

# Új molekuláris módszerek a leukaemiák diagnosztizálására, osztályozására és a betegség prognosztizálására

Zvara Ágnes, ifj. Hackler László, Puskás László G.

A sejtek normális működése különböző gének szigorú szabályozottságának a következménye. Ha egy hiba folytán felborul ez a szigorú szabályozottság és a gének közti hierarchikus rendszer, az a sejtek hibás működését, rossz esetben rákos elfajulását okozhatja. A daganatos betegségek – ezen belül a leukaemiák – modern molekuláris módszereken alapuló osztályozásának két alapvető kihívása az új betegcsoportok felderítése, valamint a már diagnosztizált vagy új esetek egy már meglévő csoportba való besorolása, amely lehetővé teszi az optimális kezelést és a betegség várható kimenetelének előrejelzését. A Humán genom projekt ma már korlátlan hozzáférési lehetőséget biztosít a gének szekvenciáit és lokalizációját tartalmazó adatbázisokhoz, nagyban segítve ezzel a kromoszómarendellenességek felderítését, a génexpressziós mintázat szisztematikus meghatározását. Ez nemcsak a sejtek normális működésének megértése szempontjából nagyon fontos, hanem hozzájárul olyan új gének azonosításához, amelyek az adott betegcsoportra markerként jellemzőek, és terápiás szempontból potenciális gyógyszer-célpontok lehetnek. A XX. század második feléig a gének funkciójának és szabályozásának tanulmányozása egyedi gének lépésről lépésre végzett vizsgálatán alapult. Tekintve, hogy egyre több organizmus genomjának szekvenciája vált és válik teljesen vagy részlegesen ismertté, számos olyan új technika fejlődött ki, amely lehetővé teszi a génfunkciók szisztematikus analízisét. A szerzők összefoglalják a molekuláris biológia legújabb módszereit felhasználó diagnosztikai, osztályozási és prognosztizálási lehetőségeket, valamint – elsősorban a leukaemiák szemszögéből – a már elért eredményeket.

**leukaemia, osztályozás,  
molekuláris biológiai módszerek**

**NEW MOLECULAR BASED METHODS  
FOR DIAGNOSIS, CLASSIFICATION  
AND PROGNOSIS OF LEUKEMIAS**

Normal functions of the cell are based on the precise regulation of various genes. If this strict regulation and the hierarchy of genes becomes upset due to some flaws of the system, the result will be cellular dysfunction which may eventually lead to carcinogenic transformation. The two main challenges in the classification of cancers are the discovery of new molecular markers characteristic to defined disease groups and the classification of already diagnosed or new cases into existing groups. This precise classification may open the door to tailored treatment or project the expected outcome of the disease. Today, there is unlimited access available to the databases containing sequences and localisation of the genes within the confines of Human Genome project. It provides significant help for the discovery of chromosome abnormalities and systematic analysis of gene expression patterns. This is important not only to understand normal functions of the cells, but it also contributes to the identification of new genes that are characteristic to given disease groups as markers and that are potential drug targets. Until the second half of the twentieth century the study of the function and regulation of genes was based on step by step investigation of individual genes. The fact that the genomes of an increasing number of organisms have become identified in whole or in part, numerous new techniques have been developed facilitating the systematic analysis of gene functions. The aim of this study is to summarise the new, molecular based possibilities for classification, diagnosis and prognosis of cancers, as well as to summarise the results of these areas, primarily from the point of view of leukemias.

**leukemia, classification,  
molecular biology methods**

dr. Zvara Ágnes (levelező szerző/correspondence), dr. ifj. Hackler László, dr. Puskás László G.:  
Magyar Tudományos Akadémia, Szegedi Biológiai Központ, Funkcionális Genomika Laboratórium,  
H-6726 Szeged, Temesvári krt. 62.  
E-mail: Zvara@nucleus.szbk.u-szeged.hu

Érkezett: 2002. május 27. Elfogadva: 2002. november 6.

A daganatos sejtek genetikai hibái alapvetően meghatározzák a normálistól eltérő viselkedésüket; ezek a hibák ma már az eddiginél hatósabban analizálhatók. Ezt a humán genom majdnem teljes szekvenciájának ismerete és a nagy áteresztőképességű molekuláris biológiai módszerek – a teljes genomra kiterjedő mutációanalízis, az összehasonlító genomhibridizáció, a génextpresszió-monitorozás cDNS-csipekkel – használata teszi lehetővé. Az így kapott eredmények kiválóan kamatoztathatók a megelőzés, a diagnózis, az osztályozás, a terápia és a betegség kimenetelével kapcsolatos kérdések megválaszolásában (1–3). A daganatos elváltozások közül a funkcionális genomika szempontjából legjobban tanulmányozott betegség a leukaemia.

Az akut leukaemia igen összetett betegség; a morfológiai, immunológiai, biokémiai, citogenetikai jellegzetességek és a kemoterápiára adott válasz alapján egyedi leukaemia-alcsoportokra osztható. A betegség osztályozása és a betegek megfelelő terápiás csoportokba sorolása jelenleg nagyon nehéz és költséges feladat; komoly laborvizsgálatokat (például immunfenotipizálást), citogenetikai és molekuláris diagnosztikai vizsgálatokat, valamint sokrétű szakorvosi háttérrel, hematológus, onkológus, patológus, citogenetikus bevonását igényli. Az egyedi és gyors teszt nem tesz lehetővé kellően megalapozott diagnózist. A körültekintő és munkáigényes diagnosztikai eljárás ellenére a leukaemiák osztályozása nem tökéletes és hibalehetőséget rejt magában (4). A leukaemiák osztályozása klinikai szempontból két ok miatt nagyon fontos:

- azért, hogy megértsük a betegség kezdeti okait, lefolyását, és legyen rálátásunk a végső folyamatokra;
- megalapozott, molekulárisan kellően alátámasztott diagnózist állíthassunk fel, amely előrevetíti az optimális terápia és a gyógyulás lehetőségét.

Az akut myeloid leukaemiát (AML) morfológiailag nyolc típusba sorolják (M0–M7), ezek a típusok bizonyos korrelációt mutatnak a klinikai megjelenéssel, a citogenetikai markerekkel és a betegség súlyosságával (5). Az akut myeloid leukaemiákat a morfológiai besoroláson alapuló FAB rendszer helyett ma már inkább a citogenetikai eltérések alapján – egyes kromoszóma-transzlokációk megléte vagy hiánya szerint – osztályozzák. A leukaemiák a speciális kromoszóma-abnormalitások alapján – amelyek az esetek több mint 90%-ában azonosíthatók – szintén osztályozhatók (6). Néhány kromoszóma-rendellenesség terápiás és prognosztikai jelentőségű is egyben (7, 8).

Az akut lymphoid leukaemiák (ALL) – azon kívül, hogy T- és B-sejtes típusokba sorolhatók – sejtfelszíni markerek alapján, immunhisztokémia segítségével további alcsoportokba sorolhatók. A klasszifikáció mindkét leukaemiatípus esetén prognosztikai jelentőségű, de ez csak statisztikailag értendő; ugyanis – különösen az akut myeloid leukaemiák esetében – a citogenetikai besorolással azonos típusba tartozó betegek egyéni variációt mutathatnak. Gyakran előfordul, hogy a különböző kritériumok alapján az egy típusba sorolt leukaemiák teljesen eltérő klinikai lefolyásúak, illetve ugyanarra a terápiás beavatkozásra eltérően reagálnak.

## RÖVIDÍTÉSEK ÉS SZÓMAGYARÁZATOK

ALL: akut lymphoid leukaemia.

AML: akut myeloid leukaemia.

BAC: bakteriális mesterséges kromoszóma.

B-ALL: B-sejtes akut lymphoid leukaemia.

cDNS: copy DNS; messenger RNS-ből reverz transzkripcióval átírt DNS, amely nem tartalmazza az intronszekvenciákat (ellentétben a genomikus DNS-darabbal).

DNS-csip: cDNS, oligonukleotid vagy genomikus DNS-darabokat nagy számban (több ezer, tízezer) tartalmazó, tárgylemeznyi méretű üveglemez, amely génkifejeződési mintázatok, mutációk, metilációs mintázatok analizésére alkalmas.

CGH: comparative genomic hybridization; összehasonlító genomi hibridizáció.

DD-PCR: differenciális display PCR.

Enhancer: gének kifejeződését segítő (aktiváló) szabályozóelem a DNS-molekulában.

FISH: fluoreszcens *in situ* hibridizáció.

Funkcionális genomika: a genetikának új tudományága; ötvözi a funkcionális biológia és a genetikai eredményeit, az egész genomra kiterjedően, összességében tanulmányozza a gének működését.

Génextpresszió: génkifejeződés.

Genomikus DNS: mind az intronokat, mind az exonokat tartalmazó DNS-darab.

Hibridizáció: a nukleinsavakat felépítő nukleotidok komplementaritásán alapuló technika, amelynek során két egyszálú nukleinsavdarab – amelyek közül az egyik vagy fluoreszcensen, vagy izotóppal jelölt (próba) – a szekvenciahomológia fokától függően párba áll; a létrejövő kétszálú nukleinsav detektálható.

IVT: *in vitro* transzkripció; olyan enzimreakció, amelynek során DNS-templátról RNS-polimeráz enzim segítségével RNS-molekula képződik.

Northern blot analízis: hibridizáláson alapuló technika; RNS-molekulákat agarózgél-elektroforézissel méret szerint elválasztanak, majd nejlonszűrőre immobilizálják őket. Az így kapott szűrőre ezután jelölt próba-DNS vagy oligonukleotid hibridizálható.

PCR: polimeráz láncreakció.

Promóter: a génkifejeződést szabályozó, irányító DNS-elem.

RDA: reprezentációs differenciális analízis.

RT: reverz transzkripció; olyan enzimreakció, amelynek során RNS-templátról reverz transzkriptáz enzim segítségével DNS-molekula képződik.

SNP: single nucleotide polymorphism; egy nukleotidra korlátozódó genetikai különbség.

T-ALL: T-sejtes akut lymphoid leukaemia.

Templát: egy adott reakcióban az átírás alapjául szolgáló minta

Az akut lymphoid leukaemiák első osztályozása a betegség különböző klinikai kimenetelét és a sejtmag-morfológia finom különbségét tükrözte. Az 1960-as évek végén a kutatók új módszerrel, enzimalapú immunhisztokémiával próbálták besorolni a betegséget. Kimutatták, hogy a leukaemiák egy része peroxidáz-festési módszerrel Schiff-sav-, míg másik része mieloperoxidáz-pozitívnak bizonyult. Ez adta elsőként az alapot a leukaemiák molekuláris szintű klasszifikációjára. E szerint megkülönböztetünk thymusból származó, prekursor T-sejt eredetű (T-ALL), illetve csontvelőből származó, prekursor B-sejt eredetű (B-ALL) akut lymphoid, illetve akut myeloblastos leukaemiát (AML). Ez az osztályozás – a myeloid és a lymphoid sejtek sejtfelszíni antigénjeit felismerő ellenanyagok felhasználásával – az 1970-es években további megerősítést kapott (9).

## Kromoszóma-rendellenességek analízise

Tumoros elváltozások esetében igen gyakori a kromoszómák belüli rendellenesség – deletio vagy amplifikáció –, valamint az eltérő kromoszómaszám (10). Specifikus átrendeződések sok esetben jellemzőek az egyes tumortípusokra, -állapotokra. Az ezekre a kromoszómális átrendeződési helyekre térképeződő gének szerepet játszhatnak a rákos betegség kialakulásában; felderítésük hozzájárul a tumoros állapotok, így a leukaemiák molekuláris jellemzéséhez. Az akut lymphoid leukaemia klinikai alcsoportjainak genetikai markerei egyes kromoszóma-transzlokációk és a rendellenes kromoszómaszám. A B-ALL esetében gyakran két gén fúziójával létrejövő fúziós géntermék, fúziós onkogén fehérje jelenléte figyelhető meg (11). Ezek közül a t(12;21)/TEL-AML1 és a t(1;19)/E2A-PBX1 transzlokációkat hordozó betegek kezelése viszonylag jó eredményekkel kecsegtet, különösen a kemoterapiás dózis emelésével; viszont a t(9;22)/BCR-ABL és a t(4;11)/MLL-AF4 transzlokációk esetében már sokkal rosszabbak a gyógyulás esélyei. Szintén jó kilátásokkal kezelhető a hiperdiploid kromoszóma-rendellenességet hordozó beteg (12). A T-ALL-t ismétlődően előforduló, de viszonylag ritka kromoszóma-transzlokáció jellemzi; ez általában olyan transzkripciósfaktorokat kódoló géneket (LYL1, HOX11, HOX11L2, TAL1) érint, amelyek rendellenes expressziója szabálytalan mederbe tereli a korai thymocytadifferenciációt, és a folyamat leukaemiába torkollik. A hiperdiploid akut lymphoid leukaemiára az általában magas kromoszómaszám jellemző (két alcsoportja esetén: 47–50, illetve >50) (11).

## Fluoreszcens in situ hibridizáció

A kromoszómasávok analízisének alapuló technikák hasznosnak bizonyulnak az átrendeződések kimutatására, azonban kevésbé informatívak a potenciális ampli-

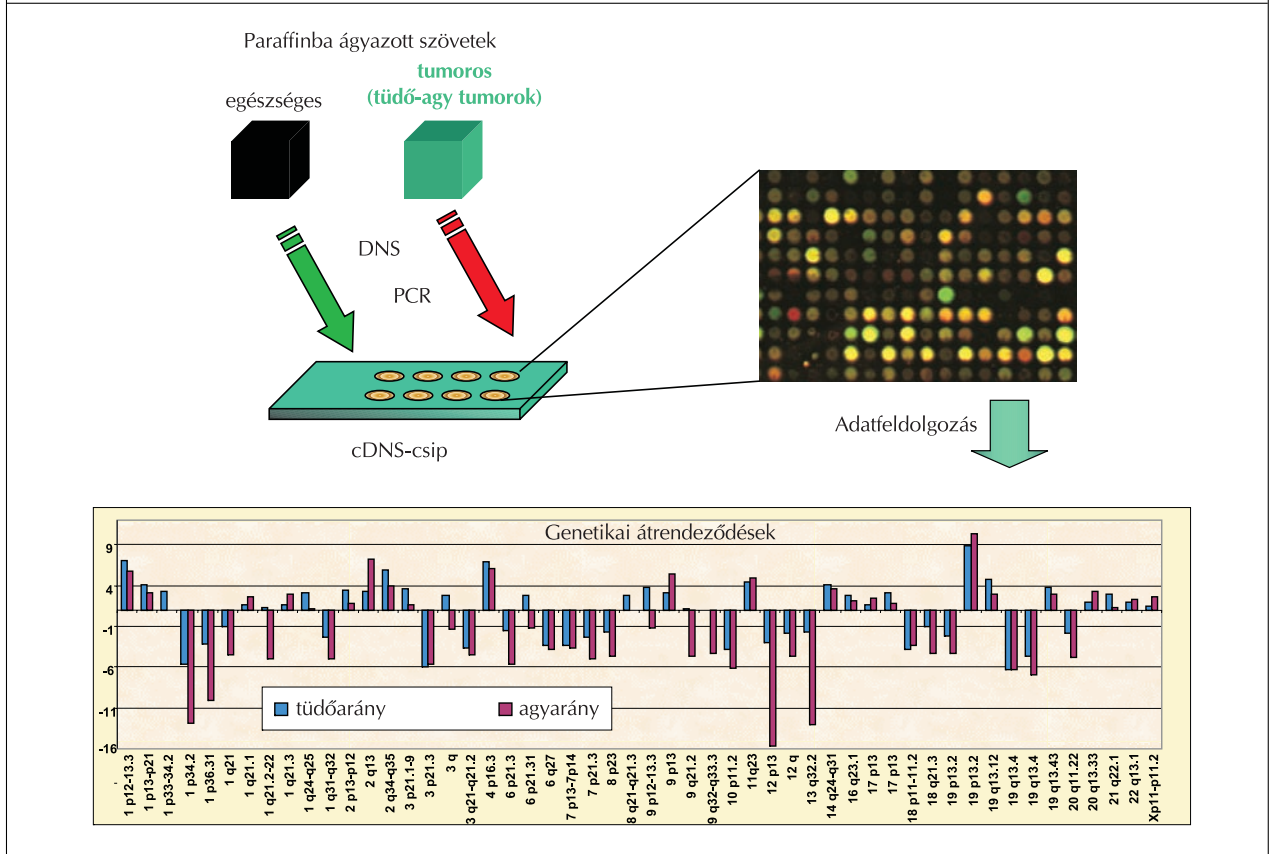
fikációs, illetve deletiós helyek felderítésében. A vizsgálat során próbaként használt DNS-darabot fluoreszcens festékkel jelölik, majd kromoszómapreparátumra hibridizálják. Azok a kromoszómarészletek, amelyekhez a jelölt DNS-darab kötődött, mikroszkóppal közvetlenül nyomon követhetők (fluoreszcens *in situ* hibridizáció, FISH) (13). A technika hátránya, hogy a sejtkultúrák vizsgálatok félrevezető eredményt adhatnak, mivel bizonyos sejtcsoportok – gyorsabb növekedésük miatt – előnyt élveznek.

## Összehasonlító genomi hibridizáció

Az összehasonlító genomi hibridizáció (comparative genomic hybridization, CGH) gyors, sejtkultúrákat nélkülöző módszer; a citogenetikai vizsgálatoknál pontosabb információkat szolgáltat az esetleges kromoszómaátrendeződésekről és -amplifikációkról (14). Ez a két fluoreszcens festékkel jelzett DNS-próbán alapuló hibridizációs módszer egyszerű kísérleti eljárás keretében sok információval szolgál a rákos sejtek genomikus egyensúlyáról, a mono-, esetleg triszómiákról, az amplifikációkról és a deletiókról. A kísérlet során a tumoros szövetből származó DNS-t egy zölden fluoreszkáló festékkel (Cy3), míg az ép szövetmintából származó DNS-t egy másik, pirosan fluoreszkáló festékkel (Cy5) jelöljük és együtt olyan üveglemezre hibridizáljuk, amelyre nagyszámú, ismert szekvenciájú cDNS- vagy genomikus DNS-darabot rögzítettek (DNS-csip, DNA microarray). Lézerszkennéssel végzett leolvasás után a színbeli különbségek számítógép segítségével értékelhetők ki, a Cy3/Cy5 arány meghatározható, ennek értéke utal az adott gén deletiójára, amplifikációjára (1. ábra). Az úttörő munkát Pinkel és munkatársai végezték, akik bakteriális mesterséges kromoszómákat (BAC), illetve a humán 20. kromoszómából származó genomikus DNS-fragmenteket kötöttek nagyszámban üvegfelületre (15). Ma már olyan csipeket is használnak, amelyre cDNS-fragmenteket kötöttek ki. Ennek az az előnye, hogy a transzkripcionálisan aktív régiókra összpontosít (16). Annak ellenére, hogy a DNS-csipeken alapuló CGH-módszer a kis, génen belüli mutációk felderítésére nem alkalmas, új megoldást kínál az eddig használt citogenetikai vizsgálatokra, hiszen rendkívül jól alkalmazható nagyszámú minta – egész genomra kiterjedő – együttes analízisére. Nagy előnye, hogy – ellentétben a sejtkultúrák vizsgálatokkal – viszonylag kevésbé érzékeny egyéb, a kísérleti rendszer szempontjából indifferens sejtkontaminációkra: mindössze egy génkópiányi változás is kimutatható olyan mintából, amelynek esetleg 60%-át is normális, egészséges sejtekkel „szennyezték” (17). Csekély mennyiségű, akár paraffinban archivált vizsgálati anyagból is igen jó minőségű jelölt próba nyerhető. A vizsgálatok eredményei könnyen analizálhatók a jelenleg elérhető, jelentős mennyiségű információt tartalmazó adatbázisok segítségével; a kísérletekben azonosított gének kromoszómális elhelyezkedése egyszerűen meghatározható.

1. ÁBRA

Komparatív genomi hibridizáció (CGH) a géntrendeződések detektálására



Felnőtt T-sejtes leukaemia esetében ezzel a módszerrel mind deletiót, mind amplifikációt sikerült detektálni. Bizonyos kromoszómaeltérések sokkal gyakoribbak voltak azoknál a betegeknél, akiknél a leukaemia agresszívebb formában jelentkezett. Nagyobb számú kromoszóma-rendellenesség társult azokhoz az esetekhez, amelyekben a túlélés esélye szignifikánsan alacsonyabb volt (18). Akut myeloid leukaemia esetén összehasonlító genomi hibridizációt alkalmazva erős amplifikációt találtak a 8q24 kromoszóma régiójában, ahova a *c-myc* protoonkogén térképeződik. A *c-myc* amplifikáció további komplex kromoszóma-rendellenességekkel együtt rövid élettartammal és a betegség gyors lefolyásával párosult az összes vizsgált esetben. Azokban az esetekben viszont, ahol ez az amplifikáció csak egyszeri egyéb rendellenességgel társult (például az egyik X-kromoszóma elvesztése vagy a 4. kromoszóma triszómiája), a kemoterápia sokkal hatékonyabbnak bizonyult, s ez jelentősen megnövelte az élettartamot (19).

Ezekben az esetekben az összehasonlító genomi hibridizáción alapuló vizsgálatok segítettek abban, hogy pontosabb kép alakulhasson ki a betegség kimeneteléről, valamint diagnosztikai és terápiás szempontból is különbséget tudjanak tenni az akut myeloid leukaemia egyes esetei között. A cDNS-csipet felhasználó CGH-technikával sikerült bizonyítani a metasztázis és a gyanúsított primer tumor klonális azonosságát is (16). Gyermekkori akut lymphoid leukaemia esetében is

összehasonlító genomi hibridizációval tudták kimutatni a 12p kromoszómarégió deletióját, amely kedvező prognosztikai és diagnosztikai lehetőséget kínálhat (20).

A DNS-csip alapú CGH-módszer nagy segítséget nyújthat:

- olyan új gének azonosításában, amelyek szerepet játszanak a rákos betegségek, így a leukaemia kialakulásában;
- a tumoros folyamat során az áttétek nyomon követésében, a tipizálásban és az osztályozásban.

## A génextpresszió-változáson alapuló osztályozás

A génextpressziós vizsgálatok alapvető célja, hogy olyan géneket azonosítsunk, amelyek differenciáltan, a normálistól eltérően, szövet- vagy állapotspecifikusan fejeződnek ki – sok esetben az előző fejezetben említett kromoszóma-rendellenességek miatt.

A nagy áttörést ezen a téren a *Northern blot hibridizáció* hozta; ennek segítségével sikerült először azonosítani különböző hírívő, messenger RNS-eket. A módszer során a tisztított RNS-populáció agarózgél-elektroforézissel elválasztható és nejlonmembránra rögzíthető. Az előzőleg általában izotóppal jelölt cDNS-fragmenteket (próba) erre a membránra hibridizálva megtudjuk, hogy az adott gén terméke (mRNS-e) – amelyet a kísérletben az izotóppal jelölt

cDNS-fragment reprezentált – milyen mértékben volt jelen a kiindulási RNS-mintában. Denzitometriás vizsgálattal, kellő kontroll mellett, viszonylag pontos mennyiségi információkat is kaphatunk az adott géntermékről (21).

A *szubsztraktív hibridizáláson* alapult az első technika, amely lehetővé tette a differenciáltan működő gének azonosítását és klónozását. A vizsgálat során a két különböző mintából származó mRNS-molekulákat egymáshoz hibridizálják, kiválasztják azokat a géntermékeket, amelyeknek nem volt párjuk, azaz vagy csak az egyik, vagy csak a másik mintában szerepeltek, majd ezekből könyvtárat készítenek (22). Ennek a technikának számos, kisebb-nagyobb változtatásokkal leírt változata terjedt el (23). Annak ellenére, hogy így sok gént sikerült azonosítani, a módszernek komoly hátrányai voltak:

- a génextpresszióbeli különbségeknek csak csekély részére sikerült fényt deríteni,
- nagy mennyiségű RNS-mintát igényelt,
- igen munka- és időigényesnek bizonyult.

Ennek a módszernek a szerepét 1992-ben egy új technika, a *differenciális display PCR (DD-PCR)* vette át (24). Ezzel a módszerrel két különböző sejtből vagy szövetből származó mRNS-populációt egy reverz transzkripció (RT) lépést követően PCR-rel amplifikáltak; az így keletkező cDNS-fragmensek, amelyek az adott sejt expressziós mintázatát tükrözték, denaturáló poliakrilamid gélen elkülönültek. Azokat a gént, amelyek különbözőképpen expresszálódtak, a gélből izolálni tudták, és egyedi nukleotid sorrendjük egy

szekvenálási reakcióban ismertté vált. Számos közlemény tanúsága szerint a komoly hibalehetőségek ellenére – mennyiségi korrelációk megőrzése a reverz transzkripció lépés és a PCR-reakciók után, a kísérletek ismételtetősége és az álpozitív jelek kiszűrése – sikeresen alkalmazták ezt a technikát (25).

A *cDNS reprezentációs differenciális analízis (RDA)* mint alternatív módszer vált ismertté, amely lehetővé tette a nagyszámú analizálandó minta csökkentését, a könnyebb azonosítást (26). A cDNS-RDA technika ötvözi a szubsztraktív hibridizációs és a PCR-amplifikációs lépéseket; eredetileg két komplex genom összehasonlítására dolgozták ki (27). A DD-PCR technikával ellentétben ez a módszer szubsztraktív hibridizációs lépéssel eliminálja a mindkét populációban szereplő fragmenteket, ezzel a különbségekre koncentrálva.

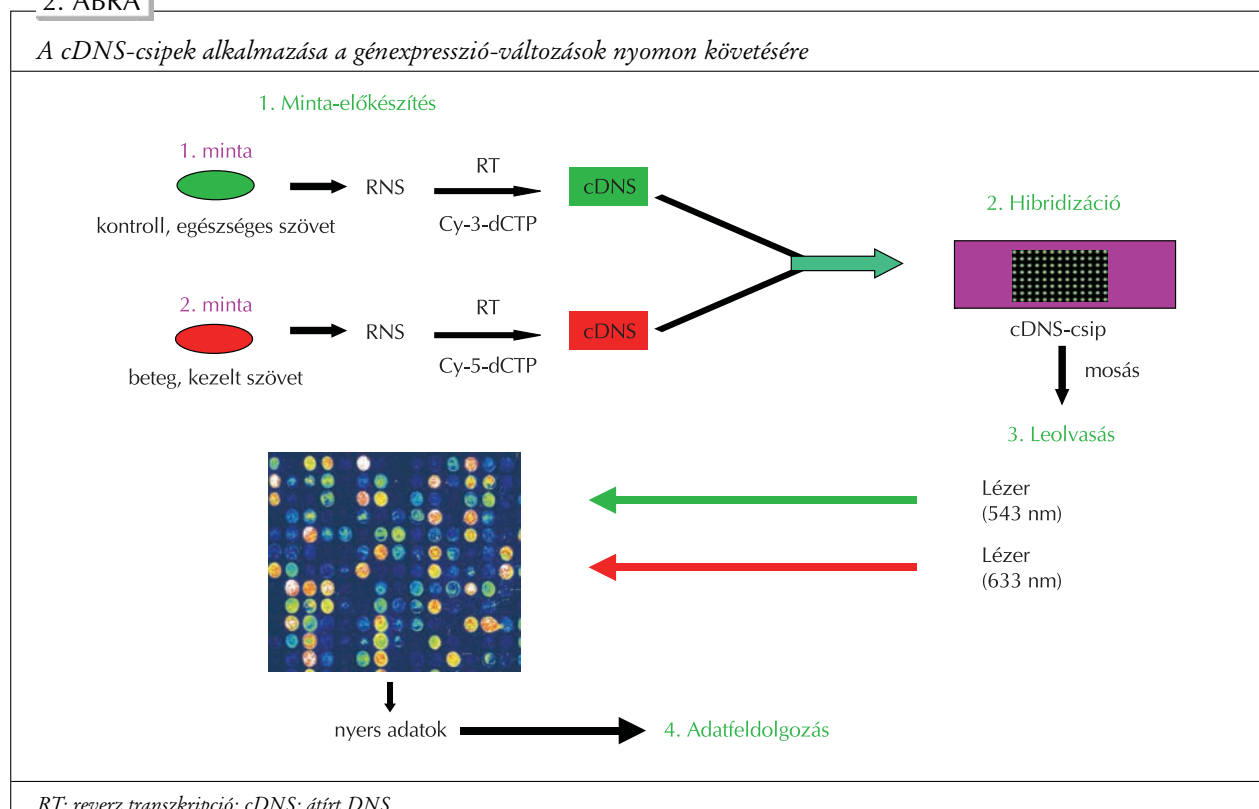
A génextpresszió-változásokat nyomon követő, szekvenáláson alapuló technika (serial analysis of gene-expression, SAGE), nagyszámú transzkriptum egymás melletti analizására alkalmas (28). A módszer alapvetően két alapfeltevésen nyugszik:

- egy rövid, 8-9 bázispár hosszúságú nukleotid-szekvenancia-részlet elég információt tartalmaz ahhoz, hogy egy géntermék azonosítható legyen,
- ezeknek a rövid szekvenancia-részleteknek az egymás utáni láncolata lehetővé teszi sok géntermék egymás melletti hatékony analizését.

A DNS-csip-technológia az utóbbi évek nagy fejlesztése. Egyidejűleg akár több ezer nukleotideltérés felderíthető.

## 2. ÁBRA

A cDNS-csipek alkalmazása a génextpresszió-változások nyomon követésére



A módszer során olyan, 9-10 bázispár hosszúságú, úgynevezett SAGE-címkeket (SAGE tags) kapunk, amelyek egy adott mRNS-populációt tükröznek. A technikának az az előnye, hogy segítségével a különböző kísérleti körülményekből származó mRNS-populációk között szignifikáns mennyiségi reláció állítható fel. A többi módszerrel ellentétben jóval érzékenyebb az alacsony kópiaszámú géntermék kimutatásában. A DNS-csipek előfutárának tekinthető, azonban időigényessége miatt ez a módszer mára jelentősen háttérbe szorult.

Napjaink forradalmian új eszköze, a *DNS-csip-technológia* (*DNS-mikroeréj-, DNS-síkmátrix-technika*) a leginformatívabb az eddig említett módszerek közül; a ráfordított idő és munka szempontjából ez a legoptimálisabb funkcionális molekuláris biológiai módszer (29, 30). Ez a technológia az utóbbi évek nagy módszertani fejlesztése; ma már lehetővé teszi, hogy az egyes sejtekben egy adott időpontban jelen lévő mRNS-populáció egyetlen hibridizációs lépésben, tárgylemeznyi felületen analizálható, s meghatározható az adott sejt expressziós mintázata (31–33). A DNS-csipek egyik csoportjába azok az általában szintetikus oligonukleotid-mintákat tartalmazó mikroeréjek tartoznak, amelyeket nukleotideltérések kimutatására fejlesztettek ki. Egyidejűleg akár több ezer nukleotideltérés [mutáció, SNP (single nucleotide polymorphism)] felderítése, újrászekvenálása is végrehajtható felsokszorozott genomi DNS-mintákból. Ez nagyon nagy jelentőségű az új polimorfizmushelyek felkutatásakor vagy ismert mutációk orvosi mintákból történő detektálásakor. Másik csoportjuk cDNS-fragmenteket tartalmaz, ezáltal génexpressziós változások észlelésére, monitorozására alkalmas. A DNS-csipek legfontosabb és leginformatívabb alkalmazása a génexpresszió párhuzamos tanulmányozása, ami a genom funkcionálisan aktív részeire összpontosít. Az eljárás egy reverz blotolási technika. Lényege, hogy több ezer különböző DNS-molekula-részletet (általában PCR-amplifikátumokat vagy oligonukleotid-részleteket) kötnek szilárd hordozóhoz, általában valamilyen kémiai eljárással aktivált üvegfelülethez. A kérdéses biológiai mintákból (szövet- vagy sejt kultúrából) nyert mRNS-ből kiindulva fluoreszcensen jelölt cDNS-t kapunk. Az mRNS kezdeti mennyisége nagymértékben változhat attól függően, hogy milyen szövetből indulunk ki (például májszövet, illetve gerincvelőminta). Erősen limitált az mRNS mennyisége azokban az esetekben is, amikor a szövetminta mennyisége kicsi, mint például lézer-mikrodisszekcióval vagy egyéb műtéti eljárásokkal nyert biológiai mintáknál, továbbá olyan kísérleti rendszerekben, ahol például 1000–5000 sejt a vizsgálat tárgya. Ezekben az esetekben mindenképpen szükséges a jelerősítés, azonban nagyon fontos, hogy olyan módszert alkalmazzunk, amely nem torzítja az eredeti mRNS-populációban meglévő arányokat. Az exponenciális (PCR-) és lineáris (*in vitro* transzkripció, IVT-) amplifikáció megfelelő használata sikeresen áthidalja ezt a problémát (34, 35). A direkt jelöléssel, illetve amplifikációs lépések során kapott, fluoreszcensen je-

lölt DNS-t csipre hibridizálva, a bázisok komplementaritási szabályai alapján konfokális lézerszkennelvel detektálható a megfelelő, kikötött komplementer DNS, amelyhez a jelölt próba kapcsolódott. A két mintát (patológiás-normál, kezelt-kezeletlen) különböző fluoreszcens festékekkel jelölve, majd egy csipre hibridizálva, minden egyes génspecifikus minta esetében összehasonlítható a génkifejeződés mértéke (36) (2. ábra). Ezzel a technikával nyomon követhetők a sejtek különböző hatásokra bekövetkező (például: gyógyszeres kezelés, patológiás folyamatok) változásai, lehetővé válik új biokémiai utak felderítése, gyógyszerek hatásmechanizmusainak nyomon követése, fiziológiailag eltérő állapotokért (például betegség esetén) felelős gének felfedezése. A technika segítségével sokkal hatékonyabbá válik az adott kóros hatásra, gyógyszeres kezelésre, esetleg más, fiziológiás körülmények között fellépő állapotra jellemző vagy azt kiváltó gének azonosítása, ez mind az alap-, mind az alkalmazott kutatásban kamatoztatható.

Egyes, az előző fejezetben taglalt kromoszómarendellenességekhez társuló génexpresszió-változások kiderítése kulcsfontosságú diagnosztikus és terápiás értéket nyerhet mind a leukaemiák, mind más tumorok esetében (37–39). A T-sejtes akut lymphoid leukaemiák molekuláris tulajdonságaira többnyire a kromoszóma-transzlokációk és kromoszómán belüli átrendeződések analízise derített fényt. Ezek az abnormalitások tipikusan ilyen elrendeződést tükröznek, ahol a sejtérés szempontjából fontos és szigorúan szabályozott gének (például HOX11, LMO1, LMO2) olyan promóterek vagy enhancerek szabályozása alá kerülnek (például T-sejt-receptor-promóter), amelyek az említett gének expresszióját nagymértékben megemelik és a sejteket a normálisnál nagyobb mértékű osztódásra kényszerítik. *Ferrando* és munkatársai oligonukleotid DNS-csipeket használva kimutatták, hogy T-ALL esetében bizonyos T-sejt-onkogének – HOX11, TAL1, LYL1, LMO1, LMO2 – gyakran a normálistól eltérő mértékben expresszálódnak, annak ellenére, hogy kromoszóma-rendellenesség nem tapasztalható. Az érett thymocyták kialakulása során ezeknek az onkogéneknek az overexpressziója (túltermelődése) a sejtek fejlődési stádiumaira specifikusan jellemzőek (LYL1<sup>+</sup> – pro-T-sejt, HOX11<sup>+</sup> – korai kérgi thymocyta, TAL1<sup>+</sup> – késői kérgi thymocyta). A hierarchikus klaszteranalízis a sejteket ezen génexpressziós mintázatok alapján egy közös onkogénaktivációs kaszkádkhoz kapcsolta. Mindez segíthet a terápia szempontjából is fontos alcsoportok kialakításában (40).

Olyan betegeknél, akiknél igen körültekintően kell mérlegelni az alkalmazott terápiát, annak erősségét és az esetleges mellékhatásokat – például a gyermekgyógyászatban –, nagyon fontos szerepet játszik a leukaemiák génexpressziós változásokon alapuló osztályozása. Ennek segítségével sorolhatók a betegek pontos, optimális terápiát lehetővé tevő csoportokba. Gyakori a betegség kiújulása a nem megfelelő terápia következtében, illetve a terápia által indukált akut myeloid leukaemia. *Yeoh* és munkatársai oligonukleo-

tid DNS-csipeket használva expresszióbeli különbségek alapján csoportosították a gyermekkori leukaemiás eseteket (41). Minden, a B-ALL-re jellemző kromoszómahibának meghatározták a saját, általában több génből álló, csak rá jellemző génexpressziós mintázatát. A különböző génexpresszióbeli különbségek kellően körültekintő csoportosítása olyan jellegzetes, az alcsoportra jellemző molekuláris „ujjlenyomatot” alakít ki, amelynek felhasználásával az egyes alcsoportok nagy pontossággal (96%) elkülöníthetők. Az „ujjlenyomat” meghatározásának és a csoportosításnak az alapját az összes expressziós különbséget mutató gén közül az a 40 gén adta, amely a kísérletben használt, a kapcsoltságot jellemző statisztikai módszer szerint a legjobban definiálta az adott csoportot. B-ALL esetében a génexpressziós mintázat nem csupán a különböző alcsoportokba sorolást teszi lehetővé, hanem magyarázatot ad a terápia esetleges sikertelenségére is. Segítségével fény derült arra is, hogy a különböző leukaemia-alcsoportok alapvetően más onkogén-aktivációs mechanizmusokat követnek, különbözőek a jelátviteli utak, ezért különböző módon reagálnak a kemoterápiára. A terápia következtében kialakuló másodlagos akut myeloid leukaemia kifejlődése szintén előre megmondható a „molekuláris ujjlenyomatok” segítségével (41).

Klinikai szempontból a DNS-csip-vizsgálatok egyértelműen életképes alternatívát jelentenek a leukaemia-alcsoportok diagnosztikájában a hagyományos kariotipizálás vagy a fluoreszcens *in situ* hibridizálással szemben, különösen olyan esetekben, amikor a kromoszóma-rendellenesség citogenetikailag nem mutatható

ki (37–39). A különböző génexpressziós változásokat nyomon követő technikákról kitűnő összefoglaló született *Kozian* és munkatársai tollából (42).

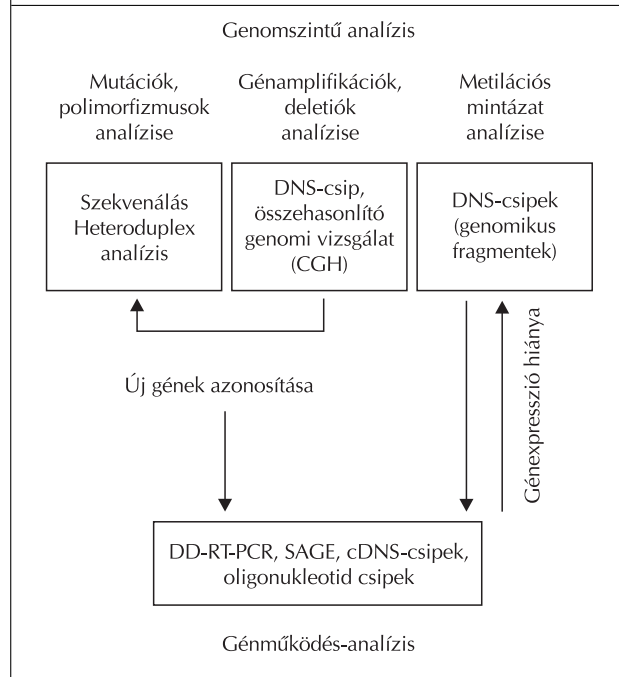
## DNS-metilációs mintázat analízisén alapuló osztályozás cDNS-csipekkel

A malignus szövetekben tapasztalható egyik legkorábbi és legáltalánosabb genetikai eltérés a normálistól eltérő metilációs mintázat a CpG-szigetekben (ezek citozinban és guaninban gazdag szigetek), amely a gének széles spektrumának túlműködését, illetve hibás működését vonja maga után (43). Aberráns metilációs mintázatot mutathatnak bizonyos tumoreretek esetében a promóterrégió kivül olyan CpG-gazdag szabályozóelemek is, amelyek a genom nem kódoló részeiben, azaz az intronokban helyezkednek el (44). A tumorsejteket általában a tumorsuppresszor molekulák hipermetilációja, míg ezzel ellentétben az egész DNS-molekula hipometilációja jellemez. Ez az általános hipometiláltság már viszonylag korán, jóval a tényleges tumor kifejlődése előtt detektálható. A hipometiláció és a megemelkedett génexpresszió közötti összefüggés számos onkogén esetében kimutatható (45, 46). Az egész genomra kiterjedő, nem génspecifikus megközelítéssel többször is kimutatták, hogy a metilációs mintázat tumorról tumorra változhat, azaz tumorspecifikus (47, 48). Az egész genomra kiterjedő metilációs mintázat, mint azt a génexpressziós mintázatnál is tapasztaltuk, egy molekuláris ujjlenyomatként jellemzi az adott sejtet, szövetet, betegséget, így ennek ismerete alkalmassá teszi ezt a módszert arra, hogy új tumorsztyályokat határozhassunk meg, illetve újonnan diagnosztizált betegségeket már meglévő osztályokba soroljunk (33). Az utóbbi években az egész genomra kiterjedő metilációs mintázat analízisére olyan módszer született, amely alkalmas nagyszámú minta egy időben való tesztelésére (49, 50).

Az utolsó másfél évtized technikai újításai forradalmasították a leukaemiák és más patológiák elváltozások molekuláris szintű megértését, funkcionális genomikai hátterének felderítését, diagnosztikai markerek azonosítását. A technikák egy része a genomszintű elváltozások detektálására törekszik (mutációk, génamplifikációk, deletiók, metilációs mintázat), míg más részük az aktív gének termékeinek, az mRNS-populációknak (transzkriptom) analízisét tűzte ki célul (génexpressziós vizsgálatok, SAGE, DD-RT-PCR, DNS-csip-technika) (3. ábra). Exponenciálisan nő azoknak a tanulmányoknak a száma, amelyek a különböző típusú rákos megbetegedésekkel – mint például a melanoma (1, 51, 52), a vastagbélrák (53–56), a pajzsmirigyrák (57–59), az emlőrák (60–62), a prosztatarrák (63–65) – a funkcionális genomika szemszögéből foglalkoznak. Az elkövetkező években e technikák remélhetőleg a klinikai gyakorlatban is felhasználhatók lesznek, segítve a diagnosztikát, a betegség kimenetelének prognosztizálását, a helyes terápia kiválasztását.

### 3. ÁBRA

*A genom és a transzkriptom (génműködések) analízise különböző technikákkal*



## IRODALOM

- Bittner M, Meltzer P, Chen Y, et al. Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature* 2000;406(6795):536-40.
- Hedenfalk I, Duggan D, Chen Y, et al. Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. *N Engl J Med* 2001;344(8):539-48.
- Sidransky D. Emerging molecular markers of cancer. *Nature Rev Cancer* 2002;2(3):210-9.
- Pui CH, Campana D, Evans WE. Childhood acute lymphoblastic leukaemia current status and future perspectives. *Lancet Oncol* 2001;10:597-607.
- Rubnitz JE, Pui C-H. Leukemias. In *Principles of Molecular Medicine*. (Jameson JL ed.). Humana Press NJ 1998. p. 233-9.
- Golub TR. The Genetics of AML: An update in proceedings of the American Society of Hematology. 1999. p. 102-111.
- Appelbaum FR. Molecular diagnosis and clinical decisions in adult acute leukemia. *Seminars in Hematology* 1999;36:401-410.
- Gilliland DG. Molecular genetics of human leukemia. *Leukemia* 1998;12:57-512.
- Schlossman SF, Chess L, Humphreys RE, et al. Distribution of Ia-like molecules on the surface of normal and leukemic human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976;73(4):1288-92.
- Mitelman F, Mertens F, Johansson B. A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nat Genet Spec* 1997. p. 417-74.
- Ferrando AA, Look AT. Clinical implications of recurring chromosomal and associated molecular abnormalities in acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol* 2000;37(4):381-95.
- Arico M, Valsecchi MG, Camitta B, et al. Outcome of treatment in children with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2000;342(14):998-1006.
- Wiener R. Rearrangements of chromosome band 3q21 in myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2002;43(1):59-65.
- Houldsworth J, Chaganti RS. Comparative genomic hybridization: an overview. *Am J Pathol* 1994;145(6):1253-60.
- Pinkel D, Segraves R, Sudar D, et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 1998;20(2):207-11.
- Furák JI, Troján T, Szoke L, et al. Development of brain metastasis 5 years before the appearance of the primary lung cancer: messenger metachronous metastasis. *Annals Thoracic Surg (elfogadva)*.
- Hodgson G, Hager JH, Volik S, et al. Genome scanning with array CGH delineates regional alterations in mouse islet carcinomas. *Nat Genet* 2001;29(4):459-64.
- Tsukasaki K, Krebs J, Nagai K, et al. Comparative genomic hybridization analysis in adult T-cell leukemia/lymphoma: correlation with clinical course. *Blood* 2001;97(12):3875-81.
- Bruckert P, Kappler R, Scherthan H, et al. Double minutes and c-MYC amplification in acute myelogenous leukemia: Are they prognostic factors? *Cancer Genet Cytogenet* 2000;120(1):73-9.
- Kanerva J, Niini T, Vetenranta K, et al. Loss at 12p detected by comparative genomic hybridization (CGH): association with TEL-AML1 fusion and favorable prognostic features in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). A multi-institutional study. *Med Pediatr Oncol* 2001;37(5):419-25.
- Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74(12):5350-4.
- Hedrick SM, Cohen DI, Nielsen EA, et al. Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins. *Nature* 1984;308(5955):149-53.
- Swaroop A, Xu JZ, Agarwal N, et al. A simple and efficient cDNA library subtraction procedure: isolation of human retina-specific cDNA clones. *Nucleic Acids Res* 1991;19(8):1954.
- Liang P, Pardee A, et al. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 1992;257:967-71.
- Prashar Y, Weissman S, et al. Analysis of differential gene expression by display of 3' end restriction fragments of cDNAs. *Proc Nat Acad Sci USA* 1996;93:659-63.
- Vogeli-Lange R, Burckert N, Boiler T, et al. Rapid selection and classification of positive clones generated by mRNA differential display. *Nucleic Acids Res* 1996;24:1385-6.
- Lisitsyn N, Wigler M, et al. Cloning the differences between two complex genomes. *Science* 1993;259:946-51.
- Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, et al. Serial analysis of gene expression. *Science* 1995;270:464-67.
- DeRisi J, Penland L, Brown P, et al. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nature Genet* 1996;14:457-60.
- Ernst T, Hergenbahn M, Kenzelmann M, et al. Decrease and gain of gene expression are equally discriminatory markers for prostate carcinoma: a gene expression analysis on total and microdissected prostate tissue. *Am J Pathol* 2002;160(6):2169-80.
- Blohm DH, Guiseppi-Elie A. New developments in microarray technology. *Curr Opin Biotechnol* 2001;12(1):41-7.
- Kopper L, Timar J. Gene expression profiles in the diagnosis and prognosis of cancer. *Magy Onkol* 2002;46(1):3-9.
- Adorján P, Distler J, Lipscher E, et al. Tumour class prediction and discovery by microarray-based DNA methylation analysis. *Nucleic Acids Res* 2002;1:30(5):21.
- Puskás LG, Zvara Á, Hackler Jrl, et al. RNA amplification results in reproducible microarray data with slight ratio biases. *Biotechniques* 2002;32(6):1330-42.
- Puskás LG, Zvara Á, Hackler Jrl, et al. Production of bulk amounts of universal RNA for DNA-microarrays. *Biotechniques (in press)*.
- Kitajka K, Puskás LG, Zvara Á, et al. The role of n-3 polyunsaturated fatty acids in brain: Modulation of rat brain gene expression by dietary n-3 fatty acids. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:2619-24.
- Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999;286(5439):531-7.
- Ramaswamy S, Tamayo P, Rifkin R, et al. Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(26):15149-54.
- Shipp MA, Ross KN, Tamayo P, et al. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med* 2002;8(1):68-74.
- Ferrando AA, Neuberg DS, Staunton J, et al. Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 2002;1:75-87.
- Yeoh EJ, Ross ME, Shurtleff SAA, et al. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell* 2002;1:133-43.
- Kozian DH, Kirschbaum BJ. Comparative gene-expression analysis. *Trends Biotechnol* 1999;17(2):73-8.
- Jones PA. DNA methylation errors and cancer. *Cancer Res* 1996;56:2463-7.
- Chan MF, Liang G, Jones PA. Relationship between transcription and DNA methylation. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000;249:75-86.
- Esteller M, Corn PG, Baylin SB, et al. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001;61:3225-9.
- Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, et al. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 2000;28:32.
- Costello JF, Fruhwald MC, Smiraglia DJ, et al. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nature Genet* 2000;24:132-8.
- Huang TH-M, Perry MR, Laux DE. Methylation profiling of CpG islands in human breast cancer cells. *Hum Mol Genet* 1999;8:459-70.
- Toyota M, Ho C, Ahuja N, et al. Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification. *Cancer Res* 1999;59:2307-12.
- Gitan RS, Shi H, Chen CM, et al. Methylation-specific oligonucleotide microarray: a new potential for high-throughput methylation analysis. *Genome Res* 2001;12(1):158-64.
- Alizadeh AA, Ross DT, Perou CM, et al. Towards a novel classification of human malignancies based on gene expression patterns. *J Pathol* 2001;195(1):41-52.
- de Wit NJ, Burtcher HJ, Weidle UH, et al. Differentially expressed genes identified in human melanoma cell lines with different metastatic behaviour using high density oligonucleotide arrays. *Melanoma Res* 2002;12(1):57-69.
- Lin YM, Furukawa Y, Tsunoda T, et al. Molecular diagnosis of colorectal tumors by expression profiles of 50 genes expressed differentially in adenomas and carcinomas. *Oncogene* 2002;21(26):4120-8.
- Duncan DS, McWilliam P, Tighe O, et al. Gene expression differences between the microsatellite instability (MIN) and chromosomal instability (CIN) phenotypes in colorectal cancer revealed by high-density cDNA array hybridization. *Oncogene* 2002;21(20):3253-7.
- Suzuki H, Gabrielson E, Chen W, et al. A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. *Nat Genet* 2002;31(2):141-9.
- Stremmel C, Wein A, Hohenberger W, et al. DNA microarrays: a

- new diagnostic tool and its implications in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2002;17(3):131-6.
57. Takano T, Hasegawa Y, Matsuzuka F, et al. Gene expression profiles in thyroid carcinomas. *Br J Cancer* 2000;83(11):1495-502.
  58. Chen KT, Lin JD, Chao TC, et al. Identifying differentially expressed genes associated with metastasis of follicular thyroid cancer by cDNA expression array. *Thyroid* 2001;11(1):41-6.
  59. Huang Y, Prasad M, Lemon WJ, et al. Gene expression in papillary thyroid carcinoma reveals highly consistent profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(26):15044-9.
  60. Jiang Y, Harlocker SL, Molesh DA, et al. Discovery of differentially expressed genes in human breast cancer using subtracted cDNA libraries and cDNA microarrays. *Oncogene* 2002;21(14):2270-82.
  61. Clark J, Edwards S, John M, et al. Identification of amplified and expressed genes in breast cancer by comparative hybridization onto microarrays of randomly selected cDNA clones. *Genes Chromosomes Cancer* 2002;34(1):104-14.
  62. Kroll T, Odyvanova L, Clement JH, et al. Molecular characterization of breast cancer cell lines by expression profiling. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002;128(3):125-34.
  63. Shou J, Soriano R, Hayward SW, et al. Expression profiling of a human cell line model of prostatic cancer reveals a direct involvement of interferon signaling in prostate tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(5):2830-5.
  64. Schwarze SR, DePrimo SE, Grabert LM, et al. Novel pathways associated with bypassing cellular senescence in human prostate epithelial cells. *J Biol Chem* 2002;277(17):14877-83.
  65. Luo JH, Yu YP, Cieply K, et al. Gene expression analysis of prostate cancers. *Mol Carcinog* 2002;33(1):25-35.



### III. MAGYAR MIKROKERINGÉS KONGRESSZUS

*Időpont:* 2003. május 9–10.

*Helyszín:* Balatonkenese, Tompa Mihály u. 1.

*A kongresszus témái:*

A mikrokeringés élettana.

A mikrocirkuláció kóreltani kutatásainak újabb eredményei.

Új diagnosztikus módszerek.

Véráramlástan eredmények.

Diabetese microangiopathia – diagnosztikus és terápiás lehetőségek.

A szemfenék mikrokeringésének vizsgálata.

A belső fül keringési zavarai.

A mikrokeringés változásai vesebetegségekben.

Az endotheldiszfunkció és a mikrokeringés kapcsolata.

A lipidpatológia mikrocirkulációs vonatkozásai és kóros érfalváltozások.

A coronariakeringés, valamint a szív mikrocirkulációja. Coronaria-X-szindróma.

A végtagok mikrokeringése, nyirokkeringési zavarok, krónikus vénás insuffitencia, diabetese láb.

Stroke és penumbraállapotok.

Funkcionális képalkotás (SPECT, PET, MRI) és a mikrokeringés.

Mikrokeringést javító gyógyszerek.

Kísérletes sebészet és mikrokeringés.

A kongresszust a Magyar Haemorrheologiai Társaság szervezi.

*Regisztrációs díj:* 6000 Ft, amely a kongresszuson való részvétel mellett a programfüzetet, a kiállításon való részvételt, valamint a 2003. május 9-én rendezendő esti fogadás költségét tartalmazza.

*További információ:*

dr. Pongrácz Endre, 06-309-544-704, e-mail: epong@dpg.hu.

dr. Bernát S. Iván, 06-302-516-506, telefax: 1-356-3087.