálú DNS töréseinek kijavításában vesz részt, tehát az MMR gének közé sorolható (MSI Oncogen 2004). Ab array-n végzett megfigyeléseink egybecsengenek *Giannini és munkatársai* eredményeivel, miszerint a MRE11 gén a vastagbél-daganatokban csökkent expressziót mutat, feltehetően a génben bekövetkezett mutáció következtében képződő trunkált fehérje miatt. Azonban ezt a megfigyelést immunohisztokémiával nem sikerült megerősítenünk, miszerint ennek a fehérjének az expressziója nem változik sem korai, sem késői stádiumú daganatokban.

A caldesmon-1 ugyan alacsony szinten expresszálódik a colorectalis adenokarcinómákban (GeneAtlas), de kimutatták, hogy ennek az aktinkötő fehérjének fontos szerepe van a sejtek invazivitásában [29]. A caldesmon-1 ectopicus expressziója gátolja az ECM-degradációt, valamint csökkenti a podoszomákat és az invadopodiát. Tehát a caldesmon-1 és a vele kölcsönhatásban álló fehérjék vizsgálata fontos lehet a tumorprogresszió megítélése szempontjából. A caldesmon esete a microarray-rendszerek egy speciális hibalehetőségére hívja fel a figyelmet, mégpedig a szövetspecifikus expresszió mértékének mérésére, valamint a minta homogenitására. Azon túlmenően, hogy a caldesmon nem a hámban expresszálódik, hanem a simaizmokban és a stromában is jelen van, leginkább a cryptákat körülölelő sejtrétegekben. Az AB array-n mért $M = -0,39$ azt sugallja, hogy ez a fehérje a tumorokban csökkent expresszióval működik. Az immunohisztokémián pedig egyértelműen látszik, hogy a tumorok bizonyos stromális sejtcsoportjaiban sokkal kifejezettebben működik. Az ellentétes expressziós érték oka lehet, hogy a tumor stromális részeiben erősebben fejeződik ki, de ezek a régiók fajlagosan ritkábbak. Valamint az is elképzelhető, hogy a mintavétel során az ép nyálkahártya simaizommal kontaminálódott. Ezért nagyon fontos visszaellenőrizni a marker lokalizációját és szövetspecifikus expresszióját.

A cluster és a TMA alapján készült asszociációs plotok azt mutatják, hogy a két klinikai csoport között nincs olyan nagy molekuláris eltérés. Felmerülhet egy molekuláris szempontból történő csoportosítás szükségessége és lehetősége a klinikai szempontok figyelembevétele helyett. A tumor progressziója során azonban bizonyos fehérjék folyamatos emelkedést (Top1, HSP60) és csökkenést (APC) mutatnak. Az EGFR szintén stádiumfüggő expressziót mutatott, ugyanis a tumor növekedési szakaszában igen erős teljes expresszió mutatkozik, ami a metasztatizálóképesség megjelenésekor látványosan csökken.

Az antibody microarray technológia mint potenciális nagy áteresztőképességű módszer (high throughput) alkalmas lehet fehérjeszintű biomarkerek és diagnosztikus mintázatok azonosítására. A markerkombinációk azonosítása és a napi gyakorlatban történő felhasználása igen fontos feladat, ahol az antibody microarray jelentős előrelépést jelenthet. A technológia érzékenységből adódóan alkalmas lehet az egyes stádiumokban történő változások screenelésére és nyomon követésére. Mindezek figyelembevételével a proteincsipek alkalmazásával egy új lehetőség nyílik meg a daganat- és a biomarker-kutatás területén.

Irodalom

- [1] Madoz-Gurpide, J., Canamero, M., Sanchez, L. és mtsai: A proteomics analysis of cell signaling alterations in colorectal cancer. Mol. Cell. Proteomics, 2007, 6, 2150–2164.

- [2] Jass, J. R.: Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*, 2007, 50, 113–130.
- [3] Calin, G. A., Croce, C. M.: MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale. *Cancer Res.*, 2006, 66, 7390–7394.
- [4] Calin, G. A., Croce, C. M.: MicroRNAs and chromosomal abnormalities in cancer cells. *Oncogene*, 2006, 25, 6202–6210.
- [5] Calin, G. A., Croce, C. M.: MicroRNA signatures in human cancers. *Nat. Rev. Cancer*, 2006, 6, 857–866.
- [6] Garzon, R., Fabbri, M., Cimmino, A. és mtsai: MicroRNA expression and function in cancer. *Trends Mol. Med.*, 2006, 12, 580–587.
- [7] Markowitz, S. D., Roberts, A. B.: Tumor suppressor activity of the TGF-beta pathway in human cancers. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 1996, 7, 93–102.
- [8] Rampino, N., Yamamoto, H., Ionov, Y. és mtsai: Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science*, 1997, 275, 967–969.
- [9] Souza, R. F., Appel, R., Yin, J. és mtsai: Microsatellite instability in the insulin-like growth factor II receptor gene in gastrointestinal tumours. *Nat. Genet.*, 1996, 14, 255–257.
- [10] Fearon, E. R., Vogelstein, B.: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 1990, 61, 759–767.
- [11] Leslie, A., Carey, F. A., Pratt, N. R. és mtsai: The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br. J. Surg.*, 2002, 89, 845–860.
- [12] Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R. és mtsai: Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Engl. J. Med.*, 1988, 319, 525–532.
- [13] Jass, J. R., Biden, K. G., Cummings, M. C. és mtsai: Characterisation of a subtype of colorectal cancer combining features of the suppressor and mild mutator pathways. *J. Clin. Pathol.*, 1999, 52, 455–460.
- [14] Caron de Fromental, C., Soussi, T.: TP53 tumor suppressor gene: a model for investigating human mutagenesis. *Genes Chromosomes Cancer*, 1992, 4, 1–15.
- [15] Zhang, D., Wang, Y., Bai, Y. és mtsai: A novel method to quantify local CpG methylation density by regional methylation elongation assay on microarray. *BMC Genomics*, 2008, 9, 59.
- [16] Haab, B. B.: Antibody arrays in cancer research. *Mol. Cell Proteomics*, 2005, 4, 377–383.
- [17] Galamb, O., Sipos, F., Dinya, E. és mtsai: MRNA expression, functional profiling and multivariate classification of colon biopsy specimen by cDNA overall glass microarray. *World J. Gastroenterol.*, 2006, 12, 6998–7006.
- [18] Galamb, O., Sipos, F., Molnar, B. és mtsai: Evaluation of malignant and benign gastric biopsy specimens by mRNA expression profile and multivariate statistical methods. *Cytometry B. Clin. Cytom.*, 2007, 72, 299–309.
- [19] Baylin, S. B., Herman, J. G., Graff, J. R. és mtsai: Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv. Cancer Res.*, 1998, 72, 141–196.
- [20] Chen, R. Z., Pettersson, U., Beard, C. és mtsai: DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature*, 1998, 395, 89–93.
- [21] Eden, S., Cedar, H.: Role of DNA methylation in the regulation of transcription. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 1994, 4, 255–259.
- [22] Jones, P. A., Laird, P. W.: Cancer epigenetics comes of age. *Nat. Genet.*, 1999, 21, 163–167.
- [23] Spisak, S., Tulassay, Z., Molnar, B. és mtsai: Protein microchips in biomedicine and biomarker discovery. *Electrophoresis*, 2007, 28, 4261–4273.
- [24] Birkenkamp-Demtroder, K., Olesen, S. H., Sorensen, F. B. és mtsai: Differential gene expression in colon cancer of the caecum versus the sigmoid and rectosigmoid. *Gut*, 2005, 54, 374–384.
- [25] Bertucci, F., Salas, S., Eysteries, S. és mtsai: Gene expression profiling of colon cancer by DNA microarrays and correlation with histoclinical parameters. *Oncogene*, 2004, 23, 1377–1391.
- [26] Giannini, G., Rinaldi, C., Ristori, E. és mtsai: Mutations of an intronic repeat induce impaired MRE11 expression in primary human cancer with microsatellite instability. *Oncogene*, 2004, 23, 2640–2647.
- [27] Giannini, G., Ristori, E., Cerignoli, F. és mtsai: Human MRE11 is inactivated in mismatch repair-deficient cancers. *EMBO Rep.*, 2002, 3, 248–254.
- [28] Belluco, C., Mammano, E., Petricoin, E. és mtsai: Kinase substrate protein microarray analysis of human colon cancer and hepatic metastasis. *Clin. Chim. Acta*, 2005, 357, 180–183.
- [29] Yoshio, T., Morita, T., Kimura, Y. és mtsai: Caldesmon suppresses cancer cell invasion by regulating podosome/invadopodium formation. *FEBS Lett.*, 2007, 581, 3777–3782.

(Spisák Sándor dr.,
Budapest, Szentkirályi utca 46., 1088
e-mail: spisak@abc.hu)

A Kenézy Kórház-Rendelőintézet Egészségügyi Szolgáltató Kft.
(Debrecen, Bartók Béla út 2–26.)

a Rehabilitációs Osztályára pszichológust és rehabilitációs szakorvost keres.
Bővebb információ a www.kenezykorhaz.hu honlapon található.