



Resum

L'habilitat d'identificar de manera prospectiva els pacients de glioblastoma (GBM) que tindran una millor o pitjor resposta a la teràpia estàndard permetria millorar de forma significativa l'optimització dels recursos terapèutics per a cadascun dels pacients. Emprant dades d'expressió de microxips de DNA de mostres de GBM de pacients amb un resultat clínic conegut, hem identificat una col·lecció multigènica de consens ($n=38$ gens) que s'associava de manera reproducible amb una supervivència de dos anys en quatre bases de dades independents. En aquest treball hem buscat validar aquest classificador multigènic emprant metodologies aplicables a mostres incrustades en parafina d'una col·lecció independent de mostres de GBM. Es van desenvolupar assaigs de reacció en cadena de la polimerasa en temps real (PCR-RT) per a cadascun dels 38 gens. L'expressió d'aquests 38 gens va ser mesurada en 70 mostres de GBM incrustades en parafina d'arxiu amb un gradient de diferents resultats clínics. Vint-i-quatre pacients van sobreviure 2 anys o més mentre que els 46 pacients restants van sobreviure menys de dos anys. Els valors de delta Ct per a cada gen es van avaluar per RT-PCR i es van comparar amb el valor mitjà de Ct per a 4 gens de control en cada cas. Els resultats demostren que els valors obtinguts de l'expressió composta d'aquest assaig multigènic permetien preveure fidelment el resultat clínic dels pacients. Una corba ROC incloent els 38 gens presentava una àrea, a sota la corba, de 0,98, que indicava una alta sensibilitat/especificitat per a la predicció de la supervivència a 2 anys. Amb l'objectiu de facilitar la utilització clínica del nostre classificador multigènic estem cercant desenvolupar-lo en un format més adaptat a aquesta tasca. De manera resumida, estem treballant a reduir la complexitat de l'assaig basat en 38 assaigs separats a un únic assaig multiplex. S'empraran tècniques estadístiques per

Magda Marquet i Mandicó

Doctora en bioquímica,
cofundadora d'Althea
Technologies (San Diego,
Califòrnia)



Magda Marquet i Mandicó

Un classificador multigènic utilitzable en la predicció de la supervivència de pacients amb glioblastoma

Nota: Treball realitzat per Magda Marquet⁴, Howard Colman¹, J. Matthew McDonald², Sonya Popoff¹, Li Zhang³, Kenneth Hess³, Oliver Bogler^{1, 4}, Gordon Vansant⁴, Kahuku Oades⁴, Jennifer Stowe⁴, Joseph Monforte⁴, Robert Jenkins⁵, Ken Aldape²
Departments of Neuro-Oncology¹, Neuropathology², Biostatistics³, Neurosurgery⁴ and Brain Tumor Center, UT MD Anderson Cancer Center; Department of Pathology⁵, Mayo Clinic, and Althea Technologies, Inc.⁶

seleccionar aquells gens, de la col·lecció de 38, amb un major poder predictiu per a la seva inclusió en l'assaig multiplex. Els resultats presents indiquen que aquest classificador basat en 38 gens té potencial com a classificador clínic i el nostre objectiu és el de desenvolupar un test que sigui pràctic per a la seva utilització clínica per saber quins pacients respondran i quins seran refractaris a la teràpia estàndard del GBM.

Introducció

Glioblastoma (GBM) és el tumor primari del cervell més comú en adults, presenta una elevada mortalitat, i els avenços terapèutics que hi estan relacionats romanen modestos. Recentment, un assaig clínic en fase III ha demostrat, per primera vegada, en un estudi amb casos triats a l'atzar, l'eficàcia de la quimioteràpia per augmentar la supervivència global en casos de GBM (1). Encara que aquestes observacions han fet canviar els estàndards de cura dels pacients amb GBM, és clar que tan sols una fracció dels pacients obtenen beneficis significatius amb aquest tractament, fet que confirma tant les evidències recents en el camp molecular com les d'estudis clínics a llarg termini, que mostren que existeixen diferents subtipus de GBM tant amb diferents taxes de supervivència com comportament al tractament (2-7). Malgrat això, tant el diagnòstic com les estratègies terapèutiques es basen únicament en estudis histopatològics, sense tenir marcadors moleculars ben validats de la predicció de supervivència ni de la resposta a la radiació o a la quimioteràpia. Per progressar cap a la individualització/optimització del tractament de la GBM, és crucial fer avenços en dues àrees inter-relacionades: 1) desenvolupar marcadors específics i sensibles per distingir entre els pacients a qui funcionarà el tractament TMZ-CR i els que no; i 2) determinar en els tumors resistents importants alteracions moleculars que podrien servir de base per a la

pròxima generació d'assaigs definits per una hipòtesi i enfocats a pacients per als quals el tractament estàndard sol tindria cap o poc efecte.

L'anàlisi amb microxips de DNA és una font important de biomarcadors potencials per a ús clínic. No obstant això, el gran nombre de gens investigats comparat al relativament petit nombre de mostres analitzades té com a conseqüència una elevada taxa de falsos descobriments en bases de dades individuals (8-9) i per aquest motiu les generalitzacions realitzades a partir de microxips amb una única base de dades s'han de fer amb precaució. A hores d'ara no existeix un consens sobre la identificació d'un perfil d'expressió gènica associat al GBM que sigui vàlid amb diferents bases de dades independents. En aquest treball hem realitzat una metaanàlisi de l'expressió gènica amb dades provinents de diferents institucions per identificar un predictor multigènic robust del resultat clínic per al GBM. Fent un pas més, hem posat a prova aquest predictor multigènic amb una sèrie independent de tumors de GBM, i hem examinat la possibilitat d'utilitzar un assaig multiplex per quantificar l'expressió gènica de mostres de GBM fixades en formaldehid i incrustades en parafina (FFPE).

Metodologia

Identificació de perfils d'expressió gènica associats a la supervivència: La metaanàlisi es va realitzar emprant 4 bases de dades de GBM microxips de DNA ja publicades i que comprenien 110 casos (2-5). Les dades entre Affimetrix U95Av2 i U133A xips van ser comparades mapejant amb sondes de seqüència les dades disponibles amb dues bases de dades. Es van dicotomitjar els casos en dos grups, segons la supervivència, entre els típics (<2 anys) contraposats als a llarg termini (>=2 anys) (TS versus LTS, respectivament). S'han investigat diferents aproximacions estadístiques per identificar

els gens amb la major associació amb la supervivència incloent un taxa de canvi (ràtio de l'expressió mitjana per TS i LTS) i anàlisi de significativitat dels microxips (SAM). Els gens van ser ordenats en funció del seu grau de diferència entre els grups TS i LTS i els 200 primers gens associats a la supervivència van ser emprats per a les validacions creuades (figura 1) i per a les anàlisis portant a la identificació d'un gen de consens per a la supervivència (figura 2).

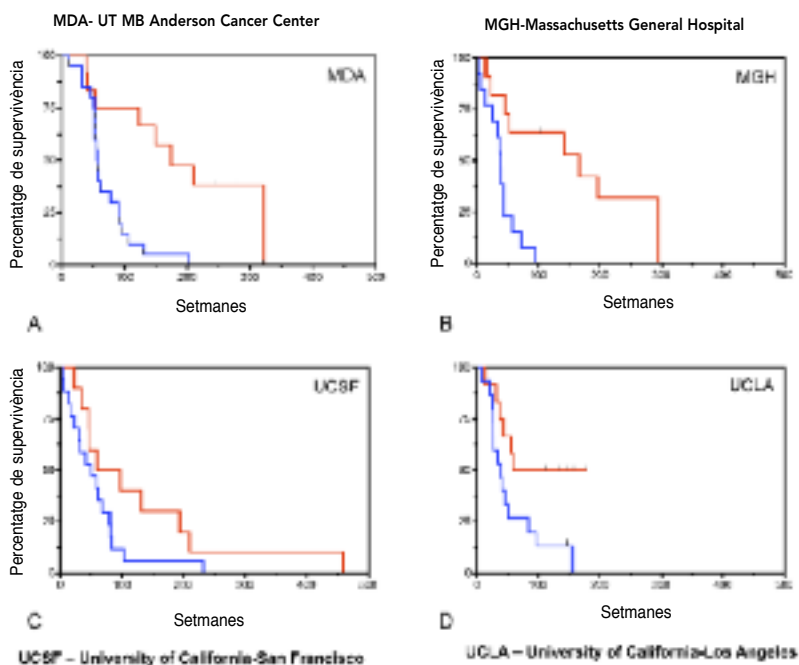


Figura 1
Perfils d'expressió gènica predictius de supervivència de mostres independents de GBM.
En proves de validació creuades, hem provat l'habilitat per a identificar 200 gens procedents de tres institucions utilitzable per a predir resultats clínics procedents d'una quarta institució.
Els resultats mostren que els perfils d'expressió gènica associada a la supervivència de la prova en els tres primers gràfics mostren una correlació estadística significativa en tots 4 anàlisis.

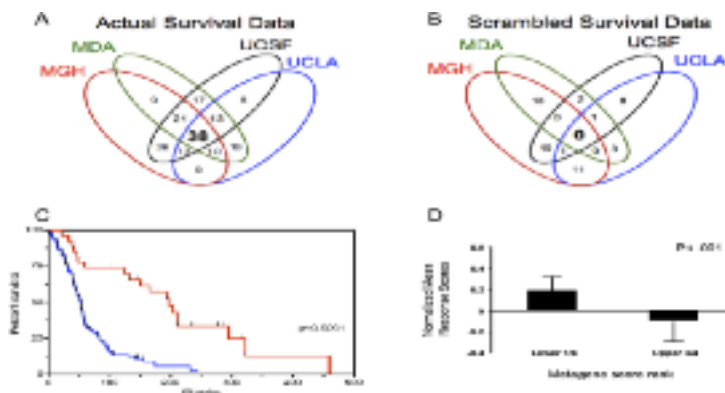


Figura 2

Identificació dels gens de consens de GBM associats als resultats clínics.

A. Superposició de gens de supervivència de 4 bases de dades de microips de DNA. Els primers 200 gens van ser identificats per a cada base de dades individualment i el solapament de les 4 llistes van identificar una col·lecció de 38 gens consensuats.

B. Estimació de taxes de falses descobertes utilitzant dades de supervivència barrejades.

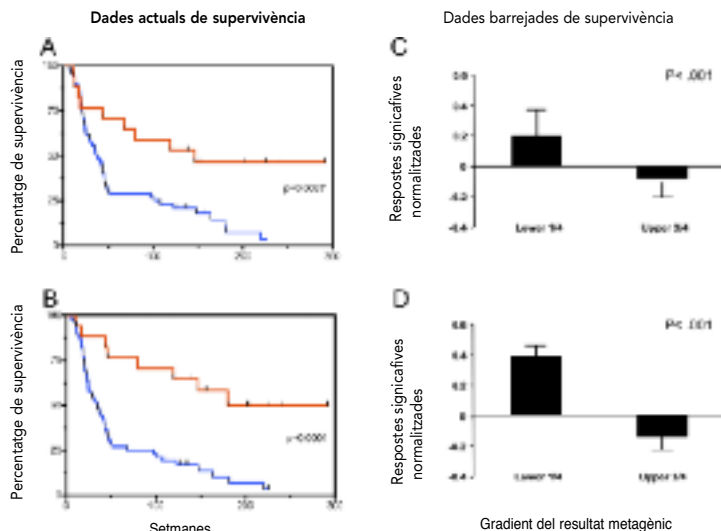
C. Supervivència d'acord amb el resultat metagènic. Els 38 gens associats a supervivència van ser usats per a calcular un resultat metagènic per cada mostra de GBM. La supervivència d'acord amb resultat metagènic es mostra en el traçat de base en vermell versus les mostres remanents en blau.

D. La resposta a la radiació d'acord amb el resultat metagènic pel subgrup de 23 mostres de C en les que les imatges pre i post radioteràpia van ser vàlides.

Càlcul d'un resultat metagènic: Amb l'objectiu de determinar l'associació entre el global de l'expressió gènica dels classificador i el resultat clínic del pacient, hem calculat un únic resultat *metagènic* per cada cas basat en la col·lecció de 38 gens sumant l'expressió dels valors normalitzats de tots els gens associats amb una baixa prognosi ($n=31$) i restant la suma l'expressió dels valors normalitzats de tots els gens associats a una bona prognosi ($n=7$) per cada cas. Això dona un únic resultat numèric per a cada tumor i llavors cada tumor és triat en funció del seu resultat metagènic.

Figura 3

Validació i optimització del predictor multigènic.



Quantitatiu RT-PCR Mesura de l'expressió gènica de teixit incrustat en parafina:

Mesures quantitatives de l'expressió gènica de gens potencials indicadors de supervivència en mostres de GBM fixades en formaldehid i incrustades en parafina (FFPE) es van realitzar emprant TaqMan quantitativa amb assaigs de reacció en cadena de la transcriptasa-polimerasa reversa(QRT-PCR). Els valors de DCt per a cada gen van ser calculats comparant-los amb la mitjana dels valors de Ct de 2 gens de control (GAPDH, GUSB) per a cada cas de tumor. Els valors de QRT-PCR van realitzar-se emprant una col·lecció de validació separada de 70 mostres de FFPE GBM de la UT MD Anderson Brain Tumor Tissue Bank.

Assaig multiplex d'expressió gènica: L'assaig Multiplex XPTTM-PCR, d'Althea Technologies, Inc. va ser emprat per quantificar l'expressió gènica utilitzant 50 ng d'inicialitzador de RNA. Després dels primers cicles de PCR conduïts per encebadors específics, encebadors universals procedeixen al procés d'amplificació, reduint la complexitat

de la reacció de PCR i bloquejant les concentracions relatives dels gens objectiu. Amb l'objectiu de quantificar el RNA degradat isolat de les mostres de FFPE, la talla del gen específic amplicon va ser restringit a entre 40-80 parells de bases. Nucleòtids separadors de diferents llargades van ser inserits entre la seqüència del gen específic i la seqüència universal per variar la llargada del fragment resultant de cada gen amplicon per permetre la separació del senyal de múltiples gens per electroforesi capil·lar. Els fragments marcats resultants van ser analitzats en un Beckman-Coulter GeXP Genetic Analysis d'electroforesi capil·lar per a la identificació, quantificació i normalització del senyal dels múltiples gens.

Gene symbol	Gene name	average qPCR	Expression level in typical survivors
TIMP1*	tissue inhibitor of metalloproteinase 1	7	higher
YKL40*	chitinase 3-like 1	8	higher
IGFBP2*	insulin-like growth factor binding protein 2	11	higher
LGALS3*	galectin 3	15	higher
LGALS1*	galectin 1	16	higher
KIAA559	KIAA559	18	lower
AQP1	aquaporin 1	23	higher
RTN1*	reticulon 1	26	lower
LDHA	lactate dehydrogenase A	27	higher
GRIN2	glutamate receptor, ionotropic, AMPA 2	29	lower
EMP3	epithelial membrane protein 3	29	higher
FABP5	fatty acid binding protein 5	29	higher
GLASTB1	gamma-aminobutyric acid	40	lower
TNC*	tenascin C	40	higher
COL1A2*	collagen, type I, alpha 2	41	higher
CLUG2	oligodendrocyte lineage transcription factor 2	41	lower
VEGF*	vascular endothelial growth factor	45	higher
MAOA	monoamine oxidase A	47	higher
FN1*	fibronectin 1	53	higher
SERPINA3*	alpha-1 antitrypsin	55	higher
PCPN	podoplanin	56	higher
TAGLN*	transgelin	59	higher
NHMT	N-methyl-N-methyltransferase	61	higher
CLIC1	chloride intracellular channel 1	61	higher
SERPINC1*	C1 inhibitor	65	higher
IGFBP3*	insulin-like growth factor binding protein 3	65	higher
SERPINE1*	plasminogen activator inhibitor type 1	72	higher
TM6SF10	thymosin, beta 10	72	higher
TGFB1*	transforming growth factor, beta-induced	72	higher
GPM6B	glycoprotein (transmembrane) nmb	74	higher
TCTE1L	5-complex-associated-testis-expressed 1-like	84	higher
RIS1	ret-induced senescence 1	95	higher
TAGLN2*	transgelin 2	102	higher
ACTN1*	actinin, alpha 1	102	higher
TCF12	transcription factor 12	105	lower
PLP2	prolactin protein 2	110	higher
OMG	oligodendrocyte myelin glycoprotein	119	lower
STOD410	STOD calcium binding protein A10	140	higher

Taula 1
38 gens associats de supervivència
GBM consensuats.

Bibliografia

1. Stupp, R. et al. "Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma". *N Engl J Med*, 2005. 352 (10): p. 987-96.
2. Nigro, J. M. et al. "Integrated array-comparative genomic hybridization and expression array profiles identify clinically relevant molecular subtypes of glioblastoma". *Cancer Res*, 2005. 65 (5): p. 1678-86.
3. Phillips, H. S. et al. "Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis". *Cancer Cell*, 2006. 9 (3): p. 157-73.
4. Nutt, C. L. et al. "Gene expression-based classification of malignant gliomas correlates better with survival than histological classification". *Cancer Res*, 2003. 63 (7): p. 1602-7.
5. Freije, W. A. et al. "Gene expression profiling of gliomas strongly predicts survival". *Cancer Res*, 2004. 64 (18): p. 6503-10.
6. Rich, J. N. et al. "Gene expression profiling and genetic markers in glioblastoma survival". *Cancer Res*, 2005. 65 (10): p. 4051-8.
7. Hegi, M. E. et al. "MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma". *N Engl J Med*, 2005. 352 (10): p. 997-1003.

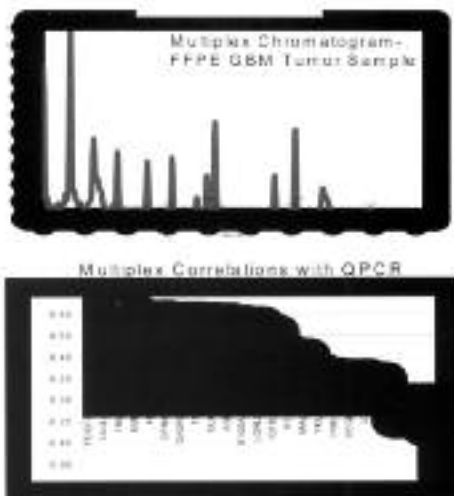


Figura 4
Resultats de l'assaig multiplex.

Conclusions

La metaanàlisi de l'expressió gènica identifica una col·lecció multigènica com a essent predictiva de la supervivència i de la resposta a la radiació de casos recentment diagnosticats de GBM.

La utilització de taxes de canvi per identificar gens associats a la supervivència millora la identificació de gens de consens entre múltiples institucions comparat al t-test i al SAM.

S'ha realitzat la validació d'una col·lecció de 38 gens com a predictors de la supervivència i de la resposta a la radiació emprant assajos de QRT-PCR en mostres independents fixades en formaldehid i incrustades en parafina.

Alguns tumors refractaris exhibeixen propietats d'EMT/angiogènesis, i suggereixen possibles dianes terapèutiques per a pacients resistents a la teràpia estàndard.

La utilització d'un assaig multiplex per a la quantificació simultània de l'expressió de teixit FFPE és factible i mostra fortes correlacions positives amb les dades d'expressió del QRT-PCR per a la majoria dels gens provats.