

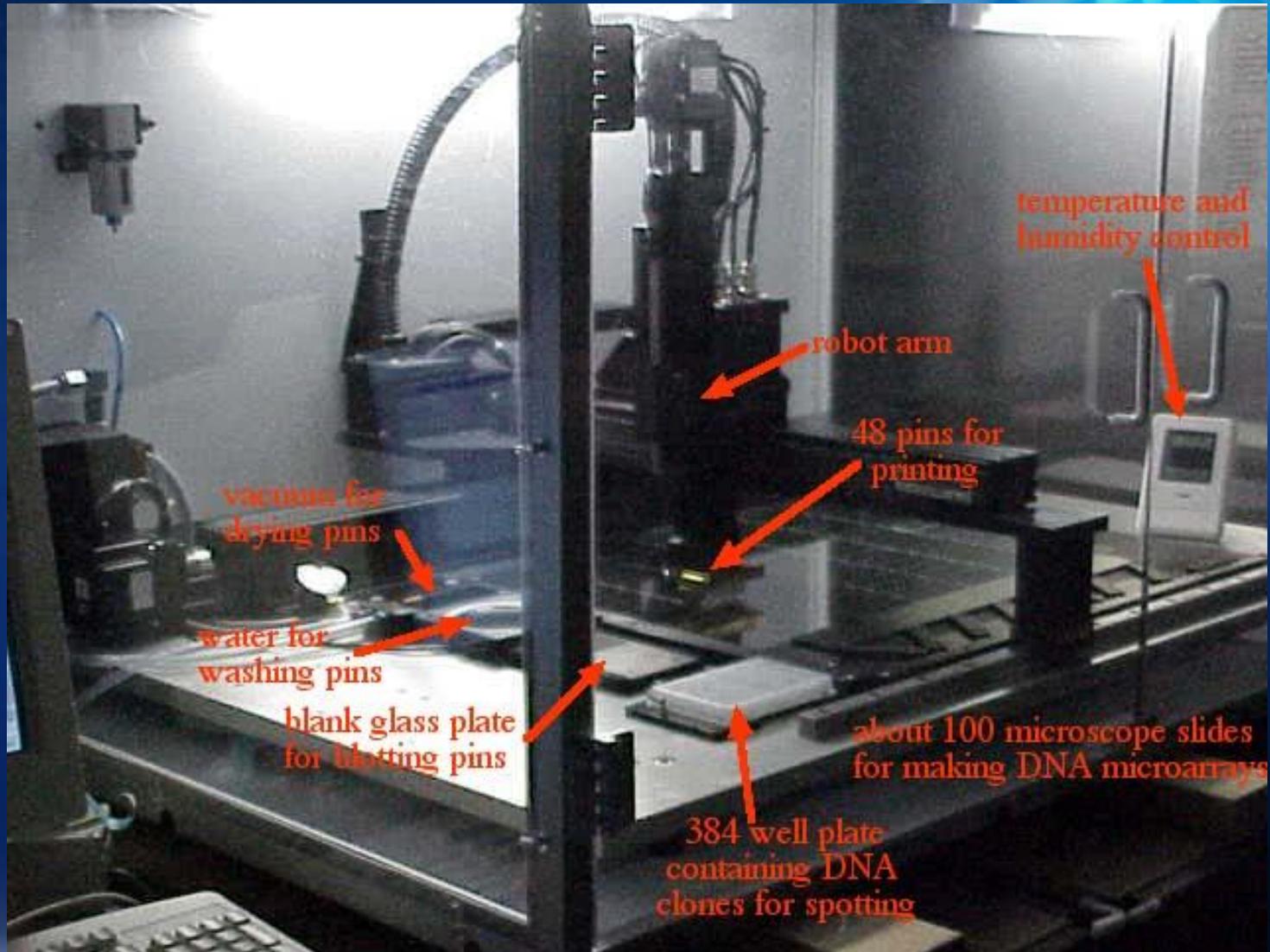
# Microarrays en melanoma

## ¿Qué es un microarray?

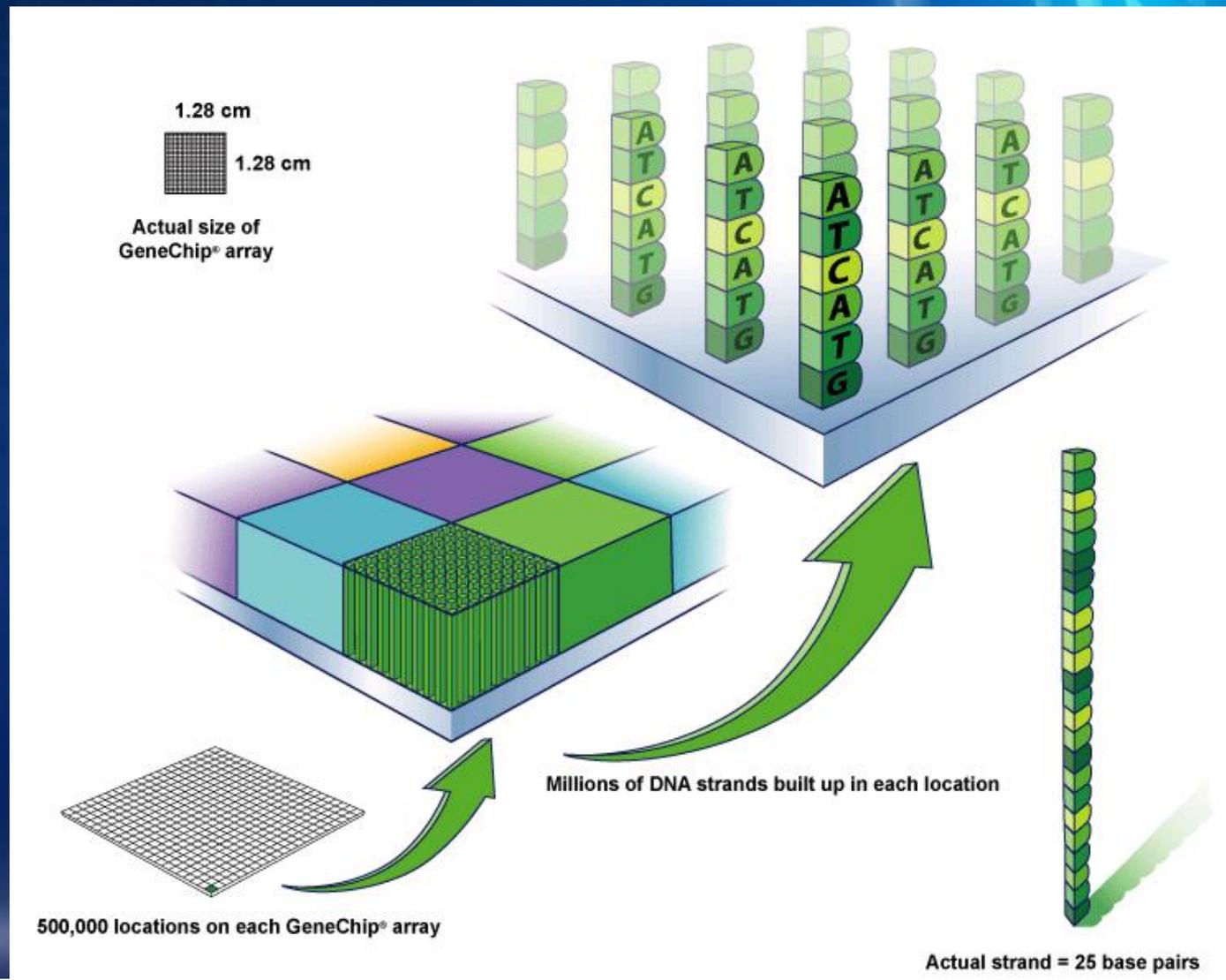
- Arrays de “oligonucleotides” arrays: sets de oligos (“sondas”) representando la secuencia de un gen en particular que son sintetizados directamente en la superficie de cristal base por base mediante fotolitografía (ej Affimetrix) o mediante síntesis química (ej ink-jet Agilent)
- Sondas cortas – normalmente 25 nucleótidos de longitud (Affimetrix) o 60 mers (Agilent)



## Producción de microarrays mediante robótica

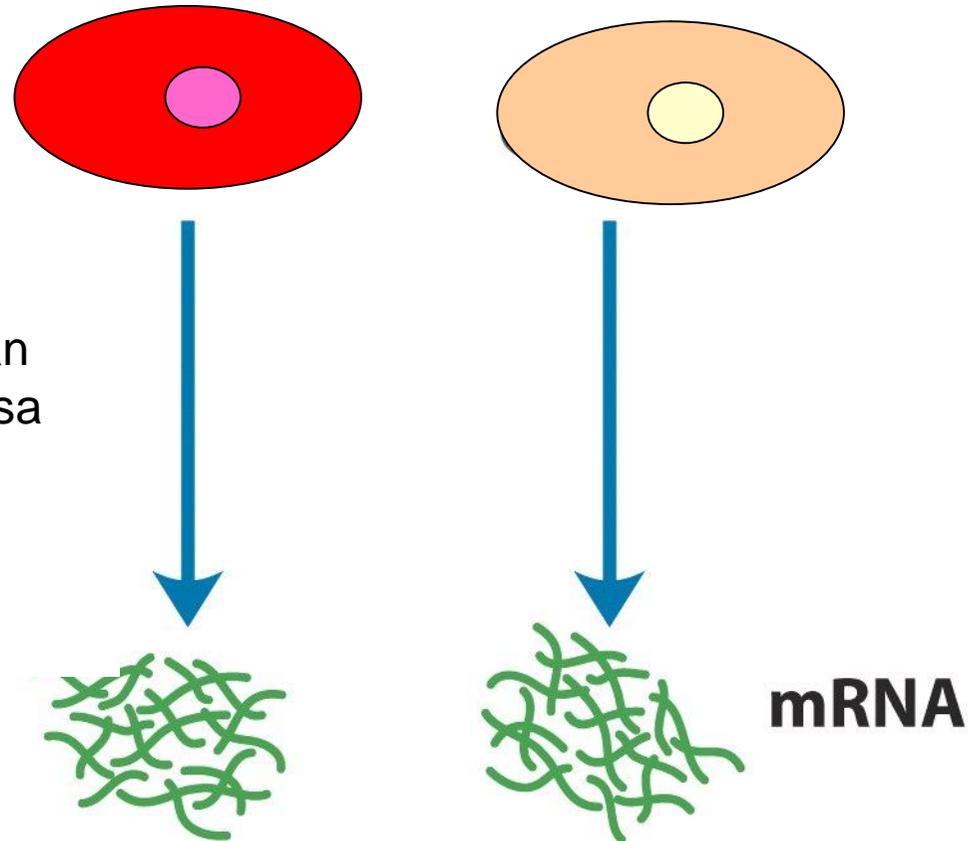


# Arrays de Oligonucleótidos: síntesis de sondas DIRECTAMENTE en la superficie del chip



# 1. Aislamiento del RNA

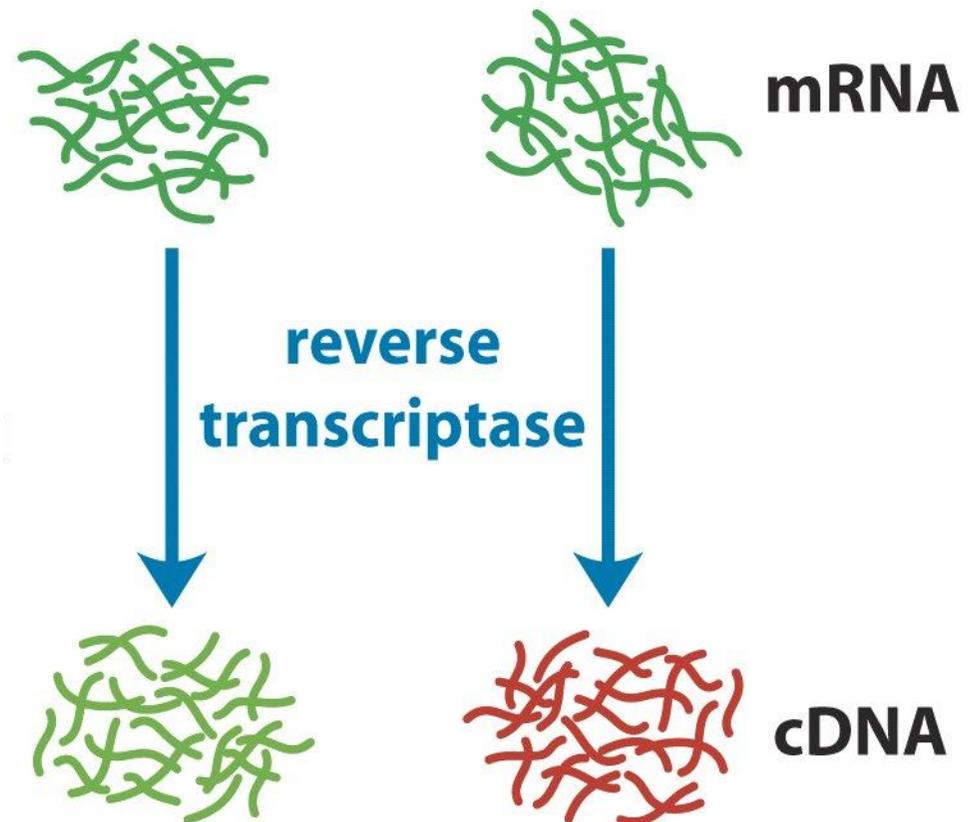
Aislamiento de mRNA de células normales y células tumorales; cada muestra de mRNA representan a todos los genes expresados en esa célula o tejido en el momento de la extracción



## 2. Generar DNA marcados

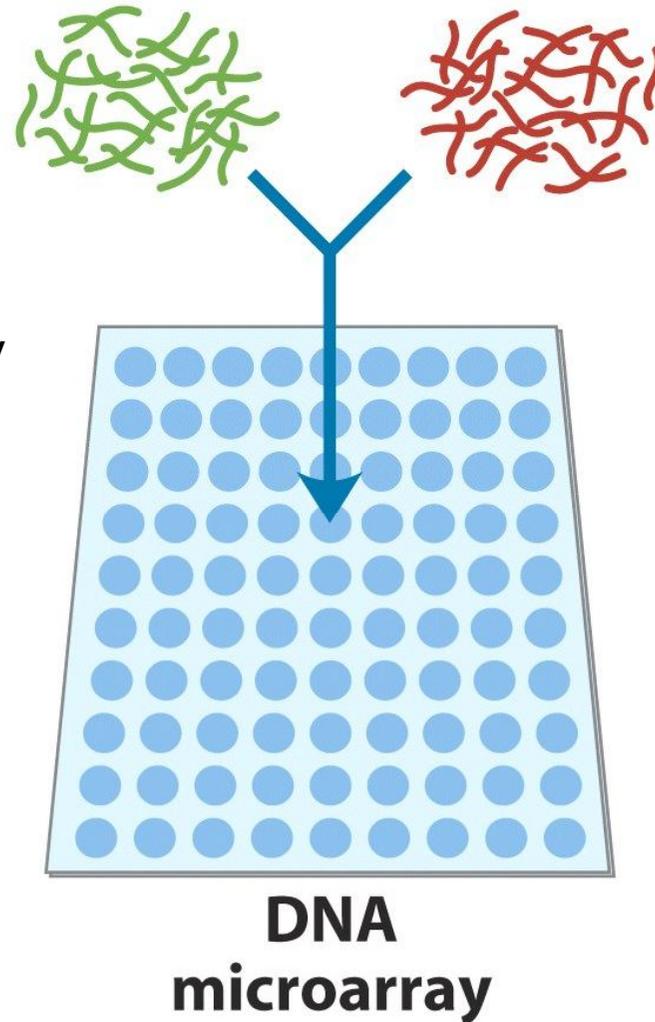


Convertir mRNAs en cDNAs mediante transcripción inversa, usando desoxirribonucleótidos marcados con fluorescencia

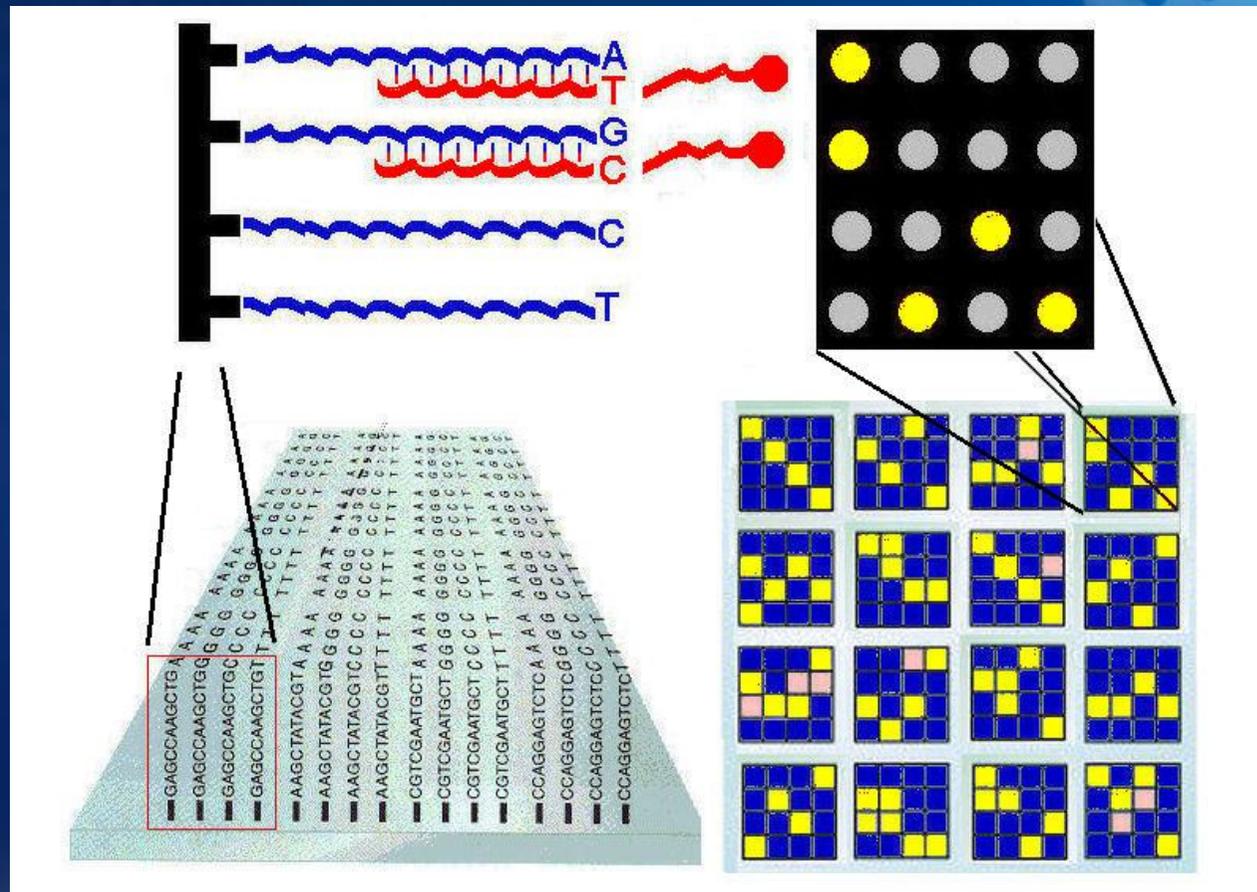


### 3. Hibridar ambos cDNA en un único microarray

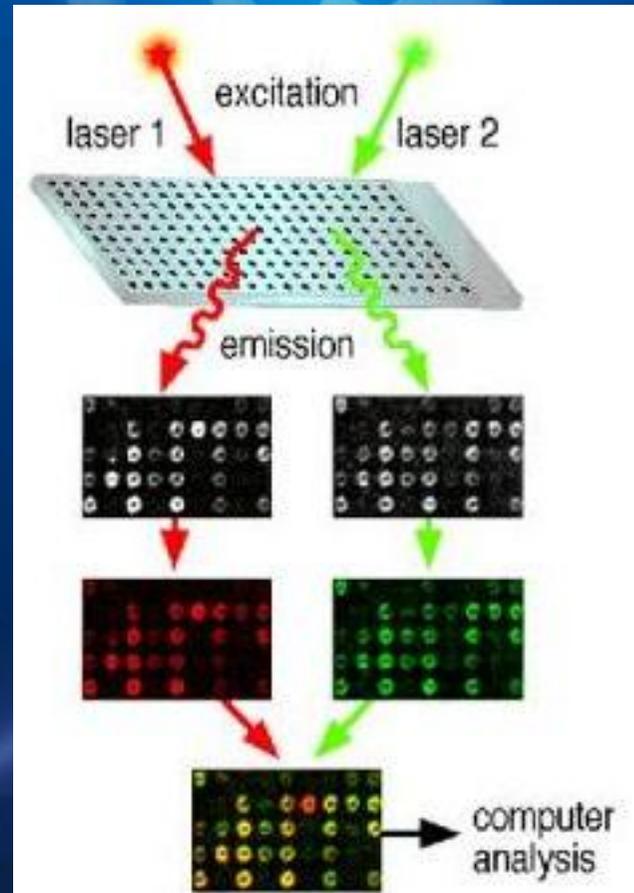
Añadir los cDNAs al microarray  
Los cDNAs anillan a las  
secuencias complementarias  
sobre el microarray



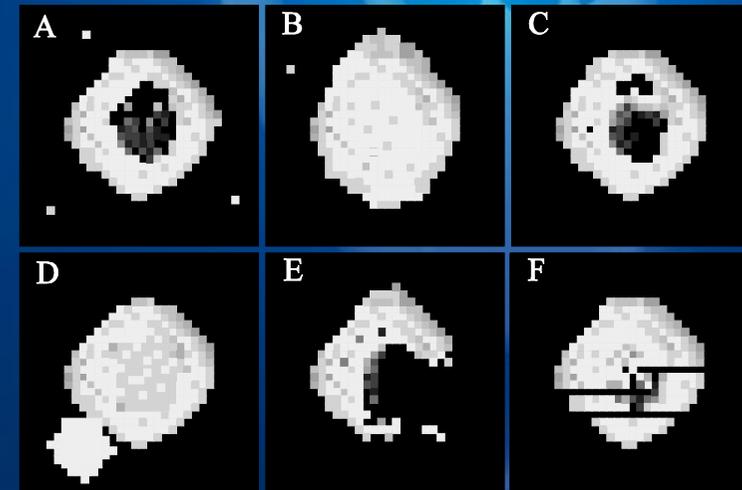
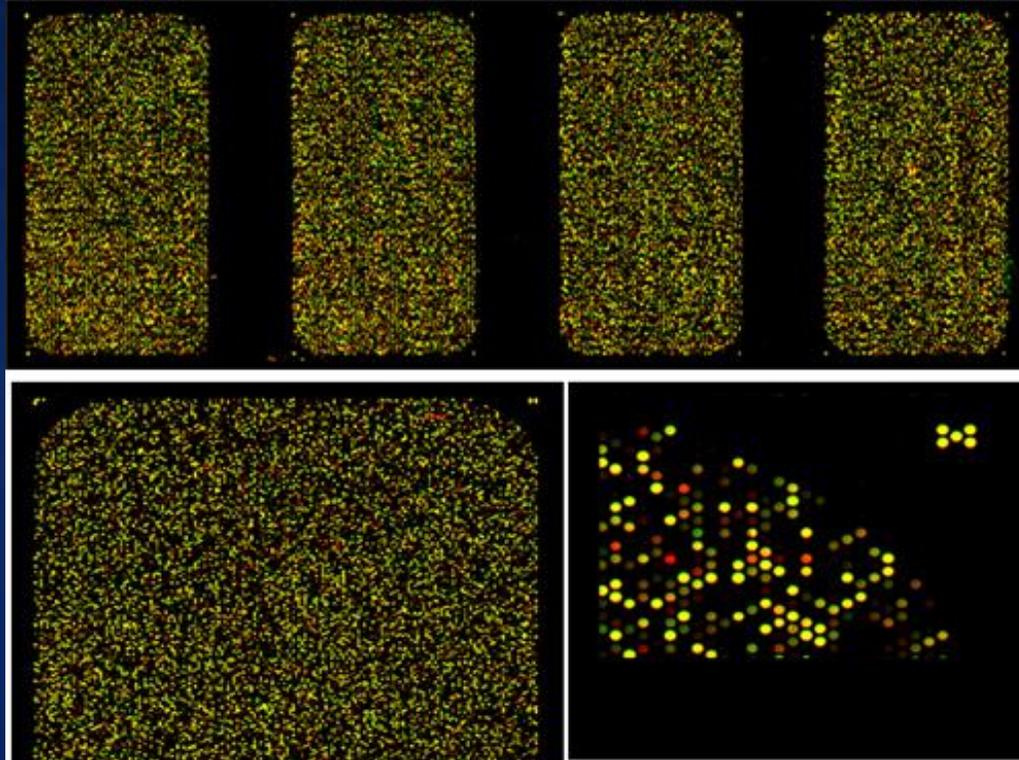
### 3. Hibridar ambos cDNA en un único microarray



## 4. Scanear el chip



## 4. Expresión genética de 4 muestras.



→ **datos crudos** pixel por pixel

Señal de fluorescencia “Promedio” para cada gen = **nivel de expresión del gen**

## 5. Análisis estadístico

OBJETIVO: Identificación de genes expresados diferencialmente entre muestras.

### 1-PREPROCESADO

Mediante métodos de análisis de imagen, normalización y transformación de datos.

### 2- INFERENCIA

Mediante test estadísticos simultáneos (multiple testing procedures) para establecer qué genes se encuentran expresados diferencialmente.

### 3-CLASIFICACIÓN (Clustering o discriminación)

No supervisada en la que las clases no son conocidas.

Supervisada en la que las clases son definidas de antemano.

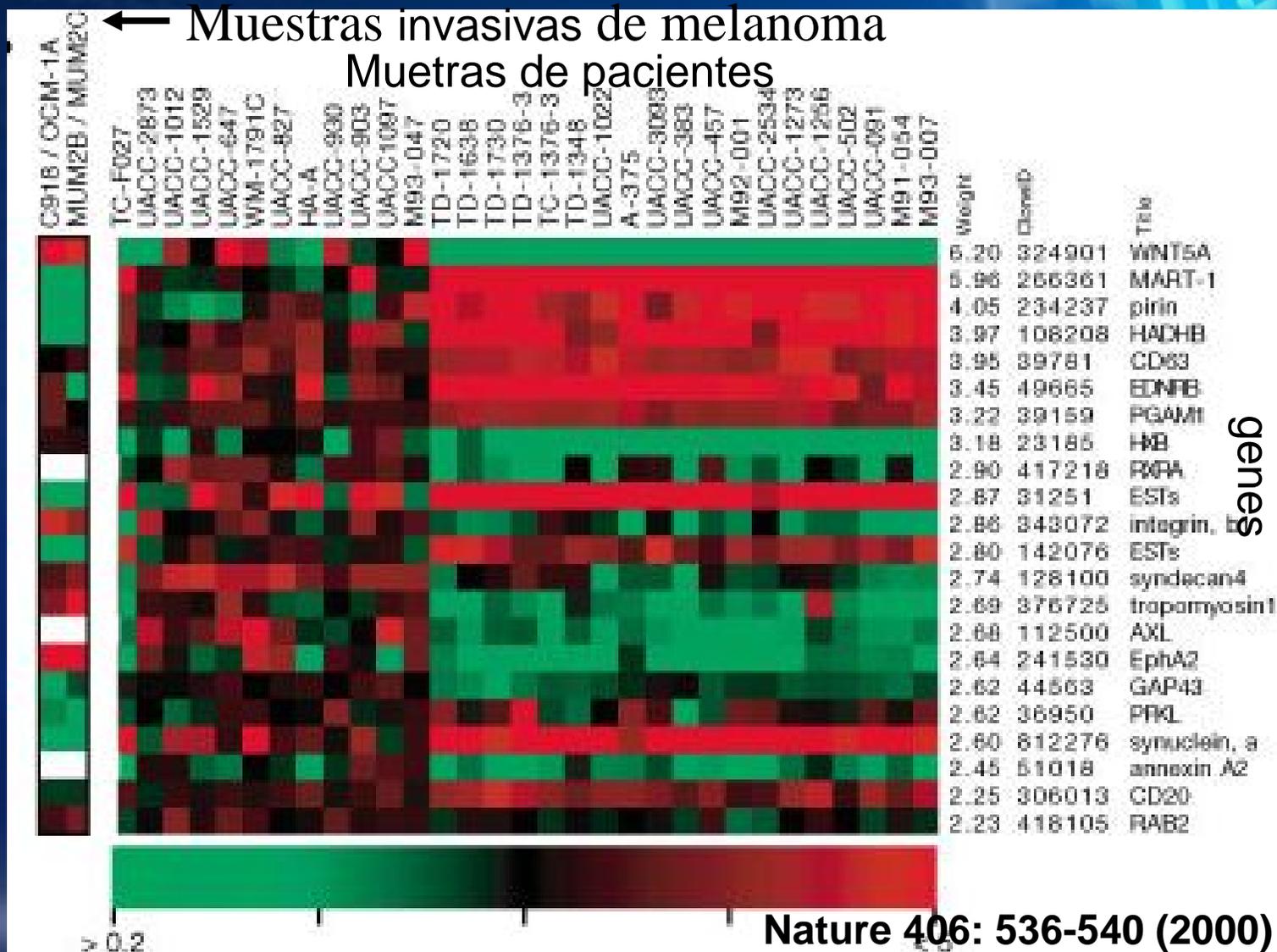
## 5. Análisis estadístico

Cada sonda del array representa un “experimento” entre decenas de miles.

Con un test de significación estadística los microarrays de ADN producirán estadísticamente un número determinado de falsos positivos. Es decir un número determinado de “experimentos” pasará el cut-off del P-value seleccionado.

Con un cut-off de 0.05 en un experimento con mil sondas cabe esperar que aprox. 50 genes erróneamente rechacen la hipótesis nula (que no hay diferencias de expresión entre las muestras).

## 5. Aplicación GEP en tumores



## Transformación de melanocitos a melanoma

- Identificación marcadores útiles en la clínica.
- Comprender los cambios transcripcionales en genes en la transformación neoplásica

Los primeros trabajos utilizaron arrays con un número relativamente pequeño de genes en plataformas “custom-made” (Derisi et al., 1996; Maniotis et al., 1999) ([De Wit et al., 2005](#); [Dooley et al., 2003](#); [Mirmohammadsadegh et al., 2004](#); [Seykora et al., 2003](#); [Zuidervaart et al., 2003](#)) y la conclusión es que no hay un acuerdo entre ellos (pequeñas plataformas, pocas réplicas e insuficiente astringencia estadística).

# Transformación de melanocitos a melanoma

BRB-ArrayTools Data Archive - Windows Internet Explorer

http://linus.nci.nih.gov/~brb/DataArchive\_New.html

Archivo Edición Ver Favoritos Herramientas Ayuda

USP Hospitales Portal del Em... BRB-ArrayTools Data Arc...

## BRB-ArrayTools Data Archive for Human Cancer Gene Expression

Expression array data and clinical descriptors are stored as BRB-ArrayTools project folders. To analyze a dataset, simply download and unzip the file and open the project worksheet in excel on a Microsoft Windows PC. BRB-ArrayTools must have been installed on the machine.

BRB-ArrayTools is a comprehensive state-of-the-art statistical analysis system for the analysis of microarray gene expression data. It is easily installed as an excel plug-in using its self installer. To download BRB-ArrayTools, go to <http://linus.nci.nih.gov/~brb/BRB-ArrayTools.html> Click [here](#) to download BRB-ArrayTools User's Manual.

Reference: Zhao Y and Simon R. BRB ArrayTools Data Archive for Human Cancer Gene Expression: A Unique and Efficient Data Sharing Resource. *Cancer Informatics* 6:9-15, 2008.

Tumor Type	Citation	Paper	Transformed Zip File	Readme File
Bladder Cancer	<a href="#">Dyrskjot et al. Nat Genet. (2003) 33:90-96</a>	<a href="#">Identifying distinct classes of bladder carcinoma using microarrays</a>	 <a href="#">4.3 MB</a>	
Bladder Cancer	<a href="#">Dozmorov et al. (2003)</a>	Extracellular matrix-modulation of malignant phenotype in bladder	 <a href="#">0.1 MB</a>	
Brain Cancer	<a href="#">Pomeroy et al. (2002) Nature 415:436-42</a>	<a href="#">Prediction of central nervous system embryonal tumour outcome based on gene expression</a>	 <a href="#">6.6 MB</a>	
Brain Cancer	<a href="#">Liang et al. (2005) PNAS 102:5814-9</a>	<a href="#">Gene expression profiling reveals molecularly and clinically distinct subtypes of glioblastoma multiforme</a>	 <a href="#">18.1 MB</a>	

Internet 100%

BRB-ArrayTools Data Archive - Windows Internet Explorer

http://linus.nci.nih.gov/~brb/DataArchive\_New.html

Archivo Edición Ver Favoritos Herramientas Ayuda

USP Hospitales Portal del Em... BRB-ArrayTools Data Arc... x

Herramientas

Medulloblastoma	<a href="#">29:143-52</a>	<a href="#">and the RAS/MAPK pathway as therapeutic targets for metastatic disease</a>	1.0 MB	
Melanoma	<a href="#">Bittner et al. (2000) Nature 406:536-40</a>	<a href="#">Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling</a>	2.3 MB	
Melanoma	<a href="#">Smith et al. (2005) Cancer Biol Ther. 4:1018-29</a>	<a href="#">Whole-genome expression profiling of the melanoma progression pathway reveals marked molecular differences between nevi/melanoma in situ and advanced-stage melanomas</a>	19.1 MB	
Melanoma	<a href="#">Talantov et al. (2005) Clin Cancer Res. 11:7234-42</a>	<a href="#">Novel genes associated with malignant melanoma but not benign melanocytic lesions</a>	22.8 MB	
Melanoma	<a href="#">Winnepeninckx et al. (2006) J Natl Cancer Inst. 98(7):472-82.</a>	<a href="#">Gene expression profiling of primary cutaneous melanoma and clinical outcome</a>	42.9 MB 10.1 MB	
Mesothelioma	<a href="#">Gordon et al. (2005)</a>	<a href="#">Malignant pleural mesothelioma</a>	15.7 MB	
Myeloma	<a href="#">Tian et al. (2003) N Engl J Med. 349:2483-94</a>	<a href="#">The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma</a>	30.6 MB	
Myeloma	<a href="#">Mattioli et al. (2005) Oncogene 24:2461-2473</a>	<a href="#">Gene expression profiling of plasma cell dyscrasias reveals molecular patterns associated with distinct IGH translocations in multiple myeloma</a>	15.3 MB	
Osteosarcoma	<a href="#">Stossi et al. (2004) Endocrinology 145:2472-84</a>	<a href="#">Transcriptional profiling of estrogen-regulated gene expression via estrogen receptor (ER) alpha or ERbeta in human osteosarcoma cells: distinct</a>	5.9 MB	

http://www.nature.com/ng/journal/v29/n2/full/ng731.html

Internet 100%

## Transformación de melanocitos a melanoma

-Plataformas más grandes ([Haqq et al., 2005](#); [Hoek et al., 2004](#); [Talentov et al., 2005](#)).  
Tejidos normales y melanoma.

6092-6097 | PNAS | April 26, 2005 | vol. 102 | no. 17

### The gene expression signatures of melanoma progression

Christopher Haqq<sup>\*†</sup>, Mehdi Nosrati<sup>‡</sup>, Daniel Sudilovsky<sup>§</sup>, Julia Crothers<sup>\*</sup>, Daniel Khodabakhsh<sup>\*</sup>, Brian L. Pulliam<sup>\*</sup>, Scot Federman<sup>\*</sup>, James R. Miller III<sup>‡</sup>, Robert E. Allen<sup>¶</sup>, Mark I. Singer<sup>||</sup>, Stanley P. L. Leong<sup>||</sup>, Britt-Marie Ljung<sup>§</sup>, Richard W. Sagebiel<sup>\*</sup>, and Mohammed Kashani-Sabet<sup>†‡</sup>

***Human Cancer Biology***

Clin Cancer Res 2005;11(20) October 15, 2005

### Novel Genes Associated with Malignant Melanoma but not Benign Melanocytic Lesions

Dmitri Talantov, Abhijit Mazumder, Jack X. Yu, Thomas Briggs, Yuqiu Jiang  
John Backus, David Atkins, and Yixin Wang

# Transformación de melanocitos a melanoma

[CANCER RESEARCH 64, 5270–5282, August 1, 2004]

## Expression Profiling Reveals Novel Pathways in the Transformation of Melanocytes to Melanomas

Keith Hoek,<sup>1</sup> David L. Rimm,<sup>2</sup> Kenneth R. Williams,<sup>1</sup> Hongyu Zhao,<sup>3</sup> Stephan Ariyan,<sup>4</sup> Aiping Lin,<sup>1</sup> Harriet M. Kluger,<sup>5</sup> Aaron J. Berger,<sup>2</sup> Elaine Cheng,<sup>6</sup> E. Sergio Trombetta,<sup>7</sup> Terence Wu,<sup>1</sup> Michio Niinobe,<sup>8</sup> Kazuaki Yoshikawa,<sup>8</sup> Gregory E. Hannigan,<sup>9</sup> and Ruth Halaban<sup>6</sup>

-Hoek, 2007 en una revisión de estos tres trabajos concluye que solo dos genes (CITED1 y CDH3) son identificados como genes expresados diferencialmente por los tres artículos.

## DNA microarray analyses of melanoma gene expression: a decade in the mines

Keith S. Hoek\*

Estudio combinando datos procedentes de experimentos que emplear una misma plataforma Affymetrix HG.U133A y líneas celulares:

- 4 estudios proporcionaron el set de muestras control (Hoek et al., 2004, 2006; Magnoni et al., 2007, Ryu et al., 2007)
- 5 sets de melanomas (mínimo de 12 muestras por set) de 3 estudios diferentes (Hoek et al., 2006; Johansson et al., 2007; Packer et al., 2007)

**Hoek****Table 1.** Genes downregulated in melanoma

Rank	ID	Gene symbol	Gene title
1	203716_s_at 211478_s_at 203717_at	Dpp4	Dipeptidyl-peptidase 4
2	201131_s_at 201130_s_at	CDH1	Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)
3	203256_at	CDH3	Cadherin 3, type 1, P-cadherin (placental)
4	201787_at 202994_s_at 207835_at	FBLN1	Fibulin 1
5	206498_at	OCA2	Oculocutaneous albinism II (pink-eye dilution homolog, mouse)
6	205051_s_at	KIT	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
7	218723_s_at	C13orf15	Chromosome 13 open reading frame 15
8	219478_at	WFDC1	WAP four-disulfide core domain 1
9	214580_x_at	KRT6	Keratin 6A, keratin 6B, keratin 6C
10	209612_s_at 209613_s_at	ADH1B	alcohol dehydrogenase 1B (Class I), beta polypeptide
11	204463_s_at 204464_s_at	EDNRA	Endothelin receptor type A
12	216603_at 202752_x_at 216092_s_at	SLC7A8	Solute carrier family 7, member 8
13	212935_at	MCF2L	MCF.2 cell line derived transforming sequence-like
14	218638_s_at	SPON2	Spondin 2, extracellular matrix protein
15	214071_at	MPPE1	Metallophosphoesterase 1
16	205551_at	SV2B	Synaptic vesicle glycoprotein 2B
17	209959_at	NR4A3	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3
18	204777_s_at	MAL	Mal, T-cell differentiation protein
19	203407_at	PPL	Periplakin
20	219315_s_at	C16orf30	Chromosome 16 open reading frame 30
21	202283_at	SERPINF1	Serpin peptidase inhibitor, clade F, member 1
22	206030_at	ASPA	Aspartoacylase (Canavan disease)
23	220911_s_at	KIAA1305	KIAA1305
24	209924_at	CCL18	Chemokine (C-C motif) ligand 18
25	204187_at	GMPR	Guanosine monophosphate reductase

## Hoek

**Table 1.** Genes downregulated in melanoma

Rank	ID	Gene symbol	Gene title
26	219040_at	CORO7	Coronin 7
27	218831_s_at	FCGRT	Fc fragment of IgG, receptor, transporter, alpha
28	205824_at	HSPB2	Heat shock 27 kDa protein 2
29	202286_s_at	TACSTD2	Tumor-associated calcium signal transducer 2
30	220813_at	CYSLTR2	Cysteinyl leukotriene receptor 2
31	202450_s_at	CTSK	Cathepsin K
32	207761_s_at	METTL7A	Methyltransferase like 7A
33	205738_s_at	FABP3	Fatty acid-binding protein 3, muscle and heart
34	206484_s_at	XPNPEP2	X-prolyl aminopeptidase 2, membrane-bound
35	219855_at	NUDT11	Nudx (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 11
36	208017_s_at	MCF2	MCF.2 cell line derived transforming sequence
37	220748_s_at	ZNF580	Zinc finger protein 580
38	203402_at	KCNAB2	Potassium voltage-gated channel, beta member 2
39	212912_at	RPS6KA2	Ribosomal protein S6 kinase, 90 kDa, polypeptide 2
40	212338_at	MYO1D	Myosin ID
41	216066_at	ABCA1	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1
42	217077_s_at 209990_s_at	GABBR2	Gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 2
43	209235_at	CLCN7	Chloride channel 7
44	205620_at	F10	Coagulation factor X
45	201525_at	APOD	Apolipoprotein D
46	208763_at	FKBP6	FK506-binding protein 6, 36 kDa
47	208039_at	RAB33A	RAB33A, member RAS oncogene family
48	211462_s_at	TBL1Y	Transducin (beta)-like 1Y-linked
49	204454_at	LDOC1	Leucine zipper, downregulated in cancer 1
50	214382_at	UNC93A	unc-93 homolog A (C. elegans)

**Hoek****Table 2.** Genes upregulated in melanoma

Rank	ID	Gene symbol	Gene title
1	214612_x_at	MAGEA6	Melanoma antigen family A, 6
2	209942_x_at	MAGEA3	Melanoma antigen family A, 3
3	210467_x_at	MAGEA12	Melanoma antigen family A, 12
4	204086_at	PRAME	Preferentially expressed antigen in melanoma
5	201689_s_at	TPD52	Tumor protein D52
	201688_s_at		
	201690_s_at		
6	209312_x_at	HLA-DRB1	Major histocompatibility complex, class II, DR beta 1
	208306_x_at		
	215193_x_at		
	204870_x_at		
7	209875_s_at	SPP1	Secreted phosphoprotein 1 (osteopontin)
8	201291_s_at	TOP2A	Topoisomerase (DNA) II alpha 170 kDa
9	203440_at	CDH2	Cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal)
10	201656_at	ITGA6	Integrin, alpha 6
	215177_s_at		
11	218782_s_at	ATAD2	ATPase family, AAA domain containing 2
12	202720_at	TES	Testis derived transcript (3 LIM domains)
13	204702_s_at	NFE2L3	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 3
14	202149_at	NEDD9	Neural precursor cell expressed, developmentally downregulated 9
15	220238_s_at	KLHL7	Kelch-like 7 (Drosophila)
16	202350_s_at	MATN2	Matrilin 2
17	204286_s_at	PMAIP1	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
	204285_s_at		
18	208894_at	HLA-DRA	Major histocompatibility complex, class II, DR alpha
19	205110_s_at	FGF13	Fibroblast growth factor 13
20	202291_s_at	MGP	Matrix Gla protein
21	210869_s_at	MCAM	Melanoma cell adhesion molecule
	211340_s_at		
	209087_x_at		
22	206070_s_at	EPHA3	EPH receptor A3
23	207147_at	DLX2	Distal-less homeobox 2
24	210095_s_at	IGFBP3	Insulin-like growth factor-binding protein 3
25	205885_s_at	ITGA4	Integrin, alpha 4 (antigen CD49D, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor)
	205884_at		
	213416_at		

### Down-regulated genes

Epithelial cadherin,  
Dipeptidyl peptidase IV  
c-KIT  
WFDC1

### Up-regulated genes

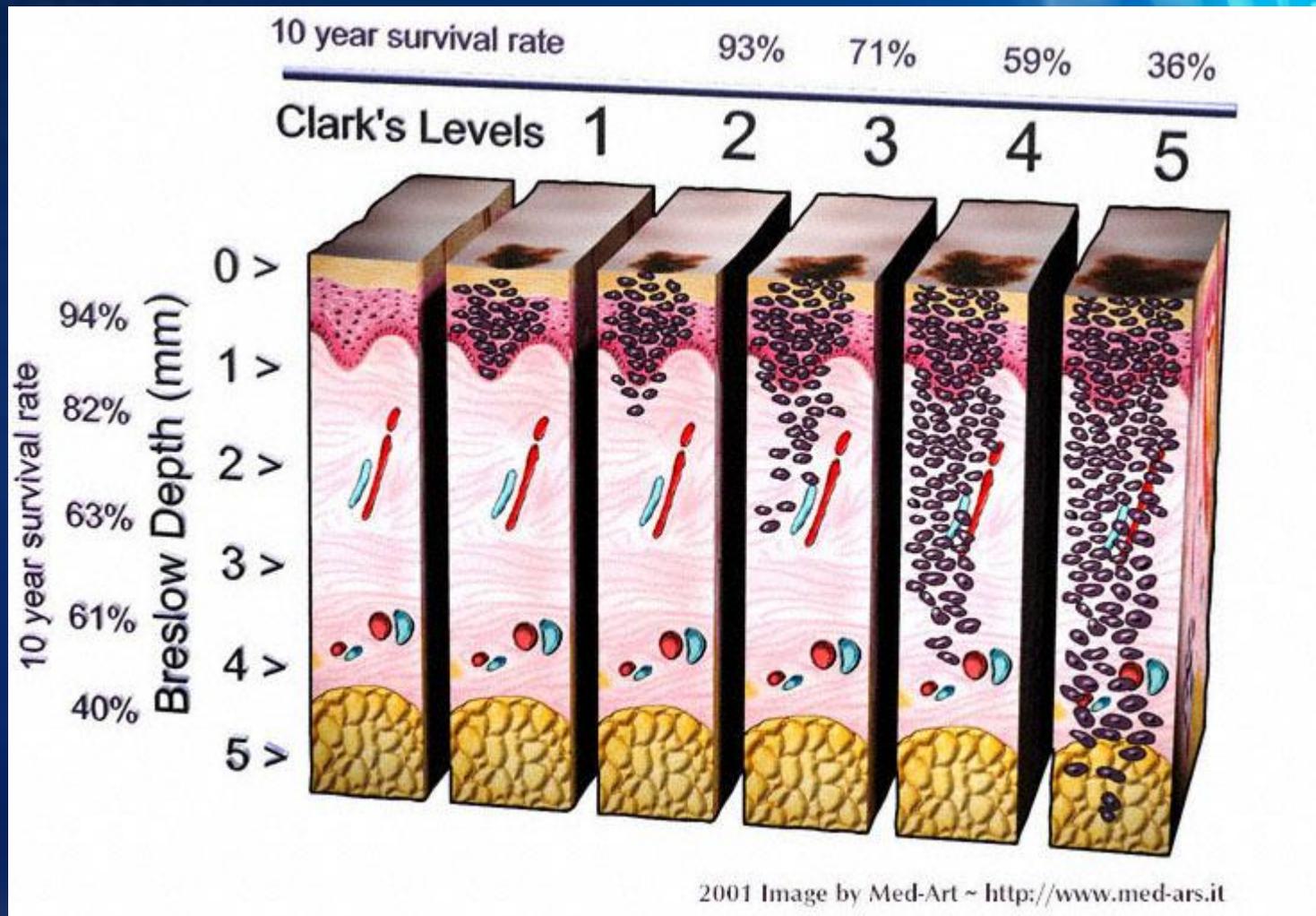
MAGEA6  
MAGEA3  
MAGEA12  
PRAME  
HLA-DRB1  
Neural cadherin  
Osteopontin  
TPD52  
Notch-2

### Transcription profiling in melanoma

**Table 3.** Extent of agreement between the present transformation analyses and others

Analysis	Downregulated			Upregulated		
	Found <sup>a</sup>	Intersect <sup>b</sup>	P-value <sup>c</sup>	Found	Intersect	P-value
Hoek et al. (2004)	274	20	$<10^{-15}$	316	88	$<10^{-15}$
Kaufmann et al. (2007) <sup>d</sup>	704	26	$<10^{-18}$	255	50	$<10^{-10}$
Talantov et al. (2005) <sup>e</sup>	–	–	–	439	31	NS
Haqq et al. (2005) <sup>f</sup>	404	8	$<0.003$	672	78	NS

# Progresión del primario a metástasis a distancia



## Progresión del primario a metástasis a distancia

Los perfiles de expresión génica han sido utilizados para la búsqueda de mejores marcadores de progresión y explorar la biología de los estadios de progresión

Algunos trabajos utilizaron ninguna o un número muy pequeño de réplicas (Baldi et al., 2003; Gallagher et al., 2005; Xi et al., 2006)

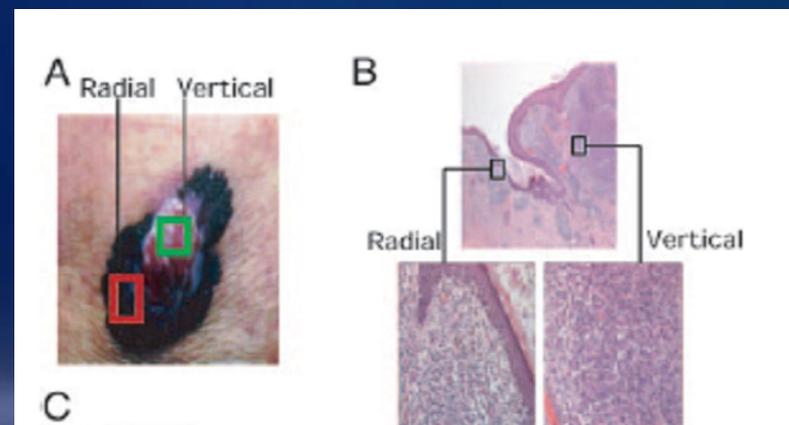
Haqq et al., 2005; Smith et al., 2005 estudian estados de progresión  
Con un número de muestras suficientes para tener un poder estadístico significativo

# The gene expression signatures of melanoma progression

Christopher Haqq<sup>\*,†</sup>, Mehdi Nosrati<sup>‡</sup>, Daniel Sudilovsky<sup>§</sup>, Julia Crothers<sup>\*</sup>, Daniel Khodabakhsh<sup>\*</sup>, Brian L. Pulliam<sup>\*</sup>, Scot Federman<sup>\*</sup>, James R. Miller III<sup>‡</sup>, Robert E. Allen<sup>¶</sup>, Mark I. Singer<sup>||</sup>, Stanley P. L. Leong<sup>||</sup>, Britt-Marie Ljung<sup>§</sup>, Richard W. Sagebiel<sup>\*</sup>, and Mohammed Kashani-Sabet<sup>†,‡</sup>

-GEP de piel, nevus, melanoma 1<sup>o</sup> y metástasis.

We found that metastatic melanomas exhibit two dichotomous patterns of gene expression, which unexpectedly reflect gene expression differences already apparent in comparing laser-capture microdissected radial and vertical phases of a large primary melanoma. Unsupervised hierarchical clustering accurately separated nevi and primary melanomas. Multiclass significance analysis of microarrays comparing normal skin, nevi, primary melanomas, and the two types of metastatic melanoma identified 2,602 transcripts that significantly correlated with sample class. These results suggest that melanoma pathogenesis can be understood as a series of distinct molecular events. The gene expression signatures identified here provide the basis for developing new diagnostics and targeting therapies for patients with malignant melanoma.





**Gene Expression Signatures for Tumor Progression, Tumor Subtype, and Tumor Thickness in Laser-Microdissected Melanoma Tissues**

Jochen Jaeger,<sup>1</sup> Dirk Koczan,<sup>2</sup> Hans-Juergen Thiesen,<sup>2</sup> Saleh M. Ibrahim,<sup>2</sup> Gerd Gross,<sup>3</sup>  
Rainer Spang,<sup>1</sup> and Manfred Kunz<sup>3</sup>

-Se comparan lesiones primarias con metástasis sin distinción del espesor. Se identificaron 308 genes discriminantes entre lesión primaria y metástasis resaltando cambios en la regulación del ciclo celular, mitosis, comunicación celular y adhesión celular.

## Progresión del primario a metástasis a distancia

Es debatible que estas diferencias sean debidas a las células de melanoma per se ya que líneas celulares no son tan distinguibles por su perfil transcripcional (Jaeger et al., 2007).

Entre las fases de crecimiento radial y vertical ocurren cambios significativos en la expresión genética que llevan a la proliferación y supresión de la apoptosis. Mientras que no hay suficientes datos para confirmar diferencias entre estadios posteriores o estos son menos remarcables que los cambios que diferencia las lesiones RGP y VGP.

## Supervivencia

Los perfiles de expresión supusieron una oportunidad para tener una información pronóstica para pacientes metastáticos. ([Kim et al., 2002](#)).

[CANCER RESEARCH 62, 3981-3986, July 1, 2002]

### *Advances in Brief*

---

#### **Prospective Molecular Profiling of Melanoma Metastases Suggests Classifiers of Immune Responsiveness**

Ena Wang, Lance D. Miller, Galen A. Ohnmacht, Simone Mocellin, Ainhua Perez-Diez, David Petersen, Yingdong Zhao, Richard Simon, John I. Powell, Esther Asaki, H. Richard Alexander, Paul H. Duray, Meenhard Herlyn, Nicholas P. Restifo, Edison T. Liu, Steven A. Rosenberg, and Francesco M. Marincola<sup>1</sup>

- Caracterizar diferencias transcripcionales entre metástasis que respondían a inmunoterapia frente a aquellas que no.
- Identificaron pequeño número de genes asociados a la regulación inmune cuya expresión cambiaba significativamente en tratamiento.

## Supervivencia

### *Human Cancer Biology*

---

#### ***DDEF1* Is Located in an Amplified Region of Chromosome 8q and Is Overexpressed in Uveal Melanoma**

Justis P. Ehlers, Lori Worley, Michael D. Onken, and J. William Harbour

Estudio de supervivencia en pacientes con melanoma ocular se identificó un gen NBS1 reparador de la doble cadena de ADN con valor pronóstico validado con IHQ en una muestra de mayor tamaño

## Supervivencia

### **Gene Expression Profiling of Primary Cutaneous Melanoma and Clinical Outcome**

*Véronique Winnepenninckx, Vladimir Lazar, Stefan Michiels, Philippe Dessen, Marguerite Stas, Soledad R. Alonso, Marie-Françoise Avril, Pablo L. Ortiz Romero, Thomas Robert, Ovidiu Balacescu, Alexander M. M. Eggermont, Gilbert Lenoir, Alain Sarasin, Thomas Tursz, Joost J. van den Oord, Alain Spatz*

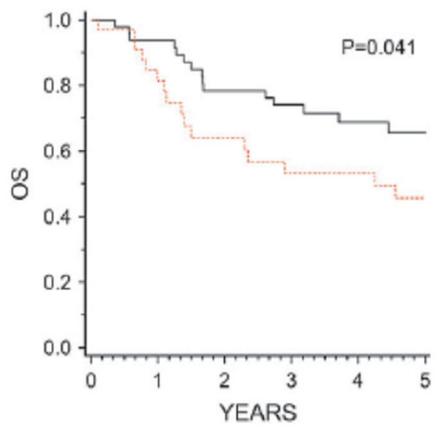
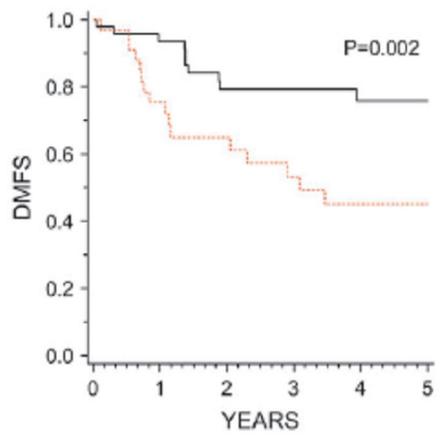
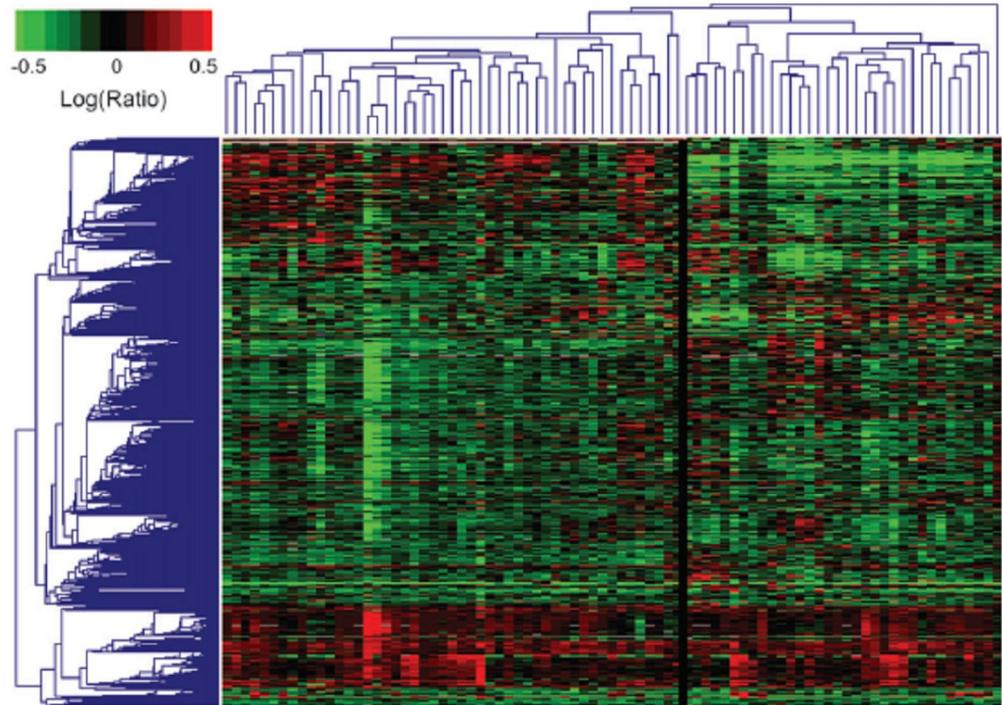
*On behalf of the Melanoma Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer*

Journal of the National Cancer Institute, Vol. 98, No. 7, April 5, 2006

-82 tumores primarios

-254 genes capaces de separar muestras basándose en la supervivencia libre de metástasis.

-Factores relacionados con la replicación del ADN y procesos de división celular



Patients at risk

Left cluster  
Right Cluster

47	41	33	32	21	16
33	23	17	13	11	10

Patients at risk

Left cluster  
Right Cluster

47	43	36	33	22	16
33	25	18	15	15	12



# Supervivencia

NATURE | VOL 406 | 3 AUGUST 2000 | www.nature.com

## **letters to nature**

.....

### **Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling**

**M. Bittner<sup>\*†</sup>, P. Meltzer<sup>\*†</sup>, Y. Chen<sup>\*</sup>, Y. Jiang<sup>\*</sup>, E. Seftor<sup>‡</sup>, M. Hendrix<sup>‡</sup>,  
M. Radmacher<sup>§</sup>, R. Simon<sup>§</sup>, Z. Yakhini<sup>||</sup>, A. Ben-Dor<sup>||¶</sup>, N. Sampas<sup>||</sup>,  
E. Dougherty<sup>#</sup>, E. Wang<sup>\*</sup>, F. Marincola<sup>\*</sup>, C. Gooden<sup>\*</sup>, J. Lueders<sup>\*</sup>,  
A. Glatfelter<sup>\*</sup>, P. Pollock<sup>\*\*</sup>, J. Capten<sup>\*</sup>, E. Gillanders<sup>\*</sup>, D. Leja<sup>\*</sup>,  
K. Dietrich<sup>\*</sup>, C. Beaudry<sup>††</sup>, M. Berens<sup>††</sup>, D. Alberts<sup>‡‡</sup>, V. Sondak<sup>§§</sup>,  
N. Hayward<sup>\*\*</sup> & J. Trent<sup>\*</sup>**



# Supervivencia

Copyright © 2006 The Authors

doi: 10.1111/j.1600-0749.2006.00322.x

Journal compilation © 2006 Blackwell Munksgaard

## Metastatic potential of melanomas defined by specific gene expression profiles with no BRAF signature

Keith S. Hoek<sup>1\*</sup>, Natalie C. Schlegel<sup>1</sup>, Patricia Brafford<sup>2</sup>, Antje Sucker<sup>3</sup>, Selma Ugurel<sup>3</sup>, Rajiv Kumar<sup>4</sup>, Barbara L. Weber<sup>5</sup>, Katherine L. Nathanson<sup>6</sup>, David J. Phillips<sup>7</sup>, Meenhard Herlyn<sup>2</sup>, Dirk Schadendorf<sup>3</sup> and Reinhard Dummer<sup>1</sup>

-líneas celulares (en vez de biopsias) no se encontraron listas de genes que correlacionaran con el pronóstico.

-Las células sacadas del contexto in vivo en cultivo celular podrían perder información que les concedería un potencial pronóstico (Hoek, 2007).

## Supervivencia

### Use of gene expression profile and mitotic index of metastatic melanoma lesions as an adjunct to TNM staging in predicting patient survival

D. Bogunovic, d. o'Neill, I. Belitskay-Levy, V. Vacic, S. Adams, F. Darvishian, A. Pavlick, J. Zavadil, I. Osman and N. Bhardwaj

Journal of Clinical Oncology, 2009 ASCO Vol 27, No 15S

-Perfil genético de 44 metástasis de melanoma (38 pacientes)

(median follow-up 20 mo. after surgery)

-300 genes asociados con supervivencia:

-Respuesta inmune (ICOS, CD3d, ZAP70, TRAT1, TARP, GZMK, LCK, CD2, CXCL13, CCL19, CCR7, VCAM1..)

-Proliferación celular (PDE4D, CDK2, GREF1, NUSAP1, SPC24 etc)

>Supervivencia relacionada con sobreexpresión genes relacionados con respuesta inmune

Menor supervivencia relacionada con sobreexpresión de genes de proliferación

-Índice mitótico (MI) (HR 2.65 p=0.003) > GEP (HR=2.71, p=0.05)

## Mutación V600 en B-Raf



Oncogene (2004) 23, 4060–4067

© 2004 Nature Publishing Group All rights reserved 0950-9232/04 \$25.00

[www.nature.com/onc](http://www.nature.com/onc)

### Microarray expression profiling in melanoma reveals a *BRAF* mutation signature

Sandra Pavey<sup>1</sup>, Peter Johansson<sup>2</sup>, Leisl Packer<sup>1</sup>, Jennifer Taylor<sup>3</sup>, Mitchell Stark<sup>1</sup>, Pamela M Pollock<sup>4</sup>, Graeme J Walker<sup>1</sup>, Glen M Boyle<sup>1</sup>, Ursula Harper<sup>4</sup>, Sarah-Jane Cozzi<sup>1</sup>, Katherine Hansen<sup>4</sup>, Laura Yudt<sup>4</sup>, Chris Schmidt<sup>1</sup>, Peter Hersey<sup>5</sup>, Kay AO Ellem<sup>1</sup>, Michael GE O'Rourke<sup>6</sup>, Peter G Parsons<sup>1</sup>, Paul Meltzer<sup>4</sup>, Markus Ringnér<sup>2</sup> and Nicholas K Hayward<sup>\*.1</sup>

-61 líneas celulares en las cuales el 42 (69%) portaban la mutación BRAFV600E y otros 7 (11%) tenían mutación en NRAS.

-83 genes eran capaces de separar los mutantes BRAF de las líneas wild type.

## Mutación V600 en B-Raf

**Effect of common B-RAF and N-RAS mutations on global gene expression in melanoma cell lines.**

*Bloethner et al.*

*Carcinogenesis 26, 1224-1232 (2005)*

-Utilizaron un pequeño número de líneas celulares, mutantes BRAF, NRAS y wild type y estudiaron la correlación entre la expresión de 22000 transcritos con 3 software diferentes.

-Encontraron 61 genes que diferencialmente expresaban muestras con mutación BRAFV600E.

## Mutación V600 en B-Raf

***SPRY2 is an inhibitor of the ras/extracellular signal-regulated kinase pathway in melanocytes and melanoma cells with wild-type BRAF but not with the V599E mutant.***

**Tsavachidou et al., 2004**

***Cancer Res., 64, 5556–5559.***

-21 líneas celulares, 16 con mutación en BRAF y cinco wild type.

-Se centraron únicamente en 36 genes codificantes para la vía de señalización de las MAPKs

## Mutación V600 en B-Raf

Pigment Cell Res. 20; 466-484

REVIEW

### DNA microarray analyses of melanoma gene expression: a decade in the mines

Keith S. Hoek\*

- Test de corrección múltiple de los tres trabajos anteriores.
- 16 genes estaban diferencialmente expresados en BRAF mutados frente a los wild type. Ninguno de los cuales había sido detectado por Pavey y Bloethner.
- Analizando otros 3 sets de datos adicionales ([Hoek et al., 2006](#)) se confirmó que ningún patrón de expresión estaba consistentemente ligado al estatus de mutación de BRAF.
- Ninguna lista de genes podía ser utilizada para distinguir el cluster de los BRAF mutados de los wild type cuando se aplicaba fuera de su grupo de muestras estudiado.

## Mutación V600 en B-Raf

Pigment Cell Res. 20; 466-484

REVIEW

### **DNA microarray analyses of melanoma gene expression: a decade in the mines**

Keith S. Hoek\*

-Esto no quiere decir que no haya relación entre BRAFV600E y la expresión de genes, sino que la relación es muy probablemente modulada por factores que no se han tenido totalmente en cuenta a la hora de realizar los experimentos y establecer el link.

Hasta que esto no se tengan en cuenta, la precisión de predecir el estatus de BRAF mediante un perfil de expresión genética permanecerá dependiente del grupo de muestras.

## Mutación V600 en B-Raf

### **Gene expression signature associated with *BRAF* mutations in human primary cutaneous melanomas**

Caroline Kannengiessera, et al.

**Molecular Oncology** Volumen 1, Issue 4, Pages 425-430 (April 2008)

- 69 melanomas primarios en los que se estudió mutación B-RAF y NRAS.
- 209 genes fueron asociados significativamente ( $P < 0.001$ ) con la mutación B-RAF.
- Entre los genes que mejor diferenciaban las muestras mutadas de las wild type, genes implicados en la respuesta inmune como MAGE-D2, CD63 y HSP70.

## Estudios basados en tratamientos y agentes

Tratamiento/Agente	Fuente
5-aza-2'deoxycytidine demethylation	Gallagher et al., 2005; Karpf et al., 2004; Mori et al., 2005; Muthusamy et al., 2006; Van Der Velden et al., 2003
agouti signal protein	Voisey et al., 2003
aloe-emodin	Lin et al., 2005
activating enhancer-binding protein2	Suyama et al., 2002
arbutin	Cheng et al., 2007
diterpine ester	Cozzi et al., 2006
E2F transcription factor 1	Jamshidi-Parsian et al., 2005
homeobox D3	Okubo et al., 2002
hypoxia	Kunz et al., 2003
interferon-induced ubiquitin-like modifier	Padovan et al., 2002
monoclonal antibody therapy	Hafner et al., 2005
promyelocytic leukemia zinc finger protein	Felicetti et al., 2004; Shiraishi et al 2007



## Estudios basados en tratamientos y agentes

Tratamiento/Agente	Fuente
tissue factor	Wang et al., 2004
transforming growth factor $\beta$	Berking et al., 2001; Foser et al 2006
vascular-endothelial growth factor VEGF	Minami et al., 2004
UV light	Jean et al., 2001; Valery et al., 2001; Yang et al., 2006
....	

## Estudios basados en tratamientos y agentes

-Rothhammer et al. 2007 en la que se reportaban 69 genes transcripcionalmente afectados por la metilación del AND en melanoma.

-Gallagher et al., 2005, Muthusamy et al., 2006 y Van Der Velden et al., 2003 que en conjunto identificaban 49 de estos genes.

Usaron DNA microarrays para establecer cambios producidos por el tratamiento de líneas celulares con 5-azadeoxycytidina.

-Karpf et al., 2004; Mori et al., 2005 efecto de la metilación en la expresión de genes en melanoma.

¡¡Estudios con un mismo propósito y casi estrategias metodológicas idénticas se mostraron inconsistentes!!

## Estudios basados en tratamientos y agentes

**Expression of defined genes identified by pretreatment tumor profiling: Association with Clinical responses to the GSK MAGE-A3 immunotherapeutic in metastatic melanoma patients (EORTC 16032-18031)**

**J Louahed et al.**

*J.Clin. Oncol* 26:2008 (May suppl; abstr 9045 ASCO 2008)

- Fase II para identificar marcadores predictivos a respuesta a Inmunoterapia en pacientes M1a MAGE-A3 + estadios III o IV tratados con ASCI (Antigen-Specific Cancer Immunotherapeutic) MAGE-A3.
- GEP en biopsias antes del tratamiento.
- Se identificó un perfil molecular y el beneficio clínico (en 2 OR), validado en 30 pacientes.
- Perfil genético inmune presente en el microambiente del tumor antes de la inmunización asociado a la respuesta al tratamiento ASCI MAGE-A3.

## Algunas guidelines para el estudio de Microarrays de DNA

### -DISEÑO EXPERIMENTAL

Las réplicas biológicas son esenciales, un mínimo de cinco réplicas por clase definida. Las réplicas técnicas no son un sustituto aceptable.

### -PREPROCESADO

Métodos de análisis de imagen (distinguir las intensidades del foreground de las del background y los artefactos), normalización (control del sesgo entre los diferentes microarrays) y transformación de los datos deben ser documentados cuidadosamente.

### -INFERENCIA

Identificación de genes expresados diferencialmente.

Mediante procesamiento de test simultáneos “multiple testing procedures”

Es importante determinar al menos errores de tipo I (falsos positivos)

# Algunas guidelines para el estudio de Microarrays de DNA

## -CLASIFICACIÓN

**No supervisada:** No se establece ninguna clase a priori. No es aceptable para apoyar la validez del estudio, la reproducibilidad es baja y raramente contribuye a identificar expresión diferencial entre las diferente clases de muestras. Es de las más utilizadas

El investigador tiene asegurado un clustering o agrupamiento de genes sin importar el tamaño de la muestra, calidad de los datos, diseño del experimento o cualquier otra variable biológica que este asociada con el agrupamiento.

**Supervisada:** clases definidas de antemano pero se debe realizar también cross-validation de los datos en un set de muestras independientes.

## Algunas guidelines para el estudio de Microarrays de DNA

### -VALIDACIÓN

Si se quieren confirmar los patrones de expresión genética con otro método se debe utilizar además un set de muestras diferente ya que una confirmación usando el mismo set de muestras para obtener unos datos no es suficiente